

بررسی تلاقی پذیری سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii* Boiss) با برخی از رقم‌های تجاری سوسن و امکان استفاده از کشت تخمک در تلاقی آنها

یونس مهدوی فیکجور^۱، پژمان آزادی^{۲*}، فرشته نعمت الهی^۳

۱- گروه باغبانی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

۲- بخش تحقیقات مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

۳- گروه شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

✉ azadip@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۸/۲۱، تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۰/۲۱، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۴

چکیده

سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii*)، از گونه‌های گیاهی بومی و کمیاب ایران است که در بلندی‌های شمالی البرز پراکنش دارد. در پژوهش حاضر، امکان تلاقی سوسن چلچراغ با برخی سوسن‌های تجاری بررسی شد. ابتدا وضعیت سیتوژنتیک سوسن چلچراغ با تعدادی از رقم‌های تجاری مقایسه شد. سپس امکان تلاقی دوجانبه سوسن چلچراغ با شماری از ارقام تجاری سوسن ارزیابی شد. همچنین، امکان کشت تخمک در والد‌های مادری رقم‌های Brindisi و Paradero در تلاقی با گرده سوسن چلچراغ، در زمان‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از گرده افشانی در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۰، ۰.۱ و ۲.۰ میلی گرم در لیتر نفتالن استیک اسید (NAA)، برای چیرگی بر موانع پس از لقاح مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد اگرچه سوسن چلچراغ به‌عنوان یک گیاه دوگان (دیپلوئید) دارای مادگی و گرده فعال است و توانایی باروری بالایی دارد، اما در تلاقی سوسن چلچراغ به‌عنوان والد مادری با ارقام تجاری، تمامی مادگی‌ها ریزش کرده و از بین رفتند. همچنین در تلاقی سوسن چلچراغ به‌عنوان والد پدری، در سه رقم Fangio، Companion و Arvandrud به‌عنوان والد مادری، هیچ میوه‌ای تشکیل نشد. در بقیه ارقام مورد بررسی نیز، میوه‌های تشکیل شده به تدریج از بین رفته و تا هفته هشتم هیچ میوه‌ای باقی نماند. یافته‌های کشت تخمک رقم‌های Brindisi در تلاقی با گرده سوسن چلچراغ، نشان داد که زمان جداسازی و غلظت NAA به‌طور معنی‌داری بر زنده‌مانی و بزرگ شدن تخمک مؤثر است. در رقم Brindisi، در زمان جداسازی ۳۰ روز پس از گرده افشانی و تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA، تنزگی تخمک مشاهده شد. در کل، به نظر می‌رسد امکان تلاقی سوسن چلچراغ به‌عنوان والد گرده دهنده با برخی از ارقام تجاری با در نظر گرفتن و برطرف کردن موانع پیش از لقاح و همچنین موانع پس از لقاح با استفاده از محیط کشت‌های بهینه، وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: سطح ترازگانی، سوسن چلچراغ، فلوسایتومتري، کشت تخمک، نجات رویان.

مقدمه

سوسن چلچراغ با نام علمی *Lilium ledebourii* Boiss. از تیره سوسن‌سانان^۱ می‌باشد. از گونه‌های بومی و کمیاب است که در بلندی‌های البرز در شمال ایران از اردبیل و آستارا تا رودسر و تنکابن و کلاردشت و منطقه نور مازندران، پراکنش دارد (Saeedifard et al., 2008; Rechinger, 1989). این گیاه ارزشمند در سال ۱۳۵۴ در ارتفاعات داماش شهرستان رودبار توسط دانشمند فرانسوی به نام کارل فردریش ون لدوبوری^۲ شناسایی شد و به خاطر بزرگداشت این دانشمند، نام وی این گونه

گذاشته شد که جزء آثار ملی طبیعی کشورمان به ثبت رسیده است (Saeedifard et al., 2008; Shokrollahi et al., 2022). فرم خاص و داشتن گلچه‌های متعدد در گل‌آذین این گیاه، جذابیت ویژه‌ای را ایجاد نموده است که در بسیاری از ارقام تجاری سوسن وجود ندارد. علاوه بر این، منبع ژنتیکی مطلوبی برای بسیاری از صفات به‌نژادی است و حتی می‌تواند در صورت به‌نژادی به‌عنوان یک رقم تجاری معرفی شود (Wendelbo, 1977; Farsam et al., 2003).

اگرچه با توجه به خطر انقراض این گونه، پژوهش‌هایی برای ضریب افزایش آن صورت گرفته است (Azadi and Khosh-). اما استفاده از این منبع ژنتیکی در به‌نژادی ارقام جدید (Van Tuyl et al., 2018) نیز می‌تواند برای ایجاد تنوع سوسن مورد استفاده قرار گیرد. در صورت تلاقی سوسن چلچراغ با سایر گونه‌های جنس سوسن و همچنین ارقام تجاری موجود، پتانسیل‌های انتقال صفات با ارزش از این گیاه و همچنین تولید ارقام جدید و تجاری وجود دارد (Marasek-Ciolakowska et al., 2018; Sheikh-Assadi et al., 2022). از جمله دشواری‌های موجود در به‌نژادی انواع سوسن، مشکل تلاقی‌پذیری متفاوت و موانع باروری بین گونه‌های این جنس می‌باشد (Marasek-Ciolakowska et al., 2018; Kim et al., 2022). اگرچه گونه‌های جنس سوسن در هفت بخش تقسیم‌بندی شده‌اند، سه گروه تجاری سوسن به نام‌های آسیایی^۱، گل‌بلند^۲ و شرقی^۳ امروزه در دنیا کشت و کار می‌شوند و در طول سال‌های گذشته دورگ‌های تجاری بین گونه‌ای و همچنین تلاقی گونه‌های تجاری با نمونه‌های وحشی آن صورت گرفته است (Robinson and Firozabady, 1993; Marasek-). با توجه به اختلاف ژنتیکی نسبتاً زیاد بین این گونه و سایر گونه‌های جنس سوسن، بررسی فاکتورهای مؤثر در تلاقی‌پذیری این گیاه با گونه‌های دیگر و ارقام تجاری موجود، ضروری است.

اگرچه در برخی از ارقام جنس سوسن، تلاقی به روش معمول گیاهان انجام شده است اما با زیاده‌شدن فاصله ژنتیکی، موانع پیش از لقاح و پس از لقاح، سبب نبود موفقیت دورگ‌گیری در گونه‌های جنس سوسن شده است (Marasek-Ciolakowska et al., 2018; Van Tuyl et al., 2018; Kim et al., 2022). استفاده از روش‌های مختلف گرده‌افشانی مانند گرده‌افشانی نرمال، روش بُرش خامه و روش پیوند خامه برای گرده‌افشانی (Van Tuyl et al., 1988, 1991) و همچنین استفاده از روش‌های گوناگون مانند کشت رویان، کشت برش تخمدان، کشت تخمک، کشت تکی تخمک جوان و روش نجات (کیسه) رویان برای کشت تخمک‌های بارور شده تلاقی‌های مختلف سوسن (Chi et al., 2002) بررسی شده است. در مطالعه‌ای، ۴۰ روز پس از گرده‌افشانی، رویان‌ها کشت شدند و پس از ۱۴ روز گیاهچه تولید شد درحالی‌که ۳۷ روز پس از لقاح تخمدان کشت شد که ۱۰ روز بعد گیاهچه تشکیل شد و در حالت گرده‌افشانی معمولی ۱۰۰ روز پس از لقاح بذر و ۲۱ روز پس از کاشت بذر، گیاهچه تشکیل شد (Van Tuyl et al., 1988). در همین راستا، Abbasi و همکاران (2019) برای تلاقی بین گونه‌ای سوسن چلچراغ به‌عنوان والد پدری با بخش‌های آسیاتیک و گونه‌های اورینتال به‌عنوان والد مادری، از دو روش گرده‌افشانی عادی و گرده‌افشانی خامه قطع شده استفاده کرده و با نجات رویان پیش از بین رفتن آن توانستند تنها در برخی تلاقی‌های محدود، گیاهچه تولید نمایند.

تاکنون پژوهش‌های متعددی در زمینه شناسایی و افزایش سوسن چلچراغ با بذر و کشت بافت انجام شده است. اما در زمینه به‌نژادی این گونه یا تلاقی آن با گونه‌های دیگر و معرفی ارقام تجاری (جدید)، پژوهش‌های محدودی صورت گرفته است. در این پژوهش، امکان تلاقی‌پذیری این گیاه با برخی ارقام تجاری ارزیابی شد که شامل بررسی مراحل مختلف تلاقی مانند دارا بودن دانه گرده فعال، مادگی آماده پذیرش، تشکیل رویان و تشکیل بذر کامل و همچنین استفاده از تکنیک کشت تخمک در شرایط درون شیشه‌ای است.



مواد و روش‌ها

این پژوهش طی سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۴۰۱ روی سوسن چلچراغ و تعدادی از سوسن‌های تجاری در قالب چهار آزمایش شامل مطالعات سیتوژنتیک، امکان تلاقی سوسن چلچراغ به‌عنوان والد مادری با گرده برخی ارقام تجاری، استفاده از گرده سوسن چلچراغ به‌عنوان والد پدری در تلاقی با چند رقم تجاری و امکان نجات رویان به روش کشت تخمک در والد مادری Brindisi پس از تلاقی با سوسن چلچراغ در منطقه داماش استان گیلان، منطقه کلاردشت استان مازندران و مجتمع باغبانی مهدوی واقع در چابکسر انجام شد.

مواد گیاهی

این پژوهش روی نمونه‌های سوسن چلچراغ منطقه داماش (استان گیلان، عرض جغرافیایی ۳۶.۷۳۹۱۹۷۳۵ شمالی، طول جغرافیایی ۴۹.۷۷۸۲۵۸۸ شرقی و ارتفاع ۱۳۵۰ متر از سطح دریا) و منطقه کلاردشت (استان مازندران، عرض جغرافیایی ۳۶.۵۲۰۳۴۷ شمالی، طول جغرافیایی ۵۱.۰۷۴۱۲۹ شرقی و ارتفاع ۲۲۹۰ متر از سطح دریا) و همچنین نمونه‌های سوسن تجاری شامل ۴ رقم آسیاتیک، ۴ رقم اوریتال، ۶ رقم اوریتال-ترومپت^۱ و ۳ رقم لانگی‌فلوروم-آسیاتیک^۲ مطابق جدول ۱، انجام شد. با توجه به محدودیت‌های حفاظت سازمان محیط‌زیست و همچنین محدود بودن گیاهان مادری سوسن چلچراغ، امکان برداشت سوخ این گیاه از عرصه طبیعت فراهم نبود و بخشی از پژوهش روی گل‌های این گیاه در طبیعت انجام شد. برای تلاقی سوسن چلچراغ به‌عنوان والد پدری نیز، تنها دانه گرده جمع‌آوری شد. سوخ‌های ارقام تجاری سوسن مورد مطالعه از نماینده شرکت هلندی BOT در ایران، شرکت ارم گل پارسه واقع در شیراز تهیه شد و برای رشد و تولید گل در گلدان‌های حاوی آمیخته خاک باغچه و ماسه با نسبت ۱:۳ کشت شدند.

شمارش کروموزوم

برای شمارش کروموزوم از نمونه‌های نوک ریشه پیازهای سوسن چلچراغ و همچنین سوسن‌های تجاری استفاده شد و شمارش کروموزوم به روش استوارسین (Singh, 2016) انجام گرفت.

جمع‌آوری و نگهداری دانه گرده

گرده‌های سوسن چلچراغ از منطقه داماش و کلاردشت جمع‌آوری شدند. همچنین دانه گرده ارقام تجاری نیز جمع‌آوری شدند. برای جمع‌آوری دانه گرده، پرچم‌ها از گل‌های تازه باز شده جدا شده و به مدت ۲۴ ساعت داخل دسیکاتور قرار گرفتند. پس از آن، بساک‌ها روی کاغذ مومی تکانه شده و با استفاده از یک تیغ گرده‌ها از روی کاغذ جمع‌آوری شده و داخل ویال‌های آزمایشگاهی قرار گرفتند و با قرار دادن گلوله پنبه‌ای و بستن ظروف تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

آزمون زنده‌بودن و تنژگی دانه گرده

برای ارزیابی زنده‌بودن دانه گرده از روش رنگ‌آمیزی با استوکارمن آهن دار ۱٪ استفاده شد (Alishah and Omid, 2008). برای سنجش توانایی جوانه‌زنی دانه گرده از روش آزمون تنژگی مستقیم روی محیط کشت حاوی ۲۰٪ ساکارز، ۱/۷٪ آگار و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید بوریک درون پتری‌دیش استفاده شد و رشد لوله گرده به‌اندازه حداقل دو برابر قطر دانه گرده پس از ۲۴ ساعت، ملاک ارزیابی تنژگی دانه گرده قرار گرفت.

سوسن چلچراغ به‌عنوان والد مادری

از گیاهان سوسن چلچراغ منطقه داماش برای انجام تلاقی به‌عنوان والد مادری استفاده شد. بدین منظور، در خردادماه ۱۳۹۶، در زمان تقریبی دو روز قبل از باز شدن گل با توجه به‌ظاهر گل و میزان تورم گلچه، پرچم‌ها به‌دقت حذف شدند. برای جلوگیری از هر نوع گرده‌افشانی ناخواسته، گلچه‌ها پاکت گذاری شده یا کلاله با فویل پوشانده شد و در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت پس



از اخته کردن گل‌ها، با گرده ۷ رقم تجاری شامل رقم‌های Companion, Fangio, Brindisi, Arvandrud, Paradero, Tresor و Robina گرده‌افشانی شدند. برای اطمینان از نحوه عمل گرده‌افشانی، تعدادی از گلچه‌ها نیز با گرده سوسن چلچراغ گرده‌افشانی شدند. پس از یک هفته، پاکت‌ها برداشته شدند. با فاصله زمانی دو هفته یک‌بار، وضعیت رشد و نمو میوه از نظر طول، قطر و ظاهر مورد بررسی قرار گرفت. بذرها حاصل از تلاقی‌ها در صورت تولید برداشت شده و پس از خشک شدن و نگهداری به مدت دو ماه، به مدت ۴ هفته درون ماسه مرطوب در یخچال (دمای ۴ درجه سلسیوس) چینه‌سرمایی شدند و در گلدان حاوی کوکوپیت و پرلیت کشت شدند.

سوسن چلچراغ به‌عنوان والد پدری (گرده دهنده)

از گیاهان گلدانی رقم‌های تجاری به‌عنوان والد مادری استفاده شد. بدین منظور، در همه ۱۷ رقم تجاری یادشده در جدول ۱، شامل ۴ رقم آسیاتیک، ۴ رقم اوریتال، ۶ رقم اوریتال-ترومپت و ۳ رقم لانگی فلوروم-آسیاتیک، ابتدا مانند روش ذکرشده در بالا، گلچه‌ها دو روز قبل از باز شدن گل اخته شده و برای جلوگیری از گرده‌افشانی ناخواسته، مادگی توسط یک فویل آلومینیومی پوشانده شد (Van Tuyt *et al.*, 1997). ۴۸ ساعت بعد، فویل برداشته‌شده و پس از رؤیت آمادگی کلاله برای پذیرش دانه گرده (ترشح ماده لزج روی کلاله)، گرده‌های سوسن چلچراغ روی کلاله قرار گرفت. ۲۴ ساعت پس از اولین گرده‌افشانی، گرده‌افشانی دوم نیز انجام شد و برای هر والد مادری، از حداقل سه گل‌آذین روی هر گیاه و تعداد دو گیاه برای هر والد مادری استفاده شد. وضعیت رشد و نمو میوه از نظر طول، قطر و ظاهر به‌صورت روزانه مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲).

کشت تخمک حاصل از تلاقی بین گرده سوسن چلچراغ و رقم‌های تجاری Brindisi و Paradero

در این بخش، نجات رویان از طریق کشت تخمک رقم‌های Brindisi و Paradero گرده‌افشانی شده با گرده سوسن چلچراغ انجام شد. میوه‌های نارس در روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ پس از گرده‌افشانی (DAP) برداشت شدند و با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲٪ به همراه ۰/۰۵٪ توین ۲۰ به مدت ۸ دقیقه، ضدعفونی سطحی شدند و پس از آن سه بار با آب استریل شستشو انجام شد. سپس تخمک‌ها روی محیط کشت MS حاوی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر گلوتامین، ۳٪ ساکارز، ۰/۸٪ آگار، ۰/۶ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین (BA) و سه غلظت نفتالن استیک اسید (NAA) شامل ۰، ۰/۱ و ۲ میلی گرم در لیتر کشت شدند. اسیدیته محیط کشت با استفاده از اسیدکلریدریک رقیق یا سود ۰/۱ نرمال روی $5/7 \pm 0/1$ تنظیم شد. سپس به میزان ۲۵ میلی لیتر در ظروف شیشه‌ای (شیشه‌های ۲۰۰ میلی‌لیتری) توزیع شد. آنگاه به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱/۵ اتمسفر و درجه حرارت ۱۲۱ درجه سلسیوس با استفاده از اتوکلاو ضدعفونی شدند. در هر شیشه تعداد ۳ یا ۴ ریزنمونه تخمک کشت گردید. نمونه‌های کشت شده به اتفاق رشد با دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس و فوتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شرایط شدت نور حدود ۱۰۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه حاصل از لامپ فلورسنت گیاهی منتقل شدند. روند تغییر تخمک‌ها و تشکیل گیاهچه‌ها در طول زمان بررسی شد.

واکاوی آماری

این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۴ شیشه حاوی ۳ تا ۴ عدد نمونه در هر تکرار انجام گرفت. داده‌های صفات مختلف اندازه‌گیری شده در زمان‌های مختلف پس از آزمون نرمال بودن داده‌ها در نرم‌افزار MiniTab، با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹.۱) تجزیه‌شده و میانگین‌ها نیز با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ مقایسه شدند. برای داده‌های کشت بافت که دارای تعداد زیادی صفر بود از رابطه $(X+0.5)^{0.5}$ برای تبدیل داده استفاده شد.



نتایج و بحث

نتایج بررسی شمارش کروموزوم نشان داد که تعداد کروموزوم‌های سوسن چلچراغ $2n=2x=24$ کروموزوم است و یک گونه دوگان (دیپلوئید) می‌باشد. در مورد ارقام تجاری مورد استفاده برای تلاقی نیز، تنوعی از ارقام دیپلوئید ($2n=2x=24$)، سه گان (تریپلوئید) ($2n=3x=36$) و چهارگان (تتراپلوئید) ($2n=4x=48$)، مشاهده گردید (جدول ۱).

اگرچه مطالعه تعداد کروموزوم در همه ارقام مورد بررسی انجام شد، اما به دلایلی مانند کمبود تعداد ریشه مناسب و همچنین زمان نامطلوب تهیه ریشه، تعداد دقیق کروموزوم‌ها تنها در تعداد مشخصی از ارقام تجاری مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی حاضر مشخص شد که رقم Nova Zembla با تعداد کروموزوم $2n=2x=24$ دیپلوئید، ارقام Arvandrud, Corsini, Fangio, Robina, Bonbini, Brindisi, Alusta, Table Dance, Original Love و با تعداد کروموزوم $2n=3x=36$ ، ارقام سه گان (تریپلوئید) و رقم Tresor با تعداد $2n=4x=48$ کروموزوم رقم چهارگان (تتراپلوئید) هستند. در تعدادی از ارقام هم مانند Ivory Pixie, Landini, Paradero, Ice Dancer, Companion و Richmond شمارش تعداد کروموزوم‌ها و سطح ترازگانی آن‌ها موفقیت‌آمیز نبود. اگرچه گونه‌های جنس سوسن دارای کروموزوم‌های بزرگ و مناسبی برای مطالعه هستند و پژوهش‌های بسیار زیادی در مورد شمارش کروموزوم در انواع بومی موجود در طبیعت و تجاری صورت گرفته است و همچنین کاربوتیپ آن‌ها به دقت بررسی شده است، اما پژوهش‌های اندکی در مورد شمارش کروموزوم و تعیین سطح ترازگانی سوسن چلچراغ انجام شده است. Moradi Ashur و همکاران (۲۰۱۰) به دلیل کمبود بذر و سوخ کمیاب این گیاه و همچنین مشکل تنژگی کم بذور و کمبود تعداد ریشه مناسب جهت بررسی نتوانستند تعداد دقیق کروموزوم‌های این گیاه را مشخص کنند.

زنده‌مانی و تنژگی دانه گرده

اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بین سوسن چلچراغ و ارقام تجاری مورد بررسی در درصد تنژگی دانه گرده وجود داشت. نتایج بررسی زنده‌مانی دانه گرده و آزمون تنژگی دانه گرده سوسن چلچراغ نشان داد که درصد بالایی از دانه‌های گرده سوسن چلچراغ زنده بوده (۸۶.۴٪) و توانایی تنژگی دارند. بیش از ۷۵.۷٪ از گرده‌ها بلافاصله پس از تهیه دانه گرده تنژگی داشتند (جدول ۱) اما با نگهداری در فریزر و همچنین گذشت زمان، درصد زنده‌مانی و تنژگی دانه گرده به تدریج کاهش یافت و با گذشت حدود سه ماه از نگهداری به ۶۳.۲٪ و با گذشت بیش از شش ماه به ۵۴.۵٪ کاهش یافت. در مورد ارقام تجاری مورد بررسی نیز، ارقام به سه گروه کاملاً مجزا با درصد تنژگی کم (کمتر از ۵٪)، متوسط (بین ۱۰ تا ۴۰٪) و بالا (بیشتر از ۵۰٪) تقسیم شدند. بیشترین درصد تنژگی دانه گرده در رقم Tresor مشاهده شد. ارقام Ivory Pixie, Paradero, Companion و Corsini در گروه متوسط قرار گرفتند و سایر ارقام با تنژگی بسیار کم در گروه تنژگی کم قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- سطح چندگانی (ترازگانی) و میزان تنژگی دانه گرده سوسن چلچراغ و ارقام تجاری مورد استفاده.

Table 1- Ploidy level and rate of pollen grain germination in Susan-e- Chelcheragh and commercial cultivars.

گونه / رقم Species/ Cultivar	گروه Group	سطح ترازگانی براساس شمارش کروموزوم Ploidy level based on chromosome count	درصد زنده‌مانی دانه گرده Survival percentage of pollen grains	درصد تنژگی دانه گرده Germination percentage of pollen grains
Susan-e- Chelcheragh	-	Diploid	86.4	75.7a
Ivory Pixie	Asiatic	-	62.1	21.5b
Landini	Asiatic	-	35.4	4.9c
Tresor	Asiatic	Tetraploid	75.3	64.5a
Fangio	Asiatic	Triploid	25.4	3.1c
Nova Zembla	Oriental	Diploid	38.4	4.7c
Paradero	Oriental	-	29.1	24.6b



Ice Dancer	Oriental	-	42.6	1.9c
Companion	Oriental	-	52.4	17.5b
Corsini	OT	Triploid	64.2	10.8b
Arvandrud	OT	Triploid	25.9	1.2c
Bonbini	OT	Triploid	39.2	4.3c
Robina	OT	Triploid	40.8	1.1c
Table Dance	OT	Triploid	46.8	2.7c
Alusta	OT	Triploid	31.4	3.1c
Richmond	LA	-	36.9	2.4c
Brindisi	LA	Triploid	61.4	2.8c
Original Love	LA	Triploid	50.3	1.7c

حرف‌های مشابه در ستون تنژگی دانه گرده نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ با استفاده از آزمون دانکن می‌باشند.

The same letters in the pollen grain germination column indicate no significant difference at the 5% level using Duncan's test.

اگرچه تنژگی گرده در شرایط آزمایشگاهی یکی از مطمئن‌ترین روش‌ها برای ارزیابی دانه گرده است، اما نیاز به تهیه محیط تنژگی مناسب دارد و ارزیابی نتیجه آن ممکن است زمان زیادی را نیاز داشته باشد. از بین روش‌های آزمایش سریع و آسان برای زنده‌مانی گرده‌ها، استفاده از رنگ استوکارمین برای آزمون زنده ماندن گرده دورگ‌های سوسن اورینتال امکان‌پذیر بوده است (Du et al., 2018).

زنده‌بودن دانه گرده و پذیرش کلالة از شرط‌های اولیه گرده‌افشانی موفق و تشکیل دانه در گیاهان گل‌دار است. در پژوهشی، Abbasi و همکاران (2019) نیز درصد زنده‌مانی دانه گرده سوسن چلچراغ مورد استفاده برای دو رگ‌گیری با سوسن‌های تجاری به روش رنگ‌آمیزی استوکارمین را ۸۵٪ و درصد تنژگی دانه گرده روی محیط کشت را بیش از ۶۰٪ گزارش کردند که نتایج پژوهش حاضر نیز با آن مطابقت دارد.

در پژوهش حاضر، درصد زنده‌بودن دانه گرده در تمامی ارقام تجاری مورد بررسی در حد قابل قبولی (بیش از ۲۵٪) بالا بود. اما در درصد تنژگی دانه گرده تنوع بسیار زیادی بین گیاهان وجود داشت به‌طوری‌که به‌صورت کاملاً مشخص در سه گروه قرار گرفتند. براساس مطالعات قبلی، ارقام تریپلوئید در گیاهان مختلف دانه گرده زنده تولید می‌کنند اما این دانه‌های گرده توانایی تنژگی خوبی ندارند یا به عبارت دیگر درصد تنژگی دانه گرده آن‌ها پایین است (Chung et al., 2013; Kwon et al., 2017). اگرچه در پژوهش حاضر، اندازه دانه گرده مورد بررسی آماری قرار نگرفت اما براساس مشاهدات ظاهری، تعداد گرده‌های ریزتر در ارقامی که تنژگی دانه گرده کمتری داشتند، بیشتر بود.

برای لقاح موفق در دورگ‌گیری گیاهان، کلالة‌ها باید پذیرای دانه گرده باشند و گرده‌ها هم زنده، دارای قابلیت تنژگی و همچنین با مادگی سازگار باشند. گل‌های گیاهان نر عقیم می‌توانند گرده‌های غیرطبیعی تولید کنند که اغلب قابلیت زنده‌مانی پایینی دارند. همچنین ممکن است برخی از ارقام عقیم اصلاً گرده تولید نکنند. با این حال، برای بسیاری از محصولات، فیزیولوژی دانه‌های گرده تولیدشده توسط گل‌های نر عقیم به‌طور دقیق بررسی نشده است و اطلاعات کمی در مورد اینکه چگونه انتقال این گرده به کلالة‌های پذیرنده بر نتایج گرده‌افشانی تأثیر می‌گذارد، وجود دارد. گرده‌هایی که زنده نیستند یا زنده بوده اما توانایی تنژگی را ندارند یا سازگار نیستند نمی‌توانند تخمک‌های گیاه را بارور کنند، با این حال چنین گرده‌هایی ممکن است بر موفقیت گرده‌افشانی از طریق مکانیکی و/یا مهار رشد لوله زنده تأثیر منفی بگذارند (Du et al., 2018; Subasinghe Arachchige et al., 2022). در تولید گیاهان دورگ از گیاهان مادری با سطوح مختلف ترازگانی، انتخاب والد پدری با گرده زنده و توان تنژگی بالا برای تولید موفق گیاهان دورگ ضروری است. با توجه به نتایج تنژگی دانه گرده، به نظر می‌رسد برخی از ارقام مورد بررسی مانند Arvandrud، Robina و Original Love به دلیل تنژگی بسیار کم دانه گرده به‌عنوان والد پدری برای دورگ‌گیری مناسب نیستند.

سوسن چلچراغ به عنوان والد مادری

در این آزمایش در تلاقی شاهد سوسن چلچراغ با گرده خودش تشکیل میوه و رشد طبیعی مشاهده شد. میوه‌های سوسن چلچراغ به طور طبیعی رشد کرده و بذره‌ای بالغ آن در زمان تقریبی ۷۵ تا ۸۰ روز پس از تلاقی برداشت شدند. این میوه‌ها با میوه‌های گرده‌افشانی آزاد اختلاف خیلی زیادی نداشتند و تنها اندکی کوچک‌تر از میوه‌های گرده‌افشانی آزاد بودند. بذره‌ای حاصل از گرده‌افشانی آزاد و خود گرده‌افشانی سوسن چلچراغ پس از تیمار چینه سرمایی تنژگی مطلوبی را داشتند که نشان‌دهنده رشد طبیعی رویان و تخمک در این گیاه است. در تلاقی بین ارقام تجاری و سوسن چلچراغ، اگرچه در چند روز اول پس از تلاقی رشد اندک میوه مشاهده شد، اما ادامه رشد میوه‌ها متوقف شده و در زمان دو هفته پس از تلاقی، هیچ میوه‌ای روی بوته‌ها باقی نمانده و همه آن‌ها زرد شده و ریزش کردند (شکل ۱).



شکل ۱- استفاده از گیاهان سوسن چلچراغ بومی منطقه داماش به عنوان والد مادری. میوه حاصل از گرده‌افشانی آزاد سوسن چلچراغ (A)، مادگی خشک شده سوسن چلچراغ پس از گرده‌افشانی با گرده رقم تجاری Fangio (B)، بذره‌ای تنژیده سوسن چلچراغ در گرده‌افشانی آزاد (C) و میوه زرد شده سوسن چلچراغ پس از گرده‌افشانی با گرده رقم Tresor (D).

Figure 1- Susan-e Chelcheragh plants native to Damash region as mother parent. Fruit from open pollination of Susan-e Chelcheragh (A), the dried pistil of Susan-e Chelcheragh after pollination with commercial cultivar of Fangio (B), the germinated seeds of Susan-e Chelcheragh in open pollination (C), and yellowed fruit of Susan-e Chelcheragh after pollination with pollen of Tresor cultivar (D).

سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری (گرده دهنده)

در این آزمایش در تلاقی دانه گرده سوسن چلچراغ با مادگی ارقام تجاری، تنوع بسیار زیادی از لحاظ تشکیل میوه و رشد طبیعی مشاهده شد. اگرچه در هیچ کدام از این تلاقی‌ها، میوه رسیده تشکیل نشد، اما میزان نمو تخمدان در تلاقی‌های مختلف بسیار متفاوت بود (شکل ۲). در تلاقی سوسن چلچراغ با والدین مادری Fangio، Companion و Arvandrud، هیچ میوه‌ای تشکیل نشد و تمامی تخمدان‌ها یک تا دو هفته پس از گرده‌افشانی ریزش کردند (شکل ۲). در تلاقی بقیه ارقام به عنوان والد مادری با گرده سوسن چلچراغ، درصد متفاوتی از میوه‌ها پس از دو هفته باقی ماندند اما تنها در رقم‌های Nova، Tresor، Ivory Pixie، Brindisi و Bonbini، Ice Dancer، Paradero، Zembla بسته به رقم بین یک تا چهار کپسول از کپسول‌های تشکیل شده روی بوته تا هفته ششم روی گیاه باقی ماندند (جدول ۲). در هیچ کدام از تلاقی‌ها، نمو میوه تا هشت هفته پس از گرده‌افشانی مشاهده نشد و تمامی میوه‌ها قبل از هفته هشتم، ریزش کردند و بررسی تشریحی آن‌ها نشان داد که بذر درشت و پر در این کپسول‌ها وجود نداشت (شکل ۲).

جدول ۲- وضعیت تشکیل میوه (کپسول) و نمو آن در تلاقی سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری با ارقام تجاری به عنوان والد مادری.

Table 2- The fruit (capsule) formation and its development in the crossing of Susan-e- Chelcheragh as the male parent with commercial cultivars as the female parent.

رقم Cultivar	درصد تشکیل کپسول (دو هفته پس از گرده افشانی) Percentage of capsule formation (two weeks after pollination)	درصد تشکیل کپسول (شش هفته پس از گرده افشانی) Percentage of capsule formation (six weeks after pollination)
Ivory Pixie	36.4	9.1
Landini	35.6	0.0
Tresor	61.6	31.2
Fangio	0.0	0.0
Nova Zembla	33.3	11.1
Paradero	63.6	27.3
Ice Dancer	38.5	15.4
Companion	0.0	0.0
Corsini	12.0	0.0
Arvandrud	0.0	0.0
Bonbini	41.7	8.3
Robina	22.2	0.0
Table Dance	14.5	0.0
Alusta	19.5	0.0
Richmond	30.8	0.0
Brindisi	57.1	35.7
Original Love	12.5	0.0



شکل ۲- استفاده از گرده سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری برای تلاقی با ارقام تجاری به عنوان والد مادری. مادگی خشک شده رقم Companion پس از گرده افشانی با سوسن چلچراغ (A)، میوه تشکیل شده رقم Brindisi پس از گرده افشانی با سوسن چلچراغ (B)، میوه زرد شده رقم Bonbini سه هفته پس از گرده افشانی با سوسن چلچراغ (C) و میوه رشد کرده بدون بذر زنده در رقم Paradero پنج هفته پس از گرده افشانی با سوسن چلچراغ (D).

Figure 2- Using *Lilium ledebourii* as a paternal parent for crossing with commercial cultivars as a maternal parent. Dried pistil of Companion cultivar after pollination with Susan-e Chelcheragh (A), formed fruit of Brindisi cultivar after pollination with Susan-e Chelcheragh (B), yellowed fruit of cultivar Bonbini three weeks after pollination with Susan-e Chelcheragh (C) and fruit grown without live seeds in cultivar Paradero Five weeks after pollination with Susan-e Chelcheragh (D).

برای انجام یک تلاقی موفق بین گیاهان علاوه بر سازگاری ژنتیکی بین گیاهان، انجام مطلوب و درست تلاقی هم ضروری است. در پژوهش حاضر، در هر سه حالت تلاقی بین سوسن چلچراغ و ارقام تجاری، آمادگی پذیرش دانه گرده و توانایی تنوگی دانه گرده در نظر گرفته شد و بر این اساس تلاقی ها انجام شد. ترشح کلاله به عنوان نشانه ای از پذیرش آن در نظر گرفته شد. بر این اساس، کلاله ها در عرض ۱ روز پس از اولین ظهور ترشح در سطح کلاله پذیرا بودند و به بالاترین میزان پذیرش رسیده بودند

(He et al., 2017). علاوه بر پذیرش کلالة، توانایی بالای تنژگی دانه گرده برای لقاح موفق ضروری است. در پژوهش حاضر، در ابتدا، سوسن چلچراغ به عنوان والد مادری انتخاب و با گرده ارقام تجاری مختلف گرده افشانی شد. نتایج آزمون تنژگی دانه گرده این ارقام تجاری در مقایسه با دانه گرده سوسن چلچراغ نشان داد که برخی از ارقام تنژگی دانه گرده بسیار کمی دارند و ممکن است این موضوع نیز علاوه بر سازگاری ژنتیکی، سبب کاهش تشکیل میوه در این تلاقی ها شده باشد که نیازمند بررسی های بیشتر است.

مشارکت متوازن ژنوم مادری و پدری برای تشکیل موفقیت آمیز بذر ضروری است. در بسیاری از تلاقی ها، به ویژه در تلاقی گیاهان با سطح ترازگانی متفاوت، مشارکت نامتعادل اغلب باعث سقط رویان و در پی آن از بین رفتن بذر می شود (Erilova et al., 2009). تلاقی بین گیاهانی یک گونه زمانی که سطح ترازگانی والدین زوج یا یکسان باشد به دلیل تولید گامت های زنده امکان پذیر است. اما با فرد شدن سطح ترازگانی یکی یا هر دو والدین، شرایط تولید گامت زنده کاهش پیدا می کند (Zhou et al., 2011). در پژوهش حاضر هم تعدادی از ارقام تجاری مورد استفاده سطح ترازگانی فرد را داشتند و علاوه بر موانع دیگر، این موضوع نیز می تواند به عنوان یکی دیگر از دلایل نبود موفقیت در رشد رویان و تکامل بذر در نظر گرفته شود.

علاوه بر ناسازگاری که بین بخش های سوسن وجود دارد، در گیاهان تریپلوئید، آنیوپلوئید و در مواردی در گیاهان آلوتراپلوئید، به دلیل میوز غیرطبیعی که در یاخته های جنسی گیاه رخ می دهد، تنژگی دانه گرده بسیار پایین است (Xiao et al., 2019, 2022). این موضوع سبب می شود که در تلاقی این گیاهان تعداد میوه و بذر بسیار کمتری تشکیل شود. همچنین، این گیاهان می توانند به عنوان والد ماده استفاده شوند تا با نرهای مناسب، نتاج^۱ آنیوترازگانی که بیشتر سترون هستند را تولید کنند (Xiao et al., 2019). اگرچه سوسن های تریپلوئید میوز غیرطبیعی دارند و معمولاً نرسترون هستند، اما تا حدی ماده بارور هستند. آن ها می توانند به عنوان والدین ماده برای تلاقی با دیپلوئید/تتراپلوئید مناسب جهت تولید نتاج آنیوپلوئید استفاده شوند (Xiao et al., 2019; Kim et al., 2022). در پژوهش حاضر، در تلاقی اول که سوسن چلچراغ به عنوان والد مادری انتخاب شد، به دلیل تولید دانه گرده فعال بسیار کم در والدین پدری و همچنین ناسازگاری ژنتیکی عملاً میوه ای تشکیل نشد. در حالی که در گیاه شاهد سوسن چلچراغ به دلیل وجود دانه گرده زنده و همچنین سازگار تشکیل میوه بالایی صورت گرفت. در آزمایش دوم، که از ارقام تجاری به عنوان والد مادری استفاده شد، تنوع بسیار زیادی از لحاظ تشکیل میوه و همچنین رشد و نمو میوه مشاهده شد.

میزان باروری مادگی در ارقام مختلف سوسن متفاوت است و این موضوع به ژنتیک گیاه و همچنین به سطح ترازگانی آن ها مرتبط است (Zhou et al., 2013). در تلاقی بین گیاهان جنس سوسن ضروری است وضعیت باروری دانه گرده و مادگی به طور جداگانه بررسی گردد. با اینکه در ارقامی با سطح ترازگانی فرد، در بسیاری از موارد دانه گرده فعال نیست و توانایی جوانی زنی بسیار کمی دارد اما ممکن است مادگی فعال با توانایی لقاح وجود داشته باشد (Xiao et al., 2019; Kim et al., 2022). نتایج پژوهش حاضر در بخش اول که سوسن چلچراغ به عنوان والد مادری انتخاب شد و در بخش دوم که از سوسن چلچراغ به عنوان والد گرده دهنده انتخاب شد و با رقم های مختلف تجاری درصد متفاوتی از تشکیل میوه و کپسول را داشت تأیید کننده این موضوع است. در سوسن ها، تلاقی بین دو گونه دور اغلب با موانع قبل و پس از لقاح همراه است. برای غلبه بر چنین مشکلاتی، روش های مختلف گرده افشانی برون و درون شیشه ای، ایجاد شده است. در این پژوهش هدف اولیه امکان تولید گیاه بدون استفاده از روش های گرده افشانی و نجات رویان بود. به همین دلیل نیز ابتدا از گیاه سوسن چلچراغ به عنوان والد مادری و در تلاقی های بعدی به عنوان والد پدری استفاده شد.

نتایج تورم میوه پس از گرده افشانی نشان می دهد که در دورگ گیری بین گونه ای بین سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری و ارقامی که در آن تلاقی میوه تولید شد، موانع پس از لقاح از رشد رویان و تولید بذر جلوگیری می کند. بررسی دقیق اندازه

تخمک رشد کرده و بررسی دقیق‌تر بافت‌های رویانی زمان شروع تحلیل در این تلاقی‌ها را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد اکثر آن‌ها به‌طور غیرعادی رشد می‌کنند و معمولاً رشد رویان در مرحله رویان‌کروی و قبل از مرحله قلبی شکل متوقف می‌شود. به همین دلیل ممکن است موانع پس از لقاح در عرض ۱۵ تا ۲۰ روز پس از گرده‌افشانی رخ داده باشد.

بررسی امکان کشت تخمک حاصل از تلاقی بین سوسن چلچراغ و رقم‌های Brindisi و Paradero

در کشت تخمک، پس از گذشت حدود دو تا سه هفته از کشت مشاهده شد که تعدادی از تخمک‌ها به رنگ سیاه تغییر رنگ داده و از بین رفتند. با گذشت زمان به هفته‌های ششم تا هشتم کشت، در برخی از تخمک‌ها ظاهر تخمک به رنگ سبز روش تغییر نمود. همچنین برخی از تخمک‌ها نیز به رنگ سبز کمی تیره با اندازه‌ای بزرگتر از تخمک کشت شده تغییر پیدا کردند. نتایج کشت تخمک حاصل از دو تلاقی مختلف نشان داد که اثر والد مادری، زمان جداسازی و غلظت NAA و همچنین برهمکنش زمان جداسازی و NAA در سطح یک درصد بر درصد تخمک سیاه شده معنی‌دار شد. اثر والد مادری، زمان جداسازی و غلظت NAA و همچنین برهمکنش دوگانه و سه‌گانه آن‌ها بر درصد تخمک‌های سبز روشن و تخمک سبز متورم شده در سطح یک درصد معنی‌دار شد. با اینکه تنها یک مورد جوانه زنی تخمک در رقم Brindisi در زمان ۳۰ روز پس از گرده‌افشانی در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد، اما اثر ساده و متقابل والد مادری، زمان جداسازی و غلظت NAA بر درصد تخمک‌های جوانه زده معنی‌دار نشد (جدول تجزیه رورایانس آورده نشده است).

درصد تخمک سیاه شده در رقم Brindisi بیشتر از Paradero بود. بررسی برهمکنش زمان جداسازی و غلظت NAA نشان داد که بیشترین درصد سیاه شدن تخمک‌ها در زمان ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی و غلظت ۲ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد. در صورتی که کمترین درصد سیاه شدن تخمک‌ها در زمان ۳۰ روز پس از گرده‌افشانی و غلظت ۲ میلی گرم در لیتر NAA بود که با غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA در همین زمان و غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA در زمان جداسازی ۲۰ روز پس از گرده‌افشانی اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۳). در مورد صفت درصد تخمک‌های سبز روشن، بررسی برهمکنش‌های سه‌گانه نشان داد که بیشترین درصد در والد مادری Brindisi در زمان جداسازی ۱۰ روز و تیمار ۲ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد. در رقم Brindisi با گذشت زمان جداسازی میزان تخمک‌های سبز روشن کاهش یافت به‌طوری‌که کمترین مقدار تخمک‌های سبز روشن در زمان جداسازی ۳۰ روز در هر سه غلظت NAA مشاهده شد. کمترین درصد تخمک‌های سبز روشن در رقم Paradero در زمان جداسازی ۳۰ روز پس از گرده‌افشانی و غلظت صفر NAA مشاهده شد. در رقم Paradero زمان‌های مختلف جداسازی و همچنین غلظت‌های مختلف NAA رفتارهای متفاوتی از لحاظ درصد تخمک‌های سبز روشن مشاهده شد (جدول ۳).

در مورد صفت درصد تخمک‌های سبز رنگ متورم شده، بررسی برهمکنش‌های سه‌گانه نشان داد که بیشترین درصد در تخمک‌های والد مادری Brindisi در زمان جداسازی ۳۰ روز پس از گرده‌افشانی و غلظت ۲ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد. در مقابل نیز کمترین درصد تخمک‌های سبز رنگ متورم شده در تخمک‌های زمان جداسازی ۳۰ روز پس از گرده‌افشانی و غلظت صفر NAA مشاهده شد. براساس نتایج این صفت به غیر از یک مورد، با گذشت زمان جداسازی از ۱۰ به ۳۰، میزان تخمک‌های سبز رنگ متورم شده افزایش یافت. در رقم Paradero، بیشترین مقدار درصد تخمک‌های سبز رنگ متورم شده در تیمار ۲ میلی گرم در لیتر NAA در هر دو زمان جداسازی ۲۰ و ۳۰ روز پس از گرده‌افشانی مشاهده شد. با اینکه در رقم Paradero، در زمان جداسازی ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی در هر سه غلظت درصد تخمک‌های سبز رنگ متورم شده کمتر بود اما در سایر زمان‌ها الگوهای متفاوتی با غلظت NAA را نشان داد (جدول ۳). تنها تخمک جوانه زده نیز در رقم Brindisi مشاهده شد که پس از دو هفته در داخل شیشه کشت قهوه‌ای شده و از بین رفت. با اینکه کشت‌ها به مدت ۱۶ هفته نیز نگهداری شدند اما تغییری در جوانه زنی تخمک‌های باقیمانده مشاهده نشد.



جدول ۳- اثر زمان جداسازی و غلظت NAA بر کشت تخمک حاصل از تلاقی رقم‌های Brindisi و Paradero به عنوان والد مادری با گرده سوسن چلچراغ، ۸ هفته پس از کشت.

Table 3- Effects of isolation time and NAA concentration on *in ovulo* culture resulting from the crossing of Paradero and Brindisi cultivars as maternal parent and Susan-e- Chelcheragh, at eight weeks after cultivation

Treatment	تخمک جوانه زده	تخمک	تخمک سبز رنگ	تخمک سیاه شده	غلظت	نفتالن	زمان جداسازی	رقم
Cultivar	Germinated ovule (%)	بزرگ شده Enlarged green ovule (%)	Light green ovule (%)	Blackened ovule (%)	استیک	اسید	Isolation time (days after pollination)	
Brindisi	0.00 ^b	11.67g	38.67e	49.67cd		0.0	10	
	0.00 ^b	11.67g	48.67c	39.67ef		0.1		
	0.00 ^b	11.67g	58.67a	29.67g		2		
	0.00 ^b	31.67e	38.67e	29.67g		0.0	20	
	0.00 ^b	36.67d	48.67c	14.67hi		0.1		
	0.00 ^b	51.67b	38.67e	9.67i		2		
	0.00 ^b	4.00h	28.67g	69.67b		0.0	30	
	4.00 ^a	41.67c	28.67g	29.67g		0.1		
	0.00 ^b	61.67a	28.67g	9.67i		2		
Paradero	0.00 ^b	11.67g	33.67f	54.67c		0.0	10	
	0.00 ^b	11.67g	43.33d	44.67de		0.1		
	0.00 ^b	11.67g	53.67b	34.67fg		2		
	0.00 ^b	26.67f	38.67e	34.67fg		0.0	20	
	0.00 ^b	11.67g	48.67c	19.67h		0.1		
	0.00 ^b	52.00b	28.67g	19.67h		2		
	0.00 ^b	4.00h	18.67h	79.33a		0.0	30	
	0.00 ^b	11.67g	38.33e	49.33cd		0.1		
	0.00 ^b	52.00b	33.67f	14.67hi		2		

حرف‌های مشابه در هر ستون نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ می‌باشد.

Similar letters in each column indicate no significant difference using Duncan's test at the 5% level.

عوامل گوناگونی بر موفقیت یا نبود موفقیت دورگ‌گیری و نجات رویان پس‌از آن تأثیر دارند. در این پژوهش، تلاقی بین سوسن چلچراغ به‌عنوان والد پدری و رقم‌های Brindisi و Paradero به‌عنوان والد مادری و سپس استفاده از تکنیک کشت تخمک، سبب تنژگی تنها یکی از تخمک‌ها گردید. اگرچه تعداد گیاهچه به‌دست‌آمده بسیار کم بود اما به نظر می‌رسد نسبت گیاهچه‌های به‌دست‌آمده برای اهداف به‌نژادی، با بهبود روش کشت و عوامل موثر بر موفقیت کشت، نسبت قابل قبولی است و در مقایسه با پژوهش‌های قبلی، با نتایج برخی از پژوهش‌های پیشین مطابقت دارد (Wang et al., 2009; Zhou et al., 2013; Abbasi et al., 2019). بااینکه در پژوهش حاضر امکان بررسی همه فاکتورهای مؤثر بر موفقیت کشت تخمک وجود نداشت اما نتایج پژوهش حاضر نشان داد که علاوه بر اثر والد مادری، عوامل مانند غلظت NAA و زمان جداسازی، تأثیر معنی‌داری بر رشد و بزرگ شدن تخمک‌های کشت شده و تنژگی آن‌ها دارد. با در نظر گرفتن نتایج آزمایش‌های مختلف این پژوهش به نظر می‌رسد در والد مادری Brindisi، عوامل پس از لقاح سبب از بین رفتن رویان لقاح شده می‌شود و استفاده از تکنیک نجات رویان و اضافه کردن ترکیبات ضروری با غلظت مناسب می‌تواند از تحلیل رویان جلوگیری نماید.

در پژوهش حاضر و در آزمایش لقاح طبیعی گرده سوسن چلچراغ با والد مادری Brindisi، میوه‌ها در زمان حدود شش هفته پس از لقاح از بین رفتند و هیچ بذر زنده‌ای تولید نشد اما در شرایط درون شیشه‌ای تنژگی در تخمک‌ها مشاهده شد. این موضوع در نتایج پژوهش‌های قبلی نیز گزارش شده است. Wang و همکاران (2009) با بررسی دورگ‌گیری بین‌گونه‌ای بین بخش

لانگی فلوروم و لوفوفوروم^۱، در شرایط برون شیشه‌ای هیچ بذر بالغ و همچنین گیاه دورگی را تولید نکردند. اما با کشت درون‌شیشه‌ای تخمک، در زمان ۵ تا ۳۵ روز پس از گرده‌افشانی روی محیط B5 یا B5 نصف غلظت حاوی ساکارز، تولید گیاهیچه را مشاهده کردند. در تلاقی آن‌ها ۱.۱۷٪ از تخمک کشت‌شده در ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی به گیاه تبدیل شدند. نتایج آن‌ها نشان داد که دورگ‌گیری بین‌گونه‌ای مانع جدی‌تری پس از لقاح نسبت به دورگ‌گیری درون‌گونه‌ای داشت و غلظت کمتر (۳٪) ساکارز منجر به رشد بهتر جنین و درصد بالاتری از نهال‌ها در کشت تخمک شد.

در پژوهشی، Abbasi و همکاران (2019) در تلاقی سوسن چلچراغ به‌عنوان والد گرده دهنده یا پدری با سه رقم از گونه‌های آسیاتیک (Tresor, Pirandello و Geb duzzel) و چهار رقم از گونه‌های اوریتال (Manissa و Paradero, Sorbonne, Rialto) به‌عنوان والد مادری با استفاده از دو روش گرده‌افشانی عادی و گرده‌افشانی برش خامه، توانایی متفاوت تولید کپسول را گزارش کردند. با توجه به نتایج پژوهش حاضر و همچنین یافته‌های Abbasi و همکاران (2019) در مورد سوسن چلچراغ، به نظر می‌رسد گونه‌ها و ارقام مختلف، قابلیت تلاقی‌پذیری متفاوتی دارند.

براساس پژوهش‌های قبلی، فشار اسمزی بالاتر محیط برای رشد طبیعی رویان‌های جوان در شرایط آزمایشگاهی مورد نیاز است (Van Tuyl et al., 1991; Ikeda et al., 2003). در مطالعه Wang و همکاران (2009)، نتایج نشان داد که غلظت ۳٪ ساکارز منجر به رشد بهتر جنین و درصد بالاتر نهال در کشت تخمک دورگ در زمان ۱۰ و ۲۵ روز پس از گرده‌افشانی شد. بر این اساس و در نظر گرفتن نتایج پژوهش حاضر، به نظر می‌رسد فشار اسمزی محیط کشت برای نجات رویان دورگ تا حد زیادی به گونه‌های گیاهی بستگی دارد.

در این پژوهش برای رفع موانع پس از تلاقی بین‌گونه‌ای در تلاقی سوسن چلچراغ به‌عنوان والد پدری با ارقام تجاری، در ارقامی که پس از گرده‌افشانی میوه تشکیل شده بود از روش کشت تخمک استفاده شد. نتایج نشان داد که ناسازگاری پس از لقاح، با کشت درون شیشه‌ای رویان‌های نجات‌یافته رفع می‌شود. علاوه بر این، کشت درون شیشه‌ای می‌تواند باعث افزایش زنده‌مانی بذرها را نبالغ شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، سوسن چلچراغ گونه‌ای دوگان (دیپلوئید، $2n=2x=24$) است و مادگی فعال و دانه گرده زنده تولید می‌کند و توانایی تلاقی با برخی از سوسن‌های تجاری را دارد. استفاده از سوسن چلچراغ به‌عنوان والد مادری، علاوه بر محدودیت‌های تأمین گیاهان مادری، محدودیت‌هایی نیز از لحاظ نبود تولید دانه گرده زنده در بسیاری از ارقام تجاری دارد و به همین دلیل در بسیاری از موارد امکان تلاقی وجود ندارد. استفاده از سوسن چلچراغ به‌عنوان والد پدری در تلاقی با برخی از ارقام تجاری سوسن، امکان‌پذیر است. در پژوهش حاضر، مشخص شد که امکان تلاقی گرده سوسن چلچراغ با ارقام Ivory, Alusta, Table Dance, Robina, Bonbini, Corsini, Ice Dancer, Paradero, Nova Zembla, Tresor, Landini, Pixie, Brindisi, Richmond و Original Love وجود دارد اما موانع پس از لقاح سبب از بین رفتن رویان و در پی آن میوه در این ارقام می‌شود. البته امکان تولید میوه پارتنوکارپ هم در این ارقام نیاز به بررسی دارد. استفاده از تکنیک کشت تخمک در رقم‌های Brindisi و Paradero نشان داد که غلظت NAA و زمان جداسازی بر زنده‌مانی تخمک و تورم آن‌ها مؤثر است. در کل، به نظر می‌رسد امکان تلاقی سوسن چلچراغ به‌عنوان والد گرده دهنده با برخی از ارقام تجاری با در نظر گرفتن و برطرف کردن موانع پیش از لقاح و همچنین موانع پس از لقاح و استفاده از تکنیک‌های گرده‌افشانی و همچنین فنون نجات رویان با استفاده از محیط کشت‌های بهینه وجود دارد.



منابع

- Abbasi, H., Naderi, R., Kafi, M., Azadi, P., Padasht Dahkaei, M.N. (2019). Interspecific hybridization between *Lilium ledebourii* and commercial cultivars of *Lilium* by cut-style method and ovary slice culture. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 50(2), 287-294. (In Persian)
- Alishah, O., Omid, M. (2008). Laboratory Methods of Cytogenetic. Tehran University Press. 188 p. (In Persian).
- Azadi, P., Khosh-Khui, M. (2007). Micropropagation of *Lilium ledebourii* Boiss. as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatment. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10, 583-591.
- Bakhshaie, M., Babalar, M., Mirmasoumi, M., Khalighi, A. (2010). Effects of light, sucrose, and cytokinins on somatic embryogenesis in *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss. via transverse thin cell-layer cultures of bulblet microscales. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85(6), 491-496.
- Chi, H. S. (2002). The efficiencies of various embryo rescue methods in interspecific crosses of *Lilium*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 43, 139-146.
- Chung, M. Y., Chung, J. D., Ramanna, M., van Tuyl J. M., Lim, K. B. (2013) Production of polyploids and unreduced gametes in *Lilium auratum* × *L. henryi* hybrid. *Journal of Biological Sciences*, 9(7), 693-701.
- Du, X. Zhu, X., Yang, Y., Zhao, F., Liu, H. (2018). Pollen ultra-morphology and pollen viability test of *Lilium* Oriental hybrids. *International Journal of Agriculture and Biology*, 20(8), 1903-1907.
- Erilova, A., Brownfield, L., Exner, V., Rosa, M., Twell, D., Mittelsten Scheid, O., Hennig, L., Köhler, C. (2009). Imprinting of the polycomb group gene MEDEA serves as a ploidy sensor in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 5(9):e1000663.
- Farsam, H., Amanlou, M., Amin, G., Nezamivand-Chegini, G., Salehi-Surmaghi, M. H., Shafiee, A. (2003). Anatomical and phytochemical study of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss., a rare endemic species in Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(4), 164-170.
- He, G., Hu, F., Ming, J., Liu, C., Yuan, S. (2017). Pollen viability and stigma receptivity in *Lilium* during anthesis. *Euphytica* 213, 1-10.
- Ikedu, N., Niimi, Y., Han, D. S. (2003). Production of seedlings from ovules excised at the zygote stage in *Lilium* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73(2), 159-166.
- Kim, J. Y., Song, Y. S., Na, J. K., Kim, J. H. (2022). Interspecific crossing between *Lilium hansonii* Leichtlin and *L. brownii* var. Colchesteri for the breeding of new lily cultivars. *Agronomy*, 12(3), 621.
- Kwon, M. J., Ramzan, F., Ahn, Y. J., Hwang, Y. J., Kang, Y. I., Kim, C. K., Younis, A., Lim, K. B. (2017). Chromosomal analysis of *Lilium longiflorum* × Asiatic hybrids using GISH (genomic *in situ* hybridization). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 58, 591-600.
- Marasek-Ciolakowska, A., Nishikawa, T., Shea, D. J., Okazaki, K. (2018). Breeding of lilies and tulips- Interspecific hybridization and genetic background. *Breeding Science*, 68(1), 35-52.
- Moradi Ashur B., Mohammadi R. Azimi M.H. (2010). Chromosome counting and ploidy level determination in different cultivars of *Lilium*. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). No. 1059805 (In Persian).
- Murashige, T. Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Rechinger, K.H. (1989) Flora Iranica, no. 165, Liliaceae. Akademische Druck-u, Verlagsantalt, Graz.
- Robinson, K.E.P. Firozabady, E. (1993) Transformation of floriculture crops. *Scientia Horticulturae* 55, 83-99.
- Saeedifard, M., Hosseini, S.M., Padasht Dehkaie, M.N. (2008). Modeling of the spatial distribution of the rare plant *Lilium ledebourii*. *Rostaniha*, 9(2), 137-150. (In Persian).
- Sheikh-Assadi, M., Naderi, R., Kafi, M., Fatahi, R., Salami, S. A., Shariati, V. (2022). Complete chloroplast genome of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss and its comparative analysis: lights into selective pressure and adaptive evolution. *Scientific Reports*, 12(1), 1-17.
- Shokrollahi, S., Yousefzadeh, H., Parisod, C., Heshmati, G., Bina, H., Ali, S., Amirchakhmaghi, N., Song, Y. (2022). Phylogenetics and biogeography of *Lilium ledebourii* from the Hyrcanian forest. *Diversity*, 14, 137.
- Singh, R. J. (2016). Plant cytogenetics. CRC press.
- Subasinghe Arachchige, E. C., Evans, L. J., Samnegård, U., Rader, R. (2022). Morphological characteristics of pollen from triploid watermelon and its fate on stigmas in a hybrid crop production system. *Scientific Reports*, 12(1), 1-12.



- Van Tuyl, J. M. De Jeu, M. J. (1997) Methods for Overcoming Interspecific Crossing Barriers. In: Shivanna, K-R., Sawhney, V-K. (eds), *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement*. Cambridge University Press, pp 273-293.
- Van Tuyl, J. M., Arens, P., Shahin, A., Marasek-Ciolakowska, A., Barba-Gonzalez, R., Kim, H. T., *et al.* (2018). *Lilium*. In: J. van Huylbroeck (ed), *Ornamental Crops* (Berlin: Springer), pp 481-512.
- Van Tuyl, J. M., Van Diën, M. P., Van Creij, M. G. M., Van Kleinwee, T. C. M., Franken, J. Bino, R. J. (1991). Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. *Plant Science*, 74, 115-126.
- Wang, J., Huang, L., Bao, M. Z., Liu, G. F. (2009). Production of interspecific hybrids between *Lilium longiflorum* and *L. lophophorum* var. *linearifolium* via ovule culture at early stage. *Euphytica* 167, 45-55.
- Wendelbo, P. (1977) Tulips and Irises of Iran and Their Relatives. Botanical Institute of Iran, Tehran.
- Xiao, K., Zheng, W., Zeng, J., Wu, L., Cui, L., Liu, Y., Yang, Y., Zhou, S. (2019). Analysis of abnormal meiosis and progenies of an odd-allotetraploid *Lilium* 'Honesty'. *Scientia Horticulturae*, 253, 316-321.
- Xiao, K., Zhu, Z., Zou, N., Zhang, L., Sun, Y., Zhou, S. (2022). The characteristics of abnormal meiosis and functional aneuploid pollen of odd-allotetraploid lily 'Honesty' unveiled using *in situ* hybridization. *Scientia Horticulturae*, 300, 111091.
- Zhou, S., Tan, X., Fang, L., Jian, J., Xu, P., Yuan, G. (2013). Study of the female fertility of an odd-tetraploid of *Lilium* and its potential breeding significance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 138(2), 114-119.
- Zhou, S., Zhou, G., Li, K. (2011). Euploid endosperm of triploid $\times$ diploid/tetraploid crosses results in aneuploid embryo survival in *Lilium*. *HortScience*, 46(4), 558-562.



Investigating the hybridization of Susan-e-Chelcheragh (*Lilium ledebourii* Boiss) with some commercial *Lilium* cultivars and the possibility of *in ovulo* culture in their crosses

Younes Mahdavi Fikejvar¹, Pejman Azadi^{2*}, Freshteh Nematollahi³

- 1- Department of Horticultural Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran
2- Department of Genetic Engineering and Biosafety, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj
3- Department of Chemistry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran

Received: 12/11/2022, Revised: 11/1/2023, Accepted: 14/1/2023

✉ azadip@abrii.ac.ir

Abstract

Susan-e-Chelcheragh (*Lilium ledebourii*) is a rare native plant in Iran, primarily found in the elevated terrains of the Alborz region. This study explores the potential for crossbreeding *L. ledebourii* with commercially available lily varieties. Initially, the study compares the cytogenetic profile of *L. ledebourii* with several commercial cultivars. Subsequently, the feasibility of hybridization between *L. ledebourii* and a subset of commercial lily cultivars was analyzed. The study also examines the viability of *in ovulo* culture in maternal genotypes of Brindisi and Paradero cultivars when cross-pollinated with *L. ledebourii* pollen. Moreover, the effects of different time intervals (10, 20, and 30 days after pollination) and NAA concentrations (ranging from 0 mg/L to 2.0 mg/L) on ovule development within the MS medium were considered. The findings reveal that *L. ledebourii* is a diploid plant with functional pistils and pollen grains. However, when used as the maternal parent in crossings with commercial cultivars, all pistils undergo abscission, preventing fruit set. Additionally, fruit set is conspicuously absent when *L. ledebourii* serves as the paternal parent in crosses with the Companion, Fangio, and Arvandrud cultivars, and fruit formation is transient in other examined cultivars, disappearing completely by the eighth-week post-pollination. The results of the *in ovulo* culture assays highlight the significant influence of isolation time and NAA concentration on ovule viability and enlargement. Notably, in the Brindisi cultivar, ovule germination becomes apparent when isolated 30 days after pollination and supplemented with 0.1 mg/L NAA. In conclusion, interspecies hybridization involving *L. ledebourii* as the pollinating parent and select commercial cultivars remains possible by skillfully managing pre- and post-fertilization barriers by using optimal cultural media.

Keywords: Flow cytometry, *In ovulo* culture, Ploidy level, Susan-e-Chelcheragh.