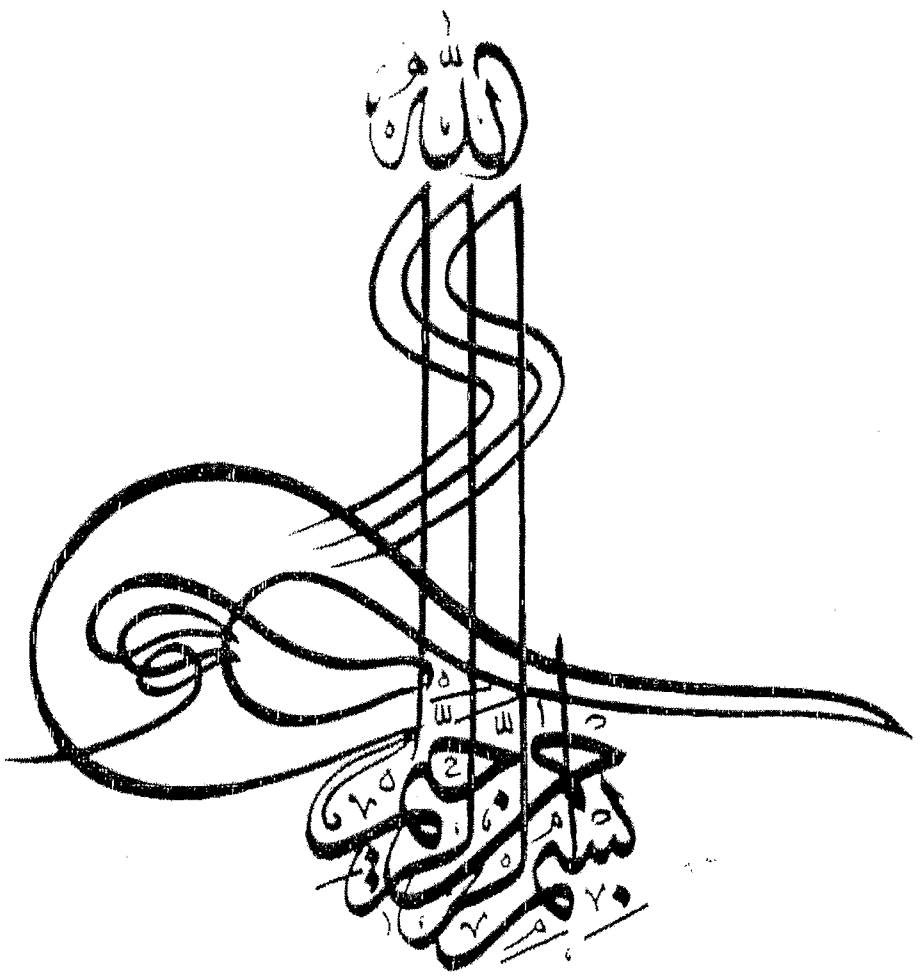

١٢٦٠٢٥

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی
گرایش اصلاح نباتات

عنوان:

مطالعه کشت بافت و بررسی تغییرات سیتوژنتیکی گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) تحت تأثیر کلشی‌سین و تری‌فلورالین

اساتید راهنما:
دکتر غلامعلی رنجبر
دکتر سید کمال کاظمی‌تبار

استاد مشاور:
مهندس مهرناز ریاست

نگارش:
الهام افشاری

۱۳۸۸/۴/۱۶
مرکز اطلاعات مدارک علمی

بهار ۸۸

۱۲۶۰۶۵

سپاسگزاری

سپاس خدای را که یگانه است اما نه به عدد و شمارا خالق است، نه به حرکت و کار؛ آشکار است اما نه که دیده شود و نهان است، نه که دیده شدنی نباشد و سپاس خدای را که خلق خود بر وجود خود راهنماست و تازه‌های خلقتش بر ازلیت وی گواه است.

اینک که در پرتو عنایات حضرت حق مراحل انجام این تحقیق به پایان رسیده، بر خود لازم می‌دانم که از اساتید محترم راهنما، جناب آقای دکتر غلامعلی رنجبر و جناب آقای دکتر سید کمال کاظمی‌تبار که همواره با روی گشاده و سعه صدر مرا پذیرا بوده و با رهنمودهای ارزنده‌شان مشوق و راهنمای من در این راه بوده‌اند، سپاسگذاری کنم.

از استاد مشاور بزرگوارم، سرکار خانم مهندس مهرناز ریاست به پاس کمک‌های بی‌شائبه و دلسوزانه ایشان کمال تشکر را دارم.

از اساتید محترم ناظر، سرکار خانم دکتر چالوی و جناب آقای دکتر حسینی نصر که زحمت داوری پایان‌نامه اینجانب را بر عهده داشتند، سپاسگذارم. همچنین از جناب آقای دکتر پیردشتی به عنوان نماینده تحصیلات تکمیلی متشکرم.

از اساتید برجسته گروه زراعت و اصلاح نباتات جناب آقای دکتر نعمت زاده و آقای دکتر بابائیان تشکر می‌نمایم.

از جناب آقای مهندس کاظمی پشت‌مساری، آقای صفدری و آقای پیغام زاده به خاطر راهنمایی‌های بی‌دریغشان در طی انجام این تحقیق صمیمانه قدردانی می‌کنم.

از همدلی و همراهی دوستان و همکلاسی‌های عزیزم به خصوص خانم مهندس سکینه امیری صمیمانه تشکر می‌کنم.

از هم اتاقی‌های عزیزم، خانمها مهندس شیروانی، مهندس بدراقی، مهندس شاه‌نظری، مهندس سلیمی و مهندس آقایی که در لحظه لحظه زندگی مونس ، یار و قوت قلب من بودند، تشکر می‌کنم.

تقدیم به:

پدر بزرگوارم؛

به وسعت وجودش و صفای حضورش

بوسه بر دستان پر مهرش کمترین سپاس من خواهد بود.

مادر عزیز و مهربانم؛

اطلس عشق، مطلع زیبای زندگی

وجودش مایه فخر است و بوسه قدردانی‌ام بر دستان وی جاریست.

برادر و خواهرانم؛

که موفقیت و خوشبختی آنها آرزوی قلبی من است.

چکیده

گیاه شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum-graecum* L ، گیاهی یکساله و علفی، از خانواده Papilionaceae ، به عنوان یک گیاه دارویی، زراعی و مرتعی حائز اهمیت فراوان می‌باشد. از مهمترین ترکیبات شیمیایی این گیاه، ساپوژنین‌های استروئیدی به ویژه دیوسژنین است که به عنوان هسته اولیه در سنتز استروئید های دارویی از جمله هورمون پروژسترون، هیدروکورتیزون و تستسترون کاربرد فراوان دارد. مطالعه کشت بافت، القاء و بررسی تغییرات سیتوژنتیکی در این گیاه با توجه به خواص دارویی و متابولیت‌های ثانویه فراوان آن، به هدف مطالعات گسترده‌تر آتی در بخش انتقال ژن و ارزیابی میزان تغییرات متابولیت‌های این گیاه در بخش داروسازی انجام گرفت. در مطالعه کشت بافت این گیاه، از دو محیط کشت پایه MS و B5 ، چهار ریزنمونه ساقه، برگچه حاوی دمبرگ، جنین و هیپوکوتیل و ۵ نوع هورمون شامل ، 2,4-D (در سه سطح) ، Kin (در چهار سطح) ، NAA (در چهار سطح) ، BAP (در چهار سطح) و IBA (در سه سطح) استفاده شد . نتایج حاکی از آن است که ، در بررسی اثر متقابل دو هورمون 2,4-D و Kin ، محیط حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر Kin ، بهترین ترکیب هورمونی جهت القاء کالوس در هر دو محیط کشت B5 و MS است. در بین ریزنمونه‌ها ، ساقه بالاترین سرعت کالوس‌زایی را دارد . پس از بررسی تأثیر انواع قند بر وزن تر کالوس و انجام مقایسه میانگین بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن، مشاهده شد که در هر دو محیط MS و B5، قند ساکاروز، گلوکز و گالاکتوز با بیشترین تأثیر بر میانگین وزن تر کالوس، در یک گروه و مالتوز و فروکتوز در گروه دیگر قرار گرفتند . همچنین مشاهده شد که غلظت بسیار بالای ساکاروز تأثیر منفی در تشکیل و افزایش وزن کالوس دارد. در مطالعه جنین‌زایی سوماتیکی، ترکیب هورمونی شامل ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP ، با بالاترین درصد جنین‌زایی، به عنوان ترکیب برتر در هر دو محیط کشت شناخته شد. از بین ریزنمونه‌ها، ریزنمونه جنین، بیشترین میزان جنین‌زایی را نشان داد. باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی و تنها در ریزنمونه جنین مشاهده شد. ترکیب هورمونی شامل ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، بهترین ترکیب هورمونی جهت القاء اندام هوایی در هر دو محیط کشت بود. مناسب‌ترین ترکیب هورمونی جهت القاء ریشه در محیط کشت MS، محیط حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون IBA بود. همچنین نتایج مربوط به مطالعه تغییرات سیتوژنتیکی این گیاه نشان داد که جهت القاء پلی‌پلوئیدی، تیمار تری‌فلورالین نسبت به کلشی‌سین مناسب‌تر است. بالاترین درصد القای پلی‌پلوئیدی، به دنبال غوطه‌وری گیاهچه‌ها در غلظت ۲۲/۵ میکرومولار تری‌فلورالین در مدت زمان ۲۴ ساعت و غلظت ۰/۵ گرم درلیتر کلشی‌سین در مدت زمان ۱۲ ساعت بدست آمد. بین نمونه‌های تیمار شده و شاهد در کلیه ویژگیهای کاریوتیپی مورد مطالعه، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت.

کلمات کلیدی:

شنبلیله ، کشت بافت ، جنین‌زایی سوماتیکی، تغییرات سیتوژنتیکی، کلشی‌سین و تری‌فلورالین

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول- مقدمه و کلیات	۱
۱- مقدمه و کلیات	۲
۱-۱- اهمیت مطالعات کشت بافت	۲
۱-۲- اهمیت مطالعات سیتوژنتیکی	۳
۱-۳- القاء پلی‌پلوئیدی و اصلاح گیاهان دارویی	۴
۱-۴- اهداف پژوهش	۵
۱-۵- گیاه شناسی *Trigonella foenum-graecum*	۶
۱-۶- اهمیت گیاه *Trigonella foenum-graecum*	۷
۱-۶-۱- ترکیب شیمیایی برگ	۷
۱-۶-۲- ترکیب شیمیایی دانه	۷
۱-۶-۳- اهمیت دارویی شنبلیله	۹
۱-۶-۴- اهمیت شنبلیله از نظر مرتعی	۱۰
۱-۶-۵- سایر مصارف گیاه شنبلیله	۱۰
۱-۷- انتشار جغرافیایی در جهان	۱۰
۱-۸- رویشگاه‌های طبیعی گیاه در ایران	۱۱
۱-۹- کشت بافت گیاهی چیست؟	۱۱
۱-۱۰- کاربردهای کشت بافت	۱۱
۱-۱۱- کالوس	۱۲
۱-۱۲- منشأ کالوس	۱۲
۱-۱۳- انواع کالوس	۱۲
۱-۱۴- نقش کالوس در جنین‌زایی، اندام زایی و کشت سلول	۱۳
۱-۱۵- باززایی و ریزازدیادی گیاهان	۱۳
۱-۱۵ -۱- باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی	۱۴
۱- ۱۵-۲- کنترل جنین‌زایی	۱۴
۱- ۱۵-۳- باززایی از طریق اندام‌زایی	۱۵
۱-۱۶- آماده سازی و ترکیب محیط کشت	۱۵
۱-۱۶-۱-آب	۱۶
۱-۱۶-۲-آگار	۱۶
۱-۱۶-۳- قند	۱۶
۱-۱۶-۴-مواد مغذی غیرآلی	۱۷
۱-۱۶-۵- مکمل‌های آلی ترکیبی	۱۷
۱-۱۶-۶- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی	۱۷
۱-۱۶-۷- pH محیط کشت	۱۷

۱-۱۷- عوامل فیزیکی ۱۸
۱-۱۷-۱- نور ۱۸
۱-۱۷-۲- درجه حرارت ۱۸
۱-۱۷-۳- اکسیژن ۱۸
۱-۱۷-۴- ریزنمونه ۱۸
۱-۱۷-۵- عوامل فهوه‌ای کننده بافت‌ها ۱۹
۱-۱۸-کاریوتیپ و کروموزوم ۱۹
۱- ۱۹- کلشی‌سین ۲۰
۱-۲۰- تری‌فلورالین ۲۰
فصل دوم- بررسی منابع ۲۲
۲- بررسی منابع ۲۳
۲-۱- کشت بافت در جنس شنبلیله ۲۳
۲-۲- کشت بافت درگونه *T. foenum-graecum* ۲۳
۲-۳- مطالعه کشت بافت در سایرلگوم‌ها ۲۶
۲-۳- ۱- لگوم مرتعی ۲۶
۲-۳-۲- یونجه ۲۶
۲-۳-۳- شبدر ۳۶
۲-۳-۴- لوبیا ۲۸
۲-۳- ۵- نخود ۲۸
۲-۳-۶- عدس ۳۰
۲-۴- مطالعه کشت بافت در سایر گیاهان دارویی ۳۰
۲- ۵- آنالیز کاریوتیپ ۳۳
۲-۶- بررسی‌های سیتوژنتیکی در جنس شنبلیله ۳۳
۲-۷- بررسی‌های سیتوژنتیکی در گونه *T. foenum-graecum* ۳۵
۲-۸- استفاده از کلشی‌سین و تری‌فلورالین در مطالعات سیتوژنتیکی جنس شنبلیله ۳۵
۲-۹- استفاده از کلشی‌سین و تری‌فلورالین درمطالعات سیتوژنتیکی گونه *T. foenum-graecum* ۳۵
۲-۱۰- استفاده از کلشی‌سین و تری‌فلورالین درمطالعات سیتوژنتیکی سایر گیاهان ۳۶
فصل سوم- مواد و روش‌ها ۳۸
۳- مواد و روش ها ۳۹
۳-۱- کشت بافت گیاه دارویی شنبلیله ۳۹
۳- ۱- ۱- زمان و مکان اجرای طرح ۳۹
۳-۱-۲- تهیه بذر ۳۹
۳-۱-۳- ریزنمونه‌های مورد استفاده وتهیه آنها ۳۹
۳-۱-۴- شرایط اتاقک کشت و ضدعفونی آن ۳۹
۳-۱- ۵- ضدعفونی ریزنمونه‌ها ۴۰
۳-۱-۶- ضدعفونی وسایل آزمایشگاهی و محیط کشت ۴۰

۳-۱-۷- نحوه واکشت ۴۰
۳-۱- ۸- محیط کشت‌های مورد استفاده ۴۱
۳-۱- ۹- محلول‌های ذخیره ۴۳
۳-۱- ۱۰- محلول ذخیره عناصر ماکرو ۴۳
۳-۱- ۱۱- محلول ذخیره عناصر میکرو ۴۳
۳-۱-۱۲- محلول ذخیره آهن- سدیم ۴۳
۳-۱-۱۳- محلول ذخیره ویتامین ها ۴۴
۳-۱-۱۴- میواینوزیتول ۴۴
۳-۱- ۱۵- هورمون‌های مورد استفاده ۴۵
۳-۱-۱۶- محلول ذخیره هورمون‌ها ۴۵
۳-۱-۱۷- تهیه یک لیتر محیط کشت MS ۴۶
۳-۱- ۱۸- بهینه سازی کالوس‌زایی ۴۶
۳-۱- ۱۸-۱- سرعت کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها ۴۷
۳-۱- ۱۸-۲- اثر قندهای متفاوت بر وزن تر کالوس ۴۷
۳-۱-۱۸ -۳- تأثیر غلظت‌های متفاوت ساکاروز بر وزن تر کالوس ۴۷
۳-۱-۱۹- بهینه سازی جنین‌زایی سوماتیکی ۴۷
۳-۱-۲۰- القاء اندام هوایی ۴۸
۳-۱-۲۱- القاء ریشه‌زایی ۴۸
۳-۱-۲۲- سازگاری گیاهچه‌های باززا شده ۴۸
۳-۱-۲۳- تجزیه و تحلیل‌های آماری ۴۹
۳-۲- تغییرات سیتوژنتیکی گیاه دارویی شنبلیله تحت تأثیر کلشی‌سین و تری‌فلورالین ۵۰
۳-۲- ۱- جوانه‌دار کردن بذرها ۵۰
۳-۲-۲- تیمار کردن گیاهچه‌ها ۵۰
۳-۲- ۳-آزمایش‌های سیتوژنتیک ۵۰
۳-۲-۴- القاء پیش تیمار شیمیایی ۵۰
۳-۲-۵- عمل تثبیت ۵۱
۳-۲-۶- نگهداری ۵۱
۳-۲-۷- هیدرولیز ۵۱
۳-۲-۸- رنگ‌آمیزی ۵۲
۳-۲-۹- تهیه لام میکروسکوپی ۵۲
۳-۲- ۱۰- عکس‌برداری و اندازه‌گیری کروموزوم‌ها ۵۳
۳-۲- ۱۱- پارامترهای کروموزومی ۵۴
۳-۲-۱۲- تعیین فرمول کاریوتیپی گونه‌ها ۵۵

۳-۲-۱۳- تهیه محلول‌های مورد نیاز ۵۶
۳-۲-۱۳-۱- محلول کلشی‌سین ۵۶
۳-۲-۱۳-۲- محلول تری‌فلورالین ۵۶
۳-۲-۱۳-۳- محلول α - برومونفتالین ۵۶
۳-۲-۱۳-۴- لویتسکی ۵۶
۳-۲-۱۳-۵- محلول NaOH ۱ نرمال ۵۷
۳-۲-۱۳-۶- هماتوکسیلین ۵۷
۳-۲-۱۴- تجزیه و تحلیل داده‌ها ۵۷
فصل چهارم- نتایج و بحث ۵۸
۴- نتایج و بحث ۵۹
۴-۱- کشت بافت گیاه دارویی شنبلیله ۵۹
۴-۱-۱- بررسی میزان آلودگی ریزنمونه‌ها پس از ضدعفونی ۵۹
۴-۱-۲- بررسی سرعت کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها ۶۰
۴-۱-۳- کالوس‌زایی ۶۱
۴-۱-۴- بررسی تأثیر انواع قند بر وزن تر کالوس ۶۶
۴-۱- ۵- بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت ساکاروز بر وزن تر کالوس ۶۷
۴-۱-۶- جنین‌زایی سوماتیکی ۶۹
۴- ۱-۷- باززایی و تولید اندام هوایی در محیط کشت MS ۷۵
۴-۱- ۸- باززایی و تولید اندام هوایی در محیط کشت B5 ۸۰
۴-۱-۹- تولید ریشه ۸۲
۴-۱-۱۰- سازگاری ۸۵
۴-۲- تغییرات سیتوژنتیکی گیاه دارویی شنبلیله، تحت تأثیر دو تیمار کلشی‌سین و تری‌فلورالین ۸۸
۴-۲-۱- نتایج حاصل از تیمار با کلشی‌سین ۸۸
۴-۲-۲- نتایج حاصل از تیمار با تری‌فلورالین ۹۰
۴-۲-۳- مقایسه اثر پلی‌پلوئیدکنندگی کلشی‌سین با تری‌فلورالین ۹۲
۴-۲-۴- نتایج حاصل از تجزیه کاریوتیپ شاهد ۹۵
۴-۲- ۵- نتایج کاریوتیپ دیپلوئید حاصل از تیمار با کلشی‌سین ۹۶
۴-۲-۶- نتایج کاریوتیپ تتراپلوئید حاصل از تیمار با کلشی‌سین ۹۸
۴-۲-۷- نتایج کاریوتیپ دیپلوئید حاصل از تیمار با تری‌فلورالین ۹۹
۴-۲-۸- نتایج کاریوتیپ تتراپلوئید حاصل از تیمار با تری‌فلورالین ۱۰۰
۴-۲-۹- مقایسه کاریوتیپ ژنوتیپ ها در گونه مورد مطالعه ۱۰۲
۴-۲-۱۰- تجزیه آماری داده ها ۱۰۳
۴-۲-۱۰-۱- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات کاریوتیپی در ژنوتیپ شاهد و ژنوتیپ‌های حاصل از تیمار با کلشی‌سین ۱۰۳
۴-۲-۱۰-۲- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات کاریوتیپی در ژنوتیپ شاهد و ژنوتیپ‌های حاصل از تیمار با تری‌فلورالین ۱۰۴

۴-۲- ۱۱- نتیجه‌گیری کلی ۱۰۷
۴-۲-۱۲- پیشنهادات ۱۰۸
منابع ۱۱۰

فهرست جدول‌ها

عنوان	صفحه
جدول ۲-۱- عدد کروموزومی چند گونه شنبلیله	۳۴
جدول ۲-۲- عدد کروموزومی چند گونه شنبلیله	۳۴
جدول ۳-۱- ترکیبات محیط کشت پایه MS	۴۱
جدول ۳-۲- ترکیبات محیط کشت پایه B5	۴۲
جدول ۳-۳- طرز تهیه محلول ذخیره و نگهداری هورمون‌های مختلف	۴۵
جدول۳- ۴- دسته‌بندی کروموزوم‌های هر کاریوتایپ بر اساس روش لوان و همکاران (۱۹۶۴)	۵۵
جدول۴-۱- تجزیه واریانس میزان آلودگی ریزنمونه‌ها	۵۹
جدول۴-۲- مقایسه میانگین درصد آلودگی ریزنمونه‌ها	۶۰
جدول۴-۳- تجزیه واریانس تعیین سرعت کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها	۶۰
جدول۴-۴- مقایسه میانگین اثرات ساده ریزنمونه بر میانگین سرعت کالوس‌زایی	۶۱
جدول۴- ۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط کشت در ریزنمونه بر میانگین سرعت کالوس‌زایی	۶۲
جدول۴-۶- تجزیه واریانس صفت وزن تر کالوس در محیط‌های MS و B5	۶۲
جدول ۴-۷- مقایسه میانگین اثرات ساده هورمون‌های توفوردی و کینتین بر میانگین وزن تر کالوس	۶۲
جدول۴-۸- مقایسه میانگین اثرساده ریزنمونه‌ها بر میانگین وزن تر کالوس	۶۳
جدول ۴-۹- تجزیه واریانس وزن تر کالوس تحت تأثیر منابع متفاوت قندی در محیط کشت MS و B5	۶۶
جدول۴-۱۰- مقایسه میانگین اثر قندهای متفاوت بر میانگین وزن تر کالوس در دو محیط MS و B5	۶۷
جدول۴-۱۲- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های متفاوت ساکاروز بر وزن تر کالوس در دو محیط MS و B5	۶۸
جدول۴-۱۱- تجزیه واریانس وزن تر کالوس تحت تأثیر غلظت‌های متفاوت ساکاروز در محیط کشت MS و B5	۶۸
جدول۴-۱۳- تجزیه واریانس صفت جنین‌زایی سوماتیکی در دو محیط MS و B5	۷۰
جدول۴-۱۵ – مقایسه میانگین اثرساده ریزنمونه بر درصد جنین‌زایی سوماتیکی	۷۱
جدول۴-۱۴- مقایسه میانگین اثرات ساده هورمون‌های NAA و BAP بر درصد جنین‌زایی سوماتیکی	۷۱
جدول۴-۱۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل NAA و BAP و ریزنمونه بر درصد جنین‌زایی سوماتیکی در محیط MS	۷۴
جدول۴-۱۷- مقایسه میانگین اثرات متقابل NAA و BAP و ریزنمونه بر درصد جنین‌زایی سوماتیکی در محیط B5	۷۵
جدول۴-۱۸-تجزیه واریانس صفت باززایی اندام هوایی در محیط MS	۷۶
جدول۴-۱۹- مقایسه میانگین اثر ساده ریزنمونه بر درصد باززایی اندام هوایی در محیط MS	۷۷
جدول۴-۲۰- مقایسه میانگین اثرات ساده NAA وBAP بر درصد باززایی اندام هوایی در محیط MS	۷۷

جدول۴ -۲۱- مقایسه میانگین اثرات متقابل NAA و BAP و ریزنمونه بر درصد باززایی اندام هوایی در محیط MS ۸۰
جدول۴-۲۲- تجزیه واریانس صفت باززایی اندام هوایی در محیطB5 ۸۱
جدول۴-۲۳- مقایسه میانگین اثر ساده NAA و BAP بر درصد باززایی اندام هوایی در محیط B5 ۸۱
جدول۴-۲۴-تجزیه واریانس صفت باززایی ریشه در محیط MS ۸۳
جدول۴- ۲۵- مقایسه میانگین اثر ساده IBA و BAP در درصد باززایی ریشه در محیط MS ۸۳
جدول۴-۲۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل IBA و BAP بر باززایی ریشه در محیط MS ۸۴
جدول۴-۲۷- تجزیه واریانس القاء پلی‌پلوئیدی پس از تیمار با کلشی‌سین ۸۹
جدول۴-۲۸- مقایسه میانگین اثرات ساده غلظت و زمان تیمار با کلشی‌سین بر میانگین درصد القاء پلی-پلوئیدی ۸۹
جدول۴-۲۹- تجزیه واریانس القاء پلی‌پلوئیدی پس از تیمار با تری‌فلورالین ۹۰
جدول۴-۳۰- مقایسه میانگین اثرات ساده غلظت و زمان تیمار با تری‌فلورالین بر میانگین درصد القاء پلی-پلوئیدی ۹۱
جدول۴- ۳۱ -پارامترهای سیتوژنتیکی محاسبه شده در کاریوتیپ شاهد ۹۶
جدول۴-۳۲-پارامترهای سیتوژنتیکی محاسبه شده در ژنوتیپ دیپلوئید حاصل ازکلشی‌سین ۹۷
جدول۴- ۳۳-پارامترهای سیتوژنتیکی محاسبه شده درکاریوتیپ تتراپلوئید حاصل ازکلشی‌سین ۹۸
جدول۴-۳۴-پارامترهای سیتوژنتیکی محاسبه شده در کاریوتیپ دیپلوئید حاصل از تیمار با تری‌فلورالین ۹۹
جدول۴- ۳۵ - پارامترهای سیتوژنتیکی محاسبه شده در کاریوتیپ تتراپلوئید حاصل از تیمار با تری-فلورالین ۱۰۱
جدول۴-۳۶ - ویژگی های کاریوتیپی ژنوتیپ شاهد و ژنوتیپ‌های دیپلوئید و تتراپلوئید حاصل از تیمار با کلشی‌سین و تری‌فلورالین ۱۰۲
جدول ۴-۳۷-تجزیه واریانس صفات کاریوتیپی در ژنوتیپ شاهد و ژنوتیپ‌های حاصل از تیمار با کلشی-سین ۱۰۴
جدول۴-۳۸- مقایسه میانگین ویژگیهای کاریوتیپی در ژنوتیپ شاهد و ژنوتیپ‌های حاصل از تیمار با کلشی‌سین ۱۰۴
جدول۴-۳۹- تجزیه واریانس صفات کاریوتیپی در ژنوتیپ شاهد و ژنوتیپ‌های حاصل از تیمار با تری-فلورالین ۱۰۵
جدول ۴-۴۰ - مقایسه میانگین ویژگیهای کاریوتیپی در ژنوتیپ شاهد و ژنوتیپ‌های حاصل از تیمار با تری‌فلورالین ۱۰۵

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار۴-۱- اثر متقابل هورمون توفوردی و کینتین بر وزن تر کالوس ۶۳
نمودار۴-۲- اثر متقابل هورمون توفوردی و ریزنمونه بر وزن تر کالوس ۶۴
نمودار۴-۳- اثر متقابل هورمون کینتین و ریزنمونه بر وزن تر کالوس ۶۵
نمودار۴-۴- اثر متقابل هورمون توفوردی و کینتین و ریزنمونه در محیط MS بر وزن تر کالوس ۶۵
نمودار۴-۵- اثر متقابل هورمون توفوردی و کینتین و ریزنمونه در محیط B5 بر وزن تر کالوس ۶۶
نمودار۴-۶- تأثیر انواع قند بر وزن ترکالوس(gr) ۶۷
نمودار۴-۷- تأثیر غلظت‌های متفاوت ساکاروز بر وزن تر کالوس(gr) ۶۹
نمودار۴-۸- اثر متقابل هورمون‌های NAA و BAP بر درصد جنین‌زایی سوماتیکی در دو محیط MS و B5 ۷۳
نمودار۴-۹- اثر متقابل هورمون NAA و ریزنمونه بر درصد جنین‌زایی سوماتیکی در دو محیط MS و B5. ۷۳
نمودار۴-۱۰- اثر متقابل هورمون BAP و ریزنمونه بر درصد جنین‌زایی سوماتیکی در دو محیط MS و B5. ۷۳
نمودار۴- ۱۱- اثر متقابل هورمون‌های NAA و BAP بر درصد باززایی اندام هوایی در محیط MS ۷۸
نمودار۴-۱۲- اثر متقابل هورمون NAA و ریزنمونه بر درصد باززایی اندام هوایی در محیط MS ۷۸
نمودار۴-۱۳- اثر متقابل هورمون BAP و ریزنمونه بر درصد باززایی اندام هوایی در محیط MS ۷۹
نمودار۴-۱۴- اثر متقابل هورمون‌های NAA و BAP بر درصد باززایی اندام هوایی در محیط B5. ۸۲
نمودار۴-۱۵- اثر سطوح متفاوت هورمون ایندول بوتیریک اسید بر درصد باززایی ریشه در محیط MS ۸۳
نمودار۴-۱۶- اثر سطوح متفاوت هورمون بنزیل آمینو پورین بر درصد باززایی ریشه در محیط MS ۸۴
نمودار۴-۱۷- اثر متقابل هورمون ایندول بوتیریک اسید و بنزیل آمینو پورین بر درصد باززایی ریشه در محیط MS ۸۵
نمودار۴- ۱۸- اثر متقابل غلظت و زمان تیمار با کلشی‌سین بر میانگین درصد القاء پلی‌پلوئیدی ۹۰
نمودار۴-۱۹- اثر متقابل غلظت و زمان تیمار باتری‌فلورالین بر میانگین درصد القاء پلی‌پلوئیدی ۹۲
نمودار ۴-۲۰- ایدیوگرام کاریوتیپ شاهد ۹۶
نمودار۴-۲۱ ـ ایدیوگرام کاریوتیپ دیپلوئید حاصل از تیمار با کلشی‌سین ۹۷
نمودار۴-۲۲ـ ایدیوگرام کاریوتیپ تتراپلوئید حاصل از تیمار با کلشی‌سین ۹۹
نمودار۴-۲۳ ـ ایدیوگرام کاریوتیپ دیپلوئید حاصل از تیمار با تری‌فلورالین ۱۰۰
نمودار۴-۲۴ ـ ایدیوگرام کاریوتیپ تتراپلوئید حاصل از تیمار با تری‌فلورالین ۱۰۱

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل۱-۱- گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*)	۶
شکل ۱-۲- ساختار حلقوی کلشی‌سین	۲۰
شکل ۱-۳- ساختار حلقوی تری‌فلورالین	۲۱
شکل ۳-۱- سازگاری گیاهچه باززاشده	۴۹
شکل ۳-۲- میکروسکوپ olympus متصل به سیستم	۵۳
شکل ۴-۱- تصاویر القای کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی گیاه *Trigonella foenum-graecum*	۸۶
شکل ۴-۲- تصاویر باززایی اندام هوایی ، ریشه‌زایی و سازگاری گیاه *Trigonella foenum-graecum*	۸۷
شکل۴-۳- تصاویر کروموزومی از مرحله متافاز میتوز نمونه‌های شاهد	۸۸
شکل۴-۴- تصاویر کروموزومی از مرحله متافاز میتوز نمونه‌های تیمار شده	۹۳
شکل ۴- ۵- تصویر کاریوتیپ مرتب شده ژنوتیپ‌های حاصل از تیمار با کلشی‌سین	۹۴
شکل ۴-۶- تصویر کاریوتیپ مرتب شده ژنوتیپ‌های حاصل از تیمار با تری‌فلورالین	۹۴
شکل۴- ۷- نمونه‌ای از کاریوتیپ اندازه‌گیری شده با نرم افزار میکرومیژر	۹۵

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱- مقدمه و کلیات

۱-۱- اهمیت مطالعات کشت بافت

امروزه رشد سریع جمعیت اهمیت به‌کارگیری علوم و فنون جدید را دو چندان کرده است. از یک طرف، تقاضا برای افزایش کمی محصولات کشاورزی، اصلاح گیاهان و بهبود شرایط غذایی و از سوی دیگر دستیابی به منابع جدید تولید مواد زیستی اعم از ترکیبات دارویی و صنعتی باعث توجه خاص به روش‌های کشت بافت و سلول گیاهی شده است. تکنیک کشت بافت و سلول گیاهی از جمله فنون بیوتکنولوژی است که کاربرد آن به اوایل سالهای ۱۹۷۰ می‌رسد. بر اساس این روش، سلول یا بافت گیاهی از اندام‌هایی مثل ریشه، ساقه، برگ، گل آذین یا هر اندام دیگری از گیاه جدا شده و در شرایط کاملا استریل در درون ظروف حاوی محیط غذایی مصنوعی قرار گرفته و با تأمین نیازهای محیطی مناسب به گیاه کامل تبدیل می‌گردد. با علم به این موضوع که هر یک از سلول‌های گیاهی تمایز نیافته توانایی تبدیل شدن به گیاه کامل را دارند (توتی پوتنسی)[1]، 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 این تکنیک به عنوان مکمل روش‌های مرسوم در این راستا نوید بخش بوده است (فروتن و وادیدار، ۱۳۸۵).

در سال‌های اخیر، توسعه روش‌های نوین از جمله کشت بافت گیاهی، پیشرفت‌های زیادی را در زمینه کشاورزی به وجود آورده است (باقری و آزادی،۱۳۸۱). عمده‌ترین موارد استعمال کشت بافت گیاهی در کشاورزی شامل، اصلاح نژاد گیاهان از طریق تولید گیاهان هاپلوئید، ازدیاد غیرجنسی گیاهان از طریق کلون، امکان انجام تلاقی‌های بین جنسی از طریق دورگ‌گیری سوماتیکی و امتزاج پروتوپلاست‌های گونه‌های مختلف برای تلاقی گونه‌های ناسازگار جنسی و تولید گیاهان هیبرید ، تولید گیاهان عاری از عوامل بیماریزا و ویروس از طریق کشت مریستم انتهایی، تولید متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات شیمیایی- دارویی، مهندسی ژنتیک و حفظ و نگهداری ذخایر توارثی و بافت‌های کشت شده گیاهی تحت شرایط انجماد و ایجاد بانک ژن می‌گردد (نوری،۱۳۷۱). همچنین، با تزریق مواد موتاسیون‌زا به کشت‌های گیاهی و انتخاب سلول‌های جهش‌یافته مطلوب بعضی از دانشمندان موفق شده‌اند گیاهان جهش‌یافته مقاوم به بعضی از بیماریها و شرایط استرس ایجاد نمایند. در اصلاح نباتات با استفاده از روش کشت بافت و تولید کالوس یا گیاهچه در مقیاس وسیع و انجام گزینش در بین نمونه‌ها می‌توان نسبت به تولید ارقام مقاوم به استرس‌های محیطی اقدام نمود (رفیعی،۱۳۸۳).

1- Totipotency

از کاربردهای صنعتی کشت بافت گیاهی، ایجاد کشت‌های سوسپانسیونی پرحجم است که قادر به تولید تعدادی از متابولیت‌های اولیه و ثانویه ارزشمند هستند که این متابولیت‌ها عبارتند از آنتی-بیوتیک‌ها، ترکیبات آلکالوئیدی ضد سرطان، گلیکوزیدها (استروئیدها و فنولیک‌ها)، ترپنوئیدها، انواع مختلف طعم‌ها، عطرها، موادشیمیایی کشاورزی، حشره‌کش‌های تجارتی و غیره (فارسی و ذوالعلی،۱۳۸۲). نمونه‌هایی از فرآورده‌های دارویی تولید شده در مقیاس صنعتی با استفاده از کشت سلولی عبارتند از شیکونین، ژینسنوزاید و پاکلیتاکسل. در دهه ۱۹۸۰ با تغییر آگاهانه و اختصاصی در خصوصیات گیاهان از طریق مهندسی ژنتیک، کشت بافت گیاهی به عنوان ابزاری ضروری جهت دستورزی ژنتیکی گیاهان جایگاه خاصی پیدا کرد . به عبارت دیگر کشت بافت گیاهی بخش جدایی ناپذیر فناوری تراریختی گیاهان است که با استفاده از آن تولید گیاهان تراریخته با انتقال DNA از منابع مختلف، امکان‌پذیر می‌شود (فروتن و وادیدار، ۱۳۸۵).

۱-۲- اهمیت مطالعات سیتوژنتیکی

دیر زمانی است که از مطالعات کروموزومی و مقایسهٔ ویژگی‌های کاریوتیپ گونه‌ها، جهت درک بهتر روابط بین گونه‌ها و فرآیندهایی که موجب تغییرات تکاملی شده است، استفاده می‌گردد. بدیهی است گونه‌هایی که از لحاظ پارامترهای سیتوژنتیکی و خواص کروموزومی به هم شبیه هستند در بحث روابط بین گونه‌ای قرابت بیشتری داشته و در صورت وجود صفات مطلوب در این گونه‌ها، امکان تلاقی بین گونه‌ای، برای تجمع ژنهای مطلوب در یک گیاه، وجود خواهد داشت (میرزایی ندوشن و همکاران، ۱۳۷۹).

به طور کلی سیتوژنتیک عبارت از مطالعه رفتار ماده ژنتیکی در تقسیم‌های میتوزی و میوزی و نحوه انتقال آن در سطح سلول است. یکی از عامل های مهم در مطالعه سیتوژنتیکی، نوع سلول مورد بررسی است. برای تحقیقات سیتوژنتیکی، سلول‌هایی که تقسیمات فعالی دارند و کروموزوم‌ها را به طور مشخص می‌توان در آنها دید مناسب هستند. این سلول‌ها همان سلول‌های مریستمی و تمایز نیافته می‌باشند. عامل دیگر، مرحله‌ای از تقسیم میتوز است که سلول‌ها در آن قرار گرفته‌اند، بخش عمده چرخه سلولی، مرحله اینترفاز است. هسته اینترفازی ظاهری شبیه به هسته سلول‌های تمایز یافته (غیر مریستمی) دارد و برای اکثر تحقیقات سیتوژنتیکی مناسب نمی‌باشد. بنابراین تنها در مدت زمان کوتاهی از تقسیم سلولی(مرحله متافاز) که کروموزوم‌ها دیده می‌شوند، انجام این مطالعات امکان پذیراست (مجد و شریعت زاده، ۱۳۷۷).

بررسی رفتار کروموزوم‌ها در تقسیم میتوز و میوز نقش مهمی در توضیح ساختار ژنومی و تاکسونومی در گونه‌ها داشته و با وجود پیشرفت‌های قابل ملاحظه در این زمینه هنوز ساختار ژنومی تعداد زیادی از گونه‌ها و حتی جنس‌ها ناشناخته مانده است. بطور کلی تحقیقات سیتوتاکسونومی،

علاوه بر مشخص کردن ارتباط و قرابت بین گونه‌ها می‌تواند اطلاعات با ارزشی را در رابطه با خزانه ژنی موجود در کشور فراهم آورد (رفیعی،۱۳۸۳).

با توجه به اینکه خصوصیات گیاهی تا حدود زیادی تحت کنترل مواد ژنتیکی هسته‌ای هستند، بنابراین از جمله روش‌های ایجاد تنوع در ارقام و گونه‌های مختلف گیاهی، القاء تغییرات سیتوژنتیکی و کاریوتیپی و ایجاد سطوح بالاتر پلوئیدی می باشد (عبد میشانی و بوشهری،۱۳۷۶). القاء تغییرات سیتوژنتیکی در گیاهان بخصوص گیاهان دارویی ، ایجاد تغییرات کمی و کیفی کروموزوم‌ها ، مطالعه تأثیر آن بر اصلاح خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و متابولیت‌های با ارزش دارویی گیاه جهت استفاده بهینه از گیاهان دارویی حائز اهمیت فراوان است.

۱-۳- القاء پلی‌پلوئیدی و اصلاح گیاهان دارویی

در اغلب گونه‌های گیاهی، القاء پلی‌پلوئیدی با افزایش در اندازه سلول‌ها، توانایی تولید اندام‌های رویشی قویتر را بوجود آورده است. اندام‌های رویشی، منبع بسیاری از متابولیت‌های ثانویه با ارزش تجاری هستند (آدانیا و شیرا، ۲۰۰۱). بنابراین ممکن است که القاء پلی‌پلوئیدی، در افزایش کمیت و کیفیت این ترکیبات با ارزش دارویی نقش مهمی داشته باشد (داوان و لاوانیا، ۱۹۹۶). در مقایسه تعداد زیادی از گیاهان پلی‌پلوئید با همتای دیپلوئید شان، افزایش در تولید ترکیبات شیمیایی و متابولیت‌های ثانویه مشاهده شده است، مثلاً گزارش شده است که تتراپلوئیدهای دو گیاه دارویی بابونه و مریم گلی، فلاونوئیدها و ترپنوئیدهای بیشتری را نسبت به حالت دیپلوئید تولید می‌کنند یا میزان آرتمیزینین در درمنه تتراپلوئید، ۲۰ درصد بیشتر از دیپلوئید آن گزارش شده است (جسوس، ۲۰۰۳). همچنین گزارش شده است که ، درصد ویتامین C در سبزیجات به علت چند برابر شدن تعداد کروموزوم‌ها افزایش می‌یابد. مقدار نیکوتین در تنباکوی تتراپلوئید، ۱۸ تا ۳۳ درصد بیش از تنباکوی دیپلوئید است. (اهدایی،۱۳۷۳).

اگرچه به طورکلی اثرات پلی‌پلوئیدی قابل پیش‌بینی نیست و بایستی که هر گونه گیاهی را به طور مجزا مورد تحقیق قرار داد، اما دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌های یک گیاه دارویی، منجر به ایجاد تنوع در ترکیبات آللی و گوناگونی آنزیم‌های فعال مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شود و می‌تواند روند متابولیسم ثانویه را تسهیل کرده و میزان متابولیت‌های ثانویه را افزایش دهد. با وجود مطالعه و تحقیقات قابل توجه بر گیاهان پلی‌پلوئید، موارد بسیار محدودی از گیاهان دارویی پلی‌پلوئید گزارش شده است (داوان و لاوانیا، ۱۹۹۶).

۱-۴- اهداف پژوهش

- بهینه سازی کالوس‌زایی و جنین‌زایی سوماتیکی در شنبلیله
- بررسی امکان باززایی از جنین‌های سوماتیکی به دست آمده در گیاه شنبلیله
- تعیین عدد کروموزومی گونه مورد نظر
- بررسی خاصیت پلی‌پلوئیدکنندگی دو تیمار کلشی‌سین و تری‌فلورالین
- تعیین بهترین غلظت و زمان القاء تیمار جهت پلی‌پلوئیدی
- انجام مطالعات کروموزومی و تهیه کاریوتیپ گونه مورد نظر و ژنوتیپ‌های القاء شده
- مقایسه ژنوتیپ‌ها بر اساس ویژگی‌های کاریوتیپی

۱-۵- گیاه شناسی *Trigonella foenum-graecum*

شنبلیله از گیاهان گلدار، نهاندانه، دولپه ، جداگلبرگ و در زمره Caliciflores می‌باشد . این گیاه از خانواده Papilionaceae است (زرگری، ۱۳۶۶؛ مظفریان، ۱۳۷۳).۳۳ گونه مختلف از جنس Trigonella در ایران گزارش شده که مهمترین آن گونه *T. foenum-graecum* است (مظفریان، ۱۳۷۵).

این گیاه علفی و یکساله به طول ۱۰-۵۰ سانتیمتر با برگهای متناوب و سه برگچه‌ای است. دارای دمبرگ است. برگچه‌ها بزرگ و تخم مرغی شکل بوده و در قسمت بالا دندانه‌دار هستند.گوشوارکها سرنیزه‌ای شکل،گلها به نسبت بزرگ وفاقد دمگل هستند.گلها منفرد به رنگ سفید، زرد روشن و بنفش مایل به سفید به بزرگی ۰/۸-۱/۸ سانتیمتر می‌باشند. گلبرگ‌ها ۵ عدد، گلبرگ عقبی که از همه بزرگتر است درفش و دو گلبرگ جانبی بال و دوتای جلویی ناو نامیده می‌شوند. تعداد پرچم‌ها ۱۰ عدد است که ۹ عدد به هم چسبیده ویکی آزاد است.کاسه گل دندانه‌دار وکرکدار است. مادگی از یک تخمدان تشکیل شده. میوه نیام به طول ۳-۱۱ سانتیمتر و محتوی ۵-۲۰ دانه گوشه‌دار به طول ۴-۶ میلیمتر وعرض ۲-۳ میلیمتر است. دانه‌ها حنایی تا قهوه‌ای و بوی قوی معطر و طعم تلخ دارند. شکل (۱-۱) . شنبلیله را به انگلیسی Fenugreek ، به فرانسه Trigonelle و Fenugrec ، به ایتالیایی Fieno Greco ، به آلمانی Bockshornklee و به عربی حلبه می‌نامند (نجف‌پور، ۱۳۷۳) .

شکل۱-۱- گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*)