به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی
دوره ۳ ■ شماره ۱ ■ بهار و تابستان ۱۳۹۴
صفحه‌های ۵۷-۶۷

بررسی تأثیرات BAP، Kin و GA_3 بر نوساقه‌زایی و تأثیرات IAA و زغال فعال بر ریشه‌زایی گیاه لیسیانتوس (*Eustoma grandiflurom*) در شرایط درون‌شیشه‌ای

روح‌اله جعفری[۱]، احمد معینی[۲]*، قاسم کریم‌زاده[۳] و زهرا موحدی[۴]

۱. کارشناس ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
۲. دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
۳. دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
۴. استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ملایر

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۳/۱۱/۰۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۵/۰۶

چکیده

گیاه لیسیانتوس، یکی از ۱۰ گل شاخه‌بریدهٔ برتر دنیا محسوب می‌شود. با توجه به محدودیت‌های روش‌های ازدیاد سنتی، کشت درون‌شیشه‌ای برای تکثیر و تولید انبوه این گیاه مطلوب است. در این پژوهش به‌منظور بهینه‌سازی ازدیاد درون‌شیشه‌ای این گیاه، آثار تنظیم‌کننده‌های رشد بر نوساقه‌زایی و ریشه‌زایی نوساقه‌های تولیدشده از کشت ریزنمونه‌های گرهی بررسی شدند. در بررسی نوساقه‌زایی، تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP و Kin با استفاده از محیط کشت پایهٔ MS و به‌صورت آزمایش‌های جداگانه و در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شدند. غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP با میانگین ۴ نوساقه در هر ریزنمونه، بهترین تیمار بوده است. همچنین در این پژوهش اثر تلفیقی دو هورمون BAP و GA_3 بر نوساقه‌زایی به‌صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. نتایج این آزمایش نشان داد که تیمار حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بهترین تیمار از نظر کیفیت و تعداد نوساقه‌ها بود (۱۷ نوساقه در هر ریزنمونه)، ضمن اینکه حضور GA_3 سبب بهبود ارتفاع نوساقه‌ها شد. نوساقه‌های تولیدشده در این تیمار، به‌منظور بررسی ریشه‌زایی، به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های متفاوتی از هورمون IAA (۰، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و زغال فعال (۰ و ۳ گرم در لیتر) منتقل شدند. محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر از IAA و بدون زغال فعال با میانگین ۲/۷۵ ریشه در هر ریزنمونه، به‌منزلهٔ بهترین تیمار برای ریشه‌زایی نوساقه‌ها تعیین شد.

کلیدواژه‌ها: پرآوری نوساقه، ریزازدیادی، ریشه‌زایی، لیسیانتوس (*Eustoma grandiflurom*).

* نویسنده مسئول Email: moieni_a@modares.ac.ir

مقدمه

گیاه لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*)، از خانوادهٔ Gentianaceae، یکی از ۱۰ گل شاخه‌بریدهٔ برتر دنیا محسوب می‌شود. این گیاه یکساله، متعلق به نواحی معتدل، متحمل به گرما و بومی آمریکای جنوبی و مکزیک است. گیاه لیسیانتوس به‌صورت گل شاخه‌بریدهٔ گلدانی پرورش داده می‌شود و امروزه در بازارهای جهانی اهمیت خاصی دارد. این گیاه، گل‌هایی به رنگ‌های متنوع شامل آبی، سفید، ارغوانی، صورتی و بنفش دارد (۹). تکثیر معمول این گیاه از طریق بذر انجام می‌شود، اما فراهم‌آوردن شرایط جوانه‌زنی بذور، سخت است. ضمناً این گیاه دگرگشن است و بذرهای تولیدی گیاه قدرت جوانه‌زنی خوبی ندارند و گیاهان یکنواختی تولید نمی‌کنند، درحالی‌که بذرهای هیبرید خصوصیات یکسانی شامل کیفیت گل، تعداد گل، ارتفاع بوته و زمان گل‌دهی دارند و از قیمت زیادی نیز برخوردارند. همچنین این گیاه را می‌توان از طریق پاجوش تکثیر کرد، اما تعداد پاجوش‌هایی که از پایهٔ مادری تولید می‌شوند، کم است و نیز رشد بسیار کمی دارند و به همین علت، تقریباً از پاجوش استفاده نمی‌شود. بنابراین، با توجه به مشکلات و محدودیت‌های روش تکثیر کلاسیک این گیاه، ضرورت دارد که تکثیر درون‌شیشه‌ای این گیاه مدنظر قرار گیرد (۵). از مزایای کشت درون‌شیشه‌ای، ازدیاد مستمر گیاهان در هر مقطع زمانی از سال و بدون توجه به فصل است (۱۲).

ریزازدیادی گیاه لیسیانتوس با استفاده از ریزنمونه‌های گرهی، جوانه‌های جانبی، برگ و میان‌گره‌ها بررسی شده است و همچنین مشخص شده است که ریزنمونهٔ گرهی، ریزنمونهٔ مناسبی برای ازدیاد این گیاه است (۷). تنظیم‌کننده‌های رشد، ترکیباتی عالی هستند که به‌صورت طبیعی در گیاهان عالی ساخته می‌شوند و بر رشد و نمو تأثیر می‌گذارند و معمولاً در نقاط مختلف گیاه فعال‌اند. امروزه هورمون‌هایی مصنوعی نیز ساخته شده‌اند که همان خصوصیت هورمون‌های طبیعی را دارند. تمایز و اندام‌زایی بافت‌ها فقط در پاسخ به یک یا چند گروه از هورمون‌ها شامل اکسین‌ها، سیتوکنین‌ها، جیبرلین‌ها و اسید آبسزیک صورت می‌گیرد و نسبت اکسین‌ها به سیتوکنین‌ها در محیط کشت بافت می‌تواند روند ریشه‌زایی و نوساقه‌زایی را تحت تأثیر قرار دهد (۴).

یکی از مراحل اصلی ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای گیاهان، ریشه‌زایی و سازگارکردن گیاهچه‌هاست. برخی عوامل فیزیکی و شیمیایی نظیر تنظیم‌کننده‌های رشد، تنش آبی، دمای زیاد، زغال فعال، اکسیژن و کاهش شدت نور در ریشه‌زایی مؤثرند. همچنین به‌طورکلی، محیط‌های کشت ریشه‌زایی به سیتوکنین کم و اکسین زیاد نیاز دارند. مرحلهٔ ریشه‌زایی در بسیاری از گیاهان مثمر و غیرمثمر و گونه‌های زینتی یک مرحلهٔ بسیار بحرانی است. معمولاً تحریک ساقه به تولید ریشه در گونه‌های علفی به‌سهولت انجام می‌گیرد (۲). در برخی گونه‌ها تنها عامل ریشه‌زایی، انتقال نوساقه‌ها به محیط کشت عاری از سیتوکنین است. در گونه‌های دیگر، شروع ریشه‌دهی فقط در حضور اکسین صورت می‌گیرد (۱). ریشه‌زایی می‌تواند در حضور اکسین‌هایی ازقبیل IAA (۰/۱ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر)، NAA (۰/۰۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر) یا IBA (۰/۵ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر) انجام شود. ترکیب هورمونی محیط کشت برای نوساقه‌زایی نسبت به مرحلهٔ ریشه‌زایی بسیار متفاوت است، لذا تعداد گیاهان اندکی وجود دارند که قادر باشند در شرایط همان محیط کشت نوساقه‌زایی، ریشه‌دار شوند (۱). در پژوهشی نوساقه‌های درون‌شیشه‌ای گیاه لیسیانتوس در محیط کشت پایهٔ MS فاقد هورمون، دمای ۲۱ و ۱۶ درجهٔ سانتی‌گراد ساعت روشنایی با نور فلورسنت (۳ هزار لوکس) و پس از ۱۴ روز ریشه‌دار شده‌اند (۶). در حال حاضر، سریع‌ترین روش تکثیر گیاه

لیسیانتوس می‌تواند روش ریزازدیادی باشد که پتانسیل تولید فراوان گیاهان سالم و عاری از بیماری را دارد. با توجه به ارزش بسیار زیاد این گیاه، پژوهش حاضر، برای ارائهٔ پروتکل مناسبی برای ریزازدیادی این گیاه با استفاده از ریزنمونه‌های گرهی و محیط کشت پایهٔ MS انجام شده است. بدین‌منظور، تأثیرات تنظیم‌کننده‌های رشد شامل بررسی تأثیرات دو هورمون BAP، در ۴ سطح (۰، ۰/۵، ۲/۵ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و Kin در سه سطح (۰، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) بر نوساقه‌زایی ریزنمونه‌های گرهی و همچنین اثر هورمون IAA، در ۴ سطح (۰، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و زغال فعال در ۲ سطح (۰ و ۳ میلی‌گرم در لیتر)، بر ریشه‌زایی نوساقه‌های تولیدشده، بررسی شده‌اند.

مواد و روش‌ها

برای اجرای این پژوهش از گیاه لیسیانتوس رقم 'ماریاچی' با گل بنفش‌رنگ استفاده شد. بذور این گیاه از شرکت ساکاتای ژاپن تهیه شده است و در بعضی گلخانه‌های منطقهٔ فیلستان ورامین کشت می‌شوند. گیاهچه‌ها در مرحلهٔ ۴ تا ۶ برگی به گلخانهٔ شیشه‌ای منتقل و در گلدان‌هایی با قطر ۲۵ سانتی‌متر حاوی پیت و پرلیت (۱:۲) کشت شدند. دمای روز گلخانه حدود ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد، در تابستان و زمستان تنظیم شد. برای تغذیهٔ گیاهان، سه بار در هفته به همراه آبیاری از کود کامل کریستالون به مقدار ۲ گرم در لیتر استفاده شد.

ضد عفونی مواد گیاهی در سه مرحلهٔ متوالی شامل: الف) استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد (w/v) به‌مدت ۱۰ دقیقه؛ ب) الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و ج) هیپوکلریت سدیم ۲ درصد (w/v) به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در هر مرحله، مواد گیاهی سه مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند.

بررسی تأثیرات دو هورمون BAP، در ۴ سطح (۰، ۰/۵، ۲/۵ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و Kin در سه سطح (۰، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) روی نوساقه‌زایی به‌صورت آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی، در محیط کشت پایه MS انجام شد. بعد از انتخاب بهترین تیمار، آزمایش بعدی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی، با دو فاکتور، فاکتور اول (A)، هورمون BAP در ۵ سطح (۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و فاکتور دوم (B)، GA_3 در سه سطح (۰، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) انجام شد. همچنین، به‌منظور بررسی ریشه‌زایی نوساقه‌های به‌دست‌آمده از بهترین تیمار مرحلهٔ قبل، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی، با دو فاکتور شامل فاکتور اول، هورمون IAA (A) در ۴ سطح (۰، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و فاکتور دوم، زغال فعال (D) در دو سطح (۰ و ۳ گرم در لیتر)، در محیط کشت پایهٔ MS انجام شد.

در کلیهٔ آزمایش‌ها، هر تیمار در ۴ تکرار انجام شد. هر تکرار شامل یک بطری شیشه‌ای (به قطر ۵/۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۸ سانتی‌متر، دارای ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS و حاوی ۴ ریزنمونه) بود. در تمام آزمایش‌ها، صفات تعداد نوساقه در هر ریزنمونه، متوسط ارتفاع نوساقه در هر ریزنمونه و متوسط تعداد برگ در هر نوساقه بررسی شدند.

در تمام موارد پس از کشت ریزنمونه‌ها، کشت‌ها به اتاق رشد کنترل‌شده با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی (تأمین‌شده با لامپ فلورسنت) و دمای ثابت ۱ ± ۲۴ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شدند. بعد از گذشت ۳۰ روز از کشت، خصوصیات مورد نظر بررسی شدند و سپس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخهٔ ۱۶) تجزیهٔ آماری شدند.

بعد از بررسی پارامترهای مطالعه‌شده، نوساقه‌های

دارای ریشه به لیوان‌های یک‌بار مصرف حاوی کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۱:۲ منتقل و با پوشش پلاستیکی شفاف پوشانده شدند. این گیاهچه‌ها هر هفته یک‌بار با آب و هر سه روز یک‌بار با محیط کشت MS/۲[1] فاقد ویتامین‌ها و ساکارز آبیاری شدند و پس از ۲۰ روز، این گیاهچه‌ها به گلدان‌های حاوی کوکوپیت و پرلیت (۵:۱) منتقل و سپس به گلخانهٔ شیشه‌ای با دمای ۱ ± ۲۷ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شدند. در این مرحله، گیاهچه‌ها با آب و کود کامل کریستالون (۲ گرم در لیتر)، به‌ترتیب هر هفته سه و دو مرتبه تغذیه شدند.

نتایج و بحث

۱. آزمایش بررسی تأثیرات هورمون‌های BAP و Kin، بر روی نوساقه‌زایی گیاه لیسیانتوس

تأثیر هورمون BAP بر متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه

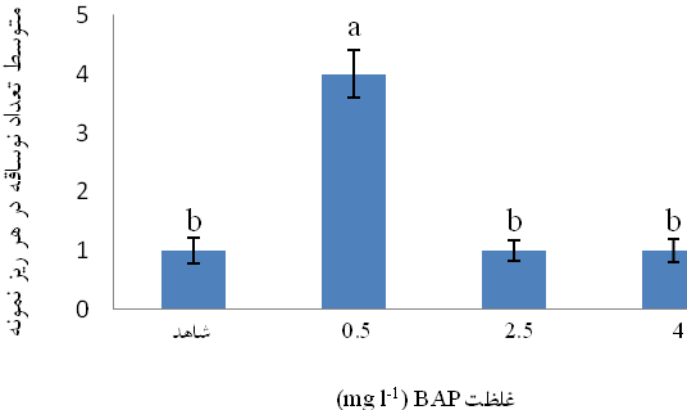
با توجه به نتایج تجزیهٔ واریانس، اثر هورمون BAP بر متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه، متوسط ارتفاع نوساقه و متوسط تعداد برگ در هر نوساقه در سطح احتمال ۱ درصد معنادار بود (جدول ۱).

نتایج مقایسهٔ میانگین نشان داد که بیشترین نوساقه‌زایی (با میانگین ۴ نوساقه در هر ریزنمونه) توسط تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمده است (شکل ۱). در این تیمار نوساقه‌ها و برگ‌های حاصله رشد نرمالی داشتند، برگ‌ها به رنگ سبز تیره بود و هیچ علائمی از تولید کالوس و شیشه‌ای‌شدن در نوساقه‌ها مشاهده نشد. در غلظت‌های بالاتر از هورمون BAP، (۲/۵ و ۴ میلی‌گرم در لیتر)، نوساقه‌ها و برگ‌های حاصله از نظر رشدی نرمال بودند ولی برگ‌ها رنگ‌پریده و زردرنگ شدند. نتایج بعضی گزارش‌ها (۱۰)، درخصوص ریزازدیادی گیاه لیسانتوس با استفاده از غلظت‌های مختلف هورمون BAP، نشان داده است که بیشترین متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه، در تیمارهای حاوی ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP تولید شده است، اما این غلظت سبب رنگ‌پریدگی برگ‌ها و نوساقه‌های حاصله شده است.

جدول ۱. نتایج تجزیهٔ واریانس اثر هورمون BAP روی صفات مطالعه‌شده در کشت درون‌شیشه‌ای گیاه لیسیانتوس

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات صفات		
		متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه	متوسط ارتفاع نوساقه در هر ریزنمونه	متوسط تعداد برگ در هر نوساقه
BAP	۳	۹/۰۰۰**	۰/۰۴۲ **	۶۴/۵۶۳**
خطا	۱۲	۰/۰۷۸	۰/۰۰۳	۱/۰۰۸
ضریب تغییرات(٪)		۱۵/۹۵	۱۴/۵۰	۱۵/۹۰

** معنادار در سطح ۱ درصد

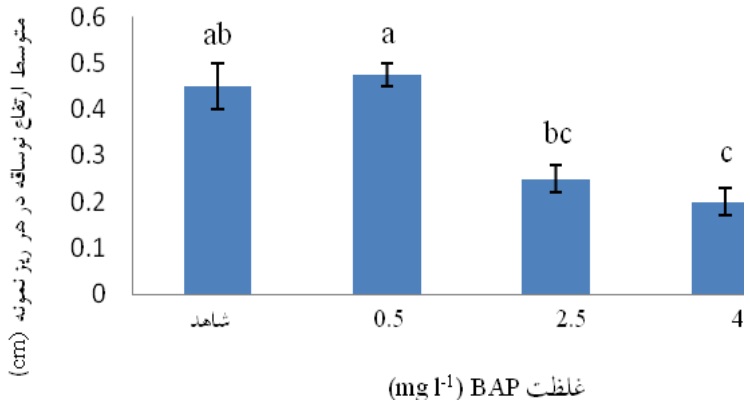


شکل ۱. مقایسهٔ میانگین اثر هورمون BAP بر متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه

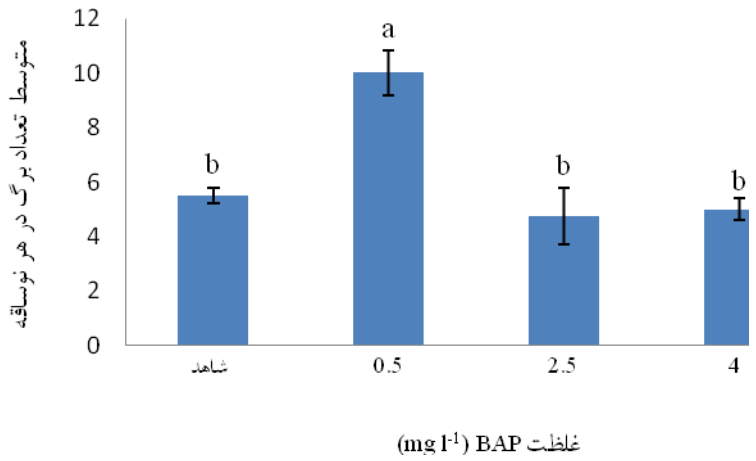
تأثیر هورمون BAP بر متوسط ارتفاع نوساقه و متوسط تعداد برگ در هر ریزنمونه (cm)

اثر هورمون BAP روی صفات متوسط ارتفاع نوساقه در هر ریزنمونه و متوسط تعداد برگ در هر نوساقه در سطح احتمال ۱ درصد معنادار بوده است. نتایج مقایسهٔ میانگین نشان داد که تیمارهای شاهد و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، بیشترین متوسط ارتفاع نوساقه را داشته‌اند و تفاوت معناداری بین آن‌ها نبوده است و با افزایش غلظت هورمون BAP، متوسط ارتفاع نوساقه‌ها کاهش پیدا کرده است.

همچنین غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، بیشترین متوسط تعداد برگ در هر نوساقه را داشت و با افزایش یا حذف آن، تعداد برگ به‌طور معناداری کاهش یافت. به‌طورکلی، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای تمام صفات، غلظت بهینه بود و سبب افزایش رشد نرمال ساقه و برگ شد و هیچ علائمی از شیشه‌ای‌شدن و کالوس در ریزنمونه‌ها مشاهده نشد.



شکل ۲. مقایسهٔ میانگین اثر هورمون BAP بر متوسط ارتفاع نوساقه در هر ریزنمونه



شکل ۳. مقایسهٔ میانگین اثر هورمون BAP بر متوسط تعداد برگ در هر نوساقه

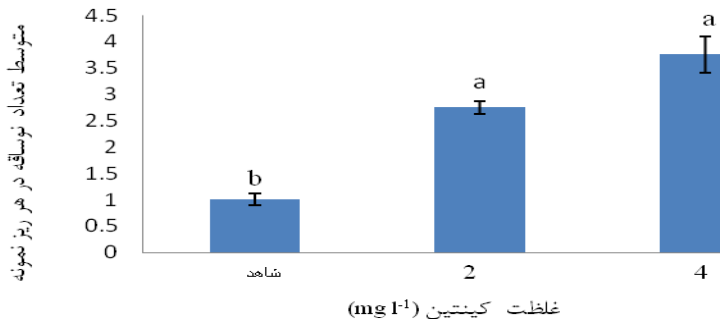
تأثیر هورمون Kin بر متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه

نتایج تجزیهٔ واریانس این آزمایش نشان داد که اثر هورمون کینتین بر صفات متوسط ارتفاع نوساقه و متوسط تعداد برگ معنادار نبوده است، اگرچه با افزایش غلظت هورمون کینتین، متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه افزایش یافته و بیشترین تعداد (۳/۷۵ نوساقه در هر ریزنمونه) مربوط به غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر Kin بوده است (جدول ۲ و شکل ۴). بااین‌حال با افزایش غلظت کینتین، درصد شیشه‌ای‌شدن نوساقه‌ها و میزان کالوس‌زایی تا ۵۰ درصد افزایش داشته است و همچنین رنگ برگ‌ها به‌صورت سبز متمایل به زرد بود، به‌طوری‌که تیمار با غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر Kin بیشترین درصد کالوس‌زایی را داشت (۱۰۰ درصد) و برگ‌ها به رنگ سبز متمایل به زرد بودند. فقط در تیمار شاهد، به‌دلیل نداشتن هورمون کینتین، نوساقه‌ها و برگ‌ها نرمال بود و علائمی از شیشه‌ای‌شدن، کالوس‌زایی و رنگ‌پریدگی برگ‌ها مشاهده نشد. براساس برخی گزارش‌ها دربارهٔ ریزازدیادی گیاه لیسیانتوس، افزایش غلظت هورمون کینتین علاوه بر سرعت تشکیل نوساقه، درصد شیشه‌ای‌شدن را نیز افزایش داده است (۳).

جدول ۲. نتایج تجزیهٔ واریانس اثر هورمون Kin روی صفات مطالعه‌شده در کشت درون‌شیشه‌ای گیاه لیسیانتوس

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات		
		متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه	متوسط ارتفاع نوساقه در هر ریزنمونه	متوسط تعداد برگ در هر نوساقه
Kin	۲	۷/۷۵۰**	۰/۰۱۶ns	۱/۳۳۳ns
خطا	۹	۰/۰۹۴	۰/۰۰۵	۰/۶۸۶
ضریب تغییرات(٪)		۱۲/۲۶	۱۳/۶۸	۱۳/۴۳

**، ns به‌ترتیب معنادار در سطح ۱ درصد و غیرمعنادار



شکل ۴. مقایسهٔ میانگین اثر هورمون کینتین بر متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه

۲. آزمایش تأثیرات هورمون‌های BAP و GA_3 بر روی نوساقه‌زایی گیاه لیسیانتوس

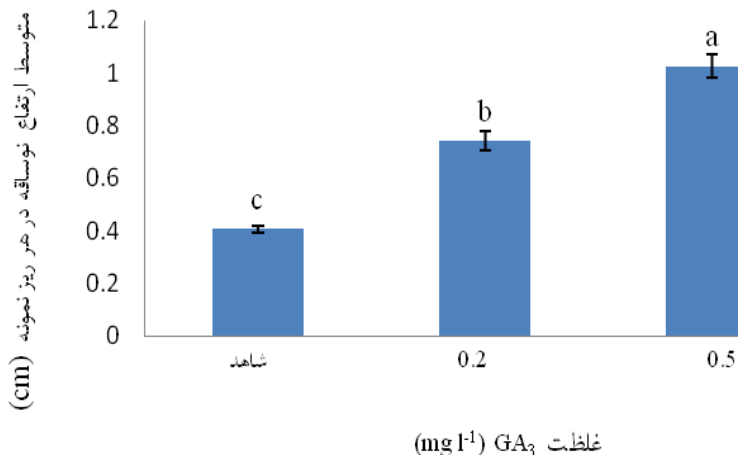
اثر متقابل BAP × GA_3 با توجه به نتایج تجزیهٔ واریانس، برای صفت تعداد نوساقه در هر ریزنمونه در سطح احتمال ۱ درصد معنادار بود، درحالی‌که برای دو صفت متوسط ارتفاع نوساقه و تعداد برگ در هر نوساقه معنادار نبود.

تأثیرات متقابل BAP × GA_3 بر تعداد نوساقه در هر ریزنمونه

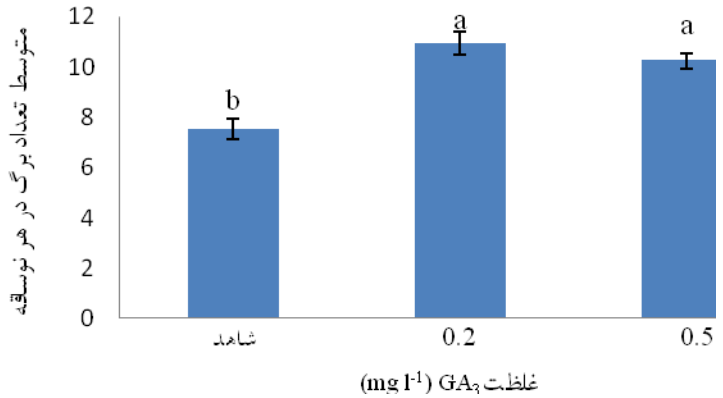
نتایج مقایسهٔ میانگین نشان داد که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 بیشترین نوساقه‌زایی (۱۷ نوساقه در هر ریزنمونه) را داشته است. همچنین در تمام غلظت‌های هورمون BAP، حضور GA_3 (در تمام غلظت‌ها) سبب تحریک و افزایش متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه شده است، به‌طوری‌که در غلظت‌های بالای هورمون BAP (۲/۵ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) که انتظار می‌رود متوسط تعداد نوساقه افزایش پیدا کند، حضورنداشتن GA_3 سبب کاهش متوسط تعداد نوساقه شده است، اگرچه گیاهچه‌های تولیدی وضعیت نرمالی از نظر رشدی (تولیدنکردن کالوس و شیشه‌ای‌شدن) داشتند. در غلظت‌های بالا از هورمون BAP (۲/۵ و ۴ میلی‌گرم در لیتر)، حضور GA_3، اگرچه سبب افزایش متوسط تعداد نوساقه شده است، درصد شیشه‌ای‌شدن نوساقه‌ها و تولید کالوس نیز افزایش پیدا کرد. به‌طورکلی، فقط در غلظت‌های پایین از هر دو هورمون، گیاهچه‌های نرمال از نظر وضعیت رشد نوساقه و برگ‌ها حاصل شده است و غلظت‌های بالا از هر دو هورمون سبب زردی برگ‌ها، وجود کالوس قاعده‌ای، شیشه‌ای‌شدن برگ‌ها شده است. در پژوهشی (۸)، با افزایش هم‌زمان غلظت BAP و GA_3، متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه افزایش یافت، اما این افزایش با شیشه‌ای‌شدن نوساقه‌های تولیدشده همراه بود.

اثر هورمون GA_3 بر متوسط ارتفاع نوساقه در هر ریزنمونه (cm)

هورمون جیبرلین سبب افزایش ارتفاع میانگره و افزایش متوسط ارتفاع نوساقه در هر ریزنمونه می‌شود. در این آزمایش مشاهده شد که اثر هورمون جیبرلین بر متوسط ارتفاع نوساقه در هر ریزنمونه بدون حضور هورمون BAP، با افزایش غلظت هورمون بیشتر می‌شود، به‌طوری‌که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3، بیشترین متوسط ارتفاع نوساقه را داشت (شکل ۵). در تمام تیمارها، نوساقه‌ها و برگ‌ها رشد نرمال داشتند و اثری از کالوس‌زایی و شیشه‌ای‌شدن مشاهده نشد.



شکل ۵. مقایسهٔ میانگین اثر سادهٔ هورمون GA_3 بر متوسط ارتفاع نوساقه در هر ریزنمونه



شکل ۶. مقایسهٔ میانگین اثر سادهٔ هورمون GA_3 بر متوسط تعداد برگ در هر نوساقه

اثر هورمون GA_3 بر متوسط تعداد برگ در هر نوساقه

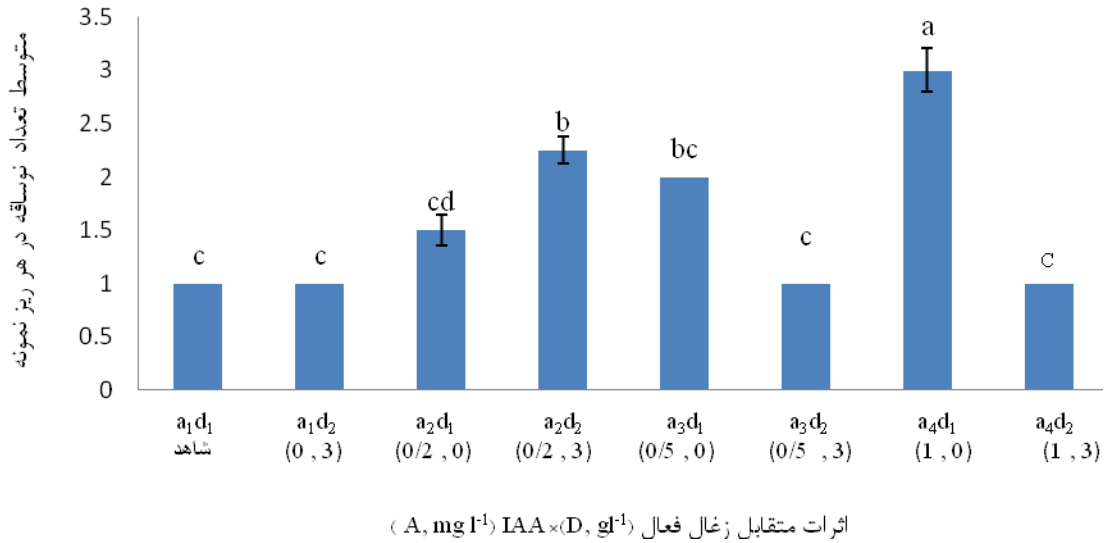
غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، به‌ترتیب بیشترین متوسط تعداد برگ در هر نوساقه را نسبت به شاهد داشته‌اند، اگرچه تفاوت معناداری بین آن‌ها مشاهده نشد (شکل ۶)، تیمار شاهد (بدون هورمون)، کمترین متوسط تعداد برگ در هر نوساقه را داشت. در این آزمایش، تمام تیمارها از نظر متوسط تعداد برگ و نیز رنگ برگ‌ها وضعیت نرمالی داشتند و فقط برگ‌ها کمی باریک و طویل بودند.

به‌طورکلی، نتایج اثر سادهٔ هورمون BAP نشان داد که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای تمام صفات مطالعه‌شده بهینه بوده و سبب افزایش رشد نوساقه‌ها و برگ‌ها شده است.

۳. آزمایش بررسی تأثیرات هورمون IAA و زغال فعال بر روی ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای نوساقه‌ها

براساس نتایج تجزیهٔ واریانس، اثر متقابل دو فاکتور IAA × زغال فعال بر متوسط تعداد ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنادار بود. بیشترین تعداد ریشه (با میانگین ۲/۷۵

ریشه در هر نوساقه) در تیمار حاوی غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر، هورمون IAA و فاقد زغال فعال به دست آمده است. حضور زغال فعال هیچ نقشی در تولید ریشه نداشته است (شکل ۷)، حتی در مواقعی که زغال فعال در ترکیب با هورمون IAA وجود داشت، سبب کاهش تعداد ریشه شده است. به نظر می‌رسد که زغال فعال هورمون IAA را جذب و آن را از دسترس نوساقه‌ها خارج می‌کند. در بسیاری از پژوهش‌ها در رابطه با گیاه لیسیانتوس، زغال فعال یک عامل بازدارنده در تولید نوساقه و ریشه بوده است (۱۱). در آزمایشی (۱۰) روی ریشه‌زایی گیاه لیسیانتوس، مشخص شد که بیشترین تعداد ریشه در غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر IAA تولید شد و نیز گزارش شد که زغال فعال تأثیرات منفی بر تعداد ریشه داشته، به‌طوری‌که در فقدان زغال فعال، متوسط تعداد ریشه ۷/۷ ریشه بوده است درحالی‌که با افزایش زغال فعال به ۱/۷ ریشه کاهش پیدا یافته است. در آزمایش حاضر بهترین تیمار از نظر وضعیت نرمال رشد نوساقه‌ها و برگ‌ها، تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بدون حضور زغال فعال بوده است اگرچه تعداد ریشه‌ها در این تیمار بسیار کم بود، درحالی‌که بهترین تیمار از نظر رشد هم‌زمان نوساقه‌ها، برگ‌ها و ریشه‌ها، تیمار حاوی غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و بدون زغال فعال بود.



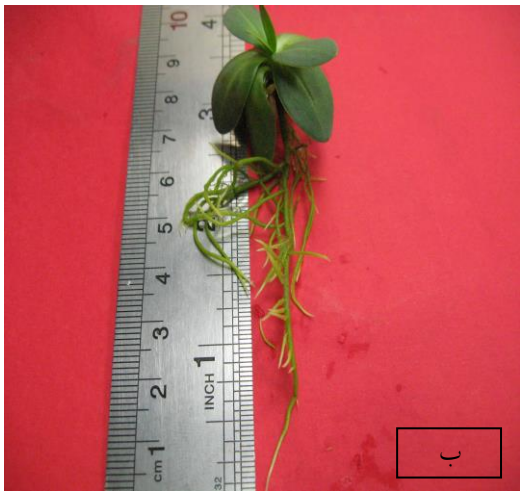
شکل ۷. بررسی تأثیرات متقابل غلظت‌های IAA و زغال فعال بر متوسط تعداد ریشه در هر ریزنمونه

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی، در آزمایش بررسی تأثیر تیمارهای هورمونی بر روی کشت درون‌شیشه‌ای گیاه لیسیانتوس، تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از BAP، بیشترین متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه، بیشترین متوسط ارتفاع نوساقه در هر ریزنمونه و بیشترین متوسط تعداد برگ در هر نوساقه را داشته است. همچنین در بررسی هورمون کینتین، بیشترین متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه با استفاده از غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌دست آمده است، اگرچه با افزایش غلظت این هورمون، درصد شیشه‌ای‌شدن نوساقه‌ها و میزان کالوس‌زایی تا ۵۰ درصد افزایش داشته است. در آزمایش بهینه‌سازی نوساقه‌زایی درون‌شیشه‌ای در گیاه لیسیانتوس،

نتایج نشان داد که استفادهٔ تلفیقی از ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین متوسط تعداد نوساقه در هر ریزنمونه را داشته است، ضمن اینکه حضور GA_3 سبب بهبود ارتفاع نوساقه‌ها شده بود. همچنین در بررسی اثر سادهٔ GA_3 مشخص شد که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3، بیشترین متوسط ارتفاع نوساقه را داشته و بیشترین متوسط تعداد برگ در هر نوساقه توسط غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمده است.

در بررسی آثار هورمون IAA و زغال فعال روی ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای نوساقه‌ها مشخص شد که بهترین تیمار از نظر وضعیت رشد نرمال نوساقه‌ها و برگ‌ها، تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بدون حضور زغال فعال بوده است، اما در این تیمار، تعداد ریشه‌ها بسیار کم بوده است، درصورتی‌که بهترین تیمار از نظر رشد هم‌زمان نوساقه‌ها، برگ‌ها و ریشه‌ها، تیمار حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و بدون زغال فعال بوده است.



شکل ۸. (الف) نوساقهٔ ریشه‌دارشده در محیط حاوی ۰/۵ mg l^{-1} از IAA و (ب) تیمار حاوی ترکیب هورمونی ۰/۵mg l^{-1} از BAP و ۰/۲ mg l^{-1} از GA_3

منابع

۱. خوشخوی م (۱۳۷۷) *فنون کشت بافت گیاهی برای گیاهان* باغبانی (ترجمه). انتشارات دانشگاه شیراز.

۲. حاج‌نجاری ح (۱۳۷۳) *ریز ازدیادی*. انتشارات مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع.

3. Cachita C and Craciun C (1990) Ultrastructural studies on some ornamentals. Ammirato, P. Evans, D. A. Sharp, WR. Bajaj, YPS. Handbook of plant cell culture. McGraw-Hill, New York. 5: 57-94.

4. Edwin FG, Hall MA and De Klerk GJ (2008) Plant Propagation by tissue culture. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 479 pp.

5. Evans DA and Bravo JE (1995) Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants. Zimmerman, RH. Tissue culture as plant production system for horticultural crops. Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff. 7: 73-94.

6. Hajime F, Matsubara C and Norihiro S (1990) Shoot regeneration from the roots of Prairie gentian (Eustoma grandiflorum). Plant Tissue Culture Letters. 7: 11-13.

7. Halevy AH and Kofranek AM (1984) Evaluation of lisianthus as a new flower crop. HortScience. 19: 845-847.

8. Hecht M, Ecker R, Ran S and Watad AA (1994) Differential expression in vitro of heterosis in lisianthus (Eustoma grandiflorum) at various benzyladenine and gibberellic acid levels. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 30: 136-139.

9. Ichimura K and Korenaga M (1998) Improvement of vase life and petal color expression in several cultivars of cut Eustoma flowers using sucrose with 8-hydroxyquinoline sulfate. Bulletin of National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants & Tea, Japan. 13: 31-39.

10. Kee PY and Eun JH (2000) Cytokinins, auxins and actived charcoal affectes organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of lisianthus [Eustoma Grandiflorum (RAF.) Shinn] In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 36: 128-132.

11. Kunitake H, Nakashima T, Mori K, Tanaka M and Mii M (1995) Plant regeneration from mesophyll protoplast of lisianthus (Eustoma grandiflorum) by adding activated charcoal into protoplast culture medium Plant, Cell, Tissue and Organ. Culture 43: 59-65.

12. Roh SM and Lawson RH (1988) Tissue culture in the improvement of *Eustoma*. HortScience. 23: 658.