دانشگاه شاهرود

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نبات- بیوتکنولوژی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

تاثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر کالوس زایی و باززایی درون شیشه‌ای گیاه زردآلو (*Prunus armeniaca*)

دانشجو:

علی مظهری نیا

اساتید راهنما:

دکتر شاهرخ قرنجیک

دکتر مهدی رضایی

استاد مشاور:

مهندس مهدی رحیمی

شهریور ۱۳۹۳

شکر و سپاس خدا را که بزرگترین امید و یاور در لحظه لحظه زندگیست...

ماحصل آموخته‌هایم را تقدیم می‌کنم به

مقدس‌ترین واژه‌ها در لغت‌نامه دلم، مادر مهربانم که زندگیم را مدیون مهر و عطوفت او می‌دانم،

پدرم، مهربانی مشفق، حامی و بردبار

خواهر عزیزم همراه همیشگیم

و خواهرزاده‌های شیرینم امیرمحمد و امیرعلی

سپاس و ستایش خداوندی را سزاست که کسوت هستی را بر اندام موزون آفرینش بپوشانید و تجلیات قدرت لایتزالی را در مظاهر و آثار طبیعت نمایان گردانید.

(من لم یشکرالمخلوق لم یشکر الخالق)

برخود لازم می‌دانم ازکلیه کسانی که بنده را در انجام، تدوین و نگارش این پایان نامه یاری نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم. به خصوص ازاساتید شایسته و راهنما جناب آقای دکتر شاهرخ قرنجیک و دکتر مهدی رضایی که همواره درکمال سعه صدر، راهنما و راه‌گشای اینجانب در اتمام واکمال پایان نامه بودند، از جناب آقای مهندس رحیمی که زحمت مشاوره این پایان نامه را در حالی متقبل شدند که بدون مساعدت ایشان ، این پروژه به نتیجه مطلوب نمی‌رسید، اساتید دلسوز جناب آقای دکتر ناصر فرخی و سرکار خانم دکتر قسیمی که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدند، کارشناسان آزمایشگاه سرکار خانم ها مهندس احمدی، مهندس عبداللهی و آقایان مهندس حسین مطهری نژاد، مهندس ابراهیم حسینی پور، مهندس غلامرضا شاکری، مهندس حسن گلی، کارمندان محترم دانشکده کشاورزی آقایان موسی الرضا عرب‌اسدی، مهدی بیاری، آقاحسینی و همچنین دوستان عزیزم به خصوص مهندس ایمان اکبری و دیگر عزیزانی که مرا در انجام این پایان نامه یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایم.

امیدوارم بتوانم در آینده جوابگوی این همه محبت آنها باشم.

علی مظهری نیا

مرداد ۱۳۹۳

تعهد نامه

اینجانب علی مظهری نیا **دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته** بیوتکنولوژی کشاورزی **دانشکده** کشاورزی **دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه** تاثیر تنظیم کننده های رشد گیاهی بر کالوس زایی و باززایی درون شیشه‌ای گیاه زردآلو (*Prunus armeniaca*) **تحت راهنمائی** دکتر شاهرخ قرنجیک **متعهد می شوم.**

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ ۱۳۹۳/۶/۲۰

مالکیت نتایج و حق نشر

- ***کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر***

چکیده

به منظور بهینه‌سازی شرایط کشت بافت گیاه زردآلو، این تحقیق در قالب چند آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. در آزمایش اول و دوم اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد سیتوکینین BAP در ترکیب با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی شامل NAA و IBA بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگی در محیط کشت پایه MS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیشترین میزان کالوس‌زایی (۸۶ درصد) در ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی ۲/۲ میکرومولار BAP و ۵/۳۶ میکرومولار NAA در واریته رجبعلی بدست آمد. در آزمایش سوم اثر نوع ریزنمونه و تنظیم-کننده‌های رشد بر میزان کالوس‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج آن نشان داد بالاترین درصد کالوس‌زایی (۹۰درصد) بر روی ریزنمونه‌های برگی که در شرایط درون شیشه‌ای ایجاد شده بودند در ترکیب با تیمار تنظیم کننده رشدی ۲/۲ میکرومولار BAP و ۵/۳۶ میکرومولار NAA بدست آمد. در آزمایش بعدی اثر ترکیبات تنظیم کننده‌های رشدی مختلف، رژیم نوری و نوع ریزنمونه بر میزان باززایی ساقه نابجا بررسی شد که نتایج نشان داد ترکیب تنظیم کننده‌های رشدی ۹ میکرومولار BAP، ۴/۵ میکرومولار KIN و ۵/۵ میکرومولار NAA در ریزنمونه‌های کوتیلدون و همچنین ترکیب تنظیم کننده‌های رشدی ۲/۵ میکرومولار TDZ و ۲/۵ میکرومولار IBA در ریزنمونه های هیپوکوتیل بیشترین میزان باززایی را به ترتیب ۵۱ و ۴۸ درصد داشتند، ضمن اینکه تاریکی در افزایش میزان باززایی به خصوص در ریزنمونه های کوتیلدون موثر بود. در آزمایشات بعدی اثر نوع محیط کشت پایه به طور جداگانه بر میزان باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون بررسی شد و نتایج نشان داد محیط کشت MS و QL به ترتیب اثر بیشتری بر روی میزان باززایی ساقه نابجا ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (۵۰ درصد) و کوتیلدون (۸۳ درصد) دارند.

کلمات کلیدی: زردآلو،کشت بافت، کالوس‌زایی، باززایی، ساقه نابجا، تنظیم‌کننده رشد گیاهی

مقالات مستخرج از پایان نامه:

- **"باززایی ساقه نابجا از ریزنمونه های هیپوکوتیل و کوتیلدون گیاه زردآلو"** کنگره جامع ملی یافته های نوین زیست شناسی - پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (اردیبهشت ۹۳)

- **"بررسی امکان القای کالوس از ریزنمونه‌های برگی زردآلو"** هفتمین همایش ملی یافته های نوین کشاورزی- دانشگاه کردستان (اردیبهشت ۹۳)

- **"بهینه سازی شرایط کشت بافت و باززایی درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون گیاه زردآلو"** دومین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار- دانشکده شهید مفتح همدان (شهریور۹۳)

فهرست مطالب

مقدمه ۱
فصل اول: ۵
کلیات ۵
۱-۱- زردآلو ۶
۱-۱-۱- گیاه شناسی زردآلو ۶
۱-۱-۲- تاریخچه زردآلو ۶
۱-۱-۳ اقلیم مناسب زردآلو ۸
۱-۱-۴ سرمازدگی بهاره ۹
۱-۱-۵ نیازهای خاکی ۹
۱-۱-۶ طبقه بندی زردآلو ۱۰
۱-۱-۷ کشت و تولید زردآلو ۱۰
۱-۱-۸ ارزش غذایی و موارد مصرف زردآلو ۱۱
۱-۱-۹- اصلاح زردآلو ۱۳
۱-۲ تکنیک های کشت بافت ۱۴
۱-۲-۱- مزایا و کاربردهای کشت بافت ۱۵
۱-۲-۲- اندام‌زایی ۱۶
۱-۲-۳- اندام‌زایی از بافت کالوس ۱۷
۱-۲-۴- تشکیل اندام نابجا به طور مستقیم ۱۸
۱-۲-۵- کشت کالوس ۱۹
۱-۲-۶- محیط کشت ۲۱
۱-۲-۷- تنظیم‌کننده های رشد ۲۴
۱-۲-۸- ضدعفونی ۲۵
فصل دوم: ۲۷
مروری بر تحقیقات گذشته ۲۷
۲-۱- زردآلو ۲۸
۲-۱-۱- لین و کاسیو (۱۹۸۶) ۲۸
۲-۱-۲-پیترس (۱۹۸۹) ۲۸
۲-۱-۳- اسکالتس و دوسبا (۱۹۹۳) ۲۹
۲-۱-۴- گوفردا و همکاران (۱۹۹۵) ۲۹
۲-۱-۵- پرز تورنرو و همکاران (۲۰۰۰) ۳۰
۲-۱-۶- بورگاس و آلبرکوارک (۲۰۰۳) ۳۱
۲-۱-۷- پتری و همکاران (۲۰۰۸ b) ۳۱
۲-۱-۸- لوپز نوگوئرا و همکاران (۲۰۰۹) ۳۲
۲-۱-۹- وانگ و همکاران (۲۰۱۱) ۳۲
۲-۲- آلو ۳۳

۲-۲-۱- منته و همکاران (۱۹۸۹) ۳۳
۲-۲-۲- تی ین و همکاران (۲۰۰۷) ۳۴
۲-۲-۳- نینگ و همکاران (۲۰۰۷) ۳۴
۲-۲-۴- سزار پتری و همکاران (۲۰۰۸c) ۳۵
۲-۲-۵- پتری و اسکورزا (۲۰۰۹) ۳۵
۲-۲-۶- کانلی و تی ین (۲۰۰۹) ۳۵
۲-۲-۷- ناس و همکاران (۲۰۱۰) ۳۶
۲-۳- هلو ۳۷
۲-۳-۱- هامشلاق (۱۹۸۶) ۳۷
۲-۳-۲- پولر و اسکورزا (۱۹۹۵) ۳۷
۲-۳-۳- ناگاتی (۲۰۱۲) ۳۸
۲-۳-۴- پرز خیمنز و همکاران (۲۰۱۲) ۳۸
۲-۴- آلبالو ۳۹
۲-۴-۱- سانگ و سینگ (۲۰۰۵) ۳۹
۲-۴-۲- اسپینوسا و همکاران (۲۰۰۶) ۳۹
۲-۴-۳- لیو و پیجوت (۲۰۰۸) ۴۰
۲-۵- گیلاس ۴۱
۲-۵-۱- باگووات و لین (۲۰۰۴) ۴۱
۲-۵-۲- فینی و همکاران (۲۰۰۷) ۴۱
۲-۶- بادام ۴۲
۲-۶-۱- ایسیکلن و همکاران (۲۰۱۰) ۴۲
فصل سوم: ۴۵
مواد و روشها ۴۵
۳-۱- مشخصات مواد گیاهی و ارقام مورد استفاده ۴۶
۳-۲- مواد شیمیایی ۴۶
۳-۳- تجهیزات ۴۶
۳-۴- تهیه محیط کشت ۴۷
۳-۴-۱ تهیه محلول‌های مادری نمک‌های پر مصرف MS با غلظت ۱۰برابر (×۱۰) ۴۷
۳-۴-۲- تهیه محلول‌های مادری نمک‌های کم مصرف MS با غلظت ۱۰۰برابر (×۱۰۰) ۴۸
۳-۴-۳- تهیه محلول مادری آهن MS با غلظت ۱۰ برابر (×۱۰) ۴۹
۳-۴-۴- تهیه محلول مادری ویتامین‌ها MS ۱۰۰ برابر (×۱۰۰) ۴۹
۳-۴-۵-تهیه محلول‌های مورد نیاز جهت تهیه محیط کشت QL ۵۰
۳-۴-۶- تهیه محلول‌های ذخیره تنظیم کننده های رشد ۵۱
۳-۴-۷- تهیه یک لیتر محیط کشت ۵۱
۳-۵- ضدعفونی و آماده سازی مواد گیاهی ۵۲
۳-۵-۱ ضدعفونی محیط و وسایل کار ۵۲
۳-۵-۲- ضدعفونی بذور ۵۳

۳-۵-۳- ضدعفونی برگ ۵۴
۳-۶- شرایط کشت، نوع و غلظت های تنظیم کننده رشدی ۵۶
۳-۶-۱- کشت بذر ۵۶
۳-۶-۲- القای کالوس ۵۶
۳-۶-۳- باززایی زردآلو ۵۷
۳-۶-۳-۱ باززایی غیر مستقیم ۵۷
۳-۶-۳-۲ باززایی مستقیم ۵۷
۳-۳ آنالیزهای آماری ۶۰
۳-۳-۱ آزمایشات کالوس‌زایی ۶۰
۳-۳-۲ آزمایشات باززایی ۶۱
۳-۴- نرم افزارها ۶۱
فصل چهارم: ۶۲
نتایج و بحث ۶۲
۴-۱ نتایج آزمایشات کالوس‌زایی ۶۳
۴-۱-۱ تاثیر مقادیر مختلف تنظیم کننده‌های رشد BAP، NAA و نوع واریته بر میزان القای کالوس ۶۳
۴-۱-۲ تاثیر مقادیر مختلف تنظیم کننده‌های رشد BAP و IBA و نوع واریته بر میزان القای کالوس ۶۸
۴-۱- ۳ تاثیرمقادیر مختلف تنظیم کننده‌های رشد NAA، BAP و نوع ریزنمونه بر میزان القای کالوس ۷۱
۴-۲ نتایج آزمایشات باززایی ۷۷
۴-۲-۱ باززایی غیرمستقیم ۷۷
۴-۲-۲ نتایج باززایی مستقیم ۷۹
۴-۲-۲-۱ تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد، نوع ریزنمونه و رژیم نوری بر درصد باززایی ساقه نابجا ۷۹
۴-۲-۲-۲ تاثیر تنظیم کننده رشد، نوع ریزنمونه و رژیم نوری بر روی تعداد شاخه باززا شده ۸۷
۴-۲-۲-۳ اثر نوع محیط کشت بر درصد باززایی ساقه نابجا از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون ۸۸
۴-۲-۲-۴ بررسی ریشه‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون ۹۱
نتیجه‌گیری کلی ۹۴
پیشنهادات ۹۵
منابع ۹۶
Abstract: ۱۰۴

فهرست اشکال

شکل ۱-۱ : گسترش زردآلو از مرکز آسیای مرکزی ۸
شکل ۳-۱ ریزنمونه‌های مورد استفاده در باززایی مستقیم..... ۵۲
شکل ۳-۲ سرشاخه های درختان زردآلو جهت استفاده به عنوان ریزنمونه های برگی ۵۳
شکل ۴-۱ : کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگی ۶۴
شکل ۴-۲: مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم کننده‌های رشد BAP، NAA و واریته بر درصد کالوس‌زایی ۶۶
شکل ۴-۳ : مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم کننده‌های رشد BAP و IBA بر کالوس‌زایی ۷۰
شکل ۴-۴ : مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم کننده‌های رشد BAP و واریته بر کالوس‌زایی ۷۱
شکل ۴-۵ مقایسه میانگین اثرمنبع ریزنمونه بر درصد کالوس‌زایی ۷۴
شکل۴-۶ مقایسه میانگین اثرات متقابل تنظیم کننده‌های رشد BAP، NAA و منبع ریزنمونه بر درصد کالوس‌زایی ۷۵
شکل ۴-۷ : کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ درون شیشه‌ای ۷۴
شکل۴-۸ : انتقال کالوس به محیط‌های باززایی ساقه ۷۸
شکل۴-۹ : مقایسه میانگین اثرات متقابل تنظیم کننده‌های رشد و ریزنمونه بر درصد باززایی ۸۱
شکل ۴-۱۰ : باززایی شاخه‌های نابجا از ریزنمونه‌های کوتیلدون ۸۳
شکل ۴-۱۱ : باززایی ساقه نابجا از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل. ۸۵
شکل۴-۱۲ : مقایسه میانگین اثرات متقابل رژیم نوری و نوع ریزنمونه بر درصد باززایی ۸۶
شکل۴-۱۳ : مقایسه میانگین اثرات متقابل تنظیم کننده رشد و ریزنمونه بر تعداد ساقه باززاشده ۸۸
شکل۴-۱۴ : مقایسه میانگین اثرات متقابل تنظیم کننده رشد و رژیم نوری بر تعداد ساقه باززاشده ۸۹
شکل۴-۱۴ : مقایسه میانگین اثر نوع محیط کشت بر باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۹۱
شکل۴-۱۵ : مقایسه میانگین اثر نوع محیط کشت بر باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدون ۹۱
شکل ۴-۱۶ ریشه‌زایی ساقه‌های باززا شده از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۹۳

فهرست جداول

جدول ۱-۱ : درجه حرارت بحرانی برای مراحل جوانه گل زردآلو ۱۰
جدول ۱-۲ کشورهای عمده‌ی تولید کننده زردآلو ۱۱
جدول ۱-۳ ارزش غذایی زردآلو ۱۲
جدول۲-۱ خلاصه تحقیقات کشت بافت ۴۳
جدول ۳-۱ غلظت‌های نمک‌های پرمصرف محیط کشت پایه MS ۴۷
جدول ۳-۲ غلظت‌های نمک‌های کم مصرف محیط کشت پایه MS ۴۸
جدول ۳-۳ غلظت‌های $FeSO_4.7H_2O$ و $Na_2EDTA.H_2O$ محیط کشت پایه MS ۴۹
جدول ۳-۴ غلظت‌های ویتامین‌های محیط کشت پایه MS ۴۹
جدول ۳-۵ غلظت‌های نمک‌های پرمصرف محیط کشت پایه QL ۵۰
جدول ۳-۷ ترکیبات حلال تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ۵۱
جدول۳-۷ تیمارهای تنظیم کننده‌های رشدی مورد استفاده در باززایی کالوس‌ها ۵۸
جدول۳-۸ تیمارهای تنظیم کننده‌های رشدی (میکرومولار) مورد استفاده در باززایی مستقیم ۵۶
جدول ۴-۱ تجزیه واریانس اثرغلظت های مختلف دو تنظیم کننده رشد BAP و NAA در واریته بر میزان کالوس‌زایی ۶۵
جدول ۴-۳ تجزیه واریانس اثرغلظت‌های مختلف دو تنظیم کننده رشد BAP و IBA درواریته بر میزان کالوس‌زایی. ۶۹
جدول ۴-۳ تجزیه واریانس اثر غلظت های تنظیم کننده‌های رشد BAP، IBA و ریزنمونه بر درصد کالوس‌زایی ۷۲
جدول ۴-۴ تجزیه واریانس اثرمتقابل تنظیم کننده‌های رشد، ریزنمونه و رژیم نوری بر درصد باززایی و تعداد شاخه. ۸۰
جدول ۴-۵ تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت بر درصد باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون ۹۰

مقدمه

رشد فزاینده جمعیت جهان، افزایش نیاز به تولیدات کشاورزی و بالا رفتن سطح آگاهی عمومی درباره مواد غذایی منجر به ایجاد الگوهای جدید مصرف با تاکید بر تولیدات باغی گردیده است. امروزه جایگاه علوم و فنون کشاورزی در شکوفایی اقتصاد کشاورزی کشورهای جهان بر کسی پوشیده نیست به-طوری‌که افزایش تولید و عرضه محصولات باغی و فرآورده‌های آن از مسائل مهم مورد توجه دولت مردان، سیاست‌گزاران و محققان کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه دنیا می‌باشد.

ایران به خاطر ویژگی‌های خاص اقلیمی و موقعیت جغرافیایی، قابلیت‌ها و پتانسیل‌های فراوانی برای تولید محصولات کشاورزی به ویژه باغی و رقابت در بازارهای جهانی داشته و به لحاظ تولید محصولات باغی همواره جزو ده کشور برتر دنیا بوده است. زردآلو با نام علمی *Prunus armeniaca* بومی مناطق چین و سیبری می‌باشد. شرایط آب و هوایی اکثر نقاط ایران برای پرورش زردآلو مناسب است. بنابراین در صنعت میوه‌کاری ایران، زردآلو و فرآورده‌های آن می‌تواند نقش کلیدی در صادرات غیرنفتی و افزایش ارزآوری ایفا کند و از سوی دیگر تنوع و اشکال مختلف مصرف زردآلو به صورت مستقیم و یا کاربرد آن در تهیه دیگر مواد غذایی و شیرینی‌جات، کمک زیادی به عرضه در تمام فصول و تجارت موفق آن می‌نماید.

عرضه محصول و رقابت در بازارهای داخلی و جهانی تنها با افزایش راندمان تولید، کاهش هزینه‌ها و تولید محصول پرکیفیت مطابق با خواسته‌ها و سلایق مصرف کنندگان میسر خواهد بود. از طرف دیگر محدودیت وجود زمین‌های مرغوب، کمبود منابع آبی، افزایش هزینه‌های تولید و نگهداری محصولات باغی، نیازمند افزایش تولید در واحد سطح از طریق دستیابی به ارقام پر محصول و متحمل به تنش-های زنده و غیر زنده و متناسب با نیازهای بازار جهانی می‌باشد.

با توجه به وجود اقلیم‌های بسیار متفاوت، اهمیت و پراکنش انواع هسته‌دارها به‌ویژه زردآلو در کشور و ضرورت پژوهش و مطالعه پیرامون آن‌ها، از اصلی‌ترین فعالیت‌ها در این راستا استفاده از برنامه‌های به نژادی و اصلاحی ارقام قدیم و معرفی ارقام جدید برتر می‌باشد، تا از این طریق بتوان نسبت به کاهش هزینه‌های تولید و افزایش کمی و کیفی محصول و بهبود توان رقابت در بازارهای داخلی و خارجی وابسته به صنعت میوه‌کاری، دست یافت.

مکانیزم‌های تولید مثل و گزینش گیاهان در برنامه‌های اصلاح کلاسیک ممکن است در اثر عواملی مانند پلی‌پلوئیدی، موتاسیون، تفاوت‌های سیتولوژیکی و ... با محدودیت روبه‌رو گردد. همچنین روش-های اصلاحی کلاسیک احتیاج به زمان زیادی دارند. روش‌های بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک راه-حل‌هایی را برای رفع محدودیت‌های فوق فراهم می‌آورد و به عنوان ابزاری قوی در به‌نژادی و دستیابی سریع به اهداف مورد نظر کمک می‌کند.

تلاش برای بهبود خصوصیات درختان زردآلو به وسیله مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی تا حد زیادی به در دسترس بودن پروتکلی قابل اعتماد کشت بافت و باززایی گیاه بستگی دارد. در روش کشت سلول، بافت، اندام و یا هر قطعه جدا شده‌ای از گیاه (ریزنمونه) در محیط غذایی مصنوعی و در شرایط استریل کشت می‌گردد. تولید گیاه به تعداد زیاد، در مدت زمان کوتاهتر نسبت به شرایط طبیعی از مزایای عمده کشت بافت گیاهی است و لازمه مهندسی ژنتیک گیاهان می‌باشد.

در کشت بافت گیاهی عوامل مختلف و متنوعی دخالت دارند که از مهمترین آن‌ها می‌توان به ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه، ترکیب محیط کشت، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و نیز شرایط محیطی اشاره کرد. تحقیق حاضر، با توجه به نیاز مبرمی که در این زمینه احساس می‌شد، به منظور بررسی تاثیر انواع تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی میزان کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های مختلف گیاه در زردآلو با هدف دستیابی به پروتوکلی مطمئن کشت بافت در گیاه زردآلو انجام گردید. با بهینه سازی شرایط

کشت بافت این گیاه می توان در آینده در برنامه های انتقال ژن‌های مفید به این محصول استراتژیک بهره‌جست.

فصل اول:

کلیات

۱-۱- زردآلو

۱-۱-۱- گیاه شناسی زردآلو

زردآلو با نام علمی *Prunus armeniaca* L. که امروزه به نام *Armeniaca vulgaris* Lam. نیز معروف است به خانوادهٔ Rosaceae، زیرخانوادهی *Prunoideae*، جنس *Prunus*، زیر جنس *Prunophora* و در گروه Armeniaca (lam.) تعلق دارد. گیاهانی غالبا درختی با برگ‌های ساده ومتناوب، پوشش گل پنج تایی، پرچم‌ها مری استمون و مادگی تک برچه با دو تخمک که ممکن است یک یا هر دو آن تلقیح شده و تولید دانه نمایند. زیرخانوادهٔ *Prunoideae* از سایر زیر خانواده‌های خانوادهٔ *Rosaceae* با دارا بودن میوه‌های گوشتی از نوع شفت که دارای مزوکارپ آبدار و اندوکارپ سخت[1] است متمایز است. این جنس دارای گونه‌های بسیاری است که به لحاظ اقتصادی برای تولید میوه، خشکبار، روغن و چوب و همچنین به عنوان گیاه زینتی برای استفاده در فضای سبز اهمیت دارند (آرادهایا و همکاران[2]،۲۰۰۴).

۱-۱-۲- تاریخچه زردآلو

تاریخچهٔ پرورش زردآلو در چین به ۵۰۰۰ سال قبل و در دنیای غرب به ۲۰۰۰ سال قبل برمی‌گردد. دکاندول[3] (۱۸۸۶) خاستگاه زردآلو را چین عنوان کرده است. بر طبق یک باور قدیمی زردآلو در زمان امپراطور Yu (۲۲۰۵ تا ۲۱۹۸ قبل از میلاد) در چین کشت شده است. زردآلو در ۶۵۸ سال قبل از میلاد در چین کاملا شناخته شده بود و باغ‌های زردآلو در دوره‌ای بین سال‌های ۴۰۶ تا ۲۵۰ قبل از میلاد در آنجا وجود داشته است (نای جتو و سورانی[4]،۱۹۸۱).

نقاشان چینی همواره از زردآلو به عنوان موضوعی در نقاشی‌های خود استفاده می‌کردند. پیوند زردآلو

1 Stony
2 Aradhya et al
3 De Candolle, 1886
4 Nyujtó, F., Surányi, D

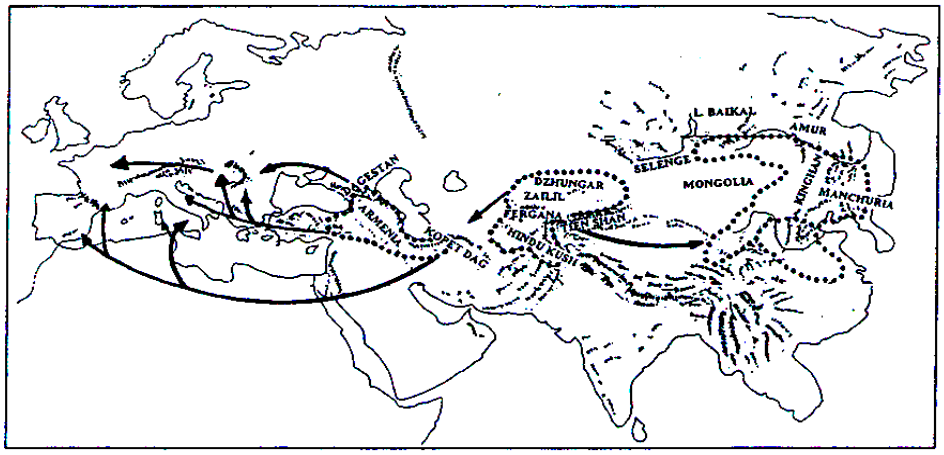
در حدود سال ۶۰۰ میلادی در چین شروع شد و از آن زمان به بعد ارقام مشخص زردآلو توسعه یافته اند (نای جتو،۱۹۸۱).

جژجان[1] (۱۹۷۷) از ارمنستان زردآلو را بومی آن کشور معرفی کرده است. او تاریخچهٔ طولانی کشت و کار زردآلو در منطقهٔ ایروان را دلیل ادعای خود بیان کرده است. بذرهای زردآلو متعلق به ۳۰۰۰ سال قبل از میلاد در سنجویت[2] و گارنی[3] در اطراف ایروان کشف شده است. ولی بر طبق نظر باستان‌شناس معروف آراکل جان[4] (۱۹۵۱) میوه‌هایی که این بذرها از آنها به دست آمده‌اند از منطقهٔ دیگری به ارمنستان آورده شده‌اند. دکاندول (۱۸۸۶) در بررسی اطلاعات موجود در مورد زردآلوهای وحشی در ارمنستان بیان کرد که سیاحانی نظیر کارکوچ[5] که به دفعات کوه‌های ارمنستان و منطقهٔ قفقاز را پیموده است هیچ زردآلوی وحشی را در آنجا مشاهده نکرده‌اند.

بر همین مبنا دکاندول نتیجه گرفت که زردآلو بومی ارمنستان نمی‌باشد. همچنین بذرهای زردآلو متعلق به دوره‌های بعد از این زمان نیز در پژوهش‌های قلعه کارمیر بلور[6] متعلق به قرن ۸ قبل از میلاد به دست آمده است (آرزومان جان[7]،۱۹۷۰).

کروسا ریناد[8] (۱۹۶۰) خاستگاه زردآلو را آسیای مرکزی دانستند که با مرکز آسیای میانه واویلوف تطابق دارد. آنها بیان کردند که زردآلو از این منطقه به سمت غرب و شرق گسترش یافته است (شکل ۱-۱). اگر این فرضیه مورد قبول واقع شود مرکز چین نیز مانند مرکز آسیای صغیر که از سوی واویلوف بیان شده بود به عنوان مراکز ثانویه گسترش زردآلو بوده است.

1 Jeszejan
2 Sengevit
3 Garni
4 Arakeljan
5 Kar Koch
6 Karmir Blur
7 Arzumanjan
8 Crossa-Raynaud, 1960



شکل ۱-۱ : گسترش زردآلو از مرکز آسیای مرکزی (واویلوف،۱۹۵۱)

۱-۱-۳ اقلیم مناسب زردآلو

زردآلو در نواحی کوهستانی با تابستان‌های گرم، خشک و طولانی و زمستان‌های سرد رشد مناسبی را نشان می‌دهد (بایلی، ۱۹۷۵). درختان مقاوم زردآلو می‌توانند سرمای زمستانهٔ ۳۵- تا ۴۰- درجهٔ سانتی‌گراد را تحمل کنند، ولی اگر دما اندکی افزایش یابد، با کامل شدن خواب درونی، به سرعت مقاومت خود را از دست می‌دهند.

بر این اساس سازگاری اقلیمی یکی از اهداف اصلی اصلاح زردآلو می‌باشد. در طی خواب درونی، تمایزیابی سلول مادری گرده[1] در دماهای بالای صفر ادامه می‌یابد ولی اگر دمای ۱۸ تا ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد و بالاتر برای مدتی در دورهٔ خواب درونی گیاه ادامه داشته باشد سبب توقف تمایز سلول‌های مادر گرده شده و حتی ممکن است سبب ریزش جوانهٔ گل شود.

مقاوم‌ترین ارقام به سرمای زمستانه برای مناطقی است که دما در زمستان متغیر است و مقاوم‌ترین ارقام به سرمای بهاره آنهایی هستند که علاوه بر داشتن دوره‌ی طولانی خواب درونی، مراحل تکامل از

1 Pollen Mather Cell (pmc)

میوز تا تبدیل به دانهٔ گرده کامل نیز در آنها طولانی است. این مراحل توسعه جوانه الزاما به یکدیگر همبستگی ندارند و می‌توانند به صورت جداگانه به ارث برسند (بایلی و هاف[1]، ۱۹۷۵).

کاستینا ارقام زردآلویی را شناسایی کرد که می‌توانند صفت دیر گلدهی را با وراثت پذیری بالا به نتاج منتقل نمایند.

۱-۱-۴ سرمازدگی بهاره

درختان زردآلو بیشترین خسارت را از سرماهای بهاره متحمل می‌شوند زیرا زودتر از سایر درختان میوه (غیر از بادام) گل می‌دهند. در زردآلو دمای بحرانی (حداقل دمایی که برای مدت ۳۰ دقیقه بدون هیچ آسیبی قابل تحمل است) برای هر یک از مراحل فنولوژی نمو گل متفاوت است. در جدول ۱-۱ درجه بحرانی همراه با متوسط دماهایی که ۱۰ و ۹۰ درصد از جوانه‌های نرمال در آن دماها می-میرند برای مراحل گلدهی ذکر شده است.

۱-۱-۵ نیازهای خاکی

زردآلوهای پیوند شده روی پایه‌های زردآلو به خاک‌های با زهکش خوب نیاز دارند. در خاک‌هایی که زهکش محدود بوده و بعد از آبیاری غرقاب می‌شوند پایه‌های آلو مورد نیاز است. زردآلو سازگاری خوبی با خاک‌های دارای pH حدود ۸-۶ نشان می‌دهد و تا اندازه‌ای شرایط قلیایی را تحمل می‌کند اما شدیدا به سطوح بالای نمک در خاک حساس است.

1 Bailey and Hough

جدول ۱-۱ : درجه حرارت بحرانی برای مراحل جوانه گل زردآلو (بر حسب سانتی‌گراد)

	تورم جوانه	تفرق نوک جوانه	قرمزی گلبرگ	اولین سفیدی	اولین گلدهی	مرحله تمام گل	بدون پوشش گل
دمای بحرانی	-	-۵	-	-۳/۹	-	-۲/۲	-
۱۰٪ مرگ	-۹/۴	-۶/۷	-۵/۶	-۴/۴	-۳/۹	-۲/۸	-۲/۸
۹۰٪ مرگ	-	-۱۸	-۱۳	-۱۰	-۷/۲	-۵/۶	-۴/۴

۱-۱-۶ طبقه بندی زردآلو

اکثر گونه‌های زردآلو دیپلوئید خود گرده‌افشان با ۸ جفت کروموزوم (۲n=۱۶) می‌باشند. *P.armeniaca* ژنوم کوچکی دارد (bp $۱۰^{۸}\times$ ۵/۹) که حدود ۲ برابر سایز *Arabidopsis thaliana* است و در جایگاهی ما بین دو گونه دیپلوئید مهم دیگر جنس *Prunus* یعنی هلو (bp $۱۰^{۸}\times$ ۵/۴) و آلو (bp $۱۰^{۸}\times$ ۶/۸) قرار دارد (آروموگاناتان و ارل[1]، ۱۱۹۹۱). زردآلو بر روی هلو و آلو قابل پیوند بوده و با هر دو قابل دو رگ گیری است

۱-۱-۷ کشت و تولید زردآلو

زردآلو در بسیاری از نقاط ایران کشت و کار می‌شود. مناطق عمده‌ی کشت زردآلو در ایران استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، سمنان، تهران، یزد، کرمان و زنجان می‌باشد. در سطح بین المللی کشورهای ترکیه و ایران به ترتیب اولین و دومین کشورهای تولیدکنندهٔ زردآلو در جهان هستند (فائو ۲۰۱۲) که بعد از ایران کشورهای ازبکستان، الجزایر و ایتالیا در رتبه‌های بعدی قرار دارند (جدول ۱-۲).

1 Arumuganathan and Earle

جدول ۱-۲ کشورهای عمدهٔ تولید کنندهٔ زردآلو در جهان و میزان تولید آنها در سال ۲۰۱۲ فائو

رتبه	کشور	میزان تولید (تن)	سطح زیر کشت (هکتار)
۱	ترکیه	۷۹۵۷۶۸	۶۰۷۳۲
۲	ایران	۴۶۰۰۰۰	۵۰۵۰۰
۳	ازبکستان	۳۶۵۰۰۰	۳۷۰۰۰
۴	الجزایر	۲۶۹۰۰۰	۳۷۸۸۹
۵	ایتالیا	۲۴۷۱۴۶	۱۹۱۸۶
۶	پاکستان	۱۹۲۵۰۰	۵۰۰۰
۷	فرانسه	۱۸۹۷۱۱	۱۳۷۷۸
۸	مراکش	۱۲۲۴۰۵	۱۲۲۲۵
۹	اسپانیا	۱۱۹۴۰۰	۱۸۴۰۰
۱۰	مصر	۹۸۷۷۲	۶۱۲۷

۱-۱-۸ ارزش غذایی و موارد مصرف زردآلو

زردآلو حاوی ماده‌ی بتا کاروتن است که به رشد اطفال کمک کرده و باعث تقویت قوه بینایی می‌شود. در بین سبزیجات هویج بیشترین مقدار بتا کاروتن را دارد و در بین میوه ها، زردآلو دارای بیشترین مقدار بتا کاروتن است. بتا کاروتن از دسته کاروتنوئیدها و پیش‌ساز ویتامین A در بدن است. همچنین به عنوان یک آنتی اکسیدان، بدن را از صدمات رادیکال‌های آزاد حفظ می‌کند. اخیراً ثابت شده است که تعداد زیادی کاروتنوئیدهای دیگر مثل کورستین و مقادیر زیادی اسید سالیسیلیک در زردآلو وجود دارد. این مواد متعلق به گروه بزرگی از مواد بیواکتیو هستند و می‌توانند از مواد غذایی، مواد درمانی بسازند و غشاء مخاطی را ترمیم نمایند. بتا کاروتن موجود در زردآلو مانع پینه بستن و خشک شدن پوست می‌شود.

بخش خوراکی میوه در زردآلو حدود ۹۴٪ از میوه را تشکیل می‌دهد (جدول ۱-۴) که منبع غنی از ویتامین A (بتا کاروتن) و ویتامینC (اسید آسکوربیک) می‌باشد (ویلز[1] و همکاران، ۱۹۸۳).

جدول ۱-۳ ارزش غذایی و مواد موجود در ۱۰۰ گرم میوهٔ تازهٔ زردآلو (ویلز ۱۹۸۳)

انرژی	۵۴ کیلوکالری	ویتامین **A**	۲۷۰۰ واحد
آب	۸۴-۸۱ گرم	ویتامین **B1**	۰/۰۳ میلی گرم
مواد قندی	۱۲-۱۰ گرم	ویتامین **B2**	۰/۰۴ میلی گرم
پروتئین	۱ گرم	ویتامین **B3**	۰/۶ میلی گرم
کلسیم	۱۸ میلی گرم	ویتامین **C**	۱۰ میلی گرم
فسفر	۲۳ میلی گرم	اسید سالیسیلیک	۵/۱ گرم
سدیم	۱ میلی گرم	مواد نشاسته‌ای	۳۵/۶ گرم
پتاسیم	۲۸۰ میلی گرم	آلبومین	۰/۴۵ گرم
آهن	۰/۵ میلی گرم	چربی	۰/۱۲ گرم

زردآلو مصارف متعددی دارد. این محصول به عنوان میوه تازه مصرف می‌شود. ولی بخش زیادی از تولید جهانی نیز به خشک کردن اختصاص دارد. زردآلو همچنین به صورت کنسرو شده، منجمد و غذای کودک نیز مصرف می‌شود. سایر محصولات حاصل از آن شامل انواع نوشیدنی‌ها، مربا و آبمیوه است. از پوست خرد شدهٔ هستهٔ زردآلو برای تمیز کردن موتورهای جت و از روغن مغز زردآلو برای تولید صابون و ادکلن استفاده می‌شود (هورمازا[2]، ۲۰۰۲). در برخی از نواحی آسیایی، زردآلو بیشتر به خاطر هسته‌ی خوراکی و روغن مغز آن کشت می‌شود که اهمیت آن در این نواحی از انواعی که برای مصرف میوه کشت می‌شود بیشتر است (لاینه[3] و همکاران، ۱۹۹۶ و بایلی ۱۹۷۵). بذر اغلب زردآلوهای کشت شده شیرین است و می‌تواند مانند بادام مصرف شوند (هورمازا ۲۰۰۲). مطالعات اخیر نشان داد که Bainiku-ekisu حاوی یک ماده بیواکتیو با نام مامفرال است که در حین فرآوری میوه ایجاد می‌شود و سبب افزایش رقت خون می‌شود (اتسونومی‌یا و همکاران، ۲۰۰۲).

1 Wills
2 Hormaza
1 Layne

۱-۱-۹- اصلاح زردآلو

برای اصلاح و تغیر ارقام نامطلوب در زردآلو معمولا از روش‌های سنتی و سرشاخه کاری استفاده می-شود که باعث تغیر واریته یک درخت توسط عمل پیوند زدن می‌گردد. البته این روش خطر انتقال بیماری‌های ویروسی را افزایش می‌دهد (کوبوریس و واسیلاکاکیس[۱]، ۲۰۰۶). اخیرا هیبریدهای درون گونه‌ای جدیدی توسط تلاقی های گرده افشان مصنوعی به دست آمده است. در حال حاضر به دلیل درجه هتروزیگوستی بالا در برخی ارقام زردآلو و نیز خودناسازگاری در برخی گونه‌ها، بهبود ارقام با روش‌های اصلاح کلاسیک به کندی پیش می‌رود (لوپز نوگوئرو[۲] و همکاران، ۲۰۰۹). علاوه بر این، برنامه‌های اصلاح کلاسیک احتیاج به زمان زیادی دارند و پر زحمت می‌باشد. روش های اصلاحی جدید با ارائه ابزار بیوتکنولوژی می تواند امکان تسریع توسعه ارقام جدید با بهبود ویژگی های زردآلو را فراهم آورد. به کارگیری مهندسی ژنتیک باعث تولید ارقامی شده که از نظر صفات با ارزش کشاورزی و اقتصادی بسیار حائز اهمیت می‌باشند. مهندسی ژنتیک در گیاهان زراعی و باغبانی به منظور تولید گیاهان تراریخت با توانایی بیان ژن خارجی برای ایجاد مقاومت به عواملی چون ویروس-ها، حشرات، علف کش‌ها، عوامل غیرزنده مانند سرمازدگی و افزایش فراورده های ذخیره‌ای تغیر شکل یافته بکار رفته است (موک پادیا[۳] و همکاران، ۱۹۹۲).

تولید موفقیت آمیز و کارآمد گیاهان تراریخته بستگی به توانایی باززایی گیاه کامل از سلول ها، بافت ها و اندام هایی که DNA ی خارجی را دریافت و بیان می نمایند دارد. تولید گیاه به تعداد زیاد، در مدت زمان کوتاهتر نسبت به شرایط طبیعی،از مزایای عمده کشت بافت گیاهی و لازمه فناوری مهندسی ژنتیک می‌باشد (هویکاس و شلپرورت[۴]، ۱۹۹۲). در حال حاضر در مورد گیاه زردآلو کمبود

4 Koubouris and Vasilakakis
1 López-Noguera
2 Mukhopadhyay
3 Hooykass and Schilperoort

سیستم‌های موثر باززایی و پروتوکل‌های بهینه‌سازی شده مهمترین فاکتور محدودکننده برای پیشرفت تکنیک‌های انتقال ژن در این گیاه می‌باشد (کوبوریس و واسیلاکاکیس، ۲۰۰۶).

۱-۲ تکنیک های کشت بافت

اصطلاح کشت بافت گیاهی[۱] به طور کلی به کشت درون شیشه‌ای[۲] هر قسمتی از گیاه اعم از یک سلول انفرادی، بافت و یا اندام در شرایط استریل اتلاق می‌گردد.. سیستم‌های کشت بافت گیاهی غالباً به عنوان سیستم‌های الگو[۳] برای بررسی‌های گوناگون فیزیولوژیکی، زیست شیمیایی، ژنتیکی و دشواری‌های ساختاری گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. کشف اکسین‌ها توسط ونت[۴] (۱۹۳۴) و سیتوکینین‌ها توسط اسکوگ[۵] و همکاران (۱۹۶۵) مقدمه اولین موفقیت کشت درون شیشه‌ای بافت-های گیاهی شد. در مطالعه‌ای پیشنهاد شد اثرات متقابل کمی بین اکسین‌ها و سیتوکسین‌ها، نوع رشد و وقایع ریخت‌زایی را که در گیاه اتفاق می‌افتد، تعیین می‌کند (اسکوک و میلر[۶]، ۱۹۵۷).

کشت بافت بر مبنای سه توانایی اصلی گیاه استوار است (تاجی[۷] و همکاران، ۲۰۰۲):

۱. **قدرت باززایی[۸] گیاه یا توتی‌پوتنسی:** اولین تلاش با نظریه‌پردازی گوتیب هابرلنت دانشمند آلمانی در مورد توانایی تبدیل یک سلول به موجود کامل یا توتی‌پوتنسی در اوایل قرن بیستم شروع شد. وی اظهار داشت که مطالعه سیستماتیک سازمان‌یافته‌ای روی کشت سلول‌های رویشی ایزوله شده گیاهان عالی انجام نشده است. همچنین وی ادعا کرد که اگر محیط و تغذیه سلول های کشت شده تنظیم شود این سلول‌ها می توانند گیاهان نرمال را به

1 Plant tissue culture
2 *In vitro*
3 Model
4 Went
5 Skoog
6 Skoog and Miller
7 Taji
8 Regeneration

وجود آوردند (تاجی و همکاران، ۱۳۸۲). این نظریه به طور کامل و واضح توسط اسمیت[1] (۲۰۰۰) بیان شد. توتی‌پوتنسی قابلیت ارثی یک سلول برای رشد و تبدیل به گیاهی کامل در صورت تحریک مناسب است. به عبارت دیگر توتی‌پوتنسی پتانسیل سلول یا بافت برای تشکیل انواع سلول‌ها و یا باززایی گیاه کامل است (پیریک[2]، ۱۹۹۹).

۲. **تمایز زدایی**[3]: به معنی ظرفیت سلول‌های بالغ برای برگشت به شرایط مریستمی و تولید یک نقطه رشد جدید می‌باشند که با تمایز مجدد که قدرت سازماندهی و تشکیل اندام جدید می باشند، ادامه می‌یابد (تاجی و همکاران، ۲۰۰۲).

۳. **شایستگی**[4]: قابلیت دورن‌زاد یک سلول یا بافت مشخص بر رشد در مسیری ویژه را توصیف می‌کند. مثلاً سلول‌هایی که از نظر جنین‌زایی دارای شایستگی هستند قادر به توسعه به جنین‌های کاملاً فعال می‌باشند (تاجی و همکاران، ۲۰۰۲).

۱-۲-۱- مزایا و کاربردهای کشت بافت

در سال های اخیر فنون کشت بافت گیاهی به یک ابزار قدرتمند جهت تکثیر بسیاری از گونه‌های گیاهی تبدیل شده است. تولید گیاهانی با ساختار ژنتیکی یکسان، معمول‌ترین مزیتی است که به کشت بافت گیاهی نسبت داده می‌شود (تاجی و همکاران، ۱۳۸۲). از دیگر مزایای تکنیک کشت بافت گیاهی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱. امکان تکثیر سریع کلون[5] ها
۲. حفظ و نگهداری منابع ژنتیکی
۳. امکان گزینش گیاه

9 Smith
1 Pierik
3 Dedifferentiation
4 Competency
5 Clone

۴. قابل بررسی بودن شرایط و کیفیت گیاه مادری

۵. محیط کنترل شده

۶. امکان استفاده از این تکنیک برای تولید هیبریدها در گونه های ناسازگار از طریق کشت جنین یا تخمک

۷. امکان تولید گیاه در طول سال با استفاده از روش های دورن‌شیشه ای

۸. امکان پذیر بودن تکثیر گونه هایی که تکثیر رویشی آن ها بر سختی صورت می گیرد.

۹. با استفاده از این تکنیک گیاهان هاپلوئید ممکن است از طریق کشت حاصل شوند که مزایای بیشتری نسبت بر گیاهان دپلوئید دارند. علاوه بر این پلوئیدهای مضاعف شده هموزیگوس هستند و لذا به عنوان مواد خالص در برنامه های اصلاحی قابل استفاده‌اند.

۱-۲-۲- اندام‌زایی

در کشت بافت گیاهی اندام‌زایی فرایندی است که طی آن اندام‌های گیاهی نظیر ساقه، ریشه، جوانه، گل و غیره تولید می‌شوند. این فرایند عبارت است از تولید اندام‌ها از نقاطی غیرعادی نسبت به بافت مادری، بر روی یک ریزنمونه سازمان یافته که فاقد مریستم از قبل تشکیل شده می‌باشد. ساقه‌ها و ریشه‌های نابجا از بافت‌هایی منشأ می‌گیرند که در حالت طبیعی این اندام‌ها را تولید نمی‌نمایند. ساقه‌های نابجا ساختارهایی متشکل از ساقه و برگ هستند که از بافت‌های گیاهی در مکان‌هایی غیر از زاویه برگ منشأ می‌گیرند. نمو گیاه از طریق اندام‌زایی عبارت از تشکیل اندام‌ها با منشأ نابجا و یا منشأ مجدد می‌باشد. گیاه کامل باززایی شده با این روش، یک ساختار یک قطبی می‌باشد (فارسی، م و ذوالعلی، ۱۳۸۷)

تولید گیاهان به روش اندام‌زایی به دو طریق امکان پذیر است.

۱_ اندام‌زایی از بافت کالوس با منشأ مجدد

۲_ خروج اندام‌های نابه‌جا به طور مستقیم از ریز نمونه

۱-۲-۳- اندام‌زایی از بافت کالوس

باززایی گیاه از ریزنمونه کشت شده، مستلزم تولید کالوس‌های پایه و سپس تمایز جوانه ساقه از این بافت است. ایجاد کالوس و سپس اندام‌زایی در بسیاری از گیاهان و از ریزنمونه‌های متعددی نظیر کوتیلدون، هیپوکوتیل، ساقه، برگ، نوک ساقه، ریشه گل آذین جوان، گلبرگ‌ها، جنین و غیره در شرایط این‌ویترو صورت گرفته است (فارسی، م و ذوالعلی، ۱۳۸۷).

برای باززایی موفق گیاه در هر گونه یا واریته معین، ممکن است به ریزنمونه خاصی نیاز باشد. ریزنمونه‌های حاصل از اندام‌های بالغ و نابالغ را می‌توان در تهیه کالوس و سپس باززایی گیاه مورد استفاده قرار داد. با این وجود، معمولا ریزنمونه‌های دارای سلول‌های فعال میتوزی، برای تولید کالوس مناسب‌تر هستند. بافت‌ها و اندام‌های نابالغ در کشت این‌ویترو از نظر مورفوژنتیکی نسبت به بافت‌ها و اندام‌های بالغ انعطاف پذیرترند. اندازه و شکل ریز نمونه نیز مهم است. تعداد زیاد سلول در ریزنمونه-های بزرگتر، احتمال تثبیت یک کشت با دوام را افزایش می‌دهد. درصد کمی از سلول‌های یک ریزنمونه معین در تشکیل کالوس شرکت می‌نمایند. محل تشکیل کالوس معمولا در سطح پیرامونی ریزنمونه و یا در سطح بریده شده است. بافت کالوس در اثر ایجاد زخم و یا در پاسخ به تنظیم کننده رشدهای اضافه شده در محیط کشت ایجاد می‌شود. ریزنمونه‌هایی نظیر برگ‌های بالغ، ریشه، ساقه، دمبرگ، اجزای گل، می‌توانند با موفقیت برای تولید گیاهچه به روش اندام‌زایی مورد استفاده قرار گیرند. غلظت مواد تنظیم‌کننده رشدی در محیط کشت برای اندام‌زایی بسیار مهم است. اسکوگ و میلر در سال ۱۹۵۷ برای اولین بار نقش مواد تنظیم کننده رشدی را در اندام‌زایی نشان دادند. ماهیت بافت کالوس به بافت ریزنمونه و یا بافت‌هایی که ریزنمونه از آن منشأ گرفته است و همچنین به ترکیب محیط کشتی که برای تولید و نگه‌داری آن به کار می‌رود، بستگی دارد. کالوس را می‌توان با

تهیه واکشت‌های مکرر برای مدت زمان طولانی نگه داشت، اما ترکیب و ساختار آن ممکن است به مرور زمان تغیر کند، انتقال قطعات کالوس به شرایطی که موجب رشد سازمان یافته شود به تشکیل مریستموئیدها که مراکز رشد نیز نامیده می‌شوند، می‌انجاند. مریستموئیدها توده‌های متمرکزی از سلول‌های شبه کامبیومی هستند که ممکن است به دلیل ظهور سلول‌های تراکئیدی در مرکز، به آوند نیز مجهز شوند. این توده‌ها محل تشکیل اندام در بافت کالوس بوده و قادر به تولید ساقه یا ریشه می-باشند.

با تغییر مقدار و نوع تنظیم کننده‌های رشد می‌توان مسیر مورفوژنز (شکل زایی) را در *in vitro* کنترل نمود. محیط کشت محتوی مقادیر زیاد اکسین، تشکیل کالوس را تحریک خواهد نمود. کاهش مقدار اکسین و افزایش غلظت سیتوکینین نیز برای تولید ساقه از بافت کالوس مرسوم است (فارسی، م و ذوالعلی، ۱۳۸۷).

۱-۲-۴- تشکیل اندام نابجا به طور مستقیم

بافت‌های رویشی گیاهان عالی تحت شرایط ویژه قادر به تولید جوانه‌های نابجا[1] می‌باشند. جوانه‌های نابجا آنهایی هستند که مستقیما از یک اندام گیاهی یا یک قطعه متعلق به آن و بدون نیاز به کالوس (به عنوان مرحله حد واسط) منشأ می‌گیرند. تولید ساقه‌های نابجا به طور مستقیم بر روی ریشه، برگ، فلس‌های پیاز و سایر اندام‌های گیاه یکی از روش‌های مرسوم تکثیر گیاهان است. مثال‌های متعددی در منابع مختلف در مورد تولید ساقه‌های نابجا بر روی اندام‌های گونه‌های مختلف گیاهان ثبت گردیده است. تسریع در تشکیل جوانه‌ها با استفاده از تنظیم کننده‌های رشد سیتوکینین در چندین گونه گیاهی به ثبت رسیده است. با این وجود، مقدار اکسین و سیتوکینین مورد نیاز از منبع خارجی در

1 Advantitious buds

این فرایند برحسب نوع بافت مورد نظر متغیر است، که این امر ظاهرا به مقادیر درونی هورمون‌ها در بافت مربوط بستگی دارد.

محرک اصلی برای تولید ساقه نابجا در روش‌های مرسوم تکثیر، جداسازی فیزیکی قلمه از گیاه والد است که این امر موجب تغییر در تولید و توزیع هورمون‌های درون‌زا می‌گردد. در روش‌های این‌ویترو نیز عمل مشابهی بر روی ریزنمونه‌ها اعمال می‌شود و در بعضی گونه‌ها تولید ساقه ممکن است به طور خودبه‌خود در یک محیط کشت فاقد هر نوع ماده تنظیم‌کننده رشدی رخ دهد، اما در اغلب گونه‌ها افزودن تنظیم‌کننده‌های رشد به محیط کشت برای شروع تشکیل ساقه لازم است. دو نوع مهم از مواد تنظیم‌کننده‌های رشدی ، یعنی اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها بسته به نوع ریزنمونه، سن گیاه و شرایط رشد با نسبت‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. باززایی نابجا در شرایط این‌ویترو ممکن است ساقه‌های بسیار بیشتری نسبت به روش تکثیر ساقه‌های جانبی تولید نماید. تکثیر ساقه‌های نابجا پرکاربردترین تکنیک در سیستم ریز ازدیادی است (شریفی و همکاران، ۱۳۸۹)

۱-۲-۵- کشت کالوس

اساسا کالوس یک بافت توموری گیاهی کم و بیش سازمان نیافته است که در زخم‌های بافت‌ها و اندام‌های تمایز یافته، به وجود می‌آید. بنابراین کالوس یک بافت سازمان نیافته با تمایز خیلی کم است و سلول‌های آن طبیعت پارانشیمی دارند. بافت ریزنمونه یک بافت تمایز یافته است (ریشه، ساقه، برگ، گل و...) که به عنوان ماده آغازین برای تولید بافت کالوس مورد استفاده قرار می‌گیرد. بافت‌های ریزنمونه معمولا سطوح مشخصی از تقسیم سلولی، ازدیاد سلولی و سازمان‌یافتگی سلول‌ها را در ساختارهای ویژه‌ای نظیر سیستم آوندی نشان می‌دهند. اگر در یک ریزنمونه جدا شده فقط سلول‌های تمایز یافته وجود داشته باشد، آنگاه بایستی قبل از شروع تقسیم سلولی، عمل تمایز زدایی انجام شود. اگر ریزنمونه جداسازی شده از قبل محتوی بافت مریستمی باشد، قادر است بدون نیاز به تمایز زدایی

بلافاصله تکثیر خود را شروع نماید. تشکیل کالوس تحت تاثیر مواد تنظیم کننده رشدی خارجی که به محیط کشت اضافه می‌شوند، قرار می‌گیرد. نوع ماده تنظیم کننده رشد مورد نیاز و غلظت مصرفی آن در محیط کشت، به طور شدیدی به ژنوتیپ و محتوی تنظیم کننده رشدی درون ریزنمونه بستگی دارد.

نوع ماده شروع کننده (جوان یا پیر) و محلی از گیاه که ریزنمونه از آنجا گرفته می‌شود، تعیین کننده سطح هورمن‌های درون زا می‌باشد، که تاثیر به سزایی بر فرآیندهایی نظیر تقسیم سلولی و شکل-گیری اندام و جنین دارند. فاکتورهای مهم دیگر در تشکیل کالوس عبارتند از: ژنوتیپ ماده گیاهی، ترکیبات محیط کشت و فاکتورهای فیزیکی رشد (نور، دما و...).

پس از تشکیل بافت کالوس، این بافت برای رشد بیشتر به محیط کشت جدیدی منتقل می‌شود که به این عمل واکشت[1] می‌گویند.

پنج مرحله در رشد کالوس وجود دارد:

۱_ فاز کمون: در این مرحله، سلول‌ها برای آغاز تقسیم مهیا می‌شوند.

۲_ فاز تصاعدی: در این مرحله، تقسیم سلولی با حداکثر سرعت صورت می‌گیرد.

۳_فاز خطی: در این مرحله تقسیم سلولی کند است، اما میزان توسعه سلولی افزایش می‌یابد.

۴_ فاز کند شدن: مرحله‌ای است که سرعت تقسیم و توسعه سلولی (هر دو) کاهش نشان می‌دهد.

۵_ فاز سکون: در این مرحله اندازه و تعداد سلول‌ها ثابت می‌ماند (فارسی، م و ذوالعلی، ۱۳۸۷).

1 Sub-calture

۱-۲-۶- محیط کشت

یکی از عوامل ایجاد رشد و مورفوژنز در کشت بافت گیاهی مواد تشکیل دهنده محیط کشت می‌باشد. انتخاب محیط کشت یا تهیه فرمولاسیون آن برای موفقیت در کشت بافت ضروری است. هیچ محیط کشت مشخصی را نمی‌توان برای رشد انواع سلول‌ها توصیه کرد و اغلب لازم است تغییراتی در محیط کشت برای پاسخگویی انواع مختلف زیرنمونه صورت گیرد. بیشتر گونه‌های گیاهی به محیط‌های کشت مختلفی نیاز دارند از این رو انتخاب محیط کشت مناسب برای یک گونه با مشکلات فراوانی همراه است. کاربرد محیط کشت MS[1] به دلیل اینکه بسیاری از گیاهان به آن عکس العمل مناسبی نشان می دهند بسیار متداول است (پیریک، ۱۹۹۹).

به طور کلی محیط های کشت از بخشی یا تمام موارد زیر تشکیل شده است:

۱-عناصر پر مصرف (N، P، K، Ca، Mg و S): محیط کشت برای رشد کافی سلول حداقل دارای ۲۵ تا ۶۰ میلی مول نیتروژن معدنی است. پتاسیم به غلظت ۲۰ تا ۳۰ میلی مول و فسفر، منیزیوم، گوگرد و کلسیم ۱ تا ۳ میلی گرم بر لیتر می باشند.

۲-عناصر کم مصرف (Mo، Cu، B، Zn، Mn و Fe): مس و کبالت در حالت عادی به غلظت ۰/۱ میکرومول، مولیبدن ۱ میکرومول، ید ۵ میکرومول، روی ۵ تا ۳۰ میکرومول، منگنز ۲۰ تا ۹۰ میکرومول و بُر ۲۵ تا ۱۰۰ میکرومول در محیط کشت به کار می رود. در حالت عادی، برای تهیه‌ی محیط کشت شکل‌های کلات آهن و روی مورد استفاده قرار می‌گیرد. آهن ممکن است مهمترین عنصر کم مصرف باشد. سیترات آهن نیز ممکن است در محیط کشت به کار روند، اما این ترکیبات به سختی در آب حل می‌شوند و معمولاً پس از تهیه محیط کشت رسوب می‌کند. موراشیگ و اسکوگ با بکارگیری کلات آهنی به نام اتیلن دی امین ترا استیک (EDTA) این مشکل را برطرف کردند.

۳-ویتامین‌ها: ویتامین‌های لازم برای گیاهان به عنوان کاتالیزور در فرآیندهای متابولیکی به‌کار می-رود. ویتامین‌هایی که بیشتر در محیط کشت سلول‌های گیاهی به کار می‌رود عبارتند از: تیامین

1 Murashige and Skoog

(B_1)[1]، اسید نیکوتیک، پیریدوکسین (B_6)[2] و میواینیوزیتول[3]. ویتامین‌های دیگر مانند بیوتین[4]، اسید فولیک[5]، اسید آسکوربیک[6]، اسید پانتوتنیک[7]، ویتامین E ، ریبوفلاوین[8] و اسید آمینو بنزوئیک[9] که در برخی کشت‌ها به کار می‌روند (شنک[10] و همکاران، ۱۹۷۲).

۴-کربن و منبع انرژی: قند، جزء بسیار مهمی در هر نوع محیط‌کشت است و چون معمولاً شرایط رشد برای فتوسنتز کافی نیست، یا اصولاً به علت تاریکی، فتوسنتز انجام نمی‌شود اضافه کردن قند به محیط‌کشت ضروری است. از میان کربوهیدرات‌هایی که در محیط‌های کشت به کار می‌روند ساکارز ترجیح داده می‌شود. ساکاروز موجود در محیط کشت به سرعت به فروکتوز و گلوکز شکسته می‌شود. ابتدا گلوکز و پس از آن فروکتوز توسط یاخته‌ها به کار برده می‌شود. سایر کربوهیدرات‌های بررسی شده عبارتند از لاکتوز، گالاکتوز، رافینوز، مالتوز و نشاسته (شنک و همکاران، ۱۹۷۲)

۵- اسیدهای آمینه و سایر افزودنی‌های نیتروژن دار: با آنکه سلول های کشت شده بطور عادی قادر به سنتز تمام اسیدهای آمینه مورد نیاز خود هستند، افزودن برخی از اسیدهای آمینه به ویژه برای کشت های یاخته‌ای و پروتوپلاست اهمیت دارد. اسیدهای آمینه میزان متوسطی از منبع نیتروژن قابل استفاده را در اختیار یاخته‌های گیاهی قرار می‌دهد که در مجموع می‌تواند سریع‌تر از نیتروژن معدنی توسط یاخته‌ها جذب شود. معمول‌ترین منابع نیتروژن آلی که در محیط‌های کشت کاربرد دارند

1 Thiamin
2 Pyridoxin
3 Myo-inositol
4 Biotin
5 Folic acid
6 Ascorbic acid
7 Pantotenic acid
8 Riboflavin
9 P- aminobenzoic acid
6 Schenk

آمیزه‌های اسیدهای آمینه (مانند کازوئین هیدرولیز شده[1])، ال- گلوتامین[2]، ال- آسپاراجین[3] و آدنین می‌باشد. (لی چون و موراشیگ[4]، ۱۹۷۷)

۶-آگار: اکثر بافت‌ها روی محیط کشت جامد کشت می‌شوند که توسط آگار یا جانشین آن مانند ژل رایت[5] و فیتاژل، ژله‌ای می‌شوند. آگار معمولی‌ترین ماده ژِل مانند است که برای تهیه‌ی محیط‌های کشت جامد و نیمه جامد کشت یافت به کار گرفته می‌شود. آگار چندین مزیت بر دیگر مواد ژل مانند دارد و نخست اینکه هنگام آمیخته شدن آگار با آب ژلی، تولید می‌شود که در دمای حدود ۶۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد ذوب شده و در دمای حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد جامد می گردد. از این رو ژِل آگار با تمام دماهای نگهداری، سازگاری دارد. افزون بر این، آگار واکنشی با مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت نداشته و توسط آنزیم‌های گیاهی جذب نمی‌شود. سِفتی ژِل آگار بستگی به غلظت و نوع آگاری که در محیط‌کشت به‌کار رفته و نیز pH محیط کشت دارد. غلظت‌هایی از آگار که بطور معمول در محیط‌های کشت یاخته به کار می‌رود بین ۰/۵ تا ۱ درصد است (تورز، ۱۳۸۶)

۸-آب: در کشت‌بافت معمولاً از آب مقطر یا آب مقطر ۲ بار تقطیر استفاده می‌شود (تاجی و همکاران، ۱۳۸۲). آب اصلی‌ترین ترکیب تشکیل‌دهنده محیط‌کشت است زیرا ۹۵ درصد از محیط‌کشت را آب تشکیل می‌دهد (پیریک، ۱۹۹۹).

۹- اسیدیته: pH محیط کشت معمولاً بین ۵/۶ تا ۵/۸ تنظیم می‌شود، اما گیاهان مختلف برای رشد مطلوب ممکن است به pH های متفاوتی نیاز داشته باشند. اگر pH از ۶ بالاتر رود ممکن است محیط کشت بسیار سخت و سفت شود و اگر کمتر از ۵/۵ باشد مشکلات ژله‌ای شدن محیط کشت را خواهیم داشت (تاجی و همکاران، ۱۳۸۲).

1 Casein hydrolysate
2 L-glutamin
3 L-esparagin
10 Li-Chun and Murashige
5 Gelrite

۱-۲-۷- تنظیم‌کننده های رشد

هورمون‌ها ترکیبات آلی هستند که به طور طبیعی در گیاهان عالی سنتز می‌شوند و رشد و نمو را تحت تاثیر قرار می‌دهند. هورمون‌ها معمولا در مکانی متفاوت از محل تولیدشان به فعالیت پرداخته و فقط در مقادیر بسیار اندک، موجود و فعال می‌باشند. غیر از ترکیبات طبیعی، انواع مختلفی از ترکیبات مصنوعی نیز تولید شده‌اند که مشابه انواع طبیعی می‌باشند. این ترکیبات مجموعا" تنظیم کننده‌های رشد" نامیده می‌شوند. دو گروه اصلی از تنظیم کننده‌های رشد وجود دارد که در کشت بافت گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. این دو گروه عبارتند از اکسین ها و سیتوکینین‌ها. در حالیکه دیگر تنظیم‌کننده‌های رشد یعنی جیبرلین‌ها، اسید آبسسیک، اتیلن و غیره اهمیت کمی دارند. تنظیم‌کننده رشد اکسین ایندول استیک اسید[۱] وتنظیم کننده رشد سیتوکینین زآتین[۲] نمونه هایی از تنظیم‌کننده رشدهای طبیعی هستند، در حالیکه بقیه تنظیم‌کننده‌های رشد مصنوعی هستند.

ویژگی عمومی اکسین‌ها القاء رشد سلول و تشکیل کالوس است. اکسین موجب تقسیم سلول، طویل شدن سلول، تورم بافت‌ها و تشکیل ریشه‌های نابجا می‌شود. اکسین غالبا از شکل‌گیری ساقه‌های نابجا و جانبی ممانعت می‌کند. در غلظت‌های پایین اکسین، تشکیل ریشه‌های نابجا بیشتر می‌شود. در-حالیکه در غلظت‌های بالای اکسین، ریشه تشکیل نمی‌شود و بافت کالوس ایجاد می‌گردد. ترکیبی که بیشترین کاربرد را داشته و بسیار موثر است، ۲ و ۴- دی کلروفنو کسی استیک اسید *(2,4-D*[۳]*)* می-باشد. معمول ترین اکسین های مورد استفاده عبارتند از IAA، IBA[۴]، NAA[۵].

1 Indol -3- acetic acid
2 *Zeatin*
3 2-4-DichloroPhenoxy acetic acid
4 H-indol-3-butric acid
5 1-naphthaleneacetic acid

سیتوکنین‌ها مشتقات آدنین بوده و نقش مهمی در القاء ساقه‌دهی ایفا می‌نماید. سیتوکینین‌هایی که معمولاً در محیط‌های کشت به کار می‌روند شامل BAP[1]، TDZ[2]، KIN[3]، Zeatin و 2-ip[4] می‌باشد. این تنظیم‌کننده‌های رشد غالبا برای تحریک رشد و نمو به‌کار می‌روند. اگر همراه با اکسین به‌کار برده شوند، تقسیم سلولی را سرعت می‌بخشند. در غلظت‌های بیشتر (۱ تا ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر)، تشکیل ساقه‌های نابجا القاء شده و تشکیل ریشه متوقف می‌شود. این تنظیم کننده‌های رشد با کاهش غالبیت انتهایی، تشکیل ساقه‌های جانبی را تسریع می‌نمایند.

۱-۲-۸- ضدعفونی

ریزنمونه‌ها و کشت‌ها ممکن است توسط انواع میکروارگانیزم‌ها مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و یا حشرات آلوده شوند. چنین ارگانیزم‌هایی معمولاً در سطح و داخل بافت گیاهی وجود دارند. بسیاری از آن‌ها تحت شرایط طبیعی بیماری‌زا نیستند ولی شرایط دورن‌شیشه‌ای مناسب برای رشد گیاه، یعنی سطوح بالای عناصر معدنی، ساکاروز، رطوبت نسبی و درجه حرارت بالا، باعث رشد و تکثیر سریع میکروارگانیزم‌ها شده و در نتیجه ریزنمونه‌های کشت شده بر اثر شدت آلودگی نابود می‌شوند. آلودگی‌های سطحی را می‌توان با شستشو و با تیمارهای شیمیایی مختلف برطرف نمود. تعیین تیمارهای مطمئن جهت حذف آلودگی، بدون آسیب رساندن به مواد گیاهی، از محدودیت‌های اصلی به شمار می‌آید (تاجی و همکاران، ۱۳۸۲). وایتکس (هیپوکلریت سدیم) معمول‌ترین ماده ضدعفونی-کننده بافت‌های گیاهی است که بسته به نوع بافت گیاهی، در غلظت های ۱۰ تا ۵۰ درصد در کشت بافت استفاده می‌شود (انجالریک[5] و همکاران، ۱۹۹۸). غلظت و مدت زمان استفاده از سفیدکننده‌های کلردار متفاوت است، بافت‌های ظریف و آبدار معمولاً بعد از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در محلول ۱۰

1 6-Benzylaminopurine
2 Thidiazuron
3 Kinetin
4 6- (4- hydroxyl-3-methyl-trans-2-butenylamino) Purine
5 Enjarlic

درصد سفیدکننده کلردار ضدعفونی می‌شوند و بعضی بذور جهت ضد عفونی نیاز به محلول ۳۰ تا ۵۰ درصد سفیدکننده کلردار به مدت ۶ تا ۲۰ دقیقه هستند (اسمیت، ۲۰۰۰). افزودن چند قطره توین[1] به محلول ضدعفونی‌کننده به دلیل از بین بردن کشش سطحی، می تواند در موفقیت ضدعفونی مؤثر باشد (انجارلیک و همکاران، ۱۹۹۸). پوسته بذر را می توان بدون آنکه آسیبی به رویان وارد شود برای مدتی در معرض غلظت‌های بالای مواد ضدعفونی‌کننده مثل پرواکسید هیدروژن قرار داد و یا آن را درون الکل غوطه ور کرد. اتانول به نوبه‌ی خود یک ماده سمی بالقوه است که تمام میکروارگانیزم‌ها را از بین نمی‌برد، برخی باکتری ها در معرض اتانول ۹۶٪ حداقل به مدت ۴۰ دقیقه زنده می‌مانند. پس از ضدعفونی سطحی، مواد ضدعفونی‌کننده با چند بار شستشو در آب مقطر استریل حذف می‌شوند. مواد ضدعفونی‌کننده باقیمانده نه تنها برای ریزنمونه سمی هستند بلکه می‌توانند اجزا ضروری محیط کشت را نیز از بین ببرند. به عنوان مثال تیامین با بقایای هیپوکلریت سدیم تخریب می‌شود (بونگاو و وون آدرکاس[2]، ۱۹۹۲).

1 1-Polyoxyetylene sorbitan monolaurate (tween)
2 Bonga and Von Adercas

فصل دوم:

مروری بر تحقیقات گذشته

تاکنون گزارش‌های کمی بر روی کالوس‌زایی و باززایی و به طور کلی کشت بافت گیاه زردآلو داده شده است. در این فصل ابتدا گزارش‌های باززایی بر روی زردآلو آمده است و در ادامه به بررسی گزارش‌های باززایی درون شیشه‌ای در گیاهان دیگر خانواده *Prunus* پرداخته می‌شود.

۲-۱- زردآلو

۲-۱-۱- لین و کاسیو[1] (۱۹۸۶)

در این گزارش به باززایی ساقه‌های نابجا از کوتیلدون گیاه گیلاس و جنین زردآلو پرداخته شد. در این بررسی جنین‌های نارس زردآلو بر روی محیط کشت MS حاوی BA با ترکیبی از اکسین‌های مختلف کشت شد. نتایج نشان داد که بالاترین میزان باززایی (حدود ۱۰۰ درصد) در زردآلو با تیمار تنظیم کننده رشدی ۵ میکرومولار BA و ۱ میکرومولار 2-4-D بدست آمد. همچنین نتایج این گزارش نشان داد که سن فیزیولوژیکی جنین‌ها در باززایی هر دو گیاه بسیار موثر است به طوری که در جنین‌های خیلی جوان یا کاملا بالغ و رسیده باززایی رخ نداد.

۲-۱-۲-پیترس[2] (۱۹۸۹)

در این بررسی از دو روش باززایی مستقیم و غیر مستقیم ریزنمونه‌های جنین نارس زردآلو استفاده شد. در روش غیرمستقیم نتایج نشان داد جنین‌های نارس در مرحله دوم جنینی (پرشدن ۵۰ درصدی)، رقم Royal، تحت تیمار تنظیم کننده رشدی ۴/۵ میکرومولار 2-4-D و ۰/۴۴ میکرومولار BA بر روی محیط کشت پایه MS تشکیل کالوس می‌دهند و محیط کشت MS حاوی ۰/۴۴ میکرومولار BA و ۱ میکرومولار 2-4-D می‌توانند کالوس‌ها را برای تولید شاخه تحریک کند و حتی

1 Lane and Cossio
2 Pieterse

برخی می‌توانند در این محیط بطور خودبه‌خودی ریشه دهند. در روش باززایی مستقیم نیز از ریزنمونه‌های کوتیلدون نارس استفاده شد، بدین ترتیب که جوانه‌های نابجا بر روی محیط کشت MS حاوی ۰/۴۴ میکرومولار BA و ۱ میکرومولار 2-4-D از ریزنمونه‌های کوتیلدون تشکیل شدند.

۲-۱-۳- اسکالتس و دوسبا[1] (۱۹۹۳)

در این گزارش به بررسی باززایی ساقه‌های نابجا از ریزنمونه‌های برگ در گونه‌های مختلف *Prunus* و از جمله زردآلو پرداخته شد. نتایج این بررسی نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه به طور معنی‌داری بر روی باززایی ساقه‌های نابجا موثر است. در این بررسی تیمار TDZ به تنهایی یا با ترکیب NAA روی محیط کشت نصف غلظت MS بیشترین میزان باززایی را روی ریزنمونه‌های برگ کلون H.146 زردآلو ایجاد کرد. از نتایج دیگر این بررسی می‌توان به استفاده از سولفات نقره[2] در محیط کشت در افزایش ۴۰-۱۰ درصدی باززایی برگ زردآلو اشاره کرد.

۲-۱-۴- گوفردا[3] و همکاران (۱۹۹۵)

در این گزارش به بررسی یک تیمار تنظیم کننده رشدی جهت باززایی مناسب گیاهچه‌های طبیعی از ریزنمونه‌های جنین‌های نارس زردآلو پرداخته شد. نتایج این بررسی نشان داد زمانی که جنین‌های نارس در مرحله دوم جنینی (پرشدن ۶۰-۳۰ درصدی) بر روی محیط کشت MS بدون تنظیم کننده های رشد گیاهی قرار می‌گیرند ساختارهای شبه جنینی تشکیل می‌دهند. بیشترین القای ساقه‌های اولیه زمانی بدست آمد که کوتیلدون‌ها بر روی محیط کشت MS حاوی ۲۰-۵ میکرومولار TDZ و ۱ میکرومولار 2-4-D کشت داده شده بودند اما مورفولوژی ساقه‌ها در این محیط‌های کشت غیرطبیعی بود، به خصوص زمانی که غلظت‌های بالای TDZ به میزان ۲۰ میکرومولار استفاده شد. در آزمایش

1 Escalettes and Dosba
2 Silver nitrate ($AgNO_3$)
3 Goffreda

فاکتوریل دیگری که در این گزارش انجام گرفته بود کوتیلدون‌های نارس بر روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف TDZ با ترکیبی از بدون اکسین، ۱میکرومولار 2-4-D، ۱میکرومولار IBA و ۵ میکرومولار IBA کشت شدند. بیشترین میزان باززایی در ترکیب تنظیم کننده رشدی ۱۰-۵ میکرومولار TDZ و ۵-۱ میکرومولار IBA از ریزنمونه‌های کوتیلدون بدست آمد. البته محیط کشت حاوی ۵ میکرومولار IBA و بدون تنظیم کننده رشد TDZ بیشترین میزان باززایی گیاهچه‌های با مورفولوژی طبیعی را به وجود آورد.

۲-۱-۵- پرز تورنرو[1] و همکاران (۲۰۰۰)

در این گزارش به بررسی فاکتوهای موثر بر روی باززایی ساقه نابه‌جا از ریزنمونه‌های برگی زردآلو پرداخته شد. در این بررسی از تنظیم کننده‌های رشد TDZ و BAP جهت باززایی استفاده شد که نتایج آن نشان داد که TDZ تاثیر بیشتری بر روی باززایی ریزنمونه‌های برگ دارد ضمن اینکه زمانیکه از BAP به جای TDZ استفاده شد میزان باززایی بسیار پایین بود. هم‌چنین نتایج این بررسی نشان داد که غلظت‌های بالای ۲/۷ میکرومولار NAA نقش موثری در کاهش میزان ترکیبات فنلی دارد. نتایج دیگر این بررسی نشان داد برگ‌های جوان نسبت به برگ‌های مسن‌تر باززایی بیشتری را نشان می‌دهند. همچنین ژنوتیپ‌ها نیز در باززایی تفاوت معنی داری داشت. در این بررسی ترکیب تنظیم کننده‌های رشدی ۹ میکرومولار TDZ و ۲/۷ میکرومولار NAA بیشترین درصد باززایی (۲۴ درصد) داشتند.

1 Pe´rez-Tornero

۲-۱-۶- بورگاس و آلبرکوارک[1] (۲۰۰۳)

در این بررسی از بازدارنده‌های اتیلن و غلظت‌های مختلف پایین آنتی‌بیوتیک در افزایش باززایی برگ زردآلو استفاده شد. نتایج این آزمایش نشان داد استفاده از تیوسولفات نقره[2] یا آمینوتوکسی وینیل گلایسین[3] به عنوان بازدارنده اتیلن، درصد باززایی برگ در ارقام Helena و Canino زردآلو را افزایش داد. همچنین آگار خالص[4] در مقایسه با آگارز و آگارژل میزان بازایی ریزنمونه‌های برگی زردرآلو را در رقم Canino افزایش داد. در این پژوهش از ۷ تیمار مختلف آنتی‌بیوتیک نیز استفاده شد. ترکیب سفاتوکسیم[5] (با غلظت ۰/۱۳ میکرومول) و ونکومایسین[6] (۰/۶۳ میکرومول) ضمن کنترل رشد اگروباکتریوم[7]، باعث افزایش باززایی در رقم Helena شد. البته این ترکیب آنتی‌بیوتیک بر روی باززایی برگ رقم Canino موثر نبود. در این بررسی محیط کشت شامل نمک‌های ماکرو QL (کوایرین و لپویور[8]، ۱۹۷۷)، نمک‌های میکرو WPM[9] و ۳ میکرومولار کلسیم کلرید[10] که حاوی تیمار تنظیم کننده‌های رشد ۳۳ میکرومولار BA و ۰/۲ میکرومولار IBA بود بیشترین میزان باززایی (۴۴درصد) را در رقم Helena داشت.

۲-۱-۷- پتری[11] و همکاران (۲۰۰۸b)

در این گزارش به بررسی ترانسفورماسیون وابسته به اگروباکتریوم به ریزنمونه‌های برگی زردآلو پرداخته شد. در این پژوهش جهت باززایی برگ‌ها از محیط کشت شامل عناصر ماکرو QL، عناصر

1 Burgos and Alburquerque
2 Silver thiosulphate
3 Aminoethoxyvinylglycine
4 Pure Agar
5 Cefotaxime
6 Vancomycin
7 *Agrobacterium*
8 Quoirin and Lepoivre
9 Woody plant medium
10 Calcium chloride
11 Petri

میکرو DKW [1] بود که حاوی ترکیب تنظیم کننده‌های رشدی ۹ میکرومولار TDZ و ۴ میکرومولار NAA بود. همچنین جهت افزایش باززایی از STS (تیوسولفات) استفاده شد. در ادامه، جوانه‌های نابجا به محیط کشت QL حاوی ترکیب تنظیم کننده رشدی ۶/۶۵ میکرومولار BAP و ۰/۰۵ میکرومولار IBA با ۲ درصد سوربیتول منتقل شدند. بعد از ۲ هفته جهت طویل شدن ساقه‌ها، جوانه‌ها به محیط کشت مشابه منتقل شد با این تفاوت که مقدار تنظیم کننده رشد BAP به نصف کاهش پیدا کرد و به محیط ۵/۷ میکرومولار نیز GA_3 اضافه گردید. در این بررسی نیز از رقم زردآلو Helena استفاده شده بود.

۲-۱-۸- لوپز نوگوئرا و همکاران [2] (۲۰۰۹)

در این بررسی به مطالعه ترانسفورماسیون ژنتیکی موثر در زردآلو پرداخته شد. در این مطالعه محیط کشت باززایی برگ شامل عناصر ماکرو QL، عناصر میکرو DKW به همراه ترکیبی از تنظیم کننده-های رشد NAA، 2-4-D و TDZ بود. نتایج باززایی این بررسی نشان داد که زمانیکه از محیط کشت فاقد تنظیم کننده رشد استفاده شد ریزنمونه‌های برگی از بین رفتند و زمانیکه از اکسین NAA در باززایی استفاده شد تنها باززایی ریشه از ریزنمونه‌های برگی مشاهده می‌شود. در نهایت، در ترکیب ۴ میکرومولار NAA و ۴/۵ یا ۰/۴۵ میکرومولار TDZ جوانه‌های نابجا از ریزنمونه‌های برگ باززا شدند.

۲-۱-۹- وانگ [3] و همکاران (۲۰۱۱)

در این آزمایش از ریزنمونه هیپوکوتیل برای باززایی ساقه نابجا استفاده شد. در این بررسی باززایی ساقه نابجا از هیپوکوتیل ارقام Canino، Dorada و Moniqui بدست آمد. ترکیب تنظیم کننده رشدی TDZ و IBA بر روی هر سه واریته تاثیر موثری بر روی باززایی هیپوکوتیل داشت. البته

1 Driver and Kuniyuki 1984
2 Lopez Noguera
3 Wang

ترکیب تنظیم کننده رشدی ۷ میکرومولار TDZ و ۱ میکرومولار IBA بیشترین میزان باززایی (۴۶ درصد) را بر روی محیط کشت پایه 3/4MS داشت. در این بررسی از ۳ نوع محیط کشت MS، WPM و QL نیز استفاده شد که اختلاف معنی‌داری بر روی میزان باززایی هیپوکوتیل نداشت. همچنین طول مدت تاریکی نیز تاثیر معنی‌داری بر روی باززایی نداشت.

۲-۲- آلو

۲-۲-۱- منته[1] و همکاران (۱۹۸۹)

در این گزارش به بررسی باززایی کوتیلدون سه گیاه هلو، آلو و آلبالو پرداخته شد. نتایج این بررسی بر روی هلو نشان داد که ساقه‌های باززا شده در نقطه اتصال جنین به کوتیلدون، روی محیط کشت پایه MS حاوی ۲/۵ میکرومولار IBA و ۵ میکرومولار TDZ تشکیل می‌شوند. نتایج نشان داد زمانی که محور جنینی یا حتی نقطه اتصال جنین به کوتیلدون از کوتیلدون جدا می‌شود کوتیلدون‌ها توانایی باززایی را ندارند. در این بررسی کوتیلدون‌های هلو بر روی محیط کشت ۲/۵ میکرومولار IBA و ۵ میکرومولار BAP ریشه دار شدند. همچنین بررسی‌های صورت گرفته بر روی هلو نشان داد سن ریزنمونه‌های کوتیلدون نیز بر روی میزان باززایی هلو تاثیر دارند به طوریکه کوتیلدون‌های نارس نسبت به کوتیلدون‌های مسن‌تر و رسیده، باززایی بیشتری را نشان دادند. در این بررسی، محیط کشت MS حاوی ترکیب تنظیم کننده رشدی ۱۰ میکرومولار TDZ و ۲/۵ میکرومولار IBA بیشترین میزان باززایی را در گیاه آلو و آلبالو (به ترتیب ۸۷ و ۶۵ درصد) ایجاد کرد.

1 Mante

۲-۲-۲- تی ین[1] و همکاران (۲۰۰۷)

در این گزارش به بررسی باززایی گیاهچه آلو از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل پرداخته شد. در این بررسی از ۱۳ واریته مختلف استفاده شده بود که نتایج نشان داد میزان باززایی در ارقام مختلف اختلاف معنی‌داری داشتند. در این گزارش از هیپوکوتیل‌های جنین نارس و بالغ استفاده شد که نتایج نشان داد هیپوکوتیل نارس میزان باززایی موثرتر و بیشتری را نسبت به هیپوکوتیل‌های رسیده و بالغ نشان می‌دهند. در این گزارش از محیط کشت MS حاوی ۲/۵ میکرومولار IBA و ۷/۵ میکرومولار TDZ جهت باززایی ساقه از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل استفاده شد. همچنین بیشترین ریشه زایی ساقه‌ها در محیط کشت نصف غلظت MS حاوی ۲/۵ میکرومولار IBA به همراه ۱۰ گرم ساکارز مشاهده شد.

۲-۲-۳- نینگ[2] و همکاران (۲۰۰۷)

در این بررسی باززایی گیاه از کالوس‌های کوتیلدون‌های جنین نارس در آلو گزارش شد. در این گزارش، کالوس‌هایی که توانایی باززایی ساقه را داشتند بر روی محیط کشت پایه نصف MS حاوی ترکیب تنظیم کننده رشدی ۲/۲ میکرومولار BAP، ۵/۴ تا ۱۰/۸ میکرومولار NAA و صفر تا ۵ میکرومولار IBA ویا با ترکیب ۲/۲ میکرومولار BAP، ۴/۵ تا ۹ میکرومولار 2-4-D و صفر تا ۵ میکرومولار IBA بدست آمدند. بیشترین میزان باززایی (۸۱ درصد) نیز زمانی بدست آمد که کالوس-های سفید رنگ، نرم و گرد بر روی محیط کشت پایه نصف غلظت MS حاوی ترکیب تنظیم کننده رشدی ۲/۲ میکرومولار BAP، ۲/۲ میکرومولار TDZ و ۱ میکرومولار IBA کشت شدند. همچنین بالاترین میزان ریشه زایی (۹۰درصد) نیز بر روی محیط کشت پایه WPM به همراه ۵ میکرومولار IBA بدست آمد. در این بررسی میزان باززایی و القای کالوس در ارقام مختلف به کار رفته در آزمایش تفاوت معنی‌داری داشت.

1 Tian
2 Ning

۲-۲-۴- سزار پتری و همکاران (۲۰۰۸c)

در این گزارش به بررسی عوامل موثر بر ترانسفورماسیون بالا در آلو پرداخته شد. در این بررسی از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل جنین‌های رسیده برای باززایی استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده برای باززایی ساقه از ریزنمونه‌ها در این گزارش محیط کشت MS حاوی ۷/۵ میکرومولار TDZ و ۰/۲۵ میکرومولار IBA بود. ریزنمونه‌ها پس از باززایی ساقه، به محیط کشت MS حاوی ۳ میکرومولار BAP جهت رشد بیشتر ساقه‌ها منتقل شدند. همچنین جهت ریشه‌زایی از محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میکرومولار کینتین و ۵ میکرومولار NAA استفاده شد.

۲-۲-۵- پتری و اسکورزا[1] (۲۰۰۹)

در این گزارش به بررسی فاکتورهای موثر در باززایی ریزنمونه‌های برگ آلو پرداخته شد. نتایج این بررسی نشان داد رژیم‌های تاریکی، نوع ماده ژل کننده، تیوسولفات نقره و تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی میزان باززایی برگ آلو موثر است. بیشترین باززایی از ریزنمونه های برگی (۶۴ درصد) بر روی محیط کشت دارای عناصر ماکرو QL، عناصر میکرو DKW و حاوی ترکیب تنظیم کننده رشدی ۱۲ میکرومولار TDZ و ۴ میکرومولار NAA مشاهده شد.

۲-۲-۶- کانلی و تی ین[2] (۲۰۰۹)

در این گزارش به بررسی باززایی ساقه نابجا از روی ریزنمونه‌های کوتیلدون رسیده و بالغ گیاه آلو پرداخته شد. در این بررسی تیمارهایی چون تاریکی، غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشدهای TDZ و BAP، پیش تیمار کردن ریزنمونه‌ها با تنظیم کننده رشد TDZ قبل از کشت و محیط کشت‌های

1 Petri and Scorza
2 Canli and Tian

مختلف WPM، QL و B5 (گامبورگ[1] و همکاران، ۱۹۶۸) بر روی میزان باززایی کوتیلدون آلو مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد تنظیم کننده رشد TDZ تاثیر بیشتری بر روی القای باززایی ساقه نسبت به تنظیم کننده رشد BAP داشت. محیط کشت QL نیز نسبت به دو محیط کشت دیگر تاثیر معنی‌دارتری بر روی باززایی ساقه‌های نابجا داشت و تاریکی نیز در افزایش میزان نقش موثری داشت. البته در این بررسی پیش تیمار کردن کوتیلدون‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آب استریل به همراه غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد TDZ قبل از کشت تفاوت معنی‌داری در میزان باززایی ایجاد نکرد. بیشترین میزان باززایی (۴۶درصد) از ریزنمونه‌های کوتیلدون نیز بر روی محیط کشت پایه QL حاوی ترکیب تنظیم کننده رشدی ۲/۵ میکرومولار IBA و ۱۵ میکرومولار TDZ، ۲۵ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر باکتوآگار بدست آمد.

۲-۲-۷- ناس[2] و همکاران (۲۰۱۰)

در این مطالعه به بررسی تاثیر سه نوع مختلف تنظیم کننده رشد سیتوکینین (BAP، mT[3] و TDZ) و نوع ریزنمونه (ریشه، کوتیلدون و هیپوکوتیل) بر روی میزان باززایی آلو پرداخته شد. طبق نتایج این بررسی، ریزنمونه‌های کوتیلدون نسبت به ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و ریشه باززایی بیشتری را نشان دادند. همچنین تنظیم کننده رشدهای BAP و mT تاثیر موثری در باززایی داشتند اما بیشترین میزان باززایی زمانی بدست آمد که تنظیم کننده رشد BAP استفاده شده بود. نتایج این بررسی نشان داد تنظیم کننده رشد TDZ در مقایسه با BAP و mT، در افزایش توانایی باززایی ریزنمونه‌ها ناچیز بود. بیشترین میزان باززایی (۷۳ درصد) بر روی محیط کشت پایه NRM [4] (ناس و رد، ۲۰۰۴) حاوی ۰/۰۵ میکرومولار IBA و ۱۲/۵ میکرومولار BAP از ریزنمونه‌های کوتیلدون مشاهده شد. همچنین

1 Gamborg
2 Nas
3 Meta-Topolin
4 Nas and Read Medium

ریشه‌زایی ریزنمونه‌های باززا شده بر روی محیط کشت نصف غلظت NRM حاوی ۲/۵-۱۰ میکرومولار IBA مشاهده شد.

۲-۳- هلو

۲-۳-۱- هامشلاق[1] (۱۹۸۶)

در این گزارش که به باززایی هلو از ریزنمونه‌های جنین رسیده و بالغ پرداخته شده بود کالوس‌های اولیه که سفید و گرد بوده و توانایی باززایی داشتند از محیط کشت MS حاوی ۴/۵ میکرومولار 2-4-D و ۰/۴۴ میکرومولار BA به محیط کشت MS دارای ترکیب تنظیم کننده رشدی ۰/۲۷ میکرومولار NAA و ۲/۲ میکرومولار BAP منتقل شدند و سه بار واکشت شدند. سپس جهت باززایی ساقه به محیط کشتی منتقل شدند که میزان غلظت تنظیم کننده رشد NAA، ۵ مرتبه کمتر و میزان غلظت تنظیم کننده رشد BAP دو برابر شده بود. جهت باززایی ریشه نیز ساقه‌ها بر روی محیط کشت MS حاوی ۲۸/۵ میکرومولار IBA در تاریکی قرار گرفتند. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که کالوس‌هایی که سبز می‌شوند توانایی باززایی ندارند.

۲-۳-۲- پولر و اسکورزا[2] (۱۹۹۵)

در این گزارش به بررسی باززایی ساقه‌های نابجا از ریزنمونه‌های کوتیلدون بذور رسیده سه واریته هلو پرداخته شد. نتایج این بررسی نشان داد بالاترین میزان باززایی زمانی رخ داد که ریزنمونه‌ها به مدت ۳ هفته بر روی محیط کشت پایه MS حاوی ۲/۵ درصد ساکارز و ترکیب تنظیم کننده رشدی IBA (۱/۲۵ یا ۲/۵ میکرومولار) و TDZ (۶/۲۵ یا ۱۲/۵ میکرومولار) کشت شده بودند. همچنین میزان

1 Hammerschlag
2 Pooler and Scorza

باززایی بر روی ارقام به کار رفته معنی دار بود. از دیگر بررسی‌های انجام گرفته در این گزارش می‌توان به تاثیر طول مدت نگهداری بذرها (۱ تا ۳ سال) بر روی میزان باززایی اشاره کرد که نتایج نشان داد طول مدت نگهداری بر روی باززایی ساقه‌های نابجا تاثیر معنی‌داری نداشت.

۲-۳-۳- ناگاتی[1] (۲۰۱۲)

در این بررسی باززایی گیاه از ریزنمونه‌های جنین هلو گزارش شد. در این گزارش، تاثیر غلظت‌های مختلف TDZ و طول مدت تاریکی بر روی باززایی ساقه هلو مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد تاریکی در افزایش باززایی موثر است. محیط کشت پایه MS حاوی ۲/۵ میکرومولار IBA با ۳/۶ میکرومولار TDZ نسبت به سایر غلظت‌های به کار برده شده تنظیم کننده رشد TDZ در این آزمایش موثرتر (۶۲درصد باززایی) بود. همچنین بالاترین میزان ریشه‌زایی (۳۸درصد) بر روی محیط کشت MS حاوی ۱۰/۷۴ میکرومولار NAA بدست آمد.

۲-۳-۴- پرز خیمنز[2] و همکاران (۲۰۱۲)

در این گزارش به بررسی القای کالوس از بافت‌های رسیده و بالغ هلو پرداخته شد. در این بررسی تاثیر ژنوتیپ، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، محیط کشت و ریزنمونه بر روی القای کالوس هلو مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد ژنوتیپ اختلاف معنی داری در میزان القای کالوس ایجاد نمی‌کند. ریزنمونه‌های ساقه و کاسه گل[3] بیشترین درصد میزان کالوس را دارند. همچنین محیط کشت WPM تاثیر بیشتری در میزان القای کالوس نسبت به محیط کشت MS دارد. در این بررسی ریزنمونه‌هایی که در شرایط تاریکی نگهداری شده بودند کالوس‌های بزرگ‌تری را تولید کردند. همچنین نتایج این بررسی نشان داد تاثیر تنظیم کننده‌های رشد در القای کالوس در هلو تحت تاثیر

1 Nagaty
2 Pérez-Jiménez
3 Calyx

نوع محیط کشت و ریزنمونه متفاوت می‌باشد اما بالاترین میزان کالوسزایی (۹۶ درصد) بر روی محیط کشت MS حاوی ۵ میکرومولار 2-4-D و ۵میکرومولار TDZ از ریزنمونه های کاسه گل بدست آمد.

۲-۴- آلبالو

۲-۴-۱- سانگ و سینگ[1] (۲۰۰۵)

در این گزارش ترانسفورماسیون اگروباکتریوم به ریزنمونه‌های برگی آلبالو از دو ژنوتیپ مختلف اشاره شد. در این مطالعه از غلظت‌های مختلف BAP،TDZ و IBA جهت باززایی ساقه استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد مناسب‌ترین محیط‌های کشت برای باززایی از دو ژنوتیپ به‌کار رفته در این آزمایش، محیط کشت WPM حاوی ۸/۸۸ میکرومولار BAP و ۴/۹۲ میکرو مولار IBA و همچنین محیط کشت QL به همراه ترکیب تنظیم کننده رشدی ۲/۲۲ میکرومولار BAP و ۰/۲۵ میکرومولار IBA بود.

۲-۴-۲- اسپینوسا[2] و همکاران (۲۰۰۶)

در این بررسی باززایی و ریشه‌زایی درون شیشه‌ای آلبالو گزارش گردید. ابتدا ریزنمونه‌های گره‌ای در محیط کشت MS حاوی ۴۴/۴ میکرومولار BAP، ۰/۴۹ میکرومولار IBA و ۰/۲۹ میکرومولار GA_3 قرار گرفتند. ریزنمونه‌های برگی از سه واریته مختلف روی محیط کشت WPM حاوی ترکیبی از غلظت‌های مختلف TDZ، BAP و NAA قرار گرفتند و به مدت ۳ یا ۵ هفته در شرایط تاریکی نگهداری شدند. نتایج این بررسی نشان داد که TDZ و ارقام تفاوت معنی‌داری بر روی میزان باززایی دارند. بیشترین میزان باززایی ساقه (۳۳درصد) از ریزنمونه‌های برگی از ترکیب تنظیم کننده رشدی

1 Song and Sink
2 Espinosa

۴/۵۴ میکرومولار TDZ و ۰/۵۴ میکرومولار NAA و در شرایط ۳ هفته تاریکی بدست آمد. همچنین بالاترین میزان ریشه‌زایی (۷۰درصد) نیز در غلظت ۲/۵ میکرومولار IBA زمانی بدست آمد که ساقه‌ها به مدت یک هفته در تاریکی قرار گرفته بودند.

۲-۴-۳- لیو و پیجوت[1] (۲۰۰۸)

در این بررسی به باززایی گیاه از ریزنمونه‌های برگی آلبالو پرداخته شد. در این بررسی از ۳ واریته مختلف جهت باززایی ساقه نابجا استفاده شد. بالاترین میزان باززایی با ۹۱ درصد روی محیط کشت WPM حاوی ۹/۰۸ میکرومولار TDZ و ۱/۰۷ میکرومولار NAA مشاهده شد. همچنین بیشترین تعداد ساقه باززا شده نیز از تیمار تنظیم‌کننده رشدی ۹/۰۸ میکرومولار TDZ و ۰/۵۴ میکرومولار NAA بر روی محیط کشت پایه WPM بدست آمد. نتایج این بررسی نشان داد که ژنوتیپ هم در میزان باززایی می‌تواند موثر باشد. از نتایج دیگر این بررسی می‌توان به استفاده از غلظت‌های ۶۰ یا ۸۰ میکرومولار تیوسولفات نقره در افزایش باززایی برگ آلبالو اشاره کرد. در این گزارش جهت ریشه‌زایی، انتهای ساقه‌های با طول ۳-۲ سانتی‌متر به مدت ۳ دقیقه در محلول ۲/۵ میکرومولار IBA قرار گرفت و سپس در محیط کشت پایه نصف غلظت MS بدون تنظیم‌کننده رشدهای گیاهی قرار گرفتند که میزان ریشه زایی حدود ۷۰ درصد در همه ژنوتیپ‌ها گزارش شد.

1 Liu and Pijut

۲-۵- گیلاس

۲-۵-۱- باگووات و لین[1] (۲۰۰۴)

در این بررسی باززایی ساقه از ریزنمونه‌های برگ دو واریته مختلف گیلاس گزارش شد. نتایج این بررسی نشان داد تنظیم کننده‌های رشد بر روی درصد باززایی گیلاس به صورت معنی داری موثر است. بالاترین میزان باززایی (۷۰ درصد) از برگ‌های گیلاس بر روی محیط کشت MS حاوی ۲/۲۷ یا ۴/۵۴ میکرومولار TDZ و ۰/۲۷ میکرومولار NAA بدست آمد. در این گزارش جهت طویل شدن ساقه‌های باززا شده از محیط کشت MS حاوی ترکیب تنظیم کننده رشدی ۳ میکرومولار BAP و ۱ میکرومولار IBA استفاده شد. همچنین ریشه‌ها بر روی محیط کشت نصف غلظت MS حاوی ۲/۶۹ میکرومولار NAA مشاهده شدند.

۲-۵-۲- فینی[2] و همکاران (۲۰۰۷)

در این گزارش باززایی ساقه از کالوس گیلاس بررسی شد. در این گزارش محیط کشت WPM حاوی ۳ میکرومولار BA بیشترین میزان کالوس (۶۷درصد) را از ریزنمونه‌های نوک ساقه ای تولید کرد. همچنین محیط کشت MS حاوی ۳ میکرومولار BA بالاترین درصد باززایی (۱۰۰درصد) ساقه را از کالوس نشان داد. نتایج این بررسی نشان داد ژنوتیپ اختلاف معنی داری در میزان کالوس ایجاد می-کند.

1 Bhagwat and Lane
2 Feeney

۲-۶- بادام

۲-۶-۱- ایسیکلن[1] و همکاران (۲۰۱۰)

در این گزارش به بررسی تاثیر تنظیم کننده رشدهای گیاهی روی القای کالوس و باززایی ساقه نابجا از ریزنمونه‌های برگ و ساقه گیاه بادام پرداخته شد. در این آزمایش از غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده-های رشد اکسین (NAA، IAA، IBA و 2-4-D) در ترکیب با ۱ میلی گرم بر لیتر BAP بر روی محیط کشت MS جهت القای کالوس از ریزنمونه‌ها تحت شراط مختلف نوری و تاریکی استفاده شد. نتایج نشان داد بهترین تیمار تنظیم کننده رشدی (۹۰ درصد) جهت تشکیل کالوس از ریزنمونه‌برگی در ترکیب تنظیم کننده رشدی ۱ یا ۲ میلی گرم بر لیتر NAA و ا میلی گرم بر لیتر BAP در شرایط نوری بدست آمد. البته این کالوس‌ها در غلظت‌های مختلف اکسین و همچنین BAP پاسخی به جنین‌زایی و باززایی ندادند. در آزمایش دیگری بهترین تیمار تنظیم‌کننده رشدی جهت القای کالوس (۸۰ درصد) از ریزنمونه‌های ساقه نیز در ترکیب تنظیم‌کننده رشدی ۱ میلی گرم بر لیتر 2-4-D و ا میلی کرم بر لیتر BAP و در شرایطی که ریزنمونه‌ها به مدت یک هفته در تاریکی قرار گرفتند بدست آمد. این کالوس‌ها زمانی‌که در در محیط کشت MS حاوی ۴ میکرومولار BAP قرار گرفت به خوبی به جنین زایی پاسخ داده و تشکیل ساقه‌نابجا نمود. در محیط کشت MS حاوی ۴ میلی گرم بر لیتر NAA و ۱ میلی گرم بر لیتر BAP بعد از یک هفته و در شرایط تاریکی ریزنمونه‌های ساقه به طور مستقیم ریشه دار شدند.

1 Isikalan

جدول۲-۱ خلاصه تحقیقات کشت بافت در گیاهان جنس ***Prunus***

گیاه	ریزنمونه	محیط کشت	اکسین کاربردی	سیتوکینین کاربردی	مناسب ترین ترکیب و غلظت تنظیم کننده رشدی(µM)	منبع
زردآلو	هیپوکوتیل	QL، 3/4MS، WPM	TDZ	2-4-D ، IBA	7 TDZ+1 IBA	وانگ و همکاران،۲۰۱۱
زردآلو	برگ	QL، DKW	TDZ	2-4-D،NAA	0.45- 4.5 TDZ + 4 NAA	نوگوئرا و همکاران،۲۰۰۹
زردآلو	برگ	QL، DKW	TDZ، BAP	NAA ،IBA 2-4-D	9 TDZ + 4 NAA	پتری و همکاران،۲۰۰۸b
زردآلو	برگ	WKW، QL	BAP	NAA ،IBA	33 BAP + 0.2 IBA	بورگاس و البورکوارک،۲۰۰۳
زردآلو	برگ	QL	TDZ ،BAP	NAA ،IBA	9 TDZ + 2.7 NAA	پرزتورنرو و همکاران،۲۰۰۰
زردآلو	جنین نارس	MS	BAP ،TDZ	2-4-D ،IBA	5-10 TDZ + 1-5 IBA	گوفردا و همکاران،۱۹۹۵
زردآلو	برگ	MS	TDZ	IBA ،NAA	5 BAP + 1 2-4-D	اسکالتس و همکاران،۱۹۹۳
زردآلو	جنین نارس	MS	BAP	IBA ،NAA، 2-4-D	0.44 BAP + 1 2-4-D	پیترس، ۱۹۸۹
زردآلو،هلو، آلو	جنین نارس	MS	BAP	2-4-D،NAA	5 BAP + 1 2-4-D	لین و کاسیو،۱۹۸۶
آلو	ریشه، هیپوکوتیل، کوتیلدون	NRM	BAP ،TDZ، mT	IBA	0.05 IBA + 12.5 BAP	ناس و همکاران، ۲۰۱۰
آلو	کوتیلدون	QL، WPM، ½ MS ،B5	BAP ،TDZ	NAA ،IBA	2.5 IBA + 15 TDZ	کانلی و تی ین،۲۰۰۹
آلو	برگ	MS، QL	TDZ ،BAP	IBA،NAA	12 TDZ + 4 NAA	پتری و اسکورزا،۲۰۰۹

آلو	هیپوکوتیل	MS	BAP،TDZ	IBA ،NAA، 2-4-D	7.5 TDZ + 0.25 IBA	پتری و همکاران،c ۲۰۰۸
آلو	کوتیلدون	MS، 1/2MS	BAP ،TDZ	IBA ،NAA، 2-4-D	2.2 TDZ + 1 IBA	نینگ و همکاران، ۲۰۰۷
آلو	هیپوکوتیل	MS	TDZ	IBA ،NAA	7.5 TDZ + 2.5 IBA	تی ین و همکاران،۲۰۰۷
هلو	برگ،ساقه، اجزای گل	MS، WPM	KIN ،TDZ	2-4-D	5 TDZ + 5 2-4-D	خیمنز و همکاران،۲۰۱۲
هلو	جنین	MS	TDZ	IBA ،NAA	3.6 TDZ + 2.5 IBA	ناگاتی و همکاران،۲۰۱۲
هلو	کوتیلدون	MS	TDZ	IBA	6.25-12.5 TDZ + 1.25-2.5 IBA	پولر و اسکورزا،۱۹۹۵
هلو	جنین	MS	BAP	NAA	4/4 BAP + 1 NAA	هامشلاق ،۱۹۸۶
آلبالو	برگ	MS، WPM	BAP ،TDZ	IBA ،NAA	9.08 TDZ + 0.54 NAA	لیو و پیجوت،۲۰۰۸
آلبالو	برگ	WPM	BAP ،TDZ	NAA	4.54 TDZ + 0.54 NAA	اسپینوسا و همکاران،۲۰۰۶
آلبالو	برگ	WPM	BAP ،TDZ	IBA	8 TDZ +5 IBA or 2.2 BAP + 0.25 IBA	سانگ و سینگ،۲۰۰۶
گیلاس	ساقه	MS، WPM	BAP	IBA ،NAA 2-4-D	3 BAP	فینی و همکاران،۲۰۰۷
گیلاس	برگ	MS، WPM	BAP، TDZ	IBA ،NAA	2.27- 4.54TDZ + 0.27 NAA	باگووات و لین،۲۰۰۴
بادام	برگ، ساقه	MS	BAP	IBA ،NAA، 2-4-D ،IAA	4 BAP	ایساکلن و همکاران،۲۰۱۰

فصل سوم:

مواد و روش‌ها

این تحقیق با هدف بهینه سازی شرایط کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های گیاه زردآلو در شرایط درون شیشه‌ای طی سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود انجام گرفت.

۳-۱- مشخصات مواد گیاهی و ارقام مورد استفاده

ارقام مورد استفاده در این پژوهش متعلق به جنس *Prunus armeniaca* می‌باشد. بذر واریته رجبعلی از میوه های زردآلو از مرکز تحقیقات کشاورزی شهرستان شاهرود در تابستان ۱۳۹۱ تهیه شد. ضمن اینکه از برگ‌های جوان و تازه روییده شده واریته‌های جعفری، رجبعلی، شاهرودی و خیوه‌ای در دانشکده کشاورزی بسطام در بهار ۱۳۹۲ جهت تهیه کالوس نیز استفاده گردید.

۳-۲- مواد شیمیایی

تمامی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده در این پایان‌نامه از شرکت Duchefa (هلند) تهیه شده بود. عناصر ماکرو و میکرو مورد استفاده در محیط‌های کشت MS و QL و هم‌چنین ساکارز و آگار از نمایندگی شرکت Merck (آلمان) در ایران خریداری شد.

۳-۳- تجهیزات

جهت انجام این پایان‌نامه از تجهیزات آزمایشگاه بیوتکنولوژی و کشت بافت شامل شیشه‌آلات، ترازو، هات پلیت، اتوکلاو، هود لامینار و اتاقک کشت (انکوباتور) آزمایشگاه زراعت دانشکده کشاورزی بسطام استفاده شد.

۳-۴- تهیه محیط کشت

۳-۴-۱ تهیه محلول‌های مادری نمک‌های پر مصرف (عناصر ماکرو) MS با غلظت ۱۰برابر (۱۰×)

نمک‌های پرمصرف در غلظت ۱۰ برابر نسبت به غلظت‌های نهایی خود تهیه شدند. ابتدا مقدار هر نمک را جداگانه با توجه به جدول ۳-۱ توزین کرده و در داخل بشر با آب مقطر حل می‌شود. نمک-های پرمصرف به صورت یک محلول مادری تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درون یخچال نگهداری شدند.

جدول ۳-۱ غلظت نمک‌های پرمصرف محیط کشت پایه MS

نمک	مقدار (گرم)
KNO_3	۱۹
NH_4NO_3	۱۶/۵
KH_2PO_4	۱/۷
$MgSO_4.7H_2O$	۳/۷
$CaCl_2.2H_2O$	۴/۴

۳-۴-۲- تهیه محلول‌های مادری نمک‌های کم مصرف (عناصر میکرو) MS با غلظت ۱۰۰برابر (×۱۰۰)

محلول مادری عناصر کم مصرف ۱۰۰ برابر غلظت تهیه شد. بدین ترتیب که هر نمک را جداگانه وزن کرده (جدول ۳-۲) و با آب مقطر حل کرده و در پایان محتویات تمام بشرهای حاوی نمک‌ها را به بشر منتقل کرده و با افزودن آب مقطر به حجم می‌رسانیم. محلول مادری نمک‌های کم مصرف در ۴ درجه سانتی‌گراد درون یخچال نگهداری شدند.

جدول ۳-۲ غلظت نمک‌های کم مصرف محیط کشت پایه MS

نمک	مقدار (میلی‌گرم)
$MnSO_4$	۲۲۳۰
$CuSO_4$	۲/۵
$ZnSO_4.7H_2O$	۸۶۰
KI	۸۳
$CoCl_2.6H_2O$	۲/۵
H_3BO_3	۶۲۰
$NaMoO_4.2H_2O$	۲۵

۳-۴-۳- تهیه محلول مادری آهن $FeSO_4.7H_2O$ و $Na_2EDTA.H_2O$ محیط کشت پایه MS با غلظت ۱۰ برابر (×۱۰)

ابتدا Na_2EDTA و $FeSo_4.7H_2o$ را جداگانه وزن (جدول ۳-۳) و به طور جداگانه در ۴۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و در نهایت دو محلول را بر روی هم مخلوط و حجم نهایی را به ۱۰۰ رسانید. این محلول بایستی در برابر نور محافظت شود بنابراین پس از تهیه، محلول در یک بطری تیره و درون یخچال در ۴ درجه سانتی‌گراد محافظت شد.

جدول ۳-۳غلظت FeSO4.7H2O و Na2EDTA.H2O محیط کشت پایه MS

مقدار (میلی‌گرم)	نمک
۲۷۸	$FeSO_4.7H_2O$
۳۷۳	$Na_2EDTA.H_2O$

۳-۴-۴- تهیه محلول مادری ویتامین‌ها وگلایسین محیط کشت پایه MS ۱۰۰ برابر (×۱۰۰)

مقادیر داده شده را در ۵۰ میلی لیتر حل کرده و در نهایت به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد (جدول ۳-۴). این محلول در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درون یخچال نگهداری نگهداری شد.

جدول ۳-۴ غلظت ویتامین‌های محیط کشت پایه MS

مقدار (میلی‌گرم)	ویتامین
۱۰	Tiamin.HCl

Nicotinic acid	۵۰
Pyriodoxine.HCl	۵۰
Glycine	۲۰۰

۳-۴-۵-تهیه محلول‌های مورد نیاز جهت تهیه محیط کشت QL

جهت تهیه محیط کشت QL از محلول‌های مادری درشت مغذی (عناصر ماکرو) متفاوت از محیط کشت پایه MS استفاده گردید (جدول ۳-۵). محلول مادری نمک های کم مصرف، آهن و همچنین محلول مادری ویتامین‌ها شبیه محلول‌های مذکور در محیط کشت MS بود.

جدول ۳-۵ غلظت نمک‌های پرمصرف محیط کشت پایه QL

نمک	مقدار (گرم)
KNO_3	۱۸
NH_4NO_3	۴
KH_2PO_4	۲/۷
$MgSO_4.7H_2O$	۱/۷۵
$CaCl_2.2H_2O$	۵/۷۸

۳-۴-۶- تهیه محلول های ذخیره تنظیم کننده های رشد

همه تنظیم‌کننده‌های رشد در آب محلول نیستند. میران حلالیت مواد مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در جدول ۳-۷ آورده شده است. ترکیب مورد نظر را باید در مقدار کمی حلال (چند میلی لیتر) حل نمود و سپس به آرامی آنقدر به آن آب اضافه کرد تا به حجم مطلوب برسد.

جدول ۳-۷ ترکیبات حلال تنظیم کننده رشدهای گیاهی

تنظیم کننده رشد	حلال
BAP	1 N NaOH
TDZ	DMSO[1]
KIN	1 N NaOH
IBA	1 N NaOH
NAA	1 N NaOH
2-4-D	Alcohol

۳-۴-۷- تهیه یک لیتر محیط کشت

برای تهیه محیط کشت، ابتدا محلول‌های مادری به صورت جداگانه تهیه شدند، با مشاهده هرگونه تغیر رنگ، وجود رسوب و یا مواد زائد تمامی محلول‌های مادری دوباره تهیه گردیدند.

برای تهیه یک لیتر محیط کشت، ابتدا مقداری آب مقطر (۶۰۰ میلی‌لیتر) داخل یک بشر یک لیتری ریخته شد و سپس ترکیبات مورد نیاز اضافه شدند. پس از اضافه کردن ۳۰ گرم ساکارز و ۰/۱ گرم میواینوزیتول و تنظیم کننده رشدهای مورد نیاز حجم نهایی به یک لیتر رسانده شد. سپس pH

[1] Dimethyl sulfoxide

محلول با HCl/NaOH یک نرمال در حدود ۵/۸ تنظیم گردید. در آخرین مرحله آگار به محیط کشت اضافه شد. سپس محلول را درون یک بطری درب‌آبی یک لیتری ریخته و پس از بستن درب بطری محیط کشت جهت استریل شدن درون اتوکلاو قرار داده شد. زمان لازم جهت استریل شدن محیط کشت، ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد بود. پس از استریل شدن بطری‌های حاوی محیط کشت به شرایط استریل، زیر هود لامینارمنتقل شدند تا بعد از خنک شدن محیط کشت، داخل ظروف کشت (پتری‌دیش‌های یک بار مصرف استریل با قطر۱۰ سانتی‌متر جهت کالوسزایی و شیشه‌های مربای استریل شده جهت مرحله باززایی) توزیع شوند. در هر پتری دیش حدود ۲۵ میلی‌لیتر و درون شیشه‌های مربا حدود ۳۵ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته شد. بعد از جامد شدن محیط کشت ظروف در شرایط استریل نگهداری شدند.

۳-۵- ضدعفونی و آماده سازی مواد گیاهی

۳-۵-۱ ضدعفونی محیط و وسایل کار

جهت کار کشت بافت گیاهی وجود مکان عاری از آلودگی لازم و ضروری است. برای ایجاد فضای سترون جهت انتقال بذور و ریزنمونه‌ها از هود لامینار استفاده شد. قبل از استفاده از هود لامینار باید آن را آماده ساخت، بدین صورت که ابتدا سطح داخلی لامینار با پنبه آغشته به الکل تمیز شده و سپس به مدت حداقل ۲۰ دقیقه تحت تابش نور UV قرار گرفت. قبل از روشن کردن لامپ UV باید کلیه لوازم و ظروف را زیر آن قرار داد. بعد از خاموش شدن لامپ UV و پیش از باز کردن درب هود و شروع به کار، فن دستگاه به مدت ۱۵ دقیقه روشن می‌گردد.

ضدعفونی کلیه لوازم شیشه‌ای با استفاده از اتوکلاو و دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه و ابزارهای فلزی شامل پنس‌ها و اسکالپل با استفاده از آون در دمای ۱۷۰درجه سانتیگراد و به

مدت ۲ تا ۳ ساعت صورت گرفت. بلافاصله پس از ضد عفونی، ظروف و لوازم به زیر هود منتقل می-شوند. پس از انتقال به زیر هود پنس‌ها و اسکالپل را درون شیشه حاوی الکل ۹۶٪ قرار داده، به طوری که حدود یک سوم آن‌ها بیرون الکل باشد. وسایل آغشته به الکل را قبل از استفاده روی شعله قرار داده و پس از سرد شدن مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۳-۵-۲- ضدعفونی بذور

هسته‌های زردآلوی واریته رجبعلی پس از جدا کردن بخش‌های گوشتی میوه با آب معمولی شسته شدند و به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم (وایتکس) ۲۰ ٪ قرار گرفتند. پس از شستشو با آب معمولی به مدت ۱۵ دقیقه، هسته‌های زردآلو را ۳-۴ روز در دمای اتاق قرار داده تا خشک شوند. پس از خشک شدن، درون کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار درون یخچال و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

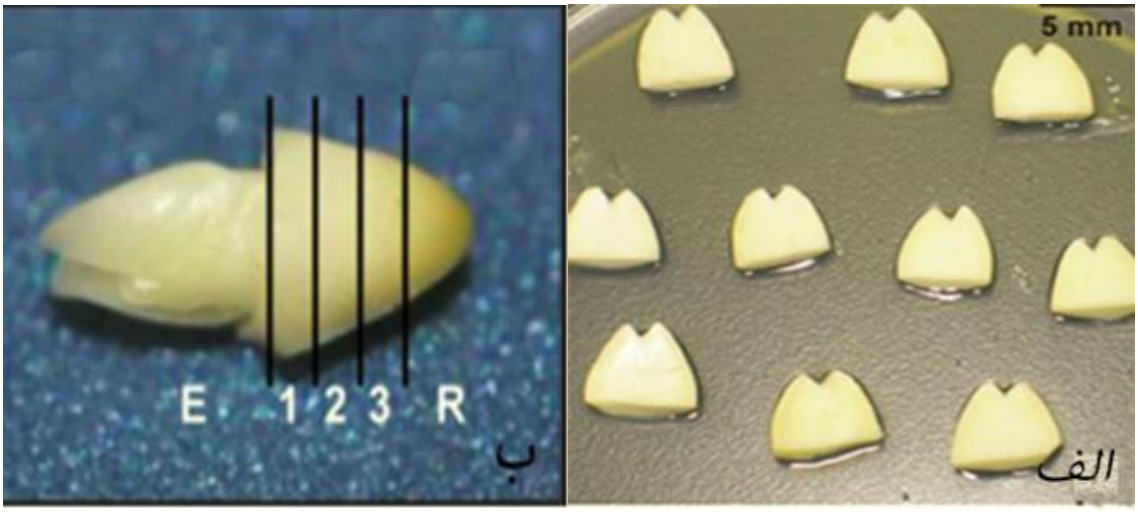
هسته‌های زردآلو را با دقت شکسته و پوسته خارجی و نازک بذور جدا می‌شود. جهت ضدعفونی، بذور در زیر هود لامینار، به مدت ۳۰ثانیه در محلول اتانول ۷۰ درصد قرار گرفته و یک بار با آب مقطر استریل شسته می‌شود. سپس بذور به مدت ۱۵دقیقه در محلول ۲۰ درصد هیپوکلرید سدیم قرار گرفته و سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند.

در باززایی ساقه نابجا از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون بذر رسیده واریته رجبعلی استفاده شد. بدین منظور پس از ضدعفونی بذور به روش مذکور، جهت تهیه ریزنمونه‌های کوتیلدون ابتدا محورجنینی از کوتیلدون جدا شد. بخش کوچکی از کوتیلدون توسط نوک یک اسکالپل استریل از نقطه‌ای که محور جنینی به کوتیلدون متصل است حذف گردید. سپس کوتیلدون را به دوقسمت مساوی تقسیم کرده و بخش موردنظر و برش خورده بر روی محیط کشت قرار گرفت (شکل ۳-۱

الف). جهت تهیه ریزنمونه هیپوکوتیل نیز پس از ضدعفونی بذر، ابتدا محور جنین از کوتیلدون جدا شده و سپس قسمت‌های رادیکل و اپی‌کوتیل توسط اسکالپل استریل شده از جنین برش داده و بخش هیپوکوتیل به اندازه‌های ۰/۵ تا ۱ میلی‌متری برش داده شده (شکل ۳-۱ ب) و برروی محیط‌های کشت قرار گرفت.

۳-۵-۳- ضدعفونی برگ

در این پایان‌نامه برای اعمال تیمارهای کالوس‌زایی، از ریزنمونه‌های برگی جوان درختان کلکسیون زردآلو دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود استفاده شد (شکل۳-۲). بدین‌منظور ابتدا برگ‌های جوان از سرشاخه‌های سالانه درختان ده ساله زردآلو در اردیبهشت سال ۱۳۹۲ گرفته شدند و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی منتقل شدند. برگ‌های جوان پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه با آب جاری شسته شدند. سپس برگ‌ها در زیر هود لامینار، به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم ۲۰ درصد ضدعفونی و ۳ بار با آب مقطراستریل شستشو شد و جهت انتقال به محیط‌های کشت آماده شد. هر برگ درشرایط استریل توسط اسکالپل استریل شده به قطعات یک سانتی متری بریده شد. قطعات برگی مورد استفاده فاقد رگبرگ میانی و دمبرگ بودند.



شکل ۳-۱ ریزنمونه‌های مورد استفاده در باززایی مستقیم. (الف) ریزنمونه‌های کوتیلدون ، (ب) قطعات هیپوکوتیل که بخش‌های ۱، ۲ و ۳ به عنوان ریزنمونه استفاده شد. E اپی‌کوتیل و R رادیکل استفاده نشدند.

شکل ۳-۲ سرشاخه های درختان زردآلو جهت استفاده به عنوان ریزنمونه های برگی

۳-۶- شرایط کشت، نوع و غلظت های تنظیم کننده رشدی

۳-۶-۱- کشت بذر

بذور ضدعفونی شده زردآلو درون شیشه‌های مربای استریل حاوی محیط کشت MS و دارای ۴/۴ میکرومولار BAP به همراه ۳۰ گرم ساکارز و ۰/۷٪ آگار کشت داده شد. ۴ بذر درون شیشه های کشت قرار گرفت. سپس درب شیشه‌های حاوی ریزنمونه‌ها محکم بسته و با پارافیلم درزگیری شدند. به منظور ایجاد تاریکی و تسریع در جوانه زنی، شیشه‌ها به وسیله فویل آلومینیومی پوشانده شدند و در دمای ۲۴ درجه سانتیگراد درون انکوباتور قرار داده شدند. به طور معمول پس از ۷-۱۰ روز جوانه-زنی بذور مشاهده گردید.

پس از جوانه‌زنی، بذرها به مدت یک هفته دیگر نیز در تاریکی نگهداری گردید. سپس شیشه‌های حاوی گیاهچه‌ها به شرایط نوری۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. پس از ۱۸-۲۱ روز از کشت بذور، محیط‌های کشت یکبار واکشت شدند. ریزنمونه‌های برگی ۲-۳ هفته پس از انتقال گیاهچه‌ها به روشنایی استفاده شدند.

۳-۶-۲- القای کالوس

برای القای کالوس ریزنمونه های برگی در پتری دیش‌های حاوی محیط کشت پایه MS با ترکیبی از تنظیم کننده رشد سیتوکینین BAP با تنظیم کننده رشدهای اکسین NAA یا IBA کشت شدند. همه‌ی محیط های کشت حاوی ۳٪ (w/v) ساکارز و ۰/۷٪ (w/v) آگار بودند. پتری دیش‌های حاوی ریزنمونه‌ها پس از درزگیری با پارافیلم، با فویل آلومونیومی به مدت ۳ هفته پوشانیده شدند و در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در اتاقک کشت نگهداری شدند.

۳-۶-۳- باززایی زردآلو

۳-۶-۳-۱ باززایی غیر مستقیم

جهت باززایی غیرمستقیم زردآلو، کالوس‌ها در ۱۶ محیط کشت شاخه‌زایی مختلف شامل محیط کشت پایه MS، ۱/۲MS و WPM با ترکیبی از غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشدهای سیتوکینین و اکسین قرار داده شدند (جدول ۳-۷). پتری دیش‌های حاوی کالوس‌های زردآلو در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی درون انکوباتور نگهداری شدند.

۳-۶-۳-۲ باززایی مستقیم

جهت باززایی مستقیم زردآلو از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون بذر رسیده زردآلو استفاده شد. پس از آماده سازی ریزنمونه‌ها، ریزنمونه های کوتیلدون و هیپوکوتیل بر روی محیط کشت پایه MS با ترکیبی از اکسین‌ها و سیتوکینین های مختلف قرار گرفتند. جدول ۳-۸ هشت تیمار مختلف به کار رفته در محیط های کشت را نشان می دهد. همه محیط های کشت حاوی ۳٪ (w/v) ساکارز و ۰/۷ ٪ (w/v) آگار بود. pH محیط‌های کشت توسط HCl/NaOH یک نرمال به ۵/۸ تنظیم شدند. ریزنمونه‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد درون اتاقک کشت نگهداری شدند. در این تحقیق تاثیر حضور یا عدم حضور نور و همچنین سه نوع محیط کشت مختلف MS کامل ، 3/4MS و QL بر روی باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون مورد مطالعه قرار گرفت. برای اعمال تیمار تاریکی، شیشه‌های حاوی ریزنمونه‌ها توسط فویل آلومینیوم پیچیده شده و به مدت ۱۰روز در تاریکی و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد درون اتاقک کشت نگهداری شدند و پس از ۱۰ روز شیشه‌ها به فتوپریود ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

جدول۳-۷ تیمارهای تنظیم کننده رشدی مورد استفاده در باززایی غیرمستقیم

محیط کشت	تنظیم‌کننده رشد گیاهی (میکرومولار)				
	BAP	TDZ	NAA	IBA	2-4-D
WPM	۴/۴	۰	۰	۲/۵	۰
	۸/۸	۰	۰	۲/۵	۰
	۰	۳۰	۲/۶۸	۰	۰
½ MS	۴/۴	۰	۰	۰	۰
	۴/۴	۰	۰	۲/۵	۰
MS	۰	۰	۰	۰	۰
	۴/۴	۰	۰/۵	۰	۰
	۴/۴	۰	۰		۱
	۴/۴	۰	۰	۲/۵	۰
	۶/۸	۰	۱	۰	۰
	۸/۸	۰	۰/۵	۰	۰
	۰	۹	۲/۶۸	۰	
	۰	۹	۰	۰	۲/۲۵
	۰	۹	۰	۲/۵	۰
	۰	۹	۴	۰	۰
	۰	۱۳	۴	۰	۰

جدول۳-۸ تیمارهای تنظیم کننده رشدی (میکرومولار) مورد استفاده در باززایی مستقیم

تیمار تنظیم کننده رشدی	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
BAP	۰	۴/۴	۰	۰	۰	۹	۰	۰
TDZ	۱۵	۰	۷	۷	۱۵	۰	۹	۷/۵
KIN	۰	۰	۰	۰	۰	۴/۵	۰	۰
NAA	۰	۰	۰	۲/۵	۰	۵/۵	۲/۵	۰
IBA	۰	۲/۵	۰/۲۵	۰	۲/۵	۰	۰	۲/۵

برای بررسی تاثیر محیط کشت نیز، ریزنمونه های هیپوکوتیل و کوتیلدون بر روی سه محیط کشت مختلف شامل MS کامل ، 3/4MS و QL به همراه ۳٪ (w/v) ساکارز و ۰/۷٪ (w/v) آگار قرار داده شدند.

محیط‌های کشت برای کوتیلدون به همراه تیمار تنظیم کننده رشدی ۹ میکرومولار BAP، ۴/۵ میکرومولار KIN و ۵/۵میکرومولار NAA و برای ریزنمونه هیپوکوتیل تیمار تنظیم کننده رشدی ۲/۵میکرومولار IBA و ۷/۵میکرومولار TDZ در نظر گرفته شد.

ساقه‌های نابجای ایجاد شده از ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل بعد از ۲-۳ هفته به محیط کشت QL حاوی ۳٪ (w/v) ساکارز و ۰/۷ ٪ (w/v) آگار به همراه ۴/۴ میکرومولار BAP و ۰/۵ میکرومولار IBA جهت طویل شدن منتقل شدند. ساقه های با طول ۲ تا ۳ سانتی‌متر به محیط ریشه زایی شامل

محیط کشت 1/2MS حاوی ۳٪ (w/v) ساکارز و ۰/۷ ٪ (w/v) آگار به همراه ۱۴/۸میکرو مولار IBA منتقل شد.

۳-۳ آنالیزهای آماری

۳-۳-۱ آزمایشات کالوس‌زایی

این آزمایشات به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. هر تکرار شامل ۱۰ ریزنمونه بود. مقایسه میانگین با آزمون LSD با سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

در آزمایش اول و دوم تنظیم کننده رشد سیتوکینین BAP (در سه سطح غلظتی صفر، ۲/۲ و ۴/۴ میکرومولار) به عنوان فاکتور اول، تنظیم کننده رشد اکسین NAA (در سه سطح غلظت ۲/۷، ۵/۴ و ۱۰/۸میکرومولار) یا IBA (در سه سطح غلظتی ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومولار) به عنوان فاکتور دوم و نوع واریته (جعفری، رجبعلی، شاهرودی و خیوه‌ای) به عنوان فاکتور سوم و همچنین اثرات متقابل آنها بر درصد کالوس‌زایی زردآلو در محیط کشت MS مورد بررسی قرار گرفت. در این دو آزمایش از ریزنمونه‌های برگی که از درختان کلکسیون زردآلو دانشکده کشاورزی جدا شده بودند استفاده گردید.

در آزمایش سوم نیز به بررسی نوع ریزنمونه در سه سطح (برگ *in vitro* ، ساقه *in vitro* و برگ *ex vitro*) به عنوان فاکتور اول، تنظیم کننده رشد سیتوکینینی BAP با دوسطح غلظت۲/۲ و ۴/۴ میکرومولار به عنوان فاکتور دوم و تنظیم کننده رشد اکسین NAA در دو سطح غلظتی ۲/۶۸ و ۵/۳۶ میکرومولار و اثرات متقابل آنها بر روی کالوس‌زایی زردآلو پرداخته شد.

۳-۳-۲ آزمایشات باززایی

در چهار آزمایش جداگانه به بررسی باززایی مستقیم زردآلو در این تحقیق پرداخته شد.

در آزمایش اول و دوم به بررسی باززایی ساقه نابجا در زردآلو پرداخته شد. این آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی در۴ تکرار انجام گرفت. در این آزمایش تیمارتنظیم کننده رشدی در ۸ سطح (جدول ۳-۸) به عنوان فاکتور اول، رژیم نوری در دو سطح (یک دوره ۱۰ روزه تاریکی و عدم اعمال تاریکی) به عنوان فاکتور دوم و نوع ریزنمونه در دو سطح (هیپوکوتیل و کوتیلدون) به عنوان فاکتور سوم و اثرات متقابل آنها بر درصد باززایی و تعداد شاخه نابجا زردآلو در ریزنمونه‌های زردآلو واریته رجبعلی مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش در ۴ تکرار صورت گرفت و هر تکرار شامل ۱۰ ریزنمونه بود.

آزمایش‌های سوم و چهارم نیز به بررسی جداگانه اثر نوع محیط کشت (MS، 3/4MS و QL) بر باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون پرداخته شد. این دو آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۴ تکرار انجام شد. مقایسه میانگین در تمامی آزمایشات با آزمون LSD با سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

۳-۴- نرم افزارها

برای آنالیز آماری از نرم افزار MSTATC و برای رسم نمودارها از نرم افزار EXCEL استفاده شد.

فصل چهارم:

نتایج و بحث

پیش‌نیاز بسیاری از روش‌های انتقال ژن، بهینه‌سازی شرایط کشت بافت جهت باززایی با راندمان بالا است. گونه‌های مختلف، ارقام درون‌گونه‌ای و اندام‌های مختلف یک گیاه به یک روش کشت بافت واکنش یکسانی نشان نمی‌دهند. بنابراین بهینه‌سازی تولید کالوس و باززایی گیاه در این ارتباط حائز اهمیت می‌باشد. از جمله عواملی که در تولید کالوس و باززایی درون شیشه‌ای موثرند، ژنوتیپ، محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد، نوع ریزنمونه و شرایط محیطی می‌باشد.

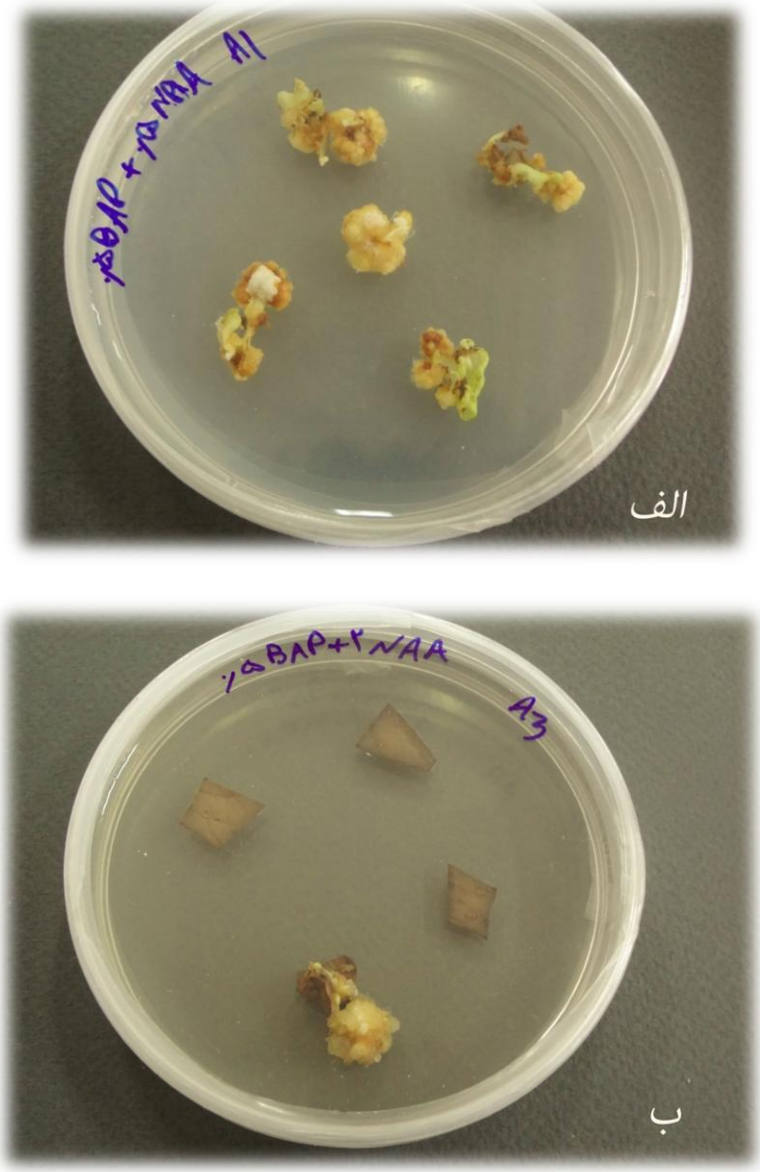
۴-۱ نتایج آزمایشات کالوس‌زایی

۴-۱-۱ تاثیر مقادیر مختلف تنظیم کننده‌های رشد BAP، NAA و نوع واریته بر میزان القای کالوس

ریزنمونه‌های برگی، ۷-۱۰ روز پس از کشت، شروع به تشکیل بافت کالوس کردند. رنگ کالوس‌ها سفید متمایل به کرم و از نظر ساختاری دارای بافت فشرده، سفت و کروی بود (شکل ۴-۱- الف). همچنین تحت تاثیر برخی از تیمارها، ریزنمونه‌ها کالوس‌زایی نشان ندادند و پس از دو هفته بعد از نکروزه شدن، قهوه‌ای شده و از بین رفتند (شکل ۴-۱- ب)

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴-۱) نشان می‌دهد بین سطوح مختلف فاکتورهای مورد مطالعه شامل تنظیم کننده رشد بنزیل آمینو پورین و تنظیم کننده رشد نفتالی‌ن اسی‌د استی‌ک در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری برای صفت درصد کالوس‌زایی مشاهده می‌شود. واریته‌های مورد بررسی به تنهایی معنی‌دار نشدند و اختلاف معنی داری را نشان ندادند. همچنین بررسی اثرات متقابل حاکی از آن است که ارقام مورد بررسی در این آزمایش در واکنش به تنظیم کننده رشد BAP به طور مستقل عمل کرده‌اند اما تا حدودی تحت تاثیر تنظیم کننده رشد NAA قرار گرفته‌اند. اثرات متقابل

سه جانبه مربوط به تنظیم کننده رشد BAP، تنظیم کننده رشد NAA و واریته‌ها نیز اختلاف معنی-داری (در سطح احتمال پنج درصد) را بر میزان کالوس‌زایی نشان دادند. (جدول ۴-۱)



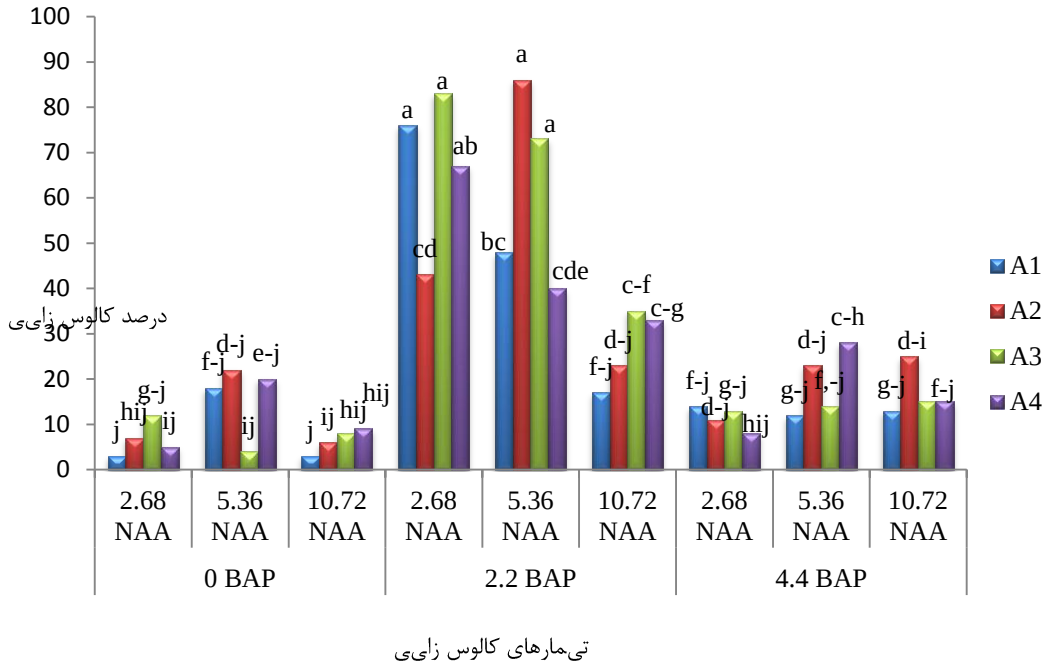
شکل ۴-۱ : کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگی. (الف) کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگی *ex vitro* در شرایط تنظیم کننده رشدی ۲/۲ میکرومولار BAP و ۲/۶۸ میکرومولار NAA بر روی محیط کشت پایه MS، (ب) قهوه ای شدن و از بین رفتن برخی از ریزنمونه‌های برگی در غلظت بالای NAA

بیشترین میزان کالوس‌زایی (۸۶ درصد) در واریته رجبعلی و در ترکیب تنظیم کننده رشدی ۲/۲ میکرومولار BAP و ۵/۳۶ میکرومولار NAA بدست آمد که با میزان کالوس‌زایی در واریته شاهرودی و با استفاده از همین ترکیب تنظیم کننده رشدی اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل۴-۲). البته این ترکیب تیماری با تیمارهای تنظیم کننده رشدی ۲/۲ میکرومولار BAP به همراه ۲/۶۸ میکرومولار NAA در واریته‌های جعفری، شاهرودی و خیوه‌ای از لحاظ میزان تولید کالوس در جدول مقایسه میانگین در یک گروه قرار گرفتند و اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد نشان ندادند. کمترین میزان کالوس‌زایی (۳ درصد) به تیمارهای بدون کاربرد BAP (غلظت صفر) با غلظت ۲/۶۸ میکرومولار و ۱۰/۷۲ میکرومولار NAA در واریته جعفری تعلق داشت. البته همانطور که در شکل ۴-۲ ملاحظه می‌شود تیمارهای زیادی نیز همراه با این دو تیمار در یک گروه (j) از جدول مقایسه میانگین قرار گرفتند و تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند.

جدول ۴-۱ : تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف دو تنظیم کننده رشد BAP و NAA در ارقام جعفری، رجبعلی، شاهرودی و خیوه‌ای بر میزان کالوس‌زایی گیاه زردآلو

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تکرار	۴	۹۲/۰۳۶ ^{ns}
غلظت‌های تنظیم کننده رشد BAP	۲	۳۹۱۵/۸**
غلظت‌های تنظیم کننده رشد NAA	۲	۳۱۳۰۳/۲۱۷**
غلظت‌های تنظیم کننده رشد NAA × BAP	۴	۳۲۷۲/۵۹۲**
نوع واریته	۳	۳۰۹/۱۳۳ ^{ns}
نوع واریته × غلظت‌های تنظیم کننده رشدBAP	۶	۴۳۰/۸۸۳ ^{ns}
نوع واریته × غلظت‌های تنظیم کننده رشد NAA	۶	۷۵۱/۵۷۸*
نوع واریته × غلظت‌های BAP × غلظت‌های NAA	۱۲	۶۰۸/۰۳۶ *
خطای آزمایش	۱۴۰	۲۸۸/۹۳۶

*معنی‌داری در سطح ۵٪ ، **معنی‌داری در سطح ۱٪ و ns عدم معنی‌داری



شکل ۴-۲: مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم کننده رشدهای BAP، NAA و واریته بر درصد کالوس‌زایی (A1 واریته جعفری، A2 واریته رجبعلی، A3 واریته شاهرودی، A4 واریته خیوه‌ای)

به طور کلی بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه، الگوی هورمونی در سیستم متابولیسم گیاه دارند که این الگوهای هورمونی نیز خود تحت کنترل ژنتیک گیاه می‌باشند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۷). همانطور که در فصل اول نیز اشاره شد اسکوگ و میلر (۱۹۵۷) فرضیه ای ارائه کردند که مسیر ریخت‌زایی اصولا به وسیله نسبت اکسین به سیتوکینین تعیین می‌شود بطوریکه نسبت مساوی این دو تنظیم کننده رشد باعث تولید کالوس می‌گردد، بنابراین میزان تولید کالوس بستگی به ترکیب تنظیم کننده رشدهای رشد به کار رفته در محیط کشت دارد و تعادل بین تنظیم‌کننده های رشدی اکسین و سیتوکینین یک فاکتور مورفوژنتیکی تعین‌کننده و مهم به شمار می‌رود (عباسی[1] و همکاران، ۲۰۰۷). تنظیم کننده‌های رشد اثر متقابل روی همدیگر داشته و می‌توانند اثرات همدیگر را بهبود

1 Abbasi

ببخشند (دلپوزا[1] و همکاران ۲۰۰۵). سیتوکینین‌ها غالباً برای تحریک رشد و نمو به کار می‌روند. این تنظیم کننده‌های رشد به ویژه اگر توأم با یک اکسین مصرف شوند باعث تحریک تقسیم سلولی می شوند (الزن[2] ،۱۹۸۳). علت همگرایی سیتوکینین با اکسین در تقسیم سلولی عبارت است از : اولا برای تقسیم سلولی ابتدا باید بزرگ شدن سلول اتفاق بیافتد و به دنبال آن تقسیم سلولی انجام گیرد و تا زمانیکه سلول به اندازه مشخص نرسیده باشد تقسیم سلولی صورت نخواهد پذیرفت و این امر رابطه نزدیکی با رشد سلول تحت تاثیر تنظیم کننده رشد اکسین دارد. پذیرش عمومی بر این است که اکسین موجب افزایش قابلیت گسترش دیواره سلولی با اسیدی کردن دیواره سلول (در نتیجه دفع پروتون) دارد (وود وارد و بارتل[3]، ۲۰۰۵). ثانیا مراحل اولیه تقسیم سلولی علاوه برتنظیم کننده رشد سیتوکینین نیاز به حضور اکسین نیز دارد (وارنر و شمولینگ[4]، ۲۰۰۹ و وانگ[5] و همکاران، ۱۹۸۱).

گزارشات کمی مبنی بر استفاده همزمان از تنظیم کننده‌های رشد BAP و NAA در بررسی کالوس-زایی گیاهان جنس *Prunus* در دست است. ایسیکالان و همکاران (۲۰۱۰) بهترین میزان تشکیل کالوس را در ترکیب تنظیم کننده رشدی ۴/۴ میکرومولار BAP و ۵/۳۶ میکرومولار NAA بدست آوردند. اسپینوسا و همکاران (۲۰۰۶) نیز در ترکیب تنظیم کننده رشدی ۶/۸ و ۴/۵۴ میکرومولار BAP به همراه ۱ میکرومولار NAA بیشترین میزان کالوس را گزارش کردند. پرزتورنرو و همکاران (۲۰۰۰) میزان القای کالوس از ریزنمونه‌های برگی زردآلو را در محیط‌های دارای BAP بسیار پایین گزارش کردند. البته کالوس‌زایی در زردآلو از ریزنمونه‌های دیگر با تنظیم کننده رشد BAP گزارش شده است. پیترس (۱۹۸۹) بیشترین درصد القای کالوس از ریزنمونه‌های زردآلو را در ترکیب ۴/۴ میکرومولار BAP و ۴/۵ میکرومولار 2-4-D گزارش کرد. همچنین در آلو نینگ و همکاران (۲۰۰۷) با ترکیب تنظیم کننده رشدی ۲/۲ میکرومولار BAP، ۱۰/۸ میکرومولار NAA و ۲/۵ تا ۵ میکرومولار

1 Del-Poza
2 Elzen
3 WoodWard and Bartel
4 Werner and Schmulling
5 Wang

IBA روی محیط کشت ۱/۲MS، بیشترین درصد کالوس‌زایی را از ریزنمونه‌های کوتیلدون آلو بدست آورد.

نتایج این آزمایش نشان داد عدم حضور تنظیم کننده رشد BAP در محیط کشت باعث کاهش زیاد و نزدیک به صفر در کالوس‌زایی ریزنمونه های برگی زردآلو می‌شود. همچنین افزایش غلظت‌های BAP و NAA بر القای کالوس تاثیر منفی و بازدارنده داشته و در بعضی موارد هیچ‌گونه واکنشی به لحاظ تولید کالوس نداشته که ممکن است به خاطر اثر سمی غلظت بالای این تنظیم کننده‌های رشد باشد که موجب نکروزه شدن ریزنمونه‌ها می‌گردد. به نظر می‌رسد تعادل تنظیم کننده رشدی بین این دو تنظیم کننده رشد اثر مناسب‌تری بر القای کالوس در گیاه زردآلو دارد.

۴-۱-۲ تاثیر مقادیر مختلف تنظیم کننده‌های رشد BAP و IBA و نوع واریته بر میزان القای کالوس

نتایج تجزیه واریانس بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین سطوح مختلف فاکتورهای مورد مطالعه شامل تنظیم کننده رشدهای بنزیل آمینو پورین، ایندول بوتریک اسید و اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال یک درصد از نظر کالوس‌زایی بود (جدول ۴-۲). نتایج مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل تنظیم کننده‌های رشدی BAP و IBA نشان داد بیشترین میزان کالوس‌زایی (۵۸ درصد) در ترکیب تنظیم کننده رشدی ۴/۴ میکرومولار BAP و ۵ میکرومولار IBA وجود دارد. همچنین در تیمارهای بدون تنظیم کننده رشد (غلظت صفر) BAP با غلظت‌های ۱۰ و ۲/۵ میکرومولار IBA کمترین میزان کالوس‌زایی (به ترتیب ۴ و ۸ درصد) مشاهده شد (شکل۴-۳).

همانگونه که در جدول ۴-۲ ملاحظه می‌شود نوع واریته از نظر درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد و از این نظر بین ۴ واریته تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود. در بین اثرات متقابل نوع واریته با تنظیم کننده رشدهای BAP و IBA، تنها برهمکنش واریته و تنظیم کننده رشد

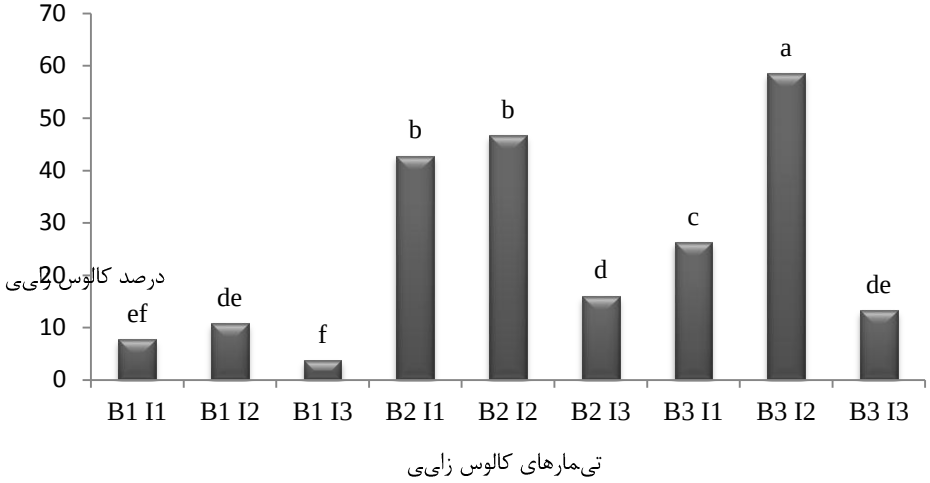
جدول ۴-۲ : تجزیه واریانس اثرغلظت‌های مختلف دو تنظیم کننده رشد BAP و IBA در واریته‌های جعفری، رجبعلی، شاهرودی و خیوه‌ای بر میزان کالوس‌زایی گیاه زردآلو

منابع تغیرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تکرار	۴	۳۷/۰۱۴ ns
غلظت‌های تنظیم کننده رشد BAP	۲	۱۴۱۳۸/۷۵۰ **
غلظت‌های تنظیم کننده رشد IBA	۲	۱۱۴۹۲/۹۱۷ **
اثر متقابل غلظت‌های تنظیم کننده‌های رشد IBA × BAP	۴	۲۵۹۹/۷۹۲ **
نوع واریته	۳	۵۲۸/۲۸۷ **
نوع واریته × غلظت‌های تنظیم کننده رشد BAP	۶	۲۶۸/۰۰۹ *
نوع واریته × غلظت‌های تنظیم کننده رشد IBA	۶	۲۵۷/۱۷۶ ns
نوع واریته × غلظت‌های BAP × غلظت‌های IBA	۱۲	۲۴۴/۶۰۶ ns
خطای آزمایش	۱۴۰	۱۲۳/۸۰۰

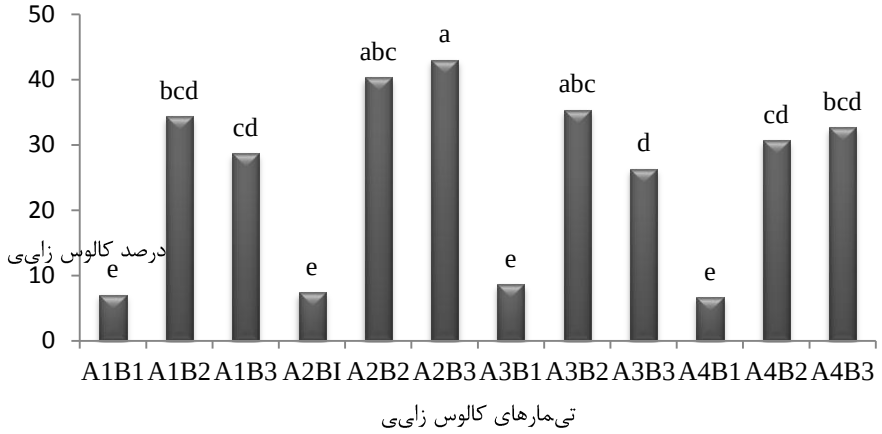
*معنی‌داری در سطح ۵٪ ، **معنی‌داری در سطح ۱٪ و ns عدم معنی‌داری

BAP معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که واریته رجبعلی و سطح سوم تنظیم کننده رشد BAP (۴/۴ میکرومولار) بیشترین درصد کالوس را با ۴۳ درصد دارا بود. ضمن اینکه سطح دوم تنظیم کننده رشد BAP (۲/۲ میکرومولار) در واریته‌های رجبعلی و شاهرودی نیز در مقایسه میانگین با تیمار مذکور در یک گروه قرار داشتند و اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. در تمامی واریته‌های بکار رفته، عدم مصرف تنظیم کننده رشد BAP با کمتر از ۱۰ درصد کالوس‌زایی کمترین درصد کالوس‌زایی را داشتند (شکل ۴-۴)

همانطور که ملاحظه شد میزان القای کالوس از ریزنمونه های برگی زردآلو در ترکیب BAP+IBA در مقایسه با BAP+NAA کمتر است. با توجه به اینکه تنظیم کننده رشد NAA نسبت به تنظیم کننده رشد IBA تنظیم کننده رشد اکسین قوی‌تری است بنابراین طبیعی به نظر می‌رسد که با تیمار تنظیم کننده رشدی IBA میزان کالوس‌زایی کمتر باشد.. این نتایج کاملا با نتایج ایسیکالان و همکاران (۲۰۱۰) نیز مطابقت دارد.



شکل ۴-۳ : مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم کننده رشد BAP و IBA بر کالوس‌زایی (B1، B2 و B3 به ترتیب غلظت‌های صفر، ۲/۲ و ۴/۴ میکرومولارBAP و I1، I2 و I3 به ترتیب غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومولار IBA)



شکل ۴-۴ : مقایسه میانگین اثر متقابل تنظیم کننده رشد BAP و واریته بر کالوس‌زایی (A1 تا A4 به ترتیب ارقام جعفری، رجبعلی، شاهرودی و خیبه‌ای، B1، B2 و B3 به ترتیب غلظت‌های صفر، ۲/۲ و ۴/۴ میکرومولار BAP)

تاثیر واریته و پاسخ آن به کالوس‌زایی در این آزمایش کاملا مشهود است. تا کنون تحقیقات در زمینه کشت بافت و مهندسی ژنتیک زردآلو تنها بر روی ارقام خاصی انجام شده است که عمدتا محدود به واریته Helena و Canino بوده که سازگار با آمریکا و برخی مناطق اروپا مانند اسپانیا است. اما در این

تحقیق سعی شد از ارقام ایرانی و محلی شاهرود با عملکرد بالا که سازگار به شرایط آب و هوایی منطقه بوده استفاده شود تا پاسخ آن‌ها به کشت بافت بررسی شود. با توجه به مطالب فوق و همچنین معنی‌دار شدن اثر واریته در کالوس‌زایی مشخص می‌شود که ژنوتیپ در کشت بافت و مهندسی ژنتیک دارای اهمیت می‌باشد. در این رابطه همواره باید ژنوتیپ‌هایی را به کار برد که دارای مناسب‌ترین پاسخ به کشت بافت را دارند.

۴-۱- ۳ تاثیرمقادیر مختلف تنظیم کننده‌های رشد NAA، BAP و نوع ریزنمونه بر میزان القای کالوس

همانگونه که در جدول تجزیه واریانس ۴-۳ ملاحظه می‌شود منبع ریزنمونه از نظر صفت کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شده و بیانگر تفاوت قدرت کالوس‌زایی بین سه نوع بافت برگ *in vitro*، برگ *ex vitro* و ساقه است. همچنین اثرات اصلی تنظیم کننده رشد BAP و NAA نیز معنی‌دار شد. برهمکنش ریزنمونه و تنظیم کننده‌های رشد نشان داد تنها اثر متقابل منبع ریزنمونه با تنظیم کننده رشد NAA معنی دار بوده اما این فاکتور با تنظیم کننده رشد BAP به طور مستقل عمل کرده است. همچنین اثرات متقابل سه‌گانه منبع ریزنمونه، تنظیم کننده رشد BAP و تنظیم کننده رشد NAA نیز اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد را نشان داد.

نتایج مقایسه میانگین اثرات ساده نوع ریزنمونه (شکل ۴-۵) نشان داد بیشترین درصد کالوس‌زایی با ۵۶/۵۶ درصد زمانی بدست آمد که ریزنمونه‌های برگی در شرایط درون شیشه‌ای ایجاد شوند. در این شرایط ضمن بیشتر بودن درصد کالوس‌ها، کالوس‌ها به مراتب از نظر اندازه نسبت به شرایطی که ریزنمونه‌های برگی از درختان بطور مستقیم استفاده می‌شود بزرگ‌تر بود (شکل ۴-۷ الف). ریزنمونه-های میانگره نیز با ۲۸/۴۴ درصد کمترین درصد کالوس‌زایی را داشتند.

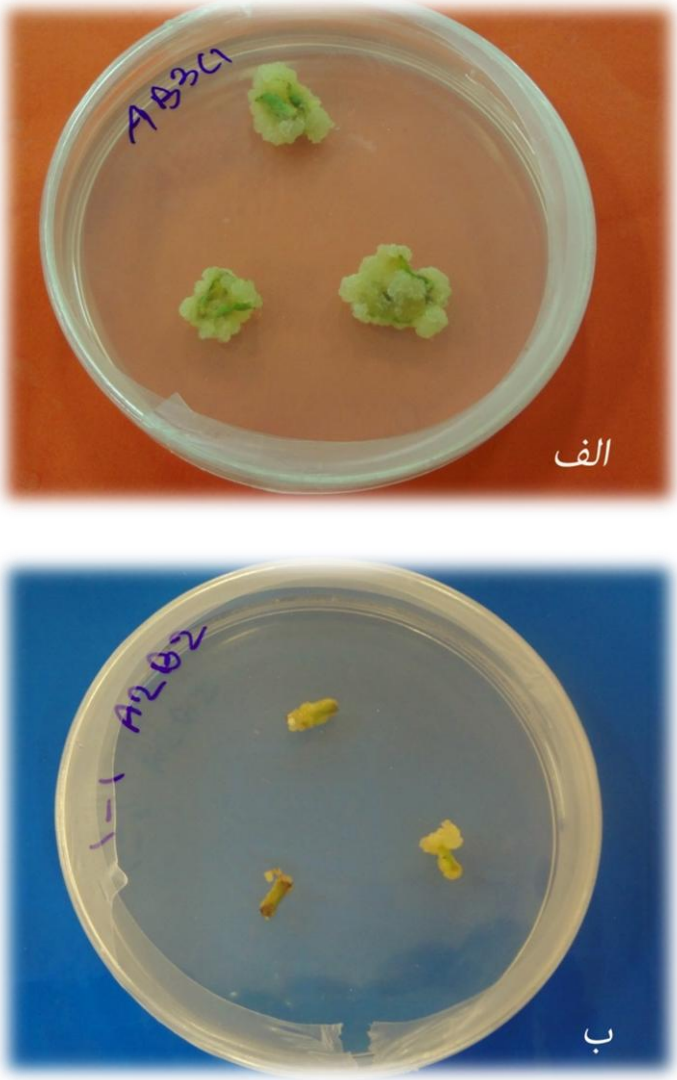
جدول ۴-۳ : تجزیه واریانس اثر غلظت های تنظیم کننده رشدهای BAP، IBA و ریزنمونه بر درصد کالوس‌زایی

منابع تغیرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تکرار	۳	۶۶۹/۹۶۵*
غلظت‌های تنظیم کننده رشدBAP	۱	۱۷۴۴۲/۱۸۸ **
غلظت‌های تنظیم کننده رشد NAA	۱	۱۵۷۵/۵۲۱*
اثر متقابل غلظت‌های NAA × BAP	۱	۱۸۸/۰۲۱ *
نوع ریزنمونه	۲	۳۱۶۸/۷۵۰ **
نوع ریزنمونه × BAP	۲	۱۳۰۰ ns
نوع ریزنمونه × NAA	۲	۹۳۳/۳۳۳ *
نوع ریزنمونه × غلظت‌های BAP × غلظت های NAA	۲	۱۲۲۷/۰۸۳**
خطای آزمایش	۱۴۰	۲۲۳/۳۷۴

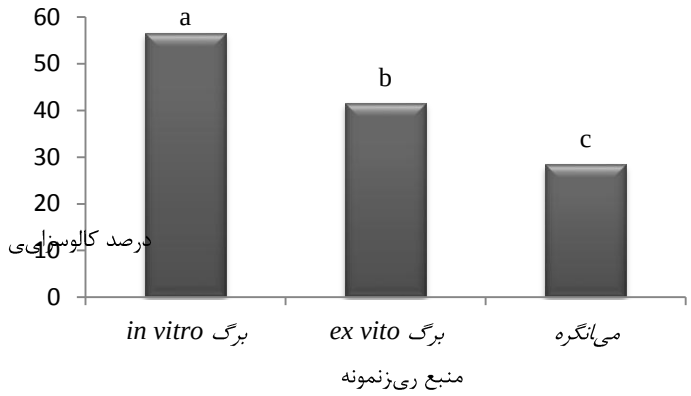
*معنی‌داری در سطح ۵٪ ، **معنی‌داری در سطح ۱٪ و ns عدم معنی‌داری

کالوس‌زایی از میانگره معمولا از دو طرف آغاز شده و اغلب کالوس‌های تشکیل شده از نظر اندازه کوچک بوده و در مقایسه با ریزنمونه‌های برگی بعد از ۴ هفته کشت، دارای رشد زیادی نبودند (شکل۴-۷ ب). رنگ کالوس در ریزنمونه‌های برگی و میانگره *in vitro* در مقایسه با ریزمونه‌های برگی *ex vitro* سفیدتر و روشن‌تر بود.

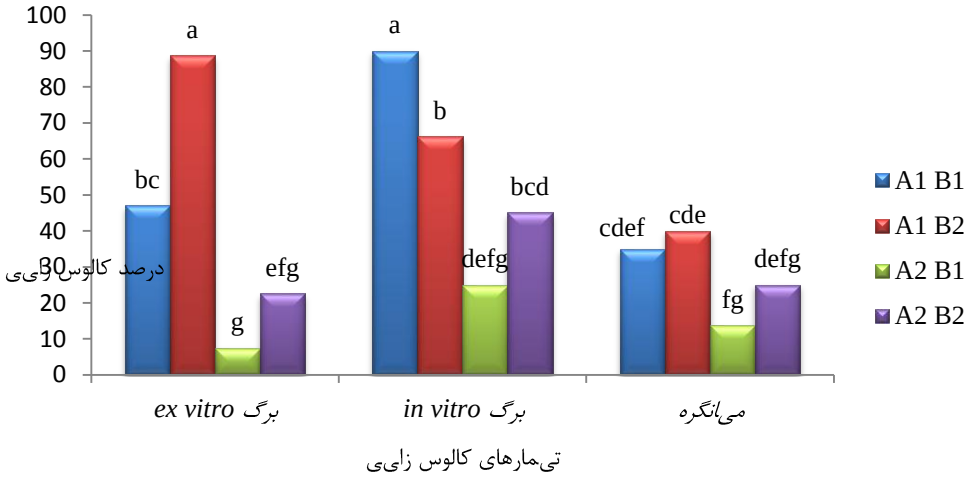
نتایج مقایسه میانگین اثرات سه‌گانه در این آزمایش نشان داد ریزنمونه‌های برگی که در شرایط درون شیشه‌ای ایجاد شده در ترکیب تنظیم کننده رشدی ۲/۲ میکرومولار BAP و ۲/۶۸ میکرومولار NAA با ۹۰ درصد کالوس‌زایی بیشترین درصد کالوس را تولید کردند. البته این ترکیب تیماری با ترکیب تنظیم کننده رشدی ۲/۲ میکرومولار BAP و ۵/۳۶ میکرومولار NAA در ریزنمونه‌های برگی*ex vitro* اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. ترکیب تنظیم کننده رشدی ۴/۴ میکرومولار BAP و ۲/۶۸ میکرومولار NAA در ریزنمونه های برگ *ex vitro* کمترین درصد کالوس (۸ درصد) را در مقایسه تیمارهای دیگر ایجاد کرد (شکل ۴-۶).



شکل ۴-۷ : کالوس‌زایی ریزنمونه‌های درون‌شیشه‌ای. (الف) ریزنمونه‌های برگی، (ب) ریزنمونه‌های میانگره



شکل ۴-۵ مقایسه میانگین اثرمنبع ریزنمونه بر درصد کالوس‌زایی



شکل۴-۶ مقایسه میانگین اثرات متقابل تنظیم کننده‌های رشد BAP، NAA و منبع ریزنمونه بر درصد کالوس‌زایی (A1 و A2 به ترتیب غلظت‌های ۲/۲ و ۴/۴ میکرومولار BAP، B1 و B2 به ترتیب غلظت‌های ۲/۶۸ و ۵/۳۶ میکرومولار NAA)

انتخاب یک ریزنمونه مطلوب نقش اساسی در موفقیت آمیز بودن کشت بافت در شرایط درون شیشه ای دارد. پیچیدگی های مورفولوژیکی یک ریزنمونه به همراه انتخاب تنظیم کننده های رشد گیاهی مناسب تاثیر چشمگیری بر القای کالوس و باززایی دارد (ابریکوس[1] و همکاران، ۲۰۰۵). نتایج ما نشان داد که تنوعی از ریزنمونه‌ها می‌توانند در زردآلو تولید کالوس کرده و مورد استفاده قرار گیرد. ریزنمونه‌ها جهت القای کالوس در زردآلو می‌توانند هم بطور مستقیم از درختان زردآلو در طول فصل رشد برداشت شوند و نیز می‌تواند از ریزنمونه‌هایی بدست آیند که در شرایط درون شیشه‌ای تولید شده‌اند. البته ریزنمونه‌های درون شیشه ای به ۲ دلیل عمده جهت کالوس‌زایی مناسب‌ترند : ۱- در طول سال در دسترس‌اند ۲- مشکلات آلودگی و از بین رفتن ریزنمونه‌ها وجود ندارد (مک کُن[2]، ۲۰۰۰).

1 Abrikos
2 McCown

تشکیل بافت کالوس ابتدا در ریزنمونه‌های برگی *ex vitro* مشاهده شد که احتمالا به علت زخمی شدن ریزنمونه‌ها در طول جداسازی و یا مراحل استریل کردن می‌باشد (باتیا[1] و همکاران، ۲۰۰۵). نوع بافت ریزنمونه نیز میزان کالوس‌زایی را تحت تاثیر قرار داد. ریزنمونه‌های برگی *in vitro* کالوس‌زایی بیشتری را نسبت به ریزنمونه‌های برگی *ex vitro* نشان دادند. یکی از دلایل میزان کمتر کالوس‌زایی در شرایط *ex vitro* مربوط به استرسی است که به ریزنمونه‌ها در زمان استریل کردن وارد می‌شود. تنگ[2] و همکاران (۲۰۰۲) این دلیل را با گونه‌های گیاه دارویی جین‌سینگ نشان دادند. همچنین از دلایل دیگر می‌توان به وجود ترکیبات فنلی بیشتر در این ریزنمونه‌ها اشاره کرد که هم باعث میزان کالوس‌زایی کمتر و نیز زودتر از بین‌رفتن کالوس‌ها می‌شود. فینی و همکاران (۲۰۰۷) نیز نتایج مشابهی را با استفاده از ریزنمونه‌های *in vitro* و *ex vitro* در کالوس‌زایی گیلاس گزارش کردند. همچنین این نتایج نشان داد ریزنمونه‌های برگی نسبت به ریزنمونه‌های میانگره (ساقه) درصد کالوس-زایی بیشتری را نشان می‌دهند که اهمیت منبع ریزنمونه در کالوس‌زایی زردآلو را نشان می‌دهد. احتمالا به علت تفاوت در تمایزیافتگی فیزیولوژیکی و محتوای تنظیم هورمون‌های داخلی بافت‌ها چنین اختلافی در میزان کالوس‌زایی در بین این دو ریزنمونه دیده می‌شود (خوشخوی و سینک[3]، ۱۹۸۲). پرز خیمنز و همکاران (۲۰۱۲)، دیکلرک و کوبن[4] (۱۹۹۶) در هلو و انسلی[5] و همکاران (۲۰۰۰) در بادام نیز نشان دادند منبع ریزنمونه می‌تواند در کالوس‌زایی موثر باشد.

1 Bhatia
2 Teng
3 Khosh-Khui and Sink
4 Declerck and Korban
5 Ainsley

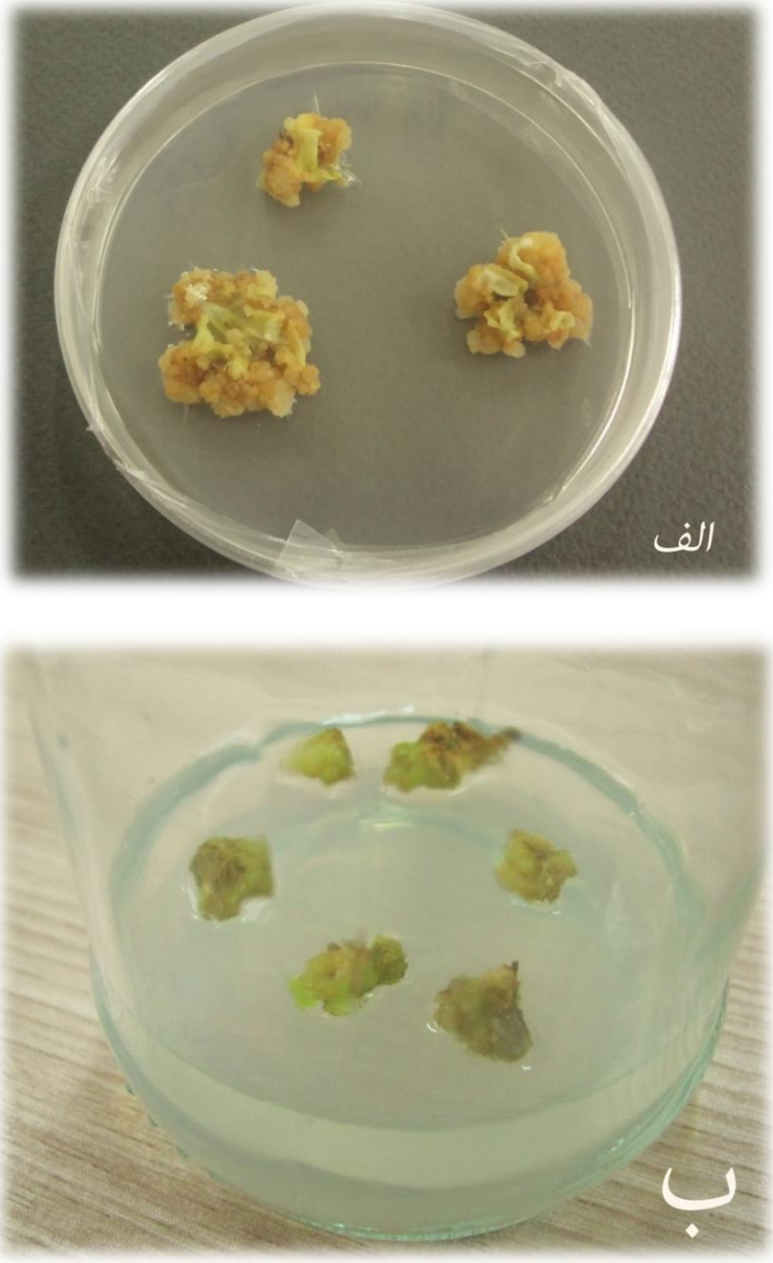
۴-۲ نتایج آزمایشات باززایی

۴-۲-۱ باززایی غیرمستقیم

کالوس‌ها پس از تشکیل در مرحله ۳ تا ۵ هفته‌ای به محیط‌های کشت باززایی در روشنایی انتقال داده شدند. یک هفته پس از انتقال به محیط کشت جدید هیچ گونه تغییری در کالوس‌ها مشاهده نشد. هر دو هفته کالوس‌ها به محیط کشت تازه واکشت شدند. اغلب کالوس‌ها بعد از ۶-۸ هفته از کشت قهوه-ای شده و در نهایت از بین می‌رفتند (شکل ۴-۸ الف). تنها برخی از کالوس‌ها در محیط کشت MS حاوی ۴/۴ میکرومولار BAP و ۱ میکرومولار 2-4-D سبز رنگ شدند (شکل ۴-۸ ب). کالوس‌های سبز رنگ شده به محیط‌های کشت تازه انتقال داده شدند اما ۳ هفته بعد از واکشت هیچ تغییری در کالوس‌های سبز رنگ مشاهده نشد.

تاکنون تحقیقات بسیار کمی بر روی باززایی غیرمستقیم زردآلو و دیگر گیاهان جنس *Prunus* انجام گرفته است. ایسیکالان و همکاران (۲۰۱۰) در بادام با انتقال کالوس‌ها به محیط کشت MS حاوی ۱۷ میکرومولار BAP توانست کالوس‌ها را باززا کند اما در دیگر تیمارهای تنظیم کننده رشدی هیچ تغییری در کالوس‌ها مشاهده نکرد. همچنین اسپینوسا و همکاران (۲۰۰۶) بیشترین باززایی ساقه - نابجا از کالوس را در ترکیب تیماری تنظیم کننده رشدی ۶/۸۱ میکرومولار TDZ و صفر یا ۰/۵۴ میکرومولار NAA گزارش کردند.

پرز تورنرو و همکاران (۲۰۰۰) در تحقیقی که بر باززایی زردآلو از برگ داشتند، بیشترین باززایی را در ترکیب تنظیم کننده رشدی ۹ میکرومولار TDZ و ۲/۷ میکرومولار NAA گزارش کردند. در این گزارش ساقه های نابجا بطور خودبه‌خودی و بدون اعمال تیمار تنظیم کننده رشدی دیگر از کالوس-های که از ترکیب تنظیم کننده رشدی مذکور تولید شده بودند ایجاد گردید. لیو و پیجوت (۲۰۰۸) نیز نتایج مشابه را با ترکیب ۹ میکرومولار TDZ و ۱ میکرومولار NAA در آلبالو گزارش کرد.



شکل۴-۸ : انتقال کالوس به محیط‌های باززایی ساقه. (الف) قهوه‌ای شدن کالوس‌ها، (ب) سبز رنگ شدن کالوس‌های منتقل شده به محیط کشت MS حاوی ۴/۴ میکرومولار BAP و ۱ میکرومولار 2-4-D

۴-۲-۲ نتایج باززایی مستقیم

۴-۲-۲-۱ تاثیر تیمارهای تنظیم کننده رشد، نوع ریزنمونه و رژیم نوری بر درصد باززایی ساقه نابجا

ریزنمونه‌های کوتیلدون بعد از ده روز دوره تاریکی در حدود دو برابر سایز اولیه متورم و بزرگ شدند (شکل۴-۱۰). کوتیلدون‌ها بعد از یک هفته انتقال به روشنایی سبز شده و ساقه‌های نابجا اغلب از قسمت برش خورده اطراف محور جنینی بر روی کوتیلدون تشکیل شدند. همچنین در برخی از تیمارها در بخش‌های برش خورده کالوس ایجاد شد و از کالوس نیز باززایی رخ می‌داد اما ساقه‌های باززا شده روی کالوس به صورت روزت ایجاد شده و توانایی طویل شدن نداشتند. کوتیلدون‌هایی که تحت تیمار تاریکی قرار نگرفته بودند و از ابتدا در روشنایی بودند بعد از یک هفته سبز شدند و باززایی در این شرایط کم بود.

ریزنمونه‌های هیپوکوتیل نیز بعد از دو هفته در حدود سه برابر اندازه اولیه رشد کردند و ساقه‌های نابجا ۳-۲ هفته بعد از کشت در حاشیه ریزنمونه‌ها تشکیل شدند. باززایی ساقه‌های نابجا به ندرت به صورت یک جوانه بود و اغلب ساقه‌های نابجا به صورت انبوه و دسته‌ای بودند (شکل۴-۱۱).

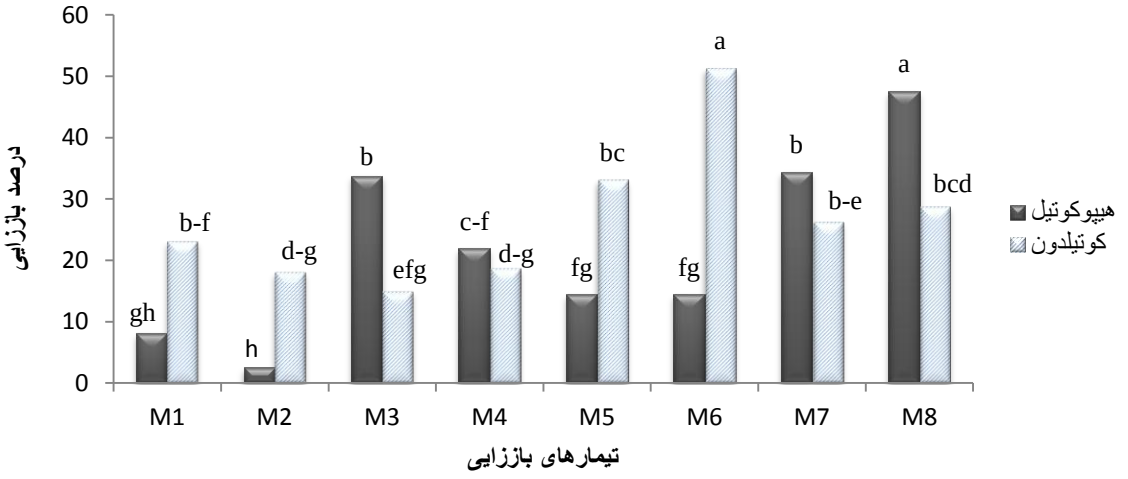
طبق نتایج تجزیه واریانس اثرات ساده تیمارهای تنظیم کننده رشدی و نوع ریزنمونه و نیز اثرات متقابل آن‌ها در سطح یک درصد معنی‌دار بر درصد باززایی ساقه نابجا زردآلو معنی‌دار بوده است (جدول ۴-۴) و مشخص شد ریزنمونه‌ها نسبت به غلظت و ترکیبات مختلف تنظیم کننده رشدی واکنش‌های متفاوتی نشان می‌دهند. نتایج مقایسه میانگین‌های مربوط به اثرات متقابل تنظیم کننده-های رشد و ریزنمونه نشان می‌دهد که ترکیبات تیماری مختلف، اثرات متفاوتی داشتند (شکل ۴-۹). بیشترین درصد باززایی (۵۱/۲۵ درصد) در ترکیب تنظیم کننده رشدی ۹ میکرومولار BAP به همراه ۴/۵ میکرومولار KIN و ۵/۵ میکرومولار NAA در ریزنمونه‌های کوتیلدون و همچنین ترکیب تنظیم

کننده رشدی ۲/۵ میکرومولار TDZ و ۷/۵ میکرومولار IBA در ریزنمونه هیپوکوتیل با ۴۷ درصد باززایی بدست آمد. کمترین درصد باززایی (۲/۵ درصد) ساقه نابجا نیز به ترکیب تنظیم کننده رشدی ۴/۴ میکرومولار BAP و ۲/۵ میکرومولار IBA در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل تعلق داشت.

جدول ۴-۴ : تجزیه واریانس اثرمتقابل تنظیم کننده رشد، ریزنمونه و رژیم نوری بر درصد باززایی و تعداد شاخه

منابع تغیرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد باززایی	تعداد شاخه
تکرار	۳	۱۸۱/۵۱^{ns}	۰/۳۸۱^{ns}
تنظیم کننده رشد	۷	۱۳۴۰/۹۶۰**	۴/۱۱۹**
نوع ریزنمونه	۱	۷۰۳/۱۲۵*	۸/۰۵۰ **
نوع ریزنمونه × تنظیم کننده رشد	۷	۱۵۹۰/۶۲۵ **	۲/۳۴۵ **
رژیم نوری	۱	۴۶۳۲/۰۳۱ **	۰/۰۰۳ ^{ns}
رژیم نوری × تنظیم کننده رشد	۷	۱۰۸/۸۱۷ ^{ns}	۰/۵۱۳*
رژیم نوری × نوع ریزنمونه	۱	۱۵۱۲/۵۰۰**	۰/۰۴۲۴ ^{ns}
رژیم نوری × تنظیم کننده رشد × نوع ریزنمونه	۷	۱۳۴/۸۲۱ ^{ns}	۰/۸۰۰۲ ^{ns}
خطای آزمایش	۹۳	۱۳۹/۱۷۲	۰/۴۱۶

* معنی‌داری در سطح ۵٪ ، ** معنی‌داری در سطح ۱٪ و ns عدم معنی‌داری



شکل۴-۹ : مقایسه میانگین اثرات متقابل تنظیم کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه بر درصد باززایی (M1 تا M8 تیمارهای تنظیم کننده رشدی باززایی)

در این آزمایش ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون حاصل از بذور رسیده زردآلو واریته رجبعلی برخلاف آزمایش قبلی که در آن از ریزنمونه‌های برگی استفاده شده بود و پس از طی مراحل کالوس زایی با مشکل عدم توانایی باززایی مواجه شده بود، به خوبی باززا شدند. بر اساس بررسی منابع انجام گرفته، تاکنون از ریزنمونه‌های کوتیلدون رسیده جهت باززایی زردآلو استفاده نشده است و این تحقیق اولین گزارش در این زمینه می‌باشد. همانطور که در فصل دوم اشاره شد گوفردا و همکاران (۱۹۹۵)، لین و کاسیو (۱۹۸۶) و پیترس (۱۹۸۹) از ریزنمونه‌های کوتیلدون جهت باززایی استفاده کردند که در تمامی این گزارشات، کوتیلدون‌ها از بذور نارس زردآلو گرفته شده بودند. باززایی از ریزنمونه‌های کوتیلدون نارس در گونه‌های دیگر نیز به خوبی مورد ارزیابی قرار گرفته است (لین و کاسیو ۱۹۸۶ در گیلاس; منته و همکاران ۱۹۸۹، وو[1] و همکاران ۲۰۰۵ و یان و ژو[2] ۲۰۰۲ در هلو; منته و همکاران ۱۹۸۹ و تانگ[3] و همکاران ۲۰۰۰ در آلبالو و انسلی[4] و همکاران ۲۰۰۱ در بادام). همچنین باززایی ساقه نابجا از ریزنمونه‌های کوتیلدون رسیده در گونه‌های دیگر خانواده *Prunus* گزارش شده است (پولر و اسکورزا ۱۹۹۵، کانلی و تیان ۲۰۰۸ و ۲۰۰۹).

تنها گزارش که از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل زردآلو استفاده شده است متعلق به هانگ وانگ و همکاران (۲۰۱۱) می‌باشد. همچنین پتری و همکاران (c ۲۰۰۸) در هلو و تیان و همکاران (۲۰۰۷) در آلو از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل جهت باززایی ساقه نابجا استفاده کردند.

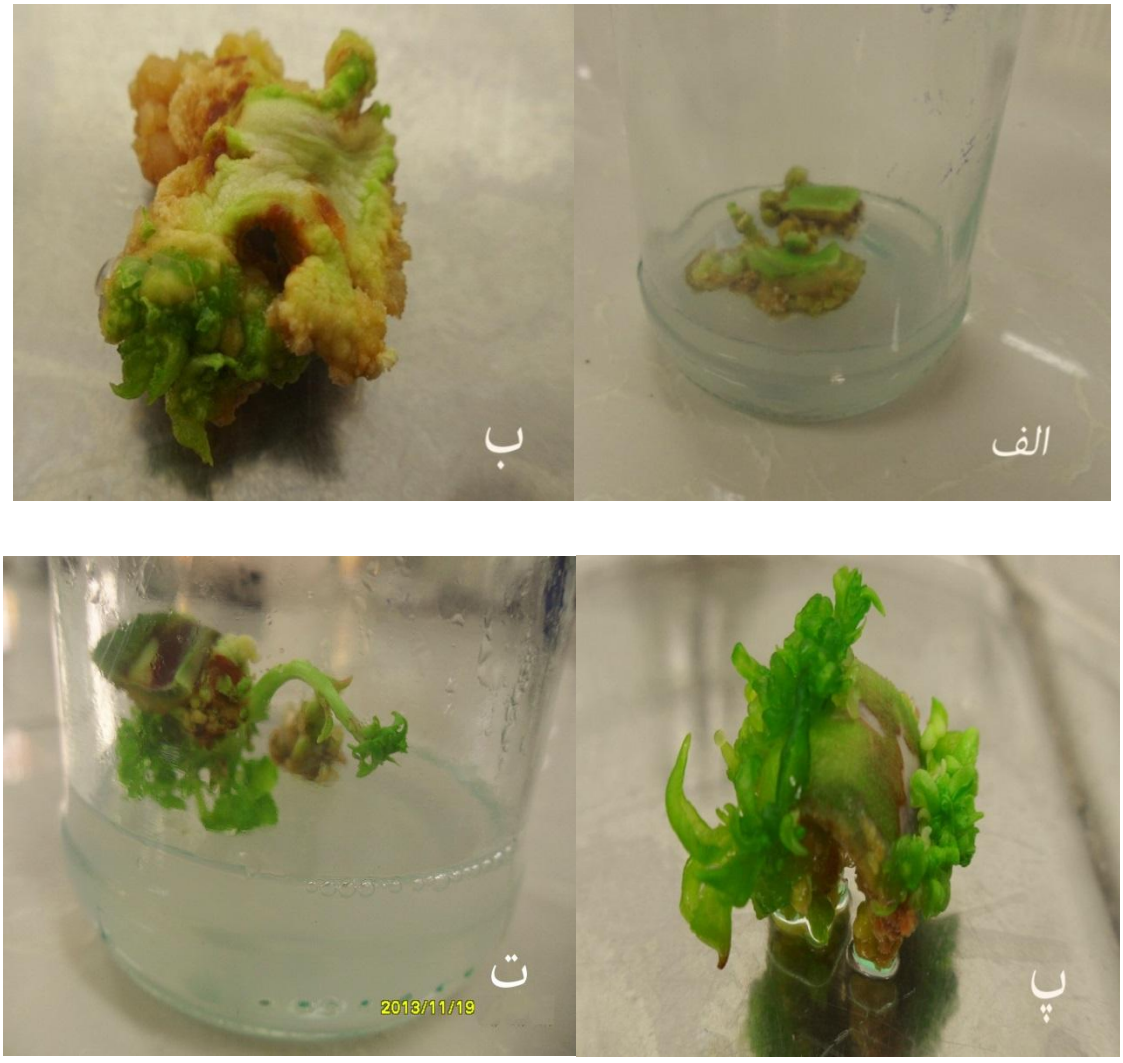
[1] Wu
[2] Yan and Zhou
[3] Tang
[4] Ainsley

نتایج درصد باززایی ساقه نابجا از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون حاصل از این آزمایش در مقایسه با کارهای قبلی بهتر بوده و نشان می‌دهد واریته رجبعلی زردآلو می‌تواند پاسخ مناسبی به باززایی ساقه نابجا دهد و در آینده می‌توان از این ریزنمونه ها در این واریته جهت کارهای انتقال ژن و مهندسی ژنتیک استفاده کرد.

از آنجاییکه در مطالعات انجام گرفته قبلی توسط سایر محققین، بذور نارس باید در مرحله خاص و در زمان‌های به خصوصی از سال از گیاه جدا گردد لذا محدودیت زمانی را در انجام کار ایجاد می‌کند. ضمن اینکه در تحقیقات قبلی، زمان برداشت میوه نارس زردآلو به صورت تجربی در روزهای معینی تخمین زده شده بود در حالیکه رشد و توسعه میوه به شدت تحت تاثیر شرایط محیطی است و ممکن است از یک سال به سال دیگر تغییر نماید. بنابراین ممکن است مراحل فیزیولوژیکی ریزنمونه‌ها در آزمایشات یکسان نباشد. بنابراین استفاده از بذر رسیده به این دلیل که در تمام سال در دسترس بوده و قابل نگهداری در یخچال بوده می‌تواند مفیدتر باشد.

دراین تحقیق مشخص گردید در تمامی تیمارهای تنظیم کننده رشدی به کار رفته، باززایی ساقه نابجا از هر دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل صورت گرفته است. تاثیر تنظیم کننده رشد تیدیازورون در افزایش باززایی ساقه نابجا در اغلب گیاهان خانواده *Prunus* به خوبی ثابت شده است. این تنظیم کننده رشدی در القای باززایی در ریزنمونه‌های بدست‌آمده از بذر زردآلو (وانگ و همکاران، ۲۰۱۱ و گوفردا و همکاران، ۱۹۹۵)، گیلاس (کانلی و تی ین، ۲۰۰۸)، آلبالو (منته و همکاران، ۱۹۸۹)، آلو (ناس و همکاران،۲۰۱۰، نینگ و همکاران، ۲۰۰۷ و کانلی و تی ین، ۲۰۰۹)، هلو (یان و ژو، ۲۰۰۲) و بادام (انسلی و همکاران، ۲۰۰۱) به خوبی استفاده شده است.

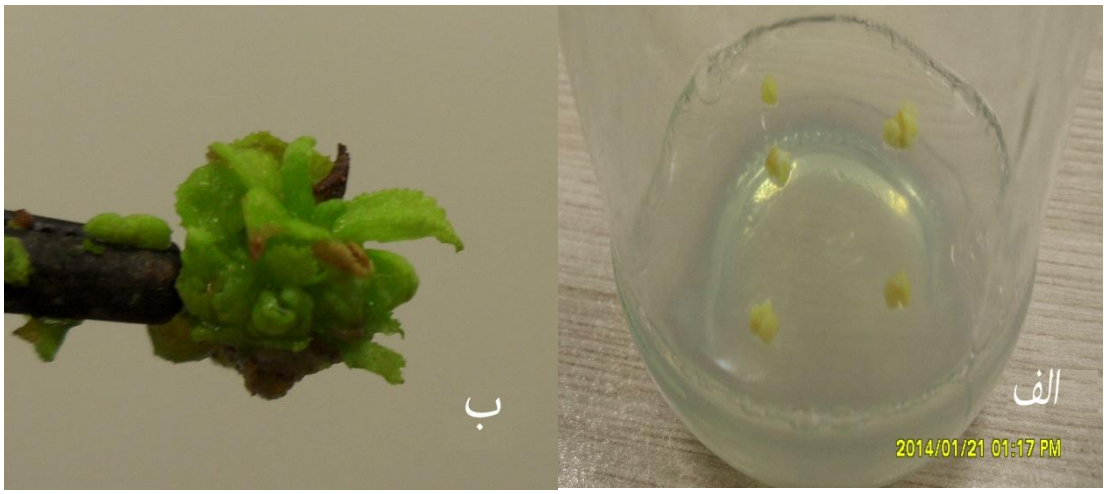
دراین آزمایش نیز، تیدیازورون تاثیر بالایی را در باززایی ساقه نابجا نشان داد. این باززایی بالا می‌تواند به این دلیل باشد که فعالیت زیستی و بیولوژیکی تنظیم کننده رشد تیدیازورون در مقایسه با آدنین فعال سایر سیتوکینین‌ها بیشتر می‌باشد (مک[1] و همکاران، ۱۹۸۷ ، هیوترمن و پریس، ۱۹۹۳). نتایج

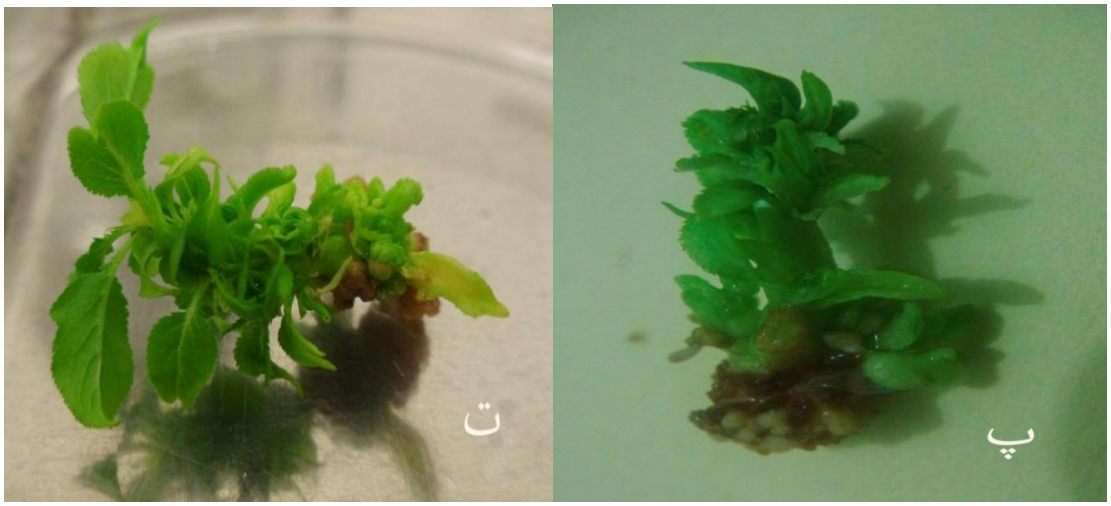


شکل ۴-۱۰ : باززایی شاخه‌های نابجا از ریزنمونه‌های کوتیلدون. (الف) یک هفته پس از انتقال از تاریکی به روشنایی، (ب) القای کالوس از بخش‌های برش خورده کوتیلدون و باززایی از بافت کالوس، (پ) باززایی شاخه‌های نابجا از کوتیلدون سه هفته پس از انتقال به روشنایی و (ت) طویل شدن شاخه‌های باززا شده هشت هفته بعد از کشت

1 Mok

ترکیبات تنظیم کننده رشدی بر باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل نشان داد تنظیم کننده رشد TDZ به تنهایی و یا در غلظت بالا (۱۵ میکرومولار)، باززایی کمی را ایجاد می‌کند اما زمانیکه در غلظت ۹-۷ میکرومولار با تنظیم کننده رشد اکسین بخصوص IBA ترکیب می‌شود باززایی به مراتب بیشتری را نشان می‌دهد که بر همکنش مثبت این دو تنظیم کننده رشد در افزایش رشد و تقسیم سلولی را نشان می‌دهد. این نتایج با نتایج تی ین و همکاران (۲۰۰۷) در آلو و پرز تورنرو و همکاران (۲۰۰۰) مطابقت دارد. البته وانگ و همکاران (۲۰۱۱) در زردآلو تفاوت معنی داری را در سطوح غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشدی TDZ در یک واریته گزارش نکردند.



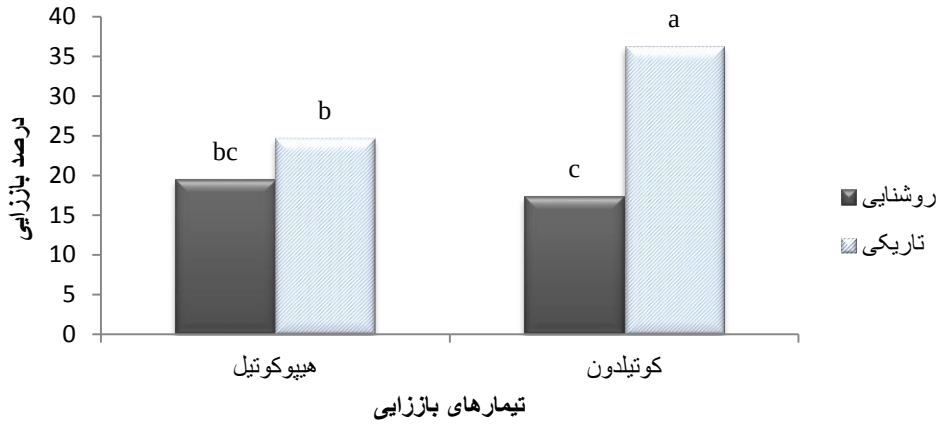


شکل ۴-۱۱: باززایی ساقه نابجا از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل. (الف) ریزنمونه‌های هیپوکوتیل یک هفته پس از انتقال به روشنایی، (ب) باززایی شاخه‌های نابجا از ریزنمونه‌ها سه هته پس از انتقال به روشنایی، (پ) و (ت) رشد و طویل شدن ساقه‌های باززاشده شش و هشت هفته پس از کشت ریزنمونه

در این آزمایش برای اولین بار از هورمون کینتین در باززایی زردآلو و بطور کلی گیاهان جنس *Prunnus* استفاده شد و نتایج ما نشان داد ترکیب هورمونی ۹ میکرومولار BAP به همراه ۴/۵ میکرومولار KIN و ۵/۵ میکرومولار NAA بالاترین باززایی را در ریزنمونه‌های کوتیلدون دارد. همچنین استفاده از تنظیم کننده رشد BAP و KIN به جای TDZ تاثیر زیادی بر افزایش باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ایجاد نکرد. تاکنون در مقالات باززایی از هیپوکوتیل، از این دو تنظیم کننده رشد استفاده نشده و تنها TDZ مورد استفاده قرار گرفته بود.

همانگونه که در جدول ۴-۴ مشخص است فاکتور رژیم نوری بر میزان باززایی در سطح یک درصد معنی‌دار شد. اثر متقابل رژیم نوری و نوع ریزنمونه نیز در سطح یک درصد معنی دار شد که نشان-دهنده برهمکنش موثر این دو فاکتور بر روی باززایی است. نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل این دو تیمار نشان داد که یک دوره ۱۰ روزه تاریکی می‌تواند باعث افزایش درصد باززایی در ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل زردآلو شود. البته این افزایش در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل دارای اختلاف معنی دار نبوده و تنها در ریزنمونه‌های کوتیلدون دارای اختلاف معنی‌دار بود. بیشترین میزان باززایی (۳۷ درصد) در ریزنمونه‌های کوتیلدونی که دوره‌ی تاریکی را گذراندند بدست آمد. همچنین باززایی در ریزنمونه های کوتیلدون که از ابتدا در روشنایی بودند کمترین درصد باززایی (۱۸ درصد) بدست آمد (شکل ۴-۱۲).

همانطور که ذکر شد تاریکی باعث افزایش باززایی ساقه نابجا به خصوص در ریزنمونه‌های کوتیلدون شد. لوپز کاربونل[1] و همکاران (۱۹۹۲) در گزارشی بیان کردند دوره تاریکی، میزان سطوح درونی تنظیم کننده‌های رشد مانند IAA را تحت تاثیر قرار دهد. این تنظیم کننده رشدی می‌تواند از طریق برهمکنش با تنظیم کننده‌های رشدی کاربردی و استفاده شده در محیط کشت باعث افزایش باززایی



شکل۴-۱۲ : مقایسه میانگین اثرات متقابل رژیم نوری و نوع ریزنمونه بر درصد باززایی

شود (پولر و اسکورزا ۱۹۹۵، میگل[2] و همکاران ۱۹۹۶ و جنتایل [3] و همکاران ۲۰۰۲). نتایج مشابهی نیز روی تاثیر تاریکی در افزایش باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدون در بادام (انسلی و همکاران، ۲۰۰۱) و گیلاس (تی ین و همکاران، ۲۰۰۸) گزارش شده است. همچنین در گزارشی، تاریکی باعث کاهش زمان باززایی برگ‌های آلو (اسپینوسا و همکاران، ۲۰۰۶) و افزایش باززایی برگ زردآلو (پرز تورنرو و همکاران، ۲۰۰۰) شد. البته همانطور که اشاره شد تاریکی در افزایش باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل دارای تفاوت و اختلاف معنی‌داری نبود که شاید به دلیل برهم خوردن نسبت تنظیم کننده رشدی سیتوکینین به اکسین در این ریزنمونه‌ها، در اثر افزایش سطح اکسین باشد. این نتیجه کاملا با نتایج

1 Lopez-Carbonell
2 Miguel
3 Gentile

گزارش‌های باززایی از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (هانگ وانگ و همکاران، ۲۰۱۱ در زردآلو، پتری و همکاران، ۲۰۰۸ در هلو و تی ین و همکاران، ۲۰۰۷ در آلو) مطابقت دارد.

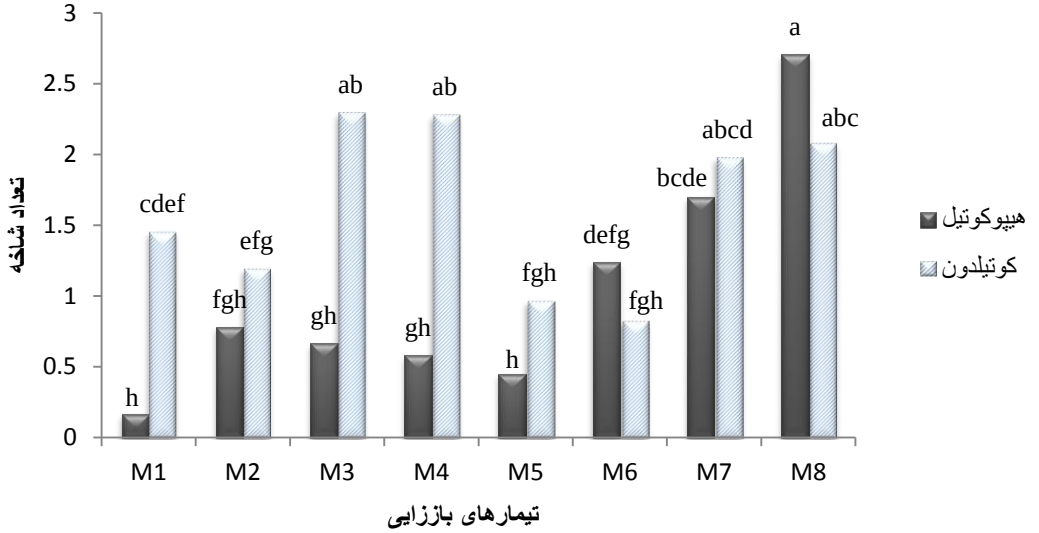
۴-۲-۲-۲ تاثیر تنظیم کننده رشد، نوع ریزنمونه و رژیم نوری بر روی تعداد شاخه باززا شده

بررسی نتایج تجزیه واریانس تعداد شاخه‌زایی، معنی‌داری اثرات ساده تنظیم کننده‌های رشد، نوع ریزنمونه و اثرات متقابل این دو فاکتور را در سطح یک درصد نشان داد (جدول ۴-۴). نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در تیمار تنظیم کننده رشدی ۷/۵ میکرومولار TDZ و ۲/۵ میکرومولار NAA بیشترین میانگین تعداد شاخه (۲/۷) را تولید کرده است. همچنین در تیمار تنظیم کننده رشدی ۱۵ میکرومولار TDZ در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل کمترین تعداد شاخه بدست آمد (شکل ۴-۱۳).

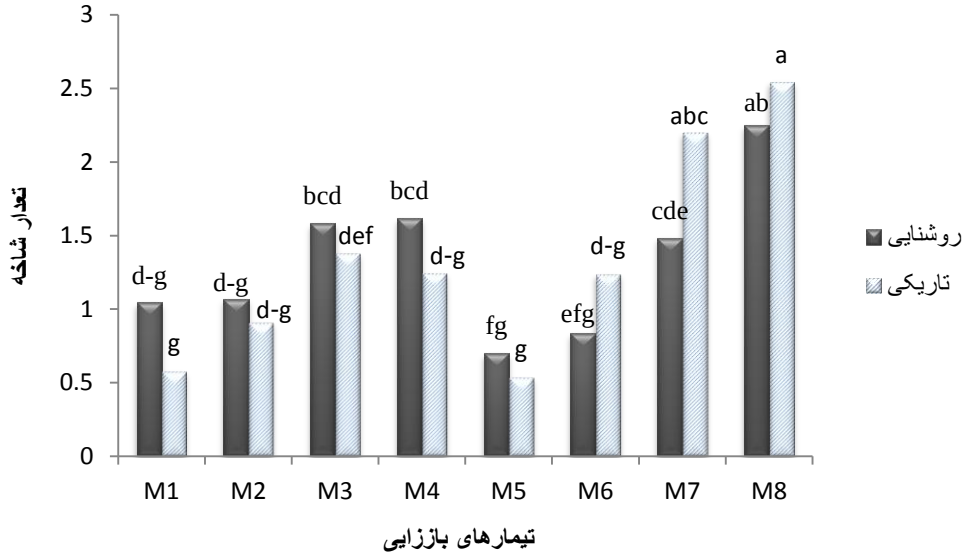
اثر ساده رژیم نوری بر تعداد شاخه‌زایی در جدول تجزیه واریانس معنی‌دار نشد. همچنین اثرمتقابل رژیم نوری با تیمار نوع ریزنمونه نیز معنی دار نشده و تنها اثر متقابل رژیم نوری با تیمار تنظیم کننده رشد در سطح ۵ درصد معنی دار شد. نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل این دو تیمار نشان داد بیشترین تعداد شاخه (۲/۵) در تیمار تنظیم کننده رشدی ۷/۵ میکرومولار TDZ و ۲/۵ میکرومولار IBA در شرایط تاریکی بدست آمده و کمترین تعداد شاخه نیز متعلق به تیمار تنظیم کننده رشدی ۱۵ میکرومولار TDZ و ۲/۵ میکرومولار IBA در شرایط روشنایی بود که نشان می‌دهد افزایش غلظت تنظیم کننده رشد TDZ و روشنایی اثر منفی بر تولید شاخه دارد (شکل ۴-۱۴).

۴-۲-۲-۳ اثر نوع محیط کشت بر درصد باززایی ساقه نابجا از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون

تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت بر باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون نشان داد که نوع محیط کشت اختلاف معنی‌داری بر درصد باززایی ایجاد میکند (جدول ۴-۵).



شکل۴-۱۳ : مقایسه میانگین اثرات متقابل تنظیم کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه بر تعداد ساقه باززاشده (M1 تا M8 تیمارهای تنظیم کننده رشدی باززایی)



شکل۴-۱۴ : مقایسه میانگین اثرات متقابل تنظیم کننده‌های رشد و رژیم نوری بر تعداد ساقه باززاشده (M1 تا M8 تیمارهای تنظیم کننده رشدی باززایی)

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد محیط کشت پایه MS با ۵۰ درصد بیشترین و محیط کشت QL با ۲۶ درصد کمترین میزان باززایی را در ریزنمونه های هیپوکوتیل داشتند (شکل ۴-۱۵). همچنین محیط کشت QL با ۸۳ درصد بالاترین و محیط کشت 3/4MS کمترین درصد باززایی را در ریزنمونه های کوتیلدون نشان دادند (شکل ۴-۱۶).

همانطور که ملاحظه می‌شود میزان غلظت نمک‌های موجود در محیط کشت می‌تواند در میزان باززایی این دو ریزنمونه موثر باشد. محیط کشت پایه QL نسبت به محیط‌های کشت MS و ¾ MS درصد باززایی بالاتری را در ریزنمونه‌های کوتیلدون ایجاد کرد. محیط کشت QL بطور موفق آمیزی در باززایی گیاهان جنس *Prunus* استفاده شده است (مت و جهل[1] ۲۰۰۵، سانگ و سینگ ۲۰۰۵). غلظت یون Ca^{+} که لازمه سنتز دیواره سلولی و فعالیت‌های بیوشیمیایی دیواره سلولی است (پیس و

1 Matt and Jehle

آلدوینکل[1] ۱۹۹۴)، در محیط کشت QL نسبت به محیط کشت MS بیشتر است. ضمن اینکه غلظت یون NH_4^+ در این محیط کشت کمتر می‌باشد. یون‌های آمونیوم در کشت بافت گیاهی می‌توانند اثر سمی داشته باشند (براند[2] ۱۹۹۳). بنابراین افزایش باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدون در محیط کشت QL می‌تواند به علت غلظت پایین نیتروژن و بالای کلسیم باشد. این نتایج با گزارش کانلی و تی ین (۲۰۰۹) در آلو مطابقت دارد.

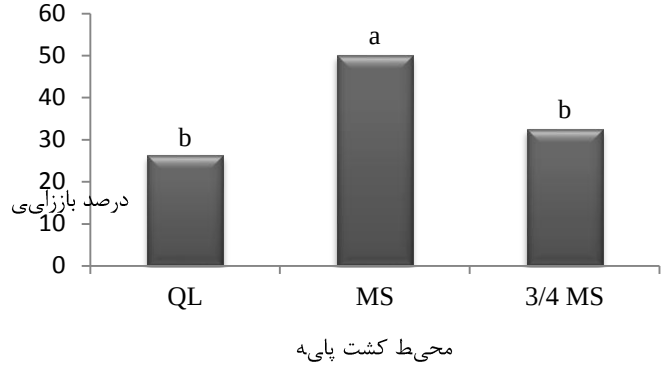
نتایج وانگ و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد محیط کشت MS در مقایسه با QL تاثیر بیشتری بر باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل زردآلو دارد که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد.

جدول ۴-۵ : تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت بر درصد باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون

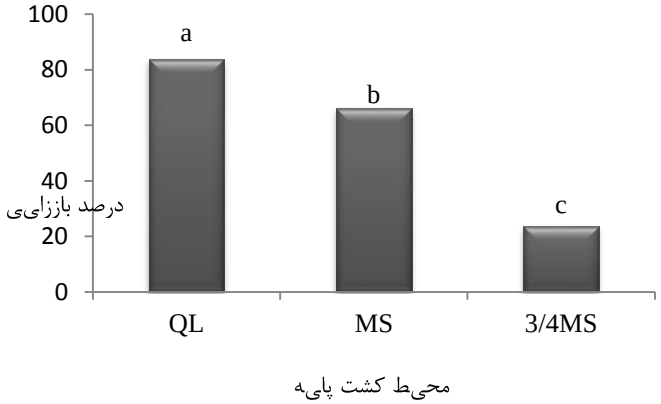
منابع تغیرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		هیپوکوتیل	کوتیلدون
تکرار	۳	۴۶/۵۲۸ ns	۱۶۸/۷۵ ns
محیط کشت	۲	۶۰۶/۲۵۰ *	۳۸۰۸/۳۳۳ **
خطای آزمایش	۶	۹۲/۳۶۱	۷۵

*معنی‌داری در سطح ۵٪ ، **معنی‌داری در سطح ۱٪

1 Yepes and Aldwincle
3 Brand



شکل۴-۱۵ : مقایسه میانگین اثر نوع محیط کشت بر باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل



شکل۴-۱۶ : مقایسه میانگین اثر نوع محیط کشت بر باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدون

۴-۲-۲-۴ بررسی ریشه‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون

همانگونه که در فصل سوم اشاره شد ساقه‌های باززا شده به طول ۲-۳ سانتی متر به محیط کشت ریشه‌زایی منتقل شدند. ریشه‌زایی تنها در ساقه‌های باززا شده ریزنمونه‌های هیپوکوتیل مشاهده شد و ریزنمونه‌های کوتیلدون در این محیط کشت توانایی باززایی نداشته و تمامی ریزنمونه‌ها پس از دو تا سه هفته از بین رفتند. به طور کلی جهت ریشه زایی گیاهان جنس *Prunus* از غلظت‌های بالای اکسین استفاده می‌شود. کانلی و تی‌ین (۲۰۰۹) میزان ریشه‌زایی در غلظت ۱۴/۸ میکرومولار را از ریزنمونه‌های کوتیلدون آلو پایین گزارش کردند. همچنین وانگ و همکاران (۲۰۱۱) در زردآلو و پتری

و همکاران (۲۰۰۸c) در گیاه آلو از تیمار تنظیم کننده رشدی ۵ میکرومولار NAA به همراه ۰/۱ میکرومولار KIN جهت ریشه زایی ساقه‌های باززا شده از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل استفاده کردند.

شکل ۴-۱۶ ریشه زایی ساقه‌های باززا شده از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل. (الف) ریشه زایی ساقه‌ها دو هفته پس از انتقال به محیط کشت ریشه‌زایی، (ب) و (پ) رشد گیاهچه‌ها سه هفته پس از ریشه‌زایی (ت) انتقال گیاهچه‌ها به خاک

نتیجه‌گیری کلی

نتایج کالوس‌زایی این پایان‌نامه نشان داد ریزنمونه‌های برگی که در شرایط درون‌شیشه‌ای ایجاد می-شوند نسبت به ریزنمونه‌هایی که بطور مستقیم از درختان و در شرایط *ex vitro* جدا شدند پاسخ مناسب‌تری بر میزان کالوس‌زایی زردآلو دارند. همچنین ریزنمونه‌های برگی نسبت به بافت ساقه جهت کالوس‌زایی مناسب‌تر هستند. به نظر می‌رسد در بین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ترکیب و غلظت ۲/۲ میکرومولار BAP و ۲/۶۸ میکرومولار NAA می‌تواند مناسب‌ترین ترکیب تنظیم کننده رشدی جهت کالوس‌زایی در زردآلو باشد. همچنین نتایج کالوس‌زایی در این پایان نامه نشان داد واریته‌های مختلف، پاسخ‌های متفاوت و معنی‌داری بر میزان کالوس‌زایی دارند و در بین واریته‌های مورد بررسی در این پایان‌نامه واریته رجبعلی بیشترین کالوس‌زایی را نشان داد. همچنین هیچ تغییری در کالوس-های انتقال داده شده به محیط‌های کشت باززایی مشاهده نگردید و تنها تعدادی از کالوس‌ها سبز رنگ شدند.

نتایج آزمایشات باززایی ساقه نابجا نشان داد ترکیبات تنظیم کننده رشدی ۴/۵میکرومولار KIN به همراه ۹میکرومولار BAP و ۵/۵میکرومولار NAA و همچنین ترکیب تنظیم کننده رشدی ۲/۵میکرومولارIBA و ۷/۵میکرومولارTDZ بیشترین درصد باززایی را به ترتیب در ریزنمونه‌های کوتیلدون (۶۶/۲۵ درصد) و هیپوکوتیل (۵۰درصد) درشرایط تاریکی داشتند. همچنین نتایج نشان داد که محیط کشت QL وMS به ترتیب تاثیر بیشتری بر درصد باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدون (۸۳/۷۵ درصد) و هیپوکوتیل (۵۰ درصد) زردآلو در شرایط تاریکی دارند.

پیشنهادات

۱- استفاده از ریزنمونه های دیگر به خصوص برگ جهت باززایی مستقیم زردآلو در تحقیقات آینده

۲- اعمال تنش های غذایی و محیطی از جمله تنش سرما به کالوس‌ها به عنوان یک تیمار در القای باززایی کالوس‌ها در آینده

۳- استفاده از محیط‌های کشت دیگر و همچنین تنظیم کننده‌های رشد جدید به خصوص اسید جیبرلیک در تحقیقات باززایی و کالوس‌زایی بعدی

۴- بهینه‌سازی ریشه‌زایی ساقه‌های نابجا از ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل با اعمال تیمارهای مختلف تنظیم کننده رشدی

منابع

پیری، خ و نظریان فیروز آبادی، ف (۱۳۸۵) **راهنمای کشت بافت گیاهی**، انتشارات دانشگاه بوعلی سینا.

تاجی، ا.، داد، ا.، ویلیامز، ا (۱۳۸۲) **کشت بافت گیاهی**، ترجمه معینی، الف.، کهریزی، د ، انتشارات سازمان بسیج دانشجویی، ۱۶۳ص

تورز، کنت.سی (۱۳۸۶) **فنون کشت بافت برای گیاهان باغبانی (بوستانکاری)**، مترجم خوشخوی، م، چاپ سوم، انتشارات دانشگاه شیراز، ص ۴۱

شریفی، ا، مشتاقی، ن ، باقری، ع (۱۳۸۹) **کشت بافت گیاهی کاربردی**، انتشارات جهاد داشگاهی مشهد، ص۱۷۳

فارسی، م و ذوالعلی، ج (۱۳۸۷) **اصول بیوتکنولوژی گیاهی**، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۴۹۵ ص

Abbasi, B., Saxena, P.K., Murch, S.J., Liu, C.Z. (**2007**) "Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities." **In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant, 43,** pp **481**

Abrikos. A., Yerevan Kh, K.M., Sarýhan, E., Sevimay, C., Cocu, S. (**2005**) "Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L. " **Period Biol, 107,** pp **113**

Ainsley, P.J., Hammerschlag, F.A., Bertozzi, T., Collins, G.G., Sedgley, M. (**2001**) "Regeneration of almond from immature seed cotyledons" **Plant Cell Tiss, Org. Cult, 67,** pp **221**

Aradhya, M.K.,Weeks, C., Simon,C J. (**2004**) "Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus L*. using amp lified fragment length polymorphism". **Sci. Hort, 103, pp 131**

Arakeljan,V.N. (1951) "Garni1.Izd.Agrik." Yerevan

Arumuganathan, K.,. Earle, E.D. (**1991**) "Nuclear DNA content of some important plant species. " **Plant Mol. Biol. Rep, 9,** pp **208**

Arzumanjan, P.R. (**1970**) "Kultura abrokoza v Armjanszki SSR.Sbornic materialov" Izd. Ajastan,Yerevan

Bailey,C.H and Hough, L.F. (**1975**) "Apricots.In Advances in fruit breeding.Edited by J. Janick and J.N. Moore." **Purdue University Press, West Lafayette, Ind,** pp **367**

Bhagwat, B and Lane, D. (**2004**) "In vitro regeneration from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) 'Lapins' and 'Sweetheart'" **Plant Cell Tiss. Org. Cult, 78,** pp **173**

Bhatia, P., Ashwath, N., Midmore D.J. (**2005**) "Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato. " ***In Vitro*** **Cell Dev Biol Plant, 41,** pp **457**

Bonga, J.M and Von Adercas, P. (**1992**) "***In vitro*** **culture of Trees**" Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 232

Brand, M.H. (**1993**) "Agar and Ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro.* " **Plant Cell Tiss. Org. Cult, 35,** pp **203**

Burgos, L and Alburquerque, N. (**2003**) " Ethylene inhibitors and Low kanamycin concentration improve adventitious regeneration from apricot leaves" **Plant Cell Rep, 21,** pp **1167**

Canli, F and Tian, L. (**2008**). "*In vitro* shoot regeneration from stored mature cotyledons of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars". **Sci. Hort, 116, pp 34**

Canli, F and Tian, L. (**2009**) "Regeneration of adventitious shoots from mature stored cotyledons of Japanese plum (*Prunus salicina* Lind1)" **Scientia Horticulturae, 120,** pp **64**

Crossa-Raynaud,P.H. (**1960**) "Problems, arboriculture fruitiere en tunise." **Abricotiers.Ann.L, Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, 33,** pp **39**

De Candolle, A., (1886) "Origin of cultivated plants. " 2nd ed. Reprinted in 1964. Hafner, New Yourk.

Declerck, V and Korban, S.S. (**1996**) "Influence of growth regulators and carbon sources on callus induction, growth and morphogenesis from leaf tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). " **J Hortic Sci, 71,** pp **49**

Del-Poza, J.C., Lopez-Matas, M.A., Ramirez-Para, E., Gutierrez, C. (**2005**) "Hormonal control of plant cell cycle. " **Physiologica Plantarum, 123,** pp **173**

Elzen, G.W. (**1983**) "Cytokinins and insect galls. " **Comp Biochem Physiol, 76,** pp **17**

Escalettes, V and Dosba, F. (**1993**) "*In vitro* adventitious shoot regeneration from leaves of *Prunus* spp" **Plant Sci. 90,** pp **201**

Enjarlic, F., Carron, M., Lardet, L. (**1988**) "Contamination of primary cultures in tropical areas: The case of *Hevea Brasilensis*" **Horticulture, 225,** pp **57**

Espinosa, A.C., Pijut, P.M., Michler, C.H. (**2006**) "Adventitious shoot regeneration and rooting of *Prunus serotina in vitro* cultures". **Hortscience, 41 (1),** pp **193**

Feeney, M,. Bhagwat, B., Mitchell, J.S,. Lane, W.D. (**2007**) " Shoot regeneration from organogenic callus of sweet cherry (*Prunus avium* L.) " **Plant Cell Tiss Organ Cult, 90,** pp **20**

Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. (**1968**) "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells " **Exp. Cell Res. 50,** pp **151**

Gentile, A., Moticelli, S., Damiano, C. (**2002**) "Adventitious shoot regeneration in peach *(Prunus persica* L. Batsch)" **Plant Cell Rpt, 20,** pp **1011**

Goffreda, J.C., Scopel, A.L., Fiola, J.A. (**1995**) "Indole butyric acid induces regeneration of phenotypically normal apricot (*Prunus armeniaca* L.) plants from immature embryos" **Plant Growth Regul, 17,** pp **41**

Hammerschlag FA. (**1986**) "Temperate fruits and nuts. In: Zimmerman RH, Griesbach RJ, Hammerschlag FA, Lawson RH (ed)" **Tissue culture as a plant production system for horticultural crops,** pp. **221**

Hooykass, PJJ and Schilperoort, R.A., (**1992**) "Agrobacterium and plant genetic engineering" **Plant Molecular Biology, 19,** pp **15**

Hormaza, J.I. (**2002**) "Molecular characterization and similarity relationships among apricot genotypes using simple sequence repeats" **Theor. Appl. Genet, 104,** pp **321**

Huetteman, CA and Preece, JE. (**1993**) "Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture." **Plant Cell Tiss. Org. Cult, 33,** pp **105**

Isikalan, C., Akbas, F., Namly, S., Basaran, D. (**2010**) "Adventitious shoot development from leaf and stem explants of *Amygdalus communis* L. cv. Yaltinski " **POJ, 3(3),** pp **92**
Jeszejan, G.S. (1977) "Kultura abricosza Armenii." P.3-147.

Khosh-Khui, M and Sink, K.C. (**1982**) "Callus induction and culture of Rosa. " **Sci Hort, 17,** pp **361**

Koubouris, G and Miltiadis, V. (**2006**) "Improvement of *in vitro* propagation of apricot cultivar "Bebecou"." **Plant cell, Tissue and Organ Culture, 85,** pp **173**

Lane, W.D and Cossio, F. (**1986**) "Adventitious shoots from cotyledons of immature cherry and apricot embryos" **Can. J. Plant Sci, 66,** pp **953**

Layne, R.E.C., Bailey,C.H., Hough, L.F. (1996) "**Apricots. In Fruit breeding. Vol. II. Tree and tropical fruits**" Edited by J. Janick and J.N. Moore. John Wiley & Sons, New York, N.Y. pp. 79

Li-Chun, H., Murashige, H. (**1977**) Plant tissue culture media; their prepation and some applications. **Tissue Culture Assoc, Man, 3,** pp **539**

Liu, X and Pijut, P.M. (**2008**) "Plant regeneration from in vitro leaves of mature black cherry (*Prunus serotina*). " **Plant Cell Tissue and Organ Culture. 94,** pp **113**

Lopez-Carbonell, M., Alegre, L., Prinsen, E., van Onckelen, H. (**1992**) "Diurnal fluctuations of endogenous IAA content in *aralia* leaves. " **Biol. Plantarum, 34,** pp **223**

López-Noguera, S., Petri, C., Burgos, L. (**2009**) " Combining a regeneration-promoting gene and site-specific recombination allows a more efficient apricot transformation and the elimination of marker genes" **Plant Cell Rep. 28,** pp **1781**

Mante, S., Scorza, R., Cordts, J.M. (**1989**) "Plant regeneration from cotyledons *of Prunus persica, Prunus domestica* and *Prunus cerasus*" **Plant Cell Tiss, Org. Cult, 19,** pp **1**

Matt, A and Jehle, J.A. (**2005**) " *In vitro* plant regeneration from leaves and internode sections of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.)" **Plant Cell Rep. 24,** pp **468**

McCown, B.H. (**2000**) "Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: dealing with genetic predeterminism. " **In Vitro Cell Dev Biol Plant, 36,** pp **149**

Miguel, C.M., Druart, P., Oliveira, M.M. (**1996**) "Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill) explants" **In Vitro Cell Dev, Biol. Plant, 32,** pp **148**

Mok, MC., Mok, DWS., Turner, JE., Muser, CV. (**1987**) "Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems.*"* **HortScience, 22,** pp **1194**

Mukhopadhyay, A., Arumugam, N., Nandakumar, P. B. A., Pradhan, A. K., Gupta, V., Pental, D. (**1992**)"*Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by mode of shoot regeneration." **Plant Cell Reports, 11,** pp **506**

Morel, G. (**1960**) "Producing virus-free cymbidium " **American Orchid Society, 29,** pp **495**

Nagaty, M.A. (**2012**) " Establishment of Regeneration system for Taif peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivar (Balady cultivar) in Taif, KSA. " **Journal of American Science, 8(4)**

Nas, M.N., Bolek, Y., Sevgin, N. (**2010**) "The effects of explant and cytokinin type on regeneration of *Prunus microcarpa*". **Sci. Hortic. -Amsterdam 126,** pp **88**

Ning, G.G., Bai, S.P., Bao, M.Z., Liu, L. (**2007**) "Factors affecting plantlet regeneration from *in vitro* cultured immature embryos and cotyledons of *Prunus mume* "Xue mei*'*"" **In Vitro Cell, Dev. Biol. – Plant, 43,** pp **225**

Nyujtó, F., Surányi, D. (**1981**) "Kajszibarack". Mezögazd. Kiadó, Budapest.

Pe´ rez-Tornero. O., Egea, J, A., Vanoostende., L, Burgos. (**2000**) "Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot" **Plant Sci, 158,** pp **61**

Pérez-Jiménez, M., López-Soto, M.B., Cos-Terrer, J. (**2012**) "*In vitro* callus induction from adult tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch) " **In Vitro Cell**

Petri, C and Scorza, R. (**2009**) "Factors affecting adventitious regeneration from *in vitro* leaf explants of 'Improved French' plum, the most important dried plum cultivar in the USA" **Ann Appl Biol, 156,** pp **79**

Petri, C., López-Noguera, S., Alburquerque, N., Egea, J., Burgos, L.(**2008a**) "An antibioticbased selection strategy to regenerate transformed plants from apricot leaves with high efficiency. " **Plant Sci, 175,** pp **777**

Petri, C., Wang, H., Alburquerque, N., Faize, M., Burgos, L. (**2008b**) "*Agrobacterium* mediated transformation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) leaf explants" **Plant Cell Rep, 27,** pp **1317**

Petri, C., Webb, K., Hily, J.M., Dardick, C., Scorza, R. (**2008c**) "High transformation efficiency in plum (Prunus domestica L.): a new tool for functional genomics studies in *Prunus* spp." **Mol. Breed, 22,** pp **581**

Pierik, R.L.M. (**1999**) "***In vitro* culture of higher plants**" Kluwer Academic Publishers, pp 260

Pieterse, R.E. (**1989**); "Regeneration of plants from callus and embryos of 'Royal' apricot". **Plant Cell Tiss, Org. Cult, 19,** pp **175**

Pooler, M.R and Scorza, R. (**1995**) "Regeneration of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] rootstock cultivars from cotyledons of mature stored seed" **HortScience, 30,** pp **355**

Quoirin, M and Lepoivre, P. (**1977**) "Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp." **Acta Horti, 78,** pp **437**

Schenk, R.V and Hildebrandt, A.C. (**1972**) " Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. " **Can J Bot , 50,** pp **199**

Smith, R.H. (**2000**) " **Plant tissue culture. Techniques and experiments**. " Academic Press, pp 231

Skoog, F and Miller, C. O. (**1957**) "Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*". **Symp. Soc. Exp. Biol, 11,** pp **118**

Skoog, F., Strong, F.N., Miller, C.O. (**1965**) "Cytokinins" **S.c tence, 148,** pp **532**

Song, G.Q and Sink, K.C. (**2005**) "Optimizing shoot regeneration and transient expression factors for Agrobacterium tumefaciens transformation of sour cherry (*Prunus cerasus L.*) cultivar Montmorency. " **Sci. Hortic, 106,** pp **60**

Taji, A., Kumar, P.P., Lakshmanan, P. (**2002**) "in vitro plant tissue breeding. **" Food Products Press,** pp **167**

Tang, H.R., Ren, Z.L., Krczal, G. (**2000**) "Somatic embryogenesis and organogenesis from immature embryo cotyledons of three sour cherry cultivars (*Prunus cerasus* L.). " **Sci. Hort, 83,** pp **109**

Teng, W-L., Sin, T., Teng M-C. (**2002**) "Explant preparation affects culture initiation and regeneration of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*. " **Plant Cell Tissue Organ Cult 68,** pp **233**

Tian, L., Wen, Y., Jayasankar, S., Sibbald, S. (**2007**) "Regeneration of *Prunus salicina* Lindl (Japanese plum) from hypocotyls of mature seeds" **In Vitro Cell, Dev. Biol Plant, 43,** pp **343**

Utsunomiya H., Takekoshi S., Gato N., Utatsu H., Motley E.D., Eguchi K., Fitzgerald T.G., Mifune M., Frank G.D., Eguchi, S. (**2002**) "Fruit-juice concentrate of Asian plum inhibits growth signals of vascular smooth muscle cells induced by angiotensin Π. " **Life Sci, 72,** pp **659**

Vavilov, N.I. (**1951**) "Phytogeographic basis of plant breeding. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants**." K. S. Chester [Translated]. Chron. Bot, 13,** pp **13**

Wang, Hong., Alburquerque, Nuria., Borgos, Lorenzo., Petri, Cesar. (**2011**) "Adventitious shoot regeneration from hypocotyl slices of mature apricot *(Prunus armeniaca* L.) seeds: A feasible alternative for apricot genetic engineering" **Scientia Horticulturae, 128,** pp **457**

Wang, T.L., Everett, N.P., Gould A.R., Street, HP. (**1981**) "Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells, The effects of Cytokinin. **" Protoplasma, 106,** pp **23**

Went, F.W. (**1934**) "On the pea test method for auxin, plant growth hormone. " **Proc. K. Ned. Akad. Wet, 37,** pp **547**

Werner, T and Schmulling, T. (**2009**) "Cytokinin action in plant development." ***Curr. Opin. Plant Bio,*** **12,** pp **527**

Wills R.B., Scriven F.M., Greenfield, H. (**1983**)"Nutrient composition of stone fruit (*Prunus* spp.) cultivars: apricot, cherry, nectarin, peach and plum. **" J. Sci. Food Agri, 34,** pp **1383**

WoodWard, W and Bartel, B. (**2005**) "Auxin: Regulation, action, and interacton" **Annals butany, 95,** pp **707**

Wu, Y.J., Zhang, S.L., Xie, M., Chen, J.W., Qin, Y.H., Qin, Q.P. (**2005**) "Plantlets regeneration from immature embryos and cotyledons of peach" **Sci. Silvae Sin, 41,** pp **45**

www. faostat.fao.org

Yan, G.H and Zhou, Y. (2002) "Plant regeneration from excised immature embryos of peach (*Prunus persica* L.)" **Acta Hort. Sin, 29,** pp **480**

Yepes, L.M and Aldwinckle, H.S. (**1994**) "Factors that effect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis" **Plant Cell Tiss. Org. Cult, 37,** pp **257**

Abstract:

For optimizing tissue culture of *Prunus armeniaca*, a study was carried out by several factorial experiments on the base of completely randomized design. In the first and second experiments, the effect of different concentrations of 6-benzylaminopurin (BAP) in combination with different concentrations of indole-3-butyric acid (IBA) and α-naphthalene acetic acid (NAA) on basal MS medium were evaluated for callus induction from leaf explants. The results showed that the highest callogenesis percentage (86% in L.cv "RajabAli") obtain on MS medium supplemented with 2/2 μM BAP and 5/36 μM NAA. In the third experiment, The effects of explant types and different concentrations of plant growth regulators was evaluated on callus induction. Highest rate of callus induction ,90%, observe *in vitro*-derived leave explants which cultured on MS medium with 2/2 μM BAP and 2/68 μM NAA. In the next experiment, The effects of plant growth regulator treatments, light conditions and explant types was studied on adventitious shoot regeneration. Results showed that the highest shoot regeneration on cotyledon and hypocotyl explants ,51% and 48%, obtain in 9 μM BAP plus 4/5 μM KIN and 5/5 μM NAA and 7/5 μM TDZ plus 2/5 μM IBA, respectively.The dark incubation especially in cotyledon explants was effective in increasing the regeneration frequency. In further experiments, the effect of different basal mediums was analyzed on regeneration rate of cotyledon and hypocotyl explants, separately. The results showed MS and QL basal salts was more effective on shoot regeneration from hypocotyl (50%) and cotyledon (83%) explants, respectively

Key Words: *Prunus armeniaca*, Tissue culture, Callogenesis, Regeneration, Shoot adventitiuos, Plant Growth Regulator

Shahrood University

Faculty of Agriculture

Effect of plant growth regulators on callogenesis and regeneration of *Prunusarmeniaca*

Ali Mazharinia

Supervisors:

Shahrokh Gharanjik and Mahdi Rezaei

September, 2014