بسم الله الرحمن الرحيم

۱۳۲۸۵۸۸

دانشکده کشاورزی

گروه باغبانی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

عنوان

تأثیر تیدیازورون و بنزیل‌آدنین در پرآوری شاخساره توت فرنگی رقم سلوا در شرایط درون شیشه‌ای

پژوهشگر

محمد اصغرپورقورچی

۱۱۲۸۹/۴/۸

استادان راهنما

دکتر لطفعلی ناصری

دکتر رسول جلیلی مرندی

فروردین ۸۹

۱۳۸۵۸۸

پایان‌نامه آقای محمد اصغرپورقورچی در تاریخ ۸۹/۱/۲۳ به شماره ۱۴۱-۲ ک مورد پذیرش هیأت محترم داوران با رتبه عالی و نمره ۱۸/— قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای اول و رئیس هیأت داوران: دکتر لطفعلی ناصری

۲- استاد راهنمای دوم: دکتر رسول جلیلی مرندی

۳- داور خارجی: دکتر مرتضی قدیم زاده

۴- داور داخلی: دکتر بهمن حسینی

۵- نماینده تحصیلات تکمیلی: دکتر ایرج برنوسی

حق طبع و نشر این رساله متعلق به دانشگاه ارومیه است.

سونولور

محبت و ایثار سیمگسی، مهربان آنا

تقدیر و تشکر

حمد و ستایش بیکران خدای را برای الطاف و رحمت بی پایانش.

تشکر صمیمانه می کنم از محبت ها و مددها و زحمات بی شائبه خانواده عزیزم.

بر خود لازم می دانم از اساتید راهنمای خود آقایان دکتر ناصری و دکتر جلیلی مرندی که در اجرای این پایان نامه و نیز در طول بیش از ۷ سال دوره تحصیل خود زحمات زیادی را در حق اینجانب متحمل شدند تشکر و قدردانی نمایم.

از اساتید دیگر گروه باغبانی آقایان دکتر حسنی، دکتر اصغری و مهندس شیرزاد تشکر می کنم.

از زحمات فراوان مهندس تقی لو که در همه مراحل این پایان نامه یار و پشتیبان اینجانب بودند کمال تشکر را دارم، همچنین از زحمات و راهنمایی های خانم مهندس جلیل دوست تشکر می کنم.

از زحمات و کمک های همکلاسی های خود بویژه آقای سید علی غیبی سپاسگزارم.

از یاران و دوستان همیشگی خود آقایان دکتر یوسف طوماری، مهندس آراز علیزاده، دکتر رضا نخشی، مهندس مهدی کیاست فر، مهندس رامین برزگر، مهندس یثم عابدی، مهندس امین چلبیانی، مهندس مونس برزگر، مهندس مرتضی دقیقیان، دکتر محمد فتحعلیلو، مهندس ناصر علیپور، مهندس محمد یوسفی، مهندس مهدی خیری، مهندس سجاد خانکشی زاده، مهندس توحید عبدالهی، مهندس محمد بدرزاده، مهندس تورج قره ملکی و مهندس منصور نعمت زاده که مثل همیشه در کنار اینجانب بوده و یاور و مددکار اینجانب بودند صمیمانه تشکر می کنم.

محمد اصغرپور

فروردین ۸۹

چکیده

در این تحقیق اثرات غلظت‌های مختلف تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر روی پرآوری شاخساره توت‌فرنگی رقم سلوا در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. شاخساره‌های ۴ هفته‌ای (۱-۱/۵ سانتی‌متری) حاصل از کشت جوانه نوک ساقه رونده به عنوان ریزنمونه در محیط کشت MS تکمیل شده با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون به همراه غلظت‌های ۰، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آدنین کشت گردیدند. غلظت نسبتاً بالای تیدیازورون (۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و غلظت پائین بنزیل‌آدنین (۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر) به طور جداگانه و یا به صورت ترکیب با یکدیگر، غلظت‌های بهینه برای پرآوری و تولید شاخساره‌های مناسب در ریزازدیادی رقم مورد آزمایش بودند که به ترتیب میانگین ۷/۱ ، ۷/۹ و ۱۳/۲ شاخساره به ازای هر ریزنمونه کشت شده تولید کردند. طول شاخساره، تعداد برگ، اندازه قطر و شاخص کلروفیل برگ شاخساره‌های تولید شده نیز در این تیمارها برای ریشه‌دار کردن و یا واکشت کردن بسیار مناسب بودند. به طور کلی اثرات متقابل دو تنظیم کننده‌ی رشد گیاهی ذکر شده در پرآوری رقم مورد آزمایش موثرتر از اثرات اصلی آنها به طور جداگانه بود. ترکیب غلظت‌های ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آدنین با غلظت‌های مختلف تیدیازورون نسبت به ترکیب غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به غیر از شاخص کلروفیل برگ که تأثیر منفی داشت، در بقیه‌ی صفات اندازه‌گیری نتیجه‌ی بهتری داشت. غلظت ۲ میلی‌گرم برلیتر تیدیازورون و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آدنین نیز به طور جداگانه و همچنین به صورت ترکیبی در پرآوری شاخساره نسبت به غلظت‌های پائین‌تر اثرات منفی نشان دادند.

واژگان کلیدی: توت فرنگی، پرآوری شاخساره، کشت درون شیشه‌ای، تیدیازورون، بنزیل آدنین

فهرست

صفحه

عنوان مطالب

فصل اول: مقدمه و کلیات ۱
۱-۱- مشخصات گیاهشناسی توت فرنگی ۱
۱-۲- اهمیت توت فرنگی ۲
۱-۳- ازدیاد توت فرنگی ۳
۱-۴- کشت بافت ۳
۱-۵- کشت بافت توت فرنگی ۴
۱-۶- مراحل مختلف کشت بافت ۵
۱-۶-۱- مرحله صفر- انتخاب و پرورش گیاه/گیاهان مادری ۵
۱-۶-۲- مرحله ۱- استقرار ۵
۱-۶-۳- مرحله ۲- افزونگری ۶
۱-۶-۴- مرحله ۳- ریشه دار کردن شاخساره‌ها ۶
۱-۶-۵- مرحله ۴- سازگار کردن و انتقال گیاهچه‌ها ۷
۱-۷- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ۷
۱-۷-۱- اکسین ۷
۱-۷-۲- سایتوکنین‌ها ۹
۱-۷-۳- جیبرلین‌ها ۱۰
۱-۸- تیدیازورون ۱۱
۱-۹- عکس العمل‌های القاء شده توسط تیدیازورون ۱۳
۱-۱۰- هدف از اجرای این تحقیق ۱۳

فصل دوم: بررسی منابع ۱۵
۲-۱- اثرات فیزیولوژیکی تیدیازورون ۱۵
۲-۲- تیدیازورون و کشت بافت ۱۶
۲-۲-۱- کشت کالوس ۱۷
۲-۲-۲- تولید شاخساره ۱۸
۲-۲-۳- جنین‌زایی بدنی ۲۳
۲-۳-باززایی برون شیشه‌ای ۲۴
۲-۴- مکانیسم‌های عمل تیدیازورون در اندام‌زایی ۲۵
۲-۴-۱- تیدیازورون و فیتوهورمون‌ها ۲۵
۲-۴-۱-۱- تیدیازورون و سایتوکنین‌ها ۲۵
۲-۴-۱-۲- تیدیازورون و اکسین‌ها ۲۷
۲-۴-۱-۳- تیدیازورون و اتیلن ۲۷
۲-۴-۱-۴- تیدیازورون و جیبرلین ۲۸
۲-۴-۲-تیدیازورون و فعالیت‌های آنزیمی ۲۸
۲-۴-۳- تیدیازورون و تنش‌های گیاهی ۲۹
۲-۵- بنزیل آدنین ۳۰

۲-۶- عوامل موثر در تولید و پرآوری شاخساره ۳۲

فصل سوم: مواد و روش ها ۳۴
۳-۲- مواد آزمایش ۳۴
۳-۲-۱- مواد گیاهی اولیه ۳۴
۳-۲-۲- ماده استریل کننده ۳۴
۳-۲-۳- آنتی اکسیدان ۳۵
۳-۳- محیط کشت ۳۵
۳-۳-۱- محلول‌های ذخیره مواد معدنی محیط کشت MS ۳۵
۳-۳-۲- محلول ذخیره ویتامین‌ها ۳۶
۳-۳-۳- محلول‌های ذخیره هورمون‌ها ۳۷
۳-۳-۴- آماده سازی محیط کشت ۳۷
۳-۴- آماده سازی ریزنمونه‌ها ۳۸
۳-۴-۱- کشت اوّلیه و باززایی شاخساره ۳۸
۳-۴-۲- آماده سازی ریزنمونه‌ها برای پرآوری شاخساره ۳۹
۳-۵- روش و ابزار گرد آوری اطلاعات ۳۹
۳-۶- روش آماری اجرای تحقیق ۴۰

فصل چهارم: نتایج ۴۱
۴-۱- تعداد شاخساره‌های تولید شده در هر ریزنمونه ۴۰
۴-۱-۱- تأثیر غلظت‌های مختلف تیدیازورون در تعداد شاخساره‌های تولید شده ۴۲
۴-۱-۲- تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین در تعداد شاخساره‌های تولید شده ۴۳
۴-۱-۳- اثرات متقابل تیدیازورون و بنزیل‌آدنین در تعداد شاخساره‌های تولید شده ۴۴
۴-۲- تعداد برگ‌های تشکیل شده به ازای هر شاخساره ۴۵
۴-۲-۱- تأثیر غلظت‌های مختلف تیدیازورون در تعداد برگ‌های تشکیل شده از شاخساره‌ها ۴۶
۴-۲-۲- تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین در تعداد برگ‌های تشکیل شده از شاخساره‌ها ۴۷
۴-۲-۳- اثرات متقابل تیدیازورون و بنزیل‌آدنین در تعداد تعداد برگ‌های تشکیل شده ۴۷
۴-۳- شاخص کلروفیل برگ شاخساره‌ها ۴۸
۴-۳-۱- تأثیر غلظت‌های مختلف تیدیازورون درشاخص کلروفیل برگ شاخساره‌ها ۴۹
۴-۳-۲- تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین در شاخص کلروفیل برگ شاخساره‌ها ۵۰
۴-۳-۳- اثرات متقابل تیدیازورون و بنزیل‌آدنین در شاخص کلروفیل برگ شاخساره‌ها ۵۰
۴-۴- قطر شاخساره در محل طوقه ۵۱
۴-۴-۱- تأثیر غلظت‌های مختلف تیدیازورون در اندازه قطر طوقه ۵۲
۴-۴-۲-تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین در اندازه قطر طوقه ۵۲
۴-۴-۳- اثرات متقابل تیدیازورون و بنزیل‌آدنین در اندازه قطر طوقه ۵۳
۴-۵- طول شاخساره‌ها ۵۲
۴-۵-۱- تأثیر غلظت‌های مختلف تیدیازورون بر طول شاخساره‌ها ۵۴
۴-۵-۱- تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین بر طول شاخساره‌ها ۵۵
۴-۵-۲- اثرات متقابل تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر طول شاخساره‌ها ۵۶

۴-۶- وزن تر توده گیاهی ۵۶
۴-۶-۱- تأثیر غلظت‌های مختلف تیدیازورون بر وزن تر توده گیاهی ۵۷
۴-۶-۲- تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین بر وزن تر توده گیاهی ۵۸
۴-۶-۳- اثرات متقابل تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر وزن تر توده گیاهی ۵۸
۴-۷- وزن خشک توده گیاهی ۵۹
۴-۷-۱- تأثیر غلظت‌های مختلف تیدیازورون بر وزن خشک توده گیاهی ۵۹
۴-۷-۲- تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین بر وزن خشک توده گیاهی ۶۰
۴-۷-۳- اثرات متقابل تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر وزن خشک توده گیاهی ۶۰

فصل پنجم: بحث ۶۲
۵-۱- تعداد شاخساره ۶۲
۵-۲- تعداد برگ ۶۴
۵-۳- شاخص کلروفیل برگ ۶۵
۵-۴- اندازه قطر طوقه ۶۶
۵-۵- طول شاخساره ۶۷
۵-۶- وزن تر و خشک توده گیاهی ۶۸
نتیجه‌گیری کلی ۶۹
پیشنهادات ۷۰
منابع ۷۱

فهرست جداول

عنوان | صفحه

جدول ۱-۱- خواص فیزیکی و شیمیایی تیدیازورون ۱۲
جدول ۱-۳- ترکیب محلول‌های ذخیره پنج نمک غیرآلی فرمولاسیون موراشیگ و اسکوک (MS) ۳۶
جدول ۲-۳- ترکیب محلول ذخیره ویتامین‌های فرمولاسیون موراشیگ و اسکوک(MS) ۳۶
جدول ۳-۳- میزان حجم برداشتی هورمون‌ها از محلول ذخیره آنها برای تهیه نیم لیتر محیط کشت هر تیمار ۳۸
جدول ۱-۴- تجزیه واریانس تأثیر تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر تعداد شاخساره تولید شده ۴۱
جدول۲-۴- تجزیه واریانس تأثیر تیدیازورون بر صفات اندازه گیری شده ۴۲
جدول۳-۴- تجزیه واریانس بنزیل‌آدنین بر بر صفات اندازه گیری شده ۴۳
جدول۴-۴- تجزیه واریانس تأثیر تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر تعداد برگ‌های تولید شده ۴۶
جدول۵-۴- تجزیه واریانس تأثیر تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر شاخص کلروفیل برگ شاخساره‌ها ۴۹
جدول۶-۴- تجزیه واریانس تأثیر تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر اندازه قطر شاخساره‌ها ۵۱
جدول۷-۴ تجزیه واریانس تأثیر تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر طول شاخساره‌ها ۵۴
جدول۸-۴- تجزیه واریانس تأثیر تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر وزن تر توده گیاهی ۵۷
جدول ۹-۴- تجزیه واریانس تأثیر تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر وزن خشک توده گیاهی ۵۹

فهرست نمودارها

عنوان — صفحه

نمودار۱-۴- اثر غلظت‌های مختلف تیدیازورون بر تعداد شاخساره تولید شده ۴۳
نمودار۲-۴- اثر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین بر تعداد شاخساره تولید شده ۴۴
نمودار۳-۴- اثرات متقابل تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر تعداد شاخساره تولید شده ۴۵
نمودار۴-۴- اثر غلظت‌های مختلف تیدیازورون بر تعداد برگ تشکیل شده ۴۶
نمودار۵-۴- اثر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین بر تعداد برگ‌های تشکیل شده ۴۷
نمودار۶-۴- اثرات متقابل تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر تعداد برگ‌های تشکیل شده ۴۸
نمودار۷-۴- اثر غلظت‌های مختلف تیدیازورون بر شاخص کلروفیل برگ شاخساره‌ها ۴۹
نمودار۸-۴- اثر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین بر شاخص کلروفیل برگ شاخساره‌ها ۵۰
نمودار۹-۴- اثرات متقابل تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر شاخص کلروفیل برگ ۵۱
نمودار۱۰-۴- اثر غلظت‌های مختلف تیدیازورون بر اندازه قطر طوقه ۵۲
نمودار۱۱-۴- اثر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین بر اندازه قطر طوقه ۵۳
نمودار۱۲-۴- اثرات متقابل تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر اندازه قطر طوقه ۵۳
نمودار۱۳-۴- اثر غلظت‌های مختلف تیدیازورون بر طول شاخساره‌ها ۵۵
نمودار۱۴-۴- اثر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین بر طول شاخساره‌ها ۵۵
نمودار۱۵-۴- اثرات متقابل تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر طول شاخساره‌ها ۵۶
نمودار۱۶-۴- اثر غلظت‌های مختلف تیدیازورون بر وزن تر توده گیاهی ۵۷
نمودار۱۷-۴- اثر غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین بر وزن تر توده گیاهی ۵۸
نمودار۱۸-۴- اثرات متقابل تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر وزن تر توده گیاهی ۵۹
نمودار۱۹-۴- اثر غلظت‌های مختلف تیدیازورون بر وزن خشک توده گیاهی ۶۰
نمودار۲۰-۴- اثرات متقابل تیدیازورون و بنزیل‌آدنین بر وزن خشک توده گیاهی ۶۱

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- مشخصات گیاه‌شناسی توت فرنگی[1]

توت فرنگی یک گیاه علفی و چند ساله از تیره گلسرخیان[2] و از جنس فراگاریا می‌باشد. ارتفاع بوته‌ها ۲۰-۱۵ سانتی‌متر بوده و ۳ الی ۵ سال قادر به رشد است. بوته توت فرنگی بسیار کوتاه بوده و جزء گیاهان طوقه‌ای به شمار می‌آید. از جوانه‌های جانبی روی طوقه گیاه، ساقه‌های رونده یا دستک حاصل می‌شودکه هنگام تماس با خاک، گیاهچه‌های جدید تولید می‌کنند. ساقه رونده اکثر ارقام توت فرنگی حاوی دو گره می‌باشند و بوته‌های دختری از گره دوم حاصل می‌شوند. گل‌ها ۱۰ کاسبرگ و ۵ گلبرگ دارند و روی گل‌آذین گرزن قرار می‌گیرند که همانند ساقه‌های رونده از جوانه‌های جانبی طوقه حاصل می‌شوند.

میوه‌های این گیاه از نوع مجتمع بوده و از اجتماع تعداد زیادی مادگی ساده که روی نهنج مشترک قرار گرفته‌اند حاصل می‌شود. هر مادگی به طور جداگانه عمل گرده افشانی و تلقیح انجام داده و میوه‌های فندقه روی نهنج گوشتی و گنبدی شکل تشکیل می‌شوند. رقم توت فرنگی وحشی[3] در اروپا، آمریکا، و در برخی از مناطق ایران از جمله نواحی شمالی، دامنه‌های البرز و آذربایجان به طور طبیعی رشد کرده و تعداد کروموزوم‌های رویشی آن ۱۴ عدد بوده و یک گونه دیپلوئید به حساب می‌آید، امّا اکثر توت فرنگی‌های پرورش یافته امروزی *F.ananassa* می‌باشند که با ۵۶ کروموزوم (۲n = ۸x = ۵۶) یک اکتاپلوئید محسوب می‌شود و از

1. *Fragaria ananassa*
2. *Rosaseae*
3. *F.vesca*

دورگ گیری گونه‌ای از توت فرنگی شیلیایی[1] و گونه آمریکای شمالی[2] به دست آمده است (جلیلی‌مرندی، ۱۳۸۱).

در حال حاضر کشت دو نوع توت فرنگی معمول است. توت فرنگی‌های روز خنثی (چهار فصل) و روز کوتاه (بهاره). البته روز بلندهایی هم در اختیار بوده، ولی آنها اغلب محدود به باغ‌های خانگی هستند.در ارقام روز کوتاه آغازش جوانه‌های گل در زیر ۱۴ ساعت روشنایی روز، یا زمانی که دما پایین‌تر از ۱۵ درجه سانتی گراد باشد اتفاق می‌افتد. در صورتی که دما بالاتر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد باشد، طول روز لازم برای تولید جوانه‌های گل به ۸ الی ۱۲ ساعت کاهش می‌یابد که بستگی به ارقام دارد. گیاهان روز خنثی تقریباً ۳ ماه بعد از کاشت، جوانه‌های گل و طوقه را بدون توجه به طول روز تولید می‌کنند ولی دمای بالا می‌تواند مانع از تشکیل جوانه‌های گل شود (منیعی، ۱۳۸۵).

توت‌فرنگی دارای ارقام تجاری بسیار متنوعی است. رقم سلوا[3] که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت یک رقم اکتاپلوئید بوده و یکی از ارقام مهم تجاری توت فرنگی در دنیاست که یک رقم چهار فصل به شمار می‌رود و در تمامی مناطق معتدله جهان قابل کشت است. این رقم دارای میوه‌های بزرگ، سفت، قدری اسفنجی و بسیار پربار است و به ویژه برای پرورش گلخانه‌ای این گیاه بسیار مناسب می‌باشد.

۲-۱- اهمیت توت فرنگی

آمارهای تولید جهانی توت فرنگی نشان می‌دهد که این میوه یکی از مهمترین ریزمیوه‌های تولید شده در سراسر دنیاست. میزان تولید سالیانه توت فرنگی در ۲۰ سال اخیر به دو برابر رسیده است. امروزه توت فرنگی جایگاه خود را در رژیم غذایی میلیون‌ها نفر در جهان پیدا کرده است و از جهت عطر و طعم و محتویات ویتامینی میوه‌ای شناخته شده به حساب می‌آید (منیعی ۱۳۸۵).

سطح زیر کشت بارور توت فرنگی جهان در سال ۲۰۰۴ برابر ۲۱۴۱۱۸ هکتار و تولید آن برابر ۳/۱ میلیون تن بوده است. کشورهای آمریکا، اسپانیا، کره و ژاپن به ترتیب بزرگترین تولید کننده‌های این محصول در جهان هستند. تقریباً ۱۵٪ تولید توت فرنگی در دنیا به بخش صادرات اختصاص می‌یابد و عمده‌ترین کشور

1. *F.chiloensis*
2. *F.virginiana*
3. Selva

صادر کننده اسپانیا است (Mercado *et al.*, 2007). بر اساس آمار سال ۲۰۰۷ فائو این آمار تغییری پیدا نکرده است. سطح زیر کشت توت فرنگی ایران در سال ۱۳۸۱ برابر ۳۶۲۹ هکتار با تولیدی معادل ۳۲۱۳۹ تن و عملکرد ۱۰۰۹۴ کیلوگرم در هکتار بوده است (تقوی، ۱۳۸۳).

۳-۱- ازدیاد توت فرنگی

معمول‌ترین شیوه در ازدیاد این گیاه استفاده از گیاهان دختری است که از گره دوم بر روی ساقه‌های رونده گیاهان مادری توت فرنگی حاصل می‌شوند. این گیاهان می‌توانند پس از برخورد با خاک ریشه دار شده و به عنوان نشاء در ازدیاد و پرورش توت فرنگی مورد استفاده قرار گیرند.

شیوه دیگر ازدیاد توت‌فرنگی تکثیر این گیاه از طریق کشت بافت می‌باشد. گیاهان به دست آمده از طریق کشت بافت در سطح تجاری پر هزینه‌تر از گیاهانی هستند که به طریق معمول تولید می‌شوند، با این حال ریزازدیادی توت فرنگی دارای مزایایی از قبیل تکثیر سریع گیاهان عاری از ویروس و به ویژه بهبود ظرفیت تولید استولون توسط این گیاهان برای کشت در مزرعه است (Mercado *et al.*, 2007).

۴-۱- کشت بافت

کشت سلول و بافت گیاهی که با عنوان‌های کشت این‌ویترو[1] و یا کشت‌استریل[2] نیز مطرح می‌شود، ابزاری مهم در مطالعات پایه و کاربردی و دارای کاربردهای تجاری است. به عملیاتی نظیر کشت سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های استریل و اجزای آنها تحت شرایط مطلوب فیزیکی و شیمیایی در آزمایشگاه، «کشت بافت گیاهی» اطلاق می‌شود (باقری و آزادی، ۱۳۸۱).

اصطلاح ریزازدیادی به طور اختصاصی به کاربرد فنون کشت بافت برای گیاه‌افزایی با استفاده از بخش‌های کوچکی از گیاه که در شرایط گندزدایی شده در لوله آزمایش یا ظرف‌های دیگر پرورش می‌یابند مربوط می‌شود. در عمل بسیاری از تکثیر کنندگان گیاهی اصطلاح «ریزازدیادی» و یا «کشت بافت» را مترادف هم به کار می‌برند تا هر شیوه‌ی گیاه افزایی در شرایط گندزدایی شده را توصیف کند. ریزافزایی با جداکردن

1. In vitro culture
2. Aexenic (Steril culture)

بخش کوچکی از گیاه آغاز می‌شود که آن را از میکروارگانیزم‌ها عاری می‌سازند و در روی محیط کشت گندزدایی شده قرار می‌دهند (خوشخوی، ۱۳۷۸).

۵-۱- کشت بافت توت فرنگی

توت فرنگی تحت شرایط درون شیشه‌ای به راحتی می‌تواند مدیریت شود. در کشت این گیاه دامنه وسیعی از ریز نمونه‌ها از قبیل جوانه نوک استولون (Nehra *et al.*, 1994; Borkowska, 2001; Nhut *et al.*, 2003) ، قطعات‌گره (Bhatt and Dhar, 2000; Sakila, 2007)، کاسبرگ و دمبرگ (Debnath, 2005)، برگ (Hanhineva *et al.*, 2005)، ریشه و گوشواره برگ (Passey *et al.*, 2003) با موفقیت برای باززایی و تولید شاخساره و در نهایت تولید گیاهان کامل بکار گرفته شده است. اما معمولاً مریستم عاری از ویروس نوک استولون‌های گیاهان برای کشت درون شیشه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد که برای تکثیر انبوه و یا به عنوان مواد گیاهی به منظور مطالعات تراریختی و باززایی به خدمت گرفته می‌شوند (Mercado *et al.*, 2007).

تولید گیاهان از طریق کشت بافت کالوس (Jones *et al.*, 1988)، و جنین‌های بدنی (Biswas *et al.*, 2007) نیز در کشت این‌ویتروی توت فرنگی گزارش شده است.

تکنیک‌های مختلفی در کشت بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد که ریزازدیادی یکی از مهم‌ترین این تکنیک‌ها به شمار می‌رود. ریزازدیادی توت فرنگی به منظور تکثیر تجاری انتخاب‌های الیت[1] در سطح وسیع و برای آنالیز مطالعات جدید در یک آزمایش تکرار دار و نیز برای تسریع فرایند اصلاح از طریق انتخاب این ویتروی[2] ژنوتیپ‌ها به منظور بهره‌گیری از صفات سودمند مورد استفاده قرار گرفته است. ریزازدیادی همچنین از طریق تأمین منابع مواد گیاهی و حفظ گیاهانی که با استفاده از سایر تکنیک‌های درون شیشه‌ای باززایی شده‌اند، اساس سایر تکنیک‌های درون شیشه‌ای را تشکیل می‌دهد.

1. Elit selection
2. *In vitro* selection

ثابت شده است که در گیاهان توت فرنگی حاصل از کشت درون شیشه‌ای تغییراتی در زیر واحدهای کوچک و بزرگ ریبولوز بی‌فسفات کربوکسیلاز (رابیسکو)[1]، افزایش در میزان کلروفیل برگ و نسبت کربن به نیتروژن دیده می‌شود (Litz, 2005).

اگرچه گیاهان توت فرنگی به دست آمده از طریق ریزازدیادی، تعداد دستک‌های بیشتری نسبت به گیاهان تکثیر شده از طریق معمول (گیاهان دختری) تولید می‌کنند، اما گل‌ها و میوه‌های بیشتری نیز تولید می‌کنند، که می‌تواند به ازدحام وکوچکتر شدن میوه‌ها منجر شود (Nehra *et al.*, 1994; Litz, 2005; Mercado *et al.*, 2007).

۶-۱- مراحل مختلف کشت بافت

به طور کلی کشت بافت یا اندام‌های گیاهی برای تولید یک گیاه کامل در ۵ مرحله انجام می‌گیرد:

۱-۶-۱- مرحله صفر- انتخاب و پرورش گیاه/گیاهان مادری

اولین مرحله کشت بافت انتخاب گیاهان مادری و ریزنمونه‌های مناسب برای کشت است. قبل از آغاز کشت بافت باید در انتخاب گیاهان مادری دقت لازم صورت گیرد. این گیاهان باید عاری از هر گونه علائم بیماری باشند. رشد، اندام‌زایی و سرعت تکثیر درون شیشه‌ای می‌تواند بوسیله عملیات زراعی و پیش تیمارهای شیمیایی مناسب بهبود یابد. ژنوتیپ، شرایط گیاه مادری، بخش‌های گیاه، موقعیت بر روی گیاه، و اندازه ریزنمونه در موفقیت یک کشت بسیار موثر است.

۲-۶-۱- مرحله ۱- استقرار

دومین مرحله مرسوم در فرایند کشت بافت موسوم به استقرار است. ریزنمونه مورد نظر از گیاه مادری تهیه می‌شود. موفقیت در این مرحله نیازمند ریزنمونه‌هایی است که عاری از آلودگی‌های سطحی و درونی باشند. برای رفع آلودگی سطحی معمولاً از مواد استریل کننده سطحی مثل هیپوکلریت سدیم یا کلرید جیوه استفاده می‌گردد. مبارزه با موجودات زنده‌ی درون بافت‌های گیاهی مشکل‌تر می‌باشد. این موجودات را می‌توان

1. Ribulose 1,5-biphosphate carboxylase (Rubisco)

تا حدودی با کاربرد آفت کش‌ها و قارچ کش‌های سیستمیک روی گیاه مادری قبل از جمع آوری ریزنمونه‌ها، در مرحله صفر یا با استفاده در محیط کشت‌ها کنترل کرد.

۳-۶-۱- مرحله ۲- افزونگری

پس از آن که کشت‌های استریل استقرار یافتند، هدف بعدی القای تکثیر شاخه خواهد بود. تکثیر می‌تواند از طریق تولید جوانه‌های جانبی موجود بر روی ریزنمونه، یا تولید شاخساره‌های نابجای جدید، و یا جنین‌زایی بدنی صورت گیرد. عمل تکثیر شاخه از جوانه‌های موجود ساده‌ترین و مطمئن‌ترین روش می‌باشد. زیرا در این شیوه تمایز از سایر بافت‌ها که همراه با جهش سوماتیکی[1] است وجود ندارد. کشت‌های در حال تکثیر را می‌توان به دفعات زیاد برای تولید شاخساره‌های فراوان مجدداً تقسیم کرد. در این مرحله می‌توان با استفاده از غلظت مناسب تنظیم کننده‌های رشد، به ویژه سایتوکنین‌ها میزان و سرعت تکثیر را افزایش داد.

۴-۶-۱- مرحله ۳- ریشه دار کردن شاخساره ها

پس از تولید انبوه شاخه مرحله بعد ریشه‌دهی می‌باشد که ممکن است در شرایط این ویترو انجام شود یا شاخه‌ها برداشت شده و به عنوان ریزنمونه تحت شرایط غیر استریل تیمار شوند. در این مرحله در هر دو روش معمولاً عمل تک کردن شاخه‌ها (جدا کردن شاخه‌ها از یکدیگر، که معمولا به صورت توده هستند) انجام می‌شود. از برخی شاخه‌ها نیز می‌توان برای ادامه تکثیر استفاده کرد. در برخی گونه‌ها ریشه‌های نابجا به سهولت حتی در خلال مرحله تکثیر شکل می‌گیرند، در حالیکه در بقیه، تولید ریشه فقط با انتقال به محیط بدون سایتوکنین انجام می‌شود. با اینحال، بسیاری از گونه‌ها به شرایط ویژه از جمله وجود اکسین در محیط کشت نیاز دارند.

واکنش‌های اختصاصی قابل ملاحظه‌ای نسبت به نوع، مقدار و ترکیبات اکسین و سایر شرایط محیط کشت برای ریشه‌دهی وجود دارد. معمولاً سایتوکنین‌ها از تشکیل ریشه جلوگیری می‌کنند و بنابر این در محیط کشت‌های ریشه‌دهی استفاده نمی‌شوند (وصال و باقری، ۱۳۸۲).

1. Somatic mutation

۵-۶-۱- مرحله ۴- سازگار کردن و انتقال گیاهچه ها

محیط کشت‌های این‌ویترو شامل رطوبت بالا، بدون عامل بیماری‌زا، ذخیره مطلوب مواد غذایی، شدت نور پایین و ساکارز غنی می‌باشند لذا گیاهچه‌های تولید شده در برابر تنش‌های محیطی حساس هستند. برای اینکه گیاهان کوچک در معرض محیط بیرون قرار بگیرند باید سازگار شوند. قرارگرفتن تدریجی در معرض شرایط طبیعی منجر به سازگاری پیش رونده فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی یعنی مقاوم شدن[1] می‌شود. این تأثیر تدریجی با تغییر شرایط کشت قبل از نشاء کردن، از طریق پیش تیمار گیاه یا کنترل دقیق محیط برای مدتی، برای نشاء کردن قابل انجام است.

۷-۱- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

برخی ترکیبات شیمیایی طبیعی در داخل گیاه وجود دارند که در رشد و نمو گیاه بیشتر نقش تنظیم کنندگی دارند تا تغذیه‌ای، که معمولاً در غلظت‌های بسیار پایین فعال بوده و به نام هورمون‌های[2] گیاهی (یا مواد رشد گیاهی[3]) نامیده می‌شوند. مواد شیمیایی مصنوعی با فعالیت فیزیولوژیکی مشابه مواد رشد گیاهی، یا ترکیباتی که توانایی ایجاد تغییر در رشد گیاه را به طرق دیگر دارند، مثل پلی‌آمین‌ها، اصطلاحاً تنظیم‌کننده‌های رشدگیاهی[4] نامیده می‌شوند. تمام موادی که به عنوان مواد رشد در کشت بافت مورد استفاده قرار می‌گیرند نیز تنظیم‌کننده‌های رشدگیاهی نامیده می‌شوند. تاکنون ۵ گروه اصلی از مواد رشد گیاهی شناخته شده‌اند که عبارتند از اکسین‌ها، سایتوکنین‌ها، جیبرلین‌ها، اتیلن و آبسزیک اسید که سه گروه اول در کشت بافت اهمیت فراوانی داشته و به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۱-۷-۱- اکسین

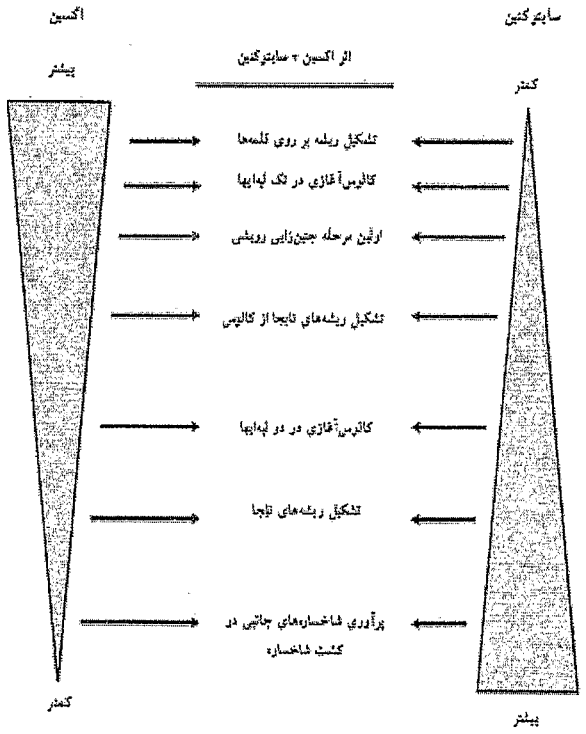
در سطح سلولی، اکسین‌ها فرایندهای اساسی از قبیل تقسیم سلولی و طویل شدن سلول‌ها را کنترل می‌کنند. اکسین در کشت بافت در سطح بسیار وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد و معمولاً جزء لاینفک محیط

1. Hardening
2. Plant hormones
3. Plant growth substance
4. Plant growth regulators

غذایی به شمار می‌رود. اکسین‌ها به ویژه در ترکیب با سایتوکنین‌ها رشد کالوس، سوسپانسیون سلولی[1]، و اندام‌ها را تحریک کرده و همچنین جهت اندام‌زایی را تنظیم می‌کنند (شکل ۱-۱). اکسین طبیعی در گیاه ایندول استیک اسید است، ولی اکسین‌های مصنوعی از قبیل ایندول بوتیریک اسید، تو- فور- دی[2]، و نفتالین استیک اسید نیز کاربرد زیادی در کشت بافت دارند.

در کشت بافت بسته به حضور سایر هورمون‌ها در محیط کشت، غلظت اکسین ممکن است نوع رشد را تغییر دهد، مثلاً تحریک تشکیل ریشه ممکن است به القای کالوس تبدیل گردد. از این لحاظ، هر سیستم کشت منحصر بفرد است و اثرات غلظت‌های مختلف اکسین و سایر هورمون‌ها باید برای هر وضعیتی جداگانه آزمایش گردد و فقط تا حدودی می‌توان نتایج را به سایر کشت‌ها بسط داد.

اکسین‌ها معمولاً در کشت اندام برای ایجاد رشد اولیه در ریز نمونه‌ها، تولید کالوس، القای ریشه‌زایی و جنین‌زایی[3] مورد استفاده قرار می‌گیرند. اکسین در غلظت‌های کم اغلب در ترکیب با مقادیر بالای سایتوکنین‌ها در پرآوری شاخساره نیز سودمند است (Georg *et al.*, 2008).



شکل ۱-۱- غلظت‌های نسبی اکسین و سایتوکنین لازم برای رشد و اندام‌زایی (Georg *et al.*, 2008).

1. Cell suspension
2. 2,4-D
3. Embryogenesis

۲-۷-۱- سایتوکنین‌ها

سایتوکنین‌ها شامل گروه جداگانه‌ای از مواد تنظیم کننده رشد است. این گروه وقتی بر روی گیاهان دست نخورده استفاده می‌شوند اثرات مختلفی را بروز می‌دهند. سایتوکنین‌ها به ویژه سنتز پروتئین را تحریک می‌کنند و در کنترل چرخه سلولی شرکت می‌کنند و می‌توانند بلوغ کلروپلاست‌ها را تسریع نموده و پیری برگ‌های جدا شده را به تأخیر اندازند. کاربرد سایتوکنین‌ها در یک قسمت گیاه (مثلاً در یک برگ) باعث می‌شود تا اندام تیمار شده یک مخزن[1] فعال برای اسیدهای آمینه باشد، که در پی آن از مکان‌های مجاور به اندام تیمار شده منتقل می‌شوند.

اثر سایتوکنین‌ها در کشت بافت بسیار قابل توجه است، چرا که برای تحریک اندام‌زایی (اغلب در ترکیب با اکسین‌ها) وجود آنها لازم می‌باشد. افزودن سایتوکنین به محیط کشت از غالبیت انتهایی جلوگیری می‌کند و رشد جوانه‌های جانبی را تحریک می‌کند.

در کشت بافت همانند گیاهان و اندام‌های دست نخورده حضور سایتوکنین‌ها برای تقسیم سلولی گیاه ضروری است. سایتوکنین‌ها در تحریک آغازش شاخساره‌زایی[2] مستقیم و غیر مستقیم بسیار موثر است. برای این منظور معمولاً در ترکیب با اکسین‌ها استفاده می‌شوند و تعادل بین اکسین و سایتوکنین کارآمدترین اندام‌زایی را حاصل می‌کند. افزودن غلظت‌های پایین سایتوکنین به محیط کشت‌های القای کالوس‌های جنینی به ویژه در پهن برگ‌ها بسیار سودمند است.

برای تحریک رشد جوانه‌های جانبی و کاهش غالبیت انتهایی[3] در کشت‌های شاخساره معمولاً یک یا چند سایتوکنین در مرحله پرآوری به محیط کشت افزوده می‌شود. یک تیمار موفقیت‌آمیز باعث رشد چندین شاخساره کوچک از هر ریزنمونه در طی یک دوره‌ی ۶-۴ هفته‌ای می‌شود. مقادیر خیلی بالای سایتوکنین ممکن است موجب تولید شاخساره‌های خیلی کوچکی شوند که معمولاً در طویل شدن دچار مشکل می‌شوند و یا ممکن است باعث شوند برگ‌های بسیاری از گونه‌ها اشکال غیر معمول به خود گیرند. غلظت‌های بالا معمولاً از تشکیل ریشه جلوگیری می‌کند، یا تشکیل آن را به تأخیر می‌اندازد، همچنین از رشد ریشه و اثر اکسین‌ها در آغازش ریشه‌زایی[4] شاخساره‌های پرآوری شده جلوگیری می‌کند (Georg *et al.*, 2008).

---

1. Sink
2. Shoot initiation
3. Apical dominance
4. Root initiation