

## بررسی تأثیر غلظت نمک‌های معدنی، ساکارز و بنزیل آدنین بر آغازش رشد ساقه‌های رونده (*Nephrolepis exaltata* Schott cv. *Bostoniensis*) سرخس بوستونی<sup>۱</sup>

مرضیه شفیعی حاجی‌آباد، یوسف حمید اوغلی و رضا فتوحی قزوینی<sup>۱</sup>

### چکیده

سرخس بوستونی (*Nephrolepis exaltata* Schott cv. *Bostoniensis*) گیاهی است برگساره‌ای و یکی از پرفروش‌ترین گیاهان زیستی گلستانی دنیا به شمار می‌رود. اخیراً کشت درون شیشه‌ای این گیاه به علت محدودیت روش‌های متداول تکثیر، گسترش زیادی یافته است. این تحقیق به منظور تعیین بهترین محیط کشت جهت کشت اولیه و آغازش رشد ساقه‌های رونده گرفت. ساقه‌های رونده گندزدایی شده در دوازده محیط کشت مختلف دارای ۳ غلظت هورمونی (۰/۵٪، ۱٪ و ۲٪ میلی گرم 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. بعد از مدت شش هفته تعداد و طول شاخصاره‌های تولید شده از هر ساقه رونده اندازه‌گیری شد. در طی دوره آزمایش صفات کیفی مثل زمان تورم، زمان ظهور اولین برگچه و وجود اجسام سبز کروی نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. اجسام سبز کروی که در واقع تجمعی از سرآغازه‌های جوانه‌های نابجا هستند در غلظت‌های یک و ۲٪ میلی گرم در لیتر BA مشاهده شدند. حداقل تعداد شاخصاره با طول کوچک در محیط کشت‌های دارای نصف غلظت نمک‌های MS و ۲۰٪ یا ۳۰٪ در لیتر ساکارز و غلظت‌های یک یا ۲٪ میلی گرم در لیتر BA به دست آمد. محیط کشت دارای نصف غلظت نمک‌های MS، ۲۰٪ گرم در لیتر ساکارز و یک میلی گرم در لیتر BA با تعداد میانگین ۶ عدد شاخصاره ۵ میلی‌متری به عنوان محیط برتر معرفی شد.

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

### مقدمه

زیستی کاربرد گسترده‌ای دارد (۱۶). سرخس بوستونی به ندرت تولید هاگ نموده و هاگ تولید شده از آن نیز قابلیت رویش ندارد. در شرایط معمولی از دیاد آن از طریق تقسیم بوته انجام می‌شود. روش متداول از دیاد سرخس بوستونی جداسازی و برداشت شاخصاره‌هایی است که در نتیجه‌ی تماس ساقه‌های

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

<sup>۱</sup>. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار باطنی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

محیط دارای هورمون BA، به سرعت تکثیر شده و با انتقال آنها به محیط بدون هورمون به آسانی تولید شاخصاره 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، بازیابی و رشد ریزنمونه‌های سرخس اعم از اسپور، ساقه رونده و شاخصاره اثر زیادی دارد. گونیولسون 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 اسپروفت (Polypodium combricum) جوان سرخس پلیپودیم کامبریکوم (Polyptilum combricum) را در محیط کشت MS حاوی BA یا کیتین به تهابی و یا در ترکیب با NAA کشت کرده و گزارش کردند که تنظیم کننده رشد نسبت به کیتین یا در ترکیب با NAA در پرآوری این سرخس BA مؤثرتر است و در هر دو نوع ریزنمونه با افزایش میزان BA در محیط کشت، طول شاخصاره‌های تولیدی تا نصف کاهش می‌یابد. زیو (Ziv) (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 ریزافزایی 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 ۴۵-۵۵ سانتی‌متر و تعداد زیادی ساقه رونده بودند استفاده شد. این گیاهان قبل از انتقال به

رونده با خاک شکل می‌گیرد (۱ و ۲). اما شاخصاره‌های 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 Murashige (Murashige and Skoog (M/S)) وجود یا فقدان فسفات‌های آلی و ترکیب هورمون‌های رشد در محیط آغازش، بر پرآوری و کیفیت شاخصاره‌های تولیدی اثر دارد. آنها گزارش کردند که شروع رشد در نصف غلظت نمک‌های MS سریع‌تر اتفاق می‌افتد و طول شاخصاره‌ها در این محیط در مقایسه با MS کامل دارای تفاوت معنی داری است، اما تعداد شاخصاره‌های تولید شده در غلظت کامل نمک‌های MS بسیار معنی‌دار بود و شاخصاره‌های حاصل از نظر شکل و کیفیت نیز از یکنواختی بیشتری برخوردار بودند. آنها استفاده از کیتین و اسید ایندول استیک (IAA) به همراه NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> را در محیط آغازش برای تولید بیشترین تعداد شاخصاره توصیه کرده و طوبیل ترین شاخصاره‌ها (۳۷ میلی‌متر) را در محیط بدون کیتین و دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA به دست آورند. در پژوهشی که روی ریزافزایی نفرولپیس بیسرتا (Nephrolepis bisserata Schott) انجام شد اثر غلظت نمک‌های معدنی محیط MS (MS  $\frac{1}{2}$ ، MS  $\frac{1}{3}$  و MS  $\frac{1}{4}$ )، ساکارز (۱۰ و ۳۰ گرم بر لیتر) و تنظیم کننده‌های رشد اسید نفتالین استیک (NAA) و کیتینین 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 شاخصاره بیشتر و طوبیل 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 میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین (BA)، اجسام سبز کروی (Green globular bodies) (GGB) تولید می‌شود که این اجسام سبز در صورت بازکشتن در

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 کاملاً 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 شده. داده‌های آزمون آغازش رشد ساقه رونده ابتدا با استفاده از برآورد اسکیونس و کورتوسیس 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.

آزمایشگاه به مدت چند هفته در شرایط کنترل شده گلخانه‌ای نگه‌داری شدند. قطعات ساقه رونده (۲-۳ 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 بلا فاصله با آب مقطر استریل شستشو شدند. جهت گندزدایی سطحی نمونه‌ها از سفید کننده وايتکس، ۱۵٪ محتوی ۰/۵٪ 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.

## 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 ساقه رونده معنی دار بود. در مقایسه میانگین‌ها مشاهده می‌شود، 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 ۸ میلی‌متر در گروه b قرار گرفت (جدول ۱). علی‌رغم این که 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 اپتیمیم 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

### 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 ( $\frac{1}{2}$  و  $\frac{1}{4}$  MS) 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 آلدگی 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

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

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

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

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 نفوپیس بیشتر مشاهده شد که در غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز نه تنها شاخصاره بیشتری تولید می‌شود بلکه طول شاخصاره‌های تولیدی نیز بیشتر است (۳). همان‌طور که قبلاً اشاره شد، لازمه تولید شاخصاره نابجا، تولید جوانه نابجا در محل نوک شاخصاره است که این خود بیوستر و نیز تقسیم سلولی زیادی را در منطقه مریستی می‌طلبد. بیوستر 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 شاخصاره 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 معنی دار وجود دارد و به نظر می‌رسد غلظت ۲۰ میلی‌متر در گروه b قرار می‌گیرد.

فرام می‌کند. در ضمن با مروری بر تحقیق‌های انجام شده روی محیط‌های آغازش ساقه‌های رونده گونه‌های مختلف نفوپیس مشاهده می‌شود که در تمام آزمون‌ها در غلظت‌های کمتر نمک‌های معدنی شاخصاره‌ها افزایش طول بیشتری داشته‌اند. به نظر می‌رسد در سرخس بوستونی طویل شدن شاخصاره به مقادیر کمتر نمک‌های معدنی نیاز دارد (۱۰ و ۱۹). چون میزان غلظت نمک‌ها در یک چهارم غلظت MS کمتر است لذا افزایش طول شاخصاره در این محیط بیشتر مورد انتظار است.

۲. اثر غلظت‌های ساکارز بر صفات اندازه‌گیری شده اثر غلظت‌های مختلف ساکارز بر تعداد شاخصاره در سطح احتمال ۵ درصد و بر طول شاخصاره در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود. مقایسه میانگین تعداد شاخصاره نشان داد که غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز با تولید میانگین ۵ شاخصاره نسبت به ۲۰ گرم در لیتر با میانگین ۴ شاخصاره در سطح بالاتری قرار دارد (جدول ۱). طویل‌ترین شاخصاره‌ها 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.

صورت مصرف صحیح مقادیر سیتوکینین‌ها، به طوری که نسبت مناسبی از هورمون‌های اکسین به سیتوکینین در محیط کشت فراهم شده و در اختیار ریزنمونه ساقه رونده قرار گیرد، نه تنها اثر غالبیت اکسین‌ها خشی شده بلکه تقسیم سلولی تحریک و تولید جوانه‌های نابجا افزایش خواهد یافت که این خود باعث پرآوری و افزایش تعداد شاخصاره می‌شود. همان‌طوری که در این آزمایش نشان داده شد به نظر می‌رسد مقادیر یک و دو میلی‌گرم در لیتر BA نسبت به  $0/5$  میلی‌گرم در لیتر BA، نسبت مناسب تری از اکسین درونی به سیتوکینین خارجی را برای تولید جوانه‌های نابجا بیشتر فراهم می‌کند. 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). بر عکس در غلظت  $0/5$  میلی‌گرم در لیتر BA نسبت مناسبی از اکسین به سیتوکینین فراهم شده و باعث افزایش طولی شاخصاره‌های تولید شده از ساقه‌های رونده می‌شود.

۴. همکنشی نمک‌های معدنی MS و ساکارز بر صفات اندازه‌گیری شده همکنشی نمک‌های معدنی و ساکارز بر تعداد شاخصاره در سطح ۵ درصد و بر طول شاخصاره در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. با توجه مقایسه میانگین‌های اثر نمک‌های معدنی و ساکارز بر تعداد و طول شاخصاره، بیشترین تعداد شاخصاره در تیمارهای دارای نصف غلظت نمک‌های MS و  $30$  گرم در لیتر ساکارز و طویل‌ترین شاخصاره‌ها در تیمارهای دارای یک چهارم غلظت نمک‌های MS و  $30$  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 شاخصاره در سطح احتمال یک درصد و بر طول شاخصاره در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بود. در مقایسه میانگین‌های تعداد

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

#### ۳. اثر غلظت‌های مختلف BA بر صفات اندازه‌گیری شده

اثر غلظت‌های BA بر تعداد شاخصاره و طول شاخصاره اختلاف معنی‌داری نشان داد. با توجه به مقایسه میانگین‌های حاصل از آزمون دانکن، بیشترین تعداد شاخصاره در غلظت  $2$  میلی‌گرم در لیتر BA با میانگین تولید  $6$  شاخصاره از هر ساقه رونده مشاهده می‌شود (گروه a) و غلظت  $0/5$  میلی‌گرم در لیتر BA با تولید  $3$  شاخصاره از هر ساقه رونده کمترین پرآوری را دارد (گروه b). غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BA با میانگین تولید  $4$  شاخصاره از نظر آماری با گروه‌های اول و دوم اختلاف معنی‌داری نداشت (گروه ab). تیمار  $0/5$  میلی‌گرم در لیتر BA با  $15$  میلی‌متر طول شاخصاره در گروه a و تیمارهای یک و  $2$  میلی‌گرم BA به ترتیب با  $7$  و  $8$  میلی‌متر در گروه b قرار می‌گیرند (جدول ۱).

هرچند گزارش‌های مختلفی در مورد ترکیب هورمونی محیط کشت آغازش ساقه‌های رونده نفوذ پیش وجود دارد اما در کلیه این محیط‌ها استفاده از یک سیتوکینین به تنها یکی 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 بافت‌ها به کار می‌روند، غالباً 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 فعل سنتز اکسین‌ها به شمار می‌روند (۱۹)، پس می‌توان گفت میزان اکسین درونی در محل جوانه‌های ساقه رونده بالا است. در

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

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

میانگین های دارای حروف مشابه، در سطح ۵٪ آزمون دانکن دارای تفاوت معنی دار نیستند.

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

تیمار	صفت	تعداد شاخصاره	طول شاخصاره (میلی‌متر)
۲mg/l BA + $\frac{1}{2}$ MS		۷ <sup>a</sup>	۵ <sup>c</sup>
۱ mg/l BA + $\frac{1}{2}$ MS		۶ <sup>ab</sup>	۵ <sup>c</sup>
۰/۵ mg/l BA + $\frac{1}{2}$ MS		۳ <sup>c</sup>	۱۳ <sup>ab</sup>
۲ mg/l BA + $\frac{1}{4}$ MS		۴ <sup>bc</sup>	۹ <sup>bc</sup>
۱ mg/l BA + $\frac{1}{4}$ MS		۲ <sup>c</sup>	۱۰ <sup>abc</sup>
۰/۵ mg/l BA + $\frac{1}{4}$ MS		۲ <sup>c</sup>	۱۶ <sup>a</sup>

میانگین های دارای حروف مشابه، در سطح ۵٪ آزمون دانکن دارای تفاوت معنی دار نیستند.

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و یک چهارم غلظت MS تعداد شاخصاره 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 معنی داری با هم ندارند). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت غلظت بالای BA اثر نمک‌های معدنی را تحت الشعاع قرار دهد و به همین دلیل تعداد شاخصاره بیشتری در یک چهارم غلظت MS به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BA تولید شود.

شاخصاره 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 معنی داری 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 شاخصاره بیشتری نسبت به یک چهارم غلظت MS تولید شود، اما

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

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

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

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 شاخصاره کم است. بنابراین می‌توان گفت سیتوکینین‌ها عامل مهم‌تری در تعیین تعداد و طول شاخصاره 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 شاخصاره تولید شده از ساقه‌های رونده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. در مقایسه میانگین‌های حاصل از آزمون دانکن از نظر تعداد شاخصاره، محیط‌های MS<sub>1</sub> و MS<sub>2</sub> در گروه a قرار می‌گیرند که محیط‌های MS<sub>4</sub> و MS<sub>5</sub> نیز به ترتیب با حروف abc و ab با آنها اختلاف معنی‌داری ندارند. طویل‌ترین شاخصاره‌ها در محیط‌های دارای یک چهارم غلظت نمک‌های MS، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA (MS<sub>9</sub>) در گروه a تولید شده است (جدول ۵).

تاکنون در هیچ گزارشی همکنشی فاکتورهای فوق بر تعداد و طول شاخصاره تولید شده در مرحله آغازش بررسی نشده است. بر اساس نتایج فوق می‌توان 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 شاخصاره تنها در غلظت‌های بالای BA (یک و ۲ میلی‌گرم در لیتر) تولید می‌شود.

#### ۶. همکنشی ساکارز و هورمون BA بر صفات اندازه‌گیری شده

همکنشی ساکارز و هورمون BA بر تعداد و طول شاخصاره 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 شاخصاره در گروه a قرار گرفت و تیمارهای دارای ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA با میانگین ۵ شاخصاره در گروه ab قرار گرفته که با گروه a اختلاف معنی‌داری ندارند. سایر تیمارها نیز در گروه c قرار گرفتند (جدول ۴). کمترین تعداد شاخصاره نیز در تیمارهای ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA با میانگین ۲ عدد شاخصاره تولید شد (گروه d). مقایسه میانگین‌های طول شاخصاره 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 شاخصاره چندان باز نیست. میزان سیتوکینین عامل اصلی موثر بر تعداد شاخصاره تولید شده از هر ساقه رونده است به طوری که در غلظت‌های بالاتر سیتوکینین تعداد شاخصاره بیشتر مشاهده می‌شود. به طور مشابه در طول شاخصاره‌ها نیز می‌توان چنین گفت که اثر غلظت پایین BA (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) بر افزایش طول شاخصاره مهم‌تر از اثر ساکارز است، زیرا هرچند افزایش طول شاخصاره در

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

محیط کشت	تعداد شاخصاره	طول شاخصاره (میلی‌متر)
MS <sub>1</sub> ( $\frac{1}{4}$ MS + ۳۰ g/l BA)	۷ <sup>a</sup>	۴ <sup>f</sup>
MS <sub>2</sub> ( $\frac{1}{4}$ MS + ۳۰ g/l BA)	۵ <sup>abc</sup>	۵ <sup>def</sup>
MS <sub>3</sub> ( $\frac{1}{4}$ MS + ۳۰ g/l BA)	۳ <sup>de</sup>	۱۶ <sup>b</sup>
MS <sub>4</sub> ( $\frac{1}{4}$ MS + ۲۰ g/l BA)	۷ <sup>a</sup>	۶ <sup>def</sup>
MS <sub>5</sub> ( $\frac{1}{4}$ MS + ۲۰ g/l BA)	۶ <sup>ab</sup>	۵ <sup>ef</sup>
MS <sub>6</sub> ( $\frac{1}{4}$ MS + ۲۰ g/l BA)	۳ <sup>de</sup>	۱۱ <sup>c</sup>
MS <sub>7</sub> ( $\frac{1}{4}$ MS + ۳۰ g/l BA)	۵ <sup>bc</sup>	۱۰ <sup>c</sup>
MS <sub>8</sub> ( $\frac{1}{4}$ MS + ۳۰ g/l BA)	۳ <sup>de</sup>	۱۲ <sup>c</sup>
MS <sub>9</sub> ( $\frac{1}{4}$ MS + ۳۰ g/l BA)	۳ <sup>de</sup>	۲۱ <sup>a</sup>
MS <sub>10</sub> ( $\frac{1}{4}$ MS + ۲۰ g/l BA)	۴ <sup>cd</sup>	۸ <sup>cde</sup>
MS <sub>11</sub> ( $\frac{1}{4}$ MS + ۲۰ g/l BA)	۲/۵ <sup>de</sup>	۹ <sup>cd</sup>
MS <sub>12</sub> ( $\frac{1}{4}$ MS + ۲۰ g/l BA)	۱/۵ <sup>d</sup>	۱۲ <sup>bc</sup>

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

مریستمی سلول‌ها در این نواحی است. این سلول‌های مریستمی آغازه‌های شاخصاره را شکل می‌دهند. به نظر می‌رسد پس از کشت ساقه‌های رونده در محیط‌های مختلف، هورمون BA جذب ریزنمونه‌ها شده 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 شاخصاره شده و ظهور اولین سرآغازه‌های برگ در تیمار ۵٪ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده می‌شود.

#### 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 و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز تورم نوک ساقه رونده مشاهده شد. ظهور و رشد اولین برگ‌ها در همه تیمارها به ترتیب در غلظت 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

## نتیجه‌گیری

از نکات مهم و قابل توجه در کلیه مراحل ریزافزایی کاهش هزینه‌ها و مقدار مواد مصرفی است، محیط کشت MS<sub>5</sub> با ترکیب نصف غلظت نمکهای MS<sub>5</sub> 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

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

غلظت نمکهای معدنی و هورمون بنتزیل آدنین بر تعداد شاخساره اثر مثبت و بر طول شاخساره اثر منفی داشته‌اند به طوری که 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 کوچک شاخساره‌ها برای 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 (۵) محیط کشت‌های MS<sub>5</sub>, MS<sub>4</sub>, MS<sub>1</sub> و MS<sub>2</sub> از نظر تعداد و طول شاخساره تفاوت معنی‌داری با هم ندارند. لذا با در نظر گرفتن این مسئله که یکی

## منابع مورد استفاده

۱. خوشخوی، م. ۱۳۷۴. روش‌های تکثیر گیاهان زیستی. انتشارات دانشگاه شیراز.
۲. معاونت آموزش 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. Fernandez, A. Ganzales and R. Sanchez Tames. 1999. *In vitro* organogenesis of *Polypodium cambricum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 57: 65-69.
5. Borgen, A. K. and S. k. Nass. 1987. Homogeneity and plant quality of *In vitro* propagated “*Nephrolepis exaltata* ‘Bostoniensis’”. Acta Horticulturae 212: 433- 438.
6. Buttle, A. and A. Aldrufe. 1987. Some factors influencing *Nephrolepis* acclimation. Acta Horticulturae 212: 367-370.
7. Chen,Y., Sh. Lin, S. Daguid., P. Dribnenki 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. Comlooh, 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. Revilla. 2003. *In vitro* culture of ornamental ferns. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 1-13.
11. Gonulsen, N., M. K. Onal E. Ozsezgin and N. Erxan. 1995. *In vitro* propagation of some ferns (*Nephrolepis exaltata*). Anadolu. 5: (2) 64-73.
12. Higuchi, 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. 2<sup>nd</sup>, 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.