بسم الله الرحمن الرحیم
الحمد لله رب العالمین الرحمن الرحیم مالک یوم الدین
اهدنا الصراط المستقیم صراط الذین
انعمت علیهم غیر المغضوب علیهم
ولا الضالین

دانشگاه اراک

دانشکده علوم پایه

کارشناسی ارشد زیست شناسی (فیزیولوژی گیاهی)

القاء تولید کالوس و بررسی اثر تنش شوری بر کالوس گیاه *Salsola arbuscula* در شرایط کشت *In vitro*

پژوهشگر

زهره قنبرزاده

استاد راهنما

دکتر فریبا امینی

استاد مشاور

دکتر مهری عسکری

تابستان ۱۳۹۱

بسم ا... الرحمن الرحیم

القاء تولید کالوس و بررسی اثر تنش شوری بر کالوس گیاه *Salsola arbuscula* در شرایط کشت *In vitro*

توسط:

زهره قنبرزاده

پایان نامه

ارائه شده به مدیریت تحصیلات تکمیلی به عنوان بخشی از فعالیت های

تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته زیست شناسی-گرایش فیزیولوژی گیاهی

از

دانشگاه اراک

اراک-ایران

ارزیابی و تصویب شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: .....

دکتر فریبا امینی (استاد راهنما) ..... استادیار

دکتر مهری عسکری (استاد مشاور) ..... استادیار

دکتر مینا تقی زاده (داور داخلی) ..... استادیار

شهریور ۱۳۹۱

تقدیم به آنکه هرگز ذره ای از خوبی هایش را سپاس نتوانم گفت

مادرم؛

بزرگ آموزگار زندگی ام که مسیر سر بلندی را به شیوا ترین روش آموخت و بیش از هر چیز فروتنی و خلوصش مرا به احترام وا داشت.

سپاسگزاری

حمد و ثنا مخصوص خداوندی است که عطش علم و دانش را در وجودمان به ودیعه نهاد تا ظلمت جهل و نادانی را به روشنایی فهم و کمال بیاراییم

شایسته‌ترین مراتب سپاس و قدردانی خود را به استاد بزرگوارم سرکار خانم دکتر امینی تقدیم می‌نمایم که در تمام مراحل مرا یاری نمودند. بی‌شک موفقیت در طی مسیر تحقیقاتی و به انجام رسیدن این پایان‌نامه مرهون تکیه بر علم و درایت خاص ایشان می‌باشد. با آرزوی سلامتی و توفیق روز افزون از درگاه باری‌تعالی برای استاد فرزانه‌ام.

با سپاس فراوان از استاد بزرگوارم سرکار خانم دکتر عسکری که مشاوره این پایان‌نامه را به عهده گرفتند، و درس‌های فراوانی در عرصه علم و اخلاق از ایشان آموخته‌ام که انشاءالله توشه راه آینده من خواهد بود.

والاترین مراتب سپاس را به خانواده‌ام تقدیم می‌کنم که همواره پشتیبان و پناه من در روزهای سخت و شیرین زندگی‌ام بوده‌اند.

از خانم بیگی و آقای فراهانی که در تمام مراحل تحقیق مرا یاری کردند سپاسگزارم

از آقای بنه و آقای احمدی که همیشه یاری رسان من بودند تشکر می‌کنم

از تمام دوستان و هم‌کلاسی هایم که همیشه یاری گر من بودند و در تمام روزهای سخت هیچ وقت من را تنها نگذاشتند سپاسگزارم

این پایان‌نامه با همکاری و حمایت مالی حوزه معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک انجام شده است

چکیده

القاء تولید کالوس و بررسی اثر تنش شوری بر کالوس گیاه *Salsola arbuscula* در شرایط کشت *In vitro*

Salsola arbuscula گیاهی هالوفیت است که می تواند در خاک های شور رشد کرده و یک زیستگاه و منبع مناسب از چراگاه‌های فصل خشک برای چارپایان فراهم کند. هدف از این تحقیق بهینه‌سازی شرایط کشت بافت به‌منظور تولید کالوس از این گیاه و همچنین بررسی میزان مقاومت کالوس به شوری بوده است. جهت تولید کالوس، جداکشت‌های ریشه، برگ و ساقه گیاهان دوماهه در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های 2,4-D و Kin قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بهترین جداکشت و محیط کشت در القاء تولید کالوس، جداکشت ریشه و محیط کشت (۱mg/L) MS + 2,4-D (۱mg/L) + Kin بود. همچنین در محیط MS +۰/۵mg/L Kin و MS +۱mg/L Kin از ساقه باززایی مستقیم صورت گرفت. سپس کالوس‌ها به محیط کشت بهینه با غلظت‌های مختلف نمک (۰, ۱۰۰, ۲۰۰, ۳۰۰, ۴۰۰mM NaCl) منتقل و پس از یک ماه نگه‌داری آن‌ها در شرایط استاندارد فاکتورهای رشد، مقدار آب نسبی، شاخص حساسیت (SI)، میزان عناصر، اسمولاریته، تجمع سدیم در واکوئل، پروتئین ، پرولین، کربوهیدرات و ابعاد سلول مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد با افزایش غلظت NaCl فاکتورهای رشد، RWC، غلظت کلسیم و ابعاد سلول‌ها کاهش یافت. ثابت ماندن شاخص حساسیت مقاوم بودن کالوس به شوری را نشان داد. میزان سدیم، کلر، اسمولاریته، پروتئین، پرولین و کربوهیدرات با افزایش غلظت NaCl تا ۳۰۰ میلی‌مولار افزایش و غلظت ۴۰۰mM نسبت به ۳۰۰ کاهش معنی‌داری را نشان داد. نسبت K^+/Na^+ نیز در غلظت‌های شوری نسبت به شاهد کاهش اما تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های متفاوت NaCl مشاهده نشد که مقاوم بودن کالوس به شوری را نشان می‌دهد. بنابراین، کالوس این گیاه هالوفیت نیز با کاهش رشد، سنتز اسمولیت‌ها و حفظ جذب پتاسیم در برابر تنش شوری مقاومت می‌کند.

کلید واژه: ابعاد سلول، اسمولیت‌ها، پروتئین، ، تنش شوری، فاکتورهای رشد، ، *Salsola arbuscua*

فهرست

عنوان .....صفحه

فصل اول مقدمه و بررسی منابع

۱-۱ کشت بافت ۱

۱-۱-۱ تعریف کشت بافت ۱

۱-۱-۲ کالوس ۱

۱-۱-۳ عوامل موثر بر تولید کالوس ۲

۱-۱-۳-۱ ژنوتیپ ۲

۱-۱-۳-۲ تنظیم کننده‌های رشد ۲

۱-۱-۳-۲-۱ اکسین ۳

۱-۱-۳-۲-۲ سیتوکینین ۳

۱-۱-۳-۳ محیط کشت ۳

۱-۱-۳-۴ هیدرات‌کربن ۴

۱-۱-۳-۵ جداکشت ۴

۱-۱-۳-۶ سن جداکشت ۵

۱-۱-۳-۷ عوامل فیزیکی ۵

۱-۱-۳-۷-۱ نور ۵

۱-۱-۳-۷-۲ دما ۵

۱-۲ تنش شوری ۶

۱-۲-۱ بررسی منابع ۶

۱-۲-۲ اثرات شوری بر گیاهان ۷

۱-۲-۳ هالوفیت‌ها در برابر گلیکوفیت‌ها ۸

۱-۲-۴ سازگاری عمده گیاهان به شوری ۹
۱-۲-۵ اساس مولکولی تحمل به شوری ۱۰
۱-۲-۵۴-۱ پروتئین ۱۱
۱-۲-۵-۲ پرولین ۱۲
۱-۲-۵-۳ هیدرات‌های کربن ۱۳
۱-۲-۶ اثرات تنش شوری بر ریخت‌شناسی گیاهان ۱۳
۱-۲-۷ واکنش کالوس به تنش شوری ۱۴
۱-۳ گیاه هالوفیت *Salsola arbuscula* ۱۵
۱-۳-۱ جنس سالسولا ۱۵
۱-۳-۲ گونه *Salsola arbuscula* ۱۶
ا-۳-۲-۱ خصوصیات سیستماتیکی و شرایط اکولوژیکی ۱۶
ا-۳-۲-۲ کاربردهای گیاه *Salsola arbuscula* ۱۶
ا-۴ اهداف پایان‌نامه ۱۷
فصل دوم مواد و روش‌ها
۲-۱مواد گیاهی و شرایط کشت ۱۸
۲-۱-۱ تهیه بذر و تولید گیاه *Salsola arbuscula* ۱۸
۲-۲ تولید کالوس ۱۸
۲-۳ تکثیر کالوس و بررسی رشد آن ۲۰
۲-۴ انتقال کالوس‌ها به غلظت‌های مختلف نمک NaCl ۲۰
۲-۵ اندازه‌گیری‌های کالوس ۲۰
۲-۵-۱ اندازه‌گیری وزن تر کالوس ۲۰
۲-۵-۲ اندازه‌گیری وزن خشک کالوس ۲۱
۲-۵-۳ اندازه‌گیری میزان رشد نسبی کالوس (RGR) ۲۱

۲-۵-۴ اندازه‌گیری میزان آب نسبی کالوس (RWC) ۲۱
۲-۵-۵ اندازه‌گیری شاخص حساسیت (SI) ۲۱
۲-۵-۶ اندازه‌گیری عناصر در کالوس ۲۲
۲-۵-۶-۱ اندازه‌گیری عناصر سدیم و پتاسیم در کالوس ۲۲
۲-۵-۶-۲ اندازه‌گیری عناصر کلر و کلسیم در کالوس ۲۲
۲-۵-۶-۲-۱ استخراج و تهیه عصاره گیاهی ۲۲
۲-۵-۶-۲-۲ اندازه‌گیری عنصر کلر در کالوس ۲۳
۲-۵-۶-۲-۳ اندازه‌گیری عنصر کلسیم در کالوس ۲۳
۲-۵-۷ تعیین اسمولاریته بافت با توجه به میزان +K و یون‌های الحاقی آن‌ها ۲۴
۲-۵-۸ سنجش و اندازه‌گیری پروتئین در کالوس ۲۴
۲-۵-۸-۱ استخراج پروتئین ۲۴
۲-۵-۸-۲ اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول به روش برادفورد ۲۴
۲-۵-۸-۲-۱ تهیه محلول برادفورد ۲۴
۲-۵-۸-۲-۲ سنجش پروتئین‌های محلول در کالوس ۲۵
۲-۵-۹ سنجش و اندازه‌گیری اسید آمینه پرولین در کالوس ۲۵
۲-۵-۱۰ اندازه‌گیری کربوهیدرات کل در کالوس ۲۶
۲-۵-۱۱ بررسی ابعاد سلول در کالوس‌های تحت تیمار NaCl ۲۶
۲-۵-۱۲ آنالیز آماری ۲۷

فصل سوم نتایج

۳-۱ تولید کالوس و باززایی گیاه *Salsola arbuscula* ۲۸
۳-۱-۱ بهینه‌سازی تولید کالوس *Salsola arbuscula* ۲۸
۳-۱-۲ باززایی مستقیم گیاه *Salsola arbuscula* ۳۰
۳-۲ اندازه‌گیری وزن تر و خشک در کالوس تحت تیمار NaCl ۳۳

۳-۳ محاسبه میزان رشد نسبی کالوس (RGR) تحت تیمار NaCl ۳۵
۳-۴ محاسبه میزان آب نسبی کالوس (RWC) تحت تیمار NaCl ۳۶
۳-۵ محاسبه شاخص حساسیت (SI) در کالوس تحت تیمار NaCl ۳۷
۳-۶ اندازه‌گیری عناصر در کالوس تحت تیمار NaCl ۳۷
۳-۶-۱ اندازه‌گیری عنصر سدیم در کالوس تحت تیمار NaCl ۳۸
۳-۶-۲ اندازه‌گیری عنصر پتاسیم در کالوس تحت تیمار NaCl ۳۸
۳-۶-۳ اندازه‌گیری نسبت K^+/Na^+ در کالوس تحت تیمار NaCl ۳۹
۳-۶-۴ اندازه‌گیری عنصر کلر در کالوس تحت تیمار NaCl ۴۰
۳-۶-۵ اندازه‌گیری عنصر کلسیم در کالوس تحت تیمار NaCl ۴۱
۳-۶-۶ محاسبه میزان تجمع یون‌های محلول و اسمولاریته در کالوس تحت تیمار NaCl ۴۲
۳-۶-۷ بررسی ذخیره سدیم در واکوئل کالوس تحت تیمار NaCl ۴۴
۳-۷ سنجش و اندازه‌گیری پروتئین در کالوس تحت تیمار NaCl ۴۵
۳-۸ سنجش و اندازه‌گیری اسید آمینه پرولین در کالوس تحت تیمار NaCl ۴۵
۳-۹ سنجش و اندازه‌گیری کربوهیدرات کل در کالوس تحت تیمار NaCl ۴۶
۳-۱۰ بررسی ابعاد سلول در کالوس‌های تحت تیمار NaCl ۴۷
فصل ۴ بحث و پیشنهادات
۴-۱بهینه‌سازی تولید کالوس و باززایی کالوس گیاه *Salsola arbuscula* ۵۱
۴-۲ اندازه‌گیری وزن تر و خشک کالوس در تیمار NaCl ۵۳
۴-۳ محاسبه میزان رشد نسبی (RGR)، آب نسبی (RWC) و شاخص حساسیت (SI) کالوس در تیمار NaCl ۵۶
۴-۴ بررسی عناصر در کالوس تحت تیمار NaCl ۵۸
۴-۴-۱ بررسی عناصر (Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{2+}) و نسبت K^+/Na^+ در کالوس تحت تیمار NaCl ۵۸
۴-۴-۲ محاسبه میزان تجمع یون‌های محلول و اسمولاریته در کالوس تحت تیمار NaCl ۶۵

۴-۴-۳ بررسی ذخیره سدیم در واکوئل در کالوس تحت تیمار NaCl.....۶۶
۴-۵ سنجش و اندازه‌گیری پروتئین در کالوس تحت تیمار NaCl ۶۷
۴-۶ سنجش و اندازه‌گیری اسمولیت‌های آلی (پرولین و کربوهیدرات) در کالوس تحت تیمار NaCl ۶۹
۴-۷ بررسی ابعاد سلول در کالوس تحت تیمار NaCl ۷۳
۴-۸ جمع‌بندی و نتیجه‌گیری کلی ۷۶
۴-۹ پیشنهادات ۷۷
پیوست‌ها ۷۸
منابع ۹۲

فهرست جداول

عنوان .....صفحه

جدول ۲-۱ ترکیبات محیط کشت مورد استفاده جهت القاء تولید کالوس ۱۹

جدول ۳-۱ اثر محیط کشت MS همراه با غلظت‌های متفاوت هورمون اکسین (2,4-D) وسیتوکینین (Kin) بر القای کالوس و خصوصیات کیفی آن..... ۳۱

جدول ۳-۲ اثر محیط کشت MS همراه با غلظت‌های متفاوت هورمون اکسین (2,4-D) وسیتوکینین (Kin) بر القای کالوس و باززایی گیاه ۳۲

پیوست ۱- محیط کشت MS ۷۹

پیوست ۱۰- آنالیز واریانس نتایج برهم کنش جداکشت و هورمون بر درجه تشکیل و وزن کالوس ۸۴

پیوست ۱۱- آنالیز واریانس نتایج تاثیر NaCl بر وزن تر و خشک ۸۴

پیوست ۱۲- آنالیز واریانس نتایج تاثیر NaCl بر میزان رشد نسبی، آب نسبی و شاخص حساسیت۸۵

پیوست ۱۳- آنالیز واریانس نتایج تاثیر NaCl برتجمع سدیم، پتاسیم، نسبت K^+/Na^+، کلر و کلسیم۸۵

پیوست ۱۴- آنالیز واریانس نتایج تاثیر NaCl بر تجمع یون‌های محلول و اسمولاریته..... ۸۵

پیوست ۱۵- آنالیز واریانس نتایج تاثیر NaCl بر پروتئین، پرولین، و کربوهیدرات..... ۸۵

پیوست ۱۶- آنالیز واریانس نتایج تاثیر NaCl بر طول، عرض و مساحت سلول‌ها..... ۸۵

پیوست ۱۷- اثر محیط کشت MS همراه با غلظت‌های متفاوت هورمون بر القای کالوس ۸۶

پیوست ۱۸- تغییرات وزن تر و خشک کالوس در تیمار مختلف NaCl..... ۸۷

پیوست ۱۹- تغییرات میزان رشد نسبی و آب نسبی کالوس در تیمار مختلف NaCl..... ۸۷

پیوست ۲۰- تغییرات سدیم و کلر کالوس در تیمار مختلف NaCl ۸۸

پیوست ۲۱- تغییرات پتاسیم و کلسیم کالوس در تیمار مختلف NaCl..... ۸۸

پیوست ۲۲- تغییرات یون‌های محلول و اسمولاریته کالوس در تیمار مختلف NaCl ۸۹

پیوست ۲۳- تغییرات پروتئین کل کالوس در تیمار مختلف NaCl ۸۹
پیوست ۲۴- تغییرات پرولین و کربوهیدرات کالوس در تیمار مختلف NaCl..... ۹۰
پیوست ۲۵- تغییرات طول و عرض سلول‌های کالوس در تیمار مختلف NaCl ۹۰
پیوست ۲۶- تغییرات مساحت سلول کالوس در تیمار مختلف NaCl ۹۱

فهرست اشکال

عنوان .....صفحه

شکل ۳-۱ نکروزه شدن بافت‌ها و عدم تولید کالوس در جداکشت‌های A) ریشه و B) برگ در محیط کشت‌های MS +۰/۵mg/L Kin و MS + ۱mg/L Kin ۲۹

شکل ۳-۲ کالوس‌های حاصل از جداکشت ریشه در A) محیط MS + (۱mg/L) 2,4D و B) MS + 2,4D (۰/۵mg/L) + Kin (۱mg/L) (۱mg/L) + Kin ۳۰

شکل۳-۳ باززایی مستقیم حاصل از جداکشت ساقه در محیط MS +۰/۵mg/L Kin، A) مرحله آغازی باززایی از ساقه پس از ۱۰ روز B) رشد گیاهچه و تبدیل شدن آن به گیاه کامل..... ۳۱

شکل ۳-۴ تغییرات وزن تر کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl ۳۴

شکل۳-۵ تغییرات وزن خشک کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl..... ۳۵

شکل ۳-۶ تغییرات میزان رشد نسبی کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl... ۳۶

شکل ۳-۷ تغییرات میزان آب نسبی کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl ۳۷

شکل ۳-۸ تغییرات شاخص حساسیت کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl.. ۳۷

شکل ۳-۹ تغییرات سدیم در کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl..... ۳۸

شکل ۳-۱۰ تغییرات پتاسیم در کالوس *Salsola arbuscula* تحت تیمارهای مختلف NaCl ۳۹

شکل ۳-۱۱ تغییرات نسبت K^+/Na^+ کالوس *Salsola arbuscula* تحت تیمارهای مختلف NaCl ۴۰

شکل ۳-۱۲ تغییرات کلر در کالوس *Salsola arbuscula* تحت تیمارهای مختلف NaC..... ۴۱

شکل ۳-۱۳ تغییرات کلسیم در کالوس *Salsola arbuscula* تحت تیمارهای مختلف NaCl ۴۲

شکل ۳-۱۴ تغییرات تجمع یون‌های محلول کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای..... ۴۳

شکل ۳-۱۵ تغییرات اسمولاریته کالوس *Salsola arbuscula* تحت تیمارهای مختلف NaCl ۴۴

شکل ۳-۱۶ ارتباط بین مقدار آب و میزان سدیم در کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای .. ۴۴

شکل ۳-۱۷ تغییرات کمی پروتئین کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl ۴۵
شکل ۳-۱۸ تغییرات اسید آمینه پرولین کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl ۴۶
شکل ۳-۱۹ تغییرات میزان کربوهیدرات کل کالوس *Salsola arbuscula* تحت تیمارهای ۴۷
شکل ۳-۲۰ تغییرات طول و عرض سلول‌ها در کالوس *Salsola arbuscula* تحت تیمارهای ۴۸
شکل ۳-۲۱ تغییرات اندازه سلول‌های کالوس *Salsola arbuscula* در A) شاهد بدون تنش B) mM ۱۰۰NaCl (C ۲۰۰mM NaCl (D ۳۰۰mM NaCl (E ۴۰۰mM NaCl ۴۹
شکل ۳-۲۲ تغییرات مساحت سلول‌های کالوس *Salsola arbuscula* در تیمارهای مختلف NaCl ۵۰
پیوست۳ منحنی استاندارد سدیم ۸۱
پیوست ۴ منحنی استاندارد پتاسیم ۸۱
پیوست ۵ منحنی استاندارد پروتئین ۸۲
پیوست ۶ منحنی استاندارد پرولین ۸۳
پیوست ۷ منحنی استاندارد کربوهیدرات کل ۸۴

فهرست علائم اختصاری

6-Benzylamino Purine .....BA
2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid..... 2,4-D
Dry weight.....DW
Ethylenediaminetetraacetic acid ..... EDTA
Electrical conductivity .....EC
Fresh weight ..... FW
Gram .....g
Kinetin..... Kin
Late embryogenesis abundance .....LEA
Litre L
micro ..... µ
Mili .....m
Molar..... M
Pyrroline-5-carboxylate..... P_5C
Relative growth rate ..... RGR
Relative water content .....RWC
Sensitivety index..... SI
micro ..... µ

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

۱-۱ کشت بافت

۱-۱-۱ تعریف کشت بافت

کشت سلول، بافت و اندام گیاهی مجموعه‌ای از روش‌های طراحی شده جهت رشد و تکثیر سلول‌ها و بافت‌ها با استفاده از محلول‌های غذایی در شرایط استریل و کنترل شده است (Loyola-Vargas and Vazquez-Flota, 2006). روش تکثیر طبیعی نیازمند زمان طولانی برای رشد یک گیاهچه توسعه یافته از بذر است. بعلاوه آن روش زمین کافی، کوددهی دائمی و مراقبت همیشگی را می‌طلبد، بنابراین نیازمند نیروی انسانی فراوان می‌باشد. بجز این، گرفتن بذر از بعضی گیاهان مشکل بوده و شانس گرفتن گیاه عاری از آلودگی و مریضی کم است. برخلاف آن، روش کشت بافت، که روشی استاندارد جهت تکثیر گیاهان می‌باشد، می‌تواند درصد بیشتری از گیاهان عاری از پاتوژن در یک زمان کمتر و در مکان کوچک‌تر فراهم آورد (Roy *et al*., 2008). استقرار سیستم کشت بافت به منظور باززایی گیاهان در تیره گندمیان، اساس دست‌ورزی و اصلاح ژنتیکی در سطح سلولی است (Wang *et al*., 2001). ایجاد کشت‌های تعلیقی یا کشت‌های کالوس‌زا با کیفیت خوب و باززایی گیاهان، پیش نیاز لازم برای انتخاب و انتقال ژن‌های مطلوب به گونه‌های علفی محسوب می‌گردد (Wang *et al*., 2003).

۱-۱-۲ کالوس

یکی از کاربردهای کشت بافت گیاهی تولید کالوس و به دنبال آن باززایی گیاه است. مهندسی ژنتیک به کاربرد کشت بافت و باززایی گیاه وابسته است (Hassan *et al*., 2009). کالوس توده سلولی

بی‌شکل تمایز نیافته است که معمولا در محل زخم بافت‌ها و اندام‌های تمایز یافته ایجاد می‌شود که گاهی به طور خودبخودی اندام‌های نابجا و یا رویان از یک کالوس ایجاد می‌شوند (Han *et al*., 2011). عمل تحریک جهت تشکیل کالوس را القای کالوس می‌نامند. اولین مرحله تشکیل کالوس تمایززدایی است.

۱-۱-۳ عوامل موثر بر تولید کالوس

عوامل موثر بر تولید کالوس و باززایی شامل: ژنوتیپ، تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت، نوع کربوهیدرات، نوع جداکشت، سن جداکشت و شرایط فیزیکی محیط کشت است.

۱-۱-۳-۱ ژنوتیپ

نتایج نشان داده است وابستگی خاص القای کالوس و باززایی گیاه به ژنوتیپ اجتناب ناپذیر و کلی است (Han *et al*., 2011) و القای کالوس و باززایی گیاه با ژنوتیپ گیاه تغییر می‌کند (Lu and Bridgen, 1996). میزان تنظیم‌کننده‌های خارجی و مواد مغذی موجود جهت القای کالوس به رقم گیاهی وابسته است بنابراین ترکیبات محیط کشت مورد استفاده بسته به ژنوتیپ گیاهی تغییر می‌کند (Han *et al*., 2011).

۱-۱-۳-۲ تنظیم‌کننده‌های رشد

القای کالوس و باززایی گیاه نیازمند حضور شرایط مناسب و ترکیبات تنظیم کننده‌های رشد در محیط کشت است (Abd Elaleem *et al*., 2009). اغلب در محیط فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد کالوس تشکیل نمی‌شود (Abd Elaleem *et al*., 2009; Ahmad *et al*., 2011). میزان تنظیم‌کننده‌های رشد لازم جهت القای کالوس به ژنوتیپ و مقدار هورمون‌های داخلی گیاه بستگی دارد (Bhaskaran and Smith, 1990;). همچنین کالوس‌زایی به هورمون‌های محیط کشت و توانایی بافت‌ها برای پاسخ به این تغییرات هورمونی در طول کشت وابسته است (Akbas *et al*., 2009). نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد مانند اکسین و سیتوکینین به عنوان اجزاء حیاتی در القای کالوس و باززایی گیاه شناخته شده‌اند (Neibaur *et al*., 2008). معمولا غلظت‌های کم تنظیم‌کننده‌ها نسبت به غلظت‌های بالاتر آن‌ها بر دو

صفت کالزایی و اندازه کالوس تاثیر بیشتری دارند (امیدی و همکاران، ۱۳۹۰). کنترل فرایندهای تمایزیابی به حضور اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها بستگی دارد (پیوندی و همکاران، ۱۳۸۹).

۱-۱-۳-۲-۱ اکسین

اکسین جهت القای کالوس ضروری است (Abd Elaleem *et al*., 2009) و تولید کالوس با نوع و غلظت اکسین تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Mendoza and Kaeppler, 2002). در محیط دارای اکسین و فاقد سیتوکینین کالوس تولید می‌شود اما بدون حضور اکسین کالوس تولید نمی‌شود (دانشور، ۱۳۸۶). بین نوع و غلظت اکسین ارتباط و برهم‌کنش مشاهده می‌شود مثلا هورمون اکسین از نوع 2,4-D در غلظت‌های کم سبب تولید کالوس می‌شود و با افزایش غلظت آن از تولید کالوس کاسته می‌شود اما پیکلورام (Picloram) و دیکامبا (Dicamba) در غلظت‌های زیاد تولید کالوس را افزایش می‌دهند (Mendoza and Kaeppler, 2002).

۱-۱-۳-۲-۲ سیتوکینین

سیتوکینین مهمترین فاکتور موثر بر باززایی ساقه است (Abd Elaleem *et al*., 2009). شاید اثرات چشمگیر آنها مرتبط با تغییرات بافتی ایجاد شده در بافت‌های القا شده است (Magyar-Tabori *et al*., 2010). معمولا زمانی که نسبت سیتوکینین بیشتر از اکسین است شاخساره‌زایی صورت می‌گیرد. اما برهم کنش هورمون‌های درون‌زا و برون‌زا تمایز بافت در شرایط درون شیشه‌ای را رقم می‌زند (پیوندی و همکاران، ۱۳۸۹). موفقیت کشت با نوع و غلظت سیتوکینین‌های بکار رفته تحت تاثیر قرار می‌گیرد. چون جذب، انتقال و متابولیسم آنها بین واریته‌ها متفاوت است و آنها می‌توانند با سیتوکینین‌های داخلی یک جداکشت تحت تاثیر قرار گیرند. بیشترین سیتوکینین‌های بکار رفته در سیستم باززایی معمولا بنزیل آدنین (BA) و Tidiazeron (TDZ) است اما بازده آنها به ژنوتیپ و دیگر فاکتورها وابسته است (Magyar-Tabori *et al*., 2010).

۱-۱-۳-۳ محیط کشت

محیط کشت مناسب بافت‌ها یا اندام‌های مختلف گیاه جهت القای کالوس با توجه به خانواده، جنس وگونه متفاوت تغییر می‌کند (Guo-qiang *et al*., 2001). تغییرات القای کالوس در محیط کشت

متفاوت شاید به علت تفاوت نسبت NO_3^-/NH_4^+، یک فاکتور مهم در جذب نیتروژن و تنظیم pH در طول کشت بافت گیاهی باشد (Yan *et al*., 2009). دلیل عمده برای تفاوت محیط کشت مناسب جهت القای کالوس در گونه‌های مختلف وجود تفاوت‌هایی در خصوصیات فیزیکی، سطوح متابولیک بیوشیمیایی همچون مقادیر هورمون در بین آن‌ها به علت دوره طولانی تکامل طبیعی است (Guo-qiang *et al*., 2001). مکمل‌های زیستی از قبیل اسیدهای آمینه خاص (گلوتامین)، کازئین هیدرولیز شده ، عصاره مخمر (Sun and Hong, 2010)، شیر نارگیل (Han *et al*., 2011) و سدیم نیترو پروساید(SNP) (Xu *et al*., 2009) نیز می‌توانند باززایی گیاه را به طور موثر تحت تاثیر قرار دهند چون گاهی رشد و نمو کالوس پس از یک واکشت کاهش یافته یا متوقف می‌گردد. در این‌صورت نیاز است که به محیط کشت مورد نیاز ترکیبات پیچیده‌تری نظیر شیرنارگیل، کازئین هیدرولیز شده، عصاره مالت، عصاره مخمر و امثال این‌ها را اضافه نمود (احسانپور و امینی، ۱۳۸۲).

۱-۱-۳-۴ هیدارت‌های کربن

هیدرات‌های کربن نقش‌های گوناگونی را مانند منبع انرژی، مواد ضروری برای اسکلت‌های کربن جهت فرایندهای بیوسنتزی، مواد ضروری برای سنتز دیواره، عناصر اسمولاریته ضروری در محیط کشت، مولکول انتقال پیام، اثر پتانسیلی قوی بر فیزیولوژی رشد و تمایز سلول‌ها در گیاهان ایفا می‌کنند (Trejgell et al., 2006). نوع قند و روش استریل آن بسته به ژنوتیپ گیاه و دیگر شرایط محیطی اثرات چشمگیری بر رشد کالوس و باززایی گیاه دارد (Mendoza and Kaeppler, 2002)، اما معمولا ساکارز بهترین منبع کربن مورد استفاده است (Trejgell et al., 2006). اثر سوربیتول بر تکثیر و باززایی کالوس برای اولین بار توسط رشید و همکاران (۲۰۰۳) ارزیابی شد. کیفیت و کمیت تولید کالوس توسط سوربیتول در گندم بهبود یافت. با افزودن سوربیتول به محیط MS بازده تولید کالوس و باززایی افزایش یافت (Trejgell *et al*., 2006). افزایش چشمگیر کالوس و باززایی گیاه در کشت بساک غلات از قبیل گندم و جو در محیط حاوی مالتوز نیز مشاهده شد (Mendoza and Kaeppler, 2002). افزایش معنی‌دار در القای کالوس و کاهش در جنین‌های انگیزش‌یافته در محیط کشت MS همراه با 2,4-D و مالتوز برای بعضی رقم‌های جو مانند CV. Golden promise مشاهده شده است (Han *et al*., 2011). مالتوز موجود در محیط کشت بر رشد کالوس در جداکشت جوانه گل موثر نبوده است