

دستورالعمل فنی

تولید پدازه در گلايول، راهكاري مناسب در صنعت توليد گياهان زيتي

(روش های تولید، تکثیر غیر جنسی، رفع خواب، بلوغ و سازگاری)



نویسندگان

پریسا کوباز

محمد فتحی قره بابا

رسالة المصطفى
إلى الأئمة



نوع نشریه: دستورالعمل فنی

نام نشریه: تولید پدازه در گلابول، راهکاری مناسب در صنعت تولید گیاهان زینتی

نویسندگان: پریسا کوباز و محمد فتحی قره بابا

ویراستار علمی:

ویراستاران ادبی:

تهیه شده در: سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی

شمارگان:

نوبت انتشار: اول

سال انتشار:

مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است



شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی ۶۶۸۵۲ به تاریخ ۱۴۰۳/۱۱/۲۹ است



تولید پدازه در گلايول، راهكاري مناسب در صنعت توليد گياهان زيتي

نويسندگان

پريسا كوباز

محمد فتحي قره بابا

فهرست مطالب

مقدمه	۵
ارقام مورد استفاده	۸
ضد عفونی ریز نمونه	۸
محیط کشت مورد استفاده	۸
استفاده از شکر بیشتر در تولید و افزایش اندازه پدازک	۹
سازگاری و شکست خواب	۱۰
ریشه زایی و برگ دهی از پدازه کشت بافتی	۱۰
استفاده از هورمون در افزایش تعداد، وزن و قطر پدازک های تولیدی	۱۱
اثرات استفاده از هورمون در افزایش طول و تعداد برگ ها و جوانه ها	۱۲
رفع خواب پدازه با استفاده از سرما و جیبرلین	۱۴
کشت دوره ای برای بلوغ پدازک ها و گلدهی	۱۶
برآورد اقتصادی	۱۷
نتیجه گیری کلی	۱۸
منابع	۲۰

مقدمه

کشت گیاهان زینتی با رشد چشمگیری در سال‌های اخیر بخصوص در کشورهای نزدیک خط استوا همراه بوده است. با وجود دوری از بازارهای اروپایی و آمریکایی به دلیل شرایط آب و هوایی مناسب کشورهای کنیا، کلمبیا و اتیوپی با رشد گیاهان زینتی متنوع سهم خوبی در بازارهای بزرگ گل پیدا کرده‌اند. طبق آمار سال ۱۴۰۱ معاونت تولیدات گیاهی وزارت جهاد کشاورزی در مجموع حدود ۸۲۰۰ هکتار شامل ۳۵۰۰ هکتار گلخانه و ۴۷۰۰ هکتار فضای باز در ۱۰ استان برتر کشور به کشت گیاهان زینتی اختصاص دارد. این میزان کشت حدود ۱/۵ تا ۲ درصد از کشت جهانی گیاهان زینتی را به خود اختصاص داده است ولی متأسفانه کمتر از ۱/۱ درصد از آن در صادرات نقش دارد. بر اساس آخرین آمار سال ۱۴۰۲ میزان صادرات گیاهان زینتی ۱۶۲ میلیون دلار اعلام شده است که بیشترین آن گیاهان گلدانی، درختی و درختچه‌های زینتی می‌باشند و بخش کمی اختصاص به گل‌های شاخه بریده دارد. با وجود اینکه ایران رتبه پنجم را در بین تولید کنندگان گیاهان زینتی دارد ولی در حوزه صادرات رتبه ۱۰۷ را دارد. از طرف دیگر میزان واردات اندام‌های تکثیری در سال ۱۴۰۱، ۳/۲۹ میلیون دلار بوده است که بیشترین حجم واردات آن به انواع پیاز گیاهان زینتی از جمله گلابول مربوط می‌شود. تولید گیاهان پیازی می‌تواند علاوه بر ممانعت از خروج ارز، در تولید گل‌های شاخه بریده و صادرات آن نقش مهمی داشته باشد.

گلابول (*Gladiolus*) یکی از گیاهان شاخه بریده زینتی در ایران است که با وجود تنوع زیاد در دیگر گیاهان زینتی تولیدی در دنیا، همچنان جایگاه اول خود در در ایران از نظر تولید گل‌های شاخه بریده را حفظ کرده است. راحتی کشت، مشکلات کمتر نسبت به سایر گیاهان شاخه بریده و پیازی بودن، از دلایل محبوبیت گلابول در بازار ایران است که آن را جزء اولین گیاهان پیازی مورد استفاده زینتی قرار داده است. تکثیر این گیاه به هر دو روش جنسی و غیر جنسی انجام می‌شود. روش کاشت بذر، به دلیل تفرق ژنتیکی منجر به تکثیر نوع مطلوب و خالص رقم نمی‌شود و تمام گیاهان بذری تولید شده نسبت به یکدیگر و والدین‌شان متفاوت هستند (Szczepaniak et al., 2016) همچنین بذر گلابول در فصل بهار کاشته می‌شود و پس از دو تا سه سال (در شرایط مساعد محیطی) به گل‌دهی می‌رسد (قاسمی قهساره و کافی، ۱۳۸۶). به خاطر مشکلات موجود، کاشت بذر اصلاً متداول و مقرون به صرفه نیست و فقط جهت کارهای اصلاحی و به نژادی از آن استفاده می‌شود. بنابراین بهترین روش برای ازدیاد گلابول، کشت پدازه می‌باشد. برای ازدیاد از پدازک‌های کوچکی که در اطراف پدازه مادری می‌رویند، استفاده می‌شود. این پدازک‌های ریز به طور فراوان در قسمت تحتانی پدازه اصلی تولید می‌شوند و در فصل بهار یا اواخر پاییز از پدازه مادری جدا می‌شوند. (کافی و قهساره، ۱۳۸۶) (شکل ۱). پدازک‌های با قطر کوچک‌تر از سه سانتی‌متر گل نمی‌دهند، از این رو پدازه‌های با قطر ۳/۵ تا ۵ سانتی‌متر برای کشت ترجیح داده می‌شوند در تکثیر سنتی از طریق پدازک‌های تولیدی در کنار پدازه اصلی، رشد پدازک‌های اولیه بسیار کم بوده و برای تبدیل شدن این پدازک‌ها به پدازه‌های تجاری با گل‌دهی مناسب باید حداقل ۳ تا ۴ دوره رویشی را طی کنند که حداقل ۳ سال زمان می‌برد. به دلیل تقاضای زیاد استفاده از این گل و زمان طولانی ایجاد پدازه‌های جدید دارای تولید تجاری، هر ساله از کشورهای اروپایی (به خصوص هلند) پدازه گلابول به کشور وارد می‌شود. واردات پیاز این گل در سال ۱۳۹۶ به کشور حدود ۱۲۰ میلیارد تومان بوده است (عبادزاده و همکاران، ۱۳۹۷). با توجه به افزایش قیمت دلار و افزایش تحریم‌ها امکان واردات هر ساله سخت‌تر شده و ارزش بیشتری از کشور خارج می‌شود. در کشورهایی که بومی گونه‌های این جنس هستند مطالعات گسترده‌ای برای تکثیر و معرفی آن به بازار جهانی صورت گرفته است. ریزازدیادی در محیط درون شیشه به عنوان یک روش جایگزین روش‌های تجاری برای تکثیر مورد توجه زیادی قرار گرفته است و در گیاهان پیازی روش دیگری به غیر از روش‌های سنتی برای تکثیر رویشی گیاه ایجاد کرده است. با استفاده از تکنیک کشت بافت، امکان تکثیر فراوان این گیاه و صدور آن به بازار جهانی گل فراهم گردیده است. در کشور هلند در مرحله اول تولید پیازهای زینتی از کشت بافت استفاده می‌کنند تا تعداد زیاد، یکنواختی و سرعت بیشتری در تولید پیاز داشته باشند.

از سال ۱۹۵۰ از تکنیک‌های درون شیشه (in vitro) به منظور ایجاد گیاهان ژئوفیت پیازی استفاده شده است. از بین روش‌های موجود برای فرایندهای نموی برای ژئوفیت (Geophyte) در گلائیول‌ها از روش Axillary buds development برای تکثیر غیر جنسی استفاده می‌کنند (Hussey, 1977). تولید ساقه در شرایط درون شیشه از طریق باززایی مستقیم روشی سریع و کارآمد برای تکثیر در گیاهان پیازی است اما باززایی از طریق کالوس موجب تنوع سوماکلونال در نمونه‌های باززا شده می‌شود. نرخ باززایی در ساقه به عوامل مختلف از جمله نوع قطعه جداگشت، ترکیب محیط کشت و ترکیبی از تنظیم کننده‌های رشد و ژنوتیپ گیاهی بستگی دارد. قطعات جداگشت مختلف از جمله نوک ساقه (Sutter, 1986; Hussain et al., 2001)، جوانه‌های راسی (Priyakumari and Sheela, 2005)، قاعده برگ (Prasad and Gupta, 2006)، مریستم (Aftab et al., 2008) پدازه و پداژک، قطعاتی از گل آذین (Ziv and Lilien-Kipnis, 2000) برای باززایی در شرایط درون شیشه مورد آزمون قرار گرفته‌اند. پدازه‌های مورد استفاده منبع مناسبتری نسبت به مریستم برای باززایی می‌باشند (Aftab et al., 2008). در آزمایشی روی ارقام تجاری گلائیول در محیط کشت با محیط کامل و محیط با نص میزان عناصر ماکرو از محیط (Murashige and Skoog media) همراه حداقل دو میلی گرم بنزیل آدنین یا بنزیل آمینو پورین و مقادیر ۰/۱ میلی گرم نفتالن استیک اسید موجب پرآوری ساقه‌های گلائیول شدند. البته میزان تنظیم کننده‌های رشد و محیط کشت بسته به نوع رقم متفاوت است (کوباز و همکاران ۱۴۰۰: Priyakumari and Sheela, 2005). با توجه به وجود تنوع سوماکلونال، صرف زمان و هزینه بیشتر و بازدهی کمتر در روش تولید کالوس، در این تحقیق تنها از روش باززایی مستقیم استفاده شد. ریشه‌زایی با استفاده از مقادیر مختلف اکسین‌ها، زغال فعال و سوکروز گزارش شده است (Lilien-Kipnis and Kochba 1987).

سوکروز نقش بسیار مهمی در شاخه‌زایی، تکثیر شاخه‌ها، جنین زایی سوماتیک، ریشه‌زایی و رشد پداژک‌ها دارد (Roy et al., 2006; Sinha and Roy, 2002). غلظت بالای سوکروز (۳-۵ درصد) و ۱ میلی گرم بنزیل آمینو پورین تولید پداژک‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. استفاده از سوکروز در محیط $1/2$ MS موجب بزرگ شدن پدازه‌ها می‌شود (Jala, 2013). بررسی‌ها نشان داد واریته در ایجاد بیشترین تعداد پدازه‌ها نقش معنی‌داری دارد. تکنیک ریزازدیادی نیز تفاوت معنی‌داری در تعداد و وزن پدازه و پداژک‌های تولیدی نداشته است ولی میزان بقا در پدازه‌های بزرگتر از ۱ سانتی‌متر باشند، بیشتر است. اندازه پدازه می‌تواند وزن گیاه، پهنای برگ، طول خوشه گل‌دهنده و تعداد سنبلیچه‌ها را تحت تاثیر قرار دهد و پدازه‌های بزرگ تعداد بیشتری پداژک با وزن بزرگتر ایجاد می‌کنند (Paek and Murthy, 2002).

برای رفع خواب پدازه در روش سنتی، زمستان‌گذرانی انجام می‌شود. برای رفع خواب می‌توان از جیبرلین و دوره کوتاه مدت سرمادهی استفاده کرد. مراحل بعدی تکثیر و رفع خواب در محیط خاکی انجام می‌شود. تولید این پدازه‌ها و ذخیره آنها مانند بذر (استفاده در زمان مناسب) می‌تواند مشکلات جابجایی و سازگاری آنها را کمتر کند. استفاده از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مثل جیبرلین، اثرات مثبتی بر رشد، عملکرد و کیفیت گل‌های گلائیول دارد (Umrao et al., 2007). شناخته شده‌ترین جیبرلین مورد استفاده برای شکست خواب در بذر، پیاز و غده GA_3 است که موجب تحریک تولید جوانه گل می‌شود. تاثیر جیبرلین می‌تواند به فاکتورهای مختلف وابسته به گیاه (گونه، رقم و مرحله فنولوژیکی)، محیط (نور، شرایط آب و هوایی و دوره رشد)، غلظت هورمون و نحوه به کارگیری آن مرتبط باشد (Taiz et al., 2013).

هورمون جیبرلین باعث افزایش ارتفاع گیاه، طول ساقه گل، اندازه گل، مدت زمان گلدهی، القای زودرس گل، افزایش تعداد ریشه‌ها، وزن پدازه، تعداد پدازه و افزایش قطر پدازه می‌شود (Singh et al., 2008). بررسی روی برخی از ارقام تجاری لیلیوم نشان داده است که استفاده از غلظت‌های مناسب جیبرلین و دوره سرمایی ۶ هفته می‌تواند موجب شکستن خواب و بزرگ شدن اندازه پیازهای لیلیوم به اندازه پیازهای تجاری شود (Mojtahedi et al., 2014).

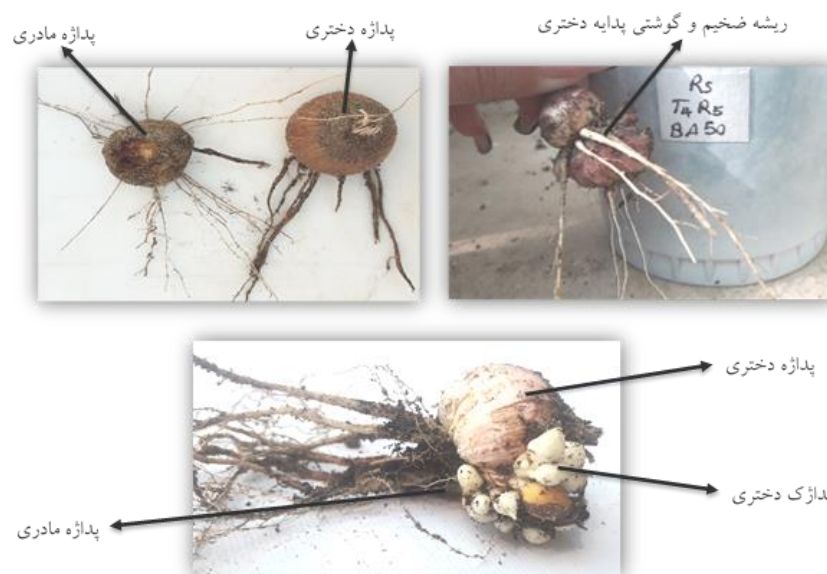
تغییر در ترکیبات محیط کشت می‌تواند منجر به تولید گیاهان کشت بافتی نرمال و سازگاری موفق در شرایط برون شیشه گردد (Preece & Sutter, 1992). کاهش ریزمغذی‌ها در محیط کشت مشابه آنچه در کشت هیدروپونیک استفاده می‌شود، توانایی سازگاری موفق‌تری دارد (Kozai et al., 1992). کاهش غلظت کربوهیدرات‌ها در محیط کشت و افزایش شدت نور نیز کارایی سازگاری را بالا می‌برد (Ziv 1990).

سازگاری پدازه‌ها و انتقال آنها از محیط درون شیشه به محیط خارج برای انجام ریز ازدیادی موفق ضروری است. در گلابول این فرایند می‌تواند در سه مرحله مختلف

۱- قبل از تشکیل پدازه ۲- بعد از تشکیل پدازه و قبل از خواب ۳- پس از گذراندن دوره خواب و زمان خشک شدن ساقه گیاه انجام شود.

معمولاً مرحله اول عملی‌تر است و در این روش شاخه‌های جوانه‌دار در محیط ریشه‌زایی کشت می‌شوند و سپس در محیط‌های ریشه‌زایی قرار گرفته و سپس در محیط‌های با رطوبت زیاد و دما و آبیاری کم برای سازگاری قرار می‌گیرند. با استفاده از ترکیبات خاکی مختلف می‌توان سازگاری کامل در پدازک‌های تولید شده برقرار کرد. در این دستورالعمل فرایند تولید پدازه‌های کشت بافتی، بزرگ شدن آنها و افزایش کارایی انتقال پدازه‌ها به خاک و کاهش مرگ و میر آنها را خواهیم داشت و پس از موفقیت در سازگاری پیازچه‌ها و انتقال به بستر مناسب با انجام آزمایش‌های *In vitro* acclimatization با تیمارهای هورمونی و سرمایی، دورمانسی پدازه‌ها از بین خواهد رفت. پدازه‌های مقاوم شده که آماده رویش هستند به گلخانه منتقل شده و پس از طی یک دوره رویشی، وارد فاز خواب جدید می‌شوند. چرخه شکستن دورمانسی پدازه‌ها و انتقال آنها به خاک تا زمانی انجام می‌گیرد که اندازه پدازه‌ها به حد استاندارد تجاری رسیده باشند. در این مرحله، پدازه‌های آماده رویش جدا می‌شوند. از این روش می‌توان برای تولید تجاری ارقام دورگ‌گیری شده جدید تا رسیدن به سایز تجاری به خوبی استفاده نمود. به طور خلاصه، به منظور تولید پدازه‌های گل‌دهنده و بلوغ آنها اهداف ذیل مورد توجه قرار گرفت.

- ایجاد پدازک‌های کشت بافتی
- سازگار کردن پیازچه‌های کشت بافتی در یک رقم گلابول
- غلبه بر دورمانسی پدازه‌های کشت بافتی
- بزرگ کردن (enlargement) پدازه‌های کشت بافتی و تولید پدازه‌های دو رقم گلابول در اندازه تجاری



شکل (۱) سیستم ریشه‌زایی و تولید پدازک پس از گذراندن دوره رشد

۱. ارقام مورد استفاده

بیشترین ارقام مورد استفاده برای کشت بافت گلایول شامل سفید (White prosperity)، قرمز (Red) از ارقام وارداتی می باشند.

۲. ضدعفونی ریزنمونه

ابتدا برای تهیه ریزنمونه پدازه هایی به قطر ۳-۴ سانتی متر که از قبل تهیه شده بود به آزمایشگاه انتقال می یابند. به منظور سترون سازی ریزنمونه ها ابتدا فلس های رویی پدازه همچنین ریشه های اضافی حذف شده سپس مراحل سترون سازی به ترتیب زیر انجام می شود:

ابتدا پدازه ها در محلول ۷۰ درصد اتانول به مدت ۴۰ ثانیه قرار می گیرند. بعد از آن در تیمار هیپوکلریت سدیم تجاری (وایتکس) ۵۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه غوطه ور و سپس ۳۰ دقیقه به محلول ۲/۵ درصد نانوسیلور منتقل می شوند. نانو سیلور بی خطر بوده و براحتی با نمک طعام خنثی می گردد درحالی که کلرید جیوه دارای بخارات سمی است. بعد از این مراحل ۳ بار آبشویی به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه انجام خواهد شد. تمامی این مراحل زیر هود لامینار بوده و پدازه ها داخل شیشه هایی که از قبل استریل شده بودند قرار می گیرند. ریزنمونه های مناسب برای تولید گیاهچه از بخش مرکزی پدازه جدا شدند (شکل ۲).



شکل ۲) ضدعفونی پدازه ها در شیشه مربایی و قطعات جداکشت مختلف از پدازه (قطعه میانی مورد استفاده برای کشت بافت)

۳. محیط کشت مورد استفاده

ترکیب محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) کامل در شیشه های کوچک به نام مک کارتی مورد استفاده قرار می گیرد (Murashige and Skoog, 1962). به دلیل امکان آلودگی زیاد در پدازه های مورد استفاده برای کشت بافت، از شیشه های کوچک مک کارتی استفاده می شود تا تعداد نمونه کمتری آلوده شود. برای تولید گیاهچه از ترکیب محیط MS حاوی ۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید و ۲ میلی گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین به مدت یک ماه استفاده می شود. سپس گیاهچه ها برای تولید ریشه در محیط MS حاوی ۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین قرار خواهند گرفت (کلانتری و همکاران، ۱۳۹۸) (شکل ۳). برای هر لیتر محیط از ۷ گرم آگار استفاده و pH محیط برای ۵/۷ تنظیم می شود. نمونه ها در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و طول روز به شب ۱۶ به ۸ ساعت قرار گرفته و شدت نور با لامپ های مهتابی سفید و زرد حدود ۳۰۰۰ لوکس تنظیم می شود. محیط ها هر ماه

تعویض می‌شوند چون هورمون‌های مورد استفاده در محیط در اثر تابش نور تجزیه می‌شوند. پس از اطمینان از عدم آلودگی، محیط‌های بعدی برای تعویض در شیشه‌های مربایی تهیه می‌شوند و معمولاً هر ۵ تکرار داخل یک شیشه قرار می‌گیرد. همچنین به منظور کاهش هزینه‌ها از شکر معمولی به جای ساکارز در محیط‌ها استفاده می‌شود.



شکل ۳) تولید برگ و ریشه در محیط MS همراه با نفتالین استیک اسید و بنزیل آمینوپورین

۴. استفاده از شکر بیشتر در تولید و افزایش اندازه پداژک

در مرحله بعد گیاهچه‌هایی که از دو رقم قرمز و سفید تولید می‌شوند برای تولید پداژک به محیط پرقند منتقل خواهند شد. در این محیط فقط ترکیب پایه MS همراه با ۶۰ گرم شکر استفاده می‌شود (شکل ۴). همانطور که میزان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در تولید پدازه موثر است، غلظت شکر نیز در تولید پدازه نقش موثری دارد و موجب تامین کربوهیدرات‌های مناسب برای تولید ترکیبات نشاسته‌ای در پداژک می‌شود. پس از دو ماه حدود ۱۲ پداژک از هر ریز نمونه تولید می‌شود. پس از تولید پداژک‌ها، از محیط مایع پایه بدون هورمون حاوی ۶۰ گرم شکر و شیشه‌های بزرگتر برای هوادهی بیشتر استفاده می‌شود تا پداژه‌ها بزرگ شوند. یک ماه پس از انتقال به شیشه‌های بزرگ، پداژک‌ها رشد کرده و قطرشان به بیش از یک سانتی‌متر می‌رسد.



شکل ۴) تولید پداژک در محیط MS همراه با شکر بیشتر و شیشه‌های بزرگتر برای هوادهی و افزایش اندازه

۵. سازگاری و شکست خواب

به منظور سازگاری ابتدا ارقام قرمز و سفید یک دوره ۲ ماهه در شیشه در دمای ۴ درجه در تاریکی سرمادهی شدند و پس از آن در ترکیب مناسب خاک قرار گرفتند. این ترکیب شامل پیت ماس، خاک مزرعه و ماسه با نسبت برابر است. در هر دو رقم سرمای ۳ ماهه بهترین میزان رشد را داشته است به طوریکه یک هفته پس از پایان سرمادهی شروع به رشد کرده و در بازه دو ماهه رشد طولی خوبی داشته است (شکل ۵).



شکل ۵- تاثیر سرما در جوانه‌زنی پداژک‌های کشت بافتی رشد کرده در سینی کشت

۶. ریشه‌زایی و برگ‌دهی از پداژه کشت بافتی

به منظور تکثیر سریعتر با آلودگی بسیار کمتر، استفاده از پداژک‌های کشت بافتی به عنوان ریز نمونه جدید، برای اولین بار مورد استفاده قرار گرفت. ریزنمونه‌ها از پداژک‌های ۲ رقم قرمز و سفید که از طریق کشت بافت در *In Vitro* تولید شده و در محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید (بهترین تیمار آزمایش قبلی) قرار گرفتند. البته به منظور تولید پداژه مستقیم از مقدار ۴۰ گرم در لیتر شکر برای این محیط استفاده شد. پس از ۶۰ روز به صورت مستقیم پداژک‌ها رشد کردند. سپس به شیشه‌های بزرگ حاوی ۶۰ گرم در لیتر شکر برای افزایش سایز منتقل شدند (شکل ۶). با استفاده از پداژک‌های کشت بافتی می‌توان با سرعت بیشتر به باززایی مستقیم و تولید سریعتر پداژک‌ها دست پیدا کرد. هر سه قطعه بالایی، میانی و انتهایی پداژک‌های زیادی در مدت یک ماه تولید کردند که حدوداً یک ماه سریعتر از تولید پداژک از پداژه‌های اولیه بود.



شکل ۶) تولید پدازک از پدازک‌های کشت بافتی به صورت باززایی مستقیم

۷. استفاده از هورمون در افزایش تعداد، وزن و قطر پدازک‌های تولیدی و جوانه‌های آن

به منظور افزایش تعداد جوانه‌ها و تولید گیاهچه‌های بیشتر، از ترکیب جیبرلین و بنزیل آدنین (GA_3 و BA) استفاده شد. برای تهیه محلول GA_3 با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر، بر اساس تعداد پدازه‌ها و حجم اشغال شده در ظرف، مقدار مورد نیاز وزن شده و درون فالکون ریخته شد. برای حل شدن هورمون، مقداری استون یا اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه و با استفاده از مگنت کاملاً حل شد و سپس با آب مقطر به حجم موردنظر رسانده شد. جهت تهیه محلول بنزیل آدنین ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر مراحل قبل تکرار شد با این تفاوت که حلال این ماده استیک اسید بود. به همین ترتیب می توان غلظت های کمتر یا بیشتر از هر هورمون به طور جداگانه تهیه کرد.

۱.۷. روش اعمال تیمار (خیساندن)

بدین منظور، ابتدا پدازک‌های دو رقم قرمز و سفید در اندازه‌های یکسان (قطر یک سانتی‌متر) انتخاب شد. این پدازک‌ها حاصل کشت دوم پدازک‌های کشت بافتی بودند. این ارقام توسط دو هورمون تنظیم کننده رشد بنزیل آدنین و جیبرلین به صورت جداگانه به مدت ۲۴ ساعت با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در شیشه‌های مربایی غوطه‌ور شدند (شکل ۷).

۲.۷. کاشت

عملیات کاشت پدازک‌های تیمار یافته در گلدان که حاوی کوکوپیت، پیت‌ماس و ماسه بادی بود، با نسبت‌های ۱:۱:۱ پس از اعمال تیمار (روش خیساندن) کشت شد. سپس به فیتوترون با شرایط خاص (دمای روز: ۲۵ و دمای شب ۱۸ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی حداقل ۶۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی) انتقال یافت و آبیاری شد. کوددهی با NPK (کود حاوی نیتروژن، پتاسیم و فسفر به نسبت برابر) هر دو هفته یکبار، به میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر (با غلظت دو گرم بر لیتر) انجام شد.



شکل ۷- سمت راست پدازه های منتخب برای اعمال تیمار شکل چپ رشد نحوه کشت در گلدان های نیم کیلویی پس از اعمال تیمار

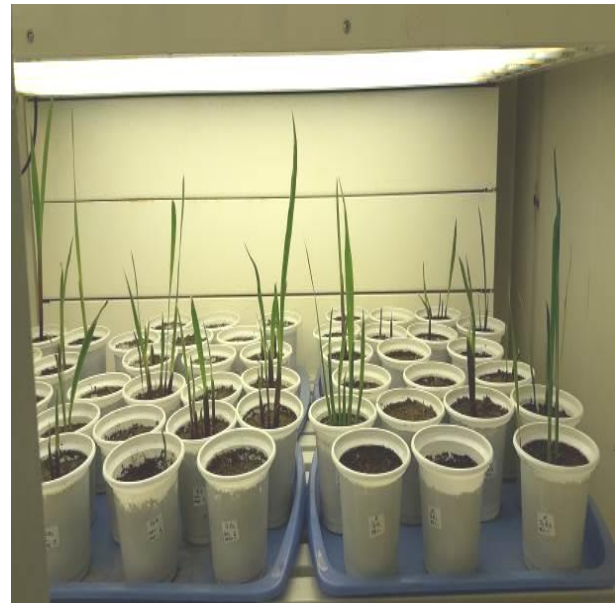
۸. اثرات استفاده از هورمون در طول و تعداد برگ ها و جوانه ها، قطر طوقه ها و وزن تر پدازه

استفاده از تیمار هورمون جیبرلین به میزان ۱۰۰ میلی گرم در لیتر به صورت غوطه وری به مدت ۴ ساعت باعث افزایش طول برگ و رشد بیشتر رویشی در هر دو رقم می شود. استفاده از بنزیل آدنین موجب افزایش تعداد بیشتر در برگ ها می شود. در واقع استفاده از هر کدام از این هورمون ها برای تسریع در رشد مناسب است ولی باید این نکته در نظر گرفته شود که استفاده همزمان از این دو هورمون اثر منفی در رشد گیاه می گذارد (شکل ۸).



شکل ۸) شکل الف تاثیر منفی ترکیب دو هورمون جیبرلین و بنزیل آدنین در کاهش رشد طولی برگ نسبت به شاهد (ترکیب هورمونی گلدان سمت چپ و شاهد بدون هورمون گلدان سمت راست) ، شکل ب تاثیر هورمون بنزیل آدنین در افزایش تعداد برگ ها (تیمار هورمونی بنزیل آدنین گلدان سمت راست و شاهد بدون هورمون گلدان سمت چپ)

هورمون بنزیل آدنین همچنین موجب افزایش تعداد جوانه‌ها روی پداژک می‌شود. در صورتی که پدازه قوی و با سایز مناسب داشته باشیم می‌تواند منجر به تولید بیش از یک شاخه گل از هر پدازه و افزایش بازده اقتصادی شود. باید دقت شود که افزایش بیش از میزان توصیه شده غلظت هورمون بنزیل آدنین برعکس موجب کاهش تعداد جوانه‌ها و دفرمه شدن برگ‌های حاصل از جوانه‌ها می‌شود (شکل ۹). تیمار هورمونی با بنزیل آدنین به دلیل افزایش تعداد جوانه‌ها و تعداد برگ در پدازه‌های تحت تیمار موجب کاهش قطر طوقه می‌شود.



شکل ۹) شکل سمت راست گیاهچه‌های رشد کرده دو هفته پس از تیمار، شکل سمت راست گیاهچه‌های رشد کرده چهار هفته پس از تیمار در رقم قرمز (تفاوت در تعداد جوانه‌ها، طول برگ، قطر جوانه)

تعداد پدازه دختری در رقم سفید تحت تاثیر استفاده از تیمار هورمونی بنزیل آدنین (۱۰۰ میلی گرم در لیتر)، افزایش می‌یابد. این افزایش تعداد پدازه، زمانی که از تیمار ترکیبی جیبرلین و بنزیل آدنین (۱۰۰ و ۵۰ میلی گرم در لیتر) در رقم قرمز استفاده می‌شود به بیش از پنج برابر می‌رسد. این در حالی است که استفاده از غلظت‌های بیشتر اثر کاهشی در تعداد پدازه دارد (آقای و همکاران، ۱۴۰۳).

بیشترین افزایش تعداد ریشه پس از تیمار پدازه با جیبرلین (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) حاصل می‌شود. تعداد ریشه بیشتر موجب جذب بهتر ترکیبات غذایی از خاک می‌شود. استفاده از تیمار جیبرلین در هر دو رقم قطر و وزن پدازه را افزایش می‌دهد. سایز پدازه بیشترین ارتباط را با عملکرد پدازه‌های جدید و سایز سنبله دارد و هر چه وزن پدازه بیشتر باشد، کیفیت پدازه تولیدی بیشتر است. (شکل ۱۰).



شکل ۱۰) شکل سمت راست پداژک رشد کرده رقم قرمز پس از تیمار با جیبرلین، شکل سمت چپ پداژک رشد کرده رقم قرمز پس از تیمار با جیبرلین و بنزیل آدنین (تفاوت در تعداد و قطر پداژک‌های تولیدی و ریشه‌ها)

۹. رفع خواب پداژه با استفاده از سرما و جیبرلین

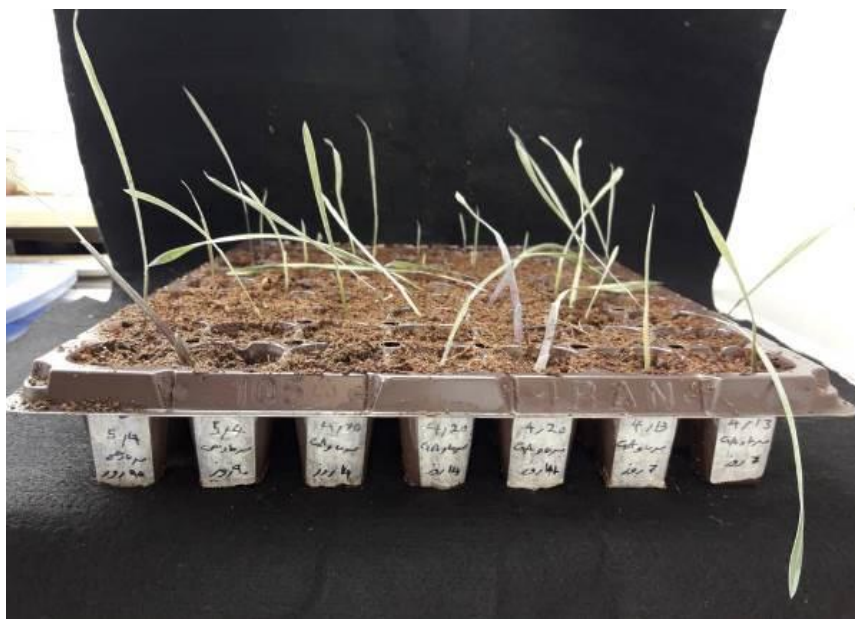
به منظور کاهش زمان رفع خواب تاثیر سرما و هورمون جیبرلین می‌تواند موثر باشد. از این تیمارها همچنین برای بزرگ کردن و رفع خواب پداژک‌های کوچک که معمولا دور ریخته می‌شوند، استفاده شد. روش اعمال تیمار

ارقام قرمز و سفید پداژک‌های دختری با اندازه‌های کوچکتر از یک سانتی‌متر انتخاب می‌شوند. با توجه به اینکه تا کنون مطالعه‌ای روی رفع خواب پداژک‌ها انجام نشده است، تیمارهای مختلفی با استفاده از تاثیر دماهای مختلف (دمای محیط و دمای یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد) و تعداد روزهای مختلف سرمادهی و ترکیب از آنها بررسی شد (شکل ۱۱).



شکل ۱۱) شکل سمت راست پداژه‌های مورد استفاده برای تیمار و شکل سمت چپ اعمال تیمار هورمونی در شرایط تاریکی برای غوطه‌وری پداژک

تیمار دمای محیط و هورمون GA (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) هر کدام به صورت جداگانه، تاثیر بسزایی بر درصد رشد پدازه‌ها در بازه زمانی ده روز پس از کشت در رقم قرمز داشته است. به نظر می‌رسد، پدازه‌های کوچک رقم قرمز تحت تاثیر دمای محیط، خواب خود را سپری می‌کنند در حالی که در رقم سفید تحت تاثیر تیمار سرما ۳۰ روزه بیشترین درصد رشد را داشت. با توجه به اندازه کوچک پدازک‌ها به نظر می‌رسد زمان ۳۰ روزه برای رفع خواب پدازه‌ها کافی باشد. اما ترکیب سرما و جیبرلین بر رفع خواب مناسب نبود و به تدریج با تجزیه جیبرلین، درصد رشد افزایش نشان داد (شکل ۱۲). در واقع با استفاده از تیمار هورمونی با جیبرلین به مقدار ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در پدازک‌های کوچک و قرار دادن در شرایط رشد، پس از ۱۰ روز رفع خواب انجام می‌شود درحالی که تیمار سرما پس از ۳۰ روز می‌تواند موجب رفع خواب در پدازک‌ها شود. بنابراین جیبرلین می‌تواند در کوتاه کردن دوره خواب نقش موثری داشته باشد و امکان بزرگ کردن و رفع خواب و رشد پدازک‌های کوچک وجود دارد (کوباز و همکاران ۱۳۹۹ گزارش نهایی).



شکل ۱۲) گیاهچه‌های رشد کرده دو هفته پس از تیمار سرما دهی، ترکیب سرما و جیبرلین

۹.۱. سرما دهی و نگهداری

با توجه به تاثیر دوره دوماهه سرما در افزایش بیشتر وزن و قطر پدازه، پیشنهاد می‌شود تا دوره آخر رشد برای رسیدن به سایز تجاری از روش سرمادهی تامین شود. سرما دهی می‌تواند به صورت زمستان گذرانی باشد که زمان طولانی‌تری صرف شده ولی پدازه‌های قوی‌تر و با سایز بزرگتر حاصل می‌شود و یا در یخچال‌های صنعتی یا خانگی بسته به حجم پدازه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گیرد. قبل از سرمادهی، ضدعفونی با قارچ کش کاربندازیم به میزان یک گرم در لیتر به مدت ۶ ساعت، خشک کردن پدازه‌ها و بسته بندی به نحوی که جریان هوا بین پدازه‌ها برقرار شود، ضروری است.

۱۰. کشت دوره ای برای بلوغ پدازک‌ها و گلدهی

به منظور افزایش سایز پدازه‌ها و طی دوران رشد، تیمار جیبرلین به جای سرمادهی برای دو دوره مورد استفاده قرار گرفت. در هر دوره پدازک‌ها در سینی رشد کشت شدند تا پدازک به رشد مناسب برسد. لازم به ذکر است تولید پدازک‌های کشت بافتی موجب شد تا در شرایط درون شیشه پدازک‌های با قطر یک تا دو سانتی متر تولید شود و با انجام دو دوره کشت که در یکی از دوره‌ها رفع خواب با جیبرلین انجام شده است (کاهش حداقل ۲۰ روزه در دوره کشت) به پدازه گل‌دهنده رسید (شکل ۱۴). ضمن اینکه در روش باززایی مستقیم بیش از ۱۲ پدازک از هر قطعه در مدت ۲ ماه حاصل می‌شود ولی در روش سنتی هر ساله ۴ تا ۵ پدازک با قطر حدود یک سانتی‌متری و تعدادی پدازک کمتر از نیم سانتی‌متر تولید می‌شود که افزایش رشد نداشته و از بین می‌روند. تعداد گلچه‌ها و کیفیت گل با گل‌های حاصله از پدازه‌های اولیه تفاوت کمی و کیفی معنی‌داری نشان نداد (شکل ۱۴). در پایان، چرخه تولید پدازه‌های گل‌دهنده در قالب شکل ۱۵ آورده شده است.



شکل ۱۳) پدازه‌های رشد کرده پس از دو دوره رشد در گلخانه (حرف W نشان‌دهنده رقم سفید و حرف R نشان‌دهنده رقم قرمز است)

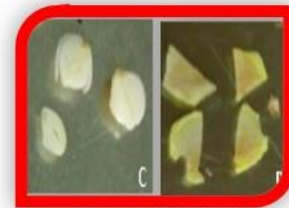
(۰)



شکل ۱۴) رشد دوره‌ای پدازه‌های کشت بافتی در گلخانه، گل‌های حاصله از دو رقم سفید و قرمز



۷- غربالگری پدازه ها و انتخاب سایز تجاری



۱- ضدعفونی و استفاده از قطعات مختلف پدازه ها



۶- گذراندن دو دوره رویشی



۲- بهینه سازی کشت بافت



۴- استفاده از هورمون جهت افزایش وزن پدازک و رشد رویشی ۵- سازگاری و رفع خواب در شرایط گلخانه



۳- افزایش سایز

شکل ۱۵) تولید پدازه های کشت بافتی گلابول تا رسیدن با سایز گلدهنده در دو رقم سفید و قرمز

۱۱. برآورد اقتصادی

با توجه به شرایط حال حاضر (کاهش روابط بین الملل و افزایش روزانه قیمت ارز) و در اولویت قرار نگرفتن گیاهان زینتی برای تخصیص ارز دولتی، دستیابی به پروتکل تکثیر، سازگاری و بلوغ می تواند علاوه بر افزایش سرعت تولید، حفظ سلامت خاک و تکمیل مراحل سازگاری و بلوغ در ارقام جدید تولیدی در این طرح، موجبات خودکفایی کشور و امکان صادرات ارقام جدید با کیفیت را فراهم کند. با توجه به شرایط اقتصادی کشور و ناپایدار بودن قیمتها، امکان ارایه دقیق پیش بینی سود و بازگشت سرمایه وجود ندارد. لذا تمامی موارد بصورت مقایسه ای آورده شده است. بر اساس برآوردهای انجام شده از سال های قبل، هر ساله حدود ۵ میلیون پدازه وارد می شود که در صورت خرید عمده به نرخ نیم دلار برای هر پدازه، هر ساله حدود ۱۷۵ میلیارد تومان صرف واردات پدازه می شود. مشکل بزرگ دیگر، ارتباط بسیار کمتر تولیدکننده و عدم انتقال پول بین خریدار و فروشنده است. همین مسئله موجب عدم دسترسی آسان در زمان مناسب به تولیدکننده و وارد آمدن خسارت زیاد به وی خواهد شد. استفاده از دستورالعمل مزایای ذیل را داراست

✓ تولید حداقل ۵۰۰۰ پدازه سایز فندقی از ۱۰۰ پدازه تجاری در یک دوره ۸ ماهه در یک اتاق رشد ۱۲ متر مربعی در حالی که در شرایط معمولی از هر پدازه مادری معمولاً یک پدازه دختری و ۴-۵ پدازه با اندازه کوچکتر از نیم سانتی متری (نامناسب برای رشد) ایجاد می شود (خرید یک پدازه تجاری به جای ۵۰ پدازه)

✓ کاهش یک دوره رشد نسبت به شرایط عادی (دو دوره به جای سه دوره) ۳۰٪ کاهش هزینه

✓ تولید پدازه های عاری از بیماری و ویروس و در نتیجه کاهش مصرف سموم

✓ ایجاد پدازه‌های یکنواخت از نظر ژنتیکی (که این امر موجب سهولت در انجام هرس و برداشت مکانیکی می‌شود)

✓ ایجاد اشتغال در شرکت‌های کشت بافتی تکثیرکننده پدازه

در بازه ۱۶-۲۰ ماهه ۴۹۰۰ پدازه (با کسر پدازه‌های اولیه) تولید می‌شود. با توجه به واردات ۵ میلیون پدازه در سال (هر پدازه حداقل ۵/۰ دلار) می‌توان بسته به فضای اختصاص داده شده (یک اتاقک رشد و یک گلخانه ۴۰ متر مربعی) ۱۰۰۰۰ پدازه در سال تولید کرد. با توجه به تغییرات زیاد در هزینه تولید و نگهداری گلخانه نمی‌توان مبلغ دقیقی برای هزینه‌های داخلی جهت تولید تعیین کرد. به طور تقریبی تولید هر پدازه تا سایز فندقی ۸۰۰۰۰ ریال (حدود ۱۰ سنت) هزینه می‌برد. انجام مراحل سازگاری و بلوغ جهت دو دوره کشت نیز هزینه ۲۰۰۰۰۰ ریالی (حدود ۲۵ سنت) دارد. هم اکنون پدازه‌های تولیدی در مناطق جنوبی از جمله جیرفت و کازرون حدود ۴۰۰۰۰۰ تا ۷۰۰۰۰۰ ریال (حدود یک دلار) به فروش می‌رسد. در واقع تولید کشت بافتی علاوه بر یکنواختی بیشتر در پدازه‌ها، عدم آلودگی، دسترسی سریع و ممانعت از خروج ارز از کشور و تکمیل ظرفیت خالی شرکت‌های کشت بافتی قیمتی حدود ده درصد قیمت پدازه‌های وارداتی و متوسط سی و پنج درصد روش سنتی دارد. صرف نظر از هر گونه برنامه توسعه سطح زیر کشت طی چند سال گذشته این اراضی و با فرض ثابت بودن سطح زیر کشت آن به علت شرایط بد اقتصادی کشور، می‌توان بر اساس میزان پدازه مورد نیاز در هر هکتار، وضعیت تقاضا را تخمین زد. بطور تقریبی در هر هکتار حدود ۲۰۰ هزار پدازه گل مورد نیاز است. بر این اساس سالانه در خصوص این گیاه به ۸ میلیون پدازه یا نشاء کشت بافتی نیاز است که به علت افزایش نرخ ارز و نیز بدتر شدن شرایط اقتصادی مردم، قطع به یقین این روند تقاضای طی سالهای آتی سیر نزولی به خود خواهد گرفت. بنابراین می‌توان تقاضای حدود ۸ میلیون عدد پدازه گلابول را در کشور تقاضای واقعی لحاظ کرد. با لحاظ نمودن استانداردهای Anon در کسب سهم از بازار، با توجه به وجود شرکت‌های متعدد بزرگ و کوچک در این حوزه و سهم نسبتاً بالای واردات این رقم در کشور، در صورت ورود به این حوزه و ارائه نوآوری، می‌توان ۵٪ تا ۱۲٪ سهم از بازار را کسب کرد که به معنی ظرفیت تولید ۴۰۰ تا ۸۰۰ هزار پدازه یا گیاهچه کشت بافتی است. شایان ذکر است که در حال حاضر واحدهای کشت بافت کشور دارای ظرفیتهای خالی زیادی هستند که می‌توان به نحو مطلوبی از این ظرفیتهای به شکل تولید قراردادی یا تولید مشترک و یا فروش دانش فنی و یا ارائه لیسانس بصورت کامل یا همراه با رویالتی استفاده نمود. با استفاده از این دستورالعمل، امکان بلوغ و تجاری‌سازی پدازه‌های جدید ایجاد شده در این طرح و تولید ارقام جدید امکان‌پذیر است.

نتیجه‌گیری کلی

ریزازدیادی در گل گلابول جهت ازدیاد پدازه و تولید گل شاخه بریده روش بسیار مناسبی است. بهترین روش در کشت بافت گلابول تولید همزمان شاخه و ریشه است. زیرا زمان برای تولید گیاه و پدازه به این صورت کمتر است. برای این کار بهتر است از محیط MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین همراه با ۵/۰ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید استفاده شود و بعد از تولید گیاهچه انتقال آنها به محیط کشت MS حاوی ۶۰ گرم بر لیتر شکر برای تولید پدازه انجام شود.

برای شکست خواب با سرما، قرار گرفتن پدازه‌ها به مدت ۳ ماه در سرمای ۴ درجه سانتی گراد و سپس کشت در ترکیب خاک با نسبت برابر از ماسه، خاک مزرعه و پیت ماس توصیه می‌شود. لازم به ذکر است بهترین رقم برای کشت بافت گلابول ارقام Rose Superme، White prosperity است که بیشترین بازار مصرف را نیز به خود اختصاص می‌دهند. کاربرد جیبرلین در بازه زمانی طولانی‌تر بیشترین تاثیر را در افزایش طول برگها دارد و هورمون بنزیل آدنین موثر در ازدیاد تعداد برگ است. اما با این حال کاربرد هورمون ترکیبی جیبرلین و بنزیل آدنین تاثیر مثبتی نداشته و غالباً اثر منفی نشان

داد. افزایش تعداد جوانه، استفاده از هورمون ترکیبی جیبرلین و بنزیل آدنین در رقم سفید بیشترین تاثیر را نشان داد. از طرفی افزایش غلظت بالاتر بنزیل آدنین، موجب کاهش تعداد جوانه‌ها و دفرمه شدن برگ‌ها شد. تیمار ترکیبی جیبرلین و بنزیل آدنین به ترتیب با غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر، نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشته و بیشترین تعداد پدازک را تولید نمود. وزن پدازه در رقم سفید با تیمار جیبرلین افزایش داشت. از این رو می‌توان گفت که تاثیر رقم در تیمار قبلی کاملاً مشهود است. دوره خواب صفت پیچیده‌ای است، زیرا توسط عوامل محیطی و درون‌زا نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد. رفع خواب کاملاً وابسته به رقم است. با استفاده از جیبرلین می‌توان خواب را برطرف نموده و موجب رشد سریع در پدازک‌های رقم سفید شد. البته سرمای ۳۰ روزه هم تقریباً همین اثر را دارد. بنابراین در شرایطی که امکان دسترسی به سرما فراهم نیست، می‌توان با استفاده از جیبرلین که قرص‌های تجاری آن هم اکنون در بازار با قیمت مناسب به فروش می‌رسد، رفع خواب را در مدت کوتاه‌تر انجام داد. ضمن اینکه با روش کشت بافت به دلیل افزایش سایز پدازک‌های تولیدی حداقل یک دوره رشد کوتاه‌تر شده، پدازک‌های یکنواخت و عاری از ویروس و باکتری (با استفاده از منابع ژنتیکی عاری از بیماری در فرایند کشت بافت) تولید می‌شود. محاسبات انجام شده نیز نشان می‌دهد می‌توان با قیمت ۲۰٪ نسبت به پدازه‌های وارداتی، پدازه گل‌دهنده تهیه کرد.

منابع

- آقائی ک، کوباز پ، کرزور س، ۱۴۰۳. اثر غلظت‌های مختلف سیتوکینین و جیبرلین بر رشد و تکثیر دو رقم گلابول. پذیرفته شده در مجله فرایند و کارکرد گیاهی
- عبادزاده ح، احمدی ک، محمدنیا افروزی ش، عباسطاقانی ر، عباسی م و یاری ش. ۱۳۹۷. آمارنامه کشاورزی سال ۱۳۹۶ جلد دوم. وزارت جهادکشاورزی تهران
- قاسمی قهساره، م و کافی، م، ۱۳۸۶. گل‌کاری علمی و عملی. جلد اول، انتشارات گلین، ۳۲۵ صفحه، اصفهان
- کافی، م و قاسمی قهساره، م، ۱۳۸۶. گل‌کاری علمی و عملی. چاپ دوم، انتشارات گلین، صفحه ۱۸۳-۱۷۷، اصفهان.
- کلانتری ا، کوباز پ، رستمی م، فتحی قره بابا م، مجتهدی ن، ۱۳۹۸. نقش تنظیم‌کننده‌های رشد، غلظت ساکارز و سرمادهی بر پرآوری، رفع رکود و تولید پدازک در دو رقم گلابول. فرآیند و کارکرد گیاهی، ۸ (۳۳): ۲۰۳-۲۱۱
- کوباز، پ، کلانتری ا، کرزور س، فتحی قره بابا م، ۱۴۰۰. فرآیند کشت بافت، سازگاری و بلوغ پدازه های گلابول به منظور تولید پدازه های مقاوم به فوزاریوم به وسیله مهندسی ژنتیک، "ایمنی زیستی، ج ۱۴، ۲-۱۰۱-۱۱۶
- کوباز، پ، مجتهدی ن، فتحی قره بابا م، شبر ز، ۱۳۹۹. گزارش نهایی پروژه تکثیر، بلوغ و شکست دورمانسی به منظور تولید پدازه های بالغ تجاری در دو رقم گلابول، ۷-۰۵-۰۵-۹۴۵۱-۹۴۰۰۳
- Aftab, F., M. Alam and H. Afrasiab. 2008. *In vitro* shoot multiplication and callus induction in *Gladiolus hybridus* Hort. Pak. Jour. Bot. 40(2):517-522.
- Hussain, I., A. Muhammad, H. Rashid, and A. Quraishi. 2001. In vitro multiplication of gladiolus (*Gladiolus crassifolius*). Plant Tissue Cult. 11:121-126.
- Hussey, G. 1977. In vitro propagation of gladiolus by precocious axillary shoot formation. Scientia Hort. 6:287-296.
- Jala, A., (2013). Potential of benzyl adenine, naphthalene acetic acid and sucrose concentration on growth, development, and regeneration of new shoot and cormel on Gladiolus. American Transactions on Engineering & Applied Sciences, 2 (4): 277-282
- Kozai, T., Fujiwara, K., Hayashi, M. and Aitken-Christie, J., 1992. The in vitro environment and its control in micropropagation pp. 247-282. In K. Kurata and T Kozai (eds). Transplant production systems. 36pp. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Lilien-Kipnis, H. and M. Kochba. 1987. Mass propagation of *Gladiolus hybrids*. Acta Hort. 212:631-638
- Mojtahedi, N., Koobaz, P., Fathi, M., Dabirashrafi, O., Azadi, P., Khosravi, S., 2014. Maturing, enlarging and breaking dormancy of in vitro *Lilium* bulblets. International Journal of Horticultural Science and Technology. 1;1(2):101-9.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum, 15, 473-497
- Paek, K.Y. and H.N. Murthy. 2002. High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 68:247-252
- Prasad, V.S.S. and S.D. Gupta. 2006. *In vitro* shoot regeneration of gladiolus in semisolid agar versus liquid cultures with support systems. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 87:263-271.
- Preece, J.E. and E.G. Sutter. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh, P.C. and R.H. Zimmerman (Eds) Micropropagation.
- Priyakumari, I. and V.L. Sheela. 2005. Micropropagation of gladiolus cv. 'Peach Blossom' through enhanced release of axillary buds. Journal of Tropical Agriculture 43(1-2):47- 50.
- Roy, S.K., G. Gangopadhyay, T. Bandyopadhyay, B. K. Modak, S. Datta and K.K. Mukherjee. 2006. Enhancement of *in vitro* micro corm production in gladiolus using alternative matrix. African Journal of Biotechnology. 5(12):1204-1209
- Singh, A., Kumar, J., Kumar, P. 2008. Effects of plant growth regulators and sucrose on post harvest physiology, membrane stability and vase life of cut spikes of gladiolus. Plant Growth Regulation.;55(3):221.
- Sinha, P. and S.K. Roy. 2002. Plant regeneration through *In vitro* cormel formation from callus culture of *Gladiolus primulinus* Baker. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 12(2):139-145.
- Sutter, E.G. 1986. Micropropagation of *Ixia viridifolia* and *Gladiolus X Homoglossum hybrid*. Scientia Horticulture. 29:181-189.

Szczepaniak, M., Kamiński, R., Kuta, E., Słomka, A., Heise, W., Cieślak, E. Natural hybridization between *Gladiolus palustris* and *G. imbricatus* inferred from morphological, molecular and reproductive evidence. Preslia. 2016;88(1).

Taiz L, Zeiger E, Maffei M. Fisiologia vegetale. 5th Edition, Artmed; 2013.

Umrao, V.K., Singh, R.P. and Singh, A.R. 2007. Effect of gibberellic acid and growing flowering responses of *Gladiolus tristis* (L.) after exposing corms to cold treatment. Scientia Horticulturae, 74:279-284.

Ziv M., 1990. The effects of growth retardants on shoot proliferation and morphogenesis in liquid cultured *Gladiolus* plants. Acta Hort. 280: 207-214.

Ziv, M. and Lilien-Kipnis, H. 2000. Bud Re-generation from Inflorescence Explants for Rapid Propagation of Geophytes in Vitro. Plant Cell Report, 19, 845-850