اثر غلظت‌های مختلف نفتالن استیک اسید و کینتین روی ریزازدیادی گیاه زینتی لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*)

بهزاد کاویانی[1]* و سارا غفاری ایسی‌زاد[2]

[1] رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، دانشکده کشاورزی، گروه باغبانی

[2] رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده کشاورزی، گروه باغبانی

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۴

چکیده

یکی از مهم‌ترین و کاربردی‌ترین فنون کشت بافت گیاهی، ریزازدیادی است. لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*) یک گیاه زینتی است که مطالعه کمی بر روی ریزازدیادی آن انجام شده است. هدف از این پژوهش، بررسی اثر غلظت‌های مختلف نفتالن استیک اسید (NAA) و کینتین (KIN) بر روی ریزازدیادی لیسیانتوس بود. به این منظور، ریزنمونه‌ها در محیط موراشیگ و اسکوگ (MS) با غلظت‌های مختلف NAA و KIN (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. نتایج نشان داد که بیشترین طول نوشاخه (با میانگین ۲/۳۲۵ سانتی‌متر در ریزنمونه)، در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN (فاقد NAA) حاصل شد. بیشترین تعداد نوشاخه (با میانگین ۲/۸۰۰ و ۲/۵۵۰ در ریزنمونه)، در محیط‌های دارای ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN (فاقد NAA) تولید شد. بیشترین تعداد گره (با میانگین ۸/۳۵۸ عدد در ریزنمونه) در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN (فاقد NAA) به‌دست آمد. بیشترین تعداد نوریشه (با میانگین ۲/۶۵۰ در ریزنمونه)، در محیط کشت دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN تولید شد. گیاهان باززایی‌شده در شرایط خارج از آزمایشگاه، ۱۰۰ درصد بقا را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، جوانه‌های رأسی و محوری، لیسیانتوس، ریزازدیادی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۱۷۷۷۴۸۲، پست الکترونیکی: b.kaviani@yahoo.com

مقدمه

لیسیانتوس یکی از گونه‌های زینتی تیره‌ی جنتیاناسه (Gentianaceae) است که گل‌هایی به رنگ‌های متنوع آبی، سفید، صورتی، زرد، قرمز، بنفش، ارغوانی و ترکیبی از رنگ‌ها دارد (۳). این گیاه بومی ایالات متحده جنوبی، نبراسکا، لویزیانا و مکزیک است و به‌عنوان گل شاخه‌بریده و گلدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۲ و ۲۷). روش معمول تکثیر لیسیانتوس با بذر است و با توجه به‌اینکه بذر آن بسیار ریز است، تولید با این روش در سطح وسیع، با ناهمسانی ژنتیکی و احتمال آلودگی گیاهچه همراه است (۶). روش‌های پیشرفته‌ای در اختیار تولیدکنندگان گیاهان زینتی و دارویی قرار دارد که می‌توانند نیازهای بازارهای جهانی را در قرن آینده فراهم کنند (۲). ریزازدیادی، ابزار مؤثری در تکثیر گیاهان زینتی در مقیاس وسیع است. برای توسعه‌ی تجارت گل‌های شاخه‌بریده در سطح جهانی، روش‌های جدیدی به‌کار گرفته می‌شود (۲۳). این روش‌ها بر اساس سطوح بهینه‌ی کربوهیدرات، ترکیبات آلی، مواد معدنی، عوامل محیطی و تنظیم‌کننده‌ها بوده است و مقادیر بالایی از باززایی را در شرایط درون‌شیشه‌ای پدید آورده‌اند (۲). بنابراین، استفاده از روش ریزازدیادی، یکی از راه‌های دستیابی به تعداد زیادی نشای لیسیانتوس با ساختار ژنتیکی یکسان و کاهش هزینه‌های تولید می‌باشد و امکان تولید مداوم و سریع را در پی دارد (۲۶). همچنین لیسیانتوس به

عنوان یک محصول تقریبا جدید در بازار بین‌المللی، به سرعت به‌عنوان یکی از ده گل شاخه‌بریده برتر جهان معرفی شده است. از علت‌های این انتخاب، می‌توان به داشتن گل‌های شبیه گل سرخ، رنگ‌های متنوع گل و عمر پس از برداشت طولانی اشاره کرد. رشد و نمو این گیاه در طبیعت بسیار کند است و ناهمسانی زیادی در کیفیت گل، زمان گلدهی، تعداد گل و ارتفاع گیاه مشاهده می‌شود (۶). تلاش‌هایی برای ریزازدیادی لیسیانتوس با استفاده از هورمون‌های مختلف از جمله NAA، KIN، IBA و BA انجام شده است (۱۳، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۶، ۲۷، ۳۰). هدف از این پژوهش، بررسی اثر غلظت‌های مختلف NAA و KIN بر روی ریزازدیادی لیسیانتوس در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌باشد.

مواد و روشها

گیاه مادری لیسیانتوس از گلخانه‌ای در مشهد تهیه شد. ریزنمونه‌ی مورد استفاده، جوانه‌ی راسی بود. 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 سترون، به‌مدت ۳۰ ثانیه با اتانول ۷۰ درصد و سپس محلول سدیم هیپوکلریت ۲ درصد به‌همراه ۲ قطره توین ۲۰ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی گردیدند. در مرحله بعد پس از سه بار شستشو با آب مقطر سترون، ریزنمونه‌ها به محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) (۱۷) با نصف غلظت به همراه غلظت‌های مختلف NAA و KIN هر یک در چهار سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. قبل از سترون‌سازی، pH محیط کشت روی ۵/۸-۵/۶ تنظیم شد، همچنین میزان آگار ۰/۸-۰/۷ درصد و میزان ساکارز ۳ درصد بود. محیط‌های کشت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به‌مدت ۳۰ دقیقه سترون شدند. محیط‌های کشت حاوی ریزنمونه‌ها در اتاق رشد تحت فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۸۰-۷۵ درصد و جریان تراکم فتون فتوسنتزی ۵۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه نگهداری شدند. پس از ۴۰ روز، پارامترهایی مانند طول نوشاخه، تعداد نوشاخه، تعداد گره و تعداد نوریشه اندازه‌گیری شد. گیاهچه‌های بالغ با آب مقطر سترون، 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 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد با آبیاری دوره‌ای نگهداری شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا" تصادفی با ۱۶ تیمار و ۵ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با نرم‌افزار MSTATC و رسم نمودارها با برنامه EXCEL انجام گرفت.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر هورمون NAA بر طول نوشاخه در سطح ۱ درصد و اثر متقابل NAA و KIN بر روی این صفت در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. غلظت‌های مختلف KIN بر روی طول نوشاخه اثر معنی‌داری نداشتند (جدول ۱). مقایسه میانگین صفات (جدول ۲) نشان داد که بیشترین طول نوشاخه‌ی لیسیانتوس مربوط به تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN بدون NAA با میانگین ۲/۳۲۵ سانتی‌متر در ریزنمونه و کمترین طول نوشاخه در حضور تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN با میانگین ۰/۸۸۸ سانتی‌متر در ریزنمونه مشاهده گردید (شکل ۱). استفاده از سیتوکینین KIN در محیط کشت، افزایش طول نوشاخه را باعث گردید و از تأثیر بیشتری نسبت به NAA برخوردار بود (شکل ۲).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر هر یک از هورمون‌های NAA و KIN به‌تنهایی بر روی تعداد نوشاخه در سطح ۱ درصد و اثر متقابل آنها بر روی این صفت در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه‌ی میانگین صفات (جدول ۲) نشان داد که بیشترین میانگین تعداد

نوشاخه، مربوط به ریزنمونه‌های رشدیافته در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN (فاقد NAA) و ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN (فاقد NAA) با میانگین ۲/۵۵۰ و ۲/۸۰۰ عدد در ریزنمونه بود. کمترین تعداد نوشاخه، در تیمار دارای ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA (فاقد KIN)، ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA(فاقد KIN) و ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر KIN (با میانگین ۰/۴۷۰ در ریزنمونه) مشاهده گردید. در محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA (فاقد KIN)، ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN نوشاخه تولید نشد (شکل ۱). استفاده از سیتوکینین KIN در این محیط کشت، افزایش تعداد نوشاخه را باعث گردید. این موضوع حاکی از آن است که پرآوری گیاهچه، نیاز به غلظت بالای سیتوکینین دارد (شکل ۳).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف NAA و KIN بر صفات اندازه‌گیری‌شده گیاهچه لیسیانتوس

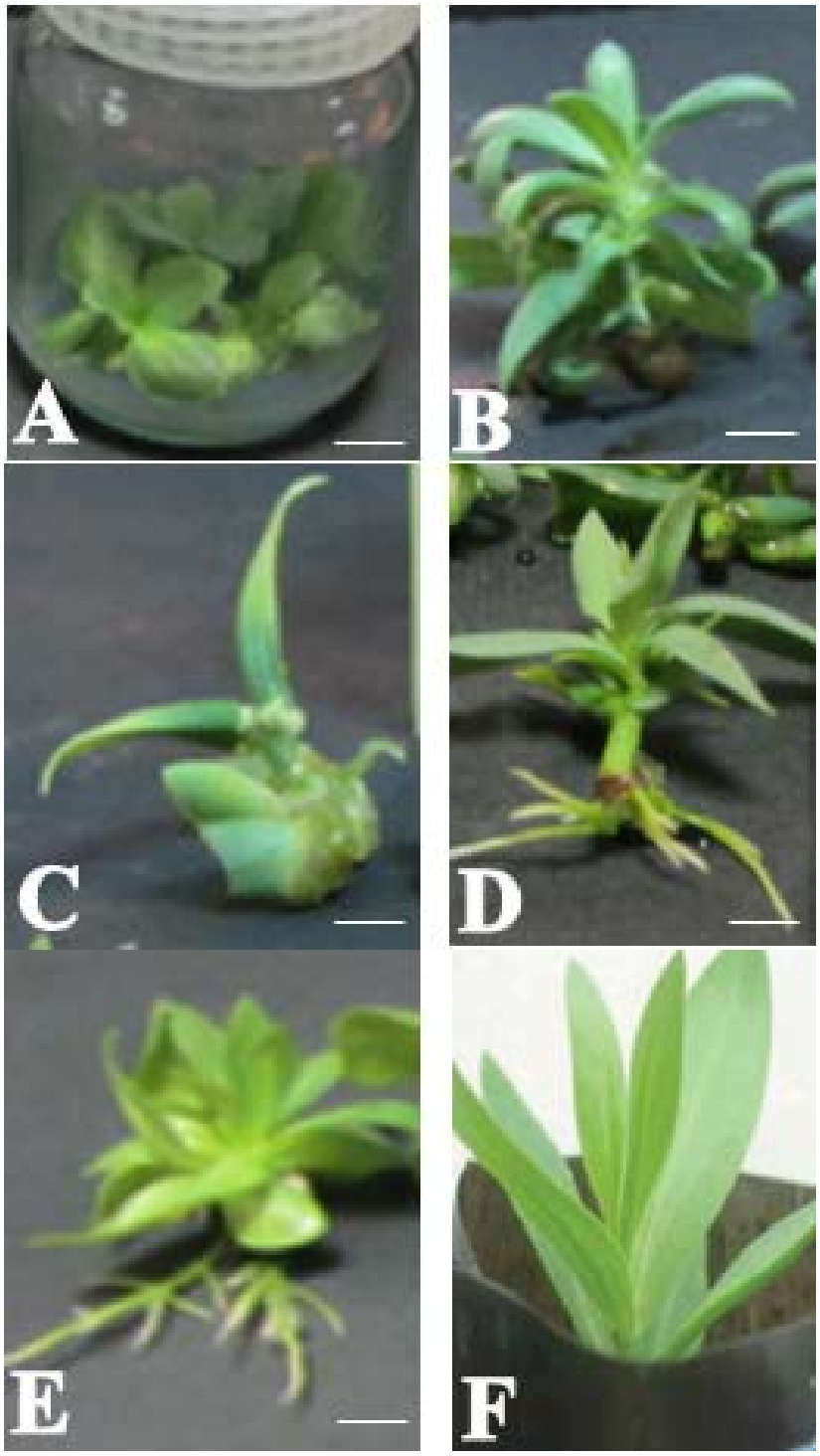
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		طول نوشاخه	تعداد نوشاخه	تعداد گره	تعداد نوریشه
NAA	۳	۱/۳۰**	۱/۲۴**	۳۵/۰۷**	۰/۲۸ns
KIN	۳	۰/۰۵ns	۱/۱۴**	۱۰/۶۴**	۰/۰۶ns
NAA × KIN	۹	۰/۲۸*	۰/۲۱*	۹/۵۵**	۰/۳۷ns
خطای آزمایشی	۶۴	۰/۱۳	۰/۱۰	۰/۶۸	۰/۲۳
CV (%)		۲۵/۶۵	۲۰/۱۵	۲۵/۸۰	۳۶/۸۶

** و *: به ترتیب معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح ۱ و ۵ درصد، ns: غیرمعنی‌دار بودن میانگین‌ها

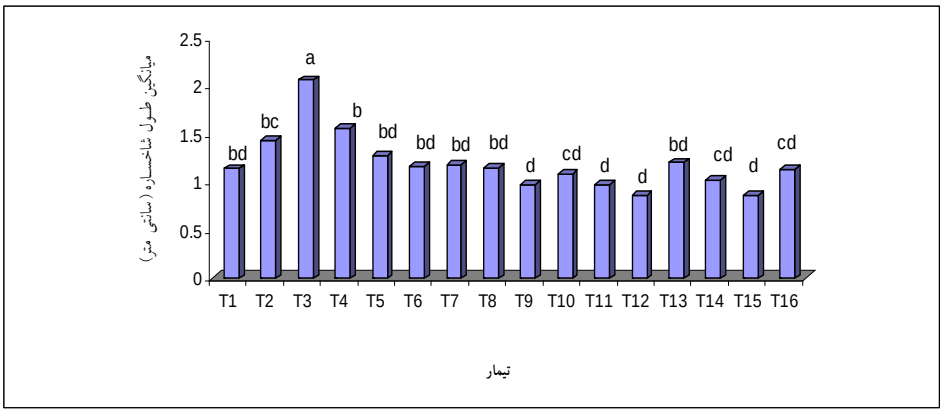
جدول ۲- مقایسه‌میانگین اثر متقابل NAA و KIN بر صفات اندازه‌گیری‌شده (میانگین ± SD) در گیاهچه‌های باززایی‌شده‌لیسیانتوس

تیمارهای هورمونی (میلی‌گرم در لیتر)	طول نوشاخه (سانتی‌متر)	تعداد نوشاخه در گیاهچه‌های باززایی‌شده	تعداد گره در گیاهچه‌های باززایی‌شده	تعداد نوریشه در گیاهچه‌های باززایی‌شده
T1 (۰ NAA + ۰ KIN)	۱/۳۵۵ ± ۰/۱۰b-d	۱/۰۰۰ ± ۰/۰۲d	۲/۰۰۰ ± ۰/۱۵d	۰/۶۵۰ ± ۰/۰۷c
T2 (۰ NAA + ۰/۵ KIN)	۱/۳۳۳ ± ۰/۱۴bc	۲/۵۵۰ ± ۰/۲۲a	۸/۳۵۸ ± ۰/۲۰a	۱/۷۲۰ ± ۰/۱۵c
T3 (۰ NAA + ۱ KIN)	۲/۳۲۵ ± ۰/۲۲a	۲/۸۰۰ ± ۰/۳۲a	۴/۴۸۰ ± ۰/۱۰bc	۰/۰۰۰c
T4 (۰ NAA + ۲ KIN)	۱/۵۰۴ ± ۰/۱۰b	۲/۰۰۰ ± ۰/۲۰b	۴/۵۰۰ ± ۰/۱۲b	۰/۰۰۰c
T5 (۰/۵ NAA + ۰ KIN)	۱/۲۸۰ ± ۰/۱۵b-d	۰/۴۷۰ ± ۰/۰۴de	۳/۱۴۰ ± ۰/۱۶cd	۰/۰۰۰c
T6 (۰/۵ NAA + ۰/۵ KIN)	۱/۲۶۰ ± ۰/۱۷b-d	۱/۵۵۰ ± ۰/۱۲b-d	۲/۸۰۰ ± ۰/۱۴cd	۰/۰۰۰c
T7 (۰/۵ NAA + ۱ KIN)	۱/۳۸۴ ± ۰/۱۰b-d	۱/۲۹۰ ± ۰/۰۸b-d	۲/۸۰۰ ± ۰/۱۳cd	۰/۶۴۰ ± ۰/۰۵c
T8 (۰/۵ NAA + ۲ KIN)	۱/۳۵۰ ± ۰/۱۳b-d	۲/۰۰۰ ± ۰/۳۳a-c	۳/۰۰۰ ± ۰/۲۲cd	۲/۶۵۰ ± ۰/۲۵a
T9 (۱ NAA + ۰ KIN)	۰/۹۸۲ ± ۰/۰۸d	۰/۰۰۰e	۲/۳۰۰ ± ۰/۱۰de	۰/۰۰۰c
T10 (۱ NAA + ۰/۵ KIN)	۱/۱۰۰ ± ۰/۱۰cd	۲/۰۰۰ ± ۰/۳۰a-c	۳/۲۸۰ ± ۰/۱۰cd	۰/۰۰۰c
T11(۱ NAA +۱ KIN)	۰/۹۲۰ ± ۰/۰۵d	۱/۲۷۰ ± ۰/۰۸b-d	۲/۵۲۰ ± ۰/۱۱d	۲/۳۰۰ ± ۰/۲۵b
T12 (۱ NAA + ۲ KIN)	۰/۹۶۰ ± ۰/۰۴d	۲/۴۹۰ ± ۰/۱۳ab	۱/۷۴۰ ± ۰/۰۹de	۰/۰۰۰c
T13 (۲ NAA + ۰ KIN)	۱/۲۲۲ ± ۰/۱۲b-d	۰/۴۷۰ ± ۰/۰۵de	۲/۵۰۰ ± ۰/۱۰de	۰/۰۰۰c
T14 (۲ NAA + ۰/۵ KIN)	۱/۱۱۶ ± ۰/۱۰cd	۰/۴۷۰ ± ۰/۰۶de	۲/۴۴۰ ± ۰/۰۸de	۰/۰۰۰c
T15 (۲ NAA + ۱ KIN)	۰/۸۸۸ ± ۰/۰۵d	۰/۰۰۰e	۱/۳۰۰ ± ۰/۱۰e	۰/۰۰۰c
T16 (۲ NAA + ۲ KIN)	۱/۱۰۰ ± ۰/۱۹cd	۱/۵۵۰ ± ۰/۲۲b-d	۳/۳۲۰ ± ۰/۱۳cd	۰/۰۰۰c

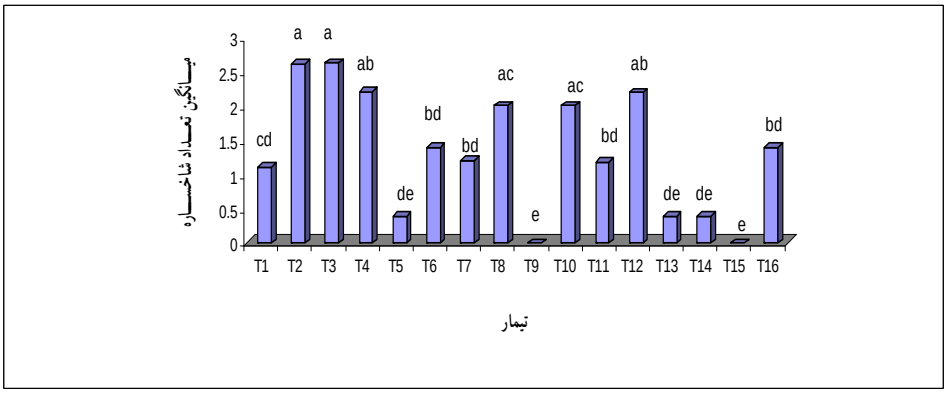
میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار داشتند



شکل ۱– ریزازدیادی گیاه زینتی لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*) با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (NAA و KIN). a: دانه‌رست-های درون‌شیشه‌ای برای تکثیر نوشاخه؛ b: تیمار حاوی یک میلی‌گرم در لیتر KIN بدون NAA (دارای بیشترین میانگین طول نوشاخه)؛ c: تیمار حاوی دو میلی‌گرم در لیتر NAA بدون KIN (دارای کمترین میانگین طول نوشاخه)؛ d: تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN بدون NAA (بیشترین میانگین تعداد گره)؛ e: تیمار حاوی دو میلی‌گرم در لیتر KIN همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (بیشترین میانگین تعداد نوریشه)؛ f: گیاهچه در حال سازگاری در بستر حاوی پیت و پرلیت به نسبت یک به یک (مقیاس= ۱۰ میلی‌متر).



شکل ۲- اثر متقابل NAA و KIN بر میانگین طول نوشاخه ریزنمونه لیسیانتوس. بالاترین طول نوشاخه (۲/۰۵۸ سانتی‌متر) در ریزنمونه‌های تیمار شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN بدون NAA به‌دست آمد (نوع تیمارها که به‌صورت کد آورده شده‌اند، در جدول ۲ مشخص شده‌اند)



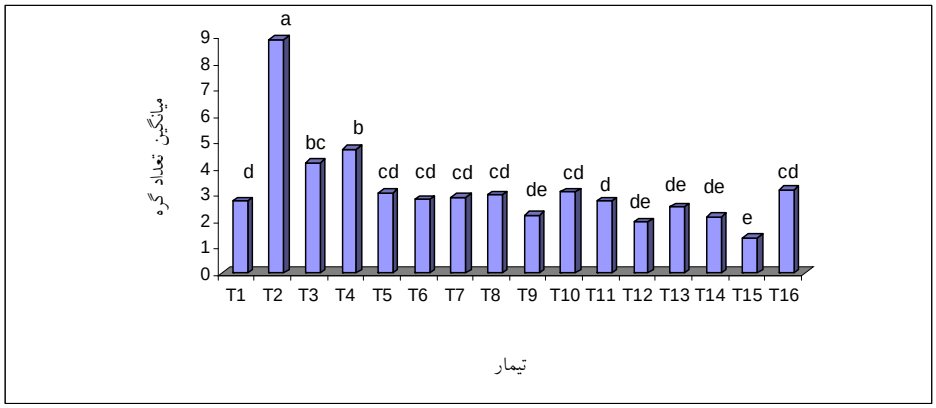
شکل ۳- اثر متقابل NAA و KIN بر تعداد نوشاخه ریزنمونه لیسیانتوس. بیشترین تعداد نوشاخه‌های بازایی‌شده بر روی ریزنمونه (۲/۶۲۰ در ریزنمونه) در گیاهچه‌های تیمار شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN بدون NAA به‌دست آمد (نوع تیمارها که به‌صورت کد آورده شده‌اند، در جدول ۲ مشخص شده‌اند)

در این آزمایش، اثر هر یک از دو هورمون NAA و KIN به‌تنهایی و اثر متقابل آنها بر تعداد گره در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین صفات (جدول ۲) نشان داد که بیشترین میانگین تعداد گره، مربوط به تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر KIN (فاقد NAA) (با میانگین ۸/۳۵۸ عدد در ریزنمونه) بود و کمترین تعداد گره در تیمار دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر KIN (با میانگین ۱/۳۰۰ عدد در ریزنمونه) تولید شد (شکل ۱). تیمار فاقد NAA و دارای KIN، اثر مثبتی بر تعداد گره ریزنمونه داشت (شکل ۴).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر هر یک از هورمون-های NAA و KIN به‌تنهایی و اثر متقابل آنها بر تعداد نوریشه، معنی‌دار نشده است (جدول ۱)، که نتیجه آن عدم رشد مناسب ریزنمونه، تولید کالوس در قاعده ریزنمونه و عدم تولید نوریشه در اکثر ریزنمونه‌ها بود (شکل ۱). مقایسه‌ی میانگین صفات (جدول ۲) نشان داد که بیشترین تعداد نوریشه در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN (با میانگین ۲/۶۵۰ عدد در ریزنمونه) و کمترین تعداد نوریشه در تیمار شاهد و تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN (با میانگین ۰/۶۴۰ در ریزنمونه) تولید شد.

نتایج مراحل سازگاری نشان داد که ۱۰۰ درصد از گیاهچه-ها طی انتقال از شرایط درون‌شیشه‌ای به شرایط برون-شیشه‌ای بقا داشتند و در شرایط گلخانه رشد کردند. این

گیاهچه‌ها از نظر مورفولوژیکی شبیه گیاه مادری بودند (شکل ۱). مخلوطی از خاک سبک با زهکشی خوب برای سازگاری گیاه لیسیانتوس مناسب است.



شکل ۴- اثر متقابل NAA و KIN بر میانگین تعداد گره ریزنمونه‌ی لیسیانتوس. بالاترین تعداد گره (۸/۸۶۰ در ریزنمونه) در گیاهچه‌های تیمارشده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN بدون NAA به‌دست آمد (نوع تیمارها که به‌صورت کد آورده شده‌اند، در جدول ۲ مشخص شده‌اند)

بحث

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش مهمی در ریزازدیادی دارند. سیتوکینین‌ها معمولا در محیط‌های کشت ریزازدیادی، برای تکثیر سرشاخه استفاده می‌شوند (۱۲، ۱۹). مطالعه‌ی حاضر، نقش مهم کینتین را بر روی ریزازدیادی لیسیانتوس نشان داد. همانند یافته‌های این تحقیق، بسیاری از محققان نشان دادند که کینتین، تشکیل و رشد طولی سرشاخه را تحریک می‌کند (۸، ۱۵، ۱۶، ۲۵). مطالعه‌ی پک و هان (۲۲) بر روی لیسیانتوس نشان داد که ترکیب BA و KIN در غلظت‌های بالا، تشکیل نوشاخه را تحریک می‌کند. غلظت‌های بالای NAA به‌تنهایی بر روی تشکیل نوریشه اثر نامناسب داشته و منجر به تشکیل کالوس می‌شود. نتایج حاصل از مطالعه‌ی ما، نتایج به‌دست‌آمده توسط پک و هان (۲۲) را تایید می‌کند. غلظت‌های استفاده‌شده‌ی NAA در مطالعه‌ی ما اثر معنی‌داری بر روی القای نوریشه‌ی لیسیانتوس نداشت و تشکیل کالوس بر روی پایه‌ی سرشاخه‌ها تحریک شد. بنابراین، با توجه به نقش اکسین‌ها در تحریک نوریشه‌زایی، غلظت‌های پایین‌تر NAA باید مورد آزمایش قرار گیرند. مطالعه‌ی فوکای و همکاران (۴) نشان داد که محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA همراه با ۰/۱ 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). نتایج حاصل از آزمایش ما، نتایج اوردوق و همکاران (۲۱) که بیشترین طول نوشاخه‌ی گیاهچه‌های لیسیانتوس را در محیط کشت MS با ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BA بدست آوردند، تأیید می‌کند. در پژوهشی دیگر، کی‌دونگ و همکاران (۱۳) 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 نوشاخه و رشد گیاهچه‌ی لیسیانتوس نقش داشته است. طبق گزارش اسکرزیپکزاک و همکاران (۲۷)، بیشترین تعداد گره در محیط کشت لیسیانتوس همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد.

مطالعه بر روی ریزازدیادی سایر گیاهان زینتی، اهمیت سیتوکینین‌ها به‌ویژه کینتین را نشان داده است. نورتن و بو (۲۰)، تکثیر سرشاخه را در میان ۱۲ گونه‌ی گیاه زینتی با

استفاده از BA و بدون اکسین نشان دادند. گومز و همکاران (۸) دریافتند که KIN در تحریک رشد سرشاخه-ی آربوتوس (*Arbutus unedo* L.) نسبت به سایر سیتوکینین‌ها موثرتر است. در مطالعه‌ی ما، ریزنمونه‌های کشت‌شده در محیط حاوی ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN بدون NAA، بیشترین تعداد سرشاخه را تولید کردند. این نتیجه، یافته‌های گومز و همکاران (۸) را تایید می‌کند. این محققان نشان دادند که NAA قادر به اصلاح میزان تکثیر نیست و بهترین نتایج بر روی محیط‌های کشت بدون NAA به‌دست آمدند. برخی گونه‌ها به غلظت پایین اکسین همراه با غلظت‌های بالای سیتوکینین برای افزایش تکثیر سرشاخه، نیاز دارند (۱۱، ۲۸). برخلاف نتایج ما، فولر و فولر (۵) نشان دادند که بیشترین درصد شاخه (۸۸/۳) در کلم (*Brassica* spp.) در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA همراه با ۴ میلی‌گرم بر لیتر KIN به‌دست آمد. همانند نتیجه حاصل از مطالعه حاضر، مطالعه تاتاری‌ورنوسفادرانی و همکاران (۱) بر روی ریزازدیادی ژربرا (*Gerbera jamesonii*) با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف نشان دادند که بیشترین طول گیاهچه در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر KIN به‌دست آمد. بر خلاف نتایج ما، مطالعه بر روی بامبو (*Bambusa arundinacea*) نشان داد که بالاترین درصد تکثیر، در محیط بدون KIN مشاهده شد (۱۸).

یافته‌های ما نشان داد که افزایش NAA به محیط‌های کشت، برای افزایش تعداد و طول نوریشه‌ها موثر نبود. برخی مطالعات، اثر مثبت NAA را بر روی نوریشه‌زایی نشان دادند (۷، ۹، ۱۲، ۱۴، ۲۹). نوریشه‌زایی، یک مرحله بحرانی برای موفقیت ریزازدیادی است. برخی مطالعات، اثر مثبت سیتوکینین‌ها بر روی نوریشه‌زایی را نشان دادند (۸، ۱۲). هارتمن و همکاران (۱۰) حضور مقادیر کم اکسین برای القای نوریشه، نه برای رشد آن‌را توسعه کردند.

نتایج بررسی‌های حاضر نشان داد که می‌توان از KIN به-تنهایی در محیط کشت، به‌عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی رشد گیاهی مناسب برای ریزازدیادی لیسیانتوس استفاده کرد. این هورمون قابلیت القای نوشاخه و نوریشه را بر روی ریزنمونه‌های لیسیانتوس دارد. نتایج ما مشخص کرد که بیشترین طول و تعداد نوشاخه در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN و بیشترین تعداد گره در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN به‌دست آمد. همچنین نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌ها (KIN و NAA) باعث تشکیل نوشاخه و نوریشه در محیط‌های کشت لیسیانتوس می‌شود. حضور ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN، بیشترین تعداد نوریشه را در پایه نوشاخه‌های تولیدشده در محیط کشت، القا کرد. نتیجه کاربردی تحقیق حاضر این است که، ریزازدیادی لیسیانتوس با استفاده از غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN امکان‌پذیر است. اگرچه بالاترین تعداد نوریشه در پایه شاخه‌ها (۲/۶۵۰) در حضور ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN به‌دست آمد، اما تعداد نوریشه‌های به‌دست‌آمده در محیط حاوی ۰/۵ میلی-گرم در لیتر KIN بدون NAA (۱/۷۲۰)، برای ریزازدیادی موفقیت‌آمیز لیسیانتوس، کافی است.

منابع

۱- تاتاری ورنوسفادرانی، م.، عسکری رابری، ن. و نصرتی، س.ض. (۱۳۸۸). بهینه‌سازی کشت درون‌شیشه‌ای برای ژربرا رقم Tropic Blend. مجله به‌زراعی نهال و بذر، ۲۵ (۲): ۳۸۹-۴۰۱.

۲- صباغ‌نیا، ن.، آل‌ابراهیم، م. و وجودی، م. (۱۳۸۹). ریزازدیادی گیاهان زینتی و دارویی. ص ۸-۱.

3. Armitage A.M. and Laushman J.M. (1993). Specialty cut flowers: The production of annuals, perennials, bulbs, and woody plants for fresh and dried cut flowers. Timber Press, 279-289.

4. Fukai S., Miyata H. and Goi M. (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.

5. Fuller M.P. and Fuller F.M. (1995). Plant tissue culture using *Brassica* seedlings. Journal of Biology Education, 20 (1): 53-59.

6. Furukawa H., Matsubara C. and Shigematsu N. (1990). Shoot regeneration from the roots of prairie gentian (*Eustoma grandiflorum* (Griseb.) Schinners). Plant Tissue Culture Letters, 7 (1): 11-13.

7. Gautam V.K., Mittal A., Nanda K. and Gupta S.C. (1983). *In vitro* regeneration of plantlets from somatic explants of *Matthiola incana*. Plant Science Letters, 29: 25-32.

8. Gomes F., Simões M., Lopes M.L. and Canhoto M. (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., Suwwan M.A., Abu-Quoud H.A. and Shibli R.A. (1998). Micropropagation and regeneration of Honeoye strawberry. Dirasat Agricultural Science, 25: 170-178.

10. Hartmann H.J., Kester D.E., Davies F.T. and Geneve R.T. (1997). Plant Propagation: Principle and Practices. 6th edition, Prentica-Hill, Englewood Cliffs, NJ.

11. Hashemabadi D. and Kaviani B. (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. Jain S.M. and Ochatt S.J. (2010). Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants. Springer Protocols, Humana Press.

13. Ke-dong D., Song Z., Yun-xiang Z., Zhi-gue Z. and Lue-ping W. (2003). Study on adventitious shoot regeneration and micro-propagation from leaves of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). Journal of Shandong Agriculture University, Abstract.

14. Lee-Epinosa H.E., Murguia-Gonzalez J., Garcia-Rosas B., Cordova-Contreras A.L. and Laguna C. (2008). *In vitro* clonal propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). HortScience, 43: 454-458.

15. Luo J.P., Wawrosch C. and Kopp B. (2009). Enhanced micropropagation of *Dendrobium huoshanense* C.Z. Tang et S.J. Cheng through protocorm-like bodies: the effects of cytokinins, carbohydrate sources and cold pretreatment. Scientia Horticulturae, 123: 258-262.

16. Mathai M.P., Zacharia J.C., Samsudeen K., Rema J., Nirmal Babu K. and Ravindran P.N. (1997). Micropropagation of *Cinnamomum verum* (Bercht and Presl.). Proceedings of the National Seminar on Biotechnology of Spices and Aromatic Plants, April 24-25, Calicut, India, pp 35-38.

17. Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology Plant, 15: 473-497.

18. Nayak S., Hatwar B. and Jain A. (2010). Effect of cytokinin and auxins on meristem culture of *Bambusa arundinacea*. Der Pharmacia Letter, 2 (1): 408-414.

19. Nitsch J.P., Nitsch C., Rossini L.M.E. and Ha D.B.D. (1967). The role of adenine on bud differentiation. Photomorphology, 17: 446-453.

20. Norton M.E. and Boe A.A. (1982). *In vitro* propagation of ornamental rosaceous plants. HortScience, 17: 190-191.

21. Ordogh M., Jambor-Benczur E. and Tilly-Mandy A. (2006). Micropropagation of Echo cultivars of *Eustoma grandiflorum* (ISHS) Acta Horticulture: V International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding, 725: 457-460.

22. Paek K.Y. and Hahn E.J. (2000). Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant, 36: 128-132.

23. Rout G.R. and Jain S.M. (2004). Micropropagation of ornamental plant-cut flowers. Propagation of Ornamental Plants, 4 (2): 3-28.

24. Ruffoni B., Damiano C., Massabò F. and Esposito P. (1990). Organogenesis and embryogenesis in *Lisianthus russellianus* Hook. (ISHS) Acta Horticulture: I International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding, 280: 83-88.

25. Sajina A., Geetha S.P., Minoo D., Rema J., Nirmal Babu K., Sadanandan A.K. and Ravindran P.N. (1997b). Micropropagation of some important herbal species. In: Biotechnology of Spices, Medicinal and Aromatic Plants, Edison S, Ramana AV, Sasikumar B, Nirmal Babu K, Santhosh JE (eds.). Indian Society for Spices, Calicut, India, pp 79-86.

26. Semeniuk P. and Griesbach R.J. (1987). *In vitro* propagation of praire gentian. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 8: 249-253.

27. Skrzypczak L., Wesolowska M. and Budsianowski J. (1993). *Eustoma grandiflorum* Shinn (Texas bluebell): Callus culture, micropropagation, and the production of gentiopiside and other secondary metabolites. Biotechnology in Agriculture and Forest, 24: 192-201

28. Van Staden D., Zazimalora E. and George E.F. (2008). Plant growth regulators, II: cytokinins, their analogues and inhibitors. In: Plant Propagation by Tissue Culture (edition 3) (George EF, et al. editions), pp 205-226, Springer.

29. Xilin H. (1992). Effect of different cultivars and hormonal conditions on strawberry anther culture *in vitro*. Journal of Nanjing Agriculture University, 15: 21-28.

30. Xue-hua J., Wei Y., You-lin L., Xiang-ying K. and Xiu-chun P. (2009). Aseptic seeding and establishment of plantlet regeneration system in *Eustoma grandiflorum*. Northern Horticulture, Abstract.

31. Yuan-rong M., Qian L. and Gen-yu Z. (2004). Establishment of leaf regeneration system in *Eustoma Russellianum*. Journal of Shanghai Teachers University, Abstract.

The effect of different concentrations of naphthalene acetic acid and kinetin on micropropagation of ornamental plant of Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*)

Kaviani B.[1] and Ghaffari Esizad S.[2]

[1] Horticultural Science Dept., Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, I.R. of Iran

[2] Horticultural Science Dept., Guilan University, Rasht, I.R. of Iran

Abstract

One of the most important and applicable tissue culture techniques is micropropagation. Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) is an ornamental plant which studies on its micropropagation is insufficient. The aim of this study was to evaluate the effect of different concentrations of NAA and KIN on micropropagation of lisianthus. For this purpose, the explants were cultured on MS medium with different concentrations of NAA and KIN (0, 0.5, 1 and 2 mg l^{-1}). Results showed that the longest shoot (2.325 cm/explant) was obtained in medium containing 1 mg l^{-1} KIN (without NAA). The largest number of shoots (with average of 2.800 and 2.550/explant) was produced in medium containing 1 and 0.5 mg l^{-1} KIN (without NAA). The highest number of node (with average of 8.358/explant) was obtained in medium supplemented with 0.5 mg l^{-1} (without NAA). Maximum number of roots (with average of 2.650/explant) was produced in medium containing 0.5 mg l^{-1} NAA along with 2 mg l^{-1} KIN. Regenerated plants showed 100% survival in *ex vitro* conditions.

Key words: Plant growth regulators, apical and axillary buds, *Eustoma grandiflorum*, micropropagation