




اثر تیمارهای مختلف سترون سازی و نوع جوانه بر رشد اولیه آناناس رقم MD2 در شرایط درون شیشه ای

Effect of Different Disinfection Treatments and Bud Type on Growth Initiation of Pineapple cv. MD2 in *In Vitro* Conditions

مریم بروجردنیا^{۱*} , ابراهیم سابکی^۲ و سید ناصر موسوی^۳

- ۱- استادیار، پژوهشکده خرما و میوه های گرمسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.
- ۲- استادیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایرانشهر، ایران.
- ۳- کارشناس تحقیقاتی، پژوهشکده خرما و میوه های گرمسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۵

چکیده

بروجردنیا، م.، سابکی، م. و موسوی، س. ن. ۱۴۰۳. اثر تیمارهای مختلف سترون سازی و نوع جوانه بر رشد اولیه آناناس رقم MD2 در شرایط درون شیشه ای. نهال و بذر: ۲۱۰-۱۹۳

این پژوهش به منظور بررسی شرایط بهینه برای شروع کشت جوانه آناناس رقم MD2 در شرایط درون شیشه ای با اجرای سه آزمایش مختلف انجام شد. در آزمایش اول، اثر تیمار سترون سازی بر آلودگی، مرگ و میر و میزان بقای ریزنمونه ها بررسی شد. هیپوکلریت سدیم و اتانول، به تنهایی یا در ترکیب، برای سترون سازی ریزنمونه ها در غلظت ها و مدت زمان های مختلف: هیپوکلریت سدیم دو و نیم درصد کلر فعال به مدت پنج، ۱۰ و ۱۵ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به مدت سه، پنج و هفت دقیقه، هیپوکلریت سدیم یک درصد کلر فعال به مدت ۱۰ دقیقه + اتانول ۷۰ درصد به مدت سه دقیقه و هیپوکلریت سدیم دو و نیم درصد کلر فعال به مدت ۱۵ دقیقه + اتانول ۷۰ درصد یک دقیقه استفاده شد. در آزمایش دوم، جوانه ها بر اساس موقعیت آنها بر روی ساقه آناناس به پنج گروه: جوانه انتهایی، جوانه های قسمت اول، جوانه های قسمت دوم، جوانه های قسمت سوم، جوانه های بخش چهارم تقسیم شدند تا بیشترین میزان رشد جوانه مشخص شود. در آزمایش سوم، اثر غلظت های مختلف بنزیل آدنین شامل: صفر، ۰/۱، ۰/۵ و یک میلی گرم در لیتر به تنهایی یا همراه با ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر اسید نفتالین استیک بر رشد جوانه ها بررسی شد. کلیه کشت ها در دمای ۲۶ ± ۲ درجه سانتی گراد، شدت نور ۳۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که هیپوکلریت سدیم دو و نیم درصد کلر فعال به مدت ۲۰ دقیقه بیشترین تأثیر را برای سترون سازی جوانه های آناناس داشت. کلیه غلظت های بنزیل آدنین مورد استفاده باعث رشد جوانه ها شد، ولی غلظت سه میلی گرم در لیتر بیشترین تأثیر را داشت. محیط فاقد تنظیم کننده های رشد کمترین میزان رشد جوانه را داشتند. جوانه های انتهایی و جوانه های جانبی بخش سوم به ترتیب با ۹۳ درصد و ۹۲ درصد بیشترین میزان رشد را داشتند.

واژه های کلیدی: آناناس، بنزیل آدنین، جوانه انتهایی، کشت بافت، هیپوکلریت سدیم.

تلفن: ۰۹۴۲۶۰۰۱۷۵۲

* نگارنده مسئول: boroujerdnia@gmail.com



2024© Seed and Plant. This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

مقدمه

آناناس یکی از مهمترین میوه‌های مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان است. آناناس [*Ananas comosus* (L.) Merr.] گیاهی تک لپه‌ای چندساله از خانواده Bromeliaceae می‌باشد. ارقام تجاری این گیاه از طریق غیرجنسی تکثیر می‌شود و از اندام‌ها و قسمت‌های متفاوت این گیاه شامل تاج، اسلیپ، هپا، تنه جوش و پاجوش برای ازدیاد آن مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sen, 1990). یکی از مشکلات تکثیر آناناس به روش سنتی، محدودیت تعداد پاجوش و عدم یکنواختی در اندازه و وزن آن‌ها می‌باشد که در سطح وسیع پاسخگوی تامین مواد گیاهی مناسب برای کشت نمی‌باشد و اغلب گیاهچه‌ها کیفیت پائینی دارند.

ریزازدیادی روشی است که برای تولید سریع گیاهان جدید به ویژه در ارقام تجاری حاصل از برنامه‌های به نژادی آناناس را دارد. موفقیت استفاده از این روش به عواملی مانند ژنوتیپ، نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد، نوع و سن فیزیولوژیکی ریزنمونه و نوع محیط کشت بستگی دارد (Shamim et al., 2016). سرعت تکثیر پایین، زمان بر بودن فرایند تولید و امکان انتقال بیماری‌های ویروسی از مهمترین مشکلات تکثیر به روش سنتی می‌باشد. پژمردگی ناشی از ویروس پژمردگی شپشک آرد آلود آناناس (Pineapple mealybug wilt-associated virus) یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌ها است که در روش تکثیر سنتی امکان انتقال آن وجود

دارد و توسط شپشک‌های آرد آلود (*D. neobrevipes* و *Dysmicoccus brevipes*) رخ می‌دهد و باعث زیان قابل توجهی در تولید می‌شود (Cunha, 2005)، بنابراین روش تکثیر سنتی منجر به افزایش انتقال بیماری‌هایی می‌گردد.

مور و همکاران (Moore et al., 1992) اولین پروتوکل تکثیر آناناس از طریق کشت بافت را ارائه دادند. در ریزازدیادی، مرحله آغازین کشت مهمترین و حیاتی‌ترین مرحله است (Daud et al., 2012; Vujovic et al., 2012). در این مرحله امکان آلودگی میکروبی (از قبیل آلودگی قارچ‌ها و باکتری‌ها) به علت انتقال نمونه از محیط بیرون به آزمایشگاه وجود دارد. در صورت عدم کاربرد روش‌های مؤثر سترون‌سازی ریزنمونه، آلودگی به محیط کشت بافت غنی از مواد غذایی راه یافته و به شدت تکثیر می‌شود و منجر به مرگ ریزنمونه خواهد شد (Cassels, 1991). برای از بین بردن عوامل میکروبی کاربرد آنتی بیوتیک‌ها و عوامل ضدقارچی در محیط کشت توصیه نمی‌شود، زیرا می‌توانند منجر به مقاومت میکروبی شوند و همچنین ممکن است برای ریزنمونه‌ها مضر باشند (Habiba et al., 2002).

معمولاً روش‌های سترون‌سازی سطحی ریزنمونه‌ها برای کنترل عوامل میکروبی ترجیح داده می‌شود و به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است (Khan et al., 2004). برای

گزارش کردند که استفاده از محیط کشت MS به همراه BA در غلظت پنج میکرومول و سه میکرومول اسید نفتالین استیک (NAA)، بیشترین تعداد گیاهچه تولید شد.

المیدا و همکاران (Almeida *et al.*, 2002) اثر غلظت BA (صفر، یک و نیم و سه میلی گرم در لیتر) بر پرآوری آناناس رقم پرولا (Pérola) مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که در محیط کشت مایع به همراه بنزیل آمینو پورین (BAP) در غلظت یک و نیم میلی گرم در لیتر بیشترین تعداد شاخه تولید شد. آتویا و همکاران (Atawia *et al.*, 2016) گزارش کردند که در رقم اسموت کاین (Smooth Cayenne) در غلظت‌های مختلف BAP در غلظت دو میلی گرم در لیتر بیشترین تعداد شاخه ایجاد شد.

این پژوهش به منظور تعیین تیمار سترون‌سازی مناسب برای شروع کشت ریزنمونه‌ها و غلظت بهینه بنزیل آدنین برای رشد آغازین جوانه‌های حاصل از پاجوش آناناس انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش شامل سه آزمایش مختلف بود:

آزمایش اول: بررسی اثر نوع ماده سترون

سازی بر میزان آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه

در این آزمایش پاجوش‌های آناناس رقم

MD2 از محیط گلخانه به آزمایشگاه کشت بافت

سترون‌سازی سطحی ریزنمونه‌ها از چندین ماده سترون‌سازی کننده از قبیل اتانول، هیپوکلریت سدیم و کلرید جیوه استفاده شده است (Almeida *et al.*, 2002). با این حال، غلظت‌های مختلف اتانول، هیپوکلریت سدیم و کلرید جیوه می‌تواند آثار متفاوتی بر سترون‌سازی جوانه‌های آناناس داشته باشند. نلسون و همکاران (Nelson *et al.*, 2015) نشان دادند که کاربرد هیپوکلریت سدیم دو درصد کلر فعال به مدت ۲۵ دقیقه باعث آسیب به جوانه‌های آناناس و کاهش رشد آن‌ها شد. علاوه بر این غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بسته به نوع ریزنمونه مورد استفاده ممکن است نتایج متفاوتی بر رشد ریزنمونه آناناس داشته باشد. سایتوکنین‌ها به تنهایی یا در ترکیب با اکسین‌ها برای تحریک به رشد جوانه‌ها استفاده شده‌اند (Bissah *et al.*, 2009).

نوزورایدا و همکاران (Zuraida *et al.*, 2011) نشان دادند که در ریزازدیادی آناناس رقم مسپین (Maspine) در محیط کشت موراشینگ و اسکوگ (MS) حاوی بنزیل آدنین (BA) با غلظت پنج میلی گرم در لیتر میزان نمو شاخه افزایش معنی‌داری داشت. بادو و همکاران (Badou *et al.*, 2018) گزارش کردند استفاده از بنزیل آدنین به محیط کشت منجر به افزایش رشد جوانه شد. عثمان و همکاران (Usman *et al.*, 2013) در ریزازدیادی آناناس

سپس جوانه‌های گندزدایی شده بر روی محیط کشت پایه موراشیج و اسکوگ (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ساکارز (سه درصد)، آگار (۰/۷ درصد) به همراه ۰/۵ میلی گرم بنزیل آدنین (BA) و ۰/۱ میلی گرم در لیتر اسید نفتالین استیک (NAA) با pH= ۵/۸ قرار گرفتند. کشت‌ها به صورت روزانه از نظر آلودگی و رشد جوانه‌ها به مدت پنج هفته ارزیابی شدند. پس از حدود یک ماه نسبت به اندازه گیری درصد آلودگی و رشد ریزنمونه‌ها اقدام شد و بهترین تیمار سترون‌سازی ریزنمونه تعیین شد. این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و چهار مشاهده در هر تکرار انجام شد.

آزمایش دوم: بررسی اثر موقعیت جوانه پاجوش بر میزان رشد جوانه

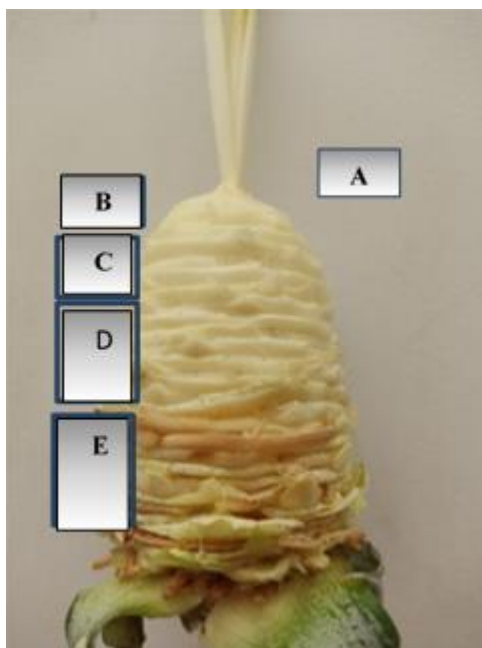
در این آزمایش جوانه‌های پاجوش بر اساس موقعیت قرار گیری بر روی ساقه به پنج گروه تقسیم شدند:

- (A) جوانه انتهایی، جوانه‌های قسمت اول (B)
- (جوانه‌های ۲۰ درصد ابتدای پاجوش)،
- (جوانه‌های قسمت دوم (C) (جوانه‌های ۲۰ درصد دوم پاجوش)، جوانه‌های قسمت سوم (D) (جوانه‌های ۳۰ درصد سوم پاجوش)،
- (جوانه‌های قسمت چهارم (E) (جوانه‌های ۳۰ درصد انتهایی پاجوش) (شکل ۱).

پژوهشکده خرما و میوه‌های گرمسیری منتقل شدند. برگهای پاجوش‌ها با دقت جدا شدند و به منظور حذف گرد و غبار در آب جاری به همراه چند قطره مایع ظرفشویی به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس ریزنمونه‌های مکعبی شکل حاوی جوانه با استفاده از چاقوی جراحی از محورهای پاجوش جدا شدند. ریزنمونه‌های جوانه با آب مقطر استریل به مدت پنج دقیقه شستشو شدند. سپس به منظور سترون‌سازی به هود لامینار انتقال داده شدند. هشت تیمار سترون‌سازی ریزنمونه‌ها به شرح ذیل بود:

هیپوکلریت سدیم دو و نیم درصد کلر فعال به مدت پنج دقیقه، هیپوکلریت سدیم دو و نیم درصد کلر فعال به مدت ۱۰ دقیقه، هیپوکلریت سدیم دو و نیم درصد کلر فعال به مدت ۱۵ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به مدت سه دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به مدت پنج دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به مدت هفت دقیقه، هیپوکلریت سدیم دو و نیم درصد کلر فعال به مدت ۱۵ دقیقه + اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم یک درصد کلر فعال به مدت ۱۰ دقیقه + اتانول ۷۰ درصد به مدت سه دقیقه.

برای تیمارهای مختلف سترون‌سازی، آبخشویی پایانی ریزنمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل به مدت پنج دقیقه انجام شد.



شکل ۱- تقسیم بندی جوانه های آناناس بر روی ساقه. A: جوانه انتهایی، B: جوانه های قسمت اول، C: جوانه های قسمت دوم، D: جوانه های قسمت سوم، E: جوانه های قسمت چهارم
 Fig. 2. Categorization of pineapple buds on the stem. A: apical bud, B: buds of first section, C: buds of second section, D: Buds of third section, E: Buds of fourth section

جوانه ها مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و چهار مشاهده در هر تکرار انجام شد.

در هر سه آزمایش همه کشت ها در قفسه های رشد تحت دوره نوری ۱۶ ساعت، شدت نور ۳۰۰۰ لوکس و دمای 26 ± 2 درجه سانتی گراد قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۱۹/۱ انجام گردید. برای مقایسه میانگین ها از آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده ها نشان داد که بین

جوانه های مختلف پس از طی مراحل سترون سازی به محیط کشت MS حاوی ساکارز (سه درصد)، آگار (۰/۷ درصد) به همراه یک میلی گرم BA و ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA با pH= ۵/۸ منتقل شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و چهار مشاهده در هر تکرار انجام شد.

آزمایش سوم: اثر غلظت تنظیم کننده های رشد بر میزان نمو جوانه

در این آزمایش اثر غلظت های مختلف بنزیل آمینوپورین (نیم، یک، دو و سه میلی گرم در لیتر) و اسید نفتالین استیک (صفر، ۰/۱ و یک میلی گرم در لیتر) بر میزان و سرعت رشد

هیپو کلریت سدیم دو و نیم درصد کلر فعال به مدت پنج دقیقه (۹۳/۶۲ درصد) قرار گرفتند که تفاوت معنی داری با هم نداشتند. کمترین میزان آلودگی در تیمار سترون سازی با هیپو کلریت سدیم دو و نیم درصد کلر فعال به مدت ۲۰ دقیقه (۱۲/۱ درصد) و پس از آن تیمار هیپو کلریت سدیم دو و نیم درصد کلر فعال به مدت ۱۵ دقیقه به همراه اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه (۲۰/۷۱ درصد) مشاهده شد (جدول ۲).

تیمارها از نظر درصد آلودگی، درصد مرگ و میر ریزنمونه ها و نمو شاخه آناناس رقم MD2 تفاوت معنی داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین ها نشان داد که بیشترین ریزنمونه های آلوده (۱۰۰ درصد) در تیمار سترون سازی ریزنمونه با اتانول ۷۰ درصد به مدت سه دقیقه به دست آمد و پس از آن تیمار اتانول ۷۰ درصد به مدت پنج دقیقه (۹۶/۱۴ درصد)، هفت دقیقه (۹۰/۲۳ درصد) و

جدول ۱- تجزیه واریانس برای اثر تیمارهای مختلف سترون سازی بر میزان آلودگی، مرگ و میر و نمو شاخه آناناس رقم MD2

Table 1. Analysis of variance for the effect of different sterilization treatments on contamination, mortality and shoot development rate in pineapple cv. MD2

S.O.V.	منبع تغییرات	درجه آزادی d.f.	درصد آلودگی Contamination (%)	درصد مرگ و میر Mortality (%)	درصد نمو شاخه Shoot development (%)
Treatment	تیمار	8	4797.85**	125.09**	5069.62**
Error	اشتباه	27	3.42**	0.83**	2.61**
C. V. (%)	درصد ضریب تغییرات		2.76	17.38	5.83

** : Significant at the 1% probability level.

** : معنی دار در سطح احتمال یک درصد.

نیم درصد کلر فعال به مدت ۱۵ دقیقه به همراه اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه (۷۵/۳۹ درصد) مشاهده شد. در تیمارهای اتانول ۷۰ درصد به مدت سه، پنج و هفت دقیقه، میزان نمو شاخه صفر بود و پس از آن تیمار هیپو کلریت سدیم یک درصد کلر فعال به مدت ۱۰ دقیقه به همراه اتانول ۷۰ درصد به مدت سه دقیقه با میزان نمو شاخه ۲/۳۵ درصد قرار داشت.

در میان تیمارهای مختلف، بیشترین درصد مرگ و میر ریزنمونه در تیمار هیپو کلریت سدیم یک درصد کلر فعال به مدت ۱۰ دقیقه به همراه اتانول ۷۰ درصد به مدت سه دقیقه (۱۸/۳۹ درصد) و پس از آن تیمار اتانول ۷۰ درصد به مدت هفت دقیقه (۹/۷۷ درصد) قرار داشت (جدول ۲).

سترون سازی موفقیت آمیز و رشد ریزنمونه یک مرحله ضروری در کشت بافت گیاهی

بیشترین میزان نمو شاخه در تیمار سترون سازی ریزنمونه با هیپو کلریت سدیم دو و نیم درصد کلر فعال به مدت ۲۰ دقیقه (۸۴/۴۹ درصد) و سپس تیمار هیپو کلریت سدیم دو و

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف سترون‌سازی بر میزان آلودگی، مرگ و میر و نمو شاخه آناناس رقم MD2

Table 2. Mean comparison of the effect of different sterilization treatments on contamination, mortality and shoot development rate in pineapple cv. MD2

Treatment	تیمار	درصد آلودگی Contamination (%)	درصد مرگ و میر Mortality (%)	درصد نمو شاخه Shoot development (%)
Naocl (2.5%)- 5 min	هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد کلر فعال ۵ دقیقه	93.62b	1.92e	4.43e
Naocl (2.5%)- 10 min	هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد کلر فعال ۱۰ دقیقه	76.33e	2.21de	21.46d
Naocl (2.5%)- 15 min	هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد کلر فعال ۱۵ دقیقه	35.14f	3.75c	61.1c
Naocl (2.5%)- 20 min	هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد کلر فعال ۲۰ دقیقه	12.1h	3.41dc	84.49a
ethanol 70%- 3 min	اتانول ۷۰ درصد سه دقیقه	100.0a	0f	0f
ethanol 70%-5 min	اتانول ۷۰ درصد پنج دقیقه	96.14b	3.86c	0f
ethanol 70%-7 min	اتانول ۷۰ درصد هفت دقیقه	90.23b	9.77b	0f
Naocl (2.5%)- 15 min+ etanol 70 -1min	هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد کلر فعال ۱۵ دقیقه + الکل ۷۰ درصد یک دقیقه	20.71g	3.90c	75.39b
Naocl (1%)- 10 min+ etanol 70 -3 min	هیپوکلریت سدیم یک درصد کلر فعال ۱۰ دقیقه + الکل ۷۰ درصد سه دقیقه	79.25d	18.39a	2.35ef

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level-using Tukey test.

است که به نوع مواد ضد عفونی کننده و غلظت و مدت آن بستگی دارد. نتایج نشان داد نوع ماده ضد عفونی کننده و مدت زمان کاربرد آن در کاهش میزان آلودگی و افزایش رشد گیاهچه اثر قابل ملاحظه‌ای دارد. هیپو کلریت سدیم خاصیت ضد میکروبی بالایی در برابر قارچ‌ها و باکتری‌ها دارد اما در غلظت‌های بالاتر از حد مطلوب برای گیاه سمی بوده و باعث افزایش مرگ و میر آن می‌گردد. استفاده از هیپو کلریت سدیم در غلظت‌های کم و شستشو با آب مقطر استریل چهار تا پنج بار اثر سمیت آن را به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد (Badou et al., 2018).

در پژوهش حاضر کاربرد اتانول به تنهایی در سترون‌سازی ریزنمونه‌های جوانه آناناس مؤثر نبود و منجر به آلودگی بیشتر و کاهش رشد ریزنمونه شد. این نتایج با نتایج هاموند و همکاران (Hammond et al., 2014) و سن و همکاران (Sen et al., 2013) مطابقت دارد که کاربرد اتانول به تنهایی منجر به آلودگی بیشتر ریزنمونه‌ها شد. اتانول نسبت به سایر مواد سترون‌سازی بر روی ریزنمونه اثر منفی بیشتری داشت و بهتر است اتانول همراه با سایر مواد سترون‌سازی مورد استفاده قرار گیرد و اثر آن بیشتر از کاربرد آن به تنهایی است (Almeida et al., 2002).

عثمان (Usman, 2013) هیپو کلریت سدیم یک و نیم درصد کلر فعال به مدت ۲۰ دقیقه و سپس ۰/۷۵ درصد کلر فعال به مدت ۱۰ دقیقه برای سترون‌سازی تاج آناناس را پیشنهاد داد. نتایج نلسون (Nelson et al., 2015) نشان داد کاربرد هیپو کلریت سدیم دو درصد کلر فعال به مدت ۲۵ دقیقه باعث حذف آلودگی از همه کشت‌ها شد، اما میزان رشد جوانه نسبت به مدت زمان ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه به میزان قابل توجهی کاهش یافت. همچنین اثر منفی قرار گرفتن جوانه آناناس در معرض طولانی مدت مواد ضد عفونی کننده در مطالعات خان و همکاران و ابراهیم و همکاران (Khan et al., 2004; Ebrahim et al., 2013) گزارش شده است. این نتایج با نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر مطابقت دارد که در آن نوع، غلظت مواد

در پژوهش حاضر کاربرد اتانول به تنهایی در سترون‌سازی ریزنمونه‌های جوانه آناناس مؤثر نبود و منجر به آلودگی بیشتر و کاهش رشد ریزنمونه شد. این نتایج با نتایج هاموند و همکاران (Hammond et al., 2014) و سن و همکاران (Sen et al., 2013) مطابقت دارد که کاربرد اتانول به تنهایی منجر به آلودگی بیشتر ریزنمونه‌ها شد. اتانول نسبت به سایر مواد سترون‌سازی بر روی ریزنمونه اثر منفی بیشتری داشت و بهتر است اتانول همراه با سایر مواد سترون‌سازی مورد استفاده قرار گیرد و اثر آن بیشتر از کاربرد آن به تنهایی است (Almeida et al., 2002).

در میان تیمارهای سترون‌سازی، تیمار هیپو کلریت سدیم دو و نیم درصد کلر فعال به مدت ۲۰ دقیقه، کمترین میزان آلودگی و بیشترین میزان رشد جوانه را داشت. استرلا و همکاران

در میان تیمارهای سترون‌سازی، تیمار هیپو کلریت سدیم دو و نیم درصد کلر فعال به مدت ۲۰ دقیقه، کمترین میزان آلودگی و بیشترین میزان رشد جوانه را داشت. استرلا و همکاران

(جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین میزان نمو شاخه از ریزنمونه در جوانه انتهایی با میانگین ۹۳/۵ درصد بود که تفاوت معنی‌داری با جوانه‌های قسمت سوم با میانگین ۹۲ درصد نداشت (جدول ۴). جوانه‌های قسمت اول ساقه کمترین میزان نمو شاخه از ریزنمونه (صفر) را نشان دادند. بیشترین سرعت نمو شاخه از ریزنمونه به ترتیب در جوانه انتهایی (۱۵/۷۵ روز) و جوانه‌های قسمت سوم (۱۶ روز) بدست آمد که تفاوت معنی‌داری نداشتند (جدول ۴).

ضدعفونی و مدت زمان کاربرد بر میزان آلودگی و رشد جوانه اثر گذار بود. کاهش میزان کم نمو جوانه با افزایش مدت زمان ضدعفونی می‌تواند به دلیل اثر ماده فعال هیپوکلریت سدیم بر روی بافت‌های ظریف و حساس جوانه باشد که منجر به از بین رفتن قسمت‌های در حال رشد می‌گردد (Teixeira et al., 2006).

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر موقعیت جوانه‌های پاجوش بر میزان نمو و سرعت آن در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود

جدول ۳- تجزیه واریانس برای اثر نوع جوانه بر مدت زمان نمو شاخه و میزان تولید شاخه آناناس رقم MD2
Table 3. Analysis of variance for bud type effect on shoot development duration of and shoot production rate of pineapple cv. MD2

S.O.V.	منبع تغییرات	درجه آزادی d.f.	مدت زمان نمو شاخه Shoot development duration	میزان تولید شاخه Shoot production rate
Bud type	نوع جوانه	4	368.37**	6629.8**
Error	اشتباه	15	5.35	3.26
C. V. (%)	درصد ضریب تغییرات		14.68	3.30

** : Significant at the 1% probability level.

** : معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر نوع جوانه بر مدت زمان نمو شاخه و درصد تولید شاخه آناناس رقم MD2
Table 4. Mean comparison of bud type effect buds on shoot development duration and shoot production rate of pineapple cv. MD2

Bud type	نوع جوانه	مدت زمان نمو شاخه (روز) Shoot development duration (day)	درصد تولید شاخه Shoot production rate (%)
Apical bud	جوانه انتهایی	15.75b	93.5a
Buds of the 1st section	جوانه‌های قسمت اول	-	0.0d
Buds of the 2nd section	جوانه‌های قسمت دوم	23.75a	28.0c
Buds of the 3rd section	جوانه‌های قسمت سوم	16.00b	92.0a
Buds of the 4th section	جوانه‌های قسمت چهارم	23.25a	60.0b

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level-using Tukey test.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که همه انواع جوانه‌های پاجوش آناناس برای کشت بافت مناسب نیستند. جوانه‌های انتهایی و پس از آن جوانه‌های جانبی برای استفاده در ریزازدیادی آناناس مناسب تر هستند و دارای بالاترین میزان تولید شاخه از جوانه و سریع‌ترین سرعت شاخه‌زایی بودند. در هر پاجوش فقط یک جوانه انتهایی وجود دارد در حالی که تعداد جوانه‌های جانبی ممکن است به ۲۰ و یا بیشتر بسته به اندازه پاجوش برسد. بنابراین، تکیه بر جوانه‌های انتهایی به تنهایی برای شروع کشت، تعداد ریزنمونه‌های حاصله از هر گیاه را محدود می‌سازد. جوانه‌های قسمت اول که بلافاصله پس از جوانه انتهایی قرار دارند، اندازه کوچکتری نسبت به سایر جوانه‌ها دارند و نمو شاخه در آنها انجام نشده است، که ممکن است به علت خواب جوانه‌ها باشد، و میزان تنظیم‌کننده رشد بکار رفته در شکستن خواب جوانه مؤثر نبوده است (Moore *et al.*, 1992).

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد بر سرعت نمو شاخه از جوانه و درصد تشکیل شاخه از جوانه و تعداد آن در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۵). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین درصد تشکیل شاخه از جوانه در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ BA با غلظت سه میلی‌گرم بر لیتر به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA با میانگین ۷۵/۷۵ درصد

مشاهده شد که با محیط کشت‌های MS حاوی ۰/۱ BA با غلظت سه و دو میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب با میانگین ۷۴ و ۷۱ درصد تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۶). کمترین درصد تولید شاخه از جوانه در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد با میانگین ۴۲ درصد مشاهده شد.

از نظر سرعت نمو شاخه از ریزنمونه، محیط کشت حاوی سه میلی‌گرم بر لیتر BA به تنهایی با میانگین ۱۸ روز بیشترین سرعت رشد را به خود اختصاص داد که تفاوت معنی‌داری با محیط کشت‌های حاوی سه میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA (۲۰ روز)، دو میلی‌گرم بر لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA (۲۱/۲۵ روز) و سه میلی‌گرم بر لیتر BA (۲۲/۵ روز) نداشت (جدول ۶). کمترین سرعت رشد در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد با میانگین ۳۴/۲۵ روز بدست آمد که با دو محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA به تنهایی یا همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۶).

بیشترین تعداد شاخه از هر ریزنمونه جوانه در محیط کشت‌های حاوی دو و سه میلی‌گرم بر لیتر BA (۲/۴۲ شاخه) مشاهده شد که با سه محیط کشت دیگر (محیط کشت‌های حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA، دو و سه میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۶).

جدول ۵- تجزیه واریانس برای اثر غلظت های مختلف بنزیل آدنین (BA) و اسید نفتالین استیک (NAA) بر مدت زمان نمو شاخه، درصد تولید شاخه و تعداد شاخه از هر ریزنمونه آناناس رقم MD2

Table 5- Analysis of variance for the effect of different concentrations of benzyl adenine (BA) and naphthalene acetic acid (NAA) on shoot development duration, shoot production rate and shoot number shoot per explant of pineapple cv. MD2

S.O.V.	منبع تغییرات	درجه آزادی d.f.	مدت زمان نمو شاخه Shoot development duration	درصد تشکیل شاخه از ریزنمونه Shoot production rate	تعداد شاخه هر ریز نمونه Shoot number explant ¹
Growth regulator concentration	غلظت تنظیم کننده رشد	8	136.37**	516.21**	1.38**
Error	اشتباه	27	5.84	4.20	0.04
C. V. (%)	درصد ضریب تغییرات		9.39	3.21	11.17

** : Significant at the 1% probability level.

** : معنی دار در سطح احتمال یک درصد.

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر غلظت های مختلف بنزیل آدنین (BA) و اسید نفتالین استیک (NAA) بر مدت زمان نمو شاخه، درصد تشکیل شاخه و تعداد شاخه از هر ریزنمونه آناناس رقم MD2

Table 6. Mean comparison of the effect of different concentrations of benzyl adenine (BA) and naphthalene acetic acid (NAA) on shoot development duration, shoot production rate and shoot number explant₁ of pineapple cv. MD2

بنزیل آدنین (میلی گرم در لیتر) BA (mg l ⁻¹)	اسید نفتالین استیک (میلی گرم در لیتر) NAA (mg l ⁻¹)	مدت زمان نمو شاخه (روز) Shoot development duration (day)	درصد تولید شاخه Shoot production rate (%)	تعداد شاخه ادر هر ریز نمونه Shoot number explant ¹
0	0	34.25a	42f	0.85e
0.5	0	31.50ab	53e	1.47cd
0.5	0.1	32.35ab	55e	1.1de
1	0	25.25cd	64d	2.35a
1	0.1	26.75bc	68cd	1.85bc
2	0	22.50cde	71abc	2.42a
2	0.1	21.25cde	69c	2.02ab
3	0	18.00e	74ab	2.42a
3	0.1	20.00de	75.75a	2.20ab

میانگین هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی داری ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level-using Tukey test.

همکاران (Danso *et al.*, 2008)، زریدا و همکاران (Zuraida *et al.*, 2011)، عثمان و همکاران (Usman *et al.*, 2013) و فراهانی (Farahani, 2014) نیز گزارش شده است. آلمیدا و همکاران (Almeida *et al.*, 2002) گزارش کردند برای جوانه‌زنی جوانه‌های جانبی آناناس محیط کشت MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BA مناسب بود. در پژوهش حاضر تفاوت معنی‌داری در سرعت رشد جوانه‌ها، با کاربرد NAA در محیط کشت نسبت به محیط کشت حاوی BA به تنهایی مشاهده نشد.

نتایج پژوهش حاضر با نتایج زریدا و همکاران (Zuraida *et al.*, 2011) مطابقت دارد که گزارش کردند BA به تنهایی برای شروع کشت آناناس کافی بود و محیط کشت MS مکمل شده با پنج میلی‌گرم در لیتر BA در غیاب NAA بیشترین درصد رشد شاخساره (۸۶ درصد) را ایجاد کرد. این نتایج با نتایج باتیا و آشوات (Bhatia and Ashwath, 2002) نیز مطابقت دارد که نشان دادند استفاده از غلظت‌های نامناسب تنظیم‌کننده‌های رشد در مرحله استقرار جوانه می‌تواند منجر به کاهش یا توقف رشد جوانه آناناس شود. بنزیل آدنین برای تحریک تقسیم سلولی و القای رشد شاخه در جوانه نقش مهمی ایفا می‌کند (Kyte and Kleyn, 1996). فیروزآبادی و گوترسون (Firoozabady and Gutterson, 2003) نیز بر نقش بنزیل آدنین در رشد گیاهچه‌ها از مریستم انتهایی آناناس تاکید کردند. بنابراین می‌توان

کمترین تعداد شاخه (۰/۸۵ شاخه) در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد بدست آمد که تفاوت معنی‌داری با محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA نداشت.

نتایج نشان داد غلظت BA به تنهایی یا در ترکیب با NAA بر میزان نمو شاخه از ریزنمونه‌های آناناس رقم MD2 مؤثر بود. افزایش غلظت BA از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به سه میلی‌گرم در لیتر، در افزایش مدت زمان نمو شاخه از جوانه مؤثر بود و در مدت زمان کوتاه‌تری شاخه از ریزنمونه تولید شد (جدول ۶). در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد نیز جوانه‌زنی آناناس روی می‌دهد، اما درصد شاخه‌زایی و سرعت آن به میزان قابل توجهی نسبت به محیط حاوی BA کاهش می‌یابد و مدت زمان بیشتری برای نمو جوانه مورد نیاز است. بنابراین کاربرد BA به تنهایی و به میزان یک میلی‌گرم در لیتر می‌تواند برای شروع کشت جوانه آناناس استفاده شود (جدول ۶). اگرچه افزایش غلظت BA تا سه میلی‌گرم منجر به افزایش شاخه‌زایی شد، اما کاربرد غلظت کمتر (دو میلی‌گرم در لیتر) در کشت اولیه ریزنمونه جهت نمو شاخه ترجیح داده می‌شود، زیرا مقرون به صرفه‌تر و سازگار با محیط زیست خواهد بود.

اثر مثبت تنظیم‌کننده BA بر تولید شاخه در کشت درون شیشه‌ای آناناس توسط خان و همکاران (Khan *et al.*, 2004)، دانسو و

کاربرد بنزیل آدنین با غلظت یک تا سه میلی گرم در لیتر در محیط کشت در افزایش سرعت نمو ریزنمونه و میزان نمو شاخه از جوانه مؤثر بود.

سپاسگزاری

نگارندگان بدینوسیله از مدیریت پژوهشکده خرما و میوه‌های گرمسیری موسسه تحقیقات علوم باغبانی برای تامین اعتبار مورد نیاز اجرای این پروژه از محل درآمد پژوهشکده و فراهم کردن امکانات لازم برای اجرای آن سپاسگزاری می‌کنند.

عدم تعارض منافع

نگارندگان اعلام می‌کنند که هیچگونه تعارض منافع ندارند.

نتیجه گیری کرد که ترکیب و غلظت تنظیم کننده‌های رشد بر نمو جوانه‌های، سرعت تولید شاخه و تعداد شاخه در هذ ریزنمونه آناناس رقم MD2 اثر قابل توجهی داشت.

بنابراین براساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، سترون‌سازی با هیپوکلریت سدیم دو و نیم درصد کلر فعال به مدت ۲۰ دقیقه در کنترل آلودگی ریزنمونه آناناس رقم MD2 و افزایش میزان نمو شاخه از جوانه نقش داشت. همچنین موقعیت (نوع) جوانه بر روی ساقه پاجوش در میزان نمو شاخه از آن مؤثر بود و در انتخاب ریزنمونه برای کشت بافت آناناس رقم MD2، جوانه انتهایی و جوانه‌های قسمت سوم ساقه بیشترین نمو شاخه از جوانه را دارا بودند. در کشت اولیه جوانه آناناس رقم MD2،

References

- Almeida, W., Santana, G., Rodriguez, A. and Costa, M. 2002. Optimization of a protocol for micropropagation of pineapples. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2, pp.296-300. DOI: 10.1590/S0100-29452002000200005
- Al-Saif, A. M., Hossain, A. B. M. S. and Rosna, M. T. 2011. Effects of benzylaminopurine naphthalene acetic acid on proliferation and shoot growth of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) *in vitro*. *African Journal of Biotechnology*, 10(27), pp.5291-5295. DOI: 10.5897/AJB11.370
- Atawia, A. R., Abd EL-Latif, F. M., EL-Gioushy, S. F., Sherif, S. S. and Kotb, O. M. 2016. Studies on micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L.). *Middle East Journal of Agriculture Research*, 5(2), pp.224-232.
- Badou, B. T., Agbidinokoun, A., Cacaï, G. T., Dossoukpèvi, R. C. and Ahanhanzo, C. 2018. Effects of system benzylaminopurine-adenine sulphate in combination with naphthalene acetic on *in vitro* regeneration and proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Mill var. *comosus*). *American Journal of Biotechnology and Bioscience*,

2(9), pp.1-15.

- Bhatia, P. and Ashwath, N. 2002.** Development of rapid method for micro propagation of a new pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] clone, “Yeppoon gold”. *Acta Horticultura. 575*, pp.125-131. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.575.11
- Cassells, A. C. 1991.** Problems in tissue culture: culture contamination. Pp. 31– 44. In: Derbergh, P. C. and Zimmerman, R. H. (eds), *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Publishers, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-94-009-2075-0_3
- Cunha, G. A. P. 2005.** Applied aspects of pineapple flowering. *Bragantia, 64*, pp.499-516. DOI: 10.1590/S0006-87052005000400001
- Danso, K. E., Ayeh, K. O., Oduro, V., Amiteye, S. and Amoatey, H. M. 2008.** Effect of 6-benzylaminopurine and α -naphthalene acetic acid on *in vitro* production of MD2 pineapple planting materials. *World Applied Sciences Journal, 3*, pp.614-619. DIO: 10.5897/AJB11.370
- Daud, N. H., Jayaraman, S. and Mohamed, R. 2012.** Methods paper: an improved surface sterilization technique for introducing leaf, nodal and seed explants of *Aquilaria malaccensis* from field sources into tissue culture. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 2*, pp.55- 58.
- Estrela, C., Ribeiro R. G., Estrela, C. R., Pécora J. D. and Sousa-Neto, M. D. 2003.** Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Brazilian Dental Journal, 14*(1), pp.58-62. DOI: 10.1590/s0103-64402003000100011
- Farahani, F. 2014.** Micropropagation and growth of *in vitro* pineapple (*Ananas comosus* L. merr) in Iran. *Plant Archives, 14*, pp.337-341.
- Firoozabady, E. and Gutterson, N. 2003.** Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. *Plant Cell Reports, 21*, pp.844-850. DOI: 10.1007/s00299-003-0577-x
- Habiba, U., Reja, S., Saha, M. L. and Khan, M. R. 2002.** Endogenous bacterial contamination during *in vitro* culture of table banana: identification and prevention. *Plant Tissue Culture, 12*(2), pp.117–124.
- Khan, S., Nasib, A. and Saeed, B. A. 2004.** Employment of *in vitro* technology for large scale multiplication of pineapples (*Ananas comosus*). *Pakistan Journal of Botany, 36*, pp.611-615.
- Kyte, L. and Kleyn, J. G. 1996.** Plants from test tubes: an introduction to micropropagation. 3rd edition. Timber Press, USA. 240 pp.
- Ibrahim, M. A., Al-Taha, H. A. and Seheem, A. A. 2013.** Effect of cytokinin type and concentration and source of explant on shoot multiplication of pineapple plant *Ananas*

- comosus* Queen) *in vitro*. *Acta Agriculturae Slovenic*, 101, pp.15-20. DOI: 10.14720/aas.2013.101.1.14940
- Nelson, B. J., Asare, P. A. and Arthur, R. 2015.** *In vitro* growth and multiplication of pineapple under different duration of sterilization and different concentration of benzylaminopurine and sucrose. *Biotechnology*, 14(1), pp.35-40. DOI: 10.3923/biotech.2015.35.40
- Moore, G. A., DeWald, M. G. and Evans, M. H. 1992.** Micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L.). Pp.460-470. Bajaj, Y. P. S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, 18-High Tech and Micropropagation II*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*, 15, pp.473-497.
- Sen, S. K. 1990.** Pineapple. Pp. 252-279. In: Bose, T. K. and Mitra, S. K (eds.) *Fruits: Tropical and Subtropical*. Naya Prokash, Calcutta, India.
- Shamim, M., Kumar, M., Ranjan, T., Kumar, R. R., Pal, A.-K., Kumar, V., Jha, V. B. and Kumar, P. 2016.** Importance of micropropagation in pineapple for disease free plantlets and rapid multiplication. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(4), pp.359-362.
- Teixeira, S. L., Ribeiro, J. M. and Teixeira, M. T. 2006.** Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv. Smooth Cayenne) behavior. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, pp.375-378. DOI: 10.1007/s11240-006-9121-3
- Usman, I. S. 2013.** Development of an efficient protocol for micro propagation of pineapple. *African Journal of Agricultural Research*, 8(18), pp.2053-2056. DOI: 10.5897/AJAR12.1763
- Vujovic, T., Ruzic, D. J. and Cerovic, R. 2012.** *In vitro* shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. *Horticultural Science*, 39, pp.101-107. DOI: 10.17221/208/2011-HORTSCI
- Zurida, A. R., Shahanadz, A. H. N., Harteeni, Roowi, S., Che Radziah, C. M. Z. and Sreeramanan, S. 2011.** A novel approach for rapid micropropagation of maspine pineapple shoots using liquid shake culture system. *African Journal of Biotechnology*, 10, pp.3859-3866.

RESEARCH ARTICLE

Effect of Different Disinfection Treatments and Bud Type on Growth Initiation of Pineapple cv. MD2 in *In Vitro* Conditions

M. Boroujerdnia^{1*} , E. Saboki² and S. N. Mousavi³

1. Assistant Professor, Date Palm and Tropical Fruit Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ahwaz, Iran.

2. Assistant Professor, Field and Horticultural Crops Sciences Research Department, Baluchestan, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization, Iranshahr, Iran.

3. Research Officer, Date Palm and Tropical Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ahwaz, Iran.

ABSTRACT

Boroujerdnia, M., Saboki, E. and Mousavi, S. N. 2024. Effect of different disinfection treatments and bud type on growth initiation of pineapple cv. MD2 in *in vitro* conditions. *Seed and Plant*, 40, pp.193–210 (in Persian).

The aim of this study was to determine the optimal conditions for *in vitro* culture initiation of pineapple cv. MD2 using tissue culture technique, in three different experiments. In the first experiment, the effect of sterilization treatment on contamination, mortality and development rate of explants was investigated. In the second experiment, the buds were divided into five groups based on their position on the pineapple stem to determine the highest rate of bud regeneration. In the third experiment, the effect of different concentrations of benzyl adenine (BA) (0, 0.1, 0.5 and 1 mg l⁻¹) was studied alone or in combination with 0.01 mg l⁻¹ of naphthalene acetic acid (NAA) concentrations on regeneration of buds. The results showed that sodium hypochlorite (2.5%) in 20 minutes was the most effective for sterilizing pineapple buds. All concentrations of BA promoted bud regeneration but the 3 mg l⁻¹ was the optimum. Apical buds and the third section axillary buds had the highest regeneration rate at 93% and 92%, respectively.

Keywords: Pineapple, benzyl adenine, apical bud, tissue culture, sodium hypochlorite.

Introduction

Pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] is one of the most economically important tropical fruit that belongs to Bromeliaceae. Pineapple plants can be propagated using vegetative materials of slips, suckers, stem sections or crowns. However, in all these three cases plant material is often limited, thus *in vitro* culture is a commercial alternative approach. *In vitro* micropropagation of pineapple plantlets has many advantages over conventional methods of vegetative propagation. Tissue culture enhances rapid propagation of suckers to supplement conventional methods to produce pineapples to meet both local and international market demands (Shamim *et al.*, 2016). However, tissue culture initiation, the most critical step towards rapid *in vitro* propagation, is challenged by microbial contamination, exogenous growth hormone requirements and bud type for growth (Vujovic *et al.*, 2012). Therefore, the aim of this study was to determine optimal sterilization protocols and BA concentration to initiate pineapple *in vitro* culture using apical and axillary buds as sources of explants.

Materials and Methods

In this study the buds of suckers of pineapple cv. MD2 was used for *in vitro* culture in three different experiments. In the first experiment, explants were sterilized with sodium hypochlorite and ethanol at different concentrations, alone or in combination, and durations (2.5% sodium hypochlorite for 5, 10, 15 minutes, 70% ethanol for 3, 5, 7 minutes, 1% sodium hypochlorite for 10 minutes + 70% ethanol for 3 minutes and 2.5% sodium hypochlorite for 15 minutes + 70% ethanol for 1 minute), followed by three rinsing with sterilized distilled water under aseptic conditions. The explants were placed on solidified Murashige and Skoog (MS) based medium supplemented with 0.5 mg l⁻¹ of benzyl adenine (BA) combined with 0.1 mg l⁻¹ of naphthalene acetic acid (NAA). In the second experiment, buds were grouped based on their position on the pineapple stem (apical, 1st section, 2nd section, 3rd section, and 4th section) to determine the highest rate of bud regeneration. Following sterilization, different buds were transferred to MS medium containing 1 mg l⁻¹ BA+ 0.1 mg l⁻¹ NAA at pH = 5.8. In the third experiment, the effect of different concentrations of BA (0, 0.1, 0.5 and 1 mg l⁻¹) was studied alone or in combination with 0.01 mg l⁻¹ NAA concentrations on regeneration of buds.

Results and Discussion

The results showed that sodium hypochlorite (2.5%) in 20 minutes was the most effective in sterilizing pineapple buds. The effectiveness of sodium hypochlorite (2.5%) enhanced with increasing exposure time. The highest explant regeneration rate was

observed in the disinfection treatment with 2.5% sodium hypochlorite for 20 minutes (84.49%) followed by 2.5% sodium hypochlorite treatment for 15 minutes + 70% ethanol for 1 minute (75.39%). Ethanol alone could not successfully disinfect pineapple buds. There was high level of harmful microbial contamination of plant tissues associated 70% ethanol treatment, hence the cultures deteriorated.

The apical bud followed by the third section buds were the first to show growth and had the highest rate of regeneration (95% after two weeks). The third section buds recorded (90%) regeneration rate within 1-3 weeks.

All concentrations of BA promoted bud regeneration. The highest regeneration rate was observed in the culture medium containing BA at concentration level of 3 mg^l⁻¹ and 0.1 mg^l⁻¹ NAA with an average of 75.75%. The lowest regeneration rate in the MS culture medium without growth regulators with an average of 42%. These results are in agreement with findings of Zuraida *et al.* (2011) and Usman *et al.* (2013).

References

- Shamim, M., Kumar, M., Ranjan, T., Kumar, R. R., Pal, A. -K., Kumar, V., Jha, V. B. and Kumar, P. 2016.** Importance of micropropagation in pineapple for disease free plantlets and rapid multiplication. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(4), pp. 359-362.
- Usman, I. S. 2013.** Development of an efficient protocol for micro propagation of pineapple. *African Journal of Agricultural Research*, 8(18), pp.2053-2056. DOI: 10.5897/AJAR12.1763
- Vujovic, T., Ruzic, D. J. and Cerovic, R. 2012.** *In vitro* shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. *Horticultural Science*, 39, pp.101-107. DOI: 10.17221/208/2011-HORTSCI
- Zurida, A. R., Shahanadz, A. H. N., Harteeni, Roowi, S., Che Radziah, C. M. Z. and Sreeramanan, S. 2011.** A novel approach for rapid micropropagation of maspine pineapple shoots using liquid shake culture system. *African Journal of Biotechnology*, 10, pp.3859-3866.

*Corresponding author: boroujerdnia@gmail.com

Tel.: +989426001752

Received: 10 July 2024

Accepted: 15 August 2024



2024© Seed and Plant. This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.