بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم باغبانی

بهینه سازی محیط کشت باززایی مستقیم گیاه شمعدانی اژدر (*Pelargonium grandiflorum*) در شرایط درون شیشه‌ای

نگارنده : **پریسا محمودی فرد**

استاد راهنما :

دکتر زیبا قسیمی حق

استاد مشاور :

دکتر حجت ا... بداقی

تیر ۱۳۹۶

شماره: ۱۸۱/ک
تاریخ: ۹۶/۵/۲۹
ویرایش:

مدیریت تحصیلات تکمیلی
فرم شماره (۶)

بسمه تعالی

فرم صورت جلسه دفاع از پایان نامه تحصیلی دوره کارشناسی ارشد

با تأییدات خداوند متعال و با استعانت از حضرت ولی عصر (عج) نتیجه ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم پریسا محمودی فرد به شماره دانشجویی۹۳۱۵۷۱۴ رشته مهندسی کشاورزی گرایش علوم باغبانی
تحت عنوان بهینه سازی محیط کشت باززایی مستقیم شمعدانی اژدر(Pelargonium grandiflorum) در شرایط درون شیشه ای
که در تاریخ ۹۶/۴/۲۱ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با درجه : عالی امتیاز ۱۹) ☐ دفاع مجدد ☐ مردود ☐

۱ـ عالی (۲۰ ـ ۱۹)
۲ـ بسیار خوب (۱۸/۹۹ ـ ۱۸)
۳ـ خوب (۱۷/۹۹ ـ۱۶)
۴ـ قابل قبول (۱۵/۹۹ ـ ۱۴)
۵- نمره کمتر از ۱۴ غیر قابل قبول

عضو هیأت داوران	نام ونام خانوادگی	مرتبهٔ علمی	امضاء
۱ـ استادراهنما	دکتر زیبا قسیمی حق	استادیار	
۲ـ استاد مشاور	دکتر حجت ا... بداقی	استادیار	
۳ـ نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر احمد رجایی	استادیار	
۴ـ استاد ممتحن	دکتر مهدی رضایی	استادیار	
۵ ـ استاد ممتحن	دکتر شاهرخ قرنجیک	استادیار	

رئیس دانشکده : امضاء

یارب دل ما را تو به رحمت جان ده　　درد همه را به صابری درمان ده

این بنده چه داند که چه می باید جست　　دانندهٔ تویی هر آنچه دانی آن ده

امروز که به همت پروردگار بی‌همتا و به مدد دعای پدر و مادر عزیزتر از جانم و لطف و راهنمایی اساتید گرانقدرم برگی دیگر از دفتر بزرگ علم و دانش را ورق زدم خاضعانه دست بوس تمام کسانی‌ام که باعث دلگرمی من بودند؛

از استاد راهنمای عزیزم خانم دکتر زیبا قیمی حق و استاد مشاورم جناب آقای دکتر حجت ا... بداقی که صبورانه جهالتم را تحمل نموده و مهربانانه بار همنودهای ارزشمندشان مرا در انجام این پایان نامه یاری نمودند نهایت سپاس را دارم.

از اساتید ارجمند جناب آقای دکتر مهدی رضایی و دکتر شاهرخ قرنجیک که زحمت داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند کمال تشکر را دارم.

از مسئولین آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود بخاطر کمک های بی دریغشان، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از پدر، مادر، خواهر و برادران عزیزم به خاطر تمامی زحمات و حمایت های بی دریغشان در امر تحصیل بی نهایت سپاسگزارم.
از تمامی دوستانم خصوصا خانم مهندس زهرا فتحی که در لحظات سخت و دشوار همدل و یار من بودند متشکرم.

و برای همه عزیزان آرزوی شادکامی و سلامتی را از خداوند متعال خواهانم.

تعهد نامه

اینجانب پریسا محمودی فرد دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی گرایش علوم باغبانی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه بهینه سازی محیط کشت باززایی مستقیم گیاه شمعدانی اژدر (**Pelargonium grandiflorum**) در شرایط درون شیشه‌ای

تحت راهنمائی دکتر زیبا قسیمی حق متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « **Shahrood University of Technology**» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

محیط کشت باززایی مستقیم جهت تولید ساقه از بافت‌های برگ و دم‌برگ دو رقم شمعدانی اژدر (آریستو و برمودا) در حضور دو سیتوکنین TDZ و BA بهینه شد. در اولین آزمایش جهت تحریک تولید ساقه از ریزنمونه جوانه جانبی اثر غلظت‌های مختلف BA به تنهایی و نیز در ترکیب با اکسین IAA بررسی شد. نتایج نشان داد در واکشت اول بیش‌ترین درصد باززایی و تعداد ساقه در رقم آریستو (۱۰۰ درصد و ۴۲/۳) و در رقم برمودا (۸۲/۳۳ و ۲۰/۸۹) در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد هر چند که حداکثر وزن ساقه (۱۹۵/۷ میلی‌گرم) و تعداد برگ (۸/۱۶) مربوط به گیاهان رشد یافته در محیط کشت کنترل بود. در دومین واکشت محیط کشت محتوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بالاترین میزان درصد باززایی و تعداد ساقه (۱۰۰ درصد و ۴۲/۷۸) را برای دو رقم مذکور نشان داد. بیش‌ترین وزن ساقه (۲۱۶/۱ میلی‌گرم) و تعداد برگ (۶/۹۹) به‌ترتیب در گیاهان رشد یافته در محیط کشت BA و NAA (۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و در گیاهان محیط کنترل مشاهده شد. در آزمایش دوم، اثر نوع ریزنمونه (برگ و دم‌برگ) و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشدی BA و IAA و TDZ در باززایی مستقیم دو رقم شمعدانی اژدر مورد بررسی قرار گرفت. بالاترین میزان باززایی و تعداد ساقه برای دو رقم در ترکیب تیماری BA، NAA و TDZ (۲ ، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به ترتیب (۸۵/۲ درصد و ۲۵/۶۱) حاصل گشت. حداکثر طول ساقه (۳۳/۲۵ میلی‌متر) در محیط کشت حاوی ترکیب تیماری BA و NAA (۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) اندازه‌گیری شد. در آزمایش سوم ریشه‌زایی در محیط کشت ۱/۲MS حاوی دو اکسین IAA و IBA مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان دو رقم بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت MS ۱/۲ حاوی دو تیمار ریشه‌زایی IAA و IBA با غلظت‌های (۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) نشان دادند. حداکثر وزن ریشه و ساقه در تیمارهای IAA و IBA با غلظت‌های (۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و بیش‌ترین تعداد ریشه (۲۰/۴۴) و طول ریشه (۲۰۰/۰۳ میلی‌متر) به ترتیب در تیمار IBA (۱/۵ میلی‌گرم) و تیمار IAA (۲ میلی‌گرم در لیتر)

بدست آمد. گیاهانی را از هر دو رقم که دارای ریشه‌های توسعه یافته بودند به گلدان‌هـایی بـا ترکیـب خاک باغچه: کوکوپیت : پرلیت به نسبت (۱ : ۳ :۱) انتقال داده شدند. درصد زنده‌مـانی بـرای گیاهـان دو رقم انتقال یافته ار دو تیمار ریشه‌زایی تیمارهای IAA و IBA با غلظت‌های (۱/۵ و ۲ میلی‌گـرم در لیتر) ۱۰۰ درصد ثبت شد.

این پژوهش می‌تواند در راستای تولید تجاری گیاهان استریل شمعدانی اژدر در سطح وسـیع اسـتفاده شود.

کلمات کلیدی :ریزازدیادی، اندام‌زایی، باززایی مستقیم، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

فهرست مطالب

۱-۱-مقدمه ۲

۱-۲- گیاه‌شناسی ۴

۱-۲-۱- جنس شمعدانی ۴

۱-۲-۲- تقسیم بندی سیستماتیک ۴

۱-۳- شمعدانی اژدر ۷

۱-۳-۱- گیاه‌شناسی شمعدانی اژدر ۷

۱-۳-۱- ریخت شناسی شمعدانی اژدر ۷

۱-۳-۲- روش‌های تکثیر و ترکیب خاکی مناسب شمعدانی اژدر ۸

۱-۳-۴- کاربردهای تجاری تیره‌ی شمعدانی ۹

۱-۴- کشت بافت ۱۱

۱-۴-۱- موارد کاربردی کشت بافت ۱۲

۱-۴-۲- انواع مختلف کشت در شرایط درون شیشه ای ۱۴

۱-۵- ریزازدیادی ۱۵

۱-۵-۱- انواع ریزازدیادی ۱۷

۱-۵-۱-۱- کشت مریستم ۱۸

۱-۵-۱-۲-کشت تک گره ۱۸

۱-۵-۱-۳- کشت نوک ساقه ۱۸

۱-۵-۲- فاکتورهای موثر بر ریزازدیادی گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای ۲۰

۱-۵-۲-۱- محیط کشت ۲۰

۱-۵-۲-۲- ژنوتیپ ۲۰

۱-۵-۲-۳- سن گیاه ۲۰

۱-۵-۲-۴- سن بافت یا اندام ۲۱
۱-۵-۲-۵- وضعیت فیزیولوژیکی ۲۱
۱-۵-۲-۶- وضعیت سلامت گیاه ۲۱
۱-۵-۲-۷- نوع ریزنمونه ۲۲
۱-۵-۲-۸- منبع ریزنمونه ۲۲
۱-۶- قهوه ای شدن کشتها ۲۲
۱-۷- شیشه ای شدن کشت‌های گیاهی ۲۳
۱-۸- ترکیبات مورد استفاده درمحیط کشت گیاهی ۲۴
۱-۸-۱- آب ۲۴
۱-۸-۲- ویتامین‌ها ۲۴
۱-۸-۳- منبع کربن ۲۵
۱-۸-۴- آگار (جامد کننده محیط کشت) ۲۶
۱-۸-۵- موادمعدنی غذایی ۲۶
۱-۸-۶- اسیدآمینه و سایر افزودنی‌های نیتروژن‌دار ۲۸
۱-۸-۷- انواع تنظیم کننده‌های رشدگیاهی ۲۸
۱-۸-۸- زغال فعال ۳۱
۱-۸-۹- pH ۳۱
۱-۹- تاثیر تنظیم کننده های رشد درانواع باززایی گیاهان در کشت بافت ۳۲
۱-۹-۱- باززایی غیر مستقیم (کالوس دهی) و سپس ساقه زایی ۳۲
۱-۹-۲- باززایی مستقیم (ساقه زایی) ۳۳
فصل دوم مروری بر مطالعات پیشین ۳۵
فصل سوم مواد و روش ها ۴۷

۳-۱- مشخصات آزمایش ۴۸
۳-۱-۱- مشخصات مواد گیاهی و ارقام مورد استفاده ۴۸
۳-۱-۲- مواد شیمیایی ۴۸
۳-۲- تهیه محیط کشت ۴۸
۳-۲-۱- محلول های ذخیره ۴۸
۳-۲-۱-۱- تهیه محلول‌های مادری نمک‌های پر مصرف (ماکرو) ۴۹
۳-۲-۱-۲- تهیه محلول مادری آهن $Na_2EDTA.\ H_2O$ و $FeSO4.\ 7H_2O$ محیط کشت MS ۵۰
۳-۲-۱-۳- تهیه محلول مادری ویتامین ها و گلایسین محیط کشت MS ۵۱
۳-۲-۱-۴- تهیه محلول‌های ذخیره تنظیم کننده‌های رشد ۵۱
۳-۲-۲- تهیه یک لیترمحیط کشت جامد ۵۲
۳-۳- ضدعفونی و آماده سازی مواد گیاهی ۵۳
۳-۳-۱- ضد عفونی محیط و وسایل کار ۵۳
۳-۳-۲- ضدعفونی ریزنمونه های تک گره برای مرحله استقرار ۵۳
۳-۴- شرایط کشت، نوع و غلظت‌های تنظیم کننده رشدی ۵۴
۳-۴-۱- مرحله استقرار ۵۴
۳-۴-۲- باززایی مستقیم شمعدانی با ریزنمونه برگ و دم‌برگ ۵۵
۳-۵- تیمارهای ریشه زایی ۵۶
۳-۶- مرحله انتقال به خاک ۵۷
۳-۷- آنالیزهای آماری ۵۸
۳-۷-۱- آزمایشات باززایی ۵۸
۳-۷-۱-۱- استقرار ۵۸
۳-۷-۱-۲- ساقه زایی از ریزنمونه برگ و دم‌برگ ۵۹

۳-۷-۲- آزمایشات ریشه زایی و زنده مانی ۵۹
۳-۷-۳- نرم افزارها ۵۹
فصل چهارم نتایج و بحث ۶۱
۴-۱- نتایج آزمایشات استقرار ۶۲
۴-۱-۱- تاثیر تیمارتنظیم کننده رشد و نوع رقم بردرصد باززایی ساقه نابجا ۶۳
۴-۱-۲- تاثیر تیمارتنظیم کننده رشد و نوع رقم برتعداد ساقه نابجا باززا شده ۶۹
۴-۱-۲-۱- تاثیر تیمارتنظیم کننده رشد و نوع رقم بر وزن تر گیاه ۷۳
۱-۴-۲-۲- تاثیر تیمارتنظیم کننده رشد و نوع رقم برتعداد برگها ۷۸
۴-۱-۳- نتایج آزمایشات باززایی مستقیم از ریزنمونه برگ و دمبرگ ۸۰
۴-۱-۳-۱- تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد، نوع ریزنمونه ۸۰
۴-۱-۳-۲- تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد، نوع ریزنمونه و نوع رقم برتعداد ساقه نابجا ۸۸
۴-۱-۳-۳- تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد، نوع ریزنمونه و نوع رقم بر طول ساقه ۹۴
۴-۱-۴- نتایج آزمایشات ریشه زایی ۹۷
۴-۱-۴-۱- تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد و نوع رقم بردرصد ریشه زایی ۹۷
۴-۱-۴-۲- تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد و نوع رقم بر تعداد ریشه های تشکیل یافته ۱۰۱
۴-۱-۴-۳- تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد و نوع رقم برطول ریشه های تشکیل یافته ۱۰۴
۴-۱-۴-۴- تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد و نوع رقم بر وزن بیومس ۱۰۷
۴-۱-۵- انتقال گیاهان ریشه دار رقم های آریستو و برمودا از شرایط ۱۱۱
نتیجه گیری کلی ۱۱۴
پیشنهادات ۱۱۶
منابع ۱۱۷

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱: تقسیم بندی سیستماتیک ۴

شکل ۱-۲: پراکنش جهانی جنس شمعدانی ۴

شکل ۱-۳: وضعیت گلهای شمعدانی ۵

شکل ۱-۴: نقش کشت بافت ۱۲

شکل ۱-۵: مراحل ریزازدیادی ۱۵

شکل ۱-۶: ارتباط بین تکنیکهای مختلف در کشت بافت گیاه..... ۱۷

شکل ۴-۱: مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار و رقم بر درصد باززایی..... ۶۲

شکل ۴-۲: مقایسه میانگین اثر ساده تیمار بر درصد باززایی ۶۳

شکل ۴-۳: چپ (زرد شدن برگها)..... ۶۵

شکل ۴-۴: مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار و رقم بر تعداد ساقه ۶۶

شکل ۴-۵: ساقه تولید شده در ۶۷

شکل ۴-۶: مقایسه میانگین اثر ساده تیمار در تولید ساقه..... ۶۷

شکل ۴-۷: اثر تیمارهای متفاوت در تولید ساقه ۶۸

شکل ۴-۸: مقایسه میانگین اثر ساده بر وزن گیاه در واکشت اول..... ۷۰

شکل ۴-۹: مقایسه میانگین اثر ساده بر وزن گیاه در واکشت دوم ۷۱

شکل ۴-۱۰: مقایسه میانگین اثر ساده در تعداد برگ در واکشت اول..... ۷۵

شکل ۴-۱۱: مقایسه میانگین اثر ساده در تعداد برگ در واکشت دوم..... ۷۶

شکل ۴-۱۲: مقایسه میانگین اثر ساده در درصد باززایی..... ۷۹

شکل ۴-۱۳: مقایسه میانگین اثر ساده نوع ریزنمونه..... ۷۹

شکل ۴-۱۴: مقایسه میانگین اثر ساده تیمار در تولید ساقه.....۸۴

شکل ۴-۱۵: تعداد ساقه تولیدی در بهترین ترکیب تیماری.....۸۵

شکل ۴-۱۶: مقایسه میانگین اثر ساده تیمار در تولید ساقه.....۸۵

شکل ۴-۱۷: مقایسه میانگین اثر ساده تیمار در طول گیاه.....۹۰

شکل ۴-۱۸: مقایسه میانگین اثر ساده تیمار در درصد ریشه زایی.....۹۳

شکل ۴-۱۹: مقایسه میانگین اثر ساده رقم در درصد ریشه زایی.....۹۳

شکل ۴-۲۰: مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار و رقم در تعداد ریشه.....۹۷

شکل ۴-۲۱: اثر بهترین تیمارهای ریشه زایی.....۹۷

شکل ۴-۲۲: مقایسه میانگین اثر ساده تیمار در طول ریشه.....۹۹

شکل ۴-۲۳: مقایسه میانگین اثر ساده تیمار در وزن تر ساقه.....۱۰۳

شکل ۴-۲۴: مقایسه میانگین اثر ساده تیمار در وزن تر ریشه.....۱۰۴

شکل ۴-۲۵: مقایسه میانگین اثر ساده تیمار در نسبت وزن ریشه به ساقه.....۱۰۴

شکل ۴-۲۶: دو هفته پس از انتقال گیاه.....۱۰۶

شکل ۴-۲۷: مقایسه میانگین اثر ساده تیمار در درصد زنده مانی ۱۰۷

فهرست جدول ها

جدول ۳-۱: غلظت نمکهای پر مصرف محیط کشت MS(mg/l) ۵۰

جدول۳-۲ : غلظت نمک های کم مصرف محیط کشت MS(mg/l) ۵۰

جدول ۳-۳ : غلظت FeSO4. 7H2 O و Na2EDTA. H2 O در محیط کشت MS (mg/l) ۵۱

جدول ۳-۴ : غلظت ویتامین‌های محیط MS (mg/l) ۵۱

جدول ۳-۵ : ترکیبات حلال تنظیم کننده‌های رشدگیاهی ۵۲

جدول ۳-۶ : ترکیبات تنظیم کننده رشدی مورد استفاده در مرحله باززایی ۵۵

جدول ۳-۷ : ترکیبات تنظیم کننده رشدی مورد استفاده در مرحله باززایی واکشت دوم ۵۵

جدول ۳-۸ : ترکیبات تنظیم کننده رشدی مورد استفاده در مرحله باززایی از برگ و دمبرگ ۵۶

جدول ۳-۹: ترکیبات تنظیم کننده رشدی در مرحله ریشه زایی (میلی‌گرم در لیتر) ۵۷

جدول ۴-۱: تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف BA در ارقام آریستو و برمودا بر درصد باززایی ۶۴

جدول ۴-۲ : تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف BA و IAA در ارقام آریستو و برمودا بر درصد ۶۵

جدول ۴-۳ : تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف تنظیم کننده رشد ۷۳

جدول ۴-۴ : تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف تنظیم کننده رشد..... ۷۴

جدول ۴- ۵ : تجزیه واریانس اثر تیمارهای ترکیبی غلظتهای مختلف تنظیم کننده..... ۸۳

جدول ۴-۶ : تجزیه واریانس اثر تیمارهای ترکیبی غلظتهای مختلف تنظیم کننده..... ۹۵

جدول ۴-۷: تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف تنظیم کننده رشد IBA..... ۹۸

جدول ۴-۸ : تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف تنظیم کننده رشد IBA..... ۱۰۵

جدول ۴-۹ : تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف تنظیم کننده رشد IBA..... ۱۰۸

جدول ۴-۱۰: تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف تنظیم کننده رشد..... ۱۱۲

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

وقتی درباره کشت گیاه صحبت می‌شود معمولا منظور کشت گیاهان در گلدان، زیرپلاستیک، گلخانه و یا در مزرعه است. تکثیر رویشی که شامل قلمه زدن، پیوند زدن و خوابانیدن و غیره می‌باشد و از دیرباز در کشاورزی اهمیت داشته است که برای تکثیر گیاهان زراعی و محصولات باغی استفاده می شود. البته روش‌های تکثیر رویشی در شرایط طبیعی در برخی موارد کارآمد نبوده و روش جدیدی از کشت گیاهان، تحت عنوان کشت بافت و سلول گیاهی معرفی و ارائه شده است. کشت بافت و سلول گیاهی با عنوان کشت درون شیشه ای و یا کشت استریل نیز مطرح می‌شود و در مورد تمام انواع کشت‌های استریل که در شرایط درون شیشه ای انجام می‌گیرد ، به کار می‌رود. در حال حاضر تکنیک‌های کشت بافت به عنوان ابزاری قوی جهت مطالعه اساسی و کاربردی بیولوژی گیاهی در آمده است. علاقه مندی به کشت بافت و توانایی آن در اصلاح گیاهان به صورت یک موضوع جهانی درآمده است و افزایش تعداد کشورهای عضو شرکت کننده در موسسه بین المللی کشت بافت گیاهی گواهی بر این ادعا می‌باشد. تکنیک کشت بافت در گیاهان زینتی منجر به بازازایی و تکثیر سریع گونه های اصلاح شده با روش‌های مدرن و سنتی خواهد شد. این تکنیک‌های کشت به اندازه‌ای پیشرفت کرده است که با اجرای آن می توان گونه‌های گیاهی را در شرایط درون شیشه باززایی و تولید نمود. سلول-ها، بافت‌ها و اندام‌های مختلف انتخاب شده از گونه‌های گیاهی متعدد را می‌توان به طور موفقیت آمیزی کشت کرد و از آن‌ها گیاهان کامل تولید نمود. یکی از کاربردهای مهم کشت بافت گیاهی، سرعت بخشیدن به تکثیر رویشی گیاهان زینتی می باشد. اخیرا صنعت گل از نظر اقتصادی اهمیت ویژه ای در جهان بدست آورده است. با استفاده از تکنیک‌های کشت سلول، امکان تولید سریع گیاهان مشابه وجود دارد. علاوه بر آن در سالهای اخیر این تکنیک‌ها کاربردهای تجاری گسترده‌ای در تکثیر گیاهان مختلف از جمله گیاهان زینتی و دارویی و نیز حذف عوامل بیماری‌زا از گیاهان پیدا نموده

است. بیشتر پژوهش‌های کشت بافت روی گیاهان زینتی پیرامون دو هدف حذف بیماری ها و تولید گیاهان عاری از ویروس و همچنین تولید سریع شمار زیادی از گیاهان از نظر ژنتیکی یکسان متمرکز شده است. فنون کشت بافت چندین مزیت برای تولید تجاری، افزون بر هدف‌های ذکر شده دارند. هنگام استقرار ریزافزایشی بافت، نیازی به گیاهان مادری نیست زیرا ریزنمونه‌های لازم برای افزایش بعدی از گیاهک‌های درون شیشه‌ای کشت شده بدست می‌آید. شمعدانی از جمله گیاهان زینتی ارزشمند است. گل شمعدانی به عنوان یک گیاه گلدانی در گلخانه‌ها و منازل و همچنین به عنوان گیاه پوششی در فضای سبز استفاده می‌شود. امروزه رقم‌های سبد آویز آن نیز به وجود آمده است. این گیاه علاوه بر جنبه زیبایی، دارای اسانس‌هایی است که دارای خواص ضد قارچی و باکتریایی است و مطالعات انجام شده در سال‌های مختلف تاکیدی بر این ادعا است. در حال حاضر در اروپا از اسانس شمعدانی برای درمان بیماری‌های تنفسی که در اثر آلودگی‌ها به وجود آمده اند استفاده می‌گردد و این گیاه به عنوان یک گیاه دارویی تلقی می‌گردد. در آفریقا این گیاه با نام شفا دهنده (Healer) معروف است و ریشه آن برای درمان مالاریا کاربرد دارد. امروزه گل شمعدانی در پزشکی برای درمان بیماری‌های کلیوی و دیگر بیماری‌ها کاربرد وسیع یافته است. گیاه شمعدانی در خاک‌هایی با فلزات سنگین مانند سرب ، نیکل و فلزات سنگین دیگر نیز قابلیت رشد دارد و می‌توان به آن به عنوان یک گیاه پالاینده نگریست (Orrano *et all*., 2009). از بین شمعدانی‌ها، شمعدانی اژدرگل آن نسبت به سایر هیبریدهای این خانواده درشت‌تر است و در ایران به شمعدانی آلمانی معروف است. در شمعدانی اژدر (رگال) به علت ضعیف بودن تشکیل بذر (Setting) و همچنین از دست رفتن تعداد زیاد قلمه‌ها درتکثیر غیر رویشی، تکنیک کشت بافت برای ازدیاد این گیاه توسعه یافته است. به طوری که با گرفتن ریزنمونه‌های تک گره و رشد یافتن آنها در محیط کشت می‌توان هزاران گیاه کامل و مشابه را در شرایط استریل طی چند ماه به دست آورد.

۱-۲- گیاه‌شناسی

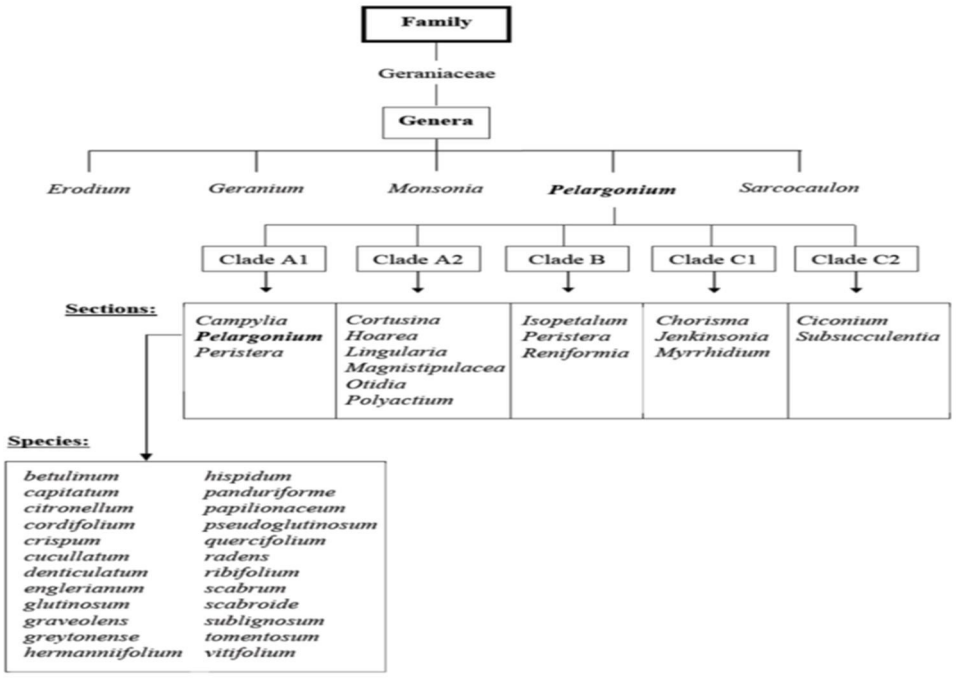
۱-۲-۱- جنس شمعدانی

تیره ژرانیاسه (Geraniaceae) تقریبا ۸۰۰ گونه دارد که ۲۸۰ گونه آن متعلق به جنس پلارگونیوم (Pelargonium) است (Hawke, 2004؛Bakker *et all*., 2000b؛Goldblatt, 2000). منشا گونه‌های شمعدانی را آفریقای جنوبی دانسته اند (Van der Walt, 1993)، که در سال هفدهم میلادی به اروپا معرفی شدند و امروزه انواع هیبریدهای بی شماری ازآن‌ها در دنیا وجود دارد که این هیبریدها به عنوان گیاه آپارتمانی استفاده می‌شوند. به‌طور معمول شمعدانی گیاهی چند ساله بوده و ارتفاع آن‌ها در طبیعت به حدود ۱ تا ۲ متر نیز می‌رسد. برگ‌های این جنس پهن و یک رنگ و کنگره دار و شکننده هستند. اگر برگ‌ها بین دو انگشت له شوند عطر ویژه ای از آن متصاعد می‌شود. جنس پلارگونیوم شامل گیاهان یک ساله و چندساله و درختچه‌ها و همچنین گیاهان برگ ریز است. شکل برگ‌ها و اندازه‌شان متغیر است و ممکن است با کرک پوشیده شده باشد، سطح برگ‌ها صاف و ضخیم باشد یا دارای بافت مخملی باشد لبه برگ‌ها نیز می‌تواند مجعد یا دندانه دار باشد گل‌ها به‌صورت چتر کاذب هستند که تعداد گل‌ها از ۱ تا ۵۰ متغیر است اما تعداد گلچه‌ها ۵ تا ۱۰ است (Webb,1984؛ Aedo *et all*., 1998 ؛Miller, 2002 ؛Taylor, 1989).

۱-۲-۲- تقسیم بندی سیستماتیک

تیره شمعدانی (Geraniaceae) زیر کلاس روزیدا (Rosidae) (Cronquist, 1988) و در بردارنده ۵ جنس و ۸۰۰ گونه است (Van der Walt, 1979).گونه های پلارگونیوم به ۱۶بخش تقسیم شده اند (Bakker *et all*., 2004 ؛Yeo, 1984) که بر اساس تکامل نژادی تنظیم شده است (Van der Walt, 1988). شکل (۱-۱). پیشرفت‌های ژنتیکی در گل شمعدانی در سال ۱۶۰۰ بود، زمانی که کمپانی

هند شرقی اولین گونه‌های شمعدانی را از جنوب آفریقا به اروپا وارد کرد. گونه شمعدانی اژدر در هلند در سال ۱۶۷۰شناخته شد (Craige, 1993). (شکل ۱-۲) پراکنش جهانی جنس شمعدانی را نشان می‌دهد (Aedo *et all*., 1998).



شکل۱-۱: تقسیم بندی سیستماتیک تیره‌ی شمعدانی

شکل ۱-۲ : پراکنش جهانی جنس شمعدانی (Aedo et all., 1998)

تفاوت بین جنس پلارگونیوم و دیگر جنس‌های این تیره در شکل و ساختار گل‌هاست. گل‌های پلارگونیوم به صورت نامنظم به همراه لوله حاوی نکتار است که هیپانتیوم نامیده می‌شود (Hughes, 2009). (شکل ۱-۳).

شکل ۱-۳ : (راست) وضعیت گل های نامنظم (*Pelargonium capitatum*)، و شکل (چپ) وضعیت گل های منظم (*Sarcocaulon vanderetiae*) در تیره شمعدانی

۱-۳- شمعدانی اژدر

۱-۳-۱- گیاه‌شناسی شمعدانی اژدر

اصلاح‌گران هیبریدهای بی شماری را از تلاقی جنس پلارگونیوم به وجود آورده اند که این هیبریدها به کشورهای بزرگی چون آمریکا و انگلستان معرفی شده اند. سومین گروه بزرگ ژرانیوم‌ها، هیبرید *Pelargonium* × *domesticum* است که به عنوان ژرانیوم‌های رگال (شمعدانی اژدر) مطرح شده اند (Carinne *et all*., 2004). در شمال آمریکا اژدرها عموما با نام‌های (Lady Washington Martha Washington و geraniums و pansy-flowere Geranium و Show و Fancy و azalea (Summer (Paul, 2009؛Craige *et all*., 1993؛Liberty, 1976) معروف هستند که این نوع شمعدانی یکی از اولین هیبریدهای پرطرفدار در آمریکا است (Hanniford, 1982) در حالی‌که شمعدانی اژدر در آلمان با نام دیگری با عنوان شمعدانی رویال[۱] شناخته شده است. در بلژیک طی سال ۱۸۸۰ اژدرها با نامی متفاوت *Pelargonium grandiflorum* معروف بودند. نام‌های دیگری نیز برای این شمعدانی محبوب استفاده می‌شد اما به‌صورت گسترده کاربردی نداشت به طور مثال در فرانسه با نام علمی *Pelargonium hortulanorum* و درکشور انگلستان *P. speciosum* (Clifford, 1970). به نظر می‌رسد که شمعدانی اژدر یا Fancy pelargoniums از تلاقی دو گونه شمعدانی با نام‌هایL'Hér (L.) *Pelargonium cucullatum* و L'Hér (L.) *Pelargonium strigifolium* به وجود آمده است (Miller, 2002).

۱-۳-۱- ریخت شناسی شمعدانی اژدر

شمعدانی اژدر با نام علمی *Pelargonium* × *domesticum* متعلق به تیره شمعدانی (Graniaceae)

۱-Royal

است. برگ‌های این هیبرد معمولا ساده، متناوب، لب دار یا دندانه ای دارای انتهای پهن و دارای دم-برگ دراز، است. اندازه و شکل کرک‌ها در اژدرها متغیر است. گل آذین به صورت چتر مرکب با گل‌های نامنظم کامل است که اندازه گل‌ها از۱/۲ تا ۲/۴ اینچ (۳ تا ۶ سانتی متر) متغیر است. گل‌های بسیار درشت آن به صورت دوتایی و تک می باشند. جوانه گل آن معمولا با کاسبرگ‌ها احاطه شده است (Craige *et all*, 1993). تعداد گلبرگ‌ها پنج عدد می‌باشد که دوتای آن‌ها نسبت به سه تای دیگر بزرگ‌تر است. گل‌ها به خاطر روشن بودن رنگ شان معروفند. گلبرگ‌های زیبای اژدر طیف وسیعی از رنگ‌ها را دارد و رنج رنگ‌ها از سفید تا صورتی کم رنگ، بنفش کم رنگ و ارغوانی متفاوت می باشد. رنگ قرمزگلبرگ ها در این نوع شمعدانی بسیار نادر است. اما *P. fulgidum* اژدری با رنگ قرمز است. شمعدانی بسته به گونه در فصل بهار، تابستان و مقداری از پاییز دارای گل است (Van engelen, 1992؛ Hanniford, 1993؛ Carinne *et all*., 2004).

۱-۳-۲- روش‌های تکثیر و ترکیب خاکی مناسب شمعدانی اژدر

این نوع شمعدانی هم از طریق بذر و هم به صورت غیر رویشی قابل تکثیر است. هر چند برای تولید گیاهان پوششی، شمعدانی‌های تکثیر یافته با بذر بازده بیش‌تری دارند (Armitage *et all*., 1992؛ Armitage,1994) اما در سال ۲۰۱۱ شمعدانی‌هایی که از طریق رویشی تکثیر شده بودند ۷۳ درصد از مقدار کل را شامل شدند (U.S.Department, 2012). تکثیر غیر رویشی (Vegetative) شمعدانی‌ها از طریق قلمه امکان پذیر است که این قلمه‌ها از کشورهایی چون مکزیک، آمریکای مرکزی و آفریقا خریداری می‌شود (Swanson *et all*., 2007؛Serek *et all*., 1998). اما قلمه شمعدانی زندگی پس از برداشت کوتاه داشته و تحمل کمی به دماهای بالای پس از برداشت دارد (Faust, 2005؛ Dole, 2006؛ Rapaka *et all*., 2008) و همچنین شرایط نامطلوب باعث افزایش تنفس و کاهش تجمع کربنات شده و در نهایت افزایش تولید اتیلن را در پی دارد که خود سبب پیری زودرس برگ‌ها در

قلمه‌های شمعدانی می‌گردد (Mutui *et all*., 2005). از دست دادن برگ‌های کوچک قابلیت ریشه‌دار شدن قلمه‌ها را کاهش داده و به علاوه میزبان مناسبی برای پاتوژن بوتریتیس Botrytis cinerea می‌گردد (Dreistadt, 2001 ؛ Powell, 1997). در نتیجه، درصد قابل توجهی از آن‌ها از این طریق از بین می‌روند (Rogres, 1993). از آن‌جا که تشکیل بذر در شمعدانی اژدر ضعیف است به دلایلی چون تغییر پذیری در باروری تخمک‌ها وگرده‌ها (Stuart and Jourdan, 1994) و اثرات محیطی روی باروری (Stuart, 1990) و همچنین ترکیب اثرات متقابل سیتوژنتیکی (Knicely *et all*., 1966) تلاش‌هایی صورت گرفت تا یک روش جایگزینی برای تکثیر آن‌ها توصیه شود (Marsolais *et all*., 1991 ؛Wilson,1994). تکنیک ریزازدیادی یا ریزافزایی در این باره استفاده شد (Cassells *et all*., 1987؛ Horn, 1994.,1988)، به طوری که تکثیرگیاهان شمعدانی از طریق کشت پروتوپلاست (Dunbar, 1991) و همچنین انواع دیگر از روش‌های کشت درون شیشه ای (Nord, 1989) با موفقیت همراه شد و نیز گزارش‌هایی ازکشت تخمک برای این هیبرید توسط (Kato, 1983) ارائه شد که نتایج آن در سال ۱۹۸۸ و ۱۹۸۹ منتشر گردید. مخلوط خاک مناسب جهت رشد ایده ال این گیاه شامل نسبت‌های مساوی از خاک لوم باغچه، پیت ماس و ماسه یا پرلایت است و در خاکی با اسیدیته ۵/۵ تا ۶ به خوبی رشد می‌کند (Clemson, 2012؛ Carinne *et all*., 2004).

۱-۳-۴- کاربردهای تجاری تیره‌ی شمعدانی

بر طبق گزارش‌هایی کیفیت و عملکرد شمعدانی به چندین عامل بستگی دارد که عبارتند از مکان رشدی آن، تراکم کشت (Lis-Balchin, 2004؛Rao, 2002)، سن برگ‌ها (Rao, 1994)، نوع رقم‌ها و تغییرات فصلی (Rao, 1996؛ Demarne, 2002) و همچنین استریل بودن (سلامت) گیاه. شمعدانی‌ها در جهان از جمله گیاهان پر طرفدار و محبوب هستند که به عنوان گیاه گلدانی و گیاه پوششی در تابستان (Hughes, 2009) و گل آویز در فضای سبز، گلخانه‌ها و در منازل استفاده می‌شوند. اژدرها به عنوان گیاهان گلدانی با دوره گلدهی کوتاه کاربرد دارند. تحت شرایط محیطی خنک و بدون سرما به

صورت درختچه‌های بزرگ و نیمه چوبی رشد می‌کنند. این گل‌های گلدانی، گیاهان مخصوص در فضای داخل هستند و در طی سال به خوبی رشد می‌کنند و زمان گلدهی آن‌ها از اسفند تا خرداد است و ادامه گلدهی آن‌ها بستگی به نور دارد. شماری از انواع جدید هیبریدهای شمعدانی سبد آویز و رونده نیز به وجود آمده است. گل اژدر یا مارتا واشینگتن یک گل گلدانی مناسب درماه‌های زمستان است که تحمل گرما را ندارد و برای فضای بیرون گل‌های مناسبی نیستند. شمعدانی‌ها در اروپا و آمریکا برای دکوراسیون فصلی و همچنین در بالکون‌ها و تراس‌ها و فضای سبز استفاده می‌شوند (Zawadzinska,2015؛Douglas, 2003). درسال ۲۰۱۳ در هلند ۶۰ میلیون گل شمعدانی به ۲۷ میلیون اروپایی فروخته شد (Flora, 2013). طبق بررسی که در سال ۲۰۱۱ انجام شد طی خرید جهانی، کشورهای تولیدکننده شمعدانی‌های گلدانی تقریبا به ارزش ۱۱۶ میلیون دلار از فروش این گل بدست آوردند (Clemson, 2012). درسال ۲۰۰۲ تقریبا ۱۲۰میلیون گیاه شمعدانی به صورت یک ساله در آمریکا و ۷۰ میلیون در آلمان و ۲ میلیون در انگلستان کشت شد. از جمله تولیدکننده‌های بزرگ شمعدانی هلند و فرانسه می‌باشند. امروزه کشورهای چین و شرق میانه خصوصا مصر و موروکو نیز تولید کننده‌های بزرگ گل‌های شمعدانی هستند (James, 2002). گیاهان بومی منبع مهمی از مواد کم یاب هستند که برای ساخت داروها استفاده می‌شوند (Gupta *et all*., 1994). گونه‌های شمعدانی *P. sidoides* و *P.scarbum* حاوی خواص آنتی‌باکتریال خصوصا در مقابل باکتری باسیلوس و استرپتوکوکوس و همچنین دارای خاصیت آنتی‌قارچی در برابر قارچ میکروسپروم کانیس نیز می‌باشد (Vorderbank, 1949؛ Kayser *et all*., 1997؛ Kolodziei *et all*., 2003؛ Kolodziei *et all*., 2007؛ Kolodziei, 2011؛ Ben hsouna *et all*., 2012؛ Dzamic *et all*., 2014؛ Carmen *et all*., 2014). اسانس گونه‌های شمعدانی مانند شمعدانی عطری کاربرد وسیعی در صنایع عطری (Singh *et all*., 2008؛ Verma *et all*., 2010) و صنایع آرایشی و بهداشتی (Lis-Balchin, 2004؛ Shawl *et all*., 2006) دارد. درصنایع غذایی و دارویی (Narayana *et all*., 1986؛ Rao, 2002) و در

آروماتراپی (Dorman, 2000؛ Hughes, 2009 ؛Dabiri *et all*., 2011) نیز در جهان استفاده می‌گـردد. بذرهای شـمعدانی در صـنایع پزشـکی و در صـنایع دارویـی کـاربرد گسـترده دارد (Hughes, 2009). اسانس شمعدانی *P. reniforme* و *P. Sidoides* برای درمان مشکلات ریه و تنظیم هورمونی و عملکرد کلیه و همچنین برای تعدیل کردن سیستم ایمنی بدن در پزشکی نیز استفاده مـی‌شـود (Kolodziei, 2002؛2004Seideh *et all*., 2007؛Mativandlela *et all*., 2007). شمعدانی *Pelargonium radula* حـاوی اسانسی است که به عنوان یک ضد آفت زیستی کابرد دارد (Held, 2003). تعـدادی از گیاهـان زینتـی در خاک‌هایی که درصد فلزات سنگین (Heavy Metal) آن‌ها بالا است قابلیت رشد دارنـد. درگزارشـی توسط (Krishna *et all*., 2000) گونه‌ای از شمعدانی با نام *Pelargonium frensham* نسبت به تجمع فلزاتی با غلظت‌های بالا مانند کریپتون و نیکل و سرب در سیسـتم‌هـای کشـت هیـدروپونیک تحمـل بالایی را از خود نشان داد. طبق گزارشی دیگـر، شـمعدانی گونـه *Pelargonium hortorum* مقاومـت بیش‌تری به فلزات سنگین نسبت به سایر شمعدانی‌ها را دارا است (Orrono, 2009).

۱-۴- کشت بافت

اصطلاح کشت بافت گیاهی به طورکلی به کشت درون شیشه‌ای هر قسمتی از گیاه اعم از یک سلول انفرادی، بافت و یا اندام در شرایط استریل اطلاق می‌گردد (Deberg, 1991؛ Drew, 1990). سیستم‌های کشت بافت گیاهی غالبا به عنوان سیستم‌های الگو برای بررسی‌های گوناگون فیزیولوژیکی، زیست شیمیایی، ژنتیکی و دشواری‌های ساختاری گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. کشف اکسین‌ها توسط (Went, 1934) و سیتوکنین‌ها توسط (Skoog *et all*., 1965) مقدمه اولین موفقیت کشت درون شیشه‌ای بافت‌های گیاهی شد. در مقالات زیادی در مورد جزئیات روش های کشت بافت بحث شده است (Bhojwani *et all*., 1983؛ George *et all*., 1984؛ Mantell *et all*., 1985؛ Pierik, 1987).

۱-۴-۱- موارد کاربردی کشت بافت

در مهندسی بیوشیمی، از طریق کشت بافت، رشد سلول‌های گیاهی به تعداد زیاد در محیط کشت مایع اتفاق می‌افتد. بنابراین به طور باالقوه منابع مفید و مناسب‌تر تولیدات ثانویه گیاهی از گیاهان سالم بدست می آید. در نتیجه تولید متابولیت‌های ثانویه، تولید و انتخاب سلول‌های خاص و نیز تکثیر و تولید گیاه‌چه فراهم می‌شود. در حال حاضر تحقیقات بسیار گسترده‌ای برای تولیدات ثانویه از جمله مواد آرایشی و درمانی از طریق سوسپانسیون سلولی گیاهان درحال انجام است.

۲ - تولید گیاهان هاپلویید منجر بدست‌یابی به رقم‌ها و لاین‌های خالص می‌شود.

۳- تلاقی بین گونه‌های دور، به وسیله روش امتزاج پروتوپلاست، امکان انتقال ژن و ایجاد تنوع ژنتیکی را در محصولات افزایش می‌دهد.

۴- ریزازدیادی، با استفاده از روش‌های کشت مریستم و ساقه، از مواد اولیه محدود گونه‌های چوبی، امکان تولید انبوه افراد مشابه بدست می آید. در نتیجه منجر به تولید انبوه گیاهچه های یکنواخت و سالم می‌گردد.

۵- امکان تکثیر سریع کلون‌ها وجود دارد (Hussey,1983.,1978؛ Altman, 2000؛ Akin *et all*., 2009؛ Kumar *et all*., 2011).

۶- برخلاف تلاقی معمول بین دو فرد، اختلالات مهمی در مواد ژنتیکی ایجاد نخواهد شد.

۷- امکان گزینش گیاه یعنی غربال سازی درون شیشه ای و انتخاب سلول را فراهم آورده است (Chaleff, 1983؛Tomes, 1982). انتخاب در محیط درون شیشه‌ای به معنای بهره برداری از تنوع ژنتیکی است که از وجود آن درگیاهان اطلاع داریم. به این ترتیب که کشت‌های سلولی را به منظور

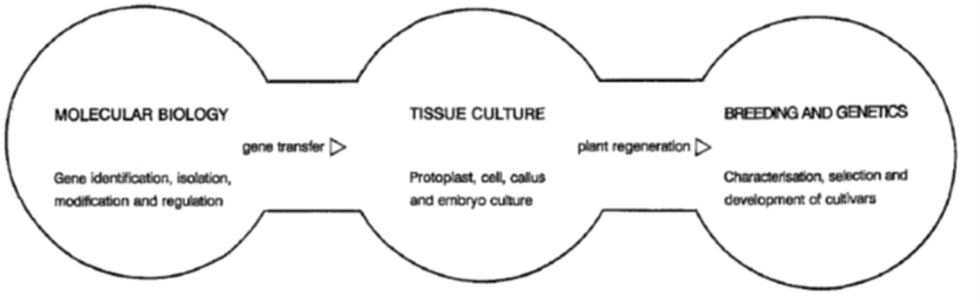
شناسایی سلول‌های مقاوم به بیماری‌ها، حشرات، علف کش‌ها در شرایط تنش مورد بررسی قرار می‌دهیم. روش انتخاب در محیط درون شیشه به طور معمول شامل قرار دادن سلول‌ها در معرض فشار انتخاب مناسب و باززایی رگه‌های سلولی متنوعی است که به تنش مقاوم هستند (Pierik, 1997 ؛ Akin *et all*., 2009).

۸- حفظ و نگهداری منابع ژنتیکی به این صورت که با استفاده از کشت بافت می‌توان سلول‌های تراریخته شده ژنتیکی را حفظ، نگهداری و تکثیر کرد سپس وارد مزرعه و محیط طبیعی کرد. از اوایل دهه ۱۹۷۰ با توسعه فنون کشت بافت آزمایشگاهی و ابداع روش‌های جدید بیولوژی مولکولی، کشت بافت و سلول گیاهی تاثیر چشم گیری در هر دو زمینه اصلاح نباتات و تکثیر رویشی داشته و ذخیره و نگهداری ذخایر توارثی را تسهیل کرده است. از طرف دیگر، کشت بافت گیاهی بخش جدایی ناپذیر فناوری تراریختی گیاهان است که با استفاده از آن تولید گیاهان تراریخته با انتقال DNA از منابع مختلف امکان پذیر است (Withers,1989) (شکل ۱-۴).

۹- محیط کنترل شده بدون تغییر در آب و هوا و همچنین آفات و غیره را فراهم آورده است (Kartha, 1985)

۱۰- با استفاده از کشت بافت می‌توان به تکثیر یک ژنوتیپ خاص به تعداد زیاد و در زمان کوتاه اشاره کرد. به این صورت که با تکثیر رویشی گیاه بدون تغییرات ژنتیکی و بدون طی کردن نسل‌ها و تقسیمات میوزی به کلون سازی یک ژنوتیپ پرداخت. این روش به طور گسترده ای برای بسیاری از گل‌های زینتی و گیاهان چوبی در سطح تولیدی و اقتصادی در حال انجام است. با استفاده از این روش موتانت های مورد نظر قابل حفظ، تکثیر و گسترش خواهند بود. تولید گل‌های با مشخصه‌های ویژه از جمله رنگ، میوه‌هایی با ویژگی‌های خاص و بازار پسندی منحصر به فرد از جمله این موارد است.

۱۱- از دیگر کاربردهای کشت بافت می‌توان به تولید گیاهان خالص ژنتیکی (دابل هاپلوییید) اشاره کرد که استفاده فراوانی در پروژه های تحقیقاتی و تولید گیاهان خاص دارد.



شکل ۱- ۴ : نقش کشت بافت در بهبود ژنتیکی گیاهان و هم‌چنین بیولوژی مولکولی و اصلاح گیاهان

۱-۴-۲- انواع مختلف کشت در شرایط درون شیشه ای

کشت گیاه کامل : یک بذر، ممکن است در شرایط درون شیشه‌ای، کشت شود، و یک گیاهچه و نهایتا یک گیاه کامل تولید کند. مثل ارکیده.

کشت جنین : در این نوع کشت جنین جدا شده، پس از حذف پوسته بذرکشت می‌شود (Tilton, 1984). این روش در مورد بذور دارای خواب (Randolph, 1945) و همچنین بذوری که جوانه‌زنی ضعیف دارند (Biggs *et all*., 1986) بسیار ارزشمند است. در سال ۱۹۰۴، هانیگ، اولین محققی بود که توانست یک گیاه زنده از کشت جنین گیاه Cruciferae بدست آورد. برای رفع موانع جوانه‌زنی بذر و همچنین کوتاه کردن دوره اصلاح نبات و موارد دیگر کاربرد دارد.

کشت اندام گیاهی : یک اندام جدا شده، در شرایط درون شیشه ای رشد می‌کنند. کشت اندام، انواع مختلفی مثل کشت مریستم (Gahan, 2008) ، کشت نوک ساقه، کشت ریشه (George, 1993)، کشت پرچم و کشت گرده (Sunderland, 1977؛ Prakash and Staden, 2008؛ Ahmad *et all*., 2011) را شامل می‌شود. غالبا قسمت جدا شده (بافت یا اندام) به عنوان قلمه شناخته می‌شود، که در

قسمت ریزازدیادی توضیح داده شده است.

کشت گرده و تخمک :

از این روش برای تولید گیاهان هاپلوئید در شرایط درون شیشه ای استفاده می‌شود (Maheshwari *et all*., 1980؛ Zhu,1979). هدف از کشت بساک یا گرده تولید گیاهان هاپلوئیدی از راه تحریک تولید جنین از تقسیمات دانه‌های گرده نابالغ می‌باشد که مزایای بیش‌تری نسبت به گیاهان هاپلویید دارند. علاوه براین پلوئیدهای مضاعف شده هموزیگوس هستند و لذا به عنوان مواد خالص در برنامه‌های اصلاحی قابل استفاده اند (Drew *et all*., 1990).

کشت کالوس :

کشت کالوس : اگر یک بافت تمایز یافته جدا شود و در شرایط درون شیشه ای تولید یک توده سلولی تمایز یافته به نام کالوس نماید، این پدیده را کشت کالوس می‌نامند. یکی از عمده‌ترین مشکلات استفاده از کشت کالوس، ایجاد تنوع می‌باشد.

کشت سلول : کشت سلول‌های منفرد که به کمک آنزیم‌ها یا به روش‌های مکانیکی از یک بافت گیاهی، کالوس یا سوسپانسیون سلولی بدست می آید کشت سلول گفته می‌شود.

کشت پروتوپلاست : کشت پروتوپلاست‌هایی که در اثر هضم آنزیمی دیواره سلول به وجود آمده اند.

از کشت پروتوپلاست برای ایجاد تغییرات ژنتیکی ، هیبریداسیون سلولی استفاده می‌شود (Shepard *et all*., 1983؛Bhojwani *et all*., 1977؛Carson, 1973).

۱-۵- ریزازدیادی

تکنیک کشت بافت گیاهی است که جهت تولید گیاهان کوچک استریل به کار می‌رود و امروزه به ابزار مهمی درکارهای علمی و تجاری تبدیل شده است. این تکنیک یک روش جایگزین برای تکثیر رویشی کلون‌های برتر است. در واقع ریزازدیادی همان کشت بافت است. ریزازدیادی به عنوان یک روش

گسترده در تکثیر تجاری گیاهان مطرح می‌شود. این روش جهت حفظ ژرم پلاسم استفاده می‌شود تا گیاهان مادری حفظ شوند (Wilkins,1983؛ Withers,1989). مراحل ریزازدیادی نخست توسط موراشیگی در سال ۱۹۴۷ شرح داده شد. او سه مرحله ریزافزایشی را برای ریزازدیادی درون شیشه ای گیاهان برشمرد که بعدها دو مرحله دیگر به آن اضافه شد. ریزازدیادی دارای پنج مرحله است (Kumar *et all*., 2011).

فاز ۰ : دربرگیرنده تهیه‌ی گیاه مادری بوده که از آن ریزنمونه‌های اولیه گرفته می‌شود. گیاه مادری باید عاری از بیماری بوده و ترجیحا در اتاقک رشد یا گلخانه پرورش داده شده باشد. گیاهان مادری باید دارای برنامه کودی و دفع آفاتی منظم باشند.

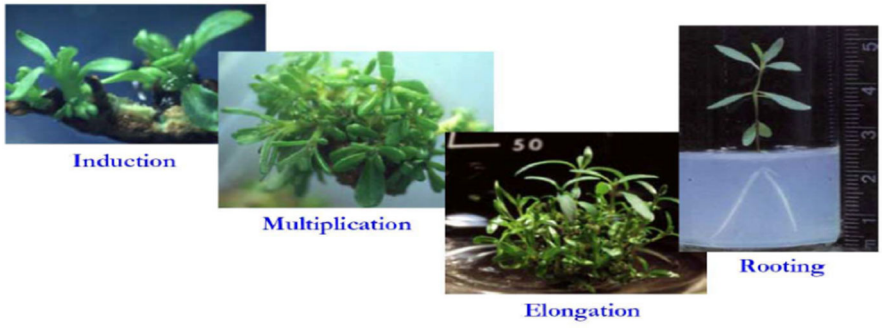
فاز ۱ : در این مرحله انتخاب ریزنمونه و عمل ضدعفونی در شرایط استریل و در نهایت کشت گیاهان در محیط کشت انجام می‌گردد. این مرحله، مرحله ریزنمونه یا مرحله استقرار نامیده می‌شود.

فاز ۲ : طی آن تکثیر سریع رخ می‌دهد و توده بافتی به وجود می‌آید. توده ایجاد شده در محیط کشت جدید برای پرآوری قرار می‌گیرد. هدف از این مرحله افزایش ساقه‌های جانبی و یا تشکیل جوانه نابجا می‌باشد. ساقه‌های ایجاد شده را می‌توان به عنوان گیاهان استوک حفظ کرد و یا برای تکثیرهای بعدی استفاده نمود به این صورت که روی محیط پرآوری دوباره در چرخه قرار می‌گیرد یا ممکن است به مرحله سوم برده شود. دراین مرحله سیتوکنین‌ها به غلظت ۱ تا ۳۰ میلی‌گرم در لیتر بکار می‌رود تا پرآوری جوانه جانبی را افزایش بخشد.

فاز۳ : در این مرحله طویل شدن ساقه‌ها و همچنین تحریک ریشه‌زایی در محیط کشت حاوی تنظیم کننده‌های رشدی متفاوتی صورت می‌گیرد. در مرحله ریشه‌زایی غلظت‌های عناصر پر مصرف و کم مصرف معمولا به نیمی از غلظت عادی کاهش داده می‌شوند. IBA موثرترین منبع اکسین برای ریشه-

زایی است. این مرحله ۲ تا ۴ هفته طول می‌کشد که در ضمن آن گیاهک‌ها ریشه‌دار می‌شوند و تا حدودی سازگار می‌گردند.

فاز۴ : این مرحله به نام سازگار شدن گیاهان به شرایط بیرون مطرح شده است و این مرحله قبل از مرحله انتقال به خاک است. همه گیاهچه‌های بدست آمده از کشت بافت، دارای کوتیلدون ابتدایی و ناقص اند و اغلب سیستم ریشه ای نامناسب دارند. گیاهچه‌های انتقال یافته به خاک اغلب دچارکمبود آب، عقب ماندگی رشد و حتی مرگ می‌شوند. در اغلب موارد ریشه‌زایی در شرایط آزمایشگاهی انجام می‌شود، ولی در خاک استریل یا نیمه استریل نیز متداول است (Zobayed *et all*., 2000). چنان‌چه گیاهک‌ها درون شیشه ریشه‌دار شده اند آن‌ها را باید در شرایط نیم‌سایه و رطوبت نسبی زیاد برای چندین روز نگه داشت. تیمار گیاهک‌های تازه انتقال یافته با قارچکش‌ها، کار دیگری است که ممکن است به بقا گیاهان کمک کند (کنت تورز، ۱۳۸۶) (شکل ۱-۵).



شکل ۱- ۵ : مراحل ریزازدیادی در شرایط درون شیشه ای

۱-۵-۱- انواع ریزازدیادی

انواع ریزدیادی به‌صورت زیراست (شکل ۱-۶) :

۱-کشت مریستم ، جوانه جانبی ، نوک ساقه

۲-جنین زایی سوماتیکی

۱-۵-۱-۱- کشت مریستم

(Morel, 1960) شخص پیش‌گام در کشت مریستم بود. برای این منظور مریستم به همراه دو یا چند پریموردیای برگ برداشته شده و در محیط کشت قرار می‌گیرد. به منظور تولید گیاه عاری از ویروس، بافت مریستم عاری از ویروس در راس ساقه یا جوانه انتهایی گیاهان را کشت کرده و سپس در محیط باززایی قرار می‌دهند. به منظور حذف بافت‌های آلوده اندازه ریزنمونه باید تا حد ممکن کوچک باشد. این نوع کشت جهت دست‌یابی به تولید گیاهان عاری از ویروس در گیاهان توت فرنگی، سیب زمینی و غیره (Quak, 1977) استفاده شده است (Kartha *et all*., 1981).

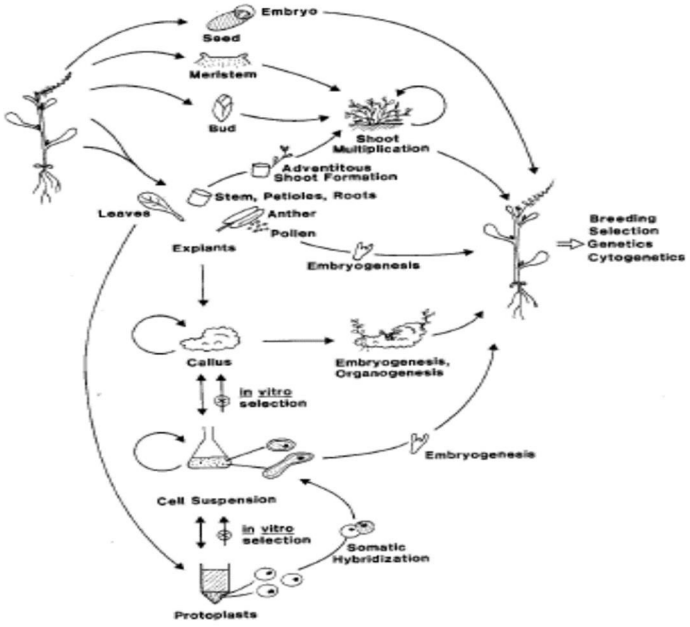
۱-۵-۱-۲-کشت تک گره

منظور از کشت تک گره، جداکردن یک جوانه به همراه قسمتی از ساقه به منظور تشکیل ساقه از طریق نمو جوانه است. این روش طبیعی‌ترین روش تکثیر رویشی گیاهان درشرایط درون شیشه‌ای است. هر جوانه در محور برگ را (مشابه با جوانه نوک ساقه) می‌توان روی محیط کشت رشد داد.

۱-۵-۱-۳- کشت نوک ساقه

رأس ساقه یا قسمت انتهایی ساقه در واقع شامل هر سیستم انتهایی ساقه همراه با چندین پریموردیای برگ‌های مجاور می‌باشد .از این روش برای تکثیر در سطح وسیع استفاده می‌شود. اولین بار (Robbins, 1922) کشت نوک ساقه را درگیاهان در محیط کشت انجام داد اما اولین کسی که به طور موفقیت آمیز به رشد قابل توجه درکشت آن دست یافت، لو(Loo, 1946a., 1945a,b) بود این کار را درسبزی مارچوبه Asparagus انجام داد. باززایی با قراردادن بافت‌های گیاهی روی محیط کشت

غذایی حاوی غلظت بالایی از تنظیم کننده‌های رشد (اکسین و سیتوکنین‌ها)، سلول‌ها غیر متمایز شده وکالوس تشکیل می‌شود. برعکس، اگرکالوس روی محیط کشتی قرار گیرد که ترکیب آن تغییر کند، یا تنظیم کننده‌های رشد در آن کاهش یابند و یا به طورکامل از آن حذف شوند، امکان تشکیل تعداد زیادی ساختار تمایز یافته وجود دارد. این ساختارها ممکن است جنین‌ها (مسیر جنین زایی)، جوانه‌های ساقه (مسیر ساقه‌زایی)، یا ریشه‌ها (مسیر ریشه‌زایی) باشند. در فرآیند اندام‌زایی، گیاه بدون جنین‌زایی به اندام زایی می‌رود و باید دانست در کشت بافت اگر اندامی نظیر ریشه یا ساقه به وجود آمد، این اندام نابجاست چون از مریستم به وجود نیامده است. گیاهان زینتی زیادی با استفاده از تکنیک کشت بافت در محیط کشت‌های حاوی اکسین و سیتوکنین تکثیر یافته اند (Preil, 2003؛ Rout, 2004).



شکل ۱-۶: ارتباط بین تکنیک‌های مختلف درکشت بافت

۱-۵-۲- فاکتورهای موثر بر ریزازدیادی گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای

۱-۵-۲-۱- محیط کشت

محیط کشت‌های متفاوتی برای ریز ازدیادی در گیاهان وجود دارد. پرکاربردترین محیط کشت MS است اما این محیط کشت الزاما همیشه برای رشد و نمو ایده آل نیست زیرا میزان نمک در آن خیلی بالاست. برای گیاهان حساسی مثل بعضی از گونه‌های چوبی، محیط کشت WPM (محیط کشت مخصوص گیاهان چوبی) (Liod, 1980) را ارائه کرده اند. ترکیبات محیط کشت پارامتر بسیار مهمی در بهبود پروتوکل باززایی گیاهان است (Zukar *et all*., 1997؛ Khan *et all*., 1988؛ Diallo *et all*., 2008).

۱-۵-۲-۲- ژنوتیپ

یک فاکتور مهم در باززایی گیاهان ژنوتیپ است (Tyagi *et all*., 2001؛ Chitra, 2005؛ Gandonou *et all*., 2005؛ Feyissa *et all*., 2005؛ Tereso *et all*., 2006؛ Reddy *et all*., 2008 ؛ Cortizo *et all*., 2009؛ Kumar *et all*., 2010). اثر ژنوتیپ روی باززایی و طویل شدن ممکن است به علت سطح هورمون‌های داخلی باشد خصوصا سطح سیتوکنین‌ها طی دوره تحریک اما هنوز مکانیسم آن نامعلوم است (Schween *et all*., 2003؛Pellegrineschi, 1997). تفاوت‌های ژنوتیپی در ارتباط با باززایی و جنین زایی سوماتیکی می‌تواند مربوط به تفاوت‌های ژنتیکی کمی و کیفی باشد (Henry *et all*., 1994).

۱-۵-۲-۳- سن گیاه

بافت‌های جنینی، معمولا دارای توان تکثیری بالایی هستند. زمانی‌که مریستم‌ها و نوک ساقه‌ها

(آغازه‌های ساقه) برای کشت ایزوله می‌شوند، نوک ساقه‌های جوان، در کشت درون شیشه ای، نیزجوان، درحالی که نوک ساقه های مسن، درکشت درون شیشه‌ای مسن باقی خواهند ماند.

۱-۵-۲-۴- سن بافت یا اندام

بافت‌های جوان و نرم (غیرچوبی) در مقایسه با بافت‌های مسن‌تر و چوبی، عموما برای کشت، قابل اعتماد ترند ؛ اگرچه که استثناهای زیادی نیز وجود دارد. زمانی‌که از نمونه‌های حاصل ازدم‌برگ استفاده شد، ملاحظه گردید که دم‌برگ خیلی جوان اغلب بهتر از دم‌برگ جوان تکثیر می‌شود (کنت تورز، ۱۳۸۶).

۱-۵-۲-۵- وضعیت فیزیولوژیکی

وضعیت فیزیولوژیکی تاثیر زیادی روی تقسیم سلولی و تکثیر در محیط درون شیشه ای دارد. به طور کلی قسمت‌های جدا شده از گیاهان در حال رویش در مقایسه با قسمت‌های جدا شده از گیاهانی که در مرحله زایشی هستند، راحت‌تر تکثیر پیدا می‌کنند، اگرچه استثناهایی در موارد فوق دیده می‌شود (Gitonga *et all*., 2010 ؛Singh *et all*., 2006).

۱-۵-۲-۶- وضعیت سلامت گیاه

چنانچه گیاه در زمان نمونه‌برداری و برداشت نمونه سالم باشد در این صورت احتمال موفقیت در محیط درون شیشه ای بیش‌تر خواهد بود. اگر انتخاب نمونه از مجموعه گیاهان مورد نظر باشد، در این صورت باید سالم‌ترین آن‌ها را به عنوان مواد آزمایش انتخاب شوند چون این وضعیت می‌تواند روی درصد آلودگی‌های بعدی موثر باشد (Ali *et all*., 2006 ؛Gubis *et all*., 2003؛Chan, 2002).

۱-۵-۲-۷- نوع ریزنمونه

نوع ریزنمونه مانند برگ، دمبرگ، هیپوکوتیل، ریشه، گره و غیره اثر شایان توجهی در پروسه کشت بافت گیاهان دارد (Kumar *et all*., 2011b). در تحقیقی ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ گیاه *cajan Cajanus* برای کشت بافت استفاده شد و بیش‌ترین درصد باززایی در ریزنمونه برگ بود (Tyagi *et all*., 2001؛ Alagumanian *et all*., 2004؛ Blin strubiene *et all*., 2004).

۱-۵-۲-۸- منبع ریزنمونه

منبع ریزنمونه چه در شرایط درون شیشه ای و برون شیشه ای در باززایی موثر است (Sujatha *et all*., 1996؛ Kumar *et all*., 2010a). منبع ریزنمونه ظرفیت متغیری در باززایی دارد (Feyissa *et all*., 2005). اولین گام در هر برنامه کشت بافت موفق، گزینش یک منبع ریزنمونه مناسب است (Sharma *et all*., 2001؛ Arockiasamy *et all*., 2002؛ Kumar *et all*., 2010). نحوه قرارگرفتن ریزنمونه به صورت افقی در مقایسه با عمودی قرار گرفتن آن به علت سطح تماس بیش‌تر آن با محیط کشت، مناسب‌تر بوده و در نتیجه درصد باززایی بیش‌تر است.

۱-۶- قهوه ای شدن کشت‌ها

ریزنمونه‌های برخی گونه‌ها اغلب ۳ تا ۵ روز پس از قرارگیری در محیط کشت قهوه ای رنگ می‌شوند. هنگام بروز چنین حالتی، عموما از رشد جلوگیری می‌شود و بافت می‌میرد. قهوه ای شدن بافت در گونه‌هایی زیاد است که حاوی میزان زیادی تانین یا دیگر هیدروکسی فنول‌ها باشند. قهوه ای شدن کشت‌ها یکی از مواردی است که متابولیسم بافت‌ها را تحت اثر قرار می‌دهد و به دلیل کیفیت نامطلوب ماده ژله ای کننده، استفاده نادرست از اتوکلاو، تنظیم نادرست pH محیط کشت و حتی

آنزیم پلی فنل اکسیداز است. استفاده از زغال فعال (۰/۲ تا ۰/۳ درصد) یا پلی وینیل پیرولیدین (PVP با غلظت ۲۵۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، PVP یک پلیمر است که مواد شبه فنل را جذب می کند) (Johansson, 1983)، افزودن آنتی اکسیدان (مانند سیتریک اسید و آسکوربیک اسید به مقدار ۵۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) نیز در کاهش قهوه ای شدن مفید است و می‌تواند عمل اکسیداسیون را مانع شود. این دو ماده معمول‌ترین ضد اکسیدکننده هستند. از راه‌های دیگر کاهش قهوه ای شدن، می‌توان به واکشت‌های پی در پی و حذف سلول‌های مرده اشاره کرد. برخی تحقیقات نمایان‌گر آن است که شستشوی بافت‌ها، نگهداری کشت‌ها در تاریکی (Rugini *et all*., 1987) و جانشینی آگار با ژل رایت در کاهش قهوه ای شدن مفید است. افزودن دی اتیل-دی تیوکربنات در مرحله شستشو بعد از استریلیزاسیون با غلظت دو گرم در لیتر، و یا به صورت قطراتی در زمان قرار دادن ریزنمونه در محیط کشت می تواند عمل اکسیداسیون را مانع شود (Jonard, 1986). کاهش زخمی شدن بافت منجر به کم شدن ترشحات می شود.

۱-۷- شیشه ای شدن کشت‌های گیاهی

محیط کشت مایع و همین طور محیط کشت جامد می‌تواند باعث نوعی اختلال فیزیولوژیک تحت عنوان ویتریفیکاسیون (شیشه ای شدن) شوند (Anonymous, 1978؛ Deberg, 1983 ؛ Ziv, 1983؛1991, Ziv). در منابع علمی ویتریفیکاسیون به حالت‌های نیمه شفافی، آب گیری زیاد و شیشه‌ای شدن، بافت‌های گیاهی کشت شده در محیط کشت اطلاق می‌شود.

وقوع و شدت ویتریفیکاسیون توسط بسیاری ازعوامل پیچیده تحت تاثیر قرار دارد :

افزایش غلظت اگار و یا قند، غالبا باعث کم شدن حالت ویتریفیکاسیون در مورد میخک و آرتیشو می‌شود.

انتخاب ظروف مناسب با تبادلات گازی، بهتر می تواند از این حالت ممانعت کند.

با میزان بالای سیتوکنین‌ها در ارتباط است (Hussey,1986).

از طریق استریلیزاسیون زیاد و همچنین در تابش نورکم و حرارت‌های بالا تحریک می‌شود. برخی از انواع آگار نسبت به این پدیده حساسیت بیش‌تری دارند (Gribble, 1999).

۱-۸- ترکیبات مورد استفاده درمحیط کشت گیاهی

یکی از عوامل ایجاد رشد و اندام‌زایی درکشت بافت گیاهی مواد تشکیل دهنده محیط کشت است. انتخاب محیط کشت یا تهیه فرمولاسیون آن برای موفقیت در کشت بافت ضروری است. هیچ محیط کشت مشخصی را نمی‌توان برای رشد انواع سلول‌ها توصیه کرد و اغلب لازم است تغییراتی در محیط کشت برای پاسخ‌گویی انواع مختلف ریزنمونه صورت گیرد. بیش‌ترگونه‌های گیاهی به محیط‌های کشت مختلفی نیاز دارند. مسیر تعیین یک محیط کشت به هدف کشت سلول و بافت بستگی دارد. از این رو انتخاب محیط کشت مناسب برای یک گونه با مشکلات فراوانی همراه است. به طور کلی محیط کشت حاوی نمک‌های غیر آلی و ترکیبات آلی مثل تنظیم کننده‌های رشد، ویتامین‌ها، کربوهیدرات‌ها و یک عامل ژله ای کننده محیط است علاوه بر این محیط کشت می‌تواند دارای اسید آمینه و آنتی‌بیوتیک نیز باشد.

۱-۸-۱- آب

به کیفیت آب، توجه زیادی باید شود؛ زیرا ۹۵ درصد از محیط کشت را آب تشکیل می‌دهد. توصیه می‌شود، برای موارد تحقیقاتی، آبی به کاربرده شود که در ظروف شیشه ای پیرکس، تقطیر شده باشد.

۱-۸-۲- ویتامین‌ها

ویتامین‌های لازم برای گیاهان به عنوان کاتالیزور در فرآیندهای متابولیکی به کار می‌رود و در

محیط‌های کشت گیاهی فقط به مقدار بسیار جزیی مورد نیاز هستند. مهم‌ترین ویتامینی که در محیط‌های کشت سلولی از آن استفاده می‌شود تیامین (Bonner, 1937.,1938a) می باشد. برخی از ویتامین‌های دیگر که در تهیه محیط کشت از آن‌ها استفاده می‌شود شامل نیکوتینیک اسید یا نیاسین (Bonner, 1940a) پیریدوکسین، اسید آسکوربیک (Vit c)، اسید فولیک و ریبوفلاوین و میواینوزیتول است. تیامین در حالت عادی در غلظتی بین ۰/۱ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر به کار می‌رود. اسید نیکوتینیک و پیرودوکسین گاهی به محیط کشت افزوده می‌شود (Naraganaswamy, 1977؛ Schenk et all., 1972؛ De Klerk *et all*., 2007 ؛ George *et all*., 2008).

۱-۸-۳- منبع کربن

قند، جز بسیارمهمی در هر نوع محیط کشت است، و چون معمولا شرایط رشد برای فتوسنتز کافی نیست و یا اصولا به علت تاریکی، فتوسنتز انجام نمی‌شود، اضافه کردن قند به محیط کشت ضروری است. ساکارز به دلایلی معمولا به عنوان منبع کربن در محیط کشت‌ها استفاده می‌شود: ارزان و در دسترس بودن آن و همچنین پایداری آن بعد از اتوکلاو و جذب سریع آن توسط اکثر گیاهان باعث رایج شدن آن گردیده است. کربوهیدرات‌های دیگر قابل استفاده مانند گلوکز و مالتوز و گالاکتوز و قندهای الکلی گلیسرول و سوربیتول در محیط کشت قابل استفاده است (Fowler, 2000).

بافت‌های سبز در حالت درون شیشه‌ای به قدر کافی اتوتروف نیستند. از میان کربوهیدرات‌هایی که در محیط‌های کشت به کار می‌روند ساکارز ترجیح داده می‌شود. بهترین غلظت ساکارز در محیط کشت ۲ تا ۴ درصد ساکارز است (George *et all*., 1984). ساکارز موجود در محیط کشت به سرعت به فروکتوز و گلوکوز شکسته می‌شود و به‌راحتی جذب گیاه می‌گردد (Schenk et all., 1972).

۱-۸-۴- آگار (جامد کننده محیط کشت)

اگار پلی ساکاریدی است که از جلبک قرمز دریا استخراج می‌شود. محیط کشت به دو نوع جامد و مایع تقسیم بندی می‌شود. نرخ باززایی در برخی گونه‌ها در محیط مایع بیش‌تر است (Deberg, 1983؛ Pateli *et all*., 2003). آگار قابل حل، به صورت ژل در می‌آید، که می‌تواند آب را جذب کند. اکثر بافت‌ها روی محیط کشت جامد کشت می‌شوند که توسط آگار یا جانشین آن فیتاژل حاصل تخمیر آگار توسط گونه ای پسودوموناس و ژل رایت (پلی ساکاریدی کامل از تخمیر گونه ای پسودوموناس) (Kang *et all*., 1982) ژله‌ای می‌شوند. مقدار مورد استفاده ژل رایت در محیط کشت در لیتر کم‌تر است (George, 1993). برخی گیاهان چوبی در محیط کشت حاوی ژل رایت بهتر رشد می‌کنند (Williams, 1987). آگار معمول‌ترین ماده ژل مانند است که برای تهیه محیط‌های کشت جامد نیمه جامد به کارگرفته می‌شوند. آگار واکنشی با مواد تشکیل دهنده محیط کشت نداشته و توسط آنزیم‌های گیاهی جذب نمی‌شوند. سفتی ژل آگار بستگی به غلظت و نوع آگاری که در محیط کشت به کار رفته و نیز pH محیط کشت دارد. غلظت‌هایی از آگار که به طور معمول در محیط‌های کشت یاخته به کار می‌رود بین ۰/۵ تا ۱ درصد است (کنت تورز، ۱۳۸۶). غلظت زیاد آگار باعث کاهش نرخ باززایی در گیاهان می‌شود (Deberg, 2000).

۱-۸-۵- موادمعدنی غذایی

مواد معدنی (میکرو و ماکرو) ترکیبات مهم در محیط کشت هستند اما متداول‌ترین محیط کشت برای اکثر گیاهان محیط موراشیک واسکوگ است زیرا به آن پاسخ بسیار مناسبی می‌دهند و حاوی همه مواد غذایی ضروری برای رشد گیاه است (Prakash, 2005). این محیط کشت نمک بالاتری نسبت به فرمولاسیون دیگر محیط‌های کشت دارد. سطح پتاسیم، نیتروژن و برخی از عناصر میکرو مخصوصا

بور و منگنز در آن بالا است (Cohen, 1995). به این علت معمولا فرمولاسیون رقیق‌تر آن را استفاده می‌کنند مثلا جهت ریشه‌زایی بهتر، غلظت نمک بالا مانع رشد ریشه است حتی زمانی که اکسین‌ها در محیط کشت موجود باشند. بعد از قند، مواد معدنی مهم‌ترین گروه مواد غذایی در رشد درون شیشه‌ای هستند. معمولا از محلول آلی غلیظ ذخیره برای ساختن محیط کشت استفاده می‌شود. انتخاب مخلوط نمک‌های پر مصرف و کم مصرف شدیدا به گیاه مورد مطالعه بستگی دارد. کاربرد محیط کشت (Murashige, 1962) به دلیل این‌که بسیاری از گیاهان به آن عکس العمل مناسبی نشان می‌دهند متداول است.

به طور کلی محیط کشت از بخشی یا تمام موارد زیر تشکیل شده است :

عناصر پر مصرف : عناصر پر مصرف در بر گیرنده شش عنصر اصلی (N، P، Ca، Mg و S) می‌باشد که برای کشت بافت و یاخته گیاهی مورد نیاز است. غلظت بهینه برای دست‌یابی به میزان رشد حداکثر به میزان زیاد بین گونه های گیاهی متفاوت است. محیط کشت برای رشد کافی سلول حداقل دارای ۲۵ تا ۶۰ میلی مول نیتروژن معدنی است. پتاسیم به غلظت ۲۰ تا ۳۰ میلی مول و فسفر، منیزیوم، گوگرد و کلسیم ۱ تا ۳ گرم بر لیتر است.

عناصر کم مصرف : این عناصر برای کشت بافت و یاخته گیاهی شامل (Mo، Cu، Zn ,B، Mn، Fe) می‌باشند. مس و کبالت در حالت عادی به غلظت ۰/۱ میکرومول، مولیبدن با غلظت ۱ میکرومول، ید با ۵ میکرومول، روی ۵ تا ۳۰ میکرومول، منگنز ۲۰ تا ۹۰ میکرومول و عنصر بور ۲۵ تا ۱۰۰ میکرومول در محیط کشت به کار می‌رود. در حالت عادی، برای تهیه محیط کشت شکل‌های کلات آهن و روی مورد استفاده قرار می‌گیرد. آهن ممکن است مهم‌ترین عنصر کم مصرف باشد. سیترات آهن نیز ممکن است در محیط کشت به کار روند، اما این ترکیبات به سختی در آب حل می‌شوند و معمولا پس از تهیه محیط کشت رسوب می‌کند. موراشیگ و اسکوگ با به کارگیری کلات آهنی به نام اتیلن دی امین ترا استیک (EDTA) این مشکل را برطرف کردند (Epstein, ؛ George *et all*., 2008

2005). امکان افزودن کبالت و ید به برخی از محیط‌های کشت وجود دارد اما نیاز مبرم به این عناصر برای رشد یاخته گیاهی ثابت نشده است.

۱-۸-۶- اسیدآمینه و سایر افزودنی‌های نیتروژن‌دار

با آن‌که سلول‌های کشت شده به طور عادی قادر به سنتز تمام اسید آمینه‌های ضروری هستند. افزودن برخی اسیدآمینه‌ها به ویژه برای کشت‌های یاخته ای و پروتوپلاست اهمیت دارد. معمول‌ترین منابع نیتروژن آلی که در محیط‌های کشت بافت کاربرد دارند آمیزه‌های اسیدآمینه مانند کازوئین هیدرولیز شده، ال-گلوتامین، ال-آسپاراژین و آدنین است. کازوئین هیدرولیز شده به طور کلی در غلظت های بین ۰/۵ تا ۰/۱ درصد بکار می‌رود. استفاده از اسیدهای آمینه به تنهایی می‌تواند اثر بازدارندگی در رشد داشته باشد.

۱-۸-۷- انواع تنظیم کننده‌های رشدگیاهی

تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ترکیبات آلی هستند که به صورت طبیعی در گیاهان آلی سنتز می‌شوند که روی رشد و نمو اثرگذارند. این ترکیبات در غلظت‌های بسیارکم در یکی از اندام‌های موجود زنده ساخته می‌شوند و پس از انتقال به اندام‌های دیگر آن، اثر فیزیولوژیکی مشخصی را بجا می‌گذارند. این مفهوم اولین بار توسط ژولیوس وان ساچز، پدر فیزیولوژی گیاهی در نیمه دوم سال ۱۹ ارائه شد (Pierik, 1997). انواع تنظیم کننده‌های رشدی عبارتند از اکسین‌ها، سیتوکنین‌ها، جیبرلیک اسیدها، اتیلن و آبسیزیک اسیدها (Auxins، Cytokinins، Gibberellins، Ethylene و Abscisic acid)

اکسین‌ها

اکسین واژه کلی برای گروهی از تنظیم کننده‌های رشد است که طویل شدن سلول‌ها را تحریک می‌کند. علاوه بر رشد طولی، اکسین‌ها در رشد جوانه جانبی، تشکیل ریشه‌های نابجا و ممانعت از تشکیل ساقه‌های نابجا و جانبی می‌گردد و در رشد میوه، تعیین جنسیت، ریزش برگ و میوه و تولید اتیلن نقش دارند. اکثر گیاهان برای باززایی موثر ریشه، به اکسین نیازمندند. در غلظت‌های پایین اکسین، تشکیل ریشه‌های نابجا تحریک شده و در حالی‌که در غلظت‌های بالاتر کالوس زایی تحریک می‌گردد. از مهم‌ترین اکسین‌هایی که به میزان زیادی در کشت بافت استفاده می‌شود ایندول بوتیریک اسید (IBA) می باشد. از دیگر اکسین های رایج می‌توان از ایندول استیک اسید (IAA) و نفتالین استیک اسید (NAA) و نیز۲ و ۴ دی کلروفنوکسی استیک اسید برای القای کالوس زایی و از NAA، IBA و IAA برای ریشه‌زایی استفاده می‌گردد (George, 1993؛ Pierik, 1997). (Khosh-khui *et all*., 1982c) گزارش کردند که بهترین تیمار ریشه‌زایی NAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و IAA یا IBA با غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر مناسب است. بیش‌ترین اثر NAA در ریشه‌زایی (۰/۱تا ۲ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با IAA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر است.

سیتوکنین‌ها

در بین تنظیم کننده‌های رشد گیاهی سیتوکنین‌ها مهم‌ترین فاکتور تاثیرگذار را در باززایی ساقه و همچنین در تغییرات هیستولوژیکی مربوط به بافت‌ها نقش دارند (Magyar *et all*., 2010). این تنظیم کننده رشدی به دلیل شباهت ساختاری بامولکول DNA الگوی بیان ژن‌ها را در جهت اندام‌زایی تغییر می‌دهد. فناوری کشت بافت و سلول گیاهی در دومین انقلاب سبز، که بر اساس تغییر ژن و دست‌ورزی ژنتیکی برای بهبود کیفیت و کمیت محصولات پایه گذاری شد، نقش کلیدی داشت. سیتوکنین‌ها در تقسیمات سلولی و تمایز یابی سلول‌ها و ریخت زایی (MacGaw, 1995؛ Howell *et*

all., 2003) و همچنین در فرآیندهای نمویی و فیزیولوژیکی (Heyl *et all*., 2003 ؛ Ferreira, 2005؛Van Staden, 2008؛ Hashemabadi, 2010) کاربرد موثر دارند. کینتین، بنزیل آدنین (BA)، زآتین، ۲-ایزوپنتیل آدنین (ip2) و TDZ از پرمصرف‌ترین سیتوکینین‌هایی هستند که در محیط های کشت گیاهی به کار می‌روند (Pierik, 1997) و غالباً برای تحریک رشد و نمو کاربرد دارند. سیتوکینین‌ها در غلظت کم (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) باعث تولید کالوس و در غلظت‌های بیش‌تر (۱ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر)، ساقه‌زایی را تحریک می‌نمایند (Durkovic *et all*., 2008).

اسید جیبرلیک

این گروه شامل حدود ۶۰ ترکیب است که GA رایج ترین آن‌ها در گیاهان است. اسید جیبرلیک به ندرت در کشت بافت استفاده می‌شود (Razdan, 1993). نقش اسید جیبرلیک عموماً در تحریک جوانه زنی بذر و شکستن خواب بذر و همچنین تحریک رشد طولی میانگره‌ها است (Pierik, 1997؛Chaturvedi *et all*., 2004 ؛ Shahzad *et all*., 2007 ؛Parveen *et all*., 2010 ؛ Balaraju *et all*., 2011). افزودن اسید جیبرلیک به محیط‌های کشت برای ترغیب رشد در کشت‌های یاخته ای کم تراکم و افزایش رشد کالوس (Murashige, 1964؛ Mehra, 1972) و طویل کردن گیاهک‌های کوتاه مانده است (Toress, 1986).

آبسیزیک اسید

افزودن ابسیزیک اسید عموما به محیط کشت برای ممانعت از رشد کالوس بر حسب گونه گیاهی یا ترغیب آن (Isikawa, 1974 ؛ Sankhla *et all*., 1986؛Altman, 1971؛ Anagnostakis, 1974)، افزایش پرآوری شاخساره یا جوانه (Heide., 1968) و جلوگیری از مراحل آخر نمو رویان است (Tisserat, 1977 ؛Fujimura, 1975).

۱-۸-۸- زغال فعال

منظور از زغال فعال کربنی است که ظرفیت بالایی برای جذب مواد دارد. اثر زغال فعال روی محیط کشت به نوع زغال، میزان فعالیت آن و گونه گیاهی کشت شده بستگی دارد. افزودن زغال به محیط کشت می‌تواند تاثیر مثبت و یا منفی روی رشد گیاه داشته باشد که برحسب نوع محیط کشت و ریزنمونه متفاوت است. زغال فعال می‌تواند اتیلن، فنل، ناخالصی‌های آگار و اجزای محیط کشت مانند ویتامین‌ها، اکسین‌ها، سیتوکنین‌ها و سایر مواد آلی را جذب کند. اثر زغال فعال روی ریخت زایی به طور عمده به دلیل جذب مواد بازدارنده از محیط کشت و در نتیجه کاهش مواد سمی، رها سازی مواد مفید برای رشد، تغییر pH محیط به یک سطح مطلوب و تیره کردن محیط کشت است. افزودن غلظت زغال فعال، به محیط کشت بین ۰/۲تا ۳ درصد وزن به حجم توصیه می‌شود (Budavari, 1996؛ Mattson *et all*., 1971؛ Owen *et all*., 1991؛ Dumas, 1995؛ Teixeria *et all*., 1994؛ Pan., 1998).

۱-۸-۹- pH

بعد از درست کردن محیط کشت و قبل از اتوکلاو کردن محیط کشت بایستی pH آن گرفته شود. درباره اثر pH محیط کشت روی رشد درون شیشه‌ای، اطلاعات کمی وجود دارد به نظر می‌رسد pH در محدوده ۵ تا ۶/۵ برای رشد مناسب باشد؛ زیرا pH های پایین‌تر (کم تر از ۴/۵) و pH های بالاتر (بالاتراز ۷) باعث توقف رشد و نمو می‌شود. اگر pH اولیه بین ۵ تا ۷ باشد معمولا حدود ۰/۳تا ۰/۵ واحد پایین می‌آید. اگر pH از ۶ بالاتر برود ممکن است محیط کشت بسیار سفت شود و اگر کم‌تر از ۵/۵ باشد مشکلات ژله ای شدن محیط کشت را خواهیم داشت (Williams, 1987، Kartha *et all*., 1981؛ Parliman, 1982). بهترین نتیجه باززایی ساقه در pH با ۵/۸ است (Rabert *et all*., 1986؛ Wang *et all*., 2005).

۱-۹- تاثیر تنظیم کننده های رشد درانواع باززایی گیاهان در کشت بافت

(Miller *et all*., 1953) اولین کسانی بودند که گزارش کردند نسبت اکسین به سیتوکنین نوع و میزان اندام‌زایی را در کشت‌های یاخته گیاهی تعیین می‌کند. به طور کلی افزوده شدن سیتوکنین‌ها به محیط کشت برای ترغیب تقسیم یاخته ای، موجب تشکیل شاخساره و پرآوری شاخساره جانبی شدن و از تشکیل ریشه پیشگیری نمودن است. آغازیدن ریشه در گیاهچه‌ها و جنین زایی و آغازیدن کالوس همگی در صورت زیاد بودن نسبت اکسین به سیتوکنین‌ها است. رشد وریخت‌زایی از طریق اثرات متقابل و بالانس بین تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت و همچنین مواد رشدی تولید شده درونی گیاه تنظیم می‌شود (George, 1993؛ Leyser *et all*., 1996؛Sugiyama, 1999). بالانس بین اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها منجر به تشکیل ریشه و یا ساقه نابجا می‌گردد (Taiz, 1991 ؛ Tiwari *et all*., 2002؛ Shirin *et all*., 2005). سطح بالای اکسین نسبت به سیتوکنین منجر به تشکیل ریشه (فاز۴) و بر عکس نسبت بالای سیتوکنین‌ها منجر به ایجاد ساقه‌های نابجا (فاز ۳) می‌شود (Torres, 2004).

۱-۹-۱- باززایی غیر مستقیم (کالوس دهی) و سپس ساقه‌زایی

اکسین با تاثیر بر حجیم شدن و تقسیم سلولی سبب کالوس‌زایی می‌شود. میزان مصرف اکسین در کشت بافت جهت کالوس زایی اغلب در دامنه ۰/۰۱ تا۱۰ میلی‌گرم در لیتر است. اکسین‌های مصنوعی 2,4-D و NAA به دلیل صرفه اقتصادی و همچنین دوام در برابر گرما و شرایط اتوکلاو بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. اثر اولیه سیتوکنین در سلول تحریک تقسیم سلولی است. سیتوکنین به تنهایی قادر به تحریک تقسیم سلولی نیست و به اکسین نیاز دارد. سیتوکنین علاوه بر کالوس‌زایی در مرحله باززایی نیز نقش دارد. کینتین یک سیتوکنین طبیعی و فعال در حالی که بنزیل آمینوپورین یک

سیتوکنین مصنوعی، پایدار در حرارت بالا و دارای بیش‌ترین کاربرد در کشت بافت گیاهی است. اغلب در دامنه غلظت ۰/۰۱ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده می‌شود و غلظت‌های بیش‌تر آن القا کننده مرگ برنامه ریزی شده سلول است (Davis, 2004 ؛Mineo, 1990). در این نوع باززایی ابتدا کالوس و سپس ساقه‌ها از توده کالوس به وجود می‌آیند.

۱-۹-۲- باززایی مستقیم (ساقه زایی)

در باززایی مستقیم، بدون ایجاد توده کالوس، ساقه‌ها از بافت به وجود می‌آیند. در این مورد سیتوکنین ها نقش اساسی را ایفا می کنند و به طور کلی اکسین‌ها مانع ساقه‌زایی می شوند (Miller *et all*., 1953؛ Parliman, 1986؛Paulet, 1965). تشکیل ساقه‌ها در باغبانی، برای تعدادی از گیاهان استفاده می شود. برخی گیاهان هستند که برای تشکیل ساقه، نیاز به اکسین برون زا دارند مانند سوسن (Aartrijic, 1984). در برخی گیاهان مانند انگشتانه به نظر می‌رسد که غلظت بالای سیتوکنین و غلظت پایین اکسین برای تشکیل ساقه ضروری است (Dolfus, 1969).

فصل دوم

مروری بر مطالعات پیشین

تا کنون گزارش های کمی در مورد باززایی (مستقیم و غیر مستقیم) و به طور کلی کشت بافت گیاه شمعدانی اژدر داده شده است. در این فصل گزارش های باززایی مستقیم و غیر مستقیم و همچنین گزارش‌هایی فقط در مورد تحریک کالوس در مورد انواع گونه‌های شمعدانی آمده است.

Katagi *et all*., 1986

بیش‌ترین تولید نوساقه را در محیط کشت LS حاوی ترکیب تیماری BA با غلظت ۰/۲۳ میلی‌گرم در لیتر به همراه IAA با غلظت ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر بدست آوردند.

Dunbar *et all*., 1989

ریزنمونه‌های برگ شمعدانی هیبریدی را در محیط کشت MS محتوی غلظت‌های متفاوت از اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها کشت کردند که مطلوب‌ترین ترکیب تیماری BA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر به همراه NAA با همین سطح انتخاب شد که حاصل آن تولید ۲ تا ۵۰ پریموردیای ساقه بود.

Qureshi *et all*., 1992

در آزمایش اول بذرهای ده رقم شمعدانی در محیطهای کشت MS حاوی سطوح متفاوتی از غلظت-های از تنظیم کننده رشدی BA کشت داده شدند. در بررسی اثر BA روی جوانه زنی مشخص شد که ۴ رقم حضور BA و یا نبود آن فرقی نمی‌کند اما در رقم‌های دیگر پاسخ به آن از ۱۳/۳ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود. در همین آزمایش مشخص گردید که بعداز جوانه زنی، این تنظیم کننده رشدی تنها در یک سطح (۲۰میکرومولار) و تنها در یک رقم باعث تولید ۲۴/۳ ساقه نابجا شده است. در آزمایش دوم ۴ رقم جهت بررسی تولید ساقه نابجا در محیط‌های کشت حاوی ترکیبی از دو تنظیم کننده رشدی، BA در غلظت‌های متفاوت و IAA تنها در یک غلظت انتخاب شدند که بهترین پاسخ در ترکیب تیماری BA و IAA با غلظت ۲۰ میکرومولار بود و در نتیجه آن تنها یک رقم در این ترکیب تیماری بیش‌ترین تعداد ساقه (۲۰/۴) را تولید نمود. در آزمایش سوم دو رقم جهت بررسی اثر تنظیم کننده رشدی TDZ در تولید ساقه نابجا بررسی شد. ۴ غلظت از این تنظیم کننده در محیط های کشت به کار رفت مناسب‌ترین غلظت برای یکی از رقم‌ها ۱ میکرومولار بود که بیش‌ترین تعداد

ساقه تولیدی (۱۳-۱۹) در این محیط کشت بدست آمد و در رقم دیگر بهترین غلظت ۲ میکرومولار از این تنظیم کننده رشدی بود و سبب تولید ۱۱-۱۹ ساقه شد. در هر سه آزمایش محیط‌های کشت حاوی ترکیب‌های تیماری برای ده روز در رژیم تاریکی قرار گرفتند و در نهایت به نور انتقال یافتند.

Desilets *et all*., 1993

آن‌ها به کشت ریزنمونه‌های نوک ساقه شمعدانی *Pelargonium* × *hortorum* در محیط کشت‌های مختلف جهت بررسی باززایی ساقه در شرایط درون شیشه ای پرداختند. محیط کشت MS و Macro ۱/۲salts با غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (BA و NAA) استفاده شد. بهترین نتایج برای این منظور محیط کشت زیر است :

½ Macro salts + 0/02 mg NAA + 0/024mg BA

گیاهان باززا شده به‌راحتی در محیط ½ MS ریشه‌دار شدند.

Rao, 1994

در این تحقیق ریزنمونه برگ شمعدانی عطری *P.graveolens* در محیط کشت MS حاوی سیتوکنین Kin با غلظت‌های متفاوت و اکسین‌های مختلف جهت تحریک کالوس کشت شدند. نتایج این‌طور نشان داد که محیط کشت MS حاوی هورمون D-۲,۴ با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و Kin با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بیش‌ترین درصد تشکیل کالوس (۶۵ درصد) بدست آمد. در مرحله بعد جهت ساقه‌زایی اثر سیتوکنین‌های مختلف بررسی شد و بهترین تیمار، محیط کشت کامل شده با 2- ip با غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر بود که ۷۰/۷ درصد ساقه زایی را نشان داد و تعداد ساقه در این محیط کشت ۱۴ بود. در آزمایش دیگر جهت بررسی تاثیر آدنین سولفات در تشکیل ساقه، به بهترین محیط تیمار حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر 2 ip؛ آدنین سولفات با غلظت‌های متفاوت اضافه شد و بهترین غلظت ۱۴/۶میلی‌گرم در لیتر بود که بیش‌ترین درصد تشکیل ساقه ۸۵/۲ و بالاترین تعداد ساقه ۱۲/۶ به‌دست آمد.

Saxena *et all*., 2000

برای باززایی مستقیم شمعدانی عطری rose scented *Pelargonium* از ریزنمونه‌های تک گره و برگ در آزمایش مورد نظر استفاده کردند. این ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف Kin و NAA کشت شدند. بهترین تیمار برای ریزنمونه گره محیط کشتی با ۸ میلی‌گرم در لیتر Kin به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بود که تعداد ساقه بدست آمده در هر ریزنمونه ۱۰/۸ بود و بهترین نتیجه برای برگ، محیط کشت ۵ میلی‌گرم در لیتر Kin با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بود و در نتیجه آن تعداد ساقه بدست آمده در هر برگ ۴۴/۲ بدست آمد. در آزمایشی دیگر جهت انجام باززایی غیر مستقیم برای کشت‌های کالوس، محیط کشت MS با غلظت های متفاوت از BAP و ۰/۱میلی‌گرم در لیتر NAA ، به کاربرده شد و تعداد ساقه در گرم کالوس ۳۳/۶ حاصل شد.

Wojtania, 2001

اثر دو سیتوکنین BAP و m-Topolin را به تنهایی و یا در ترکیب با آمینواسید گلایسین در شمعدانی *P.×hortorum* و *P.×hederaefolium* بررسی کردند و بیش‌ترین تعداد ساقه ۴/۸ در محیط کشت حاوی سیتوکنین m-Topolin با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر با حضور آمینواسید بدست آمد. سیتوکنین m-Topolin کیفیت ساقه‌ها را در هر دو ژنوتیپ بالا برد یعنی ساقه‌ها به خوبی نمو یافته و برگ‌ها سبز رنگ بودند. افزودن آمینواسید به محیط کشت، تعداد ساقه تولید شده را افزایش داد و همچنین روی کیفیت ساقه‌ها و یک شکل بودن آن‌ها تاثیرگذار بوده و روند پیری ساقه-ها را به تاخیر انداخت.

Gupta *et all*., 2002

در این گزارش چندین رقم شمعدانی عطری استفاده شد. به طوری که در این بررسی ریزنمونه‌های برگ و تک‌گره رقم‌های, *P.graveolens* cv Bipuli, Kunti , Hemanti در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های متفاوت از هورمون‌های BA و NAA به همراه ماده آدنین سولفات (ADS) در دو غلظت کشت شدند و باززایی مستقیم ساقه در هر دو ریزنمونه رخ داد و بهترین محیط باززایی هم برای گره و برگ برای تمام رقم‌ها محیط MS با ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و NAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در

لیتر به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر آدنین سولفات بود. تعداد ساقه برای رقم Kunti از ریزنمونه برگ ۲۸/۴ و باززایی ۸۵ درصد و در ریزنمونه گره، تعداد ساقه ۲۱/۸و ۲۱ و باززایی ۸۶ درصد بود. در رقم Hemanti تعداد ساقه ۳۶/۶ و باززایی ۹۲ درصد در ریزنمونه برگ و همچنین در ریزنمونه گره تعداد ساقه ۳۰ و باززایی ۸۵ درصد شد. در رقم Bipuli ریزنمونه برگ دارای ۵/۲۶ تعداد ساقه ۲۶/۵ و باززایی ۸۹ درصد و در ریزنمونه گره تعداد ساقه ۱۷/۸و باززایی ۸۶ درصد بود. جهت القای ریشه‌زایی دو اکسین NAA و IBA با غلظت‌های متفاوت استفاده شدند و بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی (۹۲ درصد) در رقم Hemanti و تعداد ریشه (۱۲/۵) در هر ریزنمونه بدست آمد. در رقم Bipuli بیش‌ترین درصدریشه‌زایی (۸۸ درصد) و تعداد ریشه (۹/۷) در محیط کشت با ۰/۱میلی‌گرم در لیتر NAA و همچنین در رقم Kunti، درصد ساقه‌زایی (۸۸ درصد) و تعداد ساقه (۸) در هر ریزنمونه حاصل گشت..

Xie *et all*., 2004

آن‌ها ریزنمونه‌های برگ و ساقه شمعدانی عطری *Lemon Scented Granium* را روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های متفاوت از تنظیم کننده‌های رشدکشت کردند. نتایج نشان داد که ریزنمونه ساقه نسبت به ریزنمونه برگ بهتر واکنش می‌دهد و فرآیند تمایزیابی در آن بیش‌تر است. محیط مناسب برای باززایی، محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و NAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و در نهایت بهترین محیط کشت برای ریشه‌زایی ۱/۲MS بود.

Negi et all., 2004

در شمعدانی عطری بالاترین میزان باززایی ساقه و تعداد ساقه (۳۴) در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و آدنین سولفات با غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر از ریزنمونه‌های گره بدست آمد.

Hassanein *et all*., 2005

در این گزارش به باززایی ساقه‌های نابجا از دیسک‌های برگی (ریزنمونه) گونه‌های شمعدانی با نام‌های *Pelargonium ×hortorum* و دو نوع شمعدانی معطر *P.graveolens* و*P. Capatatum* پرداخته شد. طی این بررسی دیسک‌های برگی در محیط‌های کشت MS حاوی BA و Zeatin با ترکیبی از

اکسین‌های مختلف کشت شد و نتایج نشان داد که باززایی مستقیم ساقه (direct shoot regeneration) از ریزنمونه های دیسک برگ *P. capitatum*، ۱۰۰ درصد بود. بهترین محیط کشت برای این نوع شمعدانی محیط ۱/۲MS حاوی هورمون NAA با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با هورمون BA با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر به همراه ۱ میلی گرم در لیتر Zeatin در شرایط تاریکی بود که بعد از ۴ هفته ۱۱/۴ساقه بدست آمد. در شمعدانی *P. graveolens* نیز باززایی مستقیم ساقه در تمام ریزنمونه های دیسک برگی قرارگرفته در محیط کشت و شرایط رشدی مشابه رخ داد که تعداد ۷/۳ ساقه در هر ریزنمونه حاصل شد. شمعدانی *P. × hortorum* باززایی ساقه ۱۰۰درصد بود و بهترین محیط رشدی برای آن محیط کشت MS به همراه ۰/۲میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA در ترکیب با ۰/۵میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و هورمون Zeatin بود که تعداد ۸/۸ ساقه در هر ریزنمونه در شرایط تاریکی بدست آمد و همچنین در شرایط نور کم نیز در محیط کشت حاوی۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با BA و Zeatin با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر تعداد ۷/۵ ساقه در هر ریزنمونه برای این رقم حاصل شد.

Jinsong *et all*., 2007

آن‌ها پروتوکل جدیدی را در رابطه با باززایی ساقه در مورد شمعدانی مسکویت *P.×citrosum* ارائه دادند. در این پروژه آن‌ها از ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ جوان استفاده کردند. مطالعات آن‌ها نشان دادکه تنظیم کننده‌های BA و TDZ و Kin برخلاف دو تنظیم کننده دیگر NAA و D-۲,۴ درتحریک تولید ساقه‌های نابجا موثرند. این نشان داد که این سیتوکنین‌ها نقش مهمی در تحریک ساقه‌زایی این هیبرید مسکویت دارد.

Ghanem *et all*., 2008

طی این گزارش، ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ شمعدانی عطری *P.graveolens* روی محیط کشت LS حاوی ۱میلی‌گرم در لیتر NAA و غلظت‌های متفاوت BA کشت شدند. بهترین نتیجه برای باززایی مستقیم ساقه برای هر دو ریزنمونه، محیط حاوی ۱میلی‌گرم در لیتر NAA و ۵ میلی‌گرم در لیتر BA

در انتهای ۵ هفته از کشت بود. نتایج نشان داد که در مرحله پرآوری ساقه ، بیش‌ترین تعداد ساقه ۳۲ برای ریزنمونه برگ و در مقابل برای ریزنمونه دم‌برگ ۳۳/۲۶ بدست آمد. همین محیط برای طویل شدن ساقه‌های باززا شده استفاده گشت. ریشه‌زایی در محیط کشت LS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و یا NAA انجام شد. بیش‌ترین تعداد ریشه (۱۵) بود.

Sukhmpinij *et all*., 2010

ریزنمونه برگ شمعدانی *Pelargonium× rapaceum* (L.) L'Hérit را در محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده های رشد BA و NAA با غلظت‌های متغیر در دو شرایط مجزا تاریکی و نور قرار دادند. بهترین محیط کشت جهت پرآوری ساقه از ریزنمونه برگ بالغ شمعدانی، محیط MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA و NAA بود که بالاترین تعداد ساقه (۱۷/۶) از این تیمار بدست آمد زمانی که به مدت یک‌ماه در شرایط تاریکی قرار داده شده بودند. جهت ریشه‌زایی هورمون NAA با غلظت‌های مختلف در محیط به کار برده شد که بهترین محیط ریشه‌زایی محیط حاوی NAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بود.

Yi *et all*., 2010

نشان دادند که محیط کشت MS محتوی ۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA باعث تولید نوساقه گشت و محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بهترین محیط برای ریشه‌دارکردن شمعدانی عطری *P.graveolens* است. Moyo *et all*., 2012

ریزازدیادی در شرایط درون شیشه‌ای درگونه دیگری از شمعدانی *Pelargonium sidoides* را انجام دادند. ریزنمونه مورد نظر در این‌کار تحقیقاتی دم‌برگ بود. به این صورت که ریزنمونه مورد نظر در محیط کشت MS همراه با سیتوکنین‌های BAP، Kin، mT، mTR، MemTR با غلظت‌های متفاوت کشت شدند و نتایج این‌گونه نشان داد که بهترین محیط کشت جهت تحریک ساقه‌زایی حاوی تنظیم کننده رشدی MemTR با غلظت ۵ میکرومولار بود که حاصل آن تولید ۱۸/۷ ساقه شد. درحالی‌که محیط کشت محتوی سیتوکنین BAP در غلظت ۱میلی‌گرم تعداد ساقه (۹/۵) بدست آمد. در محیط

کشت MS کامل شده با هورمون Kin در غلظت‌های ۰/۲میلی‌گرم در لیتر و ۲ میلی‌گرم در لیتر ساقه‌زایی (۱۰۰درصد) حاصل شد. اما تعداد ساقه در محیط کشت با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر تعداد ساقه (۲/۵) و در محیط کشت با ۲ میلی‌گرم درلیتر Kin تعداد ساقه (۴/۱) بدست آمد.

Arshad *et all*., 2012

آن‌ها از اندام‌زایی ساقه دو رقم شمعدانی *Pelargonium capitatum* به نام های ' Atomic Snowflake', و Attar گزارشی دادند که طبق آن ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم کننده های رشد گیاهی سیتوکنین‌های BA،TDZ و اکسین NAA کشت شد. کشت ها به مدت دو هفته در تاریکی قرار گرفت سپس به روشنایی انتقال یافت. بهترین تیمار برای هر دو رقم محیط کشت زیر بود :

MS+ 1mg BA +1 mg NAA 2+mg TDZ MS

انتخاب شده بود. به طوری که درصد باززایی ساقه در رقم Atomic، ۹۳ درصد و در رقم دیگر ۹۳/۵ حاصل گشت. تعداد ساقه در ریزنمونه در رقم Atomic ۱۰۳/۲ و برای رقم Attar ۱۰۲/۸ بدست آمد. سپس گیاهان باززا شده به محیط کشت MS ۱/۲ با سه غلظت از تنظیم کننده رشد گیاهی IAA انتقال یافتند و بهترین نتیجه در غلظت ۱/۵میلی‌گرم در لیتر بدست آمد.

Be nazir *et all*., 2013

در این آزمایش، ریزنمونه برگ شمعدانی *Pelargonium graveolens* در محیط کشتMS با غلظت‌های متفاوت از تنظیم کننده رشد (IAA، IBA، BAP، kinetin، 2,4-D) برای کالوس‌زایی به مدت ۱۷ روز قرار گرفتند. بهترین تیمارها برای این هدف، محیط کشت MS حاوی ۲/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP با ۴ میلی‌گرم در لیتر IBA و همچنین محیطی با ۲/۱۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۴ میلی‌گرم در لیتر IBA بود.

2/25mg BAP +4mg IBA MS1

2/15mg Kin + 4mg IBA MS2

برای مرحله پرآوری ساقه از کالوس نیز همان ترکیبات هورمونی استفاده شد که بهترین نتایج به صورت زیر است :

MS+ 1/74mg IAA + 2/15 mg Kin

MS +2/25mg BAP +4mg IBA

MS +15/2mg Kin + 4mg IBA

در مرحله بعد از گیاهان باززا شده از کالوس نمونه برگ گرفته و در محیط کشت حاوی غلظت‌های متغیر از سیتوکنین‌ها و اکسین‌ها قرار دادند. دو هفته بعد از کشت، باززایی مستقیم ساقه صورت گرفت و بهترین نتایج به صورت زیر بدست آمد :

محیط کشت MS با ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA با ۲/۱۵ میلی‌گرم در لیتر Kin

محیط کشت MS با ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP با ۴/۳ میلی‌گرم در لیتر Kin

محیط کشت MS با ۰/۸۷میلی‌گرم در لیتر IAA با ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP

محیط کشت MS با ۴ میلی‌گرم در لیتر IAA با ۴/۳ میلی‌گرم در لیتر Kin

محیط کشت MS با ۱/۷ میلی‌گرم در لیتر IAA با ۲/۱۵ میلی‌گرم در لیتر Kin

Zuraida, 2013

گره، نوک ساقه، ساقه جانبی و دمبرگ شمعدانی *Pelargonium radula* در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های متفاوت BAP و IBA کشت شدند. طبق نتایج حاصل از مرحله آغازش ساقه، بهترین ریزنمونه، گره در محیط کشت حاوی BAP با ۳ میلی‌گرم در لیتر بود که در نتیجه آن، تعداد ساقه در ریزنمونه ۹ ساقه بدست آمد. در مرحله پرآوری ساقه در واکشت دوم، ساقه‌های آغازش یافته در مرحله پیش، به محیط کشت MS حاوی غلظت‌های متفاوت BAP، IBA، GA3 و IAA انتقال یافتند. بهترین نتیجه در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. درصد پرآوری ساقه در این محیط کشت ۹۵ درصد با تعداد ساقه ۲۲ بدست امدآمد.

Duchow *et all*., 2014

بذرهای شمعدانی *P. sidoides* بعد از ضدعفونی جهت جوانه‌زنی در پتری‌دیش‌های اتوکلاو شده قرارگرفتند. سپس ریزنمونه هیپوکوتیل از بذرهای جوانه زده گرفته شد و در محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد با هدف کالوس‌زایی قرارداده شدند. بهترین تیمار محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر ۲, ۴-D با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر Kin و یا محیط کشتی با ۱ میلی‌گرم در لیتر ۲, ۴-D به همراه ۲/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ بود. در نهایت این کالوس ها برای کشت سوسپانسیون مورد استفاده قرار گرفتند.

Rosy *et all*., 2015

در این گزارش ریزنمونه‌های تک گره و نوک ساقه (Shoot tip) شمعدانی عطری با نام علمی Pelargonium graveolens و P. roseum در محیط MS جهت باززایی ساقه کشت شدند :

محیط یک MS حاوی ۵ میلی‌گرم در لیترBAP و ۶۸/۳۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین سولفات و محیط دو MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر GA3 و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA بود.

محیط کشت یک نسبت به محیط کشت دو باززایی ساقه بهتر بود. محیط کشت دو گیاهان رشد ضعیفی داشتند. جهت چند ساقه شدن ساقه‌های بازا شده بعد از ۳۵ روز به محیط کشت محتوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA انتقال داده شدند که گیاهان پاسخ بسیار مناسبی به این محیط کشت دادند.

Zuraida, 2015

جهت تحریک کالوس، ریزنمونه ساقه شمعدانی *Pelargonium radula* را در محیط کشت MS به همراه غلظت‌های متفاوت (D-۲,۴) و (NAA) کشت کردند. بهترین محیط برای تحریک کالوس تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و NAA میلی‌گرم در لیتر بود که بیش‌ترین تشکیل کالوس ۹۲ درصد را نشان داد.

Hanus *et all*., 2015

آن‌ها به بررسی باززایی مستقیم دو رقم شمعدانی اژدر با نام‌های "Tip Top Duet" و " Black Knight" پرداختند. گره‌های استریل شده در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های متفاوت BAP و IAA و همچنین پپتون و آدنین کشت شدند. بهترین نتیجه برای هر دو رقم محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده BA با ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر BAP با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بدست آمد. برای رقم "Black Knight"، تعداد ساقه ۶۵ و در رقم دیگر ۸۲ محاسبه شد.

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳-۱- مشخصات آزمایش

این تحقیق با هدف بهینه‌سازی محیط کشت باززایی مستقیم دو رقم شمعدانی اژدر در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. قالب آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا" تصادفی با سه تکرار بود و این تحقیق طی سال های ۹۴ و ۹۵ در آزمایشگاه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود انجام گردید.

۳-۱-۱- مشخصات مواد گیاهی و ارقام مورد استفاده

ارقام مورد استفاده در این پژوهش متعلق به جنس *Pelargonium* × *domesticum* بود. دو رقم شمعدانی اژدر با نام‌های آریستو Aristo و برمودا Bermoda از شرکت Pac-Elns هلند تهیه شد. ریزنمونه‌های تک‌گره از گیاهان دو رقم گرفته شد. بعد از گذر از مرحله ضدعفونی در محیط MS کشت شدند.

۳-۱-۲- مواد شیمیایی

ساکارز و آگار و همچنین همه تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده در پژوهش از نمایندگی شرکت Sigma و نیز ویتامین و عناصر ماکرو و میکرو مورد نیاز برای ساخت محیط MS از نمایندگی Merck درایران خریداری شد.

۳-۲- تهیه محیط کشت

۳-۲-۱- محلول های ذخیره

به کارگیری محلول‌های ذخیره شمار عملیات تکراری در تهیه محیط کشت را کاهش می‌دهد و از این رو احتمال خطای انسانی یا آزمایشی را کم می‌کند. افزون بر این، توزین مستقیم اجزا تشکیل دهنده

محیط کشت مورد نیاز (مانند عناصرکم مصرف و تنظیم کننده‌های رشد) که در مقادیر میلی‌گرم یا میکروگرم در غلظت‌های نهایی نمی‌تواند با دقت کافی برای کارهای کشت بافت انجام شود. برای این مواد، تهیه محلول‌های ذخیره و در پی آن رقیق کردن آن‌ها در محیط کشت نهایی یک روش کار استاندارد است.

۳-۲-۱-۱- تهیه محلول‌های مادری نمک‌های پر مصرف (ماکرو) و کم‌مصرف (میکرو) محیط کشت MS

نمک‌های پر مصرف در غلظت‌های ۱۰ برابر نسبت به غلظت نهایی خود و همچنین نمک‌های کم مصرف ۱۰۰ برابر غلظت تهیه شدند. به این صورت که برای محلول مادری عناصر ماکرو، هر نمک را جداگانه وزن کرده (مطابق با جدول ۳-۱) و داخل بشر ریخته و در آب مقطر به‌راحتی حل می‌شوند. محلول مادری تهیه شده، برچسب زده شده که برچسب حاوی مشخصاتی چون تاریخ تهیه و همچنین غلظت است و در آخر در یخچال نگهداری شدند. محلول‌های ذخیره عناصر کم مصرف به طور معمول ۱۰۰ برابر غلظت نهایی محیط کشت ساخته می‌شوند. برای تهیه محلول مادری نمک‌های میکرو، مطابق (جدول ۳-۲) نمک‌های وزن شده را جداگانه در آب مقطر حل کرده و در پایان محتویات تمام بشرهای حاوی نمک‌ها را به بشر منتقل کرده و با افزودن آب مقطر به حجم رساندیم. بر روی محلول مادر برچسب زده و سپس در یخچال نگهداری می‌شود. محلول جداگانه ای برای نمک‌های کلسیم لازم بود تا از رسوب کردن پیش‌گیری شود. محلول عناصر پر مصرف را می‌توان به خوبی برای چندین هفته در جایگاهی تاریک و خنک نگهداری کرد.

جدول ۳-۱: غلظت نمک‌های پر مصرف محیط کشت MS(mg/l)

مقدار	نمک پر مصرف
۴۴۰	$CaCl_{2.}\,7\,H2\,O$
۱۶۵۰	$NH_4\,NO_3$
۱۷۰	$KH_2\,PO_4$
۳۷۰	$MgSO_4\,.\,7\,H_2\,O$
۱۹۰۰	KNO_3

جدول۳-۲ : غلظت نمک های کم مصرف محیط کشت MS(mg/l)

مقدار (میلی‌گرم)	نمک کم‌مصرف
۰/۰۲۵	$CuSO_4$
۸/۶	$ZnSO_{4.\,7\,H2\,O}$
۰/۸۳	KI
۰/۰۲۵	$CoCl_{2.\,6}\,H_2\,O$
۶/۲	$H_{3\,BO3}$
۰/۲۵	$NaMoO_4.\,2\,H_2\,O$
۲۲/۳	$MnSO_4$

۳-۲-۱-۲- تهیه محلول مادری آهن $Na_2EDTA.\,H_2O$ و $FeSO4.\,7H_2O$ محیط کشت MS

محلول مادری آهن با غلظت ۱۰۰ برابر درست می‌گردد. ابتدا $FeSo_4.\,7H_2o$ و $Na_2EDTA.H_2o$ را جداگانه وزن کرده (جدول۳-۳) و در آب مقطر حل نموده و در نهایت هر دو محلول را مخلوط کرده و به حجم می‌رسانیم. محلول تهیه شده باید با فویل آلومینیوم پوشیده شود و یا در شیشه تاریک نگهداری شود زیرا در برابر نورتجزیه می‌شود. در پایان محلول در یخچال قرار داده می‌شود.

جدول ۳-۳ : غلظت FeSO4. 7H2 O و Na2EDTA. H2 O در محیط کشت MS (mg/l)

نمک	مقدار (میلی‌گرم)
$FeSO_4. 7H_2O$	۲۷/۸
$Na_2EDTA. H_2O$	۳۷/۳

۳-۲-۱-۳- تهیه محلول مادری ویتامین ها و گلایسین محیط کشت MS

ویتامین‌ها را در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰برابر به صورت محلول ذخیره تهیه و در فریزر (دمای ۲۰- درجه سانتی گراد) تا هنگام مصرف نگهداری می‌کنند. مقادیر داده شده را در آب مقطر حل کرده (جدول ۳-۴) و در آخر به حجم نهایی رسانده شد. بعد از برچسب زدن در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

جدول ۳-۴ : غلظت ویتامین‌های محیط MS (mg/l)

ویتامین	غلظت (میلی‌گرم)
Tiamine. HCl	۰/۵
Nicotinic acid	۰/۵
Pyriodoxine.HCl	۰/۵
Glycine	۲

۳-۲-۱-۴- تهیه محلول‌های ذخیره تنظیم کننده‌های رشد

همه تنظیم کننده‌های رشد در آب محلول نیستند. میزان حلالیت مواد مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در جدول (۳-۵) آورده شده است. ترکیب مورد نظررا باید در مقدار کمی حلال (چند میلی‌لیتر) حل کرده و سپس به آرامی به آن آب اضافه کرده تا به حجم مورد نظر برسد.

جدول ۳-۵ : ترکیبات حلال تنظیم کننده‌های رشدگیاهی

تنظیم کننده رشد	حلال
BAP	1 N NaOH
KIN	1 N NaOH
IBA	1 N NaOH
IAA	1 N NaOH
NAA	Alcohl
TDZ	1N NaOH

۳-۲-۲- تهیه یک لیترمحیط کشت جامد

برای تهیه یک لیتر محیط کشت ابتدا مقداری آب مقطر (۷۰۰ میلی‌لیتر) در داخل ارلن ریخته شد. سپس ترکیبات مورد نیاز (عناصر ماکرو میکرو و ویتامین‌ها) افزوده شدند. پس از اضافه کردن ۳۰ گرم ساکارز و ۱۰۰ میلی‌گرم میواینوزیتول و همچنین تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (بسته به فیلتری یا قابیت اتوکلاوی بودن)، محلول به حجم نهایی رسانده شد. جهت تنظیم pH محیط کشت به ۵/۸ از NaOH وHCL یک نرمال استفاده شد. مقدار مصرف آگار برای یک لیتر محیط ۷ تا ۸ گرم است. که در این آزمایش، ۷ گرم آگار وزن شد و به محیط کشت افزوده شد. محیط کشت جهت استریل شدن در داخل اتوکلاو قرار گرفت. زمان لازم جهت استریل شدن محیط کشت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر بود. زمان لازم برای سترون کردن بستگی به حجم محیط کشت درون ظرف کشت دارد. مواد ناپایدار در برابر گرما باید با فیلتر سترون گردند و اتوکلاو نشوند. محلول‌های ذخیره مواد ناپایدار به گرما مانند تنظیم کننده رشدی TDZ، تهیه شده و سپس از یک فیلتر ۰/۲۲ یا ۰/۴۴ میکرومتر عبور داده می‌شود و در یک ظرف استریل نگهداری می‌گردد. در زیر هود، محلول استریل با یک پیپت استریل به محیط کشت اتوکلاو شده که دمای آن به ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسیده است افزوده می‌شود. بنابراین بعد از خنک شدن محیط کشت (دمای تقریبا ۵۰ درجه سانتی گراد) بسته به نوع تیمار، تنظیم کننده رشد فیلتری به محیط افزوده شده و در آخر

محیط کشت داخل ظروف کشت (پتری دیش‌ها برای باززایی مستقیم از برگ و دم‌برگ و شیشه‌های مربا جهت باززایی مستقیم از جوانه تک‌گره و همچنین برای مرحله ریشه‌زایی) توزیع شد. در پتری دیش‌ها و شیشه‌های مربا ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته شد. در نهایت پس از جامد شدن محیط کشت، ظروف در شرایط استریل نگهداری شدند.

۳-۳- ضدعفونی و آماده سازی مواد گیاهی

۳-۳-۱- ضد عفونی محیط و وسایل کار

اگر چه آماده سازی و قطع قلمه ها، قطعات کالوس و غیره در یک ظرف شیشه‌ای و یا در بین کاغذ فیلتر انجام می‌شود. ولی انجام کار در اتاقک تمیز که محفظه تلقیح نیز نامیده می‌شود، ضرورت دارد. بعد از ضدعفونی سطح داخلی هود با الکل، ابتدا تمام وسایل لازم و ظروف کشت در زیر هود قرارگرفت. لامپ ماورای بنفش با استفاده از تایمر به مدت یک ساعت به منظور استریل نمودن هود لامینار روشن شد. روشن کردن فن دستگاه به مدت ۲۰ دقیقه، قبل از شروع کار الزامی است. سپس دوباره سطح داخلی هود با پنبه آغشته به الکل استریل گشت. پنس و اسکالپل که از قبل اتوکلاو شده اند را در شیشه حاوی الکل ۹۶ درصد قرار داده شد و هنگام استفاده از آن‌ها بالای شعله گرفته و در نهایت قبل از برداشتن ریزنمونه باید تا خنکی آن‌ها صبرکرد در غیر این صورت ریزنمونه آسیب خواهد دید.

۳-۳-۲- ضدعفونی ریزنمونه‌های تک گره برای مرحله استقرار

گیاهان گلدانی شمعدانی اژدر با دو رقم آریستو و برمودا برای چندین ماه در شرایط گلخانه پرورش یافته بودند گیاهان از نظر آسیب‌های آفات و همچنین بیماری‌های درونی گیاه، در سلامت کامل بودند. این گیاهان به عنوان گیاهان مادر نام برده می‌شوند. ساقه حاوی چندین گره (گره به قسمتی از

گیاه گفته می‌شود که برگ از آنجا رویش می‌نماید) با استفاده از تیغ اسکالپل بریده شد و سپس برای حفظ رطوبت گیاه در پلاستیک قرار داده شد و به آزمایشگاه انتقال داد شد. درنهایت آماده مرحله ضدعفونی شدند. با تیغ اسکالپل قسمت‌های برگ و دم‌برگ ساقه‌ها حذف شد و بعد ساقه به قطعات کوچک‌تر تقسیم گشته و در آب جاری به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. بعد از شستشو با آب جاری ساقه‌ها به زیر هود لامینار انتقال داده شدند. سپس به ترتیب در الکل ۹۵ درصد برای ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد (ماده موثر ۵ درصد) در مدت ۱۵ دقیقه غوطه ور شدند و در آخر با آب مقطر استریل، سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه شسته شدند. ریزنمونه‌های ضدعفونی شده برای رفع خیسی بر روی کاغذ استریل قرار گرفتند. ریزنمونه ها به این صورت جهت انتقال به محیط کشت آماده شدند. در شرایط استریل، ساقه‌ها با اسکالپل تیز به قطعات کوچک‌تر یعنی هر قطعه حاوی تک گره (۱/۵-۲ سانتی‌متر) بریده شد.

۳-۴- شرایط کشت، نوع و غلظت‌های تنظیم کننده رشدی

۳-۴-۱- مرحله استقرار

گره‌های ضدعفونی شده هر دو رقم درون شیشه‌های مربای استریل حاوی محیط کشت MS و دارای ۳۰ گرم ساکارز و ۰/۷ درصد آگار کشت داده شدند. درون هر شیشه ۳ ریزنمونه قرار گرفت. سپس درب شیشه‌های حاوی ریزنمونه‌ها محکم بسته و با پارافیلم درزگیری شدند. شیشه‌ها به شرایط رشدی مناسب (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) به اتاقک رشد انتقال یافتند. تقریبا بعد از ۱۰ روز جوانه‌ها رشد کرده و این جوانه‌ها با تیغ تیز جدا شده و به محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد انتقال داده شدند. جهت پرآوری (تحریک ایجاد ساقه) از جوانه رشد یافته، تنظیم کننده رشدی، سیتوکنین BA با سه غلظت (۰ و ۱ و ۲) استفاده شد (جدول ۳-۶). سپس گیاهان کوچک باززا شده (تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA) از جوانه به محیط

کشت MS ۱/۲ به منظورکامل کردن رشد طولی انتقال یافتند. تمام محیط کشت‌های حاوی گیاه پس از درزگیری با پارافیلم، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در اتاقک رشد نگهداری شدند. در واکشت دوم ترکیب تیماری مطابق جدول (۳-۷) برای پرآوری ساقه استفاده شد.

جدول ۳-۶ : ترکیبات تنظیم کننده رشدی مورد استفاده در مرحله باززایی از جوانه جانبی در واکشت اول

ردیف	BA (mg/l)
۱	۰
۲	۱
۳	۲

جدول ۳-۷ : ترکیبات تنظیم کننده رشدی مورد استفاده در مرحله باززایی از ریزنمونه تک گره در واکشت دوم

ردیف	IAA (mg/l)	BA (mg/l)
۱	۰	۰
۲	۰	۱
۳	۰	۲
۴	۰/۵	۱
۵	۰/۵	۰/۵

۳-۴-۲- باززایی مستقیم شمعدانی با ریزنمونه برگ و دم‌برگ

جهت باززایی مستقیم از ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ شمعدانی استفاده شد. از گیاهان استریل شمعدانی (تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در واکشت دوم) ریزنمونه برگ و دم برگ گرفته شد و با اسکالپل تیز به قطعات یک سانتی‌متری بریده شدند. سپس، ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ در محیط کشت MS با ترکیبی از اکسین‌ها سیتوکنین‌های مختلف قرار گرفتند. (جدول ۳-۸) تیمارهای مختلف به کار رفته در محیط کشت را بر حسب میلی‌گرم در لیتر نشان می‌دهد. همه محیط‌های کشت حاوی ۳۰ گرم ساکارز و ۰/۷درصد آگار بود. pH محیط‌های کشت توسط NaOH و HCl یک نرمال روی ۵/۸ تنظیم شد. پتری دیش‌های حاوی ریزنمونه برای دو هفته در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه

سانتی‌گراد درون اتاقک رشد نگهداری شدند. پس از دو هفته پتری‌دیش‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. در این تحقیق تاثیر تنظیم کننده‌های رشدی مختلف اکسین و سیتوکنین در باززایی دو نوع ریزنمونه (برگ و دم برگ) و دو رقم شمعدانی اژدر با نام‌های آریستو و برمودا مورد مطالعه قرار گرفت.

جدول ۳-۸ : ترکیبات تنظیم کننده رشدی مورد استفاده در مرحله باززایی از برگ و دم‌برگ

کشت		پیش تیمار		
NAA	BA	TDZ	NAA	BA
۰	۰	۰	۰	۰
۰/۵	۱	.	۰/۵	۱
۱	۱	۰	۱	۱
۱	۲	۰	۱	۲
۲	۲	۰	۲	۲
۱	۳	۰	۱	۳
۰	۰	۲	۰	۰
۰/۵	۱	۲	۰/۵	۱
۱	۱	۲	۱	۱
۱	۲	۲	۱	۲
۲	۲	۲	۲	۲
۱	۳	۲	۱	۳

۳-۵- تیمارهای ریشه‌زایی

ساقه‌های نابجا ایجاد شده از ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ شمعدانی اژدر (بهترین تیمار) بعد از سه

هفته به محیط کشت ۱/۲MS جهت طویل شدن منتقل شدند. برای ریشه‌دار کردن ریزنمونه‌ها، ساقه‌هایی به طول تقریبی ۱ تا ۳ سانتی‌متر به محیط القای ریشه‌زایی انتقال یافتند. محیط کشت مورد نظر محیطMS ۱/۲ حاوی ۰/۷ درصد آگار به همراه دو نوع اکسین IBA، IAA با غلظت‌های مختلف (جدول ۳-۹) بود. در واکشت دوم محیط کشت مایع جهت تحریک ریشه‌زایی استفاده گردید. جهت تحریک بیش‌تر تولید ریشه، زغال فعال با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت افزوده شد. تاریک شدن محیط کشت ریشه، سبب القا و تولید اکسین بیش‌تر می‌گردد. از طرفی هنگام انتقال گیاهان به شرایط خاک، ریشه‌ها آسیب نخواهند دید و به راحتی از محیط کشت جدا می‌شوند.

جدول ۳-۹: ترکیبات تنظیم کننده رشدی در مرحله ریشه زایی (میلی‌گرم در لیتر)

IAA	IBA
۰	۰
۱	۰
۱/۵	۰
۲	۰
۰	۰/۵
۰	۱
۰	۱/۵

۳-۶- مرحله انتقال به خاک

گیاهان ریشه دار شده در شرایط درون شیشه ای، برای عادت کردن به آب و هوا و شرایط بیرون، نیاز به زمان دارند و باید به این گیاهان جهت سازگار شدن با شرایط جدید و یا مقاوم شدن (قبل انتقال) فرصت داد. جهت این کار گیاهان به گلخانه انتقال یافتند و برای انتقال گیاهان ریشه‌دار (تعداد ریشه بیش‌تر از ۳ و طول تقریبا ۱۰ میلی‌متر) به بستر خاک، ابتدا خاک استریل شد (اتوکلاو) و در نهایت گیاهان ریشه‌دار در مخلوط خاکی سبک حاوی خاک باغچه : پرلیت : کوکوپیت به نسبت (۱:۳:۱)

قرار گرفتند و سپس آبیاری شدند و در آخر روی گیاهان در گلدان برای مدتی لیوان گذاشته شد و هر روز در سقف لیوان یک سوراخ ایجاد شد تا به آب و هوای گلخانه عادت کند. بعد از ۱۰ روز لیوان برداشته شد. در صورت مشاهده خشک بودن خاک گلدان آبیاری صورت گرفت.

۳-۷- آنالیزهای آماری

این آزمایشات به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار با نرم افزارSPSS نسخه ۱۶ آنالیز شد. هر تیمار با ۳ تکرار بود و هر شیشه مربا یا پتری دیش یک تکرار محسوب شد. درون هر شیشه مربا یا پتری دیش ۶ ریزنمونه قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون Duncan انجام گرفت.

۳-۷-۱- آزمایشات باززایی

۳-۷-۱-۱- استقرار

واکشت اول و واکشت دوم

در آزمایش اول (استقرار) به بررسی ساقه‌های نابجا به‌وجود آمده از جوانه در شمعدانی اژدر پرداخته شد. این آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار انجام گرفت. در این آزمایش تیمار تنظیم کننده رشدی (BAP) در ۳ سطح (۰ و ۱ و ۲ میلی‌گرم) (جدول ۳-۶) به‌عنوان فاکتور اول و نوع رقم در دو سطح (آریستو و برمودا) به عنوان فاکتور دوم و اثرات متقابل آن‌ها بر پارامترهای درصد باززایی و تعداد نوساقه‌های تولید شده و همچنین میانگین تعداد برگ و وزن کل ریزنمونه در دو رقم شمعدانی اژدر (آریستو و برمودا) مورد بررسی قرار گرفت. شرایط برای واکشت دوم نیز مشابه واکشت اول بود با این تفاوت که تنها تیمارهای تنظیم کننده رشدی مختلفی در این مرحله استفاده گردید (جدول ۳-۷).

۳-۷-۱-۲- ساقه‌زایی از ریزنمونه برگ و دم‌برگ

طی آزمایش دوم مشابه مرحله استقرار به وجود آمدن ساقه‌های نابجا در شمعدانی اژدر مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار انجام شد که فاکتور اول در آن تیمار تنظیم کننده رشدی (جدول ۳-۸) و فاکتور دوم آن نوع ریزنمونه (برگ و دم برگ) و فاکتور سوم در آن نوع رقم (آریستو و برمودا) و هم‌چنین اثرات متقابل آن‌ها بر درصد باززایی و تعداد ساقه نا به جا و طول ساقه‌ها در ریزنمونه‌های شمعدانی اژدر در دو رقم ذکر شده مورد تحقیق قرار گرفت.

۳-۷-۲- آزمایشات ریشه‌زایی و زنده‌مانی

در آزمایش سوم ریشه‌دار شدن ساقه‌های نابجا در شمعدانی اژدر بررسی شد. این آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار انجام گشت که فاکتور اول در آن تیمار تنظیم کننده رشدی (جدول۳-۹) و فاکتور دوم نوع رقم (آریستو و برمودا) و اثرات متقابل آن‌ها بر درصد ریشه زایی، تعداد ریشه، طول ریشه و وزن ساقه و ریشه و نسبت وزن ریشه به ساقه مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش زنده‌مانی نیز مشابه طرح ریشه‌زایی با همان دو فاکتور بود با این تفاوت که این آزمایش تنها در دو تکرار انجام پذیرفت و تنها صفت درصد زنده‌مانی گیاهان انتقال یافته به بستر، مورد نظر بررسی گشت.

۳-۷-۳- نرم افزارها

برای آنالیز آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶و برای رسم نمودارها از نرم افزار EXEL استفاده شد.

فصل چهارم

نتایج و بحث

کشت بافت و سلول گیاهی به همراه روش‌های مهندسی ژنتیک از ارکان مهم فناوری زیستی به عنوان یکی از علوم پیشرفته دنیا به شمار می‌آید. تنظیم کننده‌های رشدی به صورت گسترده در مطالعات کشت بافتی با هدف ریزازدیادی، تولید کالوس و القا ریشه و ساقه استفاده می‌شوند. در این مطالعه اثر این تنظیم کننده‌های رشد بر باززایی مستقیم گیاه زینتی شمعدانی اژدر مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این پژوهش می تواند در آزمایشات مربوط به انتقال ژن استفاده گردد خصوصا در کارهای مربوط به انتقال ژن مقاومت به ویروس و همچنین در تولید تجاری شمعدانی در سطح وسیع کاربرد اجرایی دارد. استقرار قابل اطمینان در پروتوکل باززایی، جهت تکثیر زیاد و همچنین برای کاربردهای مهندسی ژنتیک ضروری است.

۴-۱- نتایج آزمایشات استقرار

ریزنمونه‌های انتخابی جهت انجام آزمایش هم می‌توانند به صورت مستقیم از گل‌های شمعدانی رشد یافته در شرایط گلخانه تهیه شوند (گیاه بدون گل و ساقه علفی) و هم از گیاهان رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای بدست آیند. البته تهیه ریزنمونه از گیاهان تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای مطلوب‌تر است که یک علت آن شاید تفاوت در مرحله فیزیولوژیکی خود ریزنمونه باشد (Boase *et all*., 1998). در نتیجه کشت ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ تهیه شده از شمعدانی‌های گلخانه‌ای در محیط کشت‌های حاوی تیمارهای متفاوت هیچ‌گونه تغییرات رشدی در ریزنمونه‌ها صورت نگرفت و باززایی مشاهده نشد زیرا بافت نمونه برگ و دمبرگ بسیار ظریف بودند و با وجود اجرای چندین پروتوکل ضدعفونی، آسیب شدید نمونه‌ها را در پی داشت (داده‌ها به صورت مشاهده ای بودند) در نتیجه برای تهیه گیاهان استریل، مرحله استقرار انجام گرفت.

۴-۱-۱- تاثیر تیمارتنظیم کننده رشد و نوع رقم بردرصد باززایی ساقه نابجا

گره‌های دو رقم ازگیاهان شمعدانی اژدر از گلخانه تهیه شد و پس از استریل کردن، ریزنمونه‌ها درمحیط کشت MS فاقد تنظیم کننده رشدی کشت شدند. بعد از گذشت یک هفته جوانه جانبی رشد یافته از گره به محیط کشت MS محتوی سیتوکنین BA با سه سطح (۰ و ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) انتقال داده شدند. اولین علایم تشکیل ساختار ساقه‌های نابجا بعد از ۱۰روز در جوانه‌ها نمایان شد. گزارش (Wojtania, 2015) بیان می‌کند اگر غلظت ساکارز از ۱۵ به ۴۰ گرم در لیتر در محیط کشت افزایش یابد کاهش تولید برگ و تشکیل ساقه را در پی دارد. پس بر طبق این اصل به محض ظهور ساقه‌ها، توده باززا شده به محیط کشت ۱/۲MS جهت طویل شدن انتقال یافتند.

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴-۱) در واکشت اول جهت القای باززایی ساقه از ریزنمونه جوانه نشان می‌دهد که اثر ساده تیمار تنظیم کننده رشدی و همچنین اثر متقابل تیمار و نوع رقم در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری بر صفت درصد تشکیل ساقه‌های نابجا داشت و بیانگر این شد که رقم‌ها نسبت به غلظت‌های تنظیم کننده رشدی واکنش‌های متفاوت نشان می‌دهند. نتایج مقایسه میانگین مربوط به اثرات متقابل (شکل ۴-۱) نشان داد در محیط کشت بدون تنظیم کننده رشدی تنها رشد جوانه مشاهده شد و هیچ‌گونه تغییرات و نشانه‌هایی از باززا شدن دیده نشد (صفر درصد باززایی). همچنین در سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر BA کم‌ترین میزان درصد باززایی (۰ درصد) برای رقم آریستو و برای رقم برمودا (۲۲/۲۲) حاصل شد. بیش‌ترین درصد باززایی (صد درصد) در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر برای رقم آریستو بدست آمد که با میزان درصد باززایی در رقم برمودا (۸۲/۳۳) در همین ترکیب تیماری مشابه اختلاف معنی‌دار داشت.

در مرحله بعد جهت ازدیاد گیاهان استریل، ساقه‌های تولید شده از گیاهان مادر استریل (۲ میلی‌گرم در لیتر BA) به قسمت‌های کوچک‌تر برش داده شد و در محیط کشت MS حاوی تیمارهای تنظیم

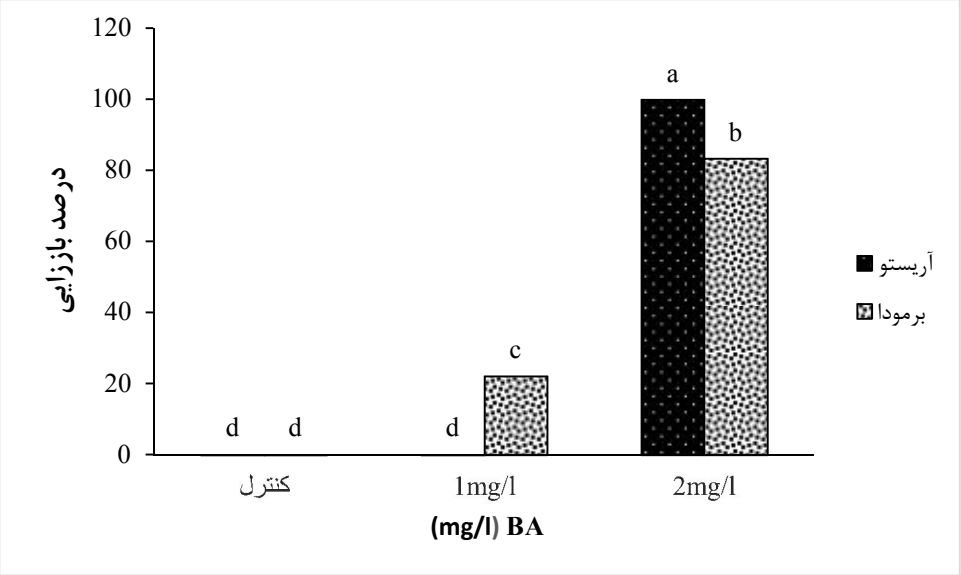
کننده رشدی اکسین و سیتوکنین قرار داده شدند. بعد از گذران یک هفته، از قسمت پایین ریزنمونه گره حاوی جوانه که در تماس با سطح محیط بود باززایی ساقه اتفاق افتاد.

در واکشت دوم طبق نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۴-۲)، اثر ساده تیمارهای تنظیم کننده رشدی (اکسین و سیتوکنین) بر صفت باززایی ساقه در سطح احتمال یک درصد معنی دار گشت. نتایج مقایسه میانگین (شکل ۴-۲) در این مرحله نشان داد که تیمار BA در سطح ۱میلی‌گرم در لیتر بهترین تیمار برای هر دو رقم بود که بیش‌ترین درصد باززایی (۱۰۰درصد) برای رقم آریستو و رقم برمودا بدست آمد. البته این ترکیب تیماری با تیمار سطح دوم BA از لحاظ درصد باززایی در جدول مقایسه میانگین در یک گروه قرار گرفتند و اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد نشان ندادند. تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ترکیب تیماری ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA در یک گروه قرار یافتند البته کیفیت ساقه‌ها در تیمار ترکیب تیماری ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بهتر از تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بود. کم‌ترین میزان درصد باززایی (۱۵/۹) در ترکیب تیماری BA و IAA در سطح ۰/۵میلی‌گرم در لیتر دیده شد که اکثر ریزنمونه‌ها در این ترکیب تیماری باززا نشدند. در گیاهان کنترل فقط رشد اولیه مشاهده شد. این دو تیمار در یک گروه آماری جای گرفتند.

جدول ۴-۱: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف BA در ارقام آریستو و برمودا بر درصد باززایی و تعداد ساقه در واکشت اول

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد باززایی	تعداد ساقه
تنظیم کننده رشد	۲	۱۵۰۱۵/۲۴۴**	۱۹۸۶/۱۳۰**
رقم	۱	۱۵/۳۸۳ns	۲۲۱/۷۲۶**
تنظیم کننده رشد × رقم	۲	۵۷۰/۹۱۰**	۲۳۴/۰۹۲**
خطا	۱۲	۶۱/۷۵۳	۸/۱۳۲
ضریب تغییرات		۲۲/۹۴	۲۶/۹۰

* معنی‌داری در سطح ۵٪ ، ** معنی‌داری در سطح ۱٪ و ns عدم معنی‌داری

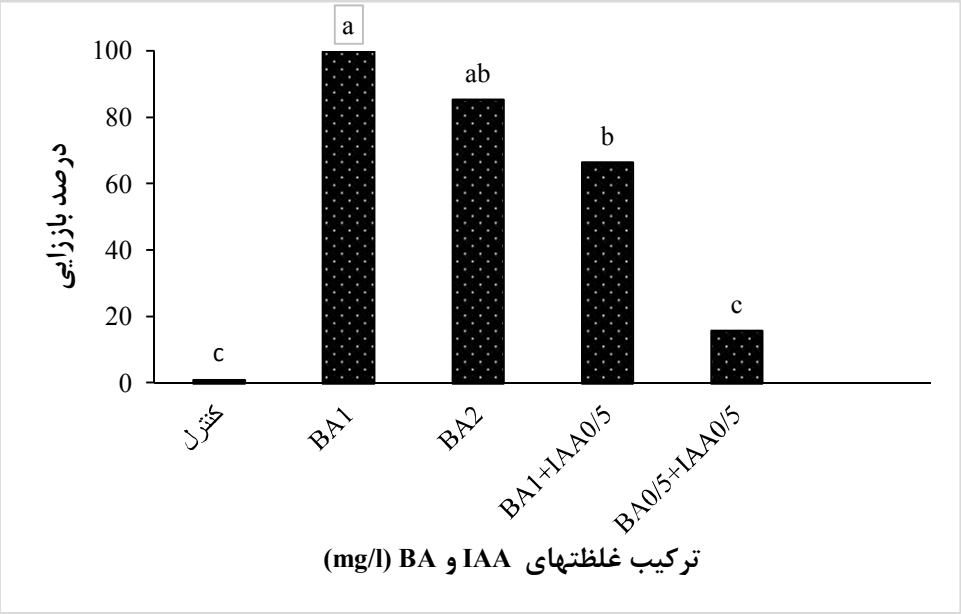


شکل ۴-۱ : مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم کننده رشد BA و رقم بر درصد باززایی دو رقم آریستو و برمودا در واکشت اول

جدول ۴-۲ : تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف BA و IAA در ارقام آریستو و برمودا بر درصد باززایی و تعداد ساقه در واکشت دوم

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد باززایی	تعداد ساقه
تنظیم کننده رشد	۴	۹۵/۰۰۲**	۱۸۳۶/۱۳۰**
رقم	۱	۱/۵۶۴ns	۰/۴۷۱ ns
تنظیم کننده رشد × رقم	۴	۰/۵۳۸ ns	۳/۶۳۶ ns
خطا	۲۰	۲/۸۴۲	۱۲/۵۳۳
ضریب تغییرات		۲۴/۶۲	۲۷/۵۲

* معنی‌داری در سطح ۵٪ ، ** معنی‌داری در سطح ۱٪ و ns عدم معنی‌داری



شکل ۴-۲ : مقایسه میانگین اثر ساده تنظیم کننده‌های رشد بر درصد باززایی در ارقام آریستو و برمودا در واکشت دوم

(Hanus *et all*., 2015) بیان کردند که مطلوب‌ترین محیط کشت برای ریزنمونه‌های گره رقم های شمعدانی اژدر "Tip Top Duet" و "Black Knight" ، محیط کشت MS محتوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IAA با حداکثر باززایی است. طی بررسی (Gupta *et all*., 2002) مشخص شد که مناسب‌ترین محیط کشت برای ریزنمونه گره چند رقم شمعدانی عطری محیط کشت MS با ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب NAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر آدنین سولفات بود و درصد باززایی برای رقم‌ها ۸۵-۸۶ درصد گزارش شد. طبق گزارش (Zuraida, 2013) در مقایسه ای که بین ریزنمونه‌های شمعدانی *Pelargonium radula* انجام داد در واکشت اول مناسب‌ترین ریزنمونه گره انتخاب شد که حداکثر باززایی در محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر سیتوکنین BA حاصل شد. در واکشت دوم ساقه‌ها به محیط کشت حاوی غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد انتقال یافتند که بیش‌ترین درصد تشکیل ساقه (۹۵درصد) در محیط کشت حاوی سیتوکنین BA با غلظت ۰/۵ و اکسین IBA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر

بدست آمد. (Rosy *et all*., 2015) گزارش دادند که بهترین محیط کشت برای ریزنمونه گره شمعدانی عطری، محیط محتوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۶۸/۳ میلی‌گرم در لیتر آدنین سولفات بود که بهینه‌ترین میزان باززایی مستقیم را نشان داد. مشاهدات (Xie *et all*.,2004) نشان داد که بهترین ترکیب تیماری حاوی اکسین و سیتوکنین برای باززایی مستقیم نوساقه برای جوانه شمعدانی عطری رقم Lemon محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA است که میزان باززایی در آن حداکثر بود. (Saxena *et all*., 2000) برای باززایی مستقیم از ریزنمونه گره بجای سیتوکنین BA از Kin با ۸ میلی‌گرم در لیتر و NAA با ۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده کردند. (Satyakala et all., 1995) گزارش دادند که ریزنمونه گره روی محیط کشت حاوی BA با IAA نسبت به محیط کشت محتوی BA در ترکیب با NAA بهتر پاسخ می‌دهد و در محیط کشت MS با ترکیب تیماری BA و IAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر از ریزنمونه گره ۵۶ ساقه تولید شد.

سیتوکنین‌ها در محیط کشت غالبا برای تحریک رشد و نمو به کار می روند و اگر همراه با اکسین استفاده شوند تقسیم سلولی را سرعت می‌بخشند به طوری که مراحل اولیه چرخه سلولی به هر دو تنظیم کننده نیاز دارد (Werner, 2009) و حضور آن‌ها در تشکیل ساقه‌های نابجا اثرگذاشته و تشکیل آن‌ها را تسریع می بخشند (Elzen, 1983). نسبت بین این دو تنظیم کننده تمایزیابی سلولی و آغازش رشد و همچنین اندام زایی را ممکن می‌سازد.

مرحله اول این آزمایش مشخص کرد که سیتوکنین BA به تنهایی قادر به تحریک تولید ساقه‌های نابجا است در حالی که در برخی گونه‌ها مطلوب‌ترین پرآوری ساقه تنها در حضور هر دو تنظیم کننده رشدی اکسین و سیتواکنین امکان پذیر است (Blakesley *et all*., 1992). با افزایش غلظت سیتوکنین BA تولید نوساقه افزایش یافت که درصد باززایی در دو رقم متغییر بود به طوری که رقم آریستو نسبت به رقم دیگر درصد باززایی بیش‌تری را از خود نشان داد. مرحله دوم نشان داد که

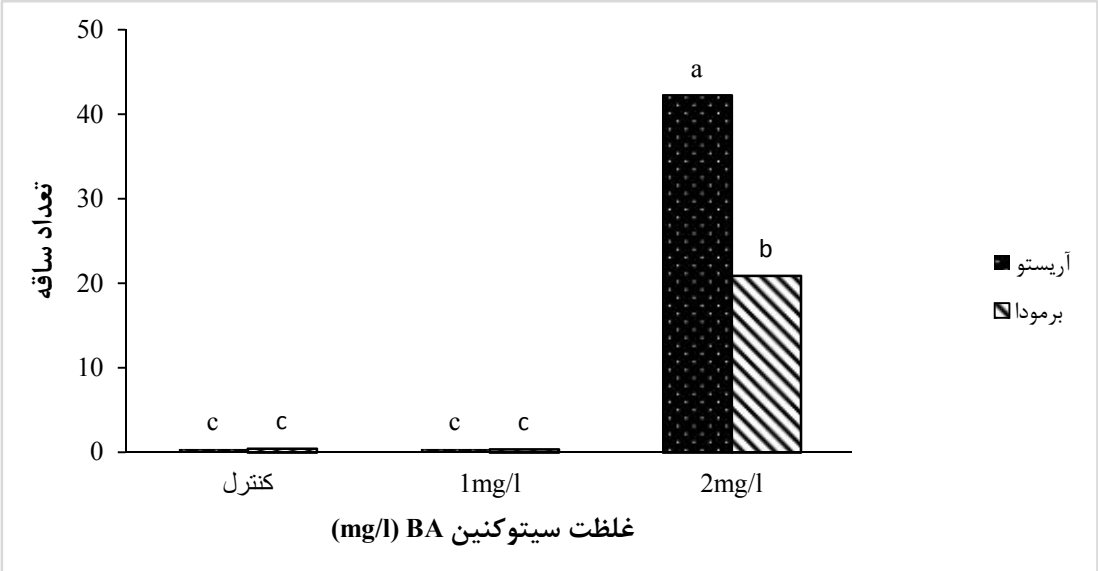
غلظت بالای سیتوکنین BA (۲ میلی‌گرم در لیتر) میزان باززایی ساقه را در هر دو رقم کاهش می‌دهد و این غلظت باعث تغییرات ظاهری مانند شیشه ای شدن و زرد شدن برگها و رشد غیر نرمال در ساقه‌های تولید شده در هر دو رقم شد (شکل ۴-۳). طی فاز تحریکی در معرض قرارگرفتن ریزنمونه با غلظت بالای سیتوکنین محیط کشت حالت سمیت ایجاد کرده و از رشد مجدد و طویل شدن آن جلوگیری می‌کند (Malik *et all*., 2005). مقایسه دو مرحله نشان داد که شاید ریزنمونه‌های گرفته شده طی مرحله اول حاوی میزان اکسین درونی بالایی بودند و همچنین فاکتورهای دیگری مانند سن ریزنمونه و حتی ناحیه برش اثرگذار بوده است. به موجب غلظت بالای سیتوکنین افزوده شده به محیط کشت، ساقه تولید شد. می‌توان نتیجه گرفت بهترین غلظت BA برای این دو رقم شمعدانی از نظر افزایش تعداد ساقه نابجا (۱-۲ میلی‌گرم در لیتر) بود (Faizal *et all*., 2011). غلظت سیتوکنین باید در محیط کشت بهینه باشد (Sharp *et all*., 1984).

این آزمایش بیانگر این است که حتی بین رقم‌های گونه‌های مشابه، اثر تیمارها متفاوت است و هر رقم نیازهای تیماری ویژه ای دارد و نیز تفاوت در پاسخ رقم‌ها به محیط کشت باززایی به گونه ای به هورمون‌های درونی ریزنمونه برمی‌گردد (Elfar *et all*., 2009) و این مهم در روش تکثیر شمعدانی در شرایط درون شیشه‌ای نیز صادق است. رشد و اندام‌زایی در شرایط درون شیشه ای از طریق اثرات متقابل بین هورمون‌ها در محیط کشت و داخل ریزنمونه تنظیم می‌شود.

شکل ۴-۳ : چپ (زرد شدن برگها) و راست (رشد غیر نرمال) در ساقه‌های تولید شده در غلظت بالای سیتوکنین BA (۲ میلی‌گرم در لیتر)

۴-۱-۲- تاثیر تیمارتنظیم کننده رشد و نوع رقم برتعداد ساقه نابجا باززا شده

همان‌گونه که در جدول تجزیه واریانس (۴-۱) ملاحظه می‌شود که در واکشت اول اثر ساده تیمار تنظیم کننده رشدی، رقم و اثر متقابل آن‌ها از نظر تعداد ساقه تولید شده در ریزنمونه در سطح احتمال یک درصد معنی دار شده است. شکل (۴-۴) نشان داد بیش‌ترین تولید تعداد ساقه برای هر دو رقم زمانی بدست آمد که غلظت سیتوکنین BA در مرحله اول ۲ میلی‌گرم در لیتر بود. بیش‌ترین تعداد ساقه در رقم آریستو و برمودا به ترتیب ۴۲/۳ و ۲۰/۸۹ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را در هر دو رقم در صفت مورد نظر در سطح احتمال یک درصد نشان دادند و در نمودار مقایسه میانگین درگروه‌های مجزا قرار گرفتند. تعداد ساقه در تیمار تنظیم کننده رشدی ۱ میلی‌گرم در لیتر برای رقم آریستو (صفر) و برای رقم برمودا (۰/۳۸۳) بود. در غلظت‌های صفر برای هر دو رقم و همچنین غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر برای رقم آریستو هیچ ساقه باززا شده‌ای مشاهده نشد (شکل ۴-۵).

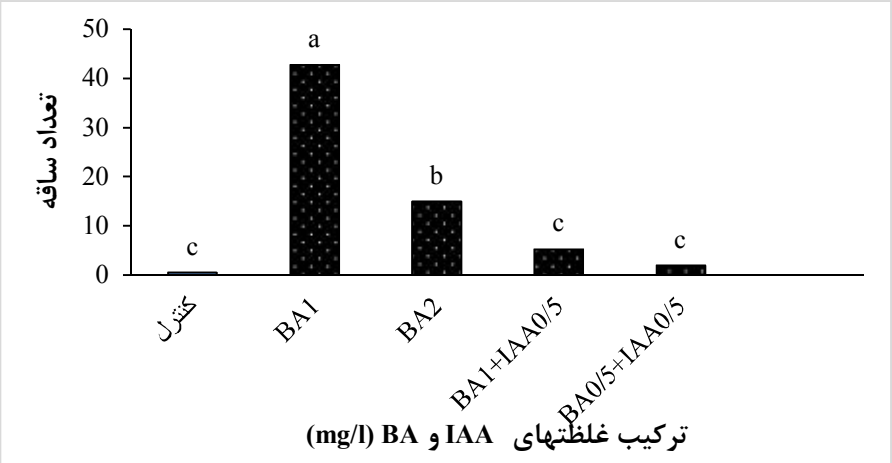


شکل ۴-۴ : مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم کننده رشد BA و رقم بر تعداد ساقه دو رقم آریستو و برمودا در واکشت اول

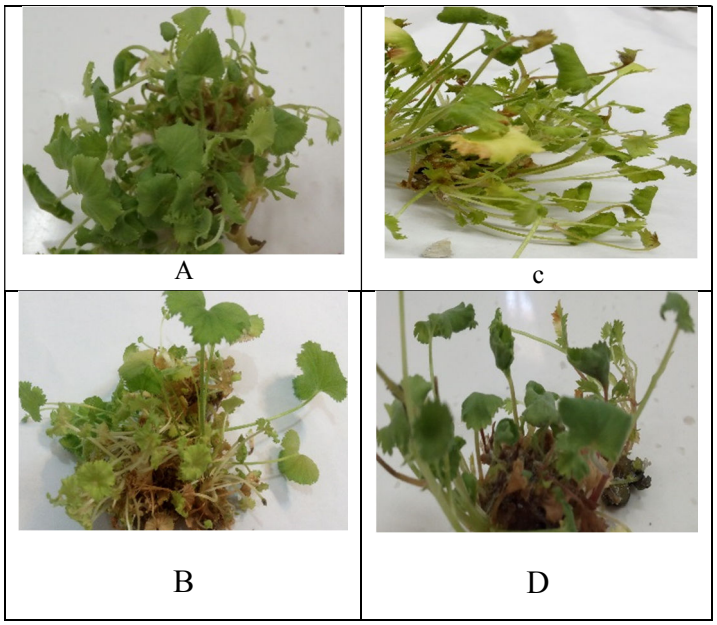
شکل ۴-۵ : ساقه تولید شده در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA در واکشت اول در رقم آریستو (راست) و برمودا (چپ)

در واکشت دوم تنها اثر ساده تیمار تنظیم کننده رشدی در تعداد ساقه بازرا شده در سطح یک درصد معنی دار شد. مقایسه میانگین (شکل ۴-۶) اثر ساده تیمار در این مرحله نشان داد که تیمار تنظیم کننده رشدی سیتوکنین BA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بیش‌ترین تعداد ساقه (۴۲/۷۸) برای هر دو رقم را تولید کرد. بعد از آن تیمار سیتوکنین BA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر با تولید نوساقه (۱۴/۹) برترین تیمار بود. تیمارهای دیگر در یک گروه قرار گرفتند و از نظر آماری اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد نشان ندادند. همچنین در تیمار تنظیم کننده رشدی سیتوکنین BA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و اکسین IAA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کم‌ترین تعداد

ساقه (۱/۹۱) در هر دو رقم بدست آمد شکل (۴-۷).



شکل ۴-۶ : مقایسه میانگین اثر ساده ترکیب تنظیم کننده‌های رشد BA و IAA (میلی‌گرم در لیتر) بر تولید ساقه در ارقام آریستو و برمودا در واکشت دوم



شکل ۴-۷ : اثر تیمارهای متفاوت در تولید ساقه در واکشت دوم A: (۱ میلی‌گرم در لیتر BA)، B: (۲ میلی‌گرم در لیتر BA)، C : (۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA)، D: (۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA)

(Desilets *et all*., 1993) گزارش دادند که نوک ساقه شمعدانی *Pelargonium ×hortorum* در محیط کشت محتوی غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (BA و NAA) کشت شدند. بهترین محیط کشت، محیط کشت MS ۱/۲ ترکیب تیماری اکسین و سیتوکنین BA و NAA با غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر بود که بیش‌ترین تعداد ساقه را تولید نمود. گزارش (Xie *et all*.,2004) نشان داد که محیط مناسب برای باززایی مستقیم ریزنمونه ساقه شمعدانی عطری رقم Lemon ، محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و NAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر است که تعداد ساقه در آن نسبت به سایر ترکیبات تیماری بالاتر بود. بر طبق گزارش (Zuraida, 2013) مطلوب‌ترین محیط کشت برای پرآوری ساقه در ریزنمونه گره شمعدانی *Pelargonium radula* محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP بود که حداکثر تولید ساقه در این محیط کشت ۹ ساقه شد. در مرحله بعد با کشت ساقه‌های پرآوری شده در مرحله پیش در محیط کشت محتوی تیمارهای اکسین، سیتوکنین و GA3، ۲۲ ساقه تولید شد که این تعداد ساقه متعلق به ترکیب تیماری ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. پس می‌توان نتیجه گرفت که میزان تشکیل ساقه به نوع تنظیم کننده رشدی و و رقم وابسته است (Shirani *et all*., 2009). نتایج این آزمایش در واکشت دوم نشان داد که با افزایش غلظت سیتوکنین میزان باززایی کاهش می‌یابد و در بعضی موارد سبب شیشه ای شدن گیاهان باززا شده و رشد غیر نرمال شد (شکل ۴-۳). (Negi *et all*., 2004) گزارش کردند محیط کشت MS به همراه ۱میلی‌گرم در لیتر BA و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین سولفات بالاترین درصد باززایی مستقیم (۹۳ درصد) و تعداد ساقه (۳۴) در ریزنمونه گره شمعدانی عطری بدست آمد. در واکشت دوم در محیط کشت حاوی تنظیم کننده، تولید نوساقه‌ها نسبت به واکشت اول زیاد شد خصوصا در رقم برمودا در واکشت دوم میزان تشکیل نوساقه دو برابر شد و علت آن شاید سازگاری ریزنمونه با شرایط درون شیشه ای باشد (Sharma *et all*., 1993) و نتایج نشان داد که با هر واکشت ساقه‌های استریل، زمان رسیدن به باززایی ساقه

کاهش یافت. در واکشت اول تفاوت بین رقم‌ها در پاسخ به تیمارهای مشابه در صفت درصد باززایی ساقه و تعداد ساقه، به علت حضور سطوح تنظیم کننده‌های رشدی درونی در دسترس ریزنمونه بود (Escubar *et all*., 2009).

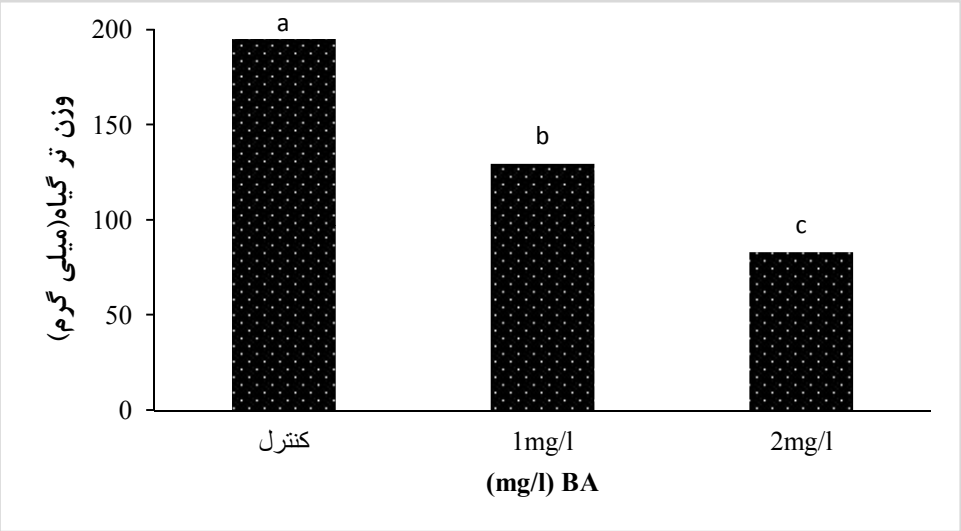
۴-۱-۲-۱- تاثیر تیمارتنظیم کننده رشد و نوع رقم بر وزن تر گیاه

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴-۳) هیچگونه اختلاف معنی داری بین اثرات متقابل فاکتورهای تیمار تنظیم کننده رشدی و نوع رقم و همچنین اثر ساده رقم بر وزن تر گیاه در دو واکشت نشان نداد و تنها اثر ساده فاکتور تیمار تنظیم کننده رشدی بر وزن تر گیاه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گشت. معمولا اختلاف معنی دار بین رقم‌ها از نظر پارامتر وزن تر گیاه وجود ندارد. مقایسه میانگین (شکل۴-۸) نشان می‌دهد که در واکشت اول گیاهان کنترل (تنها یک گیاهچه بدون باززایی) دارای بیش‌ترین وزن کانوپی (۱۹۵/۷ میلی‌گرم) بودند و کم‌ترین میزان وزن گیاه (۸۳/۵ میلی‌گرم) متعلق به تیمار BA در سطح غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بود. گیاهان رشد یافته در هر سه سطح غلظت BA از نظر صفت وزن تر گیاه در گروه‌های متفاوتی از نظر آماری جای گرفتند.

جدول ۴-۳ : تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد BA در ارقام آریستو و برمودا بر میزان وزن ترگیاه و تعداد برگ در واکشت اول

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		وزن گیاه	تعداد برگ
تنظیم کننده رشد	۲	۱۹۰۵۳/۶۲۰**	۴۷/۶۷۱**
رقم	۱	۳۶۷/۴۷۶ns	۰/۵۱۳ns
تنظیم کننده رشد × رقم	۲	۱۷/۹۰۱ ns	۰/۲۱۷ ns
خطا	۱۲	۹۵/۰۱۹	۸/۱۳۲
ضریب تغییرات		۷/۱۵	۱۴/۱۱

* معنی‌داری در سطح ۵٪ ، ** معنی‌داری در سطح ۱٪ و ns عدم معنی‌داری

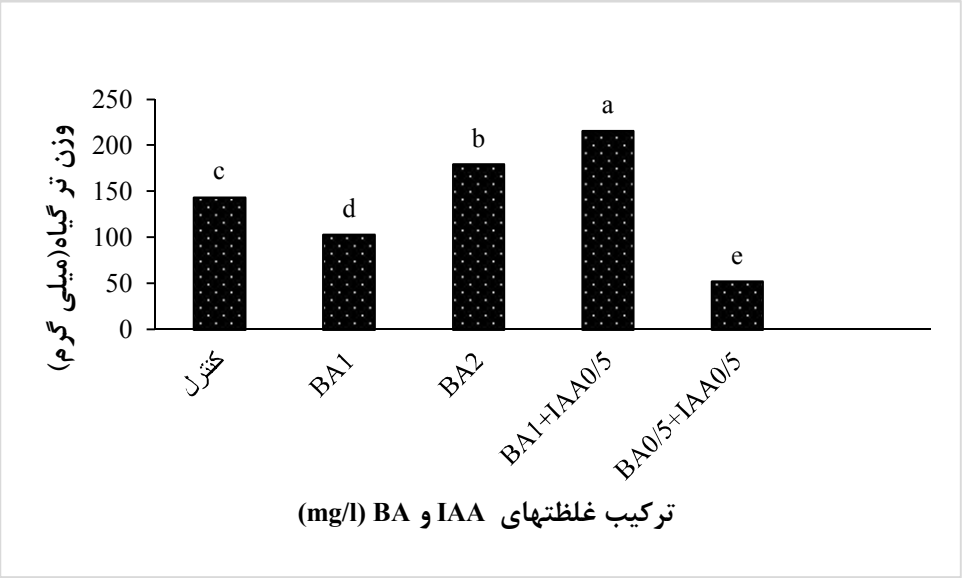


شکل ۴-۸ : مقایسه میانگین اثر ساده تنظیم کننده رشد (BA) بر وزن تر گیاه در ارقام آریستو و برمودا در واکشت اول

جدول ۴-۴ : تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد BA و IAA در ارقام آریستو و برمودا بر میزان وزن تر گیاه و تعداد برگ در واکشت دوم

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		وزن گیاه	تعداد برگ
تنظیم کننده رشد	۴	۲۴۵۵۱/۹۳۰**	۱۰/۲۹۸**
رقم	۱	۹۲/۴۷۱ ns	۰/۷۳۰ ns
تنظیم کننده رشد × رقم	۴	۵۷/۱۱۹ ns	۰/۲۱۸ ns
خطا	۲۰	۲۱۲/۰۳	۰/۱۷۷
ضریب تغییرات		۱۰/۴۵	۷/۸۱

* معنی‌داری در سطح ۵٪ ، ** معنی‌داری در سطح ۱٪ و ns عدم معنی‌داری



شکل ۴-۹ : مقایسه میانگین اثر ساده تنظیم کننده‌های رشد بر وزن تر گیاه در ارقام آریستو و برمودا در واکشت دوم

مقایسه میانگین (شکل ۴-۹) نشان می‌دهد که بین تمام ترکیب‌های تیماری از نظر وزن تر گیاه اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد وجود دارد. گیاهان در ترکیب تیماری BA در سطح غلظت ۱میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بیش‌ترین وزن تر گیاه (۲۱۶/۱ میلی‌گرم) را دارا بودند و پس از آن بیش‌ترین وزن تر (۱۸۰ میلی‌گرم) متعلق به گیاهان در تیمار BA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بود. کم‌ترین وزن (۵۲/۵۵ میلی‌گرم) در گیاهان رشد یافته در ترکیب تیماری BA در سطح غلظت ۰/۵میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA مشاهده شدند.

واکشت اول :

(Moyo *et all*., 2012) گزارش دادند ریزنمونه دمبرگ شمعدانی *Pelargonium sidoides* درمحیط کشت MS همراه با سیتوکنین‌های BAP و Kin و mT و mTR و MemTR با غلظت‌های متفاوت کشت شدند. بعد از گذشت ۴ هفته بررسی داده‌ها نشان داد که گیاهان شاهد بیش‌ترین بیومس و طول ساقه را نسبت به تیمارهای تنظیم کننده رشدی داشتند. (Babaei *et all*., 2010) ریزنمونه ساقه حاوی جوانه جانبی خیار را در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های متفاوتی از BAP و اکسین

NAA کشت کردند که وزن شاخساره در محیط کشت فاقد تیمارهای تنظیم کننده رشدی (کنترل) نسبت به تیمارهای دیگر بیش‌تر بود.

واکشت دوم :

(Wojtania, 2001) ریزنمونه ساقه حاوی جوانه جانبی شمعدانی را در محیط کشت MS محتوی تنظیم کننده‌های رشدی سیتوکنین BAP و Topolin کشت کردند. در برخی تیمارها به محیط کشت آمینواسید گلایسین افزوده شد. بررسی جدول مقایسه میانگین نشان داد که وزن شاخساره در محیط کشت MS محتوی ترکیب تیماری سیتوکنین BAP با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر به همراه آمینواسید گلایسین افزایش یافت درحالی که تعدادساقه باززا شده در آن نسبت به بهترین محیط کشت حاوی ترکیب تیماری متفاوت، کمتر بود. در گزارش (Wojtania, 2004) با کشت ریزنمونه دم‌برگ شمعدانی *P.* × *hederaefolium* در محیط کشت MS محتوی ترکیبات تیماری متفاوت مشخص شد که بیش‌ترین وزن شاخساره مربوط به محیط کشت MS با ترکیب تیماری TDZ با غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر و اکسین IBA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بود.

(Katagi *et all*., 1986) مشاهده کردند که پرآوری ساقه در شمعدانی عطری در شرایط درون شیشه-ای در محیط کشت LS حاوی ۰/۲۳ میلی‌گرم در لیتر BA با ۱/۸ میلی‌گرم در لیتر IAA به صورت مستقیم رخ داد و وزن تر ریزنمونه‌ها در این محیط کشت، افزایش یافت. (Lakshmi *et all*., 2006) گزارش دادند که بیش‌ترین وزن تر در گیاهان *Dioscorea rotundata* رشد یافته در محیط کشت محتوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. . (Tehrim *et all*., 2013) گزارش دادند که ریزنمونه گره انگور در محیط کشت MS حاوی ترکیبات تیماری متفاوت کشت شدند و زمانی که غلظت سیتوکنین BA از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به ۲ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت زیاد شد تعداد ساقه و وزن شاخساره افزایش یافت. (Ngomuo *et all*., 2013) گزارش دادند که

وزن تر گیاه و طول ساقه گیاه موز در ترکیب تیماری BA و IAA به ترتیب ۶ و ۰/۳۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت افزایش یافت. طبق گزارش (Saira *et all.*, 2005) وزن شاخساره با افزایش غلظت BA در محیط کشت به تنهایی و نیز به همراه اکسین موجود در محیط کشت زیاد شد. علت این افزایش وزن به علت زیاد شدن کلسیم سیتوسولی در نتیجه جذب بیش‌تر سیتوکنین در محیط کشت است. اثر سیتوکنین وابسته به سطوح داخلی کلسیم است به این صورت که در مسیر انتقال سیگنال سیتوکنین از نواحی داخلی کانال‌های کلسیم دخالت دارند و کاربرد سیتوکنین در افزایش غلظت کلسیم داخل سلول تایید شده و اینکه در برخی گیاهان سیتوکنین با فعالیت کانال‌های کلسیم در غشای سلولی مرتبط اند (Hepler, 1985). تحقیقات دهه گذشته نشان داده است که کلسیم اثرات مهمی بر عملکرد هر یک از انواع هورمون‌های گیاهی دارد، در بعضی از موارد، پاسخ هورمونی را تقویت کرده و در موارد دیگر آن را مهار می‌کنند (Poovaiah, 1987).

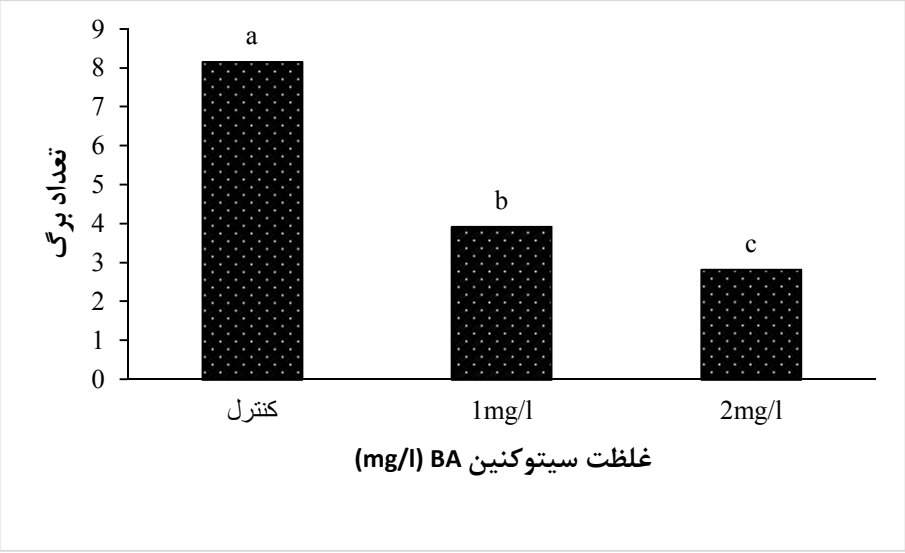
در این آزمایش مشخص گردید بین باززایی ساقه و پارامترهای رشدی مانند وزن شاخساره حالت رفت و آمدی وجود دارد یعنی گیاهان رشد یافته در محیط کشت کنترل در واکشت اول با اینکه هیچ اثری از باززایی در آنها مشاهده نشد وزن شاخساره در آن‌ها افزایش یافت و در تیمارهایی که تعداد تولید نوساقه در آن‌ها زیاد بود وزن شاخساره کم‌تر از گیاهان شاهد گزارش شد. علت این امر شاید اثرگذاری تنظیم کننده‌های رشدی مانند سیتوکنین BA و یا دیگر تنظیم کننده‌ها باشد همان‌طورکه در غلظت-های کم تنظیم کننده‌های رشدی مانند سیتوکنین BA (۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) شاید تغییراتی در ظاهر گیاه مشاهد نشود. بیان شده است که سیتوکنین‌ها بر حرکت مواد غذایی از بخش‌های دیگر به قسمت‌های تیمار شده تحت اثر این تنظیم کننده تاثیر می‌گذارند و مواد غذایی در آنجا انباشت می‌شود. فرض شده است که این هورمون با ایجاد یک رابطه منبع-مخزن جدید، موجب جابجایی مواد غذایی به محل تیمار با سیتوکنین می‌شود. بنابراین، وضعیت مواد غذایی گیاه است که موجب تنظیم مقدار سیتوکنین می‌شود که این به نوبه خود سرعت رشد اندام هوایی را تعیین می‌کند در نتیجه مواد

غذایی صرف تولید ساقه‌های جدید شده و صرف افزایش وزن تر گیاه و تولید برگ و رشد ساقه اصلی نمی‌شود (مور، ۱۳۸۲).

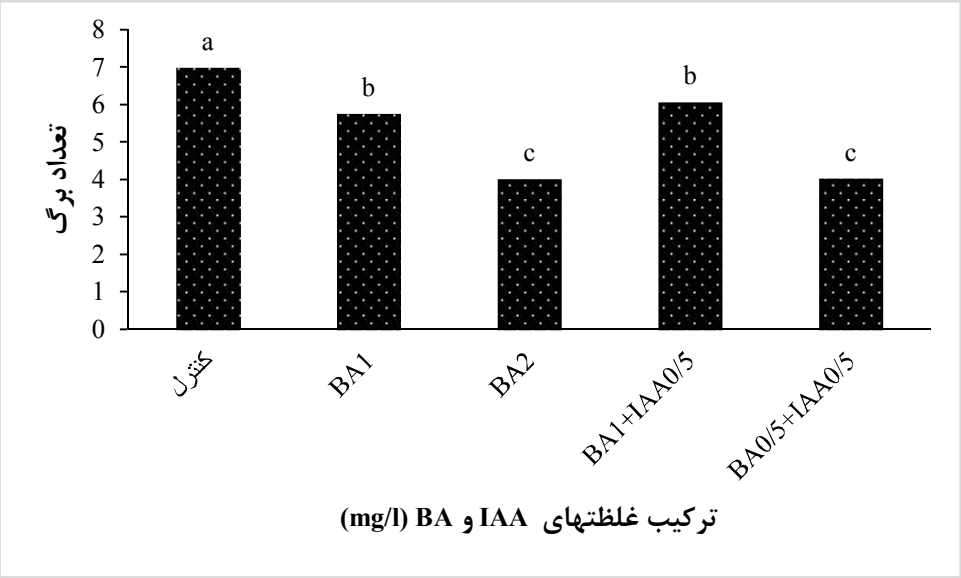
۱-۴-۲-۲- تاثیر تیمارتنظیم کننده رشد و نوع رقم برتعداد برگ‌ها

جدول تجزیه واریانس (۴-۳ و ۴-۴) در این قسمت نشان می‌دهد که اثر ساده رقم و اثرات متقابل رقم و تیمار بر پارامتر رشدی تعداد برگ اختلاف معنی دار نداشت. در حالی که اثر ساده تیمار در هر دو واکشت در مرحله استقرار تفاوت معنی داری را در سطح یک درصد نشان داد. مقایسه میانگین‌ها (شکل ۴-۱۰) در واکشت اول گویای این شد که بیش‌ترین تعداد برگ (۸/۱۶) مربوط به گیاهان رشد یافته در محیط کشت بدون حضور تنظیم کننده‌های رشد (تک گیاه) بود. کم‌ترین تعداد برگ در محیط کشت حاوی دو غلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به ترتیب با تعداد برگ (۳/۹ و ۲/۸) مشاهده شد و در یک سطح آماری قرار گرفتند. (شکل ۴-۱۱) نشان می‌دهد که در واکشت دوم بیش-ترین تعداد برگ در گیاهان کنترل (۶/۹۹) و کم‌ترین تعداد برگ در ترکیب تیماری BA در ترکیب با IAA در سطح غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (۴/۰۵) و تیمار BA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر (۴/۰۲) بدست آمد که در یک گروه از نظر آماری قرار گرفتند. تیمار BA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و ترکیب تیماری BA با غلظت ۱ میلی‌گرم در ترکیب با IAA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در یک سطح تیماری قرار گرفتند که تعداد برگ در تیمار اول ۵/۷۷ و در ترکیب تیماری دوم ۶/۰۸ حاصل شد. نتایج این قسمت با گزارش‌های (Saxena *et all*., 2000؛ Wojtania, 2001) تطابق دارد. نتایج این آزمایش بیانگر این بود که غلظت‌های بالای سیتوکنین (۲ میلی‌گرم در لیتر) در واکشت دوم در بعضی از ریزنمونه‌ها سبب تولید گیاهانی با قد کوتاه و برگ‌های سبز روشن نسبت به سایر تیمارها گردید و طبیعی است که با کاهش قد گیاه، تعداد برگ نیز روند کاهشی داشته باشد. می‌توان بیان کرد که سیتوکنین‌ها در غلظت بالا اثر کاهشی در طویل شدن گیاهان داشته و باعث تخریب کلروفیل می‌شوند

و از طریق تجمع سوپر رادیکالها و پراکسید هیدروژن به نوعی در نمو گیاه اختلال ایجاد می کنند (Gill, 2010؛Limpo *et all*., 2007) که در پی آن فرآیندهای نامطلوب فیزیولوژیکی همانند زرد شدن برگ‌ها را در پی دارد (شکل ۴-۳) (Cassells *et all*., 1983؛ Joyce *et all*., 2003) در حالی که در غلظت‌های کم باعث بهبود تشکیل ساقه و نمو کلروفیل (Legocka, 2014؛ Kulaeva *et all*., 2002) شده و به دنبال آن نرخ فتوسنتزی تسریع شده و در نهایت اثر مهم آن در وزن تر ساقه و وزن خشک و دیگر پارامترهای رشدی است و این ثابت می‌کند که سیتوکنین‌ها نقش مستقیم را در رشد دارند (Najma, 2001). آزمایش نشان داد سیتوکنین‌ها در غلظت‌های بالا اثرات بازدارنده بر رشد گیاه داشته و کاهش پارامترهای رشدی را به دنبال دارد (Van Staden, 2008؛ Elfar *et all*., 2009) همچنین گزارش دادند ترکیب ۲ میلی‌گرم در لیتر BA با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA سبب افزایش تعداد برگ و طویل شدن گیاه شد (Ezeibekwe *et all*., 2009).



شکل۴-۱۰ : مقایسه میانگین اثر ساده تنظیم کننده‌های رشد بر تعداد برگ در واکشت اول



شکل ۴-۱۱ : مقایسه میانگین اثر ساده تنظیم کننده‌های رشد بر تعداد برگ در ارقام آریستو و برمودا در واکشت دوم

مطالعات کمی با هدف تکثیر گیاهان، اثر مثبت تنها یک تنظیم کننده رشد را در باززایی گیاه بررسی نموده اند اما نتایج قسمت استقرار در این پژوهش نشان دهنده اثر مثبت یک تنظیم کننده رشد در تکثیر شمعدانی اژدر بود.

۴-۱-۳- نتایج آزمایشات باززایی مستقیم از ریزنمونه برگ و دم‌برگ

۴-۱-۳-۱- تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد، نوع ریزنمونه و نوع رقم بردرصد باززایی ساقه نابجا

ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ استریل دو رقم آریستو و برمودا از گیاهان استریل از مرحله استقرار (واکشت دوم) بهترین تیمار (BA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر) محیط‌های کشت حاوی تیمارهای متفاوت طبق جدول (۳-۸) در شرایط تاریکی (پیش تیمار) به مدت دو هفته قرار گرفتند. رشد اولیه تقریبا در تمام سطح ریزنمونه ها اتفاق افتاد و طی این دوره تغییرات محسوسی دراندازه برگ و دم-

برگ‌ها اتفاق افتاد به طوری که ریزنمونه‌ها بزرگ و متورم شدند به خصوص در محیط‌های کشت حاوی TDZ این تغییرات محسوس‌تر بود که شاید علت آن است که TDZ فعالیت سیتوکنینی دارد و سبب افزایش سطح سیتوکنین داخلی می شود که حاصل آن تقسیمات سلولی زیاد است (Chhabra *et all*., 2008). در غلظت‌های بالاتر TDZ رشد غیر نرمال گیاهان نیز گزارش شده است (Wu *et all*., 2006). (Wojtania, 2004) با مطالعات هیستولوژیکی در باززایی مستقیم در شمعدانی بیان کرد که در این زمان دو نوع ساختار بوجود می آید یکی از این ساختارها، ساختارهای جنین مانند و دیگری پریموردیای ساقه است و شاید به توان گفت که مسیر باززایی مستقیم ساقه با مصیر جنین زایی سوماتیکی میکس شده است (Croke *et all*., 1997) و درصد باززایی هر کدام از این‌ها (ساختار جنین مانند یا ساقه) بسته به نوع سیتوکنین مورد استفاده است. پس از گذران دو هفته، ریزنمونه‌های متورم (برگ و دم‌برگ) به دو یا چند قطعه برش خوردند و سپس این قطعات به محیط‌های کشت حاوی تیمارهای مشابه در شرایط نوری انتقال داده شده و در تماس با سطح محیط قرارگرفتند (جدول ۳-۸). به فاصله ۷- ۱۴روز از انتقال ریزنمونه‌ها به شرایط نوری، تمایزیابی آغاز شد و پریموردیای ساقه (ساختارهای سبزرنگ کروی با اندازه بیش‌تر از ۲ میلی‌متر با همراه داشتن پریموردیای برگ) (Dunbar *et all*, 989) نمایان شد. بعد از ۸ هفته از آغاز کشت، ساقه‌ها نمو یافتند. محیط کشت‌های حاوی تنظیم کننده رشدی TDZ بعد از دو هفته تاریکی، در روز هفتم در شرایط نوری، ساختارها ظهور یافته و نمو آن‌ها بعد از این مدت مشاهده شد اما در محیط‌های کشت حاوی تنظیم کننده‌های رشدی سیتوکنین BA اولین نشانه‌های باززا شدن بعد از ۱۴روز ظاهر شد و رشد ساختارهای تشکیل یافته بعد از ۴ هفته از کشت رخ داد و می‌توان گفت که تنظیم کننده رشدی TDZ زمان رسیدن به تشکیل ساختارهای نابجا را کاهش داد و اثر مثبتی در نمو ساقه‌ها در محیط کشت داشت.

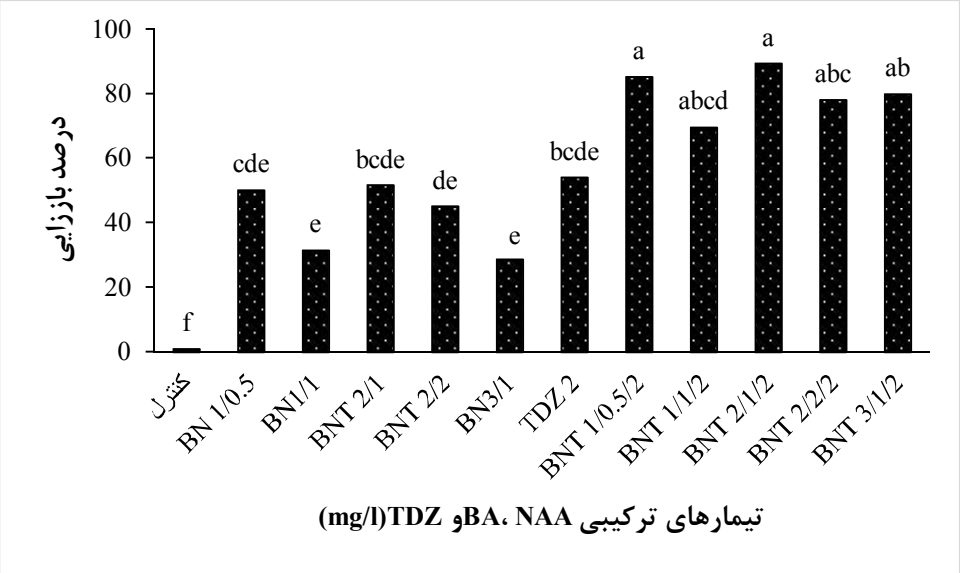
طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴-۵) اثرات ساده تیمارهای تنظیم کننده رشدی و نوع ریزنمونه

در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار را بر صفت مورد بررسی نشان داد. همچنین اثر رقم‌های مورد تحقیق به تنهایی معنی دار نشدند و در نتیجه اختلاف معنی داری را نشان ندادند. اثرات متقابل سه جانبه مربوط به ترکیب تیماری تنظیم کننده های رشد NAA، BAP، TDZ و نوع رقم و نوع ریزنمونه نیز اختلاف معنی داری را بر درصد باززایی ساقه نشان ندادند. نتایج مقایسه میانگین (شکل ۴-۱۲) مربوط به اثرات ساده تنظیم کننده های رشد بیانگر اثرات متفاوت تیمارهای متغیراست. به طوری که بیش‌ترین درصد باززایی (۸۹/۳) در ترکیب تیماری ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۱میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ در هر دو ریزنمونه هر دو رقم حاصل شد بعد از آن محیط کشت محتوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی-گرم در لیتر TDZ بالاترین درصد باززایی ساقه (۸۵/۲) را نشان دادند. کم‌ترین درصد باززایی به ترتیب (۳۱/۵ و ۲۸/۷) در دو ترکیب تیماری حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و همچنین محیط کشت محتوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل شد. هر چند که تمام تیمارهای محتوی ترکیب دو سیتوکنین BAP و TDZ به همراه اکسین NAA در غلظت‌های متفاوت از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد در یک گروه جای گرفتند و درصد باززایی در آن‌ها نسبت به سایر گروه‌ها بیش‌تر بود. در محیط کشت فاقد ترکیب تیماری هیچ‌گونه باززایی مشاهده نگردید.

جدول ۴- ۵ : تجزیه واریانس اثر تیمارهای ترکیبی غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد BA، NAA، TDZ و نوع رقم و ریزنمونه در ارقام آریستو و برمودا بر درصد باززایی و تعداد ساقه

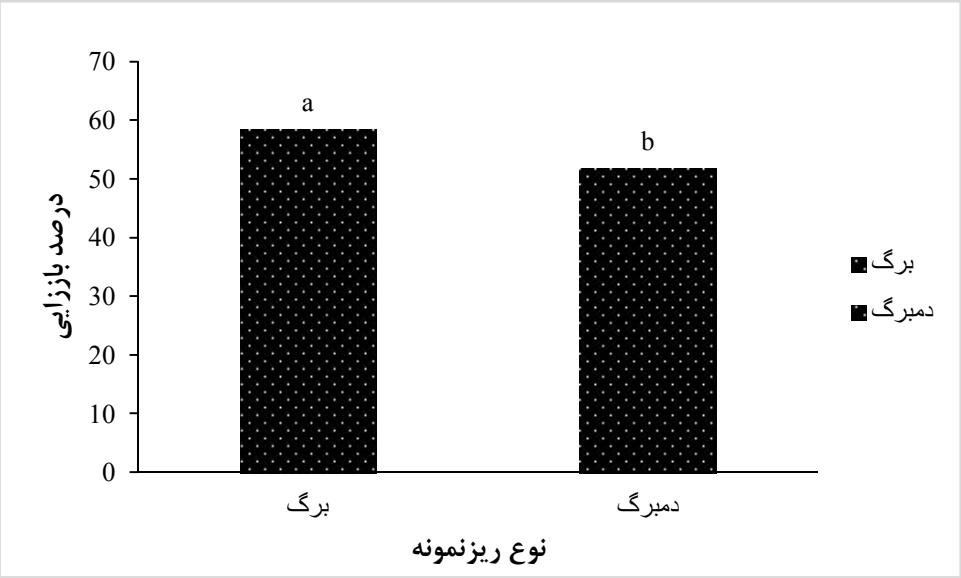
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد باززایی	تعداد ساقه
تنظیم کننده رشد	۱۱	۸۵۷۵/۸۶۰**	۱۹/۸۰۵**
رقم	۱	۴۷/۰۳۷ns	۰/۰۹۷ns
تنظیم کننده رشد × رقم	۱۱	۲۶۵/۷۵۸ ns	۰/۲۲۶ ns
ریزنمونه	۱	۱۶۱۳/۳۶۱**	۲۱/۹۴۱ **
تنظیم کننده رشد × ریزنمونه	۱۱	۴۲۹/۶۱۸ns	۰/۵۳۹ ns
رقم × ریزنمونه	۱	۱۵۳/۲۲۳ ns	۰/۷۹۱ ns
تنظیم کننده رشد × رقم × ریزنمونه	۱۱	۲۳۸/۹۱۲ ns	۰/۲۴۱ ns
خطا	۹۶	۲۴۸/۶۷۱	۰/۴۹۱
ضریب تغییرات		۲۸/۵۱	۲۱/۱۵

* معنی‌داری در سطح ۵٪ ، ** معنی‌داری در سطح ۱٪ و ns عدم معنی‌داری



شکل ۴-۱۲ : مقایسه میانگین اثر ساده تیمارهای ترکیبی تنظیم کننده‌های رشد بر درصد باززایی ساقه در ارقام آریستو و برمودا

TDZ:T NAA:N BA :B



شکل ۴-۱۳ : مقایسه میانگین اثر ساده نوع ریزنمونه بر درصد باززایی در ارقام آریستو و برمودا

بر اساس آزمایش صورت گرفته، به کارگیری پیش تیمار تاریکی برای دو هفته به همراه حضور تمامی تنظیم کننده‌های رشدی (ترکیب‌های تیماری دو سیتوکنین BAP و TDZ به همراه اکسین NAA) منجر به افزایش درصد باززایی ساقه در هر دو رقم شد. مقایسه میانگین (شکل ۴-۱۲) نشان می‌دهد که سه برابرکردن غلظت تنظیم کننده رشدی BAP از ۱ میلی‌گرم در لیتر به ۳ میلی‌گرم در لیتر به همراه غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط کشت در مرحله پیش تیمار تاریکی، به جز زمانی که تنظیم کنندی رشدی TDZ موجود باشد کاهش درصد بازایی ساقه مشاهده می‌شود و این نتیجه با گزارش (Arshad *et all*., 2012) تطابق داشت که آن‌ها نشان دادند که پاسخ تنظیم کننده رشدی TDZ وابسته به سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشدی BAP و NAA است. نتایج مقایسه میانگین (شکل ۴-۱۳) گویای این بود که نوع ریزنمونه بر درصد باززایی ساقه در شمعدانی موثر بود و اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال یک درصد نشان داد. بیش‌ترین درصد باززایی ساقه مربوط به ریزنمونه برگ (۵۸/۶۵) در هر دو رقم نسبت به ریزنمونه دمبرگ بود که در این ریزنمونه درصد باززایی (۵۱/۹) محاسبه شد.

این نتایج نشان دهنده اثر قابل توجه نوع ریزنمونه در راستای باززایی مستقیم یعنی تولید ساقه‌های نابجا بدون تشکیل کالوس است (Blin strubiene *et all*., 2004). نتایج نشان داد که می‌توان برای رسیدن به باززایی مستقیم از بخش‌های متغیر گیاه شمعدانی اژدر برای باززایی مستقیم استفاده کرد. در این تحقیق مشخص گردید که TDZ تاثیر بالایی را در باززایی ساقه نابجا داشت و درصد باززایی مستقیم برای آن (۵۴/۰۷) بدست آمد. این باززایی بالا می‌تواند به این دلیل باشد که فعالیت زیستی و بیولوژیکی این تنظیم کننده رشدی در مقایسه با آدنین فعال سایر سیتوکنین‌ها بیش‌تر است (Mok *et all*., 1982؛De melo *et all*., 2006). این سیتوکنین در غلظت‌های پایین نسبت به سایر سیتوکنین‌ها (Kin ،BA) فعالیت و اثر بیش‌تری دارد (Zhou *et all*., 1994 ؛ Akasaka *et all*., 2000). (Qureshi *et all*., 1992) گزارش دادند که سیتوکنین TDZ در غلظت‌های پایین (۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) باعث تولید ساقه‌های نابجا می‌شود و در غلظت‌های بالاتر تولید جنین‌های سوماتیکی اتفاق می افتد. (Arshad *et all*., 2012) بیان نمودند که غلظت‌های بالای سیتوکنین TDZ (۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) قهوه ای شدن سریع بافت‌ها را در پی دارد و همچنین از پدیده تمایزیابی جلوگیری می‌کند. اما این آزمایش نشان داد که تنها در غلظت (۲ میلی‌گرم در لیتر) از این سیتوکنین نوساقه‌های باززا شده نمایان شدند. گزارش دادند در رقم‌های شمعدانی *P.* × *hortorum* جایگزین شدن سیتوکنین TDZ به جای هر دو ترکیب اکسین و سیتوکنین هیچ‌گونه اثری در باززایی مستقیم نداشته و تنها سبب جنین زایی سوماتیکی شد (Visser *et all*., 1992). مشاهدات آزمایش نشان داد که TDZ به تنهایی در ریزنمونه‌های دمبرگ و برگ قادر به تحریک پذیری و تولید نوساقه‌ها است. در این تحقیق، هر دو ریزنمونه برگ و دمبرگ رقم‌های شمعدانی اژدر در همه تیمارهای تنظیم کنندی رشدی به کارگرفته شده باززایی مستقیم ساقه را نشان دادند هر چند که درصد باززایی در آن‌ها متغیر بود. گزارشات در مورد گونه‌های شمعدانی نشان می‌دهد که نتیجه تعادل بین تنظیم کننده‌های رشدی اکسین و سیتوکنین در بهینه شدن رشد سلولی موثر است. نسبت بین این تنظیم

کننده‌های رشدی در تحریک بافت‌های تمایز نیافته بسیار اهمیت دارد (Brown, 1986). اگر این نسبت به نفع اکسین بالا باشد سبب تولید کالوس و ریشه‌زایی شده و زمانی که میزان سیتوکنین بالا باشد تمایزیابی ساقه اتفاق می افتد (Beck *et all*., 2009؛ Moyo *et all*., 2012). فاکتورهای متفاوتی در تحریک تشکیل ساقه در شمعدانی موثرند. در برخی رقم‌ها کاهش غلظت نمک‌های MS باعث بهبود بخشیدن به تشکیل ساقه می‌شود (Hildebrandt, 1988) و همچنین نوع و غلظت‌های تنظیم کننده‌های رشدی (Desilets *et all*., 1993) و نوع ریزنمونه و حتی سن فیزیولوژیکی (Misra, 2010) در درصد باززایی مستقیم ساقه تاثیرگذار است (Chang *et all*., 1996).

آزمایشات ابتدایی جهت انتخاب بهترین غلظت برای TDZ بین دو سطح ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر نشان داد که در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر باززایی ساقه اتفاق نیفتاد در حالی که کاربرد TDZ به تنهایی در غلظت ۲ میلی‌گرم سبب تمایزیابی و در نهایت باززایی ساقه شد و نیز زمانی که در ترکیب با دو تنظیم کننده رشدی BAP و NAA به کاربرده شد باززایی به مراتب بیش‌تری را نشان داد که برهمکنش مثبت بین این تنظیم کننده‌های رشدی را در افزایش رشد و تقسیم سلولی نشان می‌دهد. این تنظیم کننده رشد اثر شایان توجهی در تمایزیابی (Huetteman *et all*., 1993) جنین زایی (Mithila *et all*., 2001) و همچنین در تشکیل ساقه نابجا (Winkelmann *et all*.,2005) در شرایط درون شیشه-ای انواع شمعدانی‌ها دارد. این نتایج با گزارشات (Arshad *et all*., 2012 ؛ Jinsong *et all*., 2007) در گیاه شمعدانی و همچنین با (Huetteman *et all*., 1993؛ Singh *et all*., 2003) هم‌خوانی دارد. طبق گزارش (Arshad *et all*., 2012) باززایی مستقیم در ریزنمونه برگ دو رقم شمعدانی *Pelargonium capitatum* به نام‌های 'Atomic Snowflake', و 'Attar of Roses' بررسی شد که بهترین محیط کشت برای ریزنمونه برگ هر دو رقم محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و NAA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ بود و بیش‌ترین میزان باززایی برای رقم Atomic و Attar به ترتیب ۹۳ و ۹۳/۵ درصد بدست آمد. (Ghanem *et all*., 2008) گزارش دادند ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ

شمعدانی عطری *P.graveolens* روی محیط کشت LS حاوی ۱میلی‌گرم NAA و غلظت‌های متفاوت BA کشت شدند. بهترین نتیجه برای باززایی مستقیم ساقه برای هر دو ریزنمونه، محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۵ میلی‌گرم در لیتر BA بود. بیش‌ترین تعداد ساقه برای ریزنمونه برگ و دمبرگ ۳۳ و ۳۳/۲۶ محاسبه شد. (Saxena *et all*., 2000) جهت باززایی ساقه از ریزنمونه برگ شمعدانی عطری از سیتوکنین Kin با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر (بجای BA) در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده کردند.

گزارشات کمی وجود دارد که با هدف باززایی مستقیم انواع رقم‌های شمعدانی هر سه تنظیم کننده رشد را همزمان در محیط‌های کشت به کاربرده باشند و در بیش‌تر گزارش‌ها تنظیم کننده‌های رشدی BA و NAA استفاده شده است. در مطالعاتی اثر رژیم‌های تاریکی و نور را در مورد باززایی مستقیم شمعدانی بررسی نموده اند و بر اساس نتایج آن‌ها پیش تیمار دوره تاریکی باعث افزایش و بهبود باززایی ساقه نابجا در ریزنمونه‌های استفاده می‌گردد. در گزارشی بیان شده است که پیش تیمار ۴ هفته تاریکی در شمعدانی پیش نیاز دست یافتن به حداکثر درصد باززایی در این گیاه است (Hassanein *et all*., 2005)

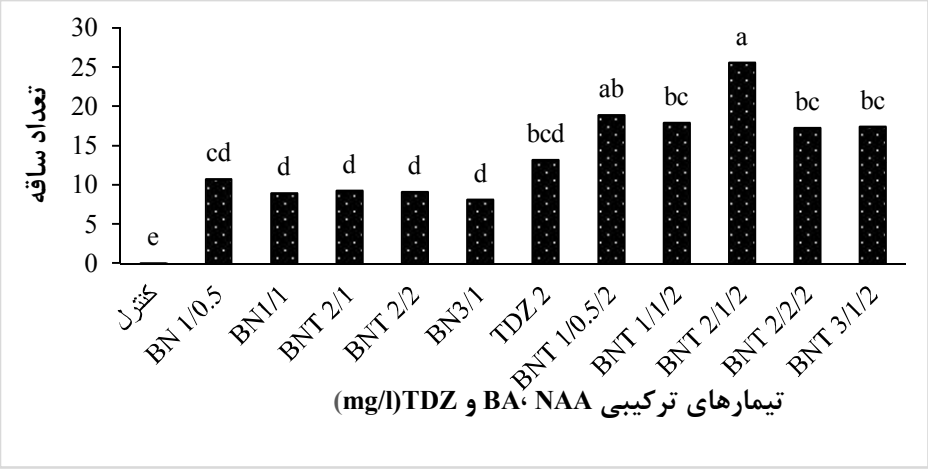
. در گزارشی دیگر ریزنمونه برگ شمعدانی معطر رقم Herit برای ۳۰ روز در شرایط تاریکی قرار گرفتند و بیان کردند که این دوره زمانی برای باززایی مستقیم این رقم بهینه است (Sukhmpinij *et all*., 2010). گزارشی مبنی بر کاهش درصد باززایی ساقه در شمعدانی وجود دارد که بیان می‌کند قرارگرفتن مستقیم ریزنمونه‌ها در شرایط نوری و همچنین بیش‌تر از دو هفته قرارگرفتن در معرض تاریکی درصد باززایی ساقه به صورت قابل توجه کاهش می‌یابد و تاریکی فاکتور بسیار مهم در باززایی مستقیم ساقه است. اثر پیش تیمار تاریکی در جنس‌های دیگر نیز بررسی شده است (Perez *et all*., 2000؛ Zobayed, 2003). این گزارشات نشان دهنده اثرات بازدارنده نوری بر کارایی هورمون‌ها است گویا دوره تاریکی میزان سطوح درونی تنظیم کننده‌های رشد مانند اکسین‌ها را مورد اثر قرار داده و با

برهمکنش با دیگر تنظیم کننده‌های رشدی مانند سیتوکنین‌ها استفاده شده در محیط کشت باعث افزایش باززایی ساقه نابجا می‌شود (Espinosa *et all*., 2006؛Suzuki *et all*., 2004). بر طبق این گزارشات پیش تیمار تاریکی دو هفته در نظر گرفته شد. آزمایش نشان داد که در باززایی ساقه سیتوکنین‌ها در غلظت‌های بهینه و در ترکیب با هم اثرات سینرژیک در محیط کشت داشتند (Van Staden, 2008) و همچنین ترکیب چند سیتوکنین به همراه یک اکسین می تواند اثر سودمندی در افزایش درصد باززایی و تولید ساقه داشته باشد اما در برخی گونه‌ها این‌گونه نیست : گیاه خیار (Kathal *et all*., 1988) و در گیاه هندوانه (Anderson, 1984).

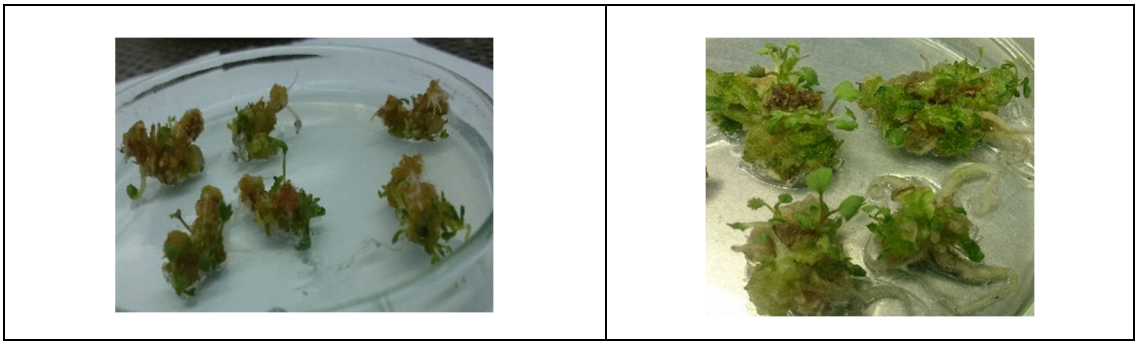
۴-۱-۳-۲- تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد، نوع ریزنمونه و نوع رقم برتعداد ساقه نابجا

بررسی نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴-۵) در مورد تعداد ساقه باززا شده، بیانگر این بود که اثرات ساده تنظیم کننده‌های رشد، نوع ریزنمونه در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند اما اثرات متقابل آن‌ها اختلاف معنی داری را نشان ندادند. نتایج مقایسه میانگین (شکل ۴-۱۴) اثر ساده ترکیب‌های تیماری نشان داد در ترکیب تیماری BA و TDZ با غلظت (۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA با غلظت ۱میلی‌گرم در لیتر بیش‌ترین تعدادساقه (۲۵/۶۱) تولید کرده است. این تیمار با ترکیب تیماری BA و TDZ به ترتیب با غلظت‌های (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در یک گروه جای گرفتند که در این ترکیب تیماری تعداد ساقه ۱۸/۹ بدست آمد. همچنین کم‌ترین تعداد ساقه (۸/۹۶) متعلق به ترکیب تیماری BA با ۳ میلی‌گرم در لیتر و NAA با ۱ میلی‌گرم در لیتر و ترکیب تیماری BA و NAA با ۱ میلی‌گرم در لیتر با تعداد ساقه (۸/۱) مشاهده شد شکل (۴-۱۵). این نتایج مشخص کرد که شاید به‌توان گفت پتانسیل باززایی برگ نسبت به دم-برگ بالاتر است. تعداد ساقه حاصل از ریزنمونه برگ (۱۵/۸۵) و برای دم‌برگ (۱۰/۲۴) حاصل شد

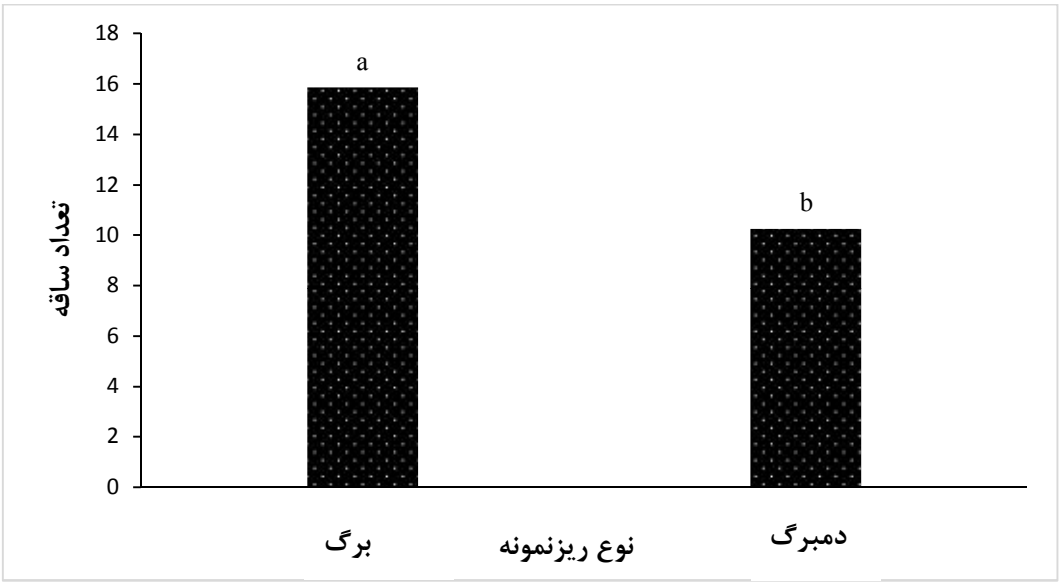
(شکل ۴-۱۶). دلیل آن را می‌توان به میزان سطح غلظت هورمون درونی ریزنمونه‌ها نسبت داد. در محیط‌های کشت مختلف در حضور دو ریزنمونه تفاوت معنی داری در تولید ساقه از نظر آماری مشاهده شد و این نشان دهنده این است که القا نوساقه در گیاه شمعدانی تحت اثر تنظیم کننده‌های رشد به خصوص اکسین و سیتوکنین است (Poudyal *et all*., 2008). ریزنمونه برگ پتانسیل باززایی بالاتری نسبت به ریزنمونه هیپوکوتیل دارد (Krishna *et all*., 1997). افزایش توان باززایی در گیاه شمعدانی با بکارگیری ریزنمونه‌های متفاوت با نتایج تحقیق (Dunbar *et all*., 1989؛ Wojtania, 2004؛Yi *et all*., 2010؛Arshad *et all*., 2012) همخوانی دارد. (Dunbar *et all*., 1989) گزارش دادند که ایده آل‌ترین ترکیب تیماری برای ریزنمونه برگ شمعدانی محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده‌های رشدی (۲ میلی‌گرم BAP و NAA) است که نتیجه آن تولید ۲ تا ۵۰ پریموردیای ساقه بود.



شکل ۴-۱۴ : مقایسه میانگین اثر ساده تیمارهای تنظیم کننده رشد بر تولید ساقه در ارقام آریستو و برمودا



شکل ۴-۱۵: تعداد ساقه تولید شده در بهترین ترکیب تیماری BA، TDZ (۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۱میلی‌گرم در لیتر) در ریزنمونه برگ (راست) و دمبرگ (چپ)



شکل ۴-۱۶ : مقایسه میانگین اثر ساده تیمارهای تنظیم کننده رشد بر تولید ساقه در ارقام آریستو و برمودا

طبق گزارش (Wojtania, 2001) ریزنمونه دمبرگ شمعدانی *P. × hederaefolium* در محیط کشت حاوی تنظیم کننده‌های رشدی اکسین و سیتوکنین قرار گرفتند و بهترین باززایی و تعداد ساقه زمانی حاصل شد که به محیط کشت حاوی BAP و TDZ تنظیم کننده رشدی اکسین IAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر افزوده شد و درصد بازایی ۵۶/۶-۷۰ محاسبه شد و غلظت موثر TDZ ۲ و ۴ میلی-

گرم در لیتر بود پس این مطالعه نقش مهم تنظیم کننده رشدی TDZ را در تحریک باززایی ساقه از ریزنمونه دمبرگ نشان داد. همچنین (Robichon *et all*., 1997) گزارش داد که اضافه کردن تنظیم کننده رشدی اکسین IAA در محیط غنی شده از تنظیم کننده رشدی TDZ اثر افزایشی در باززایی ساقه و تعداد ساقه در ریزنمونه دمبرگ چندین رقم شمعدانی *P. peltatum* دارد. این تاثیر در سایرگونه‌های گیاهی نیز مشاهده شده است : گیاه رودودندرون (Mertens *et all*., 1996) و در گیاه جاتروپا (Liu *et all*., 2015) و در گیاه *Harpagophytum* (Grabkowska *et all*., 2014) و همچنین در گیاه پتوس (Luping *et all*., 2002). (Xie *et all*.,2004) گزارش دادند که مناسب‌ترین ریزنمونه برای پرآوری ساقه، ریزنمونه برگ و ساقه است که بیش‌ترین باززایی در محیط کشت حاوی BAP و NAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. طبق گزارش (Arshad *et all*., 2012) ریزنمونه برگ شمعدانی Atomic و Attar ‘ .*Pelargonium capitatum* cv در محیط کشت‌های همراه با سطوح متفاوت از اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها کشت شدند و بر اساس نتایج، بیش‌ترین تعداد ساقه برای رقم Attar ۱۰۲/۸ و برای رقم Atomic ۱۰۳/۲ گزارش گردید. مطالعات دیگری نیز در مورد تاثیر متفاوت تیمارهای تنظیم کننده رشدی مانند TDZ بر درصد باززایی ساقه و تولید ساقه از ریزنمونه-های مختلف شمعدانی *P .hortorum* وجود دارد : کوتیلدون (Murthy *et all*., 1996) و هیپوکوتیل (Hutchinson *et all*., 1996 ؛Visser *et all*., 1992). (Hassanein *et all*., 2005) گزارش دادند که کشت ریزنمونه دیسک برگی در محیط های کشت MS حاوی تنظیم کننده‌های رشدی BA و Zeatin با ترکیبی از اکسین‌های مختلف در شمعدانی *P. capitatum* و شمعدانی *P. graveolens* با ۱۰۰ درصد باززایی ساقه همراه بود و این میزان باززایی در محیط های کشتی با ترکیب تیماری ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و Zeatin به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA با اعمال پیش تیمار تاریکی برای ۴ هفته حاصل شد. تعدادساقه در رقم اول ۱۱/۴ و در رقم دوم ۷/۳ بدست آمد. بهترین ترکیب تیماری برای شمعدانی *P. × hortorum* محیط کشت غنی شده از تنظیم کننده‌های رشدی BA و

Zeatin با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و تنظیم کننده رشدی NAA با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بود که درصد باززایی برای این نوع شمعدانی ۱۰۰ درصد و تعدادساقه ۷/۵ بدست آمد. (Qureshi *et all*., 1992) گزارش دادند که بذرهای چند رقم از شمعدانی *P.* × *hortorum* در محیط‌های با انواع ترکیب تیماری مختلف (غلظت‌های مختلف BA و یک غلظت IAA) کشت شدند. پیش تیمار تاریکی برای ده روز برای این آزمایش انتخاب شد. بهترین پاسخ در ترکیب تیماری BA و IAA با غلظت ۲۰ میکرومولار بود که در نتیجه آن تنها یک رقم در این ترکیب تیماری بیش‌ترین تعداد ساقه (۲۰/۴) را تولید نمود.

در آزمایش دیگر دو رقم جهت بررسی اثر تنظیم کننده رشدی TDZ با ۴ سطح در تولید ساقه نابجا بررسی شد. مناسب‌ترین غلظت برای یکی از رقم‌ها ۱ میکرومولار بود در نتیجه آن تعداد ساقه تولیدی در این محیط کشت ۱۳-۱۹ بدست آمد و در رقم دیگر بهترین غلظت ۲ میکرومولار از این تنظیم کننده رشدی بود که سبب تولید ۱۱-۱۹ ساقه شد.

آزمایش نشان می‌دهد که سیتوکنین TDZ به تنهایی قادر به تولید نوساقه است و طبق (شکل ۴-۱۴) در این پژوهش تعداد ساقه‌های تولید شده توسط این سیتوکنین نسبت به زمانی که دو تنظیم کننده رشدی NAA و BA در محیط کشت باشند، بیش‌تر است. پس می‌توان نتیجه گرفت که این سیتوکنین به عنوان یکی از مهم‌ترین تنظیم کننده‌های رشدی در باززایی مستقیم ساقه در شمعدانی اژدر تاثیر دارد (Dewir *et all*., 2010). باززایی در شرایط کشت درون شیشه ای در شمعدانی تحت اثر تنظیم کننده‌های رشد درونی و بیرونی و وابسته به مقادیر اکسین، سیتوکنین و نوع ریزنمونه و شرایط محیط کشت است (Skoog, 1957). (Ghanem *et all*., 2008) گزارش دادند که کشت ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ شمعدانی عطری *P.graveolens* روی محیط کشت LS حاوی ۱میلی‌گرم در لیتر NAA و غلظت‌های متفاوت BA بیش‌ترین تعداد ساقه حاصل شد که در ریزنمونه برگ ۳۲ و

در ریزنمونه دمبرگ ۲۶/ ۳۳ بدست آمد. (Chang *et all*., 1996) ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل رقم‌های شمعدانی *Pelargonium ×hortorum* را در بررسی تولید ساقه استفاده کردند. بیش‌ترین تشکیل ساقه در ریزنمونه کوتیلدون (۰/۲-۲) و در ریزنمونه هیپوکوتیل ۴۰ ساقه در محیط کشت حاوی ۲/۸-۵/۶ میلی مولاراکسین IAA به همراه ۴/۶ میلی مولار Zeatin و ۴/۵ میلی مولار TDZ بدست آمد. به طوریکه میزان باززایی ساقه در ریزنمونه‌های متفاوت در بین رقم‌ها اختلاف داشتند. (Jinsong *et all*., 2007) ریزنمونهای برگ و دمبرگ شمعدانی مسکویت را در محیط کشت حاوی غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های BA، TDZ، Kin، NAA و D-۲,۴ کشت کردند که بیش‌ترین تعداد ساقه در محیط کشت حاوی BA و NAA با غلظت‌های ۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. آزمایش نشان داد که تنظیم کننده‌های رشدی BA وTDZ به عنوان مهم‌ترین تنظیم کننده رشدی نسبت به سایر تنظیم کننده‌های رشدی در فرآیند باززایی ساقه موثر بودند که اثر آن‌ها در ریزنمونه‌های برگ و کوتیلدون گونه‌های دیگرگیاهان (Campton *et all*., 1993؛ Ainsley *et all*., 2000؛ Ma *et all*., 2006) نیز اثبات گردیده است. هرچند که سیتوکنین TDZ در آزمایش نشان داد که به تنهایی قادر به باززایی ساقه در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ در این رقم‌ها شد اما در ریزنمونه برگ شمعدانی *Pelargonium ×hortorum* رقم Baily باعث تحریک جنین‌زایی سوماتیکی شد (Qureshi *et all*., 1992؛ Visser *et all*., 1992). در گزارش (Ghanem *et all*., 2008) سیتوکنین BA در غلظت بالاتر (۵ میلی‌گرم در لیتر) با اکسین NAA با غلظت ۱میلی‌گرم در لیتر بیش‌ترین باززایی را در ریزنمونه برگ و دمبرگ شمعدانی عطری ایجاد کرد. این نشان می‌دهد که تفاوت‌های زیادی بین شمعدانی ها از نظر سیستم تحریک ساقه وجود دارد. (Brown, 1986) آن‌ها اثر تنظیم کننده‌های رشد را در رشد و تمایزیابی چندین گونه شمعدانی مانند *P.australe* و *P.citriodorum* بررسی کردند. آن‌ها اظهار داشتند که تمایزیابی برگ شمعدانی ممکن است از طریق کاربرد تنظیم کننده‌های رشد خصوصا BA و NAA کنترل شود. آن‌ها بازگو کردند که دفعات باززایی برای رقم‌های

مشابه از منبع متفاوت ریزنمونه، انعکاس تغییراتی از شرایط فیزیولوژیکی ریزنمونه‌ها است. مطالعات اخیر ثابت کرده شمعدانی پتانسیل تمایزیابی خود را تا دو سال پس از رشد در شرایط درون شیشه ای حفظ می‌کند (Wojtania, 2001). (Satyakala *et all*., 1995) گزارش دادند که درصد باززایی و تولید ساقه در ریزنمونه گره نسبت به برگ و دمبرگ بیش‌تر است. (Zuraida, 2013) گزارش دادند که ریزنمونه ساقه و برگ پتانسیل بالاتری از نظر تولید نوساقه نسبت به ریزنمونه‌هایی مانند دمبرگ دارد.

۴-۱-۳-۳- تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد، نوع ریزنمونه و نوع رقم بر طول ساقه

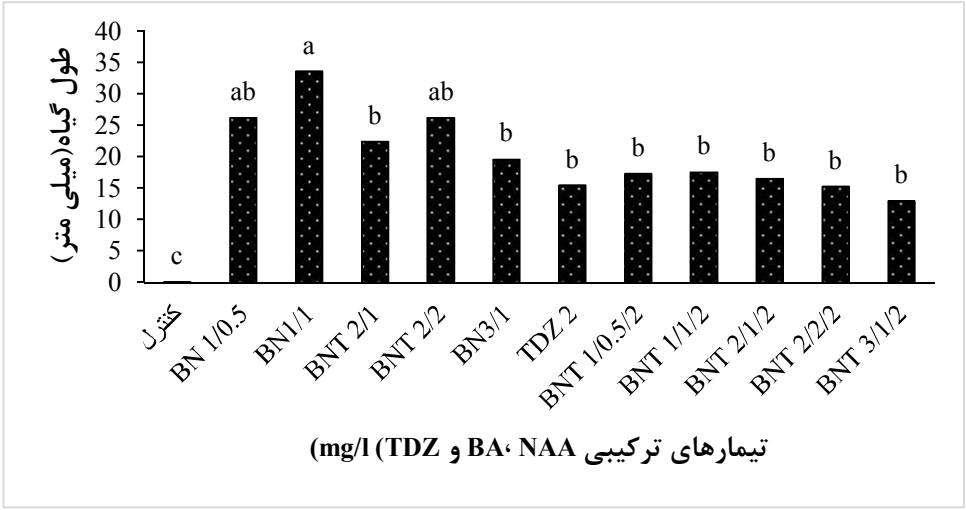
طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴-۶) اثر ساده تیمارهای تنظیم کننده رشدی در سطح یک درصد در صفت طول گیاه شمعدانی معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین های (شکل ۴-۱۷) مربوط به اثر ساده ترکیب تیماری نشان داد که بیش‌ترین طول ساقه (۳۳/۲۵ میلی‌متر) در ترکیب تیماری BA و NAA (۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) از نظر آماری وجود داشت که با ترکیب‌های تیماری BA و NAA (۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و ترکیب دیگر NAA و BA (۲ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در یک گروه آماری قرار گرفتند و اختلاف معنی داری بین آن‌ها در سطح یک درصد مشاهده نشد. کم‌ترین طول ساقه به ترتیب (۱۳/۰۱ میلی‌متر) در ترکیب تیماری BA و NAA و TDZ،(۳ و ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) حاصل شد. فرآیندهای فیزیوژیکی در گیاهان تحت اثر هورمون‌ها است. به طورکلی سیتوکنین‌ها در بسیاری از مراحل فیزیولوژیکی در گیاه موثرند. افزوده شدن سیتوکنین‌ها به محیط کشت برای ترغیب تقسیم سلولی، تشکیل شاخساره و پرآوری شاخساره جانبی و همچنین تنظیم کننده‌های رشدی اکسین طویل شدن سلول‌ها را تحریک می‌کند (George, 1993). تعادل بین تنظیم کننده-های رشدی اکسین و سیتوکنین یک فاکتور مورفوژنتیکی تعیین کننده و مهم بشمار می‌آید (Abbasi *et all*., 2007). غلظت‌های ضعیف اکسین در حضور سیتوکنین‌ها آغاز طرح ریزی جوانه‌ها را امکان

پذیر می‌سازد.

جدول ۴-۶ : تجزیه واریانس اثر تیمارهای ترکیبی غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد BA، NAA، TDZ، نوع رقم و ریزنمونه در ارقام آریستو و برمودا بر طول ساقه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
		طول گیاه
تنظیم کننده رشد	۱۱	۱۷/۵۵۹**
رقم	۱	۰/۱۶۹ns
تنظیم کننده رشد × رقم	۱۱	۰/۹۴۴ ns
ریزنمونه	۱	۴/۲۷۶ ns
تنظیم کننده رشد × ریزنمونه	۱۱	۱/۳۲۷ns
رقم × ریزنمونه	۱	۰/۱۷۹ ns
تنظیم کننده رشد × رقم × ریزنمونه	۱۱	۰/۳۳۵ ns
خطا	۹۶	۱/۷۶۲
ضریب تغییرات		۹/۱۷

* معنی‌داری در سطح ۵٪ ، ** معنی‌داری در سطح ۱٪ و ns عدم معنی‌داری



شکل ۴-۱۷ : مقایسه میانگین اثر ساده تیمارهای تنظیم کننده رشد بر طول ساقه در ارقام آریستو و برمودا

تنظیم کننده‌های رشد اثر متقابل روی همدیگر داشته و می‌توانند اثرات همدیگر را بهبود ببخشند (Delpozo *et all*., 2005). بر طبق پژوهش انجام گرفته افزودن سیتوکنین BA با غلظت بالا در محیط کشت حاوی اکسین در ریزنمونه‌ها تولید نوساقه را تحریک کرد اما به نوعی این ساقه‌ها نسبت به برخی گیاهان در محیط کشت حاوی غلظت‌های کمتر تنظیم کننده‌های رشدی اکسین و سیتوکنین دارای طول بسیارکم‌تری بودند. علت این تفاوت این است که سیتوکنین‌ها در غلظت‌های بالا تولید ساقه‌های کوتاهی را موجب می‌شوند. در برخی کشت‌ها موجب ساقه‌هایی با رشد رزت شده و یا روند رشد ساقه‌ها را کاهش می‌دهند. رشد سریع و تولید ساقه‌های سالم تنها در صورت حضور با هم تنظیم کننده‌های رشدی اکسین و سیتوکنین و نیز در غلظت‌های بهینه امکان پذیراست (Ipecki, 2004؛ Callioux,1978). (Sajid *et all*., 2006) گزارش دادند که ترکیب سیتوکنین BA به همراه اکسین IAA سبب طویل شدن ساقه در گیاه انگور شد. پژوهشگران در مطالعاتی یافتند که سیتوکنین BA در غلظت بالای ۲۰ میکرومولار و TDZ در غلظت بیش‌تر از ۲ میکرومولار طویل شدن ساقه را کاهش می‌دهد و گروهی از جوانه‌های گرد کوچک را تولید می‌کند (Arshad *et all*., 2012). نتیجه این قسمت از آزمایش با گزارش‌های (Saxena *et all*., 2000، Wojtania, 2001؛ Moyo *et all*., 2012؛ Zuraida, 2013) موافق است. طبق گزارش Zuraida, 2013 در واکشت اول ریزنمونه‌های مختلف (دم‌برگ و نوک ساقه، گره) در محیط کشت محتوی غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشدی اکسین و سیتوکنین، بیش‌ترین طول ساقه در محیط کشت حاوی IBA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه نوک ساقه بدست آمد و در واکشت دوم نیز همین مقدار از این اکسین بیش‌ترین تاثیر را در طول ساقه داشت. محیط کشت دارای ترکیب تیماری BA و IAA به ترتیب با غلظت های ۳ و ۱ میلی‌گرم در لیتر کم‌ترین طول ساقه را داشت. (Ghanem *et all*., 2008) گزارش دادند که طول گیاهان باززا شده از برگ در یک ترکیب تیماری مشابه (BA با ۵ میلی‌گرم در لیتر و NAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر) نسبت به ریزنمونه دم‌برگ بیش‌تر شد. در بیش‌تر موارد نشان داده شده

که اثرات همسو از ترکیب شدن سیتوکنین BA به همراه NAA در غلظت‌های بهینه سبب افزایش ارتفاع گیاه نسبت به محیط کشت حاوی یک تنظیم کننده رشد می‌شود که با نتیجه این پژوهش موافق است (Ezeibekwe *et all*., 2009). در غیاب اکسین، سیتوکنین فعالیتی در انجام تقسیم سلولی ندارد. در حقیقت بسیاری از بافت‌ها همانند مغز تنباکو برای رشد در محیط کشت، به اکسین یا سیتوکنین و یا هر دو نیاز دارند (مور، ۱۳۸۲).

۴-۱-۴- نتایج آزمایشات ریشه زایی

بعد از ۸ هفته از آغاز کشت، تعدادی از ساقه‌های نمو یافته با طول تقریبی (۱-۳ سانتی‌متر) از بهترین ترکیب تیماری (ساقه‌های با کیفیت و ظاهر نرمال) BA، NAA و TDZ (۲، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) هر دو رقم از مرحله باززایی مستقیم به صورت تصادفی انتخاب شدند و در محیط کشت MS ۱/۲ حاوی دو نوع اکسین IAA با چهار سطح غلظت (۲، ۱/۵، ۱ ،۰) و IBA نیز با همان تعداد سطوح با غلظت‌های (۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰) میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند. بعد از گذشت یک ماه از ریشه‌زایی داده‌ها ثبت شد.

۴-۱-۴-۱- تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد و نوع رقم بردرصد ریشه زایی

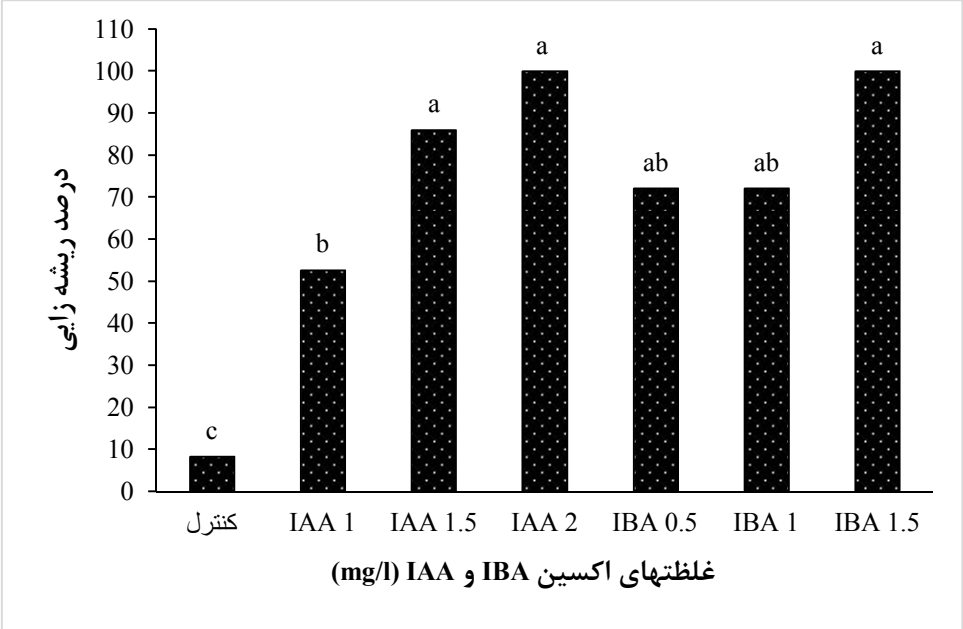
جدول تجزیه واریانس (۴-۷) نشان می‌دهد که اثرات متقابل تیمار در رقم بر درصد ریشه‌زایی اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد نداشت و تنها اثر ساده تیمار تنظیم کننده رشدی در سطح یک درصد و رقم در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌دار نشان داد. مقایسه میانگین (شکل ۴-۱۸) نشان داد که بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی (۱۰۰ درصد) در تیمار IBA با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و IAA با سطح غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بود که این دو ترکیب تیماری به همراه تمامی سطوح IBA در یک گروه قرار گرفتند. کم‌ترین درصد ریشه‌زایی (۸/۳۳) در گیاهان کنترل و سپس در تیمار IAA با

غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد. مقایسه میانگین (شکل ۴-۱۹) اثر ساده رقم نشان داد که رقم آریستو درصد ریشه‌زایی (۷۶/۱۸) بیش‌تری نسبت به رقم برمودا (۶۴/۲۸) دارد.

جدول ۴-۷: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد IBA و IAA و نوع رقم در ارقام آریستو و برمودا بر درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد ریشه‌زایی	تعداد ریشه
تنظیم کننده رشد	۶	۶۱۶۸/۸۸۱**	۱۳/۴۲۹**
رقم	۱	۱۴۸۸/۰۹۵*	۰/۰۰۱ ns
تنظیم کننده رشد × رقم	۶	۲۶۸/۹۸۱ ns	۰/۲۹۷ *
خطا	۲۸	۲۶۴/۵۴۹	۰/۲۸۵
ضریب تغییرات		۲۳/۱۶	۲۱/۵۳

* معنی‌داری در سطح ۵٪ ، ** معنی‌داری در سطح ۱٪ و ns عدم معنی‌داری



شکل ۴-۱۸ : مقایسه میانگین اثر ساده تیمارهای تنظیم کننده رشد بر درصد ریشه‌زایی در ارقام آریستو و برمودا

شکل ۴-۱۹ : مقایسه میانگین اثر ساده رقم بر درصد ریشه‌زایی در ارقام آریستو و برمودا

(Satyakala *et all*., 1995) ساقه‌های شمعدانی عطری به طول ۱ تا ۳ سانتی‌متر را به محیط کشت محتوی سه اکسین IBA، NAA و IAA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر انتقال دادند که بیش‌ترین درصد تشکیل ریشه در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA انجام گرفت. (Hassanein *et all*., 2005) برای ریشه‌زایی شمعدانی *P. Capatatum* از غلظت کمتری از اکسین IAA (۱ میلی-گرم در لیتر) برای ریشه‌زایی استفاده کرد. (Arshad *et all*., 2012) ساقه‌های باززا شده از دو رقم شمعدانی *Pelargonium capitatum* را در محیط کشت اکسین IAA با غلظت‌های مختلف کشت کردند که بالاترین درصد ریشه‌زایی برای هر دو رقم در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. درصد ریشه‌زایی برای رقم Atomic و Attar به ترتیب ۸۹ و ۹۱ درصد محاسبه شد. (Rosy *et all*., 2015) از اکسین IBA با سه غلظت برای ریشه‌زایی شمعدانی *Pelargonium graveolens* استفاده نمودند. مطلوب‌ترین غلظت برای ساقه‌ها محیط کشت ۱/۲MS حاوی ۹/۸ میکرومولارIBA گزارش شد. (Saxena *et all*., 2000) جهت القای ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های rose scented Pelargonium، محیط کشت ۱/۲MS محتوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بکار برد. (Rao, 1994) جهت القای ریشه‌زایی شمعدانی عطری، تنظیم کننده رشدی IBA با غلظت‌های متفاوت و فلورگلوسینول استفاده شد که

بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی (۶۵ درصد) در محیط کشت ۱/۲MS به همراه IBA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. (Sukhmpinij *et all*., 2010) گزارش دادند برای ریشه‌زایی در گونه ای دیگر از شمعدانی *Pelargonium rapaceum* ساقه‌ها را به محیط کشت محتوی اکسین NAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کشت کردند و ۶۶/۷ درصد ریشه‌زایی رخ داد. (Jinsong *et all*., 2007) ساقه‌های شمعدانی هیبرید را در محیط کشت حاوی تنظیم کننده رشدی IBA با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر انتقال دادند و نسبت به گیاهان کنترل، ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی انجام شد. (Moyo *et all*., 2012) ساقه‌ها در محیط کشت حاوی اکسین‌های مختلف، تفاوت در ریشه‌زایی نشان دادند که حداکثر پاسخ ریشه‌زایی (۹۱ درصد) مربوط به تیمار IBA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. تفاوت در ریشه-زایی بین رقم‌های یک نوع شمعدانی مربوط به تفاوت اختلاف غلظت هورمون‌های درونی خود رقم‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی بین آن‌ها است. از طرف دیگر تعداد برگ به گونه ای بر میزان فتوسنتز اثر گذاشته و در نتیجه فتوسنتز بیش‌تر می‌شود و ریشه هم که یک سینک قوی برای دریافت مواد غذایی است و رشد آن زیاد می‌گردد. غلظت اکسین بر درصد ریشه‌زایی و تشکیل ریشه‌های سالم از ساقه تاثیرگذار است به طوریکه درغلظت‌های بالا با کاهش درصد ریشه‌زایی همراه بوده و همچنین ریشه‌های تولید شده ضخیم شده و نیز در اطراف ساقه کالوس تولید می‌شود. شمعدانی از گیاهانی با توانایی بسیار کم، خود ریشه‌زایی (Self-rooting) است (Cassells *et all*., 2001).

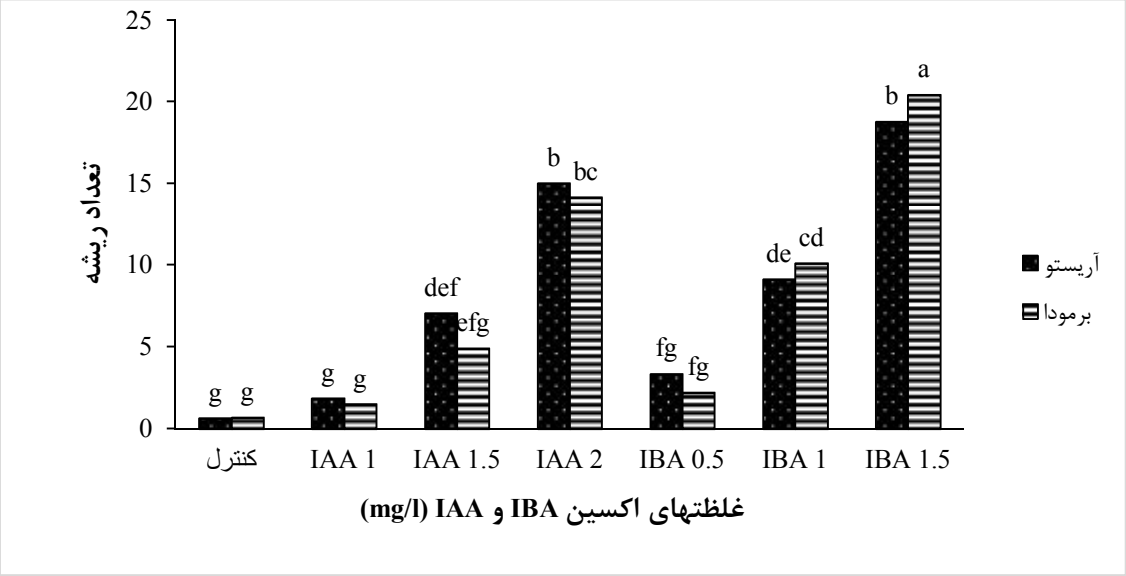
اکسین‌ها در فرآیندهای متعدد نمویی مانند تقسیم سلولی و طویل شدن سلول‌ها و همچنین آماس بافت در غلظت‌های کم (Wilmoth *et all*., 2005) شرکت دارند. ریشه‌ها در محیط کشت حاوی اکسین IAA بعد از گذشت تقریبا ۳ هفته ظاهر شدند و بر خلاف آن ریشه‌ها در محیط کشت حاوی IBA سریع‌تر (یک هفته) بوجود آمدند. (Gasper *et all*., 1996) گزارش دادند که اکسین‌ها فرآیندهای پیچیده در تشکیل ریشه‌های جانبی را از طریق تقسیمات متعدد تحریک می‌کنند. (George *et all*., 2008) گزارش دادند برای حفظ قطبیت در گیاه اکسین‌ها ضروری هستند و به

علاوه غلظت‌های بالا بر ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه اثر عکس می‌گذارند. میزان ریشه‌زایی در گیاهان از طریق اکسین‌های درونی گیاه و همچنین اکسین درون محیط کشت کنترل می‌شود. برخی از گیاهان کنترل از هر دو رقم در محیط بدون تیمار ریشه دار شدند که این تحریک ریشه ممکن است به علت فعالیت اکسین درون گیاه باشد و نیز ریشه‌دار شدن گیاهان کنترل گاهی به ژنوتیپ وابسته است در نتیجه پاسخ به ریشه‌زایی به شدت تحت اثر اکسین‌های درونی گیاه است که از محل سنتز یعنی نوک ساقه انتقال می‌یابند (Fogac, 2005). عمومی‌ترین اکسین‌ها در سیستم‌های تکثیر تجاری گیاهان بعد از IAA و NAA، اکسین IBA است (De Klerk *et all*., 1997). افزون بر این (De Klerk *et all*., 1999) توضیح دادند اختلاف در پاسخ میزان ریشه‌دار شدن، به علت تفاوت در میل ترکیبی ویژه برای گیرنده‌های اکسین دخیل در ریشه‌زایی و غلظت اکسین درون گیاه و همچنین غلظت اکسین آزاد در دسترس سلول‌های هدف است. سنجش و شناسایی سطوح اکسین داخلی منجر به درک فیزیولوژی ریشه‌زایی می‌شود. این آزمایش نشان داد که ارتباط خطی قوی بین پاسخ ریشه-زایی و غلظت IBA و IAA وجود داشت به طوری که با افزایش غلظت اکسین‌ها درصد ریشه‌زایی نیز افزایش یافت (Moyo *et all*., 2012).

۴-۱-۴-۲- تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد و نوع رقم بر تعداد ریشه‌های تشکیل یافته

نتایج جدول تجزیه واریانس (۴-۷) نشان می‌دهد که اثر متقابل تیمارهای ریشه‌زایی و رقم در صفت تعداد ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی دار بوده است و این نتایج گویای این است که تیمارها در ریشه‌زایی رقم‌ها در این صفت اثرات مختلفی داشتند و در نتیجه آن اثرات، به تبع تعداد ریشه تشکیل یافته درآن‌ها متغیر بود. مقایسه میانگین شکل(۴-۲۰) نشان داد که ریشه‌زایی اکثر ساقه‌های هر دو رقم در غلظت‌های متفاوت دو اکسین، تحریک شد. برای هر دو رقم بهترین غلظت از

اکسین IBA، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بود که حداکثر تعداد ریشه برای رقم برمودا (۲۰/۴۴) و برای رقم آریستو (۱۸/۷۷) بدست آمد و در دو گروه مجزا قرار گرفتند. از نظر تعداد ریشه سطح غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA برای رقم آریستو با سطح غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA برای هر دو رقم آریستو و برمودا در یک گروه قرار گرفتند. تعداد ریشه در تیمار با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA برای آریستو (۱۵) و در رقم دیگر (۱۴/۱۶) حاصل شد. کم‌ترین تعداد ریشه برای هر دو رقم در محیط کشت محتوی IAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و IBA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و گیاهان کنترل مشاهده گشت (شکل ۴-۲۱). آزمایش نشان داد که بیش‌ترین پاسخ تعداد ریشه در گیاهان تیمار شده با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود و علت آن پایداری این اکسین در برابر اکسید شدن نوری و حساسیت کم‌تر آن به آنزیم‌های تخریب‌گر اکسین است (Fogac, 2005 ؛ Rio *et all*., 1989). جهت القا ریشه از محیط کشت MS ۱/۲ استفاده شد زیرا در محیط کشت MS کامل ریشه‌های نازک و سطحی تولید می‌شود (Saxena *et all*., 2000) و همچنین در محیط کشت MS غلظت بالای نمک‌ها سبب کاهش پتانسیل آب شده که در پی آن از جذب آب و مواد غذایی جلوگیری می‌کند.



شکل ۴-۲۰ : مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای تنظیم کننده رشد و رقم بر تعداد ریشه در ارقام آریستو و برمودا

شکل ۴-۲۱ : اثر بهترین تیمارهای ریشه‌زایی راست (IBA با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و چپ : (IAA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر)

(Sukhmpinij *et all*., 2010) از اکسین NAA با غلظت‌های متفاوت برای القا ریشه‌زایی شمعدانی استفاده کردند. بهترین نتیجه در ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر این اکسین بدست آمد که در پی آن ۲۶/۶ ریشه تولید شد. (Chang *et all*., 1996) ریزنمونه‌ها را در محیط کشت MS با غلظت‌های متفاوت اکسین کشت نمودند . مطلوب‌ترین نتیجه محیط کشت حاوی IAA با غلظت ۵/۷ میکرومولار بود که بالاترین تعداد ریشه را بدنبال داشت در حالی که بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی در گیاهان کشت شده در محیط کنترل حاصل شد. (Zuraida, 2013) با کشت ساقه‌های باززا شده شمعدانی در محیط کشت

حامل ترکیبات تیماری مختلف، بیش‌ترین تعداد ریشه (۱۱) را در محیط کشت حاوی IAA با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر گزارش نمودند اما حداکثر درصد باززایی ریشه در محیط کشت حاوی ترکیب دو اکسین IAA و IBA با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بود. اثر اکسین‌ها در باززایی ریشه در چندین گونه گیاهی اثبات شده است (Echeverrigary, 2001) : (Mohebalipour *et all*., 2012) در گیاه لیمو بالاترین درصد باززایی ریشه و تعداد ریشه را در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر اکسین IAA گزارش نمودند. (Ezeibekwe *et all*., 2009) بهینه‌ترین محیط کشت برای القا ریشه درگیاه *Dioscorea* محیط کشت حاوی اکسین NAA با غلظت ۰/۵میلی‌گرم در لیتر بود که بیش‌ترین تعداد ریشه را تولید نمود. (Tehrim *et all*., 2013) در انگور بیش‌ترین القا ریشه‌زایی و تعداد ریشه در محیط کشت حاوی اکسین IBA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. اکسین‌ها به تنهایی و یا در ترکیب با غلظت‌های بسیار کم سیتوکنین‌ها در القا تشکیل پریموردیای ریشه دخیل اند (Pierik, 1997).

۴-۱-۴-۳- تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد و نوع رقم برطول ریشه‌های تشکیل یافته

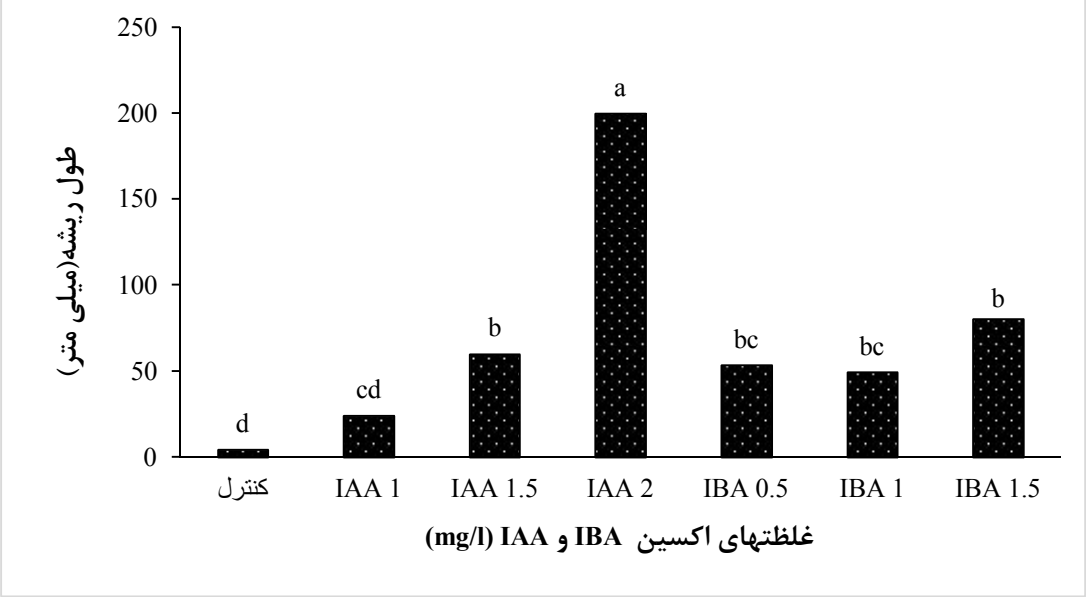
طبق جدول تجزیه واریانس (۴-۸) ملاحظه می‌شود که اثرات متقابل تیمار، رقم و اثر ساده رقم معنی-دار نشدند اما فاکتور تیمار تنظیم کننده رشدی در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری را بر صفت طول ریشه نشان داد و این نشان داد که تیمارهای مختلف بر طول ریشه اثر متفاوت داشتند. شکل (۴-۲۲) بیانگر این است که تیمارIAA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بیش‌ترین اثر را در طویل شدن ریشه نسبت به دیگر غلظت‌ها داشت و طول ریشه برای آن (۲۰۰/۰۳ میلی‌متر) محاسبه شد. در واقع این غلظت از این تیمار هم از نظر تعداد ریشه و هم کیفیت ریشه‌ها برای دو رقم مناسب‌تر بود. در سطح سوم IBA طول ریشه (۸۰/۳۳ میلی‌متر) مشاهده شد. کم‌ترین طول ریشه در گیاهان کنترل

(۴/۳۳میلی‌متر) و سطح اول از تیمار IAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر (۲۴/۱۶ میلی‌متر) ثبت شد.

جدول ۴-۸ : تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد IBA و IAA و نوع رقم در ارقام آریستو و برمودا بر طول ریشه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
		طول ریشه
تنظیم کننده رشد	۶	۴۵/۲۹۱**
رقم	۱	۳/۶۴۷ ns
تنظیم کننده رشد × رقم	۶	۱/۵۰۸ ns
خطا	۲۸	۲/۸۵۲
ضریب تغییرات		۱۰/۹۸

* معنی‌داری در سطح ۵٪ ، ** معنی‌داری در سطح ۱٪ و ns عدم معنی‌داری



شکل ۴-۲۲ : مقایسه میانگین اثر ساده تیمارهای تنظیم کننده رشد بر طول ریشه در ارقام آریستو و برمودا

(Zuraida, 2013) گزارش دادند که محیط کشت دارای ۲/ ۰ میلی‌گرم در لیتر اکسین IAA بیش-ترین تاثیر را در طویل شدن ریشه داشت. (Negi *et all*., 2004) بیان کردند که بیش‌ترین درصد تشکیل ریشه (۹۴ درصد) و تعدادریشه (۱۱/۷۶) و طول ریشه ۵/۵۳ سانتی‌متر برای شمعدانی عطری

در محیط کشتIBA با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد. (Moyo *et all*., 2012) بیان کردند اکسین IAA با غلظت‌های ۱ و ۴ میکرو مولار حداکثر طول ریشه را موجب شد. وقتی ساقه‌ها در محیط کشت حاوی غلظت‌های متفاوت IAA و IBA کشت شدند. ریشه‌های جانبی به صورت فراوان در محیط کشت رشد یافتند درحالی که در محیط کشت کنترل فقط تعداد بسیار اندکی از گیاهان ریشه-دار شدند. در غلظت‌های کم این اکسین‌ها ریشه‌های طویل و باریک تولید می‌کنند اما در غلظت‌های زیاد، ریشه‌های کم و قابل شمارش، ضخیم و کوتاه تولید می‌شوند. (Koperdakova *et all*., 2009) گزارش دادند که ساقه‌ها به راحتی در محیط کشت فاقد اکسین تولید می‌شوند در حالی که در دو رقم مورد بررسی در این پژوهش صادق نیست و این رقم‌ها جهت تولید ریشه‌های نابجا نیاز به اکسین خارجی دارند زیرا غلظت اکسین داخل گیاه برای القا ریشه ناکافی است. نتایج آزمایش نشان داد که IBA روی رشد ریشه نابجا اثرات مثبت داشت و این نتیجه با گزارش‌های (Kim *et all*., 2003؛ Wu *et all*., 2006؛ Lee, 2009) موافق است. تشکیل ریشه در گیاهان شمعدانی وابسته به کیفیت ساقه‌ها است بر طبق گزارش (Corneanu *et all*., 1991) که فقط ساقه‌هایی با رشد و نمو مناسب (بیش‌تر از ۱ سانتی‌متر) به راحتی ریشه‌دار می‌شوند. اکسین با غلظت‌های بالا از تشکیل ریشه جلوگیری کرده و پیری را تحریک می‌نماید و درنهایت اثر منفی در سازگاری گیاهان در گلخانه دارد (Wojtania, 2010). گیاهان شمعدانی پاسخ متفاوتی به تیمارهای ریشه زایی دادند و این نشانگر این بود که اکسین‌ها برای ریشه‌زایی شمعدانی ضروری هستند. آزمایش نشان داد در تکثیر و ریشه‌زایی شمعدانی نوع و غلظت تنظیم کننده رشدی و همچنین ژنوتیپ فاکتورهای اصلی هستند.

۴-۱-۴-۴- تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد و نوع رقم بر وزن بیومس ریشه و ساقه و نسبت آن‌ها

جدول تجزیه واریانس (۴-۹) بیانگر این است که اثرات متقابل تیمار در رقم و اثر ساده رقم معنی دار نشده است در حالی که اثر ساده تیمار بر وزن تر ریشه و ساقه در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد. اما فاکتور تیمار بر صفت نسبت وزن ریشه به ساقه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین (شکل ۴-۲۳) نشان می‌دهد که در تیمار IBA با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و IAA با سطح غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بیش‌ترین بیومس تر ساقه به ترتیب (۲۴۲/۲ و ۲۳۱/۱ میلی‌گرم) حاصل شد و در یک گروه آماری قرار گرفتند و کم‌ترین بیومس تر ساقه در تیمار IBA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و تیمار IAA با سطح غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب (۱۷۰/۶ و ۱۴۳/۱ میلی‌گرم) بدست آمد که با گزارش (Kim *et all*, 2003؛ Wu *et all*., 2006؛ Lee., 2009) در مورد اثرات مثبت IBA بر ریشه موافق است. شاید به توان گفت که یک ارتباط مستقیم بین تعداد ریشه و وزن تر شاخساره در این دو رقم وجود دارد. مقایسه میانگین (شکل ۴-۲۴) نشان داد که بیش‌ترین وزن تر ریشه متعلق به سطح سوم IBA (۵۰/۰۲ میلی‌گرم) و سطح سوم IAA (۴۷/۳۱ میلی‌گرم) بود که در یک گروه از لحاظ آماری قرار گرفتند. سایر تیمارهای ریشه‌زایی از نظر وزن تر ریشه در یک گروه جای گرفتند. کم‌ترین وزن تر ریشه در گیاهان کنترل (۰/۹ میلی‌گرم) مشاهده گردید.

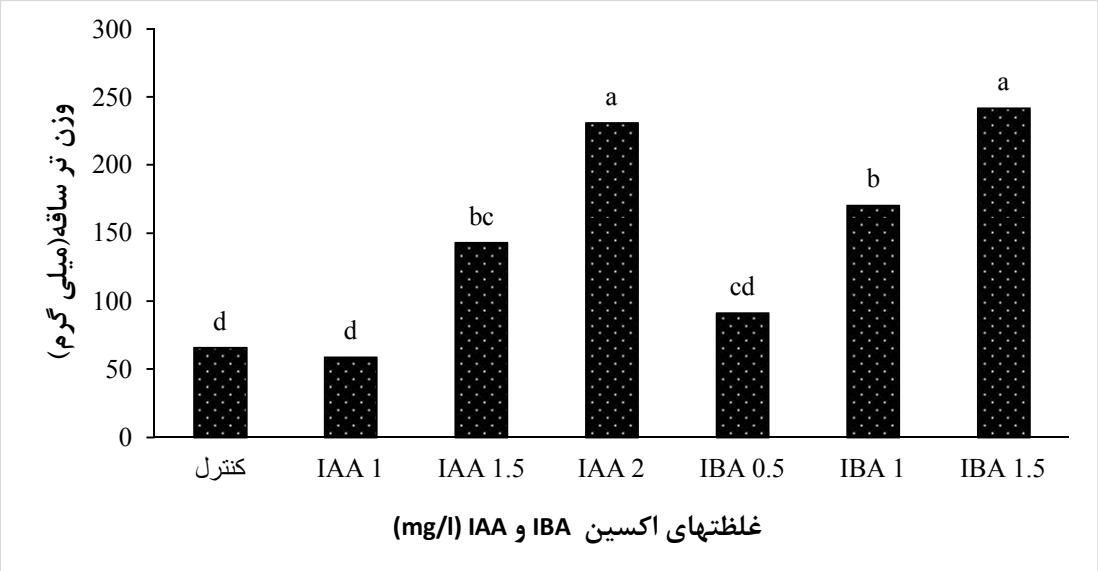
جدول ۴-۹ : تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد IBA ، IAA و نوع رقم در ارقام آریستو برمودا بر وزن تر ریشه و ساقه و نسبت وزن ریشه به ساقه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		وزن ریشه	وزن ساقه	نسبت وزن ریشه به ساقه
تنظیم کننده رشد	۶	۲۸/۵۰۵**	۳۴۰۱۷/۰۱۸**	۰/۲۷۹*
رقم	۱	۰/۲۳۶ ns	۲۵۷/۹۲۰ ns	۰۰/۰۳۵ ns
تنظیم کننده رشد × رقم	۶	۰/۳۱۴ ns	۴۳۹/۶۹۰ ns	۰/۰۱۱ ns
خطا	۲۸	۰/۸۶۲	۱۱۰۱/۸۳۵	۰/۰۲۱
ضریب تغییرات		۲۱/۷۱	۲۳/۱۵	۲۲/۴۸

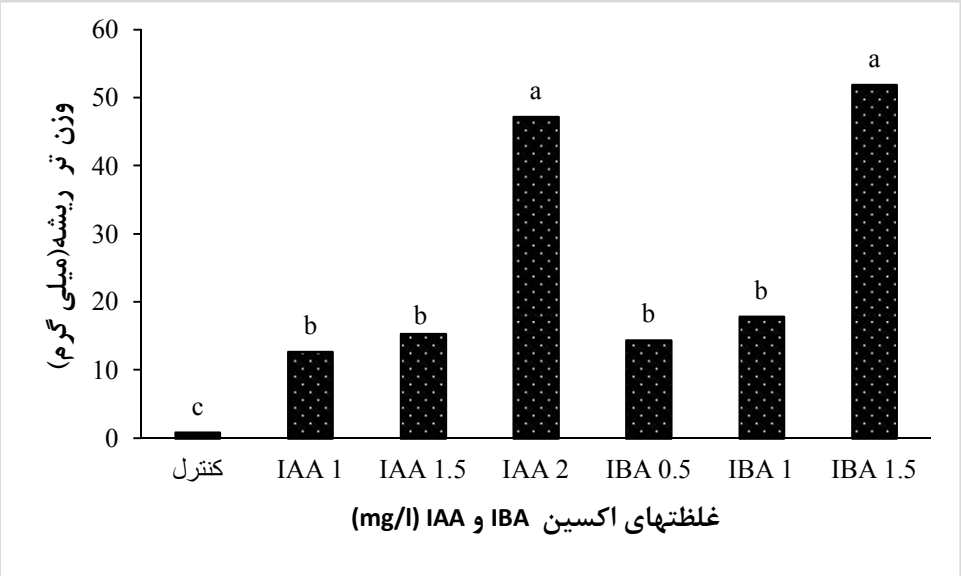
* معنی‌داری در سطح ۵٪ ، ** معنی‌داری در سطح ۱٪ و ns عدم معنی‌داری

مقایسه میانگین (شکل ۴-۲۵) نشان داد که بیش‌ترین نسبت وزن ریشه به ساقه در تیمارIBA با سطح غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (۰/۴۸) و IAA با غلظت ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر (۰/۴۳ و ۰/۳۴) مشاهده شد. همه این تیمارها در یک گروه جای گرفتند. کم‌ترین نسبت بیومس ریشه به ساقه در گیاهان کنترل (۰/۰۷) ثبت شد و پس از آن تیمارهای IAA با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و تیمار تیمار IBA با سطح غلظت ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر در یک گروه قرار یافتند. اثر اکسین‌ها در تسریع رشد و ریشه‌زایی و همچنین در باززایی کالوس و تنوع مورفوژنتیکی ثابت شده است (Kim *et all.*, 2004a ؛ Lee *et all.*, 2006). اکسین‌ها نقش محوری در ارتباط با نسبت بیوس ساقه نسبت به بیومش ریشه دارند و یک همبستگی بین شاخساره با ریشه ها وجود دارد. بالابودن بیومس ساقه سبب افزایش فتوسنتز شده که این به گونه ای با سنتز اکسین ارتباط داشته و سبب افزایش بیومس ریشه می‌شود. نسبت رشد ساقه به ریشه سرعت رشد گیاه Allometry گفته می‌شود. (Moyo *et all.*, 2012) گزارش دادند که بیش‌ترین بیومس ساقه و ریشه به ترتیب در محیط کشت حاوی ۱۰ میکرو

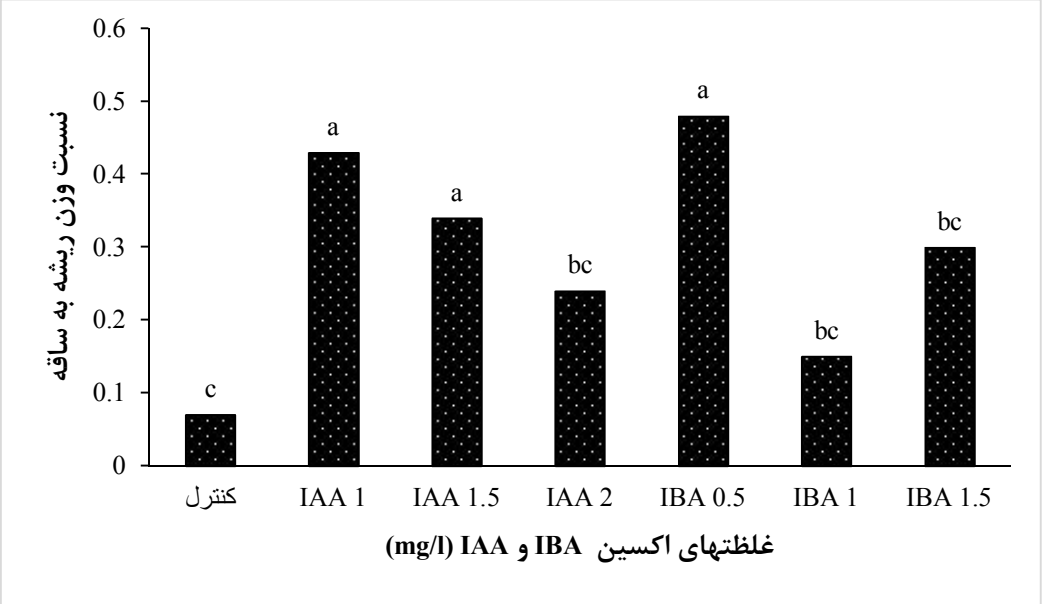
مولارIBA و ۱ میکرومولار IAA در شمعدانی *P. sidoides* بدست آمد. نتایج نشان داد که القا ریشه-زایی توسط اکسین‌های داخلی و خارجی کنترل می‌شود. (Ezeibekwe *et all*., 2009) گزارش دادند در گیاه *Dioscorea Rotundata* حداکثر بیومس ریشه و تعداد ریشه و همچنین نرخ رشدی در محیط کشت ریشه‌زایی حاوی اکسین NAA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم حاصل شد. (Yirssaw *et all*., 2014) نتایج آن‌ها نشان داد که در کاساوا بیش‌ترین میزان طول ریشه و تعداد ریشه و بیومس ریشه و نرخ رشدی در محیط کشت القا ریشه‌زایی حاوی اکسین NAA با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. (Tehrim *et all*., 2013) گزارش دادند که در انگور زمانی که غلظت اکسین IAA و IBA در محیط کشت افزون شد بیومس ریشه روند صعودی داشت. بیش‌ترین بیومس تر ساقه و ریشه به ترتیب در محیط کشت حاوی NAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و بالاترین سطح IBA (۲ میلی-گرم در لیتر) بدست آمد.



شکل ۴-۲۳ : مقایسه میانگین اثر ساده تیمارهای تنظیم کننده رشد بر وزن تر ساقه در ارقام آریستو و برمودا



شکل ۴-۲۴ : مقایسه میانگین اثر ساده تیمارهای تنظیم کننده رشد بر وزن تر ریشه در ارقام آریستو و برمودا



شکل ۴-۲۵ : مقایسه میانگین اثر ساده تیمارهای تنظیم کننده رشد بر نسبت وزن ریشه به ساقه در ارقام آریستو و برمودا

۴-۱-۵- انتقال گیاهان ریشه‌دار رقم‌های آریستو و برمودا از شرایط درون شیشه ای به شرایط گلخانه

۵۶ عدد گیاه شمعدانی ریشه‌دار (از تمامی تیمارها) از هر دو رقم از شیشه‌ها خارج شد و سپس با آب مقطر استریل محیط اطراف ریشه‌ها شسته گشت تا محیط غذایی باقی مانده برطرف شود. برای چند ثانیه در قارچکش مرکاپتانول (۱ در هزار) نگه داشته و در نهایت با احتیاط در لیوان پلی اتیلن استریل محتوی مخلوط استریل خاک باغچه : کوکوپیت : پرلیت به نسبت (۱:۳:۱) کشت شدند. برای حفظ رطوبت روی لیوان پوشیده شد و لیوان‌های حاوی گیاه در زیر سایه بان (۷۰ درصد) قرار داده شدند. هر روز یک منفذ در سطح پوشش ایجاد گشت. بعد ازسپری شدن یک هفته پوشش پلاستیکی حذف و میزان سایه دهی نیز کم‌تر شد. بعداز گذشت ۱۲ روز گیاهان به راحتی با شرایط گلخانه سازگار شدند (Ghasemi *et all*., 2012). درصد زنده مانی در تیمارهای مختلف ریشه‌زایی برای دو رقم ثبت شد این آزمایش با دو تکرار انجام شد و برای هر تیمار و هر رقم دو گیاه در نظر گرفته شد (شکل ۴-۲۶).

جدول تجزیه واریانس (۴-۱۰) نشان می‌دهد اثر ساده رقم و اثر متقابل رقم و تیمار معنی دار نشد. تنها اثر ساده تیمار بر درصد زنده مانی در سطح یک درصد معنی دار شد. نتیجه مقایسه میانگین (شکل۴-۲۷) نشان داد که بیش‌ترین درصد زنده‌مانی (۱۰۰ درصد) برای هر دو رقم در تیمار ریشه-زایی ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. کم‌ترین درصد زنده‌مانی در گیاهان کنترل مشاهده شد. این آزمایش نشان داد که اکسین IAA که بیش‌ترین طول ریشه را داشت و هم تعداد ریشه در آن مناسب بود نسبت به تیمار IBA برای استقرار شمعدانی در شرایط خاک مناسب‌تر است زیرا در دو سطح ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر این اکسین درصد زنده‌مانی به ترتیب ۱۰۰ و ۷۵ درصد بدست آمد در حالی که تنها سطح سوم اکسین IBA درصد زنده‌مانی ۱۰۰ درصد حاصل

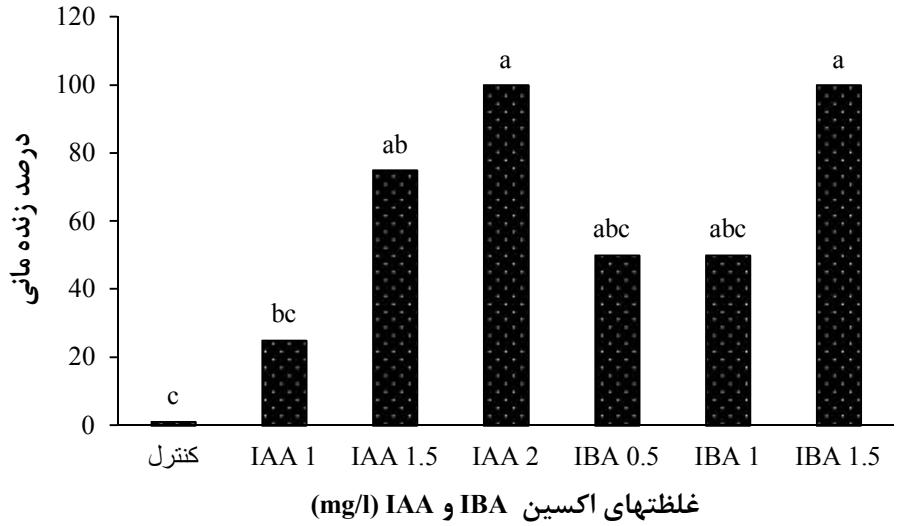
گشت. با توجه به اینکه درصد زنده‌مانی در غلظت‌های بالاتر تیمارهای دو اکسین (IBA، IAA)، افزایش یافت اما نسبت وزن ریشه به ساقه در این تیمارها بسیار کم بود گویا یک رابطه عکس بین درصد زنده مانی و این صفت وجود دارد اما تیمارهایی با درصد زنده‌مانی زیر ۵۰ درصد مانند اکسین (IAA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و IBA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) نسبت وزن ریشه به ساقه بیش‌تری داشتند. به قطع نمی‌توان گفت که این صفت همیشه از قاعده خاصی پیروی می‌کند چرا که تیمار سطح دوم (IAA با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) با اینکه درصد زنده‌مانی گیاهان در محیط کشت حاوی آن ۷۵ درصد بود اما نسبت وزن ریشه به ساقه نیز بالا بود. این نتایج با گزارش (Saxena et all., 2000؛ Satyakala *et all*., 1995) موافق است.

جدول ۴-۱۰: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد IBA، IAA و نوع رقم (آریستو و برمودا) بر درصد زنده‌مانی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
		درصد زنده‌مانی
تنظیم کننده رشد	۶	۴۸/۵۷۹**
رقم	۱	۱۲/۴۰۳ ns
تنظیم کننده رشد × رقم	۶	۱۹/۶۳۸ ns
خطا	۱۴	۱۲/۴۰۳
ضریب تغییرات		۹/۳۲

* معنی‌داری در سطح ۵٪ ، ** معنی‌داری در سطح ۱٪ و ns عدم معنی‌داری

شکل ۴-۲۶ : چپ (دو هفته پس از انتقال به بستر خاک) و راست (۴۵ روز پس از انتقال به بستر خاک)



شکل ۴-۲۷ : مقایسه میانگین اثر ساده تیمارهای تنظیم کننده رشد بر درصد زنده‌مانی گیاه در ارقام آریستو و برمودا

می‌توان این نتیجه را گرفت که درصد زنده‌مانی در گیاهان شمعدانی تحت اثر برآیندی از تعداد ریشه و طول ریشه و وزن بیومس ساقه و ریشه است. گیاهانی که طول ریشه اصلی و تعداد ریشه جانبی و تراکم طول ریشه و نسبت ریشه به اندام هوایی بالاتری دارند نسبت به سایر گیاهان مقاومت بیش‌تری به شرایطی مانند سازگاری به شرایط خاک و تنش‌ها دارند. ضمن اینکه ثبات آن (زنده‌مانی) به توانایی ریشه‌ها برای جذب آب و مواد غذایی موجود در خاک بستگی دارد و این خاصیت تنها با مکانیسم‌های سازگاری مرتبط با ریشه و اندام هوایی حاصل خواهد شد (Singh *et all*., 2003).

نتیجه گیری کلی

نتایج در مرحله استقرار این پژوهش نشان داد ریزنمونه‌های جوانه جانبی رقم آریستو در واکشت اول در محیط کشت محتوی ۲ میلی‌گرم در لیتر سیتوکنین BA بیش‌ترین میزان باززایی (۱۰۰ درصد) مشاهده شد و تعداد ساقه در این تیمار برای رقم آریستو و برمودا (۴۲/۳) ثبت گشت. گیاهان در این تیمار از لحاظ کیفیت ساقه برای واکشت دوم ایده آل‌تر بودند. در این مرحله بیش‌ترین تعداد برگ و وزن گیاه درگیاهان کنترل مشاهده شد. رقم‌های مورد بررسی، پاسخ‌های متفاوت و معنی‌داری در میزان باززایی و تولید ساقه نشان دادند و در بین این دو رقم، آریستو بیش‌ترین درصد باززایی و تولید نوساقه را نشان داد. در واکشت دوم کشت ریزنمونه‌های ساقه استریل از مرحله اول (گیاهان باززا شده از تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر سیتوکنین BA) در محیط کشت غنی از ۱ میلی‌گرم در لیتر سیتوکنین BA بالاترین درصد باززایی (۱۰۰ درصد) و تعداد نوساقه (۴۲/۷۸) را موجب شد در این واکشت بیش‌ترین تعداد برگ و وزن به ترتیب در گیاهان کنترل (تک گیاهچه) و در گیاهان رشد یافته در ترکیب تیماری BA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و IAA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ثبت شد. نتایج آزمایشات باززایی ساقه از ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ نشان داد پیش تیمار دو هفته تاریکی به همراه محیط کشت محتوی ترکیبات تنظیم‌کننده رشدی BA، NAA و TDZ به ترتیب با غلظت‌های (۲ و ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بیش‌ترین درصد باززایی (۸۵/۲) و تولید نوساقه (۲۵/۶۱) را داشت و ریزنمونه برگ پتانسل بالاتری در این دو صفت نسبت به ریزنمونه دم‌برگ نشان داد. حداکثر طول ساقه (۳۳/۲۵ میلی‌متر) در گیاهان رشد یافته در محیط کشت غنی از ترکیب تیماری BA و NAA با غلظت‌های ۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بود. بهترین محیط ریشه‌زایی برای دو رقم محیط کشت محتوی IBA با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و IAA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بود و درصد ریشه‌زایی برای گیاهان رقم آریستو ۷۶/۱۸ و رقم برمودا ۶۴/۲۸ بدست آمد. بیش‌ترین تعداد ریشه برای رقم آریستو و

برمودا در تیمار ریشه‌زایی IBA با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۲۰/۴۴ و ۱۸/۷۷ ثبت شد. حداکثر طول ریشه (۲۰۰/۰۳ میلی‌متر) در گیاهان رشد یافته در تیمار ریشه‌زایی IAA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بود. در تیمار ریشه‌زایی IBA با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و IAA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بیش‌ترین وزن ساقه ۲۳۱/۱ و ۲۴۲/۲ میلی‌گرم و حداکثر وزن ریشه ۵۲/۰۲ و ۴۷/۳۱ میلی‌گرم ثبت شد. بالاترین نسبت وزن ریشه به ساقه در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد. نتایج نشان داد بیش‌ترین درصد زنده‌مانی (۱۰۰ درصد) برای هر دو رقم در محیط کشت محتوی IBA با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و IAA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر ثبت شد.

پیشنهادات

۱- انجام همین آزمایش با ترکیبات تیماری مشابه در شرایط نوری بدون پیش تیمار تاریکی در مرحله باززایی مستقیم ساقه از ریزنمونه برگ و دمبرگ جهت مقایسه با نتایج این پژوهش

۲- بررسی تغییرات فنوتیپی مانند زمان گلدهی این گیاهان و مقایسه آن با گیاهان مادری

۳- استفاده از انواع بسترهای کشت دیگر در مرحله استقرار گیاهان در خاک

۴- بررسی اثرات فصلی در زمان نمونه‌گیری در میزان باززایی ساقه در مرحله استقرار در ارقام مورد تحقیق

۵- انجام آزمایش جهت پرآوری ساقه از طریق باززایی غیر مستقیم در این ارقام با استفاده از ریزنمونه برگ و دمبرگ

۶- بررسی تغییرات تنوع سوماکلونال در گیاهان باززا شده

۷- بررسی باززایی مستقیم در سایر ارقام و گونه‌های شمعدانی

فهرست منابع

منابع فارسی

تورز، کنت.سی. (۱۳۸۶). **فنون کشت بافت برای گیاهان باغبانی (بوستانکاری)**، مترجم خوشخوی،م، چاپ سوم، انتشارات دانشگاه شیراز، ص ۴۱

مور، ت.س. (۱۳۸۲). **بیوشیمی و فیزیولوژی هورمون‌های گیاهی**، مترجم لاهـوتی، م، زارع، مـریم، حسن آبادی، راضیه، چاپ اول، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ص ۳۶۰

منابع انگلیسی

Aedo, C., Xu, L**. (1998).** Geraniaceae. 43(1),83–86.

Abbasi, B., Saxna, P.K., Murch, S.J., Liu, C.Z. **(2007).** Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities. **In Vitro Cell. Dev.Biol-Plant,43, pp481.**

Anderson, W.C. **(1984).** Micropropagation of filberts *Coryllus avellana*. **Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 1983, 33 132-137.**

Aartrijic, van**.(1984).** Adventitious bud formation from buld-scale explants of Lilium speciosum Thunb. In vitro. Dissertation, **Agricultureal University,Wageningen,the Netherlands,1-79.**

Akasaka, Y., Daimon, H., Mii, M. **(2000). Plant Science. 156: 169-175.**

Anonymous. **(1978).** Plant tissue culture.**Pitman, Boston, 1-531**

Anagnostakis, S.L. **(1974).** Haploid plants from anthers of tobacco-enhancement with charcoal. **Planta 115,844-846.**

Akin-Idowu, P. E.1., Ibitoye, D. O.1., Ademoyegun, O. T. (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. **African Journal of Biotechnology Vol. 8 (16), pp. 3782-3788**

Arockiasamy S., Prakash, S., Ignacimuthu, S**. (2002).** Direct organogenesis from mature leaf and petiole explants of *Eryngium foetidum*. **Biol Plant 45, 129-132.**

Arshad, Muhammad and Silvestre, Jérôme and Merlina, Georges and Dumat, Camille and Pinelli, Eric and Kallerhoff, Jean. **(2012).** Thidiazuron induced shoot organogenesis from mature leaf explants of scented *Pelargonium capitatum cultivars.* **Plant Cell, Tissue and Organ Culture, vol. 108 (n°2). pp. 315-322. ISSN 0167-6857**

Ainsley, P.J., Collins, G.G. Sedgley, M. **(2000).** Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of almond (*Prunus dulcis* Mill). **In vitro Cellular and Developmrnt Biology Plant 36, 470-474**

Ali, S., Mirza, B. **(2006).** Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.): Effect of explant type and hormone concentration. **Acta Bot. Croatia 65,137-146.**

Altman, A. **(2000).** Micropropagation of plants, principles and practice. In: Spier, R. E. Encyclopedia of Cell Technology. **New York: John Wiley & Sons, 916-929.**

Altman, A. and R.Goren. **(1971).** Promotion of callus formation by ABA in Citrus bud cultres. **Physiol.Plant.47, 844-846.**

Armitage, A.M**. (1994).** Ornamental bedding plants. CAB International, **Wallingford, UK.**

Armitage, A.M. and M. Kaczperski. **(1992).** Seed propagated geraniums and regal geraniums: Production guidelines and future concerns. **Timber Press, Portland, OR.**

Alagumanian, S., Saravanaperumal, V., Balachandar, R., Rameshkannan, K., Rao, M.V. **(2004).** Plant regeneration from leaf and stem explants of *Solanum trilobatum* L. **Curr. Sci. 86, 1478-1480.**

Ahmad, N., Anis, M. **(2011)** .An efficient *in vitro* process of recurrent production of cloned plants of *Vitex negundo* L. **Eur J Fores Res 130,135–144**

Babaei.R., Matlabi Azar, A., Alizade, S**. (2010).** Effect of auxin, cytokinin and gibberellic acid on proliferation and root induction stages of greenhouse cucumber. . MS thesis**. Tabriz Univ, Iran.**

Bakker FT, Culham A, Hettiarachi P, Touloumenidou T, Gibby M**, (2004).** Phylogeny of *Pelargonium (*Geraniaceae) based on DNA sequences from three genomes**. Taxon., 53,17-28.**

Bakker, F. T., Culham, A., Pankhurst, C. E. & Gibby, M. **(2000b).** Mitochondrial and chloroplast DNA based phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae). **Amer. J. Bot. 87, 727–734.**

Boase, M.R., Bradley, J.M & Borst, N.K**. (1998).** An improved method for transformation of regal pelargonium (*Pelargonium x domesticum* Dubonnet) by Agrobacterium tumefaciens. **Plant Sci. 139: 59–69.**

Ben Hsouna , A., Hamdi, N. **(2012).** Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils and organic extracts from *Pelargonium graveolens* growing in Tunisia**. Lipids Health Dis, 11, 167.**

Beck, E., Hartig, K. **(2009).** Wie Hormone die zellteilung der pflanzen kontrollieren.Auxin und Cytokinin.**B.I.U.Z.39:268-277**

Benazir, J. F., Suganthi, R., Chandrika, P and Mathithumilan**,** B**. (2013).** In vitro regeneration and transformation studies on *Pelargonium graveolens* (geranium) - an important medicinal and aromatic plant. **Vol. 7(38), pp. 2815-2822, 10.**

Blinstrubiene, A., Sliesaravicius, A., Burbulis, N. **(2004).** Factors affecting morphogenesis in tissue culture of linseed flax (*Linum usitatissimum* L.). **Acta Universitatis Latviensis Biol 676:149–152**

Blakesley, D and Constantine, D**. (1992).** Uptake and metabolism of 6- benzyadenine in shoot cultures of a range of species. **Plant Cell Tiss. Org. Cult. 28:183-186.**

Bonner, J. **(1937).** Vitamin B1, a growth factor for higher plants**. Science 85, 183-184**.

Bonner, J. **(1938a)** .Thiamin (Vitamin B1) and the growth of roots: the relation of chemical structure to physiological activity. **Am. J. Bot. 25, 543-549.**

Bonner, J. (1940a). Specificity of nicotinic acid as a growth factor for isolated pea roots. Plant Physiol. 15, 553-557.

Bhojwani, S. S., and Razdan, M. K. (1983). 'Plant Tissue Culture: Theory and Practice.' (Elsevier: Amsterdam.)

Bhojwani, S. S., Evans, P. K., and Cocking, E. C. **(1977).** Protoplast technology in relation to cropplants: progress and problems. **Euphytica 26, 343-60.**

Biggs, B. J., Smith, M. K., and Scott, K. J. **(1986).** The use of embryo culture for the recovery of plants from cassava *(Manihot esculenta* Crantz) seeds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture 6, 229-34.**

Balaraju, K., Agastian, P., Ignacimuthu, S., Park, K**. (2011)** A rapid *in vitro* propagation of red sanders (*Pterocarpus santalinus* L.) using shoot tip explants**. Acta Physiol Plant 33, 2501–2510**

Blinstrubiene, A., Sliesaravicius, A., Burbuli, N**. (2004).** Factors affecting morphogenesis in tissue culture of linseed flax (*Linum usitatissimum* L**.). Acta Universitatis Latviensis Biol 676, 149–152.**

Brown, J.T., Charlwood, B. **(1986).** The control of callus formation and differentiation in scented *Pelargonium*, J. **Plant Physiol. 123 (1986) 409–417.**

Budavari, S. **(1996).** Merck Index Whitehouse Station. **NJ Merck.**

Clifford, D**. (1970).** Pelargoniums, including the popular ‘Geranium’. **Blandford Press, Chatham, England**

Cassells , A.C., Farre and M.C. Collman. **(1987).** Soma clonal variation as a Source of novel virus resistance potato character improvement . Xth triennial conf. Eur. **Ass.Potato Res ., Aalborg, Denmark, p.104 (Abstr).**

Cassells, A.C., Curry, R. F**. (2001).** Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell Tiss Organ Cult ; 64(2-3): 145–157. http://dx.doi.org/10.1023/A:1010692104861**

Cassells, A.C., Minas, G. **(1983).** Plant and in vitro factor influencing the micropropagation of *Pelargonium* cultivars by bud-tip culture. **Scientia Hortic.21:53-61.**

Cailloux, M. **(1978).** Simultaneous use of 3 cytokinins gives better yields with *Gynura sarmentosa*. **p. 248 in Hughes *et al.* (eds.) (q.v.).**

Chhabra, G., Chaudhary, D., Varma, M., Sainger, M., Jaiwal, P.K**. (2008).** TDZ-induced direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis on cotyledonary node explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.). **Physiol Mol biol Plants 14:347–353.**

Carinne, A., Raymond. **(2004).** Factors affecting media pH and nutrient uptake in geraniums. Dissertation submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park.

Carlson, P. S. **(1973).** The use of protoplasts for genetic research. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 70, 598-602.**

Compton, M.E., Gray.D.J. **(1993).** Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid. Triploid, and tetraploid watermelon. **Journal of the American Society for Horticultural Science 118, 151-157.**

Cortizo, M., Cuesta, C., Centeno, M.L., Rodriguez, A., Fernandez, B., Ordas, R. **(2009).** Benzyl adenine metabolism and temporal competence of *Pinus pinea* cotyledons to form buds *in vitro*. **J Plant Physiol 166, 1069–1076.**

Corneanu M., Corneanu G.C**. (1991).** The genotype, explant type and medium composition in flu ence on in vitro multiplication in *Pelargonium* sp. **Acta Hortic. 289: 101-102.**

Croke, J.T., Cassells, A.C**. (1997).** Dark in duc tion and genetic stability of somatic embryos of zonal geraniums (*Pelargonium* × *hortorum* Baily). **Angew. Bot. 71: 119-124.**

Cohen, N. **(1995).** The culture medium. **Acta Hort. 393, 15-24.**

Douglas, S. M. **(2003).** The Connecticut Agricultural Experiment Station, **New Haven, CT,06504**

Diallo, M.S., Ndiaye, A., Sagna, M., Gassama-Dia, Y.K**. (2008).** Plants regeneration from African cowpea variety (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Af. J. Biotech. 7, 2828-2833.**

Durkovic, J., Misalova, A. **(2008) .**Micropropagation of temperate noble hardwoods: An overview. **Funct Plant Sci Biotechnol 2,1–19**

Davies, P.J. **(2004)** Regulatory factors in hormone action: Level, location and signal transduction. In: Davies PJ (ed) plant Hormones, **Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p 16–35.**

Dzamic, AM., Sokovic, M.D., Ristici ,M.S., Grujic, S.M, Mileski KS, Marin PD. **(2014).**Chemical composition, antifungal and antioxidant activity of Pelargonium graveolens essential oil. **J Appl Pharm Sci,4(3):1-5.**

Debergh, P.C**. (1983).** Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiol. Plant. 59, 270-276.**

Dunbar, K.B. **(1991).** Plant regeneration from callus-derived protoplasts of *Pelargonium domesticum*. **Plant Cell Rpt. 10(8), 417–420.**

Debergh, P.C., Read, P.E**. (1991).** Micropropagation. In: Debergh PC, Zimmerman RH, editors. Micropropagation. **The Netherlands: Kluwer Acad. Publ. pp. 1-13.**

Drew, R. A., and Smith, M. K**. (1990).** Field evaluation of tissue cultured bananas in south -eastern Queensland. **Australian Journal of Experimental Agriculture 30 (in press).**

Dabiri, M., Sefidkon ,F., Yousefi, M., Bashiribod, S. **(2011).**Volatile components of *Pelargonium roseum* R. Br. **J Essent Oil Bear Pl :14(1),114-7.**

Demarne, FE. **(2002).** Rose-scented geranium a *pelargonium* grown for perfumery industry. Geranium and *pelargoniums*; the Genera geranium and *pelargonium*. In: Lis-Balchin, M. (eds. Medicinal and Aromatic plants Industrial profiles, **London, UK: Taylor and Francis. pp. 193-211.**

Cronquist, A**. (1988).** The evolution and classification of flowering plants. **2nd ed. N.Y. Botanical Garden, New York.**

Craige, R. **(1993).** Intellectual Property Protection of Pelargoniums. **Department of Horticulture, The Pennsylvania State University, 16 Tyson Building University Park, PA 16802.**

Craige, R., Marietta, M. **(1993).**History and Culture of Regal. **Department of Horticulture, The Pennsylvania State University, 16 Tyson Building University Park, PA 16802.**

Carmen, G., Hancu, G**. (2014).** Antimicrobial and Antifungal Activity of *Pelargonium roseum* Essential Oils**.** ***Adv Pharm Bull*****, 4(Suppl 2), 511-514.**

Dolfus and Nicolas-Prat. **(1969).** C.R.Acad.**Sci,268,501-503.**

Dunbar, K.B., Stephen, C.T., **(1989).** Shoot regeneration of hybrid seed geranium (*Pelargonium*×*hortorum*) and regal geranium (*Pelargonium*×*domesticum*) from primary callus cultures. **Plant Cell Tissue Org. Cult.19, 13–21.**

Dumas, E., Monteuuis, O. **(1995).** In vitro rooting of micro propagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants—influence of activated charcoal**. Plant Cell Tissue Organ Cult;40,231–235.**

Debergh, P.C. **(2000).** Micropropagation, Hyperhydricity. In: **Spier, R. E. Encyclopedia of Cell Technology. New York: John Wiley & Sons, 929-933.**

Dole, J.M. and Gibson, J.L. **(2006).** Cutting propagation: A guide to propagating producing floriculture crops. **Ball Publishing, Batavia, IL.**

Dreistadt, S.H. **(2001).** Integrated pest management for floriculture and nurseries, **Publication 3402. University of California Agriculture and Natural Resources Communication Services, Oakland, CA.**

Dorman ,H.J., Deans, S.G**. (2000).**Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J Appl Microbiol; 88(2),308-16.**

Clemson University Cooperating with U.S. Department of Agriculture **(2012).** Growing Geraniums Indoors. **HGIC 1558.**

Chaleff, R. S. **(1983).** Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. **Science 219, 676-82.**

Chitra, D.S., Padmaja, G. **(2005).** Shoot regeneration via direct organogenesis from *in vitro* derived leaves of mulberry using thidiazuron and 6-benzylaminopurine. **Sci. Hort. 106, 593-602.**

Chaturvedi ,H.C., Sharma, M., Sharma, A.K., Jain, M., Agha, B.Q., Gupta, P**. (2004)** .In vitro germplasm preservation through regenerative excised root culture for conservation of phytodiversity. **Indian J Biotechnol 3, 305–315**

Chan, J.T., Chang, W.C**. (2002).** Effect of tissue culture conditions and explant characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium* 'Grower Ramsay'. **Plant Cell Tiss Org Cult 69,41–44**

Chang, Ch., Moll, B.A., Evenson, K.B., Guiltinan, M.J. **(1996).** In vitro plantlet re gen er a tion from cot y le don, hypocotyl and root explants of hybrid seed geranium.**Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 45:61-66.**

Duchow, S.,Blaschek, W.,Classen,B. **(2014).** Influence of plant growth regulators on development and poly saccharide production of cell cultures of *pelargonium sidoides.* **African journal of Biotechnology.Vol.13(32),pp.3244-3251.**

Delpozo, J.C., Lopez-Matas, M.A., Ramirez-Parra, E., Gutierrez,C. **(2005).** Hormonal control of the plant cycle. **Physiol Plant.123: 173-183.**

De Melo Ferreira, W., Kerbauy, G.B., Kraus, J.E., Pescador, R., Suzuki, R.M. **(2006).**Thidiazuron influences the endogenous levels of cytokinins and IAA during the flowering of isolated shoots of *Dendrobium*. **J Plant Physiol 163:1126–1134.**

Desilets, H., Desjardins, Y & Belanger, R.R**. (1993).** Clonal propagation of *Pelargonium* ×*hortorum* through tissue culture: Effects of salt dilution and growth regulator concentration. **Can. J. Plant Sci.73: 871–878.**

Dewir, Y.H., Shaik, S., Singh, N., Nicholas, A. **(2010).** Indirect regeneration of the Cancer bush (*Lessertia frutescens* L.) and detection of L-canavanine in in vitro plantlets using NMR. **In Vitro Cellular & Developmental Biology, Plant 46, 41–46.**

De Klerk, G.J. **(2007).**The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. https://www.researchgate.net/publication/22531455.

De Klerk, G-J., Brugge, J.T., Marinova, S. **(1997).** Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation in vitro in Malus 'Jork 9'. **Plant Cell Tissue Organ Cult 49:39–44.**

De Klerk, G-J., Der Krieken, Van., De Jong, J.C**. (1999).** The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. **In Vitro Cell Dev Biol Plant 35:189–199.**

Epstein, E., Bloom, A.J**. (2005).** Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. **Sinauer Associates, 2nd edn. Sunderland.**

El far, M.M.M., Mangoury, K.E.I., Elazab, H.E.M. **(2009).**Novel plant regeneration for Egyptian sweet potato (Ipomoea batataa L.)Abees cultivar via indirect organogenesis stimulated by initiation medium and cytokinin effects .**Aust.J.Basic Appl.Sci.3:543-555**

Escubar, S., Munoz, L., Roca ,W.M**. (2009).**Cassava Micropropagation for Rapid Seed Production Using Temporary Immersion Bioreactors. **International Center for Tropical Agriculture (CIAT).Cali, Colombia.**

Elzen, G.W. **(1983).** Cytokinin and insect galls. **Comp Biochem Physiol, 76, pp 17.**

Espinosa, A.C., Pijut, P.M., Michler, C.H**. (2006).** Adventitious shoot regeneration and rooting of *Prunus derotina* in vitro cultures. **Hort. Sci. 41, 193–201.**

Ezeibekwe, I. O., Ezenwaka, C. L., Mbagwu, F. N and Unamba, C. I. N. **(2009).** Effects Of Combination Of Different Levels Of Auxin (Naa) And Cytokinin (Bap) On In Vitro Propagation Of *Dioscorea Rotundata* L . (White Yam). **New York Science Journal, 2(5), ISSN 1554-0200** http://www.sciencepub.net/new york , sciencepub@gmail.com 11.

Echeverrigary, S and Fracaro, F. **(2001).** Micropropagation of *Cunilagalioides*, a popular medicinal plant of south Brazil. **Plant Cell Tiss.Organ Cult. 64: 1-4.**

Ferreira, F.J., Kieber, J.J**. (2005)** Cytokinin signalling. **Curr Opin Plant Biol 8,518–525.**

Feyissa, T., Welander, M., Negash, L**. (2005).** In vitro regeneration of *Hagenia abyssinica* (Bruce) J.F. Gmel. (Rosaceae) from leaf explants. **Plant Cell Rep. 24,392-400.**

Flora Holland. Facts & Figures. **(2013).** (http://www.floraholland.com/media/2460310/Kengetallen- EN-2013.pdf).

Fowler, M.R. **(2000).** Plant cell culture, laboratory techniques. In: Spier, RE. Encyclopedia of Cell Technology. **New York: John Wiley & Sons, 994-1002.**

Faust, J.E., Lewis, K.P. **(2005).** Effect of 1-MCP on the postharvest performance of un-rooted poinsettia cuttings. **Acta Hort. 682,807–812.**

Fujimura, T. and A. Komamine. **(1975).** Effects of various growth regulators on the embryogenesis in the carrot cell suspension culture. **Plant Science Lett.5, 359-364.**

Faizal, A., Lambert, E., Foubert, F., Apers, S., Geelen, D**. (2011).** In vitro propagation of four saponin producing *Maesa* species. **Plant Cell Tiss Organ Cult 106:215–223.**

Fogac¸ a.C.M., Fett-Neto, A.G. **(2005).** Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of Eucalyptus species differing in recalcitrance. **Plant Growth Regul 45:1–10.**

Gasper, T., Kevers, C., Penel, C., Grepen, H., Reid, D., Thrope, T**. (1996).** Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cell. Dev.Biol-Plant 32:272-289.**

Gupta, R., Banerjee, S., Mallavarapu, G.R., Sharma, S., Khanuja ,S.P.S., Shasany, A.K., Kumar, S. **(2002)**. Development of a superior somaclone of rose-scented geranium and a protocol for inducing variants. **Hortscience 37: 632–636.**

Gribble, K. **(1999).** The influence of relative humidity on vitrification, growth and morphology of *Gypsophila paniculata* L. **Plant Growth Regul. 27, 179-188.**

Gandonou, C., Errabii, T., Abrini, J., Idaomar, M.F., Chibi, F., Skalisenhaji, N. **(2005).** Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). **Af. J.Biotech. 4, 1250-1255.**

George, E.F**. (1993).** Plant propagation by tissue culture, part I: the technology. **Exegetics, Edington. p 1–574.**

George, E.F., Debergh ,P.C. **(2008).** Micropropagation: uses and methods. plant propagation by tissue culture 3rd edn, Vol.1. In: George EF, Hall MA, De Klerk G-J (edn) The background. **Published by Springer, Dordrecht**

George, E.F., Sherrington, P.D**. (1984)**. In: Plant propagation by Tissue culture. **Exegetics Ltd., London, p 39–71.**

Gill, S. S, Tuteja, N. **(2010).** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants**. Plant Physiol Biochem. 2010; 48(12): 909–93**

Gubis, L., Lajchová, Z., Faragó, J., Jureková, Z**. (2003).** Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in vitro. **Czech J. Gen. Plant Breed. 39, 9-14.**

Gahan, P.B., George, E.F**. (2008).** Adventitious regeneration. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) Plant propagation by tissue culture, **3rd edn. Springer, Dordrecht, p 355–401.**

Gitonga, L.N., Gichuki, S.T., Ngamau, K., Muigai, A.W.T., Kahangi, E.M., Wasilwa, L.A., Wepukhulu, S., Njogu, N**. (2010).** Effect of explant type, source and genotype on *in vitro* shoot regeneration in Macadamia (*Macadamia* spp**.). J Agri Biotechnol Sustain Dev 2,129–135.**

Gautheret, R.J. **(1939).** Sur la possibilite de realiser a culture indefinite des tissues de tubercules de carotte. **C R Hebd Seances Acad Sci 208,118–120.**

Goldblatt, P.,Manning, J**. (2000).** Cape Plants - a conspectus of the Cape flora of South Africa. ***Strelitzia* 9,9.**

Gupta, R.K., Rutledge, L.C**. (1994).** Role of repellents in vector control and disease prevention. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 50, 82-86.**

Grąbkowska, R., Sitarek, P., Wysokińska, H. **(2014).** Influence of thidiazuron (TDZ) Pre treatment of shoot tips on shoot multiplication and ex vitro acclimatization of *Harpagophytum* procumbens. **Acta Physiologiae Plantarum 7, 1661–1672.**

Ghanem. S.A ., Aly. I.U., El-kazzaz., Abdel-Samad and Nermeen, M.Arafa. **(2008).** In vitro regeneration of *Pelargonium graveolens* .**JGEB, Vol.6, No. 1, ISSN: 1687-157X.**

Ghasemi**,** Y., Nematzadeh **,** Gh., Ghasemi, V., Dehestani, A., Hosseini. **(2012).** The effects of explant type and phytohormones on African violet (*Saintpaulia ionantha*) micropropagation efficiency. **BIHAREAN BIOLOGIST 6 (2): pp.73-76.2012.**

Hashemabadi, D., Kaviani, B. **(2010).** In vitro proliferation of an important medicinal plant Aloe-A method for rapid production. **Aust J Crop Sci 4 (4): 216-222.**

Hughes, K. **(2009*).***Cultivation of the genus *Pelargonium* under glass. **The Journal of Botanic Garden Horticulture, No. 7.**

Hassanein,A.,Dorion,N**. (2005).** Efficient plant regeneration system from leaf discs of zonal (*Pelargonium×hortorum*) and two scented (*P.capitatum and gravrolens*) geranium. **Plant Cell Tissue Org.Cult. 83,231-240.**

Henry, Y., Vain, P., Buyser, J.D**. (1994).** Genetic analysis of *in vitro* plant tissue culture responses and regeneration capacities. **Euphytica 79, 45-58.**

Hanniford, G.G. and E.J. Holcomb. **(1982).** Regal geraniums, **p. 161–169. In: J.W.**

Hanniford, G.G. and A. Riseman. **(1993).** Regal geraniums, **p. 175–190. In: J.White (ed.). Geraniums IV. Ball Publishing, Geneva, Ill.**

Hanus-fajerska, E., Mrzygłód, A., Wiszniewska, A., Koźmińska, A., Stolarczyk, P. **(2015).** Establishment of an in vitro culture of Pelargonium × domesticum cultivars characterized by different growth requirements. **BioTechnologia. vol. 96(2)** C .

Horn, W**. (1988).** Micropropagation of *Pelargonium×domesticum* hybrids. **Acta Hort. 226,53–58.**

Horn, W**. (1994).** Interspecific crossability and inheritance in *Pelargonium*. **Plant Breeding 113:3–17.**

Hussey, G. **(1983).** *In vitro* propagation of horticultural and agricultural crops**. In 'Plant Biotechnology'. (Eds S. H. Mantel1 and H. Smith.) pp. 111-38. (Cambridge University Press: Cambridge.)** .

Hussey**. (1986).** In, **Withers and Alderson.**

Hutchinson, M.J., Mureh, S.J., Saxena, P.K. **(1996).** Morphoregulatory role of TDZ: evidence of the involvement of the endogenous auxin in TDZ-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium×hortorum* Baily). **Journal of Plant Physiology149: 573-579.**

Huetteman, C.A., Preece, J.E. **(1993).** Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33, 105–119.**

Hildebrandt, V & Harney, P.M**. (1988).** Factors affecting the release of phenolic exudates from explants of *Pelargonium* × *hortorum* Bailey. **Sprinter Scarlet. J. Hort. Sci 63: 651–657**.

Hepler, P.K. and Wayne, R.O. **(1985).** Calcium and plant development. **Annu. Rev. Plant Physiol. 36: 397-439.**

Heyl, A., Schmulling, T. **(2003).** Cytokinin signal perception and transduction. **Curr Opin Plant Biol 6,480–488.**

Howell, S.H., Lall, S., Che, P. **(2003).** Cytokinins and shoot development. **Trends Plant Sci 8,453–459.**

Hussey, G. **(1978).** The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. **Science Progress, Oxford 65, 185-208.**

Hawke, R**. (2004).** Plant Evaluation Manager. **Plant Evaluation Notes, Chicago Botanic Garden.issue22.**

Held, D.W., Potter, D.A. **(2003).** Characterizing toxicity of *Pelargonium* spp. and two other reputedly toxic plant species to Japanese beetles (Coleoptera: Scarabaeidae). **Environ. Entomol., 32,873–880.**

Heide, O.M**. (1968).** Stimulation of adventitious bud formation in begonia leaves by abscisic acid. **Nature 219,960-961.**

Isikawa, H. **(1974).** In vitro formation of adventitious bud and roots on the hypocotyl of Cryptomeria japonica.**Bot.Mag.(Tokyo)87,73-77.**

Ipecki, Z., Gozukirmi**,** N**. (2004) Plant Cell Tissue Org. Cult., 79, 341-345.**

James, J**. (2002).** Cultivations and sales of *Pelargonium* plants for ornamental use in the UK and worldwide. In: LIS-BALCHIN , M. (Ed). *Geranium and Pelargonium.* **London: Taylor and Francis, pp 82–90.**

Jinsong, Z., Guohua, M., Zhang, X. **(2007).** In vitro Shoot Organogenesis from *Pelargonium* ×citrosum Vanleenii Leaf and Petiol Explants. **Floriculture and Ornamental Biotechnology ©2007.Global Science Books.**

Johansson**. (1983). Physiol.Plant ,59,397-403.**

Jonard. **(1986).**In, **Bajaj. 31-48.**

Joyce, S.M., Cassells, A.C., Jain, S.M**. (2003).** Stress and aberrant phenotypes in vitro culture. **Plant Cell Tiss Organ Cult ; 74(2): 103–121. http://dx.doi.org/10.1023/A:1023911927116.**

Kang, K.S., Veeder, G.T., Mirrasoul, P.J., Kaneko, T.,Cottrell, W. **(1982).**Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: Production and basic properties Appl**. Environ. Microbiol. 43, 1086-1091.**

Kato, M. and S. Tokumasu. **(1983).** Characteristics of F1 hybrids produced by ovule culture in ornamental *Pelargonium***. Acta Hort. 131,247–52.**

Kolodziej, H. **(2002).** *Pelargonium reniforme* and *Pelargonium sidoides*: their botany, chemistry and medicinal use. In: LIS-BALCHIN , M. (Ed). *Geranium and Pelargonium*. London: **Taylor and Francis, pp 262–290.**

Kolodziej, H., Kayser ,O., Radtke, O.A. **(2003).** Pharmacological profile of extracts of *Pelargonium sidoides* and their constituents. **Phytomedicine, 10, 18-24.**

Kayser, O., Kolodziej, H. **(1997).** Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*. In: ***Planta Medica* 63 (6), S. 508–510.**

Kumar, N., Vijayanand, K.G., Reddy, M.P. **(2010a).** Shoot regenerationfrom cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodesel plant. **Acta Physiol Plant 32, 917-924.**

Kim, O.T., Kim, M.Y., Huh, S.M., Hwang, B. **(2004a).** Effect of growth regulators on asiaticoside production in whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.). **Urban J. Plant Biol. 47, 361–365.**

Kim, Y.S., Hahn, E.J., Yeung, E.C., Paek, K.Y. **(2003).** Lateral root development and saponin accumulation as affected by IBA or NAA in adventitious root cultures of Panax ginseng C.A. Meyer. **In Vitro Cel. Develop. Biol. – Plant. 39, 245–249.**

Kumar, N., Vijayanand, K.G., Reddy, M.P**. (2011b).** Plant regeneration in non-toxic *Jatropha curcas* - impacts of plant growth regulators, source and type of explants. **J Plant Biochem Biotechnol. 20, 125-133.**

Krishna raj, S., T.V. Dan & P.K. Saxena. **(2000).** A fragrant solution to soil remediation. **International Journal of Phytoremediation 2, 117-132.**

Knop, W**. (1865)** .Quantitative Untersuchungen uber den Ernahrungsprozess der Pflanzen**. Landwirtsch Vers Stn 7,93–107.**

Kumar, N., Vijay., Anand, K.G., Reddy, M.P. **(2010).** Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant. **Acta Physiol Plant 32,917–924.**

Kumar, N., Reddy, M**. (2011).** In vitro Plant Propagation: A Review. **Journal of Forest Science. Vol. 27, No. 2, pp. 61~72.**

Kartha, K. K**. (1985).** 'Cryopreservation of Plant Cells and Organs.' **(CRC Press Inc.: Boca Raton.)**

Kolodziej ,H., Kiderlen, A.F**. (2007).** In vitro evaluation of antibacterial and immuno modulatory activities of *Pelargonium reniforme, Pelargonium sidoides* and the related herbal drug preparation EPs® 7630. **Phytomedicine, 14, 18-26.**

Kolodziej, H. **(2011).** Antimicrobial, Antiviral and Immunomodulatory Activity Studies of *Pelargonium sidoides* (EPs®7630) in the Context of Health Promotion. In: **Pharmaceuticals 4 (10), S. 1295–1314.**

Knicely, W.W., Walker, D.E. **(1966).** Chromosome numbers and crossability studies in the genus *Pelargonium*. Proc. **Intl. Hort. Congr. Abstr. 209.**

Kartha, K.K**. (1981).** Meristem culture and cryopreservation – Methods and applications. **pp. 181-211 in Thorpe T.A. (ed.) Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture.**

Kathal, R., Bhatnagar, S..P., & Bhojwani, S.S. **(1988).** Regeneration of plants from leaf explants of *Cucumis melo* cv. Pusa Sharbati. **Plant Cell Rep. 7, 449-451.**

Katagi, H.,Takahashi, E., Nako, K. and Inui, M. **(1986**).Shoot forming cultures *Pelargonium graveolens* by jar fermentation. **Journal of the Agricultural Chemical Society of japan 60(1):15-17.**

Koperdakova, J., Katkovcinova, Z., Kosuth, J., Giovannini, A., Cellarova, E. **(2009).** Morphogenetic response to plant growth regulators in transformed and untransformed *Hypericum perforatum* L. clones. **Acta Biol. Cracov. – Ser. Bot. 51, 61–70.**

KrishnaRaj, S., Bi, Y-M & Saxena, P.K**. (1997).** Somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation system for scented geraniums (*Pelargonium* sp.'Frensham'). **Planta, 201: 434–440.**

Kulaeva, O., Burkhanovaa, E., Kavaiko, N., Selvankina, S., Porfirova, S., Maslova, G., Zemlychenko, Y. **(2002).**Chloriplast effect on the leaf response to cytokinin**. J. Plant Physiol. 159: 1309-1316**

Khosh-Khui, M., Sink, K.C**. (1982 c).** Rooting enhancement of Rosa hybrida for tissue culture propagation. **Sci Hortic,17,371–6.**

Khan, N.H., nur-E kamal, M.S.A., Rahman, M. **(1988).** Antimicrobial Activity of *Euphorbia thymifolia*. **Linn Indian J Med Res 87, 395-7.**

Legocka,J.,Nowicka,E. **(2014).** Calcium variously mediates the effect of cytokinin on chlorophyll and LHCPII accumulation during greening in barley leaves and cucumber cotyledons. **Acta Biologica Series Botanica 56/2: 27-34.**

Lis-Balchin, M.T. **(2004).** Geranium, In: Peter, K.V. (Ed.), Hand Book of Herbs and Spices,Volume 2. **Woodhead Publishing Limited,UK, 365 pp.**

Lee, E.J. **(2009).** Biomass and bioactive compounds production through bioreactor cultures of adventitious roots in Eleutherococcus koreanum. Ph.D. Thesis, **Chungbuk National University, Cheong-Ju, Korea.**

Lee, E.J., Mobin, M.E., Hahn, E.J., Paek, K.Y. **(2006).** Effects of sucrose, inoculums density, auxins and aerator volume on cell growth of Gymmema sylvestre. **J. Plant Biol. 49, 427–431.**

Liu, Y., Tong, X., Wenkai, H., Liu, T., Chen, X., Li, J., Zhuang, Ch., Yang, Y & Liu, Z. **(2015).** Efficient culture protocol for plant regeneration from petiole explants of physiologically mature trees of *Jatropha curcas*. L**. Biotechnology & Biotechnological Equipment,Vol. 29, No. 3, 479_488, http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1013308.**

Limpo, K., im, H. J. GilNam, H. (2007). Leaf senescence. **Ann Rev Plant Biol. , 58(1): 115–136. http://dx.doi.** org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105316.

Luping, Q.U., Jianjun, Ch., Richard, J., Henny, Y., Huang, Y., D. Caldwell AND Cynthia, R., Robinson, A**. (2002).** Thidiazuron promotes adventitious shoot regeneration from pothos(*Epipremnum aureum*) leaf and petiole explants. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant 38:268–271.**

Lakshmi, S., Bammi, R.K and Randawa, G.S**. (2006).** Clonal propagation of *Dioscorea floribunda* by tissue culture. ***J. Hort. Sci 51*: 551-554.**

Lloyd, G., McCown, B**. (1980).** Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Int Plant Prop Soc Proc 30,421–427.**

Loo, S.W. **(1945a).** Cultivation of excised stem tips of *Asparagus in vitro*. **Am J Bot 32,13–17.**

Loo, S.W**. (1945b).** Cultivation of excised stem tips of intact plants under sterile conditions. Ph. D. Thesis. Pasadena: **California Institute of Technology.**

Loo, S.W. **(1946a).**Further experiments on the culture of excised *asparagus* tips in vitro. **Am J Bot 33,156–159.**

Leyser, H.M.O., Pickett, F.B., Dharmsiri, S., Estelle, E. **(1996).** Mutation in AXR3 gene of *Arabidopsis* result in altered auxin response including ectopic expression from the SAUR-AC1 promoter. **Plant J 10,403–413.**

Liberty Hyde Bailey Hortorium**. (1976).** Hortus third: A concise dictionary of plants cultivated in the United States and Canada. **3rd ed. Macmillan, New York.**

Miller and Skoog. **(1953). Am.J.Bot.40, 768-773.**

Murashige. **(1964).Physiol.Plant.17, 636-643.**

Mok, M.C., Mok, D.W.S., Armstrong, D.J., Shudo, K., Isogai, Y.,Okanoto,T**. (1982)** Cytokinin activity of N-phenyl-N-1,2,3-Thidiazol-5ylurea(thidiazuron).**Phytochem21:1509-1511.**

Malik, S.K., Chaudhury, R., Kalia, R.K. **(2005) Sci. Hort.106, 539-553.**

Ma, Gh., Wu, G.J. **(2006).** Direct shoot organogenesis from cotyledon explants in Ochna integerrima. **Propagation of Ornamental Plants 6: 145- 148.**

Mohebalipour, N., Aharizad. S., Mohammadi, S.A**.,** Motallebiazar, A., Rand Arefi, H.M. **(2012).** Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis*L.) landraces. **Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.10 (1): 280-286.**

Morel G. M. **(1960).** Producing virus-free *Cymbidium* through tissue culture of the shoot meristem. **American Orchid Society Bulletin,29,495-497.**

Mutui, T.M., H. Mibus, and M. Serek. **(2005).** Effects of thidiazuron, ethylene, abscisic acid and dark storage on leaf yellowing and rooting of *Pelargonium* cuttings**. J. Hort. Sci. Biotechnol. 80,543–550.**

Mineo, L**. (1990).** Plant tissue culture techniques. **Pages 151-174, in Tested studies for laboratory teaching. Volume 11. (C. A. Goldman, Editor).**

Mattson, J.S., Mark, J.r. H.B. **(1971).** Activated carbon. **New York: Dekker.**

Miller, D. M. **(2002).** The taxonomy of *Pelargonium* species and cultivars, their origins and growth in the wild. In: Lis-Balchin, M. (Ed). *Geranium* and *Pelargonium*. **Taylor and Francis, London**

Moyo, M., Finnie, JF.,Van staden, J. **(2012**). Topolins in Pelargonium sidoides micropropagation : do the new brooms really sweep clear**? Plant Cell Tissue Organ Cult.110: 319-327**

Marsolais, A.A., Wilson, D.P.M., Tsujita, M.J. & Senaratna, T. **(1991).** Somatic embryogenesis and artificial seed production in Zonal (*Pelargonium horterum*) and Regal (*Pelargonium domesticum*) geranium. **Can. J. Bot. 69, 1188-1193.**

Mativandlela, S. P. N., Meyer, J. J. M, . Hussein, A. A., Lall, N. **(2007).** Antitubercular activity of compounds isolated from *Pelargonium sidoides*," **Pharmaceutical Biology, vol. 45,no. 8, pp. 645–650**

McGaw, B.A., Burch, L.R**. (1995).** Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: Davies PJ (ed) Plant hormones, physiology, biochemistry and molecular biology. **Kluwer, Dordrecht, p 98–117.**

Mantell, S. H., Matthews, J. A., and McKee, P. A**. (1985).** 'Principles of Plant Biotechnology. An introduction to genetic engineering in plants. **Blackwell Scientific Publications: Oxford.**

Mertens, M., Werbrouck, S., Samyn, G., Botelho dos Santos, M. H., Debergh, P. **(1996).** In vitro regen eration of evergreen azalea leaves. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 45: 231-236.**

Murthy B.N.S., Singh R.P., Saxena P.K. **(1996).** In duction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium* × *hortorum* Bailey cv. Ringo Rose) cotyledonary cul tures. **Plant Cell Rep. 15: 423-426.**

Murashige, T., Skoog, F**. (1962).** Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: **Physiologia Plantarum 15, S. 473–97.**

Maheshwari, S. C., Tyagi, A. K., Malhotra, K., and Sopory, S. K. **(1980).** Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms-the current status. **Theoretical and Applied Genetics 58, 193-206.**

Magyar-Tabori, K., Dobranszki, J., Teixeira da Silva, J.A., Bulley, S.M., Hudak. **(2010).** The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple**. Plant Cell Tiss Org Cult 101,251–267.**

Mehra, A. and P.N. Mehra. **(1972).** Differentiation in callus cultres of *Mesembryanthemum Floribundum*. **Phytomorphology22, 171-176.**

Mithila, J., Murch, S.J., KrishnaRaj , S., Saxena, P.K. **(2001).** Recent advances in *Pelargonium* in vitro regeneration systems. **Plant Cell Tissue Organ Cult 67:1–9.**

Misra, M., Misra, A.N**. (2010).** Changes in photosynthetic quantum yield of developing chloroplasts in lotus (Nelumbo nucifera Gaertn.) leaf during vegetative, bud and flowering stages. **Afr. J. Plant Sci. 4:179-182.**

Najma, Y., Uzman, K. **(2001).** External Morphology and Flowering of *Phaseolus aureus* L. **Department of Botany ,University of the Punjab,Quaid-eazam campus,Lahore.454p.**

Negi, P.S., Biswas,V.R., Verma, S. and Kumar, N. **(2004).**Anew protocol for micropropagation of rose geranium (*Pelargonium graveolens*). **Progressive Horticulture36(1)31-34.**

Ngomuo, M., Mneney,E., Ndakidemi, P**. (2013).**The effect of auxins and cytokinin on growth and development of (*Musa* sp.) var. Yangambi explants in tissue culture. **American Jurnal of Plant Sciences 4, 2174-2180.**

Nord, S.M., **(1989).** An in vitro germplasm preservation system for *Pelargonium* ×*domesticum*. MS thesis**. Ohio Sate Univ., Columbus.**

Narayana ,M.R., Prakasa Rao ,E.V.S., . Rao, B.R.R., . Sastry, K.P. **(1986).** *Geranium* cultivation in India: **potentials and prospects, Pafai J. 8 ,25–30.**

Naraganaswamy,S. **(1977).** Regeneration of plant tissue culture.pp.179-202.In Applied And Fundamental Aspects of Plant Cell.Tissue and Organ culture.J.Reinert and Y.P.S.Bajaj(editors).**Springer-Verlag,New York.**

Orrono, D.I & R.S. Lavado. **(2009).** Heavy metal accumulation in *Pelargonium hortorum*: Effects on growth and development. **ΘYTON ISSN 0031 9457, 78: 75-82**

Owen, H.R., Wengerd, D., Miller, A.R**. (1991).** Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. **Plant Cell Rep; 10,583–586.**

Paulet. **(1965).** Rev.**Gen.Bot.72, 697-792.**

Parliman. **(1986).**In, Zimmerman et all.1**986, 271-282.**

Poudyal, B.K., Zhang, Y., Du, G**. (2008).** Adventitious shoot regeneration from the leaves of some pear varieties (*Pyrus* spp.) grown in vitro**. Front Agric. China 2, 82–92.**

Poovaiah, B.W and Reddy, A.S.N. **(1987).** Calcium messenger system in plants**. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 6: 47-103.**

Perez-Tornero, O., Egea, J., Vanoostende, A & Burgos, L**. (2000).** Assessment of factors affecting adventitious shoot regenerationfrom in vitro cultured leaves of apricot. **Plant Sci. 158: 61–70.**

Powell, C.C., Lindquist ,R.K. **(1997).** Ball pest and disease manual: Disease, insect, and mite control on flower and foliage crops, second ed. **Ball Publishing, Batavia, IL.**

Pateli, P., Papafotiou, M., Chronopoulos, J. **(2003).** Influence of *in vitro* culture medium on *Epidendrum radicans* seed germination, seedling growth and *ex vitro* establishment. **Acta Hort. 616, 189-192.**

Parveen, S., Shahzad, A., Saema, S. **(2010).** *In vitro* plant regeneration system for *Cassia siamea* Lam., a leguminous tree of economic importance**. Agrofores Syst 80,109–116.**

Prakash, M.G., Gurumurthi, K**. (2005).** Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis*. **Curr. Sci. 88, 1311-1316.**

Preil, W. **(2003).** Micropropagation of ornamental plants. In: Laimer M, Rucker W, editors. Plant tissue culture 100 years since Gottlieb Haberlandt. **New York: Springer-Verlag. 115-133.**

Pan, M.J., Van Staden, J. **(1998).** The use of charcoal in in vitro culture-a review. **Plant Growth Regul; 26,155–163.**

Prakash, S., Van Staden, J. **(2008)**. Micropropagation of *Searsia dentata*. **In Vitro Cell Dev Biol-Plant 44,338–341.**

Pierik, R.L.M .,Dixon, R.A. **(1997).** In Vitro Culture of Higher Plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.**

Pierik, R. L. M. **(1987).** In Vitro Culture of Higher Plants. (Martinus Nijhoff Publishers: Dordrecht.) Provvidenti, R., Robinson, R. W., and Munger, H. M**. (1978).** Resistance in feral species to six viruses infecting *Cucurbita.* **Plant Disease Reporter 62, 326-9.**

Pellegrineschi, A. **(1997).** *In vitro* plant regeneration via organogenesis of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Plant Cell Rep. 17, 89-95.**

Paul, A., Thomas **.(2009).** *Geraniums*. **The University of Georgia and Ft. Valley State University, the U.S. Department of Agriculture and counties of the state cooperating.**

Quak, F. **(1977).** Meristem culture and virus-free plants. In **'Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture'. (Eds J. Reinert and Y. P. S. Bajaj.) pp. 598-615. (Springer-Verlag: Berlin.).**

Qureshi, J.A., Saxena**,** P.K. **(1992).** Adventitious shoot induction and somatic embryogenesis with intact seedlings of several hybrid seed geranium varieties (*Pelargonium* × *hortorum* Bailey), **Plant Cell Rep. 11, 443–448.**

Rapaka, V.K., J.E. Faust, J.M. Dole, and E.S. Runkle. **(2008).** Endogenous carbohydrate status affects postharvest ethylene sensitivity in relation to leaf senescence and adventitious root formation in Pelargonium cuttings. **Postharvest Biol. Technol. 48:272–28.**

Rosy, R., Jeneka, P., Devi and Prerna, S. Babu. **(2015).** In vitro propagation of essential oil yielding plant pelargonium graveolens l. her. ex ait: syn p. roseum willd. **World journal of Pharmacy and Pharmaceutcal Sciences. Volume 4, Issue 09, 541-544, ISSN 2278 – 4357.**

Rogers, M.N. **(1993).** Vegetative propagation— Cuttings, **p. 95–102.** In: White, J.W. (ed.). *Geraniums* IV. **Ball Publishing, Batavia, IL.**

Robert, M.,Skirvin, Mel. Chu, C ., Mary., Mann, L., heatyher Young, Josesph Sullivan, and Thomas Fermanian. **(1986).** Stabiliy of tissue culture medium Ph as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Reports.5,292-294.**

Rao, P.V.L. **(1994).** In vitro plant regeneration of scented-leaved geranium *Pelargonium graveolens*. **Plant Sci. 98, 193–198**

Rao, B.R.R. **(2002).** Biomass yield, essential oil yield and essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) as influenced by row spacing and intercropping with Corn mint (*Mentha arvensis* L. *piperascens* Malinv. Ex Holmes*).* **Industrial Crops and Products .16, 133-144.**

Razdan, M.K. **(1993).** An Introduction to Plant Tissue Culture. Andover: **Hampshire.**

Reddy, M.P., Kumar, N., Vijayanand, G., Singh, A.H. Singh, S. **(2008).** Method for micropropagation of *Jatropha curcas* plants from leaf explants. **Patent filed US and PCT, Application No. 2537de.**

Rout, G.R., Jain, S.M. **(2004).** Micropropagation of ornamental plants-cut flowers. **Propag. Ornam. Plants 4, 3-28.**

Rugini ,E., Tarini ,P., and Rossodivata, M.E**. (1987).** Control of shoot vitrification of almond and olive grown in vitro. **Acta Hort. 212, 177–183.**

Rao, C.D., Goh, C.J., Kumar, P.P**. (1996).** High frequency adventitious shoot regeneration from excised leaves of *Paulownia* spp. cultured in vitro. **Plant Cell Rep 16,204–209.**

Robbins, W.J. **(1922).** Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. **Bot Gaz 73,376–390.**

Randolph, L. F. **(1945).** Embryo culture of *Iris* seed. **Bulletin of the American Iris Society 97, 33-45.**

Robichon, M.P., Renou, J.P., Jalouzot, R. **(1997).** Plant regeneration of ivy leaved *geranium* through shoot organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture 49: 209-212.**

Riov, J., Yang, S. **(1989).** Ethylene and auxin-ethylene interaction in adventitious root formation in mung bean (*Vigna radiata*) cuttings**. J. Plant Grow Reg. 8(2):131-141.**

Swanson, J.K., L. Montes, L. Mejia, and C. Allen. **(2007).** Detection of latent infections of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 in *geranium*. **Plant Dis. 91,828–834.**

Serek, M., A. Prabucki, E.C. Sisler, and A.S. Andersen. **(1998).** Inhibitors of ethylene action affect final quality and rooting of cuttings before and after storage. **Hort Science 33,153– 155.**

Saxena, G., Banerjee, S., Rahman, L., Mallavarapu, G.R., Sharma, S. & Kumar, S. **(2000).** An efficient in vitro procedure for micropropagation and generation of somaclones of *rose scented Pelargonium*. **Plant Sci. 155, 133–140**

Sankhla, N. and D. Sankhla. **(1968).Naturwissenschaften55,91-92**

Schween, G., Schwenkel, H.G. **(2003).** Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in greenhouse of *Primula* ssp. **Plant Cell Tiss. Org. Cult. 72, 53-61.**

Satyakala, G., Muralidhar, M., Rao., G. Laxmi Sita**. (1995).** In vitro micropropagation of scented geranium (*Pelargonium graveolens* L. Her. ex. Ait.:Syn. *P. roseum* wild), **Curr. Sci. 68 (7) 762–765.**

Sajid, G. M., M.K. Ilyas, and R. Anwar. **(2006).** Effect of diverse hormonal regimes on in vitro growth of grape germplasm. **Pakistan J. Bot. 38(2): 385-391.**

Seidel, V., Taylor, P.W. **(2004).** In vitro activity of extracts and constituents of *Pelagonium* against rapidly growing mycobacteria. In: **International Journal of Antimicrobial Agents 23 (6), S. 613–619.**

Sujatha, M. and Mukta, N**. (1996).** Morphogenesis and plant regeneration from tissue culture of *Jatropha curcas* L. **Plant cell Tissue Organ Culture, 44,135-141.**

Singh, A., Reddy, M.P., Patolia, J.S. **(2008).** An improved protocol for micropropagation of elite genotypes of *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider. B**iol Plant 52,538–542.**

Sugiyama, M. **(1999).** Organogenesis in vitro. **Curr Opin Plant Biol 2,61–64.**

Schenk,R.V. and A.C.Hilderbrandt. **(1972).** Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultres. **Can.J.Bot.50,199-204**.

Singh, A.K., Sharma, M., Varshney, R., Agarwal, S.S. and Bansal, K.C**. (2006).** Plant regeneration from alginate encapsulated shoot tips of *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn, a medicinally important plant species. **In Vitro Cellular Developmental Biology- Plant, 42,109-113.**

Singh,G., Sekhon,H.S., Kolar,J.S., **(2005).** Pulses. Agrotech Publishing Academy, Udaipur, India.

Singh, N.D., Sahoo, L., Sarin, N.B., Jaiwal, P.K**. (2003).** The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp). **Plant Sci 164:341–347.**

Suzuki, P.M., Kerbauy, G.B & Zaffari, G.R. **(2004).** Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catasetum fimbriatum*. **J. Plant Physiol. 161: 929–935.**

Sukhumpinij, P., Kakihara, F., Kato, M. **(2010).** In vitro regeneration from mature leaf explants of *Pelargonium rapaceum* (L.) L' He´rit. **Sci Hortic 126:385–389.**

Sunderland, N., Dunwell, J.M. **(1977).** Anther and pollen culture**. pp. 223-265 in Street H.E. (ed.) Plant Tissue and Cell Culture. Bot. Monographs Vol.11, Blackwell Scientific Publications. Oxford, London.**

Stuart, M., Jourdan, P**. (1994).** Pistil influence on growth of pollen tubes of *P.* ×*domesticum*. **HortScience 29(5),496 (abstr.).**

Stuart, M., Hanniford, G. **(1990).** Effects of supplemental lighting and genotype on fertility of *Pelargonium*□*domesticum*. **HortScience 25(9),1173 (abstr.).**

Schenk,R.V. and A.C.Hilderbrandt. **(1972).** Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultres. **Can.J.Bot.50,199-204**.

Skoog, F., Miller, C.O. **(1957).** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro.In:The Biological Action of growth Substances (H.K.Porter ed.)**pp.118-131,Academic Press, New York.**

Skoog, F., Strong, F.M., Miller, C.O**. (1965).** Cytokinins. **Science 148, 532–533.**

Shirin, F., Rana, P.K., Mandal, A.K. **(2005).** In vitro clonal propagation of mature *Tectona grandis* through axillary bud proliferation. **J Fores Res 10,465–469.**

Saira, P., G.M. Sajid., R. Anwar, and H.U. Rehman. **(2005).** Growth promotion and growth retardation of sugarcane tissue cultures for germplasm conservation. **J. Biol. Sci. 5(3):339-346.**

Shirani, S., M. Fatemeh, and M. Maziah. **(2009).** Morphological abnormality among regenerated shoots of banana and plantain (*Musa* spp.) after in vitro multiplication multiplication with TDZ and BAP from excised shoot-tips**. Afr. J. Biotechnol. 8: 5755-5761.**

Sharp, WR., Evans, D.A., Ammirato, P.V and Yamada, Y. **(1984)**: Hand Book of Plant Cell Culture. **Mac.Pub. Co., New York. pp 372-373**.

Sharma N., Chandel K. P. S., PauL, A**. (1993).** In vitro propagation of Gentiana kurroo: an indigenous threatened plant of medicinal importance. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 34: 307.309.**

Sharma, R., Wakhlu, A**. (2001).** Aadventitious shoot regeneration from petiole explants of Heracleum candicans wall. **In vitro Cell. Dev. Biol.Plant 37, 794-797.**

Shawl, A.S., Kumar, T., Chishti, N. and Shabir, S. **(2006).** Cultivation of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) as a cash crop in a Kashmir Valley. **Asian Journal of Plant Sciences 5 (4), 673-675.**

Shahzad, A., Faisal, M., Anis, M. **(2007).** Micropropagation through excised root culture of *Clitoria ternatea* and comparison between in vitro regenerated plants and seedlings. **Ann Appl Biol 150,341–349.**

Shepard, J. F., Bidney, D., Barsby, T., and Kemble, R**. (1983).** Genetic transfer in plants through interspecific protoplast fusion. **Science Vol. 219, Issue 4585, pp. 683-688.**

Teixeria, J.B., Sondahl, M.R., Kirby, E.G**. (1994).** Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Rep 13,247–250.**

Tisserat, B. and T.Murashige. **(1977).** Effects of ethephon and 2,4-D on asexual embryogenesis in vitro. **Plant Physiol.60, 437-439**

Tereso, S., Miguel, C., Maroco, J., Oliveira, M.M. **(2006.)** Susceptibility of embryogenic and organogenic tissues of maritime pine (*Pinus pinaster*) to antibiotics used in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. **Plant Cell Tiss Org Cult 87,33–40.**

Taiz, L., Zeiger, E. **(1991).** Plant Physiology. Redwood City: **The Benjamin/Cumings Publishing.**

Tehrim, S., Yasin Mirza, M., Mustafa Sajid, G**. (2013**). Comparative study of different growth regulators forefficient plant regeneration in grapes. **Pakistan J. Agric. Res. Vol. 26 No. 4,** Plant Cell.

Tyagi, A.P., Comai, L., Byers, B**. (2001).** Comparison of plant regeneration from root, shoot and leaf explants in pigeon pea (*Cajanus cajan*) cultivars. **SABRAO J. Breed. Gen. 33, 59-71.**

Tomes, D. T., and Swanson, E. B. **(1982).** Application of in vitro selection to plant improvement. **In 'Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture & Industry'**.

Tilton, V. R., and Russell, H. **(1984).** Applications in in vitro pollination/fertilization technology. **BioScience 34, 239-42.**

Tiwari, S.K., Tiwari, K.P., Siril ,E.A **.(2002).** An improved micropropagation protocol for teak. **Plant Cell Tiss Org Cult 71,1–6**

Taylor, J**. (1989).** *Geraniums* and *Pelargoniums*: The Complete Guide to Cultivation, Propagation and Exhibition. **Philadelphia, PA, Crowood Press**.

Torres, A.I. **(2004).** Rooting experiments with *Euphorbia lagascae* cuttings. **Anales de Biologia, 26,101-104.**

Torres,K.C. and J.A.Carlisi. **(1986).** Enhanced shoot multiplication and rooting of **Camellia sasanqua.Plant Cell Reports.5,381-384.**

U.S. Department of Agriculture. **(2012).** Floriculture crops 2010 summary. Nat. Agr. Sta. Service, Washington, DC. 23 Oct. 2012. <http://usda01. library.cornell.edu/usda/current/FlorCrop/ (*Pelargonium domesticum*) geranium. **Can. J. Bot. 69, 1188-1193.**

Van Staden, D. **(2008).** Plant growth regulators, II: cytokinins, their analogues and inhibitors. In: **Plant Propagation by Tissue Culture (eds 3) (George EF *et al* eds), pp 205-226, Springer.**

van der Walt, J.J.A**. (1979).** *Pelargoniums* of Southern Africa. **vol I. 2nd ed. Pallotinerdruck, Limburg, South Africa.**

van derWalt, J. J. A. & Vorster, P. J. **(1988).** *Pelargoniums of Southern Africa,* **vol. 3. National Botanic Gardens, Kirstenbosch.**

van der Walt, J.J.A. **(1993).** Discovering the world of pelargoniums. Proc. **3rd Intl. *Geranium* Conf. Ball Publ., Batavia, Ill.**

Vorderbank, H. **(1949).** Ergebnisse der Chemotherapie der Tuberculose. **Pharmazie 4, 198-207.**

Van Engelen, F.A., de Vries, S.C**. (1992):** Extracellular proteins in plant embryogenesis. In: **Trends in Genetics 8 (2), S. 66–70.**

Visser, Ch., Qureshi, J.A., Gill, R., Saxena, P. K. **(1992)**. Morphoregulatory role of thidiazuron. Substitution of auxin and cytokinin re quirement for the in duction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. **Plant Physiol. 99: 1704-1707.**

Verma, R.S., Verma ,R.K., Yadav, A.K., Amit, C. **(2010).** Change in the essential oil composition of the *Rose- scented geranium (p.graveolens L heri.exAi.)* due to date of transplanting under hill conditions of utterakhand. **Indian J. Nat. Prod. Res., 1, 367-370.**

Wilmoth, J.C.,Wang, S.,Tiwari, S.B.,Joshi, A.D., Hagan, G.,Guilfoyle.T.J.Alonso, J.M., Ecker J.R., Reed, J.W**. (2005).**NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation**. Plant,J.43:118-130.**

Williams, R.R., Taji, A.M. **(1987).** Effects of temperature, darkness and gelling agent on long-term storage of *in vitro* shoot cultures of Australian woody plant species. **Plant Cell Tiss. Org. Cult. 11, 151-156.**

Wu, C.H., Dewir, Y.H., Hahn, E.J., Paek, K.Y. **(2006).** Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. J. **Plant Biol. 49, 193–199.**

Wojtania, A., Gabryszewska, E**. (2004).** Regeneration of *Pelargonium* ×*Hederaefolium* cv. Bonete of petiol explants. **Acta Physiologiae Plantarum 26, 255-262.**

Wojtania, A., Gabryszewska, E**. (2001)**. Effect of cytokinins and amino ac ids on multipliction of *Pelargonium* cultivars. **Acta Soc. Bot. Pol. 70 (2): 203-207.**

Wojtania, A. (2010) . Effect of Meta-Topolin on in vitro propagation of *Pelargonium* ×*Hortorum* and *Pelargonium* ×*Hederaefolium* cultivars. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae. Vol79, No, 2: 101-106.**

Wang, H.M., Zu ,Y.G., Dong, F.L., Zhao, X.J. **(2005).** Assessment of factors affecting *in vitro* shoot regeneration from axillary bud explants of *Camptotheca acuminata*. **J Fores Res 16,52–54.**

Went, F.W. **(1934).** On the pea test method for auxin, plant growth hormone. **Proc.K.Ned.Akad.Wet, 37, pp547.**

Werner, T and schmulling, T. **(2009).** Cytokinin action in plant development. **Curr. Opin. Plant Bio, 12, pp527**

Wilkins, C. P., and Dodds, J. H. **(1983).** The application of tissue culture to plant genetic conservation. **Science Progress, Oxford 68, 259-84.**

Winkelmann, T/, Kaviani, K., Serek, M. **(2005).** Development of a shoot regeneration protocol for genetic transformation in *Pelargonium zonale* and *Pelargonium peltatum* hybrids. **Plant Cell Tiss Org. Cult 80:33–42**

Withers, L. A**. (1989).** In *vitro* conservation and germplasm utilisation. In 'The Use of Plant Genetic Resources'. (Eds A. H. D. Brown, *0.* H. Frankel, D. R. Marshall and J. T. Williams.) **pp. 309-34. (Cambridge University Press: Cambridge.)**

Webb, W.J. **(1984).** The *Pelargonium* family. **Croom Helm, London.**

Wilson, D.P.M**. (1994).** Histology of somatic embryogenesis in regal *geranium***. J.Amer. Soc. Hort. Sci. 119(3), 648–651.**

Xie, L., Li, X., Li, Y., Liu, J. **(2004).** Tissue culture and Rapid propagation of Lemon-scented Geranium. **Forest Research.17(3):379-381.**

Yeo, P.F**. (1984).** Fruit-discharge-type in *Geranium* (*Geraniaceae*): its use in classification and its evolutionary implications. – **Bot. J. Linn. Soc., 89, 1-36.**

Zawadzińska, A., Salachna ,P. **(2015).** Growth, flowering and photosynthetic pigments of *Pelargonium*× *Hortorum* L.H. Balley Survivor hot Pink and 'Graffiti Fire grown in substrates containing sewage sludge compost. **Volume 16, Issue 3,pages 168–176.**

Yi, Q.y., Xia, K.g., Jiang, M., Ren, H. **(2010).** Study on in vitro Shoot Culture of *Pelargonium graveolens* and Its Production. **Southwest China Journal of Agricultural. 2: 59-67.**

Yirssaw, K.,Wondyifraw, N.,Nigussie, D., Abebie,B**. (2014).** Effects of growth regulators on in vitro cultured nodal explants of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clones. **African Journal of Biotechnology. Vol. 13(28), pp. 2830-2839.**

Zukar, A., Ahroni, A., Shejtman, H., vinstein, A. **(1997).** Adventitious shoot regeneration from leaf explants of *Gypsophla paniculata* L. **Plant cell Rep. 16, 775-778.**

Ziv, M. **(1991).** Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: Debergh P.C. and Zimmerman R.H. (eds), Micropropagation: Technology and Applications. **Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 45–70.**

Ziv and Halevy. **(1983). Hort.Sci18,434-436**

Zhu, Z., and Wu, H. **(1979).** In vitro production of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of *Triticum aestivum* and *Nicotiana tabacum.* **Acta Academia Sinica 6, 181-3.**

Zobayed, S.M.A., Afreen-Zobayed, F., Kubota, C., Kozai, T**. (2000).** Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under in vitro photoautothrophic condition. **Ann. Bot. 85, 587-592.**

Zobayed, S.M.A., Saxena, P.K. **(2003).** In vitro-grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem') in a temporary immersion bioreactor. **Plant Sci. 165, 463–470.**

Zuraida, A.R., Mohd Shukri, M.A., Ayu Nazreena, O., Zamri, Z. **(2013).** Improved micropropagation of biopesticidal plant, *Pelargonium radula.* **American Journal of Research Communication.Vol, 1 (1).**

Zuraida, A. R., Mohd Shukri, M. A. Erny Sabrina, M. N. and Ayu Nazreena, O. **(2015).** Improvement of Regeneration of *Pelargonium radula* via Somatic Embryogenesis. **British Biotechnology Journal, 5(4): 166-173, 2015, Article no.BBJ.2015.016. ISSN: 2231–2927.**

Zhou, J., Ma, H., Guo, F., Luo, X. **(1994).** Effect of thidiazuron on so matic embryogenesis of *Cayratia japonica*. **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.36: 73-79.**

Abstract:

Shoot organogenesis from mature leaf and petiol tissues of two Pelargonium ×*domesticum* cultivars, 'Aristo'and 'Bermoda', grown in the greenhouse, were optimized in the presence of thidiazuron (TDZ) and BA. In the first experiment, the effect of different concentrations of 6-benzyladenine (BA) alone or compounded with Indole-3-acetic acid (IAA) on basal Murashige and Skoog (MS) medium were evaluated with two subculture for shoot induction from lateral bud explants in stablishment. The results showed that the highest regeneration percentage and shoot number in 'Aristo' (100 %, 42.3) and 'Bermoda' (82.33%, 20.89) obtion 2 mg/l BA in first subculture. However, maximum shoot mass and leaves number (195.7 mg, 8.16) was achieved in control plants (with one plantlet per explant). In the second subculture, highest regeneration and shoot number (100 %, 42.78) in 'Aristo' and 'Bermoda' was recorded with 1 mg/l BA. Control plants (with one plantlet per explant) showed highest number of leaves (6.99) on MS media. Maximum shoot mass (216.1mg) was achieved with 1 mg/l BA compounded with 0.5 mg/l IAA . In the second experiment, The effects of types of two Pelargonium×domesticum cultivars, 'Aristo'and 'Bermoda' and different concentration of plant growth regulators was evaluated on direct regeneration from mature leaf and petiol explants. Frequency of regeneration reached approximately (85.2 %) for both cultivars on basal Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2 mg/l TDZ, 2 mg/l of 6-benzyladenine (BA) and 1 mg/l a-naphtaleneacetic acid (NAA) for a period of 2 weeks and followed by subculture of explants to a fresh medium containing 2 mg/l BA and 1 mg/l NAA with the induction of shoots per explant (25/61). however the highest shoot length obtion with 1 mg/l BA with 1 mg/l NAA only at 33.25 mm.In third experiment, Regenerated plantlets were rooted on half-strength MS medium supplemented with IAA and IBA. Maximum rooting percentage and shoot mass and root mass was achieved with 2 mg/l of IAA and 1/5 mg/l of IBA and maximum number of root with 1.5 mgl of IBA and highest root length (200.03 mm.) were obtained with 2 mg/l of IAA. regenerated shoots from both cultivars developed roots when transferred to organic soil mix with cocopite and perlite (1:3:1) , acclimatized, and successfully transferred to greenhouse conditions. frequency of survival was 100 % for 'Aristo' and 'Bermoda' in 2 mg/l IAA and 1/5 mg/l of IBA treatments.

The present study provides a comprehensive methodology for high efficiency micropropagation of *Pelargonium ×domesticum* for commercial production.

Keywords: Micropropagation, Organogenesis ,Direct regeneration, Plant growth regulatore

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Horticultural Sciences

Optimizing culture medium for in vitro direct shoot regeneration of Regal (*P.grandiflorum*)

By: Parissa Mahmoudi Fard

Supervisor:

Dr. Z. Ghasimi-Hagh

Advisor:

Dr. Hojatollah Bodaghi

July 2017