دانشکده علوم پایه

پایان‌نامه جهت دریافت درجه کارشناسی‌ارشد (M.Sc.)
رشته زیست شناسی (علوم گیاهی)- گرایش فیزیولوژی گیاهی

ریزازدیادی و بهینه سازی شرایط کشت در شیشه گیاه دارویی بیلهر
(Dorema aucheri)

پژوهش و نگارش:
راحله نوری

استاد راهنما:
دکتر منیژه میان‌آبادی

اساتید مشاور:
دکتر حمیدرضا صادقی‌پور
دکتر مهناز خلفی

اسفند ۱۳۸۹

تعهدنامه پژوهشی

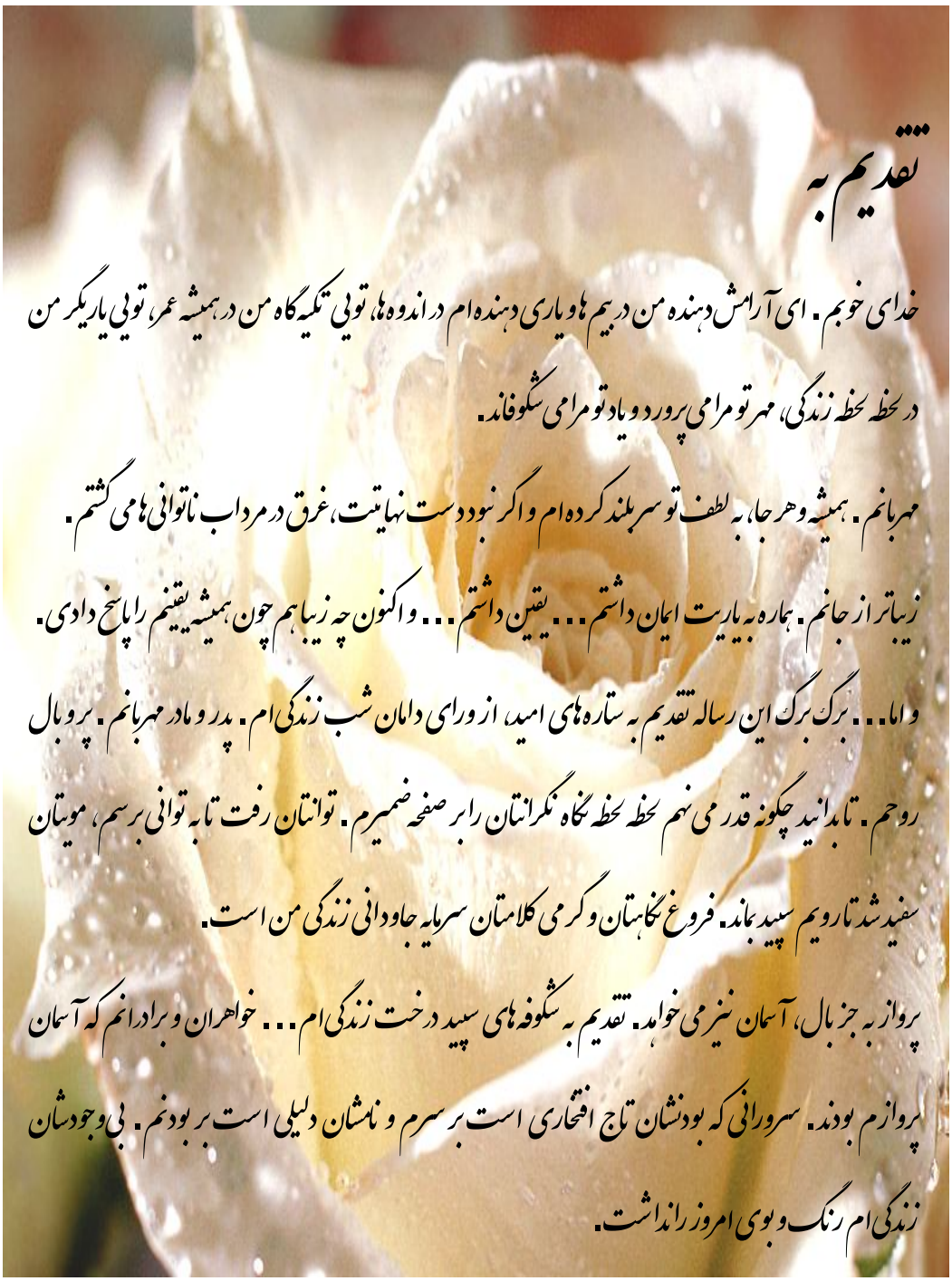
نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه گلستان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱. قبل از چاپ پایان‌نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع و کسب اجازه نمایند.

۲. در انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه گلستان الزامی است.

۳. انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **راحله نوری** دانشجوی رشته **زیست شناسی (علوم گیاهی)- گرایش فیزیولوژی گیاهی** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.



تقدیم به

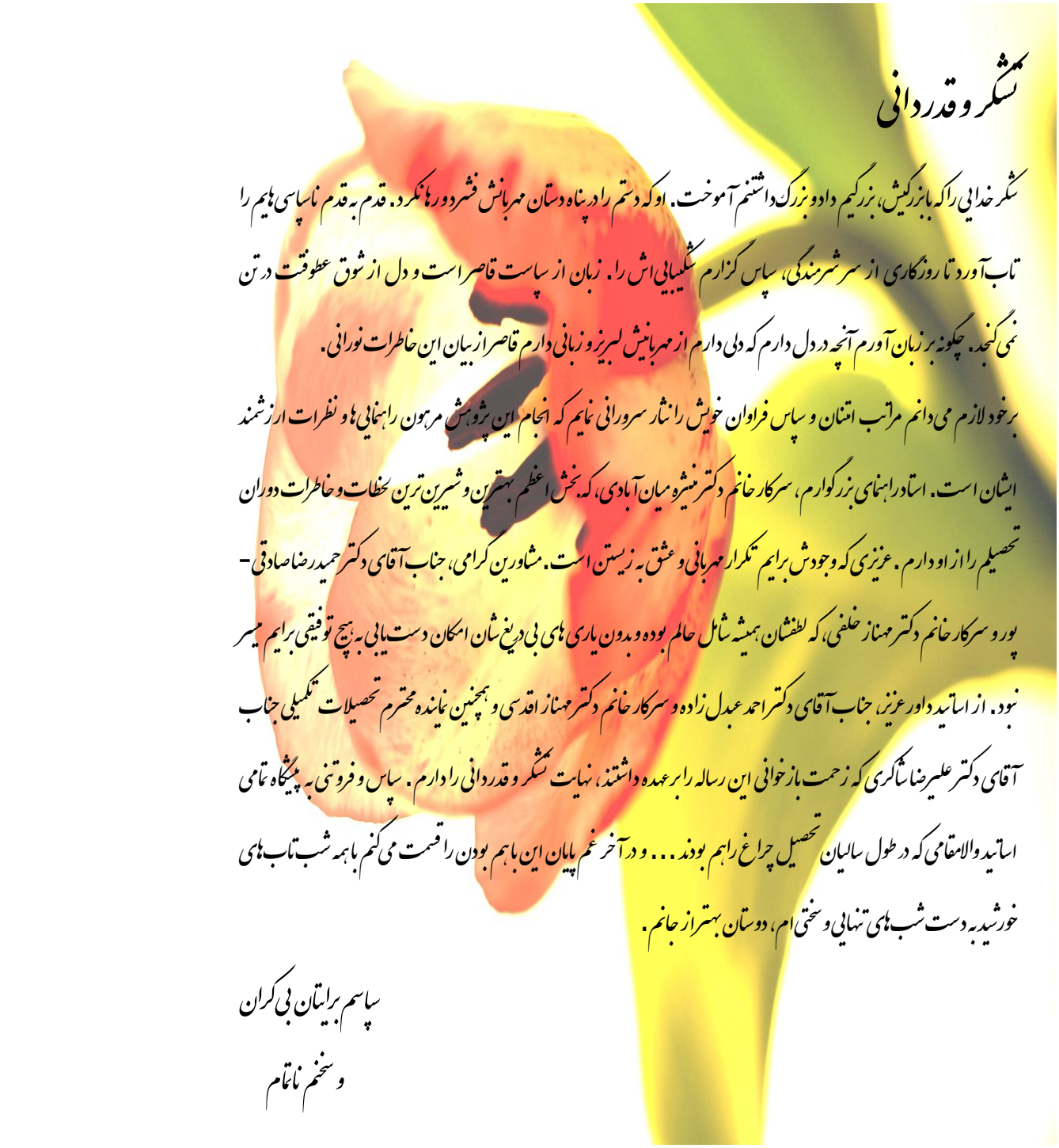
خدای خوبم. ای آرامش دهنده من در بیم ها و یاری دهنده ام در اندوه ها، تویی تکیه گاه من در همیشه عمر، تویی یاریگر من در لحظه لحظه زندگی، مهر تو مرا می پرورد و یاد تو مرا می شکوفاند.

مهربانم. همیشه و هر جا، به لطف تو سربلند کرده ام و اگر نبود دست نهایتت، غرق در مرداب ناتوانی ها می گشتم.

زیباتر از جانم. همواره به یاریت ایمان داشتم... یقین داشتم... و اکنون چه زیبا هم چون همیشه یقینم را پاسخ دادی.

و اما... برگ برگ این رساله تقدیم به ستاره های امید، از ورای دامان شب زندگی ام. پدر و مادر مهربانم. پر و بال روحم. تا بدانید چگونه قدر می نهم لحظه لحظه نگاه نگرانتان را بر صفحه ضمیرم. توانتان رفت تا به توانی برسم، مویتان سفید شد تا رویم سپید بماند. فروغ نگاهتان و گرمی کلامتان سرمایه جاودانی زندگی من است.

پرواز به جز بال، آسمان نیز می خواهد. تقدیم به شکوفه های سپید درخت زندگی ام... خواهران و برادرانم که آسمان پروازم بودند. سرورانی که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم. بی وجودشان زندگی ام رنگ و بوی امروز را نداشت.



تشکر و قدردانی

شکر خدایی را که بازرگیش، بزرگیم داد و بزرگ داشتنم آموخت. او که دستم را در پناه دستان مهربانش فشرد و رهانکرد. قدم به قدم ناسپاسی‌هایم را تاب آورد تا روزگاری از سر شرمندگی، سپاس گزارم شکیبایی‌اش را. زبان از سپاست قاصر است و دل از شوق عطوفت در تن نمی‌گنجد. چگونه بر زبان آورم آنچه در دل دارم که دلی دارم از مهربانیش لبریز و زبانی دارم قاصر از بیان این خاطرات نورانی.

بر خود لازم می‌دانم مراتب امتنان و سپاس فراوان خویش را نثار سرورانی نمایم که انجام این پژوهش مرهون راهنمایی‌ها و نظرات ارزشمند ایشان است. استاد راهنمای بزرگوارم، سرکار خانم دکتر منیژه میان آبادی، که بخش اعظم بهترین و شیرین‌ترین لحظات و خاطرات دوران تحصیلم را از او دارم. عزیزی که وجودش برایم تکرار مهربانی و عشق به زیستن است. مشاورین گرامی، جناب آقای دکتر حمیدرضا صادقی-پور و سرکار خانم دکتر مهناز خلفی، که لطفشان همیشه شامل حالم بوده و بدون یاری‌های بی‌دریغ‌شان امکان دست‌یابی به هیچ توفیقی برایم میسر نبود. از اساتید داور عزیز، جناب آقای دکتر احمد عبدل‌زاده و سرکار خانم دکتر مهناز اقدسی و همچنین نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر علیرضا شاکری که زحمت بازخوانی این رساله را بر عهده داشتند، نهایت تشکر و قدردانی را دارم. سپاس و فروتنی به پیشگاه تمامی اساتید والامقامی که در طول سالیان تحصیل چراغ راهم بودند... و در آخر غم پایان این با هم بودن را قسمت می‌کنم با همه شب‌تاب‌های خورشید به دست شب‌های تنهایی و سختی‌ام، دوستان بهتر از جانم.

سپاسم برایتان بی‌کران

و سخنم ناتمام

چکیده

کشور ایران خاستگاه گیاهان متنوعی است که بسیاری از آن‌ها به لحاظ خـواص دارویـی منحـصر بـه فـرد می‌باشند. افزایش تمایل به مصرف داروهای گیاهی به خصوص در کشورهای پیشرفته و وابسته بودن این داروها به منابع گیاهی بومی، باعث تهی شدن سریع پوشش گیاهی می‌شود. از این جهت، محققین توجه خود را به کشت درون شیشه‌ای گیاهان دارویی معطوف داشته‌اند. بیلهر با نام علمی *Dorema aucheri* متعلق به تیره چتریان و ازجمله گیاهان دارویی بومی ایران بوده که در حال انقراض است. پس از جمع آوری بذور بیلهـر از (یاسـوج) رویشگاه طبیعی گیاه، جوانه زنی آن‌ها تحت تیمارهای مختلف (با ٤ تکرار) مورد ارزیابی قرار گرفت. تیمارهای مورد بررسی شامل : خراش‌دهی مکانیکی (از طریق سنباده زدن و بریدن انتهای بذر یا پـین چینـگ کـردن) در بسترهای متفاوت و هم چنین تیمار ژیبرلیک اسید (ppm ۵۰۰ و ٤۰۰ ،۳۰۰ ،۲۰۰)، نیترات پتاسیم ۰/۲٪ و تیوره ۱مولار بود. رویش در دو دمای ^{o}C ۲۷ و ۵ و هم چنین تحت شرایط روشنایی و تاریکی بررسی شد. در نهایت، بالاترین درصد جوانه زنی (۱۰۰٪) از طریق خراش دهی مکانیکی بذور و کشت در خـاک جنگـل، در درجـه حرارت ^{o}C ۵ به دست آمد. به منظور بررسی تکثیر درون شیشه‌ای این گیاه، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تکرار انجام گردید. در این آزمایش، از محیط کشت MS و ۷۲ ترکیب غلظتی از هورمون‌های NAA/BAP و Kin/2,4-D در ٦ سطح (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵و ۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. ریز نمونه‌ها از ریشه، ساقه و لپه گیاهچه‌های بیلهر تهیه شدند. پارامترهای مورد بررسی شامل درصد ریشه‌زایی، شاخه‌زایی و کالوس‌زایی و هم‌چنین متوسط و ماکزیمم طول ریشه و شاخه نوپدید بود. در بررسی کالزایی، ریز نمونه ساقه در محیط کشت حـاوی $mg.L^{-1}BAP$ ۱ و $mg.L^{-1}NAA$ 2، بالاترین درصد (٦۲/۱٦٪) را به خود اختصاص‌داد. در آزمایشات مربوط به شاخه‌زایی، بهترین نتایج باز هم مربوط به کشت ریز نمـونه ساقه بود. به گـونه‌ای که در محیـط‌هـای حـاوی $mg.L^{-1}BAP$ ۲ و $mg.L^{-1}NAA$ ۰/۵و هم‌چنین $mg.L^{-1}BAP$ ۱ و $mg.L^{-1}NAA$ ۰/۵ به‌ترتیب بالاترین در صد شاخه‌زایی (۳۹/۹٦٪) و ماکزیمم طول شاخه نوپدید (۱۵/۱۳ میلیمتر) به‌دست آمد. نتایج حاصل از ریـشه‌زایـی ریزنمونه‌های بیلهر حاکی از آن است که بیشترین درصد ریشه‌زایی (۳۳/۳ ٪) را ریزنمونه ساقه در محیط کشت حاوی $mg.L^{-1}BAP$ ۱ و $mg.L^{-1}NAA$ ۱/۵ به خود اختصاص داده است. درصورتی که ماکزیمم طول ریـشه نوپدید (۲۰/۱٦ میلیمتر) از طریق کشت ریز نمونه ریشه در محـیط کـشت حـاوی $mg.L^{-1}BAP$ ۱ و $mg.L^{-1}NAA$ ۰/۵ مشاهده شد. بنابراین می‌توان گفت اثـر متقابـل دو هورمـون NAA و BAP در ریزازدیـادی بیلهـر چشمگیر بوده است. جهت تولید گیاه کامل، ریز نمونه‌های تک شاخساره به دست آمده را به تیمارهای بهینه برای ریشه‌زایی انتقال داده و به این‌ترتیب موفق به تولید گیاه کامل در شرایط درون شیشه‌ای شدیم. در بخش پایانی پژوهش، بهترین شرایط نگهداری گیاهچه‌ها در خاک (تحت دمای ^{o}C۵، رطوبت ۲٦٪ و شرایط نوری ۱٦ ساعت روشنایی) تعیین شد و در نهایت با شرایط طبیعی سازگار گردیدند.

واژه‌های کلیدی: بیلهر، ریزازدیادی، تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت MS

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه‌ای بر کشت بافت گیاهی ۲
۱-۲- دورنمای تاریخی کشت بافت گیاهی ۲
۱-۳- مزایای کشت بافت گیاهی ٤
۱-٤- ریزازدیادی ٤
۱-٥- چند توانی ٥
۱-٥-۱- چند توانی چیست؟ ٥
۱-٥-۲- تاریخچه چند توانی ٥
۱-٦- انتخاب محیط کشت مناسب جهت کشت بافت ٦
۱-۷- محیط کشت MS ٦
۱-۸- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ۷
۱-۹- ویتامین‌های محیط کشت ۸
۱-۱۰- مواد ژلاتینی کننده محیط کشت ۹
۱-۱۱- گیاه دارویی بیلهر ۹
۱-۱۱-۱- مشخصات گیاه شناسی و مورفولوژی ۹
۱-۱۱-۲- گیاهان عمده همراه و مناطق پراکنش بیلهر در ایران و جهان ۱۱
۱-۱۱-۳- ویژگی‌های اکوفیزیولوژیکی بیلهر ۱۲
۱-۱۱-٤- خواص مهم دارویی و فواید جانبی ۱۳
۱-۱۲- هدف ۱٥

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه استوک محیط کشت ۱۸
۲-۲- تهیه محیط کشت ۲۰
۲-۳- ضد عفونی‌کردن وسایل ۲۱

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-٤- آماده‌سازی هود (لامینارایرفلو) ۲۱
۲-۵- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ۲۲
۲-٦- آزمایشات مرحله جوانه‌زنی بیلهر ۲۳
۲-۷- اتاق رشد و شرایط نگهداری کشت‌ها ۲۵
۲-۸- تهیه منبع گیاهی ۲۵
۲-۹- ضد عفونی‌کردن گیاهچه‌ها برای تهیه ریزنمونه ۲۵
۲-۱۰- القای اندام‌زایی (ریشه‌زایی و شاخه‌زایی) و بررسی کالوس‌زایی در ریز نمونه‌ها ۲٦
۲- ۱۱- تولید گیاهچه کامل حاصل از کشت بافت ۲٦
۲-۱۲- سازگار کردن گیاهچه‌های باززایی شده با شرایط طبیعی
..... ۲۷
۲-۱۳- تجزیه و تحلیل داده‌ها ۲۸

فصل سوم: نتایج

۳-۱- نتایج حاصل از جوانه‌زنی بذور بیلهر تحت تیمارهای فیزیکی و غیرفیزیکی ۳۰
۳-۱-۱- نتایج حاصل از تیمارهای فیزیکی ۳۱
۳-۱-۲- نتایج حاصل از تیمارهای غیرفیزیکی ۳۲
۳-۲- نتایج حاصل از کالوس‌زایی ریز نمونه‌های ریشه، ساقه و لپه بیلهر ۳٤
۳-۲-۱- درصد کالوس‌زایی ۳٤
۳-۲-۲- اندازه نسبی کالوس ۳۷
۳-۲-۳- تغییرات مشاهده شده در ریز نمونه لپه بیلهر ۳۹
۳-۳- نتایج حاصل از شاخه‌زایی ریز نمونه‌های ریشه، ساقه و لپه بیلهر ٤۰
۳-۳-۱- درصد شاخه‌زایی ٤۱
۳-۳-۲- نتایج حاصل از اندازه‌گیری ارتفاع شاخساره باززایی شده ٤٤
۳-۳-۲-۱- ارتفاع شاخساره نوپدید ٤٤
۳-۳-۲-۲- ماکزیمم ارتفاع شاخساره نوپدید ٤٦

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-٤- نتایج حاصل از ریشه‌زایی ریز نمونه‌های ریشه، ساقه و لپه بیلهر ٤٨
۳-٤-۱- درصد ریشه‌زایی ٤٨
۳-٤-۲- نتایج حاصل از اندازه‌گیری طول ریشه باززایی شده۵۱ .....
۳-٤-۲-۱- طول ریشه نوپدید ۵۱
۳-٤-۲-۲- ماکزیمم طول ریشه نوپدید ۵٤
۳-۵- مرحله نهایی باززایی گیاهچه کامل ۵٦
۳-۷- نتایج حاصل از سازگارکردن گیاهچه‌های باززایی شده به خاک و شرایط طبیعی ۵۷

فصل چهارم: بحث

٤- ۱- بحث ٦۰
٤-۲- جمع‌بندی نهایی ٦٦
٤-۳- پیشنهادات ٦۷
منابع ٦۹

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- استوک (۲۰×) عناصر غذایی پر مصرف جهت تهیه محیط کشت MS ۱۸
جدول ۲-۲- استوک (۲۰۰ ×) عناصر غذایی کم مصرف جهت تهیه محیط کشت MS ۱۹
جدول ۲-۳- استوک (۲۰۰×) آهن جهت تهیه محیط کشت MS ۲۰
جدول ۲-٤- استوک (۲۰۰ ×) ویتامین‌ها جهت تهیه محیط کشت MS ۲۰
جدول ۲-۵- غلظت‌های هورمونی 2,4-D و Kin مورد استفاده برای القای اندام‌زایی و کالوس‌زایی برحسب میلی گرم در لیتر، در ۳٦ تیمار مختلف ۲۲
جدول۲-٦- غلظت‌های هورمونی NAA و BAP مورد استفاده برای القای اندام‌زایی و کالوس‌زایی برحسب میلی گرم بر لیتر، در ۳٦ تیمار مختلف ۲۳
جدول ۲-۷- تیمارهای مختلف فیزیکی و بسترهای مختلف به کار رفته برای بررسی جوانه زنی بذور بیلهر طی ۳۰ روز ۲٤
جدول۲-۸- تیمارهای مختلف غیرفیزیکی و بسترهای به کار رفته برای بررسی جوانه زنی بذور بیلهر طی۳۰روز ۲٤
جدول ۲-۹- شرایط مختلف جهت سازگار کردن گیاهچه‌های باززایی شده ۲۷
جدول ۳-۱- تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل جهت کالوس‌زایی ریز نمونه‌های بیلهر بر اساس میانگین مربعات ۳٤
جدول ۳-۲- نتایج بررسی اندازه کالوس تولیدی در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های Kin/2,4- D ۳۸
جدول ۳-۳- نتایج بررسی اندازه کالوس تولیدی در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA/BAP ۳۸
جدول ۳-٤- بررسی افزایش حجم ریز نمونه برگ بیلهر تحت تأثیر سطوح مختلف هورمونی ٤۰
جدول ۳-۵- تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل جهت شاخه‌زایی ریز نمونه‌های بیلهر بر اساس میانگین مربعات ٤۸
جدول ۳-٦- تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل جهت ریشه‌زایی بیلهر بر اساس میانگین مربعات ٤۸

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- گیاه بیلهر ۱۱
شکل ۱-۲- مناطق گسترش گیاه بیلهر در ایران ۱۲
شکل ۳-۱- گیاهچه‌های بیلهر رشد یافته در شرایط درون شیشه ۳۰
شکل ۳-۲- گیاهچه بیلهر رشد یافته در خاک جنگل ۳۱
شکل ۳-۳- مقایسه درصد جوانه‌زنی بذور بیلهر پس از اعمال تیمارهای مختلف فیزیکی ۳۲
شکل ۳-٤- دانه رست‌های بیلهر تحت تیمار نیترات پتاسیم (۰/۲٪) ۳۳
شکل ۳-۵ - مقایسه درصد جوانه زنی بذر بیلهر پس از اعمال تیمارهای مختلف غیرفیزیکی ۳۳
شکل ۳-٦- کالوس‌زایی ریزنمونه ساقه بیلهر در تیمار $mg.L^{-1}$BAP ۱ و $mg.L^{-1}$NAA ۲ ..... ۳۵
شکل ۳-۷- مقایسه درصد کالوس‌زایی ریز نمونه‌های بیلهر در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های NAA و BAP ۳۵
شکل ۳-۸- کالوس‌زایی ریز نمونه ساقه بیلهر در تیمار2,4-D $mg.L^{-1}$ ۲ ..... ۳٦
شکل ۳-۹- مقایسه درصد کالوس‌زایی ریز نمونه‌های بیلهر در محیط کشت MS حاوی هورمون‌ها Kin/2,4-D ۳٦
شکل ۳-۱۰- تصاویری از اندازه کالوس تولیدی بر روی ریز نمونه‌های ساقه و ریشه بیلهر تحت تاثیر سطوح مختلف هورمونی Kin/2,4-D ۳۷
شکل ۳-۱۱- تصاویری از اندازه کالوس تولیدی بر روی ریز نمونه‌های ریشه و ساقه بیلهر تحت تأثیر سطوح مختلف هورمونی NAA/BAP ۳۹
شکل ۳-۱۲- افزایش حجم ریز نمونه برگ تحت تأثیر سطوح مختلف هورمونی ٤۰
شکل ۳-۱۳- مقایسه درصد شاخه‌زایی ریز نمونه‌های بیلهر در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA/BAP ٤۲
شکل ۳-۱٤- شاخه‌زایی ریز نمونه ساقه بیلهر در تیمار$mg.L^{-1}$ NAA ۰/۵و $mg.L^{-1}$BAP ۲ ..... ٤۲
شکل ۳-۱۵- شاخه‌زایی ریز نمونه ساقه بیلهر در تیمار 2,4-D $mg.L^{-1}$ ۰/۲۵و Kin $mg.L^{-1}$ ۰/۵ ..... ٤۳
شکل ۳-۱٦- مقایسه درصد شاخه‌زایی ریز نمونه‌های بیلهر در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های Kin/2,4-D ٤۳

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱۷- مقایسه ارتفاع شاخساره نوپدید ریز نمونه‌های بیلهر در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA/BAP ٤٤

شکل ۳-۱۸- شاخه‌زایی ریز نمونه ساقه بیلهر در تیمار $mg.L^{-1}$BAP ۲ و $mg.L^{-1}$ NAA ۱/۵ ..... ٤٤

شکل ۳-۱۹- شاخه‌زایی ریز نمونه ساقه بیلهر در تیمار $mg.L^{-1}$2,4-D ۰/۲۵ و $mg.L^{-1}$Kin ۰/۵ ..... ٤٥

شکل ۳-۲۰- مقایسه ارتفاع شاخساره نوپدید ریز نمونه‌های بیلهر در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های Kin/2,4-D ٤٥

شکل ۳-۲۱- مقایسه ماکزیمم ارتفاع شاخساره نوپدید ریز نمونه‌های بیلهر در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA/BAP..... ٤٦

شکل ۳-۲۲- شاخه‌زایی ریز نمونه ساقه بیلهر در تیمار NAA $mg.L^{-1}$ ۰/۵ و BAP $mg.L^{-1}$ ۱ ..... ٤٦

شکل ۳-۲۳- مقایسه ماکزیمم ارتفاع شاخساره نوپدید ریز نمونه‌های بیلهر در محیط کشت حاوی هورمون‌های Kin/2,4-D ٤٧

شکل ۳-۲٤- شاخه‌زایی ریز نمونه ساقه بیلهر در تیمار $mg.L^{-1}$2,4-D ۰/۲۵ ,Kin $mg.L^{-1}$ ۰/۲۵ ..... ٤٧

شکل ۳-۲۵- ریشه‌زایی ریز نمونه ساقه بیلهر در تیمارNAA $mg.L^{-1}$ ۱/۵ و $mg.L^{-1}$BAP ۱..... ٤٩

شکل ۳-۲٦- مقایسه درصد ریشه‌زایی ریز نمونه‌های بیلهر در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA/BAP ٤٩

شکل ۳- ۲۷- مقایسه درصد ریشه زایی ریز نمونه‌های بیلهر در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های Kin/2,4-D ٥٠

شکل ۳-۲۸- ریشه‌زایی ریز نمونه ساقه بیلهر در تیمار $mg.L^{-1}$ 2,4-D ۲ و Kin $mg.L^{-1}$ ۰/۵ ..... ٥٠

شکل ۳-۲۹- مقایسه طول ریشه نوپدید ریز نمونه‌های بیلهر در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های NAA/BAP..... ٥١

شکل ۳-۳۰- ریشه‌زایی ریز نمونه ریشه بیلهر در تیمار $mg.L^{-1}$BAP ۱ و NAA $mg.L^{-1}$ ۱/۵ ..... ٥٢

شکل ۳-۳۱- ریشه‌زایی ریز نمونه ساقه بیلهر در تیمار $mg.L^{-1}$BAP ۰/۵ و$mg.L^{-1}$NAA ۲ ..... ٥٢

شکل ۳-۳۲- مقایسه طول ریشه ریز نمونه‌های بیلهر در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های Kin/2,4-D..... ٥٣

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۳۳- ریشه‌زایی ریز نمونه ریشه بیلهر در تیمار ۰/۲۵ $mg.L^{-1}$ 2,4-D ۵۳

شکل ۳-۳٤- ریشه‌زایی ریز نمونه ساقه بیلهر در تیمار ۰/۲۵ $mg.L^{-1}$ 2,4-D ۵۳

شکل ۳-۳۵- ریشه‌زایی ریز نمونه ریشه بیلهر در تیمار 1 $mg.L^{-1}$ BAP و ۰/۵ $mg.L^{-1}$ NAA ۵٤

شکل ۳-۳٦- مقایسه ماکزیمم طول ریشه نوپدید ریز نمونه‌های بیلهر در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA/BAP..... ۵٤

شکل ۳-۳۷- ریشه‌زایی ریز نمونه ساقه بیلهر در تیمار ۱ $mg.L^{-1}$ BAP و ۰/۵ $mg.L^{-1}$ NAA ۵٤

شکل ۳-۳۸- مقایسه ماکزیمم طول ریشه نوپدید درصد شاخه‌زایی ریز نمونه‌های بیلهر در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های Kin/2,4-D ۵۵

شکل ۳-۳۹- ریشه‌زایی ریز نمونه ریشه بیلهر در تیمار ۱ $mg.L^{-1}$ 2,4-D و۰/۵ $mg.L^{-1}$ Kin ۵٦

شکل ۳-٤۰- ریشه‌زایی ریز نمونه ساقه بیلهر در تیمار ۱ $mg.L^{-1}$ 2,4-D و ۰/۵ $mg.L^{-1}$ Kin..... ۵٦

شکل ۳-٤۱- گیاهچه‌های بیلهر حاصل از تکنیک کشت بافت ۵۷

شکل ۳-٤۲- گیاهچه‌های بیلهر در مرحله انتقال به خاک و سازش‌پذیری ۵۸

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه‌ای بر کشت بافت گیاهی

افزایش روز افزون جمعیت انسانی سبب شده تا بشر در فکر ابداع روش‌ها و تکنیک‌هایی باشد که ضمن افزایش کمیت و کیفیت مواد غذایی و اصلاح نژاد منابع گیاهی، ذخایر ژنتیکی موجود را حفظ نماید. کشت بافت از جمله تکنیک‌هایی است که به بشر قرن بیستم خدمات ارزنده‌ای در این خصوص ارائه داشته است [٤٦]. در حقیقت، قابلیت ژنتیکی که چند توانی[1] نامیده می‌شود باعث تبدیل یک سلول به یک گیاه کامل می‌گردد. با انتقال این گیاهچه‌ها به گلخانه و مزرعه می‌توان انبوهی از گیاهان مورد نظر را تولید کرد. در پاره‌ای از آزمایشگاه‌های پیشرفته، روبات‌های ساخت بشر، بسیاری از کارها همانند شستشو و استریل نمودن ادوات و نیز انتقال گیاهچه‌ها را انجام می‌دهند. اخیراً یک سیستم روبات هوشمند توسط دلپلانک[2] پیشنهاد شده است که گیاهچه‌ها توسط روبات در محیط کشت گذاشته شده، از آن جا برداشته می‌شوند و به داخل گلدان منتقل می‌گردند [۲۲]. اگرچه تنها حدود ۱۰۰ سال از عمر این تکنیک می‌گذرد اما چنان اثراتی را در پی داشته که امروزه به یکی از اساسی‌ترین روش‌ها در مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی تبدیل شده است. انتقال ژن و دست‌ورزی ژنتیکی در بسیاری از موارد تنها از طریق کشت بافت امکان‌پذیر است [۲۰].

۱-۲- دورنمای تاریخی کشت بافت گیاهی

به طور کلی می‌توان موارد مهم تاریخچه کشت بافت را به‌صورت زیر خلاصه کرد:

هابرلند[3]، ۱۹۰۲: نخستین کوشش برای کشت بافت گیاهی [۷۱]. هاینگ[4]، ۱۹،٤: کشت جنین در گیاهان خانواده شب‌بو [۷۲]. وایت[5]، ۱۹۳٤: کشت موفقیت آمیز ریشه گوجه فرنگی [۱۲۷]. گوترت[6]، نوبه[7] و وایت، ۱۹۳۹: کشت موفق کالوس با قابلیت رشد مداوم [۱۲۸ و ۱۰۱،٦٥]. وان[8]، ۱۹٤۱: استفاده از شیرنارگیل در کشت بافت گیاه داتوره [۱۲۲]. لو[9]، ۱۹٤٥: کشت بافت نوک ساقه‌های مارچوبه [۸۹].

---

1 Totipotency
2 Delplank
3 Haberlandt
4 Hannig
5 White
6 Gautheret
7 Nobe
8 Van
9 Loo