نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، ص. ۱۴۶-۱۳۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 25, No. 2, Summer 2011, P. 137-146
ISSN: 2008 - 4730

اثر تنظیم کننده‌های رشد بر ریزازدیادی دو رقم تجاری آنتوریوم *Anthurium andraeanum* در شرایط درون شیشه‌ای

مجتبی خرّمی راد[1*]- محمود شور[2]- یوسف حمید اوغلی[3]- علی تهرانی‌فر[4]- حسین نعمتی[5]- مصطفی صالحی فر[6]

تاریخ دریافت:۸۸/۱۱/۲۸
تاریخ پذیرش:۸۹/۸/۴

چکیده

در این مقاله، بهترین محیط کشت پینه زایی، باززایی و ریشه‌زایی گیاه آنتوریوم گزارش می‌شود. برای تولید کالوس، از ریز نمونه‌های برگ و دمبرگ رقم‌های Antadra و Casino، بر روی محیط‌کشت MS حاوی انواع تنظیم‌کننده‌های رشد (NAA، BA، Kin و IBA) استفاده شد. عامل های مورد مطالعه بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و با۳ تکرار آزمایش شدند. نتایج نشان داد که، رقم و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد به طور معنی داری، تولید کالوس را تحت تأثیر قرار دادند. بیشترین مقدار کالوس در محیط C5 (۳ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA)، در شرایط تاریکی تولید شد. بیشترین تعداد گیاهچه از کالوس، در محیط Re2 (۱ میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA)، در شرایط روشنایی بدست آمد. ۸ هفته پس از کشت در حدود ۲۲/۸۳ گیاهچه در هر سانتیمتر مربع از بافت کالوس مشاهده شد. بهترین محیط ریشه‌زاییRo2 (۰/۲ میلی-گرم در لیتر Kin، ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA) حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin بوده است، که تعداد ۱۱/۵ ریشه برای هر گیاهچه تولید نمود. رقم Antadra در تولید کالوس و شاخساره نسبت به رقم Casino برتر بوده است. اما در فرآیند ریشه‌زایی رقم Casino واکنش بهتری نشان داده است.

واژه‌های کلیدی: آنتوریوم، باززایی، ریشه‌زایی، کالوس، کشت بافت

مقدمه

آنتوریوم گیاهی از خانواده شیپوری (Araceae) است. گونه *A. andraeanum* بومی غرب کلمبیا است و در ارتفاع۹۰۰ تا ۱۶۵۰ متری از سطح دریا می‌روید، در این منطقه دما از ۱۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد تغییر می‌کند و این گیاه به صورت اپی‌فیت روی شاخه‌های درختان زندگی می‌کند. آنتوریوم‌ها با قلمه زدن و تقسیم بوته و بذر وکشت‌بافت زیاد می‌شوند. بواسطه اینکه برای تولید تجاری و صادراتی زمان و یکنواختی تولید اهمیت ویژه‌ای دارد، استفاده از روش‌های سنتی، وقت‌گیر و کم‌بازده بوده و گیاهان تولید شده نیز از یکنواختی لازم برخوردار نخواهند بود. از این رو استفاده از روش‌های کشت بافت گیاهی و یا ریزازدیادی آنتوریوم بهترین راه برای دستیابی به تعداد زیاد گیاه با ساختار ژنتیکی یکسان است، که کاهش هزینه-های تولید و امکان تولید مداوم و سریع را در پی خواهد داشت. در پژوهشی، مونتز و همکاران (۲۱) از الکل ۷۰ درصد و سپس هیپوکلریت سدیم (NaClO) برای گندزدایی ریزنمونه‌ها استفاده کردند، که بازدهی این روش گندزدایی بیش از ۹۰ درصد بود. تنگ (۲۹) در آزمایش‌های خود غلظت ۲ درصد ساکارز را در کشت درون شیشه‌ای آنتوریوم مناسب دانسته است. سریلاتاو همکاران (۲۷) نیز در سال ۱۹۹۸ محیط کشت MS با یک غلظت کاهش یافته را بر پینه-زایی آنتوریوم مورد آزمایش قرار دادند و مشخص شد که محیط MS با ۱/۴ غلظت مواد معدنی برای تکثیر و پرآوری بافت پینه کافی است. بررسی‌ها نشان می‌دهدکه در کشت درون شیشه‌ای آنتوریوم با توجه به اهدافی که در نظر بوده اغلب از اکسین‌های 2,4-D (۹، ۱۹و ۳۳)، NAA (۶، ۱۶ و ۳۵)، IAA (۲۸ و ۳۵)، IBA (۲۷) استفاده شده است. از سایتوکنین‌ها نیز اغلب از BA (۶، ۷، ۹، ۱۹، ۲۱، ۲۲، ۲۶، ۲۸، ۳۳ و ۳۵)، Kin (۱۲و ۲۸)، 2ip (۱۲ و ۱۶)، زآتین (۶) استفاده

۱،۲،۴و۵- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، دانشیار و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: Khorrami_Raad@yahoo.com)
۳- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان
۶- کارشناس ارشد زراعت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور

شده است. زنس و زیمر (۳۵) در گزارش خود نقش ژنوتیپ گیاه آنتوریوم را درپینه‌زایی متذکر شده‌اند. سریلاتا و همکاران (۲۷) گزارش نمودند که تشکیل پینه در قسمت‌های پایینی برگ از قسمت‌های بالایی بهتر بوده است. فوجا و همکاران (۸) در گزارشی برتری ریزنمونه‌های اسپادیکس بر ریزنمونه‌های برگ را در پینه‌زایی و باززایی متذکر شده‌اند. در پژوهش دیگر، گیر (۹) ریزنمونه‌های برگ را، دارای قابلیت پینه‌زایی و باززایی بالاتر وثبات ژنتیکی بیشتری در مقایسه با ریزنمونه‌های اسپادیکس دانسته است. گیر (۹) در آزمایشات خود مدت زمان مورد نیاز برای تشکیل بافت پینه در ریزنمونه‌های کشت شده را به طور متوسط ۴ هفته گزارش کرده است، اما در پژوهشی دیگر که توسط چااون (۶) انجام شد زمان مورد نیاز برای پینه‌زایی در حدود ۲ ماه برآورد شده است. بعد از اینکه طول شاخساره‌های باززایی شده به ۲ تا ۳ سانتی‌متر رسید، جهت رشد و ریشه‌زایی بهتر، در شرایط استریل، شاخساره‌ها از ریزنمونه جدا و سپس به محیط ریشه‌زایی انتقال یافتند. ریشه‌زایی این شاخساره‌ها حدود ۳ تا ۵ هفته بعد از انتقال صورت گرفت (۹و ۳۳). محققین دیگری گزارش کردند که، محیط خاصی برای ریشه‌زایی مورد نیاز نمی‌باشد، چرا که شاخه‌ها به طور خود به خود در محیط شاخه‌زایی، ریشه می‌دهند (۲۷). در پژوهشی دیگر که توسط مالهترا و همکاران (۱۹) انجام شد مشخص گردید که افزودن ذغال فعال به محیط کشت، بهبود قابل ملاحظه‌ای در درصد ریشه‌دهی شاخساره‌های باززایی شده ایجاد می‌کند. برگ‌های جوان (که حداکثر ۲۵ سانتی‌متر طول دارند) در مقایسه با برگ‌های مسن‌تر قابلیت پینه‌زایی و باززایی بیشتری دارند (۹). معمولاً در کشت درون‌شیشه‌ای، طول روز بین ۱۴ تا ۱۶ ساعت در نظر گرفته می‌شود. برای تامین نور نیز در اغلب موارد از لامپ‌های فلورسنت استفاده می‌شود. در موردکشت بافت آنتوریوم استفاده از نور لامپ فلورسنت سفید در تیمار نوری ۱۶ ساعت روشنایی به همراه ۸ ساعت تاریکی در طول مراحل پینه‌زایی و باززایی مورد استفاده بوده است (۱۳و ۱۴). البته گزارش‌هایی مبنی بر استفاده از تیمار تاریکی کامل در مرحله پینه‌زایی وجود دارد (۹ و ۲۷). استفاده از مخلوط پرلایت و پیت ماس برای استقرار گیاهچه‌ها در شرایط برون‌شیشه‌ای موفقیت‌آمیز گزارش شده و بازدهی انتقال بیش از ۹۰ درصد بود (۳۳).

با توجه به محدودیت تکثیر از طریق روش‌های سنتی و اهمیت گیاه آنتوریوم به عنوان یک گل زینتی، در این پژوهش سعی براین است تا پینه‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ گیاه آنتوریوم آندرانوم در شرایط درون‌شیشه‌ای مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد. همچنین تعیین بهترین محیط کشت پینه‌زایی، باززایی، ریشه‌زایی و تعیین سطوح مطلوب تنظیم‌کننده‌های رشد نیز می‌تواند گامی موثری در جهت تولید انبوه این گیاه از طریق سیستم کشت-بافت باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از دو رقم تجاری آنتوریوم با نام‌های *Anthurium Andraeanum Casino* با اسپات نارنجی و *Andraeanum A. Antadra* با اسپات صورتی استفاده شده است. گلدان‌ها در فضایی نسبتاً مرطوب و با نورکم برای تولید برگ‌های تازه قرار گرفتند.

در این آزمایش از برگ و دمبرگ بعنوان ریزنمونه استفاده شد. محیط رشد MS به عنوان محیط پایه مورد استفاده قرار گرفت. جهت گندزدایی، قطعات برش داده شده درون آب حاوی چند قطره مایع ظرفشویی غوطه‌ور گردیدند و پس از آن در زیر جریان آرام آب شهری به آرامی شسته شدند. در مرحله بعد نمونه‌های مورد نظر ابتدا با الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت ۳۰ تا ۴۰ ثانیه غوطه ور شد و سپس جهت خشک شدن روی کاغذ صافی گندزدایی شده قرار داده شد. پس از آن از وایتکس محتوی ۵/۲۵ درصد هیپوکلریت سدیم، با غلظت و زمان‌های مختلف به همراه ۲ تا ۳ قطره توین ۲۰ استفاده شد. تیمارهای ضدعفونی و مورد استفاده در این آزمایش شامل: S1 (۱/۲۵درصد، ۲۵ دقیقه)، S2 (۱درصد، ۲۵ دقیقه)، S3 (۱/۲۵درصد، ۲۰ دقیقه)، S4 (۰/۵ درصد، ۲۰ دقیقه)، S5 (۰/۵درصد، ۱۵ دقیقه) S6 (۰/۵ درصد، ۱۰ دقیقه)، S7 (۰/۵درصد، ۵ دقیقه)، S8 (۰/۲۵ درصد، ۱۰ دقیقه) می باشد. در پایان مدت گندزدایی، ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل شده در ۳ مرحله به مدت ۲ ، ۵ ، ۱۰ دقیقه آبکشی شدند. این آزمایش در ۱۰ تکرار و در محیط پایه MS صورت گرفت دمبرگ‌ها در قطعات ۱/۵ سانتیمتر جدا شد. در همه تیمارها، برش‌های عرضی و طولی از دمبرگ کشت شد. برگ در قطعات ۲ سانتیمتر مربعی (حاوی رگبرگ میانی) تهیه و به تعداد دو عدد در هر پتری دیش کشت گردید. در این آزمایش برای پینه‌زایی از دو رقم (v1= Casino, v2= Antadra) در محیط‌های کشت m1=MS + 0.5 BA mg/l + 0.01 mg/l NAA), m3=MS + 1 BA mg/l + 0.5 mg/l NAA, m2=MS + 0.5 BA mg/l + 0.1 mg/l NAA, m4=MS - + 2 BA mg/l + 0.01 mg/l NAA, m5=MS + 3 BA mg/l 0.5 mg/l NAA, m6=MS + 2 BA mg/l + 1 2 BA mg/l + 2 mg/l NAA, m7=MS + 2 BA mg/l + 0.1 mg/l NAA mg/l NAA) m8=MS + 2 BA mg/l + 0.1 mg/l NAA استفاده شد. با بررسی مداوم و منظم کشت‌ها، اثر محیط کشت بر پینه‌زایی، اثر رقم بر پینه‌زایی و اثر متقابل محیط‌کشت و رقم بر پینه-زایی، با اندازه‌گیری صفات روز شروع پینه‌زایی و وزن پینه مورد ارزیابی قرار گرفت. در بررسی پینه‌زایی ریزنمونه‌ها از ۸ تیمار و ۳ تکرار در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی استفاده شد در این مرحله، دوبار واکشت (هر ۲۰ روز یکبار) صورت گرفت. پس از تولید پینه کافی بر روی ریزنمونه‌های برگ (۶ تا ۸ هفته پس از کشت ریزنمونه برگ) جهت القای باززایی در پینه‌های تولید شده از محیط پایه MS به همراه هورمون‌های BA، Kin، NAA، 2,4 -D

استفاده شد. در طی این مرحله اثر محیط کشت بر باززایی و اثر رقم بر باززایی و همچنین اثر متقابل محیط کشت و رقم بر باززایی با بررسی صفات روز شروع باززایی و تعداد گیاهچه‌های باززایی شده، مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش با ۹ تیمار و ۳ تکرار در قالب فاکتوریل با پایه طرح کاملا تصادفی صورت پذیرفت. درآزمایش ریشه‌زایی مواد گیاهی لازم، از ریزنمونه‌های رشد کرده در مرحله پرآوری تهیه شد. در این آزمایش اثر محیط کشت بر ریشه‌زایی، اثر رقم بر ریشه‌زایی و اثر متقابل محیط کشت و رقم بر ریشه‌زایی گیاهچه‌های تولید شده با بررسی صفات تعداد ریشه‌های تولید شده و طول ریشه مورد ارزیابی قرار گرفت. این مطالعه در۶ تیمار با غلظت‌های Ro1=MS + 0.2 mg/l Kin + 0.02 mg/l IBA, Ro2=MS + 0.2 mg/l Kin + 1 mg/l IBA, Ro3=MS + 0.2 mg/l Kin + 0.1 mg/l Kin + 2 mg/l IBA, Ro4=MS + 0.2 mg/l Kin + 0.25 mg/l NAA mg/l NAA, Ro5=MS + 0.2 mg/l Kin + 0.05 mg/l NAA و ۳ تکرار، انجام شد. گیاهچه‌های تولید شده، پس از ریشه دار شدن به منظور سازگاری با محیط برون‌شیشه‌ای به گلدان منتقل شدند. جهت سازگار شدن تدریجی گیاهچه‌ها به شرایط بیرون، ۲۴ ساعت بعد از انتقال آنها، با شعله کبریت سوراخ‌هایی در ته لیوان شفاف پلاستیکی ایجادشد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون توکی صورت گرفت.

نتایج و بحث

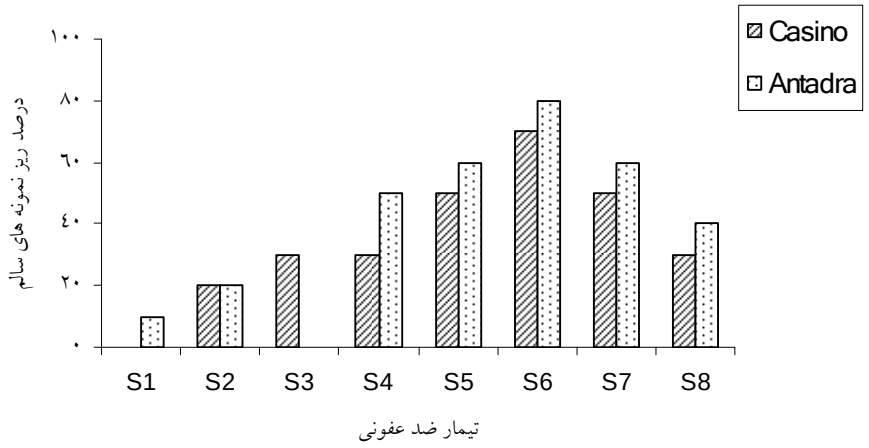
گندزدایی

در مرحله انتخاب نمونه‌ها جهت گندزدایی، مشاهده گردید که بافت و اندام‌های جوان‌تر گیاه نسبت به بافت‌های مسن، بهتر گندزدایی شدند.کمترین میزان آلودگی، در هر دو رقم Casino و Antadra در تیمار S_1 مشاهده شد (شکل۱). اما با توجه به غلظت بالای ماده گندزدا و زمان بالای ضدعفونی، بقاء ریز نمونه های سالم، در رقم Casino به میزان ۱۰۰ درصد و در رقم Antadra به میزان ۹۰ درصد کاهش یافت. در تیمار S_7 و تیمار S_8 ، نمونه‌ها از بین نرفتند ولی با توجه به کم بودن غلظت ماده گندزدا و زمان ضدعفونی، میزان آلودگی در رقم Casino در تیمار S_7 تا ۵۰ درصد و در تیمار S_8 تا ۷۰ درصد افزایش یافت. همچنین در رقم Antadra میزان آلودگی در تیمار S_7 تا ۴۰ درصد و در تیمار S_8 تا ۶۰ درصد افزایش یافت. از بین تیمارهای بکار رفته، تیمار ۱ درصد وایتکس بامدت ۱۰ دقیقه با ۷۰ درصد نمونه‌های سالم، در رقم Casino و ۸۰ درصد نمونه‌های سالم، در رقم Antadra ، بدون داشتن نمونه‌های از بین‌رفته، از سایر تیمارها بهتر بودند. پوچوآو سوکون (۲۵) جدا کشت‌هایی را که از برگ‌های جوان باز شده انتخاب شده بود را با خیساندن در محلول بنومیل ۶ درصد برای ۳۰ دقیقه پیش‌استریل کردند، در مرحله بعد برگ‌ها در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه غوطه ور شده و سپس در هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و برگ‌ها ۳ مرتبه با آب مقطر استریل به مدت ۱۵ دقیقه و در مرحله آخر به مدت ۳۰ دقیقه آبکشی شدند، این گزارشات، با نتایج بدست آمده در این تحقیق مطابقت داشت.

پینه‌زایی

به نظر می‌رسد علت قهوه‌ای شدن ناحیه‌های برش، در ریزنمونه-های دمبرگ، اکسید شدن مایع چسبنده و لزجی بود، که بلافاصله پس از برش دادن ریزنمونه‌های دمبرگ در اطراف محل برش تجمع پیدا می‌کردند. این مواد جزو مواد فنولی هستند که در حضور اکسیژن، اکسید شده و به رنگ قهوه‌ای ظاهر می‌شوند. تنها مورد مربوط به پینه‌زایی ریزنمونه‌های دمبرگ در رقم Casino در محیط C_2 پینه-زایی (۰/۵ BA، ۰/۱ NAA) با ۰/۳۴ گرم پینه و پس از ۵۲ روز از روز شروع پینه‌زایی صورت گرفت. پینه‌های تولید شده از دمبرگ در مرحله باززایی مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از ۲۰ روز از شروع کشت پینه در محیط باززایی Re_3(1BA ، ۰/۰۲ NAA) کالوس‌ها، قهوه‌ای شده و هیچ گونه باززایی صورت نگرفت. این نتیجه با نتایج کوهنل و همکاران (۱۷) مبنی بر برتری ریزنمونه‌های دمبرگ بر ریزنمونه‌های برگ در پینه‌زایی و باززایی مغایرت داشت. در گزارش جیو و همکاران (۱۱)، دمبرگ‌ها بیشترین میزان پینه‌زایی را با (۸۶/۷ درصد) نسبت به ریز نمونه‌های دیگر داشتند. اما در گزارشی، پینه‌های تولید شده ناشی از ریز نمونه‌های برگی، خیلی بیشتر از ریز نمونه‌های دمبرگ بود (۳۴). دلیل این مسئله شاید عکس العمل متفاوت دمبرگ ارقام مختلف آنتوریوم بر روی محیط‌های کشت پینه‌زایی و باززایی باشد.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر محیط‌های کشت مختلف روی وزن پینه تولید شده اختلاف معنی‌داری نشان داد (جدول ۱). با توجه به مقایسه میانگین حاصل از آزمون توکی (شکل ۲) (۰/۰۱ = α) بیشترین وزن پینه در محیط کشت C_5 (۳ میلی‌گرم بر لیتر BA، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA) با تولید میانگین ۰/۷۴ گرم به دست آمد. بین محیط‌های C_3، C_4 و C_5 به ترتیب با تولید ۰/۴، ۰/۶۳، ۰/۷۴ گرم پینه اختلاف معنی‌داری بدست آمد. با توجه به ثابت بودن میزان هورمون NAA در این ۳ محیط و افزایش هورمون BA از محیط C_3 به محیط C_5 این موضوع قابل توجه است که افزایش نسبی هورمون BA از ۱ میلی‌گرم در لیتر در محیط C_3 به ۳ میلی‌گرم در لیتر در محیط C_5 سبب افزایش پینه‌زایی می‌شود. این نتایج با گزارشات ترزا و همکاران (۳۰) مطابقت داشت.



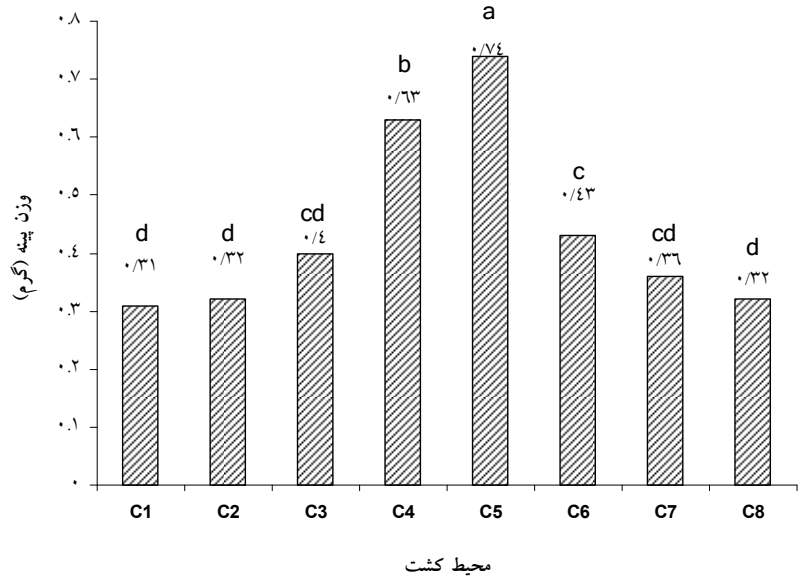
شکل۱- واکنش ریزنمونه‌های برگی رقم Casino و Antadra به تیمارهای مختلف گندزدایی سطحی

وارگاس و همکاران (۳۱) محیط بهینه برای پینه‌زایی را، محیط MS حاوی ۴/۴ میکرومول BA و ۰/۰۵ میکرومول NAA، معرفی کردند. همچنین نتایج نشان می‌دهد که نسبت بالای یک سیتوکنین مثل BA با غلظت‌های پایین یک اکسین مثل NAA می‌تواند بهترین نتیجه را در پینه‌زایی برگ‌های آنتوریوم داشته باشد. وجود یک اکسین مانند 2,4-D (۷)، NAA (۶)، IBA (۳۲) و یاIAA (۲۷) برای تحریک پینه‌زایی در ریز نمونه‌های برگ ضروری به نظر می‌رسد. در این آزمایش از اکسین NAA استفاده شد. زیرا بر اساس منابع موجود به نظر می‌رسد که برهمکنش NAA و BA اثر بهتری بر پینه زایی داشته است. البته لازم به ذکر است که شدت این بر همکنش متاثر از نسبت هورمون‌های مذکور است، چنانکه در مورد محیط کشت‌های بکار رفته در این پژوهش که حاوی هر دو نوع هورمون بودند چنین تفاوتی مشاهده شد. اثر متقابل رقم و محیط‌های کشت نیز، بر روز شروع پینه‌زایی اختلاف معنی‌داری نشان داد (جدول۱). در مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی با سطح اطمینان ۹۵ درصد، تیمار V2m5 (محیط پینه‌زایی ۵ و رقم ۲) با میانگین تولید ۳۵ روز (کمترین تعداد روز پینه‌زایی) بهترین نتیجه را داشت و تیمار V1m1 با میانگین ۵۲ روز (بیشترین تعداد روز پینه-زایی) در پایین ترین سطح قرار گرفت (شکل ۳). محیط کشت C5 ، سبب کاهش روز شروع پینه‌زایی در هر دو رقم Antadra و Casino شد. نتایج نشان داد که افزایش غلظت دو هورمون BA و NAA، در محیط C5، سبب افزایش میزان تولید پینه وسرعت تولید پینه شده است. همچنین مشاهده شد که تأثیر این محیط کشت در رقم Antadra بیشتر بوده است. این نتایج نشان می‌دهد که رقم Antadra به این محیط کشت واکنش بهتری نشان داد و روز شروع پینه‌زایی کاهش یافت. به نظر می‌رسد این تفاوت ناشی از تفاوت ژنتیکی موجود در بین ارقام مورد مطالعه بوده است، که این با نتایج پیریک (۲۴) مبنی بر تأثیر ژنوتیپ بر پینه‌زایی ارقام آنتوریوم مطابقت دارد. طبق آزمایشات نات و همکاران (۲۳)، که بر روی ۱۰ رقم آنتوریوم انجام شده بود، در دو رقم Midori و Safari تشکیل پینه پس از ۳۰ روز از کشت با ۱۸/۲ و ۱۲/۵ درصد به ترتیب مشاهده شد. در نتیجه این دو رقم از سرعت شروع پینه‌زایی بالاتری برخوردار بودند.

جدول۱- تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده برای پینه‌زایی

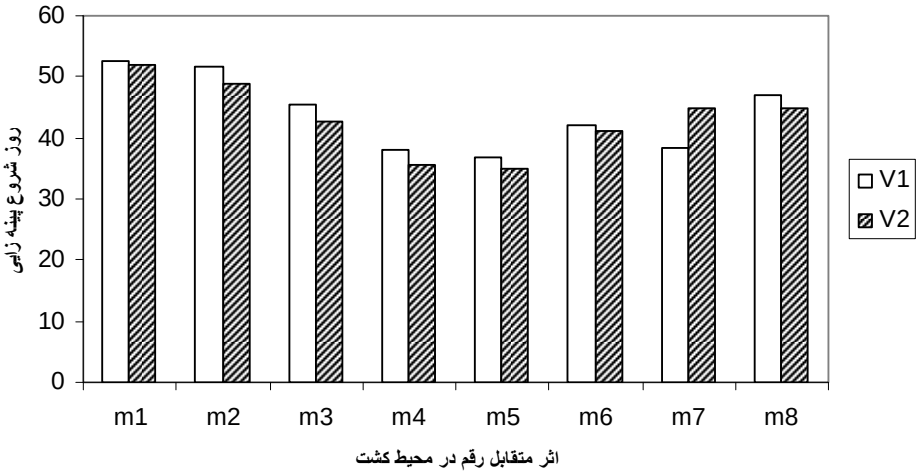
منبع تغییرات	درجه آزادی	وزن پینه	روز شروع پینه‌زایی
واریته	۱	۰/۰۰۷۵^{ns}	۷/۵۲^{ns}
محیط کشت	۷	۰/۱۵۲**	۲۰۷/۲۳**
واریته × محیط کشت	۷	۰/۰۰۰۹۸^{ns}	۱۴/۴۲*
خطا	۳۲	۰/۰۰۳۲	۵/۵۸
CV%	–	۱۲/۸۲	۵/۴۲

ns :عدم اختلاف معنی‌دار، * و **: معنی‌دار و خیلی معنی‌دار، به ترتیب با سطح اطمینان ۹۵ و ۹۹ درصد



شکل۲ - مقایسه میانگین اثر محیط کشت بر وزن پینه

C1=MS + 0.5 BA mg/l + 0.01 mg/l NAA C2=MS + 0.5 BA mg/l + 0.1 mg/l NAA
C3=MS + 1 BA mg/l + 0.5 mg/l NAA C4=MS + 2 BA mg/l + 0.01 mg/l NAA
C5=MS + 3 BA mg/l 0.5 mg/l NAA C6=MS + 2 BA mg/l + 2 mg/l NAA
C7=MS + 2 BA mg/l + 1 mg/l NAA C8=MS + 2 BA mg/l + 0.1 mg/l NAA



شکل ۳ - مقایسه میانگین [ترکیبات هورمونی(رقم در محیط)] بر روز شروع پینه‌زایی

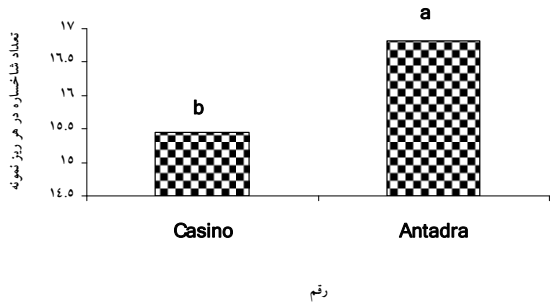
باززایی

براساس تجزیه واریانس، اثر رقم بر تعداد شاخساره، اختلاف معنی‌داری نشان داد (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین با آزمون توکی نشان داد که رقم Antadra بطور میانگین منجر به تولید ۱۶/۸۱ عدد شاخساره در هر ریزنمونه گردیده است (شکل ۴)، در حالیکه رقم Casino بطور میانگین ۱۵/۴۴ شاخساره تولید نموده است. این نتایج نشان می‌دهد که در محیط باززایی، رقم Antadra قابلیت تولید تعداد شاخساره بیشتری نسبت به رقم Casino دارد و این موضوع را می‌توان به تفاوت ژنتیکی این دو رقم در تولید شاخساره نسبت داد. تفاوت در واکنش ارقام مختلف، به محیط‌های باززایی، می‌تواند ناشی ازتفاوت در میزان درون‌زای این هورمون‌ها، در ارقام مختلف باشد. در یک محیط ثابت، دو رقم Tinorared و Senator پس از گذشت ۶۰ روز از شروع کشت، به ترتیب ۱۲/۲ و ۵/۴ شاخساره در هر ریز نمونه، تولید کردند. این گزارش با نتایج بدست آمده در این تحقیق، مطابقت

دارد. مریستموئید شاخساره بر روی ریز نمونه (پینه)، توسعه پیدا می‌کند. تعداد مریستموئیدها در رقم Tinorared (۳ تا ۶) نسبت به رقم Senator (۱ تا۴)، فراوان‌تر بودند (۲۰).

جدول۲ – میانگین مربعات صفات اندازه گیری شده برای باززایی

منبع تغییرات	درجه آزادی	روز شروع باززایی	تعداد شاخساره
واریته	۱	۱۳۱۰/۲۹**	۲۵/۳۵**
محیط کشت	۸	۲۵۶/۸۷**	۵۳/۹۴**
واریته × محیط کشت	۸	۲۹/۳۳**	۱/۲۲ ^{ns}
خطا	۳۶	۵/۲۵	۱/۰۹
CV%	–	۳/۸۰	۶/۴۸

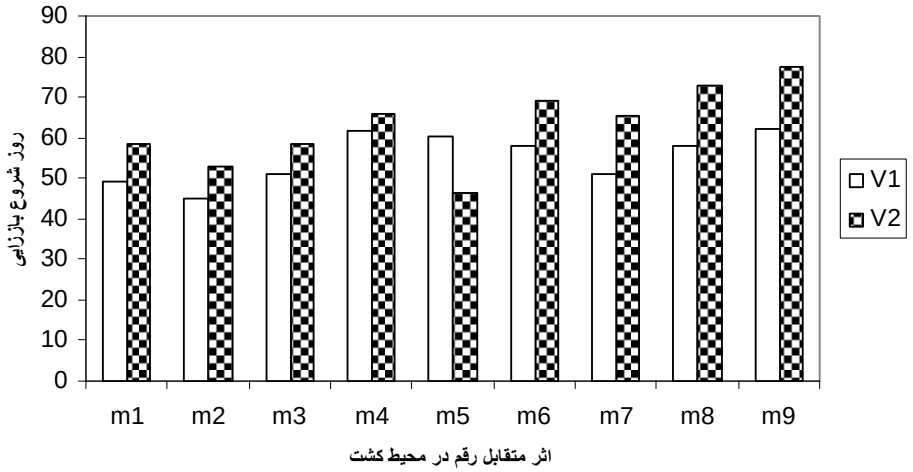


شکل ٤ – مقایسه میانگین اثر رقم بر تعداد شاخساره

با توجه به نتایج تجزیه واریانس اثر محیط کشت روی تعداد شاخساره معنی‌دار بوده است (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین به روش توکی، اختلاف معنی‌داری نشان داد (شکل ۶). محیط کشت Re2 با تولید میانگین ۲۲/۸۳ شاخساره در هر ریزنمونه بیشترین مقدار تولید شاخساره را داشته و محیط کشت Re9 با تولید میانگین ۱۳/۳۳ شاخساره کمترین میزان شاخساره تولیدی را داشته است. نتایج نشان می‌دهد که نسبت مناسب غلظت هورمون‌های BA و NAA در محیط کشت Re2 (۱ BA، ۰/۱ NAA) سبب بروز بیشترین میانگین تعداد شاخساره شده است، با توجه به ثابت بودن غلظت BA در ۵ محیط Re1، Re2، Re3، Re4 و Re5، تفاوت غلظت هورمون NAA در این ۵ محیط، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که، محیط کشت Re2 بهترین نسبت ازنسبت‌های بکاررفته در این آزمایش را برای این دو هورمون، برای تولید بالاترین میانگین تعداد شاخساره دارا می‌باشد. مقایسه محیط‌های حاوی BA با محیط های حاوی Kin این موضوع را نشان می‌دهد که ترکیب BA با NAA با توجه به میانگین‌های تعداد شاخساره نتیجه بهتری نسبت به محیط‌های حاوی ترکیب NAA و Kin داشت. محیط Re2 نسبت به محیط‌های Re1 و Re3 که به ترتیب غلظت‌های NAA پایین‌تر و بالاتر از محیط Re2 دارند، نتیجه بهتری نشان داد. این نتایج نشان داد که محیط Re2 بهترین نسبت از غلظت‌های این دو هورمون را برای باززایی دارد. این نتایج با گزارشات وارگاس و همکاران (۳۱) مطابقت داشت. اثرات متقابل رقم و محیط کشت بر روز شروع باززایی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). در مقایسه میانگین به روش توکی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. نتایج نشان داد که تیمار V1m2 با میانگین روز، ۴۵ دارای کمترین روز برای شروع باززایی بود و تیمار V2m9 با میانگین روز ۷۷/۶۶ روز، بعنوان بیشترین روز، برای شروع باززایی بود (شکل ۵). در محیط Re2 هورمون‌های BA و NAA به ترتیب با غلظت‌های ۱ و ۰/۰۱ بهترین محیط با کمترین روز برای روز شروع باززایی در هر دو رقم Casino و Antadra بود. این نتایج نشان می‌دهد که محیط Re2 با نسبت هورمون ذکر شده محیط مناسبی در جهت کم کردن تعداد روزها برای رسیدن به باززایی مناسب است و تفاوت معنی‌دار دو تیمار V1m2 و V2m2 می‌تواند مربوط به تفاوت ژنتیکی دو رقم در پاسخ به محیط Re2 باشد. رقم Casino با میانگین روز ۴۵، در محیط Re2، از سرعت باززایی بیشتری، نسبت به رقم Antadra، با میانگین روز، ۵۳ در همین محیط برخوردار است. رقم Antadra که پینه‌زایی سریع تری در مقایسه با رقم Casinoداشته است، از سرعت باززایی کمتری برخوردار بوده است. بنابراین به نظر می‌رسد نوعی همبستگی منفی بین این دو رقم درمورد سرعت پینه‌زایی و باززایی وجود داشته باشد. این نتایج با گزارشات نات و همکاران (۲۳) و مارتین و همکاران (۲۰) مطابقت دارد.

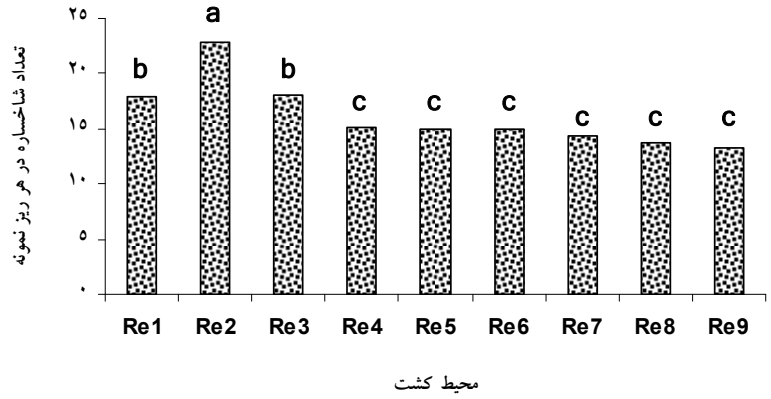
ریشه‌زایی

نتایج بدست آمده ازآزمایش ریشه‌زایی نشان داد که رقم، به طور معنی‌داری (در سطح احتمال ۱ درصد) روی تعداد ریشه تولید شده اثر دارد (جدول ۳). با مقایسه میانگین تیمارها به روش توکی، رقم Casino با تولید میانگین ۷/۶۶ دارای بیشترین ریشه در گیاهچه و رقم Antadra با تولید ۳/۷۶ ریشه دارای کمترین تعداد ریشه تولیدی در هر گیاهچه بوده است (شکل ۷). تفاوت در میانگین تعداد ریشه در دو رقم می‌تواند به دلیل تفاوت در ژنوتیپ گیاه در واکنش به محیط-های کشت مختلف ریشه‌زایی باشد. تا حدودی این اختلاف می‌تواند ناشی از تفاوت در میزان درونزای هورمون‌های مختلف باشد. اثر رقم روی طول ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). رقم Casino با میانگین ۷/۳ سانتی‌متر نسبت به رقم Antadra با میانگین ۶/۱ سانتی‌متر طول ریشه بیشتری را ایجاد کرده است. تفاوت مشاهده شده در طول ریشه در رقم‌های مختلف آنتوریوم می-تواند ناشی از واکنش متفاوت رقم‌های مختلف به محیط‌های کشت ریشه‌زایی باشد. هر رقم از لحاظ ساختار ژنتیکی، می‌تواند دارای طول ریشه متفاوت از ارقام دیگر باشد (شکل ۸). این نتایج با گزارشات نات و همکاران مطابقت دارد (۲۳).



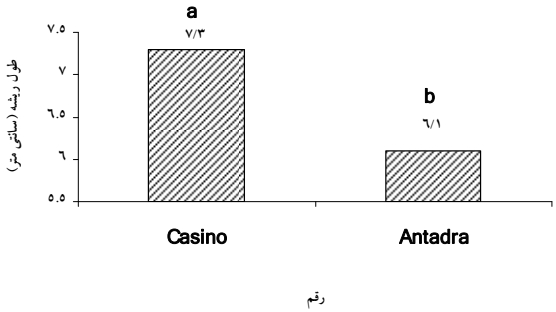
شکل ۵ - مقایسه میانگین ترکیب تیماری رقم و محیط کشت بر روز شروع باززایی

Re1=MS + 1mg/l BA + 0.005 mg/l NAA
Re2=MS + 1mg/l BA + 0.01 mg/l NAA
Re3=MS + 1mg/l BA + 0.02 mg/l NAA
Re4=MS + 1mg/l BA + 0.05 mg/l 2, 4-D
Re5=MS + 1mg/l BA + 0.1 mg/l 2, 4-D
Re6=MS + 1mg/l Kin + 0.01 mg/l NAA
Re7=MS + 1mg/l Kin + 0.02 mg/l NAA
Re8=MS + 1mg/l Kin + 0.05 mg/l 2, 4-D
Re9=MS + 1mg/l Kin + 0. 1 mg/l 2, 4-D

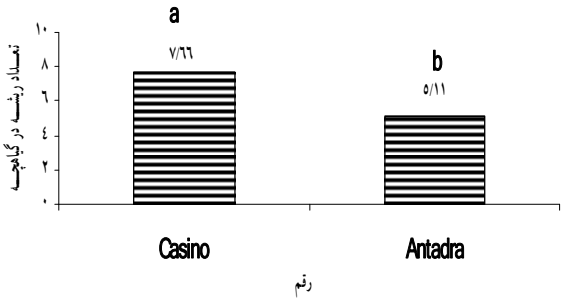


شکل ٦ - مقایسه میانگین اثر محیط کشت بر تعداد شاخساره

اثر محیط کشت بر تعداد ریشه تولید شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده است. در مقایسه میانگین تعداد ریشه، به روش توکی در سطح احتمال ۱ درصد محیط Ro2 با تولید میانگین ریشه ۱۱/۵ بیشترین تعداد ریشه و محیط Ro6 با تولید میانگین ریشه ۲/۱ کمترین تعداد ریشه را تولید کرده‌اند (شکل ۹). با توجه به ثابت بودن غلظت هورمون Kin در تمام محیط‌های کشت ریشه‌زایی (۰/۲ میلی-گرم در لیتر) و متغیر بودن غلظت هورمون‌های NAA و IBA می‌توان نتیجه گرفت که محیط Ro2 با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA می‌تواند محیط بهینه برای ریشه‌زایی باشد.



شکل ۷ - مقایسه میانگین اثر رقم بر تعداد ریشه

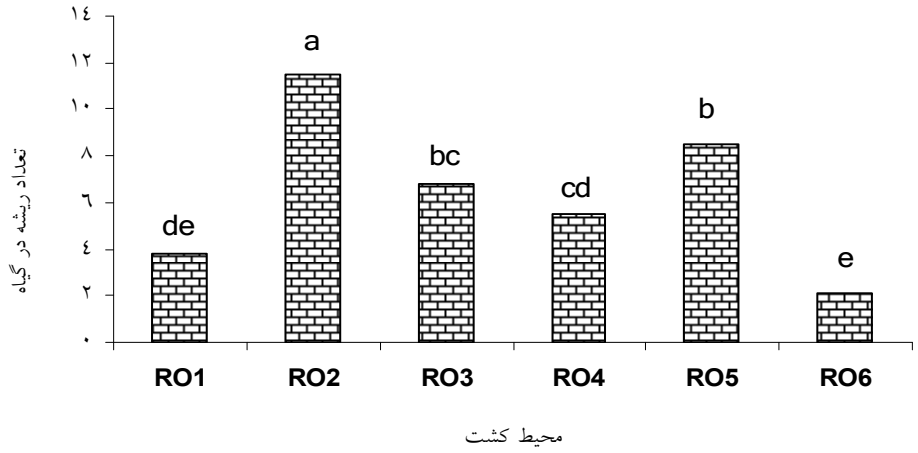


شکل ۸ - مقایسه میانگین اثر رقم بر طول ریشه

جدول۳ - تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده برای ریشه زایی

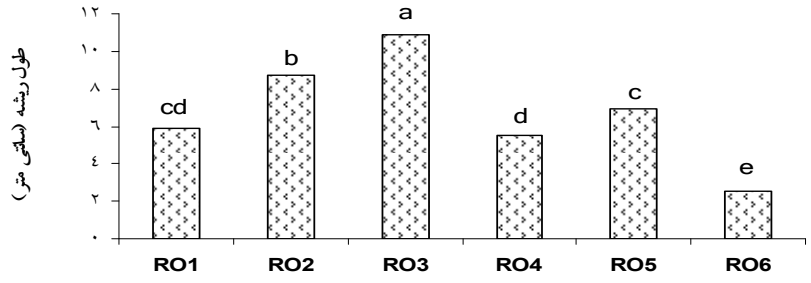
منبع تغییرات	درجه آزادی	تعداد ریشه	طول ریشه
واریته	۱	۵۸/۷۷**	۱۳/۰۸**
محیط کشت	۵	۶۷/۱۱**	۴۸/۷۷**
واریته × محیط کشت	۵	۳/۱۱ ^{ns}	۰/۲۱ ^{ns}
خطا	۲۴	۱/۴۴	۰/۳۳
CV%	-	۱۸/۸۱	۸/۵۰

زیرا از غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر IBA به ترتیب در محیط‌های RO1 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و RO3 (۲ میلی‌گرم در لیتر)، تعداد ریشه کمتری نسبت به محیط Ro2 بدست آمد. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که ترکیب هورمون‌های Kin و IBA نتیجه بهتری در تولید ریشه (میانگین تعداد ریشه بالاتر) نسبت به ترکیب هورمون‌های Kin و NAA نشان داد. در تیمار RO5 با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin بهترین نتیجه را نسبت به غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر (به ترتیب RO4 و RO6) هورمون NAA در ترکیب با Kin مشاهده شد. اکسین‌ها اثر تحریک‌کنندگی روی ریشه‌زایی دارند و نسبت اکسین به سیتوکینین محیط کشت در تقابل با میزان درون‌زای این هورمون‌ها تعیین‌کننده تشکیل ریشه یا شاخساره هستند و نسبت زیاد اکسین به سیتوکسین منجر به تولید ریشه و نسبت کم آن منجر به تولید شاخساره خواهد شد. این نتایج با گزارشات چن و همکاران (۷) که با غلظت ۰/۵۴ میکرومول در لیتر NAA و ۰/۹۳ میکرومول در لیتر Kin به ریشه‌زایی بهینه رسیده بودند، مغایرت داشت. درپژوهشی دیگر توسط عطا و همکاران (۴) ریشه‌زایی گیاهچه‌های آنتوریوم در محیط کشتی که حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود با ۶۴ درصد موفقیت انجام شد. در تحقیقی که توسط جهان و همکاران (۱۵)، انجام شد، بهترین گسترش ریشه در محیط نیمه مقاوم MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. در مطالعه دیگر، مشاهده شد که در محیط حاوی NAA، ۷۶ درصد از گیاهچه ها ریشه‌دار شدند، در حالی که در محیط حاوی IBA، ۹۰ درصد از گیاهچه‌ها ریشه‌دار شدند (۳).



شکل ۹ - مقایسه میانگین اثر محیط کشت بر تعداد ریشه

Ro1=MS + 0.2 mg/l Kin + 0.02 mg/l IBA
Ro2=MS + 0.2 mg/l Kin + 1 mg/l IBA
Ro3=MS + 0.2 mg/l Kin + 2 mg/l IBA
Ro4=MS + 0.2 mg/l Kin + 0.1 mg/l NAA
Ro5=MS + 0.2 mg/l Kin + 0.25 mg/l NAA
Ro6=MS + 0.2 mg/l Kin + 0.05 mg/l NAA



شکل ۱۰ - مقایسه میانگین اثر محیط کشت بر طول ریشه

اثر محیط‌های کشت مختلف روی طول ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). محیط کشت Ro3 با میانگین ۱۰/۹ سانتی‌متر بیشترین تأثیر را بر طول ریشه داشت، ولی محیط کشت Ro6 با میانگین ۲/۵ سانتی‌متر کمترین طول ریشه را ایجاد نمود (شکل۱۰). اکسین‌ها در طویل‌شدن سلول‌ها بسیار مؤثرند و معمولاً اگر عامل محدودکننده دیگری نباشد با افزایش غلظت، طول ریشه نیز افزایش می‌یابد (۲). در این آزمایش محیط کشت Ro3 که از غلظت بالاتری از اکسین IBA برخوردار بود نسبت به محیط Ro1 و Ro2، ریشه‌های طویل‌تری تولید کرد. در ترکیب هورمون Kin با NAA، بهترین نتیجه در محیط Ro5 در تولید ریشه طویل‌تر، مشاهده شد. چنین به نظر می‌رسدکه این نسبت از دو هورمون شرایط بهینه را برای طویل شدن ریشه فراهم می‌کند. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که، ترکیب دو هورمون IBA و Kin واکنش بهتری در افزایش طول ریشه، نسبت به ترکیب دو هورمون NAA و Kin نشان داد. با توجه به نتایج بدست آمده توسط بی‌جوی و همکاران (۵)، هورمون NAA در محیط $\frac{1}{2}$ MS، برای ریشه‌زایی و همچنین ادامه رشد شاخساره مناسب بوده و حدود ۹۸ درصد از شاخساره در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در مدت ۶ هفته ریشه‌دار شدند و در امر ریشه‌زایی دو اکسین IAA و IBA کمتر اثر داشته و در پاسخ‌های ریشه‌زایی به ترتیب ۷۵ و ۶۵ درصد موثر بودند. این گزارش با نتایج بدست آمده در این تحقیق مغایرت دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به زیبایی، تنوع و طول عمر زیاد گل‌های شاخه بریده آنتوریوم، تقاضای آن در سال‌های اخیر رو به افزایش است. ازدیاد این گیاه از طریق تقسیم بوته و قلمه به دلیل تولید محدود گیاه در مدت زمان طولانی و گسترش بیماری‌های ویروسی کمتر مورد توجه است. امروزه تولید تجاری آن در دنیا از روش کشت درون‌شیشه‌ای انجام می‌شود. لذا ضرورت تحقیق و توصیه روش مناسب جهت ریزافزایی و کشت بافت این گیاه درداخل کشور احساس می‌شود. در کشت بافت آنتوریوم ریزنمونه‌های برگ نسبت به ریزنمونه‌های دمبرگ نتیجه بهتری در پینه‌زایی نشان دادند. از میان تمام فاکتورهای مهم در کشت بافت، ژنوتیپ مهمترین نقش را در مراحل پینه‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی دارد. همچنین در مراحل مختلف کشت بافت استفاده ازمحیط کشت بهینه، سبب تسریع در فرآیند و دستیابی به نتیجه مطلوب می‌شود.

منابع

۱- خلیقی ا. ۱۳۶۴.گلکاری و پرورش گیاهان زینتی، انتشارات روزبهان. ۳۹۲ صفحه.

۲- کافی م.، لاهوتی م.، زند ا.، شریفی ع.ر. و گلدانی م. ۱۳۷۹. فیزیولوژی گیاهی. جلد اول (ترجمه). انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۱۵-۷.

3- Atak C., and Gelik O. 2009. Micro propagation of Anthurium andraeanum from leaf Explant. Pak. J. Bot. 41(3) 1155-1161.

4- Atta-Alla H., MC Alister B.G., and Van Staden j. 1998. In vitro cualture and establishment of Anthurium parvispathum south African journal of Botany, 64 : 296- 298.

5- Bejoy M., Sumitha V.R., and Anish N.P. 2008. Foliar Regeneration in Anthurium andraeanum Hort CV Agnihorti. Biotechnology 7(1): 134-138.

6- Chaon H. 1998. Micropropagation of anthurium and raeanum Lind. Bangokok (Thailand). Thsis (M.SC. in Agriculture).48 leaves.

7- Chen F., Kuehnle A.R ., and Suggi N.1997. Anthurium roots for micropropagation and Agrobacterium tumefaciens- mediated gene transfer. Plant Cell, Tissue and Organ Culture.49(1):71-74.

8- Foja S., Sangama S,. Prakash J., and Pierik R.L.M. 1991. micropropagation and plantconformity in Anthurium and raeanum. Current plant science and biotechnology in agriculture 12:201-204.
9- Geier T. 1986. Anthurium scherzerianum and tissue culture. Deatscher-Gartenbau. V. 40(43):2030-2033.
10- Geier T. 1987. Micropropagation of anthurium scherzerianumpropagation schems and plant conformity. Acta-Horticulture. 112(1):439-443.
11- Guo J.Z., and Cheng M.H. 2006. Callus Induction from different explant off Anthurium andraeanum and Bud Differentiation. Journal off North west forestry University .V. 3.
12- Hamidah M., Karim AGAS., and Debergh P. 1997. somatic embryogenesis and plant regeneration in Anthurium scherzeianum. Plant cell, tissue and organ culture.48(3):189-193.
13- Henny R., Fougerouze J., and Hamilton R.L. 1992. Flowering of Anthuraum following treatment with Gibberellac Acid. Hort Scicnce 27 (12): 1328.
14- Henny R.J., and Fooshee W.C. 1988. Response of Anthurium var. Lady jane liners to different and fertilizer levels. Proceedings of the florida state Horticultural society.101:304-305.
15- Jahan M.T., Islam M.R., Khan R., Mamun A.N.K., Ahmed G., Hakim H. 2009. In vitro clonal propagation of Anthurium (Anthurium andraeanum Lind) using callus culture. 19(1): 61-69.
16- Jaruwan A.R., and Boonyaen K. 1987. Factors influencing shoot diferentation from callus of Anthurium(Anthurium andraeanum L. cv. Dduang sarmon. Kasetsart Univ., Nakhon pathom(Thailand).3 rd annual conference on methodological techniques in biological science.12-13.
17- Kuehnle A.R., and Sugii N. 1991. callus induction and plantlet regenerationin tissue cultures of Hawaiian Anthurium.Hort Science (USA).V. 20(7). P.919-921.
18- Kunisaki J.T. 1980. In vitro propagation of Anthurium andraeanum Lind Hortsience. V. 15(4). P. 508-509.
19- Malhotra S., Puchooa D., and Goofoolye K. 1998. Callus indaction and plantlet regenarationin three varieties of anthurium andraeanum Lind. (Abstract).
20- Martin K.P., Dominc J., Madassery J., and Philip V.J. 2003. Direct shoot Regeneration from Lamina Explant of two commercial cut Flower cultivars of Anthurium andraeanum Hort. In vitro cell. 39: 500-504.
21- Monthes S., Hernandes M.M., and Varela M. 1999. Tissue culture of anthurium andraeanum.plant physiology communications(china)27(6):51-54.
22- Mu L., Talor M.B., Powaseu I., and Thrope P. 1999. Tissue culture in French polinesiya. Pacific Ragenal AgricultureProgramme.7:21-23.
23- Nhut D.T., Duy N., Vy N.N.H., Khue C.D., Khiem D.V., and Vinh D.N. 2006. Impact of Anthurium spp. Genotype on callus induction derived from leaf explants, shot and root regeneration capacity from callus. Journal of Applied Horticulture. 8(2): 135-137.
24- Pierik R.L.M. 1976. Anthurium andraeanum plants producedfrom callus tissues cultivaited in vitro. Physiology plant. 37:80-82.
25- Puchooa R.L.M., and Sookun D. 2005. Induction Mutation and Vitro culture of Anthurium Andraeanum. Faculty of Agriculture, university of Mauritius, Reduit, Mauritius.
26- Somaya K.U., Nnarayanaswamy P., and Jayarasad K.V. 1998.Micropropagation studies in Anthuriumandraeanum Lind. Karnataka Journal of Agriculture Sience.11(2):466-470.
27- Sreelatha U., Nair S.R., Rajmohan K. 1998. Factors effecting somatic organogenesis from leaf explants of Anthurium species. Journal of Ornomental HorticultureNew Series.1(2):48-54.
28- Sunlarp S., and Pranom P. 1983. Studuon tissue culture of Anthurium (Anthurium andraeanum Lind)kaset sartniv., Bangkok(Thailand). Research report.p. 123.
29- Teng W.L. 1997. Regeneration of Anthurium adventitiousshoots using Liquid or raft culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 49(2):153-156.
30- Teresa E., Vargas A., Mejias M., Oropeza E., and Garcia E.D. 2004. Plant regeneration of Anthurium andraeanum C. V Rubrun. Electronic journal of Biotechnology,7.
31- Vargas T.E., Mejias Oropeza A.M., and De Garica E. 2004 .Plant regeneration of Anthurium andreanum CV Rubrun.Electionic journal of biotechnolgogy, 72:82 – 28.
32- Yu K.J., and Paek K.Y. 1995. Micro propagation of Anthurium spp. Through shoot tip and callus culture. Journal of the Korean society for Horticulture Science. 36(5):684-694.
33- Yu K.J., and Paek K.Y. 1999. Effect of macroelement lelels in the media on shoot tip culture of Anthurium spp. And reestablishment of plantlets in soil. Joarnal of the Krean Society for Horticaltaral science. 36(6):893-899.
34- Yu Yi X., Liu L., Liu J.X., and Wang J. 2009. Plant Regeneration by callus - Mediated protocorm - Like Body induction of Anthurium andraeanum Hort. Agriculture Science in china. 8(5): 572-577.
35- Zens A., and Zimmer K. 1998. Development of Anthurium scherzerianum schott.using in vitro culture techniques.Gartenbaawissenschaft. 53(1):22-26.