

اثر محیط های مختلف کشت بر پرآوری ریزنمونه های شاخساره سرخس 'بوستونی'^۱

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

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

چکیده

سرخس 'بوستونی' با نام علمی 'Bostoniensis' *Nephrolepis exaltata* Schott cv. یکی از مورد توجه ترین و پر فروش ترین سرخس های زینتی درون خانه ای است. امروزه یکی از روش های تجاری تولید انبوه این گیاه، کشت درون شیشه ای آن است. این پژوهش به منظور دستیابی به روشی مناسب جهت پرآوری شاخساره سرخس 'بوستونی' صورت گرفت. آزمایش ها به صورت فاکتوریل و طرح به طور کامل تصادفی انجام شدند. برای انجام این پژوهش از ریزنمونه شاخساره های ۳ تا ۷ میلی متری که در محیط کشت دارای ۰/۵ غلظت نمک های MS، ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۵ میلی گرم در لیتر بنزینیل آدنین (BA) پرورش یافته بودند استفاده شد. ابتدا شاخساره ها جدا و در ۱۲ محیط کشت مختلف دارای دو غلظت نمک های معدنی (۰/۵ یا یک چهارم غلظت نمک های MS)، دو غلظت ساکارز (۲۰ یا ۳۰ میلی گرم در لیتر) و سه غلظت بنزینیل آدنین (۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر)، کشت شدند. پس از گذشت شش هفته، تعداد شاخساره، طول شاخساره، وزن تر و وزن خشک اندام های هوایی اندازه گیری شدند. تولید ساختارهای سبز کروی (ساختارهای کروی شکل مریستمی) نیز در محیط های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده بیانگر اثر معنی دار فاکتورهای به کار رفته در این آزمون بر صفات اندازه گیری شده بود. بیشترین تعداد شاخساره در محیط کشت MS ۰/۵، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۲ میلی گرم در لیتر بنزینیل آدنین (۰/۵ ± ۲۵ و با طول ۰/۵ ± ۵ میلی متر) به دست آمد. همچنین ساختارهای سبز کروی در غلظت های بالای بنزینیل آدنین (۲ و ۱ میلی گرم در لیتر) مشاهده شدند. مطالعه ساختارهای سبز کروی بیانگر مریستمی بودن این ساختارها بود که جوانه های جانبی را شکل می دهند. با توجه به نتایج به دست آمده این دو محیط به عنوان مناسب ترین محیط ها جهت پرآوری سرخس 'بوستونی' معرفی شدند.

واژه های کلیدی: بنزینیل آدنین، پرآوری، ساختارهای سبز کروی، ساکارز، سرخس 'بوستونی' معرفی شدند، نمک های معدنی.

مقدمه

کشت درون شیشه‌ای^۱ سرخس‌ها به عنوان یک ابزار پژوهشی برای مطالعه توانایی نمو سرآغازهای برگ^۲ از اوایل سال ۱۹۵۰ رواج پیدا کرد (۱، ۶). پژوهش‌های کاربردی بیشتر به منظور افزایش درون شیشه‌ای سرخس‌ها در ابتدای سال‌های ۱۹۶۰ آغاز شد (۱). در میان گونه‌های مختلف سرخس، سرخس 'بوستونی' با نام علمی 'Bostoniensis' *Nephrolepis exaltata* Schott cv. متعلق به تیره Polypodiaceae بوده و یکی از پرطرفدارترین سرخس‌های زینتی درون‌خانه‌ای است (۱۶، ۱۹). تورست^۳ (۲۴) در کتاب روش‌های کشت درون شیشه‌ای گیاهان باغی، به کشت درون شیشه‌ای سرخس 'بوستونی' پرداخته است. در دهه‌های اخیر تولید انبوه این گیاه از طریق کشت درون شیشه‌ای متداول شده است (۱۳، ۱۶، ۱۹، ۲۴). در سه دهه اخیر پژوهشگران مختلفی با روش‌های متفاوت به کشت درون شیشه‌ای سرخس 'بوستونی' پرداخته‌اند (۸، ۹، ۱۱، ۲۱). همچنین از این گیاه برای مطالعه تعیین اثرات دما، نور و شرایط گیاه‌مادری بر کیفیت و کمیت گیاهان کشت درون شیشه‌ای دختری استفاده شده است (۱۶، ۱۷، ۱۸).

مرحله پرآوری^۴ (تولید تعداد زیاد گیاهچه اسپروفیت) مهم‌ترین مرحله در فرایند کشت درون شیشه‌ای سرخس 'بوستونی' است. فرایند باززایی اسپروفیت سرخس، از طریق باززایی مستقیم و یا باززایی غیر مستقیم از پینه و یا مرحله اسپورزایی گامتوفیت است (۲۳، ۲۵). عوامل زیادی مثل سن ریزنمونه، بازجویی، مقدار مواد غذایی، ترکیب و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد، مقدار و منبع کربن، روش کشت جامد یا مایع، مسیره‌های باززایی یاخته‌های اسپروفیت را کنترل می‌کند (۲۳).

در پژوهشی که توسط پاسکوال و همکاران^۵ (۲۲) روی اثر غلظت‌های مختلف نمک‌های MS^۶ (۲۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰٪) به همراه ۵ غلظت ساکارز (۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۱۰۰ گرم در لیتر) در سرخس 'بوستونی' صورت گرفت از ریزنمونه‌های شاخساره درون شیشه‌ای استفاده کردند. آن‌ها محیط کشت دارای یک چهارم غلظت نمک‌های MS و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز را با تولید ۲/۶ شاخساره به ازای هر ریزنمونه را به عنوان بهترین محیط پرآوری معرفی نمودند. گومارز و همکاران^۷ (۱۲) با بررسی برهمکنش غلظت‌های مختلف نیتروژن معدنی (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰٪) با ۶ غلظت مختلف ساکارز (۰، ۷/۵، ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ گرم در لیتر)، میزان ۲۵٪ نیتروژن همراه با ۷/۵ گرم در لیتر ساکارز را برای ریززایی سرخس 'بوستونی' توصیه نمودند. زیو^۸ (۲۵) با کشت ریزنمونه‌های سرخس در محیط کشت مایع داخل بیوراکتور، نصف غلظت نمک‌های MS و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز را برای ریززایی سرخس 'بوستونی' پیشنهاد کرد.

نکته قابل توجه در پرآوری سرخس 'بوستونی' تولید توده‌هایی کروی شکل به نام ساختارهای سبز کروی^۹ (GGB) است. وقتی تنظیم‌کننده‌های رشد با یک نسبت مشخص به محیط افزوده شوند به احتمال به عنوان یک محرک مورفولوژیکی عمل کرده و نمو مریستم‌های کروی^{۱۰} و جوانه‌های خوشه‌ای^{۱۱} را سبب می‌شوند. واژه مریستم‌های کروی یا جوانه‌های خوشه‌ای در مورد آلاله، سرخس، سیب‌زمینی و موز به کار رفته است و به ساختارهای کروی قابل باززایی که از طریق اندام‌زایی و یا رویان‌زایی بدنی از جوانه‌ها و یا سایر بافت‌های دارای قابلیت باززایی تولید می‌شوند، گفته می‌شود (۲۵). ریززایی سرخس با استفاده از ساختارهای کروی سبز اولین

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

مواد و روش‌ها

برای ارزیابی اثر محیط‌های مختلف کشت بر مرحله پرآوری سرخس 'بوستونی' سه تیمار مختلف شامل: دو غلظت نمک‌های پرمصرف و کم مصرف (MS (A₁= ۱/۲ MS و A₂ = ۱/۴ MS) و دو غلظت ساکارز (۳۰ گرم در لیتر = B₁ و ۲۰ گرم در لیتر = B₂) و سه غلظت هورمون BA (۲ میلی گرم در لیتر = C₁، ۱ میلی گرم در لیتر = C₂ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر = C₃) به صورت فاکتوریل در نظر گرفته شد. بر این اساس ۱۲ محیط مختلف تهیه (جدول ۱) و در شیشه‌های مربا به مقدار ۵ ± ۵ گرم و در چهار تکرار توزیع شدند. محیط‌ها با ۸ گرم در لیتر آگار به حالت نیمه جامد در آمدند. pH محیط قبل از اتوکلاو در ۵/۷ تنظیم شد.

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

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

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

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

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

نتایج و بحث

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

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد برهمکنش‌های غلظت نمک‌های MS و ساکارز بر تعداد شاخساره، وزن تر و وزن خشک اندام‌های هوایی معنی‌دار شد، ولی بر طول شاخساره اثر معنی‌داری نداشت. بر خلاف نقش اساسی و موثر عناصر معدنی در فرایند باززایی و پرآوری، اسپروفیت سرخس 'بوستونی' برای تقسیم و توسعه یاخته‌ای به غلظت کاهش یافته عناصر معدنی به ویژه نیتروژن در محیط کشت نیاز داشت و غلظت‌های بالاتر حالت سمیت برای اسپروفیت ایجاد کرد (۱۰). به نظر می‌رسد محیط ۰/۵ MS نه تنها اثر بازدارندگی و سمیت عناصری چون نیتروژن را ندارد بلکه غلظت مناسبی از عناصر معدنی را برای تقسیم و تمایز یاخته‌ای فراهم می‌کند. افزون بر این شاخساره‌های به کار رفته برای مرحله پرآوری، گیاهچه‌های کوچک و جوان به طول ۳ تا ۷ میلی‌متر بود و حداکثر دارای ۲ تا ۴ برگ بودند. این شاخساره‌ها به طور کامل دگر غذا بود و توانایی فتوسنتز نداشتند، از این جهت به قند (ساکارز) به کار رفته در محیط کشت جهت تقسیم و توسعه یاخته‌ای نیازمند بودند. بنابراین ساکارز موجود در محیط کشت منبع انرژی جهت تقسیم یاخته‌ای (که لازمه تولید جوانه‌های جانبی و تولید شاخساره‌های جدید است) را فراهم کرد، واحدهای ساختاری برای بیوسنتز مولکول‌های بزرگ مورد نیاز رشد گیاه را تأمین می‌کنند (۲۲). به احتمال میزان ۳۰ گرم در لیتر ساکارز غلظت مناسب‌تری را از قند برای تقسیم یاخته‌ای فراهم می‌سازد. با توجه به این که بیشترین تعداد شاخساره تنها در تیمارهای (A₁B₁) به دست آمده است و سایر تیمارها در گروه b قرار گرفته‌اند می‌توان نتیجه گرفت که غلظت نمک‌های معدنی و ساکارز اثرات یکدیگر را بر تعداد شاخساره تشدید کرده‌اند (جدول ۲).

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

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

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

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

برهمکنش های نمک های معدنی، بنزیل آدنین بر صفات اندازه گیری شده در مرحله پراوری سرخس 'بوستونی'

مقایسه میانگین های نشان می دهد که اثر غلظت نمک های معدنی بر تعداد شاخساره مهم تر از اثر غلظت BA است. در تمام تیمارها در نصف غلظت نمک های MS (A_1) تعداد شاخساره بیشتری تولید شده است و اثر BA (در غلظت بالا) باعث شده که تیمارهای A_2C_1 و A_2C_2 از نظر آماری با تیمار A_1C_3 اختلاف معنی داری نداشته باشد (جدول ۳). کاملوه و همکاران^۱ (۹) غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد کینتین را به همراه NAA و IAA در ترکیب با غلظت های مختلف نمک های معدنی MS به کار برده و بیان کردند که مهم ترین عامل مؤثر بر

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

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

| Trait | صفت | تعداد | طول شاخساره | وزن تر | وزن خشک شاخساره |
|-------------------------------|-------|--------------|-------------------|--|-------------------------------|
| Treatment | تیمار | شاخساره | Shoot length (mm) | شاخساره (گرم) Shoots fresh weight (g) | (گرم) Shoot dry weight (g) |
| | | Shoot number | | | |
| A ₁ B ₁ | | 19.674 a | 10.209a | 0.583 a | 0.107a |
| A ₁ B ₂ | | 7.138 b | 10.908 a | 0.315 b | 0.093 b |
| A ₂ B ₁ | | 7.367 b | 7.634 a | 0.259 b | 0.076 b |
| A ₂ B ₂ | | 4.446 b | 7.204 a | 0.150 c | 0.040 c |

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

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

بر تشکیل شاخساره جدید غلظت نمک‌های MS و نه غلظت تنظیم‌کننده‌های اضافه شده به محیط کشت است. گزارش دیگری مبنی بر مقایسه برهمکنش‌های نمک‌های معدنی و تنظیم‌کننده رشد بر تعداد شاخساره تولید شده در مرحله پرآوری نفرولپیس وجود ندارد. در این پژوهش نیز در تطابق با نتایج سایر پژوهشگران مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت سیتوکینین تعداد شاخساره افزایش می‌یابد (۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲). یکی از اثرهای بارز و شناخته شده غلظت‌های بالای سایتوکینین‌ها در محیط کشت کاهش طول شاخساره است (۹). به طور معمول اکسین را مسئول اصلی افزایش طول یاخته و در نتیجه افزایش طول بخش‌های هوایی گیاه می‌دانند اما در حقیقت تعادل هورمونی ایجاد شده در پاسخ یاخته‌ها موثر است به طوری که وقتی نسبت سایتوکینین به اکسین بیشتر باشد فرایند باززایی به سمت تولید شاخساره پیش می‌رود و در حالت عکس افزایش طول اندام‌ها و نیز تولید ریشه مشاهده شد (۳، ۴، ۵). بنابراین بدیهی است که در غلظت‌های بالای BA (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) طول شاخساره کمتر از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA باشد. به همین دلیل در این آزمایش نیز غلظت‌های بالای سایتوکینین باعث کاهش رشد طولی شاخساره‌ها شده، در نتیجه کمترین طول شاخساره در تیمارهای A₁C₁ و A₂C₁ مشاهده شد.

با توجه به مناسب بودن نصف غلظت نمک‌های MS برای افزایش تعداد و طول شاخساره‌ها و این که در غلظت‌های کم تنظیم‌کننده BA، پتانسیل محیط کشت در جهت افزایش طول شاخساره‌ها و افزایش ماده خشک پیش می‌رود. عمده وزن یاخته‌ها مربوط به سلولز موجود در دیواره‌های آن‌ها و نیز آب است (۳، ۴). بنابراین بیشترین وزن تر و وزن خشک قسمت‌های هوایی در تیمارهای A₁C₃ حاصل شد. اما در تیمارهای A₂C₃ به علت کافی نبودن غلظت عناصر معدنی بیوسنتز مواد مختل شده، در نتیجه تقسیم و طویل شدن یاخته‌ای به شدت کاهش یافت به طوری که وزن تر و وزن خشک اندام‌های هوایی در کمترین حد قرار گرفت. در سایر تیمارها به علت وجود غلظت‌های بالای BA تقسیم یاخته‌ای بالاست و عمده وزن تر آن‌ها مربوط به آب فراوان موجود در یاخته‌های مریستمی است (۲۰). هر چند در یک چهارم نمک‌های MS غلظت عناصر معدنی کم است و باعث

کاهش وزن تر نسبت به نصف نمک های MS شده، اما به نظر می رسد اثر غلظت های BA بر جذب آب خیلی بیشتر از نمک های معدنی باشد. نکته قابل توجه این است که بافت های ریزنمونه در تیمار A_2C_1 در حضور دو میلی گرم در لیتر BA بر خلاف کمبود عناصر غذایی حالت مرستمی به خود گرفتند در نتیجه قسمت عمده وزن تر آن ها مربوط به آب بود و وزن خشک این تیمار تا حد A_2C_3 کاهش یافت.

جدول ۳- برهمکنش غلظت های نمک های معدنی MS و غلظت های مختلف بنزیل آدنین بر صفات اندازه گیری شده در مرحله پرآوری سرخس 'بوستونی'.

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

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

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

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

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

اثر غلظت ساکارز و نیز غلظت های بنزیل آدنین بر تعداد شاخساره معنی دار شده است. با توجه به نقش موثر ساکارز و بنزیل آدنین در تقسیم و توسعه یاخته ای و تولید جوانه جانبی بیشترین تعداد شاخساره در ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و غلظت های بالای BA (۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) تولید شد در حالی که تعداد شاخساره در ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA کمتر بود (جدول ۴). در تیمار B_1C_3 هر چند مقدار ساکارز برای تولید شاخساره کافی است اما غلظت بنزیل آدنین محدود کننده است. در تیمار B_2C_1 برعکس غلظت بنزیل آدنین برای تولید شاخساره در حد کافی است ولی غلظت ساکارز محدود کننده تولید شاخساره بیشتر است و تقابل این اثرها باعث شده این گروه از نظر آماری در یک دسته قرار بگیرند (گروه b).

طویل ترین شاخساره ها در B_1C_3 و B_2C_3 مشاهده شد. با توجه به معنی دار نشدن اثر غلظت ساکارز بر طول شاخساره چنین استنباط می شود که عامل اصلی بروز این نتیجه تنظیم کننده رشد BA بوده است، به طوری که در غلظت پایین (۰/۵ میلی گرم در لیتر) بلندترین شاخساره و در غلظت بالا (۲ میلی گرم در لیتر) کوتاه ترین شاخساره ها تولید نموده است و این با اثرهای شناخته شده برای سایتوکینین ها مطابقت دارد (۴).

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

منبع انرژی، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA (تیمار B₁C₃) باعث افزایش تقسیم و افزایش طول یاخته شد. به دنبال آن تجمع مواد سلولزی و لیگنینی بر دیواره یاخته‌های در حال بلوغ باعث افزایش وزن تر و وزن خشک اندام‌های هوایی شده است. در مقادیر کمتر ساکارز به دلیل کمبود انرژی، BA نتوانسته اثرهای خود را نشان دهد. در تیمارهای B₂C₁ و B₂C₂، B₂C₃ منابع محدود کربن و انرژی مانع بروز اثر تنظیم‌کننده‌های رشد شده، در نتیجه بیوسنتز مواد کاهش می‌یابد.

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

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

| Trait | تعداد | طول | وزن تر | وزن خشک |
|-------------------------------|--------------|-------------------|------------------------|----------------------|
| صفت | شاخساره | شاخساره | شاخساره (گرم) | شاخساره (گرم) |
| Treatment | Shoot number | Shoot length (mm) | Shoot fresh weight (g) | shoot dry weight (g) |
| B ₁ C ₁ | 16.103a | 5.325 c | 0.310 b | 0.076 bc |
| B ₁ C ₂ | 14.290 a | 7.092 bc | 0.284 b | 0.096 b |
| B ₁ C ₃ | 10.168 b | 14.348 a | 0.668a | 0.152 a |
| B ₂ C ₁ | 8.593 b | 5.605 c | 0.298 b | 0.068 c |
| B ₂ C ₂ | 5.75 c | 8.705 b | 0.270 b | 0.067 c |
| B ₂ C ₃ | 3.032 d | 12.858 a | 0.261 b | 0.064c |

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

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

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

هیچ گزارشی در مورد بررسی برهمکنش سه تیمار یاد شده در ریزافزایی سرخس 'بوستونی' وجود ندارد. اما همان طوری که در مقایسه میانگین‌ها مشاهده می‌شود بیشترین تعداد شاخساره در نصف غلظت نمک‌های MS به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر BA تولید شده است (جدول ۵). در این محیط‌ها غلظت بالای سایتوکینین باعث تشکیل ساختارهای سبز کروی شد (شکل ۱-الف). ساختارهای سبز کروی در حضور غلظت کافی نمک‌های معدنی و منبع غنی ساکارز تبدیل به شاخساره‌های جانبی زیادی شده است (شکل ۱-ب). همان طور که در جدول صفات مشاهده‌ای (جدول ۶) نیز مشاهده می‌شود تولید ساختارهای سبز کروی در محیط‌های MS₁، MS₂، MS₄، MS₅، MS₇ و MS₁₀ دیده می‌شود. غلظت BA در محیط‌های MS₁، MS₄، MS₇ و MS₁₀ ۲ میلی‌گرم در لیتر و در MS₃ و MS₅ یک میلی‌گرم در لیتر است. در نصف غلظت نمک‌های MS در غلظت‌های بالای بنزیل‌آدنین (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) هم در ۳۰ و هم در ۲۰ گرم در لیتر ساکارز ساختارهای سبز کروی تشکیل می‌شوند. اما تشکیل ساختارهای سبز کروی در یک چهارم غلظت

نمک های MS در غلظت دو میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین و هر دو غلظت ساکارز صورت می گیرد. اما در غلظت یک میلی گرم در لیتر BA تولید آن مختص به غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز می شود. همان طور که مشاهده می شود در هیچ کدام از تیمارها، تولید ساختارهای سبزکروی در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA مشاهده نشده است (جدول ۶). بنابراین می توان گفت که شرط لازم برای تولید ساختارهای سبزکروی غلظت بالای BA است. اما کافی نیست زیرا ساختارهای سبزکروی در واقع تجمع از سرآغازهای جوانه جانبی به تعداد زیاد هستند (۱۴). و هر چند تشکیل آن پاسخی به غلظت بالای BA است اما رشد و نمو این جوانه ها وابسته به تقسیم و توسعه یافته ای زیاد و سریع است که این خود به مقدار کافی عناصر معدنی و منبع غنی انرژی نیاز دارد (۳). بنابراین ظهور ساختارهای سبزکروی و توسعه آنها به شاخساره های جانبی افزون بر نیاز به غلظت بالای سایتوکینین، به غلظت کافی ساکارز و نمک های معدنی نیاز دارد.

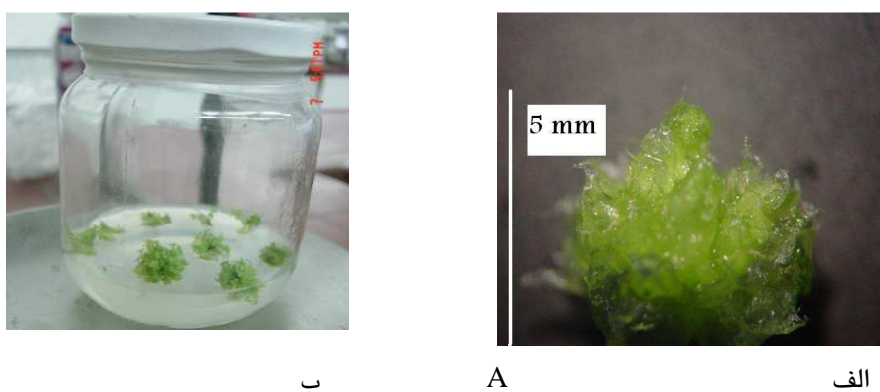


Fig. 1. A: GGB that are formed in high concentration of BA (real dimension about 5 mm).

B: Shoots produced from GGB in MS₁ and MS₂ mediums (the picture is about MS₁).

شکل ۱- الف: ساختارهای سبزکروی تولید شده در غلظت های بالای بنزیل آدنین (ابعاد حقیقی حدود ۵ میلی متر).
ب: شاخساره های حاصل از ساختارهای سبزکروی در محیط کشت های MS₁ و MS₂ (شکل مربوط به محیط کشت MS₁).

همانطور که مشاهده می شود طول ترین شاخساره ها در ۰/۵ غلظت نمک های MS و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA و ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز تولید شده اند (جدول ۵). کلیه محیط هایی که در آن ها کوتاه ترین طول شاخساره مشاهده شد، به جز MS₂ دارای غلظت ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر BA بودند که این بیانگر اثر بازدارندگی سایتوکینین در غلظت بالا بر افزایش طولی یاخته ها و در نتیجه شاخساره ها است (۴). اما در محیط MS₁₂ به دلیل کم بودن غلظت عناصر معدنی و نیز ساکارز نسبت به سایر محیط ها حتی در غلظت های کم BA امکان افزایش طول و توسعه یاخته ای بوجود نیامد.

وزن تر اندام ها و بافت های مختلف در حقیقت شامل وزن خشک و مقدار آب موجود در آن بافت ها و اندام ها است و افزایش هر یک از دو گزینه فوق منجر به افزایش وزن تر می شود (۳). در محیط کشت MS₃ تعداد ۱۳/۴ عدد شاخساره جدید با طول میانگین ۲۰/۳ میلی متر به دست آمد (جدول ۵). و این نشان دهنده غلظت مناسب عناصر معدنی، ساکارز و BA در این محیط جهت رشد و نمو شاخساره های نفرولیپس بود. با توجه به معنی دار نبودن اثر ساکارز بر طول شاخساره ها، در محیط کشت MS₆ نیز افزایش طول شاخساره ها و در نتیجه

افزایش وزن تر مشاهده می‌شود و این محیط در گروه b قرار می‌گیرد. همان طور که بحث شد غلظت‌های یک و دو میلی‌گرم در لیتر BA باعث افزایش تقسیم یاخته ای می‌شود که این خود باعث افزایش جذب آب در یاخته‌های ریزنمونه و افزایش وزن تر آن‌ها می‌شود اما ادامه فعالیت مریستم‌ها نیاز به عناصر معدنی کافی و منبع کربوهیدرات دارد. با توجه به ناکافی بودن میزان عناصر در یک چهارم MS و نیز کم بودن منبع کربن در ۲۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده می‌شود که در محیط‌های MS₁₁ و MS₁₀ برخلاف مقادیر بالای BA، وزن تر تولید شده در پائین‌ترین حد است. محیط کشت MS₁₂ به دلیل کم بودن غلظت عناصر معدنی و ساکارز، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA (در حقیقت نسبت زیاد اکسین درونی به سایتوکینین) امکان تحریک و ایجاد رشد طولی را در شاخساره نداشت. در محیط کشت MS₉ بر خلاف وجود منبع کربن در حد کافی اما عامل محدودکننده غلظت عناصر معدنی محیط کشت است و در نتیجه وزن‌تر در این تیمارها کم شده است.

مقدار آب درون یاخته‌ها با سن و نوع بافت فرق می‌کند. مقدار آب به طور یقین در بافت‌ها و اندام‌های جوان به مراتب بیشتر از بافت‌های متراکم و پیر است (۹). یاخته‌های مریستمی یاخته‌هایی کوچک با دیواره نازک و ظریف، سیتوپلاسم متراکم و فراوان، واکوئل‌های متعدد و بسیار کوچک و فاقد فضای بین یاخته ای هستند (۱۵). در مراحل اولیه تقسیم یاخته ای افزایش اندازه یاخته توسط جذب آب صورت می‌گیرد بنابراین افزایش وزن این یاخته‌ها نتیجه جذب آب و نه افزایش ماده خشک است. طی مراحل تقسیم انتقال مداوم آب به یاخته‌های در حال تقسیم ادامه دارد. افزایش اندازه یاخته گیاهی شامل افزایش چند برابر حجم واکوئل‌ها و گسترش دیواره‌های یاخته است. دیواره‌های یاخته در این مرحله نمو، قدری ضخیم می‌شوند. در بزرگ شدن یاخته پروتوپلاسم اضافی به طور معمول ساخته می‌شود ولی افزایش در مقدار مواد دیواره یاخته ای به طور عمده تحت تأثیر افزایش سلولز و ترکیبات پکتینی تا افزایش مواد پروتوپلاسمی است. جذب آب نیز لازمه مرحله طویل شدن یاخته است (۲۰). بر این اساس، انتظار می‌رود ماده خشک در تیمارهایی (همانند MS₃ و MS₆) که شاخساره‌های تکامل یافته‌تری تولید می‌کنند، بیشتر باشد. در تیمارهایی که تعداد شاخساره‌های جانبی در نتیجه تکثیر مریستمی بیشتر است به نسبت تیمارهای مشابه خود باید وزن خشک کمتری داشته باشند. برای مثال در محیط‌های MS₁ از MS₂، MS₃ و یا MS₄ از MS₅ و MS₆ با اینکه در بعضی موارد اختلافاتی در وزن خشک مشاهده می‌شود اما این اختلاف‌ها از نظر آماری معنی‌دار نیستند و این نشان دهنده نزدیک بودن اثر تیمارها به یکدیگر است. به نظر می‌رسد محیط کشت MS₁₂ به علت فقر عناصر معدنی و نیز منبع کربن محیط مناسبی جهت رشد و نمو ریزنمونه‌های سرخس 'بوستونی' نیست زیرا کمترین ماده خشک در این محیط تولید شده است. در این پژوهش محیط کشت MS₃ باعث بیشترین سنتز و تجمع ماده خشک در ریزنمونه‌ها شد.

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

صفات مشاهده شده شامل وجود ساختارهای سبز کروی، فرم رشد (فشرده یا باز) بود و نتایج مربوط آن در جدول ۶ بیان شده است. در تمام تیمارهای دارای ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به جز MS₁₂، ساختارهای سبز کروی تولید شده و شکل رشد شاخساره از نوع فشرده است. در این فرم رشد طول برگ و فاصله برگچه‌ها کم بوده طوری که طول و عرض برگ به تقریب یکسان است. افزون بر این ریشه‌ها در این تیمارها رشد چندانی نکرده و به صورت توده‌ای از ریشه‌های در هم رفته و کوتاه تشکیل شده اند (شکل ۲- الف).

جدول ۵- برهمکنش غلظت های نمک های معدنی MS، ساکارز و هورمون BA بر صفات اندازه گیری شده در مرحله پرآوری سرخس 'بوستونی'.

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

| Trait تیمار Treatment | تعداد شاخساره Shoot number | طول شاخساره Shoot height (mm) | وزن تر (گرم) Fresh weight of shoots (g) | وزن خشک (گرم) Dried weight of shoots (g) |
|-----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|---|---|
| MS ₁ | 24.773a | 4.677d | 0.348bc | 0.078bcd |
| MS ₂ | 20.83b | 5.663cd | 0.339bc | 0.096bc |
| MS ₃ | 13.42c | 20.27a | 1.134a | 0.145a |
| MS ₄ | 11.55c | 5.343cd | 0.293cd | 0.064de |
| MS ₅ | 6.583d | 9.53b | 0.285cd | 0.069cd |
| MS ₆ | 3.277e | 17.85a | 0.419b | 0.106b |
| MS ₇ | 7.433d | 5.97cd | 0.282cd | 0.059de |
| MS ₈ | 7.75d | 8.52bc | 0.276cd | 0.073cd |
| MS ₉ | 6.917d | 8.41bc | 0.2de | 0.059bcd |
| MS ₁₀ | 5.633de | 5.867cd | 0.194de | 0.033ef |
| MS ₁₁ | 4.917de | 7.88bcd | 0.214de | 0.064de |
| MS ₁₂ | 2.787e | 7.867bcd | 0.102e | 0.022f |

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

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

در فرم رشد باز برگ ها طویل شده، فاصله برگچه ها زیاد بوده، ریشه ها از نوع افشان و طویل هستند. در غلظت های ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA طول شاخساره ها بیشتر بوده و فرم رشد از نوع باز بود (جدول ۶ و شکل ۲-ب). به دلیل اثرهای بازدارنده غلظت بالای سایتوکینین ها بر رشد طولی اندام های هوایی و اثر محرک بر افزایش رشد قطری اندام ها. می توان گفت کلیه صفات مشاهده شده تحت تاثیر غلظت سایتوکینین ها به وجود آمده است که فراهم بودن منبع کربن و عناصر غذایی نیز بر بروز آن ها تاثیر به سزایی داشته است.

نتیجه گیری

از آنجا که بهترین محیط برای پرآوری محیطی است که تولید شاخساره های فراوان و با اندازه کوچک (طول کم) نماید (۷). بنابراین محیط کشت های MS₁ و MS₂ به ترتیب با تولید میانگین ۲۴/۸ شاخساره ۴/۶ میلی متری و ۲۰/۸ شاخساره ۵/۷ میلی متری که از بالاترین میزان پرآوری (گروه های a و b) برخوردار بوده اند و افزون بر این ساختارهای سبز کروی که در واقع تجمعی از شاخساره های جانبی هستند در این محیط ها به تعداد زیاد مشاهده شده است به عنوان بهترین محیط پرآوری سرخس 'بوستونی' معرفی می شوند.

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

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

| Characteristic تیمار Treatment | فرم رشد Growth form | | وجود ساختارهای سبز کروی GGB existence |
|--------------------------------------|------------------------|-------------|--|
| | فشرده Compact | باز Open | |
| | MS ₁ | + | - |
| MS ₂ | + | - | + |
| MS ₃ | - | + | - |
| MS ₄ | + | - | + |
| MS ₅ | + | - | + |
| MS ₆ | - | + | - |
| MS ₇ | + | - | + |
| MS ₈ | × | × | × |
| MS ₉ | - | + | - |
| MS ₁₀ | × | × | × |
| MS ₁₁ | - | + | - |
| MS ₁₂ | - | + | - |

+ observed in more than half of explants.

× observed in about half of explants.

- observed in none of explants.

+ در بیش از نصف نمونه‌ها مشاهده شده است.

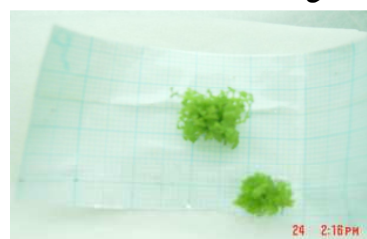
× در حدود نیمی از نمونه‌ها مشاهده شده است.

- در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نشده است.



B

ب



A

الف

Fig. 2. A: Compact form of growth with lots of small shoots short roots forming in medium containing high concentration of BA (MS₁).

B: Open form of growth with long leaves and roots forming in medium containing 0.5 mg l⁻¹ BA (MS₃).

شکل ۲- الف: فرم رشد فشرده دارای تعداد زیاد شاخساره با برگ‌های کوچک، ریشه‌های کوتاه که در محیط‌های

دارای غلظت‌های بالای بنزیل آدنین شکل می‌گیرد (MS₁).

ب: فرم رشد باز دارای برگ‌ها و ریشه‌های طویل و رشد یافته که در محیط‌کشت‌های دارای غلظت ۰/۵

میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین مشاهده می‌شود (MS₃).

سپاسگزاری

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

REFERENCES

منابع

1. خوشخوی، م. ۱۳۷۴. روش های تکثیر گیاهان زینتی. انتشارات دانشگاه شیراز. ۸۴۵ صفحه.
2. شفیع، م. ی. حمیداوغلی، ر. فتوحی قزوینی. ۱۳۸۶. اثر غلظت های نمک های معدنی، ساکارز و بنزین آدنین بر آغازش رشد درون شیشه ای رانزهای سرخس بوستونی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، جلد ۱۱، شماره ۲. صفحات ۱۳۷-۱۴۵.
3. لسانی، ح. و م.، مجتهدی. ۱۳۶۷. مبانی فیزیولوژی گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران. ۷۲۶ صفحه.
4. Arteca, R.N. 1995. Plant Growth Substances, Principles and Applications, Chapman and Hall, New York, U.S.A. 332 p.
5. Banko, T.J. and A.A. Boe. 1975. Effects of pH, temperature, nutrition, ethephon and chlormequat on endogenous cytokinin levels of *Coleus blumei* Benth. Amer. Soc. Hort. Sci. 100:168-172.
6. Bertrand, A.M. M.A. Alberne, H. Fernadez, A. Ganzales and R. Sanchez Tames. 1999. *In vitro* organogenesis of *Polypodium cambricum*. Plant Cell, Tis. Org. Cult. 57:65-69.
7. Byrne, T.E. and J.D. Caponetti. 1992a. Morphogenesis in three cultivars of Boston fern 2: Callus production from stolon tips and plantlet differentiation from callus, Amer. Fern J. 82:1-11.
8. Byrne, T.E. and J.D. Caponetti. 1992b. Morphogenesis in three cultivars of Boston fern 3. Callus production and plantlet differentiation from cell suspensions. Amer. Fern J. 82:12-22.
9. Comloh, M. N. Gogala and R. Ruzic. 1989. The micropropagation of *Nephrolepis exaltata*, Bioloski – Vestnik 37:23-33.
10. Fernandes, H. and M.A. Revilla. 2003. *In vitro* culture of ornamental ferns, Plant Cell, Tis Org Cult 73:1-13.
11. Gonulsen, N., M.K. Onal, E. Ozsezgin and N. Erxan. 1995. *In vitro* propagation of some ferns (*Nephrolepis exaltata*). Anadolu 5:64-73.
12. Guimaraes, R.T.Ch., M. Pasqual and A.M.P. Miranda. 1999. Influence of nitrogen and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of sword fern (*Nephrolepis exaltata* Schott L.), Cienc. e. Argoteco. Lavras. 23:309-316.
13. Henley, R.W. and L.S. Osborne. 2000. Fern production guide. Chase University of Florida Research and Education Center CFREC-A. Foliage Plant Research Note RH-91-8.
14. Higochi, H. and W. Amaki. 1989. Effects of 6-banzylaminopurine on the organogenesis of *Asplenium nidus* L. through *in vitro* propagation, Sci. Hort. 37:351-359.
15. Higuchi, H., W. Amaki and S. Suzuki. 1987. *In vitro* propagation of *Nephrolepis cordifolia prsel*. Sci. Hort. 32:105-113.
16. Hvosef-Eide, A.K. 1992. Influence of nitrogen fertilization to mother plant and the subsequent growth of *Nephrolepis exaltata*(L.) Schott and *Cordylin fruticosa*(L.) A. chev *in vitro* explants. Garten bauwissenschaft 57:292-297.

17. Hvosself-Eide, A.K. 1990. The effect of irradiance and temperature on *in vitro* cultures of *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott and *Cordyline fruticosa* (L.). A. chev., Garten bauwissenschaft 55:259-204.
18. Hvoslef- Eide, A.k. 1991. The effect of temperature, day length and irradiance on the growth of mother plants of *Nephrolepis exaltata*. (L.) Schott and on the subsequent growth *in vitro* of runner tip explants. Sci. Hort. 47:137-147.
19. Kessler, J.R. 2000. Greenhouse production of Boston ferns. Auburn University, www.Ohiofloriculture.com, flori.ag.ohio-state.edu.
20. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays. *Physiol. Plant.*15:473-427.
21. Padhya, M.A. 1987. Mass Propagation of ferns through tissue culture. *Acta Hort.* 212:645-649. 4PL.
22. Pasqual, M. E. Hoshika and J. Susumu Ishida. 1994. Effects of different sucrose and mineral salt concentrations on *in vitro* propagation of *Nephrolepis exaltata*: An ornamental fern. *Pesq. Agropes. Bras, Brasilia.* 29:1681-1684.
23. Teng, W.L. and M.C. Teng. 1997. *In vitro* regeneration patterns of *Platyserium bifurcatum* leaf cell suspensions culture. *Plant Cell Rep.* 16:820-824.
24. Torrest, K.C. 1987. *Tissue Culture Techinques for Horticultural Crops.* Van Nostrand Reinheld, New york, U.S.A.
25. Ziv, M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. *Hort. Rev.* 24:79-93.