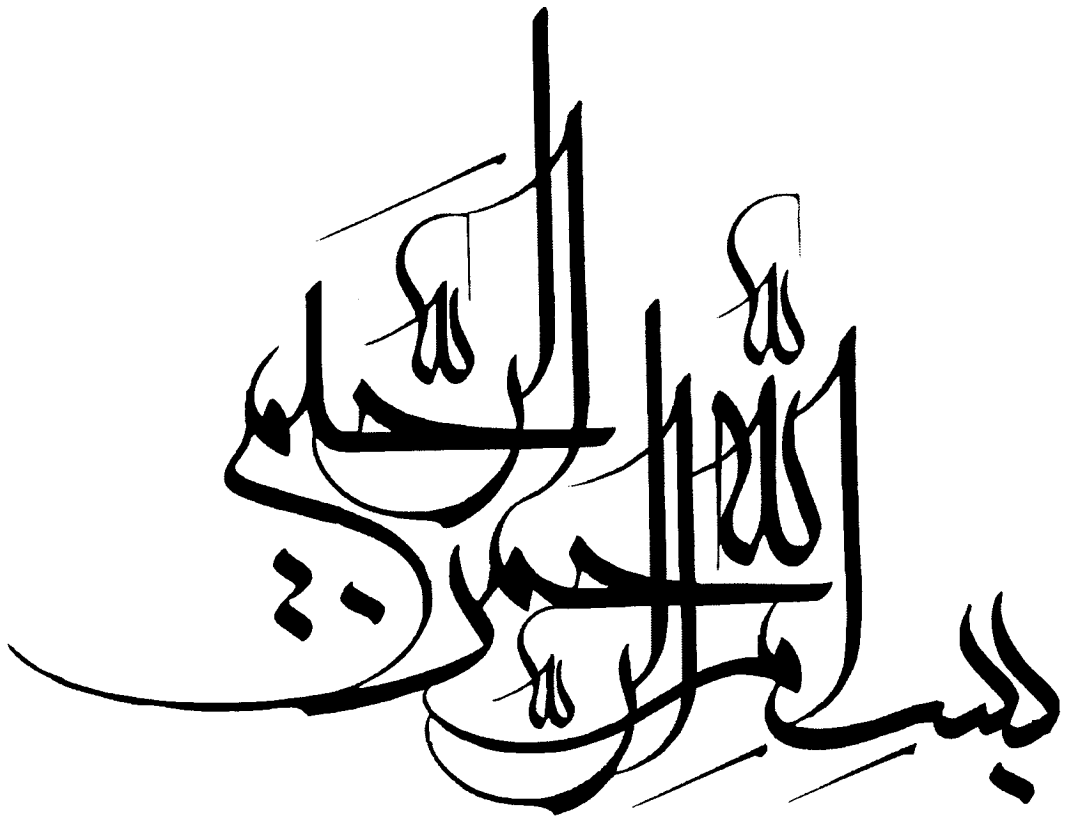

١٤٢٥٠٠

دانشگاه ارومیه

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی کشاورزی

علوم باغبانی- گرایش میوه‌کاری

بررسی اثرات متقابل بنزیل آدنین و کیتوسان در پرآوری درون شیشه ای توت فرنگی رقم سلوا

تحقیق و نگارش :

محمدرضا مرحمتی

استاد راهنما :

دکتر رسول جلیلی مرندی

استاد مشاور :

مهندس مهدی محسنی‌آذر

۱۳۸۹/۹/۸

آذر ۱۳۸۸

۱۴۶۵۰۰

پایان نامه آقای محمدرضا مرحمتی به تاریخ ۸۸/۹/۲۳ به شماره ۱۰۷-۲ک مورد پذیرش هیات محترم داوران با رتبه بسیار خوب ونمره ۱۷/۸ قرار گرفت.

۱-استاد راهنما و رئیس هیئت داوران : سید محسن سنو

۲-استاد مشاور: حسن اکبری

۳-داور خارجی : مرتضی قربانزاده

٤-داور داخلی : محسن حسنی

۵- نماینده تحصیلات تکمیلی : بهروز

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

تقدیم به:

همسر فداکارم که سختی های فراوان ادامه تحصیل مرا تحمل نمودند.

و تقدیم به:

پدر و مادر بزرگوارم که عمرشان را در راه تربیت من صرف کرده و دعای خیرشان پشتیبان من بود.

تشکر و قدردانی:

سپاس خدای را که با آفرینش آسمان ها و زمین و آنچه در آنهاست و فرستادن کتاب ها و پیغمبران خویشتن را به ما شناساند و شکر و سپاس از نعمت های خود را به ما الهام نمود.

حال که با فضل و عنایات خداوند رحمان موفق به تحقیق و نگارش این پایان‌نامه شدم، وظیفه خود می‌دانم از همه عزیزانی که اینجانب را طی این تحقیق کمک و مساعدت نمودند و یا به نحوی مرا مورد لطف و عنایات خویش قرار دادند، مراتب امتنان و تشکرخود را ابراز نمایم.

از استاد راهنمای گرامی جناب آقای دکتر رسول جلیلی مرندی که با راهنمایی‌های ارزشمند و همکاری صمیمانه خویش راهگشای این تحقیق بوده‌اند صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم.

از مساعدت ها و لطف جناب آقایان ، دکتر لطفعلی ناصری مدیریت محترم گروه باغبانی دانشکده کشاورزی ،دکتر محمد رضا اصغری و دکتر عباس حسنی صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم.

از همفکری و راهنمایی جناب آقایان مهندس حبیب شیرزاد، مهندس رامین تقی لو و مهندس مهدی محسنی‌آذر نهایت تشکر و قدردانی را می‌نمایم.

از لطف و همکاری جناب آقای دکتر حامد دولتی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از همکاری سرکار خانم مهندس جلیل دوست کارشناس محترم آزمایشگاه کشت بافت نهایت تشکر و قدردانی را می‌نمایم.

از کلیه دوستان و همکلاسی‌های عزیز که مشوق و راهنمای اینجانب بوده و به طرق مختلف مساعدت نمودند صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم.

محمدرضا مرحمتی

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول : مقدمه و کلیات

۱-۱- تاریخچه و خصوصیات گیاه شناسی توت فرنگی ۱

۱-۱-۱مشخصات برخی از گونه های توت فرنگی ۳

۱-۲- رقم سلوا ۳

۱-۳- کشت بافت ۴

۱-۴- تاریخچه کشت بافت ۴

۱-۵- موارد استفاده از کشت بافت در کشاورزی ۵

۱-۶- تاریخچه کشت بافت توت فرنگی ۵

۱-۷- مراحل تکثیر در محیط درون شیشه ای ۶

۱-۷-۱- تهیه گیاه مادری ۶

۱-۷-۲- ضدعفونی ۷

۱-۷-۳- استقرار ریزنمونه ها روی محیط کشت ۸

۱-۷-۴- تکثیر ۸

۱-۷-۵- ریشه زایی درون شیشه ای ۸

۱-۷-۶- سازگار کردن گیاهان و انتقال به محیط کشت ۸

۱-۸- ریزازدیادی ۱۰

۱-۸-۱- روش های مختلف ریزازدیادی ۱۰

۱-۸-۲- نمونه های گیاهی مورد استفاده در ریز ازدیادی ۱۱

۱-۹- کیتوسان ۱۱

۱-۱۰- سیتو کنین ۱۲

۱-۱۰-۱- محل سنتز و انتقال سیتو کینین ها ۱۳

۲-۱۰-۱- مشتقات مصنوعی سیتوکینین ها ۱۳
۱۱-۱- هدف از این تحقیق ۱۳

فصل دوم: بررسی منابع علمی

۱-۲- عوامل مؤثر بر پرآوری درون شیشه ای ۱۵
۲-۲- کاربرد بنزیل آدنین در کشت بافت ۲۲
۳-۲- کاربرد کیتوسان در کشت بافت ۲۲

فصل سوم: مواد و روش ها

۱-۳- رقم مورد استفاده ۲۵
۲-۳- محیط کشت، ترکیبات و آماده سازی آن ۲۵
۱-۲-۳- محلول ذخیره مواد معدنی محیط کشت MS ۲۶
۲-۲-۳- محلول ذخیره کیتوسان و بهینه سازی روش تهیه آن ۲۶
۳-۲-۳- محلول های ذخیره هورمون ۲۷
۴-۲-۳- محلول ذخیره ویتامین ۲۸
۳-۳- روش و ابزار گرد آوری اطلاعات ۲۹
۴-۳- روش آماری اجرای پایان نامه ۳۰

فصل چهارم: نتایج

۱-۴-تعداد شاخساره ۳۱
۱-۱-۴-اثرغلظت های مختلف بنزیل آدنین بر تعدادشاخساره ۳۲
۲-۱-۴-اثر کیتوسان بر تعداد شاخساره ۳۲
۳-۱-۴-اثرات متقابل بنزیل آدنین با کیتوسان بر تعداد شاخساره ۳۳
۲-۴-اثر تیمارها بر متوسط قطر شاخساره ۳۳
۱-۲-۴-اثرغلظت های مختلف بنزیل آدنین بر قطر متوسط شاخساره ۳۴

۲-۲-۴-اثر غلظتهای مختلف کیتوسان بر قطر متوسط شاخساره ۳۴
۳-۲-۴-اثرات متقابل بنزیل آدنین با کیتوسان بر قطر متوسط شاخساره ۳۵
۳-۴- متوسط طول شاخساره ۳۵
۱-۳-۴-اثر غلظتهای مختلف بنزیل آدنین بر طول شاخساره ۳۶
۲-۳-۴-اثر غلظتهای مختلف کیتوسان بر طول شاخساره ۳۷
۳-۳-۴-اثرات متقابل بنزیل آدنین با کیتوسان برطول شاخساره ۳۷
۴-۴- تعداد برگ ۳۷
۱-۴-۴-اثر غلظتهای مختلف بنزیل آدنین بر تعداد برگ ۳۸
۲-۴-۴-اثر غلظتهای مختلف کیتوسان بر تعداد برگ ۳۸
۳-۴-۴-اثرات متقابل بنزیل آدنین با کیتوسان بر تعداد برگ ۳۹
۵-۴- سطح برگ ۴۰
۱-۵-۴-اثر غلظتهای مختلف بنزیل آدنین بر سطح برگ ۴۱
۲-۵-۴-اثر غلظتهای مختلف کیتوسان بر سطح برگ توده گیاه ۴۱
۳-۵-۴- اثرات متقابل بنزیل آدنین با کیتوسان بر سطح برگ توده گیاه ۴۱
۶-۴- میزان کلروفیل ۴۲
۱-۶-۴-اثر غلظتهای مختلف بنزیل آدنین بر میزان کلروفیل ۴۲
۲-۶-۴-اثر غلظتهای مختلف کیتوسان بر میزان کلروفیل ۴۲
۳-۶-۴-اثرات متقابل بنزیل آدنین با کیتوسان بر میزان کلروفیل ۴۳
۷-۴-وزن تر توده گیاهی ۴۴
۱-۷-۴-اثرغلظتهای مختلف بنزیل آدنین بر وزن تر توده گیاهی ۴۴
۲-۷-۴-اثر غلظتهای مختلف کیتوسان بر وزن تر توده گیاهی ۴۵
۳-۷-۴-اثرات متقابل بنزیل آدنین با کیتوسان بر وزن تر توده گیاهی ۴۵
۸-۴- وزن خشک توده گیاهی ۴۶
۱-۸-۴-اثرغلظتهای مختلف بنزیل آدنین بر وزن خشک توده گیاهی ۴۷

۲-۸-۴-اثر غلظتهای مختلف کیتوسان بر وزن خشک توده گیاهی ۴۷
۳-۸-۴-اثرات متقابل بنزیل آدنین با کیتوسان بر وزن خشک توده گیاهی ۴۸
۹-۴- طول بلندترین شاخساره ۴۸
۱-۹-۴-اثر غلظتهای مختلف بنزیل آدنین بر طول بلندترین شاخساره ۴۹
۲-۹-۴-اثر غلظتهای مختلف کیتوسان بر طول بلندترین شاخساره ۴۹
۳-۹-۴-اثرات متقابل بنزیل آدنین با کیتوسان بر طول بلندترین شاخساره ۴۹
۱۰-۴- شیشه ای شدن گیاهک های تولید شده ۵۰

فصل پنجم : بحث

۱-۵- تأثیر بنزیل آدنین بر پر آوری درون شیشه ای توت فرنگی رقم سلوا ۵۱
۲-۵- تأثیر کیتوسان بر پر آوری درون شیشه ای توت فرنگی رقم سلوا ۵۳
۳-۵- اثرات متقابل بنزیل آدنین با کیتوسان پر آوری درون شیشه ای توت فرنگی رقم سلوا ۵۷

نتیجه گیری کلی و پیشنهادات ۵۸
فهرست منابع ۵۹
چکیده انگلیسی

فهرست جدول ها

عنوان

صفحه

جدول۱-۳- ترکیب محلول های ذخیره پنج نمک غیرآلی فورمولاسیون موراشیک و اسکوگ..... ۲۷

جدول۱-۴- تجزیه واریانس تأثیر عوامل مختلف بر تعداد شاخساره..... ۳۲

جدول ۲-۴- تجزیه واریانس تأثیر عوامل مختلف بر متوسط قطر شاخساره..... ۳۴

جدول۳-۴-تجزیه واریانس تأثیر عوامل مختلف بر طول شاخساره..... ۳۶

جدول۴-۴-تجزیه واریانس تأثیر عوامل مختلف برتعداد برگ..... ۳۸

جدول ۵-۴- تجزیه آماری تاثیر عوامل بنزیل ادنین و کیتوسان بر سطح برگ در شرایط کنترل شده..... ۴۰

جدول ۶-۴- مقایسه میانگین سطح برگ تحت تاثیر مقادیر مختلف کیتوسان در توت فرنگی..... ۴۰

جدول۷-۴-تجزیه واریانس تأثیر عوامل مختلف بر میزان کلرفیل..... ۴۲

جدول۸-۴-تجزیه واریانس تأثیر عوامل مختلف بر وزن تر توده گیاهی..... ۴۴

جدول۹-۴-تجزیه واریانس تأثیر عوامل مختلف بر وزن خشک توده گیاهی ۴۶

جدول۱۰-۴-تجزیه واریانس تأثیر عوامل مختلف بر طول بلندترین شاخساره..... ۴۸

فهرست نمودارها

عنوان

صفحه

نمودار ۱-۴-اثرات غلظتهای مختلف کیتوسان بر تعداد شاخساره..... ۳۳

نمودار ۲-۴-اثرات غلظتهای مختلف کیتوسان بر متوسط قطر شاخساره..... ۳۵

نمودار ۳-۴-اثرات غلظتهای مختلف بنزیل آدنین بر متوسط طول شاخساره..... ۳۶

نمودار ۴-۴-اثرات غلظتهای مختلف کیتوسان بر متوسط طول شاخساره..... ۳۷
نمودار ۵-۴-اثرات غلظتهای مختلف کیتوسان بر تعداد برگ..... ۳۹
نمودار ۶-۴-اثرات متقابل بنزیل آدنین با کیتوسان بر تعداد برگ..... ۳۹
نمودار ۷-۴-اثرات غلظتهای مختلف کیتوسان بر سطح برگ..... ۴۱
نمودار ۸-۴- نمودار تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوسان بر میزان کلروفیل..... ۴۳
نمودار ۹-۴- اثرات متقابل بنزیل آدنین با کیتوسان بر میزان کلروفیل..... ۴۳
نمودار ۱۰-۴- اثرات غلظتهای مختلف کیتوسان بر میزان وزن تر توده گیاهی..... ۴۵
نمودار ۱۱-۴- اثرات متقابل بنزیل آدنین با کیتوسان بر میزان وزن تر توده گیاهی..... ۴۶
نمودار ۱۲-۴- اثرات غلظتهای مختلف کیتوسان بر میزان وزن خشک توده گیاهی..... ۴۷
نمودار ۱۳-۴- غلظتهای مختلف‌کیتوسان بر طول بلند ترین شاخساره..... ۴۹
نمودار ۱۴-۴- اثرات متقابل بنزیل آدنین با کیتوسان بر طول بلند ترین شاخساره..... ۵۰

فهرست عکس ها

عنوان

صفحه

عکس شماره ۱ – ۵- تاثیر افزایش غلظت کیتوسان در محیط کشت حاوي ۱ میلي گرم بنزیل آدنین..... ۵۶
عکس شماره ۲ – ۵- تاثیر افزایش غلظت کیتوسان در محیط کشت حاوي ۲ میلي گرم بنزیل آدنین..... ۵۶

چکیده فارسی

ریزازدیادی توت فرنگی امکان تکثیر سریع و انبوه آن را فراهم می‌کند و با توجه به این‌که مرحله‌ی پرآوری، یکی از مراحل اصلی ریزازدیادی می‌باشد، در این تحقیق اثرات متقابل بنزیل‌آدنین و کیتوسان مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت MS تکمیل شده با بنزیل‌آدنین در دو سطح ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر و کیتوسان در پنج سطح صفر، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۰ تیمار در۸ تکرار تهیه شد. در کل ۸۰ واحد آزمایشی تشکیل‌دهنده مجموعه این تحقیق بود. پس از تهیه محیط کشت‌های مزبور، ریزنمونه های حاصل از زیرکشت‌های قبلی به شیشه‌های حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت انتقال داده شدند. پس از استقرار ریزنمونه‌ها، ظروف مربوطه در اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و شدت نور ۳۰۰۰-۲۰۰۰ لوکس قرار گرفت. پس از گذشت ۵۰ روز صفات مورد نظر که شامل میانگین تعداد شاخساره، میانگین قطر شاخساره، میانگین طول شاخساره، تعداد برگ، سطح برگ، میزان کلرفیل، وزن تر، وزن خشک، طول بلند ترین شاخساره و شیشه ای شدن بود، اندازه‌گیری و یادداشت برداری گردید. نتایج به‌دست آمده نشان داد که ترکیب ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین، و صفر میلی گرم در لیتر کیتوسان برای پرآوری شاخساره نسبت به سایر تیمارها مناسب‌ترین تیمار بود. میانگین شاخساره تولید شده در تیمار فوق ۵/۳ عدد و میانگین طول شاخساره ۹/۲۶ میلی متر بود. همچنین ۲۷/۶۳ عدد برگ با اندازه ۳/۵ از حداکثر ۴ از لحاظ نمره دهی و رنگ مناسب و عدم شیشه ای شدن به دست آمد. وزن تر توده گیاهی تولید شده در حد متوسط (۰/۵۳۳ گرم) بود. در تیمارهای بدون کیتوسان ، با افزایش غلظت بنزیل آدنین ، مجموع تعداد شاخساره افزایش یافت ولی ریز نمونه ها رشد رزت و متراکم داشت و برگهای کوچک زرد با بافت نرم آبدار تولید شد. بنابر این می توان نتیجه گرفت که کیتوسان در مر حله پرآوری توت فرنگی رقم سلوا اثر منفی دارد.

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- تاریخچه و خصوصیات گیاه شناسی توت فرنگی

توت فرنگی (*Fragaria ananassa Duch.*) نخستین بار در قرن ۱۴ میلادی از جنگلهای فرانسه به محیط گلخانه برای کشت منتقل شد و پس از آن در دیگر کشورها رواج یافت. در ایران نیز رقم اصلاح شده این میوه در زمان صدارت اتابک اعظم در دوره قاجاریه از فرانسه وارد و به همین علت این رقم اتابکی خوانده شد. اما توت فرنگی در کشور ما میوه ای ناشناخته نبوده و در نواحی شمال کشور به صورت خودرو به وفور می روید (جلیلی مرندی، ۱۳۸۶).

توت فرنگی متعلق به تیره گلسرخیان[۱]، جنس فراگاریا[۲] بوده و حاوی گونه های طبیعی از جمله توت فرنگی وحشی موسوم به جنگلی[۳] بوده که از طرف اصلاح گران، گونه اساسی از لحاظ ژنتیکی برای گونه های موجود در دنیا معرفی گردیده است. امروزه به صورت طبیعی و یا در اثر دورگ گیری انجام شده، گونه های متعدد موجود می باشد که در گستره وسیعی از شرایط اقلیمی پرورش داده می شوند (جلیلی مرندی، ۱۳۸۶).

توت فرنگی گیاه چند ساله علفی بوده و به طور متوسط ۵-۳ سال عمر می کند. این گیاه حاوی طوقه کوتاه می باشد که جوانه های جانبی بر روی آن قادر به تولید ساقه رونده یا گل آذین می باشد. مشخصات برخی از اندام های مختلف توت فرنگی به شرح ذیل می باشد:

۱- *Rosaceae*
۲- *Fragaria*
۳- *F.vesca*

ریشه های نابجا[1] از قسمت پائین طوقه و از دایره محیطیه طوقه حاصل می شوند و به تدریج روی ریشه های مسن قرار می گیرند. در حدود ۵۰-۲۵ درصد از ریشه ها در عمق بین صفر الی ۸ سانتی متری خاک، ۴۰-۲۵ درصد بین ۱۵-۸ سانتی متری خاک و ۱۵-۱۰ درصد از ریشه ها در عمق بین ۳۸-۱۵ سانتی متری عمق خاک مستقر می گردند. ریشه ها با توجه به شرایط اقلیمی ۳-۲ سال عمر می کنند (جلیلی مرندی ،۱۳۸۶).

ارتفاع طوقه[2] توت فرنگی بسیار کوتاه بوده و بین ۵-۱ سانتی مترمی باشد. از جوانه های جانبی طوقه نسبت به شرایط رشد، ساقه های رونده و گل آذین حاصل می شود (جلیلی مرندی،۱۳۸۶).

برگهای توت فرنگی از نوع برگ های مرکب سه برگچه ای با حاشیه مضرس می باشد. عمر متوسط برگ ها بر روی طوقه توت فرنگی در حدود ۵۶ روز می باشد.آرایش برگ ها[3] بر روی طوقه کوتاه به صورت مارپیچی می باشند (جلیلی مرندی ،۱۳۸۶).

تشکیل و رشد ساقه های رونده در طول روز بلندتر از ۱۴ ساعت در دمای بالا انجام می گیرد. هر ساقه رونده معمولاً حاوی دو گره می باشد و اولین میان گره طویل تر از میان گره دوم می باشد. جوانه اولین گره نزدیک به طوقه در طی فصل رشد به حالت رکود باقی می ماند و یا ساقه رونده جدید حاصل می کند اما جوانه گره دوم هنگام تماس با خاک، گیاه دختری [4] حاصل می کند (جلیلی مرندی ،۱۳۸۶).

گل های توت فرنگی بر روی گل آذین گرزن دوسویه[5] قرار می گیرند. معمولاً بر روی هر گل آذین ۱۵ عدد گل تشکیل می شود. گل های کامل توت فرنگی حاوی،۱۰ کاسبرگ، ۵ گلبرگ سفید رنگ ، ۳۵-۲۰ پرچم و ۵۰۰-۵۰ عدد تخمدان ساده می باشد. تعداد تخمدان در گل های اولیه نسبت به گل هایی که بعداً تشکیل می شوند، بیشتر می باشد.گرده افشانی در گل های توت فرنگی توسط حشرات و باد انجام می گیرد (جلیلی مرندی،۱۳۸۶).

میوه بعد از گرده افشانی و تلقیح تخمدان های موجود بر روی نهنج[6] گل، حاصل می شود. میوه از نوع

---

۱ - Adventitious roots
۲ - Crown
۳ - phyllotaxy
٤- Daughter plant
٥ -Dichasial cyme
٦ - Receptacle

مجتمع[1] می باشد و شامل مادگی های متعدد با تخمدان ساده بر روی یک نهنج مشترک بوده و هر مادگی به طور جداگانه بعد از عمل گرده افشانی و تلقیح ، میوه های حقیقی از نوع خشک نا شکوفا به نام آکن[2] حاصل می کند (جلیلی مرندی،۱۳۸۶).

۱-۱-۱-طبقه بندی ارقام توت فرنگی بر اساس زمان گلدهی

ارقام مختلف توت فرنگی از لحاظ زمان گلدهی به دو گروه بهاره[3] و چهار فصل یا همیشه بار[4] تقسیم می شوند.

گل انگیزی و تمایز گل ها در ارقام بهاره در اواخر تابستان هنگامی که طول روز به کمتر از ۱۴ ،ساعت و دمای محیط به پائین تر از ۱۵ درجه سانتی گراد تقلیل یابد از طریق برگها القا می گردد. از ارقام بهاره می توان به اتابکی، Asieta ، Missionary ، Senga Giana ، Pocahontas ، Red Gauntlet ، Fresno ، Tioga ، Sequoia ، Aliso ، Gorella اشاره نمود(جلیلی مرندی ،۱۳۸۶).

ارقام همیشه بار برای گل انگیزی و گل آغازی حساسیتی به طول روز ندارند و از گیاهان روز خنثی بشمار می آیند. در تولید تجاری این ارقام باید درواحد سطح، بوته های زیادی کشت نمود. زیرا بوته های همیشه بار به دلیل تولید محصول بیشتر از رشد ضعیف برخوردارمی باشند. ارقام سلوا، تانگو از این نوع می باشند (جلیلی مرندی ،۱۳۸۶).

۱-۲ – رقم توت فرنگی سلوا

رقم سلوا یک رقم جدید و مشخص از توت فرنگی، از نوع روز خنثی بوده که صفت مشخصه آن میوه دهی بعد از سه ماه بعد از کشت می باشد.

رقمی است که برای کشت تابستانه و زمستانه مناسب بوده و یک رقم پر محصول و با تولید استولون بالا در محیط گلخانه می باشد میوه های آن تجاری و بادوام بوده و اندازه میوه در مقایسه با رقم Tioga بزرگتر

---

۱ - Aggregate
۲ - Achene
۳ - June bearing
٤ - Ever bearing

است این رقم طعم عمومی بالایی دارد با وجود این محتوای میزان رطوبت میوه در مقایسه با سایر ارقام کم است. ویژگی های این رقم آن را برای استفاده تجاری برای کشت در مزارع خانگی مناسب می سازد.

۳-۱-کشت بافت

کشت بافت روشی است که جهت تکثیر درون شیشه ای اندامهای مختلف گیاهی در شرایط استریل(گندزدایی شده) مورد استفاده قرار می گیرد.

این فن در گیاه افزایی و بهنژادی گیاهی، تولید فرآورده های بیوشیمیایی، بیماری شناسی گیاهی، نگهداری و انبار کردن بافت های گیاهی، پژوهش های علمی و غیره کاربرد دارد.

اصطلاح ریزافزایی به طوراختصاصی به کاربرد فنون در کشت بافت برای گیاه افزایی با استفاده از بخش های کوچکی از گیاه که در شرایط گندزدایی شده در لوله آزمایش یا ظرف دیگر، پرورش می یابند، اطلاق می شود.

در عمل، بسیاری از افزایشگران گیاهی اصطلاح «ریزافزایی» و «کشت بافت» را مترادف هم بکار می برند تا هر شیوه گیاه افزایی در شرایط گندزدایی شده را توصیف کنند. ریزافزایی با جدا کردن بخش های کوچکی از گیاه آغاز می شود که آن را از میکروارگانیزم ها عاری می سازد و روی محیط کشت گندزدایی شده قرار می دهند (خوشخوی، ۱۳۷۸).

۴-۱-تاریخچه کشت بافت

در سال۱۸۳۸ شوان و شلیدن تئوری توانمندی[۱] را ارائه نمودند. براساس این تئوری هر سلول مستقل بوده و در اصل قادر به تولید یک گیاه کامل است. در واقع تئوری آنها پایه و اساس کشت بافت سلول گیاهی شد. اولین تلاش بوسیله Berlander در سال۱۹۰۲ انجام شد. ولی او در روش کشت بافت ناموفق بود. در سال ۱۹۳۹ نوبکرت، گوستریت و وایت برای اولین بار م وفق به تولید گیاه حاصل از کشت بافت شدند.

به دلیل تأخیر در کشف هورمونهای گیاهی، کشت بافت گیاهی، پس از کشت بافت حیوانی و انسانی، شروع شد. اولین هورمون تنظیم کننده رشد گیاهی که کشف شد، اکسین (IAA) بود که موفقیت بزرگی را

۱- Totipotency

برای کشت بافت در شرایط درون شیشه ای[1] بوجود آورد. کشف تنظیم کننده رشد کینتین (یک سیتوکنین) در سال ۱۹۵۵ انگیزه بیشتر حاصل نمود (باقری ، ۱۳۷۶).

۵-۱- موارد استفاده از کشت بافت در کشاورزی

- اصلاح نباتات از طریق گیاهان هاپلوئید
- ازدیاد غیر جنسی گیاهان به طریق تولید کلونی
- ایجاد گیاهان هیبرید
- تولید گیاهان عاری از عوامل بیماریزا
- تولید متابولیت های ثانویه
- مهندسی ژنتیک
- حفظ و نگهداری بافتهای کشت شده گیاهی تحت شرایط انجماد و ایجاد یک بانک ژن(خوشخوی، ۱۳۷۳).

۶-۱- تاریخچه کشت بافت توت فرنگی

بلکنگلن و میلر[2] اولین کسانی بودند که کاربرد کشت مریستم (ژاتاک) را برای زدودن ویروس از توت فرنگی توصیه کردند. پس از آن سایر پژوهشگران کشت مریستم را برای ویروس زدایی بسیاری از ارقام تجاری توت فرنگی به کار برده اند(خوشخوی، ۱۳۷۳).

آدامز[3] برای اولین بار ریزازدیادی توت فرنگی را گزارش کرد. بر اساس نتیجه گیری او به نظر می آید که امکان به دست آوردن شمار نامحدودی گیاهک از یک مریستم وجود دارد. نیشی و اوساوا[4] و بوکسوس[5] تولید انبوه توت فرنگی ویروس زدایی شده را توسط روشهای کشت درون شیشه ای گزارش کردند. فنونی که به وسیله نیشی و اوساوا شرح داده شده شامل تولید پینه و باززایی گیاهک از پینه می باشد. آنها دریافتند که

۱- Invitro
۲- Belkenglen & Miller
۳ -Adams
٤ - Nishi & Oosawa
٥ - Boxus

هنگام قرار گرفتن مریستم توت فرنگی روی محیط کشت لینسمایر و اسکوگ[1] به آن ۱۰ مول بنزیل آدنین افزوده شده بود، ۸۰ درصد از مریستم های کشت شده منجر به باززایی گیاه گردید. در این روش شاخساره هایی از جوانه های جانبی در پائین هر برگچه روی محیط کشت حاوی یک میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین تولید شد. نامبرده شمار جوانه های تشکیل شده به این روش را نامحدود اعلام کرد. (خوشخوی، ۱۳۷۳).

در ریزازدیادی تجاری درون شیشه ای گیاهان توت فرنگی معمولی ترین روش کار عبارت از تولید گیاهک های تولید شده از مریستم و نیز نگهداری بر روی محیط کشت اولیه و آزمون ویروسی می باشد. برای دوباره جوان سازی این گیاهان بایستی برگها و ریشه های قدیمی را برداشت و سپس آنها را در شرایط گندزدایی شده به محیط کشت اولیه تازه که به آن ۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین افزوده شده انتقال داد. پس از ۳ تا ۴ هفته بر روی این محیط کشت صفر تا ۳ جوانه جانبی بر روی قسمت پائینی دمبرگ قدیمی ترین برگ، پدیدار می شود. در طی ۶ تا ۸ هفته گیاهک هایی به صورت توده ای از جوانه های کم و بیش توسعه یافته بوجود می آید. جوانه ها باید به محیط کشت حاوی سیتوکینین، واکشت شوند، جوانه های جانبی به پرآوری ادامه می دهند اما در صورت انتقال به محیط کشت فاقد سیتوکینین، توسعه جوانه های جانبی متوقف شده و گیاهان جوان طبیعی ریشه دار، طی ۴ تا ۶ هفته بوجود می آیند. تمام ۷۴ رقمی که مورد آزمون قرار گرفتند واکنشی یکسان داشتند. بو سیله این فرآیند می توان چندین میلیون گیاه از یک گیاه مادری در طی یکسال به دست آورد (خوشخوی، ۱۳۷۳).

۷-۱ -مراحل تکثیر در محیط درون شیشه ای

۱-۷-۱-تهیه گیاه مادری

تهیه گیاه مادری که از نظر فیزیولوژیکی و بهداشتی در شرایط مطلوبی باشد، نقش مهمی در موفقیت ریزنمونه دارد. گیاهان مادری باید در گلخانه یا اتاق رشد که دارای دمای مناسب (۲۵ درجه سانتی گراد) و رطوبت نسبی مطلوب (۷۰ درصد) و نور کافی باشد، کشت شود. بهتر است گیاهان مادری خود عاری از ویروس بوده و از طریق گرما درمانی و کشت مریستم تولید شوند. جوان سازی گیاهان مادری با هرس شدید یا تنظیم کننده های رشد گیاهی از جمله سیتوکینین ها باعث افزایش واکنش ریزنمونه در محیط درون

٤- Linsmaier & Skoog

شیشه ای می شود. رعایت بهداشت گیاهان مادری موجب بهتر شدن شرایط رشد و واکنش ریزنمونه می گردد. اگر امکان پرورش گیاه مادری درگلخانه وجود ندارد، می توان شاخه های گیاهان مادری را قطع نموده و قاعده آن را در محلول غذایی و دما و نور مناسب قرار داد تا تولید شاخه های نرم نماید. می توان تعدادی از شاخه های گیاه مادری کشت شده در مزرعه را با کیسه پلاستیکی پوشانیده و یا با قارچکش محلول پاشی کرد(حسندخت و ابراهیمی، ۱۳۸۵).

۲-۷-۱- ضد عفونی ریز نمونه

ضد عفونی ریز نمونه ها به سه طریق صورت می گیرد:

۱- الکل (اتانل)

از الکل ۷۰ در صد جهت ضد عفونی ریز نمونه استفاده می شود چون الکل ۹۶ درصد باعث هیدراته شدن زیاد می شود از الکل ۹۶ درصد برای ضدعفونی میز و ابزار استفاده می شود استفاده از الکل همه میکروارگانیسم ها را از بین نمی برد بلکه آلودگی های سطحی را از بین می برد.

۲- هیپوکلرید سدیم (وایتکس)

از هیپوکلرید سدیم ۱/۵ تا ۲ درصد برای این منظور استفاده می شود چنانکه گیاه به آن حساس باشد از هیپوکلرید کلسیم استفاده می کنند .

۳- کلرید جیوه

از غلظت ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ (وزنی به حجمی)برای مدت ۲ تا ۱۲ دقیقه استفاده می شود.

پس از گندزدایی کردن، بافت ریزنمونه می‌بایستی چندین بار با آب مقطر سترون آبکشی شود تا هر ذره باقیمانده از ماده گندزدا برداشته شود. آنگاه قسمت انتهایی بافت آسیب دیده جدا می‌شود و ریزنمونه به اندازه‌های مورد نظر تقسیم می‌شود. پس از آن ریزنمونه بر روی محیط غذایی که برای حداکثر رشد آن گونه طرح‌ریزی شده قرار داده می‌شود (حسندخت و ابراهیمی، ۱۳۸۵).

۳-۷-۱-استقرار ریزنمونه ها روی محیط کشت

ریزنمونه ها می توانند جوانه جانبی یا انتهایی باشند. گاهی در اثر کشت ریزنمونه جوانه نابجا تولید می شود که احتمال وقوع جهش در آن وجود دارد. در تهیه ریزنمونه باید به نکات زیر توجه نمود:

۱-آلودگی قسمتهای هوایی گیاه کمتر از قسمتهای زیرزمینی است، بنابراین بهتر است ریزنمونه از اندامهای هوایی گرفته شود.

۲-آلودگی قسمتهای داخلی یک گیاه کمتر از قسمتهای خارجی است، بنابراین باید پوست سطوح خارجی حذف و ریزنمونه از قسمت داخلی تهیه شود.

۳-هر چه ریزنمونه کوچکتر باشد احتمال آلودگی کمتر است.

۴-در گیاهان چند ساله و چوبی ریزنمونه از شاخه جوان یا بافتهای چوبی نرم تهیه می شود.

۴-۷-۱- تکثیر

هدف اصلی این مرحله تکثیر سریع ریزنمونه ها می باشد که به روش جنین زایی از سلولهای سوماتیک و نمو جوانه های جانبی صورت می گیرد.

۵-۷-۱- ریشه زایی درون شیشه ای

شاخساره های به دست آمده جهت القای ریشه تحت تیمار قرار می گیرند. در برخی گونه ها بهترین نتیجه هنگام انتقال شاخساره ها به محیط ریشه زایی حاصل می شود. به طور کلی این مرحله نسلی است که ۴-۲ هفته طول می کشد و در طی آن گیاهچه ریشه دار می شود و تا حدودی سازگار می گردد.

۶-۷-۱- سازگار کردن گیاهان و انتقال به خاک

گیاهان تولید شده در محیط درون شیشه ای چون در شرایط رطوبت بالا رشد کرده اند، باید قبل از انتقال به گلخانه یا مزرعه با این شرایط سازگار شوند. به روشهای مختلفی می توان گیاهان را مقاوم نمود :