بررسی اثر غلظت‌های مختلف IBA, BAP و نوع ریزنمونه بر شاخه‌زایی گیاه لیزیانتوس (*Eustoma grandiflorum*)

لقمان عزیزپور[۱]، حسین حسینی مقدم[۲]، مهدی زارعی[۳] و یاسر حسینی[۴]
[۱]* دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه گنبد کاووس
[۲،۳] استادیار،دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس
[۴] دانش آموخته کارشناسی ارشد گیاه‌پزشکی، گنبدکاووس
* نویسنده مسئول: Looghman.azizpoor@yahoo.com

چکیده

لیزیانتوس (*Eustomagrandiflorum*) یکی از گونه‌های زینتی خانواده جنتیاناسه (Gentianaceae) است. این گیاه گل‌هایی به رنگ‌های متنوع شامل: آبی، سفید، ارغوانی، صورتی و بنفش دارد که در بازارهای گل‌های زینتی مورد توجه واقع شده و به‌صورت گل شاخه‌بریده، گلدانی و باغچه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. ضمناً این گیاه دگرگشن است و بذرهای تولیدی گیاه قدرت جوانه‌زنی خوبی ندارد و گیاهان یکنواختی تولید نمی‌کنند. لذا تولید این گیاه زینتی باارزش از طریق کشت‌بافت می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. در این تحقیق، ریز نمونه‌های جوانه‌های جانبی و انتهایی با مایع ظرف‌شویی (دی ترژن) و آب شهری و همچنین کلرید جیوه ۰/۰۴درصد ضدعفونی شد. نوساقه‌های تولید شده در این تیمار به‌منظور بررسی شاخه‌زایی، به محیط‌کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی غلظت‌های متفاوتی از هورمون‌های ایندول استیک اسید (IAA) و بنزیل آمینوپیورین (BAP) هر کدام شامل ۰/۸، ۰/۴ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند. آزمایش به‌صورت جداگانه و در قالب طرح فاکتوریل به‌صورت کاملاً تصادفی بررسی شدند. بیشترین تعداد شاخساره در محیط‌کشت (MS) حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP (فاقدIBA) حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: کلرید جیوه، جوانه‌های جانبی، کشت‌بافت، شاخه‌زایی، گیاه زینتی

مقدمه

لیزیانتوس (***Eustoma grandiflorum***) یکی از گونه‌های زینتی خانواده جنتیاناسه (Gentianaceae) است و با نام انگلیسی (Prairie gentian) نامیده می‌شود. گل‌های فنجانی و یا زنگوله‌ای شکل به رنگ‌های متنوع آبی، سفید، صورتی، زرد، قرمز، بنفش، ارغوانی، و ترکیبی از رنگ‌ها به‌صورت منفرد و یا چندتایی روی ساقه‌های برگ‌دار تشکیل می‌شود (Hecht et al.,1994). هر گل دارای ۲ کلاله ۵ تا ۶ عدد پرچم می‌باشد. دارای شکوفه‌های پر رنگ رزی شکل است. برگ‌ها متقابل، تخم‌مرغی و یا نیزه‌ای شکل و بدون دمبرگ و گاهی ساقه آغوش و به رنگ سبز مایل به خاکستری هستند. بسیاری از شکوفه‌های باز نشده که دارای رنگ می‌باشند به‌طور کامل باز خواهند شد. ممکن است شکوفه‌های کوچک‌تر که بی‌رنگ هستند باز نشوند اما می‌توانند از شکوفه‌های دیگر محافظت کنند (Ghasemi Ghahsareh and Kaafi, 2005). تکثیر معمول این گیاه از طریق بذر انجام می‌شود اما فراهم کردن شرایط جوانه‌زنی بذور سخت است. ضمناً این گیاه دگرگشن است و بذرهای تولیدی گیاه قدرت جوانه‌زنی خوبی ندارد 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 پایه مادری تولید می‌شود کم است و نیز رشد بسیار کندی دارد، 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 (کشت‌بافت) یعنی ازدیاد مستمر گیاهان در هر مقطع زمانی از سال و بدون توجه به فصل انجام شود (Roh and Lawson, 1988).

مواد و روش

این تحقیق در آزمایشگاه کشت‌بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه گنبدکاووس انجام گرفت. گیاه لیزیانتوس از گلخانه‌های شهر گنبدکاووس تهیه شد. از جوانه‌های جانبی و جوانه‌های انتهایی به‌عنوان ریزنمونه در کشت استفاده شد. ریز نمونه‌ها به‌منظور کاهش آلودگی با مایع ظرفشویی و آب شهری با دقت شسته شدند. پس از طی این مرحله با کلرید جیوه ۰/۰۴درصد به مدت ۷ دقیقه ضدعفونی انجام شد. سپس با آب مقطر استریل ۳ بار شستشو داده شد. تمام مراحل ضدعفونی در زیر هود لامینار انجام شد. پس از اعمال تیمارها، به‌منظور حذف کامل ماده ضدعفونی کننده، ریز نمونه‌ها سه مرتبه در آب مقطر استریل شستشو داده شدند. ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت پایه به‌همراه مقادیری از ۰/۱، ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر از IBA و BAP کشت شدند، این محیط‌ها هم‌چنین دارای ۷ گرم آگار و ۳ درصد ساکاروز بودند. اسیدیته (PH) محیط بر روی ۵/۸ تنظیم شد. محیط‌های کشت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به‌مدت ۳۰ دقیقه ضدعفونی شدند. محیط‌های کشت حاوی ریز نمونه در اتاق رشد تحت فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۵-۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۸۰-۷۵ درصد و جریان تراکم فتون فتوسنتزی ۵۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه نگهداری شدند. پس از ۳۶ روز صفت شاخساره (تعداد شاخه) اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد انجام شدند. رسم نمودار با برنامه Excel انجام گرفت. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. هر واحد آزمایشی شامل ۱۶ بطری و در هر بطری ۳ ریزنمونه کشت گردید.

شکل (۱) ریزنمونه‌های کشت شده در اتاقک رشد

نتایج و بحث

نمونه‌های مورد نظر بعد از ضدعفونی به محیط‌کشت MS با تیمارهای مختلف منتقل گردید و بعد از گذشت ۳۶ روز تعداد نمونه‌های استقرار یافته، شاخه‌زایی، شمارش و نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفت مورد مطالعه بر اساس طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در جدول (۱) آورده شده است. بر اساس نتایج این جدول در محیط کشت MS صفت شاخه‌زایی اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد و ۵ درصد وجود داشت که نشان دهنده تغییر ارزش صفات مورد مطالعه بود.

ضریب تغییرات براساس ماهیت اعداد یک معیار استاندارد بوده و میزان دقت آزمایش و تکرارپذیری ارزش صفات را نشان می‌دهد. کمی این معیار بیانگر دقت بالا در اجرای آزمایش و نیز تأثیر کم محیط برروی صفات می‌باشد. صفت مورد مطالعه با ضریب تغییرات ۶۱/۲۵ به‌دست آمد.

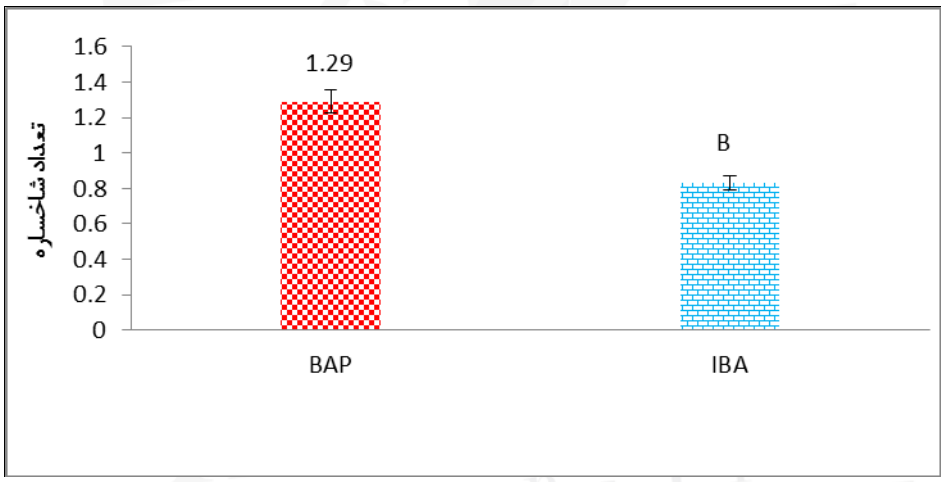
جدول۱- تجزیه واریانس صفت مورد مطالعه در گیاه لیزیانتوس در مرحله استقرار

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		تعدا شاخساره
هورمون	۱	۲/۵۲*
غلظت هورمون	۲	۲/۶۸**
هورمون × غلظت	۵	۱/۳۹*
ریزنمونه	۱	۲/۵۲*
خطا	۳۳	۰/۴۵
ضریب تغییرات		۶۳/۴۹

** و *: به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

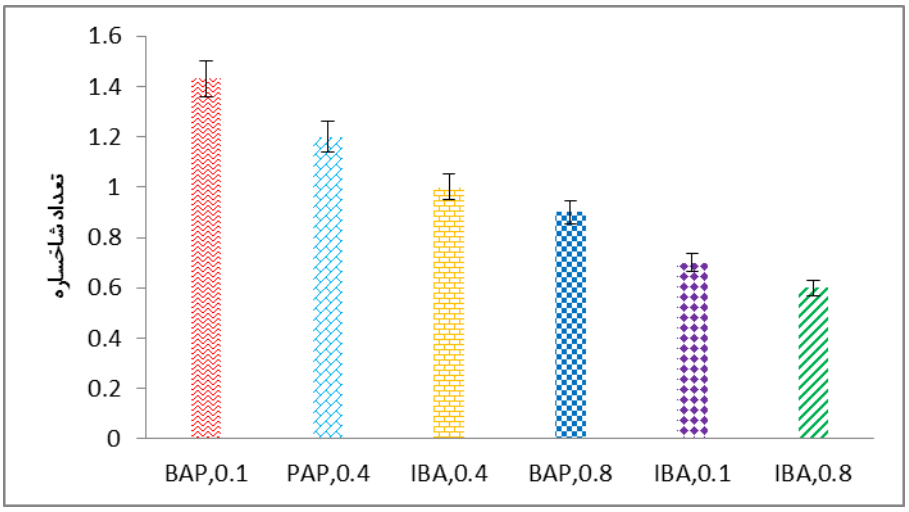
تعداد شاخه

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس جدول (۱) نشان داد اثر نوع هورمون بر تعداد شاخه در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. در این آزمایش تیمار هورمونی BAP دارای بیشترین میزان شاخه‌زایی با میانگین ۱/۲۹ نسبت به هورمون IBA بود (نمودار ۱). کونیتاک و همکاران (۱۹۹۵) با پژوهش‌هایی که بروی گیاه لیزیانتوس انجام دادند دریافتند، که درصد باززایی و تعداد شاخساره در محیط‌کشت حاوی BAP بیشتر از محیط دارای BAP و NAA به‌دست آمد که با نتایج حاصله مطابقت دارد.



نمودار۱- اثر نوع هورمون بر تعدا شاخساره گیاهچه لیزیانتوس

نتایج حاصل از تجزیه واریانس جدول (۱) نشان داد اثر غلظت هورمون بر تعداد شاخساره در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. با توجه به نمودار (۲) بیشترین تعداد شاخساره مربوط به هورمون BAP به‌میزان ۰/۱میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۱/۴۳ نسبت به سایر غلظت‌های دیگر تولید شد و کمترین تعداد شاخساره در محیط‌کشت حاوی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد در تحقیقی که توسط فروزان ضمیزایی و همکاران (۱۳۹۲) بر روی گیاه لیزیانتوس انجام شد. بیشترین تعداد شاخساره در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به وجود آمدند. نتایج به دست آمده با پژوهش حاضر همخوانی داشت.



نمودار۲- اثر نوع هورمون و غلظت بر تعداد شاخساره

به دنبال آن ریزنمونه‌ها به‌عنوان تیماری برای شاخه‌زایی مورد بررسی قرار گرفت که ریزنمونه جوانه جانبی دارای بیشترین میزان کالوس و شاخه‌زایی با میانگین ۱/۲۹ در گیاه لیزیانتوس قرار گرفت نمودار (۳). سایتوکنین‌ها در تحریک رشد جوانه‌های جانبی و کاهش غالبیت انتهایی نیز نقش دارند. نتایج این پژوهش قابل مقایسه با نتایج بابروسکی و همکاران (۱۹۹۶) است.

نمودار۳- تأثیر نوع ریزنمونه بر روی تعداد شاخساره

منابع

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 York5: 57-94**.**

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

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

Ghasemi Ghahsareh, M. and Kaafi, M. 2005. Scientific and practical floriculture. First volume. Press Golbon, Isfahan, 335 pages.

Ichimura K. and korenaga M.1998. Improvement of lif and petal color expression in several cultivar of out *Eustoma grandiflorum* flowers using sucrose 8-hydroxyguoline sulfat.Bulletin of National ResearchInstitute of Vegetables,ornamental plants 8 tea,japan13:31-39**.**

Roh SM. and Lawson RH . 1988. Tissue culturein the improvement of Eustoma**.**

Bobrowski VL, Mello-Farias Paulo C. and Peters Jose A. 1996. Micropropagation of blackberries (Rubus sp.) cultivars. Rev Bras De Agrociencia 2: 17-20.

Zmiraee F, kaviani B, Tarang A.and, Bohlooli B. 2013. The effect of different concerntrations of BAP in vitro plant lisianthus first congress of sustainable agriculthre, natural resoures, Tehran, Arvand Institue of higher Education in october

Evaluation Different Concentrations of IBA, BAP and Explants Type on Shoot Proliferation of Lisianthus (*Eustoma Grandiflorum*)

Loghman Azizpour[1]*,Hossein Hosseini Moghaddam[2],Mehdi zarei[2],Yaser Hosseini[3]
*[1]MSc. Student of Agricultural Biotechnology.GonbadKavous University, GonbadKavous
[2]Assistant Professor of plant production Dept.,GonbadKavous University, GonbadKavous
[3]Educated of MSc. degree in plant protection, GonbadKavous
Corresponding Author: looghman.azizpoor@yahoo.com

Abstract

Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) is one of the ornamental species from Gentianaceae family. Various flower colors of this plant such as: blue, white, purple, pink and purple has given high importance in the markets of cut flowers, potted and garden flowers. This plant is a cross-pollinated crop and seed germination potential is not so good and the seedling plants are not uniform. Vegetative propagation of this plant through tissue culture can be very important. In this study, samples of fine lateral and terminal buds first washed by detergent and drink water and then sterilized with mercuric chloride % 0/04 in 6 minutes. For shoot proliferation the new shoots sub cultured on MS medium containing different concentrations of the hormone indole acetic acid (IAA) and benzyl amino purine (BAP) each containing 0/8, 0/4 and 0/1 mg per liter. This experiment was designed as factorial in the form of completely random plan with 5 replication and 3 sample in each replication. The highest number of shoots obtained on medium (MS) containing 1.0 mg BAP (no IBA).

Keywords: **Lisianthus, terminal buds, mercuric chloride, BAP, IAA**