دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم باغبانی
گرایش میوه کاری

بررسی عوامل موثر در ریزازدیادی انگور بیدانه قرمز

تحقیق و نگارش:
احسان نوروزعلی‌پور تپه

استاد راهنما:
دکتر لطفعلی ناصری

۱۳۹۲

بسم الله الرحمن الرحیم

تقدیم به

پدر عزیزم

که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی ایستادگی را تجربه نمایم

مادر مهربانم

دریای بیکران فداکاری و عشق که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر

تشکر و قدردانی

سپاس خدای را که سخنوران در ستودن او بمانند و شمارندگان شمردن نعمت‌های او ندانند و کوشندگان حق او را گزاردن نتوانند. در اینجا شایسته است از زحمات بی‌دریغ استاد گرامی جناب آقای دکتر لطفعلی ناصری کمال تشکر و سپاس‌گذاری را داشته باشم.

از سایر اعضا هیئت علمی گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه که از محضرشان استفاده نموده‌ام تشکر می‌نمایم.

از آقایان مهندسین حسین خلیلی، هادی مدنی، محمد توحیدیان، صابر صادق پور، سجاد اشرفی، نیما باهمت، مختار نشاطی، حامد فتحی پور، حبیب زارع، فردین مظلوم، صابر اوستان و علی اکبرزاهدی که هریک بنحوی بنده را در مراحل مختلف تدوین پایان‌نامه کمک و یاری رسانده‌اند صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم.

همچنین از همکاری خانم مهندس آقایی و خانم مهندس جلیل‌دوست که در کارهایی آزمایشگاهی مرا یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

در پایان از خانواده‌ی عزیزم که در طول دوره تحصیل همواره یار و یاور من بوده‌اند خالصانه قدردانی می‌نمایم.

احسان نوروزعلی پور تپه

بهمن ماه ۱۳۹۲

چکیده

انگور بیدانه قرمز یکی از ارقام مهم و با کیفیت در ایران می‌باشد که در سال‌های اخیر توسط کشاورزان مورد استقبال زیادی قرارگرفته و انتظار می‌رود درآینده سهم مهمی از تاکستان‌های جدیدالاحداث را به خود اختصاص دهد. کشت بافت به عنوان روشی سریع و مناسب جهت تکثیر سریع گیاهان معرفی شده است. این پژوهش با هدف ارائه دستورالعملی مناسب جهت تکثیر درون شیشه‌ای این رقم، در قالب ۴ آزمایش جدا اجرا شد. در آزمایش اول۶ تیمار شامل اتانول (۷۰ درصد)، هیپوکلریت‌سدیم (محتوی ۵٪ کلر فعال)، کلریدجیوه (۰/۱٪)، اتانول به علاوه هیپوکلریت‌سدیم و اتانول به علاوه کلرید جیوه و اتانول به علاوه هیپوکلریت‌سدیم و کلریدجیوه جهت دستیابی به روش مناسب استریل ریزنمونه‌های اولیه بررسی شدند. آزمایش دوم با هدف تعیین محیط کشت مناسب جهت پرآوری، ۵ نوع محیط کشت (MS، B5، N&N، WPM و Knudson-C) مورد آزمایش قرار گرفتند. آزمایش سوم جهت دستیابی به غلظت مناسب بنزیل آمینوپورین برای پرآوری، چهار غلظت (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر) بنزیل آمینوپورین آزمایش شدند. در آزمایش چهارم مقایسه غلظت‌های متفاوت دو نوع هورمون اسید ایندول بوتیریک و اسید نفتالین استیک برای ریشه‌زایی در غلظت‌های (۰، ۰/۸ و ۱/۶ میلی گرم در لیتر) صورت گرفت. پس از یاداشت برداری و تجزیه آماری صفات اندازه گیری شده، نتایج نشان داد که استریل ریزنمونه‌ها بوسیله هیپوکلریت‌سدیم (۵٪ کلر فعال) بهترین نتایج را داشته است. نتایج آزمایش دوم نشان داد که محیط کشت B5 نسبت به سایر محیط‌های کشت بیشترین اثر مثبت روی صفات اندازه گیری شده داشت. در مطالعه پرآوری شاخساره، بهترین نتایج در غلظت ۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین بدست آمد. نتایج آزمایش نیز چهارم نشان داد که از بین دو هورمون اسید ایندول بوتیریک و اسید نفتالین استیک غلظت ۰/۸ میلی گرم بر لیتر اسید ایندول بوتیریک بیشترین اثر را بر میزان ریشه‌زایی داشت.

کلمات کلیدی: بنزیل آمینوپورین، اسید ایندول بوتیریک، اسید نفتالین استیک، پرآوری، ریشه‌زایی درون شیشه‌ای

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه و کلیات ۱
۱-۱- کشت بافت گیاهی ۱
۱-۲- انتخاب ریزنمونه ۱
۱-۳- کار برد های کشت بافت ۲
۱-۴- انواع روش های کشت بافت ۲
۱-۴-۱- کشت مریستم یا نوک شاخه ۳
۱-۴-۲- کشت جوانه ۳
۱-۴-۳- کشت تخمک ۴
۱-۴-۴- کشت آندوسپرم ۴
۱-۴- ۵- کشت گره و جوانه جانبی ۵
۱-۴-۶- کشت بذر ۵
۱-۴-۷- کشت ریشه ۵
۱-۴-۸- کشت کالوس ۶
۱- ۵- فرایند ریز ازدیادی ۶
۱-۵-۱- مزایای ریزازدیادی ۷

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۱- ۶- محیط رشد ۷

۱-۶-۱- شرایط محیط کشت ۸

۱-۷- تنظیم کننده های رشد گیاهی/ هورمون‌ها ۸

۱-۷-۱- اکسین ها ۸

۱-۷-۲- سیتوکنین‌ها ۹

۱-۷-۳- جیبرلین‌ها ۹

۱-۷-۴- اتیلن ۱۰

۱-۷- ۵- اسید آبسزیک ۱۰

۱-۸- معرفی گیاه ۱۱

۱-۹- خصوصیات گیاهشناسی و مورفولوژی انگور ۱۱

۱-۱۰- سطح زیر کشت، میزان تولید انگور در جهان ۱۲

۱-۱۱- سطح زیر کشت، میزان تولید انگور در ایران ۱۲

۱-۱۲- معرفی انگور رقم بیدانه قرمز ۱۳

۱-۱۳- اهداف ۱۵

فصل دوم : بررسی منابع ۱۶

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۲-۱-ضدعفونی سطحی ریزنمونه های اولیه..... ۱۶

۲-۲- نقش نوع محیط کشت و هورمون‌ها در ریزازدیادی..... ۱۷

۲-۳- ریشه دار کردن گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت..... ۲۸

فصل سوم: مواد و روش‌ها..... ۳۲

۳-۱- مواد گیاهی..... ۳۲

۳-۲- مواد شیمیایی..... ۳۲

۳-۳- طرز تهیه‌ی استوک ذخیره‌ی هورمون‌ها..... ۳۳

۳-۴- طرز تهیه‌ی کلات آهن NaFeEDTA ۳۵

۳- ۵- روش کلی تهیه انواع محلول محیط کشت..... ۳۵

۳- ۶- اجرای آزمایشات..... ۳۶

۳-۶-۱- آزمایش اول: تعیین روش گندزدایی سطحی ریزنمونه‌ها..... ۳۶

۳- ۶-۲- آزمایش دوم: بررسی اثر نوع محیط کشت بر پرآوری انگور رقم بیدانه قرمز..... ۳۷

۳- ۶-۳- آزمایش سوم: مقایسه غلظت‌های متفاوت BAP بر پرآوری انگور رقم بیدانه قرمز..... ۳۷

۳-۶-۴- آزمایش چهارم: مقایسه ریشه زایی شاخه های انگور رقم بیدانه قرمز در شرایط درون شیشه ای با استفاده از IBA و NAA..... ۳۸

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۳- ۷- روش آماری اجرای پایان نامه..... ۳۹

فصل چهارم: نتایج..... ۴۰

۴-۱- آزمایش اول: بررسی اثرات ترکیب‌های مختلف ضدعفونی بر استقرار درون شیشه‌ای انگور رقم بیدانه قرمز..... ۴۱

۴-۱-۱- درصد آلودگی..... ۴۱

۴-۱-۲- درصد ریزنمونه‌های غیر آلوده نکروزه شده..... ۴۲

۴-۱-۳- درصد ریزنمونه‌های قابل واکشت ۴۳

۴-۲- آزمایش دوم: بررسی اثرات نوع محیط کشت بر پرآوری انگور رقم بیدانه قرمز..... ۴۴

۴-۲-۱- تعداد شاخساره..... ۴۷

۴-۲-۲- طول شاخساره..... ۴۷

۴-۲-۳- شاخص کلروفیل..... ۴۸

۴-۲-۴- سطح برگ..... ۴۹

۴-۲- ۵- تعداد برگ..... ۵۰

۴-۲- ۶- تعداد گره..... ۵۱

۴-۲-۷- وزن تر شاخساره..... ۵۲

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۴-۲-۸- وزن خشک شاخساره..... ۵۳

۴-۲-۹- طول میانگره‌ها..... ۵۴

۴-۲-۱۰- قطرشاخساره..... ۵۵

۴-۲-۱۱- تولید کالوس..... ۵۶

۴-۳- آزمایش سوم: بررسی اثرات غلظت‌های مختلف BAP بر پرآوری درون شیشه ای انگور رقم بیدانه قرمز..۵۷

۴-۳-۱- تعداد شاخساره..... ۵۹

۴-۳-۲- طول شاخساره..... ۵۹

۴-۳-۳- شاخص کلروفیل..... ۶۰

۴-۳-۴- سطح برگ..... ۶۱

۴-۳- ۵- تعداد برگ..... ۶۲

۴-۳- ۶- تعداد گره..... ۶۳

۴-۳-۷- وزن تر شاخساره..... ۶۴

۴-۳-۸- وزن خشک شاخساره..... ۶۵

۴-۳-۹- طول میانگره‌ها..... ۶۶

۴-۳-۱۰- قطرشاخساره..... ۶۷

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۴-۴- آزمایش چهارم: ریشه زایی درون شیشه ای انگور رقم بیدانه قرمز با استفاده از هورمون‌های IBA و NAA ۶۸

۴-۱- وزن تر ریشه ۶۹

۴-۲- وزن خشک ریشه ۷۰

۴-۳- تعداد ریشه ۷۱

۴-۴- طول ریشه ۷۳

۵- فصل پنجم: بحث ۷۵

۵-۱-۱- آزمایش اول: بررسی اثرات ترکیب‌های مختلف ضدعفونی بر استقرار دون شیشه ای انگور رقم بیدانه قرمز ۷۵

۵-۱-۲- آزمایش دوم: بررسی اثرات نوع محیط کشت بر پرآوری درون شیشه ای انگور رقم بیدانه قرمز ۷۷

۵-۱-۳- آزمایش سوم: مقایسه غلظت‌های متفاوت هورمون BAP بر پرآوری درون شیشه ای انگور رقم بیدانه قرمز ۷۹

۵-۱-۴- آزمایش چهارم: مقایسه ریشه زایی درون شیشه ای شاخه‌ها با استفاده از NAA و IBA ۸۳

نتیجه گیری کلی ۸۶

پیشنهادات ۸۷

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فهرست منابع..... ۸۸

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱- بوته و میوه‌های انگور رقم بیدانه قرمز..... ۱۴

فهرست جداول

جدول ۳-۱- ترکیبات محیط کشت‌های مورد استفاده..... ۳۴
جدول ۳-۲- نوع تیمارهای آزمایش شده جهت تعیین روش مناسب ضدعفونی ریزنمونه‌ها..... ۳۶
جدول ۳-۳- غلظت هورمون ها برای ریشه زایی شاخساره های انگور رقم بیدانه قرمز..... ۳۸
جدول ۴-۱- نتایج تجزیه واریانس بررسی اثرات ترکیب‌های مختلف استریل کردن..... ۴۱
جدول ۴-۲- نتایج تجزیه واریانس اثرات نوع محیط کشت بر پرآوری..... ۴۶
جدول ۴-۳- نتایج تجزیه واریانس اثرات غلظت های متفاوت BAP بر پرآوری ۵۸
جدول ۴-۴- نتایج تجزیه واریانس اثرات متقابل غلظت هورمون اکسین بر ریشه‌زایی..... ۶۹

فهرست نمودارها

نمودار ۴-۱- اثر ترکیبات مختلف ضد عفونی بر درصد آلودگی ریزنمونه‌ها ۴۲
نمودار ۴-۲- اثر ترکیبات مختلف ضد عفونی بر درصد ریزنمونه‌های غیر آلوده نکروزه شده... ..... ۴۳
نمودار ۴-۳- اثر ترکیبات مختلف ضد عفونی بر درصد ریزنمونه‌های قابل واکشت..... ۴۴

فهرست مطالب

عنوان صفحه

نمودار ۴-۴- بررسی اثرات اصلی محیط کشت بر تعداد شاخساره ۴۷
نمودار ۴-۵- بررسی اثرات اصلی نوع محیط کشت بر طول شاخساره ۴۸
نمودار ۴-۶- بررسی اثرات اصلی نوع محیط کشت بر شاخص کلروفیل ۴۹
نمودار ۴-۷- بررسی اثرات اصلی نوع محیط کشت بر سطح برگ ۵۰
نمودار ۴-۸- بررسی اثرات اصلی نوع محیط کشت بر تعداد برگ ۵۱
نمودار ۴-۹- بررسی اثرات اصلی نوع محیط کشت بر تعداد گره ۵۲
نمودار ۴-۱۰- بررسی اثرات اصلی نوع محیط کشت بر وزن تر شاخساره ۵۳
نمودار ۴-۱۱- بررسی اثرات اصلی نوع محیط کشت بر وزن خشک شاخساره ۵۴
نمودار ۴-۱۲- بررسی اثرات اصلی نوع محیط کشت بر طول میانگره ها ۵۵
نمودار ۴-۱۳- بررسی اثرات اصلی نوع محیط کشت بر قطر شاخساره ۵۶
نمودار ۴-۱۴- بررسی اثرات اصلی نوع محیط کشت بر کالوس زایی ۵۷
نمودار ۴-۱۵- بررسی اثرات اصلی غلظت BAP بر تعداد شاخساره ۵۹
نمودار ۴-۱۶- بررسی اثرات اصلی غلظت BAP بر طول شاخساره ۶۰
نمودار ۴-۱۷- بررسی اثرات اصلی غلظت BAP بر شاخص کلروفیل ۶۱
نمودار ۴-۱۸- بررسی اثرات اصلی غلظت BAP بر سطح برگ ۶۲
نمودار ۴-۱۹- بررسی اثرات اصلی غلظت BAP بر تعداد برگ ۶۳
نمودار ۴-۲۰- بررسی اثرات اصلی غلظت BAP بر تعداد گره ۶۴
نمودار ۴-۲۱- بررسی اثرات اصلی غلظت BAP بر وزن تر شاخساره ۶۵
نمودار ۴-۲۲- بررسی اثرات اصلی غلظت BAP بر وزن خشک شاخساره ۶۶

فهرست مطالب

عنوان صفحه

نمودار ۴-۲۳- بررسی اثرات اصلی غلظت BAP بر طول میانگره ها ۶۷
نمودار ۴-۲۴- بررسی اثرات اصلی غلظت BAP بر قطرشاخساره ۶۸
نمودار ۴-۲۵- بررسی اثر اصلی غلظت هورمون اکسین بر وزن تر ریشه ۷۰
نمودار ۴-۲۶- بررسی اثر اصلی غلظت هورمون اکسین بر وزن خشک ریشه ۷۱
نمودار ۴-۲۷- بررسی اثر اصلی غلظت هورمون اکسین بر تعداد ریشه ۷۲
نمودار ۴-۲۸- بررسی اثر اصلی غلظت هورمون اکسین بر طول ریشه ۷۳
نمودار ۴-۲۹- برش‌دهی اثرات متقابل نوع هورمون بر وزن تر ریشه ۷۴
نمودار ۴-۳۰- برش‌دهی اثرات متقابل نوع هورمون بر وزن خشک ریشه ۷۴

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- کشت بافت گیاهی

کشت بافت گیاهی به تکثیر یا پرآوری سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌ها در محیط کشت مایع یا جامد تحت شرایط محیطی استریل و کنترل شده اشاره دارد. تکنولوژی کشت بافت گیاهی بیشتر برای تکثیر در سطح وسیع گیاهان استفاده می شود. این تکنولوژی تجاری بر پایه ریزازدیادی است که در آن پرآوری سریع گیاه به وسیله ریز قلمه‌های ساقه‌ای کوچک، جوانه‌های محوری و در سطح محدودتری از رویان‌های سوماتیکی بدست می‌آید (Singh, 2005).

۱-۲- انتخاب ریزنمونه

بافتی از گیاه که برای کشت گرفته می‌شود، ریزنمونه نامیده می‌شود. ادعا بر این است که ریزنمونه‌های توانمند می‌توانند از هر ناحیه‌ای از گیاه برداشته شوند. با این وجود، این عقیده از نظر عملی منسوخ شده است. در بیشتر گونه‌ها ریزنمونه‌های اندام‌های مختلف سرعت رشد و باززایی متفاوتی را نسبت به هم نشان می‌دهند. انتخاب ریزنمونه همچنین هویت گیاهچه‌های توسعه یافته از طریق کشت بافت را از نظر هاپلوئید بودن یا دیپلوئید بودن تعیین می‌کند. از طرفی خطر آلودگی‌های میکروبی بوسیله ریزنمونه‌های نامناسب افزایش می‌یابد. بنابراین

انتخاب ریزنمونه‌های مناسب قبل از شروع کشت خیلی مهم است. تفاوت‌های عمده در پتانسیل باززایی انـدام‌هـا و ریزنمونه‌های مختلف تفاسیر مختلفی دارد. مهم‌ترین فاکتورها شامل تفـاوت‌هـای موجـود در مرحلـه سـلول‌هـا در چرخه‌ی سلولی، فراهم بودن یا توانایی انتقال نتظیم کننده‌های رشدی درونی و سوخت و ساز سلول‌هـا مـی‌باشـد. مهم‌ترین ریزنمونه‌ای که خیلی استفاده می‌شود، نواحی مریستمی گیاه، مثل انتهـای سـاقه، جوانـه‌هـای جـانبی و انتهای ریشه است (Singh, 2005).

۱-۳- کار بردهای کشت بافت

کشت بافت گیاهی عمدتا در علوم گیاهی استفاده می شود و همچنین دارای چندین کاربرد تجاری است

الف: ازدیاد غیر جنسی گیاهان به طریق تولید کلونی.

ب: نگهداری گونه های کمیاب و در معرض خطر گیاهان.

ج: تولید گیاهان عاری از عوامل بیماریزا.

د: ایجاد گیاهان هیبرید.

ه: جهت دگر گرده افشانی گونه‌های دارای خویشاوندی خیلی دور و سپس کشت بافت رویان‌های حاصله کـه از طریق دیگر از بین خواهند رفت، از کشت بافت استفاده می شود (نجات جنین).

و: مهندسی ژنتیک.

ز: برای تولید گیاهان مونوپلوئید مضاعف شده از کشت‌های هاپلوئید که بـرای دسـتیابی سـریع بـه لایـن‌هـای هوموزیگوس در برنامه‌های اصلاحی مناسب می‌باشند، بوسیله تیمار با کلشی سین که باعث مضـاعف شـدن تعـداد کروموزوم‌ها می‌شود (نوری ،۱۳۷۱).

۱-۴- انواع روش‌های کشت بافت

کشت بافت گیاهی می تواند به گروه‌های مختلفی بر اساس نوع ماده مورد استفاده تقسیم شود.

۱) کشت مریستم یا نوک شاخه

۲) کشت جوانه

۳) کشت تخمک

۴) کشت آندوسپرم

۵) کشت گره و جوانه جانبی

۶) کشت بذر

۷) کشت ریشه

۸) کشت کالوس

۱-۴-۱- کشت مریستم یا نوک شاخه

شاخه‌ها از گروه کوچکی از سلول‌ها به نام مریستم انتهایی شاخه توسعه می‌یابند. مریستم انتهایی خودش را مستقر کرده و باعث رویش بافت‌ها و اندام‌های جدید می شود و علائمی به بقیه گیاه می‌فرستد. شاید نوک شاخه و مریستم متداول ترین منابع تهیه ریزنمونه برای استقرار کشت بافت می‌باشند. ریزنمونه نوک شاخه به اندازه ۱۰۰ تا ۵۰۰ میکرومتر می‌باشد و شامل مریستم انتهایی با یک سرآغازه برگ است (بخشی خانیکی و فرشاد فر، ۱۳۸۴).

۱-۴-۲- کشت جوانه

این شیوه کشت بافت از ریزنمونه‌های نوک شاخه و یا ریزنمونه‌های گرهی در محیط دارای سیتوکنین و اغلب یک اکسین، برای کشت استفاده می‌کند. سیتوکنین ظهور جوانه‌های شاخه موجود روی ریزنمونه را (مریستم انتهایی در ریزنمونه‌های انتهای نوک شاخه و جوانه های محوری روی ریزنمونه‌های گرهی) برای تبدیل شدن به شاخه تحریک می‌کند. در بیشتر گونه‌های گیاهی، هر ریزنمونه بعد از ۴ تا ۵ هفته ، ۵ تا ۶ شاخه تولید می‌کند،

که این می‌تواند بین ۵۱۰ تا ۶۱۲ ریزنمونه‌های منفرد اولیه بدست دهد که امکان کشت و سازگار نمودن همه‌ی گیاهان تولید شده به این روش وجود دارد (بخشی خانیکی و فرشاد فر، ۱۳۸۴).

۱-۴-۳- کشت تخمک

کشت تخمک عبارت است از کشت کیسه جنین لقاح یافته یا تلقیح نشده که از تخمدان‌های در حال رشد جدا شده است. از کشت تخمک برای دو رگ‌گیری بین گونه‌ای و بین جنسی و نیز تولید هاپلوئید استفاده می‌شود روش کار بدین صورت است که هنگام تلاقی‌های بین‌گونه‌ای و بین جنسی معمولاً جنین هیبرید در تخمک بذر در حال رشد عقیم می‌شود. با استفاده ازکشت تخمک و یا ترکیبی از کشت تخمک و جنین می توان نتایج هیبرید بدست آورد، این کار در تنباکو صورت گرفته است. در جو و گندم تخمک و تخمدان یکی هستند زیرا تخمدان یک تخمک دارد. از کشت تخمک‌های تلقیح نشده برای بدست آوردن هاپلوئیدهای ژینوژنیک[1] در ذرت، چغندرقند، آفتابگردان و پنبه استفاده شده است (بخشی خانیکی و فرشاد فر، ۱۳۸۴).

۱-۴-۴- کشت آندوسپرم

کشت آندوسپرم عبارت است از کاشت درون شیشه‌ای بافت آندوسپرم در حال رشد که از بذر گیاهان نهاندانه جدا شده است. از خصوصیات آندوسپرم این است که در ۸۱ درصد گیاهان گلدار به صورت تری پلوئید است و از ترکیب ۳ سلول هاپلوئید به وجودآمده است. آندوسپرم یک توده یکنواخت از بافت‌های پارانشیمی است که فاقد تمایز آوندی یااورگانوژنزی اندام زایی است. کاشت آندوسپرم برای اولین بار توسط لارو[2] در سال ۱۹۴۹از آندوسپرم‌های نارس ذرت صورت گرفته است. در این روش ریز نمونه‌های آندوسپرم‌های رسیده یا نارس بذر از گیاهان تک لپه و یا دولپه جدا شده و درمحیط کشت وایت قرار داده شده، سپس این محیط کشت توسط رانگا سوامی[3] تغییر یافته است. کشت‌های حاصل را در تاریکی نگهداری می‌کنند. از کشت آندوسپرم برای اصلاح گیاهان تری پلوئید در سیب درختی، موز، چغندرقند، هندوانه و غیره استفاده می شود. در روش‌های متعارف

[1] . Zhynvzhnyk

[2] . Larue

[3] . Rangaswamy

اصلاح نباتات برای بدست آوردن گیاهان تری پلوئید و (2 n × 4n) ابتدا باید گیاه تتراپلوئید را به وجـود آورنـد و سپس با دیپلوئید تلاقی‌دهی بعد گیاه 3n به وجود آورند که معمولا عقیم هستند (بخشی خـانیکی و فرشـاد فـر، ۱۳۸۴).

۱-۴-۵- کشت گره و جوانه جانبی

شامل کشت قسمتی از ساقه با جوانه جانبی همراه یا بدون بخشـی از سـاقه اسـت. وقتـی فقـط جوانـه جـانبی استفاده می‌شود"کشت جوانه جانبی[1]" نامیده می‌شود (بخشی خانیکی و فرشاد فر، ۱۳۸۴).

۱-۴-۶- کشت بذر

یک تکنیک مهم برای زمانی است که ریزنمونه‌ها از گیاهان رشد کرده در شرایط *in vitro* گرفتـه شـوند و بـه طور وسیعی در ارکیده‌ها استفاده می شود. روش‌های ضدعفونی کردن مورد نیاز بـرای مـواد گیـاهی کـه بـه طـور مستقیم به عنوان ریزنمونه استفاده می‌شود، لزوما در برخی مواقع می تواند به بافت‌ها صدمه زده و باززایی را تحـت تاثیر قرار می‌دهند. در این شرایط کشت بذر می تواند یک جایگزین مناسب بدسـت آوردن یـا تولیـد دانهـال‌هـای استریل باشد (بخشی خانیکی و فرشاد فر، ۱۳۸۴).

۱-۴-۷-کشت ریشه

می‌تواند به وسیله کشت ریزنمونه‌های انتهای ریشه‌ی اصلی و فرعی پرورش یافته به صورت *in vitro*، صـورت گیرد و کشت آنها می‌تواند در محیط‌های ساده کشت صورت گیرد. با توجه به اینکه ریشه‌ها اندام‌هـای نامحـدودی هستند، رشدریشه‌ها در *in vitro* نامحدود می‌باشد. اگرچه استقرار کشت‌های ریشـه یکـی از اولـین دسـتاوردهای کشت بافت پیشرفته گیاهی است، اما زیاد در مطالعات اصلاح گیاهی استفاده نمی شود (بخشی خـانیکی و فرشـاد فر، ۱۳۸۴).

[1] .Lateral bud culture

۱-۴-۸- کشت کالوس

کالوس بافت توموری که معمولا از روی زخم‌های بافت‌ها و اندام‌های تمایز یافته بوجود می‌آید. بنابرین، اصولا کالوس می‌تواند به عنوان بافت پارانشیمی سازمان نیافته و کمی تمایز یافته، تعریف شود. معمولا کالوس توده همگن سلولی نیست، زیرا از هر دو بافت تمایز یافته و نیافته تشکیل شده است. بافت‌های تمایز یافته گیاهی (ریشه‌ها، ساقه‌ها، برگ‌ها، گل‌ها و غیره) می‌توانند به عنوان ریزنمونه‌های اولیه جهت تولید کالوس مورد استفاده قرار گیرند. این ریزنمونه‌ها معمولا به صورت‌های متفاوتی، مراحل تقسیم سلولی، پرآوری و اندام‌زایی را طی می-کنند. تشکیل کالوس معمولا در محیط غذایی تحت تاثیر کاربرد خارجی هورمون‌ها شکل می‌گیرد که نوع تنظیم کننده‌های رشد و غلظت‌های آن به طور وسیعی در آن تاثیر می‌گذارد. اکسین به تنهایی (بخصوص برای تک لپه ای‌ها) و سیتوکنین به تنهایی یا هردو با همدیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند. کشت کالوس اغلب در تاریکی صورت می‌گیرد. کشت کالوس بیشتر در بیوتکنولوژی گیاهی معمول می‌باشد. تغییر نسبت اکسین به سیتوکنین در محیط می‌تواند منجر به توسعه شاخه‌ها، ریشه‌ها یا رویان‌های سوماتیکی که بعدا گیاهان کامل می‌توانند از آن بدست آیند، شود. کشت کالوس همچنین می تواند برای شروع تولید سوسپانسیون سلولی استفاده شود که به طرق مختلفی برای مطالعات اصلاح گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Viyas and Dixit, 2005).

۱-۵- فرایند ریزازدیادی

ریزازدیادی باززایی درون شیشه‌ای گیاهان از اندام‌ها، بافت‌ها، سلول‌ها و تکثیر شبیه به اصل یک ژنوتیپ انتخابی یا استفاده از تکنیک کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. هدف از فرایند ریزازدیادی گیاه تولید کلون (کپی های واقعی از یک گیاه در تعداد فراوان) است. این فرایند معمولا به بخش‌های زیر تقسیم می‌شود:

- مرحله صفر: مرحله پیش از ازدیاد یا انتخاب و پیش تیمار گیاهان مادری مناسب

- مرحله۱: استریل کردن سطحی و استقرار ریز نمونه‌های مادری

- مرحله۲: واکشت برای تکثیر یا پرآوری ریزنمونه‌ها