بررسی جنبه‌های باززایی درون‌شیشه‌ای بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) و ریشه‌زایی برون‌شیشه‌ای آن

Investigation of Aspects of *In Vitro* Regeneration In African Violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl,) and Its *In Vivo* Rooting

اکرم امیری[۱*]، مینا تقی‌زاده[۲]، محمود شور[۳]، سیدحسین نعمتی[۴] و علی تهرانی‌فر[۵]

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۲/۱۶

چکیده

در این تحقیق، ریزپرآوری ریزنمونه‌های برگی بنفشه آفریقایی در قالب چند آزمایش مستقل مورد بررسی قرار گرفت. مراحل مختلف آزمایش شامل بررسی بهترین روش ضدعفونی سطحی، محیط استقرار ریزنمونه‌ها، تعیین مناسب‌ترین غلظت هورمون برای شاخساره زایی و پرآوری بود. همچنین القاء ریشه‌زایی برون‌شیشه‌ای با استفاده از بسترهای مختلف کشت انجام شد. نتایج نشان داد بهترین تیمار ضدعفونی ریزنمونه‌ها الکل ۷۰ درصد در مدت ۳۰ ثانیه به همراه هیپوکلریت‌سدیم ۱ درصد در مدت ۱۰ دقیقه بود. بیشترین درصد شاخساره‌زایی و پرآوری در محیط‌کشت MS حاوی۲ میلی‌گرم در لیتر BA به‌دست آمد. در مرحله ریشه‌زایی، با حذف ریشه‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای، گیاهچه‌های باززایی شده با موفقیت در شرایط برون‌شیشه‌ای ریشه‌دار شدند. بهترین محیط برای ریشه‌زایی آن‌ها با بلندترین طول ریشه و بیشترین زنده مانی مربوط به محیط پیت-پرلایت پودر شده بود که پس از استقرار کامل گیاهچه‌ها، در شرایط طبیعی به خاک منتقل و در گلخانه نگه‌داری شدند.

واژه‌های کلیدی: باززایی، پرآوری، ریشه‌زایی برون‌شیشه‌ای، محیط‌کشت

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۲. استادیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک
۳. دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۴. استادیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۵. استاد گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
*: نویسنده مسئول Email: Amiri20008@yahoo.com

این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد.

مقدمه

استفاده از روش ریزازدیادی در تکثیر و تولید گیاهان سال‌هاست که مورد توجه محققان قرار گرفته است. از مزایای استفاده از تکنیک کشت بافت در مقایسه با روش متداول قلمه می‌توان تکثیر رویشی هم گروه‌هایی که ازدیاد آن‌ها به روش‌های غیرجنسی دیگر مشکل و یا در بعضی موارد غیرممکن است، تولید گیاهانی یکنواخت و متقارن *سن ویرتن و ویجساندرا*[1] (2007)، نیاز به فضای کمتر برای تکثیر و کاهش آلودگی در محیط تکثیر *بیلکی و کوکینگ*[2] (1981) را نام برد.

گیاه بنفشه آفریقایی با نام علمی *Saintpaulia ionantha* رایج‌ترین جنس شناخته شده در بین گیاهان خانواده جسنریاسه[3] است. این گیاه به خاطر داشتن خصوصیات ویژه، به‌عنوان یک گیاه مدل با ارزش در شرایط درون‌شیشه‌ای مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است (*لینبرگر و دراکنبورد*[4]، 1985). بدون شک اهمیت و ارزش اقتصادی گیاه بنفشه آفریقایی به عنوان یک گیاه گلدانی بسیار زیبا بر تولیدکنندگان تجاری این گیاه در سراسر دنیا پوشیده نیست. گیاهانی از این قبیل، علاوه بر زیبایی بسیار زیاد گل‌ها، به‌دلیل توانمندی تولید گل در طول سال مورد توجه تولیدکنندگان تجاری قرار گرفته‌اند، به‌گونه‌ای که پرورش این گونه گیاهان در حوزه علوم باغبانی به شکل صنعت درآمده است (*لو*[5]، 1997).

درحالی‌که این گیاه به‌طور معمول با استفاده از ازدیاد رویشی قلمه‌های برگی تکثیر می‌یابد، روش‌های ریز ازدیادی برای تولید انبوه گیاهان یکنواخت از جنبه ژنتیکی در مدت زمانی بسیار کوتاه استفاده می‌شود (*سونپوئی و کانچاناپوم*[6]، 2002). به‌ویژه این که برای تکثیر انبوه بنفشه‌های آفریقایی بافت ناهمسان[7] استفاده از کشت بافت امری اجتناب‌ناپذیر خواهد بود (*خان* و همکاران[8]، 2007).

باززایی از طریق شاخساره‌زایی با ریزنمونه‌های مختلف رویشی شامل برگ (خان و همکاران، 2007)، دمبرگ (*مولگارد* و همکاران[9]، 1991) و زایشی شامل دمگل (*بیلکی* و همکاران[10]، همکاران[10]، 1978)، گل (*سونپوئی و کانچاناپوم*، 2002) و با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف از قبیل IAA (ایندول ۳- استیک‌اسید)، NAA (نفتالن استیک‌اسید)، BA (بنزل‌آدنین) و کاینتین در این گیاه صورت گرفته است (*متیلا* و همکاران[11]، 2003). در بیشتر پژوهش‌هایی که بر روی باززایی این گیاه انجام شده، از هورمون‌های BA و NAA با غلظت‌های متفاوت استفاده شده است (*سونپوئی و کانچاناپوم*، 2002 و *مولگارد* و همکاران، 1991). *خان* و همکاران (2007) با سه میلی‌گرم در لیتر BA و یک میلی‌گرم در لیتر NAA موفق به تولید شاخساره و کالوس در بنفشه آفریقایی شدند. *دائود و تاها*[12](2008) نیز با استفاده از ترکیب BA با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و NAA با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر تولید شاخساره نمودند.

در مرحله پرآوری، هدف اصلی افزایش تعداد ریزنمونه‌ها می‌باشد. پژوهش‌ها نشان داده در بیشتر موارد ریزنمونه‌ها که در حقیقت، قلمه‌های جوان برگی می‌باشند، در محیط حاوی یکی از انواع سایتوکینین‌ها با غلظت مناسب قرار گرفته و تعدادی شاخساره[13]حاصل می‌شود (*آسمارا* و همکاران[14]، 2004). به‌طور معمول پرآوری ریزشاخساره‌ها در همان محیط‌کشت باززایی آن‌ها صورت می‌گیرد. *سونپوئی و کانچاناپوم* (2002) غلظت‌های هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BA را به‌عنوان مناسب‌ترین ترکیب جهت باززایی و پرآوری شاخساره در بنفشه آفریقایی معرفی کردند. *پاسکال* و همکاران[15](1996) جهت باززایی از هورمون GA_3 و برای پرآوری از محیط‌کشت فاقد مواد تنظیم‌کننده رشد استفاده کردند و متوسط ۱۴ شاخساره از هر ریزنمونه به دست آوردند. آن‌ها گزارش کردند که در محیط کشت فاقد مواد تنظیم‌کننده رشد، اندازه ریزشاخساره‌ها کوچک‌تر بود، درحالی‌که با استفاده از غلظت دو میلی‌گرم در لیتر GA_3 (اسیدجیبرلیک) نمو ریزشاخساره‌ها مطلوب‌تر بوده، اما پرآوری آن‌ها کمتر می‌شود.

ریشه‌زایی که نقش مهمی در آماده‌سازی ریزشاخساره‌ها برای مرحله سازگاری دارد، در برگیرنده ریشه‌زایی تک ریز شاخساره‌ها در محیط کشتی است که در آن میزان اکسین افزایش و میزان سایتوکینین‌ها کاهش یافته و یا به‌طورکلی

1. Senvirtne and Wijesundara
2. Bilkey and Cooking
3. Gesneriaceae
4. Lineberger and Druckenbrod
5. Lo
6. Sunpui and Kanchanapoom
7. Chimera
8. Khan
9. Molgard
10. Bilkey
11. Mithila
12. Daud and Taha
13. Microshoot
14. Asmara
15. Pasqual

حذف شده است. ریشه‌زایی شاخساره‌های بنفشه آفریقایی در محیط‌های کشت مختلف ریشه‌زایی و با استفاده از هورمون‌های مختلف مطالعه شده است (*اورحیاتی* و همکاران[1]، 2008). استفاده از تیمارهای مکمل مانند تاریکی و یا نور کم جهت تحریک ریشه‌زایی شاخساره‌ها در بعضی منابع گزارش گردیده است (*بیلکی* و همکاران، 1978). برخی مطالعات نشان داده است که استفاده از اکسین جهت ریشه‌زایی شاخساره‌ها موجب به‌وجود آمدن ریشه‌های نابه‌جا روی دمبرگ و یا سطح پهنک-های برگی می‌شود (*سونپوئی و کانچاناپوم*، 2002). هدف از این مطالعه، معرفی بهترین تیمار گندزدایی ریزنمونه‌ها، بررسی و تأثیر ترکیب هورمون‌های مختلف جهت باززایی و پرآوری از قطعات برگی و همچنین مقایسه ریشه‌زایی شاخساره‌های به-دست آمده در شرایط درون‌شیشه‌ای (با تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف) و برون‌شیشه‌ای (با بسترهای کشت مختلف) بوده است و بررسی امکان حذف ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای شاخساره‌ها و ریشه‌دار کردن آن‌ها در محیط برون‌شیشه‌ای بود.

مواد و روش بررسی

تهیه مواد گیاهی و گندزدایی ریزنمونه‌ها

مواد آزمایشی این تحقیق گیاهان بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) بودند که در شرایط محیطی مناسب با رطوبت نسبی ۷۵ درصد و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد نگه‌داری می‌شدند.

مواد گیاهی ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌گیری، با قارچ‌کش بنومیل سه درصد آبیاری شدند. برگ‌های سالم، جوان و توسعه‌یافته همراه با دمبرگ از ردیف‌های میانی گیاهان پایه انتخاب و جدا گردید. برگ‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در داخل بشر با آب روان همراه با چند قطره مایع ظرف‌شویی شست‌وشو داده شدند و به‌منظور استریل سطحی در زیر هود لامینار فلو[2] به بشر استریل منتقل گردیدند. تیمارهای زمانی ۳۰ و ۶۰ ثانیه جهت گندزدایی ریزنمونه‌های برگی با استفاده از الکل ۷۰ درصد اعمال گردید. سپس نمونه‌ها با هیپوکلریت‌سدیم یک درصد در دو زمان ۷ و ۱۰ دقیقه استریل شدند. نمونه‌ها پس از هر تیمار سه مرتبه به‌وسیله آب مقطر استریل و در آخرین مرحله چهار مرتبه شست‌وشو داده شدند. پس از استریل سطحی از هر پهنک برگ با قطع حاشیه، نوک و دمبرگ به تعداد سه ریزنمونه در اندازه ۲×۱ سانتی‌متر جدا گردید. درصد آلودگی ریزنمونه‌ها پس از ده روز ثبت گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل با پنج تکرار و سه مشاهده انجام گرفت.

مرحله استقرار

پس از ضدعفونی سطحی، قطعات برگ به محیط‌کشت MS[3] حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های MS، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و هشت گرم در لیتر آگار کشت شدند. تیمارهای هورمونی مورد استفاده شامل BA با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر، 2,4-D (۲ و ۴ دی‌کلروفنوکسی‌استیک‌اسید) با غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و NAA با غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر به‌صورت تنها و ترکیب BA با 2,4-D و NAA در غلظت‌های ذکر شده به‌کار رفت. pH محیط‌کشت در حدود ۵/۷ ± تنظیم شد و شیشه‌های کشت که هر کدام حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط‌کشت بودند، جهت استریل نهایی به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو گردیدند. کشت سه ریزنمونه مشخص با رعایت قطب‌گرایی در شرایط استریل انجام شد. شیشه‌های کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی ۱۶ ساعت با شدت نور معادل ۳۰۰۰ لوکس نگه‌داری شدند. صفات مورد اندازه‌گیری شامل درصد شاخساره‌زایی، درصد نکروزه شدن و درصد ریشه‌زایی بود. همچنین مقایسه محل تشکیل شاخساره در ریزنمونه‌های باززایی شده به‌صورت درصد محاسبه شد.

مرحله پرآوری

واکشت ریزنمونه‌های باززایی شده پس از شش هفته انجام گرفت. تیمارهای مورد استفاده به‌منظور پرآوری شاخساره، محیط‌کشت MS شامل BA در دو غلظت دو و چهار میلی‌گرم در لیتر بود. میانگین تعداد شاخساره‌ها پس از هشت هفته ثبت گردید. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تعداد تکرار ۱۰ و تعداد مشاهده در هر تکرار پنج بود.

مرحله ریشه‌زایی

واکشت شاخساره‌های انگیزش‌یافته به‌منظور ریشه‌زایی پس از هشت هفته انجام گرفت. برای مقایسه ریشه‌زایی شاخساره‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای و برون‌شیشه‌ای از شاخساره‌های

1. Orhayati
2. laminar flow
3. Murashige–Skoog

یکنواخت استفاده گردید. در شرایط درون‌شیشه‌ای محیط‌کشت MS بدون هورمون در پنج تکرار و چهار مشاهده در هر تکرار اعمال شد. جهت ریشه‌زایی شاخساره‌ها در شرایط برون-شیشه‌ای از هشت نوع محیط جداگانه پیت، پرلایت دانه‌ای، پرلایت پودر شده، پیت-پرلایت پودر شده، ماسه، پوشال برنج و خاک گلدان استفاده شد. تعداد ۲۰ عدد شاخساره درون-شیشه‌ای بدون هیچ تیمار هورمونی در هر یک از این محیط-کشت‌ها در گلدان‌های کوچک کشت گردید و پس از آبیاری آن‌ها برای حفظ رطوبت، روی ظروف با پوشش‌های شفاف پوشانیده شد. همه تیمارها در اتاقک رشد با همان شرایط باززایی ریزنمونه‌ها قرار گرفتند. برای مقایسه بهتر، سعی شد تمامی ریزنمونه‌ها یک اندازه با تعداد برگ ۵ تا ۶ برگ انتخاب گردند. صفات مورد اندازه‌گیری شامل طول ریشه، تعداد برگ، درصد گیاهچه‌های از بین رفته و فاصله آب‌دهی بود. کلیه شاخساره‌هایی که در شرایط درون‌شیشه‌ای و برون‌شیشه‌ای ریشه‌دار شده بودند، پس از انتقال به گلدان‌های بزرگ حاوی پیت+ پرلایت+ ماسه+ کود برگی+ کود حیوانی به‌ترتیب به-نسبت ۱+ ۱+۱+ ۰/۵+ ۰/۵ با کاهش تدریجی رطوبت با محیط جدید سازگار شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت.

تجزیه آماری داده‌ها در کلیه آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین تیمارها به‌وسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

گندزدایی ریزنمونه‌ها

در تیمارهای مختلف گندزدایی ریزنمونه‌های برگی با استفاده از هیپوکلریت‌سدیم ۲۰ درصد تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده شد. با افزایش زمان استفاده از هیپوکلریت‌سدیم میزان آلودگی کاهش یافت. به‌طوری‌که حداکثر آلودگی در تیمار ۷ دقیقه (حدود ۲۰ درصد) و حداقل آلودگی در تیمار ۱۰ دقیقه بود که هیچ‌گونه آلودگی مشاهده نگردید. در این آزمایش بین تیمارهای زمانی ۳۰ و ۶۰ ثانیه الکل ۷۰ درصد به‌همراه هیپوکلریت‌سدیم ۲۰ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. بنابراین، تیمار الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه و به‌دنبال آن هیپوکلریت‌سدیم ۲۰ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌عنوان بهترین تیمار جهت گندزدایی ریزنمونه‌ها در این تحقیق مشخص گردید. طبیعی است که با افزایش زمان استفاده از هیپوکلریت-سدیم آلودگی سطحی برگ‌ها از بین رفته و درصد آلودگی کاهش می‌یابد تا جایی‌که به بافت‌های گیاهی آسیب وارد نشود. *مولگارد* و همکاران (1991) نیز در آزمایشات خود از الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه استفاده کردند. درحالی‌که *متیلا* و همکاران (2003) از الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۱ تا ۲ دقیقه برای گندزدایی برگ‌ها بهره جستند. استفاده از هیپوکلریت‌سدیم هم در غلظت‌های مختلف مانند ۰/۵ درصد به‌مدت ۲۰ (*خان* و همکاران، 2007) و ۱۵ دقیقه (*اورحیاتی* و همکاران، 2008) و ۱ درصد به‌مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه (*متیلا* و همکاران، 2003) برای گندزدایی ریزنمونه‌های بنفشه آفریقایی استفاده شده است.

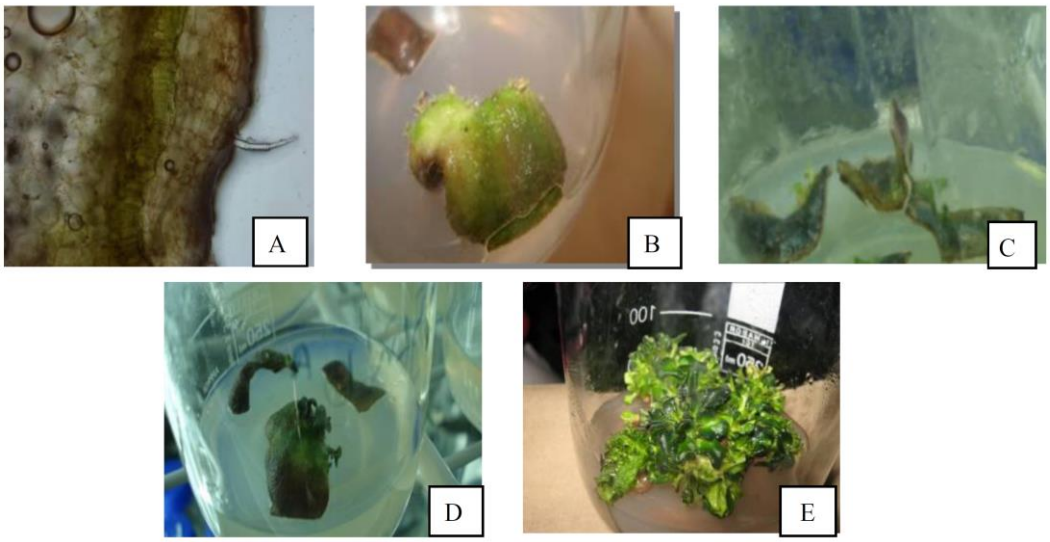
مقایسه باززایی ریزنمونه ها

در کشت قطعات پهنک برگ، تورم پهنک برگ و کالوس (شکل ۱-A) دو هفته پس از کشت، در محل تماس نمونه با محیط-کشت به خصوص در ناحیه رگبرگ اصلی مشاهده گردید. به-طوری‌که به علت تقسیم و رشد سلولی بیشتر در این ناحیه پهنک‌ها حالت قوسی شکل پیدا کردند (شکل ۱-B). در برخی موارد نیز این تورم به سمت داخل بود (شکل ۱-C) و پس از پنج هفته مراکز ریخت‌زایی در سطح پهنک‌ها قابل رؤیت بودند (شکل ۱-D) و در طول هفته‌های هشتم تا دهم شاخساره‌های قابل انتقال به‌دست آمدند (شکل ۱- E).

همان‌طور که در شکل ۲ قابل مشاهده است، بیشترین باززایی در سطح رویی ریزنمونه‌ها و پس از آن در حاشیه‌های قطعات برگ رخ داد. در برخی موارد نیز باززایی شاخساره‌ها در هر دو سطح رو و زیرین برگ و نزدیک دمبرگ دیده شد.

نتایج حاصل از مقایسه تیمارهای هورمونی نشان داد که همه ریزنمونه‌هایی که تحت تیمار هورمونی 2,4-D به صورت تنها و در ترکیب با BA قرار داشتند، پس از گذشت ۱ تا دو هفته از کشت نکروزه شده و همه ریزنمونه‌ها از بین رفته و هیچ شاخساره‌ای تولید نکردند. در سایر تیمارها افزایش غلظت BA تا ۲ میلی‌گرم در لیتر با افزایش شاخساره‌زایی اثر مستقیم و با درصد ریزنمونه‌های از بین رفته اثر معکوس داشت، به‌طوری‌که میزان شاخساره‌زایی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA تا ۹۸ درصد افزایش یافت و با افزایش غلظت تا ۴ میلی‌گرم در لیتر تغییر معنی‌داری در میزان شاخساره‌زایی مشاهده نشد. همچنین در هیچ‌کدام از محیط‌های کشت حاوی BA، اثری از ریشه‌زایی در روی ریزنمونه‌ها دیده نشد. درحالی‌که در

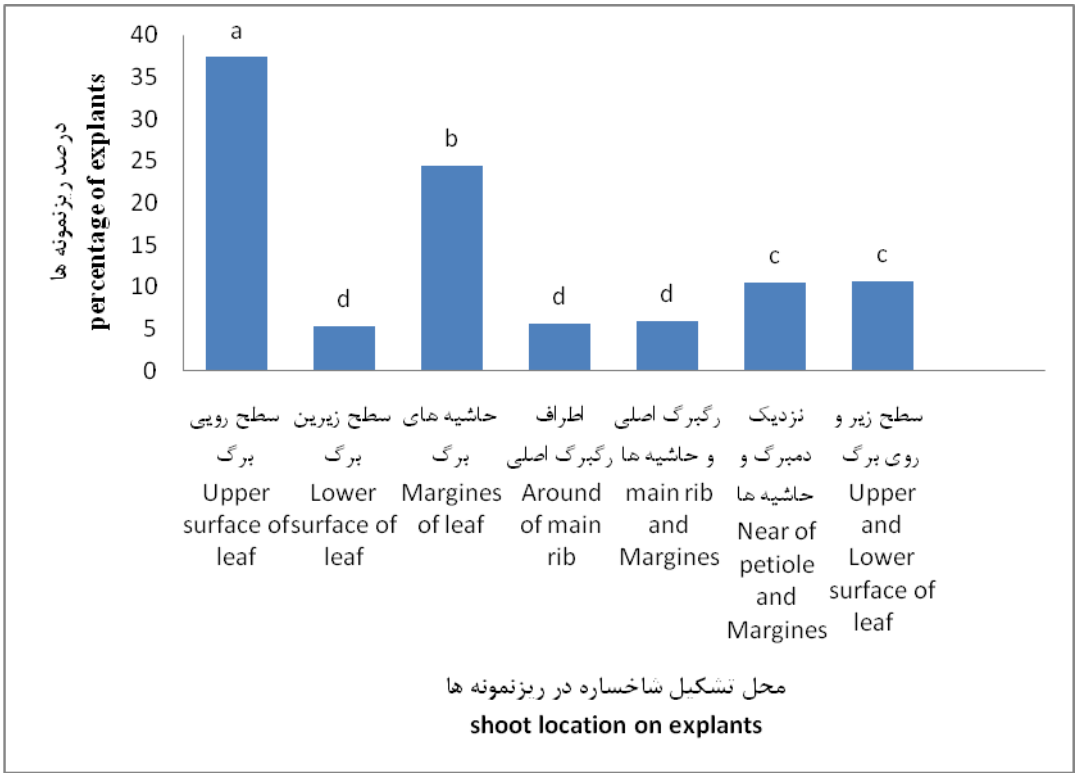
تیمارهای حاوی NAA با افزایش غلظت هورمون NAA نسبت به BA علاوه‌بر تولید شاخساره تولید ریشه افزایش یافت و از تولید شاخساره کاسته شد و در عین حال درصد ریزنمونه‌های از بین رفته نیز افزایش یافت. به‌نظر می‌رسد غلظت‌های بالای NAA منجر به متابولیسم ناقص مواد و ایجاد مواد فنولی شده که این گونه مواد خود بر سرعت مرگ بافت‌ها خواهد افزود (*سونپوئی و کانچاناپوم*، 2002). در مورد سایر تیمارهای ترکیبی BA با NAA نیز همین روند دیده شد. یعنی در تیمارهایی که غلظت BA از NAA بیشتر بود، درصد شاخساره‌زایی افزایش یافت و تا نزدیک به ۹۰ درصد رسید و از میزان تولید ریشه کاسته شد و در مقابل در تیمارهایی که مقدار NAA از BA بیشتر بود، اثر NAA غالب بود و ریشه‌زایی افزایش یافت. ضمن این‌که درصد ریزنمونه‌های از بین رفته نیز افزایش یافت (جدول ۱). در مجموع غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA جهت شاخساره‌زایی از ریزنمونه‌های برگی انتخاب گردید.



شکل ۱: باززایی ریزنمونه‌های برگی بنفشه آفریقایی
Fig. 1: African violet leaf explants regeneration
A- تصویر میکروسکوپی ۱۰X کالوس در کنار بافت برگ
B و C- ریزنمونه‌های برگ ۲ هفته پس از کشت
D- مراکز ریخت‌زایی در سطح برگ پس از ۵ هفته
E- شاخساره‌های قابل انتقال پس از ۸ تا ۱۰ هفته
A. Microscopic images 10 X of Callus on the sides of leaf texture
B and C. Leaf explants, two weeks after culture
D. Morphogenesis centers in leaf surface, after five weeks
E. Transferable shoots, after eight to ten weeks

در اکثر تحقیقاتی که روی گیاه بنفشه آفریقایی صورت گرفته است، از ترکیب این دو نوع هورمون اکسین و سایتوکینین برای باززایی شاخساره استفاده شده است. نتایج *خان* و همکاران (2007) بر روی بنفشه آفریقایی با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. آن‌ها گزارش کردند که در غلظت سه و یک میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب از هورمون‌های BA و NAA تعداد شاخساره بیشتری تولید نمودند. همچنین *دائود و تاها* (2008) با استفاده از ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر BA و دو میلی‌گرم در لیتر NAA به تولید شاخساره بدون ریشه دست یافتند. *تورز*[1] (1989) غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم از هورمون‌های NAA و BA را به‌کار برد. براساس مطالعه او بیشترین تولید شاخساره هنگامی‌که محیط‌کشت، حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ گرم در لیتر BA بود، به‌دست آمد. در غلظت‌های زیاد هورمون NAA از باززایی شاخساره‌ها جلوگیری به‌عمل آمد. به‌نظر می‌رسد که ژنوتیپ و علاوه بر آن شرایط محیطی حاکم بر کشت بافت و نیز وضعیت گیاه مادری می‌تواند اثر بالقوه‌ای بر پاسخ‌دهی ریزنمونه داشته باشد.

1. Torres



شکل ۲: مقایسه محل تشکیل شاخساره در ریزنمونه‌ها

Fig. 2: Comparison of shoot location on explants

محیط‌کشت پرآوری

نتایج تجزیه واریانس، اختلاف معنی‌داری را در سطح ۱ درصد بین غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر BA در رابطه با میانگین تعداد شاخساره ایجاد شده در هر ریزنمونه نشان داد. در مقایسه میانگین، غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین تعداد شاخساره را به خود اختصاص داد (شکل ۲). همانند محیط باززایی با افزایش غلظت هورمون BA میانگین تعداد شاخساره کمتری ایجاد شد که این نتایج با نتایج کیومر و همکاران[1] (2007) مطابقت دارد. در آزمایش آن‌ها با افزایش غلظت BA تا ۲ میلی‌گرم در لیتر بر تعداد شاخساره‌های به‌دست آمده افزوده شد و غلظت‌های بالاتر سایتوکینین پرآوری کمتری نشان دادند. یکی از دلایل محتمل بر اختلافات موجود در غلظت مناسب BA برای بیشترین پرآوری بسته به نوع و میزان هورمون‌های داخلی گیاه می‌باشد.

1 . Kumar

مقایسه ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها

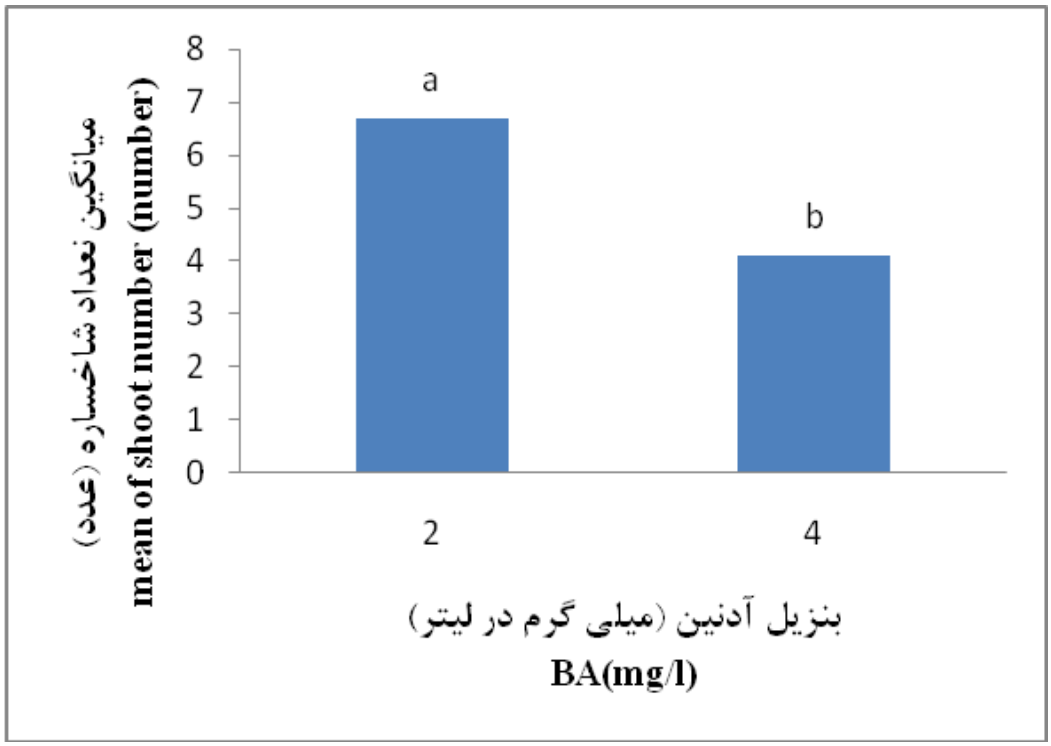
در شرایط برون‌شیشه‌ای بهترین محیط برای ریشه‌زایی شاخساره‌ها محیط پیت- پرلایت پودر شده بود که در مقایسه با محیط‌های دیگر طویل‌ترین ریشه در آن مشاهده شد، ضمن این‌که تعداد برگ بیشتری ایجاد شد و هیچ‌کدام از گیاهچه‌ها از بین نرفتند. در تیمارهای پرلایت دانه‌ای و پرلایت پودر شده نیز تلفاتی وجود نداشت. با این تفاوت که فاصله آب‌دهی در این دو تیمار بسیار کمتر بود. به‌عبارتی آب خود را سریع‌تر از بستر پیت-پرلایت پودر شده از دست می‌دهند. در سایر محیط‌ها طول ریشه‌های ایجاد شده نسبت به محیط پیت و پرلایت پودر شده و پرلایت دانه‌ای بسیار کمتر بود. کوتاه‌ترین طول ریشه در بستر پوشال برنج مشاهده شد. با توجه به این‌که بنفشه آفریقایی نیاز به محیط سبک برای ریشه‌زایی دارد (شجیعی و همکاران[2]، 2006)، انتظار می‌رود که در بستر پوشال برنج به راحتی تولید ریشه کند، درحالی‌که تلفات در این محیط بسیار زیاد بود و کمترین دور آبیاری نیز در این محیط دیده شد. علت آن می‌تواند وجود pH اسیدی در این محیط باشد که اجازه تولید ریشه‌های بیشتر را نداده است. همچنین ظرفیت پایین نگهداری آب در این بستر ممکن است موجب ایجاد تنش

1. Shajee

خشکی در شاخساره‌ها شده باشد. بیشترین تلفات در خاک باغچه و تا ۴۵ درصد بود که احتمالاً به دلیل سنگین بودن این بستر در مقایسه با سایر بسترها می‌باشد. وجود اختلاف فاحش در طول ریشه‌های ایجاد شده بین تیمارهای مختلف نشان می‌دهد که مهم‌ترین فاکتور در ریشه‌زایی شاخساره‌های بنفشه آفریقایی تهویه مناسب و وجود اکسیژن کافی است (شجیعی و همکاران، 2006). چراکه طول ریشه‌هایی که در انتهای محصور شاخساره‌های کشت‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای، درون محیط آگار به‌وجود آمده بود هرگز از ۲ تا ۳ میلی‌متر تجاوز نکرد. درحالی‌که طول ریشه‌های ایجاد شده در محیط‌های گلدانی پرلایت دانه‌ای و پیت- پرلایت پودر شده به ۲۵ میلی‌متر رسید (جدول ۲).

در مورد تعداد برگ‌های ایجاد شده نیز در تیمارهایی که ریشه‌زایی بهتری داشتند متعاقباً تعداد برگ‌های بیشتری تولید کرده‌اند. انتقال و سازگاری شاخساره‌ها در نمونه‌های ریشه‌دار شده در پرلایت دانه‌ای و پیت-پرلایت پودر شده نتایج بهتری نشان دادند. شاخساره‌ها در مدت زمانی کمتر از یک هفته با محیط جدید سازگار شدند و توقف چندانی در رشد بعدی آن‌ها دیده نشد. درحالی‌که شاخساره‌های ریشه‌دار شده در شرایط درون‌شیشه‌ای به‌مدت زمان بیشتری معادل ۳ هفته جهت سازگاری با محیط جدید نیاز داشتند و همچنین تأخیر قابل-توجهی در رشد بعدی آن‌ها مشاهده گردید.

حذف مرحله ریشه‌زایی شاخساره‌های بنفشه آفریقایی در شرایط درون‌شیشه‌ای قبلاً توسط شجیعی و همکاران (2006) گزارش شده است. در تحقیق آن‌ها ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها در شرایط برون‌شیشه‌ای در دو محیط پیت و پرلایت با یکدیگر مقایسه شدند و طبق نتایج آن‌ها میانگین طول ریشه‌های ایجاد شده در محیط پرلایت بیشتر بود و تلفات در این محیط نسبت به محیط پیت کمتر بود. در این تحقیق تعداد محیط‌های بیشتری جهت ریشه‌زایی مورد آزمایش و مقایسه قرار گرفت و در نهایت محیط پیت- پرلایت پودر شده جهت ریشه‌زایی در نظر گرفته شد. حذف مرحله ریشه‌زایی شاخساره‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای به‌دلیل کاهش دوره سازگاری، سادگی روش و کاهش قابل ملاحظه هزینه‌ها و استفاده بهینه از زمان بیانگر ارجحیت آن نسبت به روش‌های درون‌شیشه‌ای جهت ریشه‌دار کردن شاخساره‌های بنفشه آفریقایی می‌باشد.



شکل ۳: اثر سطوح BA بر میانگین تعداد شاخساره در مرحله پرآوری

Fig 3: The effect of BA levels on the mean of shoot number at proliferation stage

جدول ۱: اثر متقابل بنزیل‌آدنین (BA) و نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) بر درصد شاخساره‌زایی، نکروزه شدن و ریشه‌زایی در کشت درون‌شیشه‌ای بنفشه آفریقایی

Table 1: The effects of benzyladenine (BA) and naphthalene acetic acid (NAA) on the *in vitro* shooting, and rooting percentage of African violets

ریشه‌زایی (درصد) Rooting (%)	نکروزه(درصد) Necrotic (%)	شاخساره‌زایی (درصد) Shooting (%)	(mgL^{-1})NAA	(mgL^{-1})BA
0.00e	76.12 a	3.23d	0	
3.23d	56.45b	3.23d	0.25	0
3.23d	77.42a	3.23d	0.5	
3.23d	80.64a	3.23d	1	
0.00e	8.06d	35.48c	0	
20.96d	16.22sd	29.03c	0.25	0.5
96.77a	17.74cd	22.58cd	0.5	
98.38a	19.35cd	9.68de	1	
0.00e	6.45cd	83.87a	0	
16.12cd	14.51cd	87.09a	0.25	
79.03bc	11.29cd	87.09a	0.5	1
93.55a	12.90cd	58.06b	1	
0.00e	6.45cd	98.38a	0	
14.51de	8.07cd	93.55a	0.25	
69.35c	9.67cd	91.93a	0.5	2
82.25b	11.29cd	90.32a	1	
0.00e	8.06d	96.77a	0	
12.90de	6.45cd	90.32a	0.25	
14.51de	9.67cd	88.71a	0.5	4
16.21de	27.42c	87.09a	1	

(میانگین‌هایی که حداقل در یک حرف مشترک هستند، از نظر آماری براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نیستند)

(Means having the same letter are not significantly different based on the Duncan test at the 0/05 level)

جدول ۲: مقایسه میانگین صفت‌های اندازه‌گیری شده در محیط‌های کشت مختلف ریشه‌زایی ۳ هفته پس از کشت گیاهچه‌های باززایی شده بنفشه آفریقایی

Table 2: Comparison of the measured traits of regenerated African violet seedlings 3 weeks after planting in various rooting medias

فاصله آب‌دهی (روز) Irrigation interval (day)	گیاهچه‌های از بین رفته (درصد) Lost seedlings (%)	تعداد برگ Leaf number	طول بلندترین ریشه (میلی‌متر) The lengh of highest Root (mm)	
10a	10.1c	10d	6.2d	پیت Pitt
4e	0.0a	13b	23.9b	پرلایت دانه‌ای Granular Perlite
6d	0.0a	12c	10.3c	پرلایت پودر شده Perlite powdered
10a	0.0a	14a	25.1a	پیت-پرلایت پودر شده Pitt- Perlite powdered
4e	20.1d	10d	5.5e	ماسه Sand
3f	41.1e	7g	1.8h	پوشال برنج Rice bran
5c	45.1f	8f	3.4f	خاک باغچه Garden soil
-	5.1b	9e	2.8g	بدون هورمون Free hormone

(میانگین‌هایی که حداقل در یک حرف مشترک هستند، از نظر آماری براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نیستند)

(Means having the same letter are not significantly different based on the Duncan test at the 0/05 level)

منابع

Asmara, D., Reda, A. and Nabila, S. 2004. Criopservation of African Violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) Shoot tips. Society for *In Vitro* Biology. *In vitro* Cell. Development of Biology Plant, 40: 389-395.

Bilkey, P. C. and Cooking, E. C. 1981. Increased plant vigor by *In Vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. From sub-pidermal tissue. Hortscience, 16(5): 643-644.

Bilkey, P. C., McCcown, B. H. and Hildebrandt, A. C. 1978. Micropropation of African Violet from petiole cross-section. Hort science, 13(1): 37-38.

Cooke, R. C. 1977. Tissue Culture propagation of African Violets. Hortscience, 12(6): 549.

Daud, N., Taha, RM. 2008. Plant regeneration and floral bud formation from intact floral parts of African Violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.) cultured *In Vitro*. Pakistan Jornal of Biology Science, (7): 1055-8.

.Khan, S., Nassb, S. and Ali, K. 2007. Callus induction, plant regeneration and acclimization of AfricanViolet (*Saintpaulia ionantha*) using leaves as explants. Pakistan. Jornal of Botany., 39(4): 1263-1268.

Kumar, V., Prasad, A., Gururaj, B. C. N., Giridhar, H. B., and Ravishankar, G. A. 2007. Direct shoot bud induction and plant regeneration in *Capsicum frutescens* Mill.: influence of polyamines and polarity. Acta Physiologia Plantarum, 29(1): 11-18.

Lineberger, R. D. and Druckenbrod, M. 1985. Chieral nature of the pinwheel flowering African Violets (*saintpaulia*,Gesneriaceae). American. Jornal of Botany, 72(8):1204-1212.

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

Mithila, J., Hall, J. C., Victor, J. M. R. and Saxena, P. K. 2003. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African Violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). Plant Cell Reports., 21: 408-414.

Molgard, J. P., Roulund, N., Eichmann, V. D., Irgens-Moller, L., Andersen, S. B. and.Farestiveit, B. 1991. *In Vitro* multiplication of *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. by homogenization of tissue cultures. Scientis Horticulturae, 48: 285-292.

Orhayati, D., Mat Taha, Z. and Azlina, Z. 2008. Studies on plant regeneration and somaclonal variation in *Saintpaulia ionantha* Wendl. (African Violet). Pakistan Journal of Biological Sciences, 11(9): 1240-1245.

Pasqual, M., Maciel, A. L. D. R. and Silvia, A. B. D. 1996. Rooting of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) shoots: Effect of indolebutyric acid. Ciencia e Agrotecnologia, 20(4): 462-467.

Senvirtne, K. S. C. N and Wijesundara, D. S. A. 2007. First African Violet (*Saintpaulia ionantha* H.Wendl.) with a changing colour pattern induced by mutation. American Journal of Plant Physiology, 2(3): 233-236.

Start, N. D. and Cumming, B. G. 1976. *In Vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha*Wendl. Hortscience. 11(13): 204-206.

Shajee, K., Naderi, R., Khalighi, A. and Tehranifar, A. 2006. Regeneration and shoot proliferation from different explants and comparition of shoots rooting in *In Vitro* and in greenhouse in 16 commerical cultivars of African Violet (*Saintpaulia ionantha*, H. Wendl.). Oloome keshavarzie iran journal, University of Tehran, 37(6): 1103-1113.

Sunpui, W. and Kanchanapoom, K. 2002. Plant regeneration from petiol and leaf of African Violet (*Saintpaulia ionantha*, H. Wendl.) cultured *In Vitro* Songklanakarin. Science Tecnology, 24(3): 357-364.

Torres, K. T. 1989. Tissue culture Techniques for Horticultural Crop. Published by Van Nostrand Reinhold New Yourk.

Vazquez, A. M., Davey, M. R. and Short, K. C. 1977. Organogenesis in culture of *Saintpaulia ionantha*. ISHS Acta Horticulturae. 78: 249-258. Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes.

Investigation of Aspects *of In Vitro* Regeneration In African Violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl,) and Its *In Vivo* Rooting

Amiri[1*], A., Taghizade[4], M., Shoor[2], M., Nemati[3], H. and Tehranifar[5], A.

Abstract

In this study, the microproliferation of leaf explants in African violet was evaluated as several experiments, independently. Different stages of experiments was included study of the best way to disinfect of surface, establishment medium of explants, determination of the most suitable concentration of hormone for shoot regeneration and proliferation. also induction of rooting *in vivo* was done using different media. The results showed that the best treatment for explants disinfection were 70 % ethanol for 30 seconds with 1 % sodium hypochlorite for 10 minutes. The highest percentage of shoot induction and proliferation was obtained on MS medium supplemented with 2 mgL^{-1} BA. In rooting stage, *in vitro* rooting was removed, and regenerated plantlets were successfully rooted *in vivo* conditions. The best medium for rooting was Peat- Perlite powder with the longest root and the most survival. after establishment of the plantlets, they transferred to soil in natural conditions and were kept in the greenhouse.

Keywords: Proliferation, Regeneration, *In Vitro* rooting, Medium

1. Graduate student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad
2. Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Arak, Arak
3. Associate professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad
4. Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad
5. Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad
*: Corresponding author Email: amiri20008@yahoo.com