

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گیلان

دانشکده تولید گیاهی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته
مهندسی باغبانی

بررسی اثر عنصر مولیبدن بر نوع ازت افزوده به محیط کشت B5 در طی جنین‌زایی رویشی دم‌برگ هویج

پژوهش و نگارش:

مریم توکلی

استاد راهنما:

دکتر کامبیز مشایخی

استاد مشاور:

دکتر فرشید قادری‌فر

زمستان ۱۳۹۱

تعهدنامه پژوهشی

نظر به این که چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت های علمی - پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد زیر متعهد می شوند:

- ۱) قبل از چاپ پایان نامه (رساله) خود مراتب را قبلاً به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع و کسب اجازه نمایید.
- ۲) در انتشار نتایج پایان نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع، اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.
- ۳) انتشار نتایج پایان نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **مریم توکلی** دانشجوی رشته **علوم باغبانی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی و امضاء

مریم توکلی

سروتهاننده علی،

خود نمی دانم آنچه را به رشته تحریر سپرده ام لیاقتی برای تقدیم به آستان توست یا نه؟
چه آورم از برای کوشی که برای خصم {حجم سعرت} و در زیر گام های مجانش {جنه ازلفت}
و همراهی با سگوارانش {سما کشت} و هم فریاد با تاملی آفرینش نهیب الهی عرش که {بای دتب
قتت}؟

فاطمه جان،

اجازه ام فرما، آویخته به محبت تو، غریبه ای دور مانده و گرفتار، ارادت خود را به آستان حق مدار تو
تقدیم کنم.

امیدوارم!

که تو مادر حسنین و مادر کریمان آفرینی.

به پاس عاطفه سرشار

و گرمای امیدبخش وجودشان

و به پاس محبت‌های بی دریغشان

که هرگز فروکش نمی‌کند

تقدیم به خانواده عزیزم

تقدیر و تشکر

شکر خدا که هر چه طلب کردم از خدا بر منتهای همت خود کامران شدم

به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق»

در ابتدا بر خود لازم می‌دانم، از پدر و مادر عزیز، دلسوز و مهربانم که با حمایت‌های همه جانبه در محیطی مطلوب، آرامشی فراهم نمودند تا مراتب تحصیلی و نیز پایان‌نامه درسی را به نحو احسن به اتمام رسانم، تشکر و قدردانی نمایم.

همچنین بسی شایسته است از استاد فرهیخته، فرزانه و سبیل توأمان علم و اخلاق جناب دکتر کامبیز مشایخی که همواره راهنما و راهگشای بنده در به انجام رساندن این پژوهش بوده‌اند و نیز از حسن ظن ایشان نسبت به اینجانب که مرا شایسته اجرای آن دانستند، تقدیر و تشکر نمایم. همچنین مراتب سپاس را از اساتید بزرگوام جناب دکتر فرشید قادری‌فر، استاد مشاور و جنابان دکتر مهدی علیزاده و دکتر سید علیرضا موحدی‌نائینی داوران محترم پایان‌نامه و جناب دکتر مجتبی آهنی‌آذری نماینده محترم تحصیلات تکمیلی به عمل می‌آورم. امیدوارم که در منظری شوق‌انگیز شاهد سربلندی و غرور تک‌تک این عزیزان باشم.

از جناب آقایان دکتر سید جواد موسوی‌زاده و مهندس صادق آتشی و دوستان عزیزم سرکار خانم‌ها آتنا تنوری، زهرا طاهریان‌مقدم، زهره حلاجی، فاطمه هوشمندی، سمانه قوچی، فرزانه ابارشی، زینب کیخا، طاهره علیجانزاده، مینا جعفری و همه دوستانی که اتمام این پایان‌نامه مدیون حمایت‌های بی‌دریغ و تلاش بدون چشم‌داشت آنان است، کمال تشکر و قدردانی را دارم. توفیقات روزافزون و تندرستی همیشگی آنها را از خدای بزرگ مسئلت دارم.

چکیده

با توجه به این که کشت بافت علاوه بر کاربرد آن در ازدیاد نباتات، پایه و اساس بیوتکنولوژی و دستکاری‌های ژنتیکی گیاهی می‌باشد و جنین‌زایی رویشی تولید نهایی آن است. بنابراین لزوم بررسی و تحقیق در زمینه‌ی روش‌های مربوطه که منجر به بهینه‌سازی مواد گیاهی بدست آمده می‌شود، آشکار می‌گردد. با توجه به اینکه فرم‌های مختلف ازت از ترکیبات مهم در محیط کشت جنین‌زایی رویشی می‌باشد، لذا پژوهش حاضر در این زمینه یا به عبارت دیگر تأثیر فرم‌های مختلف ازت در طی جنین‌زایی رویشی دمبرگ هویج انجام گردید. از اینرو تأثیر چند نوع مختلف نیتروژن و عنصر مولیبدن در محیط کشت B5، بر روی این پدیده مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش مذکور در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۸ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. نتایج بدست آمده از این بررسی حاکی از آن است که فرم‌های متفاوت ازت بر ریشه‌زایی و مراحل مختلف جنینی تأثیر بسزایی دارند. مشاهدات نشان داد تیماری که در محیط کشت آن تمام فرم‌های نیتروژن به کار رفته ولی فاقد مولیبدن می‌باشد ریشه‌زایی و طول ریشه بیشتر از سایر تیمارها بود. علاوه بر این استفاده توأم تیمار نیترات تنها، با مولیبدن باعث افزایش جنین‌های کروی و سبز شد. حذف مولیبدن زمانی که آمونیوم به تنهایی استفاده شد جنین‌زایی را به شدت کاهش داد. همچنین بیشترین جنین رویشی تشکیل شده مربوط به زمانی بود که هر دو فرم نیترات و آمونیوم به همراه مولیبدن در محیط کشت بکار برده شد. در مقابل محیط‌های کشت حاوی کازئین هیدرولیزات در مقایسه با سایر تیمارها باعث تشکیل جنین‌های بزرگ‌تر و از لحاظ تکاملی همزمان‌تر که دارای لپه‌های سبزتری بودند، گردید.

کلمات کلیدی: جنین‌زایی رویشی، نیترات، آمونیوم، مولیبدن.

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اوّل

- ۱- مقدمه و کلیات ۱
- ۱-۱- بیوتکنولوژی گیاهی ۱
- ۲-۱- کشت بافت ۲
- ۳-۱- کاربرد کشت بافت گیاهی در کشاورزی ۲
- ۴-۱- جنین زایی رویشی ۳
- ۵-۱- گیاهشناسی هویج ۳
- ۶-۱- کشت بافت هویج ۴
- ۷-۱- فرضیه ۴
- ۸-۱- هدف جنین زایی دمبرگ هویج در تحقیق حاضر ۴

فصل دوّم

- ۲- بررسی منابع ۵
- ۱-۲- جنین زایی رویشی ۵
- ۲-۲- مراحل مختلف جنین زایی رویشی ۶
- ۱-۲-۲- القای جنین زایی ۶
- ۱-۱-۲-۲- القای مستقیم ۶
- ۲-۱-۲-۲- القای غیرمستقیم ۷
- ۲-۲-۲- ظهور جنین های رویشی ۷
- ۳-۲- روند تکامل جنین های رویشی ۸
- ۱-۳-۲- مرحله کروی ۸
- ۲-۳-۲- مرحله قلبی ۸
- ۳-۳-۲- مرحله اژدری ۹
- ۴-۳-۲- مرحله گیاهچه ای ۹
- ۴-۲- امبریونید ۹
- ۵-۲- نئومورف ۱۰

فهرست مطالب

عنوان صفحه

۶-۲- عوامل مؤثر بر جنین‌زایی رویشی	۱۰
۶-۲-۱- عوامل داخلی	۱۰
۶-۲-۲- عوامل خارجی	۱۱
۶-۲-۱-۲- محیط کشت	۱۱
۶-۲-۱-۱- نقش ترکیب محیط کشت در جنین‌زایی رویشی	۱۱
۶-۲-۲-۲- نقش عناصر غذایی در جنین‌زایی رویشی	۱۱
۶-۲-۲-۱- نقش نیتروژن و ترکیبات مختلف آن	۱۲
۶-۲-۲-۲- نقش مولیبدن در جنین‌زایی رویشی	۱۳
۶-۲-۷- احیای ازت	۱۴
۶-۸- اثر نیتروژن و اشکال آن بر اسیدیته محیط کشت	۱۶

فصل سوم

۳- مواد و روش‌ها	۱۹
۳-۱- محیط کشت	۱۹
۳-۱-۱- تهیه محلول‌های پایه	۱۹
۳-۱-۲- آماده کردن محیط کشت	۲۰
۳-۲- ضدعفونی وسایل مورد نیاز	۲۲
۳-۳- آماده سازی هود	۲۲
۳-۴- تهیه منبع و نمونه گیاهی	۲۳
۳-۵- آماده‌سازی محیط کشت جوانه‌زنی بذر هویج	۲۳
۳-۶- آماده‌سازی بذر هویج	۲۳
۳-۷- شرایط نگهداری ظروف کشت	۲۳
۳-۸- تهیه محیط‌های کشت برای فاز القاء	۲۴
۳-۸-۱- نحوه اعمال تیمارهای نیترات، آمونیوم و مولیبدن	۲۴
۳-۹- تهیه ریزنمونه‌های دمبرگ هویج از گیاهچه درون شیشه	۲۵
۳-۱۰- دستگاه آکسوفیتون و شرایط نگهداری	۲۵

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۱۱-۳- واکشت نمونه‌ها در فاز رئالیزاسیون.....	۲۶
۱۲-۳- شمارش جنین‌ها و ثبت داده‌ها.....	۲۶
۱۳-۳- تجزیه و تحلیل داده‌ها.....	۲۶
فصل چهارم	
۴- نتایج و بحث.....	۲۷
۱-۴- اثر نیتروژن و اشکال آن در ریشه‌زایی.....	۲۷
۲-۴- اثر مولیبدن بر ریشه‌زایی.....	۳۲
۳-۴- اثر نیتروژن و اشکال آن در جنین‌زایی رویشی.....	۳۴
۴-۴- اثر مولیبدن بر جنین‌زایی رویشی دمبرگ هویج.....	۴۳
۵-۴- امبریونید.....	۴۶
۶-۴- نئومورف.....	۴۶
۷-۴- بروز جنین‌زایی ثانویه تحت تأثیر انواع مختلف ازت.....	۴۷
۸-۴- تشکیل کلروفیل و آنتوسیانین.....	۴۹
۹-۴- نتیجه‌گیری کلی.....	۵۲
۱۰-۴- پیشنهادات.....	۵۳
منابع.....	۵۵

فهرست جداول

صفحه

عنوان

جدول ۱-۳	محلول‌های پایه مورد استفاده در محیط کشت B5	۲۱
جدول ۲-۳	ترکیبت محیط کشت‌های مورد استفاده برای یک لیتر در محیط کشت B5	۲۲
جدول ۳-۳	مقدار موجود ترکیبات حذف شده از محیط B5 و میزان مواد جایگزین آن‌ها	۲۴
جدول ۱-۴	تجزیه واریانس صفات مرتبط با ریشه	۲۷
جدول ۲-۴	مقایسه میانگین صفات مربوط به ریشه در مراحل مختلف تکامل در مرحله ظهور جنین‌ها	۲۸
جدول ۳-۴	میزان تقریبی اسیدهای آمینه موجود در کازئین هیدرولیزات	۳۱
جدول ۴-۴	تجزیه واریانس مراحل مختلف تکامل جنینی بر اساس میانگین مربعات	۳۴
جدول ۵-۴	تجزیه واریانس جنین‌های امبریوئید و نئومورف بر اساس میانگین مربعات	۳۴
جدول ۶-۴	مقایسه میانگین تعداد جنین تولید شده در مراحل مختلف تکامل در مرحله ظهور جنین‌ها	۳۵

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۴-۱- تشکیل اندام‌های ریشه‌زا زمانی که نیترات به عنوان تنها منبع نیتروژن در محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت.....	۲۹
شکل ۴-۲- ریشه‌زایی در تیمارهایی که در محیط کشت آن‌ها کازئین هیدرولیزات به کار برده شده‌است.....	۲۹
شکل ۴-۳- جنین اژدری.....	۳۲
شکل ۴-۴- جنین‌زایی رویشی مستقیم در محیط‌های کشتی که آمونیوم به عنوان منبع تأمین نیتروژن به کار رفته‌است.....	۳۵
شکل ۴-۵- جنین‌های کروی تشکیل شده در تیمارهای حاوی نیترات.....	۳۷
شکل ۴-۶- بیشترین جنین تشکیل شده مربوط به زمانی است که هم نیتروژن احیاء شده و هم نیتروژن احیاء نشده در محیط کشت موجود باشد.....	۳۹
شکل ۴-۷- مقایسه جنین‌کروی تولید شده.....	۳۹
شکل ۴-۸- نمونه گیاهچه‌های تولیدی در تیمار حاوی نیترات، آمونیوم و کازئین.....	۴۰
شکل ۴-۹- خروج جنین‌های تولید شده از اپیدرم ریزنمونه.....	۴۱
شکل ۴-۱۰- جنین‌زایی در محیطی که آمونیوم تنها منبع تأمین نیتروژن آن بود.....	۴۴
شکل ۴-۱۱- لپه‌های رشد یافته جنین‌های تشکیل شده در محیط کشت حاوی کازئین هیدرولیزات.....	۴۵
شکل ۴-۱۲- جنین امبریونید.....	۴۶
شکل ۴-۱۳- جنین نئومورف تشکیل شده در تیمارهایی که محیط کشت آنها حاوی نیترات، آمونیوم و فاقد کازئین هیدرولیز شده بودند.....	۴۷
شکل ۴-۱۴- تشکیل کلروفیل و آنتوسیانین.....	۵۱

