16th July 2018
۲۵ تیرماه ۱۳۹۷
4th. International Conference on
Agricultural Engineering and Natural Resources
چهارمین کنفرانس بین المللی
مهندسی کشاورزی و منابع طبیعی
Archive of SID

تاثیر نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اکسین بر ریشه‌زایی گیاه بگونیا *X* هیمالیس

مهدیس یحیی نتاج[۱*]، ولی اله قاسمی عمران[۲] ، محمد علی ابراهیمی[۳]

۱. کارشناسی ارشد، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور تهران شرق
۲. استادیار، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، نویسنده مسئول
۳. استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور، دانشگاه پیام نور تهران شرق
Email: Yahyanataj.Mahdis@gmail.com
Email: ghasemiomran@gmail.com
Email: ebrahimimpnu@yahoo.com

چکیده

این تحقیق با هدف دستیابی به پروتوکل ریشه‌زایی گیاه *Begonia X hiemalis* در شرایط درون‌شیشه‌ای با استفاده از کشت ریزنمونه‌های، گره و میان-گره روی محیط کشت‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در غلظت‌های مختلف صورت پذیرفت. بدین منظور جهت مشخص‌کردن بهترین ترکیب برای ریشه‌زایی از محیط‌کشت MS پایه حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA در غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ استفاده شد. از بین تیمارهای مورد استفاده در این تحقیق، بیشترین درصد ریشه‌زایی در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. با این حال، بیشترین تعداد ریشه در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد، اما اختلاف معنی‌داری بین ریزنمونه‌های گره و میانگره از نظر درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه مشاهده نشد. بیشترین طول ریشه در محیط‌کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی بدست آمد. ساقه‌ها پس از ریشه‌دار شدن به بستر خاک حاوی پیت ماس (۶۰ درصد)، پرلیت (۳۰ درصد) و خاکه ذغال (۱۰ درصد) با ۱۰۰ درصد زنده مانی انتقال داده شدند.

واژه های کلیدی: بگونیا هیمالیس، کشت‌بافت، ریزنمونه، IBA

۱. مقدمه

گیاه بگونیا هیمالیس با نام علمی *Begonia x hiemalis* متعلق به خانواده *Begoniaceae* است. حدود ۱۵۰۰ گونه بگونیا وجود دارد که خاستگاه آن جنوب و مرکز آمریکا، آفریقا و جنوب آسیا است. این گونه از بگونیا هیبرید بوده که حاصل تلاقی بگونیا توبروس و بگونیا وکس است و زاده‌ی آزمایشگاه می‌باشد. گیاهی دائمی و دارای گل‌هایی پرپر به رنگ‌های سفید، زرد، نارنجی، قرمز و صورتی است. گل‌ها براق بوده و برگ‌های این گیاه به شکل تقریبا بیضی کشیده و به رنگ سبز تیره‌اند. جالب‌ترین قسمت این گیاه گل‌های زیبای آن می‌باشد که به آنها جذابیت خاصی می-دهد و ارتفاع نهایی آن بین ۳۰ تا ۴۵ سانتی‌متر است (کاستیلو و اسمیت، ۱۹۹۷). روش‌های معمول و سنتی تکثیر این گیاه غالبا از طریق بذر، قلمه برگ و ساقه، پاجوش و... می‌باشند. از معایب این روش‌ها دستیابی به تعداد کم گیاهچه از هر گیاه، افزایش هزینه تولید، نیاز به سطوح وسیع جهت تولید انبوه و گسترش آلودگی‌های قارچی و ویروسی می‌باشد (یاداو، ۲۰۱۰). تولید تجاری گیاهان زینتی در سطح جهانی در حال پیشرفت است. ارزش اقتصادی گیاهان زینتی در طول دهه‌های اخیر رشد قابل ملاحظه‌ای داشته و پتانسیل بالایی جهت ادامه رشد هم در سطح بازارهای محلی و هم در سطح بازارهای بین المللی وجود دارد (جین، ۲۰۰۲). گیاهان گلدانی زیادی نظیر بگونیا، فیکوس، آنتوریوم، گل داوودی، رز، گل شمعدانی و اسپاتی فیلوم در کشورهای پیشرفته در حال تولید است (آنونیمس، ۲۰۰۳). امروزه بسیاری از گیاهان در سطح جهانی از طریق کشت-بافت تولید می‌شوند و ریز ازدیادی به یک بخش ضروری در کشاورزی مدرن تبدیل شده است. در ۷۰ درصد آزمایشگاه‌های تجاری هدف اصلی ازدیاد سریع گیاهان است. طبق آمار فروش تولیدات کشت‌بافتی بیش از یک میلیارد گیاه در سال تخمین زده می‌شود (امیرعلی و همکاران، ۲۰۰۷). کشت‌بافت و سلول گیاهی به روشی گفته می‌شود که در آن اجزای مختلف گیاه (سلول، پروتوپلاست جنین، بافت، اندام و غیره) در شرایط آزمایشگاهی و به طور کاملاً سترون روی یک محیط غذایی مشخص قرار می‌گیرند و در شرایط محیطی مناسب نگه‌داری می‌شوند. این روش در سطح کم وسعت (در مقایسه با کشت‌های مزرعه‌ای) صورت می‌گیرد (طباطبایی و امیدی، ۱۳۹۱). تکثیر بگونیا با استفاده از فنآوری کشت‌بافت

www.SID.ir

Archive of SID

طی مدت زمان کوتاهی صورت می‌گیرد و نتایج مطلوبی را نشان داده است. از این رو بسیاری از محققین به تکثیر بگونیا برای اهداف تجاری با استفاده از تکنیک کشت‌بافت روی آورده‌اند (میکلسون و سینک، ۱۹۷۸). تکنیک کشت‌بافت گیاهی یک مسیر جایگزین برای تولید و تکثیر گسترده گیاه بگونیا است و روشی مناسب برای غلبه بر مشکلات معمول در تکثیر سنتی و معمول بگونیا می‌باشد. اوال و همکاران (۲۰۰۹) اثر ترکیبات مختلف از هورمون‌های BAP و NAA را بر روی باززایی جوانه در گیاه بگونیا هیمالیس بررسی کرد. در این آزمایش حد مطلوب باززایی جوانه هنگامی مشاهده شد که از محیط اصلاح شده MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده شد و جوانه‌هایی نرمال به رنگ سبز تیره بوجود آمدند. همچنین استفاده از محیط اصلاح شده MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAAبهترین نتیجه را برای القا ریشه نشان داد. نتیجه‌گیری‌ها نشان داد که استفاده از BAP و NAA در غلظت‌های کمتر، تعداد جوانه‌های کمتری را بوجود می‌آورد. اوال و همکاران (۲۰۰۹) و مندی و همکاران (۲۰۰۹) اثرات همزمان BA و NAA را در ریزازدیایی گیاه بگونیا هیمالیس در محیط MS با استفاده از ریزنمونه‌های برگ، برگچه و ساقه اصلی گیاه بررسی کردند. در آزمایش مندی و همکاران، بعد از ۶ هفته بهترین پاسخ در ساقه اصلی مشاهده شد. ترکیب ۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA ۷۰ درصد باززایی را نشان داد، که دارای بیشترین درصد بود. اوال و همکاران (۲۰۰۸) مشاهده نمودند که مقدار مطلوب کالوس زمانی بوجود آمد که از محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D استفاده شد. از آنجایی‌که شکل و رنگ کالوس تاثیر بسزایی در کیفیت کالوس دارد، کالوس‌های متراکم در دو رنگ سبز و مایل به زرد در طول کالوس‌زایی با استفاده از محیط‌کشت ذکر شده پدیدار شدند. همچنین آنها بیان کردند که استفاده از محیط اصلاح شده MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در باززایی جوانه از گیاه بگونیا هیمالیس تاثیر بسزایی دارد. درتحقیقی دیگر اثر ترکیبات محیط‌کشت بر شکل کالوس با استفاده از ریزنمونه‌های گل آذین، ساقه گل و گلبرگ در گیاه بگونیا هیمالیس مطالعه شد. کالوس‌زایی بدون اضافه کردن تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر روی محیط‌کشت بی‌نتیجه ماند. همچنین ریزنمونه استفاده شده از گلبرگ گیاه هیچ کالوسی را نشان نداد و به بافت مرده تبدیل شد. استفاده از اکسین به تنهایی و یا ترکیب با سیتوکینین منجر به کالوس‌زایی شد. بالاترین و بهترین کالوس‌زایی زمانی مشاهده گردید که از ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده شد. همچنین نتیجه‌گیری شد که NAA بهتر از 2,4-D و IAA برای تولید کالوس از گل آذین و ساقه گل است (علی و همکاران، ۲۰۰۹). قائم مقامی (۱۳۹۰) آزمایشی با عنوان باززایی شاخساره از قطعات برگ و دمبرگ بگونیا رکس در شرایط درون‌شیشه‌ای را انجام داد. این آزمایش با استقرار ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ پس از ضدعفونی، روی محیط‌کشت MS با ترکیبی از تنظیم‌کننده‌های رشد با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA صورت پذیرفت. شاخساره‌ها بعد از ۶ هفته مشاهده شدند، بهترین باززایی در ترکیبی از هورمون‌های ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد. کبیرنتاج و همکاران (۱۳۹۱) در تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاه بگونیا رکس، بیشترین تعداد ساقه‌های نابجا را از ریزنمونه پهنک کشت شده در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بعد از ۵ هفته بدست آوردند. کمترین تعداد ساقه‌های نابجا از ریزنمونه دمبرگ در محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA و NAA مشاهده شد. محیط MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر GA بهترین تیمار جهت افزایش طول ساقه‌های نابجای باززایی شده بود. اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در گیاه بگونیا رکس با استفاده از ریزنمونه برگ نشان داد که بیشترین میانگین تولید برگ مربوط به تیمار هورمونی BA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر به همراه NAA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بود (۳۳ برگ). و تیمار هورمونی با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA کمترین میانگین تولید برگ (۲ برگ) را داشت. همچنین استفاده از محیط اصلاح شده MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین نتیجه را برای القا ریشه نشان داد (عابدینی و گلعین، ۲۰۱۱). در بیشتر پژوهش‌هایی که در ارتباط با کشت‌بافت گیاهان زینتی انجام شده محققان به این نتیجه رسیدند که بنزیل آدنین (BA) برای پرآوری شاخساره و نفتالین استیک اسید (NAA) برای ریشه‌زایی، موثرترین تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده می‌باشند (میکلسن و همکاران، ۱۹۷۸). همچنین تحقیقات انجام گرفته توسط پیریک (۱۹۹۷) نشان داد که کارایی غلظت بالای سیتوکینین در ترکیب با اکسین نسبت به استفاده از اکسین به تنهایی موثرتر است، به نحوی‌که با استفاده از غلظت برابر اکسین وسیتوکینین باززایی به طور چشمگیری کاهش پیدا می‌کند.

از آن جایی‌که تکثیر گیاه بگونیا هیمالیس به شیوه‌ی سنتی نظیر قلمه ساقه و برگ جواب‌گوی تقاضای بازار مصرف این گیاه نیست، امروزه می‌توان این گیاه را توسط کشت درون‌شیشه‌ای که روشی موثر و تخصصی می‌باشد، تکثیر نمود (گراسلی ۱۹۷۶). در ایران تولیدکنندگان داخلی به شدت وابسته به واردات نشاء این محصول از کشورهای صادرکننده می‌باشند که لزوم استفاده از روش‌های نوین در تولید و تکثیر این گیاه را دوچندان می‌نماید. این تحقیق با هدف انتخاب بهترین ریزنمونه و ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی جهت باززایی مستقیم، انتخاب بهترین ترکیب تنظیم-کننده رشد گیاهی جهت ریشه‌زایی از ساقه‌های باززایی شده و در نهایت دستیابی به پروتوکل باززایی گیاه بگونیا هیمالیس جهت تکثیر وسیع این گیاه صورت پذیرفت. با تکثیر در مقیاس وسیع می‌توان نیاز به واردات نشاءهای بگونیا هیمالیس را از کشورهای دیگر برطرف نمود.

www.SID.ir

Archive of SID

۲. مواد و روش‌ها

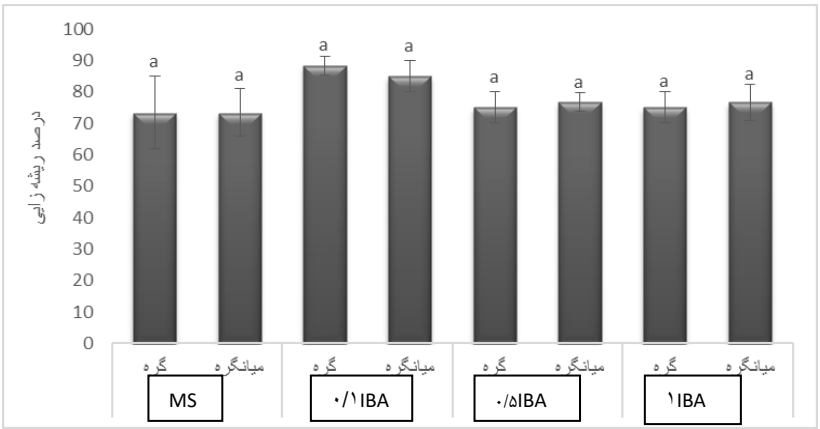
گیاه مادری بگونیا هیمالیس از شرکت Koppe از واریته Llona (دارای خصوصیت رشدی و زمان ماندگاری گل خوب، گل‌های نیمه مضاعف، دامنه‌ای وسیع از رنگ‌ها، دوره‌ی کشت کوتاه مدت و حساسیت کم به سفیدک) تهیه شد. ریزنمونه‌ها از ساقه گیاه بگونیا هیمالیس برداشته شد و برای شست و شوی سطحی زیر شیر آب جاری به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. ریزنمونه‌ها در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه غوطه ور شده و بعد از آن با آب مقطر شست و شو داده شد. سپس با محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد حاوی یک قطره مایع ظرفشویی به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شد و بعد از آن ریزنمونه‌ها، سه بار با آب مقطر استریل زیر هود لامینار شست و شو داده شدند. ریزنمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی استریل خشک گردیده و به قطعات مساوی برش داده شدند. ریزنمونه های گره و میانگره جهت القای ریشه به محیط‌های کشت MS حاوی ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی-گرم در لیتر IBA انتقال داده شدند.کشت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد زیر نور فلورسنت با شدت نور ۲۵۰۰ Lux با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. بعد از سه هفته باززایی مشاهده شد (شکل الف). ساقه‌های باززایی شده پس از ریشه‌دار شدن به بستر خاک حاوی پیت ماس (۶۰ درصد)، پرلیت (۳۰ درصد) و خاکه ذغال (۱۰ درصد) با ۱۰۰ درصد زنده مانی انتقال داده شدند (شکل ج). تجزیه داده‌های بدست آمده از آزمایش، بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار و ۵ ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS و برای رسم نمودارها از نرم افزار EXCEL استفاده شد. آزمون مقایسه میانگین توسط آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری LSD در سطح پنج درصد انجام شد.

.

۳. نتایج و بحث

برای ریشه‌زایی ساقه‌های باززایی شده از ریزنمونه‌های گره و میانگره به محیط‌کشت حاوی غلظت‌های مختلف اکسین و محیط کشت MS به تنهایی منتقل گشتند. مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارها نشان داد که افزایش غلظت هورمون IBA منجر به افزایش میزان درصد ریشه‌زایی در هر دو ریزنمونه گره و میانگره شد، بطوریکه بیشترین میزان درصد ریشه‌زایی در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA از ریزنمونه‌های گره و میانگره به ترتیب با ۸۸/۳۳ و ۸۵ درصد مشاهده شد (شکل۱). و کمترین درصد ریشه‌زایی در محیط‌کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی بدست آمد (نمودار۱) .

نمودار۱- اثر متقابل تیمار غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA و ریزنمونه بر درصد ریشه‌زایی



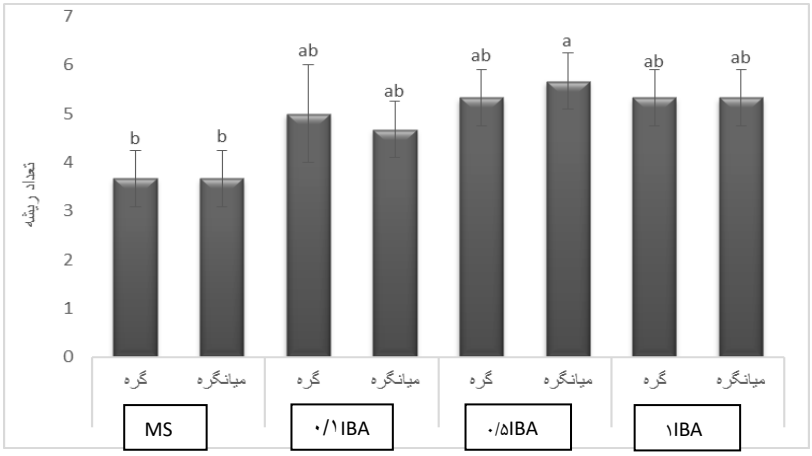
برای هر پارامتر در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

بیشترین تعداد ریشه تحت غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد اما، اختلاف معنی‌داری بین تیمار ریزنمونه‌های گره و میانگره بر روی تعداد ریشه وجود نداشت. کمترین تعداد ریشه نیز در محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی حاصل شد (نمودار۲).

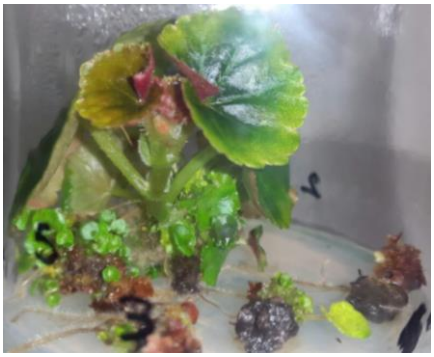
نمودار۲- اثر متقابل تیمار غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA و ریزنمونه بر تعداد ریشه

www.SID.ir

Archive of SID



برای هر پارامتر در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.



شکل۱. ریشه‌زایی ساقه‌های باززایی شده پس از ۱۱ هفته کشت روی محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA

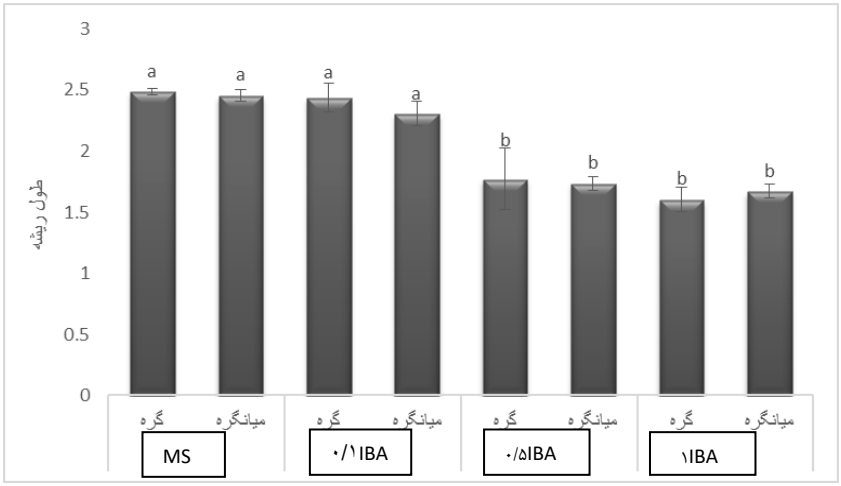
شکل۲. مرحله‌ی سازگاری و انتقال به بستر خاک

اثر متقابل تیمارها نشان داد با افزایش غلظت هورمون، طول ریشه‌های حاصل از هر دو ریزنمونه‌های گره و میانگره با کاهش همراه بود که بیشترین کاهش طول ریشه، از ریزنمونه‌های گره و میانگره تحت غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد و بیشترین طول ریشه در محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی بدست آمد (نمودار۳).

نمودار۳- اثر متقابل تیمار غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA و ریزنمونه بر طول ریشه

www.SID.ir

Archive of SID



برای هر پارامتر در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج بدست آمده از تاثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی اکسین IBA بر ریشه‌زایی از دو ریزنمونه گره و میانگره گیاه بگونیا هیمالیس نشان داد که استفاده از تنظیم‌کننده رشد گیاهی IBA تاثیر مثبت بر، ریشه‌زایی و تعداد ریشه گیاه بگونیا هیمالیس داشته است و با افزایش غلظت این تنظیم‌کننده رشد گیاهی میزان باززایی کاهش یافت اما تفاوتی بین میزان باززایی در ریزنمونه‌های گره و میانگره وجود نداشت.

گزارشات زیادی تاثیر مثبت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اکسین بر روی ریشه‌زایی گیاهان زینتی را نشان داده است ((2010) Ghafari *et al.* و Kaviani *et al.* (2011) ،). نتایج بدست آمده از این تحقیق همسو با نتایج حاصل از گزارش کبیرنتاج و همکاران (۱۳۹۱) می‌باشد. آنها در آزمایشی به بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف IBA و NAA بر روی میزان باززایی و ریشه‌زایی گیاه بگونیا رکس پرداختند. این محققین بیان داشتند بیشترین میزان ریشه‌زایی تحت غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA از ریزنمونه برگ حاصل شد.

۳. نتیجه‌گیری کلی:

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در بین غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۵، ۱، بیشترین درصد ریشه‌زایی در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. بیشترین تعداد ریشه در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد اما اختلاف معنی‌داری بین ریزنمونه‌های گره و میانگره بر درصد ریشه-زایی و تعداد ریشه مشاهده نشد. بیشترین طول ریشه در محیط‌کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی بدست آمد.

ساقه‌های باززایی شده پس از ریشه‌دار شدن به بستر خاک حاوی پیت ماس (۶۰ درصد)، پرلیت (۳۰ درصد) وخاکه ذغال (۱۰ درصد) با ۱۰۰ درصد زنده مانی انتقال داده شدند (شکل۲).

مراجع

۱. سید طباطبایی، ب. امیدی، م. (۱۳۹۱). کشت‌بافت و سلول گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ سوم. ص ۲-۱ و ص ۵۳-۲۵.

۲. قائم مقامی، س، ع. (۱۳۹۰). باززایی شاخساره از قطعات برک و دمبرگ گیاه بگونیا در شرایط دون شیشه‌ای. هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران ۱۴ تا ۱۷ شهریور

۳. عابدینی، م. و گلعین، ب. (۱۳۹۱). اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد بر کشت‌بافت گیاه بگونیا رکس. مجله به زراعی نهال و بذر. جلد اول. ص ۱۱۱-۱۰۷.

۴. کبیرنتاج، س. قاسمی، ی. نعمت زاده، ق. اصغرزاده، ر. شاهین کلیبر، ب. یزدانی، م. (۱۳۹۱). اثر نوع ریزنمونه و تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر باززایی درون شیشه‌ای بگونیا رکس. مجله تحقیقاتی بین المللی کاربردی و علوم پایه. جلد سوم. ص ۹۰۱-۸۹۶.

5. Awal, A. Taha, RM. Hasbullah, NA. (2008). Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in *Begonia x hiemalis* Fotsch. *in vitro*. Journal of Biological Sciences 8: 920-924.

6. Ali. Ahmed, AB. Rao, AS. Rao, MV. (2009). In vitro productionof gymnemic acid from Gymnema sylvestre (Retz) R.Br ex Roemer and Schultes through callus culture under abiotic stress conditions. Methods Mol Biol. 547:93-105.

www.SID.ir

Archive of SID

7. Anonymous, M. 1988. Non- stop begonias-vibrant and versatile. Bedding Plant Incorporated News. NO 19 (ED 4):11.
8. Ali, A., Munawar, A., Naz, SH, (2007). An In Vitro Study on Micropagation of *Caladium bicolor*. International Journal of Agriculture and Biology. 5: 731-735.
9. Castillo. B, Smith, MAL. (1997). Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracillis* explants. plant cell reports. 16: 385-388.
10. Grossely, J. H and Arrowsmith, S. 1967. Tuberous begonias. Publication of Canadian Department of Agriculture. PP.1335-1345.
11. Ghafari. Esizad. S, Kaviani. B, Tarang. AR, Bohlooli. Zanjani, S. (2012). Micropropagation of lisianthus, an ornamental plant. Plant Omics Journal 5, 314-319.
12. Kaviani. B, Ahmadi. Hesar, A, Tarang. AR, Bohloli. Zanjani. S, Hashemabadi. D, Rezaei MA. (2011). Callus induction and root formation on the leaf micro-cuttings of Matthiola incana using Kn and NAA. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences 11(3), 456-461.
13. Mendi YY, Curuk P, Kocaman E, Unek C, Eldogan S, Gencel G, Cetiner S. (2009). Regeneration of begonia plantlets by direct organogenesis. African Journal of Biotechnology 8 (9), 1860-1863.
14. Mikkelsen. EP, Sink, Jr KC. (1978). Histology of adventitious shoot and root formation on leaf-petiole cuttings of *Begonia x hiemalis* Fotsch. *Aphrodite Peach*. Sci Hortic-Amsterdam. 8: 179-192.
15. Yadav, A.K., Singh, S., Dhyani, D., Ahuja, S. (2010). A review on the improvement of stevia [Stevia rebaudiana (Bertoni)]. Canadian Journal of Plant Science, 91: 1-27.

www.SID.ir