Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 48, No 3, Autumn 2017 (517-526)
DOI: 10.22059/ijhs.2017.201336.946

علوم باغبانی ایران
دورۀ ۴۸، شمارۀ ۳، پاییز ۱۳۹۶ (ص ۵۲۶-۵۱۷)

تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین و نفتالین استیک اسید بر باززایی مستقیم ریزنمونه‌های چهار بوم‌جور موسیر (*Allium hirtifolium*) درشرایط درون شیشه‌ای

نسرین فرهادی[۱]، جابر پناهنده[۲*]، علیرضا مطلبی‌آذر[۲] و سعیده علیزاده سالطه[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، دانشیار و استادیار، دانشکدۀ کشاورزی، دانشگاه تبریز
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۲/۲٤ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۱٤)

چکیده

در این پژوهش تأثیر ترکیبی از غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینو پورین (۰، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید (۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) بر پیازچه‌زایی مستقیم و غیرمستقیم ریزنمونه‌های پیاز یعنی سوخ چهار بوم‌جور (اکوتیپ) موسیر (لرستان، زنجان، سنندج و اراک) در محیط کشت MS بررسی شد. نتایج نشان داد که تیمارهای مختلف هورمونی و بوم‌جور، زمان و درصد سوخک (Bulblet)زایی، شمار، طول و وزن سوخک‌های باززایی‌شدۀ موسیر را تحت تأثیر قرار دادند. استفاده از بنزیل آمینو پورین (BAP) و نفتالین استیک اسید (NAA) باعث تسریع در سوخک‌زایی شد و در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، بالاترین درصد سوخک‌زایی مستقیم (۸۲/۲٦٪) با میانگین ۱٤/۱۳ عدد بیشترین شمار سوخک به دست آمد. سوخ‌های بوم‌جور اراک، درصد بالایی از سوخک‌زایی (٦٤/٦۱٪) و شمار بیشتری سوخک باززایی‌شده از هر ریز نمونه (۱۰/۳۳) را نشان دادند. پینه (کالوس)زایی تنها در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (۷۳/۰۵ درصد) و تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (۲۳/٦۷ درصد) مشاهده شد. ریشه‌زایی در محیط کشت بدون هورمون اکسین در زمان کمتری در مقایسه با دیگر تیمارها صورت گرفت و با درصد بالایی از ریشه‌زایی (۷۹/۹۲٪) نیزهمراه بود. بنابر نتایج به‌دست‌آمده کشت سوخ‌های موسیر منطقۀ اراک در محیط کشت دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA برای تولید انبوه سوخک‌های درون شیشه‌ای موسیر توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اکسین، بوم‌جور، سوخک‌زایی، سیتوکینین، موسیر.

The effect of different concentrations of benzylaminopurine and naphthalene acetic acid on direct regeneration of explants of four Persian shallot (*Allium hirtifolium*) ecotypes at *in vitro* condition

Nasrin Farhadi[1], Jaber Panahandeh[2*], Alireza Motalebi Azar[2] and Saeideh Alizadeh Saleteh[3]
1, 2, 3. Ph. D. Candidate, Associate Professor and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
(Received: Mar. 14, 2016 - Accepted: May 3, 2016)

ABSTRACT

In the present study, the effects of different concentrations of benzylamino purine (0, 1, 1.5 and 2 mg l^{-1}) and *naphthalene acetic acid* (0, 0.25, 0.5 and 1 mg l^{1-}) on direct and indirect bulblet rejected set by user of basal plate explants of four ecotypes of Psersian shallot (Lorestan, Zanjan, Sanandaj and Arak) on MS medium were investigated. The results showed that different hormonal treatments and ecotypes affected the time and percent of bulblet regeneration as well as the number, length and weight of regenerated bulblets. Moreover, direct and indirect regeneration of bulblet were different among the treatments. Application of BAP and NAA accelerated the bulblet regeneration of Persian shallot explants and the highest bulblet regeneration (82.26%) and maximum bulbllets number (14.13) were obtained by 1.5 mg g^{-1} BAP with 0.5 mg l^{-1} NAA. The explants of Arak ecotype showed the highest percent of bulblet regeneration (64.61%) and bulblets number (10.33) per each explant. The callus induction was only observed in 2 mg l^{-1} BAP+1 mg l^{-1} NAA (75.05%) and 1 mg l^{-1} BAP+0.5 mg l^{-1} NAA (23.67%) treatments. The rooting of bulblet in all the studied ecotypes was obtained in hormone-free medium in the shortest time (25 after culture) in comparison with other treatments that was also accompanied with the highest percent of rooting (79.917%). According to the results the culture of Arak ecotype bulbs in medium with 1.5 mg g^{-1} BAP and 0.5 mg l^{-1} NAA is advisable for *invitro* bulblets production of Persian shallot.

Keywords: Auxin, bulblet regenerstion, cytokinin, ectype, mooseer.

* Corresponding author E-mail: panahandeh@tabrizu.ac.ir

مقدمه

روند رو به رشد درخواست و نیاز بازارهای جهانی، توجه بیشتر درزمینهٔ شناسایی و حفظ گیاهان دارویی به‌ویژه اهلی‌سازی (زراعی کردن) آن‌ها را پرهیزناپذیر ساخته است. تاکنون فعالیت‌های مختلفی درزمینهٔ اصلاح و افزایش گونه‌های مختلف گیاهان دارویی انجام شده است، اما هنوز بعضی از این گیاهان مهم، به میزان مورد نیاز کشت نمی‌شوند و همچنان از رویشگاه‌های طبیعی گردآوری می‌شوند. ایران با وسعت زیاد و آب‌وهوای متنوع جز مراکز مهم انتشار و پراکنش بسیاری از گونه‌های گیاهی است و شناسایی و حفاظت، این منابع ژنتیکی امری ضروری است (Omidbaigi, 2009). گیاهان بومی کشورمان به عنوان ذخایر ژنتیکی ارزشمندی هستند که امروزه متأسفانه به علت برداشت نادرست و بی‌رویه، بسیاری از آن‌ها در خطر انقراض قرار گرفته‌اند. بنابراین با انجام تحقیقات درزمینهٔ شناسایی و افزایش این گیاهان باید زمینهٔ حفظ و کشت گستردهٔ آن‌ها را فراهم آورد تا بتوان از این راه نیاز صنایع داخلی به مواد اولیهٔ این گیاهان را تأمین کرد.

موسیر با نام علمی *Allium hirtifolium* Boiss. گیاهی چندساله از خانوادهٔ Liliaceae است که از جمله گیاهان بومی و با ارزش ایران است و به‌صورت وحشی در مراتع و دامنهٔ رشته‌کوه زاگرس می‌روید (Rechinger, 1984; Ghahramani-Majd *et al*., 2010). موسیر ارزش غذایی بالایی دارد که قسمت‌های خوراکی آن برگ‌ها و سوخ (bulb) بوده و در بسیاری از مناطق کشور به‌صورت خشک‌شده و یا تازه به‌عنوان سبزی استفاده می‌شود (Ebrahimi *et al*., 2008). این گیاه غنی از املاح کانی، ویتامین‌ها و اسیدهای چرب ضروری است (Ebrahimi *et al*., 2009) و به سبب داشتن میزان زیادی از ترکیب‌های گوگردی خواص پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) بالایی دارد (Mortazaea *et al*., 2014). موسیر همچنین از نظر پزشکی جزء گیاهان دارویی مهم بوده وبرای کاهش فشارخون، درمان رماتیسم، بیماری قند (دیابت) و ترمیم زخم‌های سطحی استفاده می‌شود (Barile *et al*., 2005).

امروزه به دلیل بهره‌برداری‌های بی‌رویه و برداشت نادرست در بسیاری از مراتع، تراکم گیاه موسیر در واحد سطح به‌شدت پایین آمده است و جزء گونه‌های درخطر انقراض قرار دارد (Ghahramani-Majd *et al*., 2012). از این‌رو انجام تحقیقاتی در راستای حفظ و گسترش کشت این گیاه ارزشمند ضروری است. موسیر به‌طورمعمول با سوخک (bulblet) افزایش می‌شود، اما سرعت افزایش از این راه بسیار پایین بوده و مقرون‌به‌صرفه نیست. از سوی دیگر تولید سوخ از راه بذر با مشکل جوانه نزدن و یا جوانه‌زنی غیریکنواخت روبه‌رو است. نتایج به‌دست‌آمده از بررسی جوانه‌زنی بذر موسیر نشان می‌دهد، بذرهای این گیاه خواب فیزیکی و فیزیولوژیکی دارند (Ebrahimi *et al*., 2014; Dashti *et al*., 2012). از سوی دیگر بذر موسیر درصورت جوانه‌زنی به ۳-۲ سال نیاز دارد تا ازنظر اقتصادی سوخ قابل‌برداشت تولیدکند (Asadian *et al*., 2001). وجود تنگناهای یادشده در افزایش این گیاه انجام بررسی‌های اصلاحی و ژنتیکی در مورد موسیر را با محدودیت روبه‌رو کرده است.

در بیشتر گونه‌های متعلق به جنس *آلیوم* افزایش از روش کشت بافت می‌تواند مواد گیاهی کافی برای انجام برنامه‌های اهلی‌سازی و اصلاح این گیاهان را فراهم آورد (Mukhopadhyay *et al*., 2005). میزان موفقیت در کشت بافت *آلیوم*ها به عامل‌های مختلفی مانند نوع ریز نمونه، ترکیب محیط کشت، نوع و میزان تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده بستگی دارد (Hailekidan *et al*., 2013). باززایی موفقیت‌آمیز از راه کشت ریز نمونه‌های مختلف مانند نوک شاخه، طبق سوخ، قسمت‌های مختلف گل و ریشه در گونه‌های مختلف جنس *آلیوم* گزارش شده است (Luciani *et al*., 2006; Gantait *et al*., 2010). استفاده از طبق سوخ در سیر با باززایی و رشد قابل توجه سوخک‌های درون‌شیشه‌ای همراه بود و بسیاری از محققان استفاده از ریزنمونه‌های دارای طبق سوخ را برای تولید سوخک از ریزنمونه‌های گونه‌های مختلف جنس *آلیوم* توصیه کرده‌اند (Ayabe & Sumi 1998; Luciani *et al*., 2006). نوع و میزان استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بسته به نوع بافت، میزان هورمون‌های درون‌زا و هدف از کشت درون‌شیشه‌ای در گونه‌های مختلف،

متفاوت است (Zhang & Li, 2006). اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها نقش مهمی در القای باززایی در بسیاری از گونه‌های گیاهان دارند (Zhang & Li, 2006; Nagasawa & Finer, 1988) و استفاده از بنزیل‌آمینوپورین[1] (BAP) و نفتالین استیک اسید[2] (NAA) در محیط کشت برای باززایی سوخک از ریزنمونه‌های مختلف جنس *آلیوم* گزارش شده است (Khalid *et al*., 2001; Hailekidan *et al*., 2013). Xu *et al*. (2008) استفاده از بنزیل‌آدنین[3] (BA)و NAA را برای تسریع در تشکیل سوخک ازطبق سوخ گونهٔ *Allium chinense* در شرایط درون شیشه‌ای مثبت گزارش کرده‌اند. Ghahramani-Majd *et al*. (2010) با استفاده از طبق سوخ و کاربرد بنزیل آدنین به میزان دو برابر غلظت نفتالین استیک اسید موفق به تولید سوخک درون شیشه‌ای موسیر شدند. استفاده از ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA موجب تسریع در آغازش سوخک‌زایی در ریزنمونه‌های سیر شد (Roksana *et al*., 2002).

باتوجه به اینکه روش افزایش و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد برای گیاهان مختلف متفاوت است، این تحقیق به‌منظور بهینه ساختن روش افزایش چند بوم‌جور (اکوتیپ) موسیر ایرانی در شرایط کشت بافت صورت پذیرفت. در این راستا، تأثیر ترکیبی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین (NAA) و سیتوکینین (BAP) بر سوخک‌زایی مستقیم و غیرمستقیم موسیر بررسی و همچنین ریشه‌زایی سوخک‌های تشکیل‌شدهٔ تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نفتالین استیک اسید (NAA) وایندول بوتریک اسید[4] (IBA) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق در فصل برداشت (سال ۱۳۹۳)، سوخ‌های موسیر از چهار رویشگاه طبیعی این گیاه در استان‌های لرستان، زنجان، سنندج و اراک گردآوری شدند. مواد گیاهی پس از برداشت به آزمایشگاه منتقل و سوخ‌ها به مدت دو ماه برای رفع دورهٔ خواب در دمای ۵ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند.

پس از برطرف شدن دورهٔ خواب سوخ‌ها و حذف فلس‌های رویی به مدت دو ساعت زیر آب جاری قرارداده شدند. پس از آبکشی سوخ‌ها با آب مقطر، ادامهٔ مراحل ضدعفونی در زیر هود لامینار انجام شد. در آغاز سوخ‌ها را به مدت پنج دقیقه در الکل ۷۰درصد غوطه‌ور کرده و پس از شستشو با آب مقطر سترون (استریل)، به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد ضدعفونی شدند. در پایان سوخ‌ها سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. سوخ‌ها به صورت عمودی به قطعه‌های واجد ۲ میلی‌متر طبق سوخ تقسیم و در ظرف‌های شیشه‌ای به ابعاد ۷×۱۰ سانتی‌متر دارای ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS جامد (Murashige & Skoog, 1962) کشت شدند. محیط کشت MS مورد استفاده در این بررسی، ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصدآگار و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول به همراه نسبت‌های مختلف BAP (۰، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) داشت. نمونه‌های کشت‌شده به ژرمیناتور در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجهٔ سلسیوس منتقل شدند. pH محیط‌های کشت پیش از اتوکلاو، روی ۵/۷±۰/۱ تنظیم شد و ضدعفونی محیط‌های کشت توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱درجهٔ سلسیوس با فشار ۱/۵ کیلوگرم در مترمربع به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت.

ریزنمونه‌ها سه مرتبه به فاصله‌های زمانی ۴ هفته در محیط کشت تازه با همان ترکیب اولیه واکشت شدند. در ریزنمونه‌های هر چهار بوم‌جور کشت‌شده در محیط‌های دارای غلظت‌های مختلف هورمونی، شمار روز پس از کشت تا ظاهر شدن نخستین سوخک، درصد سوخک‌زایی نمونه‌های کشت‌شده در هر تیمار، شمار سوخک‌های تولیدشده در هر ریزنمونه، طول و وزن سوخک‌های تولیدشده در هر ریزنمونه یادداشت‌برداری شد. در شرایط سترون از هر تکرار به‌طور تصادفی چهار سوخک انتخاب و پس از خارج کردن از محیط کشت طول و وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد. برخی از تیمارها همراه با تشکیل پینه (کالوس) بودند که در بازکشت اول پینه‌ها

1. 6- Benzyl Amino Purine (BAP)
2. 1-NaphthaleneAcetic Acid (NAA)
3. 6-Benzyl Adenine (BA)
4. Indole Butyric Acid (IBA)

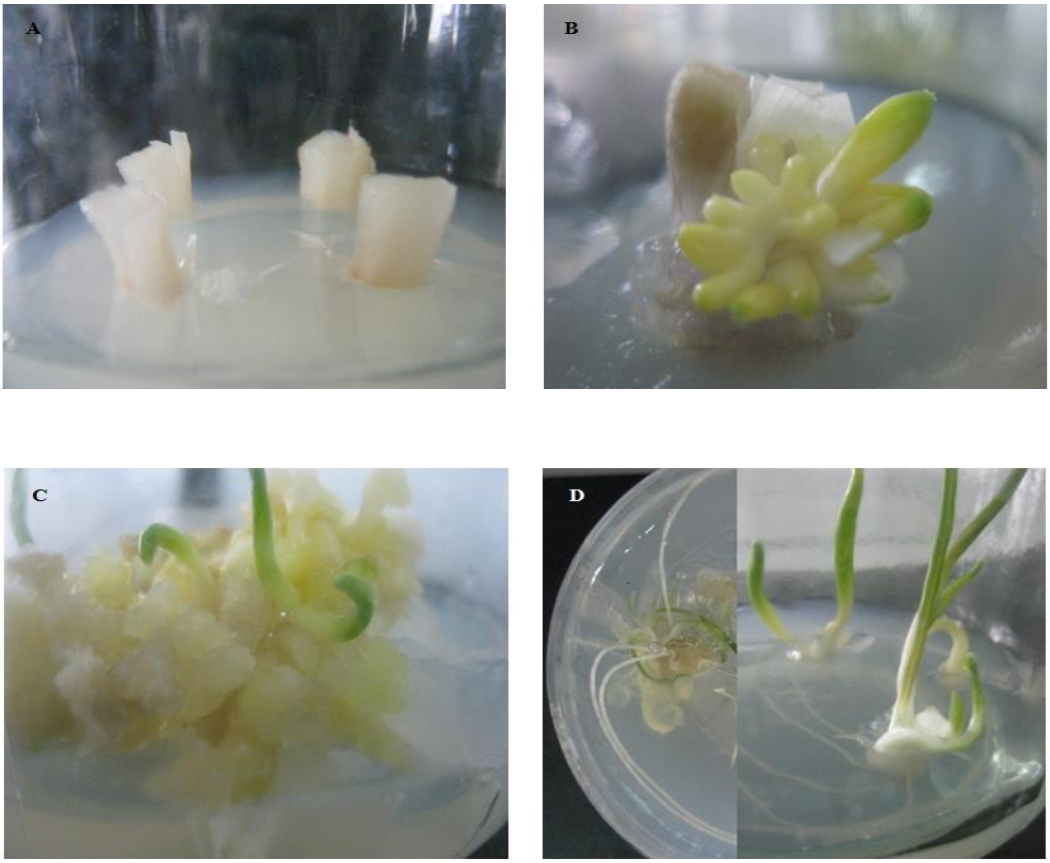
جدا و درمحیط‌های کشت با ترکیب اولیه و تیمارهای هورمونی یادشده برای سوخک‌زایی کشت شدند و شمار سوخک تولیدشده از پینه در هر تیمار به‌عنوان سوخک‌زایی غیرمستقیم ثبت شد.

سوخک‌های باززایی‌شده برای ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ایندول بوتیریک اسید (۰، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید (۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. پس از ثبت زمان لازم برای ریشه‌زایی سوخک‌های موسیر، شش هفته پس از کشت، درصد ریشه‌زایی، شمار و طول ریشه‌ها در هریک از تیمارها و بوم‌جورهای مختلف یادداشت‌برداری شد.

این تحقیق به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تکرار و در هر تکرار با چهار ریزنمونه اجرا شد. مقایسهٔ میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد توسط نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش تأثیر ترکیبی دو تنظیم‌کنندهٔ رشد BAP و NAA بر باززایی مستقیم و غیرمستقیم سوخک‌ها از ریزنمونه‌های کشت‌شدهٔ چهار بوم‌جور موسیر بررسی و همچنین میزان ریشه‌زایی سوخک‌های موسیر تحت تأثیر دو تنظیم‌کنندهٔ رشد اکسینی ارزیابی شد. شکل ۱ مراحل مختلف سوخک و ریشه‌زایی ریزنمونه‌های موسیر را نشان می‌دهد.



شکل ۱. سوخک‌زایی و ریشه‌زایی ریزنمونه‌های کشت‌شدهٔ موسیر (*Allium hirtifolim*) (بوم‌جور اراک): الف) کشت ریزنمونه‌های دارای ۲ میلی‌متر طبق سوخ، ب) سوخک‌زایی مستقیم، ج) سوخک‌زایی غیرمستقیم و د) ریشه‌زایی سوخک‌ها.

Figure 1. Bulblet regeneration and rooting of *Allium hirtifolim* explants (Arak ecotype): A) Basal plate cultured on MS medium, B) direct bulbleting, C) indirect bulblet regeneration, D) rooting of regenerated bulblet.

نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که تیمارهای مختلف هورمونی و بوم‌جور زمان و درصد سوخک‌زایی، شمار، ارتفاع و وزن سوخک‌های باززایی‌شدهٔ موسیر را در شرایط درون شیشه‌ای تحت تأثیر قرار دادند. همچنین میزان باززایی مستقیم و غیرمستقیم سوخک‌ها در بین تیمارهای مختلف متفاوت بود. تیمارهای مختلف هورمونی شمار روز از زمان کشت ریز نمونه‌ها تا ظهور سوخک‌ها را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار دادند ولی تأثیر بوم‌جور بر این صفت معنی‌دار نبود. کاربرد ترکیبی BAP و NAA در محیط کشت موجب تسریع در سوخک‌زایی ریزنمونه‌های موسیر شد (جدول ۱). استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد موجب تسریع در تشکیل سوخک‌های به‌دست‌آمده از ریزنمونه‌های کشت‌شده در گونه‌های مختلف جنس *آلیوم* می‌شود (Xu *et al*., 2008). درکشت‌های درون‌شیشه‌ای *آلیوم‌ها*، اکسین‌ها به‌طورمعمول به‌منظور تحریک تقسیم یاخته‌ای و سیتوکینین‌ها برای تقسیم یاخته‌ای وتمایزیابی سوخک‌ها از بافت‌های گیاهی و پینه نقش دارند (Zhang & Li, 2006; Nagasawa & Finer, 1988). در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌طور میانگین پس از ۳۸ روز نخستین سوخک‌های باززایی‌شده از ریزنمونه‌ها مشاهده شد و در محیط بدون هورمون بیشترین شمار روز تا زمان سوخک‌زایی (۵۷) ثبت شد. تشکیل سوخک در شرایط درون شیشه‌ای به غلظت BAP و NAA بستگی دارد (Khalid *et al*., 2001) و کاربرد این ترکیب‌ها باعث افزایش سوخک‌زایی در *Allium cepa* var. Group *aggregatum* شد (Hailekidan *et al*., 2013).

درصد و شمار سوخک‌هایی که به‌طور مستقیم از هر ریزنمونه تشکیل شدند، به‌صورت معنی‌داری تحت تأثیر محیط و بوم‌جور قرار گرفتند. محیط کشت شاهد (بدون هورمون) با کمترین درصد القای سوخک (۳۶/۲۶٪) و شمار سوخک در هر ریز نمونه (۳/۱۳) همراه بود و استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد سبب افزایش معنی‌داری بر میزان باززایی ریزنمونه‌ها شد به‌طوری‌که در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بالاترین درصد سوخک‌زایی (۸۲/۲۶٪) و بیشترین شمار سوخک به‌طور میانگین ۱۴/۱۳ عدد در هر نمونه به دست آمد (جدول ۱). Ebrahimi *et al*. (2006) گزارش کردند، استفاده از سیتوکینین‌ها در ترکیب با اکسین‌ها در محیط کشت موجب افزایش باززایی ریزنمونه‌های درون‌شیشه‌ای می‌شود. Roksana *et al*. (2002) در محیط بدون هورمون، سوخک‌زایی در ریزنمونه‌های کشت‌شدهٔ سیر را مشاهده نکردند و گزارش کرده‌اند، برای سوخک‌زایی ریزنمونه‌های سیر استفاده از هورمون‌های رشد ضروری است. Hailekidan *et al*. (2013) در ریزنمونه‌های کشت‌شده *Alliumcepa* var *aggregatum* در محیط MS بدون استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد سوخک‌زایی را گزارش کرده‌اند اما بیشتر سوخک‌های تشکیل‌شده آلبینو بودند.

بنابر نتایج به‌دست‌آمده از این بررسی، اگرچه استفاده از BAP در ترکیب با NAA موجب افزایش سوخک‌زایی شد ولی در نسبت‌های مختلف این دو هورمون میزان باززایی سوخک‌ها تفاوت معنی‌داری با هم نشان دادند. به‌طوری که تنها غلظت‌های پایین‌تر NAA نسبت به BAP موجب افزایش معنی‌دار سوخک‌زایی در ریزنمونه‌های موسیر شد و غلظت سه برابری BAP نسبت به NAA باعث بیشترین درصد باززایی در همهٔ بوم‌جورهای مورد بررسی شد. پیشتر نیز در *A. chinensis* تعدیل تأثیر بازدارندگی NAA بر سوخک‌زایی با افزایش غلظت BA گزارش شده است (Xu *et al*., 2008).این نتایج با یافته‌های Ayabe & Sumi (1998) همخوانی دارد. آنان نیز تأثیر بازدارندگی غلظت‌های بالای NAA از تمایزیابی ریزنمونه‌های کشت‌شدهٔ سیر را گزارش کردند.

در این بررسی بوم‌جورهای مختلف تفاوت معنی‌داری از نظر میزان سوخک‌زایی نشان دادند و سوخ‌های موسیر کشت‌شده از منطقهٔ اراک به سبب داشتن درصد بالای سوخک‌زایی (۶۴/۶۱٪) و بیشترین شمار سوخک‌های تولیدی در هر ریزنمونه (۱۰/۳۳)، قابلیت بالایی برای افزایش انبوه درون شیشه‌ای موسیر دارد (جدول ۱). Roksana *et al*. (2002) نیز تفاوت واکنش نژادگان مختلف سیر در محیط پرآوری درون‌شیشه‌ای را گزارش کرده‌اند.

بنابر نتایج به‌دست‌آمده از مقایسهٔ میانگین اثر متقابل دو تیمار، هر چهار بوم‌جور مورد بررسی بالاترین درصد سوخک‌زایی و بیشترین شمار سوخک را در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA نشان دادند که بین بوم‌جورهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۲-A, B). بنابراین استفاده از این غلظت‌ها با هدف سوخک‌زایی ریزنمونه‌های موسیر در شرایط درون‌شیشه‌ای قابل توصیه است. در سیر تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA موجب تسریع در آغازش سوخک‌زایی شد (Roksana *et al*., 2002). استفاده از ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱-۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA با تولید متوسط ۱۵/۴-۱۷/۲ سوخک در هر ریز نمونه ترکیبی مناسبی از تنظیم‌کننده‌های رشد برای القای سوخک‌زایی در *Allium chinense* گزارش شده است (Xu *et al*., 2008). تفاوت در غلظت‌های مناسب BAP و NAA در گونه‌های مختلف مربوط به یک جنس، به علت تفاوت در نوع ریزنمونه و رقم استفاده شده است (Hailekidan *et al*., 2013; Xu *et al*., 2008).

در این بررسی تأثیر بوم‌جور و محیط بر طول سوخک‌های تشکیل‌شده معنی‌دار بود. مقایسهٔ میانگین اثر متقابل این دو تیمار نشان داد که بیشترین طول سوخک‌ها (۲۴/۹۳ میلی‌متر) در محیط کشت حاوی غلظت سه برابری BAP نسبت به NAA و در بوم‌جور لرستان به دست آمد (شکل ۲-C). به سبب اینکه در این تیمار هورمونی سوخک‌زایی سریع‌تر از دیگر تیمارها آغاز شد، بنابراین در پایان سه دورهٔ بازکشت انتظار می‌رود که سوخک‌های تشکیل‌شده در این محیط نسبت به دیگر تیمارها رشد بیشتری نشان دهند که نتایج به‌دست‌آمده از این بررسی نیز مؤید این مسئله است. افزون بر طول، وزن سوخک‌های ناشی از بوم‌جورهای مختلف نیز تفاوت معنی‌داری با هم داشتند. سوخک‌های به‌دست‌آمده از نمونه‌های اراک (۲۷۶/۳۳ میلی‌گرم) و سنندج (۲۶۲/۴۷ میلی‌گرم) بالاترین وزن را داشتند (جدول ۱). ریخت‌شناختی (مرفولوژی) رشد در سوخک‌های به‌دست‌آمده از ریزنمونه‌های بوم‌جورهای مورد بررسی متفاوت از یکدیگر بودند. سوخک‌های به‌دست‌آمده از ریزنمونه‌های بوم‌جور لرستان رشد طولی بیشتر ولی رشد قطری اندکی داشتند که کمترین وزن را نیز در مقایسه با سوخک‌های دیگر بوم‌جورها نشان دادند.

نسبت سیتوکینین به اکسین عامل تعیین‌کنندهٔ مهمی در اندام‌زایی ریزنمونه‌های گیاهی است که در نتایج این بررسی از نظر درصد سوخک‌زایی مستقیم و غیرمستقیم ریز نمونه‌ها این مسئله روشن بود (Xu *et al*., 2008). نسبت‌های مختلف سیتوکینین‌ها و اکسین‌ها در محیط کشت، سوخک‌زایی در ریزنمونه‌های جنس *آلیوم* را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Mehrabi & Fazeli-Nasab, 2012). در بسیاری از گونه‌ها از جمله *آلیوم‌ها*، تأثیر القایی BAP در باززایی مستقیم بیشتر از NAA گزارش شده است (Guo *et al*., 2005; Xu *et al*., 2008). استفاده از غلظت‌های بالای NAA باعث القای پینه در نمونه‌های کشت‌شدهٔ موسیر شد. در همهٔ بوم‌جورهای مورد بررسی نسبت یک‌دوم غلظت NAA به BAP همراه باتشکیل پینه در ریز نمونه‌ها بود که میزان پینه‌زایی در تیمارهای ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به ترتیب ۷۳/۰۵ درصد و ۲۳/۶۷ درصد بود و بیشترین درصد پینه‌زایی در ریزنمونه‌های به‌دست‌آمده از بوم‌جورهای لرستان و زنجان مشاهده شد (جدول ۱). Ghahramani-Majd *et al*. (2010) گزارش کرده‌اند که غلظت‌های متوسط بنزیل‌آدنین در ترکیب با غلظت‌های پایین نفتالین استیک اسید بیشترین تأثیر را در تولید سوخک موسیر دارند. همچنین بنابر نظر این نویسندگان نسبت دو برابری بنزیل‌آدنین نسبت به نفتالین استیک اسید تأثیر بهتری در تولید سوخک دارد که در این بررسی این نسبت با بیشترین درصد پینه‌زایی همراه بود.

میزان باززایی پینه‌های کشت‌شده در نسبت‌های مختلف BAP و NAA نیز تفاوت معنی‌داری نشان دادند. بیشترین شمار سوخک (۷/۷۵) باززایی‌شده از پینه در محیط کشت دارای غلظت سه برابری BAP نسبت به NAA به دست آمد و کمترین شمار سوخک (۴/۵۰) در تیمار بدون هورمون (شاهد) مشاهده شد. شمار سوخک‌های تشکیل‌شده از پینه در بوم‌جورهای

مختلف به‌طور میانگین ۶/۱ عدد بود (جدول ۱). Xu *et al.* (2008) نیز تشکیل پینه در ریزنمونه‌های کشت‌شده *Allium chinense* در محیط‌های شامل ترکیبی از NAA و BA گزارش کرده‌اند. افزایش غلظت NAA میزان پینه‌زایی را در گیاهان سوخدار افزایش می‌دهد (Zaidi *et al.*, 2000). به‌طورکلی غلظت‌های کمتر اکسین‌ها درمقایسه با غلظت زیاد سیتوکینین‌ها باعث آغازش و تشکیل شاخساره می‌شود و در حالت عکس باعث تشکیل پینه و باززایی غیرمستقیم می‌شود (Kumar *et al.*, 2005).

جدول ۱. تأثیر ترکیب غلظت‌های مختلف BAP و NAA بر سوخک‌زایی مستقیم و غیرمستقیم ریز نمونه‌های چهار بوم‌جور موسیر (*Allim hirtifolium*)

Table 1. The effect of different concentrations of BAP and NAA combination on direct and indirect bulblet regeneration of explants from four *Allium hirtifolium* ecotypes

Treatments		Characters						
		Days to bulblet regeneration	Percent of direct bulbleting	Direct bulblets number in each explant	Length of bulblet (mm)	Bulblet weight (mg)	Percent of callus induction	Number of indirect bulblets
Media	MS (Control)	57[a]*	36.26[e]	3.13[e]	16.08[e]	259.58[a]	0	4.50[d]
	MS + BAP (2 mg l^{-1}) +NAA (1 mg l^{-1})	53[b]	44.51[d]	5.88[d]	18.51[d]	258.08[a]	73.05[a]	5.75[c]
	MS + BAP (1.5 mg l^{-1}) + NAA (0.5 mg l^{-1})	38[e]	82.26[a]	14.13[a]	21.24[a]	257.33[a]	0	7.75[a]
	MS + BAP (1 mg l^{-1}) + NAA (0.5 mg l^{-1})	45[c]	66.51[c]	8.38[c]	20.85[b]	258.58[a]	23.67[b]	5.75[c]
	MS + BAP (1 mg l^{-1}) + NAA (0.25 mg l^{-1})	40[d]	82.01[b]	12.13[b]	20.58[c]	258.50[a]	0	6.75[b]
Ecotype	Lorestan	47[a]	64.01[b]	8.53[c]	21.85[a]	240.93[d]	21.23[a]	6.20[ab]
	Zanjan	46[a]	64.01[b]	9.73[b]	16.84[d]	253.93[c]	21.64[a]	6.13[ab]
	Sanandaj	47[a]	56.61[c]	6.33[d]	18.10[c]	262.47[b]	19.77[b]	5.47[b]
	Arak	47[a]	64.61[a]	10.33[a]	21.03[b]	276.33[a]	14.74[c]	6.60[c]

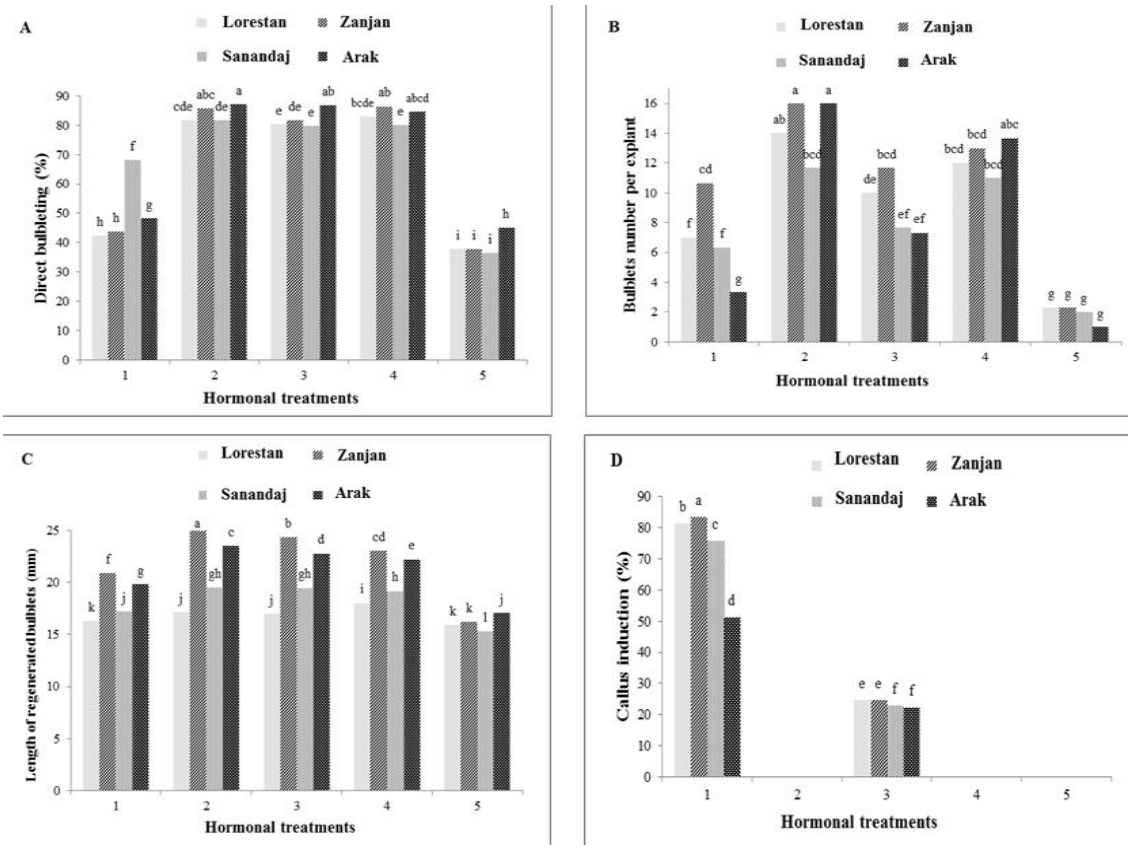
* در هر صفت و گروه مقایسه‌شده، تیمارهای با حرف‌های یکسان اختلاف معنی‌داری ندارند.

* Values followed by the same letter within a column indicating not significantly different.

اثر متقابل غلظت‌های مختلف هورمونی و بوم‌جورها در القای پینه نشان داد که بالاترین درصد پینه‌زایی در ریزنمونه‌های لرستان (۸۳/۵۳) در محیط ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (شکل D-۲). میزان باززایی مستقیم و غیرمستقیم ریز نمونه‌های متعلق به نژادگان‌های مختلف سیر نیز تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان دادند که بیانگر اهمیت نوع نژادگان مورد استفاده در واکنش به شرایط درون‌شیشه‌ای است (Asha Devi *et al.*, 2007; Barandiaran *et al.*, 1999).

سوخک‌های باززایی‌شدهٔ چهار بوم‌جور موسیر برای بررسی میزان ریشه‌زایی، در محیط کشت MS دارای غلظت‌های مختلف دو اکسین IBA و NAA کشت شدند. شمار روز تا ریشه‌زایی و درصد ریشه‌زایی در تیمارهای مختلف هورمونی تفاوت معنی‌داری با هم داشتند ولی در بوم‌جورهای مختلف این تفاوت معنی‌دار نبود. سوخک‌های کشت‌شدهٔ هر چهار بوم‌جور در همهٔ تیمارها ریشه‌دار شدند ولی در محیط کشت شاهد (بدون هورمون اکسین) در زمان کمتری (۲۵ روز پس از کشت) در مقایسه با دیگر تیمارها ریشه‌زایی مشاهده شد که با درصد بالایی از ریشه‌زایی (۷۹/۹۲٪) همراه بود. شمار ریشه در محیط‌های مختلف به‌طور میانگین ۱/۹۳ عدد در هر سوخک بود و بوم‌جور لرستان بیشترین شمار (۲/۸) ریشه‌چه در هر نمونه را داشت که تفاوت معنی‌داری با دیگر بوم‌جورها نشان داد (جدول ۲). میزان القای ریشه‌زایی عامل بسیار مهمی در استقرار ریز نمونه‌های باززایی‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای است و به‌رغم نتایج این بررسی، در بسیاری از گونه‌های گیاهی ریشه‌زایی تنها در صورت وجود یک اکسین در محیط کشت انجام می‌شود (Yasmin *et al.*, 2009). Hailekidan *et al.* (2013) گزارش کردند سوخک‌های باززایی‌شده *Allium cepa* var. *Aggregatum* بیشترین درصد ریشه‌زایی (۸۶/۶۶٪) و شمار ریشه در هر ریزنمونه (۴/۹۱) را در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA نشان دادند و در محیط کشت بدون هورمون هیچ ریشه‌زایی مشاهده نشد. ایندول بوتریک اسید مهم‌ترین اکسینی است که باعث آغازش ریشه‌های نابجا در بسیاری از گونه‌ها می‌شود (Uranbey, 2010). سوخک‌های *Allium chinense* در همهٔ سطوح NAA استفاده‌شده

پس از ۱۵ روز ریشه‌زایی نشان دادند و در سوخک‌های کشت‌شده در محیط MS دارای ۱-۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین شمار ریشه مشاهده شد (Xu *et al*., 2008). در این بررسی طول ریشه‌های تشکیل‌شده در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نشان دادند. طول ریشه تحت تأثیر میزان NAA در محیط است و سطوح پایین‌تر NAA برای طویل‌تر شدن ریشه مناسب است (Xu *et al*., 2008). در این بررسی نیز طول ریشه در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA طویل‌تر از تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. نتایج به‌دست‌آمده از مقایسهٔ میانگین نشان می‌دهد که سوخک‌های کشت‌شده در محیط MS بدون هورمون، طویل‌ترین ریشه با میانگین طول ۲۸/۷۱ میلی‌متر را داشتند و در همهٔ بوم‌جورها طول ریشه‌های به‌دست‌آمده یکسان و به‌طور میانگین ۲۳/۰۷ میلی‌متر بود (جدول ۲).



شکل ۲. اثر متقابل تیمارهای مختلف هورمونی محیط کشت و بوم‌جور بر: A) درصد سوخک‌زایی مستقیم، B) شمار سوخک‌ها در هر ریز نمونه، C) طول سوخک‌های تشکیل‌شده و D) درصد پینه‌زایی ریزنمونه‌های کشت‌شدهٔ موسیر (*Allium hirtifolium*).
تیمارهای هورمونی محیط کشت شامل: ۱) MS (شاهد)، ۲) MS + BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) + NAA (۱ میلی‌گرم در لیتر)، ۳) MS + BAP (۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) + NAA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، ۴) MS + BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) + NAA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و ۵) MS + BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) + NAA (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر).
* در هر صفت و گروه مقایسه‌شده، تیمارهای با حرف‌های یکسان اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 2. The interaction effect of different hormonal treatments and ecotype on A) percent of direct bulbleting, B) bulblets number per each explant, C) length of regenerated bulblet, and D) percent of callus induction in cultured *Allium hirtifolium* explants.
Hormonal treatments of media culture included: 1) MS (Control), 2) MS + BAP (2 mg l^{-1}) + NAA (1 mg l^{-1}), 3) MS + BAP (1.5 mg l^{-1}) + NAA (0.5 mg l^{-1}), 4) MS + BAP (1 mg l^{-1}) + NAA (0.5 mg l^{-1}) and 4) MS + BAP (1 mg l^{-1}) + NAA (0.25 mg l^{-1})
* Values followed by the same letter within a column indicating not significantly different.

جدول ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف IBA و NAA بر ریشه‌زایی سوخک‌های چهار بوم‌جور موسیر ایرانی (*Allim hirtifolium*)

Table 2. The effect of different concentration of IBA and NAA on rooting in bulblets of four ecotypes of *Allium hirtifolium*

Treatments		Characters			
		Days to rooting	Percent of rooting	Root numbers in each bulblet	Root length (mm)
Media	MS (Control)	25^{c}*	79.92^{a}	2.00^{a}	28.72^{a}
	MS + IBA (1 mg l^{-1})	31^{b}	47.97^{b}	1.92^{a}	23.53^{b}
	MS + IBA (1.5 mg l^{-1})	38^{a}	50.36^{b}	2.00^{a}	22.40^{b}
	MS + NAA (0.5 mg l^{-1})	31^{b}	22.03^{c}	1.75^{a}	22.30^{b}
	MS +NAA (1 mg l^{-1})	34^{ab}	43.88^{b}	2.00^{a}	18.42^{c}
Ecotype	Lorestan	32^{a}	47.91^{ab}	2.80^{a}	23.14^{a}
	Zanjan	34^{a}	51.53^{a}	2.00^{b}	23.52^{a}
	Sanandaj	30^{a}	45.11^{b}	0.93^{c}	22.54^{a}
	Arak	31^{a}	50.77^{ab}	2.00^{b}	23.09^{a}

* در هر صفت و گروه مقایسه‌شده، تیمارهای با حرف‌های یکسان اختلاف معنی‌داری ندارند.

* Values followed by the same letter within a column indicating not significantly different.

نتیجه‌گیری کلی

مهارت در کشت‌بافت قابلیت بالقوه‌ای را درزمینهٔ افزایش انبوه بسیاری از گونه‌های جنس *آلیوم* فراهم می‌آورد. بهینه‌سازی روش افزایش در شرایط کشت‌بافت می‌تواند برای حفظ بقا و تنوع ژنتیکی موسیر سودمند باشد. همچنین باززایی سوخک‌های موسیر از روش کشت‌بافت به عنوان فرایند ضروری و اساسی برای آغاز استفاده از روش‌های زیست‌فناوری (بیوتکنولوژی) در راستای اصلاح ژنتیکی و دستیابی به رقم‌های برتر این گیاه به‌شمار می‌آید. بنابر نتایج به‌دست‌آمده از این بررسی، استفاده از غلظت۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط کشت MS برای دستیابی به بالاترین درصد سوخک‌زایی مستقیم همراه با بیشترین شمار سوخک در ریز نمونه‌های موسیر در شرایط درون‌شیشه‌ای قابل توصیه است. همچنین در بین بوم‌جورهای مورد بررسی، سوخ‌های گردآوری‌شده از اراک با قابلیت بالای سوخک‌زایی همراه بود که می‌تواند بوم‌جور مناسب برای افزایش انبوه درون شیشه‌ای موسیر باشد.

REFERENCES

1. Asadian, G., Jalili, H., Faramarzi, J. & Babakhanlo, P. (2001). *Cultivation and domestication of mooseer (Allium hirtifolium) in Hamadan*. Natural Resources Research Center of Hamadan. 15 p. (in Farsi)
2. Asha Devi, A., Khar, A. & Lawande, K. E. (2007). Genotypic response of short day garlic (*Allium sativum* L.) accessions to shoot multiplication. *Journal of Spices* and *Aromatic Crops*, 16, 15-21.
3. Ayabe, M. & Sumi, S. (1998). Establishment of novel tissue culture method stems disc culture and practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports*, 7, 773-779.
4. Barandiaran, X., Martin, N., Rodriguez, M., Di Petro, A. & Martin, J. (1999). Genetic variability in the callogenesis and regeneration of garlic. *Plant Cell Reports*, 18, 134-137.
5. Barile, E., Capasso, R., Izzo, A. A., Lanzotti, V., Sajjadi, S. E. & Zolfaghari, B. (2005). Structure activity culture and chromosomal instability in solid callus culture.*Scientia Horticulture*, 104, 1-9.
6. Dashti, F., Ghahremani-Majd, H. & Esna-Ashari, M. (2012). Overcoming seed dormancy of mooseer (*Allium hirtifolium*) through cold stratification, gibberellic acid, and acid scarification. *Journal of Forestry Research*, 23(4), 707-710.
7. Ebrahimi, E., Mohammadi-Dehcheshmeh, M., Habashi, A. A., Ghannadha, M. R., Ghareyazie, B. & Yazdi-Samadi, B. (2006). Direct shoot regeneration from cumin, *Cuminum cyminum* L. embryo. *In Vitro Cellular* and *Developmental Biology*, 42, 455-460.
8. Ebrahimi, R., Hassandokht, M. R., Zamani, Z., Kashi, A., Roldan-Ruiz, I. & Van Bockstaele, E. (2014). Seed morphogenesis and effect of pretreatments on seed germination of Persian Shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.), an Endangered Medicinal Plant. *Horticulture*, *Environment*, and *Biotechnology*, 55(1), 19-26.
9. Ebrahimi, R., Zamani, Z. & Kashi, A. (2008). Genetic diversity evaluation of wild Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) using morphological and RAPD Markers. *Scientia Horticulturae*, 119, 345-351.
10. Ebrahimi, R., Zamani, Z., Kashi, A. & Jabbari, A. (2009).Comparison of fatty acids, mineral elements of 17 Iranian shallot landraces (*Allium hirtifolium* Boiss.). *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 5(1), 61-68. (in Farsi)

11. Gantait, S., Mandal, N. & Das, P. K. (2010). An overview on in vitro culture of genus *Allium*. *American Journal of Plant Physiology*, 5(6), 325-337.
12. Ghahramani-Majd, H., Dashti, F., Piri, K. & Yari, M. B. (2010). Bulblet production of Mooseer (*Allium hirtifolium*) in vitro condition. *Plant Production Technology*, 9(2), 65-73. (in Farsi)
13. Guo, D. P., Zhu, Z. J., Hu, X. X. & Zheng, S. J. (2005). Effect of cytokinins onshoot regeneration from cotyledon and leaf segment of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83, 123-127.
14. Hailekidan, B., Andargie, M. & Assefa, K. (2013). In vitro plantlet regeneration from the bulbs of shallot (*Allium Cepa* var. Group *Aggregatum*). *Research in Plant Sciences*, 1(2), 45-52.
15. Khalid, A., Guo, D. & Zhu, Z. J. (2001). Effect of growth regulator on plantlet regeneration and bulbing in onion (*Allium cepa L.*) in *in-vitro*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(3), 374-377.
16. Kumar, S., Kashyap, M. & Sharma, D. R. (2005).*In vitro* regeneration and bulbletgrowth from lily bulb scale explants as affected by retardants, sucrose, and andirradiance. *Biologia Plantarum*, 48, 629-632.
17. Luciani, G. F., Mary, A. K., Pellegrini, C. & Curvetto, N. R. (2006). Effects ofexplants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87, 139-143.
18. Mehrabi, A. A. & Fazeli-Nasab, B. (2012). *In vitro* culture of *Allium scorodoprasum* spp. Rotundum: callus induction, somatic embryogenesis and direct bulblet formation. International Journal of Agriculture *and Crop Sciences*, 4(1), 1-7.
19. Mortazaei, S., Rafieian, M., Ansary Samani, R. & Shahinfard, N. (2014).Comparison of phenolic compounds concentrations and antioxidant activity of eight medicinal plants.Journal *of* Rafsanjan University of *Medical Sciences*, 12, 519-530. (in Farsi)
20. Mukhopadhyay, M. J., Sengupta, P., Mukhopadhyay, S. & Sen, S. (2005) Invitro stable regeneration of onion and garlic from suspension mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*). *Plant Cell, Tissue and OrganCulture*, 83, 123-127.
21. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.*Plant Physiology*, 15, 473-497.
22. Nagasawa, A. & Finer, J. J. (1988). Induction of morphogenic callus cultures from leaf tissue of garlic. *Horticulture Science*, 23, 1068-1070.
23. Omidbaigi, R. (2009). *Production and processing of medicinal plant*.5th Edition. Astan Ghods Razavi Press, 397 p. (in Farsi)
24. Rechinger, K. H. (1984). *Flora Iranica, Alliaceae*. Akademische Druck, Univ. Verlagsanstalt Graz, Austria, 85 pp.
25. Roksana, R., Alam, M. F., Islam, R. & Hossain, M. M. (2002).*In vitro* bulblet formation from shoot apex in garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Tissue Culture*, 12(1), 11-17.
26. Uranbey, S. (2010). *In vitro* bulblet regeneration from immature embryos of *Muscari azureum*. *African Journal of Biotechnology*, 9, 5121-5125.
27. Xu, Z., Yeong-Cheol, Y. C. & Kim, C. H. (2008). Effect of plant growth regulators, temperature and sucrose on shoot proliferation from the stem disc of *Chinese jiaotou* (*Allium chinense*) and *in vitro* bulblet formation. *Acta Physiology Plant*, 30, 521-528.
28. Yasmin, S., Khan, I. A., Khatri, A., Seema, N., Nizamani, S. G. & Arain, M. A. (2009).*In vitro* plant regeneration in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 41, 2869-2876.
29. Zaidi, N., Habib Khan, Z., Zafar, F. & Iqbal Zafar, S. (2000). Bulbous and cormous monocotyledonous ornamental plants *in vitro*. *Science Vision*, 6, 58-72.
30. Zhang, S. Z. & Li, J. R. (2006). Effect of plant growth regulators combination to the stem disc callus regeneration system of garlic (*Allium sativum* L.). *Seed*, 6, 38-40.