مقایسه اثر واکشتها بر میزان موفقیت ریزازدیادی گیاه آناناس (*Ananas comosus* L. *Merr*)

سبحان گائینی [۱]، فرح فراهانی [۲]، فاطمه جمالو [۳]

دانشجوی کارشناسی ارشد علوم گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.

sobhangaeeni88@yahoo.com

عضو هیات علمی گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.

Farahfarahani2000@yahoo.com

عضو هیات علمی گروه جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.

fatemehjamalloo@yahoo.com

چکیده :

پیشرفت های علمی اخیر در زمینه بیوتکنولوژی گیاه آناناس روش های جدیدی را برای ریزازدیادی آناناس، تکثیر انبوه و کاهش هزینه های تولید فراهم ساخته است. در این پژوهش مراحل مختلف ریزازدیادی گیاه آناناس تحت تاثیر غلظت های مختلف هورمونی بررسی و مقایسه شدند. به منظور ریزازدیادی ، مریستم های مورد نظر از گیاه آناناس در شرایط استریل جدا شده و سپس آن را به محیط کشت موراشیگ اسکوگ (MS) با غلظت های مختلف NAA (6 Mgl) – BAP (1-2-3-4-5 Mgl)کشت داده شدند. با افزایش میزان هورمون BAP میانگین طول ساقه (۲ سانتی متر) و نرخ تکثیر (۳ عدد در هر جداکشت) بدست امد و میزان رشد افزایش پیدا کردند.

کلمات کلیدی: گیاهچه آناناس – ریزازدیادی – تنظیم کننده های رشد

مقدمه:

تغییرات ژنتیکی همراه با ریزازدیادی ارقام جدیدی از گیاهان آناناس را بوجود آورده که از نقطه نظر اقتصادی، مقاومت به آفات و بیماری های اساسی بعنوان مهمترین اهداف کاربرد بیوتکنولوژی آناناس هستند. آناناس در مقایسه با سایر میوه های خوراکی کمترین توسعه ژنتیکی را داشته است. تولید گیاه آناناس براساس کولیتوارهای موجود در طبیعت انجام شده است.

از ریزازدیادی برای تکثیر سریع گیاهان با کیفیت بالا و عاری از بیماری ها بطور موفقیت آمیز استفاده شده است و از نظر اقتصادی از سال ۱۹۸۰ در بسیاری ا کشورها بکاررفته است . ریزازدیادی برای تکثیر سریع و توزیع پایه های گیاهی همگن در حجم وسیع و جایگزینی پاجوش ها با منابع اجدادی استفاده می گردد. ریزازدیادی تبادل های بین المللی ژرم پلاسم آناناس را تسهیل می کند،

زیرا پایه ها می توانند در بین نواحی، کشورها و قاره ها بصورت گیاهان عاری از بیماری ها و سترون شده، در محیط جابجا شوند (Sonji et al. 2000).

میوه آناناس بعد از چیدن مقدار اسید آن کم می شود اما کاملا شیرین نمی شود، کنسرو با میوه های کمی اسیدی موفق تر است و تعادل بین قند و اسید برای بازار مصرف کاربرد دارد. نسبت قند به اسید بر حسب ارقام مختلف متفاوت، شرایط رشد و مرحله رسیدگی از ۸۰ تا ۱۰۰ گرم در هر کیلوگرم وزن تر میوه متفاوت است. اسید آسکوربیک در ارقام مختلف از ۲/۵ تا ۱۸۰ گرم در هر کیلوگرم وزن تر میوه متغیراست. گیاه آناناس بدلیل ارتفاع کوتاه قابل کشت در سایه درختان بلند مناطق گرمسیری ازجمله موز و نارگیل است، و از نظر فواصل کاشت (۷۰-۵۰ سانتی متر) فضای زیادی را در هر هکتار اشغال نمی کند. میزان انرژی زایی میوه آناناس با ۵۲-۴۷ درصد کالری می تواند ۴۰ درصد انرژی مورد نیاز بدن انسان را تامین کند. آناناس حاوی آنزیم های پروتئاز ازجمله بروملین است که در سایر میوه ها وجود ندارد و قابل جانشینی با میوه های دیگر نمی باشد. موجب انعقاد خون هنگام خونریزی، درمان بیماریهای قلب و عروق، حفاظت از سرطان، برطرف کننده تومورها، هماتوم ها، محرک انقباض عضلات و تسکین دهنده دردهای عضلانی می شود. در صنایع غذایی بعنوان نرم کننده گوشتهای سفید و قرمز و کنسروهای حبوبات و غلات نقش محافظت کننده را دارد، در تهیه اسانس، شیرینی پزی و صنایع نوشابه سازی برای تولید آبمیوه و کنستانتره مصرف می شود. در صنایع دارویی در تهیه الکل طبی (الکل مطلق با درجه خلوص ۱۰۰ درجه)، داروهای ضد انگلی، ویتامین های خوراکی سنتتیک، داروهای درمان ناراحتی های گوارشی (زخم معده و سنگ کیسه صفرا)، هضم کننده غذا، لینت دهنده روده ها،داروهای آرام بخش و ضد افسردگی، بیماریهای عفونی از جمله مخملک، عفونتهای هنگام سوختگی ها، ضد التهاب های دندان، بازدارنده اشتها و دفع کننده سریع چربی ها و ضد چاقی بکار می رود.

مواد و روش ها

ریزنمونه های جوانه انتهایی گیاهان آناناس *Ananas comosus* L. *Merr* در شرایط مناسب سترون می شوند. محیط کشت MS **(**Murashig, Skoog 1962**)** شامل مواد معدنی پر مصرف و کم مصرف ، مواد آلی مانند اسیدهای آمینه، ویتامین ها و ساکاروز بعنوان منبع کربن است. در این تحقیق بافت مریستمی گیاه آناناس پس از شرایط استریل بر روی محیط کشت MS(Murashig & Skoog, 1962) با هورمون اکسین NAA(**6mgl^{-1}**) و هورمون سیتوکینین BAP (**5mgl^{-1}**) مورداستفاده قرار گرفتند (Farahani, 2012). محیط های کشت MS تهیه شده و به مقدار ۲۰ ml در ظروف آزمایشی توزیع می گردد و با دستگاه اتوکلاو و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد با فشار ۱/۵ $KgCm^{-2}$ سترون می شوند. پس از مریستم برداری

از ریزنمونه های تولید شده آنها را به محیط های کشت مذکور منتقل می کنیم. نمونه های کشت شده را در اتاق رشد در درجه حرارت ۲۸-۲۵ درجه سانتی گراد، با ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نور۳۰۰۰ لوکس قرار می دهیم. پس از 6 هفته نمونه ها به رشد کافی می رسند. از اینرو صفات طول گیاهچه ها، تعداد جوانه های جانبی و وزن گیاهچه ها طی هر واکشت مورد بررسی آنالیزهای آماری قرار می گیرند.

نتایج و بحث:

- بررسی صفات مورفولوژیکی گیاهچه های آناناس (*Ananas comosus* Merr) در واکشت های متوالی:

از شاخص های مورد نظر رشد طول ساقه، و تعداد ساقه مشاهده شد این فاکتورها پس از گذشت ۴۵ روز از انجام کشت مورد بررسی و یادداشت برداری قرار گرفتند. نتایج این چنین نشان داد بیشترین میانگین طول ساقه در واکشتهای اول، دوم و پنجم با طول ۲ سانتی متر باززایی شده بودند و تعداد ساقه در واکشت سوم نسبت به واکشتهای اول و دوم افزایش یافته و بیشترین باززایی تعداد ساقه (۷ عدد از هر گیاهچه) در واکشتهای چهارم و پنجم مشاهده شدند. (جدول۱). ریشه زایی در گیاهچه های آناناس طی واکشتهای متوالی مشاهده نشدند (شکل ۱).

میانگین صفات مورفولوژیکی طول ساقه و تعداد ساقه گیاهچه های آناناس باززایی شده در بین واکشتهای انجام شده و در درون هر واکشت طبق آنالیز ANOVA با سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار بودند (جدول۲)

طبق آنالیز LSD تفاوت میانگین صفت طول ساقه در بین واکشت ۱ با واکشتهای ۲، ۴ و ۵، واکشت ۲ با واکشتهای ۱، ۴ و ۵، واکشت ۳ با واکشتهای ۴و ۵، واکشت ۴ با سایر واکشتها و واکشت ۵ با سایر واکشتها با سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار بودند. (جدول ۳). طبق آنالیز گروه بندی دانکن میانگین طول ساقه و تعداد ساقه در واکشت های ۴ و۵ در یک گروه قرار داشتند و در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار بودند (جدول۱).

از مقایسه واکشتها نتیجه گرفته شد که میانگین طول ساقه در واکشتهای متوالی روند افزایشی نشان ندادند و در واکشتهای سوم و چهارم طول ساقه کوتاهتر بودند و در واکشت پنجم بیشتر از واکشتهای سوم و چهارم بودند، میانگین تعداد ساقه طی واکشتها روند افزایشی داشتند و در واکشتهای ۴و ۵ بیشترین تعداد ساقه باززایی شده بودند (شکل ۲).

از کشت مریستم گیاه آناناس بر روی محیط کشت MS حاوی هورمون های NAA (5 mg/l) و BAP (6 mg/l) گیاهچه های آناناس باززایی کردند و پس از ۵ واکشت دارای طول ساقه (۲ سانتی متر) و تکثیر (۷ عدد در هر جداکشت) بودند که با نتایج گزارشات Farahani et al., (2013) همخوانی دارد. ریزازدیادی آناناس رقم Maspine در مالزی در محیط کشت MS حاوی

هورمون های NAA و BAP انجام شدند که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد (Zuraida et al., 2011). Dutta و همکاران (۲۰۱۳) برای تکثیر آناناس رقم Queen از هورمون های اکسین IAA و سیتوکینین BAP استفاده کردند.

مصرف هورمون BAP برای تکثیر گیاه آناناس توسط محققان تکنیک کشت سلول و بافت Pescador & koller , 1992 ، Kiss et.al., 1995 ، Almeida et al., 1997 ، Guerra et al., 1999 گزارش شده بود. طبق نظر Albuquerque و همکارانش در سال 2000 کاربرد هورمون BAP در محیط کشت MS برای باززایی گیاهان از ریزنمونه های ساقه آناناس با هدف تولید گیاهان عاری از فوزاریوم ضروری است. Paiva و همکارانش در سال 1998 مناسب ترین نتایج را در القای اندام هوایی آناناس رقم Skay را در محیط کشت دارای هورمونهای BAP و TDZ اعلام کرد.

پژوهشگران زیادی موفقیت در ریزازدیادی آناناس را گزارش کردند. مطابق با نظر Drew(1980) ، امکان تولید ۱۲۵۰۰۰۰ گیاهچه در مدت ۸ ماه از ۳۰ عدد جداکشت وجود دارد. Almeida et al. (۱۹۹۷) تاثیر هورمون BAP را بر روی تکثیر *In vitro* آناناس مطالعه کردند و امکان تولید ۶/۵ گیاهچه را از ۱ عدد جداکشت مشخص نمودند. تولید ارقام جدید نسبت به ارقام موجود با تکنیک های باززایی گیاهان آناناس کشت بافت شده امکان پذیر است (Mhatre, 2007)، Almeida et al. (۲۰۰۲) افزایش سرعت تکثیر تعداد ژنوتیپ های خوراکی گزینش شده را فقط با توسعه تکنیک کشت بافت آناناس رقم Merr گزارش کردند، همچنین به این منظور تکنیک های جدید ریزازدیادی انجام شده است (Firoozabady & Gutterson, 2003) و از جداکشتهای مختلف همراه با تغییرات هورمونی متفاوت استفاده شده است (Sonji et al. 2000, 2002, Sripaoraya et al., 2003).

نتیجه گیری:

از کشت مریستم گیاه آناناس بر روی محیط کشت MS حاوی هورمون های(5 mg/l) NAA و (6 mg/l) BAP گیاهچه های آناناس باززایی کردند و دارای میانگین طول ساقه (۲ سانتی متر) و نرخ تکثیر (۳ عدد در هر جداکشت) بودند. در گیاهچه آناناس میانگین افزایش میانگین طول ساقه در واکشت اول ، دوم و پنجم با طول (۲ سانتی متر) مشاهده و باززایی بیشتری نسبت به سایر واکشت ها داشت. در گیاهچه آناناس میانگین افزایش میانگین تعداد ساقه در واکشت چهارم و پنجم با بیشترین باززایی(۷ عدد گیاهچه) مشاهده و باززایی بیشتری نسبت به سایر واکشت ها داشت .

منابع :

1- Almeida W.A.B. de, Matos A.P. de, Souza, A. da S. (1997). Effects of benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Acta horticulturae*, 425: 242-244.

2- Almeida W.A.B. de, Santana G.S., Rodriguze A.P.M., Carvalho Costa M.A.P.de. (2002). Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple, *Sci Elo Brazil, Revista Brasileira Fruticultra,* 24(2): 241-253.

3- Baldotto L.E.B., Baldotto M.A., Giro V.B., Canellas L.P., Olivares F.L., Bressansith R. (2009). Desempenho do abacaxizeiro `Vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimatação. R. Bras. Ci. Solo, 33:979-990.

4- Baldotto L.E.B., Baldotto M.A., Olivares F.L., Viana A.P., Bressansmith R. (2010). Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro *(Ananas comosus L. Merrill) cultivar Vitória durante a* aclimatização. R. Bras. Ci. Solo, 34:349-360.

5- Barroso P. A. V., Moura G. E. D. D., Britto L. K. F., Martins C. P., Macedo C. E. C., Lopes D. B., Aloufe M. A. I. (2003). Efeito do cultivo *in vitro*na presença de NaCl em plantas de abacaxizeiro na fase de aclimataçمo. Revista Brasileira de Engenharia Agrىcola e Ambiental, Campina Grande: PB, 7(3): 473-477.

6- Barboza S.B.S.C., Graciano Ribeiro D., Teixeira J.B., Portes T.A., Souza L.A.C. (2006). Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. Pesq. Agropec. Bras., 41:185-194.

7- Bartholomew D.P., Malezieux E.P. (1994). Pineapple. In: Schaffer, B. and Anderson, P.c. (eds) *Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops*, Vol. II, Subtropical and Tropical Crops, CRC Press, Boca Raton, florida, 243-291.

8- Bregonic I.del., Reis E.F.dos. (2008). Evaluation of the foliar and radicular growth of the micropropagated palntlets of the pineapple cv. Gold in acclimatization, Abacaxieiro 36(3): 87-96.

9- Cunha G.A.P.da, Maatos A.P. de, Cabral J.R., Souza L.F. da S., Sanches N.F., Reinhardt D.H.R.C. (1994). Abacaxi para exportaco: aspectos tecnicos da producao. *Brasilia, DF: Embrapa/SPI,* 41 p. (Serie Publicacoes Tecnicas Frupex, 11).

Cunha G. A. P. (1999). Aspectos agroclim ل10- Cunha G. A. P., Cabral J. R. S., Souza L. F. S. (Org.). O abacaxizeiro: cultivo, agroind ة5tria e economia. Brasilia: EMBRAPA, p. 53-66.

11- Drew R.A. (1980). Pineapple tissue culture unequalled for rapid multiplication. Queensland Agr. J. Brisbane, 106 (5): 447-451.

12- Drew R.A., Smith M.K., Anderson, D.W. (1992). Field evaluation of micropropagated bananas derived from plants containing banana bunchy-top virus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 28: 203-205.

13- Firoozabady E., Gutterson N. (2003). Cost effective *in vitro* propagation methods for pineapple. Plant Cell. Rep. 21: 844-850

14- George E.F. (1993). Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd., Edington, England. pp.57414-

15- George E.F., Sherrington P.D. (1984). Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd., Basingstock, England. pp.478

16- Heylen C., Vendrig J.C., Van onckelen H. (1991). The accumulation and metabolism of plant growth during organogenesis in cultures of thin cell layers of Nicotiana tabacum. Physiologia Plantarum, 83: 578-584.

17- Jain S.M. (1997). Micropropagation of selected somaclones of *Begonia* and *Saintpaulia*. J. BioSci. 22(5): 585-592.

18- Kiss E., Kiss J., Gyulai G., Heszky L.E. (1995). A novel method for rapid micrpropagation of pineapple. *HortScience*, Alexandria, 30(1):127-129.

19- Leal F., Coppens d´Eeckenbrugge G. (1996). Pineapple. In: janick, J. and Moore, J.N. (eds) Fruit Breeding, Vol. I, *Tree and Tropical Fruits*. John Wiley & Sons, New York, pp. 515-557.

Malavolta E. (1980). Elementos de nutriçم o mineral de plantas. Piracicaba: CERES, p. 219-251.

Marler T.E. (2011). Leaf exchange of pineapple as influenced by fruits. Acta Hort. 902, ISHI. 239-243.

20- Moreira M. A. (2001). Produçم o e aclimatizaçم o de mudas micropropagadas de abacaxizeiro: *Ananas comosus* (L) Merrill cv. Pérola. Lavras: 2001. 81 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – UFLA.

21- Murashige T., Skoog F. (1962). Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*.15:473-493.

22- Omokolo N.D., Tita F.M.A., Niemenak N. (2001). Direct in vitro regeneration of Ananas comosus (L.) Merril var. Cayenne from crowns cultivated in liquid medium. Fruits 56: 415-421.

23- Paiva P.D. de O., Mayer M.D.B., Kawamura M.I., Pasqual M., Paiva R. (1999). Efeito de BAP, thidiazuron e sulfato de adenine na propagacao *in vitro* de abacaxi. *Revista Ceres, Vicosa*, 49(265): 231-237.

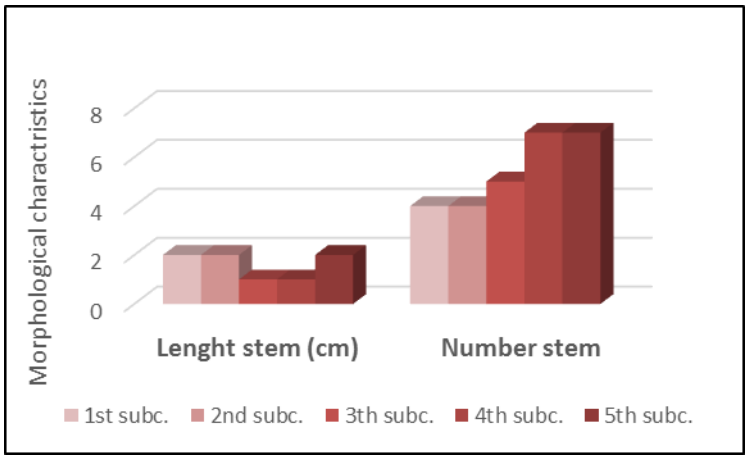
24- Piccolo A. (2001). The supramolecular structure of humic substances. Soil Sci., 166:810-832,

25- Pierik R.L.M., Steegmans H.H., Hendriks J. (1984). The influence of naphtaleneacetic acid on the growth of *in vitro* cultivated seedling of *Bromeliaceae.* Sci. Hortic. 24: 193-199.

26- Pierik R.L.M. (1978). In vitro culture of higher plant. *Martinus Nijhoff Publishers, Boston*. pp. 13.

شکل ۱- گیاهچه های آناناس باززایی شده طی واکشتهای متوالی (۱: واکشت اول، ۲: واکشت دوم، ۳: واکشت سوم، ۴: واکشت چهارم، ۵: واکشت پنجم)

شکل۲- میانگین صفات طول ساقه و تعداد ساقه در گیاهچه های آناناس در واکشتهای متوالی



جدول ۱- میانگین صفات مورد بررسی در گیاهچه های آناناس طی واکشتهای متوالی

میانگین تعداد ساقه	واکشت	میانگین طول ساقه	واکشت
۱/۰۰a	۴	۱/۰۰a	۴
۱/۰۰ab	۳	۱/۰۰ab	۳
۲/۰۰bc	۲	۲/۰۰bc	۲
۲/۰۰bc	۱	۲/۰۰bc	۱
۲/۰۰c	۵	۲/۰۰c	۵

جدول ۲- آنالیز واریانس (ANOVA) میانگین صفات مورد بررسی گیاهچه های آناناس در واکشتها

معنی دار	فراوانی	مجموع میانگین	انحراف معیار	مجموع مربعات		
۰/۰۰۲	۴	۰/۰۰	۴	۳/۰۰	در بین واکشتها	**میانگین طول ساقه (cm)**
		۰/۰۰	۴۳	۸/۰۱۹	درون واکشتها	
			۴۷	۱۱/۰۰	کل	
۰/۰۰	۷	۲۶/۰۰	۴	۱۰۷/۰۰	در بین واکشتها	**میانگین تعداد ساقه**
		۳/۰۰	۴۳	۱۵۴/۰۰	درون واکشتها	
			۴۷	۲۶۲/۰۰	کل	

تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ($p< ۰/۰۵$) است.

جدول ۳ - میانگین صفات مورد بررسی در گیاهچه های آناناس در واکشتها طبق آنالیز حداقل تفاوت میانگین ها (LSD)

صفات	واکشت (I)	واکشت (J)	تفاوت میانگین ها (I-J)	معنی دار
میانگین طول ساقه (cm)	1.00	2.00	.03750	.000
		3.00	.000	.065
		4.00	.000*	.006
		5.00	.000	.000
	2.00	1.00	-.03750	.000
		3.00	.000	.077
		4.00	.000*	.007
		5.00	.000	.000
	3.00	1.00	.000	.065
		2.00	.000	.077
		4.00	.000	.000
		5.00	.000*	.007
	4.00	1.00	.000*	.006
		2.00	.000*	.007
		3.00	.000	.000
		5.00	.000*	.000
	5.00	1.00	.000	.000
		2.00	.000	.000
		3.00	.000*	.007
		4.00	.000*	.000
میانگین تعداد ساقه	1.00	2.00	.000	.000
		3.00	.000	.000
		4.00	-2.000*	.002
		5.00	-3.000*	.001
	2.00	1.00	.000	.000
		3.00	.000	.000
		4.00	-3.100*	.001
		5.00	-3.000*	.000
	3.00	1.00	.000	.000
		2.00	.000	.000
		4.00	-2.000*	.005
		5.00	-2.000*	.002
	4.00	1.00	2.00*	.002
		2.00	3.100*	.001
		3.00	2.000*	.005
		5.00	.000	.000
	5.00	1.00	3.000*	.001
		2.00	3.000*	.000
		3.00	2.000*	.002

		4.00	.000	.000

تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد (p< ۰/۰۵) است.