

الله أكبر



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گیلان

دانشکده تولیدات گیاهی - گروه علوم باغبانی

پایان نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی علوم باغبانی

بررسی جنین زایی رویشی یک رقم تجاری (Super dominus) و یک رقم بومی هند (Green gold) خیار در محیط های مختلف کشت بافت

پژوهش و نگارش:

محبوبه کیانی

استاد راهنما:

دکتر کامبیز مشایخی

استاد مشاور:

دکتر بهنام کامکار

بهار ۱۳۹۰

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)‌های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱) قبل از چاپ پایان‌نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً بطور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.

۲) در انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.

۳) انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب محبوه کیانی دانشجوی رشته مهندسی علوم باغبانی مقطع کارشناسی ارشد تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

تقدیم بہ دویدہ الہی زندگیم

مدر فداکار
ۛ

و

مادر مہربانم

تشکر و قدردانی

سپاس بی‌کران یگانه خالقم را که مرا به رفیع‌ترین روشنایی‌ها هدایت کرد و راهم را به نور همیشه فروزان دانش روشن ساخت. پس از در بندگی خاضعانه ستایشش می‌کنم و در ادامه این راه معرفت نفس خویش را از او طلب می‌نمایم.

سپاس ویژه خود را تقدیم می‌کنم به خانواده عزیزم به ویژه پدر و مادرم به واسطه تشویق‌ها و حمایت‌های بی‌پایانشان که مرا در وادی دانش اندوزی پرورش دادند و اول بار با آیین علم آموزی آشنا نمودند. از خداوند مهرپیشه سلامتی و سربلندی‌شان را طلب می‌کنم.

در مسیری که برگزیدم همسفرانی راهبرم بودند که حضورشان همچون ستارگانی پر نور فروزنده راهم بود و از این رو بر خود لازم می‌دانم مراتب بی‌پایان سپاس و تقدیرم را نثارشان کنم. بیش از همه استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر کامبیز مشایخی که هدایت‌ها و رهنمودهای ارزنده‌شان چراغی شد فرارویم که تا پایان راه روشنگر لحظه‌هایم بود.

تقدیر و سپاس نثار مشاور محترم جناب آقای دکتر بهنام کامکار که مصاحبت و مشورت با ایشان را مایه فخر خویش می‌دانم و شاگردی در مکتبشان افتخاری است که به آن می‌بالم.

از داوران گرامی جناب آقای دکتر مهدی علیزاده و سرکار خانم دکتر منیژه میان‌آبادی و نیز نماینده تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر امیراحمد دهقانی که مطالعه این پایان‌نامه را قبل از ارائه تقبل نمودند و با رهنمودهای ارزنده‌شان مرا در ارایه بهتر مطالب یاری نمودند سپاسگزارم.

از همکاری و حمایت‌های اساتید گروه باغبانی و دوستان خوبم کمال تشکر را دارم.

چکیده

خیار (*Cucumis sativus*) یکی از مهمترین سبزی‌های خانواده کدوئیان است و اصلاح ژنتیکی آن جهت بهبود صفات مختلف از قبیل مقاومت به شرایط نامساعد محیطی و نیز آفات و بیماری‌ها، ضروری می‌باشد. این صفات در ارقام وحشی می‌تواند به عنوان منبع با ارزشی برای اصلاح خیارهای زراعی موجود استفاده شود. جهت این منظور و با استفاده از روش‌های جدید بیوتکنولوژی می‌توان علیرغم وجود موانع طبیعی محدود کننده، از تکنیک‌های انتقال ژن استفاده کرد. این روش‌ها زمانی دارای کارایی مناسب هستند که باززایی گیاهان از ریزنمونه‌های مختلف موفقیت‌آمیز باشد. تحقیقات به‌عمل آمده در این زمینه نشان داده است که بین محیط‌های کشت مختلف در بسیاری از ارقام و ریزنمونه‌های مورد استفاده، از نظر جنین‌زایی و اندام‌زایی تفاوت وجود دارد. لذا مطالعه و شناسایی محیط‌های کشت، ارقام و نیز ریزنمونه‌های مناسب جهت باززایی در گیاهان ضروری به‌نظر می‌رسد. در همین راستا آزمایشی بر روی جنین‌زایی و اندام‌زایی یک رقم تجاری (سوپردامینوس) و یک رقم بومی هند (گرین گلد) خیار در سه محیط کشت B5، MS و NL و با استفاده از دو ریزنمونه برگ و دمبرگ صورت گرفت. در این تحقیق از طرح آماری کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل و با چهار تکرار استفاده شد. ریزنمونه‌ها پس از گذشت ۴ هفته از محیط القایی به محیط رئالیزاسیون منتقل و در دستگاه آکسوفیتون با شرایط روشنایی ۲۰۰۰ لوکس و دمای حدود ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. ریشه‌زایی و جنین‌زایی رویشی، دو صفت مورد مطالعه در این تحقیق بودند که با توجه به نتایج به‌دست آمده اثر محیط کشت، نوع رقم و نوع ریزنمونه استفاده شده برای هر دو صفت دارای اثر معنی‌دار بود. بیشترین میزان جنین‌زایی رویشی در محیط B5 و بیشترین ریشه‌زایی در محیط NL صورت گرفت. رقم هندی رقم مناسب‌تر در هر دو مرحله ریشه‌زایی و جنین‌زایی بود. همچنین ریزنمونه برگ نسبت به ریزنمونه دمبرگ، تعداد بیشتری ریشه و همچنین جنین رویشی تولید نمود.

واژه‌های کلیدی: جنین‌زایی رویشی، ریزنمونه، محیط کشت، خیار

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول: مقدمه

۲	۱- مقدمه
۲	۱-۱- کشت بافت
۴	۲-۱- گیاهشناسی خیار
۴	۳-۱- خاستگاه خیار
۴	۴-۱- شرایط آب و هوایی
۵	۵-۱- ارزش غذایی و موارد مصرف
۵	۶-۱- اهداف اصلاحی
۶	۷-۱- کشت درون‌شیشه‌ای خیار
۷	۸-۱- کاربرد جنین‌زایی رویشی

فصل دوم: بررسی منابع

۱۰	۲- بررسی منابع
۱۰	۱-۲- جنین‌زایی رویشی
۱۱	۲-۲- فاکتورهای القای جنین‌زایی
۱۲	۳-۲- فرآیند جنین‌زایی رویشی
۱۲	۱-۳-۲- مرحله القا
۱۲	۲-۳-۲- مرحله رئالیزاسیون
۱۳	۴-۲- تغییرات درونی در سلول‌های جنین‌زا در محیط القایی
۱۳	۵-۲- تغییر و تحول سلول‌های جنین‌زا در مرحله ظهور
۱۴	۶-۲- مراحل تکامل و تمایز جنین‌های رویشی
۱۵	۱-۶-۲- مرحله کروی شکل
۱۵	۲-۶-۲- مرحله قلبی شکل
۱۵	۳-۶-۲- مرحله اژدری شکل
۱۶	۷-۲- عوامل مؤثر بر جنین‌زایی رویشی

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱۶	۲-۷-۱- اثر ترکیب محیط کشت
۱۶	۲-۷-۱-۱- ازت و ترکیبات آن
۱۹	۲-۷-۱-۲- قندهای محیط کشت
۲۱	۲-۷-۱-۳- تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی
۲۳	۲-۷-۲- اثر نوع رقم
۲۴	۲-۷-۳- اثر نوع ریزنمونه
۲۵	۲-۸- نقش اکسین در مرحله القای جنین‌زایی رویشی
۲۶	۲-۹- نقش اکسین در مرحله ظهور جنین‌زایی
۲۷	۲-۱۰- رابطه جنین‌زایی رویشی با متابولیسم کربوهیدرات‌ها
۲۷	۲-۱۱- کشت بافت خیار

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳۰	۳- مواد و روش‌ها
۳۰	۳-۱- تهیه بذور
۳۰	۳-۲- محیط کشت
۳۰	۳-۳- تهیه محلول‌های پایه
۳۱	۳-۳-۱- عناصر پر مصرف
۳۱	۳-۳-۲- عناصر کم مصرف
۳۱	۳-۳-۳- ویتامین‌ها
۳۲	۳-۳-۴- pH محیط کشت
۳۲	۳-۴- تهیه محیط کشت
۳۲	۳-۵- استریل کردن ابزار و وسایل
۳۴	۳-۶- استریل کردن محیط انجام کار
۳۴	۳-۷- آماده‌سازی منبع گیاهی
۳۵	۳-۸- استریل نمودن بذور

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۹-۳- مرحله القا.....	۳۵
۳-۹-۱- تهیه ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ.....	۳۵
۳-۹-۲- شرایط نگهداری نمونه‌ها در دستگاه آکسوفیتون.....	۳۶
۳-۱۰- مرحله رئالیزاسیون.....	۳۶
۳-۱۱- شمارش جنین‌ها و عکسبرداری.....	۳۷
۳-۱۲- تجزیه و تحلیل داده‌ها.....	۳۷

فصل چهارم: نتایج

۴- نتایج.....	۴۲
۴-۱- جنین‌زایی رویشی.....	۴۲
۴-۱-۱- اثر محیط کشت بر جنین‌زایی رویشی.....	۴۳
۴-۱-۱-۱- تأثیر اکسین بر جنین‌زایی رویشی.....	۴۴
۴-۱-۱-۲- تأثیر عناصر غذایی محیط کشت در جنین‌زایی رویشی.....	۴۸
۴-۱-۲- اثر نوع رقم بر جنین‌زایی رویشی.....	۵۰
۴-۱-۳- اثر ریزنمونه بر جنین‌زایی رویشی.....	۵۲
۴-۲- اثر متقابل نوع رقم با محیط کشت در تولید جنین رویشی.....	۵۳
۴-۳- اثر متقابل محیط کشت با ریزنمونه کشت شده در تولید جنین رویشی.....	۵۵
۴-۴- ریشه‌زایی.....	۵۶
۴-۴-۱- اثر نوع رقم بر ریشه‌زایی.....	۵۶
۴-۴-۲- اثر محیط کشت بر ریشه‌زایی.....	۵۷
۴-۴-۳- اثر نوع ریزنمونه کشت شده بر ریشه‌زایی.....	۵۸

فهرست اشکال

صفحه	عنوان
۳۰	شکل ۱-۳
۴۳	شکل ۱-۴
۵۲	شکل ۲-۴
۵۴	شکل ۳-۴
۵۴	شکل ۴-۴
۵۵	شکل ۵-۴
۵۹	شکل ۶-۴

فهرست جداول

صفحه	عنوان
۳۳	جدول ۱-۳
۳۴	جدول ۲-۳
۳۷	جدول ۳-۳
۳۸	جدول ۴-۳
۳۸	جدول ۵-۳
۳۹	جدول ۶-۳
۳۹	جدول ۷-۳
۴۰	جدول ۸-۳
۴۰	جدول ۹-۳
۴۵	جدول ۱-۴
۵۱	جدول ۲-۴
۵۶	جدول ۳-۴
۵۷	جدول ۴-۴
۶۱	جدول ۵-۴

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱- مقدمه

۱-۱- کشت بافت

افزایش روز افزون جمعیت بشر نیاز به افزایش همزمان تولیدات گیاهی را نیز به همراه دارد که در اغلب موارد خارج از توان و ظرفیت تولید در طبیعت است. امروزه دیگر روش‌های قدیمی و کلاسیک تکثیر گیاهان و نیز روش‌های قدیمی و معمول اصلاح نباتات به تنهایی جوابگوی نیازها نبوده و ضرورت دارد روش‌های جدیدتری جایگزین یا تکمیل‌کننده روش‌های پیشین شوند. در حال حاضر به نظر می‌رسد که مناسب‌ترین راه رسیدن به این افزایش تولید، استفاده از روش‌های فناوری زیستی می‌باشد (مشایخی، ۱۳۸۶).

امروزه در سراسر جهان استفاده از روش‌های فناوری زیستی در تولید مواد گیاهی که پایه و اساس آن بر روش‌های کشت بافت استوار است به طور چشمگیری در حال توسعه می‌باشد. هدف این تکنیک تولید سریع تعداد زیادی از گیاهان با ژنتیک مشخص از یک گیاه مادری با ارزش یا گیاهان تک‌جنسی نر و یا ماده است. می‌توان گیاهان حاصله از این روش را به‌طور مستقیم به فروش رساند و یا این‌که برای اهداف اصلاحی یا مطالعات ژنتیکی و پایه‌ای استفاده کرد (هالپرین، ۱۹۹۵). اصطلاح کشت بافت گیاهی به‌طور کلی به کشت درون‌شیشه‌ای تمام بخش‌های گیاه (تک یاخته، بافت و اندام) در شرایط گندزدایی شده، گفته می‌شود (خوشخوی، ۱۳۸۷).

تحقیقات کشت بافت بیشتر در دو زمینه اندام‌زایی و جنین‌زایی انجام می‌شود که جنین‌زایی روش نوین‌تری بوده و لذا اطلاعات کمتری در مورد آن وجود دارد. از طرف دیگر جنین‌زایی رویشی یکی از مهم‌ترین تکنیک‌های کشت بافت می‌باشد که به دلیل منافع قابل‌توجه آن گسترش زیادی پیدا نموده است و این روش جهت تولید و باززایی انبوه گیاهان ارزشمند و با صرف هزینه بسیار اندک در مقیاس زیاد می‌باشد (مشایخی، ۱۳۸۶). جنین‌زایی رویشی، فرآیندی است که طی آن سلول‌های رویشی یا سوماتیکی تمایز یافته و ساختاری دوقطبی مشتمل بر محور ریشه و ساقه تشکیل می‌دهند. جنین‌های سوماتیکی، مشابه جنین‌های زایشی یا زیگوتی بوده، می‌توانند بالغ شده و جوانه بزنند (باقری و آزادی، ۱۳۸۱).

در طی فرآیند جنین‌زایی رویشی سلول‌های رویشی به جنین‌های رویشی تغییر می‌یابند. این جنین‌ها اندام‌های گیاهی دوقطبی بوده و از لحاظ ریخت‌شناسی شبیه جنین‌های زیگوتی می‌باشند. این

تکنیک برای تولید انبوه در ازدیاد رویشی گیاهان به کار می‌رود و می‌توان آن را برای تمام گونه‌های گیاهی به کار برد، به طوری که طی دهه‌های اخیر این عمل در بسیاری از گونه‌های گیاهی توسعه یافته است (جورج و همکاران، ۲۰۰۸). در گیاه اصلی، جنین زایشی از تقسیم یک سلول تخم تلقیح شده ایجاد می‌شود که به وسیله بند ناف به گیاه مادری متصل است. در طی رشد سلول تخم از راه تقسیم میتوز تکثیر شده و توده سلولی اولیه را تشکیل می‌دهد. ساختارهای جنینی حاصل از بافت‌ها یا سلول‌های هاپلوئید یا دیپلوئید، بدون ادغام سلول‌های جنسی را جنین‌های رویشی (سوماتیکی) می‌نامند (طباطبایی، ۱۳۸۶).

شاید اولین قدم در زمینه کشت بافت گیاهی در سال ۱۷۵۶ توسط هنری لوئیس داهامل منیسو، هنگامی که وی شاهد تشکیل کالوس در حین مطالعه اولیه مواد التیام دهنده زخم‌های گیاهی بود، برداشته شد (گاتریت^۱، ۱۹۸۵). مطالعات میکروسکوپی به عمل آمده، منجر به ارائه همزمان و مستقل از هم تئوری سلولی (وجود توتی پتانسی در سلول‌های گیاهی) توسط اشلایدن (۱۸۳۸) و شوان (۱۸۳۹) گردید. اساس تئوری کشت بافت گیاهی توسط گوتلیب هابرلنت از آکادمی علوم آلمان در سال ۱۹۰۲، بعد از آزمایش‌های وی روی کشت تک سلولها ارائه گردید او در مقاله‌ای که در آن زمان منتشر کرد ادعا نمود تشکیل جنین از سلول‌های رویشی نیز امکان‌پذیر می‌باشد (هاپرلنت^۲، ۱۹۰۲).

در سال ۱۹۲۲ روبینز در آمریکا و کوت از شاگردان هابرلنت در آلمان موفقیت‌هایی را در رشد رأس ریشه‌های جدا شده گزارش کردند، ولی اولین گزارش موفقیت‌آمیز رشد کشت‌های رأس ریشه گوجه فرنگی در محیط درون شیشه توسط وایت صورت گرفت (احسان‌پور و امینی، ۱۳۸۲).

سبزیجات که گروهی از بزرگترین محصولات کشاورزی در جهان به شمار می‌روند، از لحاظ تغذیه‌ای و نیز دارویی دارای اهمیت زیادی می‌باشند و بنابراین کشت بافت آنها مورد توجه محققان زیادی بوده است. اهداف اولیه تکثیر درون‌شیشه‌ای سبزیجات عبارتند از: (۱) تولید تعداد زیادی گیاهچه از گیاهانی که رشد آنها از طریق بذر سخت است، (۲) تکثیر غیرجنسی تعداد زیادی از گیاهچه‌های همسان ژنتیکی، (۳) تولید گیاهان عاری از ویروس و (۴) بهبود محصول از طریق تکنیک‌های مختلف تغییر ژنتیکی (تورس^۳، ۱۹۸۸).

1- Gautheret
2- Haberlandt
3- Torres

۲-۱- گیاهشناسی خیار

خیار (*Cucumis sativus*) یکی از گیاهان تیره کدوئیان (*Cucurbitaceae*) است که شامل ۹۰ جنس و ۷۵۰ گونه می‌باشد. علاوه بر خیار، جنس *Cucumis* شامل حدود ۳۰ گونه دیگر است که در دو ناحیه متمایز جغرافیایی توزیع شده اند (جی کاللو^۱، ۱۳۷۹).

ساقه خیار مانند سایر گیاهان خانواده کدوئیان خزنده و کرک‌دار بوده و در مقطع زاویه‌دار است. گل‌ها ۵ قسمتی به رنگ زرد و به قطر حدود ۳ سانتی‌متراند. اغلب ارقام خیار یک پایه با گل‌های نر و ماده جدا از هم در یک بوته هستند (پیوست، ۱۳۸۱). ظهور جنسیت در گل‌های خیار تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد. در شرایط روزهای بلند و شدت نور زیاد گل‌های نر بیشتری تولید می‌کند در صورتی‌که تحت شرایط روزهای کوتاه و شدت نور کم گل‌های ماده بیشتر تولید می‌شوند (ناصری و تهرانی‌فر، ۱۳۷۴).

۳-۱- خاستگاه خیار

خیار یکی از قدیمی‌ترین سبزی‌های کشت شده می‌باشد. بیش از ۵ هزار سال تاریخ شناخته شده دارد و احتمالاً از هند منشأ گرفته است و ظاهراً مدت‌ها قبل از تاریخ مکتوب از هند به سمت شرق و چین و از سمت غرب به آسیای صغیر، شمال آفریقا و اورپای جنوبی گسترش یافته است (جی کاللو، ۱۳۷۹). عده ای آن را بومی نواحی گرم شمال شرقی هندوستان دانسته و بعضی عقیده دارند که نوع خودروی آن در ارتفاعات هیمالیا یافت شده است. تاتی‌اگلو^۲ نیز از نظر جغرافیایی دو منطقه را منشأ آن می‌داند: منطقه آفریقا که بیشترین گونه‌های خیار مربوط به آنجاست. این منطقه قسمتی از قاره آفریقا و خاور نزدیک تا پاکستان و عربستان جنوبی را شامل می‌شود و منطقه دیگر که در آن‌جا به گروه خیارهای آسیایی معروف است شامل مناطق جنوبی و شرقی هیمالیا است (پیوست، ۱۳۸۱).

۴-۱- شرایط آب و هوایی

خیار تقریباً در تمام کشورهای مناطق معتدل کشت می‌شود (جی کاللو، ۱۳۷۹). از آن‌جاکه خیار در مقابل سرما حساس بوده و طالب گرماست، باید کشت آن در مناطقی با آب و هوای نسبتاً گرم صورت

1- J Kalelo

2- Tatlioglu