[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.27.0 ]

[ DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.323 ]

# ریزازدیادی لیسیانتوس رقم سفید (*Eustoma grandiflorum* Cv. White) در شرایط کشت درون شیشه‌ای

فروزان ضمیرایی[۱]، سحر بهلولی زنجانی[۲]، علی رضا ترنگ[۳] و بهزاد کاویانی[۴*]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۱۵)

## چکیده

**لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*) رقم سفید (White) گیاه زینتی است که به‌لحاظ تنوع رنگ گل، از بازارپسندی مناسبی برخوردار است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر پرآوری و ریشه‌زائی این گیاه بود. جوانهٔ جانبی (گره) به‌عنوان ریزنمونه برای ریزازدیادی لیسیانتوس مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه، محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) به‌همراه ترکیبی از تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BA با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۲ و ۲ میلی‌گرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بیشترین طول شاخساره (با میانگین ۲/۰۷ سانتی‌متر در گیاه) در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA (فاقد NAA) حاصل شد. بیشترین تعداد شاخساره (با میانگین ۵/۸۰ عدد در گیاه) در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA تولید شد. ریزنمونه‌های جوانه در محیط‌های کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BA، بیشترین تعداد گره (با میانگین ۳/۲۰ عدد در گیاه) را تولید کردند. بیشترین تعداد ریشه (با میانگین ۱۴/۵۳) و بیشترین طول ریشه (با میانگین ۳/۸۷ سانتی‌متر)، به‌ترتیب در محیط‌های کشت حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و محیط ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA (فاقد NAA) تولید شدند. ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون گذر از مرحلهٔ تولید کالوس، تشکیل گل دادند. هم‌چنین از کالوس تولید شده در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، نیز گل به‌وجود آمد. گیاهچه‌ها جهت سازگاری به بستری از پیت و پرلیت به نسبت ۱ به ۱ منتقل شدند و ۹۸ درصد از گیاهچه‌ها سالم ماندند.**

**واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، جوانه‌ی جانبی، کشت بافت گیاهی، کالوس**

۱ و ۴. به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت

۲ و ۳. به ترتیب کارشناس ارشد باغبانی و استادیار ژنتیک، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال کشور، رشت

*. مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: b.kaviani@yahoo.com

## مقدمه

لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*) یکی از گونه‌های زینتی خانواده‌ی جنتیاناسه (*Gentianaceae*) است و گل‌هایی به رنگ‌های متنوع آبی، سفید، صورتی، زرد، قرمز، بنفش، ارغوانی و ترکیبی از رنگ‌ها دارد. این گیاه بومی ایالات جنوبی آمریکا، نبراسکا، لویزیانا و مکزیک است و به‌عنوان گل شاخه بریده و گلدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵ و ۱۰). روش معمول تکثیر لیسیانتوس با بذر است و تولید با این روش در سطح وسیع با مشکل هتروزیگوت و احتمال آلودگی گیاهچه‌ها روبرو است (۵). هتروزیگوت بودن بذر سبب تغییر ژنتیکی گیاه، کم شدن مقاومت گیاه در برابر ویروس‌ها و سایر عوامل بیماری‌زا، تنوع در رنگ، زمان شروع گل‌دهی و غیره می‌شود.

ریزازدیادی فنی مناسب برای تکثیر ارقام انتخابی است که می‌تواند جایگزین روش‌های معمول ازدیاد گردد. در این روش تعداد زیادی گیاهچه‌ی لیسیانتوس با ساختار ژنتیکی یکسان به‌دست می‌آید (۲۴). مطالعات کمی برای ریزازدیادی لیسیانتوس با استفاده از هورمون‌های مختلف صورت گرفته است (۷، ۱۴، ۲۲ و ۲۳). به‌عنوان مثال، اوردوق و همکاران (۲۲) افزایش طول شاخسارهٔ گیاهچه‌های لیسیانتوس را در محیط کشت MS غنی شده با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA گزارش کردند. در مطالعه‌ی دیگر، کی‌دونگ و همکاران (۱۴) نشان دادند که استفاده از BA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در افزایش طول شاخساره و رشد گیاهچه لیسیانتوس تأثیر بهتری نسبت به سایر تیمارها داشت. مطالعهٔ غفاری ایسی‌زاد و همکاران (۷) بر روی ریزازدیادی لیسیانتوس، افزایش طول شاخساره را در حضور KIN نشان داد. برخی مطالعات دیگر نقش مؤثر سایر سیتوکینین‌ها مانند زآتین و 2-iP در ازدیاد سرشاخهٔ لیسیانتوس را از کالوس نشان دادند (۱۴ و ۲۵).

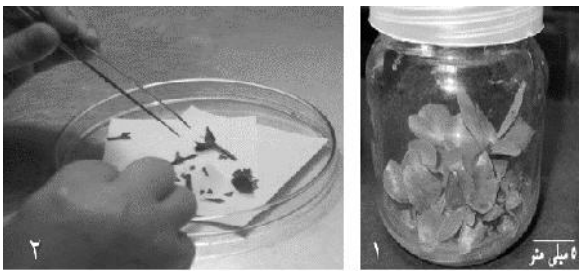
گل‌دهی برخی گونه‌های گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای توسط چند محقق گزارش شده است که از جملهٔ آن می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: رز (۳۱)، گل سپاس (*Gentiana* L.) (۳۴)، بامبو (۱۷)، اسپاتی‌فیلوم (۱)، ارکید (۲۹)، تمیس (*Dioscorea* L.) (۱۲) و خرما (۱۸). توسعهٔ روش‌های گل‌دهی در شرایط درون شیشه‌ای، اصلاح کنندگان گیاهی را برای انتخاب سریع فنوتیپ‌های مطلوب کمک می‌کند. گل‌دهی گیاهچه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای، پتانسیل تجاری بسیار خوبی به‌ویژه برای گیاهان زینتی دارد (۱۵). نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نقش مهمی در القای گل‌دهی در شرایط درون شیشه‌ای دارند (۲۸). هدف از این پژوهش، بررسی اثر غلظت‌های مختلف NAA و BA بر روی گل‌دهی و ریزازدیادی لیسیانتوس رقم سفید (*Eustoma grandiflorum* cv. White) در شرایط درون شیشه‌ای بود. کار حاضر برای اولین بار گل‌دهی لیسیانتوس در شرایط درون شیشه‌ای را گزارش می‌کند.

## مواد و روش‌ها

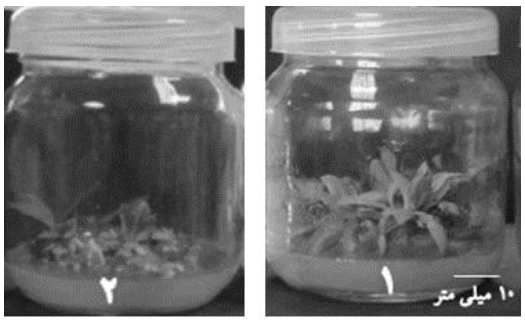
گیاه مادری لیسیانتوس رقم سفید (*Eustoma grandiflorum* cv. White) از گلخانه‌ای در محلات تهیه شد. جوانه‌های جانبی به‌عنوان ریزنمونه برای ریزازدیادی لیسیانتوس مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱). برای ضدعفونی، ریزنمونه‌ها ابتدا به‌مدت ۲۰ دقیقه در آب جاری حاوی چند قطره مایع ظرفشویی غوطه‌ور گردیدند. پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل، ریزنمونه‌ها به‌مدت ۴۰ ثانیه با الکل ۷۰ درصد و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوسیلور ضدعفونی شدند. در نهایت، ریزنمونه‌های ضدعفونی شده، سه بار به‌ترتیب به‌مدت ۱۵، ۱۰ و ۵ دقیقه با آب مقطر استریل شسته شدند. ریزنمونه‌ها در محیط موراشیک و اسکوگ (۱۹) (MS) به‌همراه ترکیبی از ۰، ۰/۱، ۰/۲ و ۲ میلی‌گرم در لیتر از NAA و BA کشت شدند (شکل ۱). این محیط‌ها هم‌چنین دارای ۰/۸ درصد آگار – آگار (CHROM agar، ساخت کشور فرانسه) و ۳ درصد ساکاروز بودند. اسیدیته (pH) محیط بر روی ۵/۸ – ۵/۶ تنظیم گردید. محیط‌های کشت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به‌مدت ۳۰ دقیقه ضدعفونی شدند. محیط‌های کشت حاوی ریزنمونه‌ها در اتاق



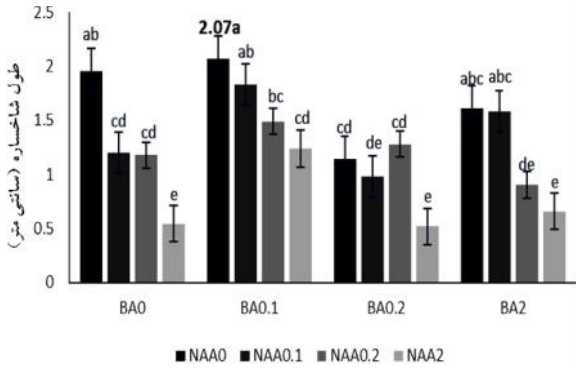
[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.27.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.323 ]




**شکل ۱. ریزنمونه‌های (جوانهٔ جانبی) لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*) و استقرار آنها. ۱) رشد ریزنمونه‌های کشت شده در محیط MS؛ ۲) جداسازی ریزنمونه‌ها برای کشت**




**شکل ۲. اثر NAA و BA بر طول شاخسارهٔ گیاهچه‌های لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*)، ۱- تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA (دارای بیشترین میانگین طول شاخساره؛ ۲- تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (دارای کمترین میانگین طول شاخساره).**




**شکل ۳. اثر NAA و BA بر میانگین طول شاخسارهٔ گیاهچه‌های لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*). حروف مشترک قرار گرفته روی ستون‌ها، عدم معنی‌داری اختلاف بین تیمارها را نشان می‌دهد.** BA: **غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین و**NA: **غلظت‌های مختلف نفتالن استیک اسید.**

رشد تحت فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۸ – ۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۸۰ – ۷۵ درصد و جریان تراکم فتون فتوسنتزی ۵۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه نگهداری شدند. پس از ۳۶ روز، صفات طول شاخساره، تعداد شاخساره، تعداد گره، تعداد ریشه، طول ریشه، طول طویل‌ترین و کوتاه‌ترین ریشه و مقدار کلروفیل برگ‌ها (توسط کلروفیل‌سنج دستی SPAD) اندازه‌گیری شدند. برای سازگاری، گیاهچه‌های بالغ با آب مقطر استریل شسته شدند و به گلدان‌های پلاستیکی حاوی پیت و پرلیت به نسبت ۱ به ۱ منتقل گردیدند. گلدان‌ها در یک گلخانه با دمای ۲۶ – ۲۴ درجهٔ سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد با آبیاری دوره‌ای نگهداری شدند. سازگاری گیاهچه‌های تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای به شرایط برون شیشه‌ای، ۲ هفته به طول انجامید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تیمار، ۳ تکرار و ۵ مشاهده انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با نرم‌افزار MSTATC و رسم نمودارها با برنامه‌ی Excel انجام گرفت.

## نتایج و بحث

مقایسه میانگین صفات نشان داد که بیشترین طول شاخسارهٔ لیسیانتوس مربوط به تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدون NAA با میانگین ۲/۰۷ سانتی‌متر و کمترین طول شاخساره در حضور تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA با میانگین ۰/۵۲ سانتی‌متر مشاهده گردید (شکل ۲ و ۳). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل NAA و BA بر طول شاخساره در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). استفاده از سیتوکینین BA در محیط کشت، افزایش طول شاخساره را باعث گردید و از تأثیر بیشتری نسبت به NAA برخوردار بود (شکل ۳). سیتوکینین‌ها به‌ویژه BA نقش مهمی در افزایش رشد طولی ساقه ایفا می‌نمایند. نتایج حاصل از این آزمایش، نتایج اوردوق و همکاران (۲۲) که بیشترین طول



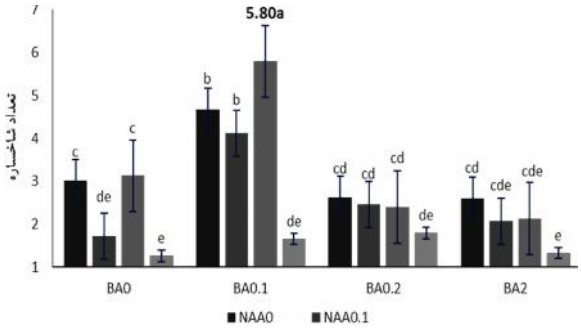
[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.27.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.323 ]

**جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثرات مختلف تنظیم کننده NAA و BA بر صفات اندازه‌گیری شده گیاهچه لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*)**

| منبع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | طول شاخساره | تعداد شاخساره | تعداد گره | طول ریشه | تعداد ریشه | مقدار کلروفیل |
| BA | ۳ | ۰/۹۶$^{**}$ | ۱۰/۵۰$^{**}$ | ۰/۱۰$^{ns}$ | ۸/۰۵$^{**}$ | ۱۵۷/۵۲$^{**}$ | ۴۹/۶۹$^{ns}$ |
| NAA | ۳ | ۱/۹۲$^{**}$ | ۸/۵۷$^{**}$ | ۳/۲۶$^{**}$ | ۴/۰۶$^{**}$ | ۶۵/۴۹$^{**}$ | ۱۷۱/۱۹$^{**}$ |
| BA × NAA | ۹ | ۰/۱۶$^{*}$ | ۱/۴۷$^{**}$ | ۰/۲۶$^{*}$ | ۱/۳۳$^{**}$ | ۳۹/۳۲$^{**}$ | ۱۳۵/۶۰$^{**}$ |
| خطا | ۳۲ | ۰/۰۶ | ۰/۳۱۳ | ۰/۱۰ | ۰/۰۷ | ۳/۷۳ | ۳۳/۰۴ |
| ضریب تغییرات (درصد) | | ۲۰/۴۸ | ۲۰/۸۸ | ۱۲/۵۹ | ۲۲/۰۹ | ۳۲/۵۶ | ۱۱/۳۴ |

$^{**}$و $^{*}$: به‌ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد، ns: غیرمعنی‌دار

**شکل ۴. اثر NAA و BA بر تعداد شاخسارهٔ گیاهچه‌های لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*)، ۱- تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (دارای بیشترین میانگین تعداد شاخساره؛ ۲- تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (بدون BA) (دارای کمترین میانگین تعداد شاخساره).**



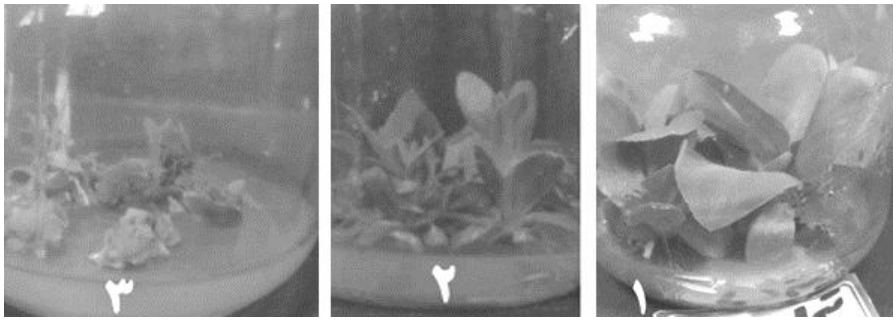

**شکل ۵. اثر غلظت‌های مختلف NAA و BA بر تعداد شاخسارهٔ گیاهچه‌های لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*). حروف مشترک قرار گرفته روی ستون‌ها، عدم معنی‌داری اختلاف بین تیمارها را نشان می‌دهد. BA: غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین و NA: غلظت‌های مختلف نفتالن استیک اسید.**

شاخسارهٔ گیاهچه‌های لیسیانتوس واریته *Blue Piccotte* را در محیط کشت MS غنی شده با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آوردند، تأیید می‌کند. در مطالعه‌ای، کی‌دونگ و همکاران (۱۴) نشان دادند که استفاده از BA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در افزایش طول شاخساره و رشد گیاهچه لیسیانتوس نقش مؤثرتری نسبت به سایر تیمارها داشت. مطالعه‌ی غفاری ایسی‌زاد و همکاران (۷) بر روی ریزازدیادی لیسیانتوس نشان داد که بیشترین طول شاخساره مربوط به تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN بدون NAA با میانگین ۲/۰۵۸ سانتی‌متر و کمترین طول شاخساره در حضور تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN با میانگین ۰/۸۵۸ سانتی‌متر به‌دست آمد. مطالعهٔ حاضر در ارتباط با عدم حضور NAA برای القای بالاترین طول شاخساره مطابق با نتایج به‌دست آمده توسط غفاری ایسی‌زاد و همکاران (۷) است.

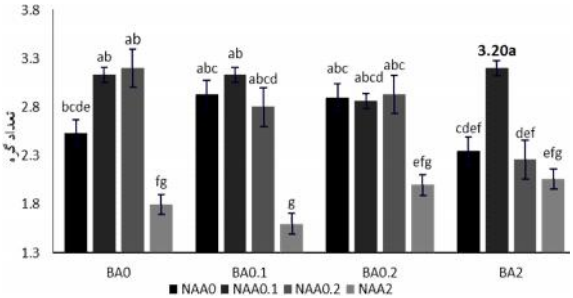
مقایسهٔ میانگین صفات نشان داد که بیشترین میانگین تعداد شاخساره (۵/۸۰ عدد در گیاه) مربوط به تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و کمترین تعداد شاخساره (۱/۲۶ عدد در گیاه) مربوط به تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (بدون BA)، بودند (شکل ۴ و ۵). نتایج نشان داد که BA نقش مهمی در افزایش تعداد شاخساره دارد. تعداد شاخسارهٔ تولید شده در تیمارهای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدون NAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.27.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.323 ]




**شکل ۶. اثر NAA و BA بر تعداد گره گیاهچه‌های لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*)، ۱- تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در در لیتر NAA بدون BA؛ و ۲- تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (دارای بیشترین میانگین تعداد گره)؛ ۳- تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (دارای کمترین میانگین تعداد گره).**



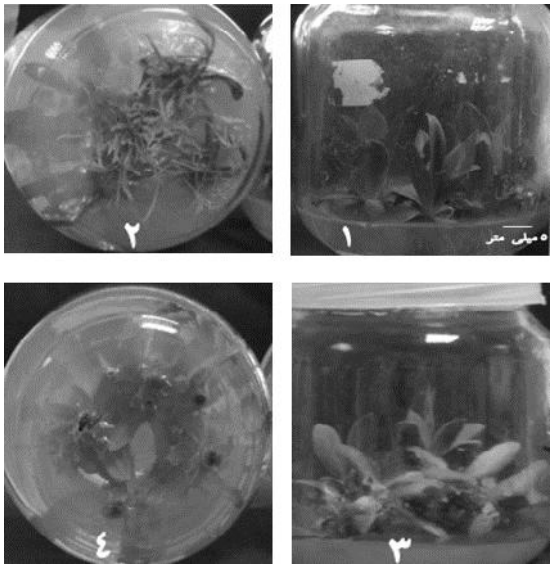

**شکل ۷. اثر غلظت‌های مختلف NAA و BA بر میانگین تعداد گره در گیاهچه‌های لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*). حروف مشترک مشترک قرار گرفته روی ستون‌ها، عدم معنی‌داری اختلاف بین تیمارها را نشان می‌دهد. BA: غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین و NA: غلظت‌های مختلف نفتالن استیک اسید.**

در لیتر NAA، به‌ترتیب با ۴/۶۸ و ۴/۱۳ شاخساره در گیاه، تیمارهای نسبتاً مناسبی بودند. نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل NAA و BA بر تعداد شاخساره در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مطالعه‌ی پک و هان (۲۳) بر روی لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*) نشان داد که BA و KIN در غلظت‌های بالا باعث تشکیل شاخسارهٔ بیشتر می‌شوند. در مطالعهٔ حاضر، غلظت پایین‌تر BA نقش مؤثرتری را در افزایش شاخساره نشان داد. مطالعهٔ فوکای و همکاران (۳) نشان داد که محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بالاترین تعداد سرشاخه را در ریزنمونه‌های لیسیانتوس تولید کرد. ریزنمونه‌های سرشاخه‌ی لیسیانتوس بر روی محیط حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA به‌خوبی تکثیر شدند (۲۶).

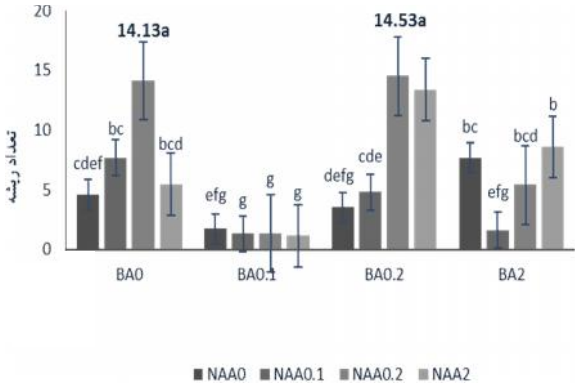
مقایسهٔ میانگین صفات نشان داد که بیشترین میانگین تعداد گره در گیاه (۳/۲۰) مربوط به تیمار ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA همراه با ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA و کمترین آن (۱/۶۰ عدد در گیاه) در تیمار دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BA تولید شد (شکل ۶ و ۷). در تیمار اخیر (۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BA) کالوس فراوانی تولید شد (شکل ۶). تعداد گرهٔ تولید شده در تیمارهای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (۳/۱۳ عدد در گیاه) گواه این موضوع است که این تیمارها نیز مناسب هستند. تجزیهٔ واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل NAA و BA بر تعداد گره در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مطالعه بر روی ریزازدیادی سایر گیاهان زینتی، اهمیت سیتوکینین‌ها به‌ویژه BA را نشان داده است. نورتن و بو (۲۱)، تکثیر سرشاخه را در میان ۱۲ گونه گیاه زینتی با استفاده از BA و بدون اکسین نشان دادند. گومز و همکاران (۸) دریافتند که NAA قادر به اصلاح میزان تکثیر نیست و بهترین نتایج بر روی محیط‌های کشت بدون NAA به‌دست آمدند. مطالعهٔ ما نشان داد که، محیط‌های بدون NAA و یا با غلظت بالای NAA تعداد گره زیادی را تحریک نکرد و غلظت پایین



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.27.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.323 ]




**شکل ۸. اثر NAA و BA بر تعداد ریشهٔ گیاهچه‌های لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*)، ۱- تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر از NAA و BA (شکل از روبرو) و ۲- تیمار مشابه با شماره ۱ (شکل از زیر) (دارای بیشترین میانگین تعداد ریشه)؛ ۳- تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از NAA و BA (شکل از روبرو) و ۴- تیمار مشابه با شماره ۳ (شکل از زیر) (دارای کمترین میانگین تعداد ریشه).**




**شکل ۹. اثر غلظت‌های مختلف NAA و BA بر میانگین تعداد ریشه در گیاهچه‌های لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*). حروف مشترک قرار گرفته روی ستون‌ها، عدم معنی‌داری اختلاف بین تیمارها را نشان می‌دهد. BA: غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین و NA: غلظت‌های مختلف نفتالن استیک اسید.**

BA بدون NAA غلظت‌های برتر بودند. غلظت کم NAA (۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) به‌تنهایی یا همراه با همهٔ غلظت‌های BA برای تحریک تشکیل گره مناسب تشخیص داده شدند. در تأیید یافتهٔ این تحقیق، برخی محققان نشان دادند که تعدادی از گونه‌ها به غلظت پایین اکسین همراه با غلظت‌های بالای سیتوکینین برای افزایش تکثیر سرشاخه، نیاز دارند (۴، ۱۱ و ۳۰). در برخی گونه‌ها، بالاترین درصد تکثیر در محیط بدون KIN مشاهده شد (۲۰). طبق گزارش اسکرزیپکزاک و همکاران (۲۷) بیشترین تعداد گره در لیسیانتوس در محیط کشت همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد. به‌نظر می‌رسد که با افزایش سیتوکینین تشکیل گره تحریک می‌شود.

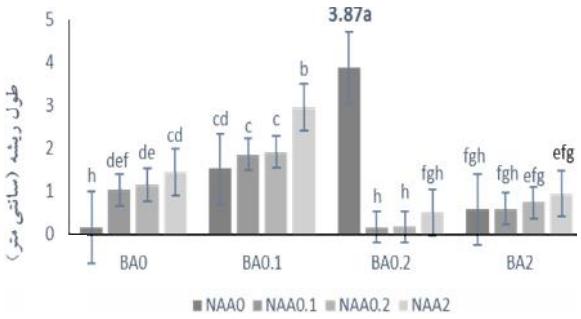
مقایسهٔ میانگین صفات نشان داد که بیشترین تعداد ریشه (۱۴/۵۳ عدد در گیاه) در تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد، که با تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون BA با القای ۱۴/۱۳ ریشه در گیاه و تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA با القای ۱۳/۴۰ ریشه در گیاه، اختلاف معنی‌داری نداشتند (شکل ۸ و ۹). کمترین تعداد ریشه (۰/۳۳ عدد در گیاه) در دو تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA تولید شد. اثر متقابل NAA و BA بر تعداد ریشه، در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است (جدول ۱).

جدول مقایسهٔ میانگین صفات نشان می‌دهد که بیشترین طول ریشه (۳/۸۷ سانتی‌متر در گیاه) مربوط به تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA بدون NAA و کمترین طول ریشه (۰/۱۶ سانتی‌متر در گیاه) مربوط به تیمارهای شاهد و تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بود (شکل ۱۰ و ۱۱). از تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (یعنی افزایش غلظت BA) به بالا همهٔ تیمارها دارای ریشه‌های کوتاهی بودند. اثر متقابل NAA و BA بر طول ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). فوکای و همکاران (۳) نشان دادند که رشد مریستم انتهایی ریشه لیسیانتوس در محیط کشت عاری از اکسین



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.27.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.323 ]

**شکل ۱۰. اثر NAA و BA بر طول ریشهٔ گیاهچه‌های لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*)، ۱) تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA بدون NAA (دارای بیشترین طول ریشه)؛ ۲) تیمار فاقد BA و NAA (شاهد) (دارای کمترین طول ریشه).**




**شکل ۱۱. اثر غلظت‌های مختلف NAA و BA بر میانگین طول ریشهٔ گیاهچه‌های لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*). حروف مشترک قرار گرفته روی ستون‌ها، عدم معنی‌داری اختلاف بین تیمارها را نشان می‌دهد.** BA: **غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین و** NA: **غلظت‌های مختلف نفتالن استیک اسید.**

مطلوب و کاهش توسعه ریشه‌های جانبی در غلظت بالای NAA رخ می‌دهد و نیز مشاهده شد که NAA مؤثرتر از IBA در تحریک سرآغازه‌های ریشه‌های جانبی است و در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA کالوس تشکیل شد. بنابراین، نوع ریزنمونه و هورمون در تشکیل ریشهٔ گیاهچهٔ لیسیانتوس مؤثر است. یافته‌های ما نشان داد که افزایش NAA به محیط‌های کشت در غلظت بالا برای افزایش تعداد و طول ریشه‌ها مؤثر نبود و بهترین نتیجه در ترکیب غلظت‌های کم BA و NAA به‌دست می‌آید. برخی مطالعات اثر مثبت NAA را بر روی ریشه‌زایی نشان دادند (۶، ۹، ۱۳، ۱۶ و ۳۲). ریشه‌زایی، یک مرحلهٔ بحرانی برای موفقیت ریزازدیادی است. برخی مطالعات دیگر، اثر سیتوکینین‌ها را بر روی ریشه‌زایی مثبت ارزیابی کردند (۸ و ۱۳). برخی محققان حضور مقادیر کم اکسین برای القای ریشه، نه برای رشد آن را توصیه کردند (۱۰ و ۳۲). مطالعهٔ حاضر نیز به این نتیجه رسید.

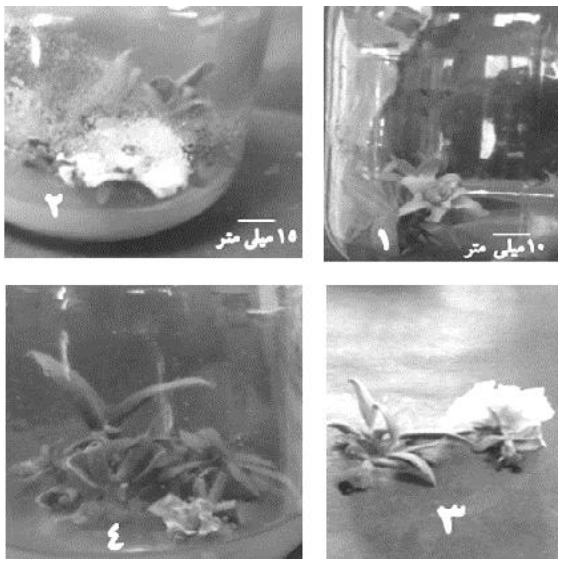
اندازه‌گیری میزان کلروفیل برگ‌ها نشان داد که برگ گیاهان رشد یافته در محیط کشت حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA بدون NAA دارای بالاترین مقدار (۶۰/۵۰) و برگ گیاهان شاهد دارای کمترین مقدار کلروفیل (۳۶/۷۰) هستند.

در پژوهش حاضر، گل بر روی برخی از نمونه‌های گیاهی (گیاهچه و کالوس) در محیط کشت تشکیل شد (شکل ۱۲). گل در گیاهچه‌های کشت شده بر روی محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدون NAA و محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و بر روی کالوس تیمار شده با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌وجود آمد (شکل ۱۲). گل تشکیل شده در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدون NAA و در کالوس به‌صورت غنچه باقی ماندند و شکوفا نشدند، درحالی‌که گل تولید شده در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA شکوفا شده و به‌طور کامل تشکیل گردید. گل‌دهی درون شیشه‌ای در برخی گیاهان زینتی گزارش شده است (۱، ۲۹، ۳۱ و ۳۴). مطالعه‌ی کالپا و نوواک (۱۵) بر روی کشت تک گره اطلسی بر روی محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و جیبرلین‌ها نشان داد که محیط غنی شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN، بیشترین تعداد گل (۲/۳۹ عدد در گیاهچه) و بیشترین گل‌دهی (۸۲ درصد) را القاء کرد. مطالعه بر روی گوجه‌فرنگی (۲)، بامبو (۱۷) و برخی گیاهان دیگر اثر بهتر سیتوکینین‌ها را در گل‌دهی نسبت به سایر هورمون‌ها نشان داد. یافته‌های ما نتایج این تحقیقات را کاملاً تأیید می‌کند.

نتایج مراحل سازگاری نشان داد که ۹۸ درصد از گیاهچه‌ها بقاء



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.27.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.323 ]




**شکل ۱۲. اثر NAA و BA بر تولید گل در گیاهچه‌های لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*)، ۱- تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدون NAA (تشکیل غنچه)؛ ۲- تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (گل کامل)؛ ۳- تیمار شماره‌ی ۲ خارج شده از ظرف کشت؛ ۴- تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (غنچهٔ تشکیل شده بر روی کالوس).**

**شکل ۱۳. سازگاری گیاهچه‌های لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*) انتقال یافته از شرایط درون شیشه‌ای به شرایط برون شیشه‌ای.**

داشتند و در شرایط گلخانه رشد کردند. این گیاهچه‌ها از نظر مورفولوژیکی شبیه گیاه مادری بودند (شکل ۱۳). مخلوطی از خاک سبک (مانند پیت و پرلیت به نسبت ۱ به ۱) با زهکشی خوب برای سازگاری گیاه لیسیانتوس مناسب است.

## نتیجه‌گیری

برای افزایش طول و تعداد شاخساره، ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به هیچ عنوان خوب نیست. هم‌چنین، هیچ‌یک از غلظت‌های این هورمون به‌تنهایی برای ارتقاء طول ریشه مناسب نیستند، درحالی‌که، غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌تنهایی یا در ترکیب با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA برای افزایش تعداد ریشه مناسب است. نتایج بررسی‌های حاضر نشان داد که BA به‌تنهایی، به‌جزء در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر برای افزایش طول شاخساره و ریشه، برای ریزازدیادی لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*) رقم سفید (White) مناسب نیست، بلکه ترکیب آن با NAA مناسب تشخیص داده شد. ترکیب ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA با ۰/۱ و به‌ویژه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA برای ارتقاء کمی همهٔ صفات بهینه بودند. گل‌دهی در گیاهچه‌های کشت شده بر روی محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدون NAA و یا با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA انجام شد.

## منابع مورد استفاده

1. Dewir, Y., D. Chakrabart, M. Ali, N. Singh, E. Hahn and K. Paek. 2007. Influence of $GA_3$, sucrose and solid medium/bioreactor culture on *in vitro* flowering of *Spathiphyllum* and association of glutathione metabolism. *Plant*



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.27.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.323 ]

*Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 225-235.
2. Dielen, V., V. Lecouvet, S. Dupont and J. Kinet. 2001. *In vitro* control of floral transition in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), the model for autonomously flowering plants, using the late flowering uniflora mutant. *Journal of Experimental Botany* 52 (357): 715-723.
3. Fukai, S., H. Miyata and M. Goi. 1996. Factors affecting adventitious shoot regeneration from leaf explants of prairie gentian (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinners). *Technical Bulletin of Faculty of Agriculture-Kagawa University* 48 (2): 103-109.
4. Fuller, M. P. and F. M. Fuller. 1995. Plant tissue culture using *Brassica* seedlings. *Journal of Biological Education* 20 (1): 53-59.
5. Furukawa, H., Matsubara C. and N. Shigematsu. 1990. Shoot regeneration from the roots of prairie gentian (*Eustoma grandiflorum* (Griseb.) Schinners). *Plant Tissue Culture Letters* 7 (1): 11-13.
6. Gautam, V. K., A. Mittal, K. Nanda and S. C. Gupta. 1983. *In vitro* regeneration of plantlets from somatic explants of *Matthiola incana*. *Plant Science Letters* 29: 25-32.
7. Ghafari Esizad, S., B. Kaviani, A. R. Tarang and S. Bohlooli Zanjani. 2012. Micropropagation of lisianthus, an ornamental plant. *Plant Omics Journal* 5: 314-319.
8. Gomes, F., M. Simões, M. L. Lopes and M. Canhoto. 2010. Effect of plant growth regulators and genotype on the micropropagation of adult trees of *Arbutus unedo* L. (strawberry tree). *New Biotechnology* 45 (1): 72-82.
9. Hammaudeh, H. Y., M. A. Suwwan, H. A. Abu-Quoud and R. A. Shibli. 1998. Micropropagation and regeneration of honeoye strawberry. *Dirasat Agricultural Science* 25: 170-178.
10. Hartmann, H. J., D. E. Kester, F. T. Davies and R. T. Geneve. 1997. Plant Propagation: Principle and Practices. 6th Edition, Prentica-Hill, Englewood Cliffs, NJ.
11. Hashemabadi, D. and B. Kaviani. 2010. *In vitro* proliferation of an important medicinal plant Aloe-A method for rapid production. *Australian Journal of Crop Science* 4 (4): 216-222.
12. Huang, X., B. Yang, C. Hu and J. Yao. 2009. *In vitro* induction of inflorescence in *Dioscorea zingiberensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99: 209-215.
13. Jain, S. M. and S. J. Ochatt. 2010. Protocols for *In Vitro* Propagation of Ornamental Plants. Springer Protocols, Humana Press. New York, USA.
14. Kedong, D., Z. Song, Z. Yunxiang, Z. Zhigue and W. Lueping. 2003. Study on adventitious shoot regeneration and micro-propagation from leaves of *lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*). *Journal of Shandong Agriculture University* 34(4): 494-498. (In Chinese, Abstract in English).
15. Kulpa, D. and N. Nowak. 2011. *In vitro* flowering of Petunia × atkinsiana D. Don. *Folia Horticulture* 23/2: 125-129.
16. Lee-Epinosa, H. E., J. Murguia-Gonzalez, B. Garcia-Rosas, A. L. Cordova-Contreras and C. Laguna. 2008. *In vitro* clonal propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *HortScience* 43: 454-458.
17. Lin, CH. S., C. J. Liang, H. W. Hsaio, M. J. Lin and W. C. Chang. 2007. *In vitro* flowering of green and albino *Dendrocalamus latiflorus*. *New Forests* 34 (2): 177-186.
18. Masmoudi-Allouche, F., B. Meziou, W. Kriaâ, R. Gargouri-Bouzid and N. Drira. 2010. *In vitro* flowering induction in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of Plant Growth Regulation* 29 (1): 35-43.
19. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
20. Nayak, S., B. Hatwar and A. Jain. 2010. Effect of cytokinin and auxins on meristem culture of *Bambusa arundinacea*. *Der Pharmacia Letter* 2 (1): 408-414.
21. Norton, M. E. and A. A. Boe. 1982. *In vitro* propagation of ornamental rosaceous plants. *HortScience* 17: 190-191.
22. Ordogh, M., E. Jambor-Benczur and A. Tilly-Mandy. 2006. Micropropagation of echo cultivars of *Eustoma grandiflorum*. *In:* Proceeding of the V International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding. (ISHS), Debrecen, Hungary. pp. 457-460.
23. Paek, K. Y. and E. J. Hahn. 2000. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of *lisianthus* [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 36: 128-132.
24. Rout, G. R. and S. M. Jain. 2004. Micropropagation of ornamental plant- cut flowers. *Propagation of Ornamental Plants* 4 (2): 3-28.
25. Ruffoni, B., C. Damiano, F. Massabò and P. Esposito. 1990. Organogenesis and embryogenesis in *Lisianthus russellianus* Hook. *In:* Proceeding of I International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding. (ISHS), Bologna - Cesena -Italy. pp. 83-88.
26. Semeniuk, P. and R. J. Griesbach. 1987. *In vitro* propagation of prairie gentian. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 8: 249-253.



[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.27.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.323 ]

27. Skrzypczak, L., M. Wesolowska and J. Budsianowski. 1993. *Eustoma grandiflorum* shinn (Texas bluebell): callus culture, micropropagation, and the production of gentiopiside and other secondary metabolites. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 24: 192-201.
28. Taylor, N. J. and J. van Staden. 2006. Towards an understanding of *in vitro* flowering. PP: 1-22. *In:* J. A. T. Da Silva (Ed.), Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues. Global Sciences Book, London.
29. Tee, C. S., M. Maziah and C. S. Tan. 2008. Induction of *in vitro* flowering in the orchid *Dendrobium* Sonia 17. *Biologia Plant arum* 52 (4): 723-726.
30. Van Staden D., E. Zazimalora and E. F. George. 2008. Plant growth regulators, II: cytokinins, their analogues and inhibitors. PP. 205-226. *In:* E. F. George and et al (Eds.). Plant Propagation by Tissue Culture, Springer. Netherland
31. Wang, G. Y., M. F. Yuan and Y. Hong. 2002. *In vitro* flower induction in roses. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 38: 513-518.
32. Xilin, H. 1992. Effect of different cultivars and hormonal conditions on strawberry anther culture in vitro. *Journal of Nanjing Agriculture University* 15: 21-28.
33. Yuan-Rong, M., L. Qian and Z. Gen-Yu. 2004. Establishment of leaf regeneration system in *Eustoma russellianum*. *Journal of Shanghai Teachers University* 01 (In Chinese, Abstract in English).
34. Zhang, Z. and D. Leung. 2002. Factors influencing the growth of micropropagated shoots and *in vitro* flowering of gentian. *Plant Growth Regulation* 36: 245-250.

[ Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.27.0 ]
[ DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.323 ]