Archive of SID

تعیین مناسب‌ترین تنظیم‌کننده رشد در کشت درون شیشه‌ای انتهای شاخساره میخک (*Dianthus caryophyllus* L.)

موسی ترابی‌گیگلو[1]، سیروس مسیحا[2]، اسلام مجیدی[3]، محمود خسروشاهلی[4] و مصطفی ولیزاده[2]

چکیده

به منظور تعیین مناسب‌ترین نوع تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی و مشخص نمودن بهترین غلظت برای به دست آوردن بیشترین بازده در تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای از ریزنمونه انتهای شاخساره میخک، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از محیط کشت پایه MS تغییر یافته انجام گردید. در این آزمایش‌ها از چند نوع تنظیم‌کننده رشد اکسین و سیتوکنین با غلظت‌های مختلف استفاده شد، و صفات درصد باززایی و ریز نمونه‌ها، تعداد باززایی در هر ریزنمونه، تعداد برگ‌های قابل رویت، درصد تولید ریشه و کالوس و درصد نمونه‌های شیشه‌ای شده، اندازه‌گیری و بررسی شد. بیشتر محیط‌ها باعث ایجاد باززایی در ریزنمونه‌ها شد. در محیط‌های حاوی کینتین، زآتین و IBA هیچگونه باززایی در ریزنمونه‌ها به دست نیامد، و بهترین باززایی (از لحاظ درصد و تعداد باززایی در هر ریزنمونه) در محیط MS تغییر یافتهٔ تکمیل شده با ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: اکسین، انتهای شاخساره، باززایی، سیتوکنین و میخک.

مقدمه

میخک یکی از عمده‌ترین گل‌های بازار جهانی گلهای بریده است و پژوهشهای زیادی برای اصلاح کلاسیک واریته‌های جدید با ویژگی‌های تازه روی آن انجام می‌گیرد. تکثیر میخک در روش‌های سنتی بیشتر از طریق قلمه‌های انتهایی صورت می‌گیرد(۱۴و۱۶) که در این روش سرعت تکثیر پایین بوده و به پایه‌های مادری زیادتری نیاز هست و نیز احتمال انتقال بیماری‌ها از گیاهان مادری به نتاج بسیار بالاست. لذا برای بالا بردن سرعت تکثیر و سالم بودن گیاهان حاصل، از روش‌های تکثیر درون شیشه‌ای استفاده می‌شود (۲، ۴، ۵، ۶، ۱۰، ۱۹، ۲۲ و ۳۱) و یکی از این روش‌ها کشت انتهای شاخساره است.

کشت مریستم و انتهای شاخساره در میخک بیشتر برای اهداف ریزازدیادی (۵، ۱۰، ۱۳ و ۱۹) و تفکیک شیمرها (۱۴) به کار برده شده است.

باززایی در کشت مریستم و انتهای شاخساره تحت تأثیر ژنوتیپ و تنظیم‌کننده‌های رشد قرار دارد(۱۵ و ۱۷). کالاک و همکاران(۱۵) برای‌بررسی ژنوتیپ و هورمونها در باززایی، ریزنمونه‌های انتهای شاخساره ۸ رقم میخک را در محیط با پایه MS تکمیل شده با تنظیم‌کننده‌های رشد NAA، BAP، کینتین و مالئیک هیدرازید کشت کردند و تفاوت‌های معنی‌داری در باززایی و رشد ارقام مختلف و اثرات تنظیم‌کننده‌ای و همچنین یک سری تغییرات مورفولوژیکی را گزارش کردند. مجیب و پال(۲۱) تغییرات درون رقمی[5] را در عکس‌العمل به کلون‌سازی درون شیشه‌ای از طریق کشت انتهای شاخساره میخک، گزارش کردند.

این تحقیق به منظور تعیین مناسب‌ترین نوع

۱- دانشجوی کارشناس ارشد.
۲- گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۳- مؤسسه اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر - کرج.
۴- دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز.

5- Intravarietal variation

www.SID.ir

Archive of SID

تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سیتوکینین و غلظت مناسب برای به دست آوردن بیشترین بازده در تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای انجام گردید.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از رقم راندوو[1] از تیپ استاندارد میخک استفاده شد. گیاهان مادری به صورت قلمه‌های ریشه‌دار در گلدانهایی در اتاقکهای رشد (فیتوترون‌های) بخش بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقاتی اصلاح نهال و بذر کرج با دمای ۲۲/۱۸(شب / روز) درجه سانتی‌گراد با فتوپریود ۱۶/۸(شب / روز) ساعت نگهداری شد. در طول دوره آزمایش از گیاهان مادری به دقت مراقبت گردیده و در حالت رشد رویشی نگه داشته شدند.

ریزنمونه‌های انتهای شاخساره، ابتدا با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد استریل و سپس به محیط کشت استقرار MS تکمیل شده با ۲۰ گرم در لیتر ساکارز، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و GA و ۸ گرم در لیتر آگار منتقل گردیدند.

تنظیم‌کننده‌های NAA و IBA از گروه اکسین‌ها و زآتین، کینتین، و بنزیل آمینوپورین (BAP) از گروه سیتوکینین‌ها در غلظتهای مختلف در محیط پایه MS تغییریافته مورد آزمایش قرار گرفتند. pH محیط کشت روی ۵/۷+۰/۰۵ تنظیم گردید.

کینتین و زآتین(با غلظت‌های ۱/۵، ۰ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با غلظت‌های مختلف NAA و IBA (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) در محیط ذکر شده تهیه شدند. BAP با غلظت‌های ۰، ۰/۳، ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر به صورت فاکتوریل با NAA با غلظت‌های ۰/۰، ۰/۳ و ۱ میلی‌گرم در لیتر، ترکیب و به صورت ۱۲ ترکیب تیماری مورد آزمایش قرار گرفتند.

در این آزمایش صفات درصد باززائی، تعداد باززائی در هر ریزنمونه، تعداد برگ رشد یافته، درصد تولید ریشه و کالوس و درصد نمونه‌های شیشه‌ای شده، اندازه‌گیری شد. آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی اجرا شد. تبدیل داده‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری MSTATC انجام گردید. در انجام تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از نرم‌افزار ذکر شده، از داده‌های تبدیل شده و برای رسم نمودارها از داده‌های واقعی استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به صفات مورد مطالعه (جدول ۱)، نشان داد که NAA در صفات درصد باززائی، تعداد باززائی در هر ریزنمونه، درصد تولید ریشه و درصد تولید کالوس در سطح احتمال ۱ در هزار اثر معنی‌داری داشته است، ولی در صفت درصد نمونه‌های شیشه‌ای شده تفاوت معنی‌داری نداشته است. این با یافته‌های حاصل از تحقیقات قبلی و از نظر درصد باززائی و تعداد باززائی در هر ریزنمونه، همسوئی دارد(۱۵، ۲۰، ۲۲ و ۳۰).

در محیط‌هائی که از هورمون‌های کینتین، زآتین و IBA استفاده شده بود، هیچگونه باززائی شاخساره مشاهده نشد. به همین دلیل در محاسبات آماری آورده نشدند. البته، این مشاهدات با نتایج آزمایش ناکائو و همکاران(۲۲) مطابقت داشت. آنها در محیط MS حاوی کینتین و زآتین در ریزنمونه‌های انتهای شاخساره، هیچگونه باززائی به دست نیاوردند و تنها نتایج باززائی شده در حضور این مواد تنظیم‌کننده رشد مربوط به ریزنمونه‌های گلبرگ بود که در مقایسه با سیتوکینین‌های TDZ و BAP ناچیز بود.

استفاده از BAP نیز اثر معنی‌داری بر روی تمام صفات مورد مطالعه در سطح احتمال ۱ در هزار داشت (جدول ۱). همچنین اثرات متقابل NAA و BAP در صفات درصد باززائی، تعداد باززائی در هر ریزنمونه، تعداد برگ‌های قابل رؤیت، درصد تولید ریشه و کالوس در سطح احتمال ۱ در هزار و بر روی درصد نمونه‌های شیشه‌ای

1- Rendez vous

www.SID.ir

Archive of SID

شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود(جدول ۱). نتایج بررسی‌های قبلی تأثیر ترکیبات فوق را روی درصد باززائی در ریزنمونه‌ها مورد تأیید قرار داد(۱۵، ۲۰، ۲۳ و ۳۰).

مقایسه میانگین غلظت‌های NAA نشان داد که به جز در صفت درصد نمونه‌های شیشه‌ای شده در بقیه صفات اختلافات معنی‌داری با هم دارند. در همه صفات به غیر از درصد تولید کالوس، غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر مطلوب‌ترین اثر را داشته است(برای درصد تولید کالوس بیشترین درصد در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد)(جدول ۲). غلظت‌های مورد مطالعه BAP در همهٔ صفات اختلاف معنی‌داری داشت. مناسب‌ترین نتایج در همه صفات مورد مطالعه در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر آن به دست آمد(جدول ۳).

اثر متقابل NAA × BAP در صفات مورد بررسی

درصد باززائی : میانگین‌های ترکیب‌های تیماری دو تنظیم‌کننده رشد با استفاده از آزمون دانکن مقایسه گردیدند(شکل ۱). بهترین ترکیب‌های تیماری با باززائی ۱۰۰ درصد دو ترکیب دارای NAA به میزان ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر و BAP به میزان ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بودند. پائین‌ترین میزان باززائی مربوط به ترکیب بدون BAP و NAA (به میزان ۲۵/۸ درصد) و ترکیب حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA(به میزان ۳۶/۶ درصد) بود. ترکیب تیماری دارای ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP از نظر اینکه بهترین درصد باززائی را در بین سایر ترکیب‌ها داشتند(شکل ۵)، کاملاً با نتایج تحقیقات قبلی(۱۵، ۲۳ و ۳۲) مطابق بودند.

تعداد باززائی در هر ریزنمونه : مقایسه میانگین‌ها در این صفت، نشان داد که، ترکیب‌های مختلف تیمارها از نظر آماری به چند گروه طبقه‌بندی می‌شوند که در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری با هم دارند(شکل ۲). بیشترین تعداد باززائی در هر ریزنمونه معادل ۱۵ باززائی مربوط به ترکیبی بود که، حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. همانطور که قبلاً ذکر شد، این تیمار بهترین درصد باززائی را نیز به همراه تیمار حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر داشته است که از نظر تعداد باززائی در هر ریزنمونه با ۹/۴ باززائی در هر ریزنمونه در رده دوم قرار گرفت. این نتیجه نشان می‌دهد که با افزایش میزان BAP از ۱ به ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر اگرچه، درصد باززائی تغییر نمی‌کند ولی تعداد باززائی در هر ریزنمونه را کاهش می‌دهد(شکل ۵). همین نتیجه در جدول مقایسه میانگین‌های درصد و تعداد باززائی در هر ریزنمونه در اثرات ساده فاکتور BAP نیز به وضوح مشاهده می‌شود(جدول ۳). این یافته با نتایج آزمایشهای نوژه و همکاران، ون آلتورست و همکاران و مسگوئر و همکاران مطابقت دارد(۱۷، ۲۳، ۲۹ و ۳۱). کمترین میزان باززائی معادل ۱/۹ باززائی در هر ریزنمونه بود که ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر از هر دو ماده تنظیم‌کننده رشد BAP و NAA را داشت که احتمالاً به دلیل پایین بودن میزان BAP بوده است.

تعداد برگ‌های قابل رؤیت : این صفت به عنوان یک نمود قابل مشاهده از رشد، مورد بررسی قرار گرفت. طبق شکل ۳ بیشترین تعداد برگ‌های قابل رؤیت معادل ۱۸/۳ برگ بود که در تیمار دارای ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA تولید شد. کمترین تعداد برگ‌های قابل رؤیت مربوط به تیمارهائی بود که در آنها NAA وجود نداشت یا به میزان کمتری استفاده شده بود و BAP بالائی داشتند. ترکیب تیماری با میزان یکسان (۱ میلی‌گرم در لیتر) از هر دو ماده، ریزنمونه را بیشتر وادار به تولید کالوس کرد تا تولید گیاهچه.

درصد تولید ریشه : مقایسه میانگین‌های این صفت در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد که ترکیب‌های مختلف تیماری به دو گروه تقسیم شده‌اند(شکل ۴). گروه اول بدون ریشه‌دهی یا با ریشه‌زائی بسیار کم که عموماً ترکیبهائی را شامل می‌شود که دارای BAP بالا و NAA کمتر بودند. گروه دوم تیمارهائی را شامل شد که در آنها مقدار NAA بیشتر از BAP بود و تنها تیماری که ۱۰۰ درصد

www.SID.ir

Archive of SID

ریشه‌زائی داشت تیمار بدون هورمون بود که به طور معمول برای ریشه‌زائی گیاهچه‌های باززائی شده مورد استفاده قرار می‌گیرد و در آزمایش‌های محققین مختلف به کار رفته است(۲،۳،۱۰،۱۱،۱۲،۱۵،۱۸،۲۷،۲۹،۳۰،۳۴و۳۵).

درصد تولید کالوس : در مواردی که مقدار NAA در محیط بیشتر از BAP بود درصد تولید کالوس افزایش یافت؛ به طوری که در محیط‌های حاوی فقط ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و محیط‌های دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر از آن میزان تولید کالوس بالا بود(شکل ۴). همچنین در مواردی که میزان استفاده شده از دو تنظیم‌کننده برابر بود درصد تولید کالوس با دو مورد اخیر اختلاف معنی‌داری نداشت.

درصد نمونه‌های شیشه‌ای شده : طبق شکل ۴ بیشترین درصد شیشه‌ای شدن مربوط به ترکیب تیماری با ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و بدون NAA می‌باشد که با نتایج پاکوئس و باکسوس و انریکو و الائیدو انطباق داشت(۹، ۲۴ و ۲۵). کمترین میزان شیشه‌ای شدن مربوط به تیمارهائی است که مقدار BAP در آنها ۱ میلی‌گرم در لیتر بود که با نتایج حاصل از اثرات ساده تأیید می‌شود(جداول ۲ و ۳).

بحث کلی

NAA و BAP دو تنظیم‌کننده رشدی هستند که بیش از سایر اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در کشت بافت میخک مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۵، ۲۲، ۲۳، ۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲ و ۳۳). البته به غیر از BAP از سیتوکینین‌های دیگری مثل TDZ و KT-30 نیز استفاده شده است(۱۲ و ۲۲) که به دلیل سرعت زیاد برگشت از تمایز (با کاربرد این تنظیم‌کننده‌ها)، احتمال بروز جهش بالا خواهد بود.

در این آزمایش مشاهده شد که NAA بر روی تمام صفات مورد بررسی اثر معنی‌داری داشته است و تنها صفتی که تحت تأثیر آن قرار نگرفت شیشه‌ای شدن گیاهچه‌های باززائی شده بود. به نظر می‌رسد که در بین تنظیم‌کننده‌های رشد، گروه سیتوکینین‌ها و در بین سیتوکنین‌ها، BAP در عارضه شیشه‌ای شدن عامل بسیار مهمی است و هر اندازه غلظت آن افزایش یابد به همان اندازه نیز شیشه‌ای شدن بیشتر می‌شود. در بین غلظت‌های استفاده شده از NAA مناسب‌ترین مقدار آن در اکثر صفات، غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر بود(جدول ۲) که منطبق با یافته‌های سایر محققین می‌باشد(۱۵، ۲۰، ۲۳ و ۳۰). مناسب‌ترین غلظت BAP در صفات مورد بررسی، ۱ میلی‌گرم در لیتر بود، به طوری که در صفات باززائی در ریزنمونه‌ها بیشترین درصد و تعداد را ایجاد نموده و در صفات درصد تولید کالوس و درصد نمونه‌های‌شیشه‌ای شده که در مرحله پرآوری‌ریزنمونه‌عامل‌منفی‌حساب می‌شوند(۷،۸،۲۶و۲۸) کمترین مقدار در این غلظت به دست آمد.

در مرحله پرآوری ریزنمونه‌ها وجود تعادل در بین دو نوع تنظیم‌کننده رشد اکسین و سیتوکینین بسیار ضروری است، به طوری که غلظت‌های بالای NAA صفات منفی مانند تولید ریشه و کالوس و حتی شیشه‌ای شدن را افزایش می‌دهد و کمیت صفات اصلی یعنی درصد باززائی و تعداد باززائی در هر ریزنمونه را کاهش می‌دهد.

بنابراین به عنوان بهترین ترکیب تیماری تنظیم‌کننده رشد برای کشت انتهای شاخساره میخک در رقم مورد استفاده، می‌توان مقادیر ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر از NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر از BAP را در محیط پایه MS توصیه کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ـ جدول تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات مورد مطالعه.

منابع تغییر	درجه آزادی	صفات مورد اندازه‌گیری: درصد باززائی	تعداد باززائی در هر ریزنمونه	تعداد برگ‌ها	درصد تولید ریشه	درصد تولید کالوس	درصد نمونه شیشه‌ای شده
NAA	۲	۰/۷۲۳***	۱/۳۰۱***	۰/۶۳۱**	۰/۸۳۴***	۵۲/۵۴***	۰/۰۰۶ns
BAP	۳	۰/۴۰۷***	۳/۴۰۳***	۱/۳۸۳***	۲/۹۰۹***	۱۹/۳۴***	۰/۱۷۸***
اثر متقابل	۶	۰/۲۲۸***	۰/۶۵۰***	۰/۹۳۷***	۰/۵۱۵***	۱۵/۰۵***	۰/۰۵۸**
اشتباه آزمایشی	۲۴	۰/۰۲۰	۰/۰۳۳	۰/۱۲۳	۰/۰۳۴	۰/۹۸۴	۰/۰۱۷
CV(%)		۱۳/۸۶	۷/۹۶	۱۰/۹۱	۲۴/۷۰	۱۵/۲۶	۳۰/۹۱

*** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ در هزار　　** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

ns : غیر معنی‌دار

جدول ۲ـ مقایسه میانگین‌های سطوح NAA در صفات مورد بررسی (P<۱٪).

غلظتهای NAA	صفات: درصد باززائی	تعداد باززائی در هر ریزنمونه	تعداد برگ‌ها	درصد تولید ریشه	درصد تولید کالوس	درصد نمونه شیشه‌ای شده
۰	۶۳/۶۷ b	۴/۱۷ b	۹/۰۴ b	۲۵/۷۱ b	۲۱/۲۱ c	۱۵/۱ a
۰/۳	۹۳/۰۴ a	۷/۳ a	۱۱/۳۳ a	۳۲/۰۸ a	۶۳/۴۶ b	۱۳/۳۳ a
۱	۵۱/۸۳ c	۴/۲۵ b	۱۱/۸۷ a	۲۵/۲۷ c	۷۵/۲۳ a	۱۶/۰۵ a

+ : حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال مربوطه است.

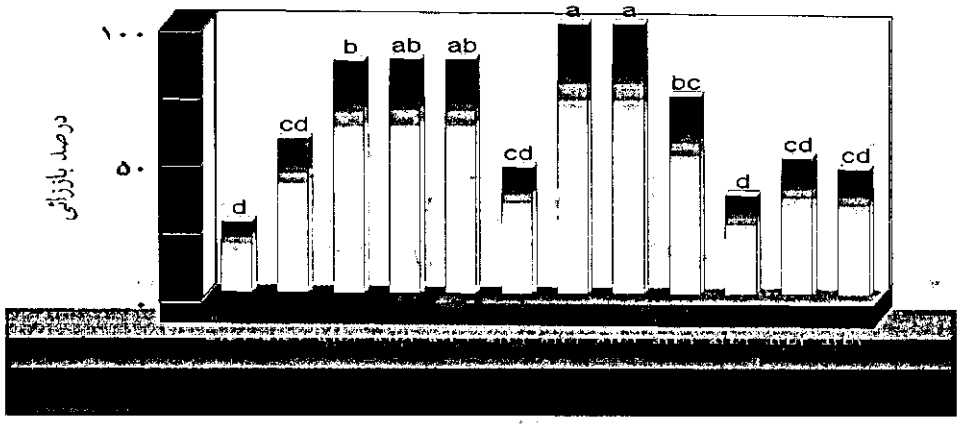
جدول ۳ـ مقایسه میانگین‌های سطوح BAP در صفات مورد بررسی.

غلظتهای BAP	صفات: درصد باززائی	تعداد باززائی در هر ریزنمونه	تعداد برگ‌ها	درصد تولید ریشه	درصد تولید کالوس	درصد نمونه شیشه‌ای شده
۰	۵۱/۸۹ b	۳/۲ c	۱۲/۶ a	۶۷/۹ d	۷۲/۴ a	۱۵/۳ a
۰/۳	۴۶/۶۷ a	۲/۵ c	۱۳/۵ a	۲۷/۸ c	۵۲/۲ b	۱۷/۸ a
۱	۷۸/۶۱ a	۸/۷ a	۸/۶ b	۰/۰ a	۳۶/۰ c	۳/۴ b
۲/۵	۷۷/۵۶ a	۶/۵ b	۸/۲ b	۱۵/۰ b	۳۹/۲ c	۲۲/۸ a
سطح احتمال	٪۵	٪۱	٪۱	٪۱	٪۱	٪۱

+ : حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال مربوطه است.

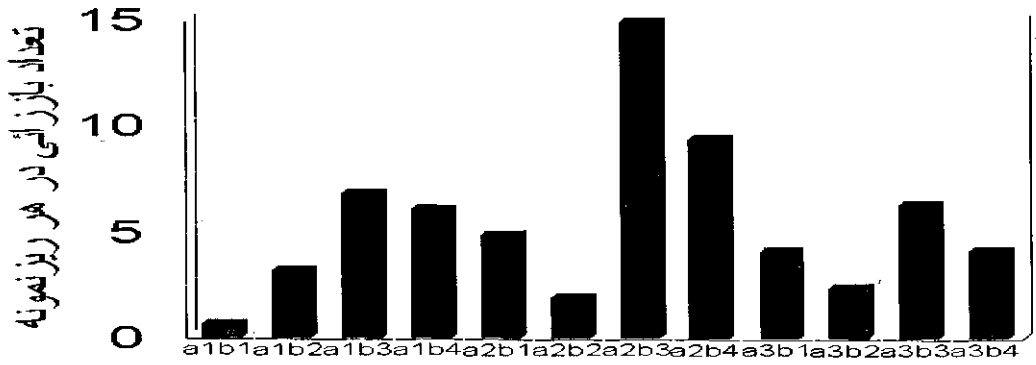
www.SID.ir

Archive of SID

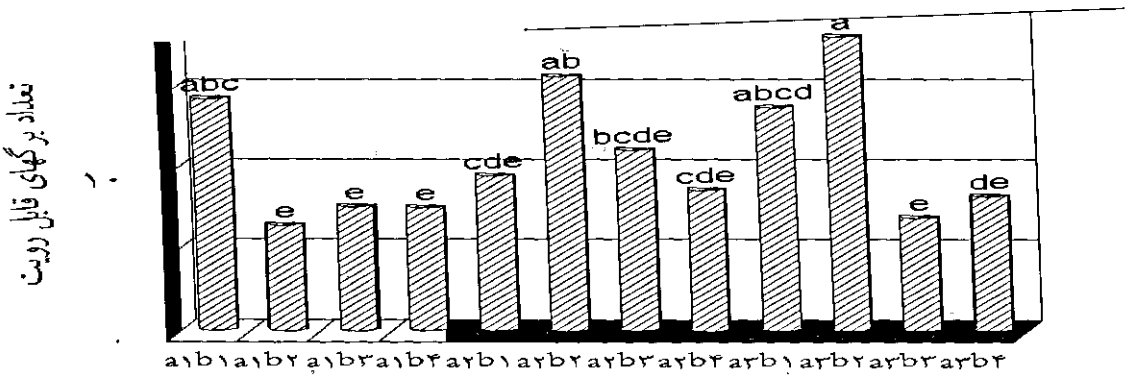


ترکیب‌های تیماری هورمونها (NAA, BAP)

شکل ۱ـ اثر ترکیب‌های تیماری تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA روی درصد باززایی.



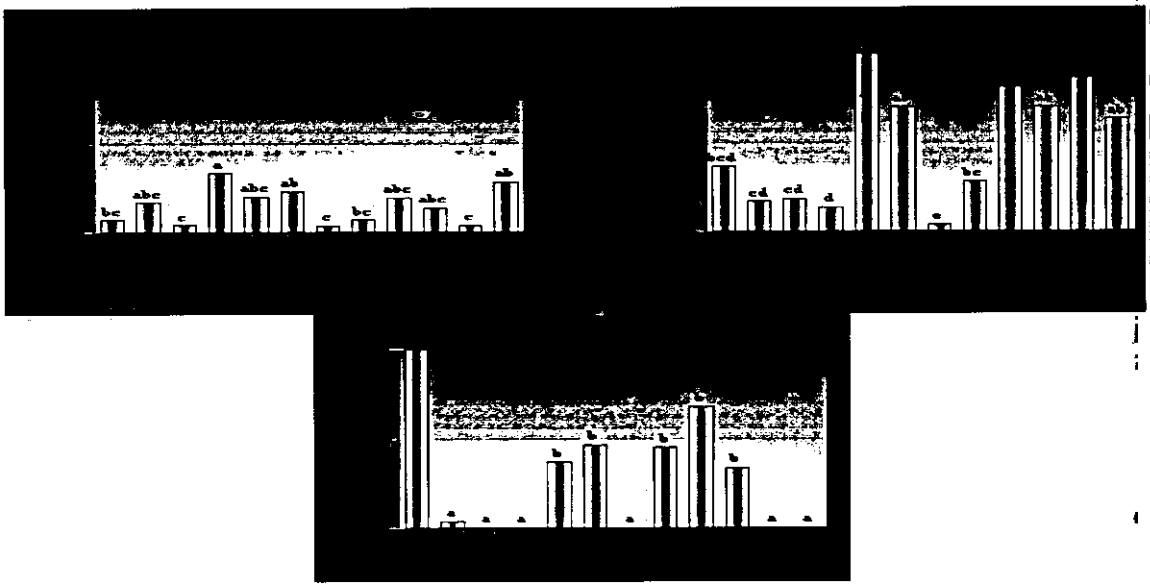
شکل ۲ـ اثر ترکیب‌های تیماری BAP و NAA روی تعداد باززایی در هر ریزنمونه.



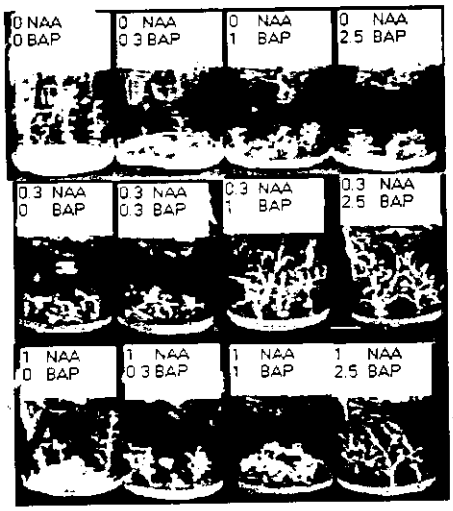
شکل ۳ـ اثر ترکیب‌های تیماری BAP و NAA روی تعداد برگ‌های قابل رؤیت.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴ـ اثر ترکیب‌های مختلف BAP و NAA روی درصد تولید ریشه و کالوس و نمونه‌های شیشه‌ای شده.



شکل ۵ـ باززایی در ترکیب‌های مختلف BAP و NAA

منابع مورد استفاده

۱ـ باقری، عبدالرضا، ۱۳۷۶ ـ مبانی کشت بافتهای گیاهی (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

2- Choudhary, M. L. and C.K. Chin. 1995. Somatic embryogenesis in cell suspention culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Plant Growth Regulator 16 (1): 1-4.

3- Choudhary, M. L. 1992. *In vitro* response of different cultural media on shoot regeneration and root develompment of carnaion (*Dianthus caryophyllus* L.). Advances in Plant Sciences 5 (1): 208-211.

www.SID.ir

Archive of SID

4- Choudhary, M. L. and M. M. Mubarak, 1991. Plant regeneration from leaf callus of carnaion (*Dianthus caryophyllus* L.). Annales of Agricultural Science University of Ainshames (Egypt)> 36 (2): 579-582.

5- Choudhary, M. L. 1991. Vegetative propagation of carnation *in vitro* through multiple shoot development. Indian Journal of Horticulture 48(2): 177-181.

6- Collin, H. A. and S. Edwards, 1998. Plant cell culture. Bios Scientific Publishers.UK.

7-Deberg, P. I. A. Christie, D. Cohen, B. Grout, S. Von Arnold, R. Zimmerman and M, Ziv, 1992. Reconsideration of the term "Vitrification" as used in micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 38: 135-140.

8- Densco, I, 1987. Factors influencing vitrification of carnation and some conifers. Acta Horticulturae 212: 167-176.

9- Enrico, O. and H. Elaido, 1998. Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. Scientia Hortiulturae 75: 91-101.

10- Fal, M. A. J. Suaraz, J. P. Majada and T. R. Sanches, 1991. Mass propagation of carnation cultivars of commercial interest. Horticultural Abstracts (1993) 63 (7) 665 (abstract).

11- Fisher, M. M. Ziv and A. Vainstein, 1993. An efficient method of adventitous shoot regeneration from cultured carnation petals. Scientia Horticulturae. 53: 231-237.

12- Frey, L. and J. Janick, 1991. Organogenesis in carnation. Journal of American Society for Horticultural Science 116(6): 1108-1112.

13- Iqbal, H. A. Mushtaq and Q. Azra. 1994. In vitro multiplication of *Dianthus caryophyllus* L. CV. CSV - Pink and WhitSim. Sarhad Journal of Agriculture 10(5): 539-546.

14- Johnson, R. T. 1980. Gamma irradiation and in vitro induced separation of chimeral genotypes in carnation. Hort,Science 15(5): 605-606.

15- Kallak, H., I. Hilpus and K. Virumae, 1996. Influence of genotype and growth regulators on morphogenetic processes in carnation shoot apex cultures. Scientia Horticulturae 65: 181-189.

16- Larson, R. A., 1992, Introduction to floricultre. Academic Press INC. PP: 45-65.

17- Messeguer, J., M. C. Arconada and E. Mele, 1993. Adventitious shoot regeneration in carnaion (*Dianthus caryophyllus* L.). Scientia Horticultuae 54: 153-163.

www.SID.ir

Archive of SID

18-Miller, R. M., V. Kaul, J. F. Hutchinson and D. Richardson, 1991. Adventitious shoot regenration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) from axillary bud explants. Annales of Botany 67 (1):35-42.

19- Montes, S., L. Ramirez, M. M. Hernands, N. Santana, M. Martines and D. Lara, 1997. Microporpropagation of carnation cultivars (*Dianthus caryophllus* L. and *Dianthus plumaris* L.) through meristem culture. Cultivus Trapicales 18(1): 75-81.

20- Mujib, A. and A. K. Pal, 1994. Growth regulators influencing *in vitro* growth and development of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Crop Research 8(3): 642-644.

21- Mujib, A. and A.K. Pal, 1995. Inter-varietal variation in response to in vitro cloning of carnation. Crop Researrch 10(2): 190-194.

22- Nakamo, M., Y. Hoshino and M. Mii, 1994.Adventitious shoot regeneration from cultured petal explants of carnation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36: 15-19.

23- Nugent, G., T. Wardley-Richardson and C. Y. Lu, 1991. Plant regeneratin from stem and petal of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Plant Cell Reports 10: 477-480.

24- Paques, M., Ph. Boxus and M. Dulos, 1984. "Vitrification": An induceable and reversible phenomenon. Acta Horticulturae 212: 253-258.

25- Paques, M. and Ph. Boxus, 1987a. Vitrification : A Phenomenon related to tissue water content. Acta Horticulturae 212: 245-252.

26- Paques, M. and Ph. Boxus, 1987b. Vitrification : Revew of literatures. Acta Horticulturae 212: 157-166.

27- Roest, S. and G. S. Bokelman, 1981. Vegetative propagation of carnation *in vitro* through multiple shoot development. Scientia Horticulturae 14: 357-366.

28- Rugini, E., P. Tarini and M. E. Rossodivita, 1987. Control of shoot vitrification of almond and olive grown *in vitro*. Acta Horticulturae 212: 177-182.

29- Van Altvorst, A. C. H. J. J. Koehorst, T. Bruinsma, J. Jansen, J. D. M. Custers, J. D. John and J. J. M. Dons, 1992. Adventitious shoot formation from in vitro leaf explants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Scientia Horticulturae 51: 223-235.

30- Van Altvorst, A. C. S. Yancheva and H. dons, 1995. Cells within the nodal region of carnation exhibit a high potential for adventitious shoot formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 40: 151-157.

www.SID.ir

Archive of SID

31- Van Altvorst, A. C., T. Bruinsma, H. D. M. Koehorst and H. J. M. Dons. 1992. Regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) using leaf explantes. Acta Horticulturae 307: 109-116.

32- Van Altvorst, A. C., T. Riksen, H. Dons, A. Vainstain and D. Weiss, 1995a. Shoot regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of carnation, Acta Horticulturae 420: 92-94.

33- Van Altvorst, A. C. T. Riksen, H. Koehst, H. Dons, A. Vainstain and D. Weiss, 1995b. Transgenic carnation obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leaf explant. Trangenic Research 4: 105-113.

34- Van de Pol, P. A. and J. V. M. Vogelgong, 1983. Accelerated rooting of carnation "Red Baron" by temperature pretreatment. Acta Horticulturae 141: 181-188.

35- Ziv, M. and G. Meir and A. H. Halevy, 1983. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2: 55-56.

www.SID.ir