بسم الله الرحمن الرحيم

٤٦١٤٠

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دانشکده علوم زراعی

پایان نامه

جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی کشاورزی- علوم باغبانی

عنوان:

بررسی اثر عناصر بور و روی در تشکیل جنین‌رویشی گیاهان هویج و خیار

پژوهش و نگارش:

فهیمه وحدت پور

استاد راهنما:

دکتر کامبیز مشایخی

اساتید مشاور:

دکتر مهدی شریفانی **مهندس مهدی شاهسوند**

۱۳۸۷ /۴/ ۱۷

بهار ۱۳۸۷

۴۶۱۴۰

به نام خدا

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دانشکده های علوم کشاورزی

صورت جلسهٔ دفاع از پایان نامه دورهٔ کارشناسی ارشد رشته علوم باغبانی

جلسهٔ دفاع از پایان نامه **خانم فهیمه وحدت پور** دانشجوی دورهٔ کارشناسی ارشد رشتهٔ **علوم باغبانی** باشماره دانشجویی **۸۴۱۳۰۲۳۱۰۴** تحت عنوان **بررسی اثر عناصر بور و روی بر تشکیل جنین رویش گیاهان هویج و خیار** در ساعت **۱۳:۳۰** روز **یکشنبه** مورخه **۸۷/۲/۲۹** در سالن اجتماعات دانشکده های علوم کشاورزی با حضور هیأت داوران به شرح زیر برگزار و پایان نامه با نمره ۱۹٫۹۶ پذیرفته شد.

اعضاء هیأت داوران:

۱- دکتر کامبیز مشایخی (استاد راهنما)

۲- دکتر مهدی شریفانی(استاد مشاور)

۳- مهندس مهدی شاهسوند(استاد مشاور)

۴ – دکتر فرهاد خرمالی (نماینده شورای تحصیلات تکمیلی دانشگاه)

۵– دکتر خدایار همتی (داور)

۶- دکتر عظیم قاسم نژاد (داور)

تقدیم به عشق پاک و بی پایان پدر و مادر عزیزم

و همسر مهربانم

سپاسگزاری

با حمد و سپاس از درگاه ایزد منان، که هر چه هست و نیست از اوست و از سر رحمت و حکمت او، اکنون برخود لازم می دانم مراتب سپاس خود را به کلیه کسانی که در این مدت مرا یاری نمودند اعلام دارم.

از استاد راهنمای گرانقدر و بزرگوارم جناب آقای دکتر کامبیز مشایخی که مسئولیت این پایان نامه را تقبل نمودند و در تمامی مراحل پایان نامه مرا از راهنمایی ها و مساعدت های بی دریغ و ارزشمند علمی و سجایای اخلاقی خود بهره مند ساختند کمال تشکر و امتنان را دارم.

از اساتید محترم جناب آقای دکتر مهدی شریفانی و دکتر مهدی شاهسوند که با تقبل مشاورت پایان نامه و راهنمایی های ارزشمند خود مراتب ارتقاء آن را فراهم نمودند بسیار ممنون و سپاسگزارم، از اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر خدایار همتی و جناب آقای دکتر عظیم قاسم‌نژادکه زحمت داوری پایان نامه را تقبل نموده و زمینه بهبود آن را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می نمایم. از مساعدت و لطف نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر خرمالی کمال سپاسگزاری را دارم. و همچنین از جناب آقایان مهندس کلاتی بعنوان کارشناس آزمایشگاههای گروه علوم باغبانی، دکتر کامکار و مهندس عرفانی مقدم که در پیشبرد هر چه بهتر این پایان نامه مرا یاری نمودند،کمال تشکر را دارم. و نیز از کلیه دوستان عزیزم بویژه خانم، مهندس مینا پیری ،الهام بلوری مقدم و الهام انصاری و آقایان موسوی‌زاده، اکبرپور و صمدی که در مراحل مختلف پایان نامه مرا یاری نمودند ممنون و سپاسگزارم. از خانواده عزیزم بویژه پدر و مادر عزیزم که همواره دعای خیرشان بدرقه راهم و دست محبتشان بر سرم، خواهران مهربان و برادر بزرگوار و همچنین همسرم آقای رحمان علیزاده، کمال تشکر و قدردانی را دارم که اگر یاری و همراهی‌های بیدریغ ایشان نبود به‌پایان بردن این کار بسی مشکل می‌نمود.

بررسی عناصر بور و روی در تشکیل جنین رویشی گیاهان هویج و خیار

چکیده:

بور و روی دو عنصر مهم در سنتز اکسین درونی در گیاهان می‌باشند و باتوجه به ضرورت حضور اکسین جهت القای جنین‌زایی رویشی سعی گردید که طی تحقیق حاضر اثر این عناصر بر جنین‌زایی رویشی مورد بررسی قرار گیرد. جنین‌زایی در دمبرگ هویج در محیط کشت تغییریافته B5، با دو غلظت ۰ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر عنصر بور و سه غلظت ۰، ۰/۴۵ و ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر عنصر روی در حضور و یا غیاب اکسین انجام گردید. این آزمایش در غالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار و ۴ تکرار طرح گردید. تیمارها شامل محیط بدون بور و بدون روی، بدون بور و روی (۰/۴۵ میلی‌گرم/ لیتر)، بدون بور و روی (۰/۹ میلی‌گرم/ لیتر)، بور (۰/۶ میلی‌گرم/ لیتر)و بدون روی، بور (۰/۶ میلی‌گرم/ لیتر) و روی (۰/۴۵ میلی‌گرم/ لیتر)، بور (۰/۶ میلی‌گرم/ لیتر) و روی (۰/۹ میلی‌گرم/ لیتر)، بور (۰/۶ میلی‌گرم/ لیتر) و روی (۰/۴۵ میلی‌گرم/ لیتر) که این محیط یکبار با IAA و یکبار با 2,4-D بکار رفته و همچنین محیط بدون بور و روی (۰/۹ میلی‌گرم/ لیتر) که آنهم یکبار با IAA و یکبار با 2,4-D بکار رفته می‌باشند. تیمارها در مرحله القا اعمال شده و سپس نمونه‌ها از محیط القا به محیط رئالیزاسیون (محیط B5 بدون اکسین) منتقل گردیدند. آنالیز آماری اثرات معنی‌دار محیط را بر جنین‌زایی هویج نشان داد. حذف روی از محیط کشت فاقد اکسین خارجی، سبب افزایش معنی‌داری در تعداد جنین‌ها گردید ($P<0/05$). افزایش تعداد جنین‌ها با حذف روی در گیاه هویج از نظر آماری با کاربرد اکسین خارجی برابر و حتی در مواردی بیشتر شد. حذف بور از محیط کشت منجر به افزایش معنی‌داری در تکامل جنین‌ها و تشکیل گیاهچه از جنین های تولید شده گردید. در خیار نتایج نشان داد که حذف بور در محیط کشت سبب القای جنین رویشی در محیطی بدون اکسین خارجی گردید. بهترین محیط‌کشت برای جنین‌زایی خیار، محیط حاوی توفوردی بود. در محیط حاوی توفوردی تغییر عناصرغذایی در جهت حذف بور و افزایش غلظت روی منجر به افزایش معنی‌دار جنین‌رویشی در مقایسه با محیط مشابه گردید.

کلمات کلیدی: جنین‌زایی رویشی، بور، روی، هویج، خیار

فهرست مطالب:

عنوان | صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه ۱

۱-۲- گیاه هویج ۴

۱-۲-۱- منشاء گیاه هویج ۵

۱-۲-۲- گیاهشناسی ۵

۱-۲-۳- آب و هوا ۶

۱-۲-۴- بیوتکنولوژی هویج و کاربردهای آن ۶

۱-۳- گیاه خیار ۶

۱-۳-۱- منشاء خیار ۶

۱-۳-۲- گیاهشناسی ۶

۱-۳-۳- آب و هوا ۷

۱-۳-۴- بیوتکنولوژی خیار وکاربرد آن ۷

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- جنین‌زایی رویشی (سوماتیکی) ۹

۲-۱-۱- پتانسیل جنین‌زایی رویشی در سلول ۹

۲-۲- ایجاد سلول جنین‌زا ۹

۲-۳- مراحل مختلف فرایند جنین‌زایی رویشی ۱۰

۲-۳-۱- مرحله القاء ۱۰

۲-۳-۱-۱- انواع جنین‌زایی ۱۰

۲-۳-۲- مرحله ظهور جنین‌ها(رئالیزاسیون) ۱۱

۲-۴- تکثیر سلول‌های جنین‌زا ۱۱

۲-۵- تکامل و تمایز جنین‌های رویشی ۱۱

۲-۵-۱- مرحله جنین کروی شکل (گلبولار) ۱۲

۲-۵-۲- مرحله جنین قلبی شکل ۱۲

۲-۵-۳- مرحله جنین اژدری شکل ۱۲

عنوان | صفحه

۲-۶- فاکتورهای مؤثر بر جنین‌زایی رویشی ۱۲
۲-۶-۱- اثر ترکیب محیط‌کشت بر جنین‌زایی رویشی ۱۲
۲-۶-۱-۱- ازت وترکیبات مختلف آن ۱۳
۲-۶-۱-۲- قندها ۱۶
۲-۶-۱-۳- اثر مواد معدنی بر روی جنین‌زایی رویشی ۱۷
۲-۶-۲- اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر جنین‌زایی رویشی ۱۸
۲-۶-۲-۱- اکسین‌ها در مرحله القا جنین‌زایی ۱۹
۲-۶-۲-۲- اکسین‌ها در مرحله ظهور جنین ۲۱
۲-۶-۲-۳- تأثیر سیتوکینین‌ها بر جنین‌زایی رویشی ۲۳
۲-۶-۲-۴- تأثیر اسیدآبسزیک بر جنین‌زایی رویشی ۲۴
۲-۷- تغییرات درون سلولی در جنین‌زایی رویشی ۲۵
۲-۷-۱- فعالیت ژنها در مراحل مختلف جنین‌زایی رویشی ۲۷
۲-۷-۲- سنتز پروتئین‌ها در جنین‌زایی رویشی ۲۹
۲-۷-۳- اثر متقابل هورمون‌ها و پروتئین‌ها ۳۲
۲-۷-۴- نقش پلی‌آمین‌ها در جنین‌زایی رویشی ۳۲
۲-۸- تاریخچه و اهمیت بور ۳۳
۲-۸-۱- نقش بور در تغذیه دام و انسان ۳۴
۲-۸-۲- جذب و انتقال بور توسط گیاه ۳۴
۲-۸-۳- اعمال فیزیولوژیک بور در گیاه ۳۴
۲-۸-۳-۱- کمپلکس‌های بور با ساختمان‌های آلی ۳۵
۲-۸-۳-۲- طویل شدن ریشه و متابولیسم اسید های نوکلئیک ۳۵
۲-۸-۳-۳- ساخت دیواره سلولی ۳۶
۲-۸-۳-۴- متابولیسم فنل‌ها، اکسین و تمایز بافتی ۳۷
۲-۸-۳-۵- فعالیت غشاء ۳۸
۲-۸-۳-۶- سوخت و ساز قند و پروتئین ۳۹
۲-۸-۳-۷- رویش دانه‌گرده و رشد لوله‌گرده ۳۹

عنوان | صفحه

۲-۹- تاریخچه و اهمیت روی ۴۰
۲-۹-۱- نقش روی در تغذیه انسان و دام ۴۰
۲-۹-۲- مکانیسم جذب و انتقال روی در گیاهان ۴۱
۲-۹-۳- اعمال فیزیولوژیک روی در گیاه ۴۱
۲-۹-۳-۱- آنزیم‌هایی که روی در آنها نقش کاتالیزوری دارد شامل ۴۱
۲- ۹-۳-۱-۱- کربونیک آنهیدراز ۴۲
۲-۹-۳-۲- آنزیم‌هایی که روی در آن‌ها نقش ساختمانی دارد شامل ۴۲
۲-۹-۳-۲-۱- الکل دهیدروژناز ۴۳
۲-۹-۳-۲-۲- سوپراکسیددسموتاز ۴۳
۲-۹-۳-۳- آنزیم‌های فعال شونده با روی ۴۳
۲-۹-۳-۴- سوخت و ساز قندها ۴۴
۲-۹-۳-۵- ساختن پروتئین ۴۴
۲-۹-۳-۶- تریپتوفان و ساختن ایندول‌اسیداستیک ۴۵
۲-۹-۳-۷- نقش روی در حفظ غشاء سلولی..... ۴۵

فصل سوم: مواد و روشها

۳-۱- منبع گیاهی مورد استفاده ۴۷
۳-۲- محیط‌کشت ۴۷
۳-۲-۱- تهیه محلول‌های پایه ۴۹
۳-۲-۲- آماده کردن محیط‌کشت ۴۹
۳-۳- ضد عفونی وسایل موردنیاز ۵۰
۳-۴- آماده‌سازی هود (لامینار ایرفلو) ۵۰
۳-۵- فراهم‌سازی منبع گیاهی نونهال ۵۰
۳-۵-۱- آماده‌سازی محیط‌کشت ۵۱
۳-۵-۲- آماده‌سازی بذر ۵۱
۳-۵-۳- شرایط نگهداری ۵۱
۳-۶- عملیات مربوط به فاز القاء. ۵۱

عنوان | صفحه

۳-۶-۱- آماده‌سازی محیط‌کشت برای فاز القاء ۵۱
۳-۶-۲- تهیه ریزنمونه از گیاه استریل ۵۲
۳-۶-۲-۱- تهیه ریزنمونه‌ها از گیاهچه درون شیشه خیار ۵۳
۳-۶-۲-۲- تهیه ریزنمونه از گیاهچه‌های درون شیشه هویج ۵۳
۳-۶-۳- دستگاه آکسوفیتون و شرایط نگهداری ۵۳
۳-۶-۴- ثبت اطلاعات فاز القایی ۵۳
۳-۷- مرحله رئالیزاسیون ۵۴
۳-۷-۱- آماده‌سازی محیط‌کشت در فاز رئالیزاسیون ۵۴
۳-۷-۲- واکشت ریزنمونه‌ها به محیط‌کشت رئالیزاسیون ۵۴
۳-۷-۳- واکشت دوباره نمونه‌های پهنک خیار ۵۴
۳-۸- شمارش و ثبت داده‌ها ۵۵
۳-۹- آماده‌سازی نمونه‌های بافت به‌منظور رنگ‌آمیزی و مطالعات میکروسکوپی ۵۵
۳-۹-۱- تثبیت در فیکساتور ۵۵
۳-۹-۱-۱- مواد لازم ۵۵
۳-۹-۲- مرحله نفوذ و جایگزینی پارافین در بافت‌ها ۵۵
۳-۹-۳- قالب‌گیری با پارافین ۵۶
۳-۹-۴- برش‌گیری با میکروتوم ۵۶
۳-۹-۵- رنگ‌آمیزی دوگانه با سافرانین O و فست‌گرین(FCF) ۵۷
۳-۹-۵-۱- موادها و محلول‌های مورد استفاده ۵۷
۳-۹-۶- طرز ساخت محلول رنگی ۵۷
۳-۹-۶-۱- طرز ساخت محلول‌رنگی سافرانین O ۵۷
۳-۹-۶-۲- طرز ساخت محلول رنگی فست‌گرین ۵۷
۳-۹-۶-۳- طرز ساخت محلول رنگی مورد استفاده ۵۷
۳-۹-۶-۴- طرز ساخت محلول رنگ‌بر ۵۸
۳-۹-۷- رنگ آمیزی بافت‌ها ۵۸
۳-۹-۸- تثبیت و مشاهده نمونه‌ها ۵۹

عنوان | صفحه

۳-۹- تجزیه و تحلیل داده‌ها ۵۹

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- جنین‌زایی رویشی دمبرگ هویج ۶۰

۴-۱-۱- القای جنین‌زایی هویج ۶۱

۴-۱-۱-۱- جنین‌زایی رویشی ۶۱

۴-۱-۱-۲- تشکیل امبروئید در هویج ۶۱

۴-۱-۱-۳- ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های هویج ۶۱

۴-۱-۲- مشاهدات مرحله رئالیزاسیون در هویج ۶۲

۴-۱-۲-۱- جنین‌زایی ۶۲

۴-۱-۲-۲- امبروئید ۶۳

۴-۱-۲-۳- ریشه‌زایی ۶۳

۴-۱-۳- نتایج حاصل از تجزیه وتحلیل آماری جنین‌زایی رویشی هویج در قالب طرح کاملاً تصادفی ... ۶۳

۴-۱-۴- نتایج آنالیز داده‌های مربوط به شمارش جنین در غالب آزمون فاکتوریل ۶۵

۴-۱-۴-۱- اثر روی در محیط‌های بدون تنظیم‌کننده‌رشد بر القای جنین‌زایی رویشی دمبرگ هویج ۶۶

۴-۱-۴-۱-۱- نقش روی در محیط حاوی بور بر جنین‌زایی رویشی ۶۷

۴-۱-۴-۱-۲- اثر روی در محیط فاقد بور بر جنین‌زایی رویشی ۷۰

۴-۱-۴-۲- نقش بور در محیط‌های بدون تنظیم‌کننده‌رشد بر جنین‌زایی رویشی دمبرگ هویج ۷۱

۴-۱-۴-۳- تکامل جنین‌ها در محیط های بدون تنظیم‌کننده‌رشد ۷۵

۴-۱-۴-۳-۱- نقش بور در تکامل جنین‌ها ۷۵

۴-۱-۴-۳-۲- روی و تکامل جنین در محیط حاوی بور ۷۸

۴-۱-۴-۳-۳- روی و تکامل جنین در محیط فاقد بور ۸۰

۴-۱-۴-۳-۳-۱- نقش روی در مقابله با استرس و اثر آن بر تکامل جنین‌رویشی ۸۱

۴-۱-۴-۴- جنین‌زایی رویشی در محیط حاوی تنظیم‌کننده‌رشد ۸۲

۴-۱-۵- بررسی تعداد امبروئیدها در گیاه هویج تحت تأثیر ترکیب محیط کشت ۸۶

۴-۱-۵-۱- تشکیل امبروئید در محیط بدون تنظیم‌کننده‌رشد ۸۹

۴-۱-۵-۱-۱- نقش روی در تشکیل امبروئیدها ۸۹

عنوان | صفحه

۴-۱-۵-۱-۲- اثر متقابل روی و بور در تشکیل امبروئیدها ۹۱
۴-۱-۵-۲- تشکیل امبروئید در محیط‌های دارای تنظیم‌کننده‌رشد ۹۲
۴-۱-۶- نتایج مربوط به ریشه‌زایی دمبرگ هویج ۹۳
۴-۱-۶-۱- ظهور ریشه در محیط بدون تنظیم‌کننده‌رشد ۹۳
۴-۱-۶-۱-۱- نقش روی در رشد ریشه‌ها ۹۶
۴-۱-۶-۲- ظهور ریشه در محیط حاوی تنظیم کننده رشد ۹۶
۴-۲- نتایج جنین‌زایی رویشی برگ خیار ۹۸
۴-۲-۱- مشاهدات ریزنمونه‌ها طی دوره القا و رئالیزاسیون ۹۸
۴-۲-۲- نتایج تجزیه واریانس داده‌های جنین‌زایی رویشی برگ خیار ۹۹
۴-۲-۲-۱- جنین‌زایی در محیط‌های بدون تنظیم‌کننده‌رشد ۱۰۰
۴-۲-۲-۱-۱- نقش بور در جنین‌زایی رویشی خیار ۱۰۰
۴-۲-۲-۱-۲- نقش روی در جنین‌زایی رویشی خیار ۱۰۱
۴-۲-۲-۲- نقش تنظیم‌کننده‌های رشد بر جنین‌زایی خیار ۱۰۱
۴-۲-۳- نتایج مربوط به تشکیل امبروئید در محیط ۱۰۴
۴-۲-۳- نتایج مربوط به داده‌های ریشه‌زایی در نمونه‌های خیار ۱۰۷
۴-۳- مطالعات بافت‌شناسی ۱۰۹
۴-۳- نتیجه گیری ۱۱۱
۴-۴- پیشنهادات ۱۱۳

فهرست منابع ۱۱۵

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱- محیط‌کشت مورد استفاده برای یک لیتر محیط‌کشت گامبورک (B5) ۴۷

جدول ۳-۲- محلول‌های پایه B5 یا گامبورک ۴۸

جدول ۳-۳- ترکیب تیمارهای اعمال شده در محیط‌کشت B5 (واحد اعداد میلی‌گرم در لیتر) ۵۲

جدول ۳-۴- جدول مواد و زمان مورد نیاز برای جایگزینی پارافین در بافت‌ها ۵۶

جدول ۳-۵- طرز ساخت محلول‌های رنگی ۵۸

جدول ۳-۶- مواد و زمان لازم برای رنگ آمیزی دوگانه بافتی ۵۸

جدول ۴-۱- تجزیه واریانس مربوط به جنین‌زایی رویشی هویج در محیط‌های کشت مختلف (نتایج بعد از تبدیل جذری X+۰/۵) ۶۳

جدول ۴-۲- مقایسه میانگین‌های مربوط به تعداد جنین‌ها در مراحل مختلف تکاملی جنین‌رویشی (طبق روش دانکن در سطح ۵٪) ۶۴

جدول ۴-۳- تجزیه واریانس برای جنین‌زایی، در ۶ تیمار بدون تنظیم‌کننده‌رشد در مورد دمبرگ هویج (نتایج پس از تبدیل جذری X+۰/۵ و آنالیز در غالب آزمون فاکتوریل) ۶۶

جدول ۴-۴- مقایسه میانگین تعداد جنین‌ها بین سطوح مختلف غلظت عنصر روی در مراحل مختلف جنین‌زایی گیاه هویج ۶۶

جدول ۴-۵- مقایسه میانگین بین سطوح مختلف غلظت عنصر بور از نظر مراحل مختلف جنین‌زایی گیاه هویج ۶۶

جدول ۴-۶- درصد جنین‌ها در مراحل تکامل جنین‌رویشی و درصد ریزنمونه‌های ریشه دار شده دمبرگ هویج در محیط‌های مختلف ۷۶

جدول ۴-۷- تجزیه واریانس برای تعداد امبروئیدها در دمبرگ گیاه هویج ۸۷

جدول ۴-۸- مقایسه میانگین‌های امبروئید تشکیل شده از دمبرگ گیاه هویج در محیط‌کشت‌های مختلف (مقایسه میانگین‌ها طبق روش دانکن در سطح ۰/۰۵) ۸۷

جدول ۴-۹- تجزیه واریانس برای تعداد امبروئید در ۶ تیمار بدون تنظیم کننده رشد (درغالب آزمون فاکتوریل) ۸۸

جدول ۴-۱۰- مقایسه میانگین بین سطوح مختلف غلظت عنصر روی از نظر تعداد امبروئید و ریشه‌زایی در گیاه هویج ۸۸

جدول ۴-۱۱- مقایسه میانگین بین سطوح مختلف غلظت عنصر بور از نظر تعداد امبروئید و ریشه‌زایی در گیاه هویج ۸۸

جدول ۴-۱۲- تجزیه واریانس برای ریشه‌زایی در نمونه‌های دمبرگ هویج ۹۳

عنوان | صفحه

جدول ۴-۱۳- مقایسه میانگین‌های ریشه‌زایی در انواع محیط‌کشت (مقایسه میانگین‌ها طبق روش دانکن در سطح ۰/۰۵) ۹۴

جدول ۴-۱۴- تجزیه واریانس برای ریشه‌زایی در ۶ تیمار بدون تنظیم‌کننده‌رشد (آنالیز در غالب آزمون فاکتوریل به‌اجرا در آمده است) ۹۵

جدول ۴-۱۵- تجزیه واریانس مربوط به جنین‌زایی خیار در محیط‌های دارای جنین (نتایج بعد از تبدیل جذری(X+۰/۵) ۹۹

جدول۴ -۱۶- مقایسه میانگین‌های جنین‌زایی در ۲۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت در گیاه خیار ۹۹

جدول ۴-۱۷- تجزیه واریانس برای تشکیل امبروئید در نمونه‌های پهنک خیار (نتایج بعد از تبدیل‌جذری (X+۰/۵) ۱۰۴

جدول ۴-۱۸- مقایسه میانگین تعداد امبروئیدها و درصد امبروئیدها از کل سلولهای پیش‌جنین‌زا در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت ۱۰۵

جدول ۴-۱۹- تجزیه واریانس داده‌های تعداد ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده ۱۰۷

جدول ۴-۲۰- مقایسه میانگین تعداد ریزنمونه ریشه‌دار شده در ۲۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت ۱۰۷

فهرست شکل

عنوان | صفحه

شکل ۴-۱- مراحل تکاملی جنین در محیط دارای ایندول‌استیک‌اسید در مرحله القایی. الف: جنین کروی، ب: جنین قلبی، پ: جنین اژدری، ج: تراکم جنین‌ها ۶۱

شکل ۴-۲- الف: ریشه‌زایی یک‌طرفه در محیط‌های بدون تنظیم‌کننده‌رشد، ب: ریشه‌زایی دو طرفه در محیط‌های دارای ایندول‌استیک‌اسید، عدم ریشه‌زایی در محیط دارای توفوردی ۶۲

شکل ۴-۳- جنین کامل در محیط کشت پایه B5 ..... ۶۲

شکل ۴-۴- نمودار مربوط به تعداد جنین‌های کروی و قلبی تشکیل شده از دمبرگ هویج در تیمارهای مختلف بعد از مرحله رئالیزاسیون ۶۴

شکل ۴-۵- نمودار مربوط به تعداد جنین‌های اژدری کوچک و اژدری بزرگ تشکیل شده از دمبرگ هویج در تیمارهای مختلف بعد از مرحله رئالیزاسیون ۶۵

شکل ۴-۶- نمودار مربوط به تعداد جنین‌های گیاهچه‌ای و کل جنین‌های تشکیل شده از دمبرگ هویج در تیمارهای مختلف ۴ هفته بعد از شروع مرحله رئالیزاسیون ۶۵

شکل ۴-۷- نمودار مقایسه تعداد کل جنین‌ها در ۲۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت، گروه الف (محیط‌های دارای عنصر بور۰/۶ mg/l) با گروه ب (محیط‌های بدون عنصر بور) ۶۷

شکل ۴-۸- جنین‌زایی در محیط بدون بور و دارای روی ۷۱

شکل ۴-۹- نمودار درصد گیاهچه‌های تشکیل شده از تعداد کل جنین‌ها در هر محیط‌کشت ۷۶

شکل ۴-۱۰- الف: تشکیل برگ سوم در محیط بدون روی، ب: عدم تمایز در بخشی از ریشه که مربوط به محیط القا بوده است ۷۹

شکل ۴-۱۱- مراحل تکامل جنین در محیط بدون روی الف و ب: جنین قلبی و اژدری پ: انبوه جنین تولید شده و تمایز کم در این محیط ۷۹

شکل ۴-۱۲- مقایسه تکامل جنین‌ها در محیط‌های دارای روی با غلظت دوبرابر، الف و ب: جنین گیاهچه‌ای در محیط القا با حضور بور، پ: مراحل تکاملی در محیط فاقد بور ۸۱

شکل ۴-۱۳- مقایسه دو محیط دارای ایندول‌استیک‌اسید از نظر تکاملی، الف: محیط بدون تغییر در ترکیب‌عناصرغذایی، ب و پ: افزایش تکامل در همان محیط به‌دلیل افزایش غلظت روی و حذف بور .. ۸۴

شکل ۴-۱۴- الف: جنین‌زایی رویشی مستقیم از دمبرگ هویج در محیط حاوی توفوردی ب: وجود رنگ سبز در قسمت لپه‌های جنین اژدری در محیط دارای توفوردی پ: تکامل جنین‌ها تا مرحله اژدری ۸۶

شکل ۴-۱۵- درصد امبروئیدها از مجموع کل جنین‌ها و امبروئیدهای تشکیل شده در هر محیط تیمار ... ۸۸

شکل ۴-۱۶- نمودار مقایسه تعداد امبروئید تشکیل‌شده در ۲۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت بین دو گروه الف: محیط‌کشت‌های دارای عنصر بور۰/۶ mg/l و ب: محیط‌کشت‌های بدون بور ۸۹

شکل ۴-۱۷- تشکیل امبروئید در محیط B5 پایه ۹۰

عنوان | صفحه

شکل ۴-۱۸- نمودار مقایسه تعداد ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده در ۲۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت بین دو گروه الف (محیط‌کشت دارای عنصر بور ۰/۶ mg/l) و ب (محیط‌کشت بدون بور) ۹۵

شکل ۴-۱۹- شاخه‌زایی در محیط بدون حاوی ۰/۰۱۲ mg/l روی ۹۵

شکل۴-۲۰- نمودار مقایسه تعداد ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده در ۲۵ میلی لیتر محیط مختلف ۹۷

شکل ۴-۲۱- ریزنمونه‌های پهنک خیار در محیط‌کشت ۹۸

شکل ۴-۲۲- جنین‌های کروی خارج شده از کناره برگ در محیط فاقد بور در گیاه خیار ۱۰۱

شکل ۴-۲۳- جنین‌زایی در محیط دارای ایندول‌استیک‌اسید با تغییر در عناصر غذایی ۱۰۲

شکل ۴-۲۴- نمودار مربوط به مقایسه تعداد جنین‌ها در محیط‌های کشت مختلف ۱۰۳

شکل ۴-۲۵- الف: جنین کروی خارج شده از سطح پهنک برگ در محیط حاوی توفوردی ب: جنین کروی آزادشده در محیط پ: جنین اژدری خیار در محیط حاوی توفوردی ۱۰۳

شکل ۴-۲۶- نمودار مربوط به تعداد امبروئیدها در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت ۱۰۵

شکل ۴-۲۷- نمودار مربوط به درصد امبروئیدها از تعداد کل امبروئید و جنین تشکیل شده در ۲۵ میلی-لیتر محیط‌کشت ۱۰۶

شکل ۴-۲۸- تشکیل امبروئید در محیط دارای توفوردی ۱۰۷

شکل ۴-۲۹- نمودار مقایسه تعداد ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده در محیط‌های مختلف ۱۰۸

شکل ۴-۳۰- ریشه‌زایی در محیط دارای ایندول‌استیک‌اسید ۱۰۹

شکل ۴-۳۱- هیستولوژی مربوط به گیاه هویج ۱۱۰

شکل۴-۳۲- هیستولوژی مربوط به بافت پهنک خیار ۱۱۰

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه:

زندگی انسانها همیشه وابسته به گیاهان و تولیدات بدست آمده از آنها است. با توجه به افزایش روزافزون جمعیت انسانی نیاز بشر به تولیدات گیاهی بیشتر شده که تأمین این نیازها گاهی خارج از توان و ظرفیت طبیعت می‌باشد. امروزه دانشمندان برای رفع این معضل، برآن شده‌اند که جهت تکثیر گیاهان روشهای جدید و کارآمدتری را، جایگزین روشهای قدیمی نمایند. در حال حاضر مناسب‌ترین راه برای افزایش سریع در مقیاس زیاد گیاهان، استفاده از روشهای بیوتکنولوژی می‌باشد. امروزه در سراسر جهان استفاده از روشهای بیوتکنولوژی در تولید مواد گیاهی که پایه و اساس آن بر روشهای کشت بافت استوار است به طور چشمگیری در حال توسعه می‌باشد. هدف این تکنیک تولید سریع تعداد زیادی از گیاهان با ژنتیک مشخص از یک گیاه مادری باارزش یا گیاهان تک‌جنسی (monosexual) نر و یا ماده است. می‌توان گیاهان حاصله از این روش را به طور مستقیم به فروش رساند و یا اینکه برای اهداف اصلاحی یا مطالعات ژنتیکی و پایه‌ای استفاده کرد (هالپرین، ۱۹۹۵).

یکی از مهمترین تکنیک‌های کشت بافت که به دلیل منافع قابل توجه آن گسترش زیادی پیدا نموده‌است، ازدیاد گیاهان از طریق جنین‌زایی رویشی است و این روش بسیار مفید جهت تولید و باززایی در مقیاس زیاد گیاهان ارزشمند و با هزینه بسیار اندک می‌باشد (مشایخی،۱۳۸۶). بیش از صد سال پیش یعنی در سال ۱۹۰۲ هابرلنت فیزیولوژیست آلمانی ادعا نمود که تشکیل جنین از سلولهای رویشی امکان پذیر می باشد و تحقیقاتی که توسط وی انجام شد منجر به بنا نهادن روشهای کشت درون شیشه گردید (هالپرین، ۱۹۹۵؛ کیلنباچ، ۱۹۸۴). این نظریه به مدت ۵۵ سال اثبات نگردید تا اینکه برای اولین بار توسط راینرت در آلمان و استوارد و همکارانش در دانشگاه کرنل آمریکا در سال ۱۹۵۸، بدون اینکه این دو محقق اطلاع از تحقیقات یکدیگر داشته باشند، درباره وقوع تشکیل جنین رویشی از طریق کشت کالوس و همچنین کشت تعلیقی سلولی ریشه هویج (*Ducus carota*) گزارش گردید (راینرت، ۱۹۵۸؛ استوارد، ۱۹۵۸).

در پی آن در سال ۱۹۵۹ راینرت عنوان نمود که گیاهک‌هایی که در کشت درون‌شیشه گیاه هویج بوجود می-آیند از جنین‌های دوقطبی منشأ گرفته‌اند (راینرت، ۱۹۵۹) و در سال ۱۹۶۸ دانشمندان دیگری مانند کاتو و

تاکیوشی (۱۹۹۵)، وترل (۱۹۷۶) و هالپرین (۱۹۹۵) بطور مجزا گزارش‌هایی را مبنی بر تولید جنین دوقطبی رویشی از اندامهای بالغ گیاه هویج ارائه دادند.

جنین‌زایی رویشی ابزار باارزشی برای دست‌یابی به دامنه گسترده‌ای از اهداف، از مطالعات پایه‌ای بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گرفته تا توسعه تکنیک‌هایی با کاربردهای عملی فراوان، می‌باشد (جیمنز، ۲۰۰۱). از جمله کاربردهای جنین‌زایی رویشی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد.

- استفاده از این تکنیک برای بررسی رویدادهای اولیه و اصلی جنین‌زایی زایشی که بررسی آن بر روی گیاه به راحتی امکان‌پذیر نیست، در بسیاری از گیاهان کاربرد دارد.
- تولید انبوه گیاهان بعنوان اقتصادی‌ترین کاربرد آن می‌باشد.
- تولید گیاهان با سطوح متفاوت از پلوئیدی، به عنوان مثال تولید رویان‌های تری‌پلوئید تولید شده از آندوسپرم و یا رویان‌های هاپلوئید تولید شده از بساک.
- استفاده از این روش جهت فراهم‌کردن منبع باارزش از پروتوپلاست‌های گونه های مختلف گیاهی اعم از گیاهان زراعی و یا درختان جنگلی.
- اصلاح محصولات از طریق انتقال ژن و مطالعه گیاهان ترانس ژنیک (با توجه به اینکه جنین‌رویشی از یک سلول منشاء می‌گیرد، بسیار اهمیت دارد).
- تولید درون شیشه‌ای متابولیت‌های ثانویه رویانی مانند گیاهان دارویی.
- بررسی نحوه تأثیر ترکیبات شیمیایی خارجی و بررسی اثر آنها بر روی جنین‌ها به دلیل اینکه واکنش و حساسیت آنها نسبت به گیاه کامل و یا حتی کالوس بالاتر است (جیمنز، ۲۰۰۱).

امروزه با بررسی‌هایی که در زمینه شرایط مختلف محیط کشت انجام شده و همچنین کاربرد روشهای جدید جهت مطالعات هورمونی، پیشرفت‌هایی در زمینه تعیین محیط بهینه، نوع و مقدار هورمون جهت جنین‌زایی در گیاهان مختلف بدست آمده است. جنین‌زایی رویشی به عنوان فرایندی برای بیان توانایی سلولهای گیاهی شناخته شده و به عنوان یک ابزار مفید برای ریز ازدیادی گیاهان محسوب می شود. گزارشات زیادی در زمینه القاء موفق جنین‌زایی رویشی در گونه‌های مختلف گیاهی وجود دارد (هارادا و همکاران، ۱۹۹۱).

تغییر وضع سلولها از حالت غیرجنین‌زا به جنین‌زا و ایجاد پتانسیل جدید در درون آنها که همان القا جنین‌زایی می‌باشد به مقدار زیادی تابع شرایط محیط‌کشت از نقطه‌نظر غذایی، هورمونی و یا حرارتی می‌باشد.

هورمون‌ها از فاکتورهای القایی مهم جنین‌زایی رویشی هستند. اگرچه در بین هورمون‌ها اکسین به عنوان عامل مهم القای جنین‌زایی رویشی معرفی شده و به طور معمول استفاده می‌شود ولی نمی‌توان اثر دیگر تنظیم کننده‌های رشد را نادیده گرفت. در مواردی که کاربرد اکسین خارجی، مؤثرترین تیمار القای جنین‌زایی رویشی اثبات شده

است برای توسعه بعدی جنین باید حذف گردد. حضور مداوم اکسین تغییر مشخصی در بیان ژن در توده‌های سلولی پیش جنین‌زا ایجاد می‌کند که احتمالاً مرتبط با افزایش دمتیلاسیون DNA است و به این صورت در این سلولها، جنین‌زایی رویشی القا می‌شود. البته فرایندهای القا سلولها هنوز به طور کامل شناخته نشده است (جیمنز، ۲۰۰۱). در این رابطه بررسی‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمی، مولکولی در تعداد معدودی از گیاهان از جمله هویج انجام شده است (تیمرز، ۱۹۹۰). آنالیز جنبه‌های بیوشیمی که مستقیم در ارتباط با جنین‌زایی می‌باشد در محیطی که در آن اکسین بکار رفته، کار بسیار مشکلی است زیرا اکسین رویدادهای فیزیولوژیک مختلفی را در سلولهای یک بافت کنترل می‌کند، به عنوان مثال بیوسنتز اتیلن، تقسیم سلول، تشکیل ریشه‌های نابجا (تیمرز، ۱۹۹۰) از این موارد می‌باشد. در نتیجه به منظور بررسی مکانیسم‌های مرتبط با جنین‌زایی رویشی، استفاده از روشهایی که در آن برای القا جنین‌رویشی از تنظیم‌کننده‌رشد گیاهی استفاده نشود، لازم به نظر می‌رسد زیرا در این صورت مقایسه تغییرات بیوشیمیایی بین سلولهای جنین‌زا و سلولهای غیرجنین‌زا با یکدیگر امکان پذیر می‌گردد.

از دیگر عوامل مهم و مؤثر بر جنین‌زایی رویشی که از ابتدای ارائه فرضیه جنین‌زایی رویشی تا کنون سرنوشت ساز بوده، ترکیب محیط‌کشت می‌باشد. کارهای تحقیقاتی زیادی بر روی تأثیر این عامل بر تمایز و تکامل جنین‌های رویشی انجام شده‌است. البته مشخص‌نمودن رابطه بین مواد تشکیل‌دهنده محیط‌کشت بافت و تغییراتی که در درون آن اتفاق می‌افتد به راحتی میسر نیست اما تحقیقات به‌عمل آمده در این زمینه نشان داده‌اند که مواد محیط‌کشت می‌تواند بطور مستقیم و یا غیرمستقیم، میزان سنتز و یا تخریب تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی را تحت تأثیر قرار دهند (هالپرین و وترل، ۱۹۶۵؛ منگل و کربی، ۱۹۸۷).

ترکیب محیط‌های کشت جنین‌زایی رویشی دارای چندین بخش عمده می‌باشد که هر کدام از آنها در سرنوشت جنین‌زایی رویشی نقش تعیین‌کننده دارند. مواد تشکیل‌دهنده محیط‌های کشت رایج در جنین‌زایی شامل نمکهای معدنی، ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه، ساکارز و مواد آلی دیگر است که به صورت تعریف شده در محیط-کشت پایه وجود دارند اما در عمل این محیط‌های کشت بنا به دلایل مختلف مانند نوع گیاه، هدف محقق از بررسی خاص و یا سایر اهداف، تغییر نموده‌است که در این صورت به آنها محیط‌های کشت تغییریافته گفته می-شود. ممکن است محیط‌های کشت به‌طور جامع برای رشد درون لوله آزمایش کل گیاهان مناسب نباشد و در مواردی که حتی محیطی خاص برای گیاهی بخصوص مناسب‌تر تشخیص داده شده باز هم دارای کمبودهایی باشد و در صورت تغییر نتیجه بهتری بدست آید. بطور مثال کیم و همکاران (۱۹۹۴)، بیان نمودند که در مورد اندام زایی از برگ گیاه سویا، بایستی عناصر کم مصرف محیط کشت MS بجز کبالت در غلظت بیشتری مورد استفاده قرار گیرند.