نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص.۳۶۴-۳۵۴
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 2, Summer 2017, P. 354-364
ISSN: 2008 - 4730

بهینه‌سازی اندام‌زایی غیرمستقیم گیاه آنتوریوم(*Anthuriumscherzerianum*)

احمد نوروزی[۱]- عبدالرضا باقری[۲*]- نسرین مشتاقی[۳]- احمد شریفی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۴

چکیده

آنتوریوم گلدانی (*Anthuriumscherzerianum*) یک گیاه زینتی چند ساله است که به دلیل مشکلات تکثیر سنتی در این گیاه، از کشت بافت به عنوان روشی مناسب برای تکثیر سریع و حذف بیماری‌های آن نام برده می شود. در این پژوهش اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و نوع ریزنمونه بر روی باززایی غیرمستقیم *A.scherzerianum* مورد بررسی قرار گرفت. به منظور القای کالوس در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ آنتوریوم اثر سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشد BA و TDZ (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) در ترکیب با NAA یا 2,4-D (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط کشت پایه MSدر شرایط تاریکی مورد بررسی قرار گرفت. برای القای باززایی در کالوس‌های تولید شده اثر سطوح پایین تر سایتوکنین‌ها و اکسین‌ها در محیط کشت پایه MS بررسی شد. برای ریشه‌زایی گیاهچه‌های، از محیط کشت $^1/_2$MS حاوی ترکیبات هورمونی IBA و IAA استفاده شد. نتایج آزمایش‌ها نشان داد که ریزنمونه دمبرگ بیشترین کالوس‌زایی، درصد زنده‌مانی و حجم کالوس را در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D تولید کرد. همچنین نتایج آزمایش باززایی نشان داد که در ترکیب هورمونی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشترین تعداد شاخساره (۶/۹)، طول شاخساره (۵ سانتی متر) تولید شد. در آزمایش ریشه‌زایی نیز بیشترین درصد ریشه‌زایی (۹۵ درصد)، تعداد ریشه (۴/۵) و طول ریشه (۳/۵ سانتی متر) در محیط کشت حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد. در نهایت گیاهچه‌های ریشه دار شده، برای سازگاری با شرایط برون شیشه‌ای در بستر کوکوپیت و پرلیت (۲:۱) ۹۰ درصد سازگار شدند.

واژه‌های کلیدی: باززایی، تنظیم کننده‌های رشد، ریشه‌زایی، کالوس، کشت بافت

مقدمه

گیاه آنتوریوم گلدان(*Anthuriumscherzerianum*) از مهمترین گونه‌های جنس آنتوریوم است که به جهت دارا بودن گل‌های بسیار زیبا و جذاب با طول عمر مفید، موارد استفاده زیادی دارد (۱۳). در این خانواده ۱۰۸ جنس و ۳۷۵۰ گونه رونده و علفی شناخته شده است (۱۱ و ۲۵). اهمیت و جایگاه گل آنتوریوم در میان گیاهان زینتی به لحاظ قیمت بالای آن در حدی است که لزوم استفاده از روش‌های نوین جهت نیل به اهداف اقتصادی را ایجاب می‌کند. روش سنتی افزایش آنتوریوم از طریق تقسیم بوته پاجوش‌های کوچک اطراف گیاه مادری و انتقال قلمه‌های انتهایی دو یا سه برگ و ریشه‌دار کردن آن‌ها در شرایط مه‌افشان می‌باشد. راندمان تولید در این روش پایین است و سالانه حداکثر ۸ گیاه از یک گیاه مادری قابل تولید است. همچنین تکثیر از طریق بذر موجب تفرق صفات در نتاج گردیده و گیاهان حاصل نیز برای به گل رفتن به سه سال وقت نیاز دارند. بواسطه اینکه برای تولید تجاری و صادرات، زمان رسیدن و یکنواختی تولید و همچنین تولید گیاهانی با ساختار ژنتیکی یکسان اهمیت ویژه‌ای دارد؛ از این‌رو استفاده از روش‌های کشت بافت گیاهی و یا ریزازدیادی آنتوریوم بهترین راه برای دستیابی به اهداف فوق است و کاهش هزینه‌های تولید و امکان تولید مداوم و سریع را نیز در پی خواهد داشت (۳).

تکثیر آنتوریوم از طریق کشت بافت نخست در سال ۱۹۷۴ توسط پیریک و همکارانش انجام شد. حمیده و همکاران (۱۰) در تحقیقی دیگر نشان دادند که جنین‌زایی سوماتیکی در گیاه *A.scherzerianum* را می توان از طریق کشت بافت ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی 2,4-D و kin انجام داد. با این حال اطلاعات اندکی در مورد کشت بافت این گیاه وجود دارد. ژنوتیپ و رقم از مهم‌ترین عوامل موثر در کشت بافت آنتوریوم است که در

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- عضو هیأت علمی گروه بیوتکنولوژی گیاهان زینتی، جهاد دانشگاهی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: bagheriyazd@gmail.com)
DOI:10.22067/jhorts4.v31i2.52890

مطالعات مختلف به این عامل توجه زیادی شده است. طی تحقیقی که اتاک و سیلیک (۱) برروی ریزازدیادی دو رقم آنتوریوم انجام دادند، مشخص شد که در رقم آریزونا سرعت القای کالوس، سرعت باززایی و درصد ریشه‌زایی، نسبت به رقم سومی بیشتر بود. باززایی از قطعات برگ *A. scherzerianum* به شدت وابسته به ژنوتیپ و سن برگ است (۸). طی پژوهش های مختلف به غیر از ریزنمونه برگ برای باززایی غیرمستقیم آنتوریوم، نتایج بسیار خوبی از ریزنمونه‌های نوک ساقه، دمبرگ و گره گزارش شده است (۱۶، ۲۵، ۲۶). در باززایی غیرمستقیم از محیط‌های کشت مختلفی چونMS ، MMS، نیچ و WPM برای کالوس‌زایی و اندام‌زایی استفاده شده است (۱، ۱۶، ۲۰، ۲۵).

طی پژوهشی، تی چاتو (۲۴) اثر چهار محیط کشت MS،MMS ، WPNو NN بر باززایی ریزنمونه‌های برگ و گره دو رقم مختلف از آنتوریوم را مورد بررسی قرار دادند و در نهایت محیط‌های MS و MMS بیشترین کالوس‌زایی و باززایی را داشتند. اتاک وسیلیک (۱) از محیط کشت MS حاوی ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA برای القای کالوس و از محیط کشت MS تغییر یافته در مقدار NH_4NO_3 (مقدار آن به ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش یافته بود) و حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA برای باززایی اندام‌های هوایی و از محیط کشت MSبا نصف غلظت نمک، ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۰/۰۴ درصد زغال فعال برای ریشه‌زایی نمونه‌ها استفاده کردند. عطا الله و همکاران (۳) نیز ریشه‌زایی گیاهچه‌های آنتوریوم را در محیط کشت MS که حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود با ۶۴ درصد موفقیت انجام دادند. گسترش روزافزون استفاده از این گیاه در جامعه شهری، واردات پایه‌های آن از خارج از کشور، اهمیت و نقش این گیاه و در اختیار نبودن روش مناسب برای تولید انبوه این پایه‌ها در شرایط این ویترو، انجام تحقیقات منسجم برای ریزازدیادی این گیاه را ضروری می‌سازد. با توجه به محدودیت تکثیر از طریق روش‌های سنتی و اهمیت گیاه آنتوریوم به عنوان یک گل زینتی، در این پژوهش سعی بر این بود تا کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی گیاه *A. scherzerianum* در شرایط درون شیشه‌ای مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد. همچنین تعیین بهترین محیط کشت کالوس‌زایی، باززایی، و تعیین سطوح مطلوب تنظیم‌کننده‌های رشد نیز می تواند گام موثری در جهت تولید انبوه این گیاه از طریق سیستم کشت بافت باشد.

مواد و روش‌ها

برای اجرای تحقیق ۱۲ گلدان گیاه *A.scherzerianum* از بازار گل تهیه و در گلخانه تحقیقاتی جهاد دانشگاهی مشهد با شرایط محیطی و تغذیه مناسب نگهداری شدند. در این تحقیق از ریز نمونه‌های برگ، دمبرگ، اسپاد و اسپادیکس گیاه شاداب در حال رشد فعال استفاده شد. ریز نمونه‌های مورد نظر به مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب جاری و چند قطره مایع شوینده رایج شستشو داده شدند. سپس برای ضد عفونی ریزنمونه‌ها به محلول حاوی ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم و چند قطره توین ۲۰ برای مدت ۱۵ دقیقه منتقل شد. ریزنمونه‌ها در شرایط استریل در زیر هود لامینار ۳ مرتبه در دوره زمانی ۵، ۱۰و ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. سپس ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی ترکیب هورمونی مختلف شامل ترکیب BA (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) همراه با 2,4-D یا NAA (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) یا ترکیب TDZ (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) همراه با 2,4-D (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر)، ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار با pH معادل ۵/۷ به منظور بررسی اثر نوع ریزنمونه، ترکیب هورمونی محیط کشت بر کالوس‌زایی کشت شدند. ریزنمونه‌ها در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در اتاق کشت نگهداری شدند. این آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی با سه عامل نوع ریزنمونه، نوع تنظیم کننده رشد و سطوح مختلف تنظیم کننده رشد در۱۲ تکرار انجام شد.

به منظور باززایی ریزنمونه‌های کالوس‌زا، ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی ترکیبات هورمونی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BAدر ترکیب با ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ، ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BAدر ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیترNAA، ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر TDZدر ترکیب با ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر TDZمنتقل شدند. ریزنمونه‌های کشت شده در اتاق رشد با دمای۲±۲۵ درجه سانتی گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۲ عامل نوع ریزنمونه و نوع تنظیم کننده رشد در۶ تکرار انجام شد.

به منظور ریشه‌زایی، گیاهچه‌های باززایی شده که دارایارتفاع تقریبا ۲ سانتی متر و حداقل ۳ برگ بودند به محیط کشت $^1/_2$MS حاوی ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشد IBA یا IAA (۰/۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و بدون هورمون و با ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار منتقل شدند. pH محیط نیز روی ۵/۷ تنظیم شد. همچنین گیاهچه‌های کشت شده در اتاق رشد در دمای۲±۲۵ درجه سانتی گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.این بررسی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تکرار انجام شد. در مرحله سازگاری بسترهای مختلف کشت، کوکوپیت و پرلیت (۲:۱)، ورمی کولیت، پیت ماس و پرلیت (۲:۱) و ورمی کولیت و پرلیت (۱:۱) بررسی شد.

داده‌های حاصل از کلیه طرح های مورد استفاده در این پژوهش با نرم افزار آماری SAS تجزیه شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از

آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ارزیابی شد. داده‌های درصدی با استفاده از فرمول [ArcsinSqrt($\frac{x}{100}$)] قبل از تجزیه واریانس، تبدیل و تجزیه واریانس با داده های تبدیل شده انجام شد.

نتایج و بحث

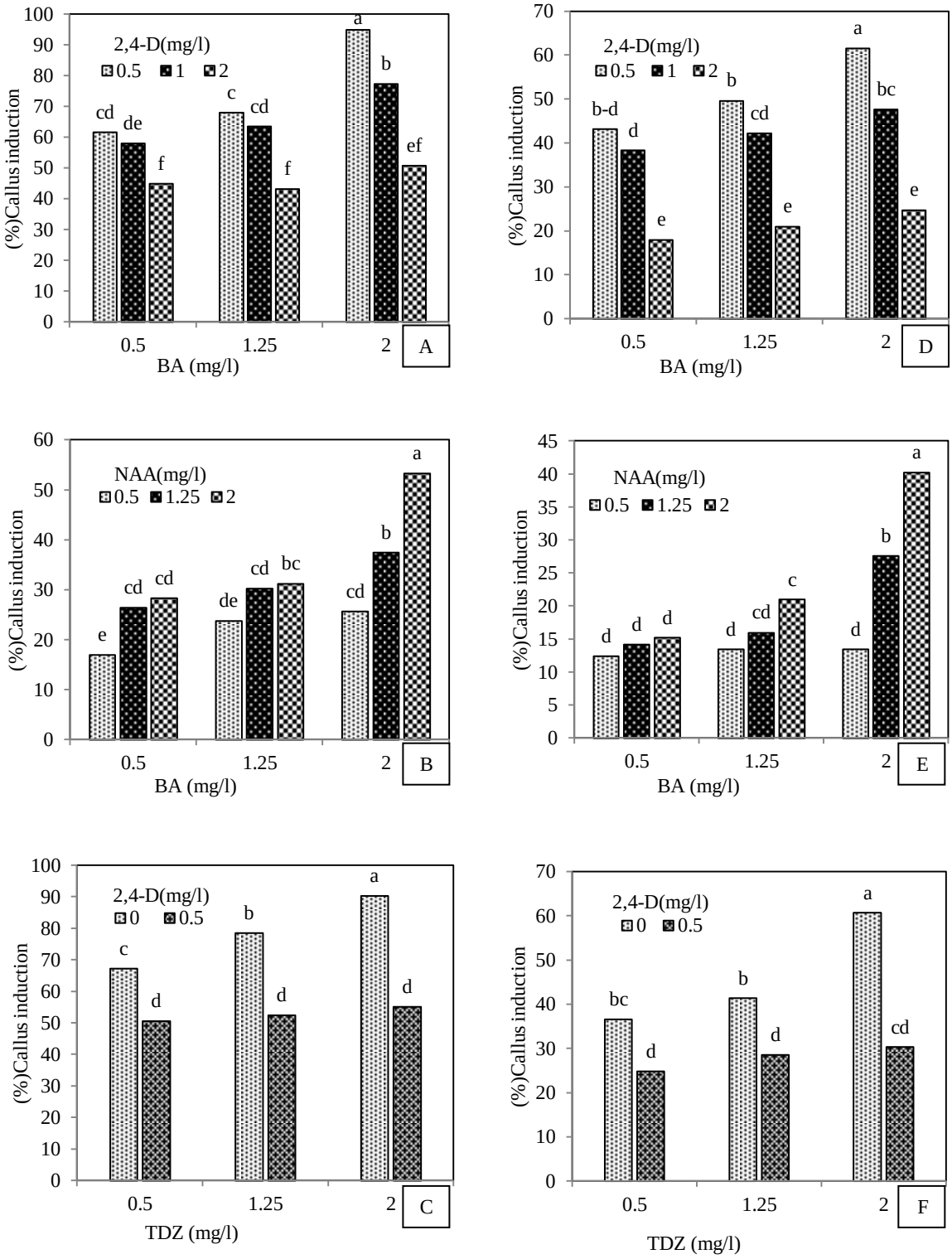
کالوس‌زایی: ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ کشت شده گیاه *A. scherzerianum* در ۲۴ ترکیب هورمونی کالوس‌زایی در نحوه‌ی القای کالوس واکنش متفاوتی از خود نشان دادند. آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که نوع ریزنمونه و ترکیب هورمونی بر روی درصد کالوس‌زایی، حجم کالوس و درصد زنده‌مانی معنی‌دار است. همچنین اثر متقابل نوع ریزنمونه و ترکیب هورمونی بر روی درصد کالوس‌زایی و درصد زنده‌مانی معنی‌دار بود. اثر نتایج مقایسه میانگین نشان داد که ریزنمونه دمبرگ درصد کالوس‌زایی، درصد زنده‌مانی و حجم کالوس بیشتری نسبت به برگ دارد.

تی چاتو و همکاران (۲۴) گزارش کردند که در سه رقم (پلیو، سانیت و والنتینو) ریزنمونه‌های میان‌گره رقم والنتینو بیشتر از ریزنمونه‌های گره و برگ دیگر ارقام در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA کالوس‌زایی نشان می‌دهند. در تیمارسیتوکینین‌های BA و TDZ مورد بررسی، افزایش مقدار سیتوکینین موجود در محیط کشت از ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم در لیتر، درصد کالوس‌زایی، درصد زنده‌مانی و حجم کالوس افزایش و فاصله زمانی تا شروع کالوس‌زایی کاهش یافت. بررسی داده‌ها نشان داد ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA، بیشترین درصد کالوس‌زایی و ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ کالوس‌ها در کمترین فاصله زمانی از کشت تولید شد. نتایج مشابه توسط چراغی و همکاران (۶) و یو یی و همکاران (۲۷) نیز بدست آمد. چراغی و همکاران (۶) گزارش کردند که ریزنمونه‌های کشت شده گیاه *A.andreanum* در محیط کشت حاوی TDZ در فاصله زمانی کمتریBAو 2,4-D شروع به کالوس‌زایی کردند. در ضمن درصد پروتوکورم‌زایی در محیط کشت حاوی تنظیم کننده‌های رشد BA خیلی بیشتر از TDZبود.

نتایج بدست آمده نشان داد با افزایش BA از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به ۲ میلی‌گرم در لیتر، درصد کالوس‌زایی، درصد زنده‌مانی و حجم کالوس تولید شده افزایش می‌یابد. در اکسین‌های 2,4-D و NAA مورد بررسی، افزایش آن از ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم در لیتر، درصد کالوس‌زایی، درصد زنده‌مانی و حجم کالوس کاهش و فاصله زمانی تا شروع کالوس‌زایی افزایش یافت، اما افزایش NAA از ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم در لیتر، درصد کالوس‌زایی، درصد زنده‌مانی و حجم کالوس افزایش و فاصله زمانی تا شروع کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ و دمبرگ کاهش یافت (شکل ۲ و ۳). همچنین افزایش غلظت 2,4-D در محیط کشت، قهوه‌ای شدن ریزنمونه و کالوس‌ها را به دنبال داشت. این نتیجه در پژوهش‌های مختلف گزارش شده است (۶ و ۱۵). در خصوص 2,4-D به جز سطح ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر با افزایش 2,4-D از ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم در لیتر، درصد کالوس‌زایی، درصد زنده مانی و حجم کالوس تولیدی کاهش می‌یابد. همچنین به نظر می‌رسد هر گونه تغییر در سطوح BA تاثیر مثبت بیشتری بر کالوس‌زایی و حجم کالوس ریزنمونه‌ها نسبت به 2,4-D داشته باشد (شکل های ۱، ۲).

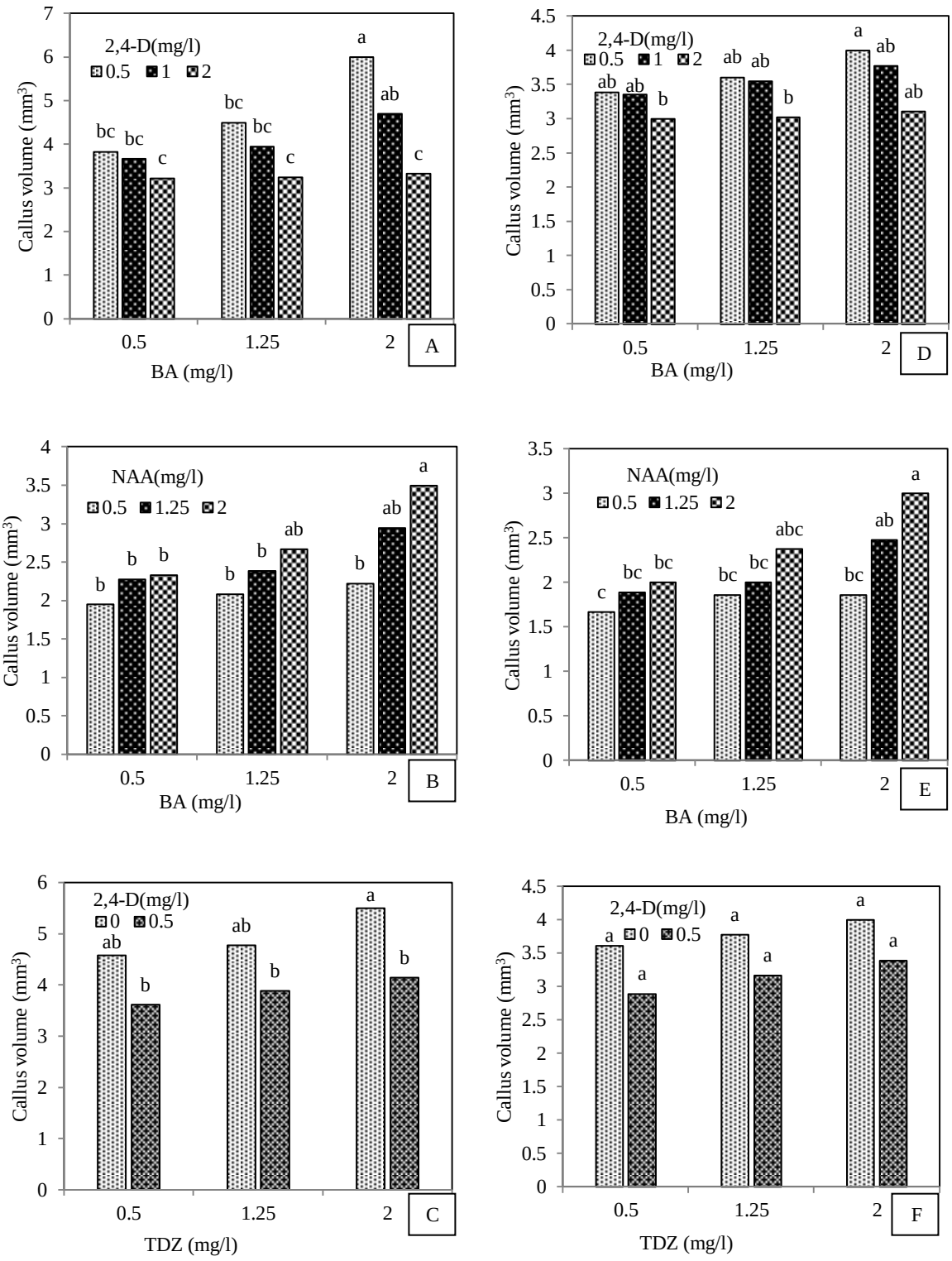
مقایسه میانگین داده‌های کالوس‌زایی نشان داد بیشترین کالوس‌زایی، درصد زنده مانی و حجم کالوس تولیدی در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد. وریزنمونه‌های دمبرگ در این ترکیب هورمونی بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۵ درصد)، درصد زنده‌مانی (۹۶ درصد) و کالوس‌هایی به ابعاد ۶ میلی متر مکعب تولید کردند. همچنین ریزنمونه‌های برگ در همین ترکیب هورمونی بیشترین درصد کالوس‌زایی (۶۱ درصد)، درصد زنده‌مانی (۶۲ درصد) و حجم کالوس (۴ میلی متر مکعب) تولیدی را داشت. نتایج بدست آمده در این آزمایش با نتایج کوهنل و همکاران (۱۴)، جیو و همکاران (۹) و چراغی و همکاران (۶) مبنی بر برتری ریزنمونه‌های دمبرگ بر ریزنمونه‌های برگ در کالوس‌زایی و باززایی مطابقت داشت. جیو و همکاران (۹) گزارش کردند که ریزنمونه‌های دمبرگ در محیط کشت MS حاوی۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشترین کالوس (۸۶ درصد) را تولید کردند. نتایج بررسی داده‌ها نشان داد ترکیبات هورمونی حاوی TDZ به تنهایی و TDZ در ترکیب با 2,4-D نسبت به ترکیبات هورمونی BA در ترکیب با NAA درصد کالوس‌زایی، درصد زنده‌مانی، حجم کالوس و سرعت کالوس‌زایی بیشتری نشان دادند بطوری که محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA کمترین درصد کالوس (۱۲ درصد)، درصد زنده‌مانی (۱۲ درصد) و حجم کالوس (۱/۷ میلی متر مکعب) را در ریزنمونه برگ تولید کردند (شکل ۱ و ۲).

کهنل و همکاران (۱۵)، حمیده و همکاران (۱۰)، تنگ (۲۳)، بی جو و همکاران (۴)، یو و همکاران (۲۷) بیان کردند که کالوس‌زایی آنتوریوم تحت تاثیر ترکیب هورمونی محیط کشت قرار می‌گیرد و بسته به رقم و ریزنمونه سطح بهینه متفاوتی گزارش شده است، بطوری که بیشترین کالوس‌زایی در ترکیب هورمونی BA (۱، ۲، ۲/۵) و 2,4-D (۰/۲، ۰/۰۸، ۰/۲، ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر)، به دست آمده است. بر اساس نتایج داده ها، با کاهش غلظت TDZ از مقدار ۲ میلی‌گرم بر لیتر درصد کالوس‌زایی، درصد زنده‌مانی و حجم کالوس تشکیل شده کاهش نشان داد (شکل ۱، ۲).



شکل۱- اثر ترکیبات هورمونی محیط کشت بر درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های دمبرگ(A, B, C) و برگ(D, E, F)گیاه آنتوریوم

Figure 1-Effect ofplant growth regulators on callus induction inpetiole (A, B, C) andleaves (D, E, F) explants of *Anthurium*



شکل۲ - اثر ترکیبات هورمونی محیط کشت بر حجم کالوس در ریزنمونه دمبرگ (A, B, C) و برگ (D, E, F) گیاه آنتوریوم

Figure 2- Effects ofplant growth regulators on callus volume inpetiole (A, B, C) andleaves (D, E, F) explants of *Anthurium*

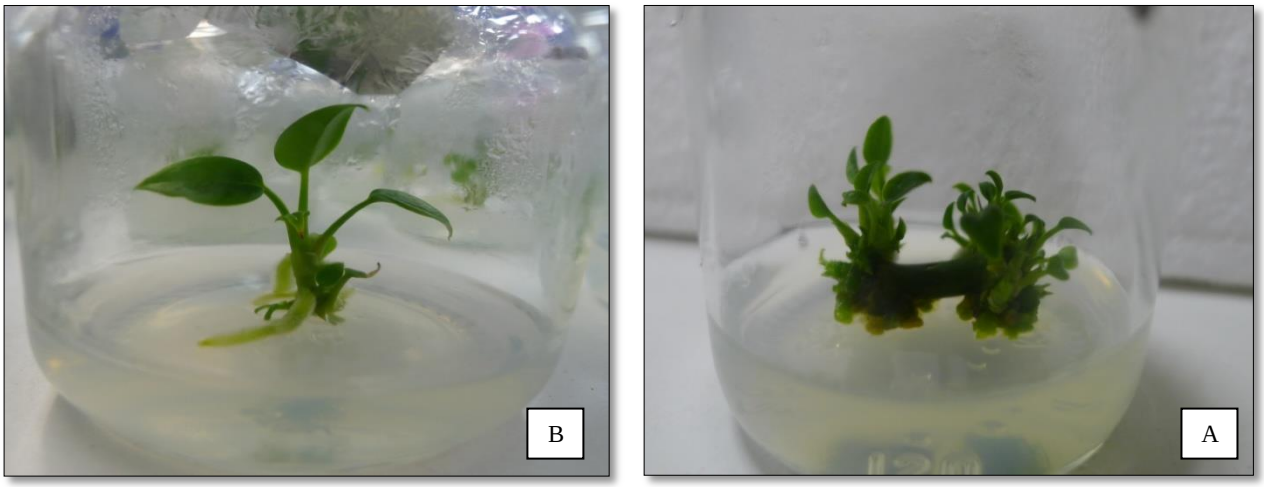
ریزنمونه–های برگ و دمبرگ کشت شده در ترکیب هورمونی حاوی TDZ (۰/۵، ۱/۲۵، ۲) از نظر صفات درصد کالوس‌زایی، درصد زنده‌مانی، حجم کالوس و سرعت کالوس نتایج بهتری نسبت به ترکیب‌های هورمونی حاوی TDZدر ترکیب با 2,4-Dنشان دادند (شکل‌های ۱، ۲). بررسی نتایج سایر محققان نیز نشان می‌دهد که برای القای کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های کشت شده ارقام مختلف آنتوریوم از ترکیبات هورمونی مختلفی استفاده شده است (۴، ۱۲، ۱۵، ۲۴، ۲۷). همچنین بی جو و همکاران (۴) گزارش کردند ریزنمونه‌های برگ کشت شده در محیط کشت MSحاوی یک میلی‌گرم BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر2,4-D، درصد کالوس‌زایی بیشتری نسبت به ترکیبات هورمونی حاوی Kinتولید می‌شود و لازم به ذکر است کالوس‌ها در این ترکیب هورمونی زودتر شروع به رشد و نمو می‌کند.

باززایی: نتایج جدول تجزیه واریانس اثرات ساده ترکیب هورمونی و ریزنمونه و اثر متقابل آنها بر باززایی نشان داد که از لحاظ درصد باززایی، تعداد شاخه، طول شاخه، تعداد برگ و طول برگ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین داده‌های باززایی نشان دادکه ریزنمونه دمبرگ در ترکیب هورمونی حاوی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشترین درصد باززایی (۸۶ درصد)، تعداد شاخساره (۶/۹)، طول شاخساره (۴/۵ سانتی متر)، تعداد برگ (۱۸) و طول برگ (۲/۸ میلی متر) را تولید می‌کند.همچنین کمترین درصد باززایی در ترکیب هورمونی حاوی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده گردید. این در حالی است که ریزنمونه برگ در ترکیب هورمونی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ بیشترین درصد باززایی (۶۷ درصد)، تعداد شاخساره (۳/۵)، طول شاخساره (۳ سانتی متر)، تعداد برگ (۱۰/۹) و طول برگ(۲/۷ میلی متر) را تولید کرد (جدول۱).

نتایج بدست آمده با نتایج چراغی و همکاران (۶) مطابقت داشت. آنها گزارش کردند ریزنمونه‌های دمبرگ نسبت به ریزنمونه‌های برگ گیاه *A.andraeanum* نتیجه بهتری در باززایی نشان دادند. با این وجود پروتوکورم‌های تولید شده در محیط کشت‌های حاوی TDZ در زمان کمتریشروع به باززایی نمودند. در پژوهش‌های مختلف جیو و همکاران (۹)، تانگ و همکاران (۲۳)، بی جوی و همکاران (۴)، جهان و همکاران (۱۲) و سیلیک و اتاک (۱) بیشترین باززایی را به ترتیب در ترکیب هورمونی BA (۲، ۱، ۲/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۰/۲، ۰/۰۸، ۰/۵، ۰/۲ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر)، گزارش کردند.

ریشه‌زایی: نتایج جدول تجزیه واریانس اثر غلظت ترکیب هورمونی بر ریشه‌زایی نشان داد که از لحاظ درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه و اثر نوع ترکیب هورمونی بر تعداد ریشه و طول ریشه اختلاف معنی‌داری وجود دارد. اثر نوع ترکیب هورمونی بر درصد ریشه‌زایی معنی‌دار نبود. همچنین نتایج جدول تجزیه واریانس اثر متقابل غلظت ترکیب هورمونی و نوع ترکیب هورمونی بر ریشه‌زایی نشان داد که از لحاظ درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه وجود ندارد.

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد غلظت پایین اکسین‌ها (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) اثر بهتری نسبت به سطوح بالای آنها (۱ میلی‌گرم در لیتر) بر ریشه‌زایی دارد بطوری که بیشترین درصد ریشه‌زایی (۹۵)، تعداد ریشه (۴/۵) و طول ریشه (۳/۵ سانتی متر) تولیدی در محیط کشت حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و کمترین درصد ریشه‌زایی (۲۸)، تعداد ریشه (۰/۸) و طول ریشه (۰/۷ سانتی-متر) در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد (شکل۴).



شکل ۳- شکل‌گیری شاخساره و برگ در ریزنمونه دمبرگ (A) وریشه‌زایی گیاهچه‌های آنتوریوم در شرایط این ویترو (B)

Figure 3 -The formation ofshootsandleaf in petiol explants (A) and *in vitro* rooting of*Anthurium* plantlets (B)

جدول۱- اثر ریزنمونه × ترکیب هورمونی بر باززایی گیاهچه آنتوریوم در ریزنمونه دمبرگ و برگ در گونه*A. scherzerianum*

Table1- The effects ofexplantsandgrowth regulatorcompositionsonpetiole and leafregenerationin *A. scherzerianum*

نوع ترکیب هورمونی Growth regulator (mg/l)	تعداد شاخه Shootnumber		طول شاخه Shoot length (cm)		تعداد برگ Leaf number		طول برگ Leaf length (mm)		باززایی Regeneration (%)	
	دمبرگ Petiole	برگ Leaf	دمبرگ Petiole	برگ Leaf	دمبرگ Petiole	برگ Leaf	دمبرگ Petiole	برگ Leaf	دمبرگ Petiole	برگ Leaf
0.75 BA + 0.05 2,4-D	6.9 a	2.7 b	5 a	2.5 a	18 a	9.9 b	2.8 a	2.5 a	86 a	66.7 a
0.75 TDZ	5.5 b	3.5 a	3.9 b	3 a	12.5 b	10.9 a	2.7 b	2.7 a	83.5 a	67 a
0.75TDZ +0.05 2,4-D	4.5 c	2.5 b	3.9 b	2.9 a	11.5 b	8.8 b	2.7 b	2.6 a	80 ab	63.9 a
0.75BA + 0.1 NAA	2.5 c	1.5 c	2.9 c	2.55 b	7c	5 c	2.5 c	2.5 b	69.5 b	50.5 a

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (P<0.05) با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن نمی‌باشند.

Numbers followed by the same letter are not significantly different (P<0.05) based on Duncan's multiple range test

همچنین بیشترین سرعت ریشه‌زایی در محیط کشت بدون هورمون رخ داد. این نتایج را محققان دیگر نیز گزارش کردند. معمولا برای ریشه‌زایی در *A.andraeanum* از IBA و IAA با غلظت پایین در محیط کشت استفاده می‌شود (۶ و ۱۳).

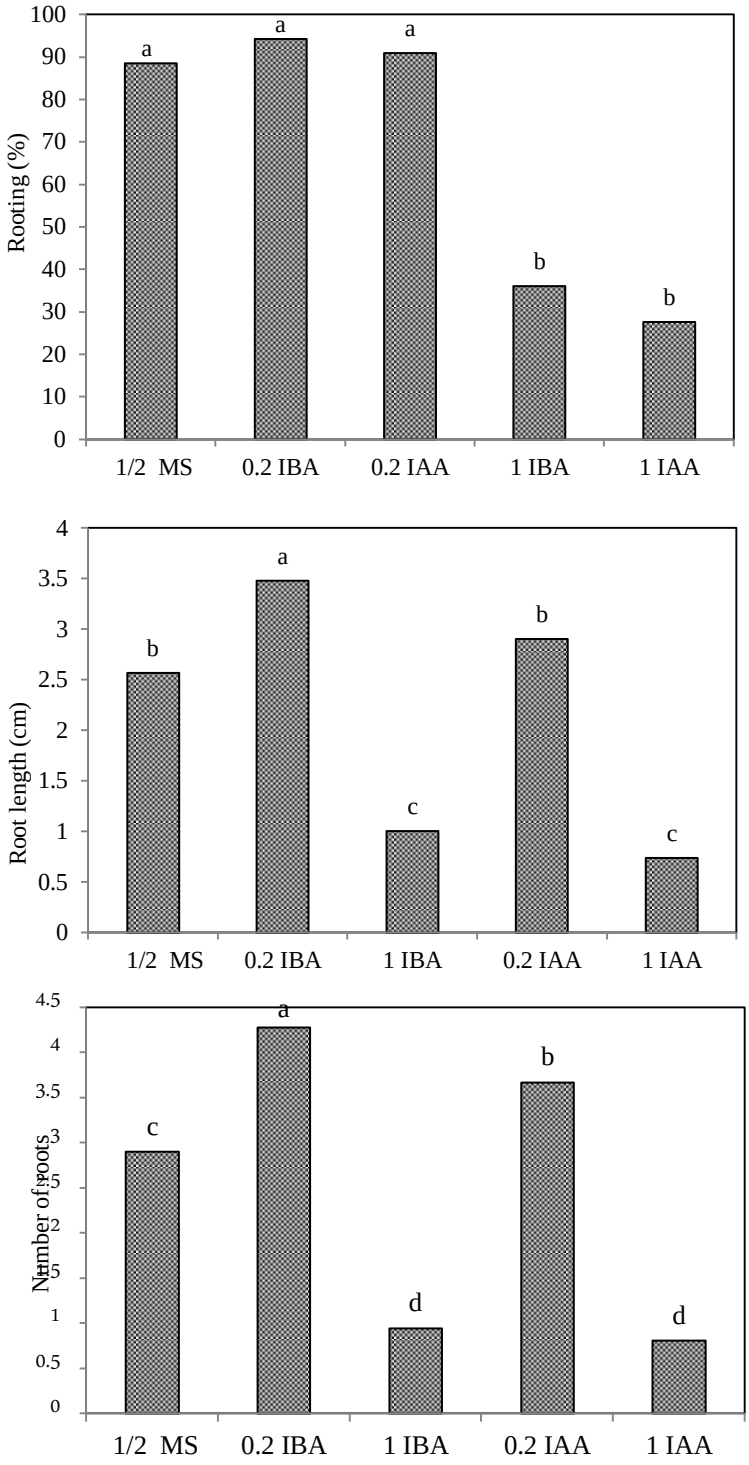
اما بعضی دیگر از محققان از سطوح بالا اکسین (IBA و IAA) برایافزایش ریشه‌زایی استفاده کرده‌اند که با نتایج این آزمایش مطابقت ندارد (۱، ۱۱، ۲۲). پوچا و همکاران (۲۲) و اتاک وسیلیک (۱) برای ریشه–زایی بیشتر شاخساره‌ها از IBA (۱ میلی‌گرم در لیتر) همراه با ۴ درصد زغال فعال در محیط کشت MS و B5 استفاده کردند. هرب و همکاران (۱۱) گزارش کردند که از بین ۵ غلظت (۰، ۱/۵، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) IBA شاخساره‌ها در ۲ میلی‌گرم در لیتر ریشه‌زایی بیشتری رخ می‌دهد.

سازگاری: به منظور سازگاری گیاهان باززا شده، می‌بایست کاهش تدریجی رطوبت انجام شود تا گیاهان به یکباره دچار تنش‌های رطوبتی و حرارتی نگردند. تحمل‌پذیری گیاه و بهینه بودن تکثیر انبوه گیاه، مقیاس اندازه‌گیری ناسازگاری گیاه در شرایط طبیعی می‌باشد.از آنجایی که خاستگاه آنتوریوم مناطق گرم و مرطوب است ایجاد شرایط رطوبتی و دمایی مطلوب گیاهچه‌های باززا شده آنتوریوم در زمان سازگاری بصورت کاملا مناسب برای این گیاه فراهم شد. در این مرحله بسترهای مختلف کشت، کوکوپیت و پرلیت (۲:۱)، ورمی کولیت، پیت ماس و پرلیت (۲:۱) و ورمی کولیت و پرلیت (۱:۱) بررسی شد. با توجه به نتایج این آزمایش و پژوهشگران دیگر مشخص شد برای سازگاری اولیه آنتوریوم باید از بستر کشتی استفاده شود که سبک بوده و تبادل هوا در آن به راحتی انجام شود و از طرفی از نظر حفظ رطوبت نیز مناسب باشد. نتایج آزمایش سازگاری گیاهچه‌های آنتوریوم نشان داد بستر کوکوپیت و پرلیت (۲:۱) با ۹۰ درصد سازگاری بهترین بستر است. با توجه به نتایج آزمایش سازگاری هر نوع بستری که بتواند رطوبت را بیشتر حفظ کند برای مرحله سازگاری مناسب تر است.

نتیجه‌گیری کلی

در حال حاضر بخش عمده‌ای از پایه‌های گیاه *A. scherzerianum* موجود در کشور از خارج تامین می‌شود و تکثیر آن به روش‌های سنتی با افت کیفیت مواجه است. گسترش روزافزون استفاده از این گیاه در جامعه شهری، واردات پایه‌های آن از خارج از کشور، اهمیت و نقش این گیاه و در اختیار نبودن روش مناسب برای تولید انبوه این پایه‌ها در شرایط این ویترو، انجام تحقیقات منسجم برای ریزازدیادی این گیاه را ضروری می‌سازد. از این رو در این پژوهش سعی بر این بود تا با بررسی و مطالعه کالوس‌زایی، باززایی و ریشه زایی ریزنمونه‌های دمبرگ و برگ گیاه *A. scherzerianum* در شرایط درون شیشه‌ای و همچنین تعیین بهترین محیط‌های کشت کالوس‌زایی، باززایی، ریشه‌زایی و تعیین سطوح تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در جهت تولید انبوه این گیاه از طریق سیستم کشت بافت مورد بررسی قرار گیرد.

در بررسی اثر ریزنمونه در گیاه *A.scherzerianum* ریزنمونه دمبرگ بیشترین کالوس‌زایی و باززایی را نشان داد.بررسی اثر ترکیب هورمونی نشان داد بیشترین کالوس‌زایی در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد. همچنین بیشترین درصد باززایی در ترکیب هورمونی حاوی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد.بررسی اثر نوع و غلظت ترکیب هورمونی نشان داد غلظت پایین (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) اکسین‌ها اثر بهتری نسبت به سطوح بالای آنها (۱ میلی‌گرم در لیتر) بر ریشه‌زایی داشته بطوری که بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و کمترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA تولید شد.نتایج آزمایش سازگاری گیاهچه‌های آنتوریوم نشان داد بستر کوکوپیت و پرلیت (۲:۱) با ۹۰ درصد سازگاری بهترین بستر است.



شکل ٤ -مقایسه اثر ترکیب هورمونی بر درصد ریشه‌زایی، تعداد ریشه و طول ریشه، گیاهچه آنتوریوم

Figure 4 –Comparison of plant growth regulatorsonrooting percentage, number of rootsand root length of *Anthurium*plantlets

منابع

1- Atak, C., and Celik, O. 2009. Micropropagation of *Anthuriumandraeanum* from leaf explants. Pakistan Journal of Botany, 41:1155-1161.

2- Atak, C., and Celik, O. 2012. Micropropagation of *Anthurium* spp. Plant Science Journal, 40: 241-253.

3- Atta-Alla, H., Mcalister, B.G., and Van Staden, J. 1998. In vitro culture and establishment of *Anthurium parvispathum.* South African Journal of Botany, 64:296-298.

4- Bejoy, M., Smitha, V.R., and Anish, N.P. 2008. Foliar regeneration in *Anthurium andraeanum* Hort Agnihothri. Biotechnology, 7:134-137.

5- Beyramizade, E., Azadi, P., and Mii, M. 2008. Optimization of factors affecting organogenesis and somatic embryogenesis of *Anthrium andraeanm* Lind. Propagation Ornamental Plants, 8: 198-203.

6 - Cheraghi, .A.L. 1389. Effects of explants, cultivar, growth regulators on *in vitro* culture of the *Anthurium* plant, Master thesis, Ferdowsi University of Mashhad. (in Persian)

7- Finnie, J.F., and Staden. J. 1986. *In vitro* culture of *Anthurium andraeanum*. South African Journal of Botany, 52:343-346.

8- Geier, T. 1986. Factors affecting plant regeneration from leaf segments of *Anthurium scherzerianum* Schott *(Araceae)* cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 6: 115-125.

9- Guo, 1.Z., Zhao-xue, F., and Mi-hong, C. 2006. Callus Induction from different explant of *Anthurium andraeanum*and bud differentiation. Journal of Northwest Forestry University, 3: 116-121.

10- Hamida, M., Abdul Karim, A.G., and Debergh, P. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 48: 189-193.

11- Harb, E.M., Talat, N.B., Weheeda, B.M., Shamy, M.A., and Omira, G.A. 201O. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from shoot tip explants. Journal of Applied Science Research, 6: 927-931.

12- Jahan, M.T., Islam, M.R., Khan, R., Mamun, A.N.K., Ahmad, G., and Hakim, L. 2009. *In vitro* Clonal Propagation of *Anthurium (Anthurium andraeanum* L.) using Cal1us Culture. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 19: 61-69.

13- Joseph, D., Martin, K.P., Madassery, J. and Philip, V.J., 2003. *In vitro* propagation of three commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort. Indian, Journal of Experimental Biology, 41: 154-159.

14- Kuehnle, A.R., and Sugii, N. 1991. Callus induction and plantlet regeneration in tissue culture of *Hawaii ananthurium*. Horticulture Science, 26: 919-921.

15- Kuehnle, A.R., Chen, F.C., and Sugii, N. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration *Anthurium andraeanum* hybrids. Plant cell Reports, II: 438-444.

16- Khorramiraad, M., BohluliZanjani, S., Shoor, M., Hamidoghli, Y., RamezaniSayyad, A., Kharabian Masouleh., A and Kaviani, B. 2012. Callus induction and organogenesis capacity from lamina and petiol explant of *Anthurium andraeanum* Linden (Casino and Antadra). Australian Journal of Crop Science, 6: 928-937.

17- Martin, K.P., Joseph, D., Madassery, J., and Philip, V.J. 2003. Direct shoot regeneration from lamina of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology, 39: 500-504.

18- Montes, S., Hernnandez, M. M., and Varela, M. 1999. Organogenesis in *Anthurium cubense.* Cultivos Tropicales, Physiology Plant, 20: 51-54.

19- Moradi, P. B., and Livari A. 2004.Proliferation and production through tissue culture *Anthurium*.The FirstNationalSeminarofCut Flowers. PAKDASHT. Tehran.

20- Nhut, D. T., Duy, N., Nhuha Ha, N., Diem Khue, C., Van Khiem, D., Thanh Hang., N. T., and Vinh, D. N. 2004. Artificial seed for propagation of *Anthuriurn* Tropical. Journal of Agriculture Science and Technology, 4: 73-78.

21- Pierik, R.L.M., Steegmans, H.H.M., and Van der Meys, J.A.J. 1974. Plantlet formation in callus tissue of *Anthurium anderanum* Lind. Scientia Horticulturae, 2: 193-198.

22-Puchooa, D. 2005. *In vitro* mutation Breeding of *Anthurium* by gamma radiation. International Journal of Agriculture and Biology, 7: 11-20.

23- Teng, W. L. 1997. Regeneration of *Anthurium* adventitious shoots using liquid or raft culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 49: 153-156.

24- Te-chato, S., Naksombut, S., and Boonsiri, J. 2002. Effect of variety and explant on callus formation and micropropagation of *Anthurium*. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 24: 569-578.

25- Viegas, J., Rocha, M. T. R., Ferreira-Moura, 1., Rosa, D. L., Souza, J.A., Correa, M. G. S., and Silva, L. 2007. *Anthurium andraeanum* (Lind ex Andre) culture: *In vitro* and *ex vitro.* Floriculture and Ornamental Biotechnolgy, 1:61-65.

26- Winarto, B., Rachmawatii, F., and Teixeira da silva, 1. A. 2011. New basal media for half-anther culture of *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre cv. Tropical. Plant Growth Regulation, 65: 513-529.

27- Yu, Y., Liu, L., Liu, J., and Wang, J. 2009. Plant regeneration by callus mediated protocorm -Like Body Induction of *Anthurium andraeanum* Hort. Agricultural Sciences in China, 8: 527-577.

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 2, Summer 2017, P. 354-364
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص.۳۶۴-۳۵۴
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Optimization of Indirect Regeneration in *Anthuriumscherzerianum*

A. Noroozi[1]- A. Bagheri[2*]- N. Moshtaghi[3]- A. Sharifi[4]

Received: 15-02-2016
Accepted: 04-03-2017

Introduction: *Anthurium* is a popular genus of the Araceae (order Spathiflorae).The flower consists of a protruding spadix containing numerous florets, subtended by a brightly colored modified leaf, the spathe. Anthuriums are bisexual and protogynous.*Anthuriumscherzerianum* as the most important species of*Anthurium* genus is a potted perennial plant. Due to having beautiful, attractive and long-life flowers, *A. scherzerianum* can be used for the production of pot and cut flowers. Tissue culture is suggested as the most commonly method in order to rapid propagation and removing disease in a short period of time. This method also recommended for Anthuriumbecause of problems in classical propagation method of this flower..The three basic propagation methods for *Anthurium*are propagation by seed, traditional vegetative and tissue culture.Micropropagation of *Anthurium* is using forcommercial production.

Materials and Methods: In this study, the effect of plant growth regulators and explants on indirect regeneration of *A. scherzerianum*determined in separate experiments. In the first experiment, callogenesis was done by leaf explants on MS medium containing growth regulators, BA in three concentrations (0.5, 1.25 and 2 mg/l) in combination with 2, 4-D (0.5, 1.25 and 2 mg/l) or NAA (0.5, 1.25 and 2 mg/l) and the combinations of TDZ (0.5, 1.25 and 2 mg/l) with 2, 4-D (0, 0.5 mg/l). In the second experiment, regeneration was done on MS medium containing 0.75 mg/l BA with 0.05 mg/l 2, 4-D and 0.1 mg/l NAA and also in combination with TDZ (0.75mg/l). For rooting, MS medium containing different concentrations of IBA and IAA (0, 0.2 and 1 mg/l) were used. Callus induction, regeneration and rooting experiments were done based on completely randomized design, with 12, 6 and 6 replications, respectively.Data from all the schemes used in this study were analyzed with SAS statistical software. The comparison of means using Duncan's multiple range test was evaluated at the 5% level.

Results and Discussion: Analysis of variance showed that the effect of explant type and hormone combinations was significant on the percentage of callogenesis, callus volume and survival percentage. The interaction effect of explant type and combination of hormones was also significant on percentage of callogenesisand the volume of callus. Means comparisons showed that the highest callogenesis, viability and callus volume were achieved on MS medium containing 2 mg/l of BA and 0.5 mg/l of 2, 4-D. Petiole explants, also produced the highest percentage of callus (95%), survival rate (96%) and callus with dimensions of 6 mm^2. Callus formation in leaf vein explants was higher than others. The effect of explant type and hormone combinations on regeneration, number of branches, number of leaves and leaf length was significant.The interaction of explant and hormone combinations on regeneration, number of branches, number of leaves and leaf length was also significant. Moreover, results of regeneration experiment indicated that the maximum number of shoots (6.9) and the maximum shoot length (5 cm), number of leaves (18) and the leaf length (2.8 mm) were achieved in 0.75 mg/l BA mg/l of and 0.05 mg/l 2, 4-D. In this study, petiole explants were also regenerated earlier than leaf explants.The effect of hormone combinations and concentrations was significant on rooting specially on the number of roots and root length.Furthermore, results of rooting experiment revealed that the highest rooting percentage (95%), the maximum number of roots (4.5 per plantlet) and the longest roots (3.5 cm) were produced in the medium containing 0.2 mg/l of IBA. Finally, the rooted plantlets were adapted (90%) in vivo condition by placing them on a mixture of cocopeat and perlite (2:1) substrate.

Conclusion: In this study callugensis, regeneration and rooting of *A.scherzerianum's* petiole and leaf explants were studied and different levels of plant growth regulators used for callugensis and regeneration. In this study petiole explants showed the highest callugenesis and regeneration. MS medium containing BA (2 mg/l) and 2, 4-D (0.5 mg/l), was the best for callugenesis. Also the highest percentage of regeneration was

1, 2 and 3- Msc Garaduated Student, Professor and Associate Professor of Agricultural Biotechnology, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad
(*- Corresponding Author Email:bagheriyazd@gmail.com)
4- Faculty of Ornamental Plant Biotechnology, ACECR, Mashhad Branch

observed in medium containing BA (0.75 mg/l) and 2, 4-D (0.05 mg/l). Moreover low concentration (0.2 mg/l) of auxin has a better effect on rooting than high levels (1mg/l) so that the highest rooting percentage was produced in medium containing IBA (0.2 mg/l) and the lowest rooting percentage was produced in medium containing IAA (1 mg/l). *Anthurium* plantlets acclimized is cocopeat and perlite substrate (2: 1) with 90% acclimation.

Keywords: Callus, Growth regulators, Regeneration, Rooting, Tissue culture