# تاثیر تنظیم کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی و اندام‌زایی در لیسیانتوس

**سید مهدی میری (۱)، کاملیا بهزاد (۱)، اکرم سواری (۱)**
۱- عضو هیات علمی، دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشجوی سابق کارشناسی باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج

لیسیانتوس گیاهی زینتی می‌باشد که اخیراً بعنوان گل شاخه بریده یا گلدانی مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه به‌دست آوردن هورمون‌های مناسب جهت کالوس‌زایی و اندام‌زایی لیسیانتوس می‌باشد. کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های برگی در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های IAA، NAA و 2,4-D انجام شد و سپس کالوس‌ها به محیط کشت اندام‌زایی شامل MS با ترکیب هورمونی BA با یا بدون IAA و NAA منتقل شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که نوع و غلظت هورمون بر کالوس‌زایی و اندام‌زایی تاثیر معنی‌داری دارد و بهترین نتیجه به ترتیب با ترکیب هورمونی ۱۰۰ میکرومول NAA و ۰/۱ + ۵ میلی‌گرم در لیتر BA + NAA به‌دست آمد.

**کلمات کلیدی:** لیسیانتوس، کالوس‌زایی، اندام‌زایی

**مقدمه:**

لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn) یک گیاه زینتی یکساله یا دو ساله بومی جنوب آمریکا و مکزیک می‌باشد که بعنوان گل بریده و یا گیاه گلدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد و گلهای آن به رنگ‌های متنوعی همچون آبی، بنفش، آلبالویی، سفید و صورتی وجود دارد (٦). این گیاه یک محصول نسبتاً جدید در بازارهای بین‌المللی می‌باشد اما به خاطر گلهای شبیه به رز، عمر پس از برداشت عالی و گلهای آبی آن به سرعت جزو ۱۰ گل بریده برتر دنیا قرار گرفت (٤).

یکی از روش‌های اصلاح این گیاه استفاده از تنوع سوماکلونال می‌باشد (٤). تنوع سوماکلونال که به تنوع ژنتیکی در گیاهان تولید شده در شرایط کشت درون شیشه‌ای گفته می‌شود، معمولاً در کشت کالوس مشاهده می‌گردد و می‌تواند در برنامه‌های اصلاح گیاهان بکار رود. گریس‌باچ و سمنیوک (۱۹۸۷) با این روش واریانت‌های پاکوتاه و مینیاتوری لیسیانتوس با شاخه‌دهی فرعی بدست آوردند که در گیاهان بذری تجاری مشاهده نشده بود (۳). در این تحقیق تاثیر تنظیم کننده‌های رشد بر کالوس‌زایی و اندام‌زایی لیسیانتوس مورد بررسی قرار گرفته است.

**مواد و روش‌ها:**

در این آزمایشات از گیاهچه‌های کشت بافتی لیسیانتوس که در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA نگهداری می‌شدند استفاده گردید (۱). برای کالوس‌زایی، برگ‌هایی به طول ۱ سانتی‌متر جدا شده و در محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۷ گرم در لیتر آگار و تنظیم کننده‌های رشد IAA، NAA و 2,4-D با سطوح ۰، ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومول در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (هر تکرار شامل ۲ ریزنمونه) کشت گردیدند و پس از یک ماه، درصد کالوس‌زایی و وزن تر و کیفیت کالوس‌ها یادداشت‌برداری شدند.

از کالوس‌هایی با کیفیت خوب، نمونه‌هایی یکدست به ابعاد ۱ سانتی‌متر تهیه شده و به منظور باززایی شاخساره در محیط کشت MS حاوی BA به میزان ۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر با یا بدون ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و یا NAA در یک آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی کشت شدند و پس از یک ماه درصد باززایی و تعداد شاخساره باززایی شده شمارش گردید.

داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16.0 مورد تجزیه آماری قرار گرفته و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد صورت گرفت.

**نتایج و بحث:**

نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از وزن تر کالوس‌های ایجاد شده نشان داد که اثر هورمون در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد. تاثیر NAA بر روی کالوس‌زایی بیشتر از 2,4-D بوده و با تیمارهای IAA کالوس بسیار کمی بوجود آمد که ناشی از فعال‌تر بودن اکسین‌های NAA و 2,4-D نسبت به IAA می‌باشد. همچنین در محیط کشت بدون اکسین و در غلظت‌های ۰/۱ میکرومول از تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده، هیچگونه کالوسی تشکیل نشد. برای القای کالوس، اضافه کردن مواد تنظیم کننده رشد معمولاً ضروری است و اکسین‌ها موجب تقسیم سلولی و تشکیل کالوس می‌شوند. بالاترین وزن تر کالوس (۱/۹۲ گرم) که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت مربوط به تیمار ۱۰۰ میکرومول NAA بود.

کالوس‌های بدست آمده به رنگ سبز و سبز مایل به زرد و یا قهوه‌ای و به صورت ترد و شکننده و یا سخت بودند. همچنین اکثر کالوس‌هایی که در محیط کشت حاوی ۱ الی ۱۰۰ میکرومول NAA قرار داشتند، تولید ریشه نابجا کردند در صورتیکه در سایر تیمارهای هورمونی ریشه‌ای تشکیل نگردید.

نتایج آزمایش باززایی شاخساره نابجا نشان داد که در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA، شاخه‌زایی صورت نگرفت و با افزایش غلظت BA از ۳ به ۵ میلی‌گرم در لیتر، باززایی افزایش یافت. همچنین IAA تاثیر مثبت و NAA تاثیر منفی بر شاخه‌زایی داشتند و بیشترین باززایی (۱۳/۵ شاخساره به ازای هر ریزنمونه) با تیمار ۰/۱ + ۳ میلی‌گرم در لیتر BA + IAA بدست آمد.

سایتوکینین‌ها موجب تشکیل شاخه‌های نابجا می‌شوند و هرچند که وجود اکسین همراه با سایتوکینین ضروری نیست اما اکسین‌ها می‌توانند اثرات مفیدی روی شاخه‌زایی نابجا بگذارند که در بررسی اخیر این مسئله بخوبی نمایان بوده و توسط محققین زیادی نیز مورد استفاده قرار گرفته است. دامیانو و همکاران (۱۹۸۹) برای باززایی از کشت سلولی لیسیانتوس از ۰/۱ + ۵ میلی‌گرم در لیتر BA + IAA استفاده کردند (۲). روفانی و همکاران (۱۹۹۰) نیز تاثیر چندین سایتوکینین و اکسین را بر روی باززایی بررسی کرده و بالاترین تعداد شاخساره را با ترکیب ۰/۱ + ۳ میلی‌گرم در لیتر Zea + IBA بدست آوردند (۷). کونیتاک و همکاران (۱۹۹۵) دریافتند که درصد باززایی و تعداد شاخساره در محیط حاوی BA بیشتر از محیط دارای BA و NAA بود که با نتایج بدست آمده مطابقت دارد (۵).

**منابع:**

۱- موسوی، ا.س.، ۱۳۸۹. بهینه‌سازی ازدیاد درون شیشه‌ای گیاه لیسیانتوس. پایان‌نامه کارشناسی ارشد باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی- واحد کرج.

2. Damiano, C., Ruffani, B., Curir, P., Esposito, P. and F. Massabo, 1990. Tissue culture and micropropagation of *Lisianthus russellianus* Hook. Acta Hort., 151: 141-145.

3. Griesbach, R.J. and P. Semeniuk, 1987. Use of somadonal variation in the improvement of *Eustoma grandlflorum*. The J. Heredity. 78: 114-116.

4. Harbaugh, B.K., 2007. Lisianthus. In: Flower Breeding and Genetics. Anderson, N.O., (ed.). Springer, Netherlands.

5. Kunitake, H., Nakashima, T., Mori, K., Tanaka, M.and M. Mii, 1995. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of lisianthus *(Eustoma grandiflorum)* by adding activated charcoal into protoplast culture medium. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 43: 59-65.

6. 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 Cell. Dev. Biol.-Plant. 36: 128-132.

7. Ruffani, B., Damiano, C., Massabo, F. and P. Esposito, 1990. Organogenesis and embryogenesis in *Lisianthus russellianus* Hook. Acta Hort., 280: 83-88.

**Effect of plant growth regulators on callus formation and organogenesis in lisianthus**

Miri, S.M., Behzad, K. and A. Savari
Member of Scientific Board, M.Sc. Student and Former B.Sc. Student, Dept. of Horticulture, Islamic Azad University, Karaj Branch

**Abstract**
Lisianthus is a flower that recently has been demanded as a cut flower or pot plant. This study focused on callus formation and organogenesis and the best kind of hormone in the most suitable concentration was selected. Callus formation was done from leaf explants on MS medium containing IAA, NAA and 2,4-D. Then calli were transferred to MS plus BA with or without IAA and NAA. The result of analysis variance indicated that type and concentration of hormones had significant effect on callus formation and organogenesis. The best results were obtained with 100 µM NAA and 5 + 0.1 $mg.l^{-1}$ BA + NAA, respectively.
**Keywords**: lisianthus, callus formation, organogenesis