بسم اللہ الرحمن ارحیم

دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان
دانشکده‌ی کشاورزی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان‌نامه‌ی کارشناسی‌ارشد
رشته‌ی مهندسی کشاورزی - اصلاح نباتات

عنوان پایان‌نامه

بررسی امکان کشت درون‌شیشه‌ای و بهینه سازی مراحل باززایی در عناب (*Ziziphus jujuba* Mill.)

استاد راهنما
دکتر علی اکبر محمدی میریک

استادان مشاور
دکتر شهاب مداح حسینی
مهندس علی موسوی

نگارنده
فرشته خلیلی زاده ماهانی

اسفند ۹۲

دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان
دانشکده‌ی کشاورزی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان‌نامه‌ی کارشناسی‌ارشد
رشته‌ی مهندسی کشاورزی - اصلاح نباتات

فرشته خلیلی زاده

بررسی امکان کشت درون شیشه‌ای و بهینه‌سازی مراحل باززایی در عناب (*Ziziphus jujuba* Mill.)

در تاریخ ۹۲/۱۲/۲۴ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه‌ی عالی به تصویب نهایی رسید.

	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر علی اکبر محمدی میریک	استادیار	
۲- استاد مشاور	دکتر شهاب مداح حسینی	استادیار	
۳- استاد مشاور	مهندس علی موسوی	مربی	
۴- داور داخل گروه	دکتر حسین دشتی	دانشیار	
۵- داور داخل گروه	دکتر محسن محمودنیا	استادیار	
۶ - نماینده‌ی تحصیلات تکمیلی	دکتر پژمان خدایگان	استادیار	

سپاسگزاری

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. و سلام و دورد بر محمّد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است؛ و نفرین پیوسته بر دشمنان ایشان تا روز رستاخیز...

بدون شک جایگاه و منزلت معلم، اجّل از آن است که در مقام قدردانی از زحمات بی شائبه ی او، با زبان قاصر و دست ناتوان، چیزی بنگاریم.

اما از آنجایی که تجلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تامین می کند و سلامت امانت هایی را که به دستش سپرده اند، تضمین؛ بر حسب وظیفه و از باب "من لم یشکر المنعم من المخلوقین لم یشکر الله عزّو جلّ" از استاد با کمالات و شایسته؛ جناب آقای دکتر علی اکبر محمدی میریک که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند؛ از استادان صبور و باتقوا، جناب آقای دکتر شهاب مداح حسینی و مهندس علی موسوی، که زحمت مشاوره این پایان نامه را متقبل شدند و از استادان فرزانه و دلسوز؛ آقایان دکتر حسین دشتی و دکتر محسن محمودنیا که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم.

با سپاس فراوان از پدر و مادر مهربانم و خواهران و برادران عزیزم، دوستان، هم اتاقی ها و همکلاسی های مهربانم به ویژه خانم ها: سمیه حسینی، سیما بابایی بافقی، فاطمه سیدخوانی نژاد و آقای علی شعله؛ از مسئولین آزمایشگاه جناب آقای مهندس برومند و آقای علیزاده

باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

تقدیم به:

پدر و مادر دلسوز و مهربانم

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگان

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است

به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند

تمامی حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های حاصل از پژوهش موضوع این پایان‌نامه، متعلق به دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان است.

چکیده

بهینه سازی مراحل باززایی گیاه عناب به روش درون شیشه‌ای، امکان تکثیر ژنوتیپ‌های مطلوب و همچنین امکان دست‌کاری‌های ژنتیکی برای این محصول را در جهت دسترسی به اهداف اصلاحی فراهم می‌کند. برای انجام این پژوهش، آزمایش‌هایی در سه مرحله انجام شد به این ترتیب که در آزمایش اول، عوامل مؤثر بر استقرار ریزنمونه در محیط کشت، در آزمایش دوم، نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد و دیگر عوامل مؤثر بر میزان پرآوری و تولید کالوس و در آزمایش سوم نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد و سایر عوامل مؤثر بر میزان تولید ریشه مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که میزان موفقیت در استقرار و رشد ریزنمونه جوانه جانبی در عناب تحت تاثیر ژنوتیپ، ترکیب محیط کشت و وضعیت ریز نمونه قرار گرفت. همچنین استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدان و زغال فعال موجب استقرار مطلوب ریزنمونه‌ی جوانه جانبی در محیط کشت شد. هورمون سیتوکینینی BAP بهترین باززایی مستقیم گره و تکثیر شاخه را داشت و بکارگیری هورمون BAP به همراه NAA در محیط کشت باعث افزایش رشد طولی شاخه‌ها و تولید گره‌های بیشترگردید. ریزنمونه برگ تهیه شده از درخت قادر به تولید کالوس نبودند، و نتایج حاصل از القای کالوس در ریزنمونه برگ تهیه شده از کشت درون شیشه نشان داد که ترکیب هورمون BAP و NAA با نسبت ۱۰ به ۱ و میزان آگار ۷ گرم باعث کالوس‌زایی مطلوب شد. استفاده از کشت تک جوانه جهت تکثیر نوساقه عناب موفقیت آمیز بود به طوری که برای ژنوتیپ‌های BIRA1 و BIRA2 بالاترین درصد رشد گره در محیط‌های کشت حاوی غلظت پایین هورمون BAP به همراه غلظت بالای هورمون NAA بدست آمد. استفاده از پیش‌تیمار هورمونی و محیط کشت وایت موجب افزایش کارایی ریشه‌زایی شد. بالاترین درصد ریشه‌زایی مربوط به ترکیب هورمونی ۱۰ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر NAA و IBA و بیشترین طول ریشه مربوط به تیمار ۱۰میلی‌گرم بر لیتر IBA می‌باشد و استفاده از تیمار هورمونی و محیط کشت وایت درصد تولید ریشه و تعداد ریشه در ریزنمونه را افزایش داد اما طول ریشه‌های تولید شده کوتاه بود. در این آزمایش محیط کشت حاوی غلظت پایین NAA (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و غلظت بالای IBA (۲ میلی‌گرم بر لیتر) در شرایط تاریکی انکوباسیون موجب ریشه‌زایی مناسب در ژنوتیپ BIRA1 گردید.

واژگان کلیدی: درون شیشه‌ای، باززایی، کالوس‌زایی، کشت بافت، عناب.

.فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- اهداف پژوهش ۴

فصل دوم: پیشینه‌ی پژوهش

۲-۱-گیاهان دارویی..... ۵

۲-۱-۱-تاریخچه گیاهان دارویی..... ۶

۲-۲- معرفی گیاه عناب ۷

۲-۲-۱- گیاهشناسی ۷

۲-۲-۲- کاربردها ۸

۲-۲-۲-۱-کاربردهای دارویی ۸

۲-۲-۲-۲-کاربردهای صنعتی..... ۹

۲-۲-۲-۳-سایر موارد استفاده..... ۱۰

۲-۲-۳-کشت وکار..... ۱۰

۲-۲-۳-۱-مناطق توسعه کاشت در جهان..... ۱۰

۲-۲-۳-۲مناطق توسعه کاشت در ایران..... ۱۱

۲-۲-۴-روش‌های ازدیاد..... ۱۱

۲-۲-۴-۱-بذر..... ۱۱

۲-۲-۴-۲-قلمه..... ۱۲

۲-۲-۴-۳-پاجوش..... ۱۴

۲-۲-۴-۴-خوابانیدن..... ۱۴

۲-۲-۵-منابع ژنتیکی..... ۱۵

۲-۲-۶-منشاء ژنتیکی..... ۱۷

۲-۲-۷-اصلاح ژنتیکی..... ۱۹

۲-۲-۷-۱-اهداف اصلاح..... ۱۹

۲-۲-۷-۲-محدودیت های اصلاح..... ۲۰

۲-۲-۷-۳-روش اصلاحی انتخاب..... ۲۱

عنوان **صفحه**

۲-۲-۷-۴- روش اصلاحی هیبریداسیون..... ۲۱
۲-۲-۷-۵- روش اصلاحی جهش..... ۲۲
۲-۲-۷-۶- روش اصلاحی پلی پلوئیدی..... ۲۴
۲-۳- تکنیک کشت بافت و کاربردهای آن..... ۲۵
۲-۳-۱-انتخاب گیاهان جهش یافته (جهش‌های خودبخودی یا القایی) و تنوع سوماکلونی..... ۲۷
۲-۳-۲- تولید گیاهان هاپلویید/ دابلد هاپلویید به منظور ایجاد لاین‌های خالص..... ۲۸
۲-۳-۳- باروری وکشت جنین یا تخمک در درون شیشه..... ۲۸
۲-۳-۴- ایجاد گیاهان تراریخته..... ۲۹
۲-۳-۵- باززایی و ریزازدیادی..... ۲۹
۲-۳-۶- ویژگی‌های محیط کشت..... ۳۲
۲-۳-۷- مراحل اصلی کشت بافت..... ۳۴
۲-۳-۷-۱- استقرار ریزنمونه در محیط کشت..... ۳۴
۲-۳-۷-۲- شاخه‌زایی وریشه‌زایی..... ۳۶
۲-۳-۷-۳- سازگاری..... ۳۸

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- تهیه ریز نمونه ۳۹
۳-۲- تهیه محیط کشت ۳۹
۳-۳- ضدعفونی لوازم آزمایشگاهی..... ۴۱
۳-۴- ضدعفونی ریز نمونه‌ها ۴۱
۳-۵- آزمایش اول: عوامل مؤثر بر استقرار ریزنمونه در محیط کشت..... ۴۲
۳-۵-۱- ارزیابی نوع محیط کشت، ژنوتیپ و سن ریزنمونه بر میزان استقرار جوانه‌های جانبی..... ۴۲
۳-۵-۲- اثر نوع غلظت های مختلف تنظیم کننده‌های رشد و نوع ماده جذب کننده ترکیبات فنلی بر استقرار و رشد جوانه جانبی در محیط کشت ۴۲
۳-۵-۳- بررسی نوع و غلظت های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر میزان رشد ریز نمونه گره..... ۴۵

عنوان **صفحه**

۳-۶- آزمایش دوم: اثر نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد و دیگر عوامل مؤثر بر میزان پرآوری و تولید کالوس..... ۴۵
۳-۶-۱- ارزیابی نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد بر میزان پرآوری از ریزنمونه تک جوانه..... ۴۵
۳-۶-۲- ارزیابی تیمارهای هورمونی و میزان آگار بر تولید کالوس با استفاده از ریزنمونه برگ..... ۴۶
۳-۷- آزمایش سوم: اثر نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد و سایر عوامل مؤثر بر میزان تولید ریشه..... ۴۶
۳-۷-۱- اثر تیمارهای هورمونی در محیط کشت MS بر میزان ریشه زایی..... ۴۶
۳-۷-۲- اثر پیش تیمار هورمونی بر ریشه زایی نوساقه‌ها در محیط کشت وایت..... ۴۶
۳-۷-۳- اثر تیمارهای هورمونی بر ریشه زایی نوساقه‌ها در محیط کشت وایت..... ۴۷

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- نتایج آزمایش استقرار ریزنمونه جوانه جانبی در محیط کشت..... ۴۹
۴-۱-۱- اثر محیط کشت، ژنوتیپ و سن بر استقرار ریزنمونه جوانه جانبی ۴۹
۴-۱-۲- اثر نوع هورمون سیتوکینین بر میزان استقرار ریز نمونه جوانه جانبی..... ۵۳
۴-۱-۳- اثر نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد و نوع ماده جذب کننده ترکیبات فنولی بر میزان رشد ریز نمونه جوانه جانبی..... ۵۵
۴-۱-۳-۱- اثر نوع آنتی اکسیدان بر میزان رشد ریز نمونه جوانه جانبی..... ۵۶
۴-۱-۳-۲- اثر نوع هورمون سیتوکینین بر میزان رشد ریز نمونه جوانه جانبی..... ۶۲
۴-۱-۳-۳- اثر غلظت های مختلف هورمون BAP بر میزان رشد ریز نمونه جوانه جانبی..... ۶۳
۴-۲- بررسی نوع وغلظت های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر میزان رشد ریز نمونه گره..... ۶۵
۴-۳- بررسی عوامل موثر بر کشت تک جوانه بدست آمده از محیط کشت..... ۶۹

عنوان **صفحه**

۴-۴- تولید کالوس از ریزنمونه برگ..... ۷۴
۴-۵- تولید ریشه بر روی نوساقه..... ۷۹
۴-۵-۱ اثر تیمارهای هورمونی بر میزان ریشه زایی در محیط کشت MS..... ۷۹
۴-۵-۲- اثر پیش تیمار هورمونی ریزنمونه‌ها بر میزان ریشه‌زایی در محیط کشت وایت ۸۰
۴-۵-۳- اثر ترکیبات هورمونی در محیط کشت وایت بر میزان ریشه‌زایی..... ۸۳

فصل پنجم : نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادها

۵-۱- نتیجه‌گیری کلی ۸۵
۵-۲- پیشنهادها ۸۶

فهرست منابع..... ۸۹

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- پراکنش آماری جنس Ziziphus ۱۱
جدول ۳-۱- ترکیبات محیط کشت‌های مختلف بر حسب میلی گرم در لیتر ۴۰
جدول ۳-۲- ترکیبات تیماری برای بررسی نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد و نوع ماده جذب کننده ترکیبات فنولی بر استقرار و رشد ریزنمونه جانبی در محیط کشت ۴۴
جدول ۴-۱- تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ و سن ریزنمونه بر صفات مورد مطالعه حاصل از کشت جوانه جانبی ۵۲
جدول ۴-۲- تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی بر صفات مورد مطالعه حاصل از کشت جوانه جانبی ۵۶
جدول ۴-۳- مقایسه میانگین تعداد روز تا شروع رشد و تعداد شاخه در تیمار های مختلف هورمونی ۶۰
جدول ۴-۴- مقایسه میانگین طول شاخه و تعداد گره در تیمارهای مختلف هورمونی ۶۱
جدول ۴-۵- تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی بر صفات مورد مطالعه حاصل از کشت گره ۶۷
جدول ۴-۶- نتایج حاصل از کشت گره گیاه عناب در محیط کشت پایه MS ۶۹
جدول ۴-۷- تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی بر صفات مورد مطالعه حاصل از کشت تک جوانه ۷۰
جدول ۴-۸- مقایسه میانگین درصد ریزنمونه‌های رشد یافته در تیمارهای مختلف هورمونی ۷۱
جدول ۴-۹- مقایسه میانگین طول شاخه و تعداد گره در تیمارهای مختلف هورمونی ۷۲
جدول ۴-۱۰- تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر صفات مورد مطالعه حاصل از ریزنمونه برگ ۷۶
جدول ۴-۱۱- مقایسه میزان کالزایی حاصل از کشت برگ عناب در تیمارهای مختلف ۷۷
جدول ۴-۱۲- محیط‌های کشت MS حاوی تیمارهای هورمونی اکسین ۸۰
جدول ۴-۱۳- تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی بر صفات مورد مطالعه حاصل از کشت نوساقه جهت تولید ریشه ۸۱
جدول ۴-۱۴- مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده در تیمارهای مختلف هورمونی ۸۲

عنوان **صفحه**

جدول۴-۱۵- محیط‌های کشت وایت حاوی تیمارهای هورمونی اکسین ۸۴

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱ تصویری شماتیک از استان‌های کشور و پراکنش ژنوتیپ های متنوع بر اساس نشانگر مولکولی ISSR روی اکوتیپ‌های با اشتراک منشاء (رنگ مشابه).از.استان‌های کشور به عنوان مراکز هسته‌ای تنوع عناب در ایران ۱۸

شکل ۴-۱- درصد ریزنمونه‌های یک ساله و چند ساله رشد یافته در ژنوتیپ‌های نهبندان۱ (NAH1)، بیرجند۱ (BIR1)، بیرجند۲ (BIR2)، بیرجند۳ (BIR3) و بیرجند۴ (BIR4).....۵۱

شکل ۴-۲- طول نوساقه رشد یافته از ریزنمونه یک ساله و چند ساله در دو ژنوتیپ بیرجند ۲ (BIR2) و نهبندان ۱ (NAH1) ۵۲

شکل ۴-۳- تعداد گره موجود در هر نوساقه رشد یافته از ریزنمونه یک ساله و دو ساله در دو ژنوتیپ بیرجند (BIR2) و نهبندان (NAH1) ۵۳

شکل ۴-۴-درصد ریز نمونه های زنده مانده در محیط‌های کشت حاوی BAP، KIN و TDZدر دو ژنوتیپ BIRA1 و BIRA2 .....۵۵

شکل ۴-۵- شکل میوه دو ژنوتیپ عناب، ۱- ژنوتیپ BIRA1 و ۲- ژنوتیپ BIRA2 .....۵۸

شکل ۴-۶- محیط‌های کشت استقرار جوانه جانبی در دو ژنوتیپ عناب، ۱، ۲ و ۳ و ۷ به ترتیب محیط‌های کشت شاهد، فاقد آنتی‌اکسیدان، دارای اسید آسکوربیک به همراه اسیدسیتریک و دارای ۱ گرم بر لیتر زغال فعال برای ژنوتیپ BIRA1 و ۴، ۵ و ۶ به ترتیب محیط‌های کشت شاهد، فاقد آنتی‌اکسیدان، دارای اسید آسکوربیک به همراه اسیدسیتریک برای ژنوتیپ BIRA2 (تمام محیط‌های کشت به جز شاهد دارای ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP هستند) ، مقیاس(نوار سیاه رنگ): ۱ سانتی‌متر.....۵۹

شکل ۴-۷ محیط‌های کشت استقرار جوانه جانبی در ژنوتیپ BIRA1، ۱ و۲ - محیط‌های کشت حاوی ۴ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب Kin و BAP و ۳ محیط کشت حاوی ۴ میلی‌گرم بر لیتر TDZ به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA ۶۳

عنوان **صفحه**

شکل ۴-۸- محیط‌های کشت تکثیر شاخه از طریق کشت تک جوانه دو ژنوتیپ عناب، ۱- محیط کشت حاوی ۰/۵ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و NAA موجب ۷۵ درصد رشد ریزنمونه-های ژنوتیپ BIRA1 و ۲- محیط کشت حاوی ۱ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و NAA موجب ۱۰۰ درصد رشد ریزنمونه‌های ژنوتیپ BIRA1 ..... ۷۳
شکل ۴-۹- کالوس‌زایی از ریزنمونه برگ در تیمار هورمونی شماره‌ی ۱۳ و ۲۰ و اندام زایی کالوس در تیمار هورمونی شماره ۱۸ (به ترتیب از راست به چپ)، مقیاس(نوار سیاه رنگ): ۱ سانتی‌متر..... ۷۶
شکل ۴-۱۰- مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از نظر حجم کالوس (کد تیمارها براساس جدول ۳ می‌باشد) ۷۸
شکل ۴-۱۱- میانگین مدت زمان کشت تا شروع کالزایی در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف هورمونی با مقادیر مختلف آگار (کد تیمارها بر اساس جدول ۳ می‌باشد) ۷۸
شکل ۴-۱۲- نوساقه‌های ریشه دار شده در محیط کشت حاوی ۱۰ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر NAA و IBA (شماره‌های۱ و ۲) و حاوی۱۰میلی‌گرم بر لیتر IBA (شماره ۳)..... ۸۲

فصل اول

مقدمه

گیاهان دارویی به‌عنوان منبعی غنی از مواد دارویی شناخته شده‌اند و استفاده از آن‌ها در درمان انسان و دام، قدمتی به بلندای تاریخ بشر دارد. علاقه به تولید گیاهان دارویی و معطر و تقاضا برای محصولات طبیعی به‌طور مداوم در جهان رو به افزایش می‌باشد به گونه ای که قرن بیستم را قرن بازگشت به طبیعت و قرن استفاده از داروهای گیاهی نام نهاده‌اند. مطابق برآورد سازمان بهداشت جهانی[1]، ۸۰ درصد مردم دنیا برای مراقبت‌های بهداشتی اولیه به طور سنتی به گیاهان دارویی و تولیدات طبیعی تمایل دارند (Chatterjee, 2002؛ محمدی گلرنگ، ۱۳۸۰؛ نوروزیان، ۱۳۸۰). از سوی دیگر، گیاهان دارویی جزء ذخایر و منابع طبیعی کشورها هستند که نوع، تعداد و تنوع گونه‌های آن‌ها بر اساس شرایط و موقعیت جغرافیایی هر منطقه متفاوت است. متأسفانه سودآوری‌های کلان اقتصادی و توجه روز افزون به تجارت جهانی گیاهان دارویی، مشکلات و مسائل ناگواری را برای این منابع به وجود آورده و نسل گونه‌های گیاهی را با خطر انقراض مواجه ساخته است، زیرا بخش عظیمی از این تجارت مربوط به جمع‌آوری بی‌رویه و با شیوه‌های نادرست گونه‌های گیاهی دارویی از طبیعت می‌باشد و این موضوع نه تنها به انقراض نسل گونه‌ها می‌انجامد بلکه تنوع زیستی منطقه و جهان را نیز با خطرنابودی مواجه می‌سازد (امیدبیگی، ۱۳۷۴).

عناب از گیاهان دارویی ارزشمندی است که در طب سنتی ایران جایگاه ویژه‌ای دارد. این گیاه بومی آسیای جنوب شرقی، آسیای میانه و قفقاز است که از چند هزار سال قبل در کشورهایی مانند

[1] World Health Organization (WHO)

چین، هندوستان، افغانستان، پاکستان و ایران کشت می‌شد و بعد به کشورهای اطراف دریای مدیترانه از جمله سوریه، ایتالیا، فرانسه، اسپانیا و کشورهای شمال آفریقا منتقل شده است. عناب از گیاهان بومی فلات ایران است و به‌طور عمده در استان‌های خراسان، گلستان، مازندران، گیلان، فارس، اصفهان، مرکزی، یزد، کرمان، لرستان، همدان، تهران، قزوین و قم حضور دارد. در حال حاضر چندین دارو از عناب تهیه می‌شود و توسعه کشت آن توسط باغداران به ویژه در استان خراسان مورد توجه است.

عناب درختی با نام علمی .*Ziziphus jujuba* Mill از تیره Rhamanaceae می‌باشد. این گیاه دارای پتانسیل بالای اقتصادی است و در حال حاضر سطح زیر کشت آن در کشور ۵۴۸ هکتار و عملکرد سالانه ۳۲۸۸۰۰۰ کیلوگرم می‌باشد و نقش عمده‌ای در صادرات غیرنفتی ایران داشته و جزء گیاهان استراتژیک محسوب می‌شود (امید بیگی و دقیقی، ۱۳۷۹). حدود ۴۰ گونه در جنس Ziziphus وجود دارد که همگی دیپلوئید و دارای ۲۴ کرموزوم هستند (حسینی آوا، ۱۳۸۱). بافت میوه‌ی عناب از لحاظ ویتامین‌ها به خصوص ویتامین C بسیار غنی است و بسته به ژنوتیپ معمولاً دارای۳۰-۲۰ درصد مواد قندی، ۲/۱۹-۰/۸ درصد پروتئین، ۰/۷۳-۰/۴درصد خاکستر و ۰/۳-۰/۱ درصد چربی می‌باشند (Yamamoto *et al*., 1990; Liang *et al*; 1998).

طب قدیم عناب را معتدل می داند و بوعلی سینا اعتقاد داشت که عناب کمی سودایی می‌باشد. از جمله خواص درمانی عناب می‌توان به خاصیت ملین ، ادرار آور، آرام کننده اعصاب، تمیز کننده خون، ضدصرفه و خواب آور بودن آن اشاره کرد. همچنین جوشانده پوست درخت عناب دارویی ضد اسهال است و آسم و تنگی نفس را تسکین می‌دهد. گرد ریشه خشک شده آن برای معالجه و التیام زخم‌های کهنه مفید می‌باشد از سوی دیگر هسته عناب خواب آور، برطرف کننده خستگی شدید و افزاینده رشد موی سر است، جوشانده عناب گرفتگی صدا را بر طرف می‌کند و برای سرفه و درد سینه مفید است و همچنین تقویت کننده دستگاه هاضمه و حافظه و برطرف کننده کم اشتهایی است، دم کرده میوه عناب برای درمان افسردگی و آب آن برای درمان سرطان و جوشانده برگ برای رفع گلو درد و خونریزی لثه و درد مفاصل مفید است (امیدبیگی، ۱۳۷۶ و زرگری، ۱۳۷۱و میرحیدر، ۱۳۷۳). کشت این گیاه نه تنها به دلیل مصارف داروئی مورد توجه است بلکه به علت زیبایی برگ‌ها و تنه درختان جوان به عنوان گیاه زینتی کشت می‌شود. عناب گیاهی سازگار است و چوب درخت عناب بسیار محکم و زیباست و برای ساختن اشیا زینتی و ساختن میز و صندلی، در و پنجره مورد استفاده قرار می‌گیرد (غوث، ۱۳۸۸).

گونه های عناب گسترش جغرافیایی وسیعی را از آرژانتین تا چین در برگرفته اند . به نظر می-رسد که گسترش این درخت از ۳۴ درجه عرض جغرافیایی جنوبی تا عرض جغرافیایی ۵۱ درجه شمالی (غوث، ۱۳۸۸و غوث و ملک‌زاده، ۱۳۸۹) ادامه می‌یابد و این نشانگر این مطلب است که گیاهان کم توقع ، از نظر اکولوژیکی گسترش وسیعتری را نسبت به گیاهان پرتوقع دارند. از جنبه نیاز آبی نیز گونه‌های عناب دارای نیازهای آبی متفاوتی می‌باشند. این درخت در دامنه بارندگی ۸۵ تا ۲۰۰۰ میلی‌متر پرورش می‌یابد (غوث و ملک‌زاده، ۱۳۸۹). خاک مناسب با pH ۴/۵ تا ۸/۴ (غوث و ملک‌زاده، ۱۳۸۹) و بافت خاک شنی لومی معین می‌شود .درخت عناب نسبت به وجود گچ و ترکیبات آهکی نسبتاً حساس است و در این گونه خاک‌ها رشد کافی نمی‌کند و میوه دهی آن کاهش می‌یابد. درخت عناب خاک‌های اسیدی و خاک‌های آبگیر را دوست ندارد و در زمین‌های باتلاقی خوب نمی‌روید. بلکه ریشه آن نیاز به اکسیژن دارد و در کنار آبهای جاری بهتر نتیجه می‌دهد . این گیاه نسبت به شوری متحمل است و فقر غذایی خاک را تا حدودی تحمل می کند (Singh *et al*، 1973).

تکثیر گیاهان فرآیندی که طی آن تعداد گیاه افزایش یافته و به بقای گونه‌ها کمک می‌کند، تکثیر عناب در حال حاضر به‌طور سنتی انجام می‌گیرد به طوری که متداول ترین شیوه تکثیر آن قلمه‌زنی و پاجوش است. تکثیر کلونال یا به عبارتی تولید گیاهان مشابه با گیاه والد، با کمک روش‌های متنوعی از کشت بافت به نام ریزازدیادی انجام می‌شود. در کشت بافت، قسمتی از گیاه به نام قلمه یا ریزنمونه که ممکن است بخشی از ساقه، برگ، جوانه و یا یک سلول باشد، در محیط کنترل شده کشت می‌شود. در این نوع کشت، شرایط به گونه‌ای است که عاری از هر میکروارگانیسم بوده و رژیم متعادلی از مواد شیمیایی و آلی مورد نیاز رشد گیاه فراهم است. در واقع در کشت درون شیشه‌ای محیط کشت بستری برای رشد گیاه است و ترکیبی از مواد شیمیایی و آلی در یک ژل مغذی یا محیط مایع برای رشد سلول‌ها و بافت‌ها می‌باشد. امروزه ریزازدیادی یکی از مهم‌ترین بخش‌های زیست فناوری گیاهی است که جنبه کاربردی و تجاری پیدا کرده است. علاوه بر این، تولید موفقیت آمیز و کارآمد گیاهان تراریخته وابسته به توانایی باززایی گیاه کامل از سلول‌ها، بافت‌ها یا اندام‌هایی است که DNAی خارجی را دریافت و بیان می‌نمایند (شریفی و همکاران، ۱۳۸۹).

ازدیاد پایه‌های اصلاح شده‌ی درختان میوه به منظور افزایش بهره‌وری و راندمان تولید محصول، مقاومت به بیماری‌ها و آفات، افزایش مقاومت به تنش‌های محیطی غیر زنده و همچنین ایجاد باغ‌های میوه یکسان از دیر باز مورد توجه بوده است و با پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌های کشت

بافت و ریز ازدیادی، تکثیر این گونه‌های گیاهی با سرعت زیاد امکان پذیر شده است (James and Thurbon, 1981).

در مورد درخت عناب روش‌های مرسوم تکثیر این درخت مانند قلمه‌زنی و پاجوش یکی از عوامل محدود کننده‌ی توسعه باغ‌های عناب در کشور می‌باشد و از طرفی گزارش کاملی در مورد ریز ازدیادی و بررسی نقش عوامل ژنتیکی در کشت درون‌شیشه‌ای وجود ندارد. بررسی امکان تکثیر از طریق کشت بافت از طرفی امکان تکثیر ژنوتیپ‌های مطلوب از نظر کیفیت و کمیت محصول را در سطح وسیع به وجود می‌آورد و باعث مرتفع شدن مشکل موجود بر سر راه احداث باغ‌های یکنواخت می‌شود و از طرف دیگر امکان دست‌کاری‌های ژنتیکی برای این محصول را در جهت دسترسی به اهداف اصلاحی فراهم می‌کند.

لذا این پژوهش با اهداف زیر طرح ریزی و اجرا گردید:

۱- بررسی امکان کاشت در شرایط درون شیشه‌ای به منظور استفاده از این روش در تکثیر ژنوتیپ‌های مطلوب مورد نظر

۲- تعیین شرایط بهینه به منظور افزایش کارایی باززایی در عناب

فصل دوم
پیشینه پژوهش

۲-۱- گیاهان دارویی

امروزه به دلیل پیشرفت زیاد دانش بشر در مورد فرآیندهای متابولیکی تولید مواد موثره در گیاهان و تاثیر مواد موثره گیاهی بر انسان و حیوانات، معیارها در گستره گیاهان دارویی دچار تغییر شده است، به‌طوری‌که برخی از گیاهان که قبلاً به‌عنوان گیاه دارویی شناخته می‌شدند و مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند، امروزه با پیشرفت دانش بشر، به عنوان گیاهان دارویی مدنظر نیستند. از سوی دیگر، گیاهان جدید بسیاری به گستره گیاهان دارویی افزوده شده‌اند و زمین‌های زراعی وسیعی نیز به کشت آن‌ها اختصاص یافته است. بطور کلی سه معیار مهم برای تعریف گیاهان دارویی وجود دارد. اول اینکه مواد موثره با ارزش دارویی در آن تولید شود. اگر چه که تولید این مواد موثره فقط محدود به اندامهای خاصی از گیاه نظیر ریشه، برگ، گل، و ... باشد. دوم اینکه استفاده از مواد موثره آن، مستلزم فرآیند فرآوری باشد. به‌عبارت دیگر، این گیاهان را نمی‌توان بصورت تازه مورد مصرف قرار داد و سوم اینکه در موارد معدود و خاص قابل استفاده بوده و از کاربرد روزمره در جیره غذایی افراد برخوردار نباشد. یعنی، در سطوح زراعی نسبتا محدودی کشت گردد.

تاکنون فقط خصوصیات دارویی حدود سی هزار گونه از ششصد هزار گونه گیاهی جهان شناخته‌شده و تحقیقات گسترده‌ای در زمینه کشف مواد موثره جدید از گونه‌های گیاهی دیگر، در جریان است. پس از آنکه پیشرفت علم شیمی، امکان سنتز بسیاری از مواد موثره دارویی را ممکن ساخت، این تفکر ایجاد شد که با عرضه مواد سنتزی، از اهمیت گیاهان دارویی کاسته شده و نیاز چندانی به کشت و تولید آنها نخواهد بود. اما آمار سال‌های اخیر نشان می‌دهد که این تصور چندان