مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۹ شماره ۲ صفحه های ۱۳۹ تا ۱۵۲ (۱۳۸۷)

اثر محیط های مختلف کشت بر پرآوری ریزنمونه‌های شاخساره سرخس 'بوستونی'[۱]

THE EFFECTS OF DIFFERENT NUTRIENT MEDIA ON SHOOT PROLIFERATION OF BOSTON FERN (*NEPHROLEPIS EXALTATA* SCHOTT CV. 'BOSTONIENSIS')

مرضیه شفیعی حاجی آباد، یوسف حمید اوغلی، رضا فتوحی قزوینی، جواد فتاحی مقدم[۲]

چکیده

سرخس 'بوستونی' با نام علمی *Nephrolepis exaltata* Schott cv. 'Bostoniensis' یکی از مورد توجه‌ترین و پرفروش‌ترین سرخس‌های زینتی درون خانه‌ای است. امروزه یکی از روش‌های تجاری تولید انبوه این گیاه، کشت درون شیشه‌ای آن است. این پژوهش به منظور دست‌یابی به روشی مناسب جهت پرآوری شاخساره سرخس 'بوستونی' صورت گرفت. آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل و طرح به طور کامل تصادفی انجام شدند. برای انجام این پژوهش از ریزنمونه شاخساره های ۳ تا ۷ میلی‌متری که در محیط کشت دارای ۰/۵ غلظت نمک‌های MS، ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین (BA) پرورش یافته بودند استفاده شد. ابتدا شاخساره‌ها جدا و در ۱۲ محیط کشت مختلف دارای دو غلظت نمک‌های معدنی (۰/۵ یا یک چهارم غلظت نمک‌های MS)، دو غلظت ساکارز (۲۰ یا ۳۰ میلی‌گرم در لیتر) و سه غلظت بنزیل آدنین (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، کشت شدند. پس از گذشت شش هفته، تعداد شاخساره، طول شاخساره، وزن تر و وزن خشک اندام‌های هوایی اندازه‌گیری شدند. تولید ساختارهای سبز کروی (ساختارهای کروی شکل مریستمی) نیز در محیط‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده بیانگر اثر معنی دار فاکتورهای به کار رفته در این آزمون بر صفات اندازه‌گیری شده بود. بیشترین تعداد شاخساره در محیط کشت ۰/۵ MS، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین (۰/۵ ± ۲۵ و با طول ۰/۵ ± ۵ میلی‌متر) به دست آمد. همچنین ساختارهای سبز کروی در غلظت‌های بالای بنزیل آدنین (۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شدند. مطالعه ساختارهای سبز کروی بیانگر مریستمی بودن این ساختارها بود که جوانه‌های جانبی را شکل می‌دهند. با توجه به نتایج به دست آمده این دو محیط به عنوان مناسب‌ترین محیط‌ها جهت پرآوری سرخس 'بوستونی' معرفی شدند.

واژه های کلیدی: بنزیل آدنین، پرآوری، ساختارهای سبز کروی، ساکارز، سرخس 'بوستونی'، نمک‌های معدنی.

۱- تاریخ دریافت: ۸۶/۹/۳ تاریخ پذیرش: ۸۷/۷/۲۴

۲- به ترتیب مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر، استادیار گروه علوم باغبانی، استاد علوم باغبانی و عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات مرکبات کشور و دانشجوی دکتری باغبانی دانشگاه گیلان، گیلان، جمهوری اسلامی ایران.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

کشت درون شیشه‌ای[1] سرخس ها به عنوان یک ابزار پژوهشی برای مطالعه توانایی نمو سرآغازه‌های برگی[2] از اوایل سال ۱۹۵۰ رواج پیدا کرد (۱، ۶). پژوهش‌های کاربردی بیشتر به منظور افزایش درون شیشه‌ای سرخس‌ها در ابتدای سال‌های ۱۹۶۰ آغاز شد (۱). در میان گونه‌های مختلف سرخس، سرخس 'بوستونی' با نام علمی *Nephrolepis exaltata* Schott cv. 'Bostoniensis' متعلق به تیره Polypodiaceae بوده و یکی از پرطرفدارترین سرخس‌های زینتی درون‌خانه‌ای است (۱۶، ۱۹). تورست[3] (۲۴) در کتاب روش‌های کشت درون شیشه‌ای گیاهان باغی، به کشت درون شیشه‌ای سرخس 'بوستونی' پرداخته است. در دهه‌های اخیر تولید انبوه این گیاه از طریق کشت درون شیشه‌ای متداول شده است (۱۳، ۱۶، ۱۹، ۲۴). در سه دهه اخیر پژوهشگران مختلفی با روش‌های متفاوت به کشت درون شیشه‌ای سرخس 'بوستونی' پرداخته‌اند (۸، ۹، ۱۱، ۲۱). همچنین از این گیاه برای مطالعه تعیین اثرات دما، نور و شرایط گیاه مادری بر کیفیت و کمیت گیاهان کشت درون شیشه‌ای دختری استفاده شده است (۱۶، ۱۷، ۱۸).

مرحله پرآوری[4] (تولید تعداد زیاد گیاهچه اسپروفیت) مهم‌ترین مرحله در فرایند کشت درون شیشه‌ای سرخس 'بوستونی' است. فرایند باززایی اسپروفیت سرخس، از طریق باززایی مستقیم و یا باززایی غیر مستقیم از پینه و یا مرحله اسپورزایی گامتوفیت است (۲۳، ۲۵). عوامل زیادی مثل سن ریزنمونه، بازجوانی، مقدار مواد غذایی، ترکیب و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد، مقدار و منبع کربن، روش کشت جامد یا مایع، مسیرهای باززایی یاخته های اسپروفیت را کنترل می‌کند (۲۳).

در پژوهشی که توسط پاسکوال و همکاران[5] (۲۲) روی اثر غلظت‌های مختلف نمک‌های MS[6] (۲۰) (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰٪) به همراه ۵ غلظت ساکارز (۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۱۰۰ گرم در لیتر) در سرخس 'بوستونی' صورت گرفت از ریزنمونه‌های شاخساره درون شیشه‌ای استفاده کردند. آن ها محیط کشت دارای یک چهارم غلظت نمک‌های MS و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز را با تولید ۲/۶ شاخساره به ازای هر ریزنمونه را به عنوان بهترین محیط پرآوری معرفی نمودند. گومارز و همکاران[7] (۱۲) با بررسی برهمکنش غلظت‌های مختلف نیتروژن معدنی (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰٪) با ۶ غلظت مختلف ساکارز (۰، ۷/۵، ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ گرم در لیتر) ، میزان ۲۵٪ نیتروژن همراه با ۷/۵ گرم در لیتر ساکارز را برای ریزافزایی سرخس 'بوستونی' توصیه نمودند. زیو[8] (۲۵) با کشت ریزنمونه‌های سرخس در محیط کشت مایع داخل بیوراکتور، نصف غلظت نمک‌های MS و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز را برای ریزافزایی سرخس 'بوستونی' پیشنهاد کرد.

نکته قابل توجه در پرآوری سرخس 'بوستونی' تولید توده هایی کروی شکل به نام ساختارهای سبز کروی[9] (GGB) است. وقتی تنظیم‌کننده‌های رشد با یک نسبت مشخص به محیط افزوده شوند به احتمال به عنوان یک محرک مورفولوژیکی عمل کرده و نمو مریستم‌های کروی[10] و جوانه‌های خوشه‌ای[11] را سبب می‌شوند. واژه مریستم‌های کروی یا جوانه‌های خوشه‌ای در مورد آلاله، سرخس، سیب‌زمینی و موز به کار رفته است و به ساختارهای کروی قابل باززایی که از طریق اندام‌زایی و یا رویان‌زایی بدنی از جوانه‌ها و یا سایر بافت‌های دارای قابلیت باززایی تولید می‌شوند، گفته می‌شود (۲۵). ریزافزایی سرخس با استفاده از ساختارهای کروی سبز اولین

۱- *In vitro* culture ۲- Leaf primordia ۳- Torrest ۴- Proliferation ۵- Pasqual *et al.*
۶- Murashige and Skoog ۷- Guimaraes *et al.* ۸- Ziv ۹- Green Globular Body ۱۰- Spherical meristematic
۱۱- Bud cluster

Archive of SID

www.SID.ir

بار توسط هیگوچی و همکاران (۱۵) در مورد نفرولپیس کوردیفولیا گزارش شده است. وی با استفاده از این روش در طول شش ماه با بازکشت جوانه انتهایی روندک[۱] ۱۶۰۰۰ گیاهچه تولید کرد. در شرایط خاصی تولید این ساختارهای سبز کروی در پاسخ به BA صورت می‌گیرد. ساختارهای سبز کروی وقتی در محیط بدون هورمون کشت شود تولید اسپروفیت می‌کند (۶). هیگوچی و آماکی[۲] (۱۴) در پژوهشی دیگر تولید ساختارهای کروی سبز را از ریزنمونه‌های نیساگ (ریزوم) سرخس آسپلنیوم نیدوس[۳] در محیط حاوی ۲/۲ میکرومول در لیتر بنزیل آدنین (BA) گزارش کردند (۱۴). برترند و همکاران[۴] (۶) نیز سرخس پولی پودیم کامبریکوم[۵] را با استفاده از تولید ساختارهای کروی سبز در حضور هورمون BA تکثیر کردند. به طور معمول سایتوکینین‌ها در کشت درون شیشه‌ای باعث تورم بافت‌ها، انگیزش نمو جوانه‌های جانبی ضمن کاهش چیرگی انتهایی و نیز تولید جوانه‌های نابجا و جانبی و شاخساره‌های جدید می‌شوند (۳، ۴، ۵). اثرهای سایتوکینین‌ها به ویژه BA نیز در تشکیل شاخساره و تولید تعداد زیاد اسپروفیت در انواع مختلف سرخس‌ها گزارش شده است (۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲).

این پژوهش به منظور به دست آوردن مناسب‌ترین محیط کشت برای تکثیر سریع و انبوه سرخس 'بوستونی' انجام گرفت و در پایان بهترین ترکیب‌های محیط کشت برای پرآوری سرخس 'بوستونی' معرفی شده‌اند.

مواد و روش‌ها

برای ارزیابی اثر محیط‌های مختلف کشت بر مرحله پرآوری سرخس 'بوستونی' سه تیمار مختلف شامل: دو غلظت نمک‌های پرمصرف و کم مصرف MS (A_1= ۱/۲ MS و A_2 = ۱/۴ MS) و دو غلظت ساکارز (۳۰ گرم در لیتر = B_1 و ۲۰ گرم در لیتر =B_2) و سه غلظت هورمون BA (۲ میلی گرم در لیتر=C_1، ۱ میلی گرم در لیتر = C_2و ۰/۵ میلی گرم در لیتر =C_3) به صورت فاکتوریل در نظر گرفته شد. بر این اساس۱۲ محیط مختلف تهیه (جدول ۱) و در شیشه‌های مربا به مقدار ۵ ± ۵۰ گرم و در چهار تکرار توزیع شدند. محیط‌ها با ۸ گرم در لیتر آگار به حالت نیمه جامد در آمدند. pH محیط قبل از اتوکلاو در ۵/۷ تنظیم شد.

در این آزمایش ریزنمونه‌ها از شاخساره‌های درون شیشه‌ای سرخس 'بوستونی' به طول ۳ تا ۷ میلی‌متر (شکل ۱) که در محیط کشت دارای نصف غلظت نمک‌های MS به همراه ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و یک میلی‌گرم در لیتر BA پرورش یافته بودند، تهیه شد (۲). ریزنمونه‌ها به تعداد سه شاخساره در هر شیشه کشت شدند. شیشه‌های کشت حاوی ریزنمونه‌ها در داخل اتاقک رشد دارای ۲۰۰۰ لوکس نور و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت طول دوره روشنایی نگهداری شدند. پس از سه هفته عمل بازکشت در تمامی محیط‌ها یک بار صورت گرفت. بعد از گذشت سه هفته دیگر، گیاهچه‌ها از شیشه‌ها خارج و ویژگی‌هایی چون تعداد شاخساره، طول شاخساره، وزن‌تر و خشک قسمت‌های هوایی در هر ریزنمونه به همراه وجود ساختارهای سبز کروی و فرم رشد مورد ارزیابی قرار گرفت.

این آزمایش به صورت فاکتوریل و در پایه طرح به طور کامل تصادفی در چهار تکرار انجام شد. داده‌ها ابتدا با استفاده از آزمون اسکیونس و کورتوسیس نرم‌افزار MSTATC به صورت نرمال درآمده و سپس مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ مقایسه نشدند.

۱- Runner ۲- Higochi and Amaki ۳- *nidus Asplenium* ۴- Bertrand *et al.* ۵- *Polypodium combricum*

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- محیط‌های کشت به کار رفته در مرحله پرآوری سرخس 'بوستونی'.

Table 1. Medium cultures used in proliferation stage of Boston fern.

تیمار Treatment	MS 1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8	MS9	MS10	MS11	MS12
نمک MS معدنی MS mineral salts	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
ساکارز (گرم در لیتر) Sucrose (g l^{-1})	30	30	30	20	20	20	30	30	30	20	20	20
بنزیل (میلی گرم در لیتر) BA (mgl^{-1})	2	1	0.5	2	1	0.5	2	1	0.5	2	1	0.5

نتایج و بحث

برهمکنش های نمک‌های معدنی و ساکارز بر صفات اندازه‌گیری شده در مرحله پرآوری سرخس 'بوستونی'

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد برهمکنش های غلظت نمک‌های MS و ساکارز بر تعداد شاخساره، وزن‌تر و وزن خشک اندام های هوایی معنی‌دار شد، ولی بر طول شاخساره اثر معنی‌داری نداشت.

بر خلاف نقش اساسی و موثر عناصر معدنی در فرایند باززایی و پرآوری، اسپروفیت سرخس 'بوستونی' برای تقسیم و توسعه یاخته ای به غلظت کاهش یافته عناصر معدنی به ویژه نیتروژن در محیط کشت نیاز داشت و غلظت‌های بالاتر حالت سمیت برای اسپروفیت ایجاد کرد (۱۰). به نظر می رسد محیط MS ۰/۵ نه تنها اثر بازدارندگی و سمیت عناصری چون نیتروژن را ندارد بلکه غلظت مناسبی از عناصر معدنی را برای تقسیم و تمایز یاخته ای فراهم می‌کند. افزون بر این شاخساره‌های به کار رفته برای مرحله پرآوری، گیاهچه‌های کوچک و جوان به طول ۳ تا ۷ میلی‌متر بود و حداکثر دارای ۲ تا ۴ برگ بودند. این شاخساره‌ها به طور کامل دگر غذا بود و توانایی فتوسنتز نداشتند، از این جهت به قند (ساکارز) به کار رفته در محیط کشت جهت تقسیم و توسعه یاخته ای نیازمند بودند. بنابراین ساکارز موجود در محیط کشت منبع انرژی جهت تقسیم یاخته ای (که لازمه تولید جوانه‌های جانبی و تولید شاخساره‌های جدید است) را فراهم کرد، واحدهای ساختاری برای بیوسنتز مولکول‌های بزرگ مورد نیاز رشد گیاه را تأمین می‌کنند (۲۲). به احتمال میزان ۳۰ گرم در لیتر ساکارز غلظت مناسب‌تری را از قند برای تقسیم یاخته ای فراهم می‌سازد. با توجه به این که بیشترین تعداد شاخساره تنها در تیمارهای (A_1B_1) به دست آمده است و سایر تیمارها در گروه b قرار گرفته‌اند می‌توان نتیجه گرفت که غلظت نمک‌های معدنی و ساکارز اثرات یکدیگر را بر تعداد شاخساره تشدید کرده اند (جدول ۲).

پاسکوال و همکاران (۲۲) گزارش کردند که برهمکنش نمک‌های MS و ساکارز بر تعداد شاخساره معنی‌دار نبود. آن ها بیشترین تعداد شاخساره را در یک چهارم غلظت نمک‌های MS و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به دست آوردند. گومارز و همکاران (۱۲) در پژوهش روی میزان پرآوری شاخساره‌های درون شیشه‌ای سرخس 'بوستونی' پیوستگی زیاد اثر غلظت‌های نیتروژن با درصد ساکارز به کار رفته را نشان دادند. در آزمایش آن ها، ۱۵ گرم در لیتر ساکارز، نصف غلظت نیتروژن MS اثر بهتری بر تعداد شاخساره داشت. اما در غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز یک چهارم غلظت نیتروژن MS بهترین بود. آن ها یک چهارم نیتروژن MS را بهترین غلظت نیتروژن معدنی معرفی کردند. همچنین برهمکنش نیتروژن محیط کشت و ساکارز را بر تعداد شاخساره معنی‌دار یافتند و

Archive of SID

www.SID.ir

عنوان کردند در ۲۵٪ نیتروژن محیط MS بیشترین تعداد شاخساره در ۷/۵ گرم در لیتر ساکارز به دست آمد درحالی که در غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز نیز بیشترین گیاهچه را در یک چهارم غلظت نمک‌های MS به دست آوردند (۱۲). از آنجایی که گومارز و همکاران (۱۲) فقط غلظت نیتروژن معدنی را در محیط کشت مورد آزمایش داشتند درحالی که در این آزمایش کل نمک‌های معدنی پرمصرف و کم مصرف مورد آزمون قرار گرفتند، بنابراین تفاوت نتایج مشاهده شده می تواند به علت نیاز سایر عناصر غذایی غیر از نیتروژن باشد.

به احتمال بین اثر دو غلظت ساکارز به کار رفته در این آزمایش از نظر نقش اسمزی و منبع کربن مؤثر بر طویل شدن شاخساره تفاوت کمی وجود دارد. به همین دلیل اثر ساکارز بر طویل شدن شاخساره سرخس 'بوستونی' معنی‌دار نشده است. پاسکوال و همکاران (۲۲) نیز در مورد برهمکنش نمک‌های معدنی و ساکارز بر طول شاخساره گزارش کردند که برهمکنش نمک‌های معدنی محیط MS و ساکارز معنی‌دار نیست. اما گومارز و همکاران (۱۲) برهمکنش نیتروژن معدنی، ساکارز و محیط کشت را بر طول شاخساره معنی‌دار یافتند. علت معنی‌دار شدن این اثرها در آزمایش گومارز و همکاران (۱۲) می‌تواند به دلیل دامنه زیاد غلظت‌های ساکارز و نیتروژن مورد آزمون باشد اما در این پژوهش فقط دو غلظت متداول تر ساکارز مورد بررسی قرار گرفته است.

مقایسه میانگین آزمون دانکن در مورد برهمکنش های غلظت نمک‌های MS و ساکارز بر وزن‌تر و وزن خشک اندام‌های هوایی نشان می‌دهد که تیمار A_1B_1 با میانگین وزن‌تر ۰/۵۸۳ گرم و با میانگین وزن خشک ۰/۱۰۷ گرم در گروه a و سایر تیمارها درگروه b و یا گروه c قرار می‌گیرند. کمترین وزن خشک نیز در تیمارهای A_2B_2 با میانگین وزن ۰/۰۴۰ گرم تولید شد(گروه c). در مطابقت با نتایج این آزمون، گومارز و همکاران (۱۲) نیز در غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بیشترین وزن تر را در نصف غلظت‌های نمک MS به دست آوردند. اما بیشترین وزن تر در غلظت ۱۵ گرم در لیتر ساکارز و در غلظت کامل نمک‌های MS به دست آمد. در غلظت‌های بالاتر ساکارز، بیشترین وزن تر در غلظت کمتر (۲۵ و ۵۰٪) نمک‌های معدنی به دست آمد. همان طور که بحث شد مناسب‌ترین غلظت نمک‌های معدنی برای افزایش وزن تر اندام‌های هوایی نصف نمک‌های MS است. در غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز نیز وزن تر بیشتری نسبت به ۲۰ گرم در لیتر ساکارز حاصل می‌شود. بنابراین بیشترین وزن‌تر در تیمار A_1B_1 به دست می‌آید. افزون بر این تعداد شاخساره جانبی که خود نشان دهنده یاخته‌های مریستمی با آب فراوان است (۳)، در این تیمار بیشتر است. در مقایسه اثر تیمارها بر وزن تر و وزن خشک مشاهده می‌شود که افزایش وزن تر با افزایش وزن خشک متناسب است و این نشان می‌دهد که در تیمار A_1B_1 به علت فراهم بودن منبع غذایی کافی برای رشد و تقسیم یاخته ای، بیوسنتز مواد به خوبی صورت گرفته و ماده خشک ریزنمونه‌ها افزایش یافته است بنابراین وزن‌تر نیز در این تیمار بیشتر از سایر تیمارها است. کم بودن وزن خشک در تیمار A_2B_2 نشان دهنده مناسب نبودن شرایط تغذیه‌ای جهت بیوسنتز مواد است.

برهمکنش های نمک‌های معدنی، بنزیل آدنین بر صفات اندازه‌گیری شده در مرحله پرآوری سرخس 'بوستونی'

مقایسه میانگین‌های نشان می دهد که اثر غلظت نمک‌های معدنی بر تعداد شاخساره مهم‌تر از اثر غلظت BA است. در تمام تیمارها در نصف غلظت نمک‌های MS (A_1)تعداد شاخساره بیشتری تولید شده است و اثر BA (در غلظت بالا) باعث شده که تیمارهای A_2C_1 و A_2C_2 از نظر آماری با تیمار A_1C_3 اختلاف معنی‌داری نداشته باشد (جدول ۳). کاملوه و همکاران[۱] (۹) غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد کینتین را به همراه NAA و IAA در ترکیب با غلظت‌های مختلف نمک‌های معدنی MS به کار برده و بیان کردند که مهم‌ترین عامل موثر بر

۱- Comloh *et al.*

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- برهمکنش غلظت‌های مختلف نمک‌های معدنی MS و غلظت‌های مختلف ساکارز بر صفات اندازه‌گیری شده در مرحله پرآوری سرخس 'بوستونی'.

Table 2. The interactions of MS mineral salts and sucrose concentrations on measured traits in proliferation stage of Boston fern.

صفت Trait		طول شاخساره	وزن‌تر	وزن خشک شاخساره
تیمار Treatment	تعداد شاخساره Shoot number	Shoot length (mm)	شاخساره (گرم) Shoots fresh weight (g)	(گرم) Shoot dry weight (g)
A_1B_1	19.674 a	10.209a	0.583 a	0.107a
A_1B_2	7.138 b	10.908 a	0.315 b	0.093 b
A_2B_1	7.367 b	7.634 a	0.259 b	0.076 b
A_2B_2	4.446 b	7.204 a	0.150 c	0.040 c

† Values in each column followed by the same letters are not significantly different (P=0.01).

† اعداد هر ستون که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۱٪ با هم تفاوت معنی دار ندارند.

بر تشکیل شاخساره جدید غلظت نمک‌های MS و نه غلظت تنظیم‌کننده‌های اضافه شده به محیط کشت است.

گزارش دیگری مبنی بر مقایسه برهمکنش های نمک‌های معدنی و تتنظیم کننده رشد بر تعداد شاخساره تولید شده در مرحله پرآوری نفرولپیس وجود ندارد. در این پژوهش نیز در تطابق با نتایج سایر پژوهشگران مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت سیتوکنین تعداد شاخساره افزایش می‌یابد (۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲).

یکی از اثرهای بارز و شناخته شده غلظت‌های بالای سایتوکینین‌ها در محیط کشت کاهش طول شاخساره است (۹). به طور معمول اکسین را مسئول اصلی افزایش طول یاخته و در نتیجه افزایش طول بخش‌های هوایی گیاه می‌دانند اما در حقیقت تعادل هورمونی ایجاد شده در پاسخ یاخته‌ها موثر است به طوری که وقتی نسبت سایتوکینین به اکسین بیشتر باشد فرایند باززایی به سمت تولید شاخساره پیش می‌رود و در حالت عکس افزایش طول اندام‌ها و نیز تولید ریشه مشاهده شد (۳، ۴، ۵). بنابراین بدیهی است که در غلظت‌های بالای BA (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) طول شاخساره کمتر از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA باشد. به همین دلیل در این آزمایش نیز غلظت‌های بالای سایتوکینین باعث کاهش رشد طولی شاخساره‌ها شده، در نتیجه کمترین طول شاخساره در تیمارهای A_1C_1 و A_2C_1 مشاهده شد.

با توجه به مناسب بودن نصف غلظت نمک‌های MS برای افزایش تعداد و طول شاخساره‌ها و این که در غلظت‌های کم تنظیم‌کننده BA، پتانسیل محیط کشت در جهت افزایش طول شاخساره‌ها و افزایش ماده خشک پیش می‌رود. عمده وزن یاخته‌ها مربوط به سلولز موجود در دیواره‌های آن ها و نیز آب است (۳، ۴). بنابراین بیشترین وزن‌تر و وزن خشک قسمت‌های هوایی در تیمارهای A_1C_3 حاصل شد. اما در تیمارهای A_2C_3 به علت کافی نبودن غلظت عناصر معدنی بیوسنتز مواد مختل شده، در نتیجه تقسیم و طویل شدن یاخته ای به شدت کاهش یافت به طوری که وزن تر و وزن خشک اندام‌های هوایی در کمترین حد قرار گرفت. در سایر تیمارها به علت وجود غلظت‌های بالای BA تقسیم یاخته ای بالاست و عمده وزن‌تر آن ها مربوط به آب فراوان موجود در یاخته های مریستمی است (۲۰). هر چند در یک چهارم نمک‌های MS غلظت عناصر معدنی کم است و باعث

Archive of SID

www.SID.ir

کاهش وزن تر نسبت به نصف نمک‌های MS شده، اما به نظر می‌رسد اثر غلظت‌های BA بر جذب آب خیلی بیشتر از نمک‌های معدنی باشد. نکته قابل توجه این است که بافت‌های ریزنمونه در تیمار A_2C_1 در حضور دو میلی‌گرم در لیتر BA بر خلاف کمبود عناصر غذایی حالت مریستمی به خود گرفتند در نتیجه قسمت عمده وزن تر آن ها مربوط به آب بود و وزن خشک این تیمار تا حد A_2C_3 کاهش یافت.

جدول ۳- برهمکنش غلظت‌های نمک‌های معدنی MS و غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین بر صفات اندازه‌گیری شده در مرحله پرآوری سرخس 'بوستونی'.

Table 3. Interaction of MS mineral salts and BA concentrations on measured traits in proliferation stage of Boston fern.

صفت Trait تیمار Treatment	تعداد شاخساره Shoot number	طول شاخساره Shoot length (mm)	وزن‌تر شاخساره (گرم) Shoot fresh weight (g)	وزن خشک شاخساره (گرم) Shoot dry weight (g)
A_1C_1	18.163a	5.010c	0.27b	0.091b
A_1C_2	13.707b	7.597bc	0.3b	0.083 b
A_1C_3	8.348c	19.068a	0.777a	0.126 a
A_2C_1	6.533cd	5.92c	0.238b	0.053 c
A_2C_2	6.333cd	8.20b	0.254b	0.080 b
A_2C_3	4.852d	8.138b	0.151c	0.040 c

† Values in each column followed by the same letters are not significantly different (P=0.01).

† اعداد هر ستون که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۱٪ با هم تفاوت معنی دار ندارند.

برهمکنش های ساکارز و بنزیل آدنین بر صفات اندازه‌گیری شده در مرحله پرآوری سرخس 'بوستونی'

اثر غلظت ساکارز و نیز غلظت‌های بنزیل آدنین بر تعداد شاخساره معنی‌دار شده است. با توجه به نقش موثر ساکارز و بنزیل آدنین در تقسیم و توسعه یاخته ای و تولید جوانه جانبی بیشترین تعداد شاخساره در ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و غلظت‌های بالای BA (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) تولید شد درحالی که تعداد شاخساره در ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA کمتر بود (جدول ۴). در تیمار B_1C_3 هرچند مقدار ساکارز برای تولید شاخساره کافی است اما غلظت بنزیل آدنین محدود کننده است. در تیمارB_2C_1 برعکس غلظت بنزیل آدنین برای تولید شاخساره در حد کافی است ولی غلظت ساکارز محدود کننده تولید شاخساره بیشتر است و تقابل این اثرها باعث شده این گروه از نظر آماری در یک دسته قرار بگیرند (گروه b).

طویل ترین شاخساره ها درB_1C_3 و B_2C_3 مشاهده شد. با توجه به معنی‌دار نشدن اثر غلظت ساکارز بر طول شاخساره چنین استنباط می‌شود که عامل اصلی بروز این نتیجه تنظیم کننده رشد BA بوده است، به طوری که در غلظت پایین (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بلندترین شاخساره و در غلظت بالا (۲ میلی گرم در لیتر) کوتاه‌ترین شاخساره‌ها تولید نموده است و این با اثرهای شناخته شده برای سایتوکینین‌ها مطابقت دارد (۴).

در غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، انرژی لازم و کافی برای رشد و نمو یاخته‌های سرخس 'بوستونی' فراهم شده است، بنابراین افزایش اندام رویشی گیاه در این غلظت قند بیشتر مشاهده شد. در حضور مقدار کافی

Archive of SID

www.SID.ir

منبع انرژی، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA (تیمار B_1C_3) باعث افزایش تقسیم و افـزایش طـول یاختـه شـد. بـه دنبال آن تجمع مواد سلولزی و لیگنینی بر دیواره یاخته‌های در حال بلـوغ باعـث افـزایش وزن تـر و وزن خشـک اندام‌های هوایی شده است. در مقادیر کمتر ساکارز به دلیل کمبود انـرژی، BA نتوانسـته اثرهـای خـود را نشـان دهد. در تیمارهای B_2C_3، B_2C_2 و B_2C_1 منابع محدود کربن و انرژی مانع بروز اثر تنظیم‌کننده‌هـای رشـد شـده، در نتیجه بیوسنتز مواد کاهش می‌یابد.

جدول ۴- برهمکنش غلظت‌های ساکارز و غلظت‌های بنزیل آدنین بر صفات اندازه‌گیری شده در مرحله پرآوری سرخس 'بوستونی'.

Table 4. Interaction of sucrose and BA concentrations on measured traits in proliferation stage of Boston fern.

صفت Trait تیمار Treatment	تعداد شاخساره Shoot number	طول شاخساره Shoot length (mm)	وزن‌تر شاخساره (گرم) Shoot fresh weight (g)	وزن خشک شاخساره (گرم) shoot dry weight (g)
B_1C_1	16.103a	5.325 c	0.310 b	0.076 bc
B_1C_2	14.290 a	7.092 bc	0.284 b	0.096 b
B_1C_3	10.168 b	14.348 a	0.668a	0.152 a
B_2C_1	8.593 b	5.605 c	0.298 b	0.068 c
B_2C_2	5.75 c	8.705 b	0.270 b	0.067 c
B_2C_3	3.032 d	12.858 a	0.261 b	0.064c

† Values in each column followed by the same letters are not significantly different (P=0.01).

† اعداد هر ستون که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۱٪ با هم تفاوت معنی دار ندارند.

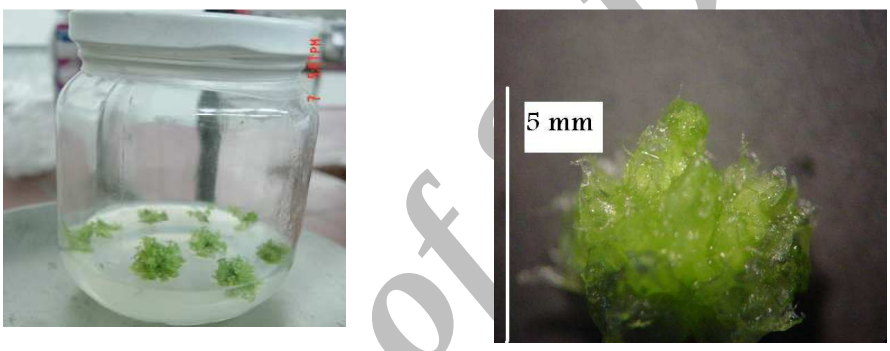
برهمکنش های نمک‌های معدنی و ساکارز و بنزیل‌آدنین بر صفات اندازه‌گیری شده در مرحله پرآوری سرخس 'بوستونی'

هیچ گزارشی در مورد بررسی برهمکنش سه تیمار یاد شده در ریزافزایـی سـرخس 'بوسـتونی' وجـود ندارد. اما همان طوری که در مقایسه میانگین ها مشاهده مـی‌شـود بیشـترین تعـداد شاخسـاره در نصـف غلظـت نمک‌های MS به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۱ یا ۲ میلی گرم در لیتر BA تولید شده است (جدول ۵). در این محیط‌ها غلظت بالای سایتوکینین باعث تشکیل ساختارهای سـبز کـروی شـد (شـکل ۱-الـف). سـاختارهای سـبز کروی در حضور غلظت کافی نمک‌های معدنی و منبع غنی ساکارز تبدیل به شاخسـاره‌هـای جـانبی زیـادی شـده است (شکل ۱-ب). همان طورکه در جدول صفات مشاهده‌ای (جدول ۶) نیز مشاهده می‌شـود تولیـد سـاختارهای سـبز کـروی در محـیط‌هـای MS_1، MS_2، MS_4، MS_5، MS_7 و MS_{10} دیـده مـی‌شـود. غلظـت BA در محیط‌هایMS_1، MS_4، MS_7 و MS_{10}، ۲ میلی گرم در لیتر و در MS_3 و MS_5 یک میلی گـرم در لیتـر اسـت. در نصف غلظت نمک‌های MS در غلظت‌های بالای بنزیل آدنین (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) هم در ۳۰ و هـم در ۲۰ گـرم در لیتر ساکارز ساختارهای سبز کروی تشکیل می‌شوند. اما تشکیل ساختارهای سبز کروی در یک چهارم غلظت

Archive of SID

www.SID.ir

نمک‌های MS در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و هر دو غلظت ساکارز صورت می‌گیرد. اما در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BA تولید آن مختص به غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز می‌شود. همان طورکه مشاهده می‌شود در هیچ کدام از تیمارها، تولید ساختارهای سبزکروی در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA مشاهده نشده است (جدول ۶). بنابراین می‌توان گفت که شرط لازم برای تولید ساختارهای سبز کروی غلظت بالای BA است. اما کافی نیست زیرا ساختارهای سبز کروی در واقع تجمع از سرآغازه‌های جوانه جانبی به تعداد زیاد هستند (۱۴). و هر چند تشکیل آن پاسخی به غلظت بالای BA است اما رشد و نمو این جوانه‌ها وابسته به تقسیم و توسعه یاخته ای زیاد و سریع است که این خود به مقدار کافی عناصر معدنی و منبع غنی انرژی نیاز دارد (۳). بنابراین ظهور ساختارهای سبز کروی و توسعه آنها به شاخساره‌های جانبی افزون بر نیاز به غلظت بالای سایتوکینین، به غلظت کافی ساکارز و نمک‌های معدنی نیاز دارد.



الف A ب B

Fig. 1. A: GGB that are formed in high concentaration of BA (real dimention about 5 mm).
B: Shoots produced from GGB in MS_1 و MS_2 mediums (the picture is about $MS_{1)}$.

شکل ۱- الف: ساختارهای سبز کروی تولید شده در غلظت‌های بالای بنزیل آدنین (ابعاد حقیقی حدود ۵ میلی‌متر).
ب: شاخساره‌های حاصل از ساختارهای سبز کروی در محیط کشت‌های MS_1 و MS_2 (شکل مربوط به محیط کشتMS_1).

همانطور که مشاهده می‌شود طویل‌ترین شاخساره‌ها در ۰/۵ غلظت نمک‌های MS و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲۰ و۳۰ گرم در لیتر ساکارز تولید شده‌اند (جدول ۵). کلیه محیط‌هایی که در آن ها کوتاه‌ترین طول شاخساره مشاهده شد، به جز MS_2 دارای غلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بودند که این بیانگر اثر بازدارندگی سایتوکینین در غلظت بالا بر افزایش طولی یاخته‌ها و در نتیجه شاخساره‌ها است (۴). اما در محیط MS_{12} به دلیل کم بودن غلظت عناصر معدنی و نیز ساکارز نسبت به سایر محیط‌ها حتی در غلظت‌های کم BA امکان افزایش طول و توسعه یاخته ای بوجود نیامد.

وزن تر اندام‌ها و بافت‌های مختلف در حقیقت شامل وزن خشک و مقدار آب موجود در آن بافت‌ها و اندام‌ها است و افزایش هر یک از دو گزینه فوق منجر به افزایش وزن تر می‌شود (۳). در محیط کشت MS_3 تعداد ۱۳/۴ عدد شاخساره جدید با طول میانگین ۲۰/۳ میلی‌متر به دست آمد (جدول ۵). و این نشان دهنده غلظت مناسب عناصر معدنی، ساکارز و BA در این محیط جهت رشد و نمو شاخساره‌های نفرولپیس بود. با توجه به معنی‌دار نبودن اثر ساکارز بر طول شاخساره ها، در محیط کشت MS_6 نیز افزایش طول شاخساره‌ها و در نتیجه

Archive of SID

www.SID.ir

افزایش وزن‌تر مشاهده می‌شود و این محیط در گروه b قرار می‌گیرد. همان طور که بحث شد غلظت‌های یک و دو میلی‌گرم در لیتر BA باعث افزایش تقسیم یاخته ای می‌شود که این خود باعث افزایش جذب آب در یاخته‌های ریزنمونه و افزایش وزن تر آن ها می‌شود اما ادامه فعالیت مریستم‌ها نیاز به عناصر معدنی کافی و منبع کربوهیدرات دارد. با توجه به ناکافی بودن میزان عناصر در یک چهارم MS و نیز کم بودن منبع کربن در ۲۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده می‌شود که در محیط‌های MS_{11} و MS_{10} برخلاف مقادیر بالای BA، وزن تر تولید شده در پائین‌ترین حد است. محیط کشت MS_{12} به دلیل کم بودن غلظت عناصر معدنی و ساکارز، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA (در حقیقت نسبت زیاد اکسین درونی به سایتوکینین) امکان تحریک و ایجاد رشد طولی را در شاخساره نداشت. در محیط کشت MS_9 بر خلاف وجود منبع کربن در حد کافی اما عامل محدودکننده غلظت عناصر معدنی محیط کشت است و در نتیجه وزن‌تر در این تیمارها کم شده است.

مقدار آب درون یاخته‌ها با سن و نوع بافت فرق می‌کند. مقدار آب به طور یقین در بافت‌ها و اندام‌های جوان به مراتب بیشتر از بافت‌های متراکم و پیر است (۹). یاخته‌های مریستمی یاخته‌هایی کوچک با دیواره نازک و ظریف، سیتوپلاسم متراکم و فراوان، واکوئل‌های متعدد و بسیار کوچک و فاقد فضای بین یاخته ای هستند (۱۵). در مراحل اولیه تقسیم یاخته ای افزایش اندازه یاخته توسط جذب آب صورت می‌گیرد بنابراین افزایش وزن این یاخته‌ها نتیجه جذب آب و نه افزایش ماده خشک است. طی مراحل تقسیم انتقال مداوم آب به یاخته‌های در حال تقسیم ادامه دارد. افزایش اندازه یاخته گیاهی شامل افزایش چند برابر حجم واکوئل‌ها و گسترش دیواره‌های یاخته است. دیواره های یاخته در این مرحله نمو، قدری ضخیم می‌شوند. در بزرگ شدن یاخته پروتوپلاسم اضافی به طور معمول ساخته می‌شود ولی افزایش در مقدار مواد دیواره یاخته ای به طور عمده تحت تأثیر افزایش سلولز و ترکیبات پکتینی تا افزایش مواد پروتوپلاسمی است. جذب آب نیز لازمه مرحله طویل شدن یاخته است (۲۰). بر این اساس، انتظار می‌رود ماده خشک در تیمارهایی (همانند MS_3 و MS_6) که شاخساره‌های تکامل یافته‌تری تولید می‌کنند، بیشتر باشد. در تیمارهایی که تعداد شاخساره‌های جانبی در نتیجه تکثیر مریستمی بیشتر است به نسبت تیمارهای مشابه خود باید وزن خشک کمتری داشته باشند. برای مثال در محیط های MS_1 از MS_2 ,MS_3 و یا MS_4 از MS_5 و MS_6 با اینکه در بعضی موارد اختلافاتی در وزن خشک مشاهده می‌شود اما این اختلاف‌ها از نظر آماری معنی‌دار نیستند و این نشان دهنده نزدیک بودن اثر تیمارها به یکدیگر است. به نظر می‌رسد محیط کشت MS_{12} به علت فقر عناصر معدنی و نیز منبع کربن محیط مناسبی جهت رشد و نمو ریزنمونه‌های سرخس 'بوستونی' نیست زیرا کمترین ماده خشک در این محیط تولید شده است. در این پژوهش محیط کشت MS_3 باعث بیشترین سنتز و تجمع ماده خشک در ریزنمونه‌ها شد.

بررسی صفات مشاهده و ارزیابی شده در مرحله پرآوری سرخس 'بوستونی'

صفات مشاهده شده شامل وجود ساختارهای سبز کروی، فرم رشد (فشرده یا باز) بود و نتایج مربوط آن در جدول ۶ بیان شده است. در تمام تیمارهای دارای ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به جز MS_{12}، ساختارهای سبز کروی تولید شده و شکل رشد شاخساره از نوع فشرده است. در این فرم رشد طول برگ و فاصله برگچه‌ها کم بوده طوری که طول و عرض برگ به تقریب یکسان است. افزون بر این ریشه‌ها در این تیمارها رشد چندانی نکرده و به صورت توده‌ای از ریشه‌های در هم رفته و کوتاه تشکیل شده اند (شکل۲- الف).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- برهمکنش غلظت‌های نمک‌های معدنی MS، ساکارز و هورمون BA بر صفات اندازه‌گیری شده در مرحله پرآوری سرخس 'بوستونی'.

Table 5. Interaction of MS mineral salts, sucrose and BA on measured traits in proliferation stage of Boston fern.

صفت Trait تیمار Treatment	تعداد شاخساره Shoot number	طول شاخساره Shoot height (mm)	وزن‌تر (گرم) Fresh weight of shoots (g)	وزن خشک (گرم) Dried weight of shoots (g)
MS_1	24.773a	4.677d	0.348bc	0.078bcd
MS_2	20.83b	5.663cd	0.339bc	0.096bc
MS_3	13.42c	20.27a	1.134a	0.145a
MS_4	11.55c	5.343cd	0.293cd	0.064de
MS_5	6.583d	9.53b	0.285cd	0.069cd
MS_6	3.277e	17.85a	0.419b	0.106b
MS_7	7.433d	5.97cd	0.282cd	0.059de
MS_8	7.75d	8.52bc	0.276cd	0.073cd
MS_9	6.917d	8.41bc	0.2de	0.059bcd
MS_{10}	5.633de	5.867cd	0.194de	0.033ef
MS_{11}	4.917de	7.88bcd	0.214de	0.064de
MS_{12}	2.787e	7.867bcd	0.102e	0.022f

† Values in each column followed by the same letters are not significantly different (P=0.01).

† اعداد هر ستون که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۱٪ با هم تفاوت معنی دار ندارند.

در فرم رشد باز برگ‌ها طویل شده، فاصله برگچه‌ها زیاد بوده، ریشه‌ها از نوع افشان و طویل هستند. در غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA طول شاخساره‌ها بیشتر بوده و فرم رشد از نوع باز بود (جدول ۶ و شکل۲- ب). به دلیل اثرهای بازدارنده غلظت بالای سایتوکینین‌ها بر رشد طولی اندام‌های هوایی واثر محرک بر افزایش رشد قطری اندام‌ها. می‌توان گفت کلیه صفات مشاهده شده تحت تاثیر غلظت سایتوکینین‌ها به وجود آمده است که فراهم بودن منبع کربن و عناصر غذایی نیز بر بروز آن ها تاثیر به سزایی داشته است.

نتیجه‌گیری

از آنجا که بهترین محیط برای پرآوری محیطی است که تولید شاخساره‌های فراوان و با اندازه کوچک (طول کم) نماید (۷). بنابراین محیط کشت‌های MS_1 و MS_2 به ترتیب با تولید میانگین ۲۴/۸ شاخساره ۴/۶ میلی‌متری و ۲۰/۸ شاخساره ۵/۷ میلی‌متری که از بالاترین میزان پرآوری (گروه‌های a و b) برخوردار بوده‌اند و افزون بر این ساختارهای سبز کروی که در واقع تجمعی از شاخساره‌های جانبی هستند در این محیطها به تعداد زیاد مشاهده شده است به عنوان بهترین محیط پرآوری سرخس 'بوستونی' معرفی می‌شوند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۶- صفات مشاهده و ارزیابی شده در مرحله پرآوری سرخس 'بوستونی'.

Table 6. Observed characteristics considered in proliferation stage of Boston fern.

صفت Characteristic تیمار Treatment	فرم رشد Growth form		وجود ساختارهای سبز کروی GGB existence
	فشرده Compact	باز Open	
MS_1	+	–	+
MS_2	+	–	+
MS_3	–	+	–
MS_4	+	–	+
MS_5	+	–	+
MS_6	–	+	–
MS_7	+	–	+
MS_8	×	×	×
MS_9	–	+	–
MS_{10}	×	×	×
MS_{11}	–	+	–
MS_{12}	–	+	–

+ observed in more than half of explants.

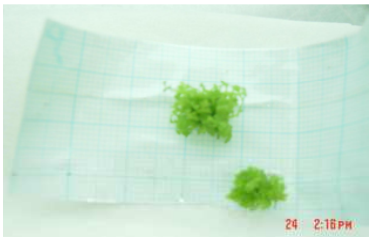
× observed in about half of explants.

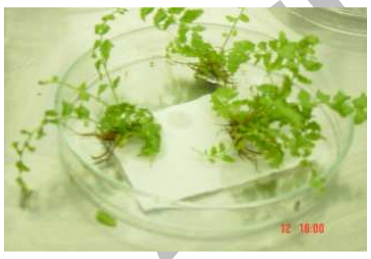
– observed in none of explants.

+ در بیش از نصف نمونه‌ها مشاهده شده است.

× در حدود نیمی از نمونه‌ها مشاهده شده است.

– در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نشده است.





الف A ب B

Fig. 2. A: Compact form of growth with lots of small shoots short roots forming in medium containing high concentration of BA (MS_1).
B: Open form of growth with long leaves and roots forming in medium containing 0.5 mg l^{-1} BA (MS_3).

شکل ۲- الف: فرم رشد فشرده دارای تعداد زیاد شاخساره با برگ‌های کوچک، ریشه‌های کوتاه که در محیط‌های دارای غلظت‌های بالای بنزیل آدنین شکل می‌گیرد (MS_1).

ب: فرم رشد باز دارای برگ‌ها و ریشه‌های طویل و رشد یافته که در محیط‌کشت‌های دارای غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین مشاهده می‌شود (MS_3).

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات سرکار خانم مهندس اخگری مسئول آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان در امور اجرایی این پژوهش قدردانی می‌شود.

منابع REFRENCES

۱. خوشخوی، م. ۱۳۷۴. روش‌های تکثیر گیاهان زینتی. انتشارات دانشگاه شیراز. ۸۴۵ صفحه.

۲. شفیعی، م. ی. حمیداوغلی، ر. فتوحی قزوینی. ۱۳۸۶. اثر غلظت‌های نمک‌های معدنی، ساکارز و بنزیل آدنین بر آغازش رشد درون شیشه‌ای رانرهای سرخس 'بوستونی'. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، جلد ۱۱، شماره ۲. صفحات ۱۳۷-۱۴۵.

۳. لسانی، ح. و م.، مجتهدی. ۱۳۶۷. مبانی فیزیولوژی گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران. ۷۲۶ صفحه.

4. Arteca, R.N. 1995. Plant Growth Substances, Principles and Applications, Chapman and Hall, New York, U.S.A. 332 p.
5. Banko, T.J. and A.A. Boe. 1975. Effects of pH, temperature, nutrition, ethephon and chlormequat on endogenenous cytokinin levels of *Coleus blumei* Benth. Amer. Soc. Hort. Sci. 100:168-172.
6. Bertrand, A.M. M.A. Alberne, H. Fernadez, A. Ganzales and R. Sanchez Tames. 1999. *In vitro* organogensis of *Polypodium cambricun*. Plant Cell, Tis. Org. Cult. 57:65-69.
7. Byrne, T.E. and J.D. Caponetti. 1992a. Morphogensis in three cultivars of Boston fern 2: Callus production from stolon tips and plantlet differenation from callus, Amer. Fern J. 82:1-11.
8. Byrne, T.E. and J.D. Caponetti. 1992b. Morphogensis in three cultivars of Boston fern 3.Callus production and plantlet differentiation from cell suspensions. Amer. Fern J. 82:12-22.
9. Comloh, M. N. Gogala and R. Ruzic. 1989. The micropropagation of *Nephrolepis exaltata*, Bioloski – Vestnik 37:23-33.
10. Fernandes, H. and M.A. Revilla. 2003. *In vitro* culture of ornamental ferns, Plant Cell, Tis Org Cult 73:1-13.
11. Gonulsen, N., M.K. Onal, E. Ozsezgin and N. Erxan. 1995. *In vitro* propagation of some ferns (*Nephrlepis exaltata*). Anadolu 5:64-73.
12. Guimaraes, R.T.Ch., M. Pasqual and A.M.P. Miranda. 1999. Influence of nitrogen and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of sword fern (*Nephrolepis exaltata* Schott L.), Cienc. e. Argoteco. Lavras. 23:309-316.
13. Henley, R.W. and L.S. Osborne. 2000. Fern production guide. Chase University of Florida Research and Education Center CFREC-A. Foliage Plant Research Note RH-91-8.
14. Higochi, H. and W. Amaki. 1989. Effects of 6-banzylaminopurine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through *in vitro* propagation, Sci. Hort. 37:351-359.
15. Higuchi, H., W. Amaki and S. Suzuki. 1987. *In vitro* propagation of *Nephrolepis cordifolia prsel*. Sci. Hort. 32:105-113.
16. Hvosef-Eide, A.K. 1992. Influence of nitrogen fertilization to mother plant and the subsequent growth of *Nephrolepis exaltata*(L.) Schott and *Cordylin fruticosa*(L.) A. chev *in vitro* explants. Garten bauwissenschaft 57:292-297.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Hvoself–Eide, A.K. 1990. The effect of irradiance and temperature on *in vitro* cultures of *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott and *Cordyline fruticosa* (L.). A. chev., Garten bauwissenschaft 55:259-204.
18. Hvoslef- Eide, A.k. 1991. The effect of temperature, day length and irradiance on the growth of mother plants of *Nephrolepis exaltata*. (L.) Schott and on the subsequent growth *in vitro* of runner tip explants. Sci. Hort. 47:137-147.
19. Kessler, J.R. 2000. Greenhouse production of Boston ferns. Aubum University, www.Ohio floriculture.com, flori.ag.ohio-state.edu.
20. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays Physiol. Plant.15:473-427.
21. Padhya, M.A. 1987. Mass Propagation of ferns through tissue culture. Acta Hort. 212:645-649. 4PL.
22. 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.
23. Teng, W.L. and M.C. Teng. 1997. *In vitro* regeneration patterns of *Platycerium bifurcatum* leaf cell suspensions culture. Plant Cell Rep. 16:820-824.
24. Torrest, K.C. 1987. Tissue Culture Techinques for Horticultural Crops. Van Nostrand Reinheld, New york, U.S.A.
25. Ziv, M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. Hort. Rev. 24:79-93.

Archive of SID

www.SID.ir