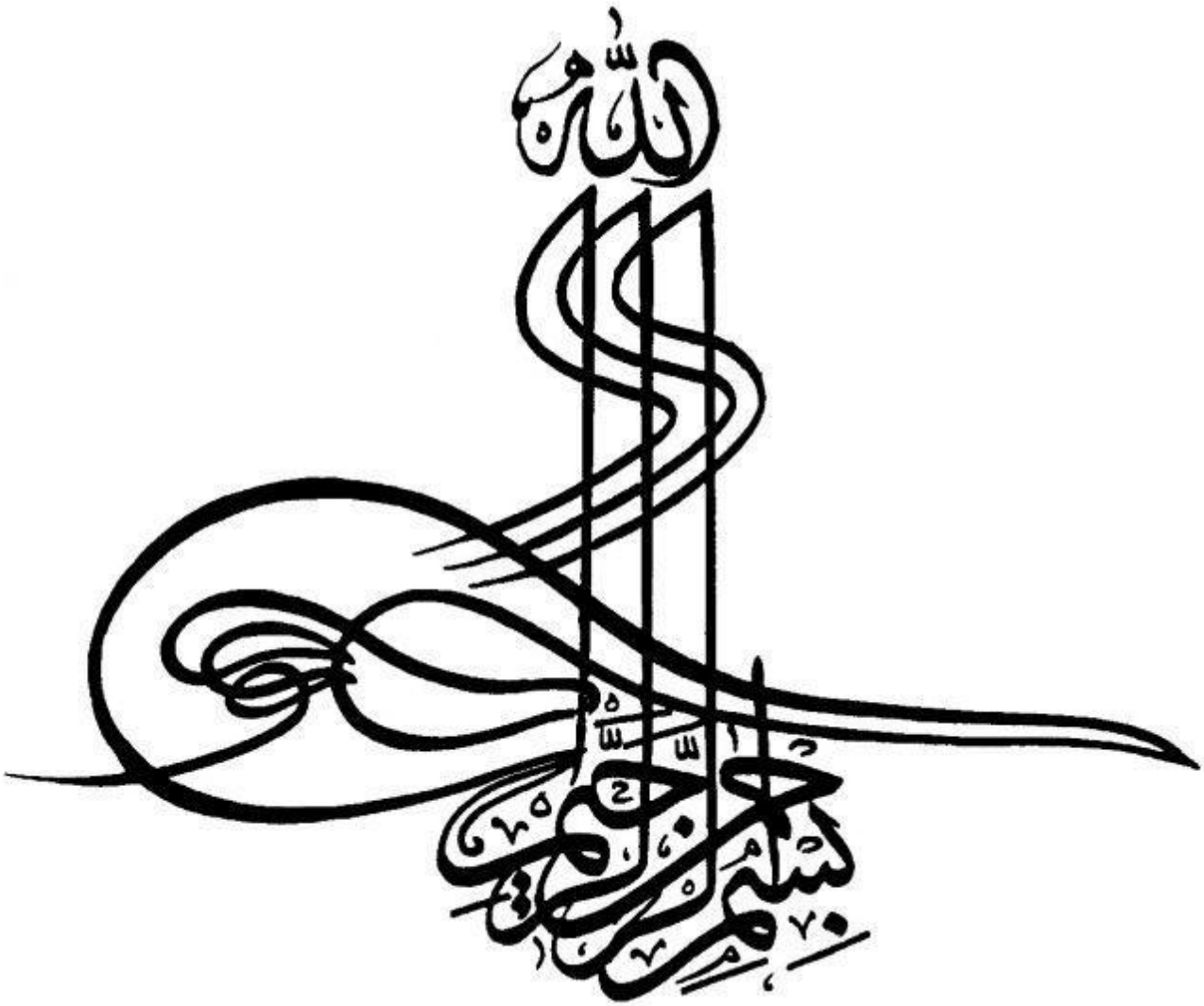
الله
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

گروه علوم باغبانی

پایان‌نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم باغبانی

عنوان

ریزازدیادی شمعدانی عطری با کشت ریزنمونه‌های گرهی، قطعات برگی، دمبرگی و برگ کامل

اساتید راهنما

آقای دکتر محمد باقر حسن پور اقدم آقای دکتر اصغر ابراهیم زاده

اساتید مشاور

آقای دکتر محمد علی اعظمی آقای دکتر علی ساعی

پژوهشگر

ملیحه فتح اللّه زاده کهانی

اسفند ۱۳۹۳

به نام پروردگار هستی بخش، آغاز و با نام او این دست نوشته حقیر را تقدیم می کنم:

به عزیزانی که دعای خیرشان بدرقه راهم بوده و هست

تقدیم به

پدرم

که انس با قرآن، عزیزترین میراث من از اوست.

مادرم

آیت صبر و طلایه دار ایثار و ایمان

آن دو فرشته ای که از خواسته هایشان گذشتند، سختی ها را به جان خریدند و خود را سپر بلای مشکلات و ناملایمات کردند تا من به جایگاهی که اکنون در آن ایستاده ام برسم.

معلمینم که راه علم آموزی را برایم هموار کردند

اساتیدم که چراغ هدایت این راه بودند

خواهران و برادرم که سبب دلگرمی ام هستند

نام خانوادگی دانشجو: فتح الله زاده کهانی نام: ملیحه

اساتید راهنما: دکتر محمد باقر حسن‌پور اقدم دکتر اصغر ابراهیم زاده

اساتید مشاور: دکتر محمد علی اعظمی دکتر علی ساعی

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد رشته: کشاورزی گرایش: علوم باغبانی

دانشگاه: مراغه دانشکده: کشاورزی تاریخ دانش آموختگی: تعداد صفحه: ۱۰٤

کلید واژه‌ها: شمعدانی عطری – ریزازدیادی – کالوس‌زایی– BAP (٦– بنزیل آمینوپورین)– NAA (α– نفتالین استیک اسید)–IBA (ایندول بوتریک اسید)

چکیده

شمعدانی عطری با نام علمی *Pelargonium odoratissimum* (L.) L'Her., یکی از پراهمیت‌ترین گیاهان عطری متعلق به خانواده Geraniaceae می‌باشد. این گیاه به دلیل داشتن اسانس و کاربرد روزافزون آن در صنایع مختلف عطرسازی، آرایشی و بهداشتی در نقاط مختلف جهان کشت می‌گردد. این پژوهش به منظور حصول به پروتوکلی کارآمد و سریع در ریزازدیادی شمعدانی عطری با استفاده از ریزنمونه‌های قطعات برگی، دمبرگی، برگ کامل و گرهی ساقه در محیط کشت MS انجام شد. در این پژوهش باززایی شاخساره‌های نابجا از ریزنمونه‌های گرهی در شرایط درون شیشه‌ای در محیط کشت MS حاوی ترکیب‌های تیماری با غلظت‌های (۱ و۲ میلی‌گرم بر لیترBAP) + ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA با موفقیت انجام شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا گردید. بیشترین میانگین تعداد شاخساره، حداکثر تعداد شاخساره به ریزنمونه و نیز کمترین میزان قهوه‌ای شدن در محیط MS حاوی تیمار ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP بدست آمد. در آزمایش دوم، از شاخساره‌های حاصل از ریزنمونه‌های گرهی در شرایط درون شیشه‌ای برای تهیه ریزنمونه‌های قطعات برگی، دمبرگی و برگ کامل استفاده شد. به منظور پرآوری، این ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی نصف غلظت عناصر ماکرو و ترکیب‌های تیماری با غلظت‌های (۱، ۱/۵، ۲ و ٤/۵ میلی‌گرم بر لیتر) BAP + (۰/۱، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) NAA کشت شدند. این آزمایش در قالب فاکتوریل بر مبنای طرح پایه کاملا تصادفی انجام شد. کالوس‌زایی در هر سه نوع ریزنمونه مشاهده شد. حداکثر کالوس‌زایی، بیشترین تعداد شاخساره و طول شاخساره و کمترین درصد قهوه‌ای شدن در قطعات برگی با ترکیب تیماری (۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA)، در ریزنمونه دمبرگی با ترکیب تیماری (۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم بر

لیتر NAA) و ریزنمونه برگ کامل با ترکیب تیماری (۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA) حاصل شد. بررسی روند تغییرات میانگین تعداد، طول ریشه و نیز درصد ریشه‌زایی در این ریزنمونه‌ها، با غلظت‌های مختلف NAA نشان داد که در غلظت (۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر)، در تعداد، طول ریشه و نیز درصد ریشه‌زایی افزایش چشمگیری مشاهده شد. در نهایت، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به گلدان‌های کوچک دارای مخلوطی از پیت‌ماس و پرلایت با نسبت حجمی ۱:۱ منتقل شدند. عادت‌دهی گیاهچه‌های شمعدانی عطری در شرایط گلخانه‌ای با میزان بقای بالا با موفقیت انجام شد.

فهرست مطالب

۱- فصل اول: مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- مقدمه..... ۱

۱-۲- بررسی منابع علمی ۲

۱-۳- شـــمعدانی عطری ۲

۱-۳-۱- مشخصات گیاه شناسی..... ۲

۱-۳-۲- پراکندگی جغرافیایی گونه‌های شمعدانی عطری..... ٤

۱-۳-۳- اهمیت دارویی شمعدانی عطری..... ٤

۱-٤-تاریخچه کشت بافت و سلول گیاهی..... ٦

۱-۵-ریزازدیادی..... ۷

۱-۵-۱- عوامل مؤثر بر موفقیت ریزازدیادی ۸

۱-۵-۱-۱-ژنوتیپ..... ۸

۱-۵-۱-۲-انتخاب ریزنمونه..... ۸

۱-۵-۱-۳-اثرات هورمون‌ها، تنظیم کننده‌های رشد و اجزای محیط کشت..... ۸

۱-۵-۲- مزایای ریزازدیادی..... ۹

۱-۵-۲-۱-تکثیر سریع کلون‌ها..... ۹

۱-۵-۲-۲-تکثیر گیاهان عاری از پاتوژن‌ها..... ۱۰

۱-۵-۲-۳-تولید گیاهان هیبرید در گونه‌های ناسازگار..... ۱۰

۱-۵-۲-٤-القای موتاسیون در شرایط درون شیشه‌ای..... ۱۱

فهرست مطالب

۱-۵-۲-۵-حفظ و نگهداری منابع ژنتیکی..... ۱۲

۱-۵-۳- معایب ریزازدیادی..... ۱۲

۱-۵-۳-۱-مشکلات پاتولوژیکی..... ۱۳

۱-۵-۳-۲-مشکلات فیزیولوژیکی و نموی..... ۱۳

۱-۵-۳-۲-۱-نکروزه شدن نوک شاخساره..... ۱٤

۱-۵-۳-۲-۲-بدشکلی و تکثیر بیش از حد بافت..... ۱٤

۱-۵-۳-۳-تغییرات اپی‌ژنتیکی و تنوع سوماکلونال..... ۱٤

۱-۵-۳-٤-ویتریفیکاسیون..... ۱۵

۱-۵-۳-۵-پدیده قهوه‌ای شدن..... ۱٦

۱-۵-٤- مراحل ریزازدیادی..... ۱۹

۱-۵-٤-۱-مرحله صفر یا مرحله نگهداری گیاه مادری..... ۲۰

۱-۵-٤-۲-مرحله اول: استقرار ریزنمونه‌های ضدعفونی شده..... ۲۱

۱-۵-٤-۲-۱-مرحله ضدعفونی..... ۲۲

۱-۰-٤-۲-۲-اجزای محیط کشت..... -۲۲

۱-۵-٤-۳-مرحله تکثیر و پرآوری..... ۲٦

۱-۵-٤-۳-۱-باززایی مستقیم بر حسب نوع ریزنمونه..... ۲۷

۱-۵-٤-۳-۲-باززایی غیرمستقیم بر حسب نوع ریزنمونه..... ۳۰

۱-۵-٤-٤-مرحله ریشه‌زایی ۳۳

۱-۵-٤-۵-مرحله سازگاری ۳۵

۲- فصل دوم

۲-۱-مواد گیاهی ٤۲

۲-۲-تهیه محلول پایه ٤۲

۲-۳-تهیه محیط کشت ٤۲

۲-٤-آماده سازی هود لامینار ٤٤

۲-۵-استریل کردن ریزنمونه‌ها ٤۵

۲-٦-نحوه انجام آزمایش ٤٦

۲-٦-۱- آزمایش اول ٤٦

۲-٦-۱-۱-مرحله استقرار و پرآوری ٤٦

۲-٦-۱-۲-مرحله ریشه‌زایی ٤۷

۲-٦-۱-۳-مرحله سازگاری ٤۷

۲-٦-۱-٤-تجزیه آماری ٤۷

۲-٦-۲- آزمایش دوم ٤۸

۲-٦-۲-۱-مرحله استقرار ٤۸

۲-٦-۲-۲-مرحله پرآوری ٤۹

۲-٦-۲-۳-مرحله ریشه‌زایی ٤۹

۲-٦-۲-٤-مرحله سازگاری..... ۵۰

۲-٦-۲-۵-تجزیه آماری..... ۵۰

الف) آزمایش اول **۵۲**

۳-۱-تأثیر ریزنمونه‌ی گرهی و ترکیب‌های تیماری بر پرآوری شمعدانی عطری..... ۵۲

۳-۱-۱- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در تشکیل شاخساره‌های حاصل از ریزنمونه‌های گرهی..... ۵۲

۳-۱-۲- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در تشکیل شاخساره‌های حاصل از ریزنمونه‌های گرهی..... ٥٤

۳-۱-۳- تجزیه واریانس صفات مرتبط با ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های گرهی..... ۵۸

۳-۱-٤- مقایسه میانگین صفات ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های گرهی..... ٦۰

۳-۲-تأثیر ریزنمونه‌های قطعات برگی، دمبرگی و برگ کامل و نوع ترکیب تیماری بر پرآوری شمعدانی عطری..... ٦۳

۳-۲-۱- تجزیه واریانس صفات مرتبط با تشکیل کالوس و پرآوری شاخساره‌های حاصل از آن در ریزنمونه‌های قطعات برگی، دمبرگی و برگ کامل..... ٦۳

۳-۲-۲- مقایسه میانگین صفات در تشکیل کالوس و پرآوری قطعات برگی، دمبرگی و برگ کامل..... ٦۵

۳-۲-۲-۱-درصد کالوس‌زایی..... ٦۵

۳-۲-۲-۲-میانگین تعداد شاخساره..... ٦۹

۳-۲-۲-۳-طول شاخساره..... ۷۳

۳-۲-۲-٤-حداکثرتعداد شاخساره به ریزنمونه..... ۷٦

۳-۲-۲-۵-درصد قهوه‌ای شدن..... ۸۰

۳-۲-۳- تجزیه واریانس صفات ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های قطعات برگی، دمبرگی و برگ کامل..... ۸٤

فهرست مطالب

۳-۲-۳-۱-نتایج مقایسه میانگین صفات مرتبط با ریشه‌زایی در ریزنمونه‌های قطعات برگی، دمبرگی و برگ کامل....۸٦

۳-۳-نتیجه‌گیری و پیشنهادات..... ۹۲

۳-۳-۱- نتیجه‌گیری کلی..... ۹۲

۳-۳-۲- پیشنهادات..... ۹٤

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- مقدمه

شمعدانی عطری با نام علمی *Pelargonium odoratissimum* (L.) L'Her. یکی از پراهمیت‌ترین گیاهان عطری متعلق به خانواده Geraniaceae می‌باشد. این گیاه چند ساله بوده و با قلمه چوب نرم ساقه قابلیت تکثیر محدودی دارد. اسانس بدست آمده از قسمت‌های علفی و تازه گیاه به طور وسیعی در صنایع عطر و ادکلن، آرایشی و بهداشتی استفاده می‌گردد. این گیاه و فرآورده‌های آن دارای ویژگی‌های ضد میکروبی، ضد قارچی، حشره‌کشی و آفت کشی نیز می‌باشد (Ghanem و همکاران، ۲۰۰۸).

طی سال‌های اخیر، کشت سلول، بافت و اندام‌های گیاهی به طور سریع گسترش یافته است، بطوریکه امروزه به عنوان یک ابزار مهم در بیوتکنولوژی، باغبانی، جنگل‌داری و صنعت مطرح می‌باشد. از دست آوردهای کشت بافت می‌توان به امکان تلاقی‌های درون و بین‌گونه‌ای، تلاقی‌های بین جنسی، ریزازدیادی، تنوع سوماکلونال، بذور کپسوله شده و غیره اشاره نمود (شریفی و کاظمی پور، ۱۳۸۸). به دلیل سخت ریشه‌زا بودن قلمه‌های شمعدانی عطری، محققین برای تولید در مقیاس وسیع این گیاه به کشت بافت آن روی آورده‌اند. از جمله تکنیک‌های ریزازدیادی شمعدانی عطری، کشت ریزنمونه‌های اندام‌های مختلف گیاه در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد. برای باززایی مستقیم شاخساره از ریزنمونه‌های مختلف شمعدانی عطری از محیط کشت‌های جامد استفاده می‌شود، درحالیکه استفاده از محیط کشت مایع به منظور تولید کالوس از ریزنمونه‌های برگی و سپس القای شاخساره و ریشه در شمعدانی عطری نیز بررسی شده است که در آن از تنظیم‌کننده‌های رشد (آدنین دی‌سولفات) ADS + BA + NAA استفاده گردیده است (Gupta و همکاران، ۲۰۰۲). بر این اساس، بررسی این گیاه در حوزه کشت بافت به عنوان یک روش کاربردی برای تولید انبوه، مفید خواهد بود. علاوه بر این، بهبود و توسعه روش‌های

کشت درون شیشه‌ای برای این گیاه یک قدم پایه‌ای و اساسی جهت ادامه تحقیقات در زمینهٔ تولید متابولیت‌های ثانویه آن در شرایط درون شیشه‌ای و دست‌ورزی مسیرهای سنتزی متابولیت‌های ثانویه آن محسوب می‌شود.

۱-۲- بررسی منابع علمی

۱-۳- شـــمعدانی عطری

۱-۳-۱- مشخصات گیاه شناسی

راســته Geraniales دارای چندین خانواده از جمله خانواده Geraniaceae می‌باشــد. در این خانواده پنج جنس مهم شـــامـل *Erodium*، *Geranium*، *Monsonia*، *Pelargonium* و *Sarcocaulon* وجود دارد. دو جنس *Pelargonium* و *Geranium* به عنوان شـمعدانی شـناخته شده‌اند ولی به خاطر شباهت نام عمومی آن‌ها اغلب اشـتباهاتی رخ می‌داد. در آغاز هر دو جنس هم نام بودند تا این که در سال ۱۷۸۹ تفکیک شده و در حال حاضر جنس *Geranium* دارای ٤۰۰ گونه اسـت که به اسـتثنای *Geranium macorrhizum* به طور وسـیعی در مناطق گرمسیری پراکنده شده‌اند (Weiss، ۱۹۹۷).

Geranium

جنس *Geranium* دارای گونه‌هایی با برگ‌های معطر شناخته شده است ولی تنها گونهٔ *G. macarrhizum* برای تولید اسانس پرورش داده می‌شود (Weiss، ۱۹۹۷). این گونه شمعدانی (*G. macarrhizum*) اغلب شمعدانی ریشه بزرگ نامیده می‌شود، گیاهی است علفی، چند ساله با ریشه‌های بزرگ قهوه‌ای، برگ‌ها سبز و دارای بریدگی عمیق با ۵ تا ۷ دندانه، دمگل کرک‌دار دارای غده‌های ترشحی، گل‌ها سفید، صورتی تا ارغوانی با گلبرگ‌های بزرگ در خوشه گل، میوه طویل، نقطه نقطه دارای بذرهای زبر و قهوه‌ای، برگساره‌ها دارای عطر و اسانس بوده

که اسانس آن از طریق تقطیر با بخار آب استحصال می‌گردد (Weiss، ۱۹۹۷).

Pelargonium

Pelargonium cucullatuml L'Herit اولین گونه‌ای بود که در سال ۱۶۷۲ توسط پاول هرمان[1] بدست آمد. کشت تجاری این گیاه به منظور استحصال اسانس قبل از قرن نوزدهم در فرانسه آغاز شد. نام جنس از نام یونانی Pelargos گرفته شده است که دارای ۵۰ زیر جنس شناخته شده می‌باشد. گونه‌هایی که به طور تجاری برای تولید اسانس مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل *P.odoratissimum P. graveolens* ، *P. capitatum* و *P. radens* می‌باشند (Saraswathi و همکاران، ۲۰۱۱).

شمعدانی عطری گیاهی است بوته‌ای، چند ساله، کوچک و شاخساره‌ای، ارتفاع حدود ۱/۳ متر، برگ‌ها معطر با بوی نعناع مانند که روی ساقه‌ها و انشعابات آن قرار دارند. برگ‌ها متقابل به طول ۶/۵ تا ۱۳/۵ سانتی‌متر بسیار منقسم با ۷– ۵ لوب شانه‌ای، دمبرگ‌ها طویل، مقاوم و دارای گوشوارک، رنگ برگ‌ها در گونه‌ها اغلب سبز است اگر چه سبز تیره، سبز زرد روشن تا تیره یا سبز روشن نیز در بعضی گونه‌ها دیده می‌شود. اسانس از برگ‌ها و شاخساره‌های سبز تازه بدست می‌آید، گل آذین جانبی با ۷–۳ گل صورتی، لوله کاسه گل کرک‌دار به ۵ لوله تقسیم شده و ۵ گلبرگ وارد آن می‌شود، تخمدان فوقانی دارای ۵ لوب هر لوب مختوم به یک تخمک معلق؛ خامه کوتاه و کرک‌دار و میوه طویل می‌باشد. اگر چه شمعدانی‌ها به طور طبیعی دارای بذر نمی‌باشند اما بعضی از ارقام قدرت تشکیل بذر را دارند. بذرها کوچک و قهوه‌ای رنگ که پوشش‌های بذری سخت داشته و به کرک‌های درازی متصل هستند (Weiss، ۱۹۹۷). اسانس، بیشتر در غده‌های ترشحی قسمت‌های سبز گیاه توزیع می‌شود که تعداد و اندازه

1- Paul Herman

آن‌ها، مقدار مورد نظر اسانس را مشخص می‌کند. به دلیل توزیع غدد ترشحی بر روی برگ‌ها، اندازه و تعداد برگ فاکتورهای مهمی در تولید اسانس به شمار می‌روند (Andrade و همکاران، ۲۰۱۰).

۱-۳-۲- پراکندگی جغرافیایی گونه‌های شمعدانی عطری

Pelargonium و *Geranium* گیاهانی طالب آب و هوای گرم و آب فراوان هستند که در ارتفاعات ٤۰۰ تا ١٦۰۰ متری رشد می‌کنند. جنس *Pelargonium* دارای ۲۵۰ گونه است که ۲۰۰ گونه در آفریقای جنوبی ، ۱۸ گونه در آفریقای مرکزی، ۸ گونه در استرالیا، ۲ گونه در ماداگاسکار، ۲ گونه در خاورمیانه و گونه آخر در جزایر ایالات متحده یافت می‌شود. زمستان‌های گرم توأم با دماهای متوسط تابستان و بارندگی یکنواخت سالیانه برای رشد این گیاه مناسب است. اگر تحت شرایط آبیاری کافی قرار بگیرد، مقاوم به دمای بالای ٤۳ درجه سانتیگراد نیز خواهد بود (webb، ۱۹۸٤).

۱-۳-۳- اهمیت دارویی شمعدانی عطری

گیاهان بومی شمعدانی، منبعی از مواد اولیه برای ساخت تعدادی از داروها محسوب می‌شوند (Gupta، ۱۹۹٤). به دلیل بالا بودن هزینه تولید داروهای شیمیایی و عوارض جانبی آن‌ها؛ رویکرد جهانی بیشتر به سمت استفاده از داروهایی با منشأ طبیعی متمایل گریده است. تعدادی از گیاهان متعلق به جنس *Pelargonium* نیز به دلیل فواید دارویی برای سلامتی انسان در سیستم‌های سنتی دارویی طبقه بندی می‌شوند. گونه‌های شمعدانی بطور وسیع به عنوان داروهای سنتی در مناطق آفریقای جنوبی به منظور اثرات درمانی و آرام‌بخشی آن‌ها روی بیماری‌های مختلف از جمله تب، اسهال، بیماری‌های تنفسی و زخم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Saraswathi و همکاران، ۲۰۱۱).

قسمت‌های علفی گیاه در زمان‌های قدیم برای اهداف دارویی در درمان مالاریا، التهاب، ناهنجاری‌های شکمی و زهدانی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. همچنین عصاره‌های حاصل از ریشه‌ها فعالیت ضد باکتریایی و قارچی را نشان داده‌اند (Mativandlela و همکاران، ۲۰۰۶). برگ‌ها در درمان زخم‌ها و عفونت‌های خارجی و بیماری‌های پوستی استفاده شده و اسانس استحصالی از آن‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی علیه میکروارگانیسم‌های باکتریایی و قارچی می‌باشد (Kolodziej and Kiderlen، ۲۰۰۷). اسانس شمعدانی عطری از نظر درمانی دارای اثر ضدافسردگی وضدعفونی کننده است، همچنین تقویت کننده کبد و کلیه‌هاست و برای درمان بیماری زردی، سنگ‌های کلیوی و عفونت‌های مختلف سیستم ادراری نیز بکار می‌رود (زرگری، ۱۳۷۲؛ کریمی، ۱۳۹۰).

مونوترپنوئیدهای اسانس شمعدانی عطری آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند که علیه سرطان‌های خاصی از جمله سرطان رحم فعالیت می‌کنند. تعدادی از مونوترپن‌های دی‌اتری فعالیت ضد توموری داشته و قادرند از تشکیل یا پیشرفت سرطان ممانعت کرده و باعث توقف رشد یا توسعه تومور شوند. اجزای اصلی اسانس شمعدانی عطری شامل سیترونلول و ترانس - ژرانیول می‌باشد که دارای فعالیت ضدسرطانی بوده و به عنوان آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند (Saraswathi و همکاران، ۲۰۱۱). از گونه‌های مهم شمعدانی که دارای این خصوصیات هستند می‌توان به *P. graveolens* ,*P. odoratissim* , *P. radula* , *P. reniforme*, *P. sidoides* اشاره کرد. برخی از گونه‌های شمعدانی مانند *P. reniform* تأثیرات آنتی‌اکسیدانی از خود نشان داده و مقدار معنی‌داری از ترکیبات فنولی در برگ‌ها و ریشه‌ها را برای افزایش دادن فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارا می‌باشند (Kolodziej and Kiderlen، ۲۰۰۷).

۱-٤- تاریخچه کشت بافت و سلول گیاهی

کشت بافت گیاهی نوعی تکثیر غیرجنسی در شرایط درون شیشه‌ای است. مزیت تکثیر از این طریق نسبت به سایر روش‌های مرسوم، تولید تعداد زیادی گیاه با محتوای ژنتیکی یکسان و کشت یکنواخت در زمان کوتاه‌تر و فضای نسبتا محدود می‌باشد (Kumar، ۲۰۰۵).

در سال ۱۸۳۸ شوان[1] تئوری توتی پوتنسی[2] را ارائه نمود. براساس این تئوری، هر سلول زنده قادر به تولید یک گیاه کامل است. هابرلند[3] در دهه ۱۸۹۰ اولین شخصی بود که در زمینه کشت سلول گیاهی تحقیقاتی انجام داد. این محقق سلول‌ها را از گیاهان جدا کرده و در یک محلول غذایی ساده نگهداری کرد. به تدریج با گذشت زمان و تکمیل محیط‌های غذایی، امکان کشت بافت‌های مختلف گیاهی نیز فراهم گردید (به نقل از شریفی و کاظمی‌پور، ۱۳۸۸).

پس از آن، محققان متعددی شروع به معرفی کشت سلول گیاهی کرده که تقسیم سلولی و استقرار رشد را در کشت‌های انجام یافته گزارش دادند. در دهه ۱۹۳۰ نقطه عطف ویژه‌ای در رابطه با امکان باززایی گیاهان کامل از کشت سلول و بافت ایجاد شد. در نتیجه، پیشرفت‌های جدیدی در ریزازدیادی گیاهان در مقیاس وسیع به وجود آمد. در سال ۱۹۳۹ نوبکرت، گوستریت و وایت[4] برای اولین بار موفق به تولید گیاه حاصل از کشت بافت شدند. بعد از جنگ جهانی دوم، پیشرفت در این زمینه بسیار سریع بود و نتایج با ارزش و مهمی برای کشاورزی، جنگل‌داری و باغبانی به همراه داشت (باقری و صفاری، ۱۳۷٦).

1- Schwann
2-Totipotency
3- Haberlandt
4- Nobecourt, Gaustheret and White

در سال ۱۹۵۷ اسکوگ و میلر به نکته مهم دیگری در مورد نقش هورمون‌ها در شکل‌گیری اندام‌های گیاهی دست یافتند. آن‌ها ثابت کردند که تمایز ریشه و شاخساره در کشت بافت مغز تنباکو به نسبت میان اکسین و سایتوکینین بستگی داشت و تمایز این اندام‌ها با تغییرات نسبت این دو هورمون در محیط کشت قابل تنظیم است. به طورکلی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی با داشتن اثرات عمده و اغلب اساسی روی متابولیت‌های اولیه و ثانویه گیاهان شناخته شده‌اند. در واقع در کشت سلول و بافت گیاهی اغلب به وجود آن‌ها در محیط کشت نیاز می‌باشد. در دهه ۱۹۷۰ محققان گزارش‌هایی مبنی بر کشت سوسپانسیون سلولی ارائه دادند و از آن زمان تا به امروز پیشرفت‌های وسیعی در تکنولوژی فرآیندها برای کشت بافت و سلول گیاهی به دست آمده است (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲).

کشت بافت گیاهی در زمینه گیاهان دارویی کاربردهای متعددی دارد که از جمله مهمترین آن‌ها می‌توان به تکثیر انبوه و سریع گیاهان دارویی یکنواخت از لحاظ محتوای ژنتیکی و کیفی، حفظ گونه‌های گیاهی در حال انقراض از طریق نگهداری در شرایط انجماد، تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای از طریق کشت سوسپانسیون سلولی و کشت اندام گیاهی (نوری قنبلانی، ۱۳۷۱)، تولید و انتخاب گیاهان مقاوم به بیماری‌ها با کشت پروتوپلاست، سوسپانسیون سلولی، کشت کالوس و مریستم اشاره کرد (شریفی و کاظمی‌پور، ۱۳۸۸).

۱-۵- ریزازدیادی

ریزازدیادی می‌تواند با عنوان باززایی درون شیشه‌ای گیاهان از اندام، بافت، سلول‌ها یا پروتوپلاست با استفاده از تکنیک‌های کشت بافتی برای توسعه گیاهان شبیه به اصل از یک ژنوتیپ منتخب تعریف شود. به طورکلی قسمتی از بافت گیاه از جمله شاخساره‌ها (نوک، گره یا میانگره)، قطعات برگی و دمبرگی را که برای کشت استفاده می‌گردند، یک ریزنمونه می‌نامند که عموماً بافت‌های جوان در این مورد پاسخ بهتری نشان می‌دهند (kumar و

همکاران، ۲۰۰۸).

۱-۵-۱- عوامل مؤثر بر موفقیت ریزازدیادی

موفقیت در ریزازدیادی و کشت بافت به عوامل متعددی بستگی دارد که برخی از این عوامل عبارتند از:

۱-۵-۱-۱- ژنوتیپ

توانایی گونه‌ها و واریته‌های مختلف جهت باززایی و کشت بافت متفاوت است و هر گونه، شرایط محیطی خاصی را نیاز دارد. بنابراین لازم است برای هر گونه و یا واریته گیاهی تحقیقات تکمیلی انجام شود. به طور کلی گیاهانی که به سادگی ازدیاد می‌شوند همانند گیاهان علفی که تکثیر ساده‌ای دارند از طریق ریزازدیادی نیز به سادگی تکثیر می‌گردند (شریفی و کاظمی‌پور، ۱۳۸۸).

۱-۵-۱-۲- انتخاب ریزنمونه

انتخاب ریزنمونه مسئله‌ای کلیدی و اساسی در موفقیت ریزازدیادی محسوب می‌شود. هر چه ریزنمونه از قسمت‌های جوان‌تر و فعال‌تر گیاه انتخاب شود مناسب‌تر است. عواملی همچون اندازه ریزنمونه، سالم بودن شاخساره، انتهایی بودن شاخساره در مقابل شاخساره‌های جانبی و همچنین وضعیت خواب جوانه بر روی فعالیت ریزنمونه مؤثر می‌باشند. باززایی ریزنمونه‌های جوان‌تر، آسان‌تر از ریزنمونه‌هایی است که از بافت‌های مسن تهیه می‌شود. در ضمن ویژگی ژنتیکی ریزنمونه نیز در باززایی مؤثر می‌باشد (جلیلی مرندی، ۱۳۸۲).

۱-۵-۱-۳- اثرات هورمون‌ها، تنظیم کننده‌های رشد و اجزای محیط کشت

محیط کشت‌های استاندارد فراوانی وجود دارد که رایج‌ترین آن‌ها محیط کشت Murashig and Skoog (۱۹۶۲) می‌باشد. برای ریزازدیادی تجاری، نیاز به بهینه‌سازی ترکیب عناصر غذایی محیط کشت وجود دارد، علاوه بر

عناصر، باید شرایط محیطی نیز بررسی و بهینه گردد. آگار و ساکارز به عنوان نگهدارنده و منبع انرژی، به علت هزینه پایین از اجزای متداول محیط‌های کشت محسوب می‌شوند. هورمون‌ها و تنظیم کننده‌های رشد نیز از اجزای محیط کشت بوده که علاوه بر ایجاد یک سطح پایه رشدی، برای هدایت رشد و نمو ریزنمونه استفاده می‌گردند؛ به طوری که تغییر غلظت آن‌ها مرحله رشدی ریزنمونه را تغییر می‌دهد برای مثال ایجاد کالوس، ریشه‌چه، ساقه‌چه را تحریک می‌کنند (شریفی و کاظمی‌پور، ۱۳۸۸).

۱-۵-۲- مزایای ریزازدیادی

تولید انبوه گیاهانی با ساختار ژنتیکی یکسان، معمول‌ترین مزیتی است که به ریزازدیادی نسبت داده می‌شود. از دیگر مزایای مهم ریزازدیادی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱-۵-۲-۱- تکثیر سریع کلون‌ها

با ریزازیادی ممکن است از یک ریزنمونه، تعداد بسیار زیادی شاخساره جدید به وجود آید که هر کدام از این شاخساره‌ها را می‌توان واکشت کرده و تعداد بسیار زیادی گیاه جدید تولید کرد. برای تشکیل کلون، تکثیر جوانه‌های محوری، کشت نوک شاخساره و کشت مریستم معمولاً مناسب است؛ زیرا به ندرت در این جوانه‌ها تغییرات ژنتیکی رخ می‌دهد. ریزنمونه‌های نوک شاخساره غالباً دارای یک یا دو سرآغازه[1] برگ به همراه منطقه مریستمی می‌باشند. به همین خاطر این نوع ریزنمونه‌ها سریع‌تر رشد کرده و میزان بقاء بیشتری دارند (پیری و نظریان، ۱۳۸۰).

[1] Primordia