فهرست مطالب

عنوان شماره صفحه

فصل اول ۶

کلیات ۶

فصل دوم ۱۰

مرورمنابع ۱۰

۲-۱ کشت بافت ۱۰

۲-۲ تاریخچه کشت بافت ۱۱

۲-۳ کاربردهای عمومی کشت بافت ۱۲

۲-۳-۱تکثیرکلون ازطریق کشت بافت ۱۲

۲-۳-۲ کاربردهای تجاری ۱۲

۲-۳-۳ تکثیرگیاهان عاری ازویروس ۱۲

۲-۳-۴حفاظت وتبادل بین‌المللی ژرم‌پلاسم ۱۲

۲-۴ مزایای کشت بافت ۱۲

۲-۵ مراحل کشت بافت گیاهی ۱۳

۲-۶ تهیه ریزنمونه ۱۳

۲-۶-۱ سن ریزنمونه ۱۳

۲-۶-۲ اندازه ریزنمونه ۱۳

۲-۶-۳ کیفیت گیاه ۱۴

۲-۶-۴ هدف نهایی کشت ۱۴

۲-۷ شرایط استریل ۱۴

۲-۸ ترکیب محیط کشت ۱۴

۲-۹ کشت این ویتروی سیب‌زمینی ۱۴

۲-۱۰ کالوس‌زایی ۱۵

۲-۱۱ باززایی ۱۸

۲-۱۲ نقش هورمون‌های مختلف دربازززایی ۱۹

۲-۱۲-۱ اکسین‌ها ۱۹

۲-۱۲-۲ سیتوکنین‌ها ۱۹

۲-۱۳ جنین‌زایی سوماتیکی ۲۱

فصل سوم ۲۶

۳-۱ مواد ۲۶

۳-۲ روش‌ها ۲۶

۳-۲-۱ کشت بذور ۲۶

۳-۲-۲ ترکیب محیط کشت ۲۶

۳-۲-۳ آماده کردن محیط کشت ۲۸

۳-۲-۴ نحوه استریل کردن ۲۸

۳-۲-۴-۱ استریل نمودن ظروف ۲۸

۳-۲-۴- ۲ استریل نمودن محیط کشت ۲۸

۳-۲-۴-۳ ضدعفونی ریزنمونه‌ها ۲۹

۳-۲-۵ انتخاب ریزنمونه ۲۹

۳-۲- ۶ کالوس‌زایی ۲۹

۳-۲-۷ تکثیرکالوس‌ها ۳۰

۳-۲-۸ جنین‌زایی ۳۰

فصل چهارم ۳۱

نتایج و بحث: ۳۱

۴-۱نتایج ضدعفونی ۳۱

۴-۲ نتایج کالوس‌دهی ۳۶

۴-۲-۱ القای کالوس ۳۶

۴-۲-۲ میزان کالوس ۴۱

۴-۲-۲ میزان کالوس ریخت‌زا ۴۶

۴– ۵ باززایی ۵۴

نتیجه گیری کلی ۶۳

پیشنهادات ۶۴

منابع ۶۵

فهرست جداول

عنوان شماره صفحه

جدول ۳- ۱ ترکیب محیط کشت MS ۲۷

جدول ۴-۱ تجزیه واریانس میزان آلودگی باکتریایی برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی پس از ضدعفونی در غلظت‌های نیم و یک درصد محلول هیپوکلریت سدیم ۳۲

جدول ۴- ۲ تجزیه واریانس میزان از بین رفتن برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی پس از ضدعفونی در غلظت‌های نیم و یک درصد هیپوکلریت سدیم ۳۳

جدول ۴- ۳ درصد آلودگی باکتریایی برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی پس از ضدعفونی در غلظت‌های نیم و یک درصد محلول هیپوکلریت سدیم ۳۴

جدول ۴-۴ درصد از بین رفتن برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی پس از ضدعفونی در غلظت‌های نیم و یک درصد محلول هیپوکلریت سدیم ۳۵

جدول ۴-۵ تجزیه واریانس درصد القای کالوس حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی در محیط کشت حاوی 2,4-D با غلظت ۵ و ۴، ۳، ۲، ۱میلی‌گرم در لیتر به تنهایی ۳۷

جدول ۴-۶ تجزیه واریانس درصد القای کالوس حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی در محیط کشت حاوی 2,4-D با غلظت ۵ و ۴، ۳، ۲ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin ۳۸

جدول ۴-۷ تجزیه واریانس القای کالوس حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی در محیط کشت حاوی2,4-D با غلظت۵ و ۴، ۳، ۲ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با۱ میلی‌گرم در لیتر Kin ۳۸

جدول ۴- ۸ مقایسه میانگین القای کالوس حاصل از برگ و میان‌گره بین پنج رقم سیب‌زمینی ۳۹

جدول ۴- ۹ مقایسه میانگین القای کالوس حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی بین سه محیط کشت ۳۹

جدول ۴-۱۰ مقایسه میانگین القای کالوس حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی بین سطوح مختلف 2,4-D ۴۰

جدول ۴-۱۱ مقایسه میانگین درصد تولید کالوس حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی بین سطوح مختلف 2,4-D در ترکیب با Kin ۴۰

جدول ۴-۱۲ تجزیه واریانس طول و وزن کالوس حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی در محیط کشت حاوی 2,4-D با غلظت ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر ۴۴

جدول ۴-۱۳ تجزیه واریانس طول و وزن کالوس حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی در محیط کشت حاوی 2,4-D با غلظت ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin ۴۴

جدول ۴-۱۴ تجزیه واریانس طول و وزنکالوس حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی در محیط کشت حاوی 2,4-D با غلظت ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتردر ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin ۴۵

جدول ۴- ۱۵ تجزیه واریانس درصد کالوس مورفوژن حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی در محیط کشت حاویD-2,4 با غلظت ۵ و ۴ ،۳ ،۲، ۱میلی‌گرم در لیتر ۴۸

جدول ۴-۱۶ تجزیه واریانس درصد کالوس مورفوژن حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی در محیط کشت حاویD-2,4 با غلظت ۵ و ۴ ،۳ ،۲ میلی‌گرم در لیتردر ترکیب با Kin با غلظت ۰/۵میلی‌گرم در لیتر ۴۸

جدول ۴-۱۷ تجزیه واریانس درصد کالوس مورفوژن حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی در محیط کشت حاویD-2,4 با غلظت ۵ و ۴ ،۳ ،۲ میلی‌گرم در لیتردر ترکیب با Kin با غلظت ۱میلی‌گرم در لیتر ۴۹

جدول ۴-۱۸ تجزیه واریانس باززایی حاصل از برگ پنج رقم سیب‌زمینی در محیط کشت حاوی هورمون های مختلف 2,4-D، BAP، Kin و GA3 ..... ۵۷

جدول ۴-۱۹ تجزیه واریانس باززایی حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی در محیط کشت حاوی هورمون‌های مختلف 2,4-D، BAP، Kin و GA3 ..... ۵۷

جدول ۴-۲۰ درصد باززایی از میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی در محیط کشت‌های حاوی Kin، GA3، BAP، 2,4-D ۵۸

جدول ۴-۲۱ درصد باززایی از برگ پنج رقم سیب‌زمینی در محیط کشت‌های حاوی Kin، GA3، BAP، 2,4-D ۶۰

فهرست اشکال

عنوان		شماره صفحه
شکل ۲-۱	مراحل تشکیل جنین سوماتیکی	۲۲
شکل ۴- ۱	کالوس‌های آبکی تشکیل شده در محیط‌کشت حاوی توفوردی	۵۰
شکل ۴ –۲	تشکیل کالوس مورفوژن حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی	۵۰
شکل ۴ – ۳	درصد مورفوژنی محیط کشت حاوی غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی	۵۱
شکل ۴ – ۴	درصد مورفوژنی محیط کشت حاوی غلظت‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی (K = Kin)	۵۱
شکل ۴ – ۵	درصد مورفوژنی محیط کشت حاوی غلظت‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin حاصل از برگ و میان‌گره پنج رقم سیب‌زمینی(K = Kin)	۵۲
شکل ۴- ۶	درصد کالوس‌های مورفوژن در سطوح مختلف 2,4-D و Kin	۵۲
شکل ۴- ۷	مقایسه درصد مورفوژنی بین ارقام	۵۳
شکل ۴- ۸	مقایسه درصد مورفوژنی بین برگ و میان‌گره	۵۳
شکل ۴ – ۹	جنین‌های سوماتیکی تولید شده در محیط کشت حاوی BAP با غلظت‌های ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با 2,4-D با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ میلی‌گرم درلیتر	۶۲

فصل اول

مقدمه

۱-۱ کلیات

سیب‌زمینی با نام علمی *Solanum tuberosum L.* گیاهی است یکساله از تیره *Solanaceae* و اتوتتراپلوئید است.این گیاه از محصولات غده‌ای است که نقش مهمی در تغذیه مردم جهان دارد. سیب‌زمینی یکی از مهمترین گیاهان دولپه‌ایست و غده آن دارای کربوهیدرات می‌باشد به طوریکه در ۱۰۰ گرم از غده آن حدود ۷۵ گرم آب، ۲۱ گرم کربوهیدرات، ۲ گرم پروتئین و مقداری هم ویتامین و املاح می‌باشد. در سیب زمینی مقدار زیادی ویتامین‌های B_1 و B_2 و A و C وجود دارد (جعفرپور، ۱۳۷۰). سیب‌زمینی گیاهی است یکساله به بلندی حدود ۳۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متر و به صورت رویشی به کمک غده تکثیر می‌شود. غده‌ها دارای جوانه هستند، که این جوانه‌ها گیاهچه جدید را به وجود می‌آورند. جنس *Solanum* دارای گونه‌های زیادی بوده ولی تنها گونه *tuberosum* و تعداد بسیار محدود دیگری هستند که تولید غده می‌نمایند (دودس و همکاران، ۱۹۸۹). این گیاه دگرگشن است. معمولاً هورمون لازم برای تحریک و شروع غده‌بندی در برگ است و تحت تأثیر روزهای کوتاه تولید می‌شود. هر چه رقم دیررس‌تر باشد نسبت به طول روز حساس‌تر و غده‌بندی آن در روزهای بلندتر به تأخیر بیشتری می‌افتد. این محصول سرمادوست است، به طوریکه در نواحی گرم، در پاییز و در نواحی سرد، در بهار کاشته می‌شود. بهترین رشد سیب‌زمینی در نواحی حاصل می‌شود که میانگین حرارت هوایی گرمترین ماه فصل رشد سیب‌زمینی حدود ۲۵ درجه سانتیگراد یا کمتر باشد (ملکی و همکاران، ۱۳۸۷).

از آنجا که عملکرد این گیاه در هکتار بسیار بالاست، مورد توجه زیادی می‌باشد. این محصول از نظر اهمیت در مقام پنجم و بعد از محصولاتی چون گندم، برنج، ذرت و جو قرار دارد. در ایران این محصول از جایگاه ویژه‌ای در تغذیه مردم برخوردار است، مخصوصاً با رشد جمعیت کشور روز به روز اهمیت آن افزوده می‌گردد (جعفرپور، ۱۳۷۰). میزان تولید سیب‌زمینی، علی‌رغم کاهش سطح زیر کشت آن، به علت بازده بالا در واحد سطح زمین درحال افزایش است. تولید این محصول در ایران در سال ۲۰۰۹ به میزان ۴/۱ میلیون تن و سطح زیرکشت ۱٫۵۳۳٫۹۵۵هکتارگزارش شده است (فائو، ۲۰۰۹).

خاستگاه سیب‌زمینی کوهستان‌های آمریکای جنوبی و مرکزی است. ارتفاعات آند، بولیوی، پرو، شیلی اولین مناطقی بودند که سیب‌زمینی در آنها کشت می‌شده است. سیب‌زمینی اولین بار در زمان فتحعلی شاه قاجار از آمریکا وارد ایران شد که در آنجا از دیرباز به عنوان یک محصول مهم غذایی مطرح بوده است. در قرن هجدهم و نوزدهم میلادی در کشورهای مختلف اروپایی سیب‌زمینی به طور گسترده برای تولید پوره مورد استفاده قرار داشت. در خلال قرن نوزدهم سیب‌زمینی عمدتاً توسط استعمارگران از اروپا به چند کشور گرمسیری و نیمه گرمسیری وارد گشت. ۸۸ درصد سیب‌زمینی وحشی در ۱۶ کشور، آرژانتین، بولیوی، مکزیک و پرو مشاهده شدند (جعفری، ۱۳۷۰).

اهلی نمودن گیاهان یکی از مهمترین وقایع کشاورزی در دنیای جدید است. هدف‌های کلی اصلاح نباتات افزایش عملکرد در واحد سطح، بهتر نمودن کیفیت محصولات کشاورزی و تولید مواد اولیه مورد نیاز جوامع انسانی است. در اغلب گیاهان یک یا چند ژن اقتصادی وجود دارد. ژن‌هایی که حساسیت و مقاومت گیاهان را نسبت به امراض و آفات کنترل می‌کنند، در اولویت برنامه‌های اصلاح‌نباتات قرار دارند. در شرایط نامساعد افزایش عملکرد به طریق اصلاح‌نباتات به مقدار کم و صرف زمان طولانی ممکن است. ژن‌های کنترل کننده عملکرد برای بروز حداکثر پتانسیل خود به عوامل محیطی تولید وابسته می‌باشند. با ترکیب بیوتکنولوژی در اصلاح‌نباتات موانعی که در روش‌های کلاسیک وجود دارد رفع شده است. روش‌های بیوتکنولوژی که برای اصلاح گیاهان استفاده می‌شوند عبارتند از: کشت بافت، تولید گیاهان هاپلوئید، کشت دانه گرده، ادغام پروتوپلاست ، انتقال ژن یا مهندسی ژنتیک، انتخاب براساس نشانگرها و QTL، تولید گیاهان هاپلوئید. در اصلاح‌نباتات با استفاده از تکنیک کشت بافت و انجام انتخاب سلولی در مقیاس وسیع می توان ارقام مقاوم به استرس‌های محیطی را تولید نمود (پیری و نظریان فیروزآبادی، ۱۳۸۰).

اصطلاح کشت درون شیشه (کشت بافت) در برگیرنده کلیه روش‌های کشت سلول، بافت و اندام گیاهی در ظروف شفاف و در شرایط استریل می‌باشد. هر سلول گیاهی در شرایط مناسب کشت می‌تواند رشد نماید و بصورت یک گیاه کامل درآید. در بهره‌برداری از این پتانسیل ژنی در گیاهان دو هدف عمده دنبال می‌شود: تولید و تکثیر گیاهان یکنواخت و دست‌یابی به صفات جدید. کشت بافت سلولی با ارائه تحقیقات گاتریت در سال ۱۹۸۵ بر روی مواد التیام دهنده زخم‌های گیاهی و تشکیل کالوس و مطالعات میکروسکوپی توسط اشلیدن در سال ۱۸۳۸ و ۱۸۳۹ که تئوری سلولی را ارائه دادند، آغاز شد (ملکی و همکاران، ۱۳۸۷). تئوری سلولی در قرن ۱۹ آغاز گردیده، این تئوری عنوان می‌کند که سلول واحد ساختاری و عملی یک موجود است. هرسلول دارای قابلیت ژنتیکی به نام توتی‌پتانسی می‌باشد که باعث تبدیل یک سلول به یک گیاه کامل می‌گردد. این تکنیک همان‌گونه که اشاره شد امکان تولید هزاران گیاهچه مشابه گیاه مادری را در مدت زمان بسیار کوتاه و در فضای فیزیکی بسیار محدود می‌تواند فراهم کند (پیری و نظریان فیروزآبادی،

۱۳۸۰). در آغاز استفاده از ریزنمونه‌های حاوی سلول‌های مریستم نوک ریشه گوجه‌فرنگی و سپس کشت جنین جو رونق یافت. سپس کاربرد تجاری کشت بافت در سال ۱۹۶۰ در آمریکا با ریزازدیادی ارکیده شروع شد (ملکی و همکاران، ۱۳۸۷).

تولید کالوس و باززایی گیاهچه‌ها از طریق اندام‌زایی یا جنین‌زایی مسئله‌ای مهم در موفقیت بسیاری از آزمایشات کشت بافت می‌باشد (دبلوک، ۱۹۸۸). کالوس شامل توده‌ای از سلول‌های تمایز نیافته می‌باشد که توانایی تولید یک گیاه کامل را دارا می‌باشند. از کالوس‌های تولید شده در محیط این ویترو (In vitro) جهت ایجاد تنوع سوماکلونی، انجام انتخاب سلولی و .... استفاده می‌شود. تمامی کالوس‌های تولید شده در محیط کشت توانایی تولید اندام را نداشته و صرفاً برخی از آنها هستند، که اصطلاحاً کالوس‌های ریخت‌زا (مورفوژن) نامیده می شوند و قابلیت تولید یک گیاه کامل را دارند. جنین‌های سوماتیکی نیز شامل جنین‌هایی است که در محیط این ویترو از سلول‌های سوماتیکی بوجود آمده و توانایی رشد و تولید گیاهچه‌های پایدار را دارا هستند. بهبود شرایط تولید کالوس‌های ریخت‌زا و باززایی از طریق جنین‌های سوماتیکی یکی از اساسی‌ترین مراحل بوده و نیاز به انجام تحقیقات گسترده جهت بهینه نمودن شرایط دارد. گزارش‌هایی از بهینه‌سازی باززایی گیاهچه‌ها از طریق جنین‌های سوماتیکی برای بسیاری از گونه‌های گیاهی دیده شده است (راقاوان، ۱۹۸۶؛ بجاج، ۱۹۹۵؛ برآون و همکاران، ۱۹۹۵).

امروزه دانشمندان با بهره‌گیری از روش‌های جدید به‌زراعی و به‌نژادی از جمله تکنیک‌های کشت بافت توانسته‌اند بر تولید سیب‌زمینی در واحد سطح بیفزایند (جعفرپور، ۱۳۷۰). ایجاد ژرم‌پلاسم جدید از میان تکنیک‌های کشت بافت و انتقال ژن، پتانسیل زیادی برای بهبود خصوصیات این گیاه ایجاد نموده است (هابرلاچ و همکاران، ۱۹۸۵). کشت مریستم به تنهایی یا به همراه تیمار گرما ابزار مفید و مؤثری برای حذف آلودگی‌های ویروسی از گیاهان است (باپات و روآت، ۱۹۷۷). به طور کلی از تمام مریستم‌های گیاه می‌توان برای تولید گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زا استفاده کرد (پیریک، ۱۳۷۶). سیب‌زمینی اولین گیاهی است که از طریق تکنیک‌های کشت بافت ویروس‌های آن حذف شده‌اند (نجیب و همکاران، ۲۰۰۳؛ فیک و همکاران ۱۹۹۲). از تکنیک کشت این ویترو برای تولید واریته‌های مصنوعی نیز استفاده شده است. شمای کلی طرح به این ترتیب است که از سیب‌زمینی تتراپلوئید، سطوح دیپلوئیدی آن گرفته می‌شود، سپس در سطح دیپلوئیدی ویژگی‌های غالب و مطلوب گزینش می‌شوند و با کشت بساک، مونوپلوئید آنها تولید می‌شود. از لاین‌های مونوپلوئید مختلف لاین‌های هموزیگوت دیپلوئید تولید خواهد شد. اگر لاین‌های دیپلوئید خودبارور باشند، می‌توان از بذر به جای غده برای تکثیر آنها استفاده کرد. بنابراین مشکل تولید بذر و همچنین انتقال ویروس مرتفع می‌شود.

هتروزیگوستی در سیب‌زمینی یکی از ویژگی‌های اساسی است. گیاهان دیپلوئید می‌توانند با سایر کلون های دیپلوئید نظیر *S. tuberosum* یا با گونه‌های مختلف دیگر تلاقی یافته و تولید گیاهان تتراپلوئید نمایند و از این طریق می‌توان به هتروزیس رسید. تلاش‌های زیادی برای انتخاب کلون‌های مقاوم صورت گرفته است و به جای اینکه گزینش در سطح گیاه کامل باززایی شده انجام گیرد، بهتر است در همان مراحل اولیه کشت پروتوپلاست با کمک گزینش‌گرهای مناسب صورت گیرد. همچنین از فناوری مهندسی ژنتیک نیز برای انتقال ژن‌های مناسب در این گیاه استفاده می‌شود (دودس و همکاران، ۱۹۸۹). همچنین گزارشاتی در رابطه با تولید جنین‌های سوماتیکی از بافت‌های مختلف سیب‌زمینی وجود دارد (برادو-آس، ۱۹۷۷؛ آبادهیا و

چندرا، ۱۹۷۷). با توجه به این‌که تکنیک‌های کشت بافت جهت اصلاح ارقام سیب‌زمینی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است، انجام تحقیقات دیگر در زمینه کشت بافت در گیاه سیب‌زمینی ضروری به نظر می‌رسد. امروزه دانشمندان با بهره‌گیری از روش‌های جدید به‌زراعی و به‌نژادی از جمله تکنیک‌های کشت بافت توانسته‌اند بر تولید این محصول در واحد سطح بیفزایند (جعفرپور، ۱۳۷۰).

هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیر استفاده از هورمون‌های 2,4-D (2,4- Dichlorophenoxyace acid-) به تنهایی و در ترکیب با Kin (Kinetin) و BAP (6-benzyl amino purine)، و NAA (α-Naphtaleneacetic acide) در ترکیب با BAP در تشکیل کالوس و هورمون‌های Kin به تنهایی، BAP به تنهایی و در ترکیب با 2,4-D و GA_3 (Gibberellic acid) در ترکیب با 2,4-D برای باززایی جنین‌های سوماتیکی در ارقام مختلف سیب‌زمینی که در ایران مورد کشت قرار می‌گیرند می‌باشد. بدیهی است بهینه کردن شرایط تولید جنین‌های سوماتیکی گام مؤثری در انجام تحقیقات آتی جهت اصلاح این ارقام بخصوص از طریق انجام انتخاب سلولی برای افزایش مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد.

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱ کشت بافت

بیوتکنولوژی یا فناوری زیستی مجموعه‌ای از فنون را تشکیل می‌دهد که امکان بکارگیری توانایی و کارآیی سلول‌های موجودات زنده اعم از حیوانی یا گیاهی را فراهم می‌سازد. در سال‌های اخیر با انجام تحقیقات متعدد در حوزه بیوتکنولوژی کشاورزی این بخش دارای جایگاه مهم و با ارزشی شده است و این امکان را در رابطه با گیاهان زراعی فراهم نموده است، تا از روش‌های کلاسیک اصلاح‌نباتات و همچنین با استفاده از تکنیک‌های مختلف از قبیل دست‌ورزی ژنتیکی، کشت بافت و سلول گیاهی در شرایط این ویترو گیاهانی با سازگاری متناسب‌تر و بیشتر به شرایط محیطی و همچنین سازگار با نیاز انسانها تولید نماید (پیری و نظریان، ۱۳۸۰).

کشت بافت و سلول گیاهی به همراه روش‌های مهندسی ژنتیک از ارکان مهم فناوری زیستی به عنوان یکی از علوم پیشرفته دنیا به شمار می‌آیند. با علم به این موضوع که هر یک از سلول‌های تمایز نیافته توانایی تبدیل شدن به گیاه کامل را دارند، دریچه‌ای تازه پیش روی دانشمندان و محققان علوم زیستی گشوده شد، به نحوی که در مقایسه با روش‌های اصلاح سنتی گیاهان، تسریع قابل ملاحظه‌ای در مدت زمان اجرای برنامه‌های اصلاحی به وجود آمد و امکان انجام تلاقی‌های بین جنسی را نیز فراهم نمود. علاوه بر این نگه‌داری ذخایر توارثی، تولید گیاهان عاری از ویروس و تولید گیاهان هاپلوئید از جمله کاربردهای مهم دیگر کشت بافت و سلول گیاهی می‌باشند. روش‌های کشت بافت مبتنی بر دو مرحله تمایززدایی و تمایزیابی است که انجام هر یک از این مراحل به شرایط خاصی نیاز دارد و باید در محیطی عاری از هر گونه آلودگی صورت

پذیرد که گاه باعث افزایش هزینه تولید می‌شود. با این وجود مراکز تولیدی سالیانه میلیون‌ها نهال و گیاه مختلف را از طریق روش‌های ریزازدیادی به بازار عرضه می‌کنند و فرآورده‌های زیستی متعددی نیز با استفاده از روش‌های کشت بافت تولید می‌شوند. کشت بافت گیاهی یا کشت این ویترو عبارت است از رشد سلول، بافت و یا اندام گیاهی در یک محیط غذایی مصنوعی استریل که به صورت جامد یا مایع تهیه می‌شود. این تکنیک به عنوان یکی از شاخه‌های زیست فناوری، کاربرد گسترده‌ای در عمل انواع کشت بافت داردکه این کاربردها به صورت زیر طبقه‌بندی می‌شوند (ربیعی، ۱۳۸۹):

۱- کشت کالوس یا بافت: رشد و نگه‌داری توده‌های حجیم سلول‌های تمایز نیافته که از رشد نامنظم قطعات کوچکی از اندام‌ها و بافت‌های گیاهی یا سلول‌هایی که قبلاً کشت شده‌اند به وجود می‌آیند را کشت کالوس گویند.

۲- کشت سوسپانسیون یا کشت سلول: کشت مجموعه‌ای از سلول‌های گیاهی و دسته‌های کوچک در محیط کشت مایع

۳- کشت پروتوپلاست: کشت سلول‌های گیاهی ایزوله شده بدون داشتن دیواره سلولی را کشت پروتوپلاست می‌نامند.

کشت بافت یا کشت عاری از آلودگی شامل کشت سلول، بافت و اندام تحت شرایط فیزیکی و شیمیایی در محیط این ویترو می‌باشد. ما بین سال‌های ۱۹۴۰ تا ۱۹۶۰ پیشرفت‌های جدیدی از تکنولوژی و بهبود در کاربرد این تکنیک گزارش شده است. در سال ۱۹۹۰ این تکنیک کاربرد زیادی در افزایش گونه‌های گیاهی داشت (تریوور، ۲۰۰۷). کشت بافت ابزار مهمی برای مطالعات سلولی و کاربردهای تجاری می‌باشد (تورپ، ۱۹۹۰).

۲-۲ تاریخچه کشت بافت

در سال ۱۹۰۴ هانیگ در محیط کشت حاوی نمک و ساکارز جنین را کشت نمود. در سال ۱۹۲۵ لای‌باچ از کشت جنین در تلاقی‌های بین‌گونه‌ای استفاده کرد. در بین سال‌های ۱۹۲۵-۱۹۲۰ روبین و کات کشت ریشه را انجام دادند. کشت ریشه گوجه فرنگی در محیط حاوی (ویتامین‌های B + شیره مخمر + ساکارز + نمک) توسط وایت و در سال ۱۹۳۴ صورت گرفت. در سال ۱۹۳۹ کشت کالوس هویج و تنباکو با استفاده از اکسین‌ها و توسط وایت و گاثرت صورت گرفت. در سال ۱۹۵۲ گیاهان عاری از ویروس با استفاده از کشت مریستم توسط مورل فرانسوی به وجود آمد. در سال ۱۹۵۷ تمایز ریشه و اندام هوایی با استفاده از نسبت اکسین و سیتوکنین مربوط به شکل‌زایی توسط اسکوگ آمریکایی و در تنباکو انجام شد. بنای کشت سلول های گیاهی توسط هیلدربرند سوئدی نیکل و ملچرز و در سال‌های ۱۹۵۹-۱۹۵۴ نهاده شد. جنین‌زایی سوماتیکی در کشت‌های سلولی در هویج و توسط رینرت آلمانی و استوارد آمریکایی در سال‌های ۱۹۵۸-۵۹ صورت گرفت (باقری و آزادی، ۱۳۸۱).

۲-۳ کاربردهای عمومی کشت بافت

۲-۳-۱ تکثیر کلون از طریق کشت بافت

برای تشکیل کلون، تکثیر جوانه‌های محوری تشکیل شده، کشت نوک ساقه و کشت مریستم معمولاً مناسب است، زیرا به ندرت در این جوانه‌ها تغییرات ژنتیکی رخ می‌دهد. عمده‌ترین مزیت تکثیر کلون، تکثیر هزاران گیاهچه از یک ژنوتیپ منفرد می‌باشد.

۲-۳-۲کاربردهای تجاری

تکنیک ریزازدیادی با استفاده از کشت بافت به صورت تجاری در گیاهان بیشترین کاربرد را داشته است. در مورد گیاهان باغی دیگری از قبیل پیرتروم، سیب‌زمینی، مارچوبه، توت‌فرنگی و گلهای زینتی دیگری که به سختی بذر می‌نمایند، پتانسیل استفاده را دارا می‌باشد، مشروط بر اینکه روش‌های مؤثر عملی کشت بافت برای گونه مورد نظر فراهم و حفظ هویت ژنتیکی گیاهان تکثیر شده نیز امکان‌پذیر باشد.

۲-۳-۳ تکثیر گیاهان عاری از ویروس

ویروس‌ها و دیگر پاتوژن‌های گیاهی ممکن است بوسیله نوک مریستم و یا ترکیبی از کشت مریستم و تیمار به گرما حذف شوند. فراوانی یک ویروس در برگها یا ساقه‌های گیاهان دارای بیشترین مقدار است و در بافت مریستم تازه تشکیل شده یا بندرت دیده می‌شود و یا اصلاً وجود ندارد. با تشکیل کلونی از ریزنمونه‌های نوک مریستم، گیاهان عاری از ویروس یا تقریباً عاری از بیماری، ممکن است باززایی شوند.

۲-۳-۴ حفاظت و تبادل بین‌المللی ژرم‌پلاسم

کشت‌های نوک ساقه ممکن است منجمد شده و به عنوان ژرم‌پلاسم ذخیره شده برای مدت‌های طولانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بدین طریق که کشت سلول و یا کشت بافت در نیتروژن مایع با درجه حرارت پایین برای مدت طولانی نگه‌داری می‌شوند.

۲-۴مزایای کشت بافت

تولید انبوه گیاهانی با ساختار ژنتیکی یکسان، معمول‌ترین مزیتی است که به کشت بافت گیاهی نسبت داده می‌شود.

- تکثیر سریع کلون‌ها: با کشت بافت یا سلول ممکن است که هزاران سلول در یک کشت موجود باشد که هر کدام قابلیت تولید گیاه کاملی را داشته باشد، این گیاهان از نظر ژنتیکی مشابه یکدیگر خواهند بود.
- یکنواختی ژنتیکی
- شرایط غیرآلوده: حفظ کشت‌های گیاهی تحت شرایط غیرآلوده، یک منبع بزرگی از مواد گیاهی عاری از بیماری‌زا در اختیار ما قرار می‌دهد.
- انتخاب گیاه: احتمال داشتن تعداد زیادی گیاه در داخل یک ظرف کشت وجود دارد. اغلب در داخل کشت‌های عادی، مقداری تنوع ژنتیکی وجود دارد. ضمناً کشت‌ها را می‌توان به گونه‌ای تیمار کرد که میزان جهش افزایش یابد.

- گیاه مادری درون شیشه‌ای: امروزه به خوبی مشخص شده است که کیفیت و شرایط رشد گیاه مادری که تحت تأثیرعناصری مانند مواد غذایی، عوامل بیماری‌زا، نور و دما می‌باشد، به طور شگفت انگیزی بر روی موفقیت تکثیر گیاهان مؤثر است.
- حفظ و نگهداری منابع ژنتیکی: نیاز به فضای کوچک و سهولت فراهم کردن شرایط مناسب موجب شده است که کشت‌های درون شیشه‌ای، روش کاربردی مناسبی جهت حفظ گیاهان مادری کلکسیون‌ها محسوب شوند. از این روش می‌توان برای نگه‌داری گیاهان زراعی، گونه‌های کمیاب و گونه‌هایی که در معرض خطر هستند استفاده کرد.
- از فنون کشت بافت ممکن است جهت تولید گیاهان هیبرید در گونه‌های ناسازگار، از طریق کشت جنین یا تخمک استفاده شود.
- با استفاده از روش‌های درون شیشه‌ای در تمام طول سال می‌توان گیاه تولید کرد.
- گونه‌هایی که تکثیر رویشی در آن‌ها به سختی صورت می‌گیرد ممکن است که از طریق کشت بافت تکثیر شوند (پیری و نظریان فیروزآبادی، ۱۳۸۰).

۲-۵ مراحل کشت بافت گیاهی

یک کار کشت بافتی می‌تواند شامل مراحل زیر باشد:

- انتخاب یک ریزنمونه گیاهی
- ساخت محیط کشت حاوی عناصر ماکرو و میکرو، ویتامین، هورمون، ساکارز و آگار
- استریل کردن محیط کشت
- استریل نمودن وسایل و لوازم کشت
- استریل نمودن نمونه گیاهی
- عمل کشت استریل
- نگه‌داری نمونه‌های کشت شده در شرایط مطلوب
- انتقال نمونه‌های گیاهی کامل شده به گلدان
- مقاوم‌سازی یا سازگار نمودن گیاهان حاصل با شرایط غیر استریل
- انتقال به مزرعه (باقری و آزادی، ۱۳۸۱).

۲-۶ تهیه ریزنمونه

ریزنمونه یا قلمه قطعه‌ای از گیاه است که در داخل محیط کشت قرار می‌گیرد. عوامل مربوط به گزینش ریزنمونه عبارتند از:

۲-۶-۱ سن ریزنمونه

سن ریزنمونه اهمیت زیادی دارد، به طوریکه هر چه ریزنمونه جوان‌تر باشد برای تکثیر مناسب‌تر است

۲-۶-۲ اندازه ریزنمونه

اندازه ریزنمونه روی پاسخ به کشت بافت مؤثر است. معمولاً کشت ریزنمونه کوچک‌تر، سخت‌تر است. بسته به اینکه ریزنمونه از انتها، وسط یا بالای ساقه انتخاب شود، پتانسیل ریخت‌زایی متفاوتی مشاهده می‌گردد.

۲-۶-۳ کیفیت گیاه

برای تهیه ریزنمونه توصیه می‌شود که از گیاهان سالم در مقایسه با گیاهان تحت تنش غذایی یا آبی و یا گیاهان دارای علائم بیماری استفاده شود.

۲-۶-۴ هدف نهایی کشت

بسته به نوع پاسخ مطلوب از کشت سلول، انتخاب بافت ریزنمونه متفاوت خواهد بود. ریزنمونه معمولاً جوانه انتهایی و جانبی و یا ساقه هوایی می‌باشد. برای القای کالوس‌زایی معمولاً از قطعات کوتیلدون، هیپوکوتیل، ساقه، برگ و یا جنین استفاده می‌شود (پیری و نظریان فیروزآبادی، ۱۳۸۰).

۲-۷ شرایط استریل

به دلیل قرار گرفتن ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی مواد مغذی باید در محیط استریل قرار گیرند. انجام یک کشت استریل شامل مراحل زیر می‌باشد (ربیعی، ۱۳۸۹):

- رشد گیاهان اولیه در شرایطی که میزان آلودگی به حداقل برسد.
- تیمار مواد گیاهی با مواد گندزدا جهت از بین بردن میکرواورگانیسم‌های سطحی
- استریل ابزاری که برای انجام برش و انتقال ریزنمونه مورد استفاده قرار می‌گیرند و هم‌چنین ظروفی که محیط کشت و ریزنمونه‌ها در آنها قرار داده می‌شوند.

بعد از ضدعفونی نمودن، ریزنمونه‌ها باید در محیط مغذی استریل برای شروع کشت بافت قرار داده شوند. جداسازی و انتقال مواد گیاهی از گیاه مادر به محیط کشت باید در اطاق مخصوص یا داخل هود یا اطاقکی که میکرواورگانیسم‌ها را بتوان حذف نمود انجام شود.

۲-۸ ترکیب محیط کشت

رشد، تمایز، نمو و تحولات مورفولوژیکی بافت‌های گیاهی نیازمند تأمین تعدادی از عناصر شیمیایی و برخی پارامترهای فیزیکی است. در محیط زنده گیاه با برقرار نمودن یک ارتباط مستقیم با محیط توسط یک سلسله فعالیت‌های فیزیکی، شیمیایی و ....مواد غذایی را جذب نموده و آنها را برای رشد، نمو و تقسیم سلولی بکار می‌برد. با وجود آنکه نیازهای عمده کشت بافت‌های گیاهی در تمام گیاهان نسبتاً مشابه است، اما در عمل ترکیبات و میزان آنها برای رشد و تمایز بهینه یک بافت در محیط مصنوعی تحت‌تأثیر گونه، جنس و حتی منشأ ریزنمونه قرار می‌گیرد. لذا ترکیبات محیط کشت بافت باید به گونه‌ای فرموله شود، که تمامی احتیاجات ویژه یک سیستم کشت بافت خاص را تأمین کند (پیری و نظریان فیروزآبادی، ۱۳۸۰).

محیط کشت معمولاً از یک محلول حاوی ماکرو و میکروالمنت‌ها که برای رشد کامل گیاه ضروری هستند ساخته شده است. به این محلول ویتامین‌های مختلف و اسیدآمینه‌ها و نیز یک منبع انرژی که معمولا ساکارز است اضافه می‌شود. رشد و نمو گیاهان در محیط کشت به نوع تنظیم‌کننده‌های رشد که به محیط اضافه می‌شوند نیز بستگی دارد.

۲-۹ کشت این ویتروی سیب‌زمینی

سیب‌زمینی از جمله گیاهانی است که بیشتر تکنیک‌های کشت این ویترو در مورد آن انجام شده است. در کشت این ویتروی این گیاه از ریزنمونه‌های غده، شاخه، مریستم، بساک و گرده استفاده شده و در بعضی

موارد هم از پروتوپلاست و مزوفیل برای باززایی استفاده شده است (شریفی و همکاران، ۱۳۸۹). استوارد و کاپلین (۱۹۵۱) با تنظیم غلظت‌های هورمونی، افزایش ۵۰ برابری وزن‌تر بافت‌های کشت شده را طی ۵ هفته گزارش کردند و این اولین گزارش در خصوص کشت بافت سیب‌زمینی بوده است. سپس نوریس در سال ۱۹۵۴ کشت مریستم سیب‌زمینی را انجام داد. از آن به بعد کارهای زیادی به منظور استاندارد کردن شرایط و استفاده از تکنیک کشت مریستم برای تولید گیاهان عاری از ویروس انجام شده است (باقری و آزادی، ۱۳۸۱).

هدف اصلی از بیشتر برنامه‌های تکثیر ایجاد تغییرات ژنتیکی جهت افزایش عملکرد محصولات است. که این در مورد سیب‌زمینی نیز صدق می‌کند. یکی از اهداف تکثیر جنسی، حفظ تغییرات ژنتیکی است و این برای سیب‌زمینی که یک گیاه تتراپلوئید است آسان نیست. کشت بافت یکی از روش‌هایی است که برای این منظور استفاده می‌شود (آرانبی، ۲۰۰۵؛ ال- ساوی و همکاران، ۲۰۰۷). کشت سلول و کالوس یکی ازروش‌های مهم است که در زمان کوتاه این تغییرات ژنتیکی را نشان می‌دهد (ال-ساوی و همکاران، ۲۰۰۷). نجیب و همکاران (۲۰۰۳) اعلام کردند که با استفاده از غده‌های بذری سیب‌زمینی عاری از ویروس تولید محصول حدود ۴۰ درصد افزایش می‌یابد. کشت مریستم به طور موفقیت‌آمیزی در سیب‌زمینی برای ایجاد گیاهان عاری از ویروس به کار گرفته شده است. شاکیا و همکاران (۱۹۹۳) چاندرا و همکاران (۱۹۸۵) در زمینه کشت بافت مریستم سیب‌زمینی و باززایی گیاه از آن تحقیق نمودند و گیاهچه‌های عاری از ویروس باززایی کردند. این محققین با تغییر مقادیر مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت سعی در ایجاد یک محیط کشت مناسب برای باززایی گیاهچه‌ها از طریق کشت بافت مریستم داشته‌اند (چافور و همکاران، ۲۰۰۰). باززایی گیاهان در آزمایشگاه به‌وسیله اندام‌زایی و جنین‌زایی جزء شرایط اولیه می‌باشد. گزارشاتی مبنی‌بر باززایی از برگ، ساقه و غده سیب‌زمینی از چندین ژنوتیپ وجود دارد (کاردی و همکاران، ۱۹۹۳؛ یاداو و استیکلن، ۱۹۹۵). آزمایشاتی در رابطه با اثر غلظت‌های مختلف BAP و NAA در محیط کشت MS (Murashige Skoog) توسط یاسمین و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. آنها از ریزنمونه‌های برگ و میان‌گره‌های سیب‌زمینی استفاده کردند. هم‌چنین هر هورمون را در پنج سطح مورد آزمون قرار دادند. بیشترین درصد کالوس‌زایی حدود ۹۵ درصد بود که در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بدست آمد و هم‌چنین کالوس‌زایی و تولید گیاهچه‌های سیب‌زمینی نیز در کمترین زمان به وقوع پیوست. با توجه به اینکه تکنیک‌های کشت بافت جهت اصلاح ارقام سیب‌زمینی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است، انجام تحقیقات دیگر در زمینه کشت بافت در گیاه سیب‌زمینی ضروری به نظر می‌رسد.

۲-۱۰ کالوس‌زایی

کشت بافت و کشت سلول تکنیکی برای تولید سریع کالوس است (استوارد و کاپلین، ۱۹۵۱). به عنوان اولین قدم در بسیاری از آزمایش‌های کشت بافت، القای کالوس از ریزنمونه اولیه ضروری است. این ریزنمونه ممکن است یک گیاهچه تازه تولید شده، ریشه، ساقه، برگ یا اندام‌های تولیدمثلی ضدعفونی شده باشد. کالوس بافت حاصل از ایجاد زخم در گیاه می‌باشد (باقری و آزادی، ۱۳۸۱). در واقع یک بافت بی‌شکل و بی نظم است. زمانی که سلول‌های گیاهی در یک مسیر نامنظم و غیر سازماندهی شده تکثیر می‌شوند بوجود می‌آیند. این بافت اغلب در قسمت جراحت یافته در یکی از اندام‌های گیاه توسط حشرات، میکرواورگانیسم‌ها و یا حتی در اثر تنش بدست می‌آید. با قرار دادن قطعه‌ای کوچک از یک گیاه در محیط کشت ضدعفونی

حاوی مواد کافی برای رشد و نمو، کالوس را در محیط این ویترو می‌توان تولید نمود. در اثر تحریک تنظیم کننده‌های رشد در درون سلول‌ها و یا تنظیم‌کننده‌های شیمیایی اضافه شده به محیط کشت متابولیسم سلول‌ها که در فاز خاموش بوده‌اند تغییر یافته و شروع به تکثیر فعال می‌کنند. در طی این فرآیند تمایز سلولی و تخصصی شدن که در گیاه کامل در حال انجام بود به یکباره معکوس شده و ریزنمونه‌ها، بافت‌های جدیدی ایجاد می‌کنند که شامل سلول‌های تمایزنیافته و مریستمی هستند.

کشت کالوس معمولاً با انتقال قطعه‌ای از کالوس اولیه به محیط جدید در ظرف جداگانه شروع به تکثیر می‌نماید. فاصله زمانی بین کشت‌های فرعی به شرایط محیطی که نمونه در آن رشد می‌کند بستگی دارد. در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، کشت‌های فرعی معمولا هر ۴ تا ۶ هفته مورد نیاز است.

کشت بافت همچنین براساس نوع ریزنمونه می‌تواند به دسته‌های زیر طبقه‌بندی شود:

- کشت اندام که خود شامل کشت مریستم، کشت ساقه، کشت جنین و کشت ریشه است.
- کشت سلول‌های تمایزنیافته که شامل کشت کالوس و کشت سوسپانسیون می‌باشد.

کالوس تمایز نیافته که از یک ریزنمونه یا از کشت قبلی بدست آمده است دارای سه مرحله نمو می‌باشد:

- القاء تقسیم سلولی
- دوره تقسیم فعال سلولی که در آن سلول‌های تمایز یافته هر گونه ساختار اختصاصی خود را از دست می‌دهند و غیر اختصاصی می‌شوند.
- دوره کاهش و توقف تکثیر سلولی که در آن سلول‌های تکثیر یافته شروع به تمایز می‌نمایند (ربیعی، ۱۳۸۹).

همه سلول‌های یک ریزنمونه در تشکیل کالوس دخالت نمی‌کنند، بعضی از آنها با اندام‌های باززایی شده رقابت می‌کنند. سطح تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی فاکتور مهمی است که تشکیل کالوس در محیط کشت را کنترل می‌کند. غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای هر گونه گیاهی متفاوت است و بستگی به منبع ریزنمونه یا گیاه مشخص دارد شرایط کشت نیز در تشکیل کالوس و نمو آن مهم است. وقتی کالوس تولید شد می‌توان از آن برای طیفی از آزمایش‌های مختلف استفاده نمود. کشت‌های کالوس برای ایزولاسیون پروتوپلاست، گزینش سلولی، جنین‌زایی سوماتیکی، اندام‌زایی و تولید فرآورده‌های ثانویه استفاده می شوند (باقری و آزادی، ۱۳۸۱).

اکثر کارهای اولیه کشت بافت، شامل کشت کالوس توتون، هویج، گل اطلسی و غیره بوده است که همه آنها جزء گیاهان علفی بوده‌اند. روش معمول در این موارد، دستکاری تعادل بین سیتوکنین‌ها و اکسین های بکار رفته بوده است تا اینکه الگوی رشد در جهت تولید نوساقه یا ریشه تنظیم شود. این مسئله منجر به توسعه محیط‌های کشتی شد که عموماً از آنها استفاده می‌شود، اما در کارهای رایج، تکثیر از طریق مریستم های نوساقه، روشی غالب محسوب می‌شود. بیشتر پتانسیل عمده استفاده از کالوس در جایی است که سلولهای کالوس را بتوان از هم جدا نموده و آنها را جهت تمایز به جنین‌های سوماتیکی القاء نمود. از نظر ریخت شناسی این جنین‌ها شبیه به جنین‌های بذری (زیگوتی) می‌باشند، با توجه به اینکه هر میلیمتر کالوس از هزاران سلول تشکیل شده و هر یک از آنها توانایی تشکیل یک جنین را دارند، لذا میزان تولید جنین می تواند بسیار زیاد باشد. نکته جالب در این مورد، تولید بذور مصنوعی می‌باشد که از طریق قرار دادن جنین‌های سوماتیکی در یک پوشش مناسب، تهیه می‌شوند (معینی و کهریزی، ۱۳۸۲).

در بسیاری از موارد ریزنمونه‌ها باید ابتدا تولید کالوس نمایند که پس از آن امکان تولید جنین و نیز ساقه، که اساس باززایی هستند بوجود می‌آیند. داشتن اطلاعات کافی در مرحله اولیه کشت بافت از این جهت که چه ترکیبی از محیط کشت و نیز هورمون‌ها کالوس سبز، ترد و با قابلیت رشد سریع و یا جنین، ریشه و ساقه را تولید می‌کنند بسیار مهم و حیاتی است. در حال حاضر راهی برای برآورد دقیق محیط کشت و نیز پروتکل رشد برای ایجاد یک نوع خاصی از کالوس موجود نمی‌باشد. این ویژگی‌ها باید از طریق یک آزمایش دقیق برای هر گونه خاص گیاهی و نیز برای هر واریته جدید مورد مطالعه و بررسی قرار گیرند. اساس هر آزمایش، محیط‌های کشت و پروتکل‌هایی که در دیگر گونه‌های گیاهی نتایج مطلوبی را داده‌اند می‌باشد (هاریشا، ۲۰۰۷). نتایج خوبی از توانایی القای کالوس با غلظت‌های اپتیمم تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی قسمت‌های مختلف سیب‌زمینی مشاهده شده است. القای کالوس یکی از موارد مهم در تنوع ژنتیکی است. القای کالوس در سیب‌زمینی تحت تأثیر هورمون‌های BAP با غلظت ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۵میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بررسی شد. زمانی که BAP به تنهایی به کار رفت تنها در غلظت‌های ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر کالوس تشکیل شد. در حالیکه در تمام غلظت های 2,4-D کالوس‌زایی صورت گرفت (یاسمین و همکاران، ۲۰۱۱). با توجه به گزارشات فوق برای تشکیل کالوس وجود اکسین الزامی است. یکی از هورمون‌هایی که به وفور برای شروع کالوس‌دهی استفاده می‌شود، هورمون توفوردی است. تلاش بسیاری جهت تعیین غلظت مناسب برای شروع و رشد کالوس در محیط کشت با استفاده از توفوردی به انجام رسیده است (آبیاراتن و همکاران، ۲۰۰۴).

دیوندرا و همکاران (۲۰۱۱) ریزنمونه‌های گیاه اکالیپتوس (*Ecalipta alba L.*) را در محیط کشت MS حاوی ۱۰/۷۵ میکرومولار NAA و ۹/۰۴ میکرومولار 2,4-D کشت کردند. بعد از سه هفته کالوس های سفید مایل به زرد و ترد تشکیل شدند. پس از انتقال کالوس‌ها به محیط باززایی، بعد از چهار هفته کالوس های جنینی تشکیل شدند. کینگ چنج (۱۹۹۲) کالوس‌های جنین‌زا را از کشت نوک ساقه سیب زمینی در محیط کشت MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آورد. خیاط‌زاده و همکاران (۲۰۱۱) تأثیر 2,4-D و Kin را در کالوس‌زایی اسفناج بررسی کردند. آنها برگ‌های دو رقم اسفناج را در محیط کشت حاوی هورمون 2,4-D در سه سطح ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و۲ میلی‌گرم در لیتر Kin کشت کردند. بیشترین درصد کالوس‌زایی در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin حاصل شد. احمد و همکارانش (۲۰۰۲) در تحقیقاتشان بهترین کالوس‌ها را در محیط کشت MS حاوی هورمون BA با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و NAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در قطعه جداکشت گرهک لپه‌ای لوبیا به دست آوردند. بر اساس نتایج حاصله سلول‌های جوانتر پاسخ بهتری به محرک‌های هورمونی می‌دهند. در مورد نحوه عمل اکسین و سیتوکنین در محیط کشت تحقیقاتی صورت گرفته است. تأثیر هورمون سیتوکنین در کشت بافت بسیار قابل توجه است چرا که اغلب همراه با اکسین‌ها جهت تحریک تقسیم سلولی و کنترل مورفوژنی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از سیتوکنین‌هایی که به وفور در کشت بافت استفاده می‌شود کینتین و بنزیل آمینو پورین می‌باشند.

جهت تحقق اهداف اصلاحی تولید کالوس با توانایی تولید جنین‌های سوماتیکی امری ضروری است. فرآیند تولید جنین‌های سوماتیکی اغلب در محیط حاوی اکسین آغاز می‌شود، اما در صورتی‌که غلظت

هورمون در مراحل بعد کاهش نیابد، رشد جنین‌ها متوقف می‌شود. مقدار هورمون مورد استفاده میزان تولید کالوس‌های جنین‌زا را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (ادوین و همکاران، ۲۰۰۸).

۲-۱۱ باززایی

باززایی از طریق کشت بافت یکی ازروش‌های مناسب ومؤثر برای حفظ وتکثیرگیاهان به شمار می‌رود و بهینه‌سازی روش‌های کلی انتقال ژن متناسب با نوع گونه مورد نظر با توجه به پیچیدگی‌های ساختاری گونه های مختلف از دیرباز مورد توجه دانشمندان بوده است (کرمی و همکاران، ۲۰۰۸). باززایی و تولید گیاهچه از کالوس برای سال‌های بسیاری، امر بعیدی بود. مسیرهای متفاوت باززایی در کشت بافت جنبه‌های مختلف بیوتکنولوژی مثل انتقال ژن، ریزازدیادی، انتخاب درون شیشه‌ای و مطالعات نموی را تحت تأثیر خود قرار داده است. تمامی روش‌های مختلف ریخت‌زایی درون شیشه‌ای مشتمل بر ساقه‌زایی مستقیم، جنین‌زایی رویشی مستقیم، ریشه‌زایی مستقیم، ساقه‌زایی غیرمستقیم از طریق کالوس، جنین‌زایی غیرمستقیم (از طریق کالوس)، ریشه‌زایی غیرمستقیم (از طریق کالوس) بدست آمدند (حسین‌زاده و همکاران، ۱۳۸۶). باززایی گیاه از سلول و کشت بافت نه تنها جزء اجزاء ضروری بیوتکنولوژی و عامل بالقوه برای ارقام موجود می‌باشند، بلکه برای تولید گیاهان جدید در زمان کوتاه نیز کاربرد دارند (خادیگه، ۲۰۰۹). کریکورین (۱۹۶۹) بیان می‌کند که سلول‌های گیاهی استریل را با کشت مجدد می‌توان به گیاه کامل تبدیل کرد که این طی نتایج بدست آمده در سلول‌هایی که قابلیت باززایی دارند مشاهده شد.

باززایی از سیب‌زمینی طی سال‌های اخیر پیشرفت قابل توجهی داشته است (احسان‌پور و جونز، ۲۰۰۰؛ فیگرت، ۲۰۰۰). استاندارد کردن پروتوکل باززایی برای واریته‌های مختلف سیب‌زمینی بسیار مهم است، زیرا باززایی گیاهان از کالوس‌هایی که ژنتیک یکسانی دارند و عاری از پاتوژن می‌باشند، موجب تولید تعداد زیادی گیاهچه سالم در مدت زمان خیلی کم می‌شود (شیرین و همکاران، ۲۰۰۷). باززایی از ریزنمونه‌های حاصل از بافت‌های مختلف سیب‌زمینی از جمله برگ (کرلی و بولیارد، ۱۹۹۷؛ گاریکا و مارتینز، ۱۹۹۵)، ساقه (گاریکا و مارتینز، ۱۹۹۵؛ هاکوئه و همکاران، ۱۹۹۶)، غده (مظفری و همکاران، ۱۹۹۷؛ ایسنا و همکاران، ۱۹۹۸) و جنین‌های زیگوتی (پریتوا و ددیکوا، ۱۹۹۲) انجام شده است. وانگ و هانگ (۱۹۷۵) از کالوس‌های حاصل از میان‌گره و نوک ساقه سیب‌زمینی واقع در محیط کشت MS حاوی هورمون ایندول استیک اسید گیاهچه‌های سیب‌زمینی را باززایی کردند. خادیگه (۲۰۰۹) گزارش داد که کالوس‌های تشکیل شده حاصل از میان‌گره سیب‌زمینی، در محیط کشت MS حاوی تیدیازورن بیشترین ساقه‌زایی و در محیط کشت حاوی IBA بیشترین ریشه‌زایی را دارد. پاتراسکو (۱۹۸۱) از محیط کشت MS اصلاح شده حاوی هورمون زآتین به تنهایی توانست برای تولید ساقه از سیب‌زمینی استفاده کند. همچنین الووالیا (۱۹۸۲) برای ساقه‌زایی در سیب‌زمینی، با استفاده از محیط کشت MS ۵۰ درصد حاوی هورمون‌های زآتین (Zeatin) و 2,4-D به ساقه‌های اولیه از کالوس‌های توسعه یافته، دست یافت. لام (۱۹۷۷) از کالوس‌های حاصل از غده های سیب زمینی، باززایی گیاهچه را انجام داد. نسرین و همکاران (۲۰۰۳) و سالتانا (۲۰۰۱) با استفاده از کینتین و نفتالیک استیک اسید در محیط کشت MS برای باززایی از ساقه سیب‌زمینی به نتایج مشابهی دست یافتند. ترکیب کینتین و نفتالیک استیک اسید در محیط کشت MS موجب تحریک و طویل شدن ساقه‌ها در سیر (*Allum sativa L.*) شد (ساه و پارک، ۱۹۸۶). نتایج نشان می‌دهد که باززایی و اندام‌زایی در سیب‌زمینی وابستگی زیادی به ژنوتیپ، نوع بافت، تنظیم‌کننده‌های رشد و شرایط کشت دارد (ترابی،

۲۰۰۸). به طور کلی از تحقیقات دانشمندان چنین بر می‌آید که بهترین غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای القای کالوس در ریزنمونه‌ها و باززایی گیاهچه از کالوس‌ها، برحسب نوع گونه گیاهی، نوع هورمون مورد استفاده شده در محیط کشت، مرحله نموی، سن گیاه مادری و نوع ریزنمونه متفاوت خواهد بود. بنابراین به طور یقین و قطع نمی‌توان استفاده از یک تیمار هورمونی مشخص را برای تمام گیاهان و در تمام عملیات کشت بافت گیاهی پیشنهاد کرد بلکه برای هرگونه گیاهی باید به طور جداگانه بررسی شود (تانگ و همکاران، ۲۰۰۳).

تأثیرات هورمون‌ها، واکشت و نور بر ایجاد و باززایی مسیرهای مختلف ریخت‌زایی درون شیشه‌ای زیره سبز بررسی شد. ساقه‌زایی مستقیم در منطقه مریستمی جنین رخ داد، در حالی که جنین‌زایی رویشی مستقیم بر روی قسمت هیپوکوتیل جنین به وقوع پیوست. اضافه کردن سیتوکنین ۶- بنزیل آمینو پورین به محیط کشت نقش اصلی را در تشکیل کالوس و آغاز مسیرهای باززایی غیرمستقیم بازی می‌کرد. اکسین IAA (Indol-3-acetic acide) نقش اصلی را در جنین زایی رویشی مستقیم به عهده داشت، در حالی که اثرات متقابل IAA و NAA به همراه سطوح بالای سیتوکنین داخلی، تعیین کننده ساقه‌زایی مستقیم بودند (حسین زاده و همکاران، ۱۳۸۶). کرمی و همکاران (۲۰۰۸) وضعیت کالوس‌زایی، ساقه‌زایی و ریشه‌زایی در گیاه لوبیا رقم گلی تحت اثر هورمون‌های BAP و NAA را بررسی کردند. طبق نتایج حاصله بهترین غلظت برای کالوس‌دهی درترکیبی از این دو هورمون، ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP بدست آمد. در فرآیند ساقه‌زایی با افزایش غلظت هورمون BAP درصدساقه‌زایی تا غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر افزایش و بعد از آن کاهش یافت. درفرآیند ریشه‌زایی با افزایش غلظت هورمون NAA ریشه‌زایی افزایش یافت. بعد از مراحل بالا گیاهچه کامل تشکیل و به خاک انتقال یافت. امیری و فهیمی (۱۳۸۲) در بررسی‌های خود بر روی لوبیا نشان دادند، بهترین تیمار هورمونی برای رشد کالوس‌ها در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون 2,4-D و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون Kin در قطعه جداکشت محور زیر لپه لوبیا (*Hypocotil*) می‌باشد. فرآیند ریشه‌زایی در قطعات جداکشت برگ لپه‌ای در تیمار هورمونی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون 2,4-D و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون Kin مشاهده گردید. زامبر و همکارانش (۲۰۰۱) بیشترین درصد تشکیل ساقه لوبیا را از کالوس‌های موجود در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP مشاهده کردند. به منظور بهینه‌سازی ساقه‌زایی عدس، از دو نوع محیط کشت MS و محیط کشت MS تغییریافته، ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل، گره لپه‌ای و جنین سربرداری شده و سطوح مختلف هورمون BAP۱، ۲، ۲/۵، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. نتایج نشان داد که محیط کشت MS تغییر یافته، محیط کشت مناسبی جهت کشت این ویتروی عدس می‌باشد. افزایش BAP سبب افزایش ساقه‌زایی گردید و غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر آن بیشترین ساقه‌زایی را بدنبال داشت. در عین حال افزایش این هورمون از ۲ میلی‌گرم در لیتر به ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش ارتفاع ساقه شد (قاسمی عمران، ۱۳۸۶).

۲-۱۲ نقش هورمون‌های مختلف در باززایی

جهت حصول نتایج مناسب در هر آزمایش کشت بافت می‌بایست شرایط رشد و باززایی برای هر گیاه خاص باتوجه به هدف آزمایش بهینه شود. از جمله مواردی که می‌بایست با دقت مورد بررسی قرار گیرد ترکیب هورمونی مورد استفاده باتوجه به هدف آزمایش می‌باشد. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی کاربردهای

فراوانی در تکنیک‌های کشت بافت گیاهی داشته‌اند. دانشمندان با افزودن این مواد به محیط‌های کشت و تغییر مقادیر آنها سعی در ایجاد شرایط بهتری در محیط کشت برای دست‌یابی سریع و آسان به هدف مورد نظر داشته‌اند. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل اکسین‌ها، سیتوکنین‌ها، جیبرلین‌ها و اتیلن می‌باشند. در بین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی هورمون‌های گروه اکسین نقش بسیار مهمی در کنترل تقسیم و تمایز سلول‌های گیاهی برعهده دارند (مور، ۱۳۸۲).

۲-۱۲-۱ اکسین‌ها

اکسین‌ها در شکل‌زایی و اندام‌زایی گیاه مؤثرند و این رویدادها تحت‌تأثیر دزهای مختلف اکسین صورت می‌گیرند. غلظت‌های ضعیف اکسین در حضور سیتوکنین آغاز رشد جوانه‌ها را امکان پذیر می‌سازند. غلظت های بالاتر، نمو این رشد اولیه را متوقف می‌کند و به حالت رشد کند درمی‌آیند. ترکیبات سنتتیک خالص بسیاری وجود دارند که به علت دارا بودن خواص فیزیولوژیکی مشابه ایندول استیک اسید می‌توان آنها را اکسین نامید. اکسین‌های سنتتیک از لحاظ شیمیایی گوناگون‌اند ولی برای آسانی کار می‌توان آنها را به پنج گروه اصلی تقسیم‌بندی کرد: ایندول اسیدها، نفتالین اسیدها، کلروفنوکسی اسیدها، بنزوئیک اسیدها و مشتقات پیکواسید.

۲-۱۲-۲ سیتوکنین‌ها

سیتوکنین‌ها غالباً برای تحریک رشد و نمو، به کار می‌روند؛ کینتین، BA ،2ip، Zea و PBA استفاده متداول دارند. این هورمون‌ها به ویژه اگر توأم با یک اکسین اضافه شوند، باعث تحریک تقسیم سلولی می‌شوند. در غلظت‌های بالا باعث تشکیل ساقه نابجا می‌شوند، اما معمولاً از تشکیل ریشه ممانعت می‌شود. آنها از طریق کم کردن چیرگی انتهایی باعث تحریک تشکیل ساقه نابجا و عقب‌افتادگی پیری می‌شوند. اثرات فیزیولوژیکی سیتوکنین‌ها شامل: تقسیم سلولی و تشکیل اندام‌ها، بزرگ شدن سلول‌ها و اندام‌ها، ریشه‌زایی و رشد ریشه، نمو جوانه و ساقه و چیرگی رأسی، تأخیر در پیری و تحریک انتقال مواد غذایی و مواد آلی و رشد میوه‌ها می‌باشد.

غلظت مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی در محیط کشت از جمله اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها عامل اصلی در تعیین شروع عمل کشت بافت و هدایت این فرآیند می‌باشند. در بسیاری از موارد ریز نمونه‌ها باید ابتدا تولید کالوس نمایند که پس از آن امکان تولید جنین‌ها و نیز ساقه‌ها که اساس باززایی هستند بوجود می‌آید (فرشادفر و بخشی‌خانیکی، ۱۳۸۲). سطح بالای اکسین و سیتوکینین موجب ریشه‌زایی می‌شود و بالعکس سطح پایین آن موجب ساقه‌زایی و سطح میانه از این هورمون‌ها موجب کالوس‌زایی می‌شود (ایوانس و همکاران، ۱۹۸۱). نتایج بسیار استانداردی از غلظت‌های اپتیمم تنظیم‌کننده‌های رشد برای باززایی سیب زمینی و در طی آن پیشرفت زیادی برای القای کالوس بدست آمده است (الووالیا، ۱۹۸۲؛ دوبرانزکی و همکاران، ۱۹۹۹؛ فیگرت و همکاران، ۲۰۰۰؛ خاتن و همکاران، ۲۰۰۳؛ یاسمین و همکاران، ۲۰۰۳؛ شیرین و همکاران، ۲۰۰۷). رستمی و همکاران (۱۳۸۷) اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D را بر کشت بافت مریستم سیب‌زمینی بررسی کردند. کالوس‌زایی بهینه در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. همچنین بیشترین اندم‌زایی در محیط حاوی ۱/۵میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد. هاکوئه و همکاران (۲۰۰۹) اثر متقابل بین تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D و Kin را بر روی طول و وزن کالوس بررسی کردند. طول و وزن ریزنمونه برگ بهتر از بقیه ریزنمونه‌ها در محیط حاوی ۱میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر