

سلام افلا



دانشگاه پیام نور
دانشکده علوم کشاورزی
گروه بیوتکنولوژی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان

**تعیین محیط کشت مناسب برای پرآوری و ریشه‌زایی در گیاهچه-
های رز رقم ماراسیا**

استادان راهنما

دکتر فرشاد ابراهیم‌پور مهندس سیروس ودادی

استاد مشاور

دکتر محمدعلی ابراهیمی

پژوهشگر

محمدایلیا نعمت‌پور

تابستان ۱۳۹۰

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از زحمات بی دریغ استادان راهنما جناب آقای دکتر فرشاد ابراهیم پور و آقای سیروس ودادی به خاطر نقش اساسی که در شکل گیری و تنظیم این تحقیق داشته اند و راهنمایهای لازم را ارائه نمودند تشکر و قدر دانی نموده و از خداوند منان برای ایشان آرزوی توفیق و موفقیت را دارم.

از استاد مشاور جناب آقای دکتر محمد علی ابراهیمی برای مساعدت دلسوزانه و راهنمایی های موثرشان در طول تحقیق سپاسگزاری و قدردانی می نمایم.

از کلیه کسانی که زمینه انجام این تحقیق را صمیمانه فراهم نمودند سپاسگزاری می نمایم.

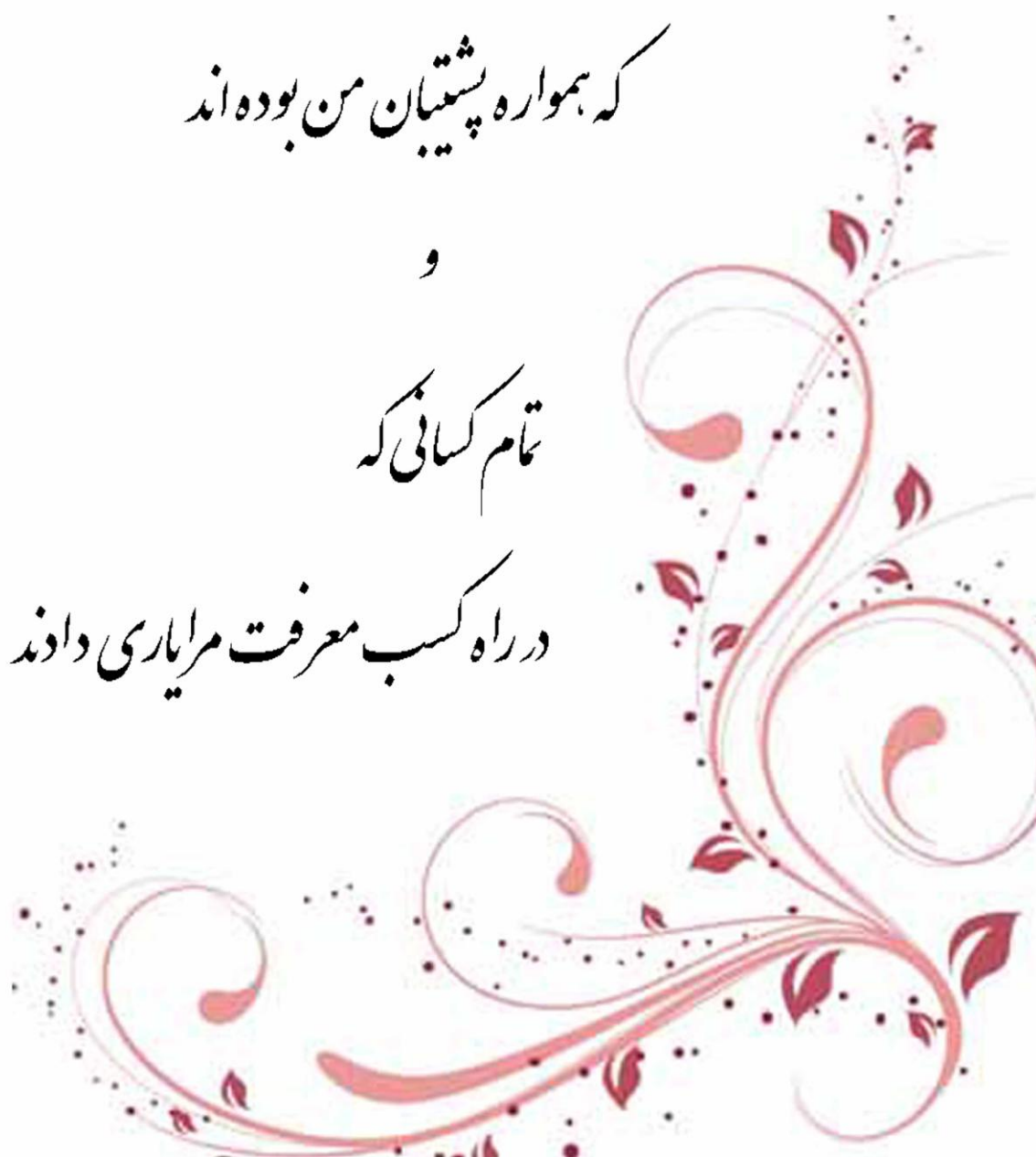
تقدیم به پدر و مادر عزیزم

که همواره پشتیبان من بوده اند

و

تمام کسانی که

در راه کسب معرفت مریاری دادند



با سپاس از استاد درون و حضور متجلی و حیات بخش جانان که مرا همواره یاری کرده است که بهترین ها را برگزینم.

تقدیم به

همه کسانی که برای عشق و صلح و دوستی رشد و تحول و آگاهی و بیداری در جهان ایستاده اند.

فهرست مطالب:

چکیده

- مقدمه : تاریخچه ۲
- خواستگاه و انتشار جغرافیائی گل سرخ ۳
- شرایط کاشت ۳
- موارد استفاده گل سرخ ۳

فصل اول: بررسی منابع

- ۱-۱- مشخصات گیاه شناسی تیره Rosaceae ۷
- ۱-۲- کشت بافت گیاهی ۸
- ۱-۲-۱- محیط کشت ۱۲
- ۱-۲-۲- اهمیت کشت بافت در گونه رز مارسیا ۱۳
- ۱-۲-۳- پیشینه کشت بافت در رز ۱۴
- ۱-۲-۳-۱- مطالعات انجام شده بر روی کشت مریستم درانواع رزها ۱۴
- ۱-۲-۳-۲- مطالعات انجام شده روی ریشه دهی و شاخه‌های تولید شده از طریق کشت بافت ۱۶

فصل دوم: مواد و روشها

- ۱-۲- کلیات و گونه گیاهی مورد مطالعه ۲۰
- ۲-۲- محیط‌های کشت و روش تهیه آنها ۲۰

- ۲۲-۲-۱-۱-۲-۲-۲ روش تهیه محیط کشت MS ۲۲
- ۲۲-۲-۱-۱-۲-۲-۲ طرز تهیه محلول مادر عناصر پرمصرف ۲۲
- ۲۳-۲-۱-۲-۲-۲ طرز تهیه محلول مادر عناصر کم مصرف ۲۳
- ۲۴-۳-۱-۲-۲-۲ طرز تهیه محلول مادر کلات آهن ۲۴
- ۲۵-۴-۱-۲-۲-۲ طرز تهیه محلول مادر ویتامین‌ها ۲۵
- ۲۶-۵-۱-۲-۲-۲ طرز تهیه محلولهای مادر هورمون‌های مورد نیاز ۲۶
- ۲۶-۶-۱-۲-۲-۲ طرز تهیه محیط کشت MS جامد ۲۶
- ۲۸-۳-۲-۳-۲-۲ سترون سازی (Sterilization) ۲۸
- ۲۸-۱-۳-۲-۳-۲-۲ سترون سازی محیط‌های کشت ۲۸
- ۲۸-۲-۳-۲-۳-۲-۲ سترون سازی وسایل مورد نیاز کشت ۲۸
- ۲۹-۳-۳-۲-۳-۲-۲ سترون سازی اتاق کشت و دستگاه لامینار ۲۹
- ۳۰-۲-۲-۲-۲-۲-۲ تهیه گیاه ۳۰
- ۳۱-۱-۲-۲-۲-۲-۲ آماده سازی ریزنمونه‌ها ۳۱
- ۳۱-۲-۲-۲-۲-۲-۲ کشت ریزنمونه ۳۱
- ۳۲-۳-۲-۳-۲-۲-۲ پرآوری و ریشه زایی گیاهان ۳۲
- ۳۲-۴-۲-۴-۲-۲-۲ نحوه اندازه‌گیری صفات ۳۲
- ۳۲-۵-۲-۵-۲-۲-۲ روش بررسی و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها ۳۲

فصل سوم: نتایج

۳-۱-نتایج حاصل از مطالعات کشت بافت در گونه رز مارسیا	۳۴
۳-۱-۱-بررسی نتایج حاصل از کشت بافت در محیط کشت MS	۳۴
۳-۱-۱-۱-بررسی توان ریزنمونه ها در ساقه زایی و رشد جوانه در محیط کشت MS محتوی هورمون‌های KIN ,BAP	۳۴
۳-۱-۱-۲-بررسی توان ریزنمونه‌ها در ریشه‌زایی در محیط کشت MS محتوی هورمون‌های IBA و NAA	۴۴

فصل چهارم: بحث

۴-۱-مطالعات انجام شده روی پرآوری و شاخه‌های تولید شده و ریشه دهی از طریق کشت بافت در گونه رز مارسیا	۵۰
۴-۱-۱-تفسیر نتایج حاصل از پرآوری و ساقه‌زایی در گونه رز مارسیا	۵۰
۴-۱-۲-تفسیر نتایج حاصل از ریشه زایی در گونه رز مارسیا	۵۴
منابع	۵۷
Abstract	۶۹

چکیده



رز یکی از گیاهان زینتی و تجاری مهم در جهان محسوب می‌گردد. رقم ماراسیا نیز به عنوان یک رقم تجاری در بخش باغبانی مطرح می‌باشد. آمارها نشان می‌دهد هلند سالانه میلیونها گل رز به کشورهای دیگر صادر می‌کند که نقش مهمی در اقتصاد این کشور دارد؛ کشور ما نیز با توجه به داشتن شرایط آب و هوای مناسب، می‌تواند گامهای موثری در راستای تولید داخلی و صادرات این محصول بردارد. از محدودیت‌های این رقم برای ارائه به بازار جهت فروش، تکثیر

سریع و عاری از بیماری بودن گیاهچه می‌باشد. استفاده از تکنیک کشت بافت می‌تواند کمک موثری به بخش تولید در سطح انبوه در مدت زمان کمتر باشد. قابلیت کشت در هر زمان و موقعیت جغرافیایی، یکنواختی از نظر ژنتیکی، همزمانی گل‌دهی و آسان شدن برداشت و عاری بودن از هرگونه بیماری از مهمترین ویژگی‌های رزهای تولید شده به روش کشت بافت است. این کار بصورت طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج انجام شد که برای تعیین بهترین محیط کشت پرآوری، از هورمونهای بنزیل امینو پورین (BAP) و کایتین (Kinetin) و جهت ریشه‌زایی از غلظتهای مختلف IBA و NAA استفاده گردید. برای پرآوری خصوصیات میزان زنده‌مانی، تعداد پاجوش، میزان کالوزدهی و وزن تر و خشک و جهت ریشه‌زایی تعداد ریشه، طول ریشه و وزن تر و خشک اندازه‌گیری شد. نتایج این تحقیق نشان داد محیط MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و محیط MS حاوی IBA با غلظت ۰٫۱ میلی‌گرم در لیتر بهترین محیط بترتیب برای پرآوری و ریشه‌زایی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کشت بافت، هورمون، ماراسیا و رز

مقدمه

مقدمه:

تاریخچه

Rose در لاتین به معنای گل سرخ می باشد. گل سرخ میراث بزرگی از افسانه و تاریخ را به همراه دارد. این درختچه زیبا، میلیونها سال قبل از بوجود آمدن بشر در روی زمین، زیسته و زیبائی و عطر را در همه جا گسترده است. فسیلهائی که از شکوفه های گل سرخ در آرگون (Oregon) و کولورادو (Colorado) بدست آمده، احتمالاً به ۳۵ تا ۷۰ میلیون سال قبل، مربوط بوده است [۹]. گل سرخ امروز با رزهای قرنهای گذشته خیلی متفاوت اند. آنها در رنگ، شکل، بو، طول مدت گل دهی با اجداد خود بواسطه هیبریدهای انجام گرفته، فرق دارند. در اوایل سال ۱۸۰۰، تمام رزها، فقط در تابستان گل می دادند به غیر از رز مانتری چینی (Monthly) که در پاییز نیز گل می دادند [۲]. با رونق گرفتن کشت گل رز در سراسر اروپا، نمایشگاههای مخصوص گل ترتیب داده شد ولی از همه بالاتر فستیوال گل در ژنو می باشد که در هر سال در سراسر دنیا برگزار می شود و بی نظیر است؛ حتی گروهی از افراد با سلیقه و ذوق آن را در ردیف مراسم برگزاری جوایز اسکار در هالیوود می دانند. از طرفی، نمایشگاه گل سرخ منحصر به ژنو نبوده، بلکه در اقصی نقاط جهان بر پا می گردد، مانند وست بروک پارک (هلند) پارک دلی در مادرید "سن" در دوبلین پایتخت ایرلند، دورتموند در آلمان و غیره، در سال ۱۹۸۷ یک مسابقه بزرگ رقابت انگیز با شرکت هزاران علاقمند به رز در شهر پاریس با حدود ۴۰۰ نوع گل مختلف به معرض نمایش درآمد و در واقع بهشتی از گل، عطر و رایحه مطبوع مشام بینندگان را معطر ساخت.

خواستگاه و انتشار جغرافیائی گل سرخ

منشأ اصلی این گل آسیای جنوب شرقی و ایران گزارش شده است که امروزه در تمام نقاط دنیا کشت می‌گردد. قسمت اعظم گل سرخ از کشورهای بالکان، فرانسه، ترکیه، مراکش و ایران تولید و صادر می‌گردد. کشت و کار آن در ایران، در زمانهای پیش متداول بوده است [۹].

شرایط کاشت

گل سرخ در آب و هوای سرد کوهستانی می‌روید، ارتفاع بوته آن بین ۵۰ تا ۱۵۰ سانتی متر است و در خاک رس شنی پرورش داده می‌شود، اگر چه انواع دیگر خاک‌ها هم مناسب گل سرخ است ولی خاک رس شنی با توجه به مواد معدنی آن برای این کار مناسب تر است. گل سرخ بعد از دو سال از کاشت اولیه آن گل می‌دهد و این گل دادن معمولاً بین سه تا چهار سال ادامه پیدا می‌کند. بعد از چهار سال بوته آن از شاخه اصلی بریده می‌شود تا دوباره سه تا چهارسال گل بدهد [۹ و ۱۰].

موارد استفاده گل سرخ

گل سرخ، مظهر محبت است و زیبایی، عطر دل انگیز آن از دوران باستان آن را ستوده‌اند و حکمای یونان مصارف فراوانی (مخصوصاً در عطر سازی و پزشکی) برای آن ذکر کرده‌اند و در طب شرق جایگاه ویژه ای دارد. گل محمدی که در واقع گل سرخ پرپر، صورتی رنگ مظهر زیبایی و جمال طبیعت به شمار می‌آید. عمده قسمتهای مورد استفاده این گیاه گلها و میوه های آن می‌باشد [۹]. گلبرگها و میوه های گل سرخ، کمی قابض بوده و از این رو آن را به عنوان داروی قابض ملایم به کار می‌برند [۱۰، ۱۱].

دانشمندان انگلیسی در حین جنگ جهانی دوم متوجه شدند که میوه های گل رز، به عنوان منابع بسیار غنی از ویتامین ث به شمار می آید، به طوری که سه عدد میوه متوسط گل سرخ به اندازه یک پرتغال معمولاً ویتامین ث دارد. روی همین اصل از قدیم در روستاهای مناطق معتدل ایران، از میوه گل سرخ و نسترن، آش، شربت و ترشی درست می کردند و یا نوعی از آن که در مازندران « کلیک » و در آذربایجان « گلدیک » می گویند و بعد از ریختن گلبرگها رنگشان قرمز روشن و نرم می باشد به شکل خام نیز مصرف می گردد. از گلبرگهای گل محمدی در نواحی غربی و شمال کشور، مربا و شربت درست می کنند که به علت داشتن املاح ملین و مفید است. میوه های گل رز حاوی اسید اسکوربیک به مقادیر ۵/۰ تا ۷/۱ درصد می باشد ولی مقدار ویتامین موجود در آن بستگی تام به منشاء گیاهی، محل کشت، آب و هوای منطقه، زمان جمع آوری و طریقه خشک شدن محصول دارد. از انواع گل سرخها اسانس، گلاب و عرق می گیرند از آب گل رز برای برخی ناراحتی پوستی و ضد عفونی کردن برخی عفونت های چشمی استفاده می شود و همچنین آرام بخش و ضد افسردگی است و تنش های عصبی، زخم های گوارشی، امراض قلبی را کاهش می دهد. عصاره رز برای ترشح صفرا، هضم غذا، ناراحتی های خونی مفید است. چای رز در تسکین گلو درد، کاهش عفونت مثانه و درمان اسهال، کاهش عوارض سرماخوردگی و آنفولانزا تأثیر دارد. از بوی گل رز در روان درمانی ها استفاده می شود زیرا که حس هورمونی و امنیت در بدنمان ایجاد می شود و به ما کمک میکند تا به غرورمان مسلط شویم. در فکر و فعالیت انرژی ایجاد می کند و در کل به قلب ما انرژی تازه ای وارد می کند. مشکلات قاعدگی و یائسگی را حل می کند و بهترین حمایت کننده روانی در دوران حاملگی است که بسیار بهتر از حمایت کننده های فیزیکی عمل می کند. در دانش آیورودا

و طب هومیوپاتی هم از گل سرخ استفاده میشود. امروزه پرورش گل‌های زیتنی و درختان میوه تیره گل سرخ، بویژه به روش‌های قلمه زدن، پیوند زدن، کشت بافت و غیره، از مسائل مهم اقتصادی در امور باغبانی به شمار می‌رود [۹].

فصل اول

بررسی منابع

فصل اول: بررسی منابع

۱-۱- مشخصات گیاه شناسی تیره Rosaceae

جنس رز از خانواده *Rosaceae* زیرخانواده *Rosidaeae* بصورت نیمه دائم سبز تا خزان کننده، با دامنه وسیعی از عادات رشد در آسیا، شمال آفریقا، آمریکای شمالی و اروپا یافت میشود [۱،۲،۳،۱۵]. امروزه پرورش گل های زینتی از مسائل مهم اقتصادی در امور باغبانی به شمار می رود [۱۱]. رزها درختچه هایی از خانواده گل سرخ (*Rosaceae*) می باشند. این خانواده متجاوز از ۲۰۰۰ گونه و حدود ۱۰۰ جنس را در بر می گیرد. جنس *Rosa* دارای ۲۵۰ گونه بوده که مهمترین آنها به غیر از گل محمدی از نظر تهیه اسانس و گلاب عبارتند از: *R. caninal* و *R. moschata* (نسترن) و *R. alba* و *R. centrifolia* و *R. galica* (گل سرخ). عدد پایه کروموزومی کلیه رزها $2n=14$ است. کروموزومهای رز از $2x=14$ تا $2n=8x=56$ متغیر است [۳، ۱ و ۹]. رزهای کشت شده که از نظر تجارتي مهم هستند عموماً تریپلوئید یا تتراپلوئید هستند. همچنین موتاسیون های خودبخودی نیز به فراوانی در جنس *Rosa* رخ می دهد و عدد پایه ژنتیکی را گسترده می کند [۵۷]. دارای برگ های متناوب و معمولاً دارای گوشوارک، گل ها منظم معمولاً دوجنسی، تخمدان در زیر محل اتصال قطعات پوشش گل و پرچم ها و یا در حد فاصل محل اتصال قطعات پوشش گل و پرچم ها واقع شده. هیپانتیوم برجسته، فرو رفته و یا لوله ای. کاسبرگ ها معمولاً ۵، گاهی همراه با کاسبرگ فرعی. گلبرگ ها ۵، آزاد، گاهی وجود ندارد. پرچم ها معمولاً ۲ تا ۳ یا ۴ برابر کاسبرگ ها، گاهی ۱ تا ۵ یا نامحدود برچه ها یک تا تعداد زیاد، آزاد یا در قاعده چسبیده، گاهی با هیپانتیوم یکی شده. تخمک معمولاً ۲، گاهی یک یا زیاد، برگشته، خامه جدا، به ندرت

یکی شده. میوه از یک تا تعداد زیادی برچه تشکیل شده یا شفت، برگه، غضروفی. هیپانتیوم گاهی رنگین و گوشتالود. آندوسپرم معمولاً وجود ندارد. در این خانواده اصطلاح هیپانتیوم به عضوی اطلاق می‌گردد که کاسبرگ‌ها، گلبرگ‌ها و پرچم‌ها در خارج و در حاشیه فوقانی آن قرار دارند و برچه‌ها را در خود جای داده است. هیپانتیوم در حقیقت قسمتی از نهنج است که گاهی اوقات با دیواره برچه‌ها آمیخته شده به طوری که تعیین حد فاصل آن مشکل و یا غیر ممکن است [۳ و ۹].

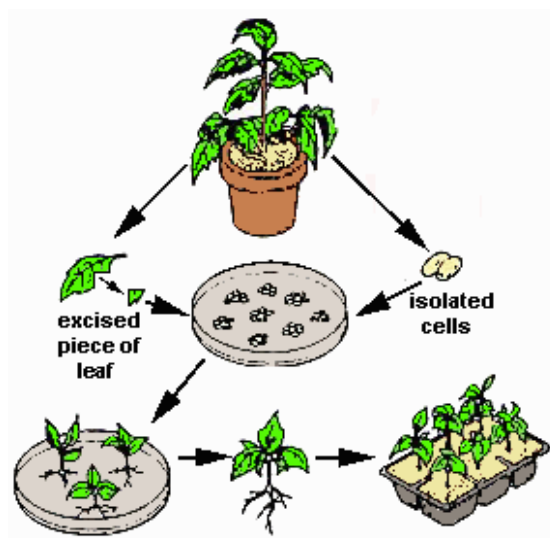
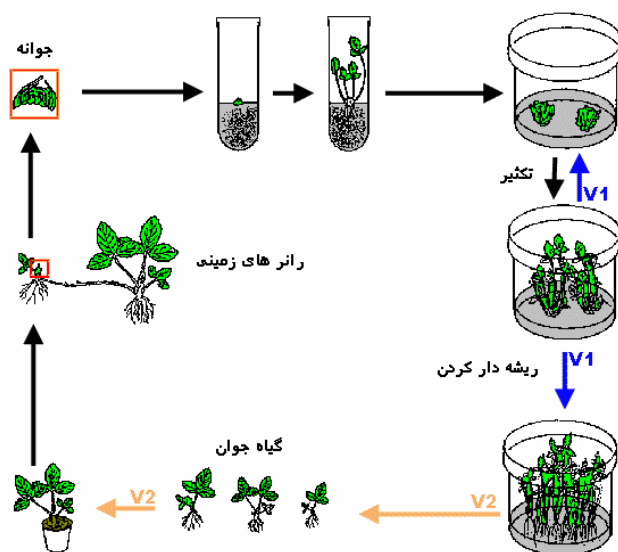
۱-۲- کشت بافت گیاهی

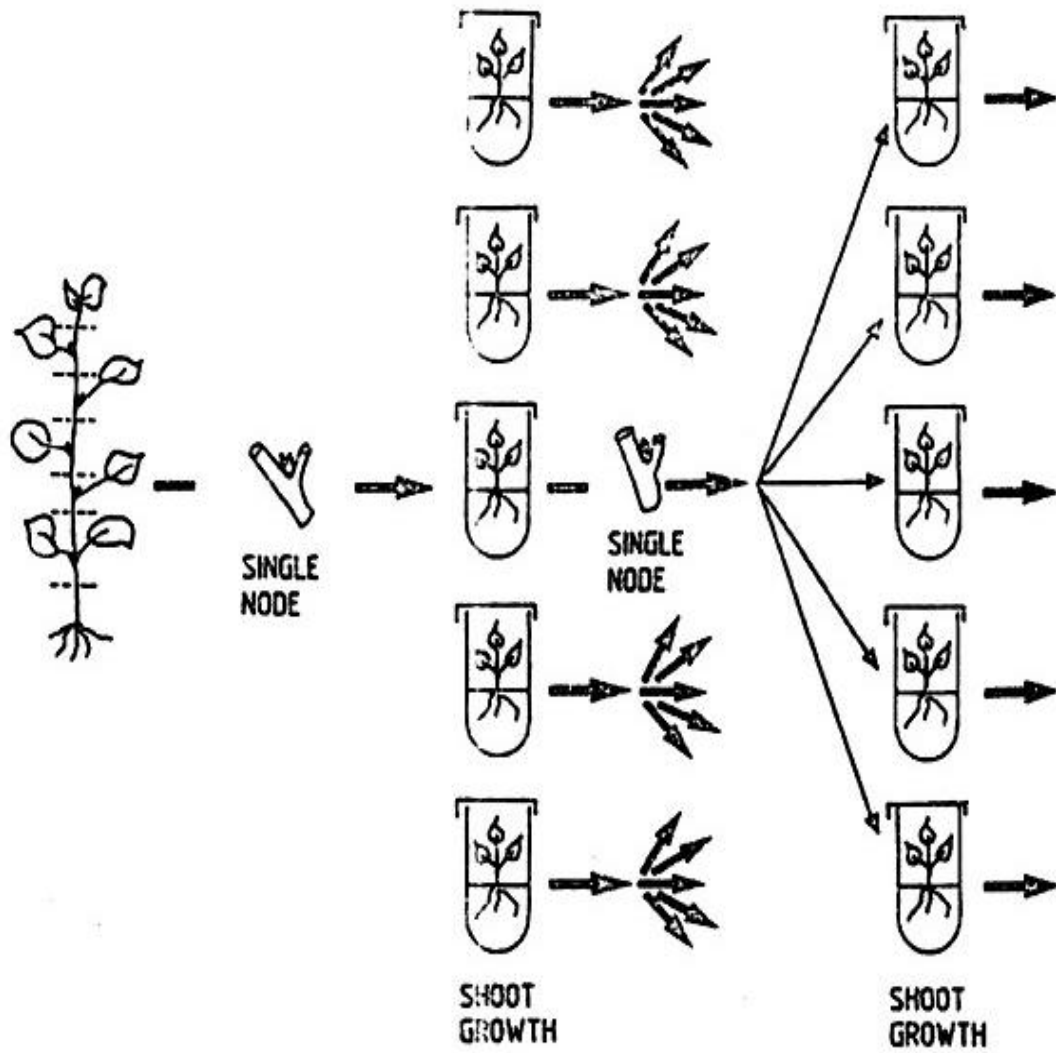
اولین استفاده علمی از تکنیک‌های کشت بافت گیاهی در کشاورزی در طول سال‌های ۱۹۲۰ بود هنگامی که دانه‌های ارکیده تحت شرایط آزمایشگاهی به جوانه زدن تحریک می‌شوند [۷۰]. در واقع قرار دادن هر قسمت از گیاه (سلول، بافت، اندام وغیره) در محیط کشت مناسب در شرایط سترون جهت ایجاد یک گیاه کامل اصطلاحاً کشت بافت گیاهی نامیده می‌شود [۳۴، ۸۹، ۴، ۱۸]. کاربرد تجارتي تکنیک‌های کشت بافت برای تکثیر رویشی گیاهان کشت شده می‌باشد، هر چند ۳۰ سال پیش از این هم گزارش شده بود که بافت‌هایی مثل نوک ساقه و یا اندام‌های گیاهی برای تولید قلمه ترجیح داده می‌شدند. در مقابل گیاهان علفی، گیاهان چوبی کمتر تحت کشت *in vitro* قرار گرفته‌اند و اطلاعات موجود فقط ۱۵۰ گونه را نشان می‌دهد که به طور موفقیت آمیز ولی با گوناگونی وسیعی از یکدیگر ریز ازدیادی شده‌اند [۱۰۲]. در دنیای امروز دانش مربوط به کشت بافت گیاهی و کاربردهای آن بسیار مورد توجه پژوهشگران می‌باشد. کشت، مریستم، قطعاتی از ساقه، برگ، میکروسپور وغیره همگی به عنوان کشت بافت در نظر گرفته می‌شوند ولی هر یک از موارد مذکور واژه خاص خود را دارد. مثلاً کشت سلول،

کشت مریستم، کشت قسمت انتهایی ساقه، کشت میکروسپور. اساس کشت بافت بر خاصیت توتی پوتنسی بودن سلولهاست. نظریه توتی پوتنسی بودن همه سلولهای یک ارگانیسم زنده در تئوری سلول مستقر بود. شوان [۸۶، ۵۳، ۵۰، ۲۵، ۲۰] این نظریه را عنوان نمود که هر یک از سلولهای زنده موجودات پرسلولی اگر در شرایط محیطی مطلوبی قرار بگیرد باید استقرار و تکامل مستقل داشته باشد. بنا به تعریف یک سلول توتی پوتنسی استعداد رشد و تکامل و ایجاد یک موجود کامل را دارد. به عبارت دیگر به قابلیت تبدیل یک سلول به یک موجود کامل توتی پوتنسی گفته می شود. وایت [۸۶] نخستین کسی بود که مسئله کشت سلولی را به روشنی بیان نمود. او اظهار داشت که تمامی سلولهای یک ارگانیسم زنده مشابه به هم و توتی پوتنت هستند. تفاوتهای مشاهده شده بین سلولها باید از واکنش سلولها نسبت به محیط خود و نسبت به سایر سلولهای موجود در بدن ارگانیسم ناشی شده باشد. بنابراین این امکان وجود دارد که بتوان با مجزا کردن سلولها از تاثیرات ارگانیسم مادری پتانسیل های نهفته را به آنها باز گردانید. ولی اگر بعضی از این پتانسیلها تحت تاثیر ارگانیسم مادری برای همیشه از دست رفته باشند، به نحوی که سلولهای موجود در بدن ارگانیسم سالم دیگر توتی پوتنت نباشند، در این صورت جدا کردن سلول از ارگانیسم های مادری هیچگونه تاثیری در استقرار مجدد فعالیتها از دست رفته نخواهد داشت [۱۲۹].

از کاربردهای کنونی کشت بافت گیاهی می تواند رشد و تکثیر یاخته ها در شرایط مصنوعی جهت به دست آوردن تولیدات با ارزش بیوستری، استفاده از دورگه گیری رویشی و ایجاد رقم های جدید، تولید مواد دارویی و فراهم سازی امکانات انتقال ژن ها و مهندسی ژنتیک نام برد. یکی از مهمترین

کاربردهای کشت بافت گیاهی کشت مریستم‌ها جهت نابودی ویروس‌ها و دیگر عوامل بیماری‌زا، به منظور افزایش محصول در حد بهینه می‌باشد. چرا که در گیاهان آلوده مریستم راسی عاری از ویروس و یا دارای تراکم پایینی از ویروس‌ها می‌باشد [۱۹،۳۸]. از اهداف مهم دیگر در کشت بافت تکثیر گیاهان از طریق ریزازدیادی است که می‌تواند سود اقتصادی کلانی را به همراه داشته باشد. که این امر بیشتر در مورد گیاهانی به کار برده می‌شود که ارزش بالایی دارند تکثیر آنها به روش‌های معمولی مشکل است و یا گیاهانی که تکثیر سریع آنها اهمیت دارد [۲۰].





تصویر شماره ۱-۱: تکثیر سریع با کمیت زیاد و عاری از آلودگی که قابلیت نگهداری در مدت زیاد را دارد در کشت بافت

[۴]