Journal of Plant Production Research

Print ISSN: 2322-2050
Online ISSN: 2322-2778

Cultivation of garden thyme plant (*Thymus vulgaris* L.) in vitro and investigating the effects of ventilation, silica and sucrose concentration on its growth and development

Afshin Moradi[1], Behnaz Yousefshahi[2], Dariush Ramezan[*3], Maryam Rahimi[4], Zaynab Mohkami[5], Yusuf Farrokhzad[6]

1. M.Sc. Graduate of Horticulture and Landscape, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. Email: afshinmoradi1387336@yahoo.com
2. Ph.D. Student of Soil Science, Faculty of Agriculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: behnazyousefshahi@gmail.com
3. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Horticulture and Landscape, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. Email: drhorticul@uoz.ac.ir
4. Assistant Prof., Dept. of Horticulture and Landscape, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. Email: mrahimi@uoz.ac.ir
5. Assistant Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Institute of Agricultural Research, University of Zabol, Zabol, Iran. Email: zaynabmohkami@uoz.ac.ir
6. Ph.D. Graduate, Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Email: farrokhzadyusuf@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 11.26.2022
Revised: 01.03.2023
Accepted: 01.15.2024

Keywords:
Anthocyanin,
Antioxidant activity,
Flavonoid,
Tissue culture

ABSTRACT

Background and Objectives: The garden thyme plant (*Thymus vulgaris* L.) belongs to the mint family (Lamiaceae). Garden thyme is considered as a valuable, important and useful plant in the cosmetic and health, therapeutic and medical industries due to having a large amount of effective substances. The purpose of this study was to improve branch processing, produce quality seedlings and reduce the effects of intra-glass stresses such as high humidity, increasing Ethylene concentration in the micro-climate inside the glass and mechanical damage to the explant tissue. Also, limited studies have been done in relation to the in vitro propagation of this plant.

Materials and Methods: To investigate the effects of ventilation, silica and sucrose concentration on the in vitro growth and development of garden thyme (*T. vulgaris*), a research was carried out under a factorial experiment based on a completely randomized design, where the first factor included ventilation at two different levels (with ventilation (0.4 micron head filters were used to carry out the ventilation treatment, which were installed in the lid of the planting containers) and without ventilation) The second factor included silica with four levels (0, 1.5, 3 and 6 mg/L), the third factor included sucrose with three levels (7.5, 15 and 30 g/L) and control (no ventilation). The culture medium used was Murashige and Skoog, which was supplemented with 1 mg/L of kinetin, 0.3 mg/L of gibberellic acid and 8 g/L of agar. The pH of the culture medium was adjusted to 5.8 before autoclaving. The explants used were single nodes of the stem, which were prepared from a growing mass. Traits include: number of branches, branch length, internode length, number of leaves, branch weight, branch dry weight, branch regeneration percentage, explant contamination percentage, root number, root length, root weight, root dry weight, root regeneration percentage, proline, antioxidant activity, plant pigments (chlorophyll, carotenoid, anthocyanin, flavonoid) and seedling survival percentage were measured and evaluated.

Results: The results of the effects of ventilation, silica and different concentrations of sucrose on the evaluated traits It showed that in the simple effects of root male weight, explant contamination percentage and seedling survival percentage in sucrose treatment and antioxidant trait in conditioning treatment and in double effects of root number, root regeneration percentage, root fresh weight, branch length , the number of stomata, flavonoid and chlorophyll b and in the triple effects of root dry weight, proline and chlorophyll a were significant at the 5% probability level. The results of variance analysis of the data showed that the treatments of ventilation, silica and sucrose concentration were not significant at the probability level of 5% in simple effects, but the double and triple effects of these factors had a significant effect on nitrogen (The treatment with 7.5 gr/L of sucrose and ventilation increased the percentage of nitrogen to 1.23).

Conclusion: The present research showed that the effects of ventilation, silica and sucrose concentration on the morphological, physiological and biochemical characteristics of garden thyme plant are different. The treatment of 15 gr/L of sucrose and 1.5 mg of silica along with no ventilation increased the growth parameters of garden thyme plant and branch length. Therefore, according to the obtained results, the use of silica can be considered economical compared to ventilation and it can be suggested as a combination to the culture solution to increase the yield and growth of *T. vulgaris*.

Cite this article: Moradi, Afshin, Yousefshahi, Behnaz, Ramezan, Dariush, Rahimi, Maryam, Mohkami, Zaynab, Farrokhzad, Yusuf. 2024. Cultivation of garden thyme plant (*Thymus vulgaris* L.) in vitro and investigating the effects of ventilation, silica and sucrose concentration on its growth and development. *Journal of Plant Production Research*, 31 (1), 23-46.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/JOPP.2023.20815.2982
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۲۰۵۰
شاپا آنلاین: ۲۳۲۲-۲۷۷۸

کشت درون‌شیشه‌ای گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) و بررسی اثرات تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز بر رشد و نمو آن

افشین مرادی[۱]، بهناز یوسف‌شاهی[۲]، داریوش رمضان*[۳]، مریم رحیمی[٤]، زینب محکمی[٥]، یوسف فرخ‌زاد[٦]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: afshinmoradi1387336@yahoo.com

۲. دانشجوی دکتری گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: behnazyousefshahi@gmail.com

۳. نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: drhorticul@uoz.ac.ir

٤. استادیار گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: mrahimi@uoz.ac.ir

٥. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: zaynabmohkami@uoz.ac.ir

٦. دانش‌آموخته دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. رایانامه: farrokhzadyusuf@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۰۹/۰۵
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۱/۱۰/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۲/۱۰/۲۵

واژه‌های کلیدی:
آنتوسیانین،
فعالیت آنتی‌اکسیدانی،
فلاونوئید،
کشت بافت

چکیده

سابقه و هدف: گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) متعلق به تیره نعناع (Lamiaceae) است. آویشن باغی به‌دلیل داشتن مقدار زیادی مواد مؤثره، در صنایع آرایشی و بهداشتی، درمانی و پزشکی به عنوان یک گیاه با ارزش، مهم و کاربردی محسوب می‌شود. هدف از انجام این مطالعه بهبود پرآوری شاخه، تولید گیاهچه‌های با کیفیت و کاهش اثرات تنش‌های درون‌شیشه‌ای مانند رطوبت بالا، افزایش غلظت اتیلن در خرد-اقلیم درون شیشه و آسیب مکانیکی به بافت ریزنمونه بود. هم‌چنین مطالعات محدودی در ارتباط با تکثیر درون‌شیشه‌ای این گیاه انجام شده است.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی اثرات تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز بر رشد و نمو درون‌شیشه‌ای آویشن باغی (*T. vulgaris*) پژوهشی تحت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی که فاکتور اول شامل تهویه در دو سطح مختلف (دارای تهویه (برای اجرای تیمار تهویه از فیلترهای سرسرنگی ۰/٤ میکرون استفاده شد که در درب ظروف کاشت نصب گردید) و عدم تهویه) فاکتور دوم شامل سیلیس با چهار سطح (صفر، ۱/۵، ۳ و ٦ میلی‌گرم در لیتر) فاکتور سوم شامل ساکارز با سه سطح (۷/۵، ۱۵ و ۳۰ گرم در لیتر) و شاهد (عدم تهویه) بود. محیط کشت مورد استفاده محیط کشت موراشیگ و اسکوک بود که با ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین، ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید و ۸ گرم در لیتر آگار تکمیل شده بود. pH محیط

کشت قبل از اتوکلاو روی ۵/۸ تنظیم شد. ریزنمونه‌های مورد استفاده تک گره‌های ساقه بودند که از یک توده پر رشد تهیه شد. صفاتی شامل: تعداد شاخه، طول شاخه، طول میانگره، تعداد برگ، وزن‌تر شاخه، وزن خشک شاخه، درصد باززایی شاخه، درصد آلودگی ریزنمونه، تعداد ریشه، طول ریشه، وزن‌تر ریشه، وزن خشک‌ریشه، درصد باززایی ریشه، پرولین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، رنگیزه‌های گیاهی (کلروفیل، کاروتنوئید، آنتوسیانین، فلاونوئید) و درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها اندازه‌گیری و مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج اثرات تهویه، سیلیس و غلظت‌های مختلف ساکارز بر صفات مورد ارزیابی نشان داد که در اثرات ساده صفات وزن تر ریشه، درصد آلودگی ریزنمونه و درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها در تیمار ساکارز و صفت فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار تهویه و در اثرات دوگانه صفات تعداد ریشه، درصد باززایی ریشه، وزن تر ریشه، طول شاخه، تعداد روزنه، فلاونوئید و کلروفیل b و در اثرات سه‌گانه صفات وزن خشک ریشه، پرولین و کلروفیل a در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز در سطح احتمال ($P\leq$۰/۰۵) در اثرات ساده معنی‌داری نداشت، ولی اثرات دوگانه و سه‌گانه این فاکتورها بر نیتروژن اثر معنی‌داری داشت (تیمار ۷/۵ گرم در لیتر ساکارز، ۳ میلی‌گرم در لیتر سیلیس و دارای تهویه باعث افزایش درصد نیتروژن به عدد ۱/۲۶ شد).

نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر نشان داد که اثرات تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و زیست شیمیایی گیاه آویشن باغی متفاوت است. تیمار ۱۵ گرم در لیتر ساکارز و ۱/۵ میلی‌گرم سیلیس به همراه عدم تهویه باعث افزایش ویژگی‌های رشدی گیاه آویشن باغی و طول شاخه گردید. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان کاربرد سیلیس را نسبت به تهویه مقرون به‌صرفه دانست و آن را به‌صورت ترکیبی به محلول کشت جهت افزایش عملکرد و رشد گیاه آویشن پیشنهاد کرد.

استناد: مرادی، افشین، یوسف‌شاهی، بهناز، رمضان، داریوش، رحیمی، مریم، محکمی، زینب، فرخزاد، یوسف (۱۴۰۳). کشت درون‌شیشه‌ای گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) و بررسی اثرات تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز بر رشد و نمو آن. *نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی*، ۳۱ (۱)، ۴۶-۲۳.
DOI: 10.22069/JOPP.2023.20815.2982

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) از خانواده Lamiaceae یکی از پرکاربردترین گیاهان معطر است. برگ‌های خشک شده و سرشاخه‌های گلدار آن به عنوان طعم‌دهنده در غذا و نوشیدنی‌ها و به عنوان منبع اسانس برای صنایع دارویی و آرایشی–بهداشتی کاربرد دارند. اسانس‌های استخراج شده از این گیاه، دارای طیف وسیعی از اثرات و خواص درمانی از جمله ضد روماتیسم، ضدعفونی‌کننده، ضد باکتری، مسکن، مدر و خلط‌آور هستند (۱). سیلیس برای رشد گیاه مورد نیاز است. سیلیس حساسیت گیاهان به شوری، دمای پایین و سمیت فلزات را کاهش می‌دهد و از قهوه‌ای شدن اکسیداتیو فنلی در گیاهان مختلف جلوگیری می‌کند. به‌طورکلی، شواهد نشان‌دهنده نقش مثبت سیلیس در بهبود جنبه‌های مختلف کشت بافت گیاه، از جمله تکثیر، اندام‌زایی، انجماد، جنین‌زایی بدنی و تولید متابولیت ثانویه است (۲). بنابراین، استفاده از آن در کشت بافت گیاهی به دلیل مزایای متعدد برای گیاه (۳)، هم در شرایط آزمایشگاهی (٤) و هم خارج از شرایط آزمایشگاهی (۵) پیشنهاد شده است. افزودن سیلیس به محیط کشت به افزایش مقاومت در برابر دماهای پایین در ارکیده *Dendrobium moniliforme* (۵) و به بهبود خصوصیات تشریحی و فیزیولوژیکی آنتوریوم کمک کرده است. در گزارش‌هایی اثرات سیلیکات‌ها و عوامل ژل‌کننده به‌تنهایی، به‌عنوان مواد کمکی برای رشد در شرایط آزمایشگاهی گونه‌های زینتی به‌عنوان مثال سیلیکات پتاسیم در مریم‌گلی (٦) و آگار در گل داودی (۷) نشان داده شده است. یک واقعیت مهم در مورد واکنش ساکارز این است که غلظت خاصی از ساکارز برای رشد گیاه ضروری است. مشخص شده است که گیاهان با تغییرات ریخت‌شناسی و تشریحی و هم‌چنین با تنظیم بیان ژن‌های مختلف از طریق انواع مسیرهای انتقال سیگنال به تغییر محتوای ساکارز پاسخ می‌دهند (۸). گزارش‌شده است که ساکارز می‌تواند به‌عنوان تنظیم‌کننده ژن عمل کند (۹). چندین گزارش کشت بافت به تأثیر منبع کربن بر اندام زایی گونه‌های مختلف گیاهی اشاره دارد. در میان بسیاری از منابع کربن موجود، ساکارز به‌عنوان منبع اصلی معرفی شده است (۱۰). با این‌حال، دلیل متابولیسم سریع آن ممکن است باعث هیپوکسی و تجمع اتانول در سلول‌ها شود (۱۱). در برخی موارد، ساکارز به‌طور کامل یا جزئی با سایر منابع کربن جایگزین می‌شود (۱۱، ۱۲). منابع کربن به‌دلیل کمبود انرژی نور و غلظت کم دی‌اکسیدکربن موجود در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای به محیط کشت اضافه می‌شوند (۱۳). در میان قندهای غیراحیاکننده، ساکارز در شیره آبکش بسیاری از گیاهان رایج است (١٤) و به‌عنوان منبع انرژی در مطالعه‌های ریزازدیادی کارآمد در بسیاری از محصولات میوه استفاده می‌شود (۱۵). غلظت ساکارز از عوامل مهم در مطالعات کشت بافت گیاهی است (١٦). گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد کیفیت شاخه‌های تولید شده در محیط درون‌شیشه‌ای گیاه آویشن پایین است و مشخصه آن‌ها داشتن ساقه‌های ضعیف و کم رنگ، برگ‌های ریز و توسعه نیافته در گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای است (۱۷). ممکن است دلیل این ناهنجاری‌ها غلظت بالای اتیلن و دیگر گازهای درون‌شیشه‌ای و غلظت بالای قند در محیط کشت باشد (۱۷). بنابراین هدف از گنجاندن تیمار تهویه جهت تعویض هوا و کاهش اثرات نامطلوب غلظت اتیلن است. زیرا گزارش شده است که تهویه موجب بهبود رشد و بسط مناسب برگ در کشت‌های درون‌شیشه‌ای گردو می‌شود (۱۸). در اثر تهویه ورود گاز دی‌اکسیدکربن به درون شیشه تسهیل شده که موجب بهبود ویژگی اتوتروف شدن گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای شده و عملکرد روزنه‌ای بهبود می‌یابد.

علاوه بر این ممکن است با کاهش نیاز به افزودن ساکارز به محیط کشت میزان شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها کاهش یابد (۱۹). نقش سیلیس در کاهش تنش‌های گیاهی به‌خوبی آشکار شده است (۲۰). تنش‌های درون‌شیشه‌ای مانند تنش مکانیکی (زخم‌زنی)، تنش اسمزی (بالا بودن قند در محیط کشت و سمیت نیتروژن (غلظت بالای نیتروژن در محیط کشت) و عدم تعادل هورمونی گیاهان را در محیط درون‌شیشه‌ای تحت‌تأثیر قرار داده و تا حدی موجب افزایش غلظت اتیلن در محیط درون‌شیشه‌ای شده که منجر به رشد ضعیف می‌گردد (۲۱). فرض بر این است که تکمیل کشت با سیلیس ممکن است بر تنش‌های درون‌شیشه‌ای اثرگذار بوده و سبب کاهش اثرات آن‌ها شود. بنابراین هدف از انجام این پژوهش بهینه‌کردن تکثیر درون‌شیشه‌ای آویشن باغی و کنترل تنش با استفاده از اعمال تیمارهای تهویه، کاربرد سیلیس و کاهش غلظت قند برون‌زا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل دو سطح تهویه شامل: دارای تهویه و عدم تهویه (شاهد)، سیلیس شامل: چهار سطح به‌ترتیب (۰، ۱/۵، ۳ و ٦ میلی‌گرم در لیتر) و غلظت ساکارز دارای سه سطح (۷/۵، ۱۵ و ۳۰ گرم در لیتر) بودند.

کشت بافت گیاهچه‌ها: بذور آویشن باغی (*T. vulgaris*) از شرکت ظرافت بذر خریداری شد. بعد از شست‌وشو با مایع ظرف‌شویی سه بار با آب مقطر شسته شد و سپس بذرها در قارچ‌کش بنومیل ۲ گرم در یک لیتر آب به مدت ٤٥ دقیقه قرار گرفت. در ادامه آزمایش در محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد روی شیکر به مدت ۸ دقیقه نگهداری شدند. سپس با آب مقطر سه بار آبکشی صورت گرفت. در ادامه زیر هود لامینار به مدت ۳۰ تا ٦۰ ثانیه در الکل اتانول ۷۰ درصد استریل شد و با آب مقطر دیونیزه سه بار آبکشی انجام شد. سپس روی محیط (MS) موراشیک و اسکوک (۲۲) دارای ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید کشت صورت گرفت. درون هر شیشه کشت حدود ۵ بذر کشت شد. تا زمان جوانه‌زنی شیشه‌ها در تاریکی نگهداری شدند. بعد از جوانه‌زنی و ظهور ٦ برگ حقیقی از نوک شاخساره گیاهان قوی و پر رشد به‌عنوان ریزنمونه جهت استقرار کشت استفاده شد. لازم به ذکر است که در تمام مراحل آزمایش pH محیط کشت روی ۵/۷ تنظیم شد. به‌منظور ارزیابی اثر کاهش گاز درون‌شیشه‌ای و بهبود کیفیت شاخساره‌های گیاه *T. vulgaris*، محیط موراشیک و اسکوک با ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک اسید (GA3) تکمیل شد و غلظت ساکارز (۷/۵، ۱۵ و ۳۰) و سیلیس (۰، ۱/۵، ۳ و ٦) به محیط کشت اضافه شد و سپس محیط آماده شده اتوکلاو گردید. برای نصف تیمارها (دارای تهویه) روی درب شیشه‌ها از سرنگ مخصوص تهویه (سرسرنگی ٤٥ دهم میکرومتر) نصب گردید. بعد از تهیه محیط کشت، سرشاخه‌های حاصل از مرحله قبل (جوانه‌زنی بذر) روی این محیط کشت داده شدند. بعد از حدود ٤ هفته و ۲ واکشت پیاپی شاخه‌زایی انجام شد (شکل ۱) و نمونه‌برداری جهت آنالیزهای مختلف صورت گرفت. نوشاخه‌های ریشه‌دار شده حاصل از مرحله ریشه‌زایی متناظر با تیمار مورد استفاده از شیشه خارج شدند و بعد از شست و شوی کامل و حذف آگار، در بستر پیت و پرلیت کشت‌شده و شرایط رطوبتی بهینه با استفاده از سیستم مه‌پاش برای آن‌ها تأمین شد. بعد از سازگاری، درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها و غلظت عناصر ماکرو (نیتروژن، فسفر و پتاسیم) اندازه‌گیری شد.

شکل ۱- کشت درون‌شیشه‌ای گیاه *T. vulgaris* روی محیط کشت موراشیک و اسکوک (MS).

Fig. 1. In vitro cultivation of *T. vulgaris* on the culture medium Murashige and Skoog (MS).

اندازه‌گیری صفات رشدی: تعداد شاخه‌ها و ریشه‌های بزرگ‌تر از ۰/٤ سانتی‌متر به‌عنوان تعداد شاخه ثبت و طول شاخه‌ها و ریشه‌های متناظر هر تیمار به‌عنوان طول شاخه یادداشت شدند. میزان آلودگی ریزنمونه‌ها به‌صورت درصد بیان شد و وزن‌تر و خشک هر نمونه متناظر با تیمار مورد نظر با استفاده از ترازوی دیجیتال تعیین گردید. وزن خشک نمونه‌ها پس از گذشت ٤٨ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد (۲۳).

اندازه‌گیری صفات زیست شیمیایی: غلظت پرولین نمونه‌ها در تولوئن با استفاده از اسکپتروفتومتر در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر و در نهایت با توجه به منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف پرولین بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر محاسبه شد (۲۳). میزان مهار رادیکال‌های 1,1- Diphenyl- 2- picryl-hydrazy (DPPH)، مورد ارزیابی قرار گرفت (٢٤). آنتوسیانین به روش Krizek اندازه‌گیری شد (۲۵). برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل از روش لیختن تالر و بوخمن (٢٦) استفاده شد. بدین‌صورت که توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Jenway ساخت کشور انگلستان) میزان جذب کلروفیل a و b در طول‌های موج ٦٤٦ و ٦٦٣ و میزان کاروتنوئید در طول موج ٤۷۰ نانومتر قرائت شد و میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید (بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر) محاسبه گردید.

اندازه‌گیری عناصر معدنی گیاه: میزان نیتروژن گیاه با استفاده از دستگاه کجدال اندازه‌گیری شد (۲۷). فسفر به روش اولسون (۲۸) و پتاسیم با دستگاه فلیم فتومتر (۲۹) اندازه‌گیری شد.

تجزیه داده‌ها: تجزیه آماری و مقایسه میانگین داده‌های به‌دست آمده با نرم‌افزار SAS انجام و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

در مطالعه حاضر اثر برهمکنش سه‌گانه تیمارهای تهویه، سیلیس و ساکارز در سطح احتمال (P≤۰/۰۵) بر تعداد ریشه اثر معنی‌داری نداشت ولی اثر دوگانه سیلیس در ساکارز بر تعداد ریشه اثر معنی‌دار داشت. با این‌حال غلظت سیلیس و ساکارز تعداد ریشه را در این گیاه افزایش داد که بیش‌ترین تعداد ریشه از گیاهان تیمار شده با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سیلیس باعث افزایش میانگین تا عدد ۲۰/۸۳ شد. کم‌ترین تعداد ریشه از گیاهان تیمار شده با ۳ میلی‌گرم در لیتر سیلیس و ۷/۵ گرم در لیتر ساکارز با میانگین ۱۶/۱۶ از تعداد ریشه شد (جدول ۱). در اثرات ساده هم معنی‌داری مشاهده نشد. هم‌چنین اثر برهمکنش سه‌گانه این فاکتورها در سطح احتمال (P≤۰/۰۵) بر درصد باززایی ریشه اثر معنی‌داری نداشت ولی اثر دوگانه سیلیس در ساکارز بر درصد باززایی ریشه اثر معنی‌دار داشت. با این‌حال غلظت سیلیس و ساکارز درصد باززایی ریشه را در این گیاه افزایش داد که بیش‌ترین درصد باززایی ریشه از گیاهان تیمار شده با ۷/۵ گرم در لیتر ساکارز و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سیلیس باعث افزایش میانگین تا ۸۶/۹۷ درصد و کم‌ترین درصد باززایی ریشه از گیاهان تیمار شده با ۳ میلی‌گرم در لیتر سیلیس و ۷/۵ گرم در لیتر ساکارز با میانگین ۷۰/۱۳ درصدی باززایی ریشه شد (جدول ۱). در اثرات ساده هم معنی‌داری مشاهده نشد. بررسی اثر غلظت‌های مختلف ساکارز بر ریز ازدیادی موز، بیش‌ترین تعداد و طول ریشه در غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز به دست آمد. گزارش شده است که افزایش غلظت ساکارز بیش‌تر از ۴۰-۶۰ گرم در لیتر (بسته به نوع گیاه) به علت برهم زدن تعادل اسمزی، باززایی و رشد گیاه را دچار اختلال می‌کند (۳۰). ترکیبات فنلی در شرایط استرس انباشته می‌شوند و بخشی از مجموعه آنتی‌اکسیدانی گیاهان هستند (۳۱). نتایج ما می‌تواند با بقا و عملکرد گیاهان تارا در شرایط آزمایشگاهی مرتبط باشد زیرا محتوای ترکیبات فنلی با سطح برگ و درصد ریشه‌زایی همبستگی دارد. ترکیبات فنلی موجود در برگ‌ها سنتز شده و در غشای تیلاکوئید تجمع می‌یابند (۳۲). ماهیت مواد حمایت‌کننده برای ریشه‌زایی تأثیر قابل‌توجهی بر رشد و کیفیت گیاهان در شرایط آزمایشگاهی دارد. جایگزینی آگار معمولی با مواد متخلخل به‌طور قابل‌توجهی محیط ریشه و درنتیجه ویژگی‌های آناتومیکی ریشه‌ها مانند درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه در هر بوته را بهبود می‌بخشد (۳۳). تخلخل بیش‌تر بستر احتمالاً تبادل گازی بیش‌تر در ناحیه ریشه‌زایی را تسهیل می‌کند، درنتیجه سطح اکسیژن اطراف را افزایش می‌دهد و سپس رشد ریشه و جذب آب و مواد مغذی را بهبود می‌بخشد. علاوه‌بر این، هنگامی‌که ساکارز در محیط آگار موجود باشد، رشد بهتر برگ در کوکو زینتی (*Alocasia amazon* L.) و نارگیل (*Cocos nucifera* L.) گزارش‌شده است (۳۴).

جدول ۱- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای سیلیس و غلظت ساکارز بر تعداد ریشه و درصد باززایی ریشه درگیاه آویشن باغی.

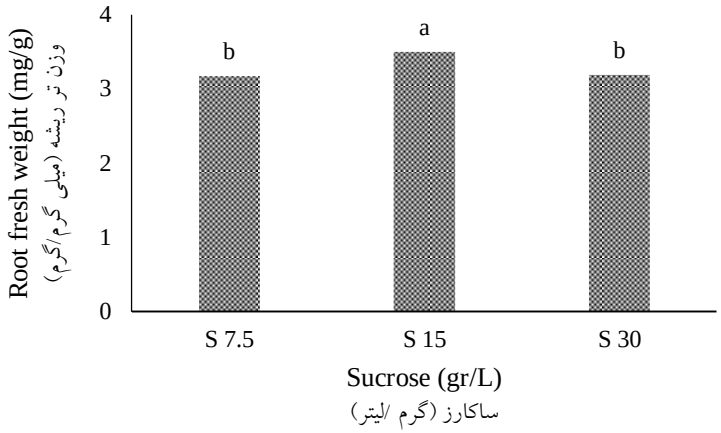
Table 1. Comparison of the mean effects of silica treatments and sucrose concentration on root number and root regeneration percentage in *T. vulgaris*.

درصد باززایی ریشه Root regeneration (%)	تعداد ریشه Roots number (n)	تیمار Treatment
76.63 [ab]	16.50 [d]	si 0 × s(7.5)
86.97 [a]	18.66 [bc]	si 1.5 × s(7.5)
70.13 [b]	16.16 [d]	si 3 × s(7.5)
85.28 [a]	16.50 [d]	si 6 × s(7.5)
76.99 [ab]	17.66 [cd]	si 0 × s(15)
75.97 [ab]	17.50 [cd]	si 1.5 × s(15)
83.77 [a]	18.50 [c]	si 3 × s(15)
86.13 [a]	18.83 [bc]	si 6 × s(15)
76.64 [ab]	18.83 [bc]	si 0 × s(30)
82.01 [ab]	20.83 [a]	si 1.5 × s(30)
76.95 [a]	20.50 [ab]	si 3 × s(30)
80.18 [ab]	19.33 [abc]	si 6 × s(30)

[*] مقادیر (میانگین‌ها) با استفاده از آزمون دانکن در هر ستون با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح P≤۰/۰۵ ندارند

* Values (means) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at P≤0.05 according to Duncan's test (Si= silica, S= sucrose)

اثر برهمکنش سه‌گانه تیمارهای تهویه، سیلیس و ساکارز و دوگانه این فاکتورها در سطح احتمال (P≤۰/۰۵) بر وزن تر ریشه اثر معنی‌داری نداشت. با این‌حال غلظت ساکارز وزن تر ریشه را در این گیاه افزایش داد و بیش‌ترین میانگین (۳/۵۰ میلی‌گرم بر گرم) مربوط به تیمار ۱۵ گرم در لیتر ساکارز و کم‌ترین میانگین وزن تر ریشه (۳/۱۷ میلی‌گرم بر گرم) از گیاهان تیمار شده ۷/۵ گرم در لیتر ساکارز ثبت شد (شکل ۲). مطالعات آزمایشگاهی که اثرات سیلیکات پتاسیم را بر ویژگی‌های رشد بگونیا سمپرفلورنس و بنفشه (Viola × wittrockiana) بررسی کردند، نشان می‌دهند که سیلیس به‌طور قابل‌توجهی وزن‌تر ریشه، محتوای کلروفیل و سطح برگ بگونیا و بنفشه را افزایش می‌دهد (۳۵). نتایج مطالعه دیگری که به بررسی اثرات منابع مختلف سیلیس مانند Na_2SiO_3، K_2SiO_3 و $CaSiO_3$ بر خصوصیات تشریحی و رشد نهال توت‌فرنگی (Fragaria × ananassa) پرداخت، نشان داد که وزن‌تر و خشک گیاهچه در محیط کشت مکمل MS افزایش یافت (۳۶).



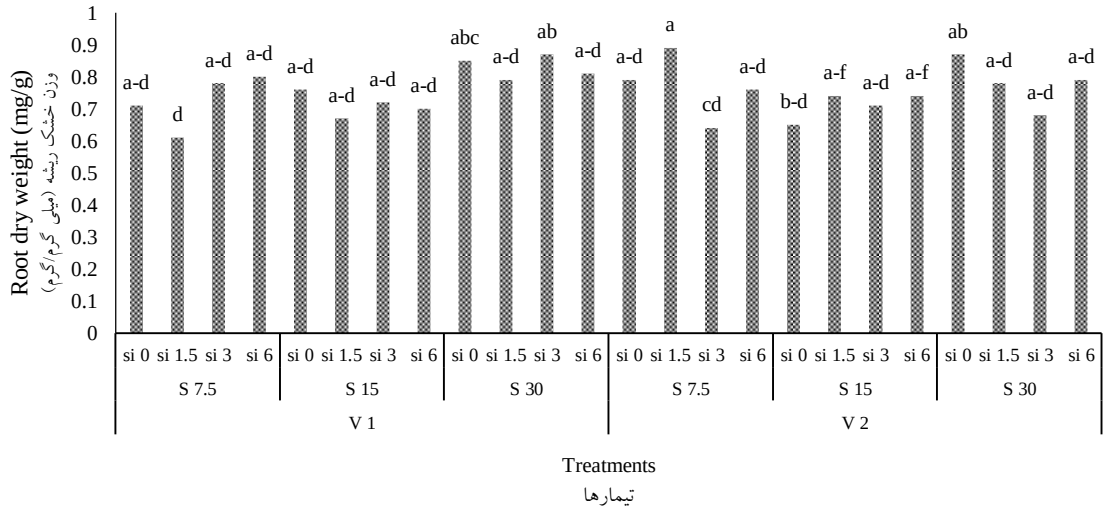
شکل ۲- مقایسه میانگین اثرات غلظت ساکارز بر وزن تر ریشه در گیاه آویشن باغی.

Fig. 2. Comparison of the mean effects of sucrose concentration on root fresh weight in *T. vulgaris*.

*** مقادیر (میانگین‌ها) با استفاده از آزمون دانکن در هر ستون با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح P≤۰/۰۵ ندارند**

*** Values (means) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at P≤0.05 according to Duncan's test (S= Sucrose)**

اثر برهمکنش سه‌گانه تیمارهای تهویه، سیلیس و ساکارز در سطح احتمال (P≤۰/۰۵) بر وزن خشک ریشه اثر معنی‌داری داشت ولی در اثرات دوگانه و ساده اثر معنی‌داری مشاهده نشد. با این‌حال اثرات سه‌گانه تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز وزن خشک ریشه را در این گیاه افزایش داد. بیش‌ترین و کم‌ترین وزن خشک ریشه از گیاهان تیمار شده با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سیلیس، ۱۵ گرم در لیتر ساکارز و عدم تهویه باعث افزایش میانگین به عدد ۰/۸۹ میلی‌گرم بر گرم و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سیلیس، ۱۵ گرم در لیتر ساکارز و دارای تهویه باعث کاهش میانگین به عدد ۰/٦۱ میلی‌گرم بر گرم شد (شکل ۳). غلظت ساکارز ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر بیش‌ترین کاربرد را در مطالعات کشت بافت گیاهی دارد. فقدان قند مشکلات آلودگی را در محیط کشت کاهش می‌دهد و به گیاهان اجازه می‌دهد تا به‌صورت اتوتروف در شرایط آزمایشگاهی رشد کنند، زمانی که CO_2 کافی تأمین می‌شود، شدت نور افزایش می‌یابد (۱٦). گزارش شده است که غلظت ساکارز (٤۵ گرم در لیتر) برای تشکیل ریشه در توت‌فرنگی Campinas cv. ایده‌آل است (۳۷). بااین‌حال، در غیاب این قند، ریشه درکشت آزمایشگاهی تشکیل نمی‌شود. در ناحیه ریشه، سیلیس باعث رشد و نمو ریشه با جذب مواد مغذی و آب می‌شود. به‌طور خاص، کاربرد سیلیس باعث افزایش وزن تازه و خشک‌ریشه‌ها و زوایای انشعاب آن‌ها در شرایط تنش فلزات سنگین می‌شود (۳۸). در یک پژوهش اضافه کردن سیلیس در غلظت‌های غذایی ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، سبب افزایش غلظت این عنصر در وزن خشک‌ریشه خیار شد و به‌طور معناداری افزایش یافت (۳۹). در گزارش دیگری تأثیر منابع مختلف کربن (ساکارز، گلوکز، فروکتوز و مالتوز) و غلظت‌های مختلف آن‌ها در تکثیر خرما رقم خنیزی به روش اندام‌زایی مستقیم در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد افزایش غلظت قند سبب افزایش در وزن خشک گیاهان تولید شده گردید و اثر گلوکز، فروکتوز و مالتوز با اثر ساکارز به‌عنوان منبع کربن در کشت بافت خرما برابر بود (٤۰).



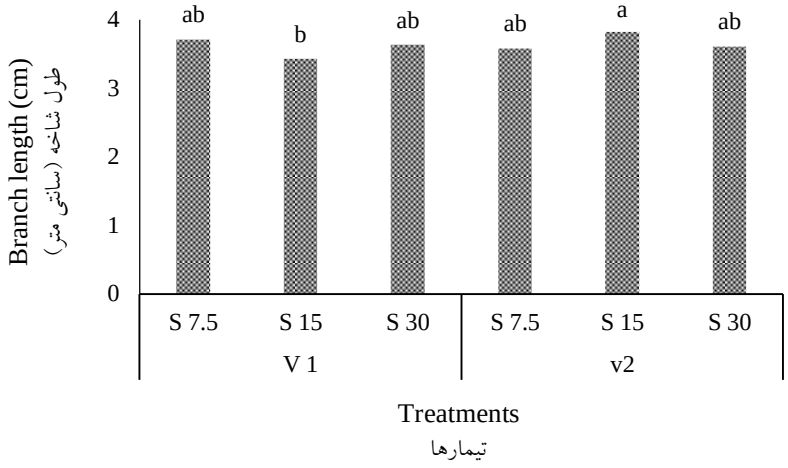
شکل ۳- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای سیلیس، غلظت ساکارز و تهویه بر وزن خشک ریشه در گیاه آویشن باغی.

Fig. 3. Comparison of the mean effects of silica treatments, sucrose concentration and ventilation on root dry weight in *T. vulgaris*.

*** مقادیر (میانگین‌ها) با استفاده از آزمون دانکن در هر ستون با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح P≤۰/۰۵ ندارند**

*** Values (means) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at P≤0.05 according to Duncan's test (Si= Silica, S= Sucrose, V1= Ventilation, V2= Unventilation)**

اثر برهمکنش سه‌گانه تیمارهای تهویه، سیلیس و ساکارز در سطح احتمال (P≤۰/۰۵) بر طول شاخه اثر معنی‌داری نداشت ولی اثر دوگانه تهویه و ساکارز بر طول شاخه اثر معنی‌داری داشت. با این‌حال تهویه و غلظت ساکارز طول شاخه را در این گیاه افزایش داد که بیش‌ترین و کم‌ترین طول شاخه از گیاهان تیمار شده با ۱۵ گرم در لیتر ساکارز و عدم تهویه باعث افزایش میانگین عدد ۳/۸۲ سانتی‌متر و ۱۵ گرم در لیتر ساکارز و دارای تهویه باعث کاهش میانگین عدد ۳/٤۳ سانتی‌متر از طول شاخه حاصل شد (شکل ٤). در اثرات ساده معنی‌داری مشاهده نشد. در پژوهشی مشخص گردید که ساکارز با غلظت ٤٥ گرم در لیتر می‌تواند محرک خوبی برای افزایش تولید هیوسیامین و اسکوپولامین با ارزش دارویی بالا در گیاه تاتوره باشد. در تیمار ساکارز ٤٥ گرم در لیتر میزان وزن تر اندام هوایی و ریشه افزایش معنی‌داری به ترتیب ۵/۷ و ۳/۵ برابر در مقایسه با غلظت ۱۵ گرم در لیتر مشاهده شد. تیمار ساکارز ۳۰ گرم در لیتر موجب افزایش دو برابری میزان وزن تر بخش هوایی نسبت به تیمار ۱۵ گرم در لیتر شد در حالی‌که میزان وزن تر ریشه و اندام هوایی در تیمار ساکارز ۱۵ گرم در لیتر از همه تیمارها کم‌تر بود (٤۱). در آزمایشی مشخص گردید که بیش‌ترین تعداد نوساقه تولید شده در هر ریزنمونه و بلندترین آن‌ها به ترتیب در محیط کشت حاوی ۳۰ گرم در لیتر شکر معمولی و ساکارز مشاهده شد (٤۲). گزارش‌شده است که حضور ساکارز در محیط باززایی ارکیده (*Calanthe hybrids*) سبب افزایش تعداد، طول شاخه و برگ در مقایسه با محیط کشت بدون ساکارز شد (٤۳). مطالعات نشان می‌دهد که سیلیس می‌تواند در کاهش تنش شوری در گیاهان مختلف مؤثر باشد. مکمل سیلیس به محیط کشت، القای اندام هوایی و میانگین تعداد شاخساره در هر ریزنمونه را افزایش می‌دهد (٤٤). گزارش شده که سیلیس می‌تواند برای بازسازی شاخساره در برنج (٤۵) و نی (٤٦) مؤثر باشد.



شکل ٤- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای غلظت ساکارز و تهویه بر صفت طول شاخه در گیاه آویشن باغی.

Fig. 4. Comparison of the mean effects of sucrose concentration treatments and ventilation on branch length in *T. vulgaris*.

*** مقادیر (میانگین‌ها) با استفاده از آزمون دانکن در هر ستون با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح P≤۰/۰۵ ندارند**

*** Values (means) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at P≤0.05 according to Duncan's test (S= Sucrose, V1= Ventilation, V2= Unventilation)**

اثر برهمکنش سه‌گانه و دوگانه تیمارهای تهویه، سیلیس و ساکارز بر درصد زنده‌مانی گیاهچه اثر معنی‌داری نداشت. با این‌حال غلظت ساکارز در اثرات ساده درصد زنده‌مانی گیاهچه را در این گیاه افزایش داد که بیش‌ترین و کم‌ترین درصد زنده‌مانی گیاهچه از گیاهان تیمار شده با ۳۰ و ۱۵ گرم در لیتر ساکارز باعث افزایش و کاهش ۸۷/٦٤ و ۵۱/۲٦ درصد زنده‌مانی گیاهچه حاصل شد (جدول ۲). هم‌چنین اثر برهمکنش سه‌گانه و دوگانه این فاکتورها بر درصد آلودگی ریزنمونه اثر معنی‌داری نداشت. با این‌حال غلظت ساکارز در اثرات ساده درصد آلودگی ریزنمونه را در این گیاه افزایش داد که بیش‌ترین و کم‌ترین درصد آلودگی ریزنمونه از گیاهان تیمار شده با ۷/۵ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز باعث افزایش و کاهش ۲۱/۹۲ و ۱۹/۳۱ درصد آلودگی ریزنمونه حاصل شد (جدول ۲). گیاهانی که در آگار بدون ساکارز و با تهویه کم (یک فیلتر) رشد کرده بودند، در طول شرایط آزمایشگاهی با سازگاری زنده ماندند، درحالی‌که گیاهان دارای تهویه بیش‌تر و بدون ساکارز، با درصد بسیار کم‌تر زنده ماندند. در حضور ساکارز و با تهویه بالا درصد گیاهان زنده مانده بیش‌تر بود. بنابراین، حضور ۳۰ گرم در لیتر ساکارز در تیمارهای آگار مهم‌تر از تهویه بود. برعکس، در پایه ویتیس 'BB۵'، تبادل گازی در رگ‌های کشت مهم‌تر از غلظت ساکارز برای رشد در شرایط آزمایشگاهی بعدی بود (٤٧)، و تکثیر فوتواتوتروفیک در شرایط آزمایشگاهی جینسینگ برزیلی با افزایش ساکارز افزایش یافت. تهویه منجر به ۱۰۰ درصد بقا در سازگاری شد (٤٨). ساکارز، گلوکز، مالتوز، گالاکتوز و سوربیتول منابع کربوهیدرات مورداستفاده درکشت بافت می‌باشند. اغلب از ۲-۵ درصد ساکارز در کشت بافت استفاده می‌شود و به‌طور متوسط برای کشت بافت نخل خرما از ۳ درصد ساکارز استفاده می‌شود (٤٩). با استفاده از تهویه در ظرف کشت، از بروز هیدرسیته برگ در سیب‌زمینی (۵۰) و اکالیپتوس (۵۱) جلوگیری شده است. وزن خشک کم‌تر شاخه‌های هیپر هیدراته به

محتوای بالای آب شاخه‌ها نسبت داده شد (۵۲). شرایط محیطی نامناسب (مانند رطوبت نسبی بالا، دمای ثابت هوا، تجمع اتیلن، فشار اسمزی بالای محیط کشت به دلیل وجود قند و آمونیوم، غلظت هورمون نامتعادل، آب‌بندی ظروف کشت و غیره) باعث اختلالات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی گیاهچه‌های آزمایشگاهی گردید. نتایج نشان داد رشد کلی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، با استفاده از سیستم تهویه، بهترین مقدار بود.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات غلظت ساکارز بر صفت درصد زنده‌مانی گیاهچه و درصد آلودگی ریزنمونه در گیاه آویشن باغی.

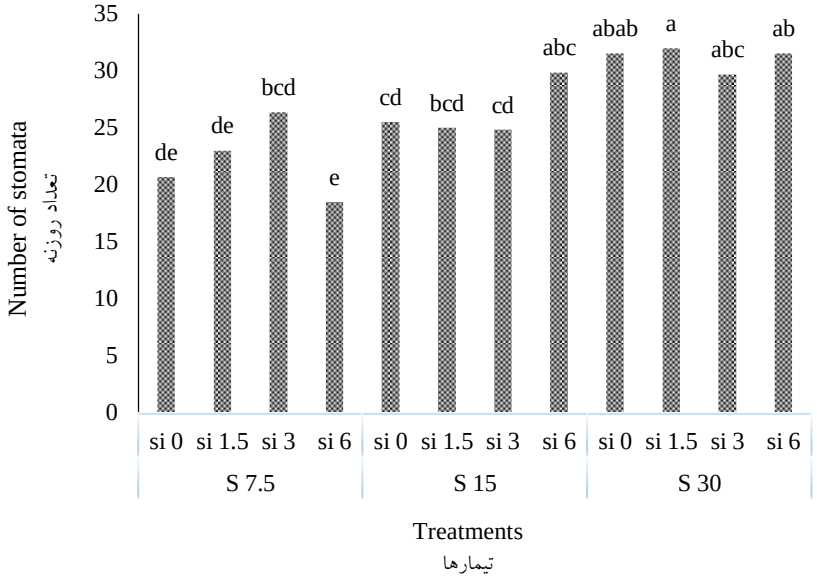
Table 2. Comparison of the mean effects of sucrose concentration on seedling survival percentage and explant contamination percentage in *T. vulgaris*.

تیمار Treatment	درصد زنده‌مانی گیاهچه (درصد) Seedling survival (%)	درصد آلودگی ریزنمونه (درصد) Explant contamination (%)
s(7.5)	85.37 [ab]	21.92 [a]
s (15)	51.26 [b]	20.86 [ab]
s (30)	87.64 [a]	19.31 [b]

* مقادیر (میانگین‌ها) با استفاده از آزمون دانکن در هر ستون با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح P≤۰/۰۵ ندارند

* Values (means) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at P≤0.05 according to Duncan's test (S= Sucrose)

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز در سطح احتمال (P≤۰/۰۵) در اثرات ساده بر تعداد روزنه اثر معنی‌داری نداشت ولی در اثرات دوگانه سیلیس و ساکارز بر تعداد روزنه اثر معنی‌دار داشت. بااین‌حال اثرات دوگانه سیلیس و غلظت ساکارز تعداد روزنه را در این گیاه افزایش داد که بیش‌ترین تعداد روزنه از گیاهان تیمار شده با ۰ میلی‌گرم در لیتر سیلیس و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز باعث افزایش میانگین به عدد ۳۱/۵۰ و کم‌ترین تعداد روزنه از گیاهان تیمار شده ٦ میلی‌گرم در لیتر سیلیس و ۷/۵ گرم در لیتر ساکارز باعث کاهش میانگین به عدد ۱۸/۵۰ از تعداد روزنه شد (شکل ۵). اثرات سه‌گانه این فاکتورها بر تعداد روزنه اثر معنی‌داری نداشت. مطالعات انجام شده بر روی توانایی فتوسنتزی قهوه نشان داد که قرار دادن جنین در زیر یک PPF بالا (۱۰۰-۱۵۰ میکرومول در مترمربع) به مدت ١٤ روز به تولید کلروفیل و توسعه روزنه‌ها کمک می‌کند و درنتیجه توانایی فتوسنتزی را افزایش می‌دهد (۵۲). گزارش شده گیاهانی که تحت شرایط فوتواتوتروفیک در مواد متخلخل رشد می‌کنند، کنترل تعرق را برای چنین شرایطی ایجاد می‌کنند و بنابراین هنگام قرار گرفتن در شرایط محیطی خارج از شرایط آزمایشگاه، اتلاف آب کم‌تری دارند (۵۳). نتایج حاصل با یافته‌های ما در مورد افزایش بسته شدن روزنه در گیاهان رشد یافته در مخلوط یا اتوتروفی، به‌ویژه آن‌هایی که در شرایط فوتواتوتروفیک رشد کرده‌اند، مطابقت دارد. گزارش‌های ذکرشده و نتایج ما در مورد بقای سازگاری نشان می‌دهد که ویژگی‌های فیزیکی بستر و منبع کربن درکشت درون‌شیشه‌ای بر درصد بقای خارج از آزمایشگاه تأثیر می‌گذارد (٥٤).



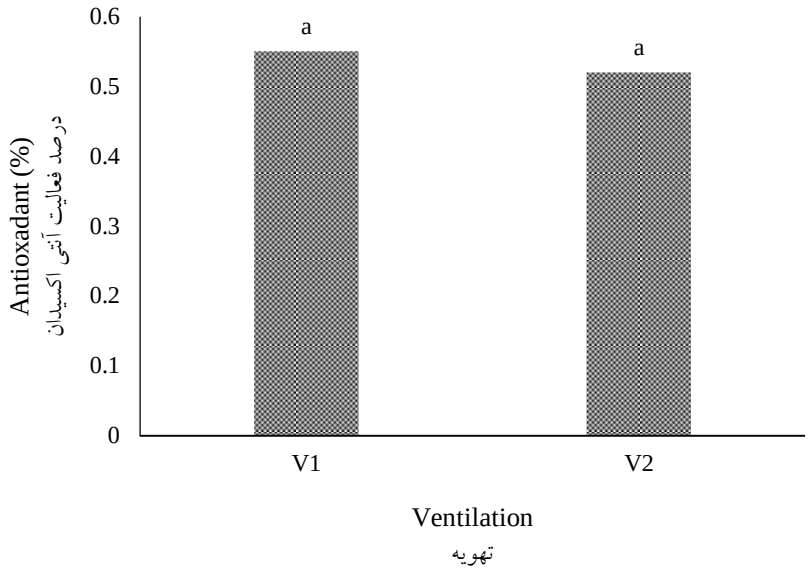
شکل ۵- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای سیلیس و غلظت ساکارز بر صفت تعداد روزنه در گیاه آویشن باغی.

Fig. 5. Comparison of the mean effects of silica treatments and sucrose concentration on number of stomata in *T. vulgaris*.

*** مقادیر (میانگین‌ها) با استفاده از آزمون دانکن در هر ستون با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح P≤۰/۰۵ ندارند**

*** Values (means) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at P≤0.05 according to Duncan's test (Si= Silica, S= Sucrose)**

اثر برهمکنش سه‌گانه و دوگانه تیمار تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز در سطح احتمال (P≤۰/۰۵) بر ظرفیت آنتی‌اکسیدان اثر معنی‌داری نداشت. با این‌حال تیمار تهویه در اثرات ساده ظرفیت آنتی‌اکسیدان را در این گیاه افزایش داد و بیش‌ترین و کم‌ترین ظرفیت آنتی‌اکسیدان از گیاهان تیمار شده ۰/۵۵ درصد و دارای تهویه و ۰/۵۲ درصد و بدون تهویه (شاهد) مشاهده و معنی‌دار شد (شکل ٦). نتایج پژوهشی نشان داد که از میان غلظت‌های مختلف مانیتول جهت تولید آنتوسیانین، غلظت ۳ درصد آن به همراه ساکارز ۳ درصد، بیش‌ترین تأثیر را داشت. با افزایش غلظت مانیتول، میزان شاخص رشد کالوس کاهش و وزن خشک کالوس افزایش یافت. هم‌چنین بین تیمارهای ساکارز بیش‌ترین میزان تولید آنتوسیانین و کم‌ترین میزان شاخص رشد در غلظت ٦ درصد مشاهده گردید (۵۵).



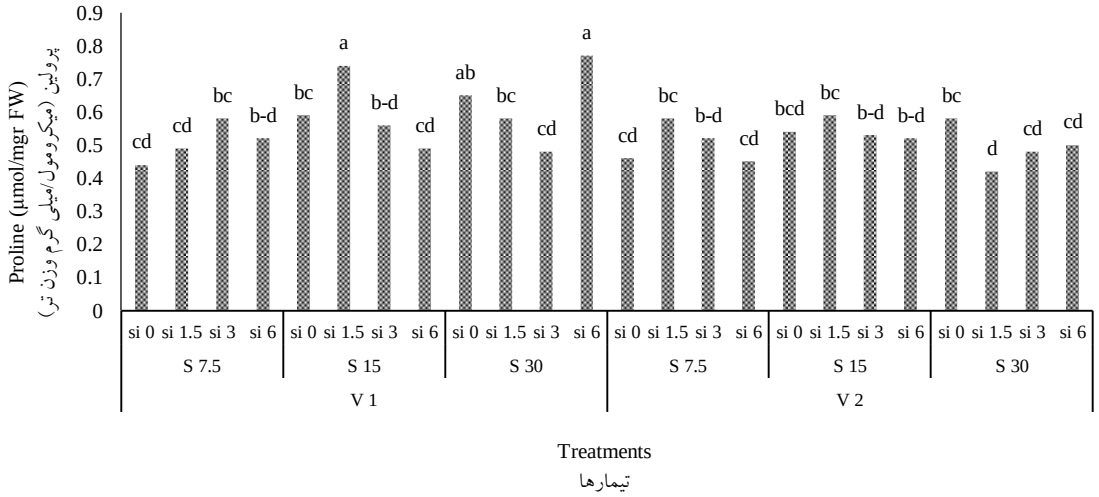
شکل ٦- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای تهویه بر صفت درصد فعالیت آنتی‌اکسیدان در گیاه آویشن باغی.

Fig. 6. Comparison of the mean effects of ventilation treatments antioxidant activity percentage in *T. vulgaris*.

*** مقادیر (میانگین‌ها) با استفاده از آزمون دانکن در هر ستون با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح P≤۰/۰۵ ندارند**

*** Values (means) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at P≤0.05 according to Duncan's test (V1= Ventilation, V2= Unventilation)**

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز در سطح احتمال (P≤۰/۰۵) در اثرات ساده و دوگانه معنی‌داری نداشت ولی در اثرات سه‌گانه تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز بر پرولین اثر معنی‌دار داشت. بااین‌حال اثرات تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز پرولین را در این گیاه افزایش داد که بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار پرولین از گیاهان تیمار شده با ٦ میلی‌گرم در لیتر سیلیس، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و دارای تهویه باعث افزایش میانگین به عدد ۰/۷۷ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سیلیس، ۷/۵ گرم در لیتر ساکارز و عدم تهویه (شاهد) باعث کاهش میانگین به عدد ۰/٤۲ شد (شکل ۷). تصور بر این است که پروتئین‌های غنی از سرین، پروتئین‌های غنی از پرولین و سایر پلی‌ساکاریدها در تجمع سیلیس دخیل هستند (٥٦). به‌طور گسترده گزارش شده است که سیلیس می‌تواند تنش‌های فیزیکی و شیمیایی را سرکوب کند. به‌عنوان مثال، گزارش گردیده که تیمار سیلیس با افزایش پرولین آزاد، پروتئین محلول و قند محلول و با کاهش محتوای MDA، تحمل سرما را در *Dendrobium moniliforme* افزایش می‌دهد (٥٧). گزارش‌هایی وجود دارد که تحمل شوری ناشی از سیلیس را درنتیجه کاهش جذب NaCl توسط گیاهان و درنتیجه حفظ فراساختار روزنه، فعالیت فتوسنتزی، تولید آنزیم آنتی‌اکسیدانی و تعدیل محتوای پرولین آزاد را نشان می‌دهد (٤٤).



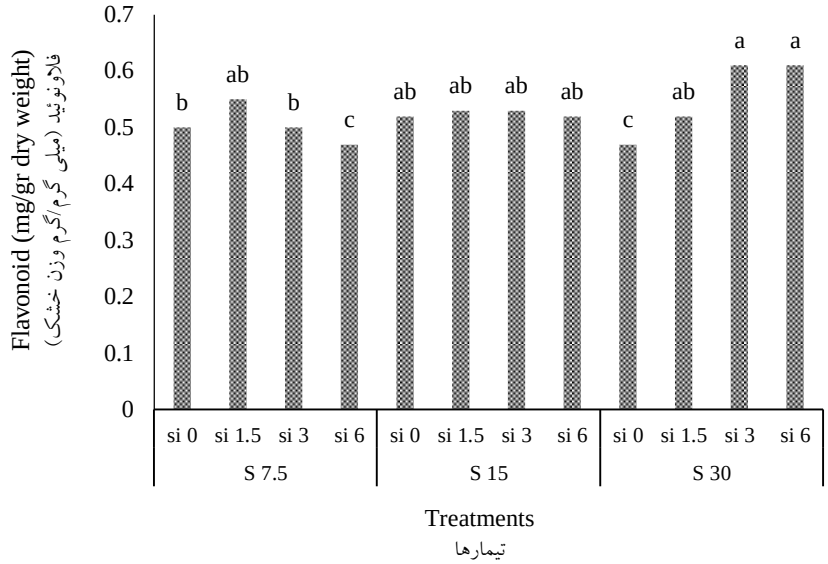
شکل ۷- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای سیلیس، غلظت ساکارز و تهویه بر صفت پرولین درگیاه آویشن باغی.

Fig. 7. Comparison of the mean effects of silica treatments, sucrose concentration and ventilation on Proline in *T. vulgaris*.

*** مقادیر (میانگین‌ها) با استفاده از آزمون دانکن در هر ستون با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح P≤۰/۰۵ ندارند**

*** Values (means) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at P≤0.05 according to Duncan's test (Si= Silica, S= Sucrose, V1= Ventilation; V2= Unventilation)**

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز در سطح احتمال (P≤۰/۰۵) در اثرات ساده معنی‌داری نداشت. ولی در اثرات دوگانه سیلیس و ساکارز بر فلاونوئید اثر معنی‌دار داشت. بااین‌حال اثرات دوگانه سیلیس و غلظت ساکارز فلاونوئید را در این گیاه افزایش داد که بیش‌ترین و کم‌ترین فلاونوئید از گیاهان تیمار شده با ٦ و ۳ میلی‌گرم در لیتر سیلیس، ۳۰ و ۷/۵ گرم در لیتر ساکارز به ترتیب باعث افزایش و کاهش میانگین به عدد ۰/٦۱ و ۰/٤۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک فلاونوئید شد (شکل ۸). در اثرات سه‌گانه این فاکتورها بر فلاونوئید اثر معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج ما افزایش قابل‌توجه رشد در گیاهان دارای تهویه که انتقال بهتر گازها و کاهش رطوبت داخلی را فراهم می‌کند با گزارشات (۵۸، ۵۹) مطابقت دارد. تحت این شرایط، گیاهان جذب مواد مغذی و آب از محیط را آسان‌تر می‌کنند (۵۸)، بنابراین منجر به بهبود رشد می‌شود. ساکارز از پرمصرف‌ترین منابع کربن درکشت بافت گیاهی است، زیرا با رشد بیش‌تر، انبساط برگی و افزایش زیست‌توده همراه است (٦۰). کشت در شرایط آزمایشگاهی بدون ساکارز منجر به کاهش نرخ تکثیر گیاه می‌شود (۳٤). اندازه‌گیری‌های رشد ما این شواهد را تأیید کرد. سطوح مختلف تبادل گاز منجر به تغییرات آناتومیکی در برگ گیاهان رشدیافته در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. گیاهان سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) که در بطری‌های بدون تبادل گاز کشت می‌شوند، ضخامت برگ کم‌تری را نشان می‌دهند (٦۱). گیاهانی که در بطری‌های بدون غشا رشد می‌کنند در معرض محیطی با رطوبت بالا قرار می‌گیرند که تقاضا برای آب و درنتیجه تراکم بافت آوندی را کاهش می‌دهد (٦۲).



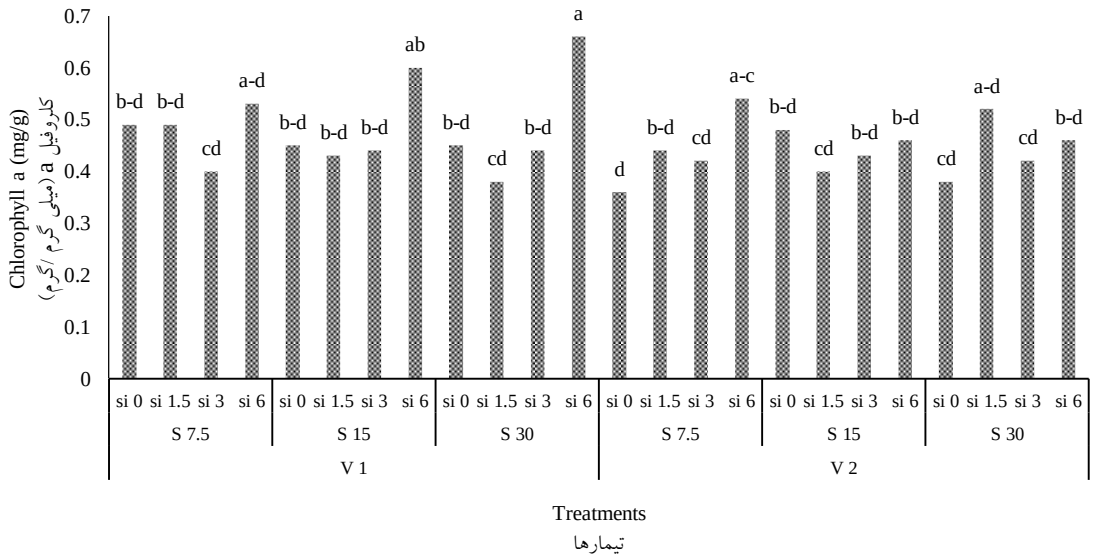
شکل ۸- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای سیلیس و غلظت ساکارز بر صفت فلاونوئید در گیاه آویشن باغی.

Fig. 8. Comparison of the mean effects of silica treatments, sucrose concentration on Flavonoid in *T. vulgaris*.

*** مقادیر (میانگین‌ها) با استفاده از آزمون دانکن در هر ستون با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح P≤۰/۰۵ ندارند**

*** Values (means) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at P≤0.05 according to Duncan's test (Si= Silica, S= Sucrose)**

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز در اثرات ساده و دوگانه در سطح احتمال (P≤۰/۰۵) معنی‌داری نداشت. ولی در اثرات سه‌گانه تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز بر تعداد کلروفیل a اثر معنی‌دار داشت. بااین‌حال اثرات سه‌گانه تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز کلروفیل a را در این گیاه افزایش داد که بیش‌ترین و کم‌ترین کلروفیل a از گیاهان تیمار شده با ٦ میلی‌گرم در لیتر سیلیس، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و دارای تهویه باعث افزایش میانگین عدد ۰/٦٦ میلی‌گرم بر گرم و ۰ میلی‌گرم در لیتر سیلیس، ۷/۵ گرم در لیتر ساکارز و عدم تهویه (شاهد) باعث کاهش میانگین عدد ۰/۳٦ میلی‌گرم بر گرم شد. (شکل ۹). گزارش گردیده سیلیس سبب افزایش میزان کلروفیل و فتوسنتز در چغندر لبویی شده است (٦۳)، که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. در پژوهشی مشخص شد که محتوای کلروفیل کل زمانی که گیاهان در ظروف تهویه‌دار رشد می‌کردند بیش‌تر از تیمارهای بدون تهویه بود (٦۱). تهویه نقش مهمی در کلروفیل و فرآیند فتوسنتز دارد. تغییرات در سطح آن برای ارزیابی فعالیت فتوسنتزی و تغییرات در نسبت کلروفیل a به کلروفیل b به‌عنوان نشانگری برای تحمل به تنش‌های غیرزنده در گیاهان استفاده شده است (٦٤). تیمار میکسوتروفیک بدون تهویه به‌طور معنی‌داری کم‌ترین مقدار را در تمامی متغیرهای ارزیابی شده داشت. نتایج ما مشابه نتایج گزارش‌شده توسط Osório و همکاران و فیصل و همکاران بود (٦۵، ٦٦). سایر نویسندگان هم‌چنین افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی و افزایش فعالیت فتوسنتزی را در شرایط *in vitro* photoautotrophic در *Limonium* spp گزارش کردند (٦۷).



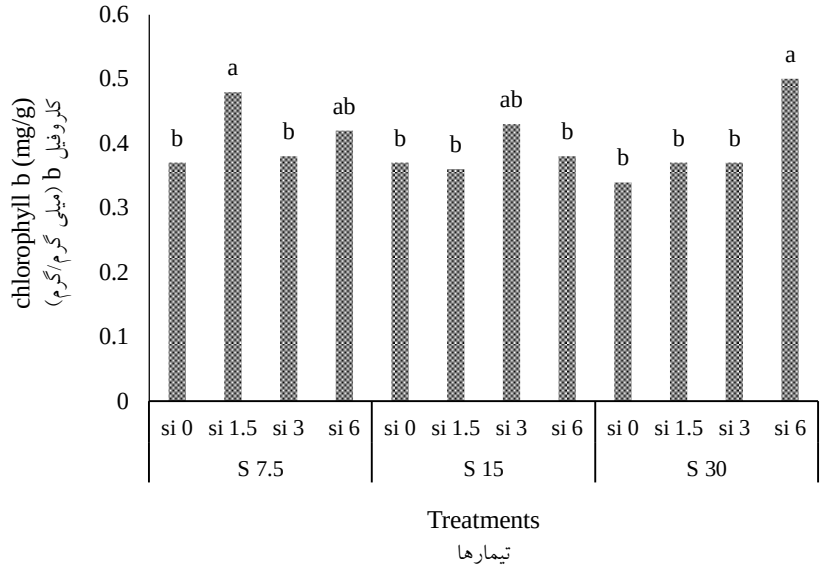
شکل ۹- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای سیلیس، غلظت ساکارز و تهویه بر صفت کلروفیل a در گیاه آویشن باغی.

Fig. 9. Comparison of the mean effects of silica treatments, sucrose concentration and ventilation on chlorophyll a in *T. vulgaris*.

*** مقادیر (میانگین‌ها) با استفاده از آزمون دانکن در هر ستون با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح P≤۰/۰۵ ندارند**

*** Values (means) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at P≤0.05 according to Duncan's test (Si= Silica, S= Sucrose, V1= Ventilation; V2= Unventilation)**

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز در اثرات ساده در سطح احتمال (P≤۰/۰۵) اثر معنی‌داری نداشت. ولی در اثرات دوگانه سیلیس و ساکارز بر تعداد کلروفیل b اثر معنی‌دار داشت (شکل ۱۰). با این حال اثرات دوگانه سیلیس و غلظت ساکارز کلروفیل b را در این گیاه افزایش داد که بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار کلروفیل b از گیاهان تیمار شده با ٦ و ۰ میلی‌گرم در لیتر سیلیس و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز باعث افزایش و کاهش میانگین به عدد ۰/۵۰ و ۰/۳٤ میلی‌گرم بر گرم از کلروفیل b شد. در اثرات سه‌گانه این فاکتورها بر کلروفیل b اثر معنی‌داری نداشت. در پژوهشی مشخص گردید که ساکارز در غلظت ٤ درصد موجب افزایش طول ریشه، وزن ریشه و میزان کلروفیل برگ گیاه تمشک سیاه بیخار رقم مرتون شد. هم‌چنین بیش‌ترین طول ریشه در غلظت ۱ درصد سیلیسیوم صورت گرفت که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارها بود (٦٨). نتایج پژوهشی دیگر نشان داد که کاربرد نانو سیلیس وزن تر، وزن خشک، طول شاخه، تعداد شاخساره، تعداد گره، طول میان گره و شاخص کلروفیل را در کشت بافت گیاه سیب رقم گالا افزایش داد (٦٩). در آزمایشی مشخص گردید که رشد کالوس گیاه آویشن شیرازی در محیط کشت حاوی ۷۵ گرم در لیتر گلوکز نسبت به سایر غلظت‌ها بیش‌تر بود (۷۰). در پژوهشی، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز تمام ویژگی‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و زیست شیمیایی را بهبود بخشید. در تمام صفات مورد مطالعه این پژوهش به‌استثنای درصد آلودگی ریز نمونه و درصد باززایی ریشه، نتایج ما با صفات یافت شده توسط (۷۱) تأیید گردید.



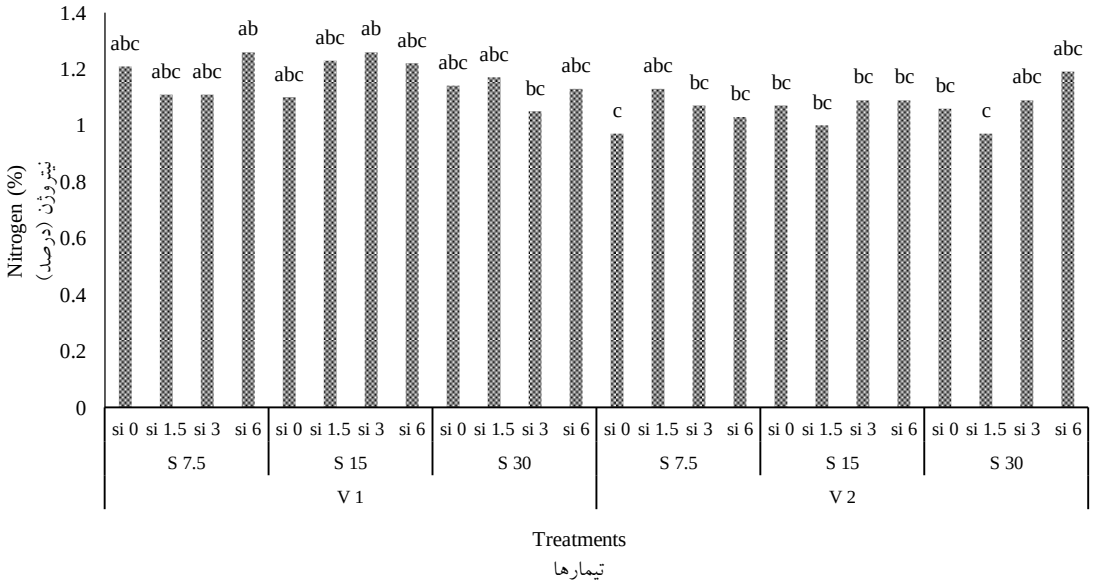
شکل ۱۰- مقایسه میانگین اثرات تیمارهای سیلیس و غلظت ساکارز بر صفت کلروفیل b در گیاه آویشن باغی.

Fig. 10. Comparison of the mean effects of silica treatments and sucrose concentration on chlorophyll b in *T. vulgaris*.

*** مقادیر (میانگین‌ها) با استفاده از آزمون دانکن در هر ستون با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح P≤۰/۰۵ ندارند**

*** Values (means) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at P≤0.05 according to Duncan's test (Si= Silica, S= Sucrose)**

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز در سطح احتمال (P≤۰/۰۵) در اثرات ساده معنی‌داری نداشت. ولی سه‌گانه این فاکتورها بر نیتروژن اثر معنی‌داری داشت. در اثرات سه‌گانه با ٦ و ۳ میلی‌گرم در لیتر سیلیس، ۷/۵ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و دارای تهویه باعث افزایش میانگین به عدد ۱/۲٦ درصد و ۰ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سیلیس، ۷/۵ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و عدم تهویه (شاهد) باعث کاهش میانگین عدد ۰/۹۷ درصد شد (شکل ۱۱). رنگدانه برگ به‌عنوان یک ویژگی مهم برای اکوفیزیولوژیست‌ها در نظر گرفته می‌شود زیرا روشی غیرمستقیم برای اندازه‌گیری نیتروژن برگ (کلروفیل حاوی نیتروژن در ساختار خود است) و به نوبه خود وضعیت مواد مغذی در نظر گرفته می‌شود (۷۲). پژوهش‌های زیادی بر روی نیاز غذایی گونه‌های مختلف آویشن انجام شده و میزان تأثیر مقادیر مختلف یک نوع کود و یا ترکیبی از آن‌ها را مورد بررسی قرار گرفته است. اثرات ازت در مقادیر مختلف را بر روی رشد و میزان اسانس *T. vulgaris* مطالعه شده و مشخص شده که عملکرد ماده خشک گیاه با افزایش مصرف ازت افزایش می‌یابد ولی اثر معنی‌داری بر میزان کل اسانس و یا درصد تیمول ندارد (۷۳). پژوهش‌ها نشان داده است که ارتفاع گیاه و تعداد پنجه توسط تیمارهای سیلیسی تغییر می‌کند و روند افزایشی را در تعداد پنجه در مرحله پنجه‌زنی در پی دارد (۷٤). در پژوهشی تحت عنوان تأثیر سیلیس و نیتروژن در برنج به این نتیجه دست یافتند که تیمار نیتروژن و سیلیس روی رشد برنج مؤثر است (۷۵).



شکل ۱۱- مقایسه میانگین اثرات غلظت ساکارز، سیلیس و تهویه بر عنصر نیتروزن گیاه آویشن باغی.

Fig. 11. Comparison of the mean effects of ventilation treatments and sucrose concentration and silica on Nitrogen element in *T. vulgaris*.

*** مقادیر (میانگین‌ها) با استفاده از آزمون دانکن در هر ستون با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح P≤۰/۰۵ ندارند**

*** Values (means) within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at P≤0.05 according to Duncan's test (Si= Silica, S= Sucrose, V1= Ventilation; V2= Unventilation)**

نتیجه‌گیری کلی

پژوهش حاضر نشان داد اثرات تهویه، سیلیس و غلظت ساکارز می‌تواند بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی و زیست شیمیایی گیاه آویشن باغی متفاوت باشد. استفاده از تهویه نسبت به تیمارهای عدم تهویه (شاهد)، سبب افزایش معنی‌داری کلروفیل a، پرولین، طول شاخه و وزن تر ریشه گردید. غلظت‌های مختلف ساکارز به خصوص ۷/۵ گرم در لیتر، باعث کاهش معنی‌داری صفات تعداد ریشه، وزن‌تر ریشه، تعداد روزنه، پرولین، فلاونوئید و کلروفیل a گردید. تیمار ۱۵ گرم در لیتر ساکارز و ۱/۵ میلی‌گرم سیلیس به همراه عدم تهویه باعث افزایش ویژگی‌های رشدی گیاه آویشن باغی و طول شاخه گردید. بنابراین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان کاربرد سیلیس را نسبت به تهویه مقرون به‌صرفه دانست و آن را به‌صورت ترکیبی به محلول کشت جهت افزایش عملکرد و رشد گیاه آویشن در مناطق مختلف پیشنهاد کرد.

منابع

1. Mirzaei-Aghsaghali, A., Syadati, S. A. & Fathi, H. (2012). Some of thyme (*Thymus vulgaris*) properties in ruminant's nutrition. *Annals of biological research*, 3 (2), 1191-1195.
2. García-Gonzáles, R., Quiroz, K., Carrasco, B. & Caligari, P. (2010). Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *International journal of agriculture and natural resources*, 37 (3), 5-30.
3. Azizi, P., Mahbod Sahebi, M. & Hanafi, M. (2016). Application of silicon in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52, 226-232.
4. Dias, G. D. M. G., Rodrigues Soares, J. D., Pasqual, M., Lara Silva, R. A., Rodrigues, L. C. D. A., Pereira, F. J. & de Castro, E. M. (2014). Photosynthesis and leaf anatomy of'Anthurium'cv. rubi plantlets cultured'in vitro'under different

silicon (Si) concentrations. *Australian Journal of Crop Science*, 8(8), 1160-1167.
5. Asmar, S. A., Rodrigues Soares, J. D., Lara Silva, R. A., Pasqual, M., Pio, L. A. S. & Mauro de Castro, E. (2015). Anatomical and structural changes in response to application of silicon (Si)'in vitro'during the acclimatization of banana cv.'Grand Naine'. *Australian Journal of Crop Science*, 9(12), 1236-1241.
6. Duan, X., Tang, M. & Wang, W. (2013). Effects of silicon on physiology and biochemistry of Dendrobium moniliforme plantlets under cold stress. *Agricultural Biotechnology*, 2(3), 18.
7. PAIVA, P. D. D. O., Pasqual, M. & Paiva, R. (1999). Efeito de concentrações de ágar e níveis de pH na propagação in vitro de crisântemo. *Ceres*, 46(264).
8. Smeekens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 51(1), 49-81.
9. Praveen, G., Vineet, K. & Yadav, S. K. (2011). Effect of sucrose on steviol glycoside biosynthesis pathway in Stevia rebaudiana. *Asian Journal of Plant Sciences*, 10(8), 401-407.
10. Fuentes, S. R., Calheiros, M. B., Manetti-Filho, J. & Vieira, L. G. (2000). The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in Coffea canephora. *Plant cell, tissue and organ culture*, 60(1), 5-13.
11. Ramarosandratana, A., Harvengt, L., Bouvet, A., Calvayrac, R. & Pâques, M. (2001). Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(1), 29-34.
12. Caton, L. (2008). Application of Tissue Culture Propagation to Woody Plants. In *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society*, 58, 284.
13. Tombolato, A. F. C. & Costa, A. M. M. (1998). Micropropagation in the ornamental plants. *Boletim Tecnico-Instituto Agronomico (Brazil)*, 174.
14. Ahmad, T., Abbasi, N. A., Hafiz, I. A. & Ali, A. (2007). Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in microprogation of peach rootstock GF-677. *Pakistan Journal of Botany*, 39(4), 1269.
15. Faria, R. T. D., Rodrigues, F. N., Oliveira, L. D. V. & Müller, C. (2004). *In vitro* Dendrobium nobile plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Horticultura Brasileira*, 22, 780-783.
16. Deberg, P. C. (1988). Control of in vitro plant propagation. *Simpósio Internacional de Biotecnologia de Plantas*, *1*.
17. El Ansari, Z. N., El Mihyaoui, A., Boussaoudi, I., Benkaddour, R., Hamdoun, O., Tahiri, H. & Lamarti, A. (2019). Effect of macronutrients, cytokinins and auxins, on in vitro organogenesis of Thymus vulgaris L. *American Journal of Plant Sciences*, 10(09), 1482.
18. Hassankhah, A., Vahdati, K., Lotfi, M., Mirmasoumi, M., Preece, J. & Assareh, M. H. (2014). Effects of ventilation and sucrose concentrations on the growth and plantlet anatomy of micropropagated Persian walnut plants. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 1(2), 111-120.
19. Nguyen, Q. T., Xiao, Y. & Kozai, T. (2020). Photoautotrophic micropropagation. *Plant factory*, 333-346.
20. Sahebi, M., Hanafi, M. M. & Azizi, P. (2016). Application of silicon in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52, 226-232.
21. Farrokhzad, Y., Babaei, A., Yadollahi, A., Kashkooli, A. B., Mokhtassi-Bidgoli, A. & Hessami, S. (2022). Informative title: Development of lighting intensity approach for shoot proliferation in Phalaenopsis amabilis through combination with silver nanoparticles. *Scientia Horticulturae*, 292, 110582.
22. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
23. Mashayekhi, K. & Atashi, S. (2015). Guide to plant physiology tests (pre- and post-harvest examination of plants). Publications of Agricultural Education Research. 296-298. [In Persian]

24.Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(6), 945-948.
25.Krizek, D. T., Kramer, G. F., Upadhyaya, A. & Mirecki, R. M. (1993). UV-B response of cucumber seedlings grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. *Physiologia Plantarum*, 88(2), 350-358.
26.Lichtenthaler, H. K. & Buschmann, C. (2001). Extraction of phtosynthetic tissues: chlorophylls and carotenoids. *Current protocols in food analytical chemistry*, 1(1), F4-2.
27.Page, A. L., Miller, R. H. & Keeny, D. R. (1982). Methods of soil and plant analysis. *American Society of Agronomy, Madison*.
28.Olsen, S. R. (1954). *Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate* (No. 939). US Department of Agriculture.
29.Ashworth, D. J. & Alloway, B. J. (2008). Influence of dissolved organic matter on the solubility of heavy metals in sewage-sludge-amended soils. *Communications in soil science and plant analysis*, 39(3-4), 538-550.
30.Morfeine, E. A. (2014). Effect of sucrose and glucose concentrations on micropropagation of Musa sp. cv. Grand Naine. *Journal of Applied and Industrial Sciences*, 2(2), 58-62.
31.Grace, S. C. (2005). Phenolics as antioxidants. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*, 141-168.
32.Cartaya, O. & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Caracteristicas química y aplicaciones, *Cultivos Tropicales*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba. 22,5-14.
33.Fujiwara, K. & Kozai, T. (1995). Physical microenvironment and its effects. In: Aitken-Christie J, Kozai T, MAL S (eds) *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Springer Publishers, Dordrecht. 319–369.
34.Jo, E. A., Tewari, R. K., Hahn, E. J. & Paek, K. Y. (2009). *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of Alocasia amazonica plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 96, 307-315.
35.Lim, M. Y., Lee, E. J., Jana, S., Sivanesan, I. & Jeong, B. R. (2012). Effect of potassium silicate on growth and leaf epidermal characteristics of begonia and pansy grown in vitro. *Horticultural Science & Technology*, 30(5), 579-585.
36.Braga, F. T., Nunes, C. F., Favero, A. C., Pasqual, M., Carvalho, J. G. D. & Castro, E. M. D. (2009). Anatomical characteristics of the strawberry seedlings micropropagated using different sources of silicon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44, 128-132.
37.Calvete, E. O., Kämpf, A. N. & Suzin, M. (2002). Concentração de sacarose no enraizamento in vitro de morangueiro. *Horticultura Brasileira*, 20, 186-191.
38.Vaculík, M., Landberg, T., Greger, M., Luxová, M., Stoláriková, M. & Lux, A. (2012). Silicon modifies root anatomy, and uptake and subcellular distribution of cadmium in young maize plants. *Annals of Botany*, 110(2), 433-443.
39.Mohggeg, P., Shirvani, M. & Ghasemi, S. (2009). Effect of silicon application on growth and produce cucumber, two cultivar in hydroponic system. *Journal of Science and techniques of greenhouse culture*, 1(1), 39-35. [In Persian]
40.Al-Kaby, A. M. S. (2004). The effect of some antibiotics and fungicides on the growth of embryogenic callus of date palm *Phoenix dactylifera* L. *Basra Journal of Date Palm Research*, 3(1/2), 97-110.
41.Fathi Rezaei, P. & Rakee, E. (2016). Investigation of sucrose effect on tropane alkaloid production and several biochemical parameters of Datura under in vitro culture condition. *Molecular and Cellular Researches*. 30(4), 375-386. [In Persian]
42.Zarei, M., Garoosi, G. H., Nezami, E., Hosseini, R. & Ahmadi, J. (2013). The Effect of Medium, Carbon Source, Light Spectrum and Style Treatment of Auxin on Shoot and Root Regeneration of Gisela 6 Root Stock. *Cell and Tissue Journal*. 4(2), 169-185. [In Persian]

43. Baque, M. A., Shin, Y. K., Elshmari, T., Lee, E. J. & Paek, K. Y. (2011). Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the microporpagation of Calanthe hybrids ('Bukduseong' × 'Hyesung' and 'Chunkwang' × 'Hyesung'). *Australian Journal of Crop Science*, 5(10), 1247-1254.
44. Sivanesan, I. & Jeong, B. R. (2014). Silicon promotes adventitious shoot regeneration and enhances salinity tolerance of Ajuga multiflora Bunge by altering activity of antioxidant enzyme. *The Scientific World Journal*, 15, 25-37.
45. Islam, M. M., Ahmed, M. & Mahaldar, D. (2005). In vitro callus induction and plant regeneration in seed explants of rice (*Oryza sativa* L.). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(1), 72-75.
46. Mathe, C., Mosolygó, Á., Surányi, G., Beke, A., Demeter, Z., Tóth, V.R., Beyer, D., Mészáros, I. & Márta, M. (2012). Genotype and explanttype dependent morphogenesis and silicon response of common reed (*Phragmites australis*) tissue cultures. *Aquatic botany*, 97(1), 57-63.
47. Shim, S. W., Hahn, E. J. & Paek, K. Y. (2003). *In vitro* and *ex vitro* growth of grapevine rootstock5BB'as influenced by number of air exchanges and the presence or absence of sucrose in culture media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75, 57-62.
48. Iarema, L., da Cruz, A. C. F., Saldanha, C. W., Dias, L. L. C., Vieira, R. F., de Oliveira, E. J. & Otoni, W. C. (2012). Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110, 227-238.
49. Al-Khalifah, N. S. & Shanavaskhan, A. E. (2012). Micropropagation of date palms. *Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB) and Association of Agricultural Research Institutions in the Near East and North Africa (AARINENA)*, *54*.
50. Bienert, G. P., Schüssler, M. D. & Jahn, T. P. (2008). Metalloids: essential, beneficial or toxic? Major intrinsic proteins sort it out. *Trends in biochemical sciences*, 33(1), 20-26.
51. Zobayed, S. A., Armstrong, J. & Armstrong, W. (2001). Leaf anatomy of in vitro tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. *Plant Science*, 161(3), 537-548.
52. Zobayed, S. M. A., Armstrong, J. & Armstrong, W. (2001). Micropropagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. *Annals of Botany*, 87(1), 53-59.
53. Afreen, F. (2005). Physiological and anatomical characteristics of in vitro photoautotrophic plants. In *Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system* (pp. 61-90). Springer Netherlands.
54. Zobayed, S. M. A., Afreen-Zobayed, F., Kubota, C. & Kozai, T. (2000). Mass propagation of Eucalyptus camaldulensis in a scaled-up vessel under in vitro photoautotrophic condition. *Annals of Botany*, 85(5), 587-592.
55. Posada, L. (2016). *Embriogénesis somática y enraizamiento in vitro fotoautotrófico en papaya (Carica papaya* L.*) cultivar'Maradol Roja'* (Doctoral dissertation, Ph. D. Thesis, Santa Clara, Cuba).
56. Zahed Zadeh, F., Mahna, N., Kakavand, F., Zare Nahandi, F. & Panahande, J. (2014). Effect of concentration and source of carbohydrate on in vitro production of anthocyanin in apple. *Agricultural Biotechnology Journal*. *5*(4), 37-48. [In Persian]
57. Kauss, H., Seehaus, K., Franke, R., Gilbert, S., Dietrich, R. A. & Kröger, N. (2003). Silica deposition by a strongly cationic proline-rich protein from systemically resistant cucumber plants. *The plant journal*, 33(1), 87-95.
58. Xiao, Y., Niu, G. & Kozai, T. (2011). Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105, 149-158.

59. Arigita, L., Cañal, M. J., Tamés, R. S. & González, A. (2010). CO_2-enriched microenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes autotrophy in the in vitro culture of kiwi (Actinidia deliciosa Chev. Liang and Ferguson). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46, 312-322.
60. Batista, D. S., Dias, L. L. C., Rêgo, M. M. D., Saldanha, C. W. & Otoni, W. C. (2016). Flask sealing on in vitro seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. *Ciência Rural*, 47, e20150245.
61. Zahara, M., Datta, A. & Boonkorkaew, P. (2016). Effects of sucrose, carrot juice and culture media on growth and net CO_2 exchange rate in Phalaenopsis hybrid 'Pink'. *Scientia horticulturae*, 205, 17-24.
62. Mohamed, M. H. & Alsadon, A. A. (2010). Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. *Scientia Horticulturae*, 123(3), 295-300.
63. Fanourakis, D., Bouranis, D., Giday, H., Carvalho, D. R., Nejad, A. R. & Ottosen, C. O. (2016). Improving stomatal functioning at elevated growth air humidity: a review. *Journal of Plant Physiology*, 207, 51-60.
64. Behtash, F., Tabatabaii, S. J., Malakouty, M. J., Sorour-Aldin, M. H. & Ustan, S. (2009). Effect of cadmium and silicon on growth and some physiological aspect of red beet. *Journal of plant physiology and breeding*. 2(1), 53-67. [In Persian]
65. Larcher, W. (1995). Physiological Plant Ecology, pp. 424-426. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
66. Osório, M. L., Gonçalves, S., Osório, J. & Romano, A. (2005). Effects of CO_2 concentration on acclimatization and physiological responses of two cultivars of carob tree. *Biologia plantarum*, 49, 161-167.
67. Faisal, M., Siddique, I. & Anis, M. (2006). An efficient plant regeneration system for *Mucuna pruriens* L. (DC.) using cotyledonary node explants. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42, 59-64.
68. Lian, M. L., Murthy, H. N. & Paek, K. Y. (2002). Culture method and photosynthetic photon flux affect photosynthesis, growth and survival of Limonium 'Misty Blue'in vitro. *Scientia Horticulturae*, 95(3), 239-249.
69. Dehpour Joybari, A. A., Soltani, S., Bishehkolaei, R., Ghasemi, K. & Rajabzadeh, Z. (2021). Plant regeneration from blackberry lateral bud culture under a set of hormone, silicic acid, sucrose and activated charcoal. *Developmental Biology*, 13(3), 55-66. [In Persian]
70. Avestan, S. & Naseri, L. (2015). Effects of nano silicon (SiO_2) application on in vitro proliferation of Gala apple cultivar. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 46(4), 669-675. [In Persian]
71. Hassan Poor, H., Bernard, F. & Shaker, H. (2007). Optimizing callus culture in Zataria multiflora boiss for rosmarinic acid production. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 15(1), 1-9. [In Persian]
72. Pruski, K., Astatkie, T., Mirza, M. & Nowak, J. (2002). Photoautotrophic micropropagation of Russet Burbank potato. *Plant cell, tissue and organ culture*, 69, 197-200.
73. Richardson, A. D., Duigan, S. P. & Berlyn, G. P. (2002). An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New phytologist*, 153(1), 185-194.
74. Ceylan, A., Bayram, E. & Özay, N. (1994). The effects of N-fertilizer on the yield and quality of *Thymus vulgaris* L. in ecological conditions of Bornova-İzmir.
75. Falah, A. & Elyasi, H. (2020). Effect of different rate of silicate fertilizer on the growth and yield of Tarom Hashemi rice variety. *Agricultural Knowledge*, 3(7), 28-40. [In Persian]