گل و گیاهان زینتی (۱۴۰۲)، ۸(۱): در انتظار انتشار
مقاله پژوهشی

بررسی تلاقی پذیری سوسن چلچراغ (*Lilium ledeburii*) با برخی از رقم های تجاری سوسن و امکان نجات رویان در رویان‌های حاصل از تلاقی بین این گونه و رقم بریندیزی

یونس مهدوی فیکجور[۱]، پژمان آزادی[۲*]، فرشته نعمت الهی[۳]
۱- گروه باغبانی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- بخش تحقیقات مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۳- گروه شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
azadip@abrii.ac.ir

چکیده

سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii*)، از گونه‌های گیاهی بومی و کمیاب ایران است که در ارتفاعات شمالی البرز پراکنش دارد. در پژوهش حاضر، امکان تلاقی سوسن چلچراغ با برخی سوسن‌های تجاری بررسی شد. ابتدا وضعیت سیتوژنتیکی سوسن چلچراغ با تعدادی از رقم های تجاری مقایسه شد. سپس امکان تلاقی متقابل سوسن چلچراغ با شماری از ارقام تجاری سوسن ارزیابی شد. همچنین، امکان نجات رویان به روش کشت برش‌های تخمدان در والد مادری رقم Brindisi در تلاقی با سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد اگرچه سوسن چلچراغ به عنوان یک گیاه دوگان (دیپلوئید) دارای مادگی و گرده فعال است و توانایی باروری بالایی دارد، اما در تلاقی سوسن چلچراغ به عنوان والد مادری با ارقام تجاری، تمامی مادگی‌ها پس از دو هفته ریزش کرده و از بین رفتند. همچنین در تلاقی سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری، در سه رقم Companion، Fangio و Arvandrud به عنوان 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 و بذری تشکیل نشد. یافته‌های کشت برش‌های تخمدان والد مادری Brindisi در تلاقی با گرده سوسن چلچراغ، نشان داد که غلظت ساکارز و غلظت NAA به طور معنی داری بر زنده‌مانی و بزرگ شدن برش‌های تخمدان موثر است. بیشترین جوانه زنی تخمک در تیمار ۳ درصد ساکارز به همراه ۰.۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. پس از آن نیز تیمار ساکارز ۳ درصد به همراه ۰.۲ میلی‌گرم در لیتر NAA ، قرار گرفت. در کل، به نظر می‌رسد امکان تلاقی سوسن چلچراغ به عنوان 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: فلوسایتومتری، سطح پلوئیدی، نجات رویان، سوسن چلچراغ، کشت تخمک،

مقدمه

سوسن چلچراغ با نام علمی *Lilium ledebourii* Boiss. از تیره سوسن سانان[۱] می‌باشد. از گونه‌های بومی و کمیاب است که در ارتفاعات 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 لدوبوری[۲] شناسایی شد و به خاطر بزرگداشت این دانشمند ، نام وی روی این گونه گذاشته شد که جزء آثار ملی طبیعی کشورمان به ثبت رسیده است (Saeedifard et al., 2008; Shokrollahi et al., 2022). فرم

۱- Liliaceae
۲- Carl Friedrich Ledebour

خاص و داشتن گلچه‌های متعدد در گل‌آذینِ 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 اصلاحی است و حتی می‌تواند در صورت به‌نژادی به عنوان یک رقم تجاری معرفی شود (Farsam et al., 2003 ؛Wendelbo, 1977) .

اگرچه با توجه به خطر انقراض این گونه، پژوهش‌هایی برای افزایش ضریب تکثیر آن صورت گرفته است (Azadi and Khosh-Khui, 2007; Bakhshaie et al., 2010) 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 تقسیم بندی شده‌اند، سه گروه تجاری سوسن به نام‌های آسیاتیک[۱]، لانگی‌فلوروم[۲] و اورینتال[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-Ciolakowska et al., 2018). با توجه به اختلاف ژنتیکی نسبتا زیاد بین این گونه و سایر گونه‌های جنس سوسن، بررسی فاکتورهای موثر 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 زیاد شدن فاصله ژنتیکی، موانع پیش از لقاح و پس از لقاح، سبب عدم موفقیت دورگ گیری در گونه‌های جنس سوسن شده است (Marasek-Ciolakowska et al., 2018; Van Tuyl et al., 2018; Kim et al., 2022). استفاده از روش‌های مختلف گرده افشانی مانند گرده‌افشانی نرمال، روش بُرِش 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 به همراه جفت، 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 مطالعه ای، ۴۰ روز بعد از گرده‌افشانی، رویان‌ها کشت شدند و بعد از ۱۴ روز گیاهچه تولید شد در حالی که ۳۷ روز پس از لقاح تخمدان کشت شد که ۱۰ روز بعد گیاهچه تشکیل شد و در حالت گرده افشانی 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 در مورد تلاقی بین گونه‌ای سوسن چلچراغ، عباسی و همکارن (۲۰۱۹) برای تلاقی بین گونه‌ای سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری با بخش‌های آسیاتیک و گونه‌های اورینتال به‌عنوان والد مادری، از دو روش گرده‌افشانی عادی و گرده‌افشانی خامه قطع‌شده استفاده کرده و نجات رویان قبل از سقط آن توانستند تنها در برخی تلاقی‌های محدود، گیاهچه تولید نمایند.

تا کنون پژوهش‌های متعددی در زمینه شناسایی و تکثیر سوسن چلچراغ با بذر و کشت بافت انجام شده است. اما در زمینه به‌نژادی این گونه یا تلاقی آن با گونه‌های دیگر و همچنین اصلاح و معرفی ارقام تجاری (جدید)، روی این گونه پژوهشی انجام نشده است. در این پژوهش، 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 برش‌های تخمدان در شرایط درون شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها

۱- Asiatic ۲- Longiflorum ۳- Oriental

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 به عنوان والد مادری با گرده برخی ارقام تجاری، استفاده از گرده سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری در تلاقی با چند رقم تجاری و امکان نجات رویان به روش کشت برش‌های تخمدان 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 اورینتال، ۶ رقم اورینتال-ترومپت[۱] و ۳ رقم لانگی‌فلوروم-آسیاتیک[۲] مطابق جدول ۱، انجام شد. با توجه به محدودیت‌های حفاظت سازمان محیط زیست 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 به عنوان والد پدری نیز، تنها دانه گرده جمع آوری 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 مخلوط 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 استواورسین (بخشی‌خانیکی، ۱۳۸۴) انجام گرفت.

جمع آوری و نگهداری دانه گرده

گرده‌های سوسن چلچراغ از منطقه داماش و کلاردشت جمع‌آوری شدند. همچنین دانه گرده ارقام تجاری نیز جمع آوری شدند. برای جمع آوری 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 تکانده شده و با استفاده از یک تیغ گرده‌ها از روی کاغذ جمع آوری شده و داخل ویال‌های آزمایشگاهی قرار گرفتند و با قرار دادن گلوله پنبه‌ای و بستن ظروف تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمون زنده بودن و جوانه زنی دانه گرده

برای ارزیابی زنده بودن دانه گرده از روش رنگ‌آمیزی با استوکارمن آهن‌دار ۱ درصد استفاده شد (Alishah and Omidi, 2008). برای سنجش توانایی جوانه زنی‌دانه گرده از روش آزمون جوانه‌زنی مستقیم روی محیط کشت حاوی ۲۰ درصد ساکارز، ۱/۷ درصد آگار و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بوریک اسید درون پتری‌دیش انجام شد و رشد لوله گرده به اندازه حداقل دوبرابر قطر دانه گرده پس از ۲۴ ساعت ملاک ارزیابی جوانه زنی دانه گرده قرار گرفت.

سوسن چلچراغ به عنوان والد مادری

از گیاهان سوسن چلچراغ منطقه داماش برای انجام تلاقی به عنوان والد مادری استفاده شد. بدین منظور، در خرداد ماه ۱۳۹۶، در زمان تقریبی دو روز قبل از باز شدن گل با توجه به ظاهر گل و میزان تورم گلچه، پرچم‌ها به دقت حذف شدند. برای جلوگیری از هر نوع گرده‌افشانی ناخواسته، گلچه‌ها پاکت گذاری شده یا کلاله با فویل پوشانده شد و در زمان‌های ۴۸ و

[۱] - Oriental-Trumpet

[۲] - Longiflorum-Asiatic

۷۲ ساعت پس از اخته کردن گل‌ها، با گرده ۷ رقم تجاری شامل رقم‌های Tressor، Paradero، Arvandrud، Brindisi، Fangio، Companion و Robina گرده افشانی 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. بذرهای 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 سانتی‌گراد) چینه سرمایی شدند و در گلدان حاوی کوکوپیت و پرلیت کشت شدند.

سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری (گرده دهنده)

از گیاهان گلدانی رقم‌های تجاری به عنوان والد مادری استفاده شد. بدین منظور، در همه ۱۷ رقم تجاری یاد شده در جدول ۱، شامل ۴ رقم آسیاتیک، ۴ رقم اورینتال، ۶ رقم اورینتال-ترومپت و ۳ رقم لانگی‌فلوروم-آسیاتیک، ابتدا مانند روش ذکر شده 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 Tuyl et al., 1990). ۴۸ ساعت بعد، فویل برداشته شده و پس از رویت 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 گل آذین روی هر گیاه و تعداد دو گیاه برای هر والد مادری استفاده شد. وضعیت رشد و نمو میوه از نظر طول، قطر و ظاهر به صورت روزانه مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲-۴).

نجات رویان در رویان‌های حاصل از تلاقی بین گرده سوسن چلچراغ و رقم Brindisi

برای بدست آورن نتایج با استفاده از کشت برش‌های تخمدان، از تلاقی سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری با رقم Brindisi استفاده شد. برای کشت برش‌های تخمدان در سال ۱۳۹۸ از محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین، سه غلظت ساکارز (۳، ۶ و ۹ درصد)، ۰.۸ درصد آگار و سه غلظت NAA (۰، ۰.۱ و ۰.۵ میلی‌گرم در لیتر) به صورت یک آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور غلظت ساکارز و غلظت NAA در قالب طرح کاملا تصادفی استفاده شد.

برای کشت برش‌های تخمدان در سال ۱۳۹۹ از محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین، سه غلظت ساکارز (۱.۵، ۳ و ۴.۵ درصد)، ۰.۸ درصد آگار و سه غلظت NAA (۰.۰۵، ۰.۱ و ۰.۲ میلی‌گرم در لیتر) به صورت یک آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور غلظت ساکارز و غلظت NAA در قالب طرح کاملا تصادفی استفاده شد. اسیدیته محیط کشت با استفاده از اسیدکلریدریک رقیق یا سود ۰/۱ نرمال روی ۰/۱± ۵/۷ تنظیم شد. سپس به میزان ۲۵ میلی لیتر در درون ظروف شیشه‌ای (شیشه‌های ۲۰۰ میلی‌لیتری) توزیع شد. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱/۵ اتمسفر و درجه حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اتوکلاو ضدعفونی شدند.

پس از شستشوی کپسول‌ها با آب و مایع شوینده، با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به همراه ۰/۰۵ درصد توین ۲۰ به مدت ۸ دقیقه ضدعفونی سطحی انجام شد و با آب مقطر استریل آبکشی شدند. برای کشت برش‌های تخمدان، کپسول‌ها با استفاده از پنس و اسکالپل برش خورده و قطعات عرضی تخمدان با ضخامت حدود ۳ میلی‌متر تهیه شده و روی محیط کشت قرار گرفتند. در هر شیشه تعداد ۳ یا ۴ ریزنمونه کشت گردید. سپس نمونه‌های کشت شده به اتاقک رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود 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. در فواصل هفتگی پس از کشت و قرارگیری در اتاقک کشت و تا زمان چهارماه پس از آن، صفات زنده مانی تخمک یا برش‌های تخمدان، قهوه‌ای شدن، بزرگ شدن نمونه و همچنین تولید گیاهچه بررسی و یادداشت برداری شدند.

تجزیه آماری

این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۴ شیشه حاوی ۳ تا ۴ عدد نمونه در هر تکرار انجام گرفت. داده‌های صفات مختلف اندازه گیری شده در زمان‌های مختلف پس از آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم افزار MiniTab، با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹.۱) تجزیه شده و میانگین‌ها نیز با آزمون چنددامنه‌ای دانکن 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 Fangio، Corsini، Arvandrud، Bonbini، Robina، Table Dance، Alusta، Brindisi و Original Love با تعداد کروموزوم 2n=3x= 36، ارقام سه گان (تریپلوئید) و رقم Tressor 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 پلوئیدی آنها موفقیت آمیز 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 کاریوتیپ آنها به دقت بررسی شده است، اما پژوهش‌های اندکی در مورد شمارش کروموزوم و تعیین سطح پلوئیدی سوسن چلچراغ انجام شده است. Moradi Ashur و همکاران (۲۰۱۰) به دلیل کمبود بذر و سوخ کمیاب این گیاه و همچنین مشکل جوانه‌زنی کم بذور و کمبود تعداد ریشه مناسب جهت بررسی نتوانستند تعداد دقیق کروموزوم‌های این گیاه را مشخص کنند.

زنده‌مانی و جوانه زنی دانه گرده

اختلاف معنی داری در سطح یک درصد بین سوسن چلچراغ و ارقام تجاری مورد بررسی به ترتیب در درصد جوانه زنی دانه گرده وجود داشت. نتایج زنده‌مانی دانه گرده نشان داد که زنده بودن دانه‌های گرده بیش از ۶۱ درصد در ارقام مختلف و سوسن چلچراغ بود. نتایج بررسی زنده‌مانی دانه گرده و آزمون جوانه زنی دانه گرده سوسن چلچراغ نشان داد که درصد بالایی از دانه‌های گرده سوسن چلچراغ زنده بوده (۸۶.۴ درصد) و توانایی جوانه زنی دارند. بیش از ۷۵.۷ درصد از گرده‌ها بلافاصله پس از تهیه دانه گرده جوانه‌زنی داشتند (جدول ۱) اما با نگهداری در فریزر و همچنین گذشت زمان، درصد زنده‌مانی و جوانه زنی دانه گرده به تدریج کاهش یافت و با گذشت حدود سه ماه از نگهداری به ۶۳.۲ درصد و با گذشت بیش از شش ماه به ۵۴.۵ درصد کاهش یافت. در مورد ارقام تجاری مورد بررسی نیز، ارقام به سه گروه کاملا مجزا با درصد جوانه زنی کم (کمتر از ۵ درصد)، متوسط (بین ۱۰ تا ۴۰ درصد) و بالا (بیشتر از ۵۰ درصد) تقسیم شدند. بیشترین درصد جوانه زنی دانه گرده در رقم Tressor مشاهده شد. ارقام Ivory Pixie، Paradero، Companion و Corsini در گروه متوسط قرار گرفتند و سایر ارقام با جوانه زنی بسیار کم در گروه جوانه زنی کم قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- سطح چندگانی (پلوئیدی) و میزان جوانه زنی دانه گرده سوسن چلچراغ و ارقام تجاری مورد استفاده.

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

گونه/ رقم Species/ Cultivar	گروه Group	سطح پلوئیدی براساس شمارش	درصد زنده‌مانی دانه گرده	درصد جوانه‌زنی دانه گرده

		Ploidy کروموزوم level based on chromosome count	Survival percentage of pollen grains	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
Tressor	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

حروف مشابه در ستون جوانه‌زنی دانه گرده نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد 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 جوانه زنی گرده در شرایط آزمایشگاهی یکی از مطمئن‌ترین روش‌ها برای ارزیابی دانه گرده است، اما نیاز به تهیه محیط جوانه زنی مناسب دارد و نتیجه آن ممکن است زمان زیادی را نیاز داشته باشد. از بین روش‌های آزمایش سریع و آسان برای زنده‌مانی گرده‌ها با استفاده از رنگ آمیزی، استفاده از رنگ استوکارمین برای تست زنده ماندن گرده دورگ‌های سوسن اورینتال امکان پذیر بوده است (Du et al., 2018).

زنده بودن دانه گرده و پذیرش کلاله از شرط‌های اولیه گرده افشانی موفق و تشکیل دانه در گیاهان گلدار است. Abbasi و همکاران (2019) نیز درصد زنده مانی دانه گرده سوسن چلچراغ مورد استفاده برای دو رگ‌گیری با سوسن‌های تجاری به روش رنگ آمیزی استوکارمن را ۸۵ درصد و درصد جوانه زنی دانه گرده روی محیط کشت را بیش از ۶۰ درصد گزارش کردند که نتایج پژوهش حاضر نیز با آن مطابقت دارد.

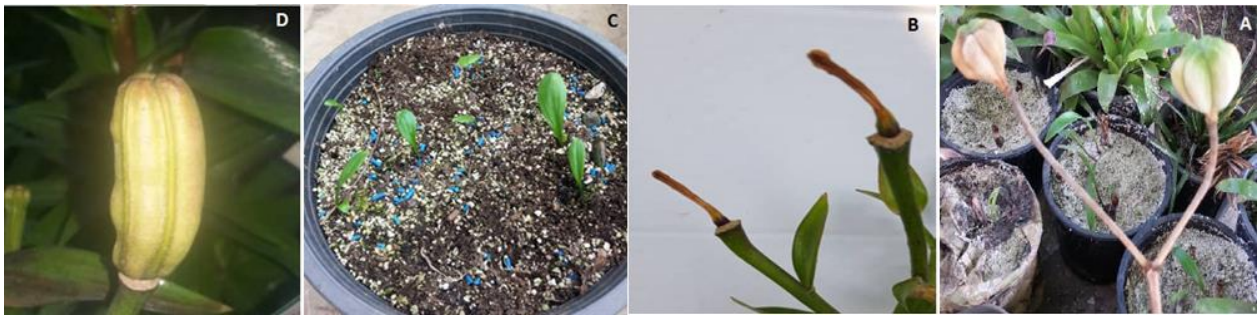
در پژوهش حاضر، درصد زنده بودن دانه گرده در تمامی ارقام تجاری مورد بررسی در حد قابل قبولی (بیش از ۲۵ درصد) بالا بود. اما در درصد جوانه زنی دانه گرده تنوع بسیار زیادی بین گیاهان وجود داشت به طوری که به صورت کاملا مشخص در سه گروه قرار گرفتند. براساس مطالعات قبلی، ارقام تریپلوئید در گیاهان مختلف دانه گرده زنده تولید می‌کنند اما این دانه‌های گرده توانایی جوانه‌زنی خوبی ندارند یا به عبارت دیگر درصد جوانه‌زنی 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 جوانه‌زنی دانه گرده کمتری داشتند، بیشتر بود.

برای لقاح موفق در دورگ گیری گیاهان، کلاله‌ها باید پذیرای دانه گرده باشند و گرده‌ها هم زنده، دارای قابلیت جوانه زنی 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 اصلا گرده تولید نکنند. با این حال، برای بسیاری از محصولات، فیزیولوژی دانه‌های گرده تولید شده توسط گل‌های نر عقیم به طور دقیق بررسی نشده است و اطلاعات کمی در مورد اینکه

چگونه انتقال این گرده به کلاله‌های پذیرنده بر نتایج گرده‌افشانی تأثیر می‌گذارد، وجود دارد. گرده‌هایی که زنده نیستند یا زنده بوده اما توانایی جوانه زنی 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 گرده زنده تأثیر منفی بگذارند (Du et al., 2018; Subasinghe Arachchige et al., 2022). در تولید گیاهان دورگ از گیاهان مادری با سطوح مختلف پلوئیدی، انتخاب والد پدری با گرده زنده و توان جوانه زنی بالا برای تولید موفق گیاهان دورگ ضروری است. با توجه به نتایج جوانه زنی دانه گرده، به نظر می‌رسد برخی از ارقام مورد بررسی مانند Arvandrud، Robina و Original Love به دلیل جوانه زنی بسیار کم دانه گرده به عنوان والد پدری برای دورگ گیری 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 گرده افشانی آزاد اختلاف خیلی زیادی نداشتند و تنها اندکی کوچک‌تر از میوه‌های گرده افشانی آزاد بودند. بذرهای حاصل از گرده‌افشانی آزاد و خود گرده‌افشانی سوسن چلچراغ پس از تیمار چینه سرمایی جوانه زنی 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 گرده افشانی آزاد سوسن چلچراغ (A)، مادگی خشک شده سوسن چلچراغ پس از گرده‌افشانی با گرده رقم تجاری Fangio (B)، بذر جوانه زده سوسن چلچراغ در گرده‌افشانی آزاد (C) و میوه زرد شده سوسن چلچراغ پس از گرده افشانی با گرده رقم Tressor (D).

Fig. 1- Susan-e- Chalcheragh plants native to Damash region as mother parent. Fruit from free pollination of Susan-e Chalcheragh (A), dried pistil of Susan-e Chalcheragh after pollination with commercial cultivar of Fangio (B), germinated seed of Susan-e Chalcheragh in free pollination (C) and yellowed fruit of Susan-e Chalcheragh after pollination with pollen of Tressor 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 پس از 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 Ivory Pixie، Tressor، Nova Zembla، Paradero، Ice Dancer، Bonbini و Brindisi 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 پ تا هشت هفته پس از گرده افشانی 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- Chalcheragh 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
Tressor	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 گرده‌افشانی 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).

Fig. 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 Chalcheragh (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 Chalcheragh (C) and fruit grown without live seeds in cultivar Paradero Five weeks after pollination with Susan-e Chalcheragh (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 جوانه زنی دانه گرده در نظر گرفته شد و بر این اساس تلاقی‌ها انجام شد. ترشح کلاله به‌عنوان نشانه‌ای از پذیرش آن در نظر گرفته شد. براین اساس، کلاله‌ها 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 کلاله، توانایی بالای جوانه زنی 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 گرده‌افشانی شد. نتایج آزمون جوانه زنی دانه گرده این ارقام تجاری در مقایسه با دانه گرده سوسن چلچراغ نشان داد که برخی از ارقام جوانه‌زنی دانه گرده بسیار کمی دارند و ممکن است این موضوع نیز علاوه بر سازگاری ژنتیکی، سبب کاهش تشکیل میوه در این تلاقی‌ها شده باشد که نیازمند بررسی‌های بیشتر است.

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

علاوه بر ناسازگاری که بین بخش‌های سوسن وجود دارد، در گیاهان تریپلوئید، آنیوپلوئید و در مواردی در گیاهان آلوتتراپلوئید، به دلیل میوز غیر طبیعی که در سلول‌های جنسی گیاه رخ می‌دهد، جوانه زنی دانه گرده بسیار پایین است (Xiao et al., 2019, 2022). این موضوع سبب می‌شود که در تلاقی این گیاهان تعداد میوه و بذر بسیار کمتری تشکیل شود. همچنین، این گیاهان می‌توانند به عنوان والد ماده استفاده شوند تا با نرهای مناسب برای تولید نتاج[1] آنیوپلوئید که عموما عقیم هستند را تولید کنند (Xiao et al., 2019). اگرچه سوسن‌های تریپلوئید میوز غیرطبیعی دارند و معمولاً نر عقیم هستند، اما تا حدی ماده بارور هستند. آنها می‌توانند به عنوان والدین ماده برای تلاقی با دیپلوئید/تتراپلوئید مناسب برای 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 عملا میوه‌ای تشکیل نشد. در حالیکه 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 پلوئیدی آنها 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 پلوئیدی 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 تایید

[1]- progeny

کننده این موضوع است. در سوسن‌ها، تلاقی بین دو گونه دور اغلب با موانع قبل و پس از لقاح همراه است. برای غلبه بر چنین مشکلاتی، روش‌های مختلف گرده افشانی برون و درون شیشه‌ای، ایجاد شده است. در این پژوهش هدف اولیه امکان تولید گیاه بدون استفاده از روش‌های گرده‌افشانی و نجات رویان بود. به همین دلیل نیز ابتدا از گیاه سوسن چلچراغ به عنوان والد مادری و در تلاقی‌های بعدی به عنوان والد پدری استفاده شد.

نتایج تورم میوه پس از گرده‌افشانی نشان می‌دهد که در دورگ گیری بین گونه‌ای 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 می‌کند. 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 رویان کروی و قبل از مرحله قلبی شکل متوقف می‌شود. به همین دلیل ممکن است موانع پس از لقاح در عرض ۱۵ تا۲۰ روز پس از گرده افشانی رخ داده باشد.

بررسی امکان نجات رویان در رویان‌های حاصل از تلاقی بین سوسن چلچراغ و رقم Brindisi

در کشت برش‌های تخمدان در سال ۱۳۹۸، پس از گذشت حدود دو هفته از کشت مشاهده شد که تعدادی از برش‌های تخمدان به رنگ‌های سیاه و قهوه‌ای تغییر رنگ داده و به تدریج از بین رفتند. در مقابل برخی از برش‌های تخمدان باقیمانده در محیط به رنگ سبز تغییر یافته اما فاقد رشد و تغییر قابل ملاحظه‌ای بودند. همچنین برخی از برش‌های تخمدان باقیمانده متورم شده و در مواردی تخمک‌های درون آنها شروع به جوانه زنی نمود (شکل۳). براساس نتایج تجزیه واریانس، اثر غلظت ساکارز، غلظت NAA و اثر متقابل آنها بر درصد برش‌های تخمدان سیاه شده در سطح یک درصد معنی دار شد (جدول ۳). همچنین، اثر غلظت ساکارز و اثر متقابل غلظت ساکارز و غلظت NAA در سطح پنج درصد و اثر غلظت NAA در سطح یک درصد بر درصد برش‌های تخمدان قهوه‌ای شده معنی‌دار شد. در مورد صفت برش‌های تخمدان بزرگ شده، اثر غلظت ساکارز و غلظت NAA در سطح یک درصد و اثر متقابل آنها در سطح پنج درصد معنی‌دار شد. در خصوص برش‌های تخمدان دارای تخمک جوانه زده نیز، تنها اثر ساده غلظت ساکارز معنی‌دار شد و اثر غلظت NAA و اثر متقابل آنها معنی‌دار نشد (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر غلظت ساکارز و غلظت NAA بر رشد برش‌های تخمدان حاصل از تلاقی سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری با رقم تجاری Brindisi در زمان شش هفته پس از کشت در سال ۱۳۹۸.

Table 3- Variance analysis of the effect of sucrose and NAA concentration on the growth of ovary slices resulting from the crossing of Susan-e- Chalcheragh as the male parent with the commercial cultivar Brindisi, six weeks after cultivation in 2018.

منابع تغییر Source of variance	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean of square				
		تخمدان سیاه شده Blackened ovary	تخمدان قهوه‌ای شده Browned ovary	تخمدان سبز رنگ Greenish ovary	تخمدان بزرگ شده Enlarged ovary	تخمک جوانه زده Germinated ovule
غلظت ساکارز Sucrose concentration	2	4436.112**	64.04*	120.37*	2880.703**	21.543*
غلظت نفتالین استیک اسید NAA concentration	2	4158.321**	366.81**	178.481**	1065.593**	5.444ns
اثر متقابل ساکارز NAA Interaction of Sucrose × NAA	4	278.76**	63.37*	44.037ns	71.259*	5.444ns
خطا	18	28.70	16.52	27.333	22.518	6.074

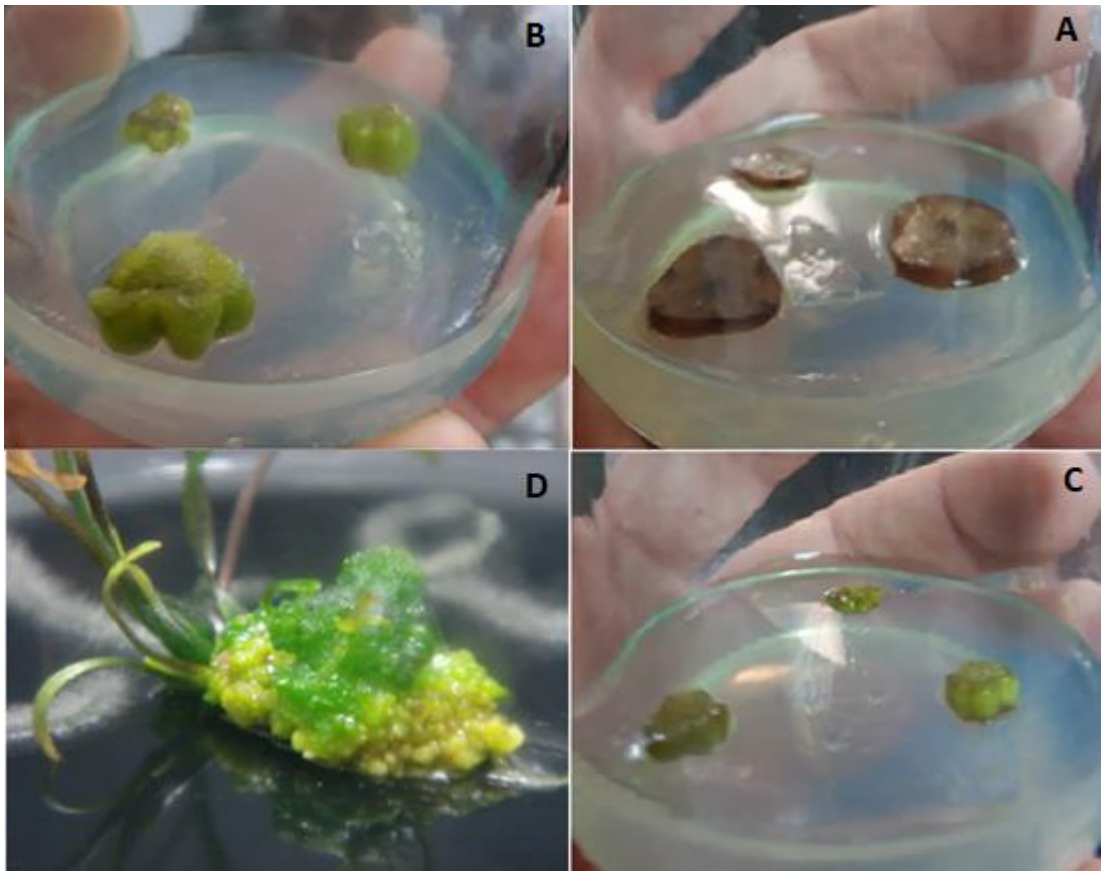
Error ضریب تغییر C.V. (%)	-	20.14	30.31	32.15	23.77	31.26

**، * و ns به ترتیب معنی دار در سطح احتمال یک درصد، ۵ درصد و غیر معنی دار

**, * and ns represent significant at of 1% and 5% probability level and not significant, respectively.

براساس مقایسه میانگین‌ها، بالاترین درصد سیاه شدن برش‌های تخمدان (۹۰ درصد) در تیمار ساکارز ۹ درصد به همراه ۰.۵ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد. پس از آن نیز تیمار ساکارز ۶ درصد به همراه ۰.۵ میلی گرم در لیتر NAA قرار گرفت. کمترین میزان سیاه شدن برش‌های تخمدان در تیمار ۳ درصد ساکارز به همراه غلظت صفر ساکارز مشاهده شد. در هر کدام از غلظت‌های ساکارز، با افزایش غلظت NAA، میزان سیاه شدن برش‌های تخمدان افزایش یافت (جدول ۴). در مورد قهوه‌ای شدن برش‌های تخمدان، بیشترین درصد در تیمار ۹ درصد ساکارز و بدون NAA مشاهده شد که با تیمار ۳ درصد ساکارز و بدون NAA اختلاف معنی داری نداشت. در تمامی غلظت‌های ساکارز با افزایش غلظت NAA، میزان قهوه‌ای شدن برش‌های تخمک کاهش یافت. کمترین میزان قهوه‌ای شدن برش‌های تخمدان در تیمار ۹ درصد ساکارز به همراه درصد به همراه ۰.۵ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد. در مورد صفت برش‌های تخمدان سبز رنگ بدون رشد، بیشترین درصد در تیمار ۶ درصد ساکارز و بدون NAA (۲۳.۳۳ درصد) مشاهده شد که با بسیاری از تیمارهای دیگر اختلاف معنی داری را نداشت. کمترین مقدار درصد برش‌های تخمک سبز رنگ در تیمار ۹ درصد ساکارز و ۰.۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد که با تیمارهای ۹ درصد ساکارز به همراه درصد به همراه ۰.۱ میلی گرم در لیتر NAA، ۳ و ۶ درصد ساکارز به همراه ۰.۵ میلی گرم در لیتر NAA اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۴).

در مورد برش‌های تخمدان بزرگ شده، بیشترین درصد در تیمار ۳ درصد ساکارز و بدون NAA مشاهده شد. پس از آن نیز تیمار ساکارز ۳ درصد به همراه ۰.۵ میلی گرم در لیتر NAA قرار گرفت که با تیمار ساکارز ۶ درصد بدون NAA اختلاف معنی داری نداشت. در تیمارهای ۹ درصد ساکارز به همراه هردو غلظت ۰.۱ و ۰.۵ میلی گرم در لیتر NAA و همچنین تیمار ۶ درصد ساکارز به همراه غلظت ۰.۵ میلی گرم در لیتر NAA بزرگ شدن محسوسی در برش‌های تخمدان مشاهده نشد (جدول ۴). در مورد درصد برش‌های تخمدان دارای تخمک جوانه زده، در دو تیمار ساکارز ۳ درصد به همراه NAA ۰.۱ و ۰.۵ میلی گرم در لیتر جوانه زنی تخمک در برش‌های تخمدان مشاهده شد. در بقیه تیمارها جوانه‌زنی تخمک مشاهده نشد (جدول ۴).



شکل ۳- تخمدان برش یافته حاصل از تلاقی سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری و رقم تجاری Brindisi به عنوان والد مادری روی محیط کشت در سال ۱۳۹۸. تخمدان سیاه شده (A)، تخمدان بزرگ شده (B)، تخمدان سبز رنگ (C) و تخمدان با تخمک جوانه زده (D).

Fig. 3- Ovary slice culture resulting from the crossing of Susan-e Chalcheragh as the male parent and Brindisi cultivar as the female parent on culture medium in 2019. Blackened ovary (A), enlarged ovary (B), green ovary color (C) and ovary with germinated ovule (D).

جدول ۴- اثر غلظت ساکارز و NAA بر رشد برش‌های تخمدان حاصل از تلاقی سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری با رقم تجاری Brindisi در زمان شش هفته پس از کشت در سال ۱۳۹۸.

Table 4- The effect sucrose and NAA concentration on the growth of ovary slices resulting from crossing Susan-e- Chalcheragh as the male parent with the commercial cultivar Brindisi, six weeks after planting in 2019.

تیمار Treatment	تخمدان سیاه شده Blackened ovary (%)	تخمدان قهوه‌ای شده Browned ovary (%)	تخمدان سبز رنگ Greenish ovary (%)	تخمدان بزرگ شده Enlarged ovary (%)	تخمک جوانه زده Germinated ovule (%)
غلظت ساکارز Sucrose concentration (%)					
3	27.22c	16.44a	17.22ab	40.33a	6.67a
6	55.00b	12.23b	19.32a	13.23b	0.00[b]
9	71.11a	11.44b	12.23b	6.33c	0.00[b]
غلظت نفتالین استیک اسید NAA concentration (mg/l)					
0.0	27.22c	20.67a	20.00a	32.11a	0.00a
0.1	57.22b	10.89b	17.44a	16.67b	1.22a

0.5	68.89a	8.67b	11.33b	11.11c	1.44a
اثر متقابل غلظت ساکارز و غلظت NAA Interaction of sucrose concentration and NAA concentration					
S 3- NAA 0.0	13.33g	22.67a	16.67ab	47.33a	0.00b
S 3- NAA 0.1	26.67f	15.67b	21.67a	10.00e	3.67a
S 3- NAA 0.5	41.67d	11.67bc	13.33abc	33.33bc	4.33a
S 6- NAA 0.0	31.67ef	15.00b	23.33a	30.33c	0.00b
S 6- NAA 0.1	58.33c	11.33bc	20.67a	10.00e	0.00b
S 6- NAA 0.5	75.00b	11.00bc	14.00abc	0.00f	0.00b
S 9- NAA 0.0	36.67de	24.33a	20.00a	19.00d	0.00b
S 9- NAA 0.1	86.67a	6.67cd	10.00bc	0.00f	0.00b
S 9- NAA 0.5	90.00a	3.33d	6.67c	0.00f	0.00b

حروف مشابه در هر ستون و گروه تیماری نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

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

در کشت برش‌های تخمدان در سال۱۳۹۹، براساس نتایج تجزیه واریانس، اثر غلظت ساکارز، غلظت NAA و اثر متقابل آنها بر درصد برش‌های تخمدان سیاه شده، درصد برش‌های تخمدان قهوه‌ای شده، درصد برش‌های تخمدان سبز رنگ، درصد برش‌های تخمدان بزرگ شده و درصد تخمک جوانه زده در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۵).

مقایسه میانگین‌های اثر متقابل غلظت ساکارز و غلظت NAA نشان داد که بالاترین درصد سیاه شدن برش‌های تخمدان (۹۰.۷۰ درصد) در تیمار ساکارز ۴.۵ درصد به همراه ۰.۲ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد. پس از آن نیز تیمار ساکارز ۴.۵ درصد به همراه ۰.۱ میلی‌گرم در لیتر NAA قرار گرفت. کمترین میزان سیاه شدن برش‌های تخمدان در تیمار ۱.۵ درصد ساکارز به همراه غلظت ۰.۲ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد. در حالی که در غلظت ۴.۵ درصد ساکارز با افزایش غلظت NAA، میزان سیاه شدن برش‌های تخمدان افزایش یافت، در دیگر غلظت‌های ساکارز الگوهای متفاوتی از درصد سیاه شدن برش‌های تخمدان با افزایش غلظت NAA مشاهده شد (جدول ۶).

در مورد قهوه‌ای شدن برش‌های تخمدان، بیشترین درصد (۵۹.۳۳ درصد) در تیمار ۳ درصد ساکارز و ۰.۰۵ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد. پس از آن نیز تیمارهای ساکارز ۳ درصد به همراه ۰.۲ میلی گرم در لیتر NAA و ساکارز ۴.۵ درصد به همراه ۰.۱ میلی گرم در لیتر NAA قرار گرفت. کمترین میزان قهوه‌ای شدن برش‌های تخمدان در تیمار ۱.۵ درصد ساکارز به همراه ۰.۱ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد که با تیمارهای ۱.۵ درصد ساکارز به همراه ۰.۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۴.۵ درصد ساکارز به همراه ۰.۰۵ میلی گرم در لیتر NAA اختلاف معنی داری نداشت (جدول ۶). در مورد برش‌های تخمدان سبز رنگ، بیشترین درصد در تیمار ۱.۵ درصد ساکارز و بدون NAA مشاهده شد که با تیمار ۴.۵ درصد ساکارز و غلظت ۰.۰۵ میلی گرم در لیتر NAA اختلاف معنی داری نداشت. کمترین درصد برش‌های تخمدان سبز رنگ در تیمار ۳ درصد ساکارز به همراه درصد به همراه ۰.۰۵ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد. در دو تیمار ساکارز ۴.۵ درصد به همراه ۰.۱ و ۰.۲ میلی گرم در لیتر NAA تمامی برش‌های تخمدان در مراحل اولیه سیاه یا قهوه‌ای شدند و از بین رفته بودند (جدول ۶).

در مورد صفت برش‌های تخمدان بزرگ شده، بیشترین درصد (۵۹.۶۷ درصد) در تیمار ۱.۵ درصد ساکارز و ۰.۲ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد. پس از آن نیز تیمار ساکارز ۴.۵ درصد به همراه ۰.۰۵ میلی گرم در لیتر NAA و تیمار ۱.۵ درصد ساکارز به همراه ۰.۱ میلی گرم در لیتر NAA قرار گرفت. کمترین میزان درصد برش‌های تخمدان بزرگ شده در تیمارهای ۳ درصد ساکارز به همراه غلظت‌های ۰.۰۵ و ۰.۱ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد (جدول ۶). در مورد درصد برش‌های

تخمدان دارای تخمک جوانه زده، بیشترین درصد در تیمار ۳ درصد ساکارز به همراه ۰.۱ میلیگرم در لیتر NAA مشاهده شد. پس از آن نیز تیمار ساکارز ۳ درصد به همراه ۰.۲ میلی گرم در لیتر NAA قرار گرفت. در سایر تیمارها جوانه زنی تخمک در برش‌های تخمدان مشاهده نشد (جدول ۶). با اینکه کشت‌های انجام شده تا ۱۲ هفته پس از کشت نگهداری شدند اما در جوانه زنی تخمک‌ها در برش‌های تخمدان تغییری مشاهده نشد.

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر غلظت ساکارز و غلظت NAA بر رشد برش‌های تخمدان حاصل از تلاقی سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری با رقم تجاری Brindisi در زمان شش هفته پس از کشت در سال ۱۳۹۹.

Table 5. Variance analysis of sucrose concentration and NAA concentration on the growth of ovary slices resulting from the crossing of Susan-e- Chalcheragh as the male parent with the commercial cultivar Brindisi, six weeks after cultivation in 2020.

منابع تغییر Source of variance	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean of square				
		تخمدان سیاه شده Blackened ovary	تخمدان قهوه‌ای شده Browned ovary	تخمدان سبز رنگ Greenish ovary	تخمدان بزرگ شده Enlarged ovary	تخمک جوانه زده Germinated ovule
غلظت ساکارز Sucrose concentration	2	2928.287**	1412.533**	438.533**	2233.533**	172.800**
غلظت نفتالین استیک اسید NAA concentration	2	1696.047**	391.258**	344.103**	108.533**	44.978**
اثر متقابل ساکارز NAA Interaction of Sucrose × NAA	4	1969.761**	685.485**	441.884**	1681.985**	41.051**
خطا Error	18	26.183	16.314	4.275	8.784	2.078
ضریب تغییر C.V. (%)	-	23.62	18.79	13.67	12.67	32.06

**معنی دار در سطح احتمال یک درصد

** represent significant at of 1% probability level.

جدول ۶- اثر غلظت ساکارز و غلظت NAA بر رشد برش‌های تخمدان حاصل از تلاقی سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری با رقم تجاری Brindisi در زمان شش هفته پس از کشت در سال ۱۳۹۹.

Table 6- The effect sucrose and NAA concentration on the growth of ovary slices resulting from crossing Susan-e Chalcheragh as the male parent with the commercial cultivar Brindisi, six weeks after planting in 2020.

تیمار Treatment	تخمدان سیاه شده Blackened ovary (%)	تخمدان قهوه‌ای شده Browned ovary (%)	تخمدان سبز رنگ Greenish ovary (%)	تخمدان بزرگ شده Enlarged ovary (%)	تخمک جوانه زده Germinated ovule (%)
غلظت ساکارز Sucrose concentration (%)					
1.5	19.28c	11.38c	24.13a	45.25a	0.00b
3.0	34.03b	36.00a	18.67b	11.33c	9.00a
4.5	57.37a	16.00b	10.67c	16.00b	0.00b
غلظت نفتالین استیک اسید NAA concentration (mg/l)					

0.05	19.54b	35.50a	24.75a	25.25a	0.00b
0.1	47.69a	19.00b	14.11b	19.22b	4.44a
0.2	43.48a	16.00b	14.67b	25.89a	3.56a
اثر متقابل غلظت ساکارز و غلظت NAA					
Interaction of sucrose concentration and NAA concentration					
S 1.5-NAA 0.05	21.05d	19.00c	33.00a	17.00c	0.00c
S 1.5- NAA 0.1	21.67de	8.33d	20.33b	49.67b	0.00c
S 1.5- NAA 0.2	9.03f	9.33d	22.33b	59.67a	0.00c
S 3- NAA 0.05	20.70e	59.33a	12.00c	8.00d	0.00c
S 3- NAA 0.1	50.33c	19.33c	22.00b	8.00d	13.33a
S 3- NAA 0.2	30.67d	29.33b	22.67b	18.00c	10.67b
S 4.5- NAA 0.05	10.70f	9.33d	32.00a	48.67b	0.00c
S 4.5- NAA 0.1	70.70b	29.33b	-	-	-
S 4.5- NAA 0.2	90.70a	9.33d	-	-	-

حروف مشابه در هر ستون و گروه تیماری نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

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

عوامل گوناگونی بر موفقیت یا عدم موفقیت دورگ‌گیری و نجات رویان پس از آن تأثیر دارند. در این پژوهش، تلاقی بین سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری و رقم Brindisi به عنوان والد پدری و سپس استفاده از تکنیک کشت درون شیشه‌ای برش‌های تخمک، سبب جوانه زنی تعدادی از تخمک‌ها در برخی از ترکیبات محیط‌های کشت و در پی آن تولید گیاهچه گردید. اگرچه تعداد گیاهچه‌های بدست آمده بسیار کم بود اما به نظر می‌رسد نسبت گیاهچه‌های بدست آمده برای اهداف اصلاحی، 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). با اینکه در پژوهش حاضر امکان بررسی همه فاکتورهای موثر بر موفقیت نجات رویان وجود نداشت اما نتایج پژوهش حاضر نشان داد که غلظت ساکارز و غلظت NAA تاثیر معنی‌داری بر زنده ماندن برش‌های تخمدان، رشد و بزرگ شدن برش‌های تخمدان و جوانه زنی تخمک‌های موجود در این برش‌ها 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 جوانه زنی در تخمک‌ها مشاهده شد. این موضوع در نتایج پژوهش‌های قبلی نیز گزارش شده است. Wang و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی دو رگ‌گیری بین گونه‌ای بین بخش لانگی‌فلوروم 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 گرده افشانی روی محیط B5 یا B5 نصف غلظت حاوی ساکارز، تولید گیاهچه را مشاهده کردند. در تلاقی آنها ۱.۱۷ درصد از تخمک کشت شده در ۱۰ روز پس از گرده‌افشانی به گیاه تبدیل شدند. نتایج آنها نشان داد که دورگ‌گیری بین گونه‌ای مانع جدی‌تری پس از لقاح نسبت به دورگ‌گیری درون گونه‌ای داشت و غلظت کمتر (۳ درصد) ساکارز منجر به رشد بهتر جنین و درصد بالاتری از نهال‌ها در کشت تخمک شد.

۱- Lofoforum

Abbasi و همکاران (۲۰۱۹) در تلاقی سوسن چلچراغ به عنوان والد گرده دهنده یا پدری با سه رقم از گونه‌های آسیاتیک (Tressor، Pirandello و Ceb duzzel) و چهار رقم از گونه‌های اورینتال (Rialto، Sorbonne، Paradero و Manissa) 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 (۲۰۱۹) 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). براساس نتایج Van Tuyl و همکاران (۱۹۹۱)، استفاده از ساکارز ۱۰ درصد و ۱ میلی گرم در لیتر NAA برای کشت برش‌های تخمدان موفق بود. اما در مطالعه Wang و همکاران (۲۰۰۹)، نتایج نشان داد که غلظت ۳ درصد ساکارز منجر به رشد بهتر جنین و درصد بالاتر نهال در کشت تخمک دورگ در زمان ۱۰ و ۲۵ روز پس از گرده افشانی 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 پژوهش حاضر غلظت‌های بالای ساکارز اثر مثبتی بر ویژگی‌های مورد بررسی نداشت و در ابتدای کاشت برش‌های تخمدان نیز سبب افزایش درصد تخمک‌های سیاه شده در ترکیب با غلظت بالای NAA را نشان داد.

در این پژوهش برای رفع موانع پس از تلاقی بین گونه‌ای در تلاقی سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری با ارقام تجاری، در ارقامی که پس از گرده‌افشانی میوه تشکیل شده بود بصورت موفقیت آمیزی از روش‌های کشت تخمک و کشت برش‌های تخمدان استفاده شد. نتایج نشان داد که ناسازگاری پس از لقاح، با کشت درون شیشه ای رویان‌های نجات یافته رفع می شود. علاوه بر این، کشت درون شیشه ای می‌تواند باعث افزایش زنده‌مانی بذرهای نابالغ شود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده، 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 به عنوان والد مادری، علاوه بر محدودیت‌های تامین گیاهان مادری، محدودیت‌هایی نیز از لحاظ عدم تولید دانه گرده زنده در بسیاری از ارقام تجاری هست و به همین دلیل در بسیاری از موارد امکان تلاقی وجود ندارد. استفاده از سوسن چلچراغ به عنوان والد پدری در تلاقی با برخی از ارقام تجاری سوسن، امکان پذیر است. در پژوهش حاضر، مشخص شد که امکان تلاقی گرده سوسن چلچراغ با ارقام Ivory Pixie، Landini، Tressor، Nova Zembla، Paradero، Ice Dancer، Corsini، Bonbini، Robina، Table Dance، Alusta، Richmond، Brindisi 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 برش‌های تخمدان در رقم Brindisi نشان داد که غلظت ساکارز و غلظت NAA بر زنده مانی برش‌های تخمدان و تورم آن‌ها موثر است. در این پژوهش، جوانه زنی تخمک‌ها در برش‌های تخمدان در تیمار ۳ درصد ساکارز به همراه ۰.۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و تیمار ساکارز ۳ درصد به همراه ۰.۲ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد. در کل، به نظر می‌رسد امکان تلاقی سوسن چلچراغ به عنوان 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 گرده افشانی و همچنین تکنیک‌های نجات رویان با استفاده از محیط کشت‌های بهینه وجود دارد.

منابع

Abbasi H., Naderi R., Kafi M., Azadi P. and 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. and Omidi M. (2008). Laboratory Methods of Cytogenetic. Tehran University Press. 188 p. (In Persian).

Azadi P. and Khosh-Khui M. (2007). Micropropagation of *Lilium ledebourii Bioss.*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., and Khalighi, A. (2010). Effects of light, sucrose, and cytokinins on somatic embryogenesis in *Lilium ledebourii* (Baker) Bioss. *via* transverse thin cell-layer cultures of bulblet microscales. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 85(6), 491-496.

Beal, J. M. (1943). Histological studies on parthenocarpic fruits of *Lilium* regale induced by growth substances. *Botanical Gazette*, 105(1), 25-34.

Chi, H. S. (2002). The efficiencies of various embryo rescue methods in interspecific crosses of *Lilium*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 43.

Chung MY, Chung JD, Ramanna M, van Tuyl JM, Lim KB. (2013) Production of polyploids and unreduced gametes in Lilium auratum × L. henryi hybrid. *Int. J. Biol. Sci*. 19;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.

Du, Y. P., Bi, Y., Zhang, M. F., Yang, F. P., Jia, G. X., & Zhang, X. H. (2017). Genome size diversity in Lilium (Liliaceae) is correlated with karyotype and environmental traits. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1303.

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 Genet. 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.

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T., & Geneve, R. L. (2014). Plant Propagation: Principles and Practices, Prentice-Hall Inc.

He, G., Hu, F., Ming, J. et al. (2017). Pollen viability and stigma receptivity in *Lilium* during anthesis. *Euphytica* 213, 231.

Ikeda, 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, MJ., Ramzan, F., Ahn, YJ. et al. (2017) Chromosomal analysis of *Lilium longiflorum* x Asiatic hybrids using GISH (genomic in situ hybridization). Hortic. Environ. Biotechnol. 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.

Marasek-Ciolakowska, Agnieszka, Dariusz Sochacki, and Przemysław Marciniak. 2021. Breeding aspects of selected ornamental bulbous crops. *Agronomy*, 11(9): 1709.

Moradi Ashur B., Mohammadi R. and 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 bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3), 473-497.

Rechinger KH (1989) Flora Iranica, no. 165, Liliaceae. Akademische Druck-u, Verlgsantalt, Graz.

Robinson, K.E.P. and Firozabady, E. (1993) Transformation of floriculture crops. Scientia Horticulturae 55:83-99.

Saeedifard M., Hosseini S.M. and Padasht Dehkaie M.N. (2008). Modelling 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.

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: Ornamental Crops, ed. J. van Huylenbroeck (Berlin: Springer), 481–512.

Van Tuyl, J. M., Straathof, T. P., Bino, R. J., & Kwakkenbos, A. A. M. (1988). Effect of three pollination methods on embryo development and seedset in intra-and interspecific crosses between seven *Lilium* species. *Sexual Plant Reproduction*, 1(2), 119-123.

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, Mz. et al. (2009). Production of interspecific hybrids between Lilium longiflorum and L. lophophorum var. linearifolium via ovule culture at early stage. Euphytica 167, 45.

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., ... & 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.

Younis, A., Ramzan, F., Hwang, Y. J., & Lim, K. B. (2015). FISH and GISH: molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants. *Plant Cell Reports*, 34(9), 1477-1488.

Zhou J., An R. and Huang X., (2021). Genus Lilium: A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 270, 113852.

Zhou, S., Li, K., & Zhou, G. (2012). Analysis of endosperm development of allotriploid× diploid/tetraploid crosses in *Lilium*. *Euphytica*, 184(3), 401-412.

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., Zhong, L., Zhang, L., Xu, Z., Liu, X., Li, K., & Zhou, G. (2015). Study on the homology of the genomes of tetraploid Asiatic lilies (*Lilium*) using FISH. Genome, 58(11), 453-461.

Zhou, S., Zhou, G., & Li, K. (2011). Euploid endosperm of triploid × diploid/tetraploid crosses results in aneuploid embryo survival in *Lilium*, HortScience, 46(4), 558-562.

Flower and Ornamental Plants (2023), 8(1)
Research article

Investigating the hybridization of *Lilium ledebourii* with some commercial liliy cultivars and the possibility of embryo rescue in embryos resulting from this species and Brindisi cultivar

Younes Mahdavi Fikejvar[1], Pejman Azadi[2*], Freshteh Nematolahi[3]

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

Abstract

Susan-e- Chelcharagh (*Lilium ledebourii*), is one of the rare and native plant species of Iran distributed in the northern heights of Alborz. In the present study, the possibility of crossing Susan-e- Chelcheragh with some commercial lilies was investigated. First, the cytogenetic status of Susan-e- Chelcheragh was compared with a number of commercial cultivars. Then, crossbreeding of Susan-e- Chelcheragh with a number of commercial *Lilium* cultivars was assessed using the usual crossbreeding method. The possibility of embryo rescue using ovary slice culture in the maternal parent Brindisi crossed with Susan-e- Chelcheragh was evaluated. The results showed that Susan-e- Chelcheragh is a diploid species. Susan-e- Chelcheragh is a species with active pistil and pollen and has high fertility rate. In the crossing of Susan-e Chelcheragh as a maternal parent with commercial cultivars, all the pistils fell and died after two weeks. No fruits were formed in the crossing of Susan-e- Chelcharagh as the male parent with the t cultivars Companion, Fangio and Arvandrud as the maternal parent. In the rest of the examined cultivars, the formed fruits gradually disappeared and until the eighth week, no fruits remained and no seeds were formed. The findings of ovarian slices culture, also showed that sucrose concentration and NAA concentration, significantly affect the survival and enlargement of ovarian slices. The highest ovule germination was observed in the treatment of 3% sucrose along with 0.1 mg/L NAA. After that, 3% sucrose treatment along with 0.2 mg/L NAA was applied. In general, it seems possible to cross Susan-e- Chelcheragh as a male parent with some commercial cultivars by considering and removing obstacles before and after fertilization using pollination techniques and embryo rescue techniques and optimal media culture.

Keywords: flow cytometry, ploidy level, embryo rescue, Susan-e- Chelcheragh.