بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

رشته بیوتکنولوژی

پایان نامه کارشناسی ارشد

تأثیر تنظیم کننده‌های رشدی بر ریزازدیادی درون شیشه‌ای گیاه *Haworthia spp.* با استفاده از ریزنمونه برگی

نگارنده: نفیسه نجاریان کرمانی

اساتید راهنما:

دکتر مهدیه پارساییان

دکتر زیبا قسیمی حق

دی ۹۸

شماره: ۹۰۱۰۲۲۰
تاریخ: ۱۳۹۸/۱۲/۰۲

باسمه‌تعالی

دانشگاه صنعتی شاهرود
مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم نفیسه نجاریان کرمانی با شماره دانشجویی۹۵۱۵۱۴۴ رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی تحت **عنوان تأثیر تنظیم کننده‌های رشدی بر ریزازدیادی درون شیشه‌ای گیاه *Haworthia spp.* با استفاده از ریزنمونه برگی** که در تاریخ ۹۸/۱۰/۱۸ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

الف) درجه عالی: نمره ۲۰-۱۹ ☐ ب) درجه خیلی خوب: نمره ۱۸/۹۹ – ۱۸ ☑
ج) درجه خوب: نمره۱۷/۹۹– ۱۶ ☐ د) درجه متوسط: نمره ۱۵/۹۹-۱۴ ☐
ه) کمتر از ۱۴ غیر قابل قبول و نیاز به دفاع مجدد دارد ☐
نوع تحقیق: نظری ☐ عملی ☐

عضو هیأت داوران	نام ونام خانوادگی	مرتبهٔ علمی	امضاء
۱ـ استادراهنمای اول	دکتر مهدیه پارسابیان		
۲- استادراهنمای دوم	دکتر زیبا قسیمی حق		
۳- استاد مشاور	-		
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر امین ابراهیمی		
۵- استاد ممتحن اول	دکتر شاهرخ قرنجیک		
۶ـ استاد ممتحن دوم	دکتر پرویز حیدری		

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: محمد رضا عامریان

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

منت و سپاس به درگاه یگانه خداوندی که پرتویی از لطف ثبوتیه اش جان عامیان و شفای درد فراق عالمیان است معبودی که محبوبیتش پوشیده نیست و شکر نعمتش واجب است.

از پدر و مادرم به خاطر لطف بی دریغ و از همسر عزیزم به پاس همراهی ایشان سپاسگزارم.

از اساتید راهنمایی گرامی سر کار خانم دکتر مهدیه پارساییان و سرکار خانم دکتر زیبا قسیمی حق به خاطر همکاری و راهنمایی های بی دریغشان صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

تعهد نامه

اینجانب نفیسه نجاریان کرمانی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه **تأثیر تنظیم کننده‌های رشدی بر ریزازدیادی درون شیشه‌ای گیاه *Haworthia spp.* با استفاده از ریزنمونه برگی** تحت راهنمائی دکتر مهدیه پارساییان و 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:

هاورتیا از گیاهان چند ساله در خانواده *Liliaceae* و بومی آفریقای جنوبی است. تکثیر بذری این گیاه زمان‌بر بوده و با مشکلاتی در زمینه حفظ خلوص ژنتیکی همراه است و تکثیر غیرجنسی آن از طریق پاجوش‌ها و قلمه برگی به دلیل نیاز به گیاه مادری فراوان محدود است، پس استفاده از کشت بافت گیاهی می‌تواند برای تکثیر این گیاه سودمند باشد. در این پژوهش اثر دو نوع تنظیم‌کننده‌ی رشدی سایتوکنینی BAP وKIN (۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم در لیتر) و دو نوع تنظیم کننده‌ی رشدی اکسین IBA و NAA (۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) با استفاده از دو نوع ریزنمونه‌ی برگ کامل و بخش تحتانی برگ در محیط کشت MS تغییر یافته، بر ریزازدیادی درون شیشه‌ای گیاه زینتی هاورتیا رقم Attenuata بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین تعداد (۳/۵ عدد)، طول (۱/۴۵ سانتی‌متر) و عرض (۰/۸۷ سانتی‌متر) شاخساره در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN با کاربرد ریزنمونه‌ی تحتانی حاصل شد. ریزنمونه‌ی برگ کامل نیز توانست در ترکیب ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین تعداد شاخساره (۵/۲۲ عدد) را تولید نماید. حداکثر تعداد برگ (۴/۶۶ عدد) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون حضور IBA و طویل‌ترین و عریض-ترین برگ‌ها (۱/۰۵ و ۰/۶۸ سانتی‌متر) نیز در بالاترین سطح سیتوکنین‌ها (BAP و KIN) به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA با کاربرد ریزنمونه‌ی برگ کامل تولید شدند. در این پژوهش تأثیر ضخامت ریزنمونه‌ی TCL (۳ و ۵ میلی‌متر) بر باززایی گیاه هاورتیا نیز مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین میانگین تعداد شاخساره (۱/۰۶ عدد) با بالاترین میزان میانگین طول و عرض شاخساره (۱ و ۰/۹ سانتی‌متر) در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP با کاربرد ریزنمونه‌ی TCL با ضخامت ۳ میلی‌متر تولید شد. شاخساره‌های باززاشده جهت ریشه‌زایی، به طور جداگانه به محیط‌های MS و ½MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد IBA وNAA (در غلظت‌های ۰، ۰/۵ ، ۱ ، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) انتقال یافتند. بر اساس نتایج، بیشترین تعداد ریشه (۶/۶۶ عدد) و طویل‌ترین ریشه (۳/۴۷ سانتی‌متر) در محیط ½MS به ترتیب در تیمار۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل گردید. سپس، گیاهان ریشه‌دار شده به گلدان‌های حاوی کوکوپیت و پرلیت با رطوبت نسبی ۸۰ درصد و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، جهت سازگاری به گلخانه منتقل شدند. شاخساره‌های هاورتیا به میزان ۹۰ درصد با محیط گلخانه سازگار شدند.

کلمات کلیدی: هاورتیا، ریزنمونه‌ی برگی، باززایی، تنظیم‌کننده‌های رشد، شاخه‌زایی، ریشه‌زایی

مقالات مستخرج از پایان نامه:

ریزازدیادی گیاه *Haworthia attenuatae* با استفاده از ریزنمونه‌ی برگ کامل و بخش تحتانی برگ، یازدهمین همایش ملی و سومین همایش بین المللی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، مرکز همایش‌های رازی، شهریور ۹۸.

فهرست مطالب

عنوان .....صفحه

فصل اول: مقدمه و کلیات **۱**

۱-۱ مقدمه ۲

۱-۲- مشخصات گیاه شناسی هاورتیا ۳

۱-۳- تکثیر هاورتیا و شرایط خاک آن ۴

۱-۴- کاربردهای کشت بافت گیاهی ۵

۱-۵- پیشرفت‌های کشت بافت و سلول گیاهی در ایران ۶

۱-۶- باززایی..... ۶

۱-۷- ریزازدیادی ۷

۱-۸- موارد ویژه ریزازدیادی در کشت بافت ۸

۱-۸-۱- قهوه‌ای شدن کشت‌ها ۸

۱-۸-۲- شناخت آلودگی‌های درونی ۹

۱-۸-۳-شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها ۹

۱-۹- محیط کشت ۱۰

۱-۹-۱- اجزای محیط کشت ۱۱

۱-۹-۱-۱-نیتروژن ۱۱

۱-۲-۶-۲- کلسیم ۱۲

۱-۹-۱-۳- منیزیم ۱۲

۱-۹-۱-۴- پتاسیم ۱۲

۱-۹-۱-۵- فسفر ۱۲

۱-۹-۱-۶- سولفور ۱۳

۱-۹-۱-۷- آهن ۱۳

۱-۹-۱-۸- منگنز ۱۳

۱-۹-۱-۹- روی ۱۳

۱-۹-۱-۱۰- مس ۱۳

۱-۱۰- تنظیم کننده‌های رشد ۱۴
۱-۱۱- ضد عفونی ریزنمونه‌ها ۱۵
۱-۱۲- فناوری کشت لایه‌های سلولی نازک (TCL) ۱۵
۱-۱۳- اهداف تحقیق ۱۵
فصل دوم: مروری بر منابع ۱۷
۲-۱- تاریخچه کشت بافت ۱۸
۲-۲- مروری بر تحقیقات گذشته ۱۹
فصل سوم: مواد و روش‌ها ۳۱
۳-۱- وسایل و تجهیزات آزمایشگاهی ۳۲
۳-۲- تنظیم کننده‌های رشد ۳۲
۳-۳- ویتامین‌ها ۳۲
۳-۴- هگزیتول‌ها ۳۳
۳-۵- آنتی اکسیدان‌ها ۳۳
۳-۶- pH محیط کشت ۳۳
۳-۷- تهیه‌ی محیط کشت ۳۳
۳-۷- ۱- تهیه‌ی محلول‌های مادری نمک‌های پر مصرف محیط کشت MS با غلظت ۱۰ برابر (۱۰X) ۳۳
۳-۷- ۲- تهیه‌ی محلول‌های مادری نمک‌های کم مصرف محیط کشت MS با غلظت ۱۰۰ برابر (۱۰۰X) ۳۴
۳-۷- ۳- تهیه‌ی محلول‌های مادری ویتامین‌ها در محیط کشت MS با غلظت ۱۰۰ برابر (۱۰۰X) ۳۴
۳-۷- ۴- تهیه‌ی محلول مادری آهن محیط کشت MS ۳۵
۳-۷- ۵- تهیه‌ی محلول‌های ذخیره‌ی تنظیم کننده‌های رشد ۳۵
۳-۸- تهیه‌ی یک لیتر محیط کشت ۳۶
۳-۹- ضدعفونی کردن محیط و وسایل کار ۳۷
۳-۱۰- استریل کردن با فیلتر ۳۷
۳-۱۱- ضدعفونی و آماده سازی ریزنمونه‌ها ۳۸
۳-۱۲- شرایط اتاق رشد ۳۸
۳-۱۳- کشت و استقرار ریزنمونه‌ها ۳۸

۳-۱۳-۱- استقرار ۳۸
۳-۱۳-۲- بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد بر باززایی شاخساره گیاه هاورتیا در محیط درون شیشه‌ای ۳۹
۳-۱۳-۲-۱- واکشت در مرحله‌ی باززایی ۳۹
۳-۱۳-۲-۲- صفات مورد اندازه گیری در مرحله‌ی باززایی ۳۹
۳-۱۳-۳- بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد IBA، BAP و اندازه ریزنمونه‌ی TCL ساقه بر باززایی شاخساره ی گیاه هاورتیا در محیط درون شیشه‌ای ۳۹
۳-۱۳-۴- ریشه‌زایی ۴۰
۳-۱۳-۴-۱- واکشت در مرحله‌ی ریشه‌زایی ۴۰
۳-۱۳-۴-۲- صفات مورد اندازه گیری در مرحله‌ی ریشه‌زایی ۴۰
۳-۱۴- سازگاری و انتقال به گلخانه ۴۰
۳-۱۵- آنالیز آماری ۴۱
۳-۱۵-۱- نرم افزارهای مورد استفاده ۴۱
فصل چهارم: نتایج و بحث ۴۳
۴-۱- اثر تیمارهای ضدعفونی بر آلودگی و فنول‌زایی ریزنمونه‌ها ۴۴
۴-۲- آزمایش اول: بررسی اثر تنظیم کننده‌های BAP و IBA بر باززایی از شاخساره‌ی گیاه هاورتیا در محیط درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های برگی ۴۶
۴-۲-۱- تعداد شاخساره ۴۷
۴-۲-۲- طول شاخساره ۴۸
۴-۲-۳- عرض شاخساره ۴۹
۴-۲-۴- تعداد برگ ۵۱
۴-۲-۵- طول برگ ۴۹
۴-۲-۶- پهنای برگ ۵۱
۴-۳- آزمایش دوم: بررسی اثر تنظیم کنده‌های KIN و IBA بر باززایی از شاخساره‌ی گیاه هاورتیا در محیط درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های برگی ۵۷
۴-۳-۱- تعداد شاخساره ۵۷
۴-۳-۲- طول شاخساره ۶۰
۴-۳-۳- عرض شاخساره ۶۱
۴-۳-۴- تعداد برگ ۶۴

۴-۳-۵- طول برگ ۶۵
۴-۳-۶- پهنای برگ ۶۵
۴-۴- آزمایش سوم: بررسی اثر تنظیم کننده‌های BAP و NAA بر باززایی از شاخساره‌ی گیاه هاورتیا در محیط درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های برگی ۶۸
۴-۴-۱- تعداد شاخساره ۶۹
۴-۴-۲- طول شاخساره ۷۱
۴-۴-۳- عرض شاخساره ۷۳
۴-۴-۴- تعداد برگ ۷۴
۴-۴-۵- طول برگ ۷۴
۴-۴-۶- پهنای برگ ۷۵
۴-۵- آزمایش چهارم: بررسی اثر تنظیم کننده‌های KIN و NAA بر باززایی از شاخساره‌ی گیاه هاورتیا در محیط درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های برگی ۷۷
۴-۵-۱- تعداد شاخساره ۷۸
۴-۵-۲- طول شاخساره ۸۰
۴-۵-۳- عرض شاخساره ۸۱
۴-۵-۴- تعداد برگ ۸۳
۴-۵-۵- طول برگ ۸۵
۴-۴-۶- پهنای برگ ۸۵
۴-۶-آزمایش پنجم: بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های BAP ، IBA و اندازه‌ی ریزنمونه‌ی TCL ساقه بر باززایی شاخساره ی گیاه هاورتیا..... ۸۷
۴-۶-۱- کالوس‌زایی ۸۸
۴-۶-۲- تعداد شاخساره ۸۹
۴-۶-۳- طول شاخساره ۹۱
۴-۶-۴- عرض شاخساره ۹۳
۴-۷- آزمایش ریشه‌زایی ۹۵
۴-۷-۱- تعداد و طول ریشه‌های رشد یافته تحت تنظیم کننده‌ی رشد IBA..... ۹۶
۴-۷-۲- تعداد و طول ریشه‌های رشد یافته تحت تنظیم کننده‌ی رشد NAA..... ۹۸
۴-۸- مرحله‌ی سازگاری ۱۰۱

۴-۹- نتیجه گیری کلی ۱۰۲
۴-۱۰- پیشنهادات ۱۰۴
منابع و مآخذ ۱۰۵

فهرست جداول

۳-۱- غلظت نمک‌های پرمصرف محیط کشت MS در حجم نهایی (۵۰۰ میلی‌لیتر) ۳۴

۳-۲- غلظت نمک‌های کم‌مصرف محیط کشت MS در حجم نهایی (۲۵۰ میلی‌لیتر)..... ۳۴

۳-۳- غلظت نوع ویتامین‌های مورد استفاده در محیط کشت MS در حجم نهایی (۲۵۰ میلی‌لیتر) ۳۵

۳-۴- غلظت آهن قرمز در محیط کشت MS تغییر یافته در حجم نهایی (۲۵۰ میلی‌لیتر) ۳۵

۳-۵- نام غلظت‌های تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مور استفاده در محیط کشت ۳۶

۴-۱- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی گیاهان باززاشده‌ی هاورتیا تحت تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد BAP، IBA و نوع ریزنمونه‌ی برگی..... ۴۶

۴-۲- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی گیاهان باززاشده‌ی هاورتیا تحت تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد KIN، IBA و نوع ریزنمونه‌ی برگی..... ۵۶

۴-۳- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی گیاهان باززاشده‌ی هاورتیا تحت تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد BAP، NAA و نوع ریزنمونه‌ی برگی..... ۶۸

۴-۴- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی گیاهان باززاشده‌ی هاورتیا تحت تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد KIN، NAA و نوع ریزنمونه‌ی برگی..... ۷۷

۴-۵- تجزیه واریانس صفات درصد کالوس، تعداد، طول و عرض شاخساره‌ی حاصل از باززایی شاخساره گیاه هاورتیا تحت تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد BAP، IBA و ضخامت ریزنمونه‌ی TCL.....۸۷

۴-۶- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های تنظیم کننده‌ی رشد IBA و نوع محیط کشت بر میزان ریشه‌زایی گیاه هاورتیا..۹۶

۴-۷- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های تنظیم کننده‌ی رشد IBA و نوع محیط کشت بر میزان ریشه‌زایی گیاه هاورتیا..۹۹

فهرست اشکال

۱-۱- شکل ظاهری گیاه *Haworthia attenuatae* ۴

۴-۱-عدم رشد ریزنمونه‌های میانی ۴۴

۴-۲- باززایی از ریزنمونه‌های الف: برگ کامل و ب: بخش تحتانی برگ، یک ماه پس از کشت اولیه ۴۴

۴-۳- ریزنمونه‌های آلوده به باکتری و قارچ در طی مراحل آزمایش ۴۵

۴-۴- مقایسه میانگین اثر متقابل انواع ریزنمونه و ترکیبات تنظیم کننده‌های رشد BAP و IBA بر تعداد شاخساره‌ی باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۴۷

۴-۵-مقایسه میانگین طول شاخساره‌های باززاشده تحت تیمارهای هورمونی IBA و BAP در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۴۸

۴-۶- مقایسه میانگین طول شاخساره‌های باززاشده در تیمار هورمونی IBA با ریزنمونه‌های برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۴۹

۴-۷- مقایسه میانگین طول شاخساره‌های باززاشده در تیمار هورمونی BAP با ریزنمونه‌های برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۵۰

۴-۸- مقایسه میانگین عرض شاخساره‌های باززاشده تحت تیمار هورمونی IBA وBAP در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۵۰

۴-۹- مقایسه میانگین عرض شاخساره‌های باززاشده در تیمار هورمونی IBA با ریزنمونه‌های برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا.....۵۱

۴-۱۰-مقایسه میانگین تعداد برگ تولید شده توسط شاخساره‌های باززاشده‌ی گیاه هاورتیا تحت تأثیر برهمکنش ترکیبات هورمونی BAP، IBA و نوع ریزنمونه در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۵۲

۴-۱۱- مقایسه میانگین طول برگ شاخساره‌های باززاشده تحت تیمار هورمونی BAP و IBA در کشت درون شیشه-ای گیاه هاورتیا ۵۲

۴-۱۲- مقایسه میانگین طول برگ شاخساره‌های باززاشده از ریزنمونه‌های برگی مختلف تحت تیمار هورمونی IBA در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا.....۵۳

۴-۱۳- مقایسه میانگین طول برگ‌های تولید شده توسط شاخساره‌های باززاشده‌ی تحت تأثیر برهمکنش ترکیبات هورمونی BAP، IBA و نوع ریزنمونه در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا.....۵۴

۴-۱۴- مقایسه میانگین پهنای برگ شاخساره‌های باززاشده در تیمار هورمونی BAP و IBA در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا.....۵۵

۴-۱۵- مقایسه میانگین پهنای برگ شاخساره‌های باززاشده در تیمار هورمونی IBA با استفاده از انواع ریزنمونه برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۵۵

۴-۱۶- باززایی شاخساره هاورتیا از ریزنمونه تحتانی و برگ کامل با تیمار هورمونی BAP و IBA یک ماه پس از کشت اولیه، الف: باززایی از ریزنمونه تحتانی ب: باززایی از ریزنمونه برگ کامل ج: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه تحتانی د: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه برگ کامل ۵۶

۴-۱۷- مقایسه میانگین تعداد شاخساره‌های باززاشده تحت تیمارهای KIN و IBA در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۵۸

۴-۱۸- مقایسه میانگین تعداد شاخساره‌های باززاشده تحت تیمار هورمونی IBA با ریزنمونه‌های برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۵۹

۴-۱۹- مقایسه میانگین تعداد شاخساره‌های باززاشده تحت تیمار هورمونی KIN با ریزنمونه‌های برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۵۹

۴-۲۰- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN، IBA و انواع ریزنمونه بر تعداد شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۶۰

۴-۲۱- مقایسه میانگین طول شاخساره‌های باززاشده تحت تیمارهای هورمونی KIN و IBA در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۶۱

۴-۲۲- مقایسه میانگین طول شاخساره‌های باززاشده در تیمار هورمونی IBA با استفاده از انواع ریزنمونه برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۶۱

۴-۲۳- مقایسه میانگین طول شاخساره‌های باززاشده در تیمار هورمونی KIN با استفاده از انواع ریزنمونه برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۶۱

۴-۲۴- مقایسه میانگین عرض شاخساره‌های باززاشده در ترکیب تیماری IBA با KIN در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۶۳

۴-۲۵- مقایسه میانگین عرض شاخساره‌های باززاشده در تیمار هورمونی IBA با استفاده از انواع ریزنمونه برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۶۴

۴-۲۶- مقایسه میانگین تعداد برگ‌های شاخساره‌ی باززاشده تحت تیمار هورمونی KIN و IBA در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۶۴

۴-۲۷- مقایسه میانگین تعداد برگ‌های تولید شده توسط شاخساره‌های باززاشده تحت تأثیر برهمکنش ترکیبات هورمونی BAP، IBA و نوع ریزنمونه در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۶۵

۴-۲۸- مقایسه میانگین ترکیبات سه جانبه‌ی تیمارهای هورمونی IBA، KIN و انواع ریزنمونه‌های برگی بر طول برگ شاخساره‌های تولید شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۶۶

۴-۲۹- مقایسه میانگین ترکیبات سه جانبه‌ی تیمارهای هورمونی IBA، KIN و انواع ریزنمونه‌های برگی بر پهنای برگ شاخساره‌های تولید شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۶۷

۴-۳۰- باززایی شاخساره هاورتیا از ریزنمونه تحتانی و برگ کامل با تیمار هورمونی KIN و IBA یک ماه پس از کشت اولیه، الف: باززایی از ریزنمونه تحتانی ب: باززایی از ریزنمونه برگ کامل ج: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه تحتانی د: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه برگ کامل..... ۶۷

۴-۳۱- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP و NAA بر تعداد شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۶۹

۴-۳۲- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار هورمونی NAA و نوع ریزنمونه بر تعداد شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۷۰

۴-۳۳- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP، NAA و نوع ریزنمونه بر تعداد شاخساره‌های باززاشده در تیمار در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۷۱

۴-۳۴- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP، NAA بر طول شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۷۲

۴-۳۵- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون BAP بر طول شاخساره های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۷۲

۴-۳۶- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP، NAA بر عرض شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۷۳

۴-۳۷- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون NAA بر عرض شاخساره های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۷۳

۴-۳۸- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP، NAA بر تعداد برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۷۴

۴-۳۹- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP، NAA بر طول برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۷۵

۴-۴۰- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP، NAA و نوع ریزنمونه بر طول برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۷۵

۴-۴۱- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP، NAA بر پهنای برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۷۶

۴-۴۲- باززایی شاخساره هاورتیا از ریزنمونه تحتانی و برگ کامل با تیمار هورمونی BAP و NAA یک ماه پس از کشت اولیه، الف: باززایی از ریزنمونه تحتانی ب: باززایی از ریزنمونه برگ کامل ج: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه تحتانی د: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه برگ کامل..... ۷۶

۴-۴۳- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN، NAA بر تعداد شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۷۸

۴-۴۴- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون NAA بر تعداد شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۷۹

۴-۴۵- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون KIN بر تعداد شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۷۹

۴-۴۶- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN، NAA بر طول شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۸۰

۴-۴۷- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون NAA بر طول شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۸۱

۴-۴۸- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون KIN بر طول شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۸۱

۴-۴۹- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN، NAA بر عرض شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۸۲

۴-۵۰- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN، NAA و نوع ریزنمونه بر عرض شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۸۲

۴-۵۱- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN، NAA بر تعداد برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۸۳

۴-۵۲- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون NAA بر تعداد برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۸۴

۴-۵۳- مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون KIN بر تعداد برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۸۴

۴-۵۴- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN، NAA بر طول برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۸۵

۴-۵۵- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN، NAA بر پهنای برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۸۶

۴-۵۶- باززایی شاخساره هاورتیا از ریزنمونه تحتانی و برگ کامل با تیمار هورمونی KIN و NAA یک ماه پس از کشت اولیه، الف: باززایی از ریزنمونه تحتانی ب: باززایی از ریزنمونه برگ کامل ج: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه تحتانی د: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه برگ کامل..... ۸۶

۴-۵۷- مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه‌ی TCL ساقه و هورمون BAP بر درصد کالوس‌زایی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۸۸

۴-۵۸- مقایسه میانگین برهمکنش سه جانبه‌ی ترکیبات هورمونی BAP، IBA و ضخامت ریزنمونه‌ی TCL ساقه بر درصد کالوس‌زایی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۸۹

۴-۵۹- القای کالوس از بخش‌های برش خورده ریزنمونه‌ی TCL ساقه و شاخساره‌های باززاشده از بافت کالوس..... ۸۹

۴-۶۰- مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه‌ی TCL ساقه و هورمون IBA بر تعداد شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۹۰

۴-۶۱- مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه‌ی TCL ساقه و هورمون BAP بر تعداد شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۹۱

۴-۶۲- مقایسه میانگین برهمکنش سه جانبه‌ی ترکیبات هورمونی BAP، IBA و ضخامت ریزنمونه‌ی TCL ساقه بر تعداد شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۹۱

۴-۶۳- مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه‌ی TCL ساقه و هورمون IBA بر طول شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۹۲

۴-۶۴- مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه‌ی TCL ساقه و هورمون BAP بر طول شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۹۲

۴-۶۵- مقایسه میانگین برهمکنش سه جانبه‌ی ترکیبات هورمونی BAP، IBA و ضخامت ریزنمونه‌ی TCL ساقه بر طول شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۹۳

۴-۶۶- مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه‌ی TCL ساقه و هورمون IBA بر عرض شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۹۴

۴-۶۷- مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه‌ی TCL ساقه و هورمون BAP بر عرض شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۹۴

۴-۶۸- مقایسه میانگین برهمکنش سه جانبه‌ی ترکیبات هورمونی BAP، IBA و ضخامت ریزنمونه‌ی TCL ساقه بر عرض شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۹۵

۴-۶۹- مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون IBA با نوع محیط کشت بر تعداد ریشه‌ی تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۹۶

۴-۷۰- مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون IBA با نوع محیط کشت بر طول ریشه‌ی تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۹۷

۴-۷۱- مرحله ریشه‌زایی با کاربرد تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA ۹۸

۴-۷۲- مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون NAA با نوع محیط کشت بر تعداد ریشه‌ی تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا..... ۹۹

۴-۷۳- مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون NAA با نوع محیط کشت بر طول ریشه‌ی تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا ۱۰۰

۴-۷۴- مرحله ریشه‌زایی با کاربرد تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA..... ۱۰۰

۴-۷۵-مرحله سازگاری با گلخانه در گیاه هاورتیا ۱۰۱

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

تکثیر گیاهان فرآیندی است که تضمین کننده‌ی بقا و افزایش تعداد آنها است. روش تکثیر جنسی و غیرجنسی از جمله روش‌های اصلی تکثیر گیاهان است. در روش جنسی از بذر برای تکثیر گیاهان استفاده می‌شود. در حالی که تکثیر غیرجنسی شامل استفاده از بخش‌های رویشی گیاه، نظیر ریشه، ساقه، برگ‌ها و ... می‌باشد. در این روش، بخشی از گیاه مادری قادر به باززایی گیاه کامل و مشابه با گیاه والد است.گیاهان زینتی بخشی از کل گیاهان موجود در دنیا هستند که بر اساس سلیقه انسان و دارا بودن خصوصیات ویژه‌ای از جمله رنگ، شکل و اندازه گل، برگ و ساقه جزء گروه گیاهان زینتی قرار داده شده‌اند. در حال حاضر صنعت گل و گیاه یک صنعت جهانی و پویا است که در طول چند دهه نرخ رشد زیادی داشته است. با توجه به اهمیت اقتصادی پرورش گل‌ها و گیاهان زینتی در دنیا، استفاده از فناوری‌ها و روش‌های جدید در جهت بازارپسندی آنها می‌تواند نقش بسزایی در بازاریابی این محصولات و تجارت آنها در بازارهای بین المللی داشته باشد. اهمیت تجاری گیاهان زینتی در دهه‌های اخیر، به صورت چشمگیری افزایش یافته و این امر باعث افزایش معنی‌دار پژوهش‌های صورت گرفته بر روی گل و گیاهان زینتی در دنیا شده است(سود و کوهان، ۲۰۰۹). گونه‌های هاورتیا از ساکولنت‌های بیابانی تک لپه‌ای می‌باشند که به عنوان گیاهان زینتی ارزش اقتصادی پیدا کرده‌اند. آنها به صورت رویشی از طریق قلمه‌ها و یا به صورت جنسی توسط بذرها تکثیر می‌یابند (بایر،۱۹۸۲). شیوه‌های کشاورزی نوین، منجر به پراکندگی محل رویش و انزوای جمعیت هاورتیا به کناره‌های ماسه‌سنگ‌ها شده‌است، که این امر با رقابت با سایر گونه‌های مهاجم همراه بوده و یک اثر منفی بر ثبات جمعیت گونه‌های هاورتیا داشته‌است. همچنین، استفاده‌ی بی رویه از برخی گونه‌های این گیاه نظیر *H.limifolia* و *H.koelmamorum* در طب سنتی نیز عاملی است که بقای این گونه‌ها را تهدید می‌کند (کونینگام، ۱۹۸۸). بعضی از گونه‌های هاورتیا، مقادیر زیادی بذر تولید می‌کنند، این گیاهان ممکن است به صورت رویشی از طریق پاجوش‌های گیاه مادری و یا قلمه‌های برگ، نیز تکثیر شوند؛ اما این فرآیند آهسته است.

در نتیجه، ریزازدیادی از طریق کشت بافت می‌تواند جایگزین مناسب برای گونه‌های هاورتیای در معرض خطر در نظر گرفته شود (مایکوک و همکاران ۱۹۹۵). کشت بافت[1] گیاهی عبارت است از رشد بافت و یا اندام گیاهی در یک محیط غذایی مصنوعی استریل که به صورت جامد یا مایع تهیه می‌شود. این تکنیک به عنوان یکی از شاخه‌های زیست فناوری، کاربرد گسترده‌ای در کشاورزی دارد (شریفی و همکاران، ۱۳۸۹). فناوری کشت بافت با هزینه پایین باعث برتری در کشاورزی، باغبانی و گلکاری در بسیاری از کشورهای در حال توسعه است، که هزینه معقول و کیفیت بالای مواد گیاهی را به همراه دارد (ساهو، ۲۰۱۳). پتانسیل کشت بافت گیاهی در افزایش تولیدات کشاورزی توسط سرمایه‌گذاران در کشورهای در حال توسعه به خوبی مشخص شده است. با وجود این، در بیشتر کشورهای در حال توسعه، تأمین مالی امکانات و هزینه واحد تولیدی گیاهان ریزازدیادی شده از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست. با این حال، داد و ستد گیاهان زینتی علیرغم هزینه‌های بالای تولید، پررونق است و گیاهان زینتی بطور کلی ارزش بالایی در واحد گیاهی دارند (سود و کوهان، ۲۰۰۹).

۱-۲- مشخصات گیاه شناسی هاورتیا

هاورتیا (*Haworthia spp.*) از گیاهان گلدار چندساله در خانواده *Liliaceae* و بومی آفریقای جنوبی و به ویژه کشور نامیبیا می‌باشد که تنوع مورفولوژیکی زیادی در این مناطق دارد. به طوری که تاکنون تنوع وسیعی از گونه‌ی *H.limifolia* در شهرهای موزامبیک، سوازیلند، مپومالانگا، کوازولوناتال و گونه‌ی *H.koelmamorum* در استان کیپ شمالی و گونه‌ی *H.arachnoidea* در نامیبیا یافت شده است (کورت، ۲۰۰۰). پزشک و متخصص فرانسوی، هنری آگوست دووال، جنس‌های هاورتیا را از جنس آلوئه ورا جدا کرد و آنها را به احترام یک بازرگان انگلیسی (Adrian Haworth) که بیشتر زندگی خود را صرف معرفی گونه‌های جدید بومی آفریقای جنوبی نموده بود، نامگذاری کرد (هولووی ۱۹۹۸).

1-Tissue culture

هاورتیا، گیاهی زینتی و دیپلوئید (2n=14) است. برگ‌های آن، گوشتی و آبدار بوده و در کنار یکدیگر قرار دارند (بایر، ۱۹۸۲). ارتفاع این گیاه تا ۲۰ الی ۲۵ سانتی‌متر می‌رسد و قطر آن بین ۶-۱۲سانتی‌متر است. این گیاه جزو ساکولنت‌های کوچک محسوب می‌شود و در واقع مجموعه‌ای از برگ‌های به هم پیوسته هستند. هاورتیا رقم Attenuatae دارای برگ‌های ضخیم، نوک تیز، سبزرنگ وسفت با نقاط سفید و راه راه است، که علت نامگذاری آن همین نقاط سفید و راه راه است (بایر، ۱۹۹۹). این گیاه درفصل تابستان گلدهی دارد، اما ممکن است در هر زمانی بسته به شرایط نگهداری آن گلدهی داشته باشد. فصل رشد آن اوایل بهار و پاییز است و به ۱۲ساعت نور غیر مستقیم وملایم نیاز دارد. گرما و نور زیاد باعث متوقف شدن رشد آن می‌شود. نور مستقیم باعث سفید یا زرد شدن برگ‌ها می‌شود. رنگ برگ در شرایط سایه روشن‌تر ودر نور زیاد به قهوه‌ای نزدیک می‌شود (شکل ۱-۱).

شکل ۱-۱ شکل ظاهری گیاه *Haworthia attenuatae*

۱-۳- تکثیر هاورتیا و شرایط خاک آن

گونه‌های هاورتیا در خاک‌های کم عمق بوته‌زارها تمایل به رشد دارند (بوید ۱۹۹۴). هاورتیا گورخری نیازمند خاکی سبک با منافذ زیاد وتهویه‌ی خوب می‌باشد. بدین منظور، می‌توان از مخلوط پیت ماس، ماسه و ورمی کمپوست استفاده کرد و نیز می‌توان از خاک سبکی که شامل دو سوم ماسه و یک سوم خاک‌برگ و رس باشد، استفاده کرد. این گیاه بسیار مستعد پوسیدگی است پس باید در خاکی کاشته شود که آب را برای مدت زیاد در خود نگه ندارد (گجدارزی، ۲۰۰۳).

سه روش رایج برای تکثیر سنتی گیاه هاورتیا وجود دارد (بایر ، ۱۹۸۲):

۱. تکثیر ازطریق بذر: بذرهای حاصل از تکثیر جنسی این گیاه را می‌توان در بهار و اوایل تابستان کشت نمود.
۲. تکثیر ازطریق پاجوش: پاجوش ها را زمانی که به اندازه‌ی یک سوم گیاه مادری است به راحتی می‌توان از گیاه مادری جدا کرد و در گلدان دیگری کاشت.
۳. تکثیر از طریق برگ: فلس‌های برگ به صورت قلمه در خاک کاشته می‌شوند و یک گیاه کامل را تولید می‌نمایند.

ازدیاد از طریق قلمه برگ‌ها به دلیل درصد ریشه‌زایی کم به ندرت مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین به دلیل محدودیت‌های تکثیر رویشی گیاه هاورتیا، به ویژه سرعت کند رشد این گیاه و استقبال بسیار زیاد از گیاه هاورتیا در سال‌های اخیر، سبب شده است که کشت بافت این گیاه از اهمیت بالایی برخوردار باشد. لذا ضرورت تحقیق و توسعه روش مناسب و بهینه جهت ریزازدیادی و کشت بافت این گیاه در داخل کشور احساس می‌گردد.

۱-۴-کاربردهای کشت بافت گیاهی

تکثیر رویشی قلمه‌های ساقه و یا سایر بخش‌های گیاهی برای تولید کلون‌های ژنتیکی در برخی گیاهان به کار می‌رود. تکثیر از طریق کشت بافت جنبه مهمی از کاربردهای این تکنیک است که امروزه از آن در سطح وسیع برای تکثیر گونه‌های جنگلی، باغی و به ویژه گیاهان زینتی استفاده می‌شود. با تمام مزیت‌های کشت بافت، گاهی این تکنیک ممکن است دارای محدودیت‌هایی از قبیل ناهنجاری‌های کروموزومی باشد که با افزایش سن سلول‌های کشت شده، ایجاد می‌شود و تغییرات نامطلوبی در سلول‌ها تولید می‌کند. علاوه براین، کشت‌های طولانی مدت سبب از دست دادن توانایی باززایی گیاهان و سلول‌ها می‌شود.

البته گونه‌های مختلف گیاهی از نظر توانایی باززایی در کشت بافت متفاوت هستند و عواملی همچون شرایط فیزیولوژیکی سلول‌ها و شرایط کشت بر میزان باززایی و رشد موثر هستند. در طی چهار دهه قبل پیشرفت های سریع و قابل توجه ای در این زمینه حاصل شده است که با سایر پیشرفت‌ها در زمینه‌ی زیست شناسی برابری می‌کند؛ به طوری‌که باعث استفاده از این فناوری در سطح جهانی شده است. مشکلات موجود و هزینه‌ی تولید نیز باعث ایجاد محدودیت در استفاده از آنها شده است (فروتن و وادیدار ۱۳۸۵).

۱-۵- پیشرفت‌های کشت بافت و سلول گیاهی در ایران

کشت بافت و سلول گیاهی در ایران کم و بیش از اوایل دهه‌ی ۱۹۷۰ با تحقیقات دکتر داریوش دانش در دانشگاه اصفهان و پس از آن در دانشگاه‌های صنعتی اصفهان، تهران و دیگر موسسات آموزشی و تحقیقاتی کشور شروع شد. به تازگی بخش خصوصی در این زمینه فعالیت‌هایی را شروع کرده است. اگرچه بیشتر مراکز آموزشی و تحقیقاتی کشور در این زمینه فعالیت دارند، ولی گیاهان حاصل از این تحقیقات در کشور از نظر کمی و کیفی در سطح مناسبی نیستند و به ندرت در سطح تولید انبوه قرار می‌گیرند. این در حالی است که در بسیاری از کشورها از جمله هلند، فرانسه و ایالات متحده‌ی آمریکا، افزون بر فعال بودن بخش‌های آموزشی و تحقیقاتی، بخش خصوصی نیز بسیار فعال بوده و از این روش درآمدهای زیادی به دست می‌آورند (طباطبایی و امیدی، ۱۳۹۱).

۱-۶- باززایی[1]

باززایی گیاهان از یک سلول و یا اندام گیاهی از قابلیت‌های کشت بافت است که با کشف هورمون‌های گیاهی امکان پذیر گردید. درصد باززایی در گیاهان بسته به گونه گیاه، شرایط محیط و ترکیبات هورمونی متفاوت است.

1- Regeneration

باززایی به دو صورت مستقیم و غیرمستقیم صورت می‌گیرد. در روش مستقیم ابتدا بافت‌های مریستمی کشت شده و سپس از شاخه‌زایی و ریشه‌زایی برای باززایی گیاهان استفاده می‌شود. در این نوع کشت، شاخه‌های فراوانی از بافت ریزنمونه بدون واسطه‌ی کالوس، تولید می‌شود. در روش باززایی غیرمستقیم عموما تولید گیاهان با واسطه کالوس صورت می‌گیرد (شریفی و همکاران، ۱۳۸۹).

۱-۷- ریزازدیادی[1]

تکثیر کلون در شرایط آزمایشگاهی را ریزازدیادی می‌نامند. کلون عبارتست از ازدیاد افرادی با محتوی ژنتیکی یکسان که با استفاده از روش غیرجنسی تکثیر می‌شوند. ازدیاد رویشی از این نظر که امکان تولید گیاهان یکسان را برای تکثیر گیاهان زینتی فراهم می‌کند، حائز اهمیت است (ویدرز، ۱۹۸۹). ریزازدیادی به عنوان یک روش گسترده در تکثیر تجاری گیاهان مطرح است. این روش جهت حفظ ژرم پلاسم استفاده می‌شود تا گیاهان مادری حفظ شوند (کومار و ردی، ۲۰۱۱). مزیت مهم استفاده از روش‌های تکثیر کلون در شرایط استریل (ریزازدیادی) این است که تکثیر جوانه‌ی جانبی، تعداد ساقه را در هر دوره یک ماهه کشت به طور متوسط تا ۱۰ برابر افزایش می‌دهد و در یک دوره شش ماهه امکان تولید بیش از یک میلیون گیاه از یک ریزنمونه وجود دارد. از تکنیک ریزازدیادی، به عنوان ابزاری کارآمد برای تکثیر رویشی گیاهان با هدف تکثیر سریع و همچنین بقای نسل گونه‌های نادر و در حال انقراض استفاده می‌شود. به کمک تکنیک ریزازدیادی، می‌توان در مدت زمانی کوتاه و فارغ از محدودیت-های فصلی به تعداد زیادی گیاه دست یافت که این سرعت تکثیر و تولید یکنواخت گیاهان را در هیچ یک از روش‌های تکثیر رویشی در شرایط طبیعی نمی‌توان انتظار داشت. همچنین به کمک این روش می‌توان گونه‌های برتر و نادر موجود در طبیعت را به سرعت تکثیر نمود و از آنها برای امور اصلاحی و یا عرضه مستقیم به بازار استفاده نمود (باقری و صفری ،۱۳۸۳).

1- Micropropagation

در حال حاضر تکثیر گیاهان به روش این ویترو، به رغم وجود برخی مشکلات، به علت رشد و تکثیر سریع، تولید خارج از فصل، تولید گیاهان عاری از بیماری، نگهداری ژرم‌پلاسم‌ها و آسان کردن مبادلات بین المللی به عنوان یک صنعت پررونق در مقیاس کوچک و بزرگ محسوب می‌شود.کشورهایی مثل آمریکا و اروپای غربی، ریزازدیادی تجاری را از سال ۱۹۸۰ آغاز کردند و کشورهای اروپای شرقی و در حال توسعه نظیر لهستان، مجارستان، هند و تایلند، تولید را از سال ۱۹۹۰ آغاز کردند و به علت هزینه‌های پایین تولید در این کشورها، آنها توانستند به سرعت جایگاه خود را در بین صادرکنندگان این نوع محصولات تثبیت کنند (وینکلمن و بویز، ۲۰۰۶).

۱-۸- موارد ویژه ریزازدیادی در کشت بافت

۱-۸-۱- قهوه‌ای شدن کشت‌ها

قهوه‌ای شدن کشت‌ها یکی از مواردی است که متابولیسم بافت‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد و به دلیل کیفیت نامطلوب ماده‌ی ژله‌ای کننده، استفاده‌ی نادرست از اتوکلاو، تنظیم نادرست pH محیط کشت و حتی فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز است. آنزیم پلی فنل اکسیداز در پلاست‌های سلول‌ها وجود دارد و در صورت آمیخته شدن با پیش ماده فنولی، سبب قهوه‌ای شدن کشت‌ها می‌شود. پیش ماده‌ی فنولی اغلب در واکوئل سلول‌ها وجود دارد و در صورت زخمی شدن سلول‌ها، آزاد می‌شود. بنابراین یکی از راه‌های جلوگیری از قهوه‌ای شدن کشت‌ها، پیشگیری از زخمی‌شدن آنهاست. ترکیبات فنولی به عنوان واکنش گیاه به تنش، تولید می‌شوند. تعدادی از این ترکیبات سمی‌اند و در صورت آزاد شدن به درون سلول سبب مرگ بافت گیاهی می‌شوند. بر این اساس هر تیماری که تولیدات فنولی را افزایش دهد، نامطلوب به شمار می‌رود (گلین و همکاران، ۲۰۰۴). گیاهان تحت تنش آب یا مواد غذایی و همچنین گیاهان بیمار، ممکن است دارای سطوح بالای ترکیبات فنولی باشند. استفاده از زغال فعال یا پلی وینیل پیرولیدین (pvp)، افزودن آنتی اکسیدان‌ها مانند اسید سیتریک و اسید آسکوربیک نیز در کاهش قهوه‌ای شدن مفید است (رامسی و گراتن، ۲۰۰۰). ولی باید توجه داشت که زغال فعال یا pvp، تنظیم‌کننده‌ها

و برخی ترکیبات دیگر محیط کشت را نیز جذب می‌کنند. این ترکیبات را می‌توان به محیط کشت اضافه کرد یا ریزنمونه را پیش از کشت به وسیله‌ی این آنتی‌اکسیدان‌ها تیمار نمود. تاکنون تلاش‌های زیادی برای کاهش اثر ترکیبات فنولی صورت گرفته است. از راه‌های دیگر کاهش قهوه‌ای شدن، می‌توان به واکشت‌های پی‌درپی و حذف سلول‌های مرده اشاره کرد؛ البته واکشت‌های پی‌درپی افزون بر افزایش هزینه‌ها، ممکن است به زخمی شدن سلول‌ها و افزایش قهوه‌ای شدن منجر شود (هوآنگ و همکاران، ۲۰۰۲).

۱-۸-۲- شناخت آلودگی‌های درونی

آلودگی‌های داخلی ریزنمونه‌ها و مشکلات مربوط به روش ضدعفونی، سبب آلوده شدن کشت‌ها می‌شوند. ولی بیشتر این موارد را می‌توان به آلودگی‌های باکتریایی و قارچی درون بافتی نسبت داد. وجود آلودگی‌های درون بافتی سبب می‌شود که کشت‌ها پس از چندین روز یا چندین ماه و یا حتی پس از چندین بار واکشت شدن آلودگی‌های خود را نشان دهند. افزون بر این، قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نیز ممکن است به دلیل آلودگی‌های درون بافتی باشد و تیمارهای محیط کشت مانع از قهوه‌ای شدن آن نمی‌شود. در مجموع، نمونه‌برداری صحیح و بررسی دقیق نمونه‌ها در شناخت و کنترل آلودگی‌های درونی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (رید و همکاران ۱۹۹۴).

۱-۸-۳- شیشه‌ای شدن[1] گیاهچه‌ها

شرایط درون ظرف کشت گیاهان ریزازدیاد شده دارای یک وضعیت غیر متعارف است. زیرا گیاهان در یک فضای بسته و در محیطی قرار دارند که به دلیل وجود قند و نمک‌های موجود در محیط کشت، فشار اسمزی زیادی دارد.

1- Vitrification

نتیجه‌ی قرار گرفتن در چنین محیط سربسته‌ای آن است که غلظت Co_2 در مقایسه با اتمسفر، بسیار بیشتر است و غلظت اتیلن و بخار آب نیز بسیار زیاد است (کورل و ودرز، ۲۰۰۱). غلظت زیاد اتیلن به مورفولوژی غیر طبیعی، مانند کلفت شدن ساقه و تغییر جهت رشدی ساقه، ریشه و برگ‌ها (بر اساس نیروی جاذبه) منجر می‌شود. رطوبت زیاد ممکن است تشکیل واکس را برسطح برگ‌ها کاهش دهد و فشار اسمزی زیاد در محیط منجر به تشکیل بافت‌های ضخیم و نیمه شفاف می‌شود. تشکیل این اندام‌های هوایی نامطلوب را شیشه‌ای شدن می‌نامند. فضای بین سلول این بافت‌ها افزایش و تعداد روزنه‌ها به شدت کاهش می‌یابد و حتی روزنه‌های موجود به وظیفه‌ی خود عمل نمی‌کنند. کاهش رطوبت و اتیلن در محیط کشت و هوای بالای آن در رفع شیشه‌ای شدن موثر است (هازاریکا و بارا، ۲۰۱۰).

۱-۹- محیط کشت

محیط کشت، مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات مختلف است. لذا تعیین این ترکیبات و نیازمندی‌های گیاهان متفاوت، کار پیچیده و سختی است. در عین حال، موفقیت در کشت بافت‌های گیاهی به انتخاب یک محیط کشت مناسب برای نمونه گیاهی مورد نظر بستگی دارد (باقری و آزادی، ۱۳۸۱). بنابراین قبل از انجام کشت برای هر نوع بافت گیاهی لازم است در این مورد بررسی و در صورت معرفی نشدن محیط کشت مناسب برای آن، تحقیقی در مورد نوع محیط کشت مناسب برای گیاه مورد نظر انجام شود. به طور عمده، گونه‌های گیاهی، محیط کشت‌های متفاوتی نیاز دارند. لذا، انتخاب بهترین محیط کشت با مشکلاتی همراه است. نتایج محققان کشت‌بافت گیاهی این عقیده کلی را تقویت می‌کند که اگر هیچ گونه اطلاعاتی در اختیار نباشد، در این صورت معمولاً کار با محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ ۱۹۶۲) شروع می‌شود. کاربرد محیط کشت MS به این دلیل متداول است که بسیاری از گیاهان به آن عکس العمل مناسبی نشان می‌دهند. واکنش به محیط کشت، به گونه، ژنوتیپ و نوع ریزنمونه بستگی دارد. برخی از گونه‌ها در بیشتر محیط‌های کشت دارای واکنش مشابهی هستند. در حالی که

بعضی دیگر، محیط‌های کشت خاصی را ترجیح می‌دهند. در مورد گونه‌ها یا ژنوتیپ‌هایی که برای اولین بار مورد آزمایش قرار می‌گیرند، استفاده از محیط‌های کشت با غلظت کم نمک توصیه می‌شود. (میشل و همکاران، ۲۰۰۸).

۱-۹-۱- اجزای محیط کشت

فورمولاسیون نمک‌های غیر آلی در ترکیب محیط‌های کشت مختلف، متفاوت است. با این وجود محیط کشت MS، مطلوب‌ترین محیطی است که از آن به صورت کامل یا تغییریافته برای طیف وسیعی از گیاهان استفاده می‌شود. آزمایش‌های مختلف نشان داده که کشت این ویتروی گیاهان به عناصری مانند نیتروژن، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، فسفر و سولفور نیاز دارد. مقدار نیاز گیاه به هر یک از عناصر معدنی متفاوت است. برحسب نیاز گیاه به این عناصر می‌توان آنها را در دو گروه عناصر پرمصرف[1] (نیتروژن، کلسیم، پتاسیم، منیزیم، فسفر و غیره) و عناصر کم‌مصرف[2] (آهن، روی، کبالت، مس، مولیبدن و غیره) طبقه‌بندی نمود (فارسی و ذوالعلی ۱۳۹۰).

در ادامه به بررسی نقش هر یک از عناصر مورد نیاز در محیط کشت پرداخته می‌شود:

۱-۹-۱-۱- نیتروژن

یک عامل تعیین کننده در محیط کشت نیتروژن است و بر رشد طولی ساقه و شکل ظاهری گیاه تأثیر می‌گذارد. برای تأمین نیتروژن در محیط کشت از نمک‌های نیترات و آمونیوم استفاده می‌شود. در قدیم از ترکیباتی نظیر شیر نارگیل برای تأمین اسیدهای آمینه و نیتروژن استفاده می‌کردند. حضور نیتروژن نیتراتی به مرور زمان سبب افزایش pH محیط می‌شود و به بافت گیاهی خسارت وارد می‌کند. لذا از ترکیبات آمونیومی نیز در محیط کشت استفاده می‌کنند تا pH بالا نرود (ساتل ماشر و هورست ، ۲۰۰۷).

1- Macro elements

2- Micro elements

۱-۹-۱- ۲- کلسیم

کلسیم نقش مهمی در سنتز دیواره سلولی، غشای پلاسمایی و لیگنین دارد. مهم‌ترین وظیفه این عنصر حفاظت غشای سلولی در برابر ضربات مکانیکی می‌باشد. کلسیم در تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلول نقش دارد (میزوکامی و همکاران، ۲۰۰۸). حضور کلسیم در محیط سبب خنثی نمودن برخی از آثار مضر تنظیم کننده‌های رشد می‌شود (تاکدا و همکاران، ۲۰۰۳).

۱-۹-۱-۳- منیزیم

این عنصر، در ساختمان کلروفیل نقش مهمی دارد. منیزیم در حفظ تمامیت ریبوزوم‌ها، اسیدهای نوکلئیک و استحکام غشاها نقش دارد (رودریگرز و همکاران، ۲۰۰۰).

۱-۹-۱-۴- پتاسیم

پتاسیم نقش مهمی در تنظیم فشار اسمزی دارد و جزء کاتیون‌هایی است که بیشترین مقدار آن در سلول وجود دارد. پتاسیم سبب فعال شدن برخی آنزیم‌ها گردیده و در سنتز پروتئین و تنظیم pH نقش دارد. در مواقعی که پتاسیم در محیط کافی نباشد، عنصر کلسیم می‌تواند نقش جایگزین داشته باشد (ساتل ماشر و هورست، ۲۰۰۷).

۱-۹-۱-۵- فسفر

فسفر در فتوسنتز و فسفوریلاسیون نوری نقش دارد و در مسیرهایی مانند پنتوز فسفات، گلیکولیز و چرخه ATP و NADP نقش دارد. در ساختمان نوکلئوتیدها نیز نقش مهمی دارد. گاهی، اتیلن درمحیط کشت به عنوان یک عامل نامطلوب تشکیل می‌شود و به بافت گیاهی خسارت وارد می‌کند. اگر فسفر در مقدار مناسب وجود داشته باشد، می‌تواند مانع سنتز اتیلن شود و اگر مقدار فسفر بیش از حد باشد، رشد طولی ساقه را تحریک می‌نماید. فسفر از عناصر پر مصرف است که جذب آگار می‌شود و اغلب کمبود آن در محیط ایجاد می‌شود (مارشنر،۱۹۹۵).

۱-۹-۱-۶- سولفور

سولفور در ترکیب اسیدهای آمینه متیونین و سیستئین و برخی ویتامین‌ها نظیر تیامین یافت می‌شود و عمدتاً به صورت نمک‌های سولفات در محیط مصرف می‌شود (خسروشاهی و بهنامیان، ۱۳۸۵).

۱-۹-۱-۷- آهن

آهن نقش کلیدی در واکنش‌های اکسیداسیون و احیا دارد. کمبود آهن در محیط سبب زرد شدن و رنگ پریدگی شاخ و برگ‌های انتهایی گیاه می‌شود. نمک‌های آهن به خوبی در آب حل نمی‌شوند و معمولا به همراه Na_2EDTA تهیه می‌شوند. مقدار مصرف این عنصر در گیاه کم می‌باشد (جورج و همکاران، ۲۰۰۸).

۱-۹-۱-۸- منگنز

جزء عناصری است که در مقادیر کم توسط گیاه مصرف می‌شود و اثر متقابل پیچیده‌ای با سایر عناصر دارد. منگنز به عنوان یک کوفاکتور عمل نموده و در اکسیداسیون IAA نقش دارد (رودریگرز و همکاران، ۲۰۰۰).

۱-۹-۱-۹- روی

این عنصر در فعالیت RNA پلیمرازها نقش دارد و جذب آن توسط آهن و مس ممانعت می‌شود. ولی سولفات جذب آن را تحریک می‌کند. غالباً در محیط‌های کشت از نمک‌های سولفات روی استفاده می‌شود (وحدت‌پور، ۲۰۰۸).

۱-۹-۱-۱۰- مس

این عنصر نیز در مقادیر کم مورد نیاز گیاه است. اگر مقدار آن در محیط بالا باشد، سبب تولید ترکیبات فنلی حاوی مس می‌شود که این پدیده در کشت بافت نامطلوب است (خسروشاهی و بهنامیان، ۱۳۸۵).

از جمله عناصر دیگری که به مقدار کم در محیط کشت گیاه مورد نیاز است، می توان به بر، مولیبدن، کبالت، نیکل و ید اشاره نمود (ساتل‌ماشر و هورست، ۲۰۰۷).

۱-۱۰- تنظیم کننده‌های رشد

اکسین‌ها یکی از پرکاربردترین تنظیم‌کننده‌های رشدی در کشت بافت گیاهی هستند که غالباً به تنهایی یا در ترکیب با سیتوکنین‌ها استفاده می‌شوند (ماچاکووا و همکاران، ۲۰۰۸). اضافه کردن غلظت پایین اکسین به محیط کشت، تأثیر بازدارنده‌ی مقادیر زیاد سیتوکنین بر رشد طولی شاخه‌های جانبی را خنثی کرده و باعث رشد شاخساره‌ها می‌شود. اکسین‌ها در غلظت کم، غالباً موجب تشکیل ریشه شده در حالی‌که کاربرد غلظت‌های بالای آن به تشکیل کالوس منجر می‌شود. در بعضی موارد، اضافه نمودن اکسین سبب تسریع رشد گیاهچه می‌شود (شهزاد و سیدیکوئی، ۲۰۰۰). سیتوکینین‌ها غالباً برای تحریک رشد و نمو، به کار می‌روند. این هورمون‌ها اگر با یک اکسین توأم شوند، باعث تحریک تقسیم سلولی می‌شوند. در غلظت‌های بالا باعث تشکیل ساقه نابجا می‌شوند؛ اما معمولا از تشکیل ریشه ممانعت می‌کنند. آنها از طریق کم کردن چیرگی انتهایی باعث تشکیل ساقه نابجا و عقب افتادگی پیری می‌شوند. سیتوکنین‌ها از جمله مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشدی برای باززایی به شمار می‌آیند که در بین آنها بنزیل آمینو پورین(BAP) موثرترین و پرکاربردترین سیتوکنین مورد استفاده در تحقیقات کشت بافت است و کینتین در درجه‌ی بعدی قرار دارد (اسکالا و ویسوکینسکا، ۲۰۰۶).سطح بالای اکسین نسبت به سیتوکنین منجر به تشکیل ریشه و برعکس نسبت بالای سیتوکنین‌ها منجر به ایجاد شاخساره می‌شود (تورز، ۲۰۰۴). با در نظر گرفتن نقش شناخته شده‌ی اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها در رشد و تقسیم سلولی و نتایج بیشمار کاربرد تیمارهای تنظیم کننده‌های رشد که از طریق تأثیرگذاری بر غلظت هورمون‌های درونی نقش خود را ایفا می‌کنند، می‌توان چنین اظهار نظر کرد که هر ژنوتیپ دارای مقادیر خاصی از هورمون‌های درونی بوده است. بنابراین، پاسخ گونه‌های گیاهی به غلظت تیمار تنظیم کننده‌های رشد به کار گرفته شده، به میزان سطح هورمون‌های داخلی بستگی دارد (گاسپر و همکاران، ۲۰۰۳).

۱-۱۱- ضدعفونی ریزنمونه‌ها

عدم ضدعفونی مناسب ریزنمونه‌ها منجر به آلودگی‌های باکتریائی و قارچی می‌گردد، که این امر منجر به از بین رفتن ریزنمونه‌های کشت شده، می‌شود و باید توجه داشت که اگر ریزنمونه‌ها استریل نشوند، قسمت اعظم کشت‌ها آلوده خواهند شد. بنابراین تهیه‌ی ریزنمونه‌های استریل، برای کشت بافت امری ضروری است (باقری و صفری، ۱۳۸۸).

۱-۱۲- فناوری کشت لایه‌های سلولی نازک [1](TCL)

مطالعات گسترده‌ای در مورد فناوری کشت لایه‌های سلولی نازک (TCL) در شرایط درون شیشه‌ای، به عنوان راه حل مناسبی جهت برطرف کردن موانع تکثیر بعضی از گیاهان انجام شده است (نات و همکاران، ۲۰۰۱). از آنجایی که کشت لایه‌های سلولی نازک به طور گسترده در بسیاری از مطالعات مورفولوژیکی موفق بوده است، از آن به عنوان یک سیستم مدل در تکثیر گیاهان استفاده شده است. در این روش برش‌های نازکی از بافت اپیدرمی به همراه تعداد کمی از لایه‌های سلولی پیرامون آن به عنوان ریزنمونه در نظر گرفته می‌شود. دارا بودن اندازه کوچک ریزنمونه موجب میان‌کنش کمتر بین سلول‌ها می‌شود. از این رو کاربرد این روش در شرایط درون شیشه‌ای به دلیل قرار گرفتن بیشتر سلول‌ها در معرض تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، میزان باززایی و اندام زایی را افزایش می‌دهد (سیلوا، ۲۰۰۳).

۱-۱۳- اهداف تحقیق

۱- یافتن مناسب‌ترین ریزنمونه‌ی برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

۲- به دست آوردن غلظت‌های بهینه‌ی تنظیم کننده‌های رشدی اکسین و سیتوکنین جهت حصول بیشترین درصد باززایی شاخه

۳- به دست آوردن غلظت‌های بهینه‌ی هورمون اکسین برای ریشه‌زایی

1- Thin cell layer

فصل دوم:

مروری بر منابع

۲-۱- تاریخچه کشت بافت

کشت بافت تا دهه ۵۰ میلادی خیلی موفق نبود و عامل اصلی آن عدم کشف هورمون‌های گیاهی بود. کشف نوعی اکسین به نام ایندول استیک اسید (IAA) در دهه ۱۹۵۰ کشت بافت بسیاری از گیاهان را در شرایط این ویترو آسان نمود. بعد از آن در سال ۱۹۵۵ کینتین که یک نوع سیتوکنین است، شناسایی گردید. به دنبال کشف این هورمون‌ها، اسکوگ و میلر در سال ۱۹۵۷ موفق شدند تا ریشه و ساقه را از کالوس تیمارشده با اکسین و کینتین به‌دست آورند. علاوه بر آن مورل (۱۹۶۰) نیز از جیبرلین برای القای مریستم‌ها و تمایز آنها به گیاه کامل استفاده نمود. بنابراین تلاش‌های عمده برای انجام کشت بافت از اواخر دهه ۵۰ شروع شد و در دهه ۷۰ به اوج پیشرفت رسید (شریفی و همکاران، ۱۳۸۹). از نظر تاریخی شروع کشت بافت گیاهی به اواخر قرن نوزدهم و اوایل قرن بیستم باز می‌گردد. اما در واقع اولین کوشش در کشت بافت گیاهی توسط گیاه شناس آلمانی به نام هابرلنت (۱۹۰۲) صورت گرفت. او در شرایط این‌ویترو به کشت بافت سلول‌های مزوفیل گیاه ارکیده (Lanium) در محیط مصنوعی ناپ (Knop) اقدام نمود. اگر چه وی در کار خود ناموفق بود، ولی با تلاش‌های او تکنیک کشت بافت گیاهی به صورت جدی شکل گرفت. به همین دلیل او را پدر علم کشت بافت گیاهی نام نهادند (فارسی و ذوالعلی ۱۳۹۰). در بیشتر پژوهش‌هایی که در ارتباط با کشت بافت گیاهان زینتی انجام شده‌است، محققان به این نتیجه رسیدند که بنزیل آدنین (BA) برای شاخه‌زایی و نفتالین استیک اسید (NAA) برای ریشه‌زایی موثرترین تنظیم کننده‌ی رشدی مورد استفاده می‌باشند. همچنین طی تحقیقات انجام گرفته توسط پیریک (۱۹۹۷)، این نتیجه حاصل شد که کارایی غلظت بالای سیتوکنین در ترکیب با اکسین نسبت به کاربرد انفرادی اکسین در شاخه‌زایی موثرتر است. البته، محققین بسیاری وجود نسبت مناسبی از اکسین و سیتوکنین را برای القای کالوس ضروری دانستند. بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد سیتوکنین در روند باززایی با توجه به نوع سیتوکنین به کار برده شده و غلظت‌های مختلف در گیاهان، متفاوت است (فراتینی و ریزو، ۲۰۰۲؛ چنگالریان و گالو، ۲۰۰۱).

۲-۲- مروری بر تحقیقات گذشته

تاکنون تحقیقات متنوعی در زمینه‌ی کشت بافت گیاهان خانواده‌ی *liliaceae* انجام شده است که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

اوجیهارا (۱۹۷۹) گزارش کرد که NAA در ترکیب با کینتین، القاء کالوس و ساقه‌زایی را در گیاه هاورتیا ارتقا می‌بخشد. در این پژوهش غلظت‌های پایین ایندول استیک اسید(IAA) بدون حضور کینتین تشدید شاخساره‌ها را به همراه داشت، با این حال منجر به تولید کالوس نگردید. در این مطالعه کالوس‌های با بالاترین مقدار کلروفیل در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین بدون حضور اکسین و یا حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده گردیدند.

راجرز (۱۹۹۳) کشت بافت چند گونه‌ی مختلف هاورتیا با نام‌های علمی *Haworthia emelyae* ، *Haworthia retusa* cultivar "Dekenahii" ، *Haworthia mirabilis* ، *Haworthia retusa cultivar* "Giant from" را با استفاده از ریزنمونه‌ی برگی بر روی محیط پایه MS که حاوی غلظت‌های ۰ تا ۴ میلی‌گرم بر لیتر کینتین یا بنزیل آدنین (BA) بود، مورد بررسی قرار داد. در این پژوهش، همچنین ریشه‌زایی با کاربرد تیمارهای ۰/۱ میلی گرم بر لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) و ۱/۵ گرم ورمیکولیت در گیاهان باززاشده به طول ۱۰ تا ۱۷ میلی متر مورد بررسی قرار گرفت. در این راستا گیاهان باززاشده با طول کوچکتر از ۱۰ میلیمتر برای ریشه‌زایی قابل استفاده نبودند. درگونه‌های *H.mutica* و *H.mirabilis* کاربرد هورمون کینتین در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در باززایی ساقه‌ها، مؤثرتر از کاربرد هورمون BA بود. در حالی که در گونه‌ی *Haworthia retusa* رقم Giant from صرفاً کاربرد تیمار هورمونی BA در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر بر تولید ساقه مؤثر بود، همچنین در گونه‌ی *Haworthia emelyae* علاوه بر هورمون BA (در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر) کاربرد هورمون کینتین (در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر) نیز پاسخ بهینه‌ای را در تولید ساقه ایجاد نمود. ساقه‌های تولیدشده در آزمایشگاه، طی ۴ الی ۶ هفته تحت تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA ریشه دار شدند. سپس گیاهان ریشه‌دار جهت

سنجش سازگاری، به گلدان‌های پلاستیکی (با عمق ۷/۵ سانتی متر با مخلوطی از پیت ماس و پرلیت) انتقال داده شدند و برای ۸ هفته در شرایط گلخانه‌ای با ۱۰ درصد سایه اندازی قرار گرفتند (راجرز، ۱۹۹۳).

در آزمایشات کائول و سابهاروال (۱۹۷۲)، کشت بافت گیاهانی از چند گونه هاورتیا *H.chloracrtha* ، *H.retusa*، *H.angustifolia* ، *H.atrofusca* ، *H.setata* و *H.truncata* در محیط پایه‌ی وایت با غلظت‌های مختلف از هورمون‌های BA، K، NAA، IAA و کازئین هیدرولیزات (CH) و شیر نارگیل (CM) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که کالوس‌دهی در محیط حاوی غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۲۰ درصد شیرنارگیل با کاربرد ریزنمونه‌ی گل‌آذین آغاز شد. همچنین، نتایج بهینه‌سازی تمایز ریشه نشان داد که در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D اغلب ریشه‌ها سبز و ضخیم و در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ریشه‌ها زرد و نازک بودند. به این ترتیب، با افزایش غلظت هورمون 2,4-D در محیط، ریشه‌هایی کوتاه و با تعداد کم، ایجاد شدند. در هاورتیا استفاده از سیتوکنین، جهت تولید حداکثری شاخه‌هایی با طول ۱۰ میلی متر و بالاتر، لازم است. در رقم "Dekenahii " از گونه‌ی *H.retusa* تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین، بیشترین میزان رشد طولی شاخه‌ها را (با اندازه ۱۰ میلیمتر و بیشتر) ایجاد نمود. سطوح بالاتر این هورمون تعداد شاخه‌ها را (ولی با اندازه کوچکتر) افزایش داد. تاثیر مثبت این هورمون بر افزایش تعداد و طول شاخه‌ها در کشت بافت سایرگونه‌های هاورتیا نیز گزارش شده بود (کائول و سابهاروال، ۱۹۷۲).

ریچواین و همکاران (۱۹۹۵) توانایی چندین گونه هاورتیا *Haworthia limifolia*، *Haworthia coarctata* ، *Haworthia attenuate* ، گاستریا و آلوئه ورا را برای باززایی از ریزنمونه گل‌آذین، در محیط آزمایشگاه بررسی کردند. در این پژوهش، از گل‌آذین نابالغ به طول ۱۷ سانتی‌متر (قبل از ظهور جوانه‌های گل) برای اخذ ریزنمونه با کاربرد هورمون‌های زآتین (۵/۴ µm) و BA (۴ µm) در محیط پایه‌ی MS استفاده شد، شاخه‌زایی را در تمام گونه‌های هاورتیا در عرض ۸ تا ۱۲ هفته القا نمود.

چن و همکاران (۲۰۱۱) ترکیب ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA را برای تکثیرساقه گیاه *Haworthia cooperi* معرفی نمودند. لیو و همکاران (۲۰۱۷) در پژوهش خود، کالوس‌زایی از ریزنمونه‌ی برگ گیاه هاورتیا را در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش نمودند. همچنین در پژوهش کیم و همکاران (۲۰۱۸) بیشترین تولید شاخساره‌ی گیاه *Haworthia maughanii* (۲۲ عدد) در تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با استفاده از ریزنمونه‌ی برگ تولید شد.

ترن (۲۰۰۰) سیستم برش نازک سلولی (thin – cell- layer) (TCL) را در ریزازدیادی ریزنمونه‌های برگ و ساقه *Haworthia cymbioformis* پیشنهاد نمود. در این روش یک ناحیه مشخص از بافت استفاده می شود که اثر شتاب دهنده‌ی اندام‌زایی از ریزنمونه‌ی بافت های متنوع را فراهم میکند که آثار آن در بسیاری از گونه های گیاهی تایید شده است. در پژوهشی که توسط لیزومی و آماکی (۲۰۱۱) در زمینه‌ی کشت بافت چند گونه‌ی هاورتیا انجام شد، ریزنمونه‌های TCL برگ (به ضخامت ۱ میلی‌متر) و TCL ساقه (به ضخامت ۳ میلی‌متر) در محیط پایه MS حاوی ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۸ گرم بر لیتر آگار تحت تیمارهای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA کشت گردیدند. نتایج نشان داد که تنها ریزنمونه‌های TCL ساقه، شاخساره‌های ضعیفی در همه محیط‌ها تولید نمودند. این در حالی بود که ریزنمونه‌های TCL برگ هیچ پاسخی نشان ندادند. در این مطالعه، بیشترین میزان باززایی شاخساره‌ها، تعداد ۲۴ عدد شاخساره در هر ریزنمونه بود که در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA به دست آمد.

آلوئه ورا نیز یک گیاه دارویی و زینتی در دنیا است که به خانواده Liliaceae تعلق دارد (باکشا و همکاران، ۲۰۰۵). این گیاه توسط بسیاری از پژوهشگران در شرایط آزمایشگاهی کشت شده است (آلبانیل و همکاران، ۲۰۰۶). برخی از تحقیقات (ولچوا و همکاران، ۲۰۰۵ و دبیاسی و همکاران، ۲۰۰۷) اشاره می‌کنند که هورمون سیتوکنین BAP موثرتر از هورمون KIN برای القای شاخه‌زایی عمل می‌کند.

اگرچه که بندری و همکاران (۲۰۱۰)، گانتیت و همکاران (۲۰۱۰) گزارش نمودند که غلظت‌های مختلف هورمون BA بر ریزازدیادی گیاه آلوئه‌ورا تاثیرگذار بود. ریزنمونه‌های کشت شده توسط اغلب محققان قبلی که بر ریزازدیادی آلوئه‌ورا یا سایر گونه‌های آن کار می‌کردند شامل جوانه انتهایی ساقه مرکزی (آبریه و استادن، ۲۰۰۱) و سلول‌های مریستمی بود (ناتالی و همکاران، ۱۹۹۰). این محققین جوانه انتهایی را قطع کرده و پس از جدا کردن برگهای اولیه از ریزنمونه در زیر میکروسکوپ، تنها بافت مریستم را در محیط کشت قرار می‌دادند. با توجه به اینکه تنها یک جوانه انتهایی در هر گیاه وجود دارد، پس از جدا سازی آن، مابقی گیاه، بدون استفاده می‌گردید (سینگ و سود، ۲۰۰۹). بودهاییانی (۲۰۰۱) نیز در مطالعه‌ی ریزازدیادی گیاه آلوئه‌ورا بر تأثیر مثبت کاربرد BAP و NAA در شاخه‌زایی این گیاه تاکید نمود. در تحقیق اسماعیل زاده و همکاران (۱۳۹۴) از گره‌های ساقه به عنوان ریزنمونه استفاده شد. بیشترین تعداد جوانه زنی (۴/۲۵±۰/۴۲) در غلظت ۱۷/۷۶ میکرومول BAP مشاهده گردید که بطور معنی داری با دیگر نتایج این آزمایش متفاوت بود و کمترین میزان جوان زنی مربوط به غلظت ۲/۲۲ میکرو مول BAP بود. در تحقیقات (کوماری و همکاران، ۲۰۱۵؛ هاشم آبادی و کاویانی، ۲۰۰۸ ؛ آگاروال و بارنا، ۲۰۰۴) محققان از قطعات جوانه انتهایی و جوانه برگی ابتدایی گیاه آلوئه ورا به عنوان قطعه قابل کشت استفاده نمودند. حسینی و پارسا (۲۰۰۷) تلاش کردند تا آلوئه ورا را از طریق کشت بافت ریزنمونه-ی برگ تکثیر کنندکه در این زمینه موفقیتی کسب نگردید. برخی دیگر (لیا و همکاران، ۲۰۰۴) از قطعات زیر زمینی گیاه *Aloe vera var.* Chinensis استفاده نمودند و در پژوهش (سینگ و سود، ۲۰۰۹) از قطعات ساقه به عنوان ریزنمونه استفاده گردید. در پژوهشی که توسط گوپتا و همکاران (۲۰۱۴) به منظور بهینه‌سازی تولید شاخساره در گیاه آلوئه‌ورا انجام شد، محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به عنوان بهترین محیط باززایی شاخه در این گیاه معرفی گردید. در حالی که محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به عنوان محیط بهینه‌ی ریشه‌زایی تعیین گردید. همچنین نتایج مطالعه‌ی مذکور حاکی از حصول ۹۵ درصد ریشه‌زایی طی ۲۳ الی ۲۸ روز پس از اولین کشت بود. تیرکی و همکاران (۲۰۱۷) بهترین محیط باززایی شاخساره آلوئه‌ورا را محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم

در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA با استفاده از مریستم‌های شاخساره به عنوان ریزنمونه معرفی نمودند. در پژوهش نایاناکانتا و همکاران (۲۰۱۰) ریزنمونه‌های شاخه جانبی گیاه آلوئه‌ورا در محیط کشت MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۱ گرم در لیتر PVP کشت شدند. که در این ترکیب هورمونی ۱۶ شاخه باززاشده به ازای هر ریزنمونه در این پژوهش حاصل شد. در حالی‌که اضافه نمودن ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اسید سیتریک و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر زغال فعال به ترکیب هورمونی فوق، باعث تولید ۲۱/۵ شاخه باززاشده به ازای هر ریزنمونه شد.

ریزواین و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند که بیشترین میزان باززایی از شاخساره‌های گیاه آلوئه ورا با تعداد میانگین ۲۷/۷ عدد، در محیط‌کشت MS با کاربرد ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA بود. آنها همچنین مناسب‌ترین محیط ریشه‌زایی را ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA به دست آوردند. در مطالعه‌ی انجام شده توسط روی و ساکار (۱۹۹۱) تیمارهای ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین در محیط پایه MS بالاترین راندمان را در کالوس‌دهی از ریزنمونه‌های برگی گیاه آلوئه‌ورا را در پی داشت. همچنین مصرف غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D در محیط MS بیشترین درصد ریشه‌زایی را موجب گردید. چودهاری و موکاندان (۲۰۰۱) گزارش نمودند که کاربرد سیتوکنین و اعمال غلظت مشخصی از هورمون اکسین در باززایی گیاه آلوئه‌ورا در شرایط محیط درون شیشه‌ای تأثیرگذار است و بهترین شاخه‌زایی در محیط MS حاوی تیمارهای BA و آدنین سولفات و IAA حاصل می‌گردد.

در پژوهش شمسیان و همکاران (۱۳۹۳) اثر تنظیم کننده‌های BAP و NAA و زغال فعال با غلظت‌های ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر زغال فعال در محیط کشت MS برای القا جوانه های جانبی از گیاهچه آلوئه ورا مورد مطالعه قرار گرفت. محیط کشت MS به همراه ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر زغال فعال بهترین محیط برای القا جوانه جانبی شناخته شد. جوانه‌های به دست آمده در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در

لیتر NAA ریشه‌دار شدند و ۸۵ درصد پاجوش‌های به دست آمده پس از طی مرحله سازگاری در گلخانه زنده ماندند. در تحقیقی دیگر(ملصقی و همکاران، ۱۳۹۰)، ریزنمونه‌های جوانه‌ی انتهایی و جوانه‌ی جانبی گیاه آلوئه ورا بر روی محیط کشت پایه MS به همراه ترکیبات مختلف هورمونی کشت گردید. ترکیب هورمونی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IAA بیشترین تعداد نوساقه را تولید نمود. از ساکارز ۳ درصد به عنوان منبع کربن و از آگار ۷ درصد به عنوان جامد کننده محیط کشت استفاده شد. اسید آسکوربیک و اسید سیتریک به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر جهت کاهش ترکیبات فنلی مورد استفاده قرار گرفت. ریزنمونه‌ها در اتاق رشد تحت فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱± ۲۵ در جه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در محیط القاء نوساقه، ریشه‌زایی نیز همزمان صورت گرفت. گیاهچه‌های تولید شده جهت سازگاری به شرایط جدید درون گلدانهای پلاستیکی حاوی کوکوپیت و پرلیت اتوکلاو شده، منتقل شدند. میزان بقای گیاهان سازگار شده ۱۰۰ درصد مشاهده شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق می‌توان گفت در بین هورمون‌های سیتوکنین، BAP بیشترین تاثیر را در تولید نوساقه از ریزنمونه‌ها دارد و سبب تحریک بیشتر سلول‌های مریستمی به سمت تولید نوساقه می‌شود. در بسیاری از گیاهان، نقش موثر سیتوکنین‌ها بخصوص هورمون BAP در تشکیل نوساقه نیز به اثبات رسیده است (سوجاتا و رادی، ۱۹۹۸). لازم به ذکر است که یکی از دلایل تفاوت نتایج بدست آمده با تحقیقات انجام شده در زمینه گیاه آلوئه‌ورا می‌تواند مربوط به سن گیاهان مادری و یا شرایط نگهداری آنها باشد. در شرایط کشت درون شیشه آلوئه‌ورا بسیاری از محققان بر وجود یک اکسین در کنار سیتوکنین جهت تکثیر ریزنمونه‌ها تأکید کردند (روت و همکاران، ۲۰۰۱) اما نسبت سیتوکنین به اکسین به گونه آلوئه‌ورا بستگی دارد (هاشم آبادی و کاویانی، ۲۰۰۸).

در بعضی از ساکولنت‌ها مانند آگاو، پروتوکل ریزازدیادی در محیط MS دارای ۵/۸- ۵/۶ =PH همراه با ۰/۷ تا ۰/۹ درصد جامدکننده آگار مورد بررسی و استفاده قرار گرفته است. با این حال، تاکنون گزارشی از کاربرد محیط پایه‌ی مایع در ریزازدیادی این گیاه ارائه نشده است (سانتاکروز و پورتیلو،

۲۰۰۹). بیشترین میزان باززایی از ریزنمونه‌های شاخه گیاه آگاو در محیط ½MS با تیمار هورمونی ۸/۹ میکرومول BA مشاهده شد. گیاهچه‌های حاصل در محیط MS حاوی ۱۱/۴۲ میکرومول IAA ریشه‌دار شدند، که نهایتاً سازگاری و انتقال آنها به خاک ۱۰۰ درصد موفقیت آمیز بود(کولوس، ۲۰۱۵). یوسنیتا و همکارن (۲۰۱۱) از جوانه‌های شاخساره به عنوان ریزنمونه‌ی کشت بافت درون شیشه‌ای گیاه سانسوریا استفاده نمود. در این پژوهش، بیشترین تعداد شاخساره باززاشده (۹/۳ عدد در هر ریزنمونه) در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA ، ۲ هفته پس از کشت تولید گردید.

لیو و همکاران (۲۰۱۶) در کشت بافت کاکتوس *Orostachys fimbriata* از خانواده کراسولاسه (گیاهانی با برگ‌های گوشتی) با استفاده از ریزنمونه برگی توانستند بهترین کالوس را در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Thidiazuron(TDZ) و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA تولید نمایند. در تحقیق شریفی و همکاران (۱۳۹۶) بهترین محیط کشت برای باززایی ریزنمونه‌های TCL گیاه لیلیوم از خانواده Liliaceae با ضخامت ۳ میلی‌متر، محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در نظر گرفته شد.

رحیمی و همکاران (۲۰۱۴) به بالاترین درصد باززایی از شاخساره‌های گیاه لاله *Fritillaria imperialis* با کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ در محیط کشت دست یافتند. لاله متعلق به خانواده لیلیاسه از گل‌های با ارزش و بومی ایران می‌باشد (اسلام زاده و همکاران، ۲۰۱۰). تشکیل کالوس در گیاهان تک‌لپه‌ای در مقایسه با گیاهان دولپه‌ای کمتر صورت میگیرد (باقری و صفری، ۱۳۸۸). حمید اوغلو (۲۰۱۱) در تحقیق خود به بالاترین میزان باززایی مستقیم (۳۳/۸ عدد جوانه) با بیشترین طول جوانه (۲۶ میلیمتر) و بیشترین تعداد ریشه (۸ عدد) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA دست یافت.

در پژوهش چمنی و همکاران (۱۳۹۶) کالوس‌های لاله به عنوان ریزنمونه در محیط کشت حاوی غلظت-های مختلف NAA (۰، ۰/۳ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با سه نوع سیتوکنین BA (۰، ۰/۳، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) TDZ (۰، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و KIN (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵

میلی‌گرم در لیتر) کشت گردیدند. همچنین محمدی و همکاران (۲۰۰۷) از ریزنمونه‌های گل‌آذین و گلبرگ به منظور تکثیر لاله از طریق کشت بافت از دو مسیر اندام‌زایی مستقیم و غیر مستقیم استفاده کردند.

پژوهش‌های گسترده‌ای در زمینه‌ی کشت بافت گیاهان خانواده‌ی کاکتوس‌ها (Cactaceae) نیز انجام شده است که در ادامه به آنها اشاره شده است:

در ایران پرورش و نگهداری این گیاه پیشینه‌ی چندانی نداشته است. کاکتوس‌ها بومی ایران نیستند و برخی از آنها به عنوان گیاهان زینتی وارد ایران شده اند (مطلق زاده، ۱۳۸۷). ریزازدیادی روشی موثر برای ازدیاد سریع و موفقیت آمیز کاکتوس است. با این روش می‌توان در مدت زمان کوتاه نسبت به تولید انبوه گیاهان کاکتوس درتمام طول سال اقدام نمود. در کاکتوس‌ها بهترین محیط برای باززایی، محیط MS با غلظت‌های بالایی از سیتوکنین‌ها مانند KIN و BAP و غلظت‌های پایین‌تر اکسین مانند NAA می‌باشد (پرزمولفه و همکاران، ۲۰۱۲). در پژوهش قادی و همکاران (۱۳۹۴) به منظور ارزیابی توان باززایی درون شیشه ای کاکتوس، در محیط‌های کشت شامل MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (NAA و BA) و MS فاقد هورمون کشت گردیدند. در این تحقیق فاکتورها شامل تعداد و طول شاخه‌ها، تعداد و طول ریشه است. بیشترین تعداد شاخساره (۶/۵۳ عدد) در ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و بیشترین طول شاخساره با میانگین (۷/۹۷ سانتی‌متر) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد. پارامترهای ریشه به طور معنی‌داری تحت تاثیر محیط کشت دارای ۴ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA قرار گرفت.

استراد لونا و همکاران (۲۰۰۸) در ریزازدیادی کاکتوس زینتی اوپونتیالانگرا بیشترین تعداد شاخه (۶ عدد) از هر ریزنمونه را در حضور ۵ میلی‌گرم در لیتر BA به دست آوردند. آنها گزارش نمودند که روش کشت عمودی ریزنمونه‌ها در مقایسه با کشت افقی آنها توانست تولید شاخساره را به طور معنی‌داری افزایش دهد. در ریزازدیادی کاکتوس زینتی اوپونتیالانگرا (استراد لونا و همکاران ، ۲۰۰۸) بلندترین

شاخه را در هنگام استفاده از ۵۰ درصد محیط کشت MS با ساکارز ۲/۵ و ۵ گرم در لیتر به دست آوردند. کارلوس و همکاران (۲۰۰۶) در کشت درون شیشه‌ای گونه‌های کاکتوس‌های توربینی کارپوس مشاهده نمودند که ریشه‌دهی شاخه‌ها در محیط کشت MS از ۵۴/۲ الی ۹۲/۲ درصد رسید و درصد بقا گیاهان انتقال یافته به خاک به طور متوسط ۹۶/۶ درصد گردید. خالافالا و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که با افزایش غلظت BA در تعداد شاخساره افزایش چشمگیری مشاهده شد. آنها گزارش نمودند که در ریزازدیادی O.ficus-indica با به کار بردن NAA تعداد ریشه افزایش یافت. همپنین در پژوهش سیسلیا و پاسرا (۲۰۰۲) ریشه‌دهی ۱۰۰ درصد کاکتوس آپونتیا در محیطی حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد.

دی الیویرا و همکاران (۱۹۹۴) بهترین محیط کالوس‌زایی برای گیاه سرئوس پرویانوس از خانواده کاکتوس ها، را محیط کشت MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۱۵ درصد شیره نارگیل و با استفاده از ریزنمونه رشد یافته از بذر معرفی نمودند. آنها دریافتند محیط فوق با مقدار ۶ میلی‌گرم در لیتر کینتین، با داشتن کالوس‌های ترد بیشتر، تعداد شاخساره کمتری تولید می‌کند و همین محیط با مقدار ۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین با وجود کالوس‌های فشرده تعداد شاخساره کمتری تولید می‌کند. سیسلیا وپاسرو(۲۰۰۲) در کشت بافت آپونتیا بهترین محیط کشت شاخه‌زایی را مقادیر ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP با محیط کشت پایه MS معرفی نمود.

ساگستوم (۲۰۰۶) در کشت بافت هلیوسرئوس از ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده نمود. دریو و عظیمی (۲۰۰۰) در کشت بافت این گیاه در محیط شاخه‌زایی از سیتوکنین ایزوپنتیل آدنین (2ip) به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر و در محیط ریشه‌زایی از اکسین IBA با غلظت۲ میلی‌گرم در لیتر استفاده کردند و هلیوسرئوس را باززایی نمودند. این در حالی بود که یاسین (۲۰۰۲) برای باززایی این کاکتوس از TDZ و NAA به میزان مساوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده نمود و

محیط MS را جهت ریشه‌زایی به کار برد. بی‌شاپ (۱۹۹۵) در باززایی تعدادی از کاکتوس‌ها از جمله آپونتیا محیط ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA را به عنوان بهترین محیط کالوس‌زایی و محیط ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D را به عنوان بهترین محیط شاخه‌زایی معرفی نمود. پرزمولفه و همکاران (۲۰۰۲) نیز در کشت بافت کاکتوس‌های ستونی با استفاده از محیط پایه MS به همراه ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین موفق به باززایی شدند. این در حالی است که ماتارزاس و همکاران (۲۰۰۱) با کاربرد ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به تولید کالوس سبز و شفاف در کاکتوس توربینوکارپوس اقدام نمودند، سپس در محیط حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به شاخه‌زایی بهینه در این گیاه دست یافتند.

اغلب گزارش‌های منتشر شده از کاکتوس‌ها حاکی از کالوس‌زایی گیاه حاصل از بذر در شرایط درون شیشه‌ای و تأثیر ترکیب‌های مختلفی از تنظیم کننده‌های رشد، بر میزان پرآوری در آن است. با این وجود، بر اساس منابع موجود ویکا و همکاران (۲۰۰۶) در تکثیر مامیلاریا با استفاده از ریزنمونه گل‌آذین در محیط ۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA ابتدا کالوس تولید نمودند و سپس با واکشت کردن آنها در همین محیط از آنها شاخه گرفتند. در پژوهش کریمی و همکاران (۱۳۸۹) اثر غلظت های مختلفی از 2,4-D به همراه کینتین، TDZ، BA در باززایی ریزنمونه‌های مختلف سرئوس پرویانوس مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده، میزان باززایی در محیط MS با کاربرد هورمون ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر کینتین به همراه ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در بالاترین سطح و کمترین میزان باززایی در محیط MS حاوی مقادیر مختلف TDZ و NAA مشاهده شد. در این پژوهش محیط کشت MS همراه ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۶ میلی‌گرم در لیتر کینتین مناسب‌ترین محیط ریشه‌زایی کاکتوس (سرئوس پرویانوس) معرفی گردید.

در آزمایش کریمی و همکاران (۱۳۸۹) مشاهده شد که اکثر ریزنمونه‌هایی که از قسمت مریستمی گیاه سرئوس پرویانوس گرفته شده بودند، تولید گیاهچه نمودند که این مسأله احتمالاً به سن سلول‌ها و

جوان‌تر بودن آنها مرتبط است. هرچند که چایری و همکاران (۲۰۰۲) در کشت درون شیشه‌ای برخی گیاهان زینتی کمترین میزان کالوس و باززایی را از ریزنمونه‌های انتهایی گزارش نمودند و اظهار داشتند که این مسأله می‌تواند به عوامل ژنتیکی مرتبط باشد به طوری که در برخی گیاهان مریستم‌های انتهایی بیشترین و در برخی کمترین قدرت کالوس‌زایی یا باززایی را دارند.

در پژوهش غفاری و همکاران (۱۳۹۰) تهیه نهال‌های کاکتوس علوفه‌ای از طریق ریزازدیادی انجام شد. برای این منظور، ریزنمونه‌ها از کلادودهای جوان جداشده و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف از بنزیل آمینو پورین (BAP) کشت شدند. ریزنمونه‌ها جهت شاخه‌زایی به محیط‌های حاوی هورمونBAP (۵ میلی‌گرم در لیتر) و هورمون IAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. نتایج نشان داد که بهترین ترکیب برای شاخه‌زایی هورمون BAP با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. ریشه‌زایی در محیط پایه با موفقیت انجام شد به طوری که طول ریشه‌ها در این محیط ۱ الی ۲ سانتی‌متر بود، در حالی‌که ریشه‌های مطلوب با طول ۸ تا ۱۰ سانتی‌متر در محیط کشت حاوی هورمون NAA به دست آمد. گیاهان ریشه‌دار شده به طور موفقیت آمیز در خاک مستقر شده و با محیط گلخانه سازگار شدند. آل طاها و همکاران (۲۰۱۸) در کشت بافت درون شیشه‌ای کاکتوس *Schlumbergera russelliana* ، بیشترین تعداد شاخساره‌ی باززاشده (۶/۳۳ عدد) با طول ۱/۸۳ سانتی‌متر و عرض شاخساره (۱/۷۰ سانتی‌متر) را در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ تولید نمودند.

فصل سوم:

مواد و روش ها

این پژوهش با هدف بررسی آثار تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی گیاه هاورتیا رقم Attenuatae، در دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود انجام شد.

مراحل انجام این پژوهش شامل ۳ بخش استقرار، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی است که در ادامه معرفی می‌گردند.

۳-۱- وسایل و مواد آزمایشگاهی

جهت انجام این پژوهش، از تجهیزات آزمایشگاه بیوتکنولوژی و کشت بافت دانشکده کشاورزی بسطام شامل شیشه آلات، ترازو حساس، هات پلیت، اتوکلاو، pH متر، هود لامینار و اتاقک کشت (فیتوترون) استفاده شد. ساکارز و آگار و همچنین تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده در این پژوهش از نمایندگی شرکت Sigma و ویتامین‌ها، عناصر ماکرو و میکرو نیز از نمایندگی شرکت Merck در ایران تهیه شدند.

۳-۲- تنظیم کننده‌های رشد

اکسین‌های مورد استفاده در این پژوهش شامل هورمون‌های IBA و NAA به ترتیب با کاربرد غلظت‌های (۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) در مرحله‌ی شاخه‌زایی و غلظت‌های (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) در مرحله ریشه‌زایی است. همچنین، در این پژوهش از سیتوکنین‌های BAP و KIN با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر در مرحله‌ی شاخه‌زایی استفاده گردید.

۳-۳- ویتامین‌ها

ویتامین‌های گروه B جزء مهم‌ترین ویتامین‌هایی هستند که در کشت سلولی به کار می‌روند. در این پژوهش از تیامین، نیکوتینیک اسید، پیریدوکسین و گلایسین استفاده گردید.

۳-۴- هگزیتول‌ها

از این ترکیبات می‌توان به میواینوزیتول اشاره نمود که در این پژوهش با غلظت ۰/۱ گرم در لیتر استفاده گردید.

۳-۵- آنتی اکسیدان‌ها

برخی نمونه‌های گیاهی در شرایط کشت بافت، ترکیبات فنلی تولید می‌نمایند که مانع رشد گیاه می شوند و یا سبب قهوه‌ای شدن بافت‌های در حال رشد می‌گردند. بنابراین اضافه کردن آنتی اکسیدان‌هایی نظیر اسید آسکوربیک برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن بافت‌ها توصیه می‌گردد. در این پژوهش از اسید آسکوربیک به میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت استفاده شد.

۳-۶- pH محیط کشت

pH در محیط کشت ثابت نیست و در طول زمان کشت، کاهش می‌یابد. محیط کشت مورد نظر با pH حدود ۵/۸ تنظیم گردید.

۳-۷- تهیه‌ی محیط کشت

۳-۷-۱- تهیه‌ی محلول‌های مادری نمک‌های پرمصرف محیط کشت MS با غلظت (10x)

در این پژوهش، نمک‌های پرمصرف در غلظت ۱۰ برابر نسبت به غلظت‌های نهایی خود تهیه شدند. ابتدا مقدار هر نمک را جداگانه با توجه به جدول ۳-۱ توزین شده و با آب مقطر در بشر به حجم یک لیتر رساندیم. محلول مادری $Cacl_2.2H_2o$ به صورت جدگانه با غلظت ۱۰ برابر (10x) تهیه شد. نمک‌های پر مصرف به صورت یک محلول مادری تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درون یخچال نگهداری شدند.

جدول۳-۱ غلظت نمک‌های پرمصرف محیط کشت MS (mg/l)

نمک	مقدار(میلی‌گرم)
KNO_3	۱۹۰۰
NH_4NO_3	۱۶۵۰
$MgSO_4.7H_2O$	۳۷۰
KH_2PO_4	۱۷۰
$CaCL_2.7H_2O$	۴۴۰

۳-۷-۲- تهیه‌ی محلول‌های مادری نمک‌های کم‌مصرف محیط‌کشت MS با غلظت (100x)

محلول‌های مادری عناصر کم مصرف ۱۰۰ برابر(**100x**) غلظت تهیه شدند. بدین ترتیب که نمک‌های جدول ۳-۲ جداگانه وزن گردیده و با آب مقطر حل شدند. در پایان، تمام محتویات بشرهای حاوی نمک‌ها را به ارلن منتقل کرده و با افزودن آب مقطر به حجم یک لیتر می‌رسانیم. محلول مادری نمک‌های کم‌مصرف در ۴ درجه سانتی‌گراد در درون یخچال نگهداری شدند.

جدول۳-۲ غلظت نمک‌های کم‌مصرف محیط کشت MS (mg/l)

نمک	مقدار(میلی‌گرم)
H_3BO_3	۶/۲
$MnSO_4$	۲۲/۳
$ZnSO_4.7H_2O$	۸/۶
$Na_2\ MoO4.2H_2O$	۰/۲۵
$CuSO_4$	۰/۰۲۵
$CoCL_2.6H_2O$	۰/۰۲۵
KI	۰/۸۳

۳-۷-۳- تهیه‌ی محلول‌های مادری ویتامین‌ها در محیط‌کشت MS با غلظت (100x)

هر محلول ویتامین جداگانه توزین شدند (جدول ۳-۳) و در آخر به حجم رسانده شد. این محلول ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد درون یخچال نگهداری گردیدند.

جدول۳-۳ غلظت نوع ویتامین‌های مورد استفاده در محیط کشت MS (mg/l)

ویتامین	مقدار(میلی‌گرم)
گلایسین	۲
نیکوتنیک اسید	۰/۵
پیرودوکسین	۰/۵
تیامین	۰/۵

۳-۷-۴- تهیه‌ی محلول مادری آهن محیط کشت MS تغییر یافته با غلظت (100x)

برای تهیه‌ی این محلول ماده‌ی Fe-EDDHA (مطابق جدول ۳-۴) به میزان ذکر شده وزن شده و با آب مقطر حل گردیدند و به حجم رسانده شدند. نظر به اینکه محلول تولید شده می‌بایست در برابر نور محافظت شود، پس از تهیه‌ی محلول، ظرف محتوی آن در فویل آلومینیومی پوشانده شد و درون یخچال در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جدول۳-۴: غلظت آهن قرمز در محیط کشت MS تغیر یافته (mg/l)

آهن قرمز	مقدار (میلی‌گرم)
Fe-EDDHA	۱۱۹

۳-۷-۵- تهیه محلول‌های ذخیره تنظیم‌کننده‌های رشد

تمام تنظیم کننده‌های رشد، در آب محلول نیستند. برای تهیه‌ی محلول‌های ذخیره‌ی تنظیم کننده‌ی اکسین IBA، NAA (۰/۰۱ گرم) و تنظیم کننده‌های سیتوکنین BAP، KIN (۰/۰۲ گرم) به طور جداگانه در مقدار کمی حلال (۱نرمال NaOH) حل گردید، سپس به آرامی تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر به آن آب اضافه شد.

۳-۸- تهیه یک لیتر محیط کشت

به منظور تهیه‌ی محیط کشت، ابتدا محلول‌های مادری به صورت جداگانه تهیه شدند، با مشاهده هر گونه تغییر رنگ، وجود رسوب و یا مواد زائد، می‌بایست تمامی محلول‌های مادری دوباره تهیه گردند. برای تهیه یک لیتر محیط کشت، ابتدا مقداری آب مقطر(۶۰۰ میلی‌لیتر) داخل یک بشر یک لیتری ریخته شد و سپس از محلول‌های ذخیره، عناصر ماکرو (۱۰۰میلی‌لیتر)، کلسیم کلرید (۱۰۰میلی‌لیتر)، ویتامین‌ها (به طور جداگانه ۱۰میلی‌لیتر)، آهن قرمز به فرم Fe-EDDHA (۱۰ میلی‌لیتر) و در پایان عناصر میکرو (۱۰ میلی‌لیتر) اضافه شدند. پس از اضافه کردن ۳۰ گرم ساکارز، ۰/۱ گرم میواینوزیتول و تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سیتوکنین (مطابق با جدول ۳-۵)، حجم نهایی محلول به یک لیتر رسانده شد. سپس pH محلول با استفاده از NaoH/Hcl یک نرمال در حدود ۵/۸ تنظیم گردید. در آخرین مرحله آگار به میزان ۷ گرم در لیتر به محیط کشت اضافه شد. محلول حاصل جهت استریل شدن در اتوکلاو قرار داده شد. زمان لازم جهت استریل شدن محیط کشت، ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد بود. بطری‌های حاوی محیط کشت پس از استریل شدن، به زیر هود لامینار منتقل شدند. سپس به منظور کاهش پدیده‌ی قهوه‌ای شدن ، آنتی اکسیدان اسید آسکوربیک نیز به میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شد و به محیط کشت اضافه گردید. در نهایت بعد از کمی خنک شدن محیط کشت، محلول محیط کشت، داخل ظروف کشت (شیشه‌های کشت بافت استریل شده) توزیع شدند. در هر یک از شیشه‌های مذکور حدود ۳۵ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته شد. پس از جامد شدن محیط کشت، ظروف در شرایط استریل نگهداری شدند.

جدول ۳-۵ نام غلظت‌های تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده در محیط

تنظیم کننده‌های رشد	غلظت های مورد استفاده (میلی‌گرم در لیتر)
IBA-NAA	۰، ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۵
BAP-KIN	۰/۵، ۱، ۲

۳-۹- ضدعفونی کردن محیط و وسایل کار

جهت کشت بافت گیاهی وجود مکان عاری از آلودگی، ضروری است. به منظور ایجاد فضای سترون جهت انتقال ریزنمونه‌ها از هود لامینار استفاده شد. قبل از استفاده از هود لامینار باید آن را آماده ساخت، بدین صورت که ابتدا سطح داخلی لامینار با پنبه آغشته به الکل ۷۰ درصد تمیز شده و سپس به مدت حداقل ۱۰ دقیقه تحت تابش نور UV قرار گرفت. قبل از روشن کردن لامپ UV کلیه لوازم و ظروف زیر هود قرار داده شدند. بعد از خاموش شدن لامپ UV و پیش از باز کردن درب هود و شروع به کار، فن دستگاه به مدت ۱۰ دقیقه روشن گردید. کلیه لوازم شیشه‌ای و ابزارهای فلزی شامل پنس‌ها و اسکالپل ، با استفاده از اتوکلاو و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی گردیدند. بلافاصله پس از ضدعفونی، ظروف و لوازم به زیر هود انتقال داده شدند. پس از انتقال به زیر هود، پنس‌ها و اسکالپل درون شیشه حاوی الکل ۹۶ درصد قرار داده شدند، به طوری که حدود یک سوم آنها بیرون الکل بود. وسایل آغشته به الکل قبل از استفاده روی شعله نگه داده شدند و پس از سرد شدن استفاده گردیدند.

۳-۱۰- استریل کردن با فیلتر

استریل کردن با فیلتر، غالباً هنگامی استفاده می‌شود که نیاز به یک ماده حساس به گرما (اسید آسکوربیک) در محیط‌کشت باشد. اسید آسکوربیک توسط سرنگ زیرپوستی که مناسب با غشای فیلتر است، تزریق می‌شود (این اعمال در داخل هود لامینار، انجام می‌گیرند). سپس محیط کشت به هم زده شده و محیط کشت کاملی که به این ترتیب حاصل شده است، به ظروف استریل شده، منتقل می‌گردد. در استریل نمودن با فیلتر (محلول‌ها، محیط کشت‌های مایع و غیره، از یک غشا، عبور داده می‌شوند) کلیه ذرات میکروارگانیزم‌ها و ویروس‌هایی که بزرگ‌تر از قطر منافذ فیلتر هستند، حذف می‌شوند.

۳-۱۱- ضدعفونی و آماده سازی ریزنمونه‌ها

بدین منظور ابتدا برگ‌های جوان گیاه هاورتیا رقم *Attenuatae* از گلخانه به آزمایشگاه بیوتکنولوژی انتقال یافتند و به مدت ۳۰ دقیقه با آب جاری و یک قطره مایع ظرف‌شوئی شستشو شدند. سپس برگ‌ها در زیر هود لامینار به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر استریل قرار گرفتند و پس از آن به مدت ۱ دقیقه در محلول الکل ۷۰ درصد غوطه ور شدند و بعد از آن ۲ مرتبه نیز با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. در مرحله بعد، بامحلول هیپوکلرید سدیم (وایتکس) ۲۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شده و ۲ مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند. در مرحله‌ی آخر ضدعفونی با محلول کلرید جیوه (HgcL) ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه و ۳ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. هر برگ در شرایط استریل، توسط اسکالپل استریل شده، به ۲ قطعه تحتانی و میانی با اندازه‌های ۲ سانتی‌متری بریده شدند. قطعات برگ تحتانی مورد استفاده دارای مریستم انتهایی بودند. از قطعات برگی کامل و بدون برش نیز به عنوان ریزنمونه استفاده شد.

۳-۱۲- شرایط اتاق رشد

ریزنمونه‌های کشت شده در دمای ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در دستگاه فیتوترون تحت نور فلورسنت سفید با ۱۴ ساعت دوره‌ی نوری و ۱۰ ساعت دوره‌ی تاریکی نگهداری شدند.

۳-۱۳- کشت و استقرار ریزنمونه ها

۳-۱۳-۱- استقرار

برای مرحله استقرار، محیط‌هایی بدون تنظیم کننده‌های رشد گیاهی تهیه شد و ریزنمونه‌هایی که در طی مرحله ضدعفونی، استریل شده بودند درون این محیط‌ها کشت شدند.

۳-۱۳-۲- بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد بر باززایی شاخساره گیاه هاورتیا در محیط درون شیشه‌ای

ریزنمونه‌های کشت شده در مرحله استقرار، به محیط باززایی شاخساره انتقال یافتند. محیط باززایی شامل محیط کشت با غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی می‌باشد. جوانه‌های باز شده در مرحله استقرار به وسیله پنس استریل جدا شده و داخل محیط کشت MS تغییر یافته حاوی تنظیم کننده‌های رشد، قرار داده شدند. تمامی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مصرفی، قابلیت اتوکلاو شدن را دارند و قبل از تنظیم pH به محیط کشت اضافه می‌شوند.

۳-۱۳-۲-۱ واکشت در مرحله‌ی باززایی

محیط‌کشت‌ها هر ۴ هفته یک بار تعویض شدند، طول این دوره ۲ ماه بود.

۳-۱۳-۲-۲- صفات مورد اندازه گیری در مرحله‌ی باززایی

در انتهای مرحله‌ی باززایی، داده‌برداری صفاتی چون تعداد شاخساره‌ی باززاشده، طول و عرض شاخساره، تعداد برگ‌ها، طول و پهنای برگ انجام گرفت.

۳-۱۳-۳- بررسی اثرتنظیم کننده‌های رشد (BAP و IBA) و اندازه ریزنمونه‌ی TCL ساقه بر باززایی گیاه هاورتیا

به منظور بررسی تأثیر هورمون‌های BAP و IBA و اندازه ریزنمونه در باززایی هاورتیا رقم *Attenuatae* از لایه‌های سلولی نازک ساقه (TCL) نیز به عنوان ریزنمونه استفاده شد. بدین ترتیب از محور ساقه‌ی برگ‌ها برش‌هایی نازک با ضخامت‌های ۳ و ۵ میلی‌متر تهیه نموده و در محیط کشت MS تغیر یافته حاوی ترکیب‌های هورمونی IBA با غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و BAP با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند. در این آزمایش صفاتی چون تعداد، طول و عرض شاخساره‌ی گیاهان باززاشده ارزیابی شدند.

۳-۱۳-۴- ریشه‌زایی

برای تولید ریشه، شاخساره‌های باززا شده به ۲ نوع محیط شامل محیط MS تغییر یافته و 1/2MS تغییر یافته حاوی ساکارز ۱/۵ درصد و آگار ۳ درصد منتقل شدند. در این محیط کشت هورمون‌های IBA و NAA با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، به عنوان تیمار استفاده شدند.

۳-۱۳-۴-۱- واکشت در مرحله‌ی ریشه‌زایی

واکشت ریزنمونه‌ها در این مرحله، هر ۲ هفته یک بار صورت گرفت و طول این دوره یک ماه در نظر گرفته شد.

۳-۱۳-۴-۲- صفات مورد اندازه گیری در مرحله‌ی ریشه‌زایی

در پایان این مرحله تعداد و طول ریشه‌ها اندازه گیری شدند.

۳-۱۴- سازگاری و انتقال به گلخانه

پس از مرحله باززایی، شاخساره‌های ریشه‌دار شده برای مرحله سازگاری به گلدانهای حاوی کوکوپیت و پرلیت استریل در شرایط عاری از قارچ و باکتری منتقل گردیدند. گیاهچه‌های سالم تولید شده در شرایط این ویترو با هدف تولید واکس کوتیکولی، فعال شدن روزنه‌ها و تولید ریشه‌های جدید به مدت ۴ تا ۶ هفته در شرایط نور ۶۰۰۰ لوکس، دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰ درصد قرار داده شدند. جهت بررسی امکان ریشه‌دهی در خاک، گیاهان برای مدت ۱۰ روز با پوشش‌های پلاستیکی که مانع از تبخیر می‌گردند، پوشیده شدند. بعد از اینکه گیاه اتوتروف شد، شدت نور افزایش یافته و رطوبت در شرایط طبیعی رشد تنظیم گردید. سپس سرپوش گلدان‌ها برداشته شد و گیاهچه‌های تولید شده به خاک استریل منتقل شدند و مراقبت و آبیاری بر اساس نیاز گیاه درگلخانه انجام شد.

۳-۱۵- آنالیز آماری

جهت باززایی شاخساره، آزمایشی به صورت فاکتوریل با طرح پایه‌ی کاملا تصادفی اجرا شد که فاکتور اول نوع ریزنمونه بود که شامل قسمت میانی، تحتانی برگ و برگ کامل بود. فاکتور دوم هورمون‌های رشد اکسینی IBA و NAA با غلظت‌های ۰ ، ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر و فاکتور سوم هورمون‌های رشد سیتوکنینی BAP و KIN با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم بر لیتر بود. در این آزمایش تیمارها در ۳ تکرار اعمال شدند. هر شیشه حاوی ۳ ریزنمونه به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. در مرحله‌ی ریشه‌زایی نیز آزمایشی به صورت فاکتوریل با طرح پایه‌ی کاملا تصادفی اجرا شد که فاکتور اول نوع محیط شامل محیط MS و 1/2MS و فاکتور دوم تنظیم‌کننده رشدی اکسینی NAA و IBA با غلظت-های ۰، ۰/۵، ۱و۱/۵ میلی گرم بر لیتر است. در این آزمایش نیز، تیمارها در ۳ تکرار اعمال گردیدند و هر شیشه حاوی ۳ ریزنمونه به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد.

۳-۱۵-۱ نرم افزارهای مورد استفاده

تجزیه داده ها با نرم افزار SAS انجام شد و نمودارها با نرم افزار Excel رسم گردید. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون LSD توسط نرم افزار MSTAT-C صورت گرفت.

فصل چهارم:

نتایج و بحث

۴-۱- اثر تیمارهای ضدعفونی بر آلودگی و فنول‌زایی ریزنمونه‌ها

هدف از مرحله استقرار ریزنمونه‌ها، رسیدن به درصد بالایی از کشت‌های بدون آلودگی و تثبیت گیاهان مادری در محیط کشت است. به طور کلی، موفقیت تیمارهای ضدعفونی با درصد ریزنمونه‌های استقرار یافته در محیط کشت در ارتباط است، زیرا آغاز رشد در ریزنمونه‌های بدون آلودگی، مشاهده شد.

در پژوهش حاضر، ریزنمونه‌های برگ کامل و تحتانی تقریبا همزمان با یکدیگر شروع به رشد نمودند. نتایج آزمایش بیانگر عدم امکان باززایی از ریزنمونه‌های میانی برگ بود. این ریزنمونه‌ها در اثر اکسیداسیون و قهوه‌ای شدن رنگ ریزنمونه از قابلیت رشد برخوردار نبودند (شکل۴-۱).

شکل۴-۱ عدم رشد ریزنمونه‌های میانی

این در حالی بود که ریزنمونه‌هایی که از قابلیت باززایی برخوردار بودند، سبز رنگ بوده و از زمان کشت آنها در محیط، تغییر رنگ محسوسی مشاهده نگردید (شکل ۴-۲). با این حال، در بعضی از ریزنمونه‌ها فنول‌زایی مشاهده شد که با اعمال تیمار اسیدآسکوربیک به میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر، این مشکل برطرف گردید.

ب الف

شکل ۴-۲ باززایی از ریزنمونه‌های الف: برگ کامل و ب: بخش تحتانی برگ، یک ماه پس از کشت اولیه

بررسی نتایج آزمایش ضدعفونی و استقرار ریزنمونه‌ها پس از ۱۴ روز، نشان داد آلودگی باکتریایی در بعضی از تیمارها به میزان متوسط دیده شده است که این میزان آلودگی‌ها با استفاده از محلول کلرید جیوه به حداقل رسید.

شکل ۴-۳ ریزنمونه‌های آلوده به باکتری و قارچ در طی مراحل آزمایش

در این پژوهش از آهن به فرم کلات (آهن قرمز) استفاده شد. Fe-EDTA به علت ناپایدار بودن، باعث تغییراتی در جهت افزایش pH محیط می‌شود. با این حال کلات Fe-EDDHA بسیار پایدار می‌باشد. به طوری‌که پس از ۶ هفته هیچ گونه تغییری در pH رخ نمی‌دهد و برگ‌ها بعد از این مدت سبز رنگ باقی می‌مانند. محتوای کلروفیل و ارتفاع گیاهان تیمار شده با Fe-EDDHA نسبت به گیاهان تیمار شده با آهن Fe-EDTA به طور معنی‌داری بالاتر است (گومز و همکاران، ۲۰۰۵). علاوه بر این جایگزینی Fe-EDTA با فرم کلات Fe-EDDHA آثار بسیار مثبتی بر میزان تکثیر و ریزازدیادی اکثر گونه‌ها دارد. جذب آهن به صورت آهسته، از سطح ریزنمونه در تماس با محیط کشت صورت می‌گیرد، بنابراین فرم‌های پایدار در دسترس بودن آهن برای گیاه را افزایش می‌دهند. حضور Fe-EDDHA در محیط کشت توانایی نوساقه‌زایی جوانه‌های جانبی و همچنین ظهور شاخه‌های نابه‌جا و ریشه‌زایی را افزایش می‌دهد. همچنین، اضافه نمودن آهن به محیط کشت به شکل Fe-EDDHA شیشه‌ای شدن بافت‌ها را نیز کاهش خواهد داد (ترجل و همکاران، ۲۰۱۲).

۴-۲- آزمایش اول: بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد BAP و IBA بر باززایی از شاخساره گیاه هاورتیا در محیط درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های برگی

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های تعداد شاخساره نشان داد که اثر ساده و آثار متقابل دو و سه جانبه‌ی هر سه فاکتور IBA، BAP و نوع ریزنمونه در سطح احتمال یک درصد برای این صفت معنی‌دار شد. به عبارتی تعداد شاخساره‌ی تولید شده به طور معنی‌داری از کلیه‌ی تیمارهای آزمایش تأثیر پذیرفت(جدول ۴-۱).

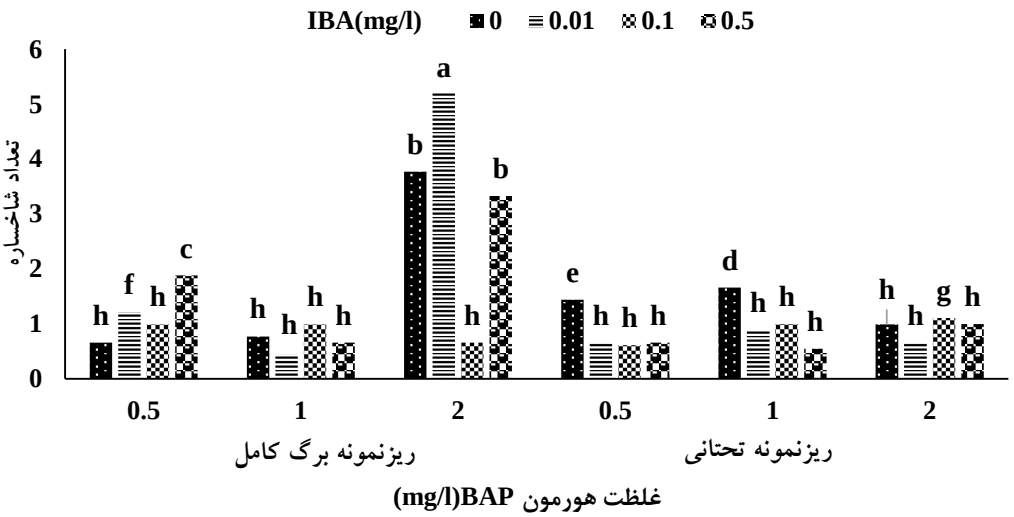
جدول۴- ۱ تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی گیاهان باززاشده‌ی هاورتیا تحت تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد BAP ، IBA و نوع ریزنمونه‌ی برگی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات					
		تعداد شاخساره	طول شاخساره	عرض شاخساره	تعداد برگ	طول برگ	پهنای برگ
BAP	۲	۱۰/۷**	۱/۳۸**	۰/۵۹**	۴/۱**	۱/۳۸**	۰/۵۸**
IBA	۳	۱/۶۳**	۰/۲۷**	۰/۱۵**	۴/۶**	۰/۰۹*	۰/۰۲*
ریزنمونه	۱	۱/۹۳**	۰/۱۵^{ns}	۰/۰۷^{ns}	۰/۱۱ ^{ns}	۰/۱۶*	۰/۰۷**
IBA×BAP	۶	۱/۸۲**	۰/۱۹**	۰/۲۰**	۱/۵۱ ^{ns}	۰/۱۲**	۰/۳۳**
ریزنمونه × IBA	۳	۲/۴۱**	۰/۱۶*	۰/۲۷**	۰/۲۵ ^{ns}	۰/۱۷**	۰/۳۷**
ریزنمونه × BAP	۲	۱۱/۰۸**	۰/۱۴*	۰/۰۰۵^{ns}	۲/۰۹ ^{ns}	۰/۰۹ ^{ns}	۰/۰۰۳ ^{ns}
ریزنمونه × BAP × IBA	۶	۲/۶۸**	۰/۰۲^{ns}	۰/۰۵ ^{ns}	۲/۲۲*	۰/۱۵**	۰/۰۳۷ ^{ns}
خطای آزمایش	۴۸	۰/۱۵	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۷۹	۰/۰۳	۰/۰۰۶
درصد CV		۲۹/۸۹	۳۱/۸۱	۲۷/۷۴	۳۰/۸۹	۳۰/۱۵	۲۵/۴۶

*** و ** به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهد.**

۴-۲-۱- تعداد شاخساره

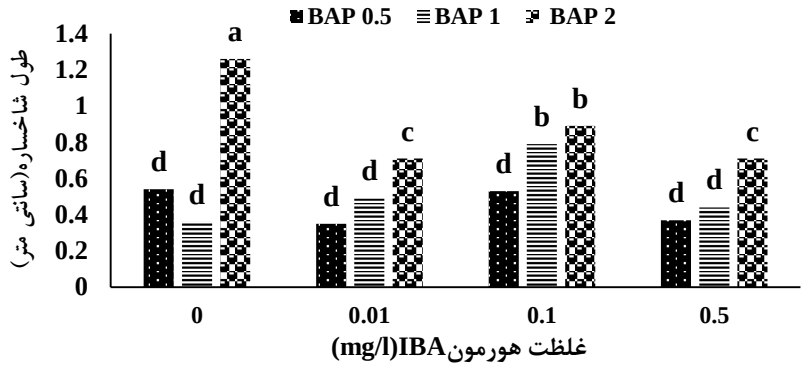
نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه در تعداد شاخساره باززاشده گیاه هاورتیا نشان داد که ریزنمونه‌ی برگ کامل نسبت به ریزنمونه‌ی بخش تحتانی برگ، تعداد شاخساره بیشتری را تولید نموده است، به طوری‌که در این ریزنمونه، بیشترین تعداد شاخساره‌ی باززاشده (با تعداد ۵/۲۲ عدد) با کاربرد ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌دست آمد (شکل ۴-۴). بنزیل آمینو پورین با کاهش چیرگی انتهایی سبب افزایش تعداد شاخساره‌ها در گیاهان می‌شوند(شهزاد و سیدیکوئی، ۲۰۰۰). در تحقیقات انجام شده، اثر مثبت کاربرد BAP به تنهایی و IBA به همراه BAP بر شاخه‌زایی گیاه آلوئه ورا توسط آگاروال و بارنا (۲۰۰۴) و دبیاسی و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش شده بود. علاوه بر این در پژوهش (چاندرا و همکاران ،۲۰۱۷ ؛ کومار و همکاران ،۲۰۱۱) برهمکنش مناسب این دو هورمون با ریزنمونه‌ی برگ برای القای کالوس و باززایی غیرمستقیم گیاه آلوئه‌ورا گزارش شده بود.



شکل ۴-۴ مقایسه میانگین اثر متقابل انواع ریزنمونه و ترکیبات تنظیم کننده‌های رشد BAP با IBA بر تعداد شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

۴-۲-۲- طول شاخساره

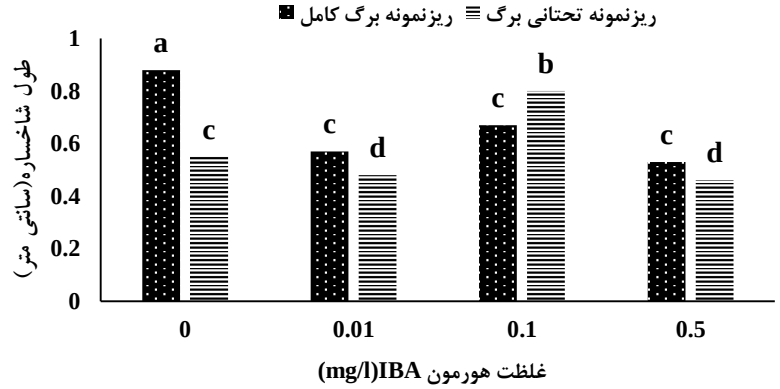
نتایج تجزیه واریانس داده‌های طول شاخساره گیاهان هاورتیای باززاشده نشان داد که اثر ساده هورمون-های IBA، BAP و اثر متقابل آنها در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴-۱). مقایسه میانگین طول شاخساره‌های رشد یافته تحت تیمارهای هورمونی IBA و BAP نشان داد که بیشترین میانگین طول شاخساره (۱/۲۶ سانتی‌متر) تنها در بالاترین سطح BAP یعنی ۲ میلی‌گرم در لیتر و عدم حضور هورمون IBA به دست آمد (شکل ۴-۵).



شکل ۴-۵ مقایسه میانگین طول شاخساره‌ی باززا شده تحت تیمارهای هورمونی IBA و BAP در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل دو جانبه‌ی هورمون IBA و نوع ریزنمونه، در شرایط عدم استفاده از هورمون IBA ریزنمونه‌ی برگ کامل در مجموع بیشترین میانگین طول شاخساره (۰/۸۸ سانتی‌متر) را تولید نمود (شکل ۴-۶). همچنین در بالاترین سطح هورمون IBA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و نیز کاربرد ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر از این هورمون ریزنمونه‌ی برگ کامل از طویل‌ترین شاخساره‌ها به ترتیب ۰/۵۳ و ۰/۵۷ سانتی‌متر در گیاهان باززاشده برخوردار بود (شکل۴-۶). بر اساس نتایج مقایسه میانگین، تنها در شرایط اعمال تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA ریزنمونه‌ی تحتانی توانست نسبت به ریزنمونه برگ کامل به طور معنی‌داری شاخساره‌های طویل‌تری (۰/۸ سانتی‌متر) تولید نماید (شکل ۴-۶). در حالی‌که نتایج پژوهش داس و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که مناسب‌ترین باززایی از سرشاخه گیاه آلوئه ورا در محیط MS حاوی ۸/۸۷ میکرومول BAP و ۲/۴۶ میکرومول IBA به دست

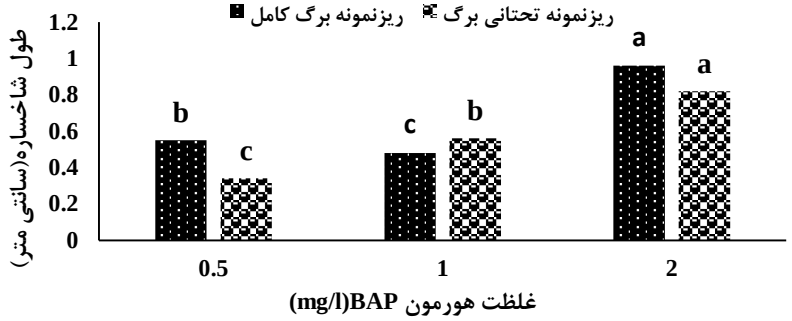
آمد. به طوری‌که بیشترین طول شاخساره ۴/۲ سانتی‌متر بود. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه با هورمون BAP برای صفت طول شاخساره نشان داد که هر دو ریزنمونه ی برگ کامل و بخش تحتانی برگ، در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیترBAP بالاترین میزان طول شاخساره (۰/۸۸ سانتی‌متر) را تولید نمودند (شکل ۴-۷). بر اساس نتایج، مشاهده شد که ریزنمونه‌های مختلف از روند متفاوتی در تولید شاخساره‌های طویل‌تر برخوردار بودند. به طوریکه در سطح ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BAP، ریزنمونه‌ی برگ کامل و در سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر از این هورمون ریزنمونه‌ی تحتانی برگ، به طور معنی‌داری موفق به تولید شاخساره‌های طویل‌تر گردیدند (شکل ۴-۷). سینگ و همکاران (۲۰۰۹) گزارش نمودند که بیشترین طول شاخساره آلوئه ورا (۲/۴۹ سانتی‌متر) در محیط MS همراه با ۱۳/۳۲ میکرومول هورمون BAP مشاهده شد. سن فیزیولوژیکی ، نوع و اندازه ریزنمونه‌ها از فاکتورهای مهم است که بر تشکیل اندام‌های درون شیشه‌ای موثر هستند(روت و همکاران، ۱۹۹۹).



شکل ۴-۶ مقایسه میانگین طول شاخساره‌ی باززا شده در تیمار هورمونی IBA با ریزنمونه‌های برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

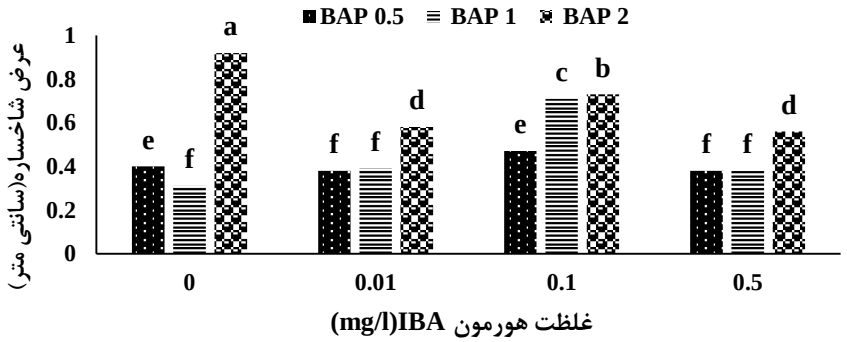
۴-۲-۳- عرض شاخساره

نتایج تجزیه واریانس داده‌های عرض شاخساره گیاهان هاورتیای باززاشده نشان داد که اثر ساده هورمون‌های IBA، BAP و اثر متقابل آنها در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴-۱). معنی‌دار بودن این اثر متقابل بدان معناست که در هر سطح هورمون، عرض‌های شاخساره‌ی تولید شده در سطوح



شکل ۴-۷ مقایسه میانگین طول شاخساره‌های باززا شده در تیمار هورمونی BAP با ریزنمونه‌های برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

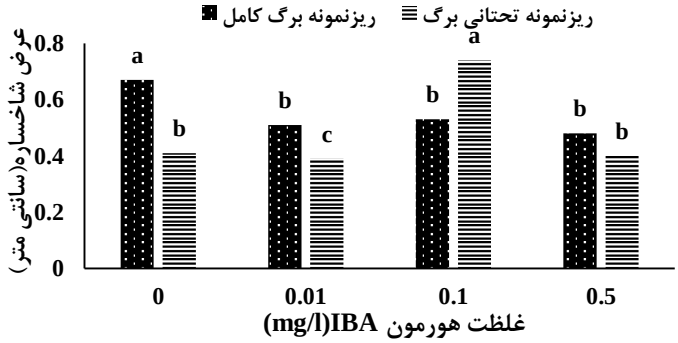
مختلف هورمون دیگر، روند یکنواخت و یکسانی نداشته‌اند. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میانگین عرض شاخساره (۰/۹۲ سانتی‌متر) دربالاترین سطح هورمون BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) بدون حضور هورمون IBA تولید گردید (شکل ۴-۸).



شکل ۴- ۸ مقایسه میانگین عرض شاخساره‌های باززا شده تحت تیمارهای IBA و BAP در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا.

همچنین با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل ریزنمونه و هورمون IBA (جدول ۴-۱)، نتایج مقایسه‌ی میانگین بیانگر این واقعیت بود که بجز سطوح بالای مصرف این هورمون (سطوح ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، در تیمار شاهد (عدم مصرف هورمون) و سطح ۰/۰۱ از مصرف این هورمون، ریزنمونه‌ی برگ کامل به طور معنی‌داری شاخساره‌های عریض‌تر تولید نمود. این در حالی است که در سطح ۰/۵ میلی‌گرم

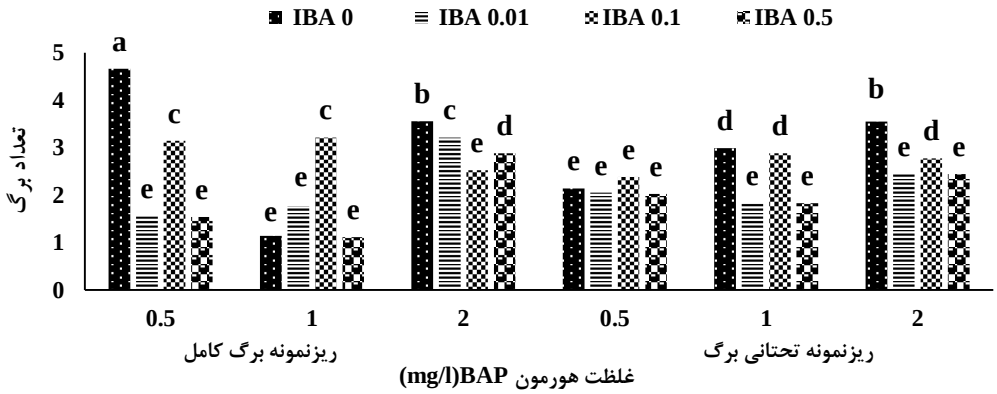
در لیتر از مصرف این هورمون، دو ریزنمونه، تفاوت معنی‌داری در پهنای شاخساره‌ی تولید شده نشان ندادند. اگرچه در سطح ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از کاربرد هورمون IBA، ریزنمونه‌ی تحتانی با راندمان ۲۱ درصد، توانست شاخساره‌های عریض‌تری را نسبت به ریزنمونه‌ی برگ کامل تولید نماید (شکل۴-۹). بیشترین عرض شاخساره (۰/۶۷ سانتی‌متر) در شرایط عدم مصرف هورمون IBA با استفاده از ریزنمونه‌ی برگ کامل و در شرایط مصرف ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA با استفاده از ریزنمونه‌ی تحتانی برگ (۰/۷۴ سانتی‌متر) ، تولید گردید (شکل ۴-۹).



شکل۴-۹ مقایسه میانگین عرض شاخساره باززا شده در تیمار هورمونی IBA با ریزنمونه‌های برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

۴-۲-۴- تعداد برگ

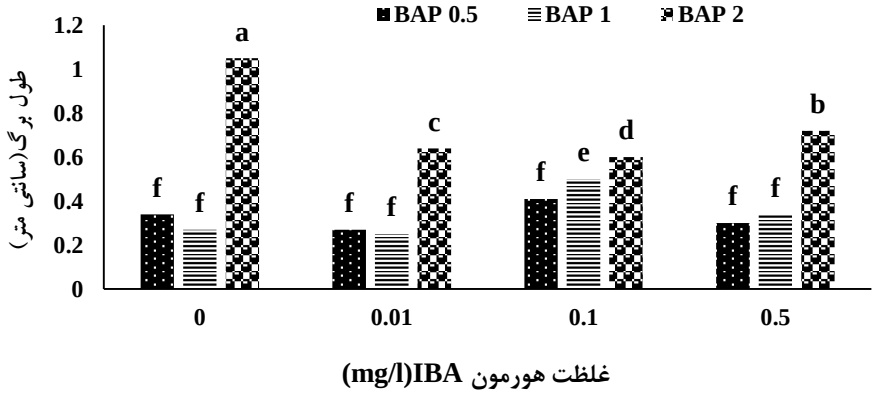
نتایج تجزیه واریانس تعداد برگ نشان داد که اثر ساده‌ی هورمون‌های IBA وBAP در سطح احتمال یک درصد و برهمکنش سه جانبه‌ی تیمارهای آزمایش (هورمون‌ها و ریزنمونه‌ها) در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴-۱). نتایج مقایسه‌ی میانگین این صفت، نشان داد که ریزنمونه‌ی برگ کامل تحت تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP در شرایط عدم حضور هورمون IBA، توانست بیشترین تعداد برگ (۴/۶۶ عدد) را تولید نماید (شکل ۴-۱۰). جایاکریشنا و همکاران (۲۰۱۱) گزارش نمودند که ریزنمونه‌های گره ساقه آلوئه ورا در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین پاسخ را در تولید برگ نشان دادند.



شکل۴-۱۰ مقایسه میانگین تعداد برگ تولید شده توسط شاخساره‌های باززاشده‌ی گیاه هاورتیا تحت تأثیر برهمکنش ترکیبات هورمونی BAP ، IBA و نوع ریزنمونه در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

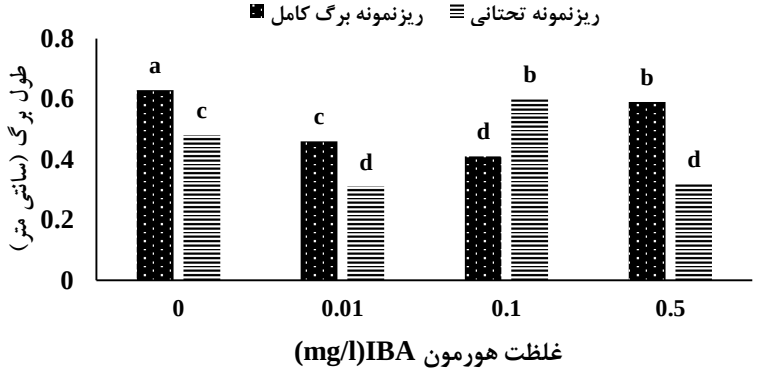
۴-۲-۵- طول برگ

با توجه به معنی داری اثر ساده‌ی هورمون‌های BAP و IBA و اثر متقابل آنها (جدول۴-۱)، نتایج مقایسه میانگین صفت طول برگ نشان داد که به طور متوسط طویل‌ترین برگ‌های هاورتیا (۱/۰۵ سانتی‌متر) تحت تیمار بالاترین سطح هورمون BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) و بدون حضور هورمون IBA تولید گردیدند (شکل ۴-۱۱).



شکل۴- ۱۱ مقایسه میانگین طول برگ شاخساره‌های باززا شده تحت تیمارهای هورمونی BAP و IBA در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا.

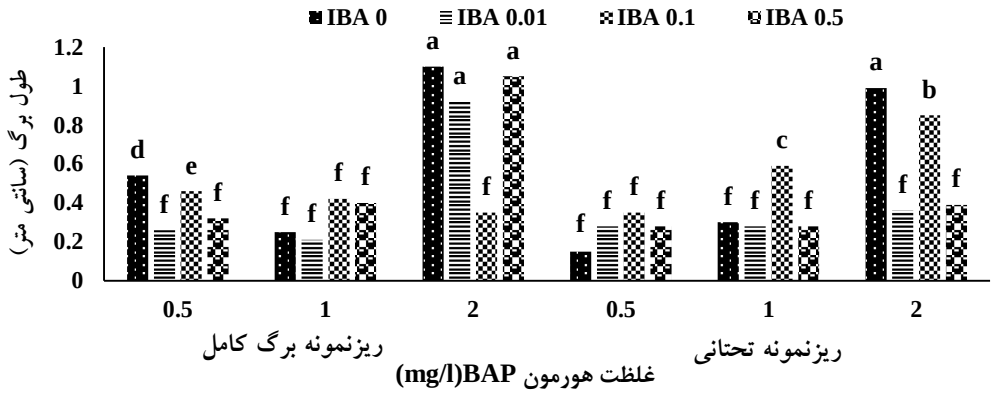
همچنین بیشترین طول برگ با استفاده از ریزنمونه برگ کامل در محیط فاقد هورمون IBA تولید گردید (شکل ۴-۱۲). بر اساس نتایج، ریزنمونه‌های مختلف در تولید طویل‌ترین برگ‌ها، در سطوح مختلف هورمون IBA به طور یکسانی عمل نکردند. یعنی به استثنای تیمار هورمونی IBA در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، که در آن شاخساره‌های تولید شده از ریزنمونه‌ی برگ تحتانی به طور معنی‌داری برگ‌های طویل‌تری از شاخساره‌های تولید شده از ریزنمونه‌ی برگ کامل تولید کردند، در بقیه سطوح این هورمون از جمله (۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و نیز عدم مصرف این هورمون، طویل‌ترین برگ‌ها، به شاخساره‌های تولید شده توسط ریزنمونه‌ی برگ کامل تعلق داشت.



شکل۴-۱۲ مقایسه میانگین طول برگ شاخساره‌های باززا شده از ریزنمونه‌های برگی مختلف تحت تیمار هورمونی IBA در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا.

بر اساس معنی‌دار بودن برهمکنش سه جانبه‌ی تیمارهای آزمایش برای صفت طول برگ (جدول۴-۱) بررسی نتایج مقایسه‌ی میانگین‌ها نشان داد که ریزنمونه‌های مختلف، واکنش‌های متفاوتی را تحت تیمارهای هورمونی مختلف نشان دادند (شکل ۴-۱۳). به طوری‌که تنها در بالاترین سطح هورمون BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) و عدم حضور هورمون IBA هر دو ریزنمونه، به لحاظ تأثیری که بر طویل شدن برگ‌ها داشتند مشترکاً در گروه برتر آماری قرار گرفتند. این در حالی است که در همین سطح هورمون BAP، غلظت‌های مختلف IBA در دو ریزنمونه روند کاملاً متفاوتی ایجاد نمود. در ریزنمونه‌ی برگ کامل، غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA (تحت بالاترین سطح هورمون BAP) نیز

توانستند طویل‌ترین برگ‌ها را تولید کنند، در حالی‌که در شاخساره‌های تولید شده از همین ریزنمونه، تحت بالاترین سطح هورمون BAP و غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA کوتاه‌ترین برگ‌ها تولید گردید. این روند در شاخساره‌های تولید شده از ریزنمونه‌ی تحتانی برگ، کاملاً متفاوت بود(شکل ۴-۱۳). البته باید توجه داشت که علت واکنش بهتر برخی از ریزنمونه‌ها تأمین بهتر مواد غذایی در قسمت مریستم ریزنمونه و عدم پخش این مواد در محیط کشت است (حسندخت و ابراهیمی، ۱۳۸۵).

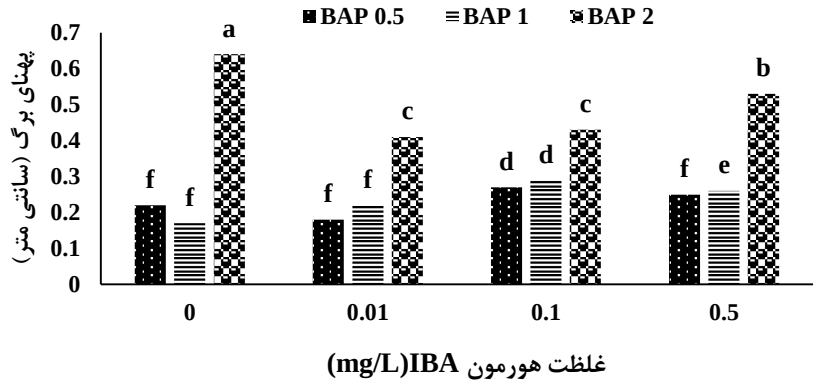


شکل۴- ۱۳ مقایسه میانگین طول برگ‌های تولید شده توسط شاخساره‌های باززاشده تحت تأثیر برهمکنش ترکیبات هورمونی BAP ، IBA و نوع ریزنمونه در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

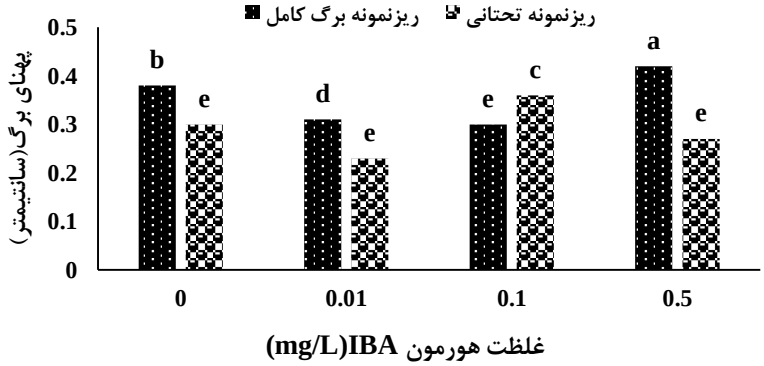
۴-۲-۶- پهنای برگ

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها برای صفت پهنای برگ نشان داد که اثر متقابل هورمون BAP، IBA و هورمون IBA با نوع ریزنمونه در سطح یک درصد معنی دار شد (جدول۴-۱). نتایج مقایسه‌ی میانگین بر همکنش دو هورمون IBA و BAP برای صفت پهنای برگ گویای آن بود که عریض‌ترین برگ‌ها (۰/۶۴ سانتی‌متر) در بالاترین سطح هورمون BAP و عدم حضور هورمون IBA تولید گردیدند (شکل۴-۱۴). همچنین نتایج مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون IBA نشان داد که ریزنمونه‌ی برگ کامل در بالاترین سطح این هورمون (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بیشترین پهنای برگ (۰/۴۲ سانتی‌متر) را تولید نمود. این روند در سایر سطوح این هورمون نیز برقرار بود به استثنای سطح

۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA که ریزنمونه‌ی تحتانی برگ به طور معنی‌داری از برگ‌های عریض-تری در شاخساره‌های تولید شده، برخوردار بود (شکل۴-۱۵). بر اساس نتایج حاصل به نظر می‌رسد که این سطح هورمون IBA مناسب‌ترین سطح هورمونی برای این ریزنمونه باشد. چراکه نتایج بهینه‌ای را درکلیه‌ی صفات اندازه گیری شده در شاخساره‌های تولید شده دارا بود.



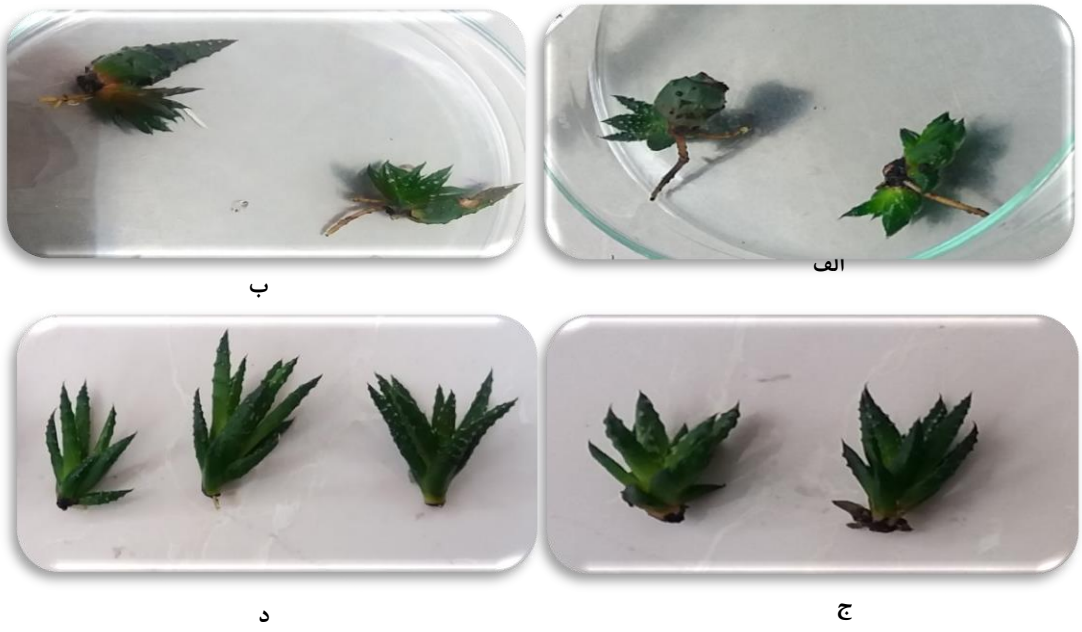
شکل۴- ۱۴ مقایسه میانگین پهنای برگ شاخساره‌های باززا شده در تیمار هورمونی BAP و IBA در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا.



شکل۴- ۱۵ ، مقایسه میانگین پهنای برگ شاخساره‌های باززا شده در تیمار هورمونی IBA با استفاده از ریزنمونه‌ی برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا.

به طور کلی، در واکنش‌های هورمونی ممکن است یک هورمون اثر هورمون دیگر را تشدید یا خنثی کند. معلوم شده است که هورمون‌ها روی هم اثر متقابل داشته و اثرات یکدیگر را بهبود می‌بخشند (دل پوزا و همکاران، ۲۰۰۵). در برخی گونه‌ها و ارقام، سطوح داخلی هورمون‌های اکسین و سیتوکنین به گونه‌ای است که استفاده‌ی خارجی تنظیم کننده‌های رشد را تحت تأثیر قرار می‌دهند. اگر اکسین داخلی بالا بوده افزودن اکسین به محیط درون شیشه‌ای موجب کاهش میزان باززایی شده است (گاسپر و همکاران، ۲۰۰۳).

زانگ و همکاران (۲۰۰۱) نیز گزارش نمودند که تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نه تنها غیر اختصاصی شدن و تکثیر سلول‌ها را تنظیم میکنند بلکه موجب کنترل اندام‌زایی بافت نیز می‌گردند.



شکل ۴-۱۶ باززایی شاخساره هاورتیا از ریزنمونه تحتانی و برگ کامل با تیمار هورمونی BAP و IBA یک ماه پس از کشت اولیه، الف: باززایی از ریزنمونه تحتانی ب: باززایی از ریزنمونه برگ کامل ج: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه تحتانی د: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه برگ کامل

۴-۳- آزمایش دوم: بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد KIN و IBA بر باززایی گیاه هاورتیا در محیط درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های برگی

نتایج تجزیه واریانس صفت تعداد شاخساره بیانگر معنی‌داری اثر ساده‌ی هر یک از دو هورمون IBA و KIN در سطح احتمال یک درصد بود. همچنین کلیه‌ی آثار متقابل دو جانبه و سه جانبه‌ی تیمارهای هورمونی و نوع ریزنمونه نیز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند (جدول ۴-۲).

جدول۴- ۲ تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی گیاهان باززاشده هاورتیا تحت تیمارهای هورمونی KIN ، IBA و نوع ریزنمونه‌ی برگی

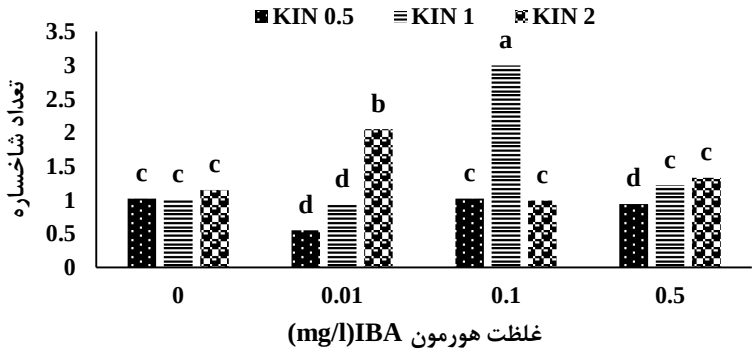
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات					
		تعداد شاخساره	طول شاخساره	عرض شاخساره	تعداد برگ	طول برگ	پهنای برگ
KIN	۲	۱۲/۲۲**	۰/۵۴**	۰/۲۱**	۰/۲۱^{ns}	۰/۴۱**	۰/۳۴**
IBA	۳	۱۰/۶۷**	۰/۶۶**	۰/۲۲**	۴/۶۸**	۰/۰۴*	۰/۰۲*
ریزنمونه	۱	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۸*	۰/۰۱^{ns}	۰/۸۲^{ns}	۰/۱۷**	۰/۰۹**
IBA×KIN	۶	۱۳/۸۳**	۰/۴۵**	۰/۴**	۲/۴۱**	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۰۹^{ns}
ریزنمونه × IBA	۳	۰/۷۱**	۰/۰۵**	۰/۰۸**	۰/۰۸^{ns}	۰/۰۲^{ns}	۰/۰۴^{ns}
ریزنمونه × KIN	۲	۱/۶۳**	۰/۰۹**	۰/۰۲^{ns}	۰/۸۹^{ns}	۰/۰۴^{ns}	۰/۰۰۸^{ns}
ریزنمونه × KIN × IBA	۶	۰/۷۲**	۰/۱۷^{ns}	۰/۰۹^{ns}	۱/۰۷*	۰/۰۷**	۰/۰۴**
خطای آزمایش	۴۸	۰/۱۲	۰/۰۱۳	۰/۰۱	۰/۴۲	۰/۰۳	۰/۰۰۶
درصد CV		۲۳/۱۶	۱۷/۵۱	۲۰/۵۱	۳۲/۶۸	۲۵/۰۴	۲۲/۹۸

*** و ** به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهد.**

۴-۳-۱- تعداد شاخساره

نتایج مقایسه میانگین برهمکنش دو تیمار هورمونی IBA و KIN بر تولید تعداد شاخساره‌ی گیاه هاورتیا نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره (۳ عدد) در تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA

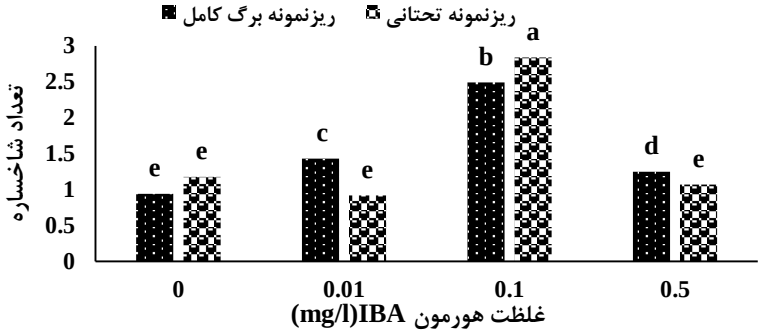
و ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN تولید گردید (شکل ۴-۱۷). این در حالی است که کمترین تعداد شاخساره‌ی تولید شده در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه سطوح ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN و نیز در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN مشاهده گردید (شکل۴-۱۷). سیتوکنین‌ها در محیط کشت غالباً برای تحریک رشد و نمو به کار می‌روند 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 (ورنر، ۲۰۰۹). حضور سیتوکنین‌ها در تشکیل شاخساره اثر گذاشته و تشکیل آنها را بهبود می‌بخشد و نسبت بین تنظیم کننده‌های رشد، تمایزیابی بین سلول و اندام‌زایی را ممکن می‌سازد (الزن، ۱۹۸۳).



شکل۴- ۱۷ مقایسه میانگین تعداد شاخساره‌های باززا شده تحت تیمارهای KIN و IBA در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا.

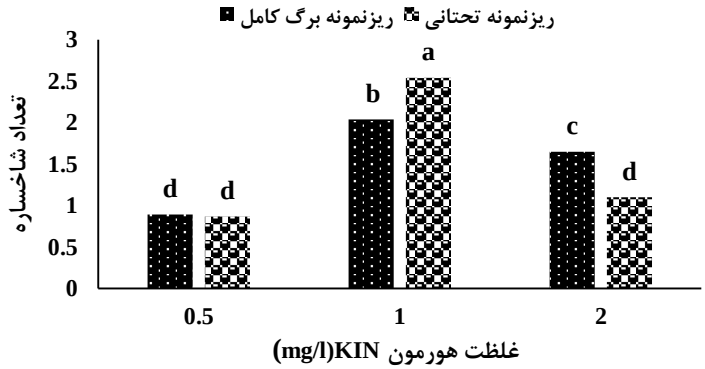
نتایج مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف هورمون IBA و نوع ریزنمونه نشان داد که ریزنمونه‌های مختلف در سطوح متفاوت این هورمون الگوی یکسانی را تولید تعداد شاخساره در پیش نگرفتند. به طوری‌که در کلیه‌ی سطوح اعمال هورمون IBA به جز سطح ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، اگرچه ریزنمونه‌ی تحتانی برگ به طور معنی‌داری تعداد شاخساره‌ی کمتری را نسبت به ریزنمونه‌ی برگ کامل تولید کرد، با این حال در سطح ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA روند کاملاً متفاوتی حاصل گردید. در این سطح، ریزنمونه‌ی تحتانی برگ نه تنها تفاوت معنی‌داری را در تولید تعداد شاخساره‌ی بیشتر نسبت به ریزنمونه‌ی برگ کامل نشان داد، بلکه با تولید ۲/۸۴ عدد شاخساره به طور متوسط، رکورددار

تولید بیشترین تعداد شاخساره در بین سایر ترکیبات تیماری مورد بررسی در این برهمکنش بود (شکل ۴-۱۸).



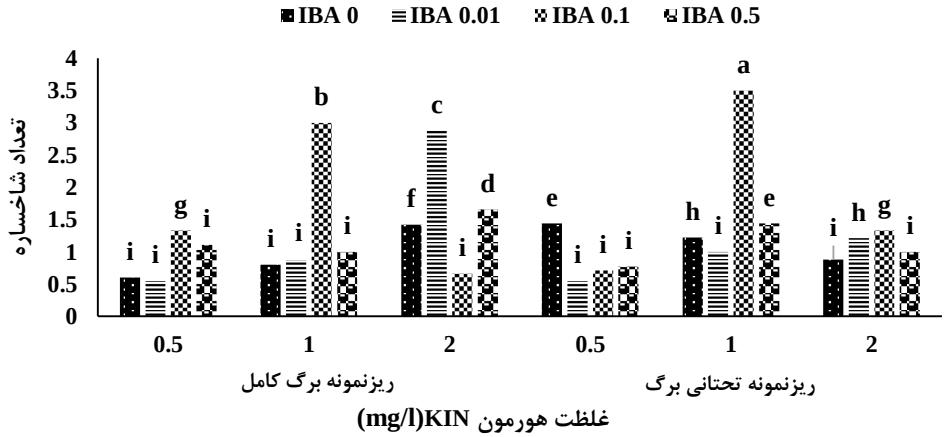
شکل۴- ۱۸ مقایسه میانگین تعداد شاخساره‌های باززا شده تحت تیمار هورمونی IBA با ریزنمونه‌های برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

همچنین در بررسی نتایج برهمکنش سطوح مختلف هورمون KIN با نوع ریزنمونه‌ی برگی، ریزنمونه‌ی تحتانی برگ با تولید ۲/۵۴ عدد شاخساره (به طور متوسط) در سطح کاربرد ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون KIN نیز رکورددار تولید بیشترین تعداد شاخساره بود (شکل ۴-۱۹). در پژوهش احمدزاده (۱۳۹۱) حداکثر تعداد شاخساره آلوئه ورا با ۵/۷۷ عدد به ازای هر ریزنمونه با استفاده از محیط کشت MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN حاصل شد.



شکل۴- ۱۹ مقایسه میانگین تعداد شاخساره‌های باززا شده تحت تیمار هورمونی KIN با ریزنمونه‌های برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

در مجموع، در بررسی برهمکنش ترکیبات سه جانبه‌ی انواع هورمون و نوع ریزنمونه مشخص گردید که ریزنمونه‌ی تحتانی برگ با کاربرد تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین تعداد شاخساره (۳/۵ عدد) را تولید کرد. ریزنمونه‌ی برگ کامل نیز با تولید ۳ عدد شاخساره، در غلظت‌های هورمونی مشابه بیشترین تعداد شاخساره را پس از ریزنمونه‌ی تحتانی برگ تولید نمود (شکل ۴-۲۰). بنابراین چنین استنباط می‌گردد که چنانچه نوع و غلظت‌های هورمونی مناسب، گزینش شده و مورد استفاده قرار گیرند، هر دو ریزنمونه‌ی برگی هاورتیا قابلیت تولید شاخساره را خواهند داشت.

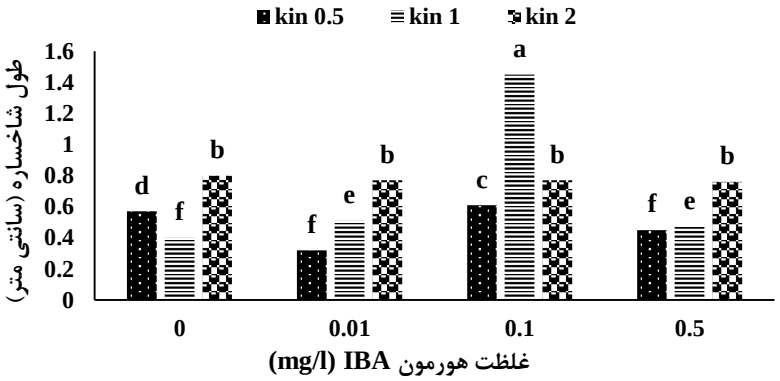


شکل۴- ۲۰ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN ، IBA و انواع ریزنمونه بر تعداد شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

۴-۳-۲- طول شاخساره

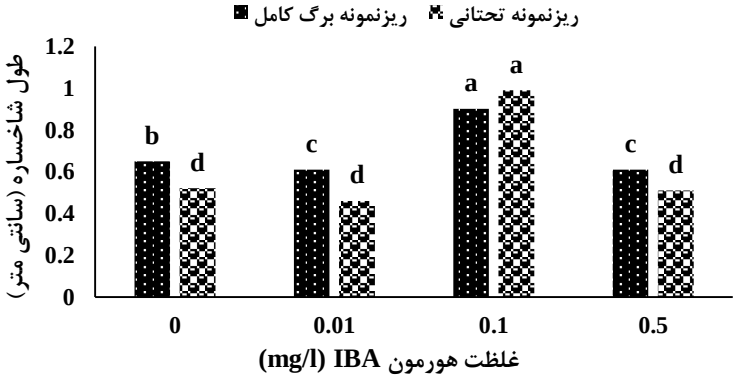
بر اساس نتایج تجزیه واریانس، صفت طول شاخساره به طور معنی‌داری از آثار ساده و متقابل دو جانبه‌ی تیمارهای هورمونی و نوع ریزنمونه تأثیر پذیرفت. این در حالی است که برهمکنش سه جانبه‌ی تیمارها تأثیر معنی‌داری بر این صفت نشان نداد (جدول۴-۲). در بررسی نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل دو جانبه‌ی سطوح مختلف هورمونی IBA و KIN مشخص گردید که طویل‌ترین شاخساره‌ها (۱/۴۵ سانتی‌متر) در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN تولید شد.

در حالی‌که کمترین طول شاخساره در عدم مصرف و کاربرد سطوح ۰/۰۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به ترتیب همراه سطوح ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN مشاهده شد (شکل۴-۲۱).



شکل۴- ۲۱ مقایسه میانگین طول شاخساره‌ی باززا شده تحت تیمارهای KIN و IBA در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

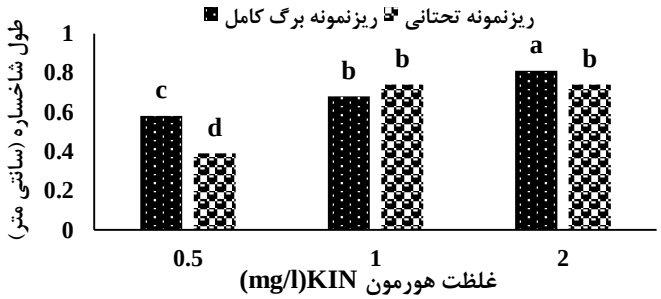
مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه‌های کشت شده با هورمون اکسین IBA نشان داد که هر دو ریزنمونه‌ی برگ کامل و تحتانی به طور مشترک در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، طویل‌ترین شاخساره‌ها (به ترتیب ۰/۹۹ و ۰/۹ سانتی‌متر) را تولید نمودند (شکل ۴-۲۲).



شکل۴-۲۲ مقایسه میانگین طول شاخساره‌ی باززا شده در تیمار هورمونی IBA با استفاده از انواع ریزنمونه برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

این نتایج با یافته‌های آزمایش قبل مبنی بر تأثیر معنی‌دار کاربرد سطح ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA بر افزایش معنی‌دار طول شاخساره‌های تولید شده توسط ریزنمونه‌ی تحتانی برگ نسبت به سایر

سطوح مصرف و عدم مصرف هورمون IBA، مطابقت داشت. ماک هرجی و روچودهوری (۲۰۰۸) از طوقه گیاه آلوئه ورا ، به عنوان ریزنمونه استفاده کردند و گزارش نمودند که بیشترین طول شاخساره (۲/۳۳ سانتی‌متر) در محیط کشت MS همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیترKIN حاصل گردید. نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل دو جانبه‌ی هورمون KIN با نوع ریزنمونه‌های کشت شده در این آزمایش نشان داد که بیشترین طول شاخساره (۰/۸۱ سانتی‌متر) توسط ریزنمونه‌ی برگ کامل با کاربرد ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN تولید شد، در حالی‌که کمترین طول شاخساره توسط ریزنمونه تحتانی برگ با اعمال کمترین سطح (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) هورمون KIN تولید گردید (شکل ۴-۲۳). در مجموع به نظر می‌رسد با افزایش غلظت هورمون KIN بر طول شاخساره‌ی گیاه هاورتیا افزوده شده است. همچنین با توجه به اینکه در هر دو ریزنمونه‌ی برگ کامل و قسمت تحتانی، غلظت‌های بالای هورمون KIN شاخساره‌های طویل‌تری را سبب شده است، می‌توان استنباط کرد که احتمالاً غلظت داخلی این هورمون‌ها در این ریزنمونه‌ها پایین بوده است.

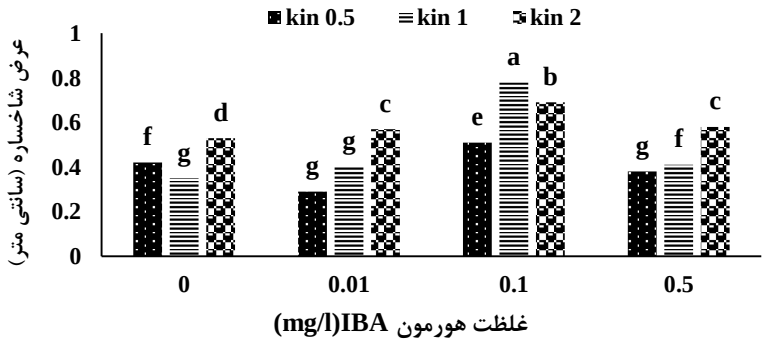


شکل۴- ۲۳ مقایسه میانگین طول شاخساره‌ی باززا شده در تیمار هورمونی KIN با استفاده از انواع ریزنمونه برگی

۴-۳-۳- عرض شاخساره

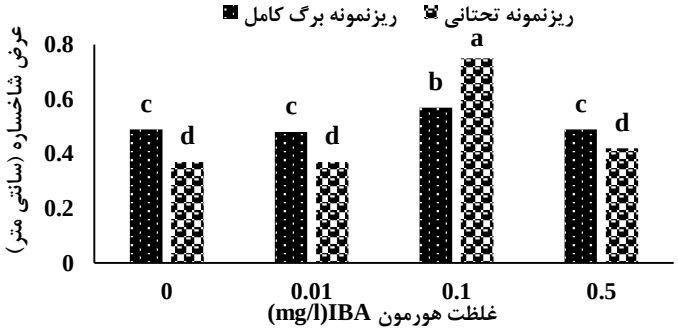
جدول نتایج تجزیه واریانس صفت عرض شاخساره نشان داد که آثار اصلی و متقابل هر یک از دو تیمار هورمونی IBA و KIN و نیز اثر متقابل هورمون IBA با نوع ریزنمونه در سطح یک درصد معنی‌دار بودند (جدول ۴-۲). مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون‌های IBA و KIN نشان داد که بیشترین عرض

شاخساره (۰/۸۷ سانتی‌متر) در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN به دست آمد (شکل ۴-۲۴). این نتیجه با نتایج به دست آمده برای صفت طول شاخساره مشابه بود. پس به نظر می‌رسد که طول و عرض شاخساره‌هایی باززا شده‌ی رقم هاورتیای مورد بررسی با استفاده از این ترکیب هورمونی نسبت به سایر سطوح به بالاترین میزان خود رسیده است. تعادل بین تنظیم کننده‌های رشدی اکسین و سیتوکنین یک فاکتور مورفولوژیکی مهم به شمار می‌آید (عباسی و همکاران، ۲۰۰۷). راجرز (۱۹۹۳) گزارش نمود که تناسب طول و عرض شاخساره در شکل ظاهری گیاه هاورتیا بسیار اهمیت دارد.



شکل۴- ۲۴ مقایسه میانگین عرض شاخساره‌ی باززا شده در ترکیب تیماری IBA با KIN در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا.

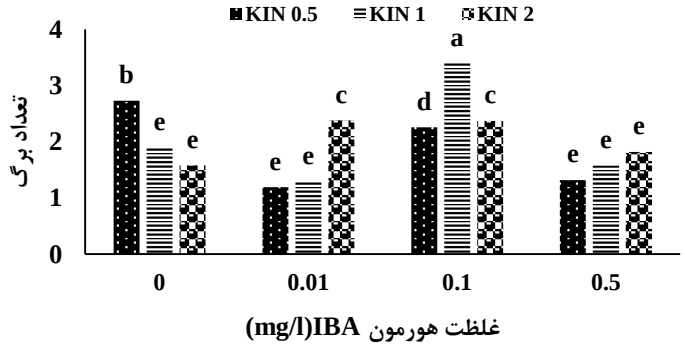
نتایج مقایسه میانگین‌های اثر هورمون IBA با نوع ریزنمونه‌های برگی استفاده شده نشان داد که ریزنمونه‌ی تحتانی برگ تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، نه تنها روند معنی‌داری متفاوتی را نسبت به ریزنمونه‌ی برگ کامل در مقایسه با سایر سطوح ترکیبات تیماری ایجاد نمود، بلکه با تولید عریض‌ترین شاخساره (۰/۷۵ سانتی‌متر) رکورددار این صفت در بین سایر سطوح بود. بنابراین در تطابق با یافته‌های به دست آمده از صفت طول شاخساره به نظر می‌رسد که ریزنمونه‌ی تحتانی برگ با تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA قادر است طویل‌ترین طول و عرض شاخساره را تولید نماید. شایان ذکر است که این یافته با نتایج آزمایش اول نیز مطابقت دارد (شکل ۴-۲۵).



شکل۴- ۲۵ مقایسه میانگین عرض شاخساره‌های باززا شده در تیمار هورمونی IBA با استفاده از انواع ریزنمونه برگی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

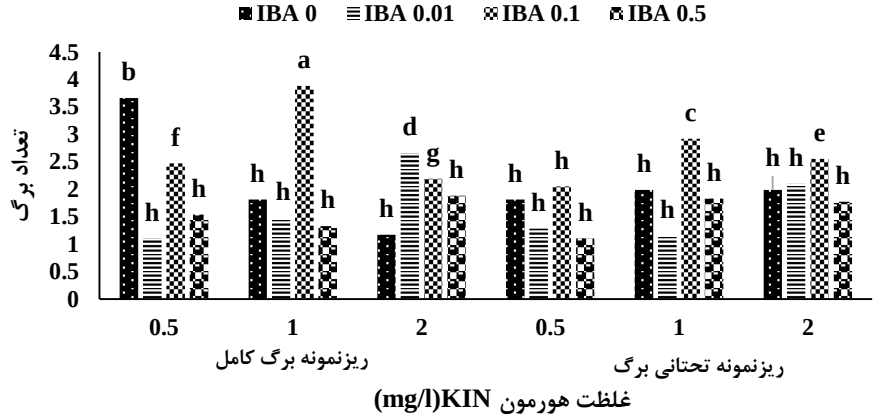
۴-۳-۴- تعداد برگ

صفت تعداد برگ به طور معنی‌داری تحت تأثیر اثر ساده‌ی هورمون IBA و اثر متقابل دو جانبه‌ی هورمون‌های KIN ، IBA و نیز آثار سه جانبه‌ی هر سه تیمار (هورمون‌های KIN و IBA و نوع ریزنمونه) قرار گرفت (جدول ۴-۲). بر این اساس، مقایسه میانگین تعداد برگ‌های تولید شده تحت تیمارهای هورمونی IBA و KIN نشان داد که بیشترین تعداد برگ (۳/۴ عدد) با کاربرد ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN تولید شد (شکل۴-۲۶).



شکل۴- ۲۶ مقایسه میانگین تعداد برگ‌های شاخساره‌ی باززا شده تحت تیمارهای هورمونی KIN و IBA در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا.

در بررسی نتایج مقایسه‌ی میانگین‌های حاصل از اثر متقابل سه جانبه‌ی تیمارهای مورد بررسی این صفت مشخص گردید که ریزنمونه‌ی برگ کامل تحت تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، مناسب‌ترین شرایط را جهت تولید تعداد برگ بیشتر (۳/۸۸ عدد) دارا بود (شکل ۴-۲۷). همچنین با توجه به نتایج، ریزنمونه‌ی تحتانی برگ هم با دریافت ترکیبات هورمونی مشابه نسبت به سایر ترکیبات هورمونی اعمال شده روی این ریزنمونه بالاترین تعداد برگ را تولید نمود. به طور کلی، انتخاب یک ریزنمونه در مرحله‌ی رشدی مطلوب نقش اساسی در موفقیت آمیز بودن کشت بافت در شرایط این ویترو بازی می‌کند (خوشخوی، ۱۳۸۷).

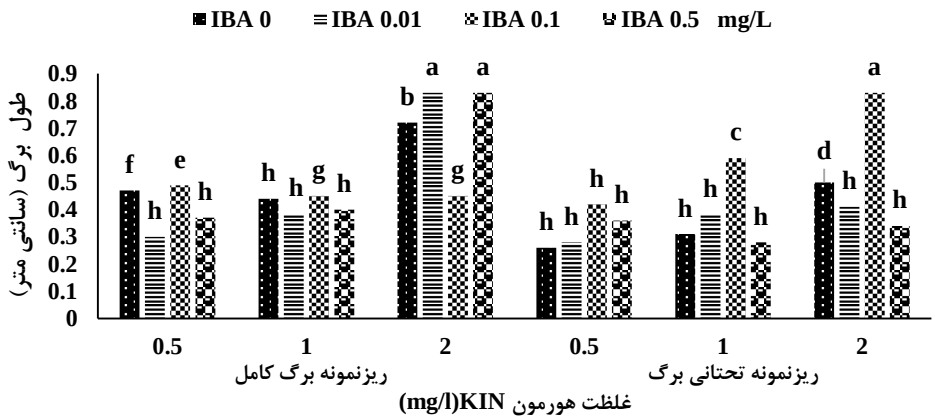


شکل ۴- ۲۷ مقایسه میانگین تعداد برگ تولید شده توسط شاخساره‌های باززاشده‌ی گیاه هاورتیا تحت تأثیر برهمکنش ترکیبات هورمونی KIN و IBA و نوع ریزنمونه در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

۴-۳-۵- طول برگ

نتایج تجزیه‌ی واریانس صفت طول برگ نشان داد که نه تنها آثار ساده‌ی هر یک از تیمارهای هورمونی و نوع ریزنمونه برای این صفت معنی‌دار بود، بلکه این صفت به طور معنی‌داری تحت تأثیر برهمکنش سه جانبه‌ی این تیمارها نیز قرار گرفت (جدول ۴-۲). مقایسه میانگین برهمکنش سه جانبه‌ی ترکیبات تیماری و نوع ریزنمونه‌ی برگی نشان داد که ریزنمونه‌ی برگ کامل موفق به تولید طویل‌ترین برگ‌ها با متوسط اندازه‌ی ۰/۸۳ سانتی‌متر تحت تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN به همراه ۰/۰۱ و ۰/۵

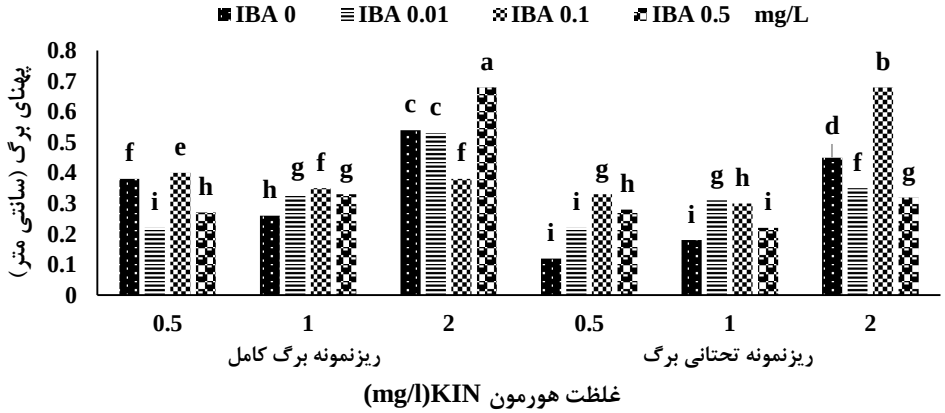
میلی‌گرم در لیتر IBA گردید. این در حالی است که ریزنمونه‌ی تحتانی برگ تحت تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA نیز توانست در گروه برتر آماری از نظر تولید برگ‌های طویل‌تر باشد (شکل ۴-۲۸).



شکل ۴- ۲۸ مقایسه میانگین ترکیبات سه جانبه‌ی تیمارهای هورمونی KIN ، IBA و ریزنمونه‌های برگی مختلف بر طول برگ شاخساره‌های تولید شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

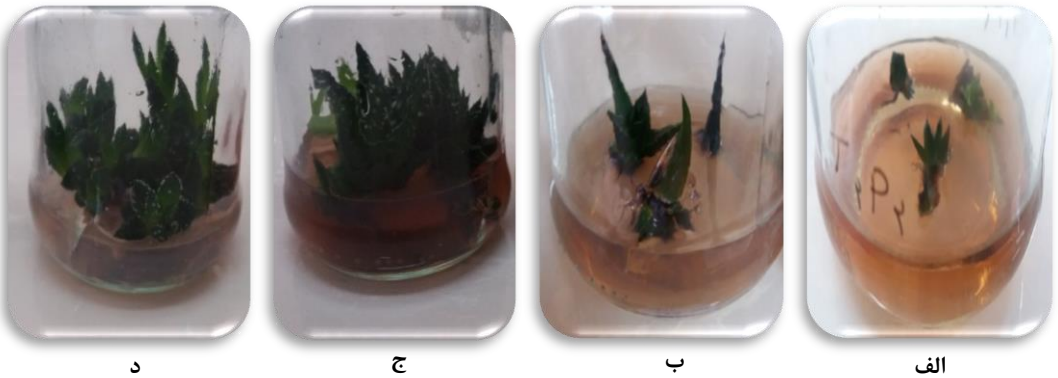
۴-۳-۶- پهنای برگ

صفت پهنای برگ نیز روند معنی‌دار مشابهی را با صفت طول برگ تحت تیمارهای مورد بررسی نشان داد (جدول ۴-۲). با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل سه جانبه‌ی تیمارهای هورمونی و نوع ریزنمونه، نتایج مقایسه میانگین مبین تولید عریض‌ترین برگ‌ها از شاخساره‌های باززاشده (۰/۶۸ سانتی‌متر) با استفاده از ریزنمونه برگ کامل تیمار شده با بالاترین سطوح هورمونی (۲ میلی‌گرم در لیتر KIN به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA) بود. ریزنمونه‌ی تحتانی برگ نیز در بالاترین سطح هورمون KIN (۲میلی‌گرم در لیتر) به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA در رتبه‌ی دوم تولید برگ‌های عریض (۰/۶۶ سانتی‌متر) در گونه‌ی هاورتیا مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴-۲۹). شواهد نشان می‌دهد که افزایش غلظت‌های به کار رفته‌ی تنظیم کننده‌های رشد موجب افزایش باززایی می‌شود به گونه‌ای که میزان پرآوری با کاربرد تنظیم کننده‌های رشد نسبت مستقیم داشت.



شکل ۴- ۲۹ مقایسه میانگین ترکیبات سه جانبه‌ی تیمارهای هورمونی KIN، IBA و ریزنمونه‌های مختلف برگی بر پهنای برگ شاخساره‌های تولید شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

به طور کلی، فرآیندهای فیزیولوژیکی در گیاهان تحت اثر هورمون‌ها است. سیتوکنین‌ها در بسیاری از مراحل فیزیولوژیکی در گیاهان مؤثرند. افزودن سیتوکنین‌ها موجب ترغیب تقسیم سلولی، تشکیل و پرآوری شاخساره می‌شوند و اضافه نمودن اکسین‌ها طویل شدن سلول را تحریک می‌کنند (جورج، ۱۹۹۳).



شکل۴-۳۰ باززایی شاخساره هاورتیا از ریزنمونه تحتانی و برگ کامل با تیمار هورمونی KIN وIBA یک ماه پس از کشت اولیه، الف: باززایی از ریزنمونه تحتانی ب: باززایی از ریزنمونه برگ کامل ج: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه تحتانی د: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه برگ کامل

۴-۴- آزمایش سوم: بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد BAP و NAA بر باززایی گیاه هاورتیا در محیط درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه های برگی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها برای صفات تعداد، طول و عرض شاخساره نشان داد که اثر ساده هورمون‌های NAA و BAP ، همچنین اثر متقابل آنها در سطح یک درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون NAA برای صفات تعداد و عرض شاخساره در سطح یک درصد نیز معنی‌دار بود(جدول ۴-۳). همچنین، برهمکنش نوع ریزنمونه و هورمون BAP آثار معنی‌داری بر طول شاخساره‌ی گیاهان باززاشده داشت. اثر متقابل سه جانبه‌ی تیمارهای هورمونی و نوع ریزنمونه برای صفت تعداد شاخساره در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴-۳).

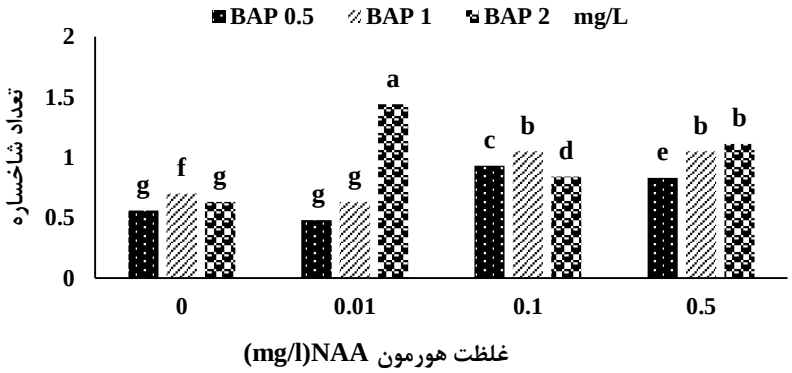
جدول۴- ۳ تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی گیاهان باززاشده‌ی هاورتیا تحت تیمار هورمونی BAP ، NAA و نوع ریزنمونه‌ی برگی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات					
		تعداد شاخساره	طول شاخساره	عرض شاخساره	تعداد برگ	طول برگ	پهنای برگ
BAP	۲	۰/۵۵**	۰/۴۳**	۰/۱۱**	۳/۰۵**	۰/۱۱**	۰/۱۳**
NAA	۳	۰/۴۶**	۰/۱۶**	۰/۰۷**	۲/۳۱**	۰/۰۳**	۰/۰۱*
ریزنمونه	۱	۰/۰۴^{ns}	۰/۰۴*	۰/۰۰۵^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۴^{ns}	۰/۰۱*
NAA×BAP	۶	۰/۴۲**	۰/۲۱**	۰/۳**	۳/۰۱ **	۰/۰۱**	۰/۱**
ریزنمونه × NAA	۳	۰/۱۷**	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۱**	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۹^{ns}	۰/۰۰۴^{ns}
ریزنمونه × BAP	۲	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۵**	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۵ ^{ns}	۰/۰۰۵ ^{ns}	۰/۰۰۴ ^{ns}
ریزنمونه×BAP × NAA	۶	۰/۲۸**	۰/۰۰۷^{ns}	۰/۰۲ ^{ns}	۰/۲۱^{ns}	۰/۰۱**	۰/۰۱ ^{ns}
خطای آزمایش	۴۸	۰/۰۳	۰/۰۰۹	۰/۰۰۳	۰/۱۳	۰/۰۰۴	۰/۰۰۲
درصد CV		۲۲/۴۱	۱۵/۹۵	۲۰/۲۲	۲۱/۷۰	۱۵/۰۰	۱۵/۰۵

*** و ** به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهد.**

۴-۴-۱- تعداد شاخساره

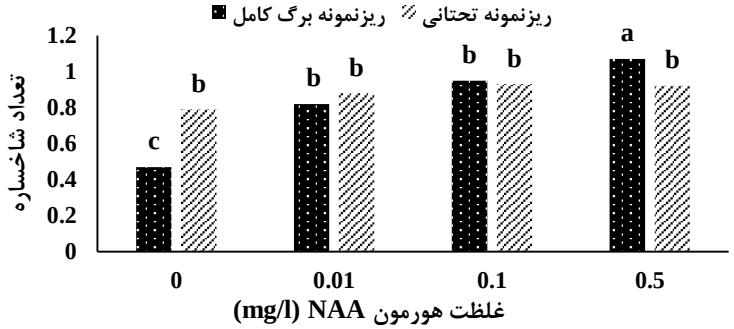
بر اساس نتایج مقایسه میانگین، تیمار هورمونی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین تعداد شاخساره (۱/۴۴ عدد) را تولید نمود (شکل ۴-۳۱). در حالی‌که تیمار ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و نیز تیمارهای ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به تنهایی، مشترکاً از کمترین تعداد شاخساره برخوردار بودند (شکل۴-۳۱).



شکل۴- ۳۱ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP و NAA بر تعداد شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

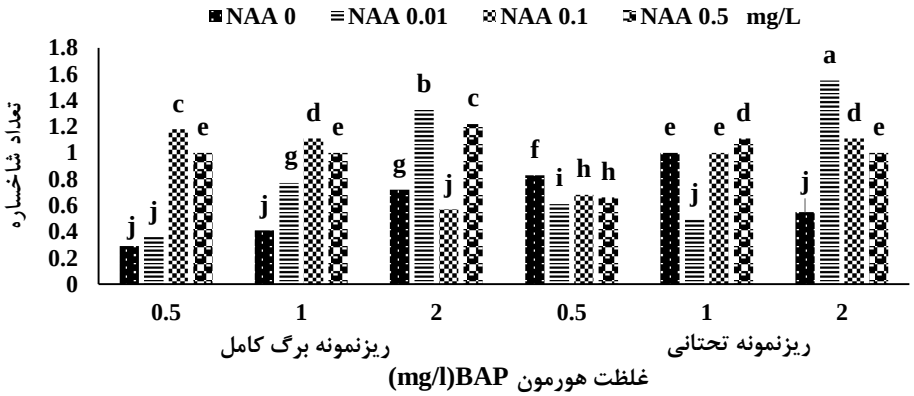
در پژوهش کیم و همکاران (۲۰۱۹) بیشترین تعداد شاخساره‌ی گیاه هاورتیا رقم truncatae (۶۶/۳ عدد) با کاربرد ریزنمونه برگ در تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد. تحقیقات باکشا و همکاران (۲۰۰۵) و بیسواس و همکاران (۲۰۱۳)، کاربرد ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA را مناسب‌ترین محیط برای باززایی شاخساره‌های گیاه آلوئه ورا نشان داد. الیاس و همکاران (۲۰۱۴) نیز در کاکتوس اچینوسرئوس گزارش نمودند که بیشترین تعداد شاخساره (۳/۰۷ عدد در هر ریزنمونه) با کاربرد ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط کشت باززایی این گیاه به دست آمد.

ارزیابی میانگین تعداد شاخساره‌های تولید شده از ریزنمونه‌های مختلف در تیمار هورمونی NAA نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره (۱/۰۷ عدد) در بالاترین سطح اعمال شده‌ی این هورمون (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) با استفاده از ریزنمونه برگ کامل تولید شد (شکل ۴-۳۲). همچنین، در ریزنمونه‌ی برگ کامل، غلظت‌های بالاتر هورمون NAA تعداد شاخساره‌ی باززاشده بیشتری تولید می‌کند، به طوری‌که از غلظت ۰ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر میزان تولید شاخساره روندی صعودی داشته است (شکل ۴-۳۲).



شکل۴- ۳۲ مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار هورمونی NAA و نوع ریزنمونه بر تعداد شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

در مجموع، نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه‌ی هر سه تیمار مورد بررسی نشان داد که کاربرد ترکیب هورمونی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، روند تولید شاخساره را در ریزنمونه‌ی تحتانی، به بالاترین سطح (۱/۵۵ عدد) در این آزمایش رساند. ترکیب هورمونی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP با استفاده از ریزنمونه‌ی برگ کامل نیز در درجه بعدی قرار گرفت (۴-۳۳). به نظر می‌رسد نسبت بالای سیتوکنین به اکسین عامل اصلی تقسیم سلولی، تشکیل و پرآوری شاخساره ها باشد. هاشم آبادی و کاویانی (۲۰۰۸) گزارش کردند که محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین تعداد شاخساره گیاه الوئه ورا را تولید می‌نماید.



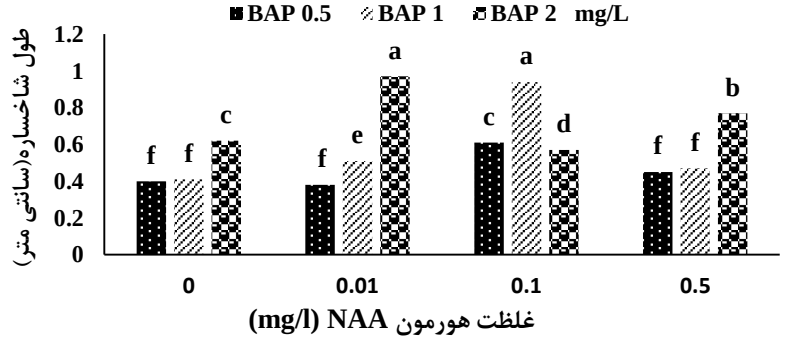
شکل ۴- ۳۳ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP، NAA و نوع ریزنمونه بر تعداد شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

همچنین لیا و همکاران (۲۰۰۴) نیز گزارش نمودند که بهترین محیط کشت برای ریزازدیادی گیاه آلوئه ورا محیط MS با کاربرد ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. زاکیا (۲۰۱۳) نیزگزارش نمود که در گیاه آلوئه‌ورا با کاربرد ریزنمونه‌ی برگ، بیشترین تعداد شاخساره (۱۱/۱۸عدد) با حداکثر طول شاخساره (۱۲/۱۵ سانتی‌متر) در ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد. همچنین نایاناکانتا و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند که بیشترین تعداد شاخساره‌ی آلوئه ورا در محیط حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به مدت ۴ هفته پس از کشت حاصل گردید. در پژوهش چن و همکاران (۲۰۱۹) نیز بیشترین تولید شاخساره (۸۱/۰۱ درصد) با کاربرد ریزنمونه‌ی برگ گیاه هاورتیا در محیط کشت حاوی ۱ میلی-گرم در لیتر BA و ۰/۰۴ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد.

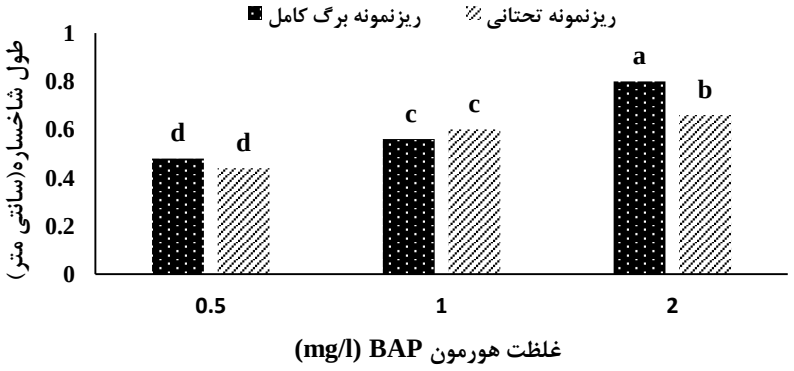
۴-۴-۲- طول شاخساره

نتایج مقایسه میانگین طول شاخساره‌های رشدیافته تحت تیمارهای هورمونی NAA و BAP نشان داد که بیشترین میانگین طول شاخساره (۰/۹۷ سانتی‌متر) و (۰/۹۴ سانتی‌متر) به ترتیب در ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل گردید (شکل۴-۳۴).

در پژوهش خانام و همکاران (۲۰۱۴)، حداکثر طول شاخساره (۲/۵ سانتی‌متر) در گیاه آلوئه ورا با کاربرد ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. با توجه به معنی‌دار بودن میانگین طول شاخساره‌های تولید شده از ریزنمونه‌های مختلف تحت تیمار هورمونی BAP، نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میانگین طول شاخساره (۰/۸ سانتی‌متر) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP با کاربرد ریزنمونه‌ی برگ کامل به دست آمد (شکل ۴-۳۵). همچنین این شکل نشان می‌دهد که با افزایش غلظت هورمون BAP برای هر یک از ریزنمونه‌های برگ کامل و قسمت تحتانی برگ روند افزایش طول شاخساره‌های باززاشده مشاهده می‌گردد. دویدی و همکاران (۲۰۱۴) کاربرد ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP را مناسب‌ترین تیمار برای باززایی از شاخساره گیاه آلوئه‌ورا گزارش نمودند.



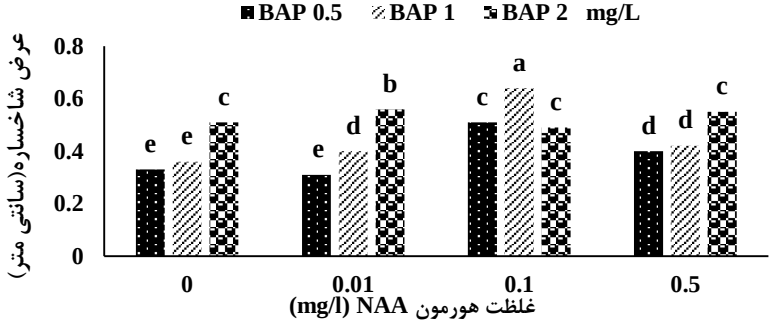
شکل۴- ۳۴ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP، NAA بر طول شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا



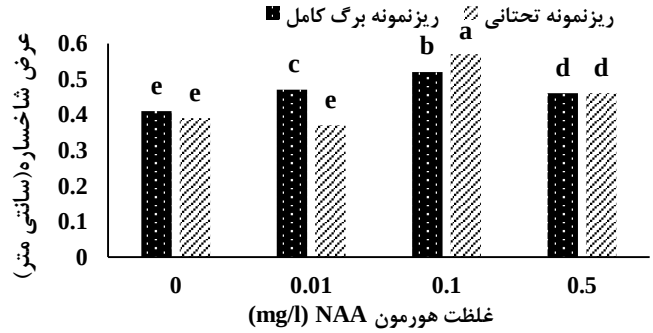
شکل ۴- ۳۵ مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون BAP بر طول شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

۴-۴-۳- عرض شاخساره

بیشترین میانگین عرض شاخساره در تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP (۰/۶۴ سانتی‌متر) حاصل گردید، همچنین کمترین عرض شاخساره نیز با ۰/۳۱ سانتی‌متر در محیط کشت حاوی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه کمترین غلظت هورمون BAP (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) تولید شد (شکل ۴-۳۶). این نتیجه، با اعمال تیمارهای ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به تنهایی نیز مشاهده شد. به طوری‌که در تیمارهای مذکور نیز شاخساره‌های تولید شده از کمترین میزان عرض شاخساره برخوردار بودند. مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون NAA بر صفت عرض شاخساره حاکی از آن بود که ریزنمونه‌ی تحتانی برگ با دریافت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA عریض‌ترین شاخساره‌ها (۰/۵۷ سانتی‌متر) را تولید نمود (شکل ۴-۳۷).



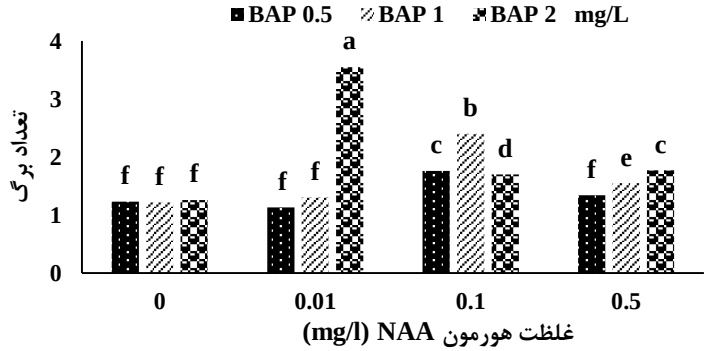
شکل ۴- ۳۶ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP و NAA بر عرض شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا



شکل ۴- ۳۷ مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون NAA بر عرض شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

۴-۴-۴- تعداد برگ

بر اساس نتایج تجزیه واریانس آثار ساده‌ی هر یک از دو هورمون BAP ، NAA و نیز برهمکنش آنها بر تعداد برگ‌های تولید شده در شاخساره‌های باززاشده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴-۳). نتایج مقایسه میانگین ترکیبات دو هورمون نشان داد که تیمار هورمونی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بالاترین میانگین تعداد برگ (۳/۵۵ عدد) را تولید نمود (شکل ۴-۳۸). در پژوهش چمنی و همکاران (۱۳۹۶) در گیاه لاله، تنها در ترکیب ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین تعداد برگ (۱۷ عدد) و نیز بالاترین میانگین طول برگ (۴ سانتی‌متر) مشاهده شد.

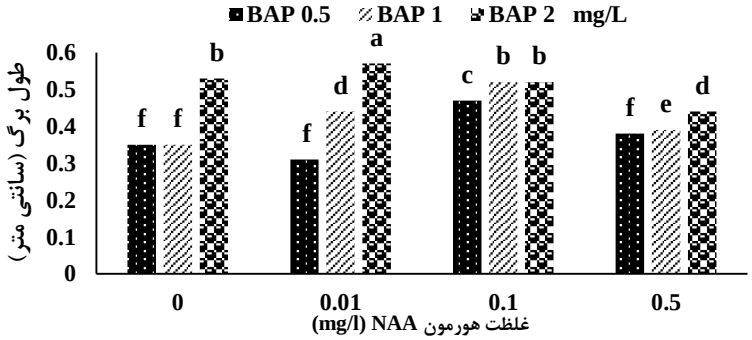


شکل۴- ۳۸ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP و NAA بر تعداد برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

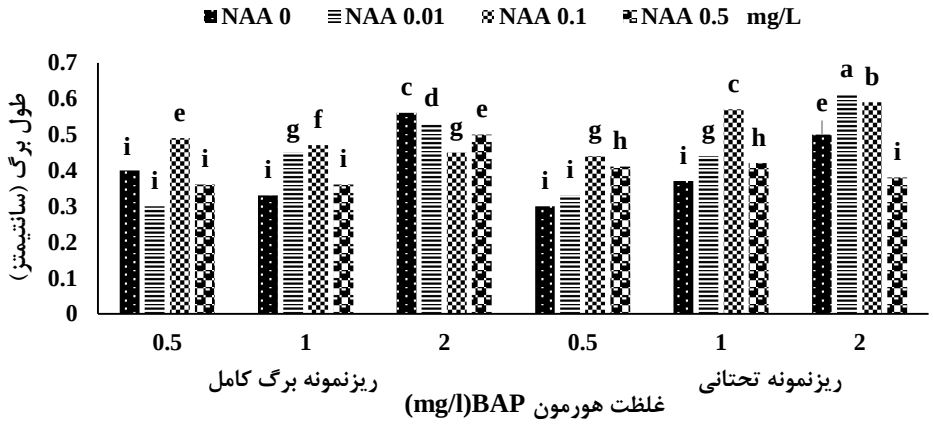
۴-۴-۵- طول برگ

با توجه به معنی دار بودن اثر متقابل هورمون‌های BAP، NAA و برهمکنش ۳ جانبه‌ی هورمون‌ها با نوع ریزنمونه برای صفت طول برگ‌های باززاشده در سطح یک درصد (جدول ۴-۳)، نتایج مقایسه میانگین این صفت نشان داد که طویل‌ترین برگ‌ها (۰/۵۷ سانتی‌متر) در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل گردید (شکل ۴-۳۹). بر اساس نتایج مقایسه میانگین برهمکنش ۳ جانبه‌ی تیمارهای هورمونی و نوع ریزنمونه، کاربرد ترکیب هورمونی ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین طول برگ را از ریزنمونه‌ی تحتانی برگ (۰/۶۱

سانتی‌متر) تولید نمود (شکل ۴-۴۰). در مقایسه‌ی نتایج به دست آمده برای تعداد و طول برگ، مشاهده شد که ترکیب تیماری مذکور در تولید بیشترین تعداد برگ (۳/۵۵ عدد) با بالاترین میزان طول برگ (۰/۶۱ سانتی‌متر) در گیاه هاورتیا موفق عمل نموده است.



شکل۴- ۳۹ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP و NAA بر طول برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

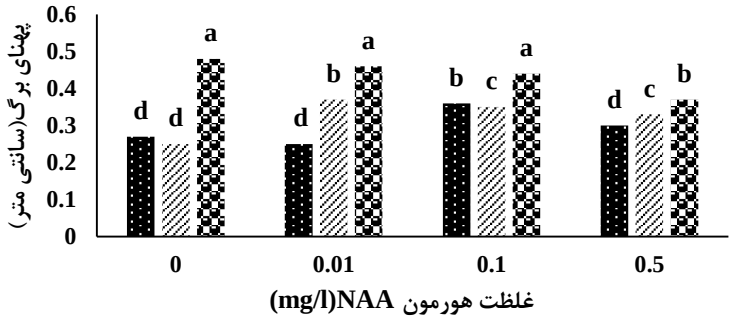


شکل۴- ۴۰ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP ، NAA و نوع ریزنمونه بر طول برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

۴-۴-۶- پهنای برگ

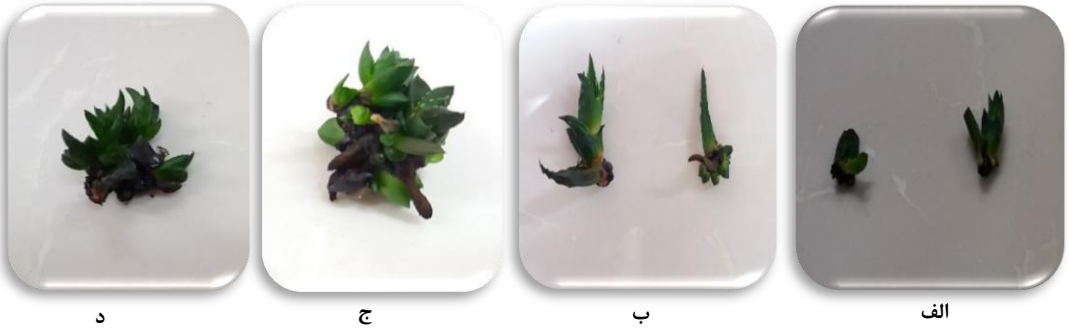
اثر متقابل هورمون‌های NAA و BAP برای پهنای برگ‌های شاخساره‌های باززاشده‌ی گیاه هاورتیا در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود (جدول ۴-۳). مقایسه میانگین داده‌ها برای این صفت نشان داد که بیشترین پهنای برگ (۰/۴۸، ۰/۴۶ و ۰/۴۴ سانتی‌متر) به طور مشترک با کاربرد بالاترین سطح

هورمون BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) به ترتیب همراه با عدم حضور هورمون NAA، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA تولید شد (شکل۴-۴۱).



شکل۴- ۴۱ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP و NAA بر پهنای برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

به طور کلی، هورمون IBA نسبت به هورمون NAA در افزایش طول شاخساره‌های باززایی شده موثرتر بوده که نشان دهنده‌ی تأثیرات متفاوت اکسین‌ها بر ریزنمونه‌ها می‌باشد. همچنین، پاسخ شاخه‌زایی بالا می‌تواند با جذب سیتوکنین خارجی، سوخت و ساز سیتوکنین، انتقال پیام سیتوکنین و تعامل با سایر هورمون‌ها مرتبط باشد. در این راستا، در برخی موارد استفاده از سیتوکنین خارجی سریعاً تولید سیتوکنین درونی را القا می‌کند و تعادلی بین هورمون‌های درونی ایجاد می‌کند(الفار و همکاران، ۲۰۰۹).



شکل ۴-۴۲ باززایی شاخساره هاورتیا از ریزنمونه تحتانی و برگ کامل با تیمار هورمونی BAP و NAA یک ماه پس از کشت اولیه، الف: باززایی از ریزنمونه تحتانی ب: باززایی از ریزنمونه برگ کامل ج: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه تحتانی د: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه برگ کامل

۴-۵- آزمایش چهارم: بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد KIN و NAA بر باززایی از گیاه هاورتیا در محیط درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های برگی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها برای صفات تعداد، طول و عرض شاخساره گیاه هاورتیا نشان داد که اثر ساده هورمون‌های NAA و KIN و همچنین اثر متقابل آنها در سطح یک درصد معنی دار بود. همچنین اثر متقابل هورمون NAA با نوع ریزنمونه و هورمون KIN با نوع ریزنمونه برای صفت تعداد و طول شاخساره در سطح یک درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل دو جانبه‌ی هورمون KIN با نوع ریزنمونه نیز برای صفت تعداد و طول شاخساره در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد معنی‌دار بود. معنی داری یک درصد برای اثر سه جانبه‌ی هورمون‌ها و نوع ریزنمونه تنها درصفت عرض شاخساره مشاهده شد (جدول ۴-۴).

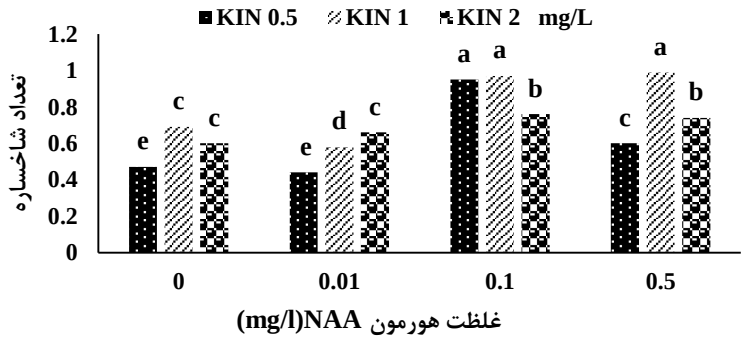
جدول۴- ۴ تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی گیاهان باززاشده‌ی هاورتیا تحت تیمارهای هورمونی KIN ، NAA و نوع ریزنمونه‌ی برگی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات					
		تعداد شاخساره	طول شاخساره	عرض شاخساره	تعداد برگ	طول برگ	پهنای برگ
KIN	۲	۰/۲۲**	۰/۱۲**	۰/۰۹**	۰/۰۷**	۰/۱۲**	۰/۰۹**
NAA	۳	۰/۴۵**	۰/۰۷**	۰/۰۴**	۲/۴۴**	۰/۰۱۵**	۰/۰۰۵^{ns}
ریزنمونه	۱	۰/۰۴*	۰/۰۰۸^{ns}	۰/۰۰۱^{ns}	۰/۵۴**	۰/۰۰۵^{ns}	۰/۰۰۸^{ns}
NAA×KIN	۶	۰/۰۸**	۰/۰۸**	۰/۰۴**	۲/۰۷**	۰/۰۲**	۰/۰۱**
ریزنمونه × NAA	۳	۰/۲۴**	۰/۰۳**	۰/۰۰۲^{ns}	۰/۲۷**	۰/۰۰۹^{ns}	۰/۰۰۲^{ns}
ریزنمونه × KIN	۲	۰/۰۶*	۰/۰۷**	۰/۰۰۳^{ns}	۰/۹۱**	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۰۲^{ns}
ریزنمونه × KIN × NAA	۶	۰/۰۴^{ns}	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۲**	۰/۶۱^{ns}	۰/۰۰۵^{ns}	۰/۰۰۷^{ns}
خطای آزمایش	۴۸	۰/۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۰۲
درصد CV		۱۴/۱۷	۱۱/۸۹	۱۰/۴۶	۱۶/۰۲	۱۶/۰۱	۱۴/۸۵

* و ** به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

۴-۵-۱- تعداد شاخساره

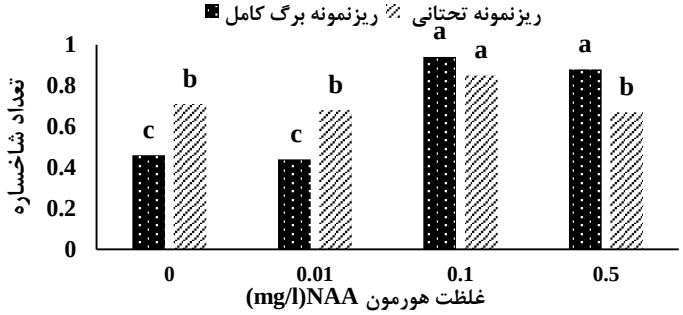
نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل دو هورمون KIN و NAA بر تعداد شاخساره‌ی تولید شده از گیاه هاورتیا در شرایط درون شیشه‌ای نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره (۰/۹۹، ۰/۹۷ و ۰/۹۵ عدد) به ترتیب در تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه کاربرد ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN و در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN تولید گردید، کمترین تعداد شاخساره نیز (۰/۴۴ عدد) در تیمار ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN مشاهده شد که با کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN به تنهایی در کلاس آماری مشابه قرار داشت (شکل۴-۴۳). احمد و همکاران (۲۰۰۷) گزارش نمودند که بهترین محیط باززایی شاخساره‌های گیاه الوئه ورا شامل محیط MS با غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA می‌باشد.



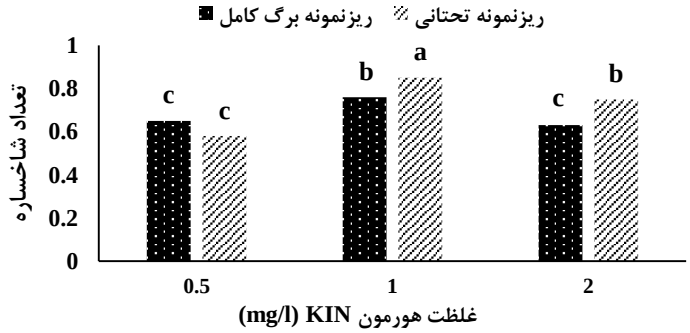
شکل۴- ۴۳ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN و NAA بر تعداد شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

با توجه به معنی‌دار بودن میانگین تعداد شاخساره‌های تولید شده از ریزنمونه‌های مختلف تحت تیمار هورمونی NAA، نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میزان تولید شاخساره (۰/۹۴، ۰/۸۸) در محیط حاوی ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA با استفاده از ریزنمونه‌ی برگ کامل و ۰/۸۵ عدد شاخساره در ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با استفاده از ریزنمونه تحتانی برگ به دست آمد (شکل ۴-۴۴). کیواتی و همکارن (۲۰۱۷) کاربرد تیمار ۱/۳۴ میکرومول NAA را برای ریزازدیادی کاکاتوس

زینتی میکرانتوسرئوس پیشنهاد نمودند. شکل ۴-۴۵ در ارزیابی برهمکنش اثر نوع ریزنمونه و غلظت هورمون KIN، نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره باززاشده (۰/۸۵ عدد) در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN با کاربرد ریزنمونه تحتانی برگ تولید شد. تنظیم کننده‌ی رشد KIN در تعادل با غلظت‌های مختلف اکسین، ریزنمونه‌ها را در جهت افزایش طول سلول‌ها و در نتیجه افزایش تولید شاخساره پیش برده است. در پژوهش یانگ و همکاران (۲۰۰۷) بیشترین میزان شاخه‌زایی در محیط MS حاوی ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA، ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN و۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با کاربرد ریزنمونه‌ی گل‌آذین گیاه هاورتیا حاصل شد. یافته‌های دانشور و همکاران (۲۰۱۳) در گیاه آلوئه‌ورا نیز نشان داد که محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN و ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بالاترین درصد تعداد شاخساره را تولید نمودند.



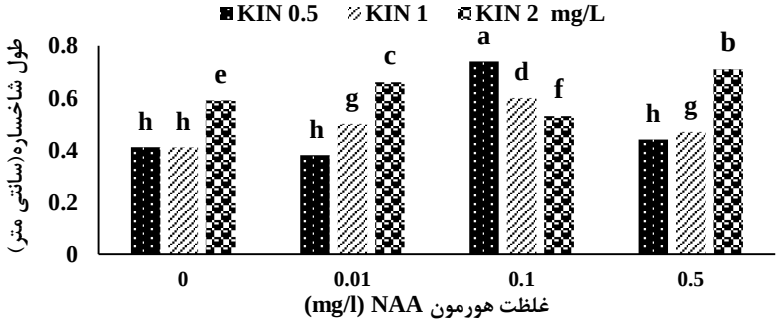
شکل۴- ۴۴ مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون NAA بر تعداد شاخساره باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا



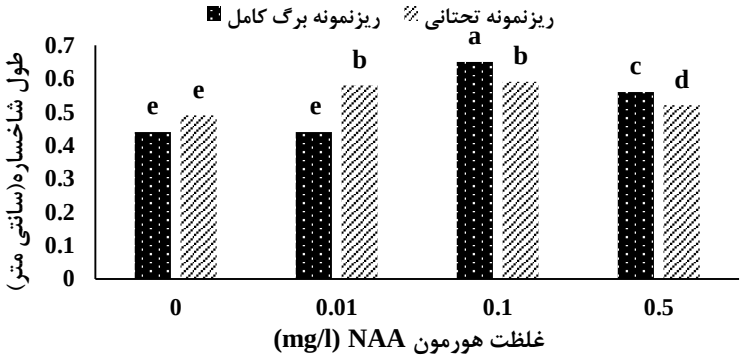
شکل ۴- ۴۵ مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون KIN بر تعداد شاخساره باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

۴-۵-۲- طول شاخساره

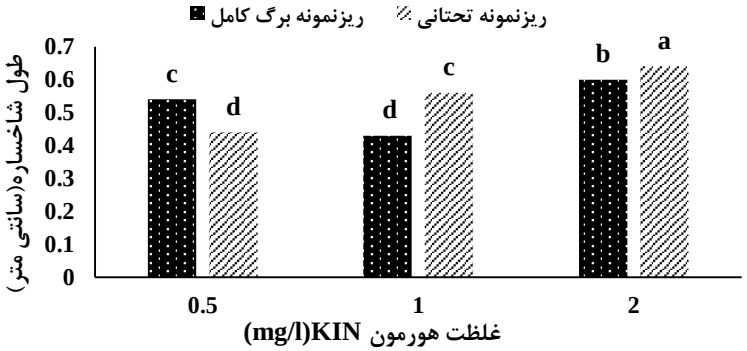
با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل هورمون‌های KIN، NAA و اثر متقابل هر یک از هورمون‌ها با انواع ریزنمونه‌های کشت شده (جدول ۴-۴)، مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین طول شاخساره (۰/۷۴ سانتی‌متر) با کاربرد ترکیب تیماری ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN تولید شد (شکل ۴-۴۶). در بررسی برهمکنش نوع ریزنمونه با سطوح مختلف هورمون NAA نیز مشاهده شد که ریزنمونه‌ی برگ کامل در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA طویل‌ترین شاخساره (۰/۶۵ سانتی‌متر) را تولید نمود (شکل ۴-۴۷). این در حالی است که مقایسه میانگین آثار متقابل غلظت‌های مختلف هورمون KIN با نوع ریزنمونه حاکی از آن بود که ریزنمونه‌ی تحتانی برگ در بالاترین سطح هورمون KIN (۲ میلی‌گرم در لیتر) توانست طویل‌ترین شاخساره (۰/۶۴ سانتی‌متر) را تولید نماید. روند رشد طولی شاخساره‌ی هاورتیا تحت تأثیر مصرف هورمون KIN نشان می‌دهدکه با افزایش غلظت هورمون KIN در ریزنمونه تحتانی کشت شده، طول شاخساره گیاه هاورتیا بیشتر شده است (شکل ۴-۴۸). کانوار و همکاران (۲۰۱۵) در پژوهش خود بر باززایی گیاه آلوئه‌ورا در شرایط کشت بافت به این نتیجه دست یافتند که بیشترین تعداد شاخساره (۵/۵ عدد) به ازای هر ریزنمونه با حداکثر طول شاخساره (۳/۳ سانتی‌متر) در محیط کشت حاوی ترکیبات هورمونی ۱/۶ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۲/۲ میلی‌گرم در لیتر BA تولید شد.



شکل۴- ۴۶ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN و NAA بر صفت طول شاخساره باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا



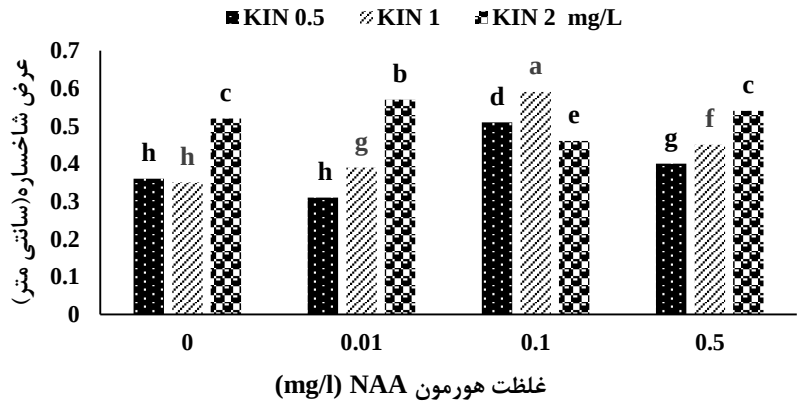
شکل۴- ۴۷ مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون NAA بر طول شاخساره باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا



شکل۴- ۴۸ مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون KIN بر طول شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

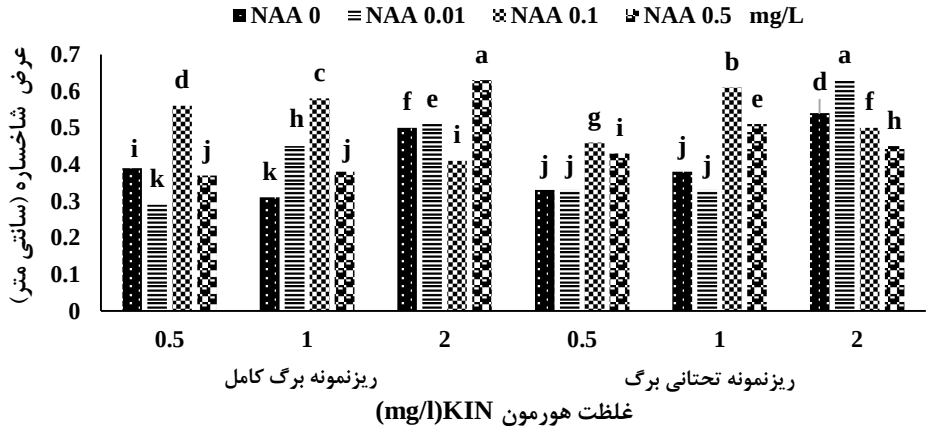
۴-۵-۳- عرض شاخساره

نتایج مقایسه میانگین عرض شاخساره‌های رشد یافته در تیمارهای هورمونی KIN و NAA مشخص نمود که عریض‌ترین شاخساره (۰/۵۹ سانتی‌متر) در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN تولید شد (شکل۴-۴۹).



شکل۴- ۴۹ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN و NAA بر عرض شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

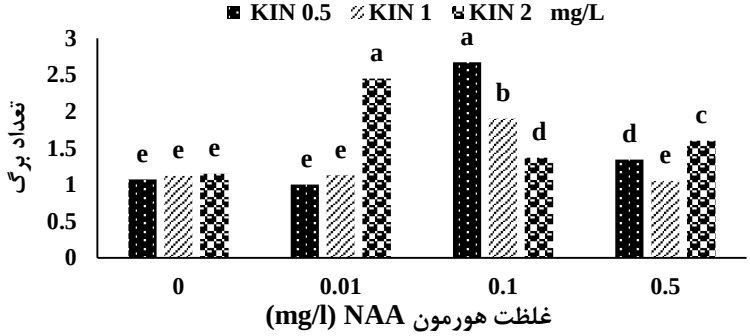
نتایج مقایسه میانگین صفت عرض شاخساره‌ی تولید شده در پی برهمکنش سه‌جانبه‌ی تیمارهای هورمونی و نوع ریزنمونه نشان داد که ریزنمونه‌ی برگ کامل و بخش تحتانی برگ، هر دو در بالاترین سطح هورمون KIN (۲ میلی‌گرم در لیتر) به ترتیب همراه با ۰/۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA، مشترکاً عریض‌ترین شاخساره (۰/۶۳ سانتی‌متر) را تولید نمودند (شکل۴-۵۰).



شکل۴- ۵۰ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN ، NAA و نوع ریزنمونه بر عرض شاخساره باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

۴-۵-۴- تعداد برگ

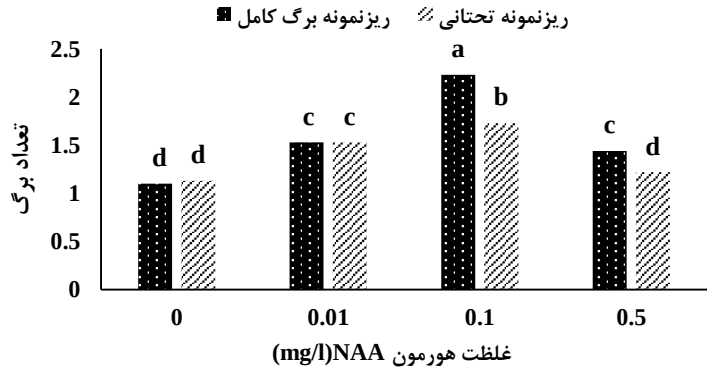
نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴-۴) نشان داد که آثار ساده و مقابل دو جانبه‌ی کلیه‌ی تیمارهای مورد بررسی (هورمون‌های KIN، NAA و نوع ریزنمونه) تأثیر بسیار معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر تعداد برگ تولید شده در شرایط محیط کشت گیاه هاورتیا داشتند. بر اساس مقایسه میانگین تعداد برگ‌های تولید شده تحت برهمکنش دو هورمون KIN و NAA، بیشترین میانگین تعداد برگ (۲/۶۷ و ۲/۴۵ عدد) به ترتیب در ترکیب‌های هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN تولید شد (شکل۴-۵۱).



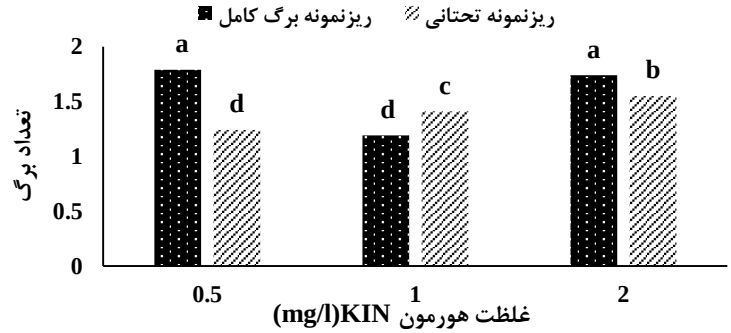
شکل۴- ۵۱ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN باNAA بر تعداد برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززا شده در شرایط کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون NAA با نوع ریزنمونه نشان داد که ریزنمونه‌ی برگ کامل تحت تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، بیشترین تعداد برگ (۲/۲۳ عدد) را تولید نمود (شکل ۴-۵۲). این ریزنمونه، همچنین در بررسی میانگین تعداد برگ‌های تولیدی از شاخساره‌ی باززاشده تحت تیمار هورمونی KIN، بیشترین تعداد برگ را (۱/۷۹ و ۱/۷۴ عدد) مشترکاً در تیمارهای هورمونی ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN تولید نمود (شکل ۴-۵۳). روند افزایش تعداد برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززاشده از ریزنمونه‌ی تحتانی برگ در غلظت‌های مختلف هورمون KIN نشان

داد که با افزایش غلظت این هورمون، تعداد برگ‌های تولید شده از این ریزنمونه نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت. با این حال در رتبه‌ی دوم نسبت به تعداد برگ‌های تولید شده توسط ریزنمونه‌ی برگ کامل قرار داشت (شکل۴-۵۳). فرض شده است که سیتوکنین‌ها با ایجاد یک رابطه‌ی جدید، موجب جابه‌جایی مواد غذایی به محل تیمار با سیتوکنین می‌شوند. بنابراین، وضعیت مواد غذایی گیاه است که موجب تنظیم مقدار سیتوکنین می‌شود که این امر به نوبه‌ی خود، سرعت رشد اندام گیاهی را تعیین می‌کند. در نتیجه مواد غذایی صرف تولید شاخساره‌های جدید می‌شود (لاهوتی و همکاران، ۱۳۸۲).



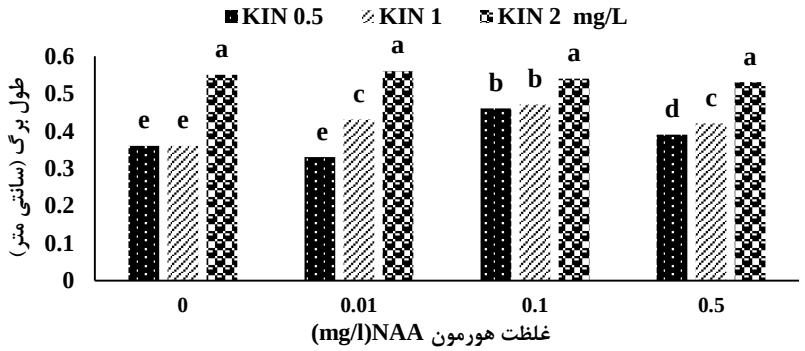
شکل۴- ۵۲ مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون NAA بر تعداد برگ‌های تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا



شکل۴- ۵۳ مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون KIN بر تعداد برگ‌های حاصل از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

۴-۵-۵- طول برگ

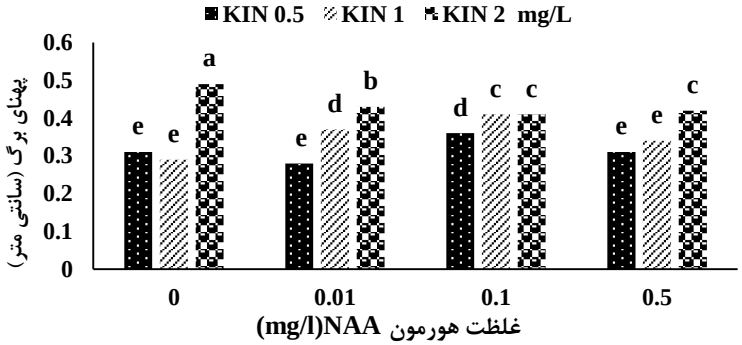
بر اساس نتایج تجزیه واریانس جدول ۴-۵، اثر ساده و نیز اثر متقابل دو جانبه‌ی هورمون‌های KIN و NAA در سطح یک درصد معنی دار بود. مقایسه میانگین برهمکنش این دو هورمون بر رشد طولی برگ نشان داد که طویل‌ترین برگ‌ها به میزان (۰/۵۶، ۰/۵۵، ۰/۵۴ و ۰/۵۳ سانتی‌متر) مشترکاً در بالاترین سطح هورمون KIN (۲ میلی‌گرم در لیتر)، در سطوح مختلف هورمون NAA به ترتیب (۰، ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) تولید شدند (شکل۴-۵۴). بر اساس نتایج به دست آمده در پژوهش چمنی و همکاران (۱۳۹۶)، حضور هورمون NAA در ترکیب با KIN برای باززایی گیاه لاله ضروری بوده و در محیط‌هایی که تنها حاوی هورمون KIN بودند، هیچ گونه باززایی مشاهده نگردید.



شکل ۴- ۵۴ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN و NAA بر طول برگ‌های شاخساره‌ی باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

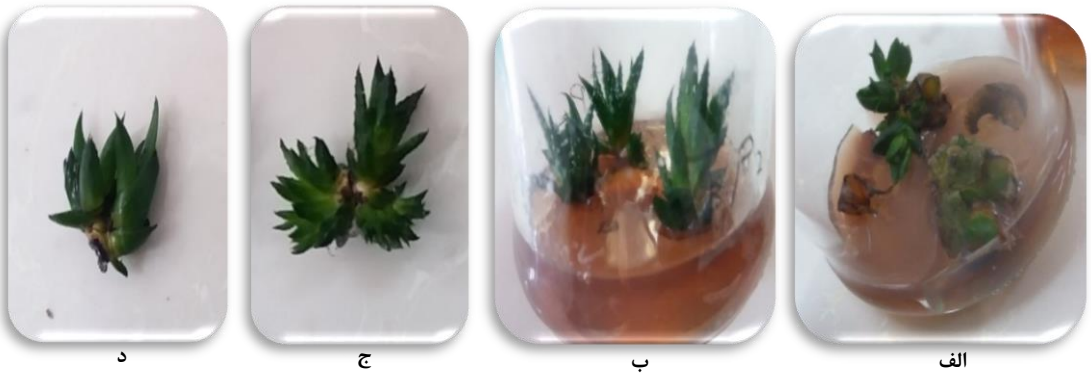
۴-۵-۶- پهنای برگ

صفت پهنای برگ به طور معنی‌داری از برهمکنش دو جانبه‌ی تیمارهای هورمونی KIN و NAA تأثیر پذیرفت(جدول ۴-۴). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که عریض‌ترین برگ‌ها (۰/۴۹ سانتی‌متر) در بالاترین سطح هورمون KIN (۲ میلی‌گرم در لیتر)، بدون حضور هورمون NAA تولید شد(شکل۴-۵۵).



شکل ۴- ۵۵ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی KIN و NAA بر پهنای برگ‌های شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

سیتوکنین‌های BAP و KIN در غلظت‌های بالا باعث تشکیل شاخساره‌های بیشتر می‌شوند (پیک و هان ، ۲۰۰۰). سیتوکنین KIN در مقایسه با BAP بیشتر در افزایش طول شاخساره مؤثر است، که با نتایج این پژوهش نیز مطابقت دارد. مشخص شده است که KIN در مراحل فیزیولوژیکی متعددی در گیاهان تأثیرگذار است. یکی از اثرات عمده‌ی این هورمون، تسریع در تقسیم سلولی است که یکی از بارزترین و مهم‌ترین خصوصیات سیتوکنین‌ها می‌باشد (لوریا و همکاران، ۲۰۰۴).



شکل ۴-۵۶ باززایی شاخساره هاورتیا از ریزنمونه تحتانی و برگ کامل با تیمار هورمونی KIN و NAA یک ماه پس از کشت اولیه، الف: باززایی از ریزنمونه تحتانی ب: باززایی از ریزنمونه برگ کامل ج: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه تحتانی د: دو ماه پس از باززایی از ریزنمونه برگ کامل

۴-۶- آزمایش پنجم: بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد IBA و BAP و اندازه‌ی ریزنمونه‌ی TCL ساقه بر باززایی گیاه هاورتیا

ریزنمونه‌های TCL بعد از ۴ هفته متورم و بزرگ شدند و تولید کالوس نمودند، از کالوس نیز باززایی رخ داد. بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، آثار ساده‌ی تنظیم کننده‌های رشد BAP و IBA برای کلیه‌ی صفات مورد بررسی (درصد کالوس‌زایی، تعداد، طول و عرض شاخساره) معنی‌دار بود. ضخامت TCL بر تعداد شاخساره‌ی تولید شده اثر معنی‌داری داشت(جدول ۴-۵). همچنین کلیه ی صفات مورد بررسی از آثار متقابل سه جانبه‌ی تیمارهای هورمونی BAP و IBA و نیز ضخامت TCL و نیز برهمکنش دو جانبه‌ی BAP و ضخامت TCL تأثیر معنی‌داری پذیرفتند. اثر متقابل دوجانبه‌ی ضخامت TCL و سطوح مختلف هورمون IBA بر کلیه‌ی صفات به جز صفت درصد کالوس‌زایی معنی‌دار بود (جدول ۴-۵).

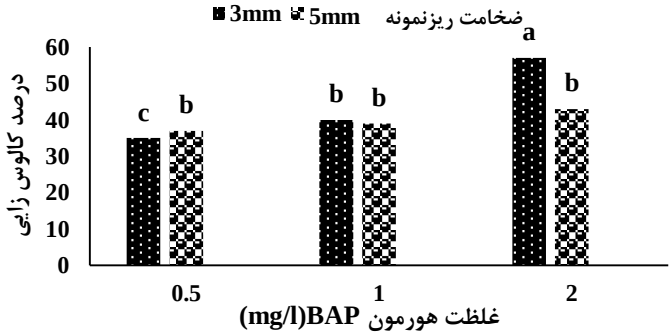
جدول۴- ۵ تجزیه واریانس صفات درصد کالوس، تعداد، طول و عرض شاخساره حاصل از باززایی شاخساره گیاه هاورتیا تحت تیمارهای هورمونی BAP ، IBA و ضخامت ریزنمونه‌ی TCL

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات			
		کالوس‌زایی	تعداد شاخساره	طول شاخساره	عرض شاخساره
BAP	۲	۱۰۰۶ /۰۵*	۰/۷۱**	۰/۵۶**	۰/۱۷**
IBA	۳	۹۲۷/۴۵**	۰/۰۷**	۰/۱۳**	۰/۰۷**
ضخامت TCL	۱	۱۷۱/۱۲ ^{ns}	۰/۱۲**	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۰۲^{ns}
IBA×BAP	۶	۲۱۵/۳۳ ^{ns}	۰/۰۲ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}
ضخامتIBA × TCL	۳	۳۱۱/۷۱ ^{ns}	۰/۵*	۰/۰۸**	۰/۰۴**
ضخامت BAP × TCL	۲	۶۸۱/۱۶*	۰/۲۹**	۰/۰۹**	۰/۰۲*
ضخامتIBA × BAP × TCL	۶	۶۸۰/۳۷**	۰/۰۳*	۰/۰۸**	۰/۰۳**
خطای آزمایش	۴۸	۲۰۳/۷۵	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰۶
درصد CV		۳۳/۰۷	۲۳/۳۹	۱۸/۵۵	۱۷/۰۸

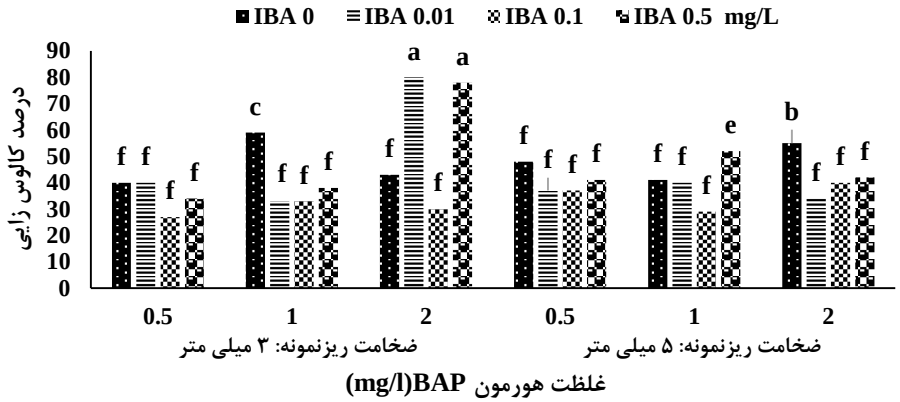
* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

۴-۶-۱- کالوس زایی

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون BAP با ضخامت ریزنمونه‌ی TCL نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی (۵۷ درصد) در بالاترین سطح هورمون BAP با کاربرد ریزنمونه‌ی TCL به ضخامت ۳ میلی‌متر به دست آمد (شکل ۴-۵۷).با توجه به اینکه در ریزنمونه‌ی TCL ، غلظت‌های بالای هورمون BAP کالوس‌زایی بیشتری را سبب شده است می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا غلظت داخلی این هورمون در این ریزنمونه پایین بوده است. برهمکنش سه جانبه‌ی ترکیبات هورمونی BAP، IBA و ضخامت ریزنمونه نشان داد که بالاترین درصد کالوس‌زایی به طور مشترک (۸۰ و ۷۸ درصد) بر روی ریزنمونه‌ی TCL ساقه با ضخامت ۳ میلی‌متر که در شرایط درون شیشه‌ای تولید شده بودند در تیمار هورمونی ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل گردید (شکل ۴-۵۸). در پژوهش لیزومی و آماکی (۲۰۱۱) بالاترین درصد تولید کالوس (۵۷/۱ درصد) با استفاده از ریزنمونه‌ی t-TCL ساقه‌ی گیاه هاورتیا در تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA به دست آمد و باززایی به میزان (۲۸/۶ درصد) نیز از بافت کالوس انجام شد.



شکل ۴- ۵۷ مقایسه میانگین اثر متقابل ضخامت ریزنمونه‌ی TCL ساقه و هورمون BAP بر کالوس‌زایی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا



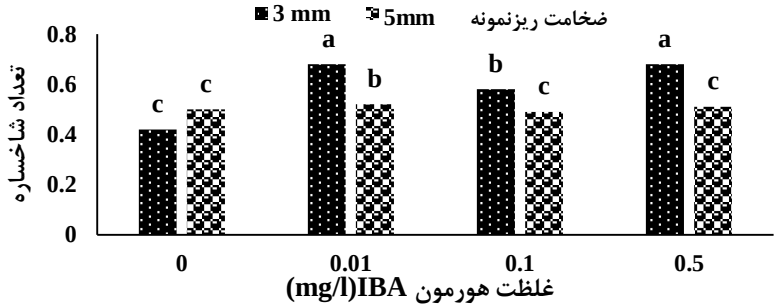
شکل ۴- ۵۸ مقایسه میانگین برهمکنش سه جانبه‌ی ترکیبات هورمونی BAP، IBA و ضخامت ریزنمونه‌ی TCL ساقه بر درصد کالوس‌زایی در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

شکل ۴- ۵۹ القای کالوس از بخشهای برش خورده ریزنمونه ی TCL ساقه و شاخساره های باززاشده از بافت کالوس

۴-۶-۲- تعداد شاخساره:

نتایج مقایسه میانگین برهمکنش ضخامت ریزنمونه‌ی TCL و هورمون IBA بر صفت تعداد شاخساره نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره با متوسط ۰/۶۸ عدد به طور مشترک در تیمار هورمونی ۰/۰۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمونIBA با کاربرد ریزنمونه‌ی TCL ساقه به ضخامت ۳ میلی‌متر تولید شد (شکل۴-۶۰). اندام‌زایی از اندام‌های خاص ممکن است بطور مؤثری از طریق استفاده از روش TCL به همراه شرایط کنترل شده درون شیشه‌ای و کاربرد خارجی تنظیم کننده‌های رشد امکان پذیر باشد(سیلوا، ۲۰۰۳). نات و همکاران (۲۰۰۱a) نشان دادند که در کشت ساقه لیلیوم (*Lilium*

longiflorum) ریزنمونه‌هایی با ضخامت ۱ میلیمتر، قدرت باززایی بالاتری نسبت به سایر ریزنمونه‌ها داشتند.

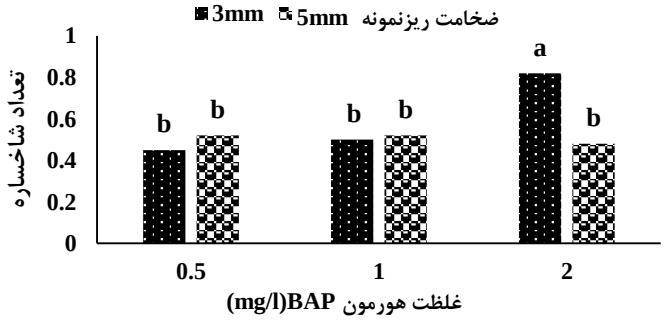


شکل ۴- ۶۰ مقایسه میانگین اثر متقابل ضخامت ریزنمونه‌ی TCL و هورمون IBA بر تعداد شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

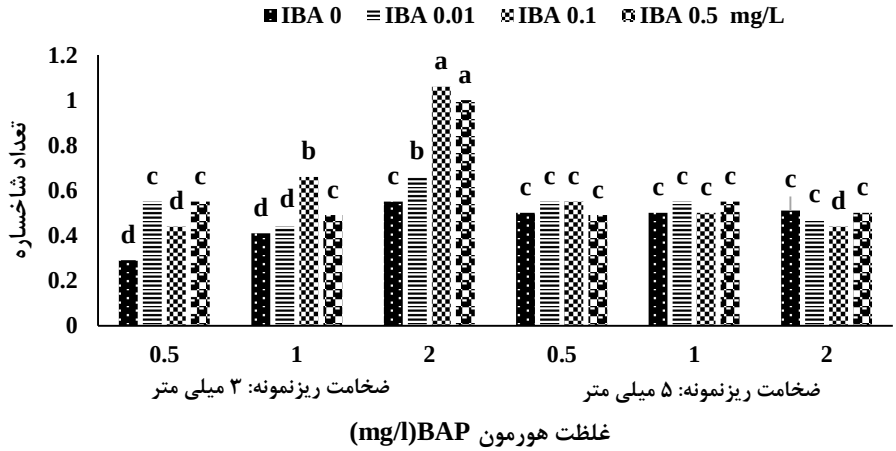
در شکل ۴-۶۱ اثر متقابل هورمون BAP و ضخامت ریزنمونه‌ی TCL ساقه بر باززایی گیاه هاورتیا نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره (۰/۸۲ عدد) در محیط حاوی تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP با ریزنمونه‌ی TCL ساقه به ضخامت ۳ میلی‌متر حاصل گردید. روند باززایی در این شکل نشان داد که افزایش غلظت هورمون BAP در ریزنمونه‌ی TCL ساقه با ضخامت ۳ میلی‌متر، باعث تولید بیشتر شاخساره گردید. در مجموع، مقایسه میانگین برهمکنش سه جانبه‌ی هورمون‌های BAP، IBA وضخامت ریزنمونه‌ی TCL نشان داد که ریزنمونه‌ی TCL با ضخامت ۳ میلی‌متر در مقایسه با ریزنمونه‌ی TCL ساقه با ضخامت ۵ میلی‌متر، تعداد شاخساره بیشتری تولید نمود (شکل ۴-۶۲). همچنین بیشترین تعداد شاخساره با میانگین (۱/۰۶ و ۱ عدد) به ترتیب در تیمارهای هورمونی ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA با بالاترین غلظت هورمون BAP (۲میلی‌گرم در لیتر) به دست آمد (شکل ۴-۶۲).

در مطالعه‌ای که تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی گیاه لیلیوم(*Lilium ledebourii*) با استفاده از روش کشت لایه‌های سلولی نازک عرضی (tTCL) مورد بررسی قرار گرفت، افزودن BA به محیط کشت باعث اندام‌زایی شد به طور متوسط ۴/۴ عدد گیاهچه از هر ریزنمونه تولید شد (میرمعصومی

و همکاران، ۲۰۱۳). تحقیقات انجام شده توسط سایر محققین نیز بیانگر تأثیر زیاد تنظیم کننده‌ی رشد BAP بر درصد باززایی ریزنمونه‌های برگ لیلیوم است (باچتا و همکاران،۲۰۰۳؛ کومار و همکاران، ۲۰۰۷).



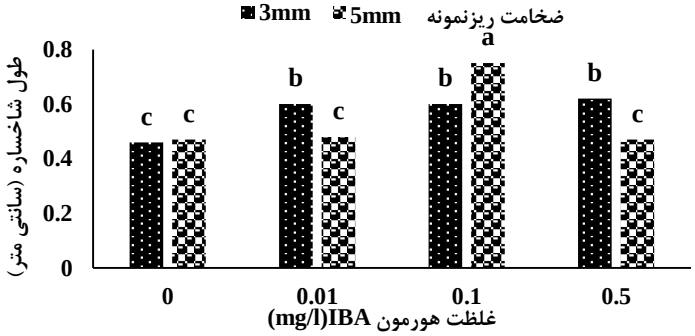
شکل ۴- ۶۱ مقایسه میانگین اثر متقابل ضخامت ریزنمونه‌ی TCL و هورمون BAP بر تعداد شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا



شکل ۴- ۶۲ مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی BAP ، IBA و ضخامت ریزنمونه‌ی TCL بر تعداد شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

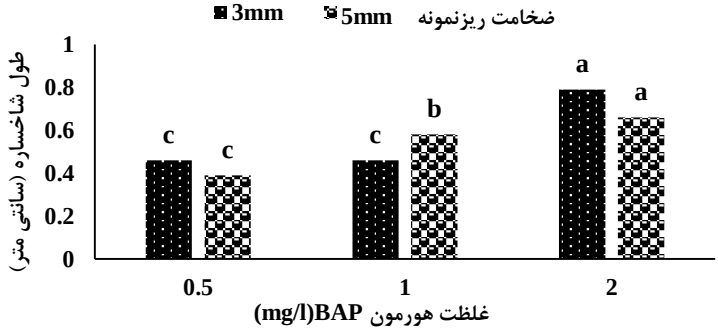
۴-۶-۳- طول شاخساره

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون IBA با ضخامت ریزنمونه‌ی TCLساقه بر طویل شدن شاخساره‌های تولید شده، نشان داد که بیشترین مقدار طول شاخساره (۰/۷۵ سانتی‌متر) در ۰/۱ میلی-گرم در لیتر هورمون IBA با ضخامت ریزنمونه‌ی TCL، ۵ میلی‌متر به دست آمد (شکل ۴-۶۳).



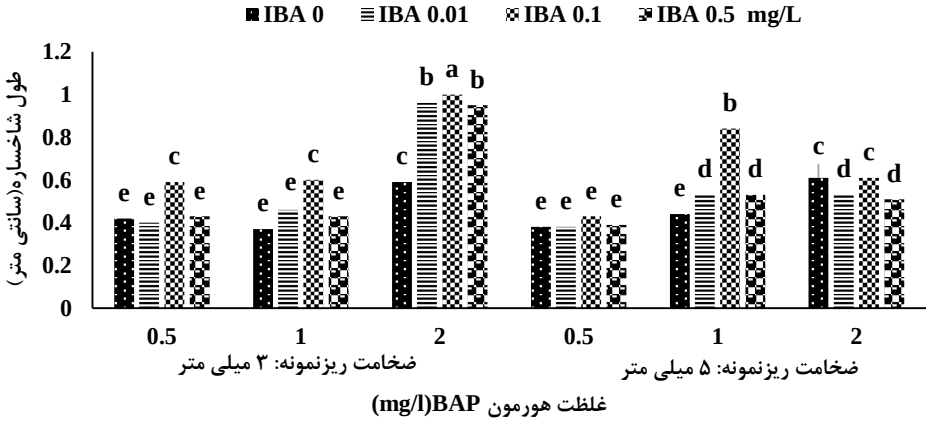
شکل ۴- ۶۳ مقایسه میانگین اثر متقابل ضخامت ریزنمونه‌ی TCL و هورمون IBA بر طول شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون BAP با ضخامت ریزنمونه‌ی TCL ساقه نشان داد که در بالاترین سطح هورمون BAP هر دو نوع ضخامت TCL (۳ و ۵ میلی‌متر) طول شاخساره بیشتری (۰/۷۹ و ۰/۶۶ سانتی‌متر) را تولید نمودند (شکل ۴-۶۴).



شکل ۴- ۶۴ مقایسه میانگین اثر متقابل ضخامت ریزنمونه‌ی TCL و هورمون BAP بر طول شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه ترکیبات تیماری مورد بررسی برطول شاخساره‌ی باززاشده‌ی گیاه هاورتیا نشان داد که طویل‌ترین شاخساره (۱ سانتی‌متر) در تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP با استفاده از ریزنمونه‌ی TCL ساقه با ضخامت ۳ میلی‌متر تولید گردید (شکل۴-۶۵).

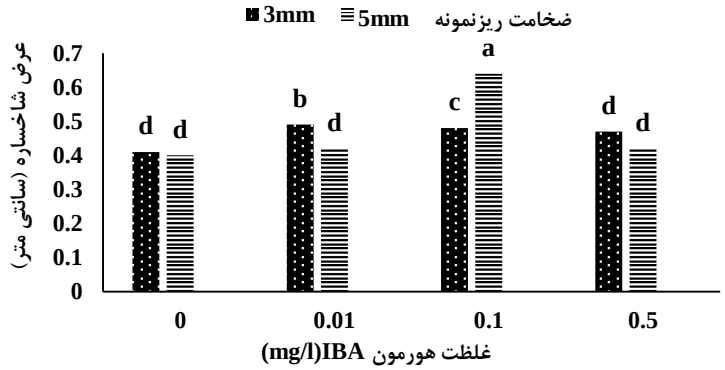


شکل ۴- ۶۵ مقایسه میانگین برهمکنش سه جانبه‌ی ترکیبات هورمونی BAP ، IBA و ضخامت ریزنمونه‌ی TCL بر طول شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

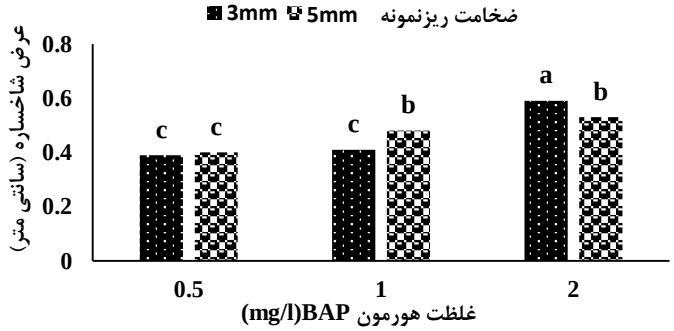
۴-۶-۴- عرض شاخساره:

با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل ضخامت ریزنمونه و هورمون IBA، نتایج مقایسه‌ی میانگین صفت عرض شاخساره بیانگر این واقعیت بود که بیشترین عرض شاخساره (۰/۶۴ سانتی‌متر) در تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با ریزنمونه‌ی TCL ساقه (۵ میلی‌متر) تولید گردید (شکل ۴-۶۶). باززایی این گیاه در تیمار هورمونی IBA نشان می‌دهد که روند تولید شاخساره‌ی عریض‌تر ابتدا سیر صعودی داشته اما از غلظت ۰/۱ میلی‌گرم به بعد این روند سیری نزولی پیدا نموده است. این نتایج نیز نشان می‌دهد که تناسب طول و عرض شاخساره در تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA با ریزنمونه‌ی TCL ساقه به ضخامت ۵ میلی‌متر، به دست آمده است،که در بازارپسندی محصول حائز اهمیت می‌باشد.

اثر متقابل هورمونBAP با ضخامت ریزنمونه‌ی TCL ساقه نشان داد که عریض‌ترین شاخساره (۰/۵۹ سانتی‌متر) با استفاده از ریزنمونه‌ی TCL ساقه با ضخامت ۳ میلی‌متر در بالاترین سطح هورمون BAP تولید شد (شکل۴-۶۷).



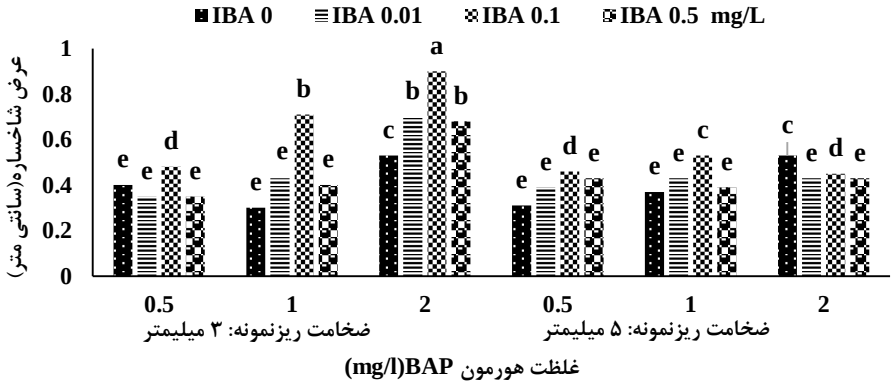
شکل ۴- ۶۶ مقایسه میانگین اثر متقابل ضخامت ریزنمونه‌ی TCL و هورمون IBA بر عرض شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا



شکل ۴- ۶۷ مقایسه میانگین اثر متقابل ضخامت ریزنمونه‌ی TCL و هورمون BAP بر عرض شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

بر اساس نتایج مقایسه میانگین برهمکنش ۳ جانبه‌ی تیمارهای هورمونی و ضخامت ریزنمونه‌ی TCLساقه، کاربرد ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین عرض شاخساره (۰/۹ سانتی‌متر) را از ریزنمونه‌ی TCL ساقه با ضخامت ۳ میلی‌متر تولید نمود (شکل ۴-۶۸). در بررسی نتایج حاصل از سه صفت تعداد، طول و عرض شاخساره، در مجموع می‌توان نتیجه

گرفت که بیشترین میانگین تعداد شاخساره (۱/۰۶ عدد) و نیز بالاترین میزان میانگین طول و عرض شاخساره (۱ و ۰/۹ سانتی‌متر) در تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP با کاربرد ریزنمونه‌ی TCL ساقه با ضخامت ۳ میلی‌متر، تولید شده است.



شکل ۴- ۶۸ مقایسه میانگین برهمکنش سه جانبه‌ی ترکیبات هورمونی BAP، IBA و ضخامت ریزنمونه‌ی TCL بر عرض شاخساره‌های باززا شده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

به طور کلی، برای القای باززایی مجموع سطوح تنظیم کننده‌های رشد درونی گیاه و همچنین تنظیم کننده‌های رشد خارجی دخالت دارند. هیچ واکنش گیاه را نمی‌توان در اثر یک عامل منحصر به فرد مانند تنظیم کننده‌های رشد دانست. ریزنمونه‌های مختلف در شرایط کشت درون شیشه‌ای به ترکیبات هورمونی مختلف، عکس‌العمل متفاوتی نشان می‌دهند که این واکنش به عوامل متعددی از قبیل ژنوتیپ، سطوح تنظیم کننده‌های رشد داخلی، نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد خارجی و برهمکنش اثر این عوامل بر چگونگی پاسخ ریزنمونه بستگی دارد(گاسپر و همکاران، ۲۰۰۳).

۴-۷- آزمایش ریشه‌زایی

شاخساره‌های باززاشده یک ماه پس از واکشت دوم به محیط کشت ریشه‌زایی با غلظت‌های مختلف از هورمون‌های NAA و IBA (۰، ۰/۵، ۱ و۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) انتقال داده شدند. یک ماه پس از انتقال شاخساره‌ها به محیط ریشه‌زایی، تقریباً تمامی شاخساره‌ها ریشه‌دار شدند. القای ریشه‌زایی توسط

اکسین‌ها پاسخ متعارفی است که بسته به گیاه، ریزنمونه و ژنوتیپ در مدت زمان متفاوتی در حضور هورمون‌های NAA و IBA مشاهده می‌شود. این هورمون‌ها به عنوان اکسین‌های مصنوعی پایدار در محیط‌های کشت گیاهی برای ایجاد ریشه در اکثر گونه‌ها به کار می‌روند (دبناس و همکاران، ۲۰۰۶). نوک شاخساره‌ها محل تولید و سنتز اکسین بوده و هنگامی که به قسمت قاعده ساقه حرکت می‌کند، باعث تحریک تولید ریشه می‌شود. بنابراین، کیفیت شاخساره‌ی باززاشده نیز عامل تعیین‌کننده در موفقیت ریشه‌زایی است (بندری و همکاران، ۲۰۱۰).

۴-۷-۱- تعداد و طول ریشه‌های رشد یافته تحت تیمار تنظیم کننده‌ی رشد IBA

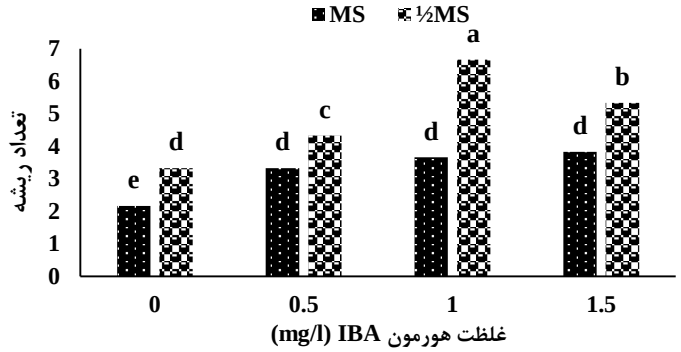
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که آثار ساده‌ی هورمون IBA و نوع محیط کشت و اثر متقابل هورمون IBA با نوع محیط کشت تغییر یافته، بر تعداد و طول ریشه‌های تولید شده معنی‌دار بود (جدول۴-۶).

جدول۴- ۶ تجزیه واریانس اثر غلظت‌های تنظیم کننده‌ی رشد IBA و نوع محیط کشت بر میزان ریشه‌زایی گیاه هاورتیا

		میانگین مربعات صفات	
منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد ریشه	طول ریشه
IBA	۳	۶/۵۲**	۱/۵۷**
محیط کشت	۱	۱۶/۶۶**	۵/۰۶**
محیط کشت×IBA	۳	۱/۲۵*	۰/۷۹**
خطای آزمایش	۱۶	۰/۲۷	۰/۱۱
درصد cv		۱۲/۷۴	۱۵/۶۷

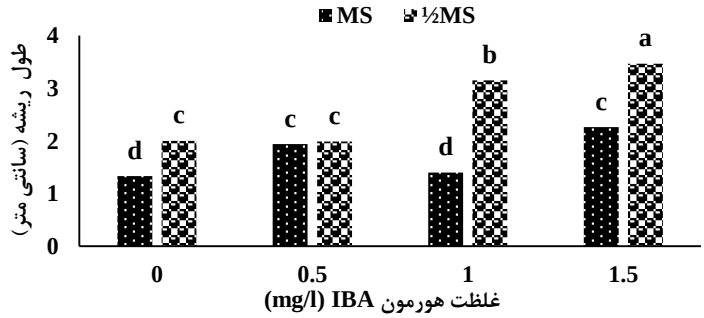
* و ** به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

مقایسه میانگین داده‌ها نشان می‌دهد که شاخساره‌های کشت شده در محیط ½MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین تعداد ریشه (۶/۶۶ عدد) را تولید نمودند (شکل ۴-۶۹).



شکل ۴- ۶۹ مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم کننده‌ی رشد IBA با نوع محیط کشت بر تعداد ریشه‌ی تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

در حالی‌که شاخساره‌هایی که در محیط ½MS حاوی تیمار هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA کشت شدند، بیشترین طول ریشه (۳/۴۷ سانتی‌متر) را تولید کردند (شکل ۴-۷۰).



شکل ۴- ۷۰ مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم کننده‌ی رشد IBA با نوع محیط کشت برطول ریشه‌ی شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

هوآنگ و همکاران (۲۰۱۴) در گیاه *Haworthia cymbioformis* برای القای ریشه از محیط½ MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA استفاده نمودند. دیویدی و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند که کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA به تولید بیشترین تعداد ریشه (۱۰ عدد) در هر ریزنمونه برگ گیاه آلوئه‌ورا انجامید. اما در پژوهش کومار و همکاران (۲۰۱۱) شاخساره‌های باززاشده‌ی گیاه آلوئه‌ورا در محیط بدون هورمون‌های گیاهی ریشه‌هایی با طول و ضخامت بیشتر تولید نمودند.

سوکدو و همکاران (۲۰۰۵) نیز برای ریشه‌زایی کاکتوس *O.ficus indica* محیط MS فاقد هورمون‌های گیاهی را پیشنهاد نمودند. تیرکی و همکاران (۲۰۱۷) و مهتا (۲۰۱۳) نیز اثر مطلوبی از ریشه‌زایی گیاه آلوئه‌ورا را در محیط کشت ½MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر زغال فعال گزارش نموده‌اند. نتایج نشان داد که محیط کشت ½MS تغییر یافته نسبت به محیط کشت MS تغییر یافته در تولید ریشه موثرتر است و در مقادیر بالاتر هورمون IBA بر میزان طول ریشه افزوده می‌شود (شکل ۴-۷۱).

شکل ۴-۷۱ مرحله ریشه زایی با کاربرد تیمار هورمونی IBA

در پژوهش چن و همکاران (۲۰۱۹) بیشترین تعداد ریشه (۱۷ عدد) با طول (۱۵/۵۷سانتی‌متر) از شاخساره‌های گیاه هاورتیا در محیط کشت حاوی تیمارهای هورمونی NAA و IBA (۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) حاصل گردید.

۴-۷-۲- تعداد و طول ریشه‌های رشد یافته تحت تیمار تنظیم کننده‌ی رشد NAA

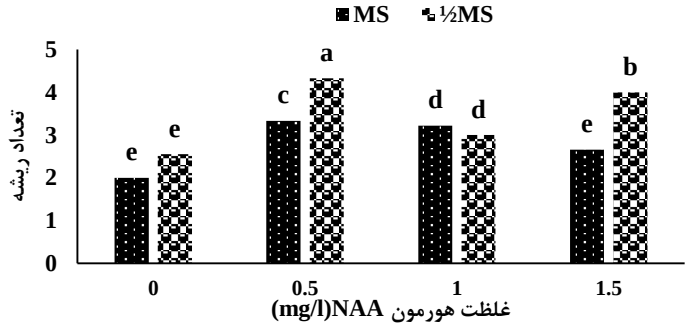
با توجه به نتایج جدول، تجزیه واریانس داده‌ها برای صفات تعداد و طول ریشه‌ی شاخساره‌های کشت شده تحت اعمال تیمار هورمونی NAA، علاوه بر معنی‌داری اثر ساده‌ی هورمون NAA، اثر متقابل این هورمون و نوع محیط کشت بر تعداد و طول ریشه‌ی تولید شده از شاخساره‌های هاورتیا به ترتیب در سطح یک و ۵ درصد، معنی‌دار بود (جدول ۴-۷).

جدول۴- ۷ تجزیه واریانس اثر غلظت‌های تنظیم کننده‌ی رشد NAA و نوع محیط کشت بر میزان ریشه‌زایی گیاه هاورتیا

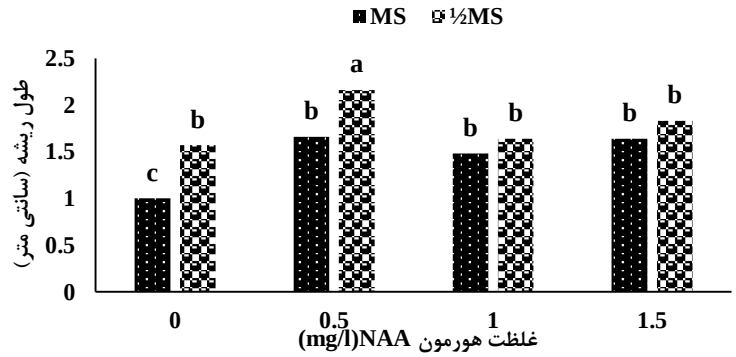
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات	
		تعداد ریشه	طول ریشه
NAA	۳	۲/۵۲**	۰/۴۳*
محیط کشت	۱	۰/۱۶ns	۰/۰۶ns
محیط کشت×NAA	۳	۱/۵۱**	۰/۲۹*
خطای آزمایش	۱۶	۰/۱۷	۰/۲۱
درصد cv		۱۳/۳۴	۱۸/۹۷

* و ** به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی داری را نشان می‌دهد.

نتایج مقایسه میانگین نیز نشان داد که بیشترین تعداد ریشه (۴/۳۳ عدد) به همراه بیشترین میزان طول ریشه (۲/۱۶ سانتی‌متر) مشترکاً در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط کشت ½MS تغییر یافته به دست آمد (شکل ۴-۷۲ و ۴-۷۳). در ریشه‌زایی گیاه آلوئه‌ورا، شمسیان (۱۳۹۳) گزارش نمود که ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین محیط برای تولید ریشه بود. پلا و همکاران (۲۰۰۲) تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA را جهت ریشه‌زایی شاخساره‌های کاکتوس اچینوسرئوس به کار بردند.



شکل۴- ۷۲ مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون NAA با نوع محیط کشت بر تعداد ریشه‌ی تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا



شکل ۴- ۷۳ مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون NAA با نوع محیط کشت بر طول ریشه‌ی تولید شده از شاخساره‌های باززاشده در کشت درون شیشه‌ای گیاه هاورتیا

شکل ۴-۷۴ مرحله ریشه زایی با کاربرد تیمار هورمونی NAA

به طور کلی، به نظر می‌آید که هورمون IBA نسبت به هورمون NAA در تولید تعداد و طول بیشتر ریشه، موثرتر بوده است. همان طور که مشاهده شد، محیط ½MS تغییر یافته عملکرد بهتری نسبت به محیط MS تغییریافته در ریشه‌زایی گیاه هاورتیا داشته است. بنابراین، برای القای ریشه‌زایی در گیاهانی همچون هاورتیا بهتر است از محیط ½MS تغییر یافته استفاده شود. روزاس و همکاران (۲۰۰۱) ، ویلاویسنسیو و همکاران (۲۰۱۲) و الفینیتی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمودند که در کاکتوس‌ها محیط ½MS برای ریشه‌زایی مناسب‌ترین محیط است. در گیاه هاورتیا همزمان با تولید و رشد ریشه، شاخساره‌های جدید در محیط ریشه‌زایی نیز رشد قابل توجهی نشان دادند. از این رو در این مرحله، به کاربرد هورمون برای القای تولید شاخساره جدید نیازی نبود. در نتیجه، انتقال به محیط گلخانه در مدت زمان کمتری بعد از تشکیل و رشد ریشه امکان‌پذیر گردید.

۴-۸- مرحله سازگاری

یکی از مراحل مهم و پیچیده کشت بافت گیاهان، استقرار شاخساره‌های باززاشده‌ی ریشه‌دار در خاک بعد از کشت درون شیشه است. در مرحله سازگاری شاخساره‌های هاورتیا به میزان ۹۰ درصد با محیط بیرون سازگار شدند و پس از انتقال به خاک رشد مطلوبی را از خود نشان دادند (شکل۴-۷۵).

شکل ۴-۷۵ مرحله سازگاری با گلخانه در گیاه هاورتیا

کومار و همکاران (۲۰۱۷) گلدان‌های سرپوشیده حاوی کوکوپیت و ماسه را برای سازگار نمودن گیاه آلوئه‌ورا با گلخانه به کار برده اند. لیا (۲۰۰۴) درصد زنده مانی گیاه آلوئه ورا را در پژوهش خود ۹۳ درصد، باکشا (۲۰۰۵) حدود ۷۰ درصد و دویودی و همکاران (۲۰۱۴) ۸۳ درصد گزارش نمودند.

۴-۹- نتیجه گیری کلی

در این آزمایش به طور موفقیت آمیزی از ریزنمونه‌های مختلف گیاه هاورتیا رقم Attenuatae جهت ریزازدیادی در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شد که به عنوان روشی موثر در باززایی و تولید گیاه این گیاه تلقی می‌گردد. نتایج آزمایشات باززایی شاخساره این گیاه نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره (۲۲/ ۵ و ۳/۵ عدد) به ترتیب در بالاترین سطح BAP (۲میلی‌گرم در لیتر) به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با کاربرد ریزنمونه‌ی برگ کامل و تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN با کاربرد ریزنمونه تحتانی تولید گردید. بیشترین میزان طول و عرض شاخساره (۱/۴۵و ۰/۸۷ سانتی‌متر) به طور مشترک، در ترکیب ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN با استفاده از هر دو ریزنمونه برگ کامل و تحتانی حاصل شد. حداکثر تعداد برگ (۴/۶۶ عدد) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بدون حضور هورمون IBA با استفاده از ریزنمونه‌ی برگ کامل به دست آمد. طویل‌ترین برگ‌ها (۱/۰۵ سانتی‌متر) نیز تنها در بالاترین سطح BAP با استفاده از برگ کامل تولید گردید. ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیترIBA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر KIN با کاربرد ریزنمونه‌ی برگ کامل بیشترین پهنای برگ (۰/۶۸ سانتی‌متر) را تولید نمود. در این پژوهش تأثیر ضخامت ریزنمونه‌ی TCL ساقه (۳ و ۵ میلی‌متر) نیز بر باززایی گیاه هاورتیا مورد بررسی قرار گرفت. دقت در انتخاب ضخامت ریزنمونه برش یافته نیز اهمیت بالایی دارد. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که بالاترین درصد کالوس‌زایی به طور مشترک (۸۰ و ۷۸ درصد) بر روی ریزنمونه‌ی TCL ساقه در تیمار ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل گردید. همچنین نتایج باززایی از این ریزنمونه نشان داد که بیشترین میانگین تعداد شاخساره (۱/۰۶ عدد) با بالاترین میزان میانگین طول و عرض شاخساره (۱ و ۰/۹ سانتی‌متر) در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP با کاربرد ریزنمونه‌ی TCL ساقه با ضخامت ۳ میلی‌متر تولید شد. شاخساره‌های باززا شده به محیط ریشه‌زایی انتقال داده شدند. بیشترین تعداد ریشه (۶/۶۶ عدد) در محیط MS ½ حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA تولید شد و بیشترین طول ریشه (۳/۴۷ سانتی‌متر) در

محیط ½MS با تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل گردید. ریشه‌زایی شاخساره‌ها در کشت درون شیشه‌ای یک پیش شرط اساسی برای استقرار آنها در خاک است. به نظر می‌رسد غلظت مناسب IBA توانسته است در تحریک سلول‌ها جهت تولید ریشه‌ها به طور موفقی عمل نماید. در مرحله‌ی آخر گیاهان ریشه‌دار به گلدان‌های حاوی کوکوپیت و پرلیت با رطوبت نسبی ۸۰ درصد جهت سازگاری با شرایط گلخانه منتقل شدند. شاخساره‌های هاورتیا به میزان ۹۰ درصد با محیط گلخانه سازگار شدند. در نتیجه با استفاده از تکنیک کشت بافت و با ریزنمونه‌ی برگ کامل و تحتانی برگ در یک محیط مغذی حاوی ترکیب سیتوکنین و اکسین مناسب، میزان و سرعت تکثیر شاخساره به میزان زیادی افزایش می‌یابد.

۴-۱۰- پیشنهادات

۱- استفاده از ریزنمونه‌ی TCL برگ جهت باززایی گیاه هاورتیا در تحقیقات آینده

۲- کاربرد محیط‌های کشت دیگر و همچنین تنظیم‌کننده‌های رشد جدید در تحقیقات باززایی بعدی

۳- مطالعه‌ی جنین زایی سوماتیکی در گونه‌های مختلف گیاه هاورتیا

۴- بررسی و مقایسه گیاهان تکثیر یافته در آزمایشگاه با گیاهان اولیه

۵- بررسی تنظیم فشار اسمزی پارانشیم برگ با محیط کشت

۶- تغییر در برخی از مواد به کار رفته در ساخت محیط‌های کشت مانند ژلرایت که بر باززایی موثر است. از این رو پیشنهاد می‌شود در تحقیقات بعدی ماده‌ی جامدکننده ژلرایت جایگزین آگار شود.

منابع و مأخذ:

۱. احمدزاده قویدل ر، (۱۳۹۱) "ریز ازدیادی گیاه دارویی آلوئه‌ورا *Aloe barbadensis Mill*" سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (گیاهی، دامی و صنعتی) ، دانشگاه فردوسی مشهد.

۲. اسماعیل زاده م، ولی‌زاده م، عزیزی ا، شریف‌خانی ا، شریفیان‌پور گ، (۱۳۹۴) " کشت بافت و تولید انبوه گیاه آلوئه ورا به روش ریزازدیادی درون شیشه‌ای" سومین همایش سراسری کشاورزی و منابع طبیعی پایدار. ایران.

۳. باقری ه، آزادی پ، (۱۳۸۱) " **کشت بافت گیاهی، تکنیک‌ها و آزمایش‌ها**" ترجمه انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۴. باقری ع، صفری م، (۱۳۸۳) " **کشت درون شیشه‌ای گیاهان** " انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۴۰۶ ص.

۵. باقری ع، صفری م، (۱۳۸۸) " **مبانی کشت بافت گیاهی** " انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۶. چمنی ا، قمری م، محب الدینی م، قنبری ع و حیدری ح، (۱۳۹۶) " اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی لاله (*Fritillaria imperalis L*) " **نشریه علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد**، جلد ۳۱، ۴۶۹- ۴۸۲.

۷. حسندخت م.ر، ابراهیمی ر، (۱۳۸۵) "**مبانی کشت بافت گیاهی**" انتشارات مرز دانش، تهران، ۳۲۸.

۸. خسروشاهی ، بهنامیان (۱۳۸۵) "**زیست شناسی پایه کشت سلول**" انتشارات تهران.

۹. خوشخوی م، (۱۳۸۷) "**فنون کشت بافت گیاهی برای گیاهان باغبانی**" ترجمه، چاپ سوم، انتشارات دانشگاه شیراز،۴۱ ص.

۱۰. شریفی ا، مشتاقی ن و باقری ع، (۱۳۸۹) " **کشت بافت گیاهی کاربردی**" چاپ اول، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۱۱. شریفی ا، کیخا آخر ف، یزدی م و باقری ع، (۱۳۹۶) " اثر رقم و تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی بر باززایی درون شیشه‌ای لیلیوم با استفاده از ریزنمونه‌های TCL " **نشریه علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد**، جلد ۳۱، شماره ۳، ۵۵۵-۵۶۴.

۱۲. شمسیان س، ترابی س ، امیدی م، (۱۳۹۳) " اثر تنظیم کننده‌های رشد و زغال فعال بر تکثیر درون شیشه‌ای گیاه آلوئه ورا " اولین کنگره بین المللی و سیزدهمین کنگره ملی علوم زراعت و اصلاح نباتات، ایران.

۱۳. طباطبائی ب، امیدی م، (۱۳۹۱) " **کشت بافت و سلول گیاهی** " چاپ سوم، انتشارات دانشگاه تهران.

۱۴. غفاری ا، حسنلو ط، خیام نکویی م، (۱۳۹۰) " بررسی فاکتورهای فیزیولوژیکی در نهال های کاکتوس علوفه‌ای حاصل از کشت بافت" هفتمین همایش ملی بیوتکنولوژی ،صفحه ۲،ایران.

۱۵. فارسی م، ذوالعلی ج، (۱۳۹۰) " **اصول بیوتکنولوژی گیاهی** " انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۱۶. فروتن آ، وادیدار ر، (۱۳۸۵) " **کشت بافت گیاهی** " ترجمه، چاپ اول، انتشارات سپهر، تهران.

۱۷. قادی ن، پورمیرزایی ه، لولایی ا، (۱۳۹۴) "بررسی تاثیر تنظیم کننده‌های رشد در کشت بافت کاکتوس" نهمین کنگره علوم باغبانی. اهواز.

۱۸. کریمی ن، نادری ر، ابراهیمی م، مفید م، (۱۳۸۹) " بررسی تکثیر کاکتوس زینتی- دارویی *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae) با استفاده از تکنیک کشت بافت "فصلنامه **گیاهان دارویی**، سال نهم، دوره دوم، شماره سی و چهارم.

۱۹. لاهوتی م، زارع م، حسن آبادی ر، (۱۳۸۲) " **بیوشیمی و فیزیولوژی هورمون‌های گیاهی**" ترجمه، چاپ اول، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۳۶۰ ص.

۲۰. مطلق زاده ر، (۱۳۸۷) "**جهان کاکتوس‌ها**" انتشارات فرهنگ جامع، تهران، ۲۵۵ ص.

۲۱. ملصقی م، معینی ا، کهریزی د، (۱۳۹۰) " تکثیر سریع آلوئه ورا در شرایط درون شیشه‌ای" هفتمین همایش ملی بیوتکنولوژی، ایران.

22. Abbasi B, Saxna P.K, Murch S.J. and Liu C.Z. **(2007)** "Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities" **In vitro Cell. Dev. Biol-Plant. 43(481).**
23. Abrie A and Van Staden J. (**2001**) "Micropropagation of the endangered Aloe polyphylla" **j.of .Plant Growth Regulation**, **19-23**.
24. Aggarwal D and Barna K.S. (**2004**) "Tissue culture propagation of elite plant of *Aloe vera Linn"* **J.of .Plant Biochem Biotech**., **13, 1**, **9-77**.
25. Ahmed S; Kabir A.H.; Ahmed M.B.; Razvy M.A. and Ganesan S. (**2007**). "Development of rapid micropropagation method of *Aloe vera* L." **Seed Science journal. 24(2):121-128.**
26. Al- Taha H. A. Matroad S.A and Hasan, S.M. **(2018)** "In vitro shoot multiplication and plants regeneration from single shoot of Christmas cactus (*Schlumbergera russelliana*)".**IJRAS 37 (1).**
27. Albanyl NJ, Vilche S, Lion MM, Chacin P. **(2006)** "A methodology for the propagation in edge *Aloe vera*" **Rev. Fac. Agron. 23:213-222.**
28. Bacchetta L, Remotti P.C, Bernardini C, and Sccardof F.**(2003)**"Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stemnodes of lilium" **Plant Cell Tissue Culture, 74: 37-44.**
29. Baksha R, Jahan M, Khatun R, Munshi J. **(2005)** "Micropropagation of Aloe vera barbadensis Mill. Through in vitro culture of shood tip explant" **Plant Tissue Cult and Biotech. 15: 121-126.**
30. Bayer B. **(1999)** "Haworthia revisited.Arevision of the genous" **National Botanic Gardens of South Africa. Umdaus Press. 130.**
31. Bayer M.D. **(1982)** "The new Haworthia handbook" **National Botanic Gardens of South Africa. Krestenbosch. 124.**
32. Bandari A.K, Negi J.S, Bisht V.K, Bharti M.K. **(2010)** "In vitro propagation of *Aloe vera* - A plant with Medicinal properties" **Nat. Sci. 8:8**
33. Bishop V. **(1995)** "Optimization of Tissue culture in Opuntia" **University of Texas at Austin. pp**: **1 - 51.**
34. Biswas G.C, Miah M, Sohel H.M, Hossain A.K.M, Shakil S.K and Howlader M.S. **(2013)** "Micropropagation of *Aloe indica* L. through shoot tip culture" **J. Agri.Vety. Sci. 5:30-35.**

35. Boyd W.M.**(1994)**"Conservation plan: Haworthia koelmaniorum" **Chief Directorate of Nature and Environmental Conservation. 1- 12.**
36. Budhiani E. **(2001)** "Micropropagation of *Aloe vera* through shoot multiplication" **UG Thesis Indonesia.6:22-30.**
37. Carlos A, Ourdes D, and Eugfnio Perez-Molphe- Balch. (**2006**) "In vitro propagation of eight species or subspecies of Turbinigarpus (Cactaceae)" **In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 41: 540–545.**
38. Cecilia Juarez, M and Bernardo Passera C.(**2002**)"In vitro propagation of 0puntia ellisiana Griff. And acclimatization to field conditions" **J. Biocell .26: 1-18.**
39. Chandra S, Diribia A. and Roja A. **(2017)** "A method of rapid invitro proliferation and morphological characterization of the medicinal plant Aloe vera L" **African journal of biotechnology.16 (47):2201-2214.**
40. Chaudhuri S, Mukundan U. **(2001)** "Aloe vera micropropagation and characterization of its gel" **Phytomorphology, 5:155-157.**
41. Chen H.G, Gao S.F. and Yang T. **(2011)** "Tissue culture and rapid propagation of *Haworthia cooperi* var. pilfera M.B.Bayer" **Northen Horticulture. 33:682.**
42. Chen Y.M, Huang J.Z, Hou T.W and Pan I.C. **(2019)** "Effects of light intensity and plant growth regulators on callus proliferation and shoot regeneration in the ornamental succulent Haworthia" **Botacial studies .60:10.**
43. Chengalrayan K, and Gallo-Meagher M**.(2001)**"Effect of various growth regulators on shoot regeneration of Sugarcane" **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, **37: 434-439.**
44. Chiari A and Bridgen M.P. **(2002)** "Meristem culture and virus eradication in Alstroemeria" **J. Plant Cell, Tissue and Organ Culture; 68: 49 - 55.**
45. Civatti M.L. Marchi M.N.G. and Bellintani M.C. **(2017)** "Micropropagation of two species of *Micranthocereus* (Cactaceae) with ornamental potential native to Bahia, Brazil" **African jurnal of biotechnology. Vol.16 (4). 749- 762.**
46. Correll M.J, Weathers P.J **(2001) "**Effect of light, co2 and humidity on carnation growth, hyperhydration and cuticular wax development in a mist reactor" **In Vitro Cell Biol Plant. 37:405-413.**
47. Court D. **(2000)** "**Succulent flora of Southern Africa**". Rotterdam: Brookfield.
48. Cunningham T.**(1988)**"Over-exploitation of medicinal plants in Natai/KwaZulu: Root" **74: 85-87.**

49. Daneshvar M.H., Moallemi N. and AbdolahZadeh N. **(2013) "**The Effects of Different Media on Shoot Proliferation from the Shoot Tip of *Aloe vera L*." **Jundishapur J Nat Pharm Prod. 8(2):7-93.**
50. Das A, Mukherjee P, Ghorai A. and Jha T.B **(2010)** "Comparative karyomorphological analyses of in vitro and in vivo grown plant of *Aloe vera* L." **Burm.F.Nucleus 53:89-94.**
51. Debnath C.P. Malik and Bisen P.S. **(2006)** "Micropropagation: A Tool for the Production of High Quality Plant-based Medicines". **Current Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 7:33-49.**
52. De Oliveira S.A, Pires F, Da Silva Machado M, Jose Prioli A, Mangolin C. A. (**1994**)"In vitro propagation of Cereus peruvianus Mill. (Cactaceae)" **J. In vitro Cell Dev. Biol: 8-94.**
53. Debiasi C, Silva C.G. and Pescador R. **(2007)** "Micropropagation of *Aloe vera L*." **Rev Bras Plant Med Botucatu. 9.36-43.**
54. Del poza j.C, Lopez-matas M.A, Ramirez- parra E. and Gutierre Z. C **(2005)** "A hormone control of the plant cell cycle" **Physiologia plantarum 123:173-183.**
55. Drew RA, Azimi M. **(2000)** "Micropropagation of Red Pitaya (Hylocereus undatus)" **J. Acta HortiCulture, 575.**
56. Dwivedi NK, Indiradevi A, Asha KI, Asokan Nair R, and Suma A. **(2014)** "A protocol for micro propagation of *Aloe vera* L. (Indian Aloe) a miracle plant" **Res. Biotechnol. 5(1):1-5.**
57. El far M.M.M, Mangoury K.E.I, and Elazab H.E.M. **(2009)** "Novel plant regeneration for Egyptian sweet potato. Abees cultivar via indirect organogenesis stimulated by initiation medium and cytokinin effects" **Aust.J.Basic Apple. Sci. 3: 543-555.**
58. El Finti A, El Boullani R, Ait Aabd N, Msanda F, Serghini MA, and Mousadik A. **(2013)** "In vitro propagation of three Moroccan prickly pear cactus *Opuntia* and plant establishment to soil" **Notulae Scientia Biologicae, 5:39–44**.
59. Elias H. Rosna M.T. and Hasbullah N.A. **(2014)** "The effects of plant growth regulators on shoot formation, regeneration and coloured callus production in *Echinocereus cinerascens* in vitro" **Plant cell organ cult**.**1-6**.
60. Elzen G.W. **(1983)** "Cytokinin and insect gall" **Comp Biochem Physiol. 76, pp17.**
61. Eslam Zade N, Hosseini S.M, and Moradi H.R.**(2010)**"The Study of *Fritillaria imperialis* Site by Ellenberg Table" **Journal of Sciences and Techniques in Natural Resources, 1:83-93.**

62. Estrada-Luna A. A., Martinez-Hernandez J.J., Estela Torres M. and Chable-Moreno F.**(2008)** "In vitro micropropagation of the prickly pear cactus Opuntia lanigera Salm-Dyck and effects of sprayed GA3 after transplantation to ex vitro conditions" **Scientia Horticulturae 117: 378-385.**
63. Fratini R, and Ruiz M.L.**(2002)**"Comparative study of different Cytokinins in the induction of morphogenesis in Lentil (Lens culinaris Medik.)" **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 38: 46-51**.
64. Gajdarzy MM. **(2003)** "Aloe, Gasteria, Gavortia: introduction, biology, ecology" **VPC kyivs Kyj University.**
65. Gantait S, Mandal N, Bhattacharya S, Das PK. **(2010)** "A Novel Strategy for in vitro conservation of Aloe vera L. through long term shoot culture" **Biotechnology 9(3):326-331.**
66. Gasper T, Kevers C, Faivre- Rampant O, Crevecoeur M, Penel C, Greppin H and Dommes J. **(2003)** " Changing concepts in plant hormone action" **In Vitro cell.Dev.Biol.Plant. 39:85-106.**
67. George E.F. **(1993)** "Plant propagation by tissue culture" **Exegetics, Edington, pp1-574**.
68. George E.F, Hall M.A. and De Klerk, G.J. **(2008)** "Plant tissue culture procedure-Background. Plant propagation by tissue culture" **Published by Springer, Dordrecht. pp 1-28**.
69. Glynn C, Ronnberg-Wastijung A, Julkunen-Titti R. and Weih M **(2004)** "Willow genotype, but not drought treatment, affects foliar phenolic con-centrations and leaf-beetle resistance" **Ento-mologia Experimentalis ET Applicata. 113 (1): 1-14.**
70. Gomez M, Pellico D, Ramırez-Lopez P, Mancheno MJ, Romano S, de la Torre MC,Sierra MA, **(2005)** "Understanding of the mode of action of FeIII-EDDHA as iron chlorosis corrector based on its photochemical and redox behavior" **Chem Eur J 11:5997–6005.**
71. Gupta S.h, Pankaj K.S, Devki L. Senand P. P. **(2014) "**In-vitro Propagation of *Aloe vera (L.)*Burm. F" **J.British Biotechnology, 4, 7, pp 806-816.**
72. Haberlandt G. **(1902)** "Culturevessuche mit isoleerten pflanzellen, sitzungsber, math. Naturwiss K1, Kais". **Akad, Wiss. 69-92**.
73. Hamidoughlou S. **(2011),** MS Thesis "Study on explant types and plant growth regulators on in vitro propagation of Fritillaria imperialis L." University of Mohaghegh Ardabili.

74. Hashemabadi D, kaviani B, **(2008)** "Raoid micropropagation of Aloe vera L. via Shoot Multiplication" **Africa Journal of Biotechnology. 7:1899-1902.**
75. Hazarika BN, Bora A. **(2010)** "Hyperhydricity-a bottleneck to micropropagation of plants" **Acta Hort. 865:95-102.**
76. Holoway S.A. **(1998)** "History of haworthia Part 1. Cact Succ" **J (US); 70(4):192-198**.
77. Hosseini R and Parsa M. **(2007)** "Micropropagation of Aloe vera L. grown in South Iran" **J of Biol Sci.10: 1134–1137.**
78. Huang L.C, Lee Y.L, Huang B.L, Kou C.I. and Shaw J.F. **(2002)**"High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture" **In Vitro Cellular & Development Biology-Plant. 38: 4. 358-365.**
79. Huang S.H, Xiao H.Y. and Hong Y.P. **(2014)** "Tissue culture and rapid propagation of *Hworthia cymbioformis*" **Journal of Fujian normal university (Naturral Science Edition).33:682.**
80. Jayakrishna C, Katthik C, Barathi S, Kamalanathan D. and ArulSelvi I.P. **(2011)** "In vitro propagation of *Aloe vera barbadensis* Miller, a miracle herb" **Res. Plant Biol.1 (5):22-26**.
81. Kanwar K, Devi V, Sharma S, Soni M, and Sharma D. (**2015**) "Effect of physiological age and growth regulators on micropropagation of Aloevera followed by genetic stability assessment" **Natl.Acad.Sci.Lett. 38, 29–35.**
82. Kaul K, and Sabharwal P.S. **(1972) "**Morphogenetic studies on *Haworthia* Establishment of tissue culture and control of differentiation" **Amer.J.Bot. 59, pp 377-385.**
83. Khalafalla M. M, Abdellatef E, Mohamed Ahmed M.M, and Osman M.G. (**2007**) "Micropropagation of cactus (Opuntia ficus-indica) as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions" **Int. J. Sustain. Crop Prod. 2(4):1-8.**
84. Khanam N, Khanam M. and Sarma G.K. **(2014)** "Rapid in vitro propagation of Aloe vera L. with some growth regulators using lateral shoots as explant" **World J. Pharm. Pharmaceu. Sci. 3(3):2278-4357.**
85. Kim Y.H, Kim H.H, Lee G.Y, Lee J.H, Jung J.H. and Lee S.D. **(2018)** " Effect of growth regulators on In vitro mass propagation of *Haworthia maughanii*" **J Plant Biotechnol. 45:369-374.**
86. Kim Y.H, , Lee G.Y, Kim H.H, Lee J.H, Jang J.H. and Lee S.D. **(2019)** "In vitro mass propagation of *Haworthia truncata*" **J Plant Biotechnol. 46:127-135.**

87. Kulus D. **(2015**) "Micropropagation of selected Agave species" **J PHD interdisciplinary, 76-84.**

88. Kumar S, Awashthi V, and Kanwar J.K.**(2007)"**Influence of growth regulators and nitrogenous compounds on in vitro bulblet formation and growth in oriental lily" **Horticultural Science, 34:77-83.**

89. Kumar N. and Reddy M. **(2011)** "In vitro Plant Propagation: A review. **Journal of Forest Science.27 (2):61-72.**

90. Kumar M, kumar B, Khumari C.H and Kumar N. **(2017)** "In vitro morphogenesis of *Aloe Vera*: The (Medicinal Wonder) Plant" **J of Medicinal Plants Studies. 5(6):130-134.**

91. Kumar M, Singh S. and Singh C. **(2011)** "In vitro morphogenesis of a medicinal plant *Aloe vera* L." **Asin J. Pl. Sci. Res. 1(1):31-40.**

92. Kumari A, Naseem M.D.**(2015)**"An efficient protocol for micropropagation of a medicinal plant *Aloe vera* L. Through organ culture" **J of Indian bot. Soc. 94: 118–125.**

93. Liao Z, Chen M, Tan F, Sun X, and Tang K. **(2004)** "Micropropagation of Chinese Aloe" **Plant Cell Tiss. Org., 83-86.**

94. Liu B.L, Fang H.Z, Meng C.R, Chen M, Chai Q.D, Zhang K, Liu S.J **(2017)** "Establishment of a rapid and efficient micropropagation system for succulent plant Haworthia turgida" **HortScience 52:1278–1282.**

95. Liu B.L, Zhang Y, Zhang K, Fang H.Z, Zhang X.M, Fu R, Qiu X.H and Xu R. **(2016).** "The Efficient Tissue Culture System of *Orostachys fimbriata*" **Agricultural Sciences, 7, 175-180.**

96. Lizumi M. and Amaki W. **(2011)** "Miropropagation of *Haworthia*cymbioformis through Thin-cell-layer tissue culture" **Combined Proceedings International Plant Propagators. 51:288-291.**

97. Luria G, Wiess D, Ziv O. and Borochov A. **(2004)** "Effect of planting depth and density, leaf removal, cytokinin and gibberellic acid treatment on flowering and rhizome production in *Zantedeschia aethiopica*" **IX international Symposium on Flower Bulbs. 725-730.**

98. Machakova I, Zazimalova E. and George E. F. **(2008)** "Plant Growth Regulators" **The Technology. Springer, Verlag, Berlin, Germany. 175-205.**

99. Marschner H. (**1995**) "Mineral Nutrition of Higher Plants" **Academic Press, London, 889.**

100. Mata Rosas M, Monroy De.L.M.A, Moebius goldammer K, Chavezavila VM. **(2001)** "Micropropagation of Turbinicarpus laui glasset foster, an endemic and endangered species" **J. In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant. 37: 34-40.**

101. Mehta S.**(2013)**"In-vitro Multiplication of *Aloe Vera* L." **An Important Medicinal Plant, Vegetos, 26(special): 155–159.**

102. Michel Z, Hilaire KT, Mongomake K, Georges AN, Justin KY **(2008)** "Effect of genotype, explants, growth regulators and sugars on callus induction in plant" **Australian J Crop Sci. 2 (1): 1-9.**

103. Mirmasoumi M, Azadi P, Sharafi A, Ntui V.O, and Mii M.**(2013)**"Simple protocol for plant regeneration of Lilium ledebourii using transverse thin cell layer" **Progress in Biological Sciences, 3: 117-122.**

104. Mizukami M, Takeda T, Satonaka H, and Matsuoka H. **(2008)** "Improvement of propagation frequency with two-step direct somatic embryogenesis from carrot hypocotyls" **Biochemical Eng. 38(1): 55-60.**

105. Mohammadi D.M, Khalighi A, and Naderi R. **(2007)** "Indirect somatic embryogenesis from petal explant of endangered wild population of Fritillaria imperialis" **Pakistan Journal of Biological Sciences, 10:1875- 1879.**

106. Morel G.M. **(1960)** "Producing virus free Cymbidium" **Amer. Orch. Soc. Bull. 29:495-497.**

107. Mukherjee A. and Roychowdhury B. **(2008) "**The invitro propagation of Aloe vera sp" **TIG Research Journal. 2: 116-119.**

108. Murashige, T. and Skoog, F. **(1962)** "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures" **Physiol. Plant., 15:473-497.**

109. Mycock D.J, Wesley-Smith and Bberjak.**(1995)**"Cryopreservation of somatic embryos of four species with and without cryoprotectant"**Bot. 75: 331-336.**

110. Natali L, Castorena-sanchez I, and Cavallini A. **(1990)** "In vitro culture of aloe barbadensis mill. Micropropagation of vegetative meristem". **Plant Cell, Tissue and Organ Cultur, 71-74.**

111. Nayankantha N.M.C, Singh B.R and kumar A. **(2010)** "Improved culture medium for micropr ppagation of Aloe vera L" **Trop. Agri. Res.Ext. 13(4):87-93.**

112. Nhut D.T, Le B.V, Teixeira Da Silva J.A, and Aswath C. R. **(2001)** "Thin cell layer culture system in lilium: regeneration and transformation Perspectives" **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 37:516-523.**

113. Nhut D.T, Van Le B., Fukai S, Tanaka M, and Van K.T.T.(**2001a**) "Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of Lilium longiflorum via young stem culture" **Plant Growth Regulation, 33:59-65.**

114. Ogihara Y. and Tsunewaki K. **(1979)** "Tissue culture in *Haworthia*. Ill, Occurrence of callus variants during subcultures and its mechanism" **J. Genet., 54: 271-293**.

115. Paek K.Y and Hahn E.J. **(2000)** "Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip culture of lisianthus" **In vitro Cell Dev-Pl. 36(2):128-132.**

116. Pelah D, Kaushik R, Mizrahi Y, Sitrit Y. **(2002)** "Organogenesis in the vine cactus Selenicereus megalanthus using thidiazuron" **Plant Cell Tissue Org Cult 71:81–84.**

117. Perez molphe E, Perezreyes Martha E, Davilafelgueroa CA, **(2002)** "Villalobus Amador E. In vitro propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran desert" **J. Hortscience; 37:6-693.**

118. Perez molphe E, Perez-Reyes ME, De Lourdes De La Rosa-Carrillo MA**.(2012)** "In vitro conservation of Turbinicarpus (Cactaceae) under slow growth conditions" **Haseltonia, 17: 51–57.**

119. Pierik R.L.M. **(1997) "In vitro culture of Higher Plants**" (First edition) Springer.

120. Rahimi M.; M. H. Daneshvar and M. Heidari **(2014).** "Propagation bulb formation of *(fritillaria L)* via in vitro culture*"* **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences. 4(3) 2231 – 4490**.

121. Ramsay MM, Gratton Y **(2000)** "Propagation of *Aloe polyphylla* Schonl. Expillanus from callus derived from leaf tissue" **Bot. Gardens Micropropagation News. 2: 61- 63.**

122. Reed B.M, Buckley P.M, and Dewllde T.N. **(1994)**"Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants" **In Vitro Cell. Dev. Biol. 31:53-57.**

123. Richwine A.M., Tipton J.L. and Thompson G.A. **(1995) "**Establishment of Aloe, *Gasteria*, and *Haworthia* Shoot Cultures from Inflorescence Explants" J**. Hortscience, 30(7)1443–1444.**

124. Rizwan M, Soni P, Kumar R, Gupta N.K, Shahzad M, Govind S and Y Sudasan. **(2014)** "High Frequency Regeneration Protocol of *Aloe Vera* L" **journal of plant research. 27 (2):127-130.**

125. Rodriguez R, Berros B, Centeno M.L, Rovira M, Rodrigues A. and Radojevic L. **(2000)** "Applied and basic studies on somatic embryogenesis in hazelnut (Corylus avellana L.), in: Jan, M.S., Gupta, P., and Newton, R.J. (eds.), Somatic Embryogenesis in woody Plants" **Kluwer Academic Publishers Dordrecht-The Netherland .6: 291-359.**

126. Rogers S.M.D. **(1993)**. **"**Optimization of plant regeneration and rooting from leaf explants of five rare *Haworthia"* **J. ScientiaHorticulturae., 56:157-161.**

127. Rosas MM, Rosa MA, Goldammer M, Avila M. **(2001)** "Micropropagation of Turbinicarpus laui Glass ET Foster, an endemic and endangered species" **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 37: 400–404.**

128. Rout G, Saxeena C, Samantaray S and Das P. **(1999)** "Rapid clonal prppagation of plumbago zeylanica**" Plant Growth Regulation. 28:1-4.**

129. Rout GR, Reddy GM, and Das P **(2001)** "Study on in vitro clonal propagation of Paulownia tomentosa Steud evaluation of genetic fidelity through RAPD Marker" **Silvae Genet. 50:208-212.**

130. Roy S.C. and Sarkar A. **(1991)** "In vitro regeneration and micropropagation of Aloe vera L." **Scientia Hortic., 47:107-113.**

131. Sagastume Tecnoregion H.(**2006**). "Propagation in vitro cactus cabeza (pilocereus maxonii)" J**. Biotecnologia .ICTA. 4-23.**

132. Sahu R.K.A**. (2013) "**Review on Low Cost Methods for In Vitro Micropropagation of Plant through Tissue Culture Technique" **UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences 1(1):38-41.**

133. Santacruz-ruvalcaba F. and Portillo L. **(2009)** "Thin cel suspension layer as a new methodology for somatic embriogensis in agave tequilana weber cultivar azul" **Industrial crops and products, 609-614.**

134. Sattelmacher B, and Horst J.W. **(2007)** "The Apoplast of higher plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions" **University of Honnover, Germany. Springer, 323p.**

135. Saucedo G, Pedro A, Maribel V.Mo, Maria E.V, Andres C.H, and Octavio P.L. **(2005) "**Regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food" **Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 80:215–219.**

136. Shahzad A. and Siddiqui S.A. **(2000)** "In vitro organogenesis in Ocimum sanctum L. A multi purposeheb" **Phytomorphology.Delhii. 50: 27-35.**

137. Silva J.A. (**2003**) "Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology"**African Journal of Biotechnology, 12: 683-691.**

138. Singh B., and Sood N. **(2009)** "Significance of explant preparation and sizing in Aloe vera L. A highly efficient method for in vitro multiple shoot induction" **Scientia Horticulturae, 122:146-151.**

139. Singh M, Rathore M.S, Panwar D, Rathore J.S, Dahla H.R and Shkhawat N.S**. (2009)** "Micropropagation of selected genotype of *Aloe Vera* L. ancent plant for modern industry" **J. Sustain. Forest. 28:935-950.**

140. Skala A. and Wysokinska A. **(2006)** "In viro regeneration of Salvia nemorosa L. from shoot tips and leaf explants" J**. In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant., 40: 596-602.**

141. Skoog F. and Miller C.C. **(1957)** "Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro" **Symp. Soc. Exp. Biol. 11:118-131.**

142. Sood H. and Chauhan R.S**. (2009)**"Development of a low cost micropropagation technology for an endangered medicinal herb (Picrorhiza kurroa) of North-Western Himalayas" **Plant Sciences 4: 21-31**.

143. Sujatha M, Raddy T.R, **(1998)** "Differentiol cytokinin effects on the stimulation of in vitro shoot proliferation from meristematic of Caster (Ricinus Communis L.)"**Plant Cell Report. 17:561-566.**

144. Takeda T., Inose H., and Matsuoda H**. (2003)** "Stimulation of somaticembryogenesis in carrot cells by the addition of the calcium" **Biochemical Engineering Journal, 14: 143-148.**

145. Tran Thanh Van K, Bui VL **(2000)** "Curent status of thin cell layer method for the induction of organogenesis or somatic embryogenesis. In: Somatic embryogenesis in woody plants" **Kluwer Academic, Publishers, Dordrecht. 51-92.**

146. Tirkey A., Kiran Sh., Jha Z and Prte S.S. **(2017)** "In Vitro Regeneration of Aloe Vera (*Aloe barbadensis* Mill)" **International Journal of current Microbiology and Applied Sciences. ISSN: 2319-7706.**

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

148. Trejgell A., Libront I. and Tretyn A.**(2012)**"The effect of Fe-EDDHA on shoot multiplication and in vitro rooting of Carlina onopordifolia Besser" **Acta Physiologiae Plantarum, 34: 2051-2055.**

149. Vahdatpour F. **(2008)** "The investigation of zinc and boron elements effects in somatic embryogenesis of Daucuse carota L. and Cucumis sativus L. M.Sc." **Thesis Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resoures, Iran, 128p.**

150. Velcheva M, Faltin Z, Vardi A, Eshdat Y and Peral A **(2005)** "Regeneration of *Aloe arborescens* via organogenesis from young inflorescences" **Plant Cell Tissue Organ Cult 83: 293-301.**

151. Villavicencio G.E.E, Cortes AG, Carranza Perez MA. **(2012)** "Micropropagation of Epithelantha micromeris (Engelm.) F.A.C. Weber ex Britt. And Rose, ornamental cactus and phytogenetic resource of the Chihuahuan Desert" **Rev. Mex. de Cienc. Forestales. 3(14):83–99.**

152. Werner T. and Schmulling T. **(2009)** "Cytokinin action in plant development" **Curr.Opin. Plant Bio. 12: 527.**

153. Winkelmann R., and Boes S. **(2006)** "Analysis of microdata. Berlin" Springer.234.

154. Withers L.A. **(1989)** "In vitro conservation and germplam utilization" **Cambridge University Press. 34-309.**

155. Wyka T, Hamerska M, Wroblewska M. **(2006)** "Organogenesis of vegetative shoots from in vitro cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae)" **J. Plant cell, Tissue and Organ Culture. 87: 27 – 32.**

156. Yong X.J, Mai Y.L, Lin S.H. and Xia S.Y**. (2007)** "Tissue culture and rapid propagation of *Haworthia arachnoidea* var. setata" J **of Tianjin Agricultural Sciences. 32:682.**

157. Yasseen M.Y. **(2002)** "Micropropagation of pitaya (Hylocereus undatus britton ET Rose)" **J. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 38: 9–427.**

158. Yusnita P, and Hapsoro D. **(2011)** "In vitro organogenesis of two Sansevieria cultivars on different concentration of benzyladenine (BA)" **Agrivita 33(2). 0126-0537**.

159. Zakia S, Zahid N.Y, Yaseen M, Abbasi N.A, Hafiz A.A. and Mahmood N. **(2013)** "Standardization of micropropagation techniqes for Aloe vera" **Pak.J.Pharm. Sci. 26(6):1083-1087.**

160. Zhang C.L, Chen D.F, Elliott M.C and Slater A. **(2001) "**Thidiazeron induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (Beta vulgaris L.)" **In vitro cellular and Development Biology – Plant. 37:305-310.**

Abstract

Hawothia is a perennial plant in the Liliaceae family and is native to South Africa. Seed propagation of this plant is time consuming and has problems with genetic purity and its non-sexual reproduction through offshoot and cuttings is limited due to the need for abundant native plant, so the use of plant tissue culture can be beneficial for this plant. In this study, the effect of two types of growth regulators of cytokinin BAP and KIN (0.5, 1, 2 mg/l) and two types of growth regulators of auxin IBA and NAA (0, 0.01, 0.1 and 0.5 mg /l) by two type of complete and lower part of leaf explants in modified MS medium were investigated in vitro on Haworthia attenuatae. The results showed that the highest number (3.5), length (1.45 cm) and width (0.87 cm) of shoots were obtained in treatment combination of 0.1 mg/l IBA with 1 mg/l KIN by using the lower part of leaf explant. Complete leaf explants also produced the highest number of shoots (5.22) in combination of 2 mg/l BAP and 0.01 mg/l IBA. Maximum number of leaves (4.66) in 0.5 mg/l BAP treatment without IBA and the longest and widest leaves (1.05 and 0.68 cm) in the highest Levels of cytokinins (BAP and KIN) with 0.5 mg/l IBA were produced using by leaf explants. In this study, the effect of TCL explants thickness (3 and 5 mm) on regeneration of Haworthia plant was also investigated. The highest average of shoot number (1.06) with the highest mean shoot length and width (1 and 0.9 cm) were produced in 0.1 mg/l IBA and 2 mg/l BAP using TCL stem explants with a thickness of 3 mm. In order to produce root, the regenerated shoots were transferred to MS and ½MS media containing IBA and NAA growth regulators (at concentrations of 0, 0.5, 1, 1.5 mg/l). According to the results, the highest number of roots (6.66) were produced in ½MS medium containing 1 mg/l IBA and the highest root length (3.47 cm) was obtained in ½MSmedium with 1.5 mg/l IBA. Finally, rooted plants were transferred to pots containing cocoopeat and perlite at 80% relative humidity and 28-30 °C in order to adaption of greenhouse conditions. Totally, 90% of the Haworthia shoots were adapted to the greenhouse condition.

Keywords: Haworthia, leaf explants, regeneration, growth regulators, shooting, rooting

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Agricultural Biotechnology

Effect of growth regulators on in vitro micropropagation of *Haworthia spp.* plant using leaf explants

By: Nafise njarian kermani

Supervisors:

Dr.Mahdieh Parsaeian

Dr.Ziba Ghasimi-Hagh

January 2020