بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia* 'Pretty Miss Kelly') از ریزقطعات برگ

رضا شیرزادیان‌خرم‌آباد* و فرشته تقی‌پورجیردهی

ایران، رشت، دانشگاه گیلان، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۳

چکیده

استفاده از فناوری کشت بافت میتواند از جمله مطلوبترین روشهای تکثیر سریع گیاهان زینتی در زمانی کوتاه و فضایی محدود محسوب می شود. این پروژه بمنظور دستیابی به مناسبترین محیط غذایی جهت تکثیرانبوه گیاه زینتی بنفشه آفریقایی از ریزقطعات برگ در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شد. اثر تنظیم‌کننده‌های مختلف بر میزان تولید شاخساره، تعداد برگ، تعداد ریشه و مدت زمان ریشه‌زایی بررسی شد. لذا برگهای جوان از پایه مادری رقم 'Pretty Miss Kelly' جدا و پس از ضدعفونی به ریزقطعات با اندازه یک سانتی‌مترمربع تقسیم شدند. اثر تنظیم‌کننده‌های رشدی شامل BAP بهمراه NAA یا IAA بصورت ترکیبی و در سطوح مختلف بر تولید شاخساره، اثر BAP و AdS بر تعداد برگ ، اثر محیط‌های مختلف ریشه‌زایی مورد بررسی قرار گرفت. جهت آنالیز داده‌ها از آزمایش فاکتوریل بر مبنای طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد که ۰٫۱mg/l NAA یا ۰ mg/l NAA بهمراه ۰٫۱mg/l از BAP و همچنین ۰ mg/l IAA بهمراه ۰٫۱mg/l BAP مناسبترین ترکیب برای تولید شاخساره هستند. افزایش تعداد برگ بترتیب با استفاده از ۱۵ mg/l AdS و ۰٫۲ mg/l BAP رخ داد. میانگین تولید ریشه هر گیاهچه در ماسه استریل نسبت به دو محیط دیگر مناسبتر بود. در زمینه زمان ریشه‌دهی محیط MS ۱/۲ بهمراه ۰٫۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA با میانگین ۱۰ روز مناسبترین محیط بود. بنابراین در این مطالعه مناسبترین محیط‌های غذایی در مراحل مختلف جهت تکثیر انبوه بنفشه آفریقایی معرفی شد.

واژه‌های کلیدی: بنفشه آفریقایی، تکثیر انبوه، هورمونها، *In vitro*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۷۰۶۱۲۰۸، پست الکترونیکی: R.shirzadian@guilan.ac.ir

مقدمه

بنفشه آفریقایی در سال ۱۸۹۲ در شرق آفریقا توسط Baron Walter von Saint Paul شناسایی گردید. جنس بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia* spp.) نیز به افتخار او نامگذاری شده است (۱۱). بنفشه آفریقایی از تیره Gesneriaceae بوده و دارای ۲۰ گونه است (۱۰). برگهای گیاه کرکین و تا حدی آبدار بوده و بر روی یک ساقه فشرده و کوتاه قرار دارند. گلها به شکل ستاره با کناره‌های شفاف، موج‌دار، نازک و حاشیه‌دار بر روی ساقه طویل شده‌ای ایجاد می‌شوند (۱۰). ویژگیهایی از قبیل جاذبه بصری، سازگاری با فضاهای تحت سایه، توانایی گلدهی تحت نور مصنوعی، سهولت تکثیر رویشی قابل توجه و آسان در تمام طول سال باعث شده‌اند که بنفشه آفریقایی یک گیاه آپارتمانی محبوب باشد (۱۶)؛ بعلاوه این گیاه به دلیل بی‌تفاوت بودن به طول روز در تمام طول سال گل-دهی دارد (۶). بنفشه آفریقایی با استفاده از بذر و قلمه برگ بهمراه قسمت کوچکی از دمبرگ قابل تکثیر است (۴). تعداد بسیار کمی از ارقام بنفشه آفریقایی از بذر بدست آمده اند(۱۱)؛ با این وجود در روش تکثیر با بذر

باید از ارقامی برای بذرگیری استفاده نمود که دارای کیفیت ثابتتری هستند و در نسلهای بعد کمتر دچار تغییر می‌شوند (۴). تکثیر رویشی بنفشه آفریقایی توسط قلمه برگ صورت می‌گیرد (۳۲). هرقطعه ۵-۳ گیاه جوان تولید می-کند که بطور معمول حدود ۹ ماه پس از قلمه‌زنی به گل می‌روند (۱۸). هنگامی که یک یا چند شاخه مجاز به رشد بر روی یک قطعه باشند، تراکم تحمیل شده توسط تعدد گیاهچه‌ها در فضای رشدی محدود، موجب تولید گیاهان نامتقارن با دمبرگ کشیده و متمایل به یک سمت می‌شود. برای غلبه بر این مشکل، از تکثیر در شرایط آزمایشگاهی استفاده می‌شود که بموجب آن تعداد زیادی گیاه تک ساقه شکل می‌گیرند (۳۲). بعلاوه تکثیر بنفشه آفریقایی از طریق روش سنتی قلمه برگ بسیار وقت‌گیر است و تعداد محدودی گیاه از طریق این روش تولید می‌شود؛ در نتیجه، توسعه یک روش تکثیر سریع برای این گونه‌های گیاهی، یک منفعت بزرگ اقتصادی در صنعت گیاهان زینتی خواهد بود. یکی از بهترین روشها برای تکثیر سریع گیاهان، تکنولوژی کشت بافت است که تکثیر سریع گیاه را در زمان کوتاه و فضای محدود ممکن می‌سازد (۱۴). یک مزیت مهم دیگر این است که گیاهان مشتق شده از کشت بافت نسبت به گیاهان تولید شده با روشهای معمولی از کیفیت بیشتر و سلامت بهتری برخوردار می‌باشند (۲۴). ریزازدیادی تا حد زیادی جهت تکثیر سریع ارقام جدید و یا تکثیر شیمرهایی که نمی‌توان از طریق قلمه برگ آنها را حفظ نمود، مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱). بعلاوه از این روش برای تکثیر در مقیاس بالا و آغاز تغییرپذیری ژنتیکی برای توسعه کولتیوار جدید استفاده می‌شود(۲۸). بنفشه آفریقایی یک گیاه زینتی مهم اقتصادی با گونه‌هایی با رنگها و اشکال متنوع می‌باشد (۱۴). گیاهانی از این قبیل علاوه بر زیبایی بسیار زیاد گل‌ها، بدلیل توانمندی تولید گل در طول سال مورد توجه تولیدکنندگان تجاری قرارگرفته‌اند و ظرفیت بالایی در باززایی درون‌شیشه‌ای و درنتیجه پتانسیل زیادی در تولید انبوه دارد(۳۱) به گونه ای که پرورش این گونه گیاهان در حوزه علوم باغبانی بصورت یک صنعت در آمده است (۲۱). کشت درون‌شیشه‌ای بنفشه آفریقایی با موفقیت از چندین ریزنمونه مختلف از جمله: برگ (۲۹)، جوانه گل (۲۲)، بساک (۳۳) و پروتوپلاست (۱۷) انجام شده است و به خاطرداشتن خصوصیات ویژه، بعنوان یک گیاه مدل در شرایط درون شیشه‌ای مورد توجه بسیاری از محققین قرارگرفته است(۲۰)

شکل۱- بنفشه آفریقایی رقم
(Saintpaulia 'Pretty Miss Kelly'*)*

نتایج مطالعات Taha و همکاران نشان داد محیط MS بهمراه ۱ mg/L NAA و ۲ mg/L BAP -۰,۵ بهترین محیط برای باززایی شاخساره از ریزنمونه برگ و دمبرگ بنفشه آفریقایی است(۲۸). بر طبق مطالعات Ghasemi و همکاران بیشترین تعداد شاخه‌های نابجا در محیط کشت حاوی BA ۰,۵ mg/l همراه با ۰,۵ mg/l IBA مشاهده شد (۱۳). در مشاهدات امیری و همکاران بیشترین درصد شاخساره‌زایی و پرآوری در محیط کشت MS (۲۳) حاوی ۲ mg/l BA بدست آمد (۱). نتایج مطالعات Ghasemi و همکاران نشان داد: بهترین محیط ریشه‌زایی برای بنفشه آفریقایی محیط MS حاوی مقدار ۱mg/l NAA است (۱۳). عوامل مختلف از قبیل تنظیم‌کننده‌های رشد، نوع ریزنمونه، جهت‌گیری ریزنمونه و شرایط رشد (نور و دما) بر میزان باززایی تأثیر می‌گذارد (۱۳). بهینه‌سازی در شرایط *In vitro* برای ارگانوژنز و جنین‌زایی سوماتیکی، هزینه‌های مرتبط را کاهش داده و تولید تجاری بنفشه آفریقایی را بهبود می-بخشد (۲۷). با وجود در دسترس بودن متون کافی، بسیاری

از روشهای موفق بعلت جنبه‌های تجاری منتشر نشده است (۱۳).

این پروژه با تمرکز بر تغییر میزان تنظیم‌کننده‌های غذایی کم هزینه و در دسترس و بمنظور یافتن بهترین بستر غذایی جهت تکثیر انبوه بنفشه آفریقایی به بررسی باززایی شاخساره از ریز قطعات برگ، تقویت رشد شاخساره‌ها و ریشه‌زایی آنها در شرایط درون شیشه‌ای (*In vitro*) جهت رسیدن به پروتکلی کارآمد و اقتصادی پرداخته است. ژنوتیپ مورد استفاده در این تحقیق رقم 'Pretty Miss Kelly' بوده که با توجه به اندازه بوته، به گروه Standard تعلق داشته و بعلت داشتن برگهای سبز تیره و گلهای صورتی یکی از زیباترین واریته‌های بنفشه آفریقایی محسوب می‌شود.

مواد و روشها

جهت آماده‌سازی گیاهان مادری رقم 'Pretty Miss Kelly'، ابتدا این گیاهان بمدت یک ماه در گلخانه نگهداری و مواظبتهای لازم از قبیل استفاده از کود مایع و تیمار با قارچ‌کش (بنومیل) و حشره‌کش (مالاتیون) بمنظور تهیه گیاهان مادری سالم انجام شد. سپس برگهای شاداب و با طراوت و عاری از بیماری، از پایه مادری جدا و با محلول تجارتی هیپوکلرید سدیم ۱٫۵٪ بمدت ۷ دقیقه ضدعفونی و سپس سه مرتبه توسط آب مقطر استریل شستشو گردیدند. قطعات برگ با رعایت شرایط استریل به ریز قطعاتی به اندازه یک سانتی‌مترمربع تقسیم و به محیط‌های غذایی منتقل شدند. پتریهای محتوی ریزقطعات برگ بنفشه آفریقایی در دمای ۲۵± ۱ °C و شدت نور ۴۰۰۰Lux با شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در ژرمیناتور انکوبه شدند. در بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشدی بر میزان تولید شاخساره از هر ریزنمونه، فاکتورها شامل BAP (بنزیل آمینوپورین) به غلظتهای (۰٫۵ و ۰٫۱) میلی‌گرم در لیتر بهمراه NAA (۱-نفتالن استیک اسید) با غلظتهای (۲ -۱ -۰٫۵ -۰٫۱ -۰)میلی‌گرم در لیتر و یا IAA (ایندول۳- استیک اسید) با غلظتهای (۲ -۱ -۰٫۱ -۰) میلی‌گرم در لیتر بوده است. محیط کشت مورد استفاده محیط MS، حاوی ۳٪ ساکارز، ۰٫۸ ٪ آگار با pH=۵٫۷ بود. شاخساره‌های حاصل از این مرحله تفکیک شده و بمنظور بررسی تعداد برگ، به محیط‌های غذایی MS بهمراه ۰٫۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، آدنین سولفات (AdS) با مقادیر ۱۵و۳۰ میلی‌گرم در لیتر و BAP با مقادیر ۰٫۲ و ۰٫۴ و ۰٫۸ میلی‌گرم در لیتر انتقال یافتند. پس از مرحله اخیر، جهت بررسی مدت زمان ریشه‌زایی شاخساره‌ها و تعداد ریشه‌های حاصله، سه نوع محیط ریشه‌زایی شامل: محیط MS با ۱/۲ غلظت مواد معدنی و ۲٪ ساکارز بهمراه ۰٫۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، محیط MS بدون تنظیم-کننده رشد و ماسه استریل مورد بررسی قرار گرفت. گیاهچه‌های حاصل بمنظور سازگاری جهت رشد مطلوبتر به خاک پیت منتقل و بمدت ۱۵ روز در شرایط رطوبتی بالا نگهداری شدند. آنگاه گیاهان حاصله به گلدان منتقل شده و در گلخانه نگهداری شدند. بمنظور آنالیز داده‌های حاصله از بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشدی و محیط‌های مختلف بر رشد ریزنمونه‌ها، از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در چهار تکرار استفاده گردید. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری (version) SAS 9.00 انجام گرفته و نمودارها با استفاده از نرم افزار (Microsoft Office 2013) رسم گردیدند.

نتایج

بررسی اثر NAA در ترکیب با BAP بر میزان تولید شاخساره: تجزیه واریانس داده‌های حاصله از بررسی اثر NAA بر میزان تولید شاخساره از هر ریزنمونه، معنی‌دار شدن اثر NAA را در سطح احتمال ۱٪ بر تعداد شاخساره تولید شده از ریزقطعات برگ نشان داد. اما با توجه به جدول ۱، بین سطوح مختلف BAP به تنهایی اختلاف معنی‌داری دیده نشد. مقایسه میانگین بروش LSD در سطح احتمال ۵٪ برتری دو سطح NAA شامل (۰mg/l،

(۰,۱mg/l) در ترکیب با ۰,۱mg/l از BAP با میانگین ۹ شاخساره به ازای هر ریزقطعه را نشان می‌دهد.

جدول۱- تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده از بررسی اثر تنظیم-کننده‌های رشد NAA و BAP بر تعداد شاخساره حاصله از هر ریزقطعه برگ

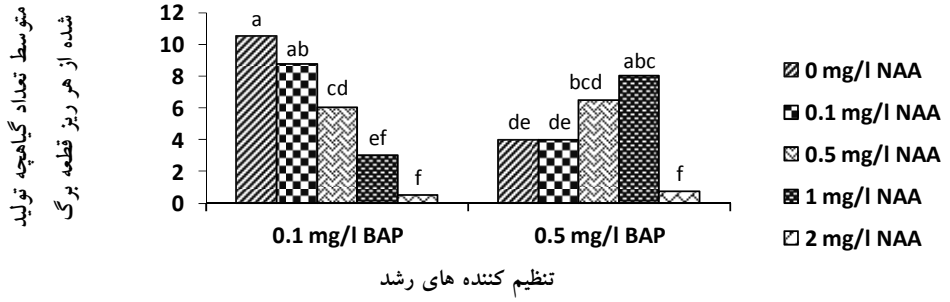
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات تعداد گیاهچه
BAP	۱	۱۲,۱ ns
NAA	۴	۵۵,۴۱ **
BAP*NAA	۴	۴۲,۰۳ **
خطا	۳۰	۳,۲۸
کل	۳۹	

c.v. = ۳۴,۸۴

ns، *، ** بترتیب بمعنای: عدم معنی دار بودن، معنی دار در سطح احتمال ۵٪، معنی دار در سطح احتمال ۱٪

در حالیکه در سطح ۰,۵mg/l از BAP بیشترین میزان تولید شاخساره به غلظتهای ۰,۵ mg/l و ۱ mg/l از NAA با میانگین ۷,۵ شاخساره به ازای هر ریزقطعه تعلق داشت. لذا با حضور BAP میزان تأثیر NAA بر میزان تولید شاخساره از هر ریز نمونه به نحو قابل توجهی تغییر می‌کند. این موضوع در بررسی اثر متقابل دو هورمون مشاهده می‌شود.

اثر متقابل حاصل از BAP, NAA نیز در سطح ۱٪ معنی‌دار شده است. این بدان معنی است که بین ترکیبات تیماری BAPو NAA از نظر عملکردی تفاوت قابل توجهی وجود دارد. با حضور و افزایش غلظت NAA، در سطح ۰,۱mg/l از BAP، از میزان تولید شاخساره کاسته می‌شود. هرچند در سطح ۰,۵mg/l از BAP، این روند متفاوت است؛ در غلظتهای پایین NAA (۰mg/l، ۰,۱mg/l) افزایش BAP از ۰,۱mg/l به ۰,۵mg/l موجب کاهش تعداد شاخساره می‌شود، اما در غلظتهای ۰,۵mg/l، ۱mg/l و ۲mg/l از NAA، افزایش BAP موجب افزایش تعداد شاخساره شده و به تولید بیشتری منجر می‌شود. جالب اینکه پایینترین تعداد شاخساره در ۲ حالت فوق هم مربوط به بالاترین غلظت NAA یعنی ۲mg/l می‌باشد. بنابراین با توجه به شکل ۲، ترکیب تیماری ۰,۱ mg/l NAA و ۰mg/l NAA در ترکیب با ۰,۱mg/l از BAP مناسبترین محیط برای تکثیر شاخساره تعیین شد. مقایسه میانگین سطوح NAAبروش LSD(α=5%) نشان داد که حضور و افزایش میزان NAA موجب کاهش تولید شاخساره شده و استفاده از آن در تکثیر بنفشه آفریقایی چه از لحاظ عملکردی و چه از لحاظ اقتصادی مناسب نمی‌باشد.



شکل۲- مقایسه میانگین اثر ترکیبات تیماری BAP, NAA بر تولید شاخساره از هر ریزقطعه برگ که بروش LSD انجام شده است. ستونهایی که حداقل یک حرف مشابه دارند، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

بررسی اثر IAA در ترکیب با BAP بر میزان تولید شاخساره: تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده از بررسی اثر IAA بر میزان تولید شاخساره از هر ریزنمونه نشان داد که BAP به میزان ۰,۱ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی اثر معنی-داری بر میزان تولید شاخساره از ریز نمونه‌های برگی با میانگین ۱۱ دارد. استفاده از غلظتهای مختلف IAA در

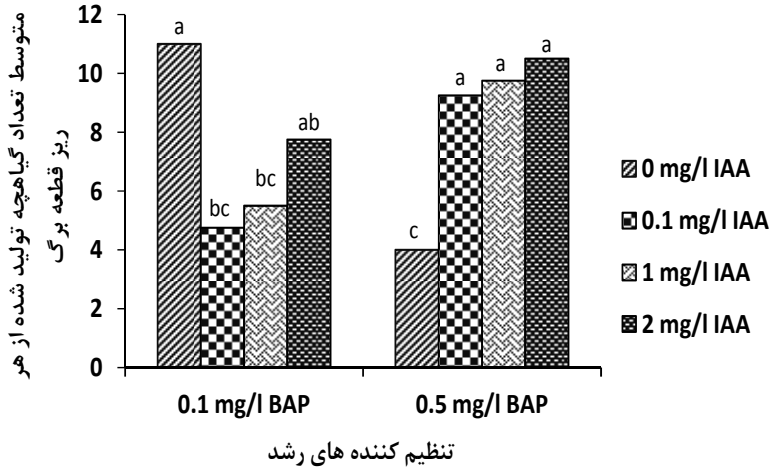
ترکیب با ۰٫۱mg/l BAP موجب کاهش تولید شاخساره از ریزنمونه‌های برگی می‌شود. به بیان دیگر اثر متقابل IAA و BAP وجود داشته و در سطح احتمال ٪۱ معنادار است (جدول ۲). بنابراین آنچه اهمیت دارد اثر متقابل این دو تنظیم‌کننده‌رشد و بررسی ترکیبات تیماری حاصل از آنهاست. با توجه به شکل ۳، افزایش غلظت IAA در ترکیب با ۰٫۱ mg/l BAP نقشی منفی و کاهنده بر تعداد شاخساره دارد؛ اما این افزایش غلظت در ترکیب با BAP ۰٫۵mg/l مثبت و مطلوب بوده و روند تولید شاخساره افزایشی است. همانطور که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود مقایسه میانگین انجام شده بروش LSD(α=5%) نشان داد که چهار ترکیب تیماری بعنوان مناسبترین ترکیبات با سطح a مطرح هستند. بنابراین با در نظر گرفتن مسائل اقتصادی، استفاده از محیط کشت MS حاوی ۰ mg/l IAA، و BAP ۰٫۱mg/l بعنوان مناسبترین تیمار هورمونی تعیین می‌گردد. بدان معنی که محیط غذایی که در آن BAP بمیزان ۰٫۱ میلی‌گرم حضور دارد می‌تواند بنحو مطلوبی میزان قابل توجهی از شاخساره‌ها را در ریزبرگها القاء نماید (شکل ۴). لازم بذکر است که با افزایش میزان BAP به ۰٫۵ میلی‌گرم در لیتر میزان القاء شاخساره در ریزنمونه‌ها بنحو قابل توجهی کاهش می‌یابد.

جدول۲- تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده از بررسی اثر تنظیم-کننده‌های رشد IAA و BAP بر تعداد شاخساره حاصله از هر ریزقطعه برگ

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات تعداد شاخساره
BAP	۱	۱۰٫۱۲^{ns}
IAA	۳	۶٫۷^{ns}
BAP*IAA	۳	۵۹٫۸۷ **
خطا	۲۴	۵٫۲۰
کل	۳۱	

c.v. = ۲۹٫۲۱

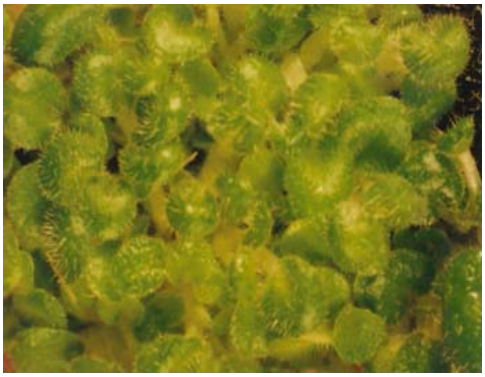
ns، *، ** بترتیب بمعنای: عدم معنی‌دار بودن، معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪، معنی‌دار در سطح احتمال۱٪



شکل۳- مقایسه میانگین اثر ترکیبات تیماری BAP, IAA بر تولید شاخساره از هر ریزقطعه برگ که بروش LSD انجام شده است. ستونهایی که حداقل یک حرف مشابه دارند، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

ولی با حضور IAA در مقادیر استفاده شده در شکل ۳، میزان القاء شاخساره در ریزنمونه‌ها تقویت می‌گردد. لذا بر اساس نتایج این آزمایش ضمن تائید نقش حضور میزان ۰٫۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به تنهایی بر تولید شاخساره، بر نقش مثبت IAA در ترکیب با ۰٫۵ میلی‌گرم در لیتر BAP صحه می‌گذارد. جالب اینکه برآیند تأثیر سطوح مختلف BAP معنی‌دار نیست. در واقع اثر متقابل غلظتهای بالاتر IAA با میزان بیشتر BAP در این آزمایش نتیجه مطلوبتر و

معنی‌داری داشته است.



شکل ۴- تشکیل برگچه و ظهور گره انشعاب بر روی بافت برگی بنفشه آفریقایی.

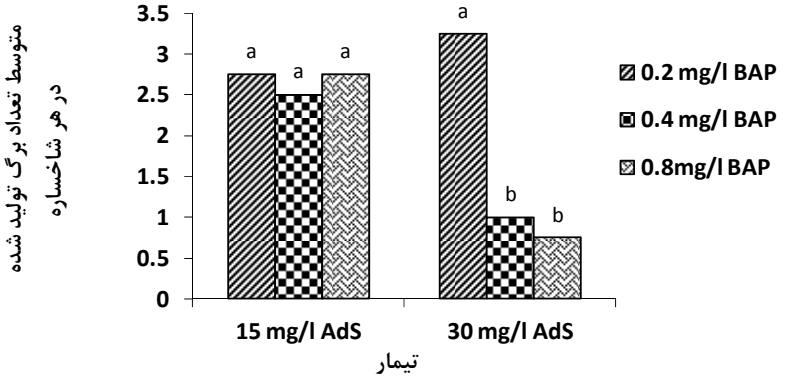
بررسی اثر BAP در ترکیب با آدنین سولفات (AdS) بر تعداد برگ: شاخساره‌های حاصله در مرحله قبل تفکیک شده و بمنظور بررسی تعداد برگ القایی در هر شاخساره به محیط‌های غذایی حاوی BAP و آدنین سولفات (AdS) منتقل و مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به تجزیه واریانس داده‌های آزمایش فوق و همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است، سطوح مختلف آدنین سولفات (AdS) و BAP در این بررسی در سطح ٪۵ اختلاف معناداری در تعداد برگ تولید شده از هر شاخساره داشته‌اند. بعلاوه اثر متقابل این دو فاکتور نیز در سطح ٪۵ معنادار است. مقایسه میانگین بروش LSD(α=5%) نشان داد که در غلظت ۱۵ mg/l AdS، سطوح مختلف استفاده شده BAP تأثیر مطلوبی و قابل توجهی بر تعداد برگ تولید شده از هر شاخساره دارند. البته تأثیر مقادیر مختلف BAP در ترکیب با ۱۵ mg/l AdSدارای اثر معنی‌داری نیست. با افزایش AdS به ۳۰mg/l این وضعیت تغییر می‌کند و تنها تیمار ۳۰mg/l AdS + ۰,۲mg/l BAP با سطح a دیده می‌شود (شکل۵). با توجه به این نتایج، بهترین سطح AdS، ۱۵ mg/l و بهترین سطح BAP، ۰,۲ mg/l است. در بررسی اثر متقابل دو فاکتور نیز با توجه به شکل ۵، مناسبترین ترکیب تیماری در افزایش تعداد برگ، mg/l ۱۵ AdSو ۰,۲ mg/l BAP تعیین می‌شود.

جدول۳- تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده از بررسی اثر تنظیم-کننده‌رشد BAP و بر AdS تعداد برگ تولید شده در هر شاخساره

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات تعداد برگ
BAP	۱	۶,۰*
AdS	۲	۴,۱۶*
BAP* AdS	۲	۳,۵ *
خطا	۵	۰,۸۸
کل	۱۸	

c.v. = ۴۳,۵۱

ns، *، ** بترتیب بمعنای: عدم معنی دار بودن، معنی دار در سطح احتمال ۵٪، معنی دار در سطح احتمال ۱٪



شکل۵- مقایسه میانگین اثر ترکیبات تیماری AdS , BAP بر تعداد برگ تولید شده در هر شاخساره که بروش LSD انجام شده است. ستونهایی که حداقل یک حرف مشابه دارند، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

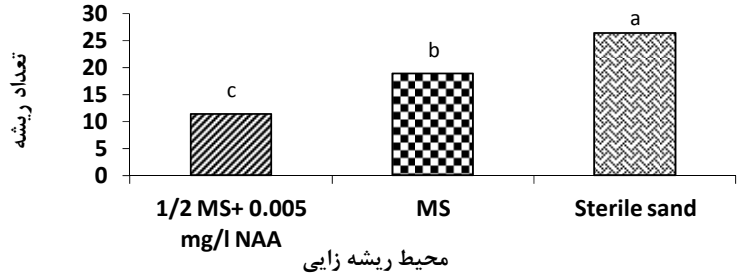
چرا که استفاده از این ترکیب در بین ۴ ترکیب سطح a، از نظر اقتصادی بصرفه‌تر است. این نتیجه حکایت از آن دارد که با استفاده همزمان AdS و BAP جهت افزایش تعداد برگ در هر شاخساره، سطوح پایینتر این تیمارها مورد نیاز است.

بررسی تأثیر محیط‌های مختلف ریشه‌زایی بر شاخساره‌ها: پس از تکثیر شاخساره، جهت بررسی مدت زمان ریشه‌زایی شاخساره‌ها و تعداد ریشه‌های حاصله، شاخساره‌ها به سه محیط غذایی شامل محیط MS بدون تنظیم‌کننده‌رشد، محیط 1/2 MS بهمراه ۰٫۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ماسه استریل منتقل شدند. با توجه به جدول ۴، اختلاف معنی‌داری در سطح ٪۱ بین محیط‌های مختلف ریشه‌دهی در زمینه القاء ریشه و همچنین زمان ریشه‌دهی مشاهده می‌شود. مقایسه میانگین انجام شده بروش LSD(α=5%) (شکل ۶) حاکی از آنست که ماسه استریل با تولید میانگین حدود ۲۶ ریشه نسبت به دو محیط دیگر عملکرد مناسبتری را نشان داده است.

جدول۴- تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده از بررسی اثر محیط-های ریشه‌دهی برتعداد ریشه و زمان ریشه‌دهی

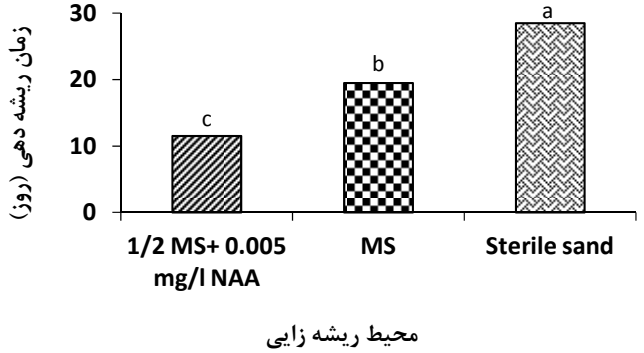
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تعداد ریشه	ریشه دهی
محیط ریشه دهی	۲	۲۲۵٫۰**	۲۸۹٫۳۳**
خطا	۹	۹٫۱۱	۱٫۶۶
کل	۱۱		
		c.v. = ۶٫۵	**c.v.** = ۱۵٫۸

ns، *، ** بترتیب بمعنای: عدم معنی دار بودن، معنی دار در سطح احتمال ۵٪، معنی دار در سطح احتمال۱٪



شکل۶- مقایسه میانگین اثر محیط‌های مختلف ریشه‌دهی برتعداد ریشه بروش LSD. ستونهایی که حداقل یک حرف مشابه دارند، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

پس از ماسه محیط غذایی MS کامل با متوسط ۲۰ ریشه قرار می‌گیرد. اما در زمینه زمان ریشه‌دهی (شکل ۷) محیط MS با ۱/۲ غلظت مواد معدنی بهمراه ۰٫۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA برترین محیط با میانگین ۱۰ روز بوده است و لذا ریشه‌دهی در این محیط در مقایسه با دیگر شرایط بمدت زمان کمتری نیاز دارد.



شکل۷- مقایسه میانگین اثر محیط‌های مختلف ریشه‌دهی بر زمان ریشه‌دهی بروشLSD. ستونهایی که حداقل یک حرف مشابه دارند، در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

محیط غذایی MS کامل با متوسط ۲۰ روز ریشه‌زایی بعنوان گزینه دوم مطرح می‌باشد. بعبارت دیگر هر چند ماسه استریل توانسته تعداد ریشه را افزایش دهد، اما زمان ریشه‌دهی در ماسه طولانیتر است. لذا برای تعیین محیط مناسب باید در نظر داشت که کدام پارامتر (تعداد ریشه-دهی یا زمان ریشه‌دهی) برای تولید کننده بنفشه آفریقایی در محیط درون‌شیشه‌ای بیشتر اهمیت دارد. شاخساره‌های ریشه دار شده (گیاهچه‌ها) جهت سازگاری با محیط *In vivo* به خاک استریل مناسب رشد این گیاه انتقال و بقیه مراحل رشد و نمو را در گلخانه پشت سر گذاشتند (شکل ۸).

شکل۸- انتقال شاخساره‌های ریشه دار به گلدان‌های حاوی خاک استریل

بحث

در این پژوهش اثر غلظتهای مختلف از: تنظیم‌کننده‌های-رشدی سیتوکینین و اکسین، آدنین سولفات و محیط MS بر روی تکثیر اندام هوایی و ریشه بنفشه آفریقایی مورد بررسی قرارگرفت.

در بررسی اثر دو اکسین NAA و IAA بر تولید شاخساره-های بنفشه آفریقایی از ریزقطعات برگ، ترکیبهای تیماری ۰,۱mg/l NAA و ۰mg/l NAA بهمراه ۰,۱mg/l از BAP و ۰ mg/l IAA، بهمراه ۰,۱mg/l BAP مناسبترین ترکیبات تیمارهای تعیین شدند. از طرف دیگر حضور BAP به تنهایی تأثیر قابل توجه و مثبتی بر تولید شاخساره از برگهای بنفشه آفریقایی داشت و این تأثیر در غلظتهای مختلف NAA و IAA متفاوت است. با توجه به مشاهدات ایرانبخش و همکاران BAP به تنهایی توانایی بیشتری نسبت به NAA در افزایش تعداد شاخه و برگهای تشکیل شده دارد. سطح مناسب غلظت BAP بدون NAA برای اندام‌زایی در آزمایش آنها mg/l ۰,۱۲- ۰,۰۸ بود و غلظتهای بالای BAP و NAA بخصوص غلظتهای بالای NAA اثر بازدارنده بر شاخساره‌زایی داشت. گمان می‌رود این غلظتهای بیش از حد با اثر سمیت، شاخساره‌زایی را کاهش می‌دهند (۲). نتایج آزمایشات فوق با نتایج ارائه شده در این مطالعه تطبیق دارد. Torres علت اصلی تکثیر انبوه بنفشه آفریقایی با استفاده از مقادیر محدود NAA را کاسته شدن میزان وزن و تولید جوانه‌های نابجا و گیاهچه بنفشه در غلظتهای یک میلی‌گرم و بیشتر از NAA می‌داند (۳۲). آزمایشات زبرجدی و همکاران نشان داد که هورمون BAP به تنهایی یا در ترکیب با NAA در گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) موجب تولید نوساقه‌های متعدد می‌شود(۵). مطالعات Al-Hussein و همکاران نشان داد، محیط MS حاوی ۰,۵۴ μ*M* NAA بهترین غلظت BA برای باززایی شاخساره از ریزنمونه برگ است(۸). در مشاهدات زید و همکاران مشخص شد، محیط μ*M* GA3 ۰,۵۸+ μ*M* IBA ۱,۴۷+ μ*M* BA ۴,۴۴+ MS بهترین حالت برای القاء تولید شاخساره جدید بنفشه آفریقایی بوده است(۷). Sunpui و Kanchanapoom در پژوهشی نشان دادند محیط MS حاوی ۳ mg/L BA به تنهایی یا بهمراه NAA۱mg/ L بالاترین درصد باززایی شاخساره را دارد(۳۰). مطالعات انجام شده توسط Godo و همکاران بر روی قسمتهای برگی لیسیانتوس، جنس دیگری از خانواده جسنریاسه نیز نشان داد که بیشترین ساقه از ریزنمونه برگ در محیط حاوی غلظت کم (۲-۰,۵ میکرومولار) از NAA القاء می‌شود (۱۵). مشاهدات Kaviani روی بر شاخساره انتهایی لیسیانتوس نشان داد که تیمارهای mg/l KIN ۱ و ۰,۵ بدون NAA بهترین محیط شاخساره‌زایی است؛ در حالی که در تیمارهای حاوی mg/l NAA ۲ و ۱، بدون

KIN هیچ شاخساره‌زایی صورت نگرفت (۱۹). Daud و همکاران پس از گذشت ۸ هفته، کشتهای محیط MS حاوی ۱ mg/L IAA بهمراه ۳ mg/L Zeatin را دارای بالاترین تعداد شاخساره، معرفی نمودند(۱۲). مشاهدات Shepherd و Almeida بر روی جوانه جانبی (*Sinningia allagophylla*) نیز نشان داده است که بالاترین درصد شاخساره‌زایی (۱۰۰٪) در محیط کشت حاوی IAA ۰ mg/l و ۰,۱ mg/l BA بوده است (۹).

در بررسی تعداد برگ تأثیر مثبت هر یک از تیمارهای BAP و AdS بر افزایش تولید برگ مشاهده شد. بعلاوه نتایج نشان داد که حضور همزمان AdS و BAP جهت افزایش تعداد برگ سطوح پایینتری از این تیمارها را نیاز دارد بطوری که بهترین سطح AdS، ۱۵ mg/l و بهترین سطح BAP، ۰,۲ mg/l بود. در مطالعه‌ای بر روی قسمتهای برگی بنفشه آفریقایی مشخص شد که محیط MS حاوی mg/l ۰,۴BA و ۳۰ mg/l AdS بهترین محیط ساقه‌زایی است(۱۶). در نتایج مطالعات انجام شده توسط Raman آمده است: ریزنمونه‌های *Streptocarpus* در محیط MS حاوی ۳٪ گلوکز و ۴۰ mg/l آدنین پس از ۶-۴ هفته شروع به تولید جوانه نمودند. وی نتایج مشابهی را از محیط MS حاوی غلظتهای کم از آدنین سولفات(۱۰mg/l) بهمراه ۱mg/l کینتین بدست آورد. Raman همچنین در بررسی خود روی ساقه گل گلوکسینیا Gloxinia *(Sinningia speciosa)* مشخص نمود: در محیط حاوی ۳٪ گلوکز بهمراه ۱mg/l NAA و ۱mg/l BAP یا محیط حاوی ۳٪ گلوکز بهمراه ۱ mg/l NAA و ۴۰ mg/l آدنین، تعداد زیادی جوانه همراه با ریشه تولید می‌شود. وی در تفسیر نتایج حاصله بیان داشت: آدنین و آدنین‌سولفات به تنهایی یا بهمراه کینتین برای تولید جوانه در غیاب BAP ضروری هستند و با افزایش غلظت آدنین یا آدنین سولفات تعداد جوانه تولید شده در هر قطعه افزایش یافته است (۲۶). این بررسی نیز نشان داد که با حضور BAP سطوح پایینتری از آدنین‌سولفات برای افزایش تولید برگ نیاز است؛ چرا که سطح ۱۵ mg/l از آدنین سولفات نسبت به سطح ۳۰ mg/l عملکرد بهتری را نشان داده است.

در ارزیابی اثر محیط‌های مختلف ریشه‌زایی، ماسه استریل با تولید میانگین حدود ۲۵ ریشه نسبت به دو محیط دیگر عملکرد مناسبتری را نشان داد. اما در زمینه زمان ریشه‌دهی محیط MS با ۱/۲ غلظت مواد معدنی بهمراه ۰,۰۰۵ میلی-گرم در لیتر NAA برترین محیط با میانگین ۱۰ روز بود. بنابراین ماسه استریل توانست تعداد ریشه را افزایش دهد، اما بهمان نسبت زمان ریشه دهی را نیز افزایش داد. هورمون اکسین و ترکیبات مشابه آن عامل مناسب برای ریشه‌زایی می‌باشند. این هورمون به راحتی سبب تحریک سلولهای دایره محیطی در بخشهای بالایی ناحیه تارهای کشنده می‌شود، این تحریک منتج به تقسیم سلولهای این منطقه و در نهایت تشکیل ریشه می‌گردد(۳). مطالعات انجام شده توسط Ghasemi و همکاران نشان داد بهترین محیط ریشه‌زایی برای بنفشه آفریقایی محیط MS حاوی مقدار ۱mg/l NAA است (۱۲). مشاهدات Kaviani بر روی شاخساره انتهایی لیسیانتوس نشان داد که تیمارهای ۲ mg/l KIN با ۰,۵ mg/l NAA و ۰,۵ mg/l KIN با mg/l ۰ NAA بالاترین ریشه‌زایی را داشته‌اند (۱۷). با توجه به مشاهدات Godo و همکاران بر روی قسمتهای برگی لیسیانتوس، بیشترین القاء ریشه از ریزنمونه برگ در محیط حاوی ۱۲۸-۳۲ µM از NAA بدست آمد(۱۵). در مطالعه ای دیگر بر روی شاخساره انتهایی لیسیانتوس مشخص شد تیمار ۱,۶۲ µM NAA بالاترین درصد ریشه‌زایی (۱۰۰٪) را داشته است(۲۵).

نتیجه‌گیری نهایی

تحقیق حاضر با تبیین اثر NAA و IAA در تولید اندام هوایی بنفشه آفریقایی، بررسی نقش پررنگ BAP در تولید شاخساره و برگ، ارزیابی نتایج حضور AdS بر تعداد برگ تولید شده و مقایسه محیط‌های مختلف ریشه‌دهی، می‌تواند کمک بسیار مؤثری جهت حصول ترکیب تیماری مناسب

هر مرحله از رشد گیاه بنفشه آفریقایی نماید و در راستای تکثیر صنعتی این گیاه زینتی محبوب مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

۱- امیری، ا.، تقی زاده، م.، شور، م.، نعمتی، س.ح.، تهرانی فر، ع.، ۱۳۹۳. بررسی جنبه‌های باززایی درون‌شیشه‌ای بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha* Wendl) و ریشه‌زایی برون‌شیشه-ای آن.دوفصلنامه فنآوری تولیدات گیاهی (علمی-پژوهشی) ۱۴(۱): ۱۲۱-۱۳۱.

۲- ایرانبخش، ع.، عبادی، م.، حمدی، س.م.م.، ۱۳۸۸. تکثیر نیمه صنعتی گیاه بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia inonata*) به روش ریزازدیادی. فصلنامه زیست شناسی تکوینی۴:۱۰-۱.

۳- **پیوندی، م.، کاظمی، ل.، مجد، ا.**، تاثیر سیتوکینین‌های مختلف بر ریز ازدیادی گیاه اسطوخودوس (*Lavandula vera*)، مجله زیست شناسی ایران، ۲۸ (۲): ۲۵۷-۲۶۳

۴- خلیقی، ا.، ۱۳۶۴. گلکاری- پرورش گیاهان زینتی ایران. انتشارات روزبهان. تهران

۵- زبرجدی، ع.ر.، معتمدی، م.ج.، طراوت، ا.، اسماعیلی، ا.، ۱۳۹۲، ریز¬ازدیادی گیاه دارویی سرخارگل(. *Echinacea purpurea* L) با استفاده از قطعات کوتیلدون و هیپوکوتیل، مجله زیست شناسی ایران، ۲۶ (۳):۳۱۱-۳۱۹

۶- قائم مقامی، س.ع.،۱۳۸۲. بهینه سازی تکثیر درون شیشه ای بنفشه آفریقایی، مجله علمی پژوهشی علوم کشاورزی۳:۱۰۸-,۹۹

۷- زید، س.، التیناوی، ع.، عبدالقادر، أ.،۲۰۰۸ . تأثیر بعض مکونات الأوساط الغذائیه فی الإکثار الدقیق للبنفسج الإفریقی(.*Saintpaulia ionantha* L)**.** مجله جامعه تشرین للبحوث و الدراسات العلمیه- سلسله العلوم البیولوجیه۳۰(۳): ۱۱۱-۱۲۲.

8- Al-Hussein, S., Shibli, R.A., Karam, N.S., 2010. Regeneration in African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) using different leaf explants, cytokinins sources, and light regimes. Jordan Journal of Agricultural Sciences 2(4): 361-371.

9- Almeidia, V.P.D., Shepherd, S.L.K., 1999. *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae): *In vitro* cultivation of a native plant of the Brazilian cerrado. Brazilian Journal of Botany 22(3): 381-384.

10- Brickell, c., 1995. The Royal Horticultural Society Encyclopedia of Gardening A-Z. Dorling Kindersley, Great Britain.

11- Chen, J., Henny, R. J., 2015. Cultural Guidelines for Commercial Production of African Violets (*Saintpaulia ionantha*). Environmental Horticulture Department, UF/IFAS Extension.

12- Daud, N., Taha, R.M., Hasbullah, N.A., 2008. Studies on plant regeneration and somaclonal variation in *Saintpaulia ionantha* Wendl.(African violet). Pakistan journal of biological sciences: PJBS, 11(9): 1240-1245.

13- Ghasemi, Y., Nematzadeh, G. A., Omran, V. G., Dahestani, A., Hosseini, S., 2012. The effect of explant type and phytohormones on African violet (*Saintpaulia ionantha*) micropropagation efficiency. Biharean Biologist 2: 73–76.

14- Ghorbanzade, Z., Ahmadabadi, M., 2014. An improved system for rapid *In vitro* regeneration of *Saintpaulia ionantha*. Plant Tissue Culture Biotechnology 1: 37-45.

15- Godo, T., Lu, Y., Mii, M., 2010. Micropropagation of *Lysionotus pauciflorus* Maxim (Gesneriaceae). Protocols for *In vitro* Propagation of Ornamental Plants: 127-139.

16- Grout, B. W. W., 1990. African violet. Handbook of Plant Cell Culture 5:181-205.

17- Hoshino, Y., Nakano, M., Mii, M., 1995. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Saintpaulia ionantha* Wendl. Plant Cell Reports 14: 341-344.

18- Ioannou, M., 1987. Micropropagation of African violet from petiole and leaf blade tissue. Agricultural Research Institute, Ministry of Agriculture and Natural Resource 92:1-4.

19- Kaviani, B., 2014. Micropropagation of ten weeks (*matthiola incana*) and lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) (two ornamental plants) by using kinetin (KIN), naphthalene acetic acid (NAA) and 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D). Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus, 13(1): 141-154.

20- Lineberger, R. D., Druckenbrod, M., 1985. Chieral nature of the pinwheel flowering

African violets (*saintpaulia*,Gesneriaceae). American. Jornal of Botany 8:1204-1212.

21- Lo, K. H., 1997. Factors affecting shoot organogenesis in leaf disc culture of African violet. Scientia Horticulturae 72: 49-57

22- Molgaard, J. P., Roulund, N., Deichmann, V., Irgens-Moller, L., Andersen, S. B., Farestveit, B., 1991. *In vitro* multiplication of *Saintpauliaionantha* Wendl. by homogenization of tissue cultures. Scientia Horticulturae 48: 285-292.

23- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 472–497.

24- Murashige, T., 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture. Frontiers of plant tissue culture: 15- 26.

25- Paek, K. Y., Hahn, E. J., 2000. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of Lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 36(2): 128-132.

26- Raman, K., 1977. Rapid multiplication of Streptocarpus and Gloxinia from *In vitro* cultured pedicel segments. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 83 (5): 411-418.

27- Rout, G.R., Mohapatra, A., Mohan Jain, S., 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology Advances 24: 531-560.

28- Shukla, M., Sullivan, J.A., Jain, S.M., Murch, S.J., Saxena, P.K., 2013. Micropropagation of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). Protocols for Micropropagation of Selected Economically.Important Horticultural Plants. Methods in Molecular Biology : 279-289.

29- Start, N. D., Cumming, B. G., 1976. *In vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. Horticultural Science 11(3): 204-206.

30- Sunpui, W., Kanchanapoom, K., 2002. Plant regeneration from petiole and leaf of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cultured *In vitro*. Songklanakarin J. Sci. Technol 24(3): 357-364.

31- Taha, R.M., Daud, N., Hasbullah, N.A., 2008. Establishment of Efficient Regeneration System, Acclimatization and Somaclonal Variation in *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. IV International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. 865: 115-121.

32- Torres, K., 1988. *In vitro* Propagation of African Violets. Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops: 80-85.

33- Weatherhead, M. A., Grout, B. W. W., Short, K. C., 1982. Increased haploid production in *Saintpaulia ionantha* Wendl. by anther culture. Scientia Horticulturae 17: 137-144.

Assessment of hormonal effects on test tube micropropagation of *Saintpaulia* 'Pretty Miss Kelly' using micro leaf segments

Shirzadian-Khorramabad R.and Taghipour-Jirdehi F.

Dept. of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

Abstract

African violet as one of the important economic ornamental plants could be propagated through tissue culture technique in a short time and limited space. The effect of different growth regulators on shoot production, leave number, root number and rooting time was measured. 'Pretty Miss Kelly' young leaves were collected, and after disinfection, were divided into pieces with dimensions of 1cm*1cm. Therefore, effect of different combination of NAA, BAP, and IAA on shoot regeneration from leaf segments was monitored. Moreover, the effects of various combinations of BAP and AdS has been evaluated on the number of leaves. Subsequently, different root induction mediums including ½ MS with 0.005 mg/l NAA, MS without growth regulators and sterile sand were investigated. The obtained data was analysed by factorial experiment in a completely randomized design with 4 replications. The results showed that 0 mg/l NAA or 0.1 mg/l NAA in combination with 0.1 mg/l BAP and also 0 mg/l IAA in combination with with 0.1 mg/l of BAP are most suitable for shoot production. The best level of AbS and BAP regarding leaf number was inturn 15 mg/l and 0.2 mg/l. A better performance for root induction happened in sterile sand with an average of 25 roots per plantlet. In the case the root induction time, ½ MS with with 0.005 mg/l NAA with an average of 10 days was the best. Therefore, the most appropriate nutrient mediums in various stages for *In vitro* micrpropagation of African violet from leaf segments was identified.

Key words: hormones, *In vitro*, micropropagation, *Saintpaulia* spp.