بررسی تأثیر غلظت نمک‌های معدنی، ساکارز و بنزیل آدنین بر آغازش رشد ساقه‌های رونده سرخس بوستونی (*Nephrolepis exaltata* Schott cv. Bostoniensis)

مرضیه شفیعی حاجی‌آباد، یوسف حمید اوغلی و رضا فتوحی قزوینی[۱]

چکیده

سرخس بوستونی (*Nephrolepis exaltata* Schott cv. Bostoniensis) گیاهی است برگساره‌ای و یکی از پرفروش‌ترین گیاهان زینتی گلدانی دنیا به شمار می‌رود. اخیراً کشت درون شیشه‌ای این گیاه با محدودیت روش‌های متداول تکثیر، گسترش زیادی یافته است. این تحقیق به منظور تعیین بهترین محیط کشت جهت کشت اولیه و آغازش رشد ساقه‌های رونده صورت گرفت. ساقه‌های رونده گندزدایی شده در دوازده محیط کشت مختلف دارای ۳ غلظت هورمونی(۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بنزیل آدنین (BA)، دو غلظت نمک‌های معدنی (نصف و یک چهارم) محیط موراشیگی و اسکوگ (MS) و دو غلظت ساکارز (۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر) کشت شدند. این آزمون به صورت آزمایش فاکتوریل در پایه طرح کاملاً تصادفی و در ۴ تکرار انجام شد. پس از گذشت شش هفته تعداد و طول شاخساره‌های تولید شده از هر ساقه رونده اندازه‌گیری شد. در طی دوره آزمایش صفات کیفی مثل زمان تورم، ظهور کالوس، ظهور برگچه و وجود اجسام سبز کروی نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. اجسام سبز کروی که در واقع تجمعی از سرآغازه‌های جوانه‌ای نابجا هستند در غلظت‌های یک و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شدند. حداکثر تعداد شاخساره با طول کوچک در محیط کشت‌های دارای نصف غلظت نمک‌های MS و ۲۰ یا ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و غلظت‌های یک یا ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به دست آمد. محیط کشت دارای نصف غلظت نمک‌های MS، ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و یک میلی‌گرم در لیتر BA با تعداد میانگین ۶ عدد شاخساره ۵ میلی‌متری به عنوان محیط برتر معرفی شد.

واژه‌های کلیدی: سرخس بوستونی، نمک‌های معدنی MS، ساکارز، بنزیل آدنین (BA)، اجسام سبز کروی (GGB)

مقدمه

نفرولپیس (*Nephrolepis exaltata* Schott cv. Bostoniensis) یک سرخس علفی و بومی نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان به شمار می‌رود. رقم بوستونی متداول‌ترین رقم نفرولپیس است و امروزه به عنوان یکی از محبوب‌ترین گیاهان برگساره‌ای زینتی کاربرد گسترده‌ای دارد (۱۶). سرخس بوستونی به ندرت تولید هاگ نموده و هاگ تولید شده از آن نیز قابلیت رویش ندارد. در شرایط معمولی ازدیاد آن از طریق تقسیم بوته انجام می‌شود. روش متداول ازدیاد سرخس بوستونی جداسازی و برداشت شاخساره‌هایی است که در نتیجه‌ی تماس ساقه‌های

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

Archive of SID
www.SID.ir

رونده با خاک شکل می‌گیرد (۱ و ۲). اما شاخساره‌های حاصل از این روش تنها یک مرکز رشد با تعداد محدودی برگ تولید می‌کنند (۱۵). در دهه‌های اخیر تولید انبوه این گیاه از طریق کشت درون شیشه‌ای امری متداول شده است (۱). بورگن و ناس(Borgen and Nass) (۵) نشان دادند که در کشت درون شیشه‌ای سرخس بوستونی غلظت نمک‌های MS (Murashige and Skoog) (۱۴)، وجود یا فقدان فسفات‌های آلی و ترکیب هورمون‌های رشد در محیط آغازش، بر پرآوری و کیفیت شاخساره‌های تولیدی اثر دارد. آنها گزارش کردند که شروع رشد در نصف غلظت نمک‌های MS سریع‌تر اتفاق می‌افتد و طول شاخساره‌ها در این محیط در مقایسه با MS کامل دارای تفاوت معنی داری است، اما تعداد شاخساره تولید شده در غلظت کامل نمک‌های MS بسیار معنی‌دار بود و شاخساره‌های حاصل از نظر شکل و کیفیت نیز از یک‌نواختی بیشتری برخوردار بودند. آنها استفاده از کینتین و اسید ایندول استیک (IAA) به همراه NaH_2PO_4 را در محیط آغازش برای تولید بیشترین تعداد شاخساره توصیه کرده و طویل‌ترین شاخساره‌ها (۳۷ میلی‌متر) را در محیط بدون کینتین و دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA به دست آوردند. در پژوهشی که روی ریزافزایی نفرولپیس بیسرتا (*Nephrolepis bisserata* Schott) انجام شد اثر غلظت نمک‌های معدنی محیط MS (MS $\frac{1}{2}$، MS و MS $\frac{2}{3}$)، ساکارز (۱۰ و ۳۰ گرم بر لیتر) و تنظیم کننده‌های رشد اسید نفتالین استیک (NAA) و کینیتین بر آغازش رشد ساقه‌های رونده این سرخس مورد بررسی قرار گرفت و گزارش شد که در محیط نصف غلظت نمک‌های MS و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز تعداد شاخساره بیشتر و طویل تری تولید می‌شود و غلظت تنظیم کننده‌های رشد بر این صفات اثری ندارد (۳). هیگوچی و همکاران (۱۳) در سال ۱۹۸۷ طی تحقیقی روی کشت درون شیشه‌ای نفرولپیس کوردیفولیا (*Nephrolepis cordifolia* (L.) Presl) گزارش کردند که در یک چهارم غلظت نمک‌های MS و در حضور ۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین (BA)، اجسام سبز کروی (Green globular bodies) (GGB) تولید می‌شود که این اجسام سبز در صورت بازکشت در محیط دارای هورمون BA، به سرعت تکثیر شده و با انتقال آنها به محیط بدون هورمون به آسانی تولید شاخساره می‌کنند. کاملوه و همکاران (۸) اعلام کردند که کشت آغازین در غلظت‌های کم نمک‌های MS دارای رشد سریع‌تری هستند. پاسکوال (۱۶) با آزمایش‌هایی بیان کرد که غلظت نمک‌های MS بر استقرار، آغازش، نمو، باززایی و رشد ریزنمونه‌های سرخس اعم از اسپور، ساقه رونده و شاخساره اثر زیادی دارد. گونیولسن و همکاران (۱۱) از کشت درون شیشه‌ای نوک ساقه رونده سرخس بوستونی در محیط MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA در عرض شش ماه از هر ساقه رونده ۱۱۴۷ گیاه تولید کردند. برترند و همکاران (۴) در تحقیقی ریزنمونه‌های ریزوم، برگ و نوک ریشه اسپروفیت جوان سرخس پلیپودیم کامبریکوم (*Polypodium combricum*) را در محیط کشت MS حاوی BA یا کینتین به تنهایی و یا در ترکیب با NAA کشت کرده و گزارش کردند که تنظیم‌کننده رشد BA نسبت به کینتین یا در ترکیب با NAA در پرآوری این سرخس مؤثرتر است و در هر دو نوع ریزنمونه با افزایش میزان BA در محیط کشت، طول شاخساره‌های تولیدی تا نصف کاهش می‌یابد. زیو و همکاران (۱۹) نصف غلظت نمک‌های MS و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز را برای کشت مایع سرخس بوستونی مناسب یافت.

با توجه به اهمیت تولید درون شیشه‌ای سرخس بوستونی و هم‌چنین وجود گزارش‌های متفاوت و پراکنده در مورد محیط کشت مناسب برای ریزازدایی این گیاه، در این تحقیق، غلظت‌های مختلف نمک‌های معدنی محیط کشت MS، ساکارز و هورمون BA روی کشت ساقه‌های رونده سرخس بوستونی مورد آزمون قرار گرفتند و بهترین ترکیب‌ها جهت کشت و آغازش رشد ساقه‌های رونده معرفی شدند.

مواد و روش‌ها

گندزدایی نمونه‌های گیاهی

در این آزمایش از گیاهان مادری سرخس بوستونی پر رشد که دارای برگ‌هایی به طول بین ۵۵-۴۵ سانتی‌متر و تعداد زیادی ساقه رونده بودند استفاده شد. این گیاهان قبل از انتقال به

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایشگاه به مدت چند هفته در شرایط کنترل شده گلخانه‌ای نگه‌داری شدند. قطعات ساقه رونده (۳-۲ سانتی‌متر طول) بعد از جداسازی از گیاه مادری به دقت شسته شدند و پس از خشک کردن با کاغذ صافی، ادامه عمل گندزدایی آنها در اتاقک تمیز (Clean room) و در شرایط استریل صورت گرفت. به منظور گندزدایی ابتدا ساقه‌های رونده به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰٪ فرو برده شدند و بلافاصله با آب مقطر استریل شستشو شدند. جهت گندزدایی سطحی نمونه‌ها از سفید کننده وایتکس، محتوی ۵/۲۵٪ محلول هیپوکلریت سدیم با غلظت حجمی ۱۵ درصد، به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. به منظور کاهش کشش سطحی ۲ قطره توین ۲۰ به محلول گندزدایی اضافه شد. در پایان عمل گندزدایی، آبکشی با آب مقطر استریل به مدت ۳، ۵ و ۱۰ دقیقه صورت گرفت تا بقایای مواد گندزدایی کننده از سطح نمونه شسته شود.

کشت و آغازش رشد ساقه‌های رونده

به منظور استقرار ساقه‌های رونده‌ی گندزدایی شده در محیط کشت و تعیین بهترین محیط آغازش، دوازده محیط مختلف حاوی ۳ غلظت هورمون BA (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، ۲ غلظت از نمک‌های معدنی MS (MS $\frac{1}{2}$ و MS $\frac{1}{4}$) و ۲ غلظت ساکارز (۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر) تهیه شد. محیط‌ها با ۸ گرم در لیتر آگار به حالت جامد در آمدند و pH محیط قبل از اتوکلاو در ۵/۷ ثابت گردید. پس از اتوکلاو، حدود ۳۵ میلی‌لیتر از هر نوع محیط کشت در داخل شیشه‌های مربا در ۴ تکرار و در هر تکرار از ۳ ریز نمونه استفاده شد. شیشه‌هایی که ریزنمونه‌ها در آنها کشت شده بودند در داخل اتاقک رشد دارای ۲۰۰۰ لوکس نور و در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد با طول روز ۱۶ ساعت روشنایی نگه‌داری شدند. در طی ۳ هفته بعد از کشت، میزان آلودگی و قهوه‌ای شدن بافت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. بعد از مدت ۶ هفته تعداد شاخساره و طول شاخساره‌های تولید شده اندازه‌گیری شدند. در طی دوره آزمایش صفات کیفی مثل زمان تورم، زمان ظهور اولین برگچه و وجود اجسام سبز کروی نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای تعیین ماهیت اجسام سبز کروی از آنها برش‌های میکروسکوپی تهیه شد.

این آزمون به صورت فاکتوریل و در پایه طرح کاملا تصادفی در ۴ تکرار انجام شد. داده‌های خام حاصل از آزمایش گندزدایی نمونه‌ها به صورت درصد بوده و قبل از تجزیه و تحلیل، عملیات تبدیل داده‌ها با استفاده از آرک سینوس انجام شد. داده‌های آزمون آغازش رشد ساقه رونده ابتدا با استفاده از برآورد اسکیونس وکورتوسیس مورد آزمون نرمال قرار گرفتند و سپس تجزیه و تحلیل آماری شدند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد بر روی کلیه داده‌های اصلی و تبدیل شده انجام شد. رسم نمودار با نرم‌افزار EXCEL صورت گرفت.

نتایج و بحث

کشت و آغازش رشد ساقه‌های رونده

۱. اثر غلظت نمک‌های معدنی بر صفات اندازه گیری شده

در سطح احتمال یک درصد اثر غلظت نمک‌های محیط آغازش بر تعداد و طول شاخساره تولید شده از هر ساقه‌رونده معنی‌دار بود. در مقایسه میانگین‌ها مشاهده می شود، نصف غلظت نمک‌های MS با تولید ۵ شاخساره در گروه a و یک چهارم غلظت نمک‌های MS با تولید ۳ شاخساره در گروه b قرار گرفتند. اما بیشترین طول شاخساره (۱۲ میلی‌متر) در یک چهارم غلظت نمک‌های MS به دست آمد (گروه a) و نصف غلظت نمک‌های MS با طول میانگین ۱۰ میلی‌متر در گروه b قرار گرفت (جدول ۱). علی‌رغم این در معمولاً از غلظت‌های کاهش یافته نمک‌های MS برای آغازش رشد ساقه رونده استفاده می‌شود (۱۰)، اما مسلم است که با توجه به نقش‌های متعدد و اساسی این عناصر در رشد و نمو، وجود مقدار اپتیمم آنها برای تقسیم و طویل شدن سلولی، که لازمه تولید شاخساره و نیز افزایش طول آنها است، ضروری است. احتمالاً نصف غلظت نمک‌های MS نسبت به یک چهارم غلظت نمک‌های MS نسبت مناسب‌تری از عناصر معدنی را در مراکز تقسیم سلولی

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱ . مقایسه میانگین اثر غلظت نمک‌های MS بر تعداد و طول شاخساره

صفت تیمار	تعداد شاخساره	طول شاخساره (میلی‌متر)
$\frac{1}{2}$ MS	۵[a]	۸[b]
$\frac{1}{4}$ MS	۳[b]	۱۲[a]
۳گرم در لیتر ساکارز	۵[a]	۱۱[a]
۲۰ گرم در لیتر ساکارز	۴[b]	۸[b]
۲ mg/l BA	۶[a]	۷[b]
۱ mg/l BA	۴[ab]	۸[b]
۰/۲ mg/l BA	۳[b]	۱۵[a]

میانگین‌های دارای حروف [illegible] سطح ۵٪ آزمون دانکن دارای تفاوت معنی دار نیستند.

فراهم می‌کند. در ضمن با مروری بر تحقیق‌های انجام شده [illegible] محیط‌های آغازش ساقه های رونده گونه‌های [illegible] نفرولپیس مشاهده می‌شود که در تمام آزمون‌ها در غلظت‌های کمتر نمک‌های معدنی شاخساره‌ها افزایش طول بیشتری داشته‌اند. به نظر می‌رسد در سرخس بوستونی طویل شدن شاخساره به مقادیر کمتر نمک‌های معدنی نیاز دارد (۱۰ و ۱۹). چون میزان غلظت نمک ها در یک چهارم غلظت MS کمتر است لذا افزایش طول شاخساره در این محیط بیشتر مورد انتظار است.

۲. اثر غلظت‌های ساکارز بر صفات اندازه‌گیری شده

اثر غلظت‌های مختلف ساکارز بر تعداد شاخساره در سطح احتمال ۵ درصد و بر طول شاخساره در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین تعداد شاخساره نشان داد که غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز با تولید میانگین ۵ شاخساره نسبت به ۲۰ گرم در لیتر با میانگین ۴ شاخساره در سطح بالاتری قرار دارد (جدول ۱). طویل‌ترین شاخساره‌ها نیز با میانگین طول ۱۱ میلی‌متر در غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده می‌شود. غلظت ۲۰ گرم در لیتر ساکارز با طول میانگین ۸ میلی‌متر در گروه b قرار می‌گیرد.

این نتایج با نتایج پژوهشگرانی چون بورگن و ناس (۵)، باتل و آلدروف (۶)، پادهیا (۱۵) و زیو (۱۹) مبنی بر مناسب بودن ۳۰ گرم در لیتر ساکارز جهت کشت درون شیشه‌ای سرخس بوستونی مطابقت دارد. در محیط آغازش نفرولپیس [illegible] مشاهده شد که در غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز نه تنها شاخساره بیشتر تولید می‌شود بلکه طول شاخساره‌های تولیدی نیز بیشتر است (۱). همان‌طور که قبلاً اشاره شد، لازمه تولید شاخساره نابجا تولید جوانه نابجا در محل نوک شاخساره است که این خود بیوسنتز و نیز تقسیم سلولی زیادی را در منطقه مریستمی می‌طلبد. بیوسنتز و نیز تقسیم سلولی، نیازمند منبع انرژی غنی مثل ساکارز موجود در محیط کشت است (۱۷). هر چند غلظت خیلی بالای ساکارز به دلیل اثرات منفی ناشی از اسمز بالای محیط کشت، رشد و نمو را مختل می‌کند، اما مقدار بهینه این ماده برای تضمین رشد مناسب در محیط کشت مورد نیاز است (۱۸). همان‌طور که در این تحقیق مشاهده شد افزایش ساکارز در محیط کشت، باعث افزایش تعداد شاخساره تولید شده از هر ساقه رونده می‌شود، اما بین اثر دو غلظت ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز تنها در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد و به نظر می‌رسد غلظت ۲۰

Archive of SID

www.SID.ir

گرم در لیتر ساکارز نیز برای باززایی مناسب ساقه‌های رونده سرخس بوستونی کافی باشد.

۳. اثر غلظت‌های مختلف BA برصفات اندازه‌گیری شده

اثر غلظت‌های BA بر تعداد شاخساره و طول شاخساره اختلاف معنی‌داری نشان داد. با توجه به مقایسه میانگین‌های حاصل از آزمون دانکن، بیشترین تعداد شاخساره در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA با میانگین تولید ۶ شاخساره از هر ساقه رونده مشاهده می‌شود (گروه a) و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA با تولید ۳ شاخساره از هر ساقه رونده کمترین پرآوری را دارد (گروه b). غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BA با بیشترین تولید ۴ شاخساره از نظر آماری با گروه‌های اول و دوم اختلاف معنی‌داری نداشت (گروه ab). تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA با ۱ میلی‌متر طول شاخساره در گروه a و تیمارهای یک و ۲ میلی‌گرم BA در ترتیب با ۷ و ۸ میلی‌متر در گروه b قرار می‌گیرند (جدول ۱).

هرچند گزارش‌های مختلفی درمورد ترکیب هورمونی محیط کشت آغازش ساقه های رونده نفرولپیس وجود دارد اما در کلیه این محیط‌ها استفاده از یک سیتوکنین به تنهایی یا در ترکیب با یک اکسین توصیه شده است. تاکور و همکاران (۱۸) در ریزافزایی ماتوسیا استوتیوپتریس از طریق کشت جوانه‌های جانبی ریزوم این گیاه عنوان کردند که ناحیه نوک جوانه‌ها دارای سلول‌های فعال مریستمی است. این سلول‌ها جوانه‌هایی تولید می‌کنند که تحت تأثیر بافت‌های اطراف در حالت غیرفعال باقی می‌مانند. وقتی تنظیم کننده‌های رشد مناسب در محیط کشت این بافت ها به کار می‌روند، غالبیت انتهایی و حالت غیرفعال جوانه‌ها کنترل شده و فرایندهای متوالی و منظم در بین سلول‌های جوانه‌ها در نهایت منجر به تشکیل آغازه‌های جدید جوانه می‌گردند. به طور مشابه در مورد سرخس بوستونی نیز مشاهده می‌شود که نوک ساقه رونده سرخس بوستونی دارای جوانه است. چون جوانه‌ها محل فعال سنتز اکسین‌ها به شمار می‌روند (۱۹)، پس می‌توان گفت میزان اکسین درونی در محل جوانه‌های ساقه رونده بالا است. در صورت مصرف صحیح مقادیر سیتوکینین‌ها، به‌طوری‌که نسبت مناسبی از هورمون‌های اکسین به سیتوکنین در محیط کشت فراهم شده و در اختیار ریزنمونه ساقه رونده قرار گیرد، نه تنها اثر غالبیت اکسین‌ها خنثی شده بلکه تقسیم سلولی تحریک و تولید جوانه‌های نابجا افزایش خواهد یافت که این خود باعث پرآوری و افزایش تعداد شاخساره می‌شود. همان طوری که در این آزمایش نشان داده شد به نظر می‌رسد مقادیر یک و دو میلی‌گرم در لیتر BA نسبت به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، نسبت مناسب تری از اکسین درونی به سیتوکینین خارجی را برای تولید جوانه‌های نابجای بیشتر فراهم می‌کنند. در غلظت‌های بالای BA نسبت هورمونی ایجاد شده برای افزایش طول سلول‌ها مناسب نیست و بر طویل شدن سلول‌ها اثر بازدارنده دارد که این با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (۷ و ۱۴). برعکس در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA نسبت مناسبی از اکسین به سیتوکینین فراهم شده و باعث افزایش طولی شاخساره‌های تولید شده از ساقه های رونده می‌شود.

۴. همکنشی نمک‌های معدنی MS و ساکارز بر صفات اندازه‌گیری شده

همکنشی نمک‌های معدنی و ساکارز بر تعداد شاخساره در سطح ۵ درصد و بر طول شاخساره در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. با مقایسه میانگین‌های اثر نمک‌های معدنی و ساکارز بر تعداد و طول شاخساره، بیشترین تعداد شاخساره در تیمارهای دارای نصف غلظت نمک‌های MS و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و طویل‌ترین شاخساره‌ها در تیمارهای دارای یک چهارم غلظت نمک‌های MS و ۱۵ گرم در لیتر ساکارز به دست آمد (جدول ۲).

۵. همکنشی نمک‌های معدنی MS و هورمون BA بر صفات اندازه‌گیری شده

همکنشی نمک‌های معدنی و هورمون BA بر تعداد شاخساره در سطح احتمال یک درصد و بر طول شاخساره در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. در مقایسه میانگین‌های تعداد

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲ . مقایسه میانگین اثرات متقابل نمک‌های معدنی و ساکارز بر تعداد و طول شاخساره

صفت / تیمار	تعداد شاخساره	طول شاخساره (میلی‌متر)
$\frac{1}{2}$ MS + ۳۰ g/l ساکارز	۵[a]	۸[c]
$\frac{1}{2}$ MS + ۲۰ g/l ساکارز	۵[a]	۷[d]
$\frac{1}{4}$ MS + ۳۰ g/l ساکارز	۳/۵[b]	۱۴[a]
$\frac{1}{4}$ MS + ۲۰ g/l ساکارز	۳[b]	۱۰[b]

میانگین های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون دانکن دارای تفاوت معنی‌دار نیستند.

جدول ۳ . مقایسه میانگین همکنشی نمک‌های معدنی و هورمون BA بر تعداد و طول شاخساره

صفت / تیمار	تعداد شاخساره	طول شاخساره (میلی‌متر)
$\frac{1}{2}$ MS + ۲mg/l BA	۷	۵[c]
$\frac{1}{2}$ MS + ۱ mg/l BA	۶[ab]	۵[c]
$\frac{1}{2}$ MS + ۰/۵ mg/l BA	۳[c]	۱۳[ab]
$\frac{1}{4}$ MS + ۲ mg/l BA	۴[bc]	۹[bc]
$\frac{1}{4}$ MS + ۱ mg/l BA	۲[c]	۱۰[abc]
$\frac{1}{4}$ MS + ۰/۵ mg/l BA	۲[c]	۱۱[a]

میانگین‌های دارای حروف مشابه، در سطح ۵٪ آزمون دانکن دارای تفاوت معنی دار نیست

شاخساره با آزمون دانکن محیط‌های نصف غلظت MS و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA، نصف غلظت MS و یک میلی‌گرم در لیتر BA از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند و در گروه a قرار گرفتند (جدول ۳). تیمارهای یک چهارم غلظت MS و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA در گروه b قرار می‌گیرند (جدول ۳).

براساس نتایج به دست آمده از اثرات ساده انتظار می‌رود که در تمام تیمارهای دارای نصف غلظت نمک MS تعداد شاخساره بیشتری نسبت به یک چهارم غلظت MS تولید شود، اما همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و یک چهارم غلظت MS تعداد شاخساره بیشتری نسبت به محیط دارای نصف غلظت MS و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA تولید شده است (هرچند که از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت غلظت بالای BA اثر نمک‌های معدنی را تحت‌الشعاع قرار می‌دهد و به همین دلیل تعداد شاخساره بیشتری در یک چهارم غلظت MS به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BA، تولید می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴ . مقایسه میانگین همکنشی ساکارز و هورمون BA بر تعداد و طول شاخساره

صفت / تیمار	تعداد شاخساره	طول شاخساره (میلی‌متر)
۳۰g/l ساکارز + ۲ mg/l BA	۶[a]	۷[b]
۳۰ g/l ساکارز + ۱mg/l BA	۴[abc]	۹[b]
۳۰g/l ساکارز +۰/۵ mg/l BA	۳[bc]	۱۸[a]
۲۰g/l ساکارز +۲ mg/l BA	۵[ab]	۷[b]
۲۰g/l ساکارز + ۱ mg/l BA	۴[abc]	۷[b]
۲۰g/l ساکارز + ۰/۵ mg/l BA	۲[c]	۱۱[b]

میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ آزمون دانکن دارای تفاوت معنی‌دار نیستند.

۶. همکنشی ساکارز و هورمون BA بر صفات اندازه‌گیری شده

همکنشی ساکارز و هورمون BA بر تعداد و طول شاخساره در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. با آزمون دانکن کلیه تیمارهای دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۲ میلی‌گرم BA با میانگین ۶ شاخساره در گروه a قرار گرفت و تیمارهای دارای ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA با میانگین ۵ شاخساره در گروه ab قرار گرفته که با گروه a اختلاف معنی‌داری ندارند. سایر تیمارها نیز در گروه c قرار گرفتند (جدول ۴). کمترین تعداد شاخساره نیز در تیمارهای ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA با میانگین۲ عدد شاخساره تولید شد (گروه d). مقایسه میانگین‌های طول شاخساره نشان داد تیمارهای حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA با میانگین طول ۱۸ میلی‌متر در گروه a و سایر تیمارها در گروه b قرار گرفتند.

همان‌طور که در مورد اثرات ساده مشاهده شد در اینجا نیز اثر غلظت‌های ساکارز مورد استفاده بر تعداد شاخساره چندان بارز نیست. میزان سیتوکینین عامل اصلی موثر بر تعداد شاخساره تولید شده از هر ساقه رونده است به طوری که در غلظت‌های بالاتر سیتوکینین تعداد شاخساره بیشتری مشاهده می‌شود. به طور مشابه در طول شاخساره‌ها نیز می‌توان چنین گفت که اثر غلظت پایین BA (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) بر افزایش طول شاخساره مهم‌تر از اثر ساکارز است، زیرا هرچند افزایش طول شاخساره در غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز باید بیشتر باشد اما در غلظت ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و یک و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA طول شاخساره کم است. بنابراین می‌توان گفت سیتوکینین‌ها عامل مهم‌تری در تعیین تعداد و طول شاخساره هستند.

۷. همکنشی نمک‌های معدنی، ساکارز و هورمون BA بر صفات اندازه‌گیری شده

تجزیه واریانس آثار متقابل نمک‌های معدنی و ساکارز و BA بر تعداد و طول شاخساره تولید شده از ساقه‌های رونده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. در مقایسه میانگین‌های حاصل از آزمون دانکن صفت تعداد شاخساره، محیط‌های MS_1 و MS_2 در گروه a قرار می‌گیرند که محیط‌های MS_4 و MS_5 نیز به ترتیب با حروف abc و b با آنها اختلاف معنی‌داری ندارند. طویل‌ترین شاخساره‌ها در محیط‌های دارای یک چهارم غلظت نمک‌های MS، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA (MS_9) در گروه a تولید شده است (جدول ۵).

تاکنون در هیچ گزارشی همکنشی فاکتورهای فوق بر تعداد و طول شاخساره تولید شده در مرحله آغازش بررسی نشده است. بر اساس نتایج فوق می توان گفت نصف غلظت نمک‌های معدنی MS برای آغازش ساقه‌های رونده سرخس بوستونی مناسب است و ساکارز اثر کمی بر آن دارد و در این غلظت از نمک‌های معدنی تعداد زیاد شاخساره تنها در غلظت‌های بالای BA (یک و ۲ میلی‌گرم در لیتر) تولید می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵ . مقایسه میانگین‌های همکنشی نمک‌های معدنی، ساکارز و بنزیل آدنین در مرحله آغازش رشد ساقه رونده

محیط کشت	تعداد شاخساره	طول شاخساره (میلی‌متر)
MS_1 ($\frac{1}{2}$ MS + ۳۰g/l ساکارز + ۲ mg/l BA)	۷^{a}	۴^{f}
MS_2 ($\frac{1}{2}$ MS + ۳۰g/l ساکارز + 1 mg/l BA)	۵^{abc}	۵^{def}
MS_3 ($\frac{1}{2}$ MS + ۳۰g/l ساکارز + 0.5 mg/l BA)	۳^{de}	۱۶^{b}
MS_4 ($\frac{1}{2}$ MS + 2۰g/l ساکارز + ۲ mg/l BA)	۷^{a}	۶^{def}
MS_5 ($\frac{1}{2}$ MS + 2۰g/l ساکارز + ۱ mg/l BA)	۶^{ab}	۵^{ef}
MS_6 ($\frac{1}{2}$ MS + 2۰g/l ساکارز + ۰,۵ mg/l BA)	۳^{de}	۱۱^{c}
MS_7 ($\frac{1}{4}$ MS + ۳۰g/l ساکارز + ۲ mg/l BA)	۵^{bc}	۱۰^{c}
MS_8 ($\frac{1}{4}$ MS + ۳۰g/l ساکارز + 1 mg/l BA)	۳^{de}	۱۲^{c}
MS_9 ($\frac{1}{4}$ MS + ۳۰g/l ساکارز + 0.5 mg/l BA)	۳^{de}	۲۱^{a}
MS_{10} ($\frac{1}{4}$ MS + 2۰g/l ساکارز + ۲ mg/l BA)	۴^{cd}	۸^{cde}
MS_{11} ($\frac{1}{4}$ MS + 2۰g/l ساکارز + 1 mg/l BA)	۲/۵^{de}	۹^{cd}
MS_{12} ($\frac{1}{4}$ MS + 2۰g/l ساکارز + 0.5 mg/l BA)	۱/۵^{d}	۱۲^{bc}

میانگین‌های دارای حروف مشابه، در سطح ۵٪ آزمون دانکن دارای تفاوت معنی‌دار نیستند.

۸ . بررسی صفات کیفی ارزیابی شده در آغازش رشد ساقه‌های رونده سرخس بوستونی

حدود ۹ روز بعد از کشت در تمامی تیمارهای دارای نصف غلظت نمک‌های MS و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، تورم و جذب آب مشاهده شد. در طی پنج روز بعدی به ترتیب در گروه‌های نصف غلظت MS و ۲۰ گرم بر لیتر ساکارز، یک چهارم غلظت MS، ۳۰ و ۲۰ گرم در لیتر ساکارز تورم نوک ساقه رونده مشاهده شد. ظهور و رشد اولین برگچه‌ها در همه تیمارها به ترتیب در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، یک میلی‌گرم BA و سپس در ۲ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد. در مطابقت با نتایج سایر محققین (۵، ۱۲ و ۱۴) در این تحقیق نیز مشاهده شد که اجسام سبز کروی در کلیه تیمارهای دارای یک و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA تولید شده‌اند به جز در تیمار یک چهارم غلظت MS با ۲۰ گرم در لیتر ساکارز که اجسام سبز کروی فقط در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شدند. مطالعات میکروسکوپی اجسام سبز کروی نشانگر ماهیت مریستمی سلول‌ها در این نواحی است. این سلول‌های مریستمی اغلب شاخساره را شکل می‌دهند. به نظر می‌رسد پس از کشت ساقه های رونده در محیط‌های مختلف، هورمون BA جذب ریزنمونه شده و باعث تقسیم و توسعه سلولی می‌شود که در غلظت‌های بالاتر BA اثر آن بارزتر است. در نتیجه اولین تورم‌ها در محیط‌های حاوی غلظت بالای BA مشاهده شده است. اما در این محیط‌ها انرژی پتانسیل موجود صرف تقسیم و توسعه مراکز رشد مریستمی و در نتیجه تولید جوانه‌های نابجا می‌شود. وجود اجسام سبز کروی نیز که پاسخی به BA و در نتیجه تقسیم سلولی و تولید جوانه‌های نابجا است، تنها در محیط‌های حاوی یک و ۲ میلی‌گرم BA در لیتر مشاهده می‌شود. در مقادیر کمتر BA، تقسیم و توسعه سلولی کندتر صورت گرفته و تولید جوانه‌های نابجا در این تیمار به ندرت مشاهده می‌شود، در نتیجه انرژی این محیط‌ها صرف افزایش طول شاخساره شده و ظهور اولین سرآغازه‌های برگ در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری

غلظت نمک‌های معدنی و هورمون بنزیل آدنین بر تعداد شاخساره اثر مثبت و بر طول شاخساره اثر منفی داشته‌اند به طوری‌که با افزایش غلظت آنها، تعداد شاخساره‌ها افزایش و طول آنها کاهش می‌یابد. اثر غلظت‌های ساکارز به کار رفته در این آزمون بر روی تعداد و طول شاخساره تفاوت زیادی با هم نداشتند. چون تعداد زیاد و طول کوچک شاخساره‌ها برای ریزافزایی مفید است (۶) و معمولاً از شاخساره‌های حاصل از این آزمون برای مرحله تکثیر استفاده می‌شود (۳)، محیط کشت‌های MS_1، MS_2، MS_4 و MS_5 از نظر تعداد و طول شاخساره تفاوت معنی‌داری با هم ندارند. لذا با در نظر گرفتن این مسئله که یکی از نکات مهم و قابل توجه در کلیه مراحل ریزافزایی کاهش هزینه‌ها و مقدار مواد مصرفی است، محیط کشت MS_5 با ترکیب نصف غظت نمک‌های MS، ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و یک میلی‌گرم در لیتر BA با تولید میانگین ۶ عدد شاخساره به طول ۵ میلی‌متر در طول ۶ هفته به عنوان محیط برتر معرفی می‌شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از هم‌فکری و مساعدت آقای مهندس جواد فتاحی مقدم و سرکار خانم مهندس صغری اخگری در کلیه مراحل این پژوهش تشکر می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱. خوشخوی، م. ۱۳۷۴. *روش‌های تکثیر گیاهان زینتی*. انتشارات دانشگاه شیراز.

۲. معاونت‌آموزش و پژوهش سازمان پارک‌ها و فضای سبز شهر تهران. ۱۳۷۹. *تکثیر گیاهان آپارتمانی* (ترجمه). سازمان پارک‌ها و فضای سبز شهر تهران.

3. Anica-Parr, A. J. 2000. Micropropagation of ferns *Pteris vittara* Spore and *Nephrolepis biserrata* runner. http://www.Fern Tissue Culture
4. Bertrand, A. M., M.A. Alberne, H. Fernadez, A. Gonzales and R. Sanchez Tames. 1999. *In vitro* organogensis of *Polypodium cambricun*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 57: 65-69.
5. Borgen, A. K. and S. k. Nass. 1987. Homogenity and plant quality of *In vitro* propagated "*Nephrolepis exaltata* 'Bostoniensis. Acta Horticulturae 212: 433- 438.
6. Buttle, A. and A. Aldrufeu. 1987. Several factors influencing *Nephrolepis* acclim ation. Acta Horticulturea 212: 367-370.
7. Chen,Y., Sh. Lin, S. Daguid,. P. Saribiki and E. Kenaschuk. 2003. Effects of sucrose concentration on elongation of shoot from flax anther culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 72: 181-183.
8. Comloh, M., N. Gogala and R. Ruzic. 1989. The micropropagation of *Nephrolepis exaltata*. Bioloski – Vestnik. 37☹3) 23-33.
9. Cooke, R.C. 1977. The use of an agar substitute in the initial growth of Boston ferns in vitro. Hort Sci. 12(4). 339.
10. Fernandes, H. and M. A. Sevilla. 2003. *In vitro* culture of ornamental ferns. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 1-13.
11. Gonulsen, N., M. Kural E. Ozsezgin and N. Erxan. 1995. *In vitro* propagation of some ferns (*Nephrdepis exaltata*). Anadolu. 5. (2) 64-73.
12. Higochi, H. and W. Amaki. 1989. Effects of 6-banzylaminopurine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through *in vitro* propagation. Scientia Horticulturae 37: 351-359.
13. Higuchi, H., W. Amaki and S. Suzuki. 1987. *In vitro* propagation of *Nephrolepis cordifolia prsel*. Scientia Horticulturae. 32: 105-113.
14. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497.
15. Padhya, M.A. 1987. Mass Propagation of ferns through tissue culture. Acta Horticulturae 212:(II) 645- 649.
16. Pasqual, M., E. Hoshika and J. Susumu Ishida. 1994. Effects of different sucrose and mineral salt concentrations on *in vitro* propagation of *Nephrolepis exaltata*: An ornamental fern. Pesq. Agropes. Bras. Brasilia. 29: 1681-1684.
17. Razdan, M. K. 2003. Introduction to Plant Tissue Culture. 2nd, Science Pub. Inc., USA.
18. Thakur, R.C., Y. Hosoi and K. Ishii. 1998. Rapid *In vitro* propagation of *Matteuccia Stuthiopteris* (L.) Todare –an edible fern. Plant Cell Reports. 18: 203-208.
19. Ziv, M. 2000. Bioreactor Technology for Plant Micropropagation. *In*: Jules Janick (Ed.), Horticultural Reviews. John Wiley & Sons, USA.

Archive of SID

www.SID.ir