

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده مهندسی کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

بهینه سازی اندام زایی غیر مستقیم در گیاه کینوا (*Chenopodium quinoa* WILD) با استفاده از ریز نمونه ی هیپوکوتیل

نگارنده: مرضیه حسن زاده خوش

اساتید راهنما

دکتر مهدیه پارسائیان

اساتید مشاور

دکتر زیبا قسیمی حق

شهریور ۱۴۰۰

تقدیم به:

روح پدرم که شانه های خسته اش تکیه گاه زندگیم بوده است و روح مادرم دریای سیکران فداکاری و عشق او

که وجودم برایش همه نجب بود و وجودش برایم همه مهر

همسر مهربانم که همواره در طول تحصیل متعل زحمتم بودند و تکیه گاه من در مواجهه با مشکلات، و وجودشان یه دگر می من می باشد.

تشکر و قدردانی

سپاس قلبی و لسانی خود را از استاد عالی قدر سرکار خانم حمیدیه پارسلیان که زحمات راهبانی این پایان نامه را عمده دار گردیدند و در تمامی مراحل انجام رساله از راهبانی های بدبرانه ایشان

استفاده نمودم ابراز می دارم و توفیقات روز افزون ایشان را توأم با صحت و سعادت خواستارم و از سرکار خانم زیبا قسمی که در امر مشاوره این رساله مساعدت نمودند و در این امر نهایت مراقبت،

توجه و دقت خود را مبذول فرموده اند کمال تشکر و امتنان را دارم و برای ایشان از خداوند سلامت و سعادت ابدی را خواهم.

بمختص نهایت تقدیر از سایر اساتید که تقدیرم علی الخصوص جناب آقای دکتر شاهرخ قریبچیک که توفیق نگار دیشان را داشتم و از بیکاری آقای دکتر نیاز علی سهوند و همه دوستان عزیز می که در انجام

این رساله یاری رسانیدن، لطف و مهربانی بی شائبه شان همیشه در خاطر من خواهد ماند.

تهدنامه

اینجانب مرضیه حسن زاده خوش دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه کارشناسی ارشد تحت راهنمایی مهدیه پارسائیان 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

امضای دانشجو

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 شود . استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

کینوا (*Chenopodium quinoa* Willd) گیاهی دارویی با دانه‌های دارای ارزش غذایی بالا است. این پژوهش در قالب چند آزمایش فاکتوریل بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی در سه بخش جوانه‌زنی، کالوس‌دهی، اندام‌زایی انجام شد. بررسی جوانه‌زنی بذر کینوا تحت تیمارهای نوری و نوع محیط کشت نشان داد که بیشترین سرعت جوانه‌زنی بذر کینوا (۱۵/۸۷ روز) در شرایط تاریکی و محیط‌های MS و MS ½ مشاهده شد. کالوس‌زایی در گیاه کینوا با ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل و در محیط MS حاوی 2,4-D (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و نانو کربن (صفر، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با هورمون‌های سیتوکینینی BAP و KIN (صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) نشان داد که در عدم کاربرد 2,4-D کالوس‌زایی مشاهده نگردید. در حالی‌که کاربرد ترکیب BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به القای بالاترین درصد کالوس‌زایی به همراه بیشترین وزن (۲/۵۷ گرم) و مساحت (۱/۷ سانتی‌متر مربع) کالوس منجر شد. با این حال، افزودن BAP باعث تولید کالوس‌های شل و سفید شد که مناسب باززایی نبودند. کالوس‌های کرم رنگ و فشرده‌ی مناسب اندام‌زایی، در محیطی با ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوکربن تولید شدند. اندام‌زایی کالوس‌های انتخاب شده در محیط MS حاوی هر دو سیتوکنین BAP و KIN در ترکیب جداگانه با سه اکسین IAA، IBA و NAA نشان داد که در محیط‌های فاقد هر دو سیتوکنین، شاخه‌زایی مشاهده نگردید. استفاده از IAA در اندام‌زایی نشان داد که بیشترین شاخه‌زایی، تعداد شاخه و طول‌ترین شاخه‌ها در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و KIN و عدم مصرف IAA حاصل گردیدند. در حالی‌که بیشترین طول و تعداد ریشه در سطوح مصرف IAA به دست آمد. افزودن IBA جهت اندام‌زایی نشان داد که بالاترین میزان شاخه‌زایی، تعداد و طول شاخه‌ها در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و KIN و بدون IBA مشاهده شد. بیشترین تعداد ریشه در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN تولید شد، در حالی‌که طول‌ترین ریشه‌ها در ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN در ترکیب با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP تولید گردیدند. استفاده از NAA در اندام‌زایی نشان داد که بیشترین شاخه‌زایی، تعداد شاخه و طول‌ترین شاخه‌ها در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و KIN حاصل

شد، درحالی که طولی ترین و بیشترین تعداد ریشه در محیط حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA و محیط حاوی ۱ میلی گرم در لیتر KIN و ۰/۲ میلی گرم در لیتر ثبت گردید. بیشترین درصد شاخه زایی (۷۰٪) در محیط حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۵ میلی گرم در لیتر KIN القا گردید و طولی ترین ریشه ها (۱۲ سانتی متر) در محیط های تیمار شده با ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA در ترکیب با ۱ میلی گرم در لیتر KIN مشاهده شد. در مجموع، می توان از ریزنمونه ی هیپوکوتیل برای دستیابی به یک دستور العمل بهینه برای بهبود ریزازدیادی غیر مستقیم گیاه کینوا استفاده کرد.

کلمات کلیدی: القاء کالوس، کینوا، باززایی، جوانه زنی در شرایط درون شیشه ای، ریشه زایی

لیست مقالات مستخرج از پایان نامه

۱-

۲-

۳-

فهرست مطالب

فصل ۱ : مقدمه و کلیات	۱
۱-۱ مقدمه	۲
۲-۱ کینوا (<i>Chenopodium quinoa willd</i>)	۴
۱-۲-۱ کینوا و بهینه سازی کشت بافت	۵
۲-۲-۱ کینوا در ایران	۶
۳-۱ گیاهشناسی کینوا	۷
۱-۳-۱ مشکلات کشت کینوا	۸
۴-۱ کشت بافت	۸
۵-۱ مراحل کشت بافت گیاه از طریق کالوس	۱۰
۶-۱ اهمیت و کاربرد کشت بافت	۱۰
۷-۱ انواع کشت	۱۱
۱-۷-۱ نوع محیط کشت	۱۲
۸-۱ سن و نوع ریز نمونه	۱۳
۹-۱ مواد و اجزای تشکیل دهنده ی محیط کشت	۱۳
۱۰-۱ مواد جامدکننده محیط کشت	۱۷
۱۱-۱ PH محیط کشت	۱۷
۱۲-۱ تنظیم کننده های رشد	۱۷
۱-۱۲-۱ اکسین ها	۱۸
۲-۱۲-۱ سیتوکنین ها	۱۹
۳-۱۲-۱ جیبرلین (GA)	۱۹
۴-۱۲-۱ اسیدآبسیزیک اسید (ABA)	۲۰
۱۳-۱ آلودگی های محیط کشت	۲۰
۱۴-۱ نانو کربن ها در کشت بافت	۲۲
۱۵-۱ کاربردهای صنعتی و دارویی کینوا	۲۵

۱۶-۱	هدف از کشت بافت گیاه کینوا.....	۲۵
۱۷-۱	هدف تحقیق.....	۲۶
	فصل دوم: مروری بر تحقیقات انجام شده.....	۲۷
۱-۲	کالوس زایی.....	۲۸
۲-۲	اندام زایی.....	۳۰
	فصل سوم: مواد و روش ها.....	۳۷
۱-۳	محل و زمان اجرای پژوهش.....	۳۸
۲-۳	مواد مورد استفاده.....	۳۸
۳-۳	تهیه محیط‌های کشت گیاهی.....	۳۸
۱-۳-۳	تهیه محلول های ذخیره عناصر پرمصرف محیط کشت MS.....	۳۸
۲-۳-۳	تهیه محلول ذخیره عناصر کم مصرف محیط کشت MS با غلظت ۱۰۰ برابر.....	۳۹
۳-۳-۳	تهیه محلول ذخیره آهن محیط کشت MS با غلظت ۱۰۰ برابر.....	۴۰
۴-۳-۳	تهیه محلول ذخیره ویتامین ها در محیط کشت MS با غلظت ۱۰۰ برابر.....	۴۰
۵-۳-۳	تهیه محلول های ذخیره تنظیم کننده های رشد.....	۴۱
۴-۵-۳-۳	تهیه یک لیتر محیط کشت.....	۴۲
۴-۳	تهیه محلول ذخیره نانوکربن.....	۴۲
۵-۳	سترون کردن وسایل و محیط کشت.....	۴۲
۶-۳	ضد عفونی بذور.....	۴۳
۷-۳	بررسی اثر جوانه زنی در محیط های مختلف در تاریکی و روشنایی.....	۴۳
۱-۷-۳	بررسی جوانه زنی بذرها در محیط کشت WA.....	۴۳
۲-۷-۳	بررسی جوانه زنی بذرها در محیط کشت MS.....	۴۳
۸-۳	صفات اندازه گیری شده در تست جوانه زنی.....	۴۴
۹-۳	بررسی اثر هورمونهای رشد (2,4.D و KIN و BAP) و اثر نانوکربن MWCNTs بر کالوس زایی گیاه کینوا.....	۴۴
۱۰-۳	بررسی تاثیر تنظیم کننده های رشدی سیتوکینینی KIN و BAP به همراه هر یک از اکسینهای IAA، IBA و NAA بر اندام زایی کینوا.....	۴۵
۱۱-۳	تجزیه تحلیل آماری.....	۴۵
	فصل چهارم: نتایج و بحث.....	۴۷

۴۸.....	۱-۴ آزمایش اول: ارزیابی تاثیر روشنایی و نوع محیط کشت بر جوانه‌زنی بذور کینوا.....
۵۰.....	۲-۴ کالوس زایی.....
۵۰.....	۱-۲-۴ آزمایش دوم: بررسی تاثیر هورمونهای رشدی (2,4-D و BAP) و نانوکربن MWCNTs بر کالوس زایی گیاه کینوا.....
۵۱.....	۱-۱-۲-۴ درصد القای کالوس.....
۵۳.....	۲-۱-۲-۴ مساحت کالوس.....
۵۴.....	۳-۱-۲-۴ وزن کالوس.....
۵۶.....	۱-۲-۲-۴ درصد القای کالوس.....
۵۸.....	۲-۲-۲-۴ مساحت کالوس.....
۶۰.....	۳-۲-۲-۴ وزن کالوس.....
۶۲.....	۳-۴ اندام زایی.....
۶۲.....	۱-۳-۴ آزمایش چهارم: بررسی اثرتنظیم کننده های رشد IAA، KIN و BAP بر اندامزایی گیاه کینوا.....
۶۲.....	۱-۱-۳-۴ شاخه زایی.....
۶۴.....	۲-۱-۳-۴ تعداد شاخه.....
۶۵.....	۳-۱-۳-۴ طول شاخه.....
۶۶.....	۴-۱-۳-۴ تعداد ریشه.....
۶۷.....	۵-۱-۳-۴ طول ریشه.....
۶۹.....	۲-۳-۴ آزمایش پنجم: بررسی اثرتنظیم کننده های رشد IBA، KIN و BAP بر اندامزایی گیاه کینوا.....
۶۹.....	۱-۲-۳-۴ شاخه زایی.....
۷۱.....	۲-۲-۳-۴ تعداد شاخه.....
۷۲.....	۳-۲-۳-۴ طول شاخه.....
۷۳.....	۴-۳-۲-۴ تعداد ریشه.....
۷۵.....	۵-۲-۳-۴ طول ریشه.....
۷۷.....	۳-۳-۴ آزمایش ششم: بررسی اثرتنظیم کننده های رشد NAA، KIN و BAP بر اندامزایی گیاه کینوا.....
۷۷.....	۱-۳-۳-۴ شاخه زایی.....
۷۹.....	۲-۳-۳-۴ تعداد شاخه.....
۸۰.....	۳-۳-۳-۴ طول شاخه.....

۸۱	 ۴-۳-۳-۴ تعداد ریشه
۸۲	 ۴-۳-۳-۵ طول ریشه
۸۵	 نتیجه گیری کلی
۸۷	 ۴-۵ پیشنهادات
۸۹	 پیوست ها
۹۱	 منابع

فهرست جداول

جدول ۱-۳	غلظت نمک‌های پر مصرف محیط کشت پایه MS (mg/l).....	۳۹
جدول ۲-۳	غلظت نمک‌های کم مصرف محیط کشت پایه MS (mg/l).....	۳۹
جدول ۳-۳	غلظت آهن محیط کشت پایه MS (mg/l).....	۴۰
جدول ۴-۳	غلظت ویتامین‌های محیط کشت پایه MS (mg/l).....	۴۰
جدول ۱-۴	نتایج تجزیه واریانس صفات مرتبط با جوانه‌زنی بذور کینوا تحت سطوح مختلف روشنایی و نوع محیط کشت.....	۴۸
جدول ۲-۴	نتایج تجزیه واریانس صفات مرتبط با کالوس زایی گیاه کینوا از ریز نمونه‌ی هیپوکوتیل تحت سطوح مختلف.....	۵۰
جدول ۳-۴	نتایج تجزیه واریانس صفات مرتبط با کالوس زایی گیاه کینوا از ریز نمونه‌ی هیپوکوتیل تحت سطوح مختلف تیمار هورمونهای 2,4-D و KIN در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نانوکربن.....	۵۶
جدول ۴-۴	نتایج تجزیه واریانس صفات شاخه‌زایی و ریشه زایی گیاه کینوا در شرایط کشت بافت تحت تاثیر هورمونهای.....	۶۲
جدول ۵-۴	نتایج تجزیه واریانس صفات شاخه‌زایی و ریشه زایی گیاه کینوا در شرایط کشت بافت تحت تاثیر هورمونهای.....	۶۹
جدول ۶-۴	نتایج تجزیه واریانس صفات شاخه‌زایی و ریشه زایی گیاه کینوا در شرایط کشت بافت تحت تاثیر هورمونهای NAA، KIN و BAP.....	۷۸

فهرست اشکال

- شکل ۴-۱ مقایسه میانگین سرعت جوانه‌زنی بذور کینوا در شرایط روشنایی و تاریکی..... ۴۹
- شکل ۴-۲ مقایسه میانگین سرعت جوانه‌زنی بذور کینوا کشت شده در محیط‌های مختلف..... ۴۹
- شکل ۴-۳ مقایسه میانگین میزان القای کالوس در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوکربن، BAP و 2,4-D..... ۵۱
- شکل ۴-۴ مقایسه میانگین میزان القای کالوس در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوکربن و 2,4-D در شرایط کاربرد سیتوکینین BAP..... ۵۲
- شکل ۴-۵ مقایسه میانگین مساحت کالوس‌های رشدیافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوکربن و 2,4-D در شرایط کاربرد سیتوکینین BAP..... ۵۳
- شکل ۴-۶ مقایسه میانگین مساحت کالوس‌های رشدیافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوکربن، 2,4-D و BAP..... ۵۴
- شکل ۴-۷ مقایسه میانگین وزن کالوس‌های رشدیافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوکربن، 2,4-D و BAP..... ۵۵
- شکل ۴-۸ مقایسه میانگین میزان القای کالوس در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوکربن و 2,4-D در شرایط کاربرد سیتوکینین KIN..... ۵۷
- شکل ۴-۹ مقایسه میانگین میزان القای کالوس در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوکربن، KIN و 2,4-D..... ۵۸
- شکل ۴-۱۰ مقایسه میانگین مساحت کالوس‌های رشدیافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوکربن و 2,4-D در شرایط کاربرد سیتوکینین KIN..... ۵۹
- شکل ۴-۱۱ مقایسه میانگین مساحت کالوس‌های رشدیافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوکربن، 2,4-D و KIN..... ۵۹
- شکل ۴-۱۲ مقایسه میانگین وزن کالوس‌های رشدیافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوکربن، 2,4-D و KIN..... ۶۱
- شکل ۴-۱۳ مقایسه میانگین میزان شاخه‌زایی در کالوس‌های رشدیافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف BAP، KIN و IAA..... ۶۳
- شکل ۴-۱۴ مقایسه میانگین تعداد شاخه‌های تولید شده از کالوس‌های رشدیافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف BAP، KIN و IAA..... ۶۴

- شکل ۴-۱۵ مقایسه میانگین طول شاخه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف BAP، KIN و IAA ۶۵
- شکل ۴-۱۶ مقایسه میانگین تعداد ریشه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف BAP و KIN ۶۶
- شکل ۴-۱۷ مقایسه میانگین تعداد ریشه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف KIN و IAA ۶۷
- شکل ۴-۱۹ مقایسه میانگین میزان شاخه زایی در کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف BAP و KIN ۷۰
- شکل ۴-۲۰ مقایسه میانگین میزان شاخه زایی در کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف IBA و KIN ۷۱
- شکل ۴-۲۱ مقایسه میانگین تعداد شاخه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف IBA، KIN و BAP ۷۲
- شکل ۴-۲۲ مقایسه میانگین طول شاخه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف IBA، KIN و BAP ۷۳
- شکل ۴-۲۳ مقایسه میانگین تعداد ریشه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف IBA، KIN و BAP ۷۴
- شکل ۴-۲۴ مقایسه میانگین طول ریشه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف KIN و BAP ۷۶
- شکل ۴-۲۵ مقایسه میانگین طول ریشه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف KIN و IBA ۷۶
- شکل ۴-۲۶ مقایسه میانگین طول ریشه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف BAP و IBA ۷۷
- شکل ۴-۲۷ مقایسه میانگین میزان شاخه زایی در کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار ۷۸
- شکل ۴-۲۸ مقایسه میانگین تعداد شاخه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف BAP، KIN و NAA ۸۰
- شکل ۴-۲۹ مقایسه میانگین طول شاخه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف BAP، KIN و NAA ۸۱
- شکل ۴-۳۰ مقایسه میانگین تعداد ریشه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف BAP، KIN و NAA ۸۲

شکل ۴-۳۱ مقایسه میانگین طول ریشه های رشد یافته از کالوس های حاصل از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف BAP و KIN ۸۳

شکل ۴-۳۲ مقایسه میانگین طول ریشه های رشد یافته از کالوس های حاصل از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف NAA و KIN ۸۳

شکل ۴-۳۳ مقایسه میانگین طول ریشه های رشد یافته از کالوس های حاصل از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف NAA و BAP ۸۴

فصل ۱: مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه

گیاهان به دو روش، جنسی^۱ و یا غیر جنسی^۲ تکثیر می‌شوند. تولید و تکثیر نقش مهمی در ادامه حیات آن‌ها دارد و در طبیعت در اکثر موارد، گیاهان از طریق بذر به ادامه نسل می‌پردازند. تکثیر جنسی با نصف شدن و کاهش کروموزومی گامت‌های نر و ماده، آغاز می‌شود و بعد از لقاح تعداد کروموزوم‌ها به تعداد اولیه افزایش می‌یابد و با به وجود آمدن ژنوتیپ‌های جدید همراه است. در تولید مثل غیر جنسی، تقسیم سلول بدون کاهش کروموزومی صورت می‌گیرد، در نتیجه گیاهان تولید شده حاوی اطلاعات ژنتیکی پایه مادری هستند (فرید مرادی نژاد، ۱۳۹۷). تکثیر رویشی یا غیرجنسی به دو نوع طبیعی و مصنوعی است. تکثیر غیرجنسی به روش طبیعی مثل، قلمه زدن، خوابانیدن شاخه، پیوند زدن می‌باشد که هر کدام از این روش‌ها ارزان و ساده است. روش تکثیر رویشی مصنوعی شامل تولید گیاه با استفاده از قسمت‌های بسیار ریز گیاه نظیر بافت‌ها و یاخته‌ها در شرایط استریل شده و در محیط کشت مصنوعی و کنترل شده با استفاده از سیستم درون شیشه‌ای (کشت بافت) می‌باشد (فرید مرادی نژاد، ۱۳۹۷). در روش تکثیر مصنوعی، بنیه قوی گیاهی نشانه مهمی از کیفیت است که تعیین کننده توانایی گیاهان برای سازگاری در شرایط مزرعه است، درچنین سازکارهایی که با هزینه همراه هستند باید گیاهان نیمه سازگاری را در محیط کشت‌ها تولید کنند. چنین گیاهانی، سیستم ریشه‌ای گسترده و پایداری تولید می‌کنند که سازگاری آن‌ها به شرایط مزرعه را در زمان اندکی تامین می‌کند (کلودیا و همکاران، ۲۰۱۸).

در سال‌های اخیر، تقاضا برای جایگزینی گیاهان جدید با محتوای پروتئینی بالا و ارزش غذایی بیشتر افزایش یافته است. یکی از گیاهان مورد توجه به لحاظ ارزش غذایی و زراعی، گیاه کینوا^۳ است. به دلیل مقاومت در برابر شرایط شدید محیطی و خصوصیات غذایی و عملکردی آن به عنوان "یکی از دانه‌های مهم قرن بیست و یکم" معرفی شده است. علاوه بر دارا بودن مقدار زیادی پروتئین، لیپیدها، فیبرها،

¹ Sexual

² Asexual

³ Quinoa

ویتامین‌ها و مواد معدنی و تعادل عالی اسیدهای آمینه ضروری کینوا حاوی مقادیر زیادی متابولیت‌های ثانویه شامل ساپونین‌ها، فیتواسترول‌ها، فیتودیستروئیدها، ترکیبات فنولیک، پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌های فعال و پپتیدها است (گوردیلوباستیداس و همکاران، ۲۰۱۶). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که اثرات مفید این ترکیبات بر سلامت متابولیک، قلبی و عروقی و دستگاه گوارش باعث شده است که کینوا به عنوان دانه‌ای کاربردی و مغذی شناخته شود (هنارژوس اسکودرو و همکاران، ۲۰۱۸).

تکثیر گیاه کینوا در شرایط طبیعی به وسیله بذر تولیدشده به روش دگرباروری می‌باشد وجود نر عقیمی در بذرهای این گیاه، همچنین وجود بیماری‌های ویروسی و قارچی بذرزاد، و نیز بیماری سفیدک از جمله موانع تکثیر طبیعی این گیاه می‌باشد (بازل و همکاران، ۲۰۱۳؛ ایزا و همکاران، ۲۰۰۵). ایران با برخورداری از تنوع اقلیمی و با توجه به شرایط آب و هوایی نیمه خشک و وجود زمین‌های بایر و شوره-زارهای فراوان کاندیدای مناسب جهت توسعه‌ی کشت گونه‌های مختلف کینوا می‌باشد. خصوصیات مختلفی نظیر دوره کشت کوتاه، حداقل مصرف آب و به‌خصوص دارا بودن ترکیبات غنی غذایی می‌تواند مورد توجه کشاورزان ما واقع گردد. با وجود استعدادهای طبیعی، سهم ایران در تولید و تجارت این گیاه بسیار اندک است. از طرفی یکی از مهمترین مشکلات در توسعه‌ی کشت این گیاه، وجود بیماری‌های ویروسی است (حسامی و همکاران ۲۰۱۶). کشت بافت این گیاه را می‌توان با هدف حفظ خلوص ژنتیکی ارقام اصلاح شده و دارای کمیت و کیفیت پروتئین متمایز یا مقاوم به استرس‌ها و نیز ریزازدیادی گونه-های نر عقیم بکار برد. همچنین، این رویکرد را می‌توان برای پژوهش‌های آینده با تمرکز بر افزایش خواص درمانی و کاهش برخی آکالوئیدهای نامطلوب نیز مورد استفاده قرار داد، با توجه به اهمیت تولید گیاه کینوا مطالعه‌ی حاضر بر روی بهینه‌سازی اندام‌زایی غیر مستقیم در گیاه کینوا با استفاده از ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل تمرکز کرده است.

۱-۲ کینوا (*Chenopodium quinoa willd*)

کینوا^۱، این گیاه یکی از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی است که به "مادر دانه‌ها" معروف است، بومی آمریکای جنوبی (کشورهای بولیوی، پرو، شیلی و کلمبیا) بوده که سابقه کشت طولانی (۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ سال پیش) در آن مناطق دارد (ریاز و همکاران، ۲۰۱۹؛ ایزا و همکاران، ۲۰۰۵). به اعتقاد صاحب نظران حوزه کشاورزی، کینوا در مواجهه با چالش افزایش تولید مواد غذایی با کیفیت بالا برای تغذیه‌ی جمعیت در حال رشد، یک جایگزین عالی برای اطمینان از امنیت غذایی در محیط‌های حاشیه‌ای در منطقه خاورمیانه، شمال آفریقا و همچنین سایر مناطق جهان است. کشورهای نظیر مراکش و امارات متحده عربی، پیشرفت‌های قابل توجهی در زمینه تولید این محصول در سیستم‌های محلی بدست آورده‌اند (شکرالله و همکاران، ۲۰۱۶). با توجه به کیفیت غذایی استثنایی و توانایی رشد تحت محیط‌های حاشیه‌ای، سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد^۲ و سال ۲۰۱۳ را به عنوان "سال کینوا" نامگذاری کرده‌است (بازل و همکاران، ۲۰۱۵). براساس تحقیقات انجام شده، این گیاه تحمل بالایی در برابر استرس‌های شوری و خشکی داشته و در طیفی از خاک‌های اسیدی تا قلیایی، در شرایط اقلیمی سرد (۵- درجه) تا گرم (بالای ۳۵ درجه) رشد می‌کند (جاکوبسن و همکاران، ۲۰۰۳). دانه این گیاه از کمیت (۱۴/۵ درصد) و کیفیت روغن بالاتری نسبت به ذرت برخوردار است. وجود ترکیب پر خاصیت از اسیدهای چرب غیر اشباع نظیر اسیدلینولئیک (۷۰ تا ۸۹/۴ درصد)، اولئیک (۲۴ تا ۲۷/۷ درصد) و آلفالینولئیک (۴ درصد) به همراه حضور توکوفرول‌ها، روغن این گیاه را در ردیف روغن‌های مناسب برای

^۱ *Chenopodium quinoa willd*

^۲ *Amaranthaceae*

^۳ Food and Agriculture Organization

پخت و پز قرار داده است. دانه‌ی کینوا از کمیت (۷/۵ تا ۲۲/۱ درصد) و کیفیت پروتئین ممتازی نیز برخوردار است. به ویژه اینکه پروتئین این گیاه مشابه ترکیب پروتئینی شیر و غنی از اسیدهای آمینه‌ی هیستیدین (۳/۲ درصد) و لیزین (۶/۱ درصد) است که در اغلب پروتئین‌های گیاهی کمبود آن‌ها گزارش شده است (لوتز و همکاران، ۲۰۱۷). برگ‌های این گیاه نیز حاوی پروتئین بوده و میزان پروتئین بالاتری نسبت به دانه دارند. علاوه بر این، کینوا مقادیر قابل قبولی از کلسیم، آهن، مس، منیزیم و پتاسیم و نیز ویتامین‌هایی نظیر اسیدفولیک، تیامین، ویتامین C، A و E را نیز دارا می‌باشد (باستیداس و همکاران، ۲۰۱۶). لوتز و همکاران، ۲۰۱۷). کینوا دارای رنگ‌های متنوعی است و این بخاطر وجود گروهی از پروتئین‌ها بنام آمین (رنگیزه ای گیاهی نیتروژن دار) می‌باشد. دانه‌های این گیاه پتانسیل زیست فعالی بالایی در جذب نور و جمع آوری رادیکال آزاد، دارند و فعالیت شیمیایی ضد سرطانی قوی دارند، همچنین دانه‌های کینوا دارای بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (هنارژوس اسکودرو و همکاران، ۲۰۱۸).

۱-۲-۱ کینوا و بهینه سازی کشت بافت

بهینه‌سازی پروتکل‌های کشت بافت می‌تواند کمک موثری به تولید گیاهان و تولید بذور عاری از ویروس کند. علاوه بر این، چون کینوا از گونه‌های با درجاتی از دگرباروری است، کشت بافت این گیاه را می‌توان با هدف حفظ خلوص ژنتیکی ارقام اصلاح شده و دارای کمیت و کیفیت پروتئین متمایز یا مقاوم به استرس‌ها و نیز ریز ازدیادی گونه‌های نر عقیمی بکار برد. همچنین این رویکرد را می‌توان برای پژوهش‌های آینده با تمرکز بر افزایش خواص درمانی و کاهش برخی آلکالوئیدهای نامطلوب نیز مورد استفاده قرارداد (حسامی و همکاران، ۲۰۱۶). بررسی‌ها اهمیت تولید و بهینه‌سازی کشت گیاه کینوا را به خاطر خواص این گیاه نشان داده است (هبا شاهین، ۲۰۱۹). عامل محدود کننده عمده برای کشت کینوا به عنوان یک محصول دانه‌ای در مقیاس بزرگ، بیماری‌های ویروسی، به ویژه بیماری‌های منتقله از طریق دانه هستند. بنابراین، پروتکل جنین‌زایی سوماتیک ابزاری ضروری برای

تولید گیاهان عاری از ویروس است (ایزا و همکاران، ۲۰۰۵). با توجه به تحقیقات صورت گرفته روش اصلاح ژنتیکی بر روی این گیاه به منظور تولید گونه‌های متنوع پاسخ مناسب نداده اما روش کشت بافت برای تولید گونه‌های اصلاح شده با هدف حفظ خلوص ژنتیکی بهتر عمل کرده است. در کینوا، بیماری سفیدک داخلی توسط پرونوسپورا واریابیلس ایجاد می‌شود و مکانیسم‌های مقاومت در برابر این بیماری هنوز درک نشده‌اند (باقری و همکاران، ۱۳۹۷). در حالی که به طور کلی تصور می‌شود که گونه‌های کینوا تلخ با مقدار ساپونین بالا، کم‌تر مستعد حمله میکروبی هستند، به نظر نمی‌رسد که ارتباطی بین تحمل به سفیدک داخلی و مقدار ساپونین در گونه‌های خاص کینوا وجود داشته باشد (هبا شاهین، ۲۰۱۹). در کشور ما علی‌رغم اینکه شرایط رشد کینوا فراهم است، با این حال تولید آن هنوز به مرحله تجاری نرسیده است و پروژه‌های تحقیقاتی این گیاه در ابتدای راه قرار دارد، کارهای اصلاحی این گیاه در آمریکای جنوبی با اهداف مختلفی از جمله تولید ارقام پرمعطر و بدون ساپونین (عامل ایجاد طعم تلخ پوسته رویی بذور کینوا) آغاز شده است، با این حال، مشکل حفظ خلوص ژنتیکی واریته‌های جدید اصلاحی وجود دارد که با روش‌های سنتی انجام نمی‌شود، بنابراین تکثیر درون شیشه‌ای این گیاه می‌تواند راهکار مناسبی برای تحقق این مهم باشد، ایران با برخورداری از تنوع اقلیمی و با توجه به شرایط آب و هوایی نیمه خشک و وجود زمین‌های بایر و شوره‌زارهای فراوان کاندیدای مناسب جهت توسعه کشت گونه‌های مختلف کینوا می‌باشد، خصوصیات مختلفی نظیر دوره کشت کوتاه، حداقل مصرف آب و به خصوص دارا بودن ترکیبات غنی غذایی می‌تواند مورد توجه کشاورزان ما واقع گردد، با وجود استعدادهای طبیعی، سهم ایران در تولید و تجارت این گیاه بسیار اندک است.

۱-۲-۲ کینوا در ایران

ژنوتیپ‌های مختلفی از کینوا در حال حاضر در ایران وجود دارد که از نظر رنگ و میزان ساپونین حتی

ریشه‌دهی با یکدیگر متفاوت هستند، ژنوتیپ‌های زراعی موجود در کشور با توجه به منطقه و زمان کشت، طول دوره رشدی حدود ۸۰ تا ۱۷۰ روز را دارا می‌باشند. این ژنوتیپ‌ها شامل، Sajama, RedCarina, Titicaca, Giza1, Q26, Q29، بوده و در گروه ارقام با طول دوره رشد کوتاه می‌باشد. رقم ساجاما در شهرکرد در کشت خرداد ماه با طول دوره ۱۰۳ روزه بهترین پاسخ را داده است و این در حالی است که رقم ساجاما و تی تی کاکا و Q26, Q29 در کشت دی ماه در ایرانشهر بیشترین طول دوره رشد حدود ۱۶۹ روز بالاترین عملکرد را تجربه کردند (باقری و همکاران، ۱۳۹۷). دانه کینوا به رنگ‌های تیره سیاه، قرمز و تا روشن نظیر سفید شیری می‌باشد که هرکدام از لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی و تغذیه‌ای با یکدیگر متفاوت اند، ارقام‌های کینوا شیری رنگ دارای ریشه‌هایی قوی، عمیق و منشعب بوده که می‌تواند به خوبی در خاک توسعه یابند. پوسته‌ی دانه حاوی ساپونین بوده که مقدار آن در ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت است (۰/۲۰ تا ۰/۷۳ درصد). در برخی ژنوتیپ‌ها مانند ساجاما یا سانتاماریا با میزان ساپونین کمتر از یک میلی‌گرم در هر گرم، جزو ژنوتیپ‌های شیرین محسوب شده و برخی دیگر از ژنوتیپ‌ها مانند تی تی کاکا با میزان ساپونین حدود ۴ میلی‌گرم در گرم جزو ژنوتیپ‌های نسبتاً تلخ و ژنوتیپ Q31 با میزان ساپونین بیش از ۶ میلی‌گرم در گرم جزو ژنوتیپ‌های کاملاً تلخ محسوب می‌شوند (باقری و همکاران، ۱۳۹۷).

۱-۳ گیاهشناسی کینوا

کینوا با نام علمی (*Chenopodium quinoa willd*)، از خانواده، *Amaranthaceae*، رویشگاه آن منطقه آند است (ایزا و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین این گیاه در سراسر جهان ۲۵۰ گونه مختلف دارد (لوتز و همکاران، ۲۰۱۷). کینوا گیاهی دانه‌ای یکساله و دولپه، دارای برگ متناوب و شبیه اسفناج می‌باشد با ساقه راست که طول ارتفاع آن به دو متر هم می‌رسد و دارای گل خوشه‌ای که گل‌آذین در خوشه به طول ۱۵ تا ۷۰ سانتی متر اندازه‌گیری شده است، رنگ گل‌های آن از سفید تا قرمز متغیر است (لوتز و همکاران، ۲۰۱۷). این گیاه دارای سیستم ریشه‌ای قوی بوده و نسبت به خشکی مقاوم است (بازل و همکاران، ۲۰۱۳). گیاه کینوا بذره‌ای کوچک و رنگ‌های متنوعی از سفید تا تیره دارند. دانه‌های کینوا

گرد با متوسط قطر ۱.۴ تا ۱.۶ میلی متر هستند قسمت‌های بیرونی آن‌ها با یک غلاف پریکارپ و یک پوسته دانه شکل می‌گیرد (ریاز و همکاران، ۲۰۱۹).

۱-۳-۱ مشکلات کشت کینوا

بیماری ویروسی و نوعی کپک در بذره‌های این گیاه و همچنین بیماری سفیدک از جمله موانع تکثیر طبیعی این گیاه می‌باشد. کپک داونی یکی از علل اصلی کاهش تولید کینوا، با کاهش بیش از ۹۹ درصد در عملکرد گزارش شده برای ارقام حساس است (هبا شاهین، ۲۰۱۹). در کینوا بیماری سفیدک داخلی توسط عامل پرونوسپورا واریابیلیس ایجاد می‌شود و مکانیسم‌های مقاومت در برابر این بیماری هنوز درک نشده‌اند (بازل و همکاران، ۲۰۱۳). در حالی که به طور کلی تصور می‌شود که گونه‌های کینوا تلخ با مقدار ساپونین بالا، کمتر مستعد حمله میکروبی هستند، به نظر نمی‌رسد که ارتباطی بین تحمل به سفیدک داخلی و مقدار ساپونین در گونه‌های خاص کینوا وجود داشته باشد (بازل و همکاران، ۲۰۱۳). همچنین یکی از مهمترین مشکلات در توسعه کشت این گیاه، وجود بیماری‌های ویروسی است (حسامی و همکاران، ۲۰۱۶).

۱-۴ کشت بافت

کشت بافت گیاهی به عنوان بستری برای بیوتکنولوژی گیاهی عمل می‌کند و از این رو در پیشرفت فعلی این حوزه مهم تحقیقاتی از اهمیت بسیاری برخوردار است. این امر به ویژه برای تکثیر و حفاظت از گیاهانی که از نظر رویشی تکثیر می‌شوند یا بذره‌های غیرقابل انعطاف دارند، مفید است (خان و همکاران، ۲۰۱۷). موفقیت در فناوری و کاربرد روش این ویترو بیشتر به دلیل درک بهتر نیازهای غذایی سلول‌های کشت شده است (القدامی و همکاران، ۲۰۲۰). سابقه کشت بافت حدوداً به یک قرن پیش باز می‌گردد و اساس کشت بافت به تئوری سلول شیلدن و شوان مربوط می‌شود، بر اساس این تئوری، هر سلول از موجود زنده اگر در شرایط مطلوب قرار گیرد، به یک گیاه کامل تکامل می‌یابد، این خاصیت

توتی پتنسی (باززایی) نامیده می‌شود (باقری و همکاران، ۱۳۷۶). باززایی به معنای توانایی یک سلول جهت ایجاد بافت‌های مختلف و در نهایت ایجاد یک گیاه کامل تحت شرایط کشت مناسب است (باقری و همکاران، ۱۳۷۶). اصطلاح کشت بافت یا کشت درون شیشه‌ای به کشت قطعه‌ای از بافت گیاه در شرایط آزمایشگاهی و کاملاً استریل گفته می‌شود که در نهایت از این قطعه، یک گیاه کامل به دست می‌آید (کوماری و همکاران، ۲۰۱۹). کشت بافت گیاه را می‌توان به عنوان فرآیندی توصیف کرد که در آن ریز نمونه‌ی (بخش‌های بسیار کوچک گیاهان، مانند نوک ساقه، نوک ریشه، کالوس، دانه، جنین، دانه‌گرده، تخمک و یا حتی یک سلول) جدا شده از ارگانیسم (گیاه مادری)، در محیط مغذی تحت شرایط استریل و کنترل شده رشد می‌کند (باقری و همکاران، ۱۳۷۶). ریز ازدیادی درون شیشه‌ای، یک روش مؤثر برای تکثیر گونه‌هایی است که نیاز به یکنواختی زیاد در نتاج دارند. بنابراین علاقه به استفاده از این تکنیک‌ها برای تکثیر سریع گیاهان دارویی و مغذی در مقیاس بزرگ به طور قابل توجهی افزایش یافته است (کلودیا و همکاران، ۲۰۱۸). روش‌های بیوتکنولوژی نه تنها امکان تولید سریعتر و محافظت از ژنوتیپ‌های گیاهی را ارائه می‌کند، بلکه برای تغییر و تبدیل اطلاعات ژنی آن‌ها، تنظیم و بیان ژن برای تولید مواد گیاهی با ارزش در مقادیر زیاد و یا با خواص بهتر، راهکارهایی را پیشنهاد می‌دهد (تاشیوا و همکاران، ۲۰۱۱). کوماری و همکاران، ۲۰۱۹. در حال حاضر تکثیر گیاهان به روش این ویترو، به رغم وجود برخی مشکلات، به علت رشد و تکثیر سریع، تولید خارج از فصل، تولید گیاهان عاری از بیماری، نگهداری ژرم پلاسماها و آسان کردن مبادلات بین المللی به عنوان یک صنعت پر رونق در مقیاس کوچک و بزرگ محسوب می‌شود (کوماری و همکاران، ۲۰۱۹). باززایی و تولید گیاهان توسط کشت بافت را می‌توان به یکی از دو روش زیر انجام داد: یک- جنین‌زایی سوماتیک، در اینجا اولین اصل قطبی شدن سلول گیاهی است به این صورت که تمام واکوئل‌ها در یک قطب و تمامی میتوکندری‌ها در قطب مقابل آن قرار می‌گیرند از قطب بالایی که محل تجمع واکوئل‌هاست شاخه و از قطب پایینی ریشه به وجود می‌آید. جنین‌زایی می‌تواند مستقیم یا غیرمستقیم باشد. در نوع مستقیم، بدون تشکیل کالوس جنین‌زایی صورت می‌گیرد و در نوع غیر مستقیم، با تشکیل کالوس رویان‌زایی صورت می‌گیرد. دو-

اندام‌زایی، در این روش گیاه بدون جنین‌زایی به اندام‌زایی می‌رود و باید دانست در کشت بافت اگر اندامی نظیر ریشه یا شاخه به وجود آمد، این اندام نابجاست چون از مریستم به وجود نیامده است (باقری و همکاران، ۱۳۷۶). باززایی گیاهان دارویی از طریق اندام‌زایی غیرمستقیم با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف، می‌تواند کشت و زراعت گیاهان دارویی را ترفیع دهد و نیز از نظر حفاظت درون شیشه‌ای، ناتوانی ذخیره بذر در بانک ژن به دلیل کاهش جوانه‌زنی بذر را جبران کند، همچنین چرخه اصلاحی گیاهانی را که رشد کند دارند، تسریع کرده و تولید ژرم پلاسماهای عاری از پاتوژن را افزایش دهد (کوماری و همکاران، ۲۰۱۹).

۱-۵ مراحل کشت بافت گیاه از طریق کالوس

ابتدا هورمون‌ها که به سلول‌ها کمک می‌کنند به سرعت تقسیم شوند و سلول‌های متعددی تولید کنند که توده جرمی به نام "کالوس" را تشکیل می‌دهند و سپس کالوس به محیط ریشه‌زایی حاوی هورمون‌های گیاهی مناسب منتقل می‌شود که کالوس را برای تولید ریشه تحریک می‌کند وقتی ریشه‌ها رشد کردند، به محیط شاخه‌زایی حاوی هورمون‌های مختلف منتقل می‌شود که رشد و نمو شاخه‌ها را تحریک می‌کنند، در نهایت کالوسی که شاخه و ریشه دارد گیاهچه‌های کوچک را تشکیل می‌دهد و به این ترتیب، تعداد زیادی گیاهچه کوچک تنها از چند سلول یا بافت گیاهی اصلی تولید می‌شوند سپس این گیاهچه‌های تولید شده به محیط حاوی (کوکومیت یا پیت ماس)، منتقل می‌شوند که در آنجا می‌توانند رشد کنند تا گیاهان بالغ را تشکیل دهند، و از آنجا به مزرعه این مرحله سازگار شدن نامیده می‌شود (کوماری و همکاران، ۲۰۱۹).

۱-۶ اهمیت و کاربرد کشت بافت

- تولید گیاهان عاری از پاتوژن (ویروس) که معمولاً بوسیله کشت مریستم می‌باشد.
- تهیه پروتکل‌های مناسب جهت استفاده در مطالعات گیاه‌شناسی و همچنین برای تکثیر و ریزازدیادی گیاهان از طریق تکنیک‌های کشت بافت.

- تولید گیاهان هاپلوئید و همچنین دیپلوئید کاملاً هموزیگوس از طریق کشت میکروسپور یا بساک
- دست ورزی ژنتیکی و دورگ گیری سوماتیکی با استفاده از الحاق پروتوپلاسمی و همچنین ایجاد تلاقی بین گونه ای در شرایط این ویترو.
- کشت دانه گرده و استفاده از سایر روش ها به منظور تولید گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئید در جهت دستیابی به اهداف اصلاحی آنها.
- بررسی پدیده تنوع سوماکلونی و بهره گیری از آن جهت ایجاد واریته های مطلوب با تکنیک های کشت بافتی.
- القای کالوس و بهینه سازی کشت های سوسپانسیون سلولی برای تولید متابولیت های ثانویه.
- تولید گیاهان هیبرید به منظور تکثیر ارقام همگن و پرمحصول از طریق کشت بافت.
- کاهش نهفتگی و همچنین نجات جنین با استفاده از کشت جنین های نارس در تلاقی بین گونه ای.
- حفاظت از ژرم پلاسما به منظور حفظ گونه های انحصاری و در خطر انقراض در شرایط درون شیشه ای (کوماری و همکاران، ۲۰۱۹؛ کلودیا و همکاران، ۲۰۱۸).

۷-۱ انواع کشت

- کشت بذر
- کشت کالوس
- کشت اندام (برگ، ریشه ، ساقه ، مریستم و دانه گرده)

۱-۷-۱ نوع محیط کشت

در شرایط آزمایشگاهی به اولین چیزی که نیاز داریم یک بستر مناسب برای رشد گیاه می‌باشد، به این بستر اصطلاحاً محیط کشت می‌گویند (باقری و همکاران، ۱۳۷۶).

تأثیر محیط از کل فعل و انفعالات عناصر مختلف تشکیل دهنده آن حاصل می‌شود برخی از آن‌ها فرآورده‌های رشد در شرایط آزمایشگاهی را تحریک می‌کنند، در حالی که برخی دیگر تأثیر کمتری بر رشد دارند (تلاحیگو و همکاران، ۲۰۱۷).

اگرچه مواد مغذی ماکرو و میکروی محیط کشت در شرایط آزمایشگاهی ممکن است از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت باشد، اما برای باززایی موفق گیاه، غلظت تنظیم کننده‌های رشد (هر دو اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها)، ژنوتیپ، نوع ریزنمونه حائز اهمیت است (احمد و همکاران، ۱۹۹۹). بهترین محیط برای جوانه‌زنی بذور، محیط پایه MS می‌باشد (اتیلا فخر، ۲۰۱۹). دلیل مطلوب بودن محیط پایه MS برای جوانه‌زنی بذور کینوا نسبت به سایر محیط‌ها، را می‌توان تأثیر تنوع عناصر معدنی سازنده آن مرتبط دانست. این تفاوت اساساً به دلیل محتوای نیتروژن و پتاسیم است با در نظر گرفتن تمایل نیتروفیلی بیشتر کینوا، وجود نیترات کافی در محیط MS باعث رشد سلولی ریزنمونه‌های کینوا می‌شود (تلاحیگو و همکاران، ۲۰۱۷). در مقابل، محیط‌های KNOP و WHITE از نظر نیترات پتاسیم ضعیف هستند و همین کاهش نیتروژن در محیط کشت کینوا سطح بسیار پایین کلوزن‌زایی را نشان داد (تلاحیگو و همکاران، ۲۰۱۷). در مقایسه محیط کشت MS با محیط کشت ARM، اگر بخش معدنی این دو محیط کشت را با هم مقایسه کنیم در ARM میزان NH_4NO_3 و KNO_3 تقریباً تا ۱/۴ نسبت به محیط کشت MS کاهش یافته است و برخلاف کینوا، در تمشک قرمز این کاهش نیترات در محیط نتیجه مطلوبی داشت و باعث افزایش شاخه‌زایی تمشک قرمز شد (ایزا و همکاران، ۲۰۰۵). مقایسه دو محیط کشت MS پایه با محیط کشت MS ۱/۲ در گیاه تنباکو، برتری محیط MS ۱/۲ نسبت به محیط MS در تنباکو را نشان

داد. در محیط MS $\frac{1}{2}$ با کاهش سطح نمک و کاهش سطح نیتروژن نسبت به محیط MS مواجهه هستیم است، که باعث افزایش نسبت کربوهیدرات به نیتروژن در محیط و افزایش تشکیل ریشه در تنباکو شده بود (القدامی و همکاران، ۲۰۲۰). غلظت بالای عناصر محیط کشت MS و میزان زیاد و ممکن است برای بعضی گونه ها ایجاد سوزندگی و سمیت نماید (القدامی و همکاران، ۲۰۲۰).

۸-۱ سن و نوع ریز نمونه

سن بوته‌هایی که از آن‌ها برای گزینش ریزنمونه در گیاه کینوا و به منظور تولید کالوس استفاده می‌شود، معمولاً در دامنه‌ای ۱۰ تا ۱۵ روز قرار دارد. القای و رشد کالوس کینوا به عوامل مختلفی از جمله محیط کشت و ماهیت هورمون‌های رشد و دز آن‌ها بستگی دارد (تلاحیگو و همکاران، ۲۰۱۷). بافت‌های جوان‌تر از نظر فیزیولوژیکی پاسخ بهتری به کشت بافت می‌دهند. همچنین آلودگی کمتری در این بافت‌ها دیده می‌شود (کوماری و همکاران، ۲۰۱۹). بافت و رنگ کالوس نشانه‌ای برای باززایی هستند. اندازه کالوس نیز یک فاکتور مهم در زنده ماندن کالوس است. میزان بقای کالوس‌های کوچک در مقایسه با کالوس‌های بزرگ بیشتر است (بهوجوانی و دانتو، ۲۰۱۳).

۹-۱ مواد و اجزای تشکیل دهنده ی محیط کشت

الف- نمک‌های غیر آلی و مواد معدنی

جهت رشد بافت‌های گیاهی کشت شده، تامین مداوم بعضی از عناصر شیمیایی معدنی در محیط کشت ضروری می‌باشد این عناصر شامل:

- ۱- عناصر پرمصرف یا ماکروالمان‌ها: گوگرد، منیزیم، کلسیم، پتاسیم، فسفر، نیتروژن، کربن، هیدروژن و اکسیژن می‌باشد. نیتروژن که بیشتر از سایر عناصر مورد استفاده می‌باشد به صورت نترات یا یون آمونیوم یا ترکیبی از آن‌ها به محلول غذایی افزوده می‌شود. برای تامین منیزیم و گوگرد از افزودن سولفات منیزیم به محیط کشت استفاده می‌شود. عنصر فسفر را می‌توان بصورت فسفات منوسیک و یا

فسفات منوپتاسیک به محیط کشت اضافه کرد ترکیبات کلروکلسیم و یا نیترات کلسیم تامین کننده کلسیم محیط کشت هستند.

۲- عناصر کم مصرف یا میکروالمانها: کبالت، ید، مولیبدین، مس، بور، روی، منگنز، آهن می باشد. برای تامین منگنز، بصورت ترکیب سولفات منگنز به محیط کشت افزوده می شود و برای تامین روی در محیط کشت ترکیب سولفات روی، استفاده می شود، برای تامین مس نیز بصورت ترکیب سولفات مس به محیط کشت افزوده می شود، برای تامین بور در محیط کشت بصورت ترکیب بوریک اسید و همچنین برای تامین کبالت بصورت ترکیب کلرید کبالت، به محیط کشت استفاده می شود. و برای تامین ید محیط کشت ترکیب، یدیدپتاسیم مناسب است، برای تامین مولیبدین نیز بصورت ترکیب سدیم مولیبدین هیدرات، در محیط کشت استفاده می شود. آهن نیز معمولاً جدا از عناصر ماکرو و میکرو حل و بصورت ترکیب اتیلن دی آمینه تترا استیک اسید^۱، مورد استفاده قرار می گیرد.

نیتروژن: گیاهان برای رشد کافی به مقدار زیادی نیتروژن نیاز دارند. نسبت نیتروژن به کربوهیدرات نقش بسیار مهمی در کنترل بیوسنتز تنظیم کننده های رشد در بافت های تمایز نیافته دارد (تلاحیگو و همکاران، ۲۰۱۷). همچنین نیتروژن در کینوا بخاطر تمایل نیتروفیلی این گیاه به جذب نیتروژن در محیط MS، تفاوت چشمگیری در قطر کالوس های تولید شده داشته است (حسامی و همکاران، ۲۰۱۶).

گوگرد: گوگرد، مانند نیتروژن، از اجزای برخی از اسیدهای آمینه است گوگرد در ساختمان اسیدهای آمینه است و امکان ایجاد پیوندهای دی سولفیدی در پروتئین ها است. گوگرد همچنین یکی از اجزای سازنده پروتوپلاست و آنزیم های گیاهی است.

کلسیم : سلول ها جهت تقسیم و نمو سلولی به کلسیم نیاز دارند این عنصر در ساختار به عنوان عنصری ضروری مورد استفاده قرار می گیرد.

¹ EDTA

روی: این عنصر برای تجزیه پروتئین و فعال سازی آنزیم‌ها در گیاهان مورد نیاز است.

بور: بور باعث انتقال قند به سلول می‌شود همچنین برای تنظیم کننده‌های رشد مهم است و باعث افزایش تقسیم سلولی می‌شود.

منیزیم: منیزیم جزو ترکیبات کلروفیل است.

کلر: گیاهان برای فتوسنتز به کلرید نیاز دارند.

مس: مس اجزای سازنده سیتوکروم‌های گیاهی است و برای فعال سازی آنزیم مورد نیاز است.

منگنز: منگنز در واکنش فوتوسیستم II مورد نیاز است و برای فعالیت آنزیمی مهم است.

مولیبدین: گیاهان برای تثبیت نیتروژن محیط و تبدیل آن به ترکیبات قابل جذب مثل آمونیوم نیاز دارند (ماهلر و همکاران، ۲۰۰۴).

آهن: آهن برای سنتز کلروفیل، فرآیندهای متابولیکی و فعال سازی آنزیم در محیط کشت مورد نیاز است. در محیط کشت KNOP، که کالوس رشد یافته دچار کمبود آهن شده است کالوس به رنگ سبز روشن دیده شد و این بیانگر آن است که آهن محیط کشت در سنتز عناصر ساختاری کلروپلاست‌ها نقش دارد و بنابراین مستقیماً بر سنتز کلروفیل تأثیر می‌گذارد (رادوسویچ و همکاران، ۱۹۸۵).

پتاسیم: پتاسیم نقش‌های زیادی در گیاهان دارد برای انتقال آب و غذا مهم است و باعث بهبود مقاومت گیاه در برابر سرما می‌شود. محیط کشت‌هایی که از نظر نترات پتاسیم ضعیف هستند کلون‌زایی بسیار پایینی را نشان دادند (برحداد و همکاران، ۲۰۰۳). در مقابل محیط کشت‌هایی که از نظر نترات پتاسیم در سطح بسیار بالاتری به عنوان مثال ۲۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر بودند از نظر رشد جوانه‌های جانبی کینوا افزایش داشتند داده بودند (تلاچیگو و همکاران، ۲۰۰۱۷).

ب- ویتامین ها

نقش کاتالیزوری در واکنش‌های آنزیمی به عهده‌ی ویتامین‌ها می‌باشد. مهمترین ویتامین‌ها برای کشت بافت سلول‌های گیاهی شامل تیامین (B_1)، اسیدنیکوتینیک (B_3)، پیریدوکسین (B_6) و میواینوزیتول، اسیدفولیک و ریبوفلاوین (B_2) می‌باشند (باقری و همکاران، ۱۳۷۶).

ج- اسیدهای آمینه

اسیدهای آمینه می‌توانند اهمیت زیادی در ریخت‌زایی داشته باشند. به عنوان مثال اسید آمینه‌ی، گلیسین (Gly) به‌طور معمول در اکثر محیط‌های کشت دیده می‌شود. تیروزین (Thr) در شاخه‌زایی و آرژنین (Arg) در ریشه‌زایی مؤثر هستند (کوماری و همکاران، ۲۰۱۹).

د- کربوهیدرات‌ها (قندها)

سلول‌های کشت شده، معمولاً از نظر فتوسنتزی فعال نیستند. بنابراین به یک منبع کربن نیاز دارند لذا از قندهای مختلفی مانند ساکارز و یا گلوکز در محیط کشت استفاده می‌شود، از سایر کربوهیدرات‌ها مانند فروکتوز و نشاسته نیز می‌توان استفاده نمود. در کشت پروتوپلاست سطوح کمتری از کربوهیدرات‌ها استفاده می‌گردد اما در کشت جنین و بساک به مقدار بیشتری از آن‌ها استفاده می‌شود (کوماری و همکاران، ۲۰۱۹). همچنین قندها تاثیر بسیاری در کالوس‌زایی و رشد ریزنمونه‌ها در محیط کشت دارند. در محیط کشت مرکبات، بیشترین میزان کالوس‌زایی در محیط کشت حاوی ۳۰ گرم بر میلی لیتر ساکارز همراه با سایر ترکیبات هورمونی از ریزنمونه ساقه، ریشه، برگ بیش‌ترین پاسخ را نشان دادند (ژاکوپ و همکاران، ۲۰۱۴).

۱-۱۰ مواد جامدکننده محیط کشت

اغلب کشت بافت‌ها بر روی بستری ثابت صورت می‌گیرد و به‌طور معمول از یک عامل جامدکننده برای این منظور استفاده می‌شود. آگار و ژلرایت از جمله موادی هستند که برای ژله‌ای کردن محیط کشت استفاده می‌شوند. آگار از یک جلبک دریایی استخراج گردیده و پس از خالص‌سازی از انواع بسیار مرغوب آن جهت استفاده در محیط کشت استفاده گردد. ژلرایت یک پلی ساکارید حاصل از تخمیر گونه‌ای از باکتری پزودوموناس با ترکیبی پایدار است، علاوه بر آگار در برخی موارد می‌توان از محیط‌های کشت مایع استفاده نمود و برای ایجاد یک بستر ثابت می‌توان از کاغذ فیلتر، پنبه استریل استفاده نمود (باقری و همکاران، ۱۳۷۶).

۱-۱۱ PH محیط کشت

اسیدیته‌ی محیط کشت معمولاً در حدود ۵/۵ تا ۶ تنظیم می‌شود، pH را باید قبل از اضافه کردن آگار اندازه‌گیری کرد. در pH پایین‌تر از ۵/۵، آگار به طور مناسب ژلاتینی نمی‌شود و در pH بالاتر از ۶، ژل به‌صورت خیلی محکم تشکیل می‌شود که در هر دو صورت جذب مواد غذایی توسط ریز نمونه را به‌شدت دچار اختلال می‌کند. کاهش pH در کشت برخی بافت‌های گیاهی به دلیل تولید اسیدهای آلی می‌باشد، pH محیط کشت تحت تأثیر مواد معدنی، قند، آگار، ذغال فعال و روش نگهداری محیط کشت تغییر می‌یابد (باقری و همکاران، ۱۳۷۶).

۱-۱۲ تنظیم کننده های رشد

هورمون‌ها یا تنظیم کننده رشد گیاهی مواد آلی هستند که گیاهان برای تنظیم رشد به مقدار کم به آن نیازمندند (چن و همکاران، ۲۰۰۸؛ کلودیا و همکاران، ۲۰۱۸). هورمون‌ها را می‌توان به طور طبیعی یا مصنوعی یافت، آن‌ها در تمایز سلول، رشد و تقسیم سلولی نقش دارند. پنج گروه اصلی هورمون‌های گیاهی شامل، اکسین، سیتوکینین‌ها، جیبرلین‌ها، اسید آبسزیک و اتیلن می‌باشند (جورج و

همکاران، ۲۰۰۰). اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها پراستفاده‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در کشت بافت گیاه هستند و نسبت اکسین به سیتوکینین نوع باززایی را تعیین می‌کند (هرمان، ۲۰۰۶). این نسبت معمولاً از نظر حساسیت گیاه به هورمون‌ها با توجه به جنس‌ها و گونه‌ها متفاوت است (رازدان و همکاران، ۲۰۰۵).

۱-۱۲-۱ اکسین‌ها

هورمون‌های این دسته، به طور طبیعی در شاخه‌های در حال رشد، ریشه و ساقه یافت می‌شوند. اکسین‌های طبیعی شامل: ایندول-۳-استیک اسید (IAA)، ایندول بوتیریک اسید (IBA) و نوع مصنوعی آن شامل: دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D)، نفتالین استیک اسید (NAA) می‌باشد. اکسین هورمونی است که هم در از بین رفتن ریشه و هم در تولید ریشه نقش دارد (آمناء و همکاران، ۲۰۰۹). یکی از عملکردهای اکسین تحریک فعالیت میتوزی بافت‌های کامبیال است، خاصیتی که در کشت بافت در شرایط آزمایشگاهی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد (تلاحیگو و همکاران، ۲۰۱۷). این هورمون عمدتاً در تقویت رشد ریشه گیاه و ریشه فرعی در کشت بافت استفاده می‌شود، ضمن اینکه رشد جوانه‌های جانبی را مهار کرده و از تکثیر شاخه‌ها جلوگیری می‌کند (رزدان و همکاران، ۲۰۰۵). معمولاً اکسین در مرحله اولیه کشت، در مقایسه با سیتوکینین مورد نیاز نیست، اما اگر مقدار کمی اضافه شود، همراه با استفاده از سیتوکینین، می‌تواند نتیجه مثبتی ایجاد کند (هال و همکاران، ۱۹۹۹). اگرچه اکسین باعث تحریک تکثیر شاخه‌ها نمی‌شود، اما رشد ریشه را که در جذب ماده مغذی نقش حیاتی دارد، تقویت می‌کند (فلپکی و همکاران، ۲۰۰۵). در کشت بافت گیاهی، اکسین IAA (ایندول-۳-استیک اسید) و NAA (نفتالین استیک اسید)، بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد، با این حال، IAA ناپایدارتر است زیرا ساختار شیمیایی آن به راحتی تغییر می‌کند، همچنین NAA به طور کلی در کشت سلول‌های گیاهی کلم در محدوده غلظت ۰/۰۱ - ۰/۱ میلی گرم در لیتر برای القا ریشه استفاده می‌شود و بالاتر از این غلظت، به دلیل تشکیل بیش از حد کالوس (پینه)، می‌تواند از ریشه‌زایی جلوگیری کند (جورج و همکاران، ۲۰۰۰).

۱-۱۲-۲ سیتوکنین ها

سیتوکنین ها هورمون هایی هستند که نقشی اساسی در تنظیم چرخه ی سلول های گیاهی داشته و نیز در بسیاری از فرآیندهای رشد نقش مهمی دارند. در شرایط کشت بافت بنزیل آمینو پورین (BAP) یکی از پر استفاده ترین سیتوکنین ها است که باعث رشد ساقه و شاخه های جانبی می گردد (کونینگ و همکاران، ۱۹۹۴). در شرایط کشت بافت کاینترین (KIN) نقش مهمی در القا ساقه گیاه به عنوان مثال چغندر قند دارند (زمانی فر و همکاران، ۱۳۹۵) سیتوکنین ها در تمام بافت های گیاه از جمله، نوک ریشه، راس ساقه و بذرهای نابالغ وجود دارند. غلظت درون زاد آن ها بسیار اندک و معمولا در محدوده میلی گرم در لیتر است، آن ها به طور طبیعی در قسمت هایی از گیاه که تقسیم سریع سلول اتفاق می افتد، سنتز می شوند و به دو صورت طبیعی: زئاتین (ZTD)، ایزوپنتنیل آدنین و مصنوعی: کاینترین، بنزیل آدین، دیفنیل اوره، تیدیا زورون، یافت می شوند (هارتمن و همکاران، ۲۰۰۷).

بنزیل آمینو پورین نسبت به سایر سیتوکنین ها در برابر فشار اکسیداتیو پایدارتر است این هورمون معمولا در غلظت های ۱ تا ۳ میلی گرم در کشت بافت گیاهان مختلف مورد استفاده قرار می گیرد، علی رغم آثار مثبت گزارش شده برای این هورمون با افزایش غلظت، تاخیر در رشد شاخساره و توقف رشد گیاه را به دنبال دارد. با این حال تاثیر آن در گونه های مختلف متفاوت گزارش شده است (جورج و همکاران، ۲۰۰۰).

۱-۱۲-۳ جیبرلین (GA)

به دلیل اثر بازدارندگی آن روی رشد کالوس و نیز اثر بازدارنده آن روی تشکیل ریشه های نابجای القا شده در اثر اکسین، بندرت در کشت بافت استفاده می شود؛ اما برای تسریع جوانه زنی، تحریک طویل شدن فاصله بین گره ها و تحریک تشکیل جنین از کالوس در کشت بافت گیاهی گاه ها مورد استفاده قرار می گیرد (هدایت و همکاران، ۱۳۸۱).

۱-۱۲-۴ اسیدآبسیزیک اسید (ABA)

به عنوان یک بازدارنده رشد محسوب می شود. این هورمون در کنترل آثاری برخلاف جبرلین ها نقش دارد.

اتیلن

از این هورمون در کشت های این ویترو جهت جوانه زدن و تمایز سلول های چوبی استفاده می شود (هدایت و همکاران، ۱۳۸۱).

۱-۱۳ آلودگی های محیط کشت

الف- آلودگی های درونی

آلودگی های باکتریایی و قارچی معمولاً با افزایش ناگهانی کدوری و تغییر رنگ محیط کشت در اثر تغییر pH محیط شناسایی می شوند. باکتری ها در اثر تولید متابولیت های اسیدی به سرعت pH محیط کشت را کاهش داده و آن را زرد رنگ می کنند. آلودگی باکتریایی (مایکوپلاسمایی) برخلاف دیگر آلودگی ها معمولاً تغییر رنگ محیط کشت و کدورت آن را در پی ندارند. لذا تشخیص این نوع آلودگی از سایر آلودگی ها مشکل تر است. مایکوپلازما اغلب باعث کاهش رشد یا توقف رشد سلول ها و گاهی از بین رفتن سلول ها می شود (خرمی زاده و همکاران، ۱۳۸۸). این میکرو ارگانیسم برای مصرف مواد غذایی، با سلول های کشت داده شده رقابت نموده و باعث کاهش سنتز مواد داخل سلولی و کاهش رشد سلول ها می شود (خرمی زاده و همکاران، ۱۳۸۸). امروزه کیت های تشخیص مایکوپلازما به روش های مختلف از جمله الایزا طراحی و تولید شده اند و ساده بودن روش کار این کیت ها، تشخیص مایکوپلازما را آسان نموده است. با این حال، ضروریست آزمون های اختصاصی برای بررسی آلودگی باکتریایی و قارچی، به عنوان یکی از فرآیندهای پایش و کنترل کیفی روزمره مدنظر قرار گیرند و به کمک روش های فیزیکی و آنتی بیوتیک های مناسب نسبت به حذف آن ها اقدام کرد (خرمی زاده و همکاران، ۱۳۸۸). با این وجود باید توجه داشت که با استفاده ی مداوم از آنتی بیوتیک ها در محیط های

کشت می‌تواند من تولید سوبه‌های مقاوم میکروبی، نیاز به کاربرد آنتی‌بیوتیک‌های قوی‌تر که برای خود سلول‌های گیاهی نیز سمی هستند را افزایش دهد (امام و همکاران، ۱۳۹۶) ضمن اینکه می‌توان جهت حذف آلودگی سطحی از ریزنمونه‌ها می‌توان از قارچ کش‌ها و ترکیبات کلردار مانند کلرید جیوه، هیپوکلریت سدیم و غیره با غلظتی که از صدمه زدن به بافت گیاه جلوگیری نموده و ضد عفونی سطحی ریز نمونه‌ها را تامین نماید، در محیط کشت استفاده کرد (امام و همکاران، ۱۳۹۶). استفاده از واکشت‌های مکرر و همچنین کشت مریستم نیز می‌تواند از راه‌حل‌های کاربردی دیگر برای حذف پاتوژن‌های موجود در شرایط کشت بافت باشد.

ب- قهوه ای شدن

به‌منظور جلوگیری از نکروزه (قهوه‌ای) شدن ریز نمونه‌ها که عمدتاً به دلیل تولید ترکیبات و آلکالوئیدهای فنلی زیاد از ریز نمونه می‌باشد، از موادی مانند اسیدسیتریک، اسیدآسکوربیک و پیروگالل استفاده می‌گردد تا اکسید شدن ریز نمونه‌ها را کاهش دهند علاوه بر این‌ها، ترکیباتی نظیر ذغال فعال و نیز پلی وینیل پیرولیدون (PVP) نیز به‌عنوان ترکیبات جاذب برای جذب مواد سمی مضر برای ریز نمونه، استفاده می‌گردند. البته این ترکیبات علاوه بر مواد فنلی و مضر، مواد مفید محیط کشت را نیز تا حدی به خود جذب می‌کنند به همین دلیل این‌گونه از محیط‌های کشت باید در زمان‌های کوتاه‌تری واکشت گردند تا همواره مواد موردنیاز گیاه با غلظت مناسب در دسترس ریز نمونه باشد (رامسی و همکاران، ۲۰۰۰).

ج- شیشه ای شدن

پدیده شیشه‌ای شدن ناشی از تغییرات نامطلوب فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در بافت گیاهی است، عوامل متعددی بر پدیده‌ی شیشه‌ای شدن موثر می‌باشند که از جمله مهم ترین این عوامل نوع تنظیم کننده‌ی رشد، نوع و غلظت سیتوکینین، نسبت یون نترات به آمونیوم در محلول غذایی، نوع و مقدار آگار، تهویه و تعداد دفعات واکشت می‌باشد (امام و همکاران، ۱۳۹۶). افزایش غلظت آگار به علت کاهش

رطوبت محیط کشت باعث کاهش این پدیده می‌گردد، درحالی که افزایش غلظت هورمون سیتوکینین و کاهش نسبت یون نیترات به آمونیوم در محیط کشت باعث افزایش آن می‌شود. و حضور هورمون BA نسبت به سایر سیتوکینین‌ها و همچنین فیتاژل نسبت به سایر انواع آگار باعث افزایش پدیده شیشه‌ای شدن می‌شوند. استفاده از درپوش پارافیلیم به علت افزایش تبادلات گازی باعث کاهش تجمع اتیلن و در نتیجه کاهش میزان شیشه‌ای شدن می‌گردد، کاربرد سیستم سرمادهی از کف می‌تواند باعث کاهش فعالیت تمامی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت گردیده و به کاهش میزان شیشه‌ای شدن شاخساره‌ها منجر شود. جهت کاهش میزان پدیده شیشه‌ای شدن در شرایط درون شیشه‌ای، کاربرد سیتوکینین با غلظت های پایین‌تر، جایگزین نمودن BA، با سایر سیتوکینین‌های رایج به عنوان مثال (Kin) و در صورت لزوم کاربرد غلظت های پایین BA با مقدار ۰/۵ میلی گرم در لیتر، استفاده از درپوش پارافیلیم، افزایش غلظت آگار تا حد قابل قبول 10 گرم در لیتر، کاهش تعداد دفعات واکشت تا حد امکان و سازگار نمودن هرچه سریعتر گیاهچه‌های کشت بافتی پیشنهاد می‌گردد (امام و همکاران، ۱۳۹۶).

۱-۱۴ نانو کربن ها در کشت بافت

نانوکربن‌ها در سال ۱۹۹۱ توسط لیجایما معرفی شدند و به دلیل خواص منحصر بفرد آن‌ها از جمله خواص عالی الکتریکی و استحکام کششی خوب و از طرف دیگر طبیعت کربنی بودن نانولوله‌ها، از دهه گذشته تاکنون شاهد رشد تحقیقات علمی بر روی آن‌ها در علوم مختلف از جمله کشاورزی هستیم. نانو لوله‌های کربنی که از صفحات کربن به ضخامت یک اتم و به شکل استوانه‌ای توخالی ساخته شده‌اند، یکی از نانو ذرات پرکاربرد می‌باشند، تاکنون نقش مثبت آن‌ها را در جوانه‌زنی بذور و رشد شش گونه‌ی *Lolium1 perienne*, *Brassica nap*, *Cucumis nelo*, *Raphanus sativus* به تأیید رساندند (لین و زینگ، ۲۰۰۷). اصطلاح نانوتکنولوژی از ترکیب دو کلمه ناشی می‌شود: ابتدا، پیشوند عددی یونانی nano با اشاره به یک میلیارد و سپس کلمه فناوری در مجموع، نانو فناوری در تعریفی بسیار ساده، یعنی تکنولوژی‌هایی که در ابعاد نانومتری عمل می‌کنند. نانومتری واحد اندازه‌گیری است و برابر یک میلیارد متر یا ۱۰ به توان ۹ متر است. اندازه اتم‌ها و مولکول‌ها در این محدوده قرار دارند

(فیضا و همکاران، ۲۰۲۰). نانو تکنولوژی در حوزه‌های مختلفی از جمله، غذا، دارو، پزشکی، بیوتکنولوژی، الکترونیک، کامپیوتر، ارتباطات، حمل و نقل، انرژی، محیط زیست، مواد هوا فضا و امنیت ملی کاربرد دارند، نانولوله‌های کربنی ورق‌های گرافیتی هستند که به صورت لوله‌های استوانه‌ای به دور هم پیچیده شده‌اند. نسبت مساحت سطحی بالا، خواص برتر مکانیکی، الکتریکی و حرارتی از جمله خصوصیات هستند که آن‌ها را برای بسیاری از کاربری‌ها به گزینه مناسبی تبدیل کرده است. همچنین نانو لوله‌های کربنی خاصیت جذب بسیار خوبی برای ترکیبات مختلف آلی و یون‌های معدنی از خود نشان داده‌اند، جاذب‌های نانومانند نانولوله‌های کربنی (CNTs)، مواد پلیمری، مانند دندریمرها و ژئولیت‌ها دارای قدرت جذب فوق العاده بالایی هستند که برای حذف فلزات سنگین، مواد آلی و ناخالصی‌های بیولوژیکی بکار می‌روند، انواع مختلفی از نانو لوله‌های کربنی شامل تک دیواره (SWCNTs)، دودیواره (DWCNTs) و یا چند دیواره (MWCNTs)، در بازار وجود دارند (زایتسوا و همکاران، ۲۰۱۶). نانوسنسورها مشخص می‌کنند که هر قسمت کوچک از مزرعه به چه میزان عناصر غذایی و سم نیاز دارد و بدین وسیله از آلودگی محیط زیست جلوگیری کرده، سلامت محصولات و افزایش بازده اقتصادی را ممکن می‌سازد. همچنین فناوری نانو باعث کاهش مصرف علف کش‌ها و آفت کش‌ها، افزایش بازارپسندی گیاهان مختلف با تولید بذور نانو، ارتقای ژنتیکی گیاهان و حیوانات، بهبود بسته‌بندی محصولات کشاورزی و تولید ترکیبات شیمیایی سازگار با محیط زیست گردیده است (زایتسوا و همکاران، ۲۰۱۶). تعامل نانوذرات با سیستم بیولوژیکی از اهمیت بالایی برخوردار است و امروزه محققان در تلاش‌اند تا اثرات بالقوه انواع نانوذرات را در گیاهان، حیوانات و انسان‌ها پیدا کنند بنابراین، این ذرات می‌توانند به عنوان "گلوله‌های جادویی" حاوی علف کش‌ها، سموم دفع آفات نانو، کودها یا ژن‌ها عمل نمایند. اکسید روی (ZnO) نیز یکی از پرکاربردترین محصولات نانو است که به دلیل اثر ضد میکروبی برتر در بسته‌بندی مواد غذایی و داروها مورد استفاده قرار می‌گیرد. ZnO-NPs همچنین در لوسیون‌های ضد آفتاب، رنگ‌های دیواری، تولیدات سرامیک یا وسایل ورزشی مورد استفاده قرار می‌گیرند (الفدای و همکاران، ۲۰۲۰). برخی از نانو مواد مثل، (نانوکربن‌ها) CBNها، (نانواکسید روی)، ZnO-NPs و غیره ممکن است بهره‌وری تنظیم

کننده‌های رشد گیاه را افزایش دهند (پاندی و همکاران، ۲۰۱۸). استفاده طیف وسیعی از CBNها در دوزهای پایین می‌تواند جوانه‌زنی بذر، رشد گیاه و توسعه گیاهان نمونه و گونه‌های زراعی مانند جو، ذرت و سویا را فعال کنند، همچنین در گیاهانی نظیر گوجه فرنگی و غیره، باعث جوانه‌زنی اولیه بذر با سرعت جوانه‌زنی بیشتر، رشد سریع، افزایش عملکرد، زیست توده بزرگتر و تحمل تنش‌ها گردند (پاندی و همکاران، ۲۰۱۸). غلظت مطلوب تیمار نانوکربن می‌تواند برای افزایش پتانسیل القای کالوس و باززایی گیاه استفاده شود (چوتپاجیت و همکاران، ۲۰۱۸). در آزمایش کشت بافت برنج که در محیط کشت آن از زغال فعال و نانوکربن کروی در اندازه‌ی متوسط ۴۰-۶۰ نانومتر در غلظت‌های به ترتیب (۱۰۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) به محیط کشت استفاده شده بود باززایی گیاه برنج افزایش یافت و در مقایسه محیط کشت با تیمار نانوکربن نسبت به محیط کشت با تیمار ذغال فعال در القای کالوس و باززایی گیاه محیط با ترکیب تیماری نانوکربن برتری نشان داده است. مسیر سنتز نانوذرات و اندازه نسبی و ساختار آن‌ها در نمایش خصوصیات بیولوژیکی ذرات نانو نقش محوری دارد، نانوذرات (ZnO-NPs) سازگار با محیط زیست بوده و از این رو به طور گسترده‌ای در کاربردهای بیولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند این ذرات دارای خواص فیزیکی-شیمیایی خاصی هستند که به اندازه کوچکتر، سطح وسیع و واکنش پذیری زیاد آن‌ها نسبت داده می‌شود، نانوذرات ZnO-NPs نقش مهمی در تنظیم مکانیسم‌های مختلف درگیر در پاسخ به تنش‌های غیر زنده در گیاهان دارند، استفاده از ذرات نانو اکسید روی در غلظت‌های مختلف زیر ۲۰ میلی‌گرم در محیط کشت، میزان جوانه‌زنی گیاه کینوا را تا صد درصد افزایش داد. با این حال با افزایش غلظت به بیش از ۲۰ میلی‌گرم در لیتر مسمومیت بذور و در نتیجه ممانعت از جوانه‌زنی آن‌ها حادث شد (القدامی و همکاران، ۲۰۲۰). اخیراً گزارشاتی از تجمع مقادیر CBNsهای جذب شده توسط گیاهان قرار گرفته در معرض نانولوله‌های کربنی با استفاده از تکنیک میکروویو القایی (MIH)، در اندام‌های مختلف گیاهی ارائه گردید، با این حال، با استفاده از نانو ذرات جهت تولید برخی محصولات کشاورزی مانند الیاف گیاهی بدون هیچ محدودیتی رو به گسترش است (پاندی و همکاران، ۲۰۱۸).

۱-۱۵ کاربردهای صنعتی و دارویی کینوا

مطالعات برای کاربردهای خوراکی، دارویی و صنعتی، کینوا مانند استفاده از آن به عنوان یک جایگزین جدید، برای استفاده در مواد خوراکی بر پایه نشاسته کینوا و به عنوان تثبیت کننده در مواد خوراکی، در خوراکی های بسته بندی شده بر پایه پروتئین کینوا، انجام شده است. همچنین اصلاحات در استفاده از اجزای بیوشیمیایی موجود در کینوا به عنوان مواد اولیه خام زیستی جایگزین مواد شیمیایی برای استفاده صنعتی است و همچنین ترویج فن آوری های جدید با استفاده از چنین مواد شیمیایی زیستی مشتق شده از کینوا می تواند زنجیره ارزش صنعتی این گیاه و همچنین مناطق تولید آن را افزایش دهد، فرآوری های جانبی و پسماندهای حاصل از تولید کینوا در کشاورزی، کاربردهای موضعی، مواد خام و انرژی زیستی پتانسیل زیادی برای گسترش در آینده دارد (انجل و همکاران، ۲۰۲۰). کاربردهای صنعتی متعددی از ساپونین های موجود در کینوا به دست آمده، از جمله دانه های کینوا که پس از فرآوری آنها در صنعت داروسازی به عنوان ادجوانت های ایمنی، برای تحریک ایمنی غیر اختصاصی، و همچنین افزایش پاسخ ایمنی به یک آنتی ژن منتخب و افزایش جذب مخاطی در برخی داروها استفاده شده است. همچنین پروتئین های موجود در کینوا بخاطر خاصیت کف کنندگی بالا در تولید مواد شوینده، کاربرد دارند (لوتزو همکاران، ۲۰۱۷).

۱-۱۶ هدف از کشت بافت گیاه کینوا

چون این گیاه بومی مناطق امریکای جنوبی است بنابراین باید گیاهان سازگار با اقلیم کشورمان که تنوع اقلیمی بالایی دارد تولید گردد. چون برخی ارقام در یک استان مثلا اصفهان ممکن است خوب پاسخ دهد. اما در استان البرز آن رقم محصول مناسبی تولید نکند. همچنین مشکل حفظ خلوص ژنتیکی واریته های جدید اصلاحی وجود دارد که با روش های سنتی انجام نمی شود. بنابراین تکثیر درون شیشه ای این گیاه می تواند راهکار مناسبی برای تحقق این مهم باشد.

۱-۱۷ هدف تحقیق

در پژوهش حاضر، ابتدا جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های کینوا در محیط کشت‌های MS، $\frac{1}{2}$ MS و WA با هدف تولید منابع تهیه‌ی ریز نمونه ارزیابی گردید سپس کالوس‌زایی و بررسی رشد درون شیشه‌ای آن در پاسخ به غلظت‌های مختلف نانوکربن و تیمارهای هورمونی (Kin، BAP و 2,4-D) انجام می‌شود. نهایتاً تاثیر تیمارهای هورمونی مختلف (Kin و BAP) و اکسین‌های (IAA، IBA و NAA)، در آزمایش‌های جداگانه با هدف اندام‌زایی از کالوس‌های تولید شده از ریز نمونه‌ی هیپوکوتیل مورد بررسی قرار می‌گیرد.

فصل دوم: مروری بر تحقیقات انجام شده

۱-۲ کالوس زایی

استفاده از تنظیم کننده‌های رشد، تاثیر بسیار زیادی در کالوس‌زایی و باززایی گیاهان مختلف در شرایط کشت بافت دارد. تاکنون تحقیقات بسیار اندکی در زمینه کاربرد تنظیم کننده‌های رشد در ریزازدیادی گیاه کینوا صورت گرفته است. بهوجوانی ودانتو (۲۰۱۳)، گزارش دادند که بافت و رنگ کالوس نشانه‌ای برای باززایی هستند. اندازه کالوس نیز یک فاکتور مهم در زنده ماندن کالوس است. میزان بقا کالوس های کوچک در مقایسه با کالوس های بزرگ بیشتر است. ایزا و همکاران (۲۰۰۵)، در بررسی ریزنمونه های کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه، ریزنمونه ی هیپوکوتیل را مناسب‌ترین ریز نمونه جهت تولید کالوس و القاء جنین‌زایی سوماتیکی در گیاه کینوا معرفی نمودند و کاربرد ۰/۴۵ میکرو مول 2,4-D در محیط پایه‌ی MS جامد، را به عنوان بهترین تیمار هورمونی جهت کالوس‌زایی از این ریز نمونه دانستند. در حالی که الخیری و همکاران (۱۹۹۲)، تیمار ۳/۳۹ میکرومول 2,4-D در محیط پایه MS را بهترین تیمار در کالوس‌زایی گیاه اسفناج معرفی کردند. در پژوهش حسامی و دانشور (۲۰۱۶)، استفاده از ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۹/۳۳ درصد) و بزرگترین اندازه‌ی کالوس تولید شده از ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل در گیاه

کینوا را در پی داشت. در تحقیق هبا شاهین (۲۰۱۹)، بیشترین درصد جوانه‌زنی (۱۰۰ درصد)، بذور کینوا در محیط MS جامد حاصل گردید و در همین مطالعه، بهترین کالوس ها از ریز نمونه‌ی هیپوکوتیل گیاهچه‌ی ۱۰ روزه در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر Kin به دست آمد درحالی که محیط غنی شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به اضافه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، کمترین میزان کالوس را تولید نمود. در مطالعه‌ی مقایسه‌ای رگلادو و همکاران (۲۰۲۰)، بر روی دو رقم (Cahuil and Villa) کینوا (ساحلی و کوهستانی) برای تعیین بالاترین درصد شاخه‌زایی و ریشه‌زایی در محیط MS جامد، رقم چایلو (کوهستانی) با شاخه‌زایی ۹۳ درصدی تحت اعمال ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بهترین پاسخ باززایی را نسبت به رقم ویلا (ساحلی) با ۷۹ درصد شاخه‌زایی در شرایط مشابه از نظر محیط کشت و تیمارهای هورمونی، نشان داد. در همین مطالعه، نتایج مقایسه‌ی ریشه‌زایی کینوا در این دو رقم نشان داد که مصرف ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA در محیط MS توانست میزان ریشه‌زایی را در رقم کوهستانی با ۸۷ درصد و رقم ساحلی به ۸۳ درصد برساند. در پژوهش تلاحیگو و همکاران (۲۰۱۷)، بر روی گیاه کینوا مطالعه‌ی مقایسه‌ای مبنی بر القای کالوس و همچنین قطر کالوس در دو محیط کاملاً متفاوت MS جامد و B₅ مشخص نمود که تفاوت معنی‌داری بین القای کالوس و رشد آن در این دو محیط کشت با ترکیب هورمونی (BA+ 2,4-D)، هر یک به مقدار مشابه (0/2 میلی‌گرم در لیتر)، برای هر دو محیط MS و B₅ وجود داشت. این تفاوت را می‌توان با تاثیرتنوع عناصر معدنی سازنده آن‌ها و به خصوص محتوای نیتروژن و پتاسیم محیط کشت توضیح داد. با در نظرگرفتن تمایل بسیار زیاد نیتروفیلی کینوا محیط کشت MS جامد با ۱۹۰۰ میلی‌گرم در لیتر نترات پتاسیم در مقایسه با محیط کشت B₅ با ۲۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نترات پتاسیم باعث رشد سلولی بهتر ریزنمونه‌های کینوا را موجب شد همچنین در همین مطالعه دو محیط کشت KNOP و WHITE نیز از نظر تولید کالوس بررسی شدند و نتایج حاصله نشان داد که دو محیط چون این دو محیط از نظر نترات پتاسیم (KNO₃)، ضعیف

هستند به همین دلیل سطح بسیار پایینی از کالوژزایی را نسبت به دو محیط قبلی (MS و B₅) نشان دادند.

۲-۲ اندام زایی

در پژوهش القدامی و همکاران (۲۰۲۰)، با هدف بررسی ریشه‌زایی و شاخه‌زایی گیاه کینوا در کالوس‌های رشد یافته از ریز نمونه‌ی هیپوکوتیل، محیط کشت MS جامد با ترکیب هورمونی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۱۰ گرم در لیتر ساکارز عدم حضور هورمون NAA به عنوان مناسب‌ترین محیط جهت شاخه‌زایی معرفی گردید. همچنین محیط ½MS با تیمار هورمونی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۱۰ گرم در لیتر ساکارز بهینه‌ترین شرایط را برای تولید ریشه فراهم نمود که این یافته با نتایج پژوهش‌های خیری و همکاران (۱۹۹۲)، موافق است. بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر باززایی و همچنین کالوس‌زایی سایر گیاهان مانند تاج خروس، اسفناج، گندم، چغندر، کلم، فلفل دلمه، پروانش، آنتوریوم و سیر نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

در پژوهش حجتیان‌فر و همکاران (۱۳۹۵)، جهت حصول شاخه‌زایی گیاه تاج خروس زینتی تریکالر صورت پذیرفت، بیشترین میانگین طول ساقه چه (۱۲ سانتی متر)، و در محیط کشت MS با ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA حاصل شد. و کمترین طول ساقه چه (۵ سانتی متر) با ترکیب هورمونی ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۱/۵ میلی‌گرم IAA نشان داده شد. در بیان اندازه‌گیری صفت تعداد شاخساره نشان داده شد که بیشترین تعداد شاخساره (۳۰) با ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA در محیط کشت MS حاصل گردید همچنین برای اندازه‌گیری صفت تعداد ریشه، بیشترین تعداد ریشه (۱۳/۵) با محیط کشت ½MS و با ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل شد و کمترین تعداد ریشه (۶) در محیط کشت شاهد نشان داده شد. همچنین در مورد صفت طول ریشه در این مطالعه، بیشترین طول ریشه (۵/۵ سانتی متر) در محیط کشت ½MS با ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA و کمترین

میانگین طول ریشه (۱/۶ سانتی متر) با تیمار هورمونی ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA با میانگین (۲/۴ سانتی متر) حاصل گردید. همچنین در این تحقیق، مناسبترین هورمون از میان سایتوکنین‌های مورد استفاده برای صفات شاخه‌زایی BAP و برای صفات ریشه‌زایی از میان اکسین‌ها IBA بیان شده است.

در پژوهش‌های خیری و همکاران (۱۹۹۲)، که جهت باززایی گیاه اسفناج در محیط MS جامد، از ریزنمونه برگ گیاه اسفناج استفاده کردند، بهترین تنظیم کننده رشد برای القای کالوس از ۲ میلی گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D مصرف شد. در این بررسی بیشترین درصد شاخه‌زایی با مصرف ۲ میلی گرم در لیتر Kin و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۱ میلی گرم در لیتر GA (جبرلین)، بدست آمد. درحالی که ریشه دار کردن شاخه‌های باززا شده در محیط کشت MS و تحت اعمال تیمار ۱ میلی گرم در لیتر IBA، از بالاترین بازدهی برخوردار بود.

در مطالعه‌ی زمانی‌فر و همکاران (۱۳۹۵)، به منظور اندام‌زایی در گیاه چغندر قند، تعیین بالاترین درصد اندام‌زایی مستقیم (۹۳ درصد) از کشت جوانه راسی و در محیط کشت MS با ترکیب ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون BAP به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA حاصل گردید. و بیشترین تعداد از نظر صفت تعداد جوانه (۹) در محیط کشت MS با ترکیب هورمونی ۲ میلی گرم بر لیتر هورمون BAP با عدم وجود اکسین و کمترین تعداد جوانه (۵/۶۲) مربوط به محیط کشت MS با ترکیب هورمونی ۱/۵ میلی گرم در لیتر و همچنین با عدم حضور اکسین نشان داده شد.

در تحقیق احمد و همکاران (۱۹۹۱)، بر روی کلم پیچ به منظور القای کالوس و ارزیابی تاثیر دو تیمار هورمونی NAA و BAP در رشد کالوس و باززایی آن مشخص شد که ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل مناسبترین ریزنمونه برای باززایی این گیاه از کالوس می‌باشد. در پژوهش مذکور، ترکیب دو هورمون NAA و BAP با غلظت مساوی ۱ میلی گرم در لیتر و در تعادل باهم در محیط کشت $MS \frac{1}{2}$ کمترین درصد کالوس‌زایی و همچنین شاخه‌زایی را تولید نمود درحالی که استفاده از غلظت ۱ تا ۱/۵ میلی گرم در لیتر NAA به همراه ۱ میلی گرم در لیتر BAP در محیط کشت $MS \frac{1}{2}$ به همراه ۱ میلی گرم در لیتر GA، بیشترین

میزان تولید و رشد کالوس را نشان داد. همچنین محیط کشت MS ½ با ۱ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۱ میلی گرم در لیتر GA توانست میزان باززایی را در گیاه کلم پیچ افزایش دهد.

طبق گزارش اطرشی و همکاران (۱۳۹۲)، درمورد کالوس‌زایی و باززایی غیرمستقیم گیاه فلفل دلمه در محیط MS جامد و از ریزنمونه کوتیلدون، هیپوکوتیل، نوک ساقه و نوک ریشه، ترکیب هورمونی ۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۱ میلی گرم در لیتر IBA و از ریزنمونه کوتیلدون، بهترین کالوس‌ها و طویل‌ترین شاخساره‌ها را تولید کرد، به طوری که، شاخساره‌های با طول بیشتر در محیط کشت MS پایه حاوی زغال فعال بیشترین میزان ریشه‌زایی را نشان دادند و در مرحله سازگاری و انتقال به محیط گلخانه، نیز گیاهچه‌های سازگار شده (حدود ۹۵ درصد) رشد مناسبی را نشان دادند.

در پژوهش طالبی و همکاران (۱۳۹۰)، بر روی گیاه پراونش به منظور تولید کالوس و باززایی غیر مستقیم این گیاه به جای استفاده از بذور به دلیل قوه نامیه پایین ترجیح دادند از کشت گره (جوانه)، و همچنین برگ، استفاده کنند اما از ۲۵ تیمار هورمونی و دو نوع ریزنمونه فقط ریزنمونه برگ توانست با موفقیت پاسخ دهد و از بین تیمارهای هورمونی، تنها دو تیمار هورمونی BAP و NAA در محیط کشت MS پایه بهتر عمل کردند. در شرایط کشت بافتی گیاه پراونش، ریزنمونه‌ی برگ در محیط کشت MS حاوی تیمارهای هورمونی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA موفق به تولید کالوس شد. سپس کالوس‌ها برای باززایی به محیط جدید حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۵ میلی گرم در لیتر NAA انتقال داده شدند، کالوس‌ها ریشه‌های فراوانی را تولید کردند در این تحقیق مشخص شد محیط‌های کشت حاوی زغال فعال برای تولید کالوس مناسب می‌باشد چرا که از تولید ترکیبات فنولی جلوگیری می‌کند اما در محیط باززایی وجود زغال فعال مانع از تغذیه نمونه‌ها و در نتیجه کاهش یا عدم باززایی گیاه می‌شود.

پژوهش خان و همکاران (۲۰۱۷)، که بر روی گیاه غده‌ای سیر به منظور تولید کالوس و باززایی غیرمستقیم این گیاه صورت گرفت، نشان داد ریز نمونه‌ی ریشه بهینه‌ترین ریز نمونه برای کالوس‌دهی و

باززایی از بین ریز نمونه‌های ساقه و برگ و ریشه‌ی، این گیاه می‌باشد، من اینکه مناسب‌ترین محیط برای تولید کالوس نیز محیط پایه‌ی MS حاوی ترکیبات هورمونی ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر Kin گزارش گردید. در پژوهش مذکور، همچنین بهترین ترکیب هورمونی برای باززایی و تولید شاخساره محیط MS پایه با غلظت ۰/۵ - ۱ میلی گرم در لیتر BA به اضافه ۰/۵ میلی گرم در لیتر Kin تعیین شد در حالی که محیط ۱/۲ MS حاوی تیمارهای هورمونی ۲ میلی گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA فراوان‌ترین میزان ریشه‌ها را در گیاهچه‌های باززا شده تولید نمود.

در مطالعه‌ی نوروزی و همکاران (۱۳۹۴)، به منظور القای کالوس در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ گیاه آنتوریوم صورت پذیرفت و در این مطالعه از تنظیم کننده‌های رشد BA و TDZ در غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۱، ۲ میلی گرم بر لیتر) در ترکیب با NAA و 2,4-D با غلظت‌های (۰/۵، ۱، ۲ میلی گرم بر لیتر)، در محیط MS، بررسی شد که نشان داد بهترین ریزنمونه دمبرگ بود و بهترین ترکیب محیط کشت برای القای کالوس سطوح پایین ۲ میلی گرم در لیتر BA به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D بهترین کالوس را داد و برای تولید شاخساره ترکیب تیمار هورمونی BA با غلظت ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D به طول ۶/۹ سانتی متر تولید کرد و در همین آزمایش برای ریشه زایی گیاهچه‌های باززای شده در محیط متوسط MS حاوی ۰/۲ میلی گرم در لیتر IBA با ۹۵ درصد ریشه‌زایی بیشترین تولید ریشه را داشته است.

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های چشمگیری در توسعه‌ی فناوری نانو حاصل شده است. رشد فناوری نانو منجر به توسعه سریع کاربردهای تجاری آن شده است که شامل استفاده از طیف گسترده‌ای از نانو ذرات ساخته شده و توانایی تحول در صنعت کشاورزی و صنایع غذایی است بدین ترتیب، یک ضرورت اساسی برای انجام مطالعات بیشتر در مورد استفاده از ذرات نانو در زمینه کشاورزی را می‌طلبد، تعامل نانوذرات با سیستم بیولوژیکی از اهمیت بالایی برخوردار است و امروزه محققان در تلاش‌اند تا اثرات بالقوه انواع نانو ذرات را در گیاهان، حیوانات و انسان‌ها پیدا کنند.

پژوهش القدامی و همکاران (۲۰۲۰)، با هدف بررسی اثر نانوذرات روی بر سرعت جوانه زنی بذرها در گیاه کینوا در محیط MS انجام شد، در این آزمایش از نانوذرات روی (ZnO-NPs) در غلظت های کمتر از ۲۰ میلی گرم در لیتر مورد استفاده شد و بیشترین میزان جوانه زنی ۲۲ درصد در محیط حاوی ۲ میلی گرم در لیتر از نانو ذرات روی حاصل شد، در حالی که کمترین میزان جوانه زنی ۱۲ درصد در محیط حاوی ۲۰ میلی گرم در لیتر نانوذرات روی رخ داد، و این بدان معنی است که در افزایش غلظت نانوذرات در محیط می تواند منجر به سمیت برای جوانه زنی بذرها ی کینوا شود، نیز با کاربرد نانو ذرات روی در غلظت ۲ تا ۱۰ میلی گرم در لیتر جهت شاخه زایی و ریشه زایی در کینوا مشخص شد که اگرچه نانو ذرات موفق به افزایش شاخه زایی و ریشه زایی در کینوا شده بودند، اما اثر معنی داری بر افزایش طول شاخه یا ریشه نشان ندادند.

نانوذرات روی جوانه زنی و هسته دانه را از نظر محصول از جمله گوجه فرنگی بهبود بخشیده است القدامی و همکاران (۲۰۲۰)، همچنین نتایج مشابهی از گیاه بادام زمینی (*Cucumis sativus*)، گزارش شده است. اثر نانوکربن بر القای کالوس و باززایی سایر گیاهان زراعی مثل برنج و گندم و چمن مورد بررسی قرار گرفت.

در تحقیقی که توسط چوتی پاجیت و همکاران (۲۰۱۸)، بر روی گیاه برنج (*Oryza sativa L.*)، به منظور القای کالوس و باززایی آن انجام شد، نشان داد که محیط حاوی ۵ میلی گرم در لیتر نانوکربن از بالاترین در صد القای کالوس (۹۴/۷۰ درصد) و نیز بیشترین نرخ باززایی (۶۰/۴۰ درصد)، برخوردار بوده همچنین نتایج حاصله مبین تاثیر بیشتر غلظت های کم نانو کربن ۵ میلی گرم در لیتر نسبت به ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بر القای کالوس و نیز باززایی این کالوس ها بود با این حال غلظت های بالاتر تیمار نانو کربن در محیط کشت افزایش اندازه کالوس های تولید شده را به دنبال داشت. در همین راستا، در تحقیقات خود اواوسکی و همکاران (۲۰۱۲)، کاربرد نانوکربن (نانولوله کربن) قادر به افزایش سرعت رشد سلول ها و به خصوص در سلول های توتون و تنباکو و گیاه خردل گردید. در گزارش تری پاتی (۲۰۱۱)، نیز اظهار شد که کاربرد غلظت بهینه ی نانو کربن، افزایش انتقال آب و مواد غذایی و در نتیجه افزایش

تقسیم سلولی را به همراه داشت. در توافق با این یافته، مائورل و همکاران (۲۰۰۸)، نیز پیش تر به حضور مقادیر بالا و قابل توجهی از پروتئین‌های Aquaporins در سلول‌های تیمار شده با نانو لوله های کربنی اشاره نمودند. این پروتئین‌ها نقش مهمی در رابطه ی آب و گیاه و توسعه سلول‌ها دارند. با این حال در اغلب تحقیقات، از جمله تحقیقات انجام شده توسط انجوم و همکاران (۲۰۱۴)، گزارش شده است که کاربرد غلظت های بالای نانو کربن، به دلیل افزایش تولید و تجمع گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر ROS و در نتیجه ایجاد علائم نکروتیک در بافت‌های گیاهی، آثار سوئی بر گیاهان می تواند داشته باشد. لین و همکاران (۲۰۰۹)، نیز گزارش نمودند اظهار شده است که تیمار غلظت بالای نانوکربن‌ها به دلیل تولید بیش از حد ROS در سلول‌های گیاهی دارای سمیت سلولی برای سلول‌های گیاهی است درحالی که کاربرد غلظت مطلوب نانوکربن تأثیر مثبتی در کاهش تجمع ROS با تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان دارد.

پاندی و همکاران (۲۰۱۸)، به دنبال بررسی اثر دو نوع نانوکربن لوله‌ای تک جداره (CNT) و چند جداره (CBN) بر دو گیاه مختلف (سورگوم، *Sorghum bicolor L*) و (چمن، *Panicum virgatum L*) اظهار کردند که تیمار CBN و CNT، باعث افزایش سرعت جوانه زنی بذرهای چمن و نیز بذور سورگوم شد همچنین تیمار چمن‌ها با ۲۰۰ میلی گرم در لیتر CNT، افزایش معنی دار ۲۸ درصدی زیست توده را در مقایسه با گیاهان تیمار نشده در پی داشت. علاوه براین، یافته‌های این پژوهش بر نقش مثبت کاربرد تیمارهای CBN و CNT در کاهش علائم تنش شوری حاصل از افزودن NaCl به محیط رشد و به نوعی در حفاظت گیاهان در برابر تنش شوری از طریق نمک زدایی محیط رشد تاکید داشت. ضمن این که تجزیه و تحلیل فنوتیپی دقیق گیاهچه‌های ۱۰ روزه‌ی چمن رشد یافته در محیط حاوی ۵۰ تا ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر CBN و یا CNT تولید شاخه‌ها و ریشه های طویل تر را به اثبات رساند، که این نتیجه در مورد گیاهچه‌های سورگوم تیمار شده با CNT به افزایش طول ساقه منجر شد. درمقابل، گیاهچه‌های سورگوم رشد یافته تحت تیمار CBN، افزایش بیشتر و معنی‌دار کل زیست‌توده را نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند.

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱ محل و زمان اجرای پژوهش

این پژوهش با هدف بررسی آثار تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر اندام‌زایی غیرمستقیم از ریزنمونه هیپوکوتیل از رقم تی‌تی‌کاکا (TiTicaca)، انجام شد. پژوهش در قالب چند آزمایش فاکتوریل بر پایه‌ی طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی با سه تکرار در دو بخش کلی کالوس‌زایی و اندام‌زایی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی شاهرود و در سال تحصیلی ۱۳۹۷-۱۳۹۸ انجام شد.

۳-۲ مواد مورد استفاده

۳-۲-۱ مواد گیاهی

بذور مورد استفاده در این تحقیق شامل بذور رقم تی‌تی‌کاکا (TiTicaca)، کینوا بود که از ارقام با ساپونین متوسط می باشد. این بذور از مرکز تحقیقات نهال و بذر کرج تهیه گردیدند.

۳-۳ تهیه محیط‌های کشت گیاهی

محیط‌های کشت مورد استفاده جهت کشت بذور شامل، کاغذ صافی مرطوب، محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ ۱۹۶۳) محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ و محیط کشت WA بود که در مراحل مختلف تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

۳-۳-۱ تهیه محلول‌های ذخیره^۱ عناصر پرمصرف محیط کشت MS

در پژوهش حاضر، نمک‌های پرمصرف در غلظت ۱۰ برابر مقدار هر نمک نسبت به غلظت های نهایی خود تهیه شدند. به این صورت که ابتدا مقدار هر نمک مطابق جدول ۳-۱ به صورت جداگانه وزن و داخل بشر ریخته شد و سپس در آب مقطر حل شدند و به حجم یک لیتر رسانده شدند. محلول مادری تهیه شده، در دمای ۴ درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری شد، محلول مادری نمک کلسیم به صورت جداگانه، طبق جدول (۳-۱) جهت جلوگیری از رسوب آن با غلظت ۱۰ برابر تهیه شد.

^۱ stock

جدول ۳-۱ غلظت نمک‌های پر مصرف محیط کشت پایه MS (mg/l)	
نمک	مقدار (میلی گرم) $10 \times$
CaCl_2	۳۳۲/۰۲
KH_2PO_4	۱۷۰
KNO_3	۱۹۰۰
MgSO_4	۱۸۰/۵۴
NH_4NO_3	۱۶۵۰

۳-۳-۲ تهیه محلول ذخیره عناصر کم مصرف محیط کشت MS با غلظت

۱۰۰ برابر

محلول‌های ذخیره عناصر کم مصرف، ۱۰۰ برابر غلظت نهایی محیط کشت تهیه شدند. بدین ترتیب که نمک‌ها مطابق جدول (۳-۲) جداگانه وزن شدند و در آب مقطر حل گردیدند و در پایان محتویات تمام بشرهای حاوی نمک‌ها به یک بشر منتقل شد و با افزودن آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری گردید.

جدول ۳-۲ غلظت نمک‌های کم مصرف محیط کشت پایه MS (mg/l)	
نمک	مقدار (میلی گرم) $100 \times$
$\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۲۵
$\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۲۵
Fe NaEDTA	۳۶/۷۰
H_3BO_3	۶/۲
KI	۰/۸۳
$\text{MnSO}_4. \text{H}_2\text{O}$	۱۶/۹۰
$\text{Na}_2\text{MoO}_4. 2\text{H}_2\text{O}$	۰/۲۵
$\text{ZnSO}_4. 7\text{H}_2\text{O}$	۸/۶۰

۳-۳-۳ تهیه محلول ذخیره آهن محیط کشت MS با غلظت ۱۰۰ برابر

محلول مادری آهن با غلظت ۱۰۰ برابر تهیه شد. از هر یک از مواد Na_2EDTA و $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ مقادیر مشخصی مطابق جدول (۳-۳) بطور جداگانه وزن شد و در آب مقطر حل گردیدند. در نهایت هر محلول جداگانه به حجم رسانده شد. محلول تهیه شده با فویل آلومینیومی پوشیده شد تا در برابر نور تجزیه نگردد. در پایان محلول حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری شد.

جدول ۳-۳ غلظت آهن محیط کشت پایه MS (mg/l)

نمک	مقدار (میلی گرم) $100\times$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	۲۷/۸
Na_2EDTA	۳۷/۳

۳-۳-۴ تهیه محلول ذخیره ویتامین‌ها در محیط کشت MS با غلظت ۱۰۰ برابر

برابر

ویتامین‌ها در غلظت ۱۰۰ برابر به صورت محلول ذخیره تهیه گردیدند و در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی-گراد) تا هنگام مصرف نگهداری شدند. مقادیر هر یک از ویتامین‌ها مطابق جدول (۳-۴) در آب مقطر حل و به حجم نهایی رسانده شدند.

جدول ۳-۴ غلظت ویتامین‌های محیط کشت پایه MS (mg/l)

ویتامین	مقدار (میلی گرم) $100\times$
Glycine	۲
myo - Inositol	۱۰۰
Nicotinic acid	۰/۵
Pyridoxine Hcl	۰/۵
Thiamine Hcl	۰/۱

۳-۳-۵ تهیه محلول‌های ذخیره تنظیم کننده‌های رشد

تمام تنظیم کننده‌های رشد، در آب محلول نیستند. لذا از هر یک از تنظیم کننده‌های رشد به صورت جداگانه محلولی تهیه می‌شود و با استفاده از آب مقطر به حجم نهایی رسانده می‌شود.

۳-۳-۵-۱ اکسین‌ها

به منظور تهیه محلول هورمون اکسین، مقدار ۰/۰۵ گرم از پودر خشک اکسین به ظرف بزرگی که حاوی حلال هیدروکسید سدیم ۱ نرمال بود، اضافه گردید و در ادامه با استفاده از آب مقطر دوبار یونیزه مقدار حجم آن به ۵۰ سی سی رسانده شد.

۳-۳-۵-۲ سیتوکنین‌ها

برای هر هورمون یک ظرف بزرگ انتخاب گردید و تقریباً ۸۰٪ حجم نهایی مورد نیاز حلال هیدروکسید سدیم ۱ نرمال در آن ریخته شد و تنظیم کننده‌های رشد سیتوکینینی بطور جداگانه به میزان ۰/۰۵ گرم به طور جداگانه به همه ظرف اضافه شدند. در نهایت با استفاده از آب دوبار تقطیر حجم نهایی محلول‌ها به ۵۰ سی سی رسانده شد.

۳-۳-۵-۳ تهیه 2.4-D

برای تهیه محلول ۱ میلی گرم در میلی لیتر 2.4-D، ۱۰۰ میلی گرم از پودر آن در یک لوله آزمایش ریخته شد و ۲ تا ۵ میلی لیتر اتانول به آن اضافه گردید تا پودر آن حل شود. لوله به آرامی گرم شد. پس از حل شدن کامل، محلول به تدریج با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر رقیق گردید و محلول حاصل در یخچال نگهداری شد.

۳-۳-۴ تهیه یک لیتر محیط کشت

قبل از تهیه محیط کشت چنانچه هرگونه تغییررنگ یا رسوب در محلول‌های ذخیره ساخته شده وجود داشت آن محلول باید دوباره تهیه گردد. برای تهیه یک لیتر محیط کشت MS، ابتدا مقداری آب مقطر (۶۰۰ میلی‌لیتر) در داخل ارلن ریخته شد، سپس محلول‌های ذخیره‌ی عناصر ماکرو (۱۰۰ میلی‌لیتر)، عناصر میکرو (۱۰ میلی‌لیتر)، کلسیم کلراید (۱۰۰ میلی‌لیتر) و ویتامین‌ها به طور جداگانه (۱۰ میلی‌لیتر)، افزوده شدند. پس از اضافه کردن ۳۰ گرم ساکارز و ۱۰۰ میلی‌گرم میواینوزیتول، محلول به حجم نهایی ۱ لیتر رسانده شد. جهت تنظیم pH محیط کشت به ۵/۸ از NaOH یا HCL یک نرمال استفاده شد. مقدار مصرف آگار برای یک لیتر محیط ۷ تا ۸ گرم است. در این آزمایش، ۸ گرم آگار وزن شد و به محیط کشت افزوده شد. محیط کشت جهت استریل شدن در داخل اتوکلاو قرار گرفت. زمان لازم برای سترون کردن محیط کشت، ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد بود. سرانجام ظروف حاوی محیط کشت، پس از استریل به زیر هود لامینار منتقل شدند و نهایتاً محیط‌های کشت درون شیشه‌های کشت توزیع گردیدند.

۳-۴ تهیه محلول ذخیره نانوکربن

نانوکربن MWCNTs-COOH از شرکت نانو پیشگام مشهد تهیه شد، جهت تهیه استوک حاصله ابتدا ۲ گرم از این ماده وزن شد و سپس درون یک لیتر آب مقطر استریل ریخته پس از آن، محلول به مدت ۶۰ دقیقه و دمای ۳۰ درجه و فرکانس ۸۰ کیلوهرتز اولتراسونیک^۱ شد.

۳-۵ سترون کردن وسایل و محیط کشت

وجود محیط عاری از آلودگی از ضروریات کشت بافت است. به این منظور از هود لامینار استفاده شد و ابتدا سطوح داخلی آن با پنبه آغشته به الکل ۷۰ درصد تمیز شده و به مدت ۱۵ دقیقه تحت تابش نور UV قرار گرفت. البته پیش از روشن نمودن لامپ UV کلیه شیشه‌های حاوی محیط کشت و وسایل مورد نیاز مانند ظروف آب مقطر، تیغ، اسکالپل، پنس و پتری دیش توسط اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و

^۱ Ultrasonic

فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه ضد عفونی شدند. پس از انجام ضد عفونی و پیش از باز کردن درب هود، فن دستگاه به مدت ۱۰ دقیقه روشن گردید. همچنین پنس ها و اسکالپل درون الکل ۹۶ درصد قرار داده شدند، به طوری که ۱/۳ آن ها خارج از الکل بوده و قبل از استفاده روی شعله نگه داشته شده و پس از سرد شدن استفاده گردیدند.

۳-۶ ضد عفونی بذور

ابتدا بذور با آب مقطر استریل شسته شدند ، سپس به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد (v/v) قرار گرفتند و بعد از شستشوی مجدد با آب مقطر استریل، به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت ۵ درصد (v/v) قرار داده شدند. در نهایت شستشوی بذور سه مرتبه با آب مقطر استریل (هر بار یک دقیقه) شستشو گردیدند (بیس و همکاران، ۲۰۰۰).

۳-۷ بررسی اثر جوانه زنی در محیط های مختلف در تاریکی و روشنائی

بذور پس از شستشوی مجدد با آب مقطر استریل، و بعد از جذب آب اضافی اطراف بذور با استفاده از کاغذ صافی، به زیر هود منتقل و پس از ضد عفونی درون پتری حاوی محیط WA، MS و $MS \frac{1}{2}$ کشت شدند.

۳-۷-۱ بررسی جوانه زنی بذرها در محیط کشت WA

بذرها بعد از شستشو با آب مقطر استریل و خشک کردن آنها، به زیر هود انتقال داده شدند و داخل پتری دیش های حاوی محیط کشت (واتر+آگار) یا WA که یک محیط فاقد هرگونه تیمار و یا تنظیم کننده های رشد است، کشت داده شدند.

۳-۷-۲ بررسی جوانه زنی بذرها در محیط کشت MS

بذرها بعد از شستشو با آب مقطر استریل و خشک کردن آنها، به زیر هود انتقال داده شدند و داخل پتری دیش های حاوی محیط کشت MS جامد کشت داده شدند.

۳-۸ صفات اندازه‌گیری شده در تست جوانه زنی

در این آزمایش صفاتی چون درصد جوانه زنی بذور، میانگین طول ریشه‌چه و سرعت جوانه‌زنی بذور و اطلاع از آلودگی یا عدم آلودگی محیط کشت به صورت ثبت روزانه اندازه‌گیری گردید. نتایج حداکثر جوانه زنی (GMX^۱) بذور طبق فرمول (۱) بدست آمد.

$$GMX = \frac{\text{تعداد کل بذور جوانه‌زده (در آخرین روز شمارش)}}{\text{تعداد بذور}} \times 100$$

۳-۹ بررسی اثر هورمون‌های رشد (2,4.D و KIN و BAP) و اثر نانوکربن

MWCNTs بر کالوس زایی گیاه کینوا

در اولین مرحله گیاهچه‌های کینوا استریل شدند. برای تهیه گیاهچه‌های استریل بذور ابتدا با هیپوکلرید ۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شدند. بعد سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی شدند. در مرحله بعد از ناحیه هیپوکوتیل گیاهچه‌های کینوا برش‌هایی به طول ۱۰ میلی متر تهیه گردید و طی دو آزمایش فاکتوریل جداگانه در قالب طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی در محیط کشت MS غنی شده با سطوح مختلف تیمارهای هورمونی و نانوکربنی اجرا شد. تیمارهای مورد استفاده در آزمایش اول شامل نانو کربن با غلظت‌های (۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) و تیمارهای هورمونی 2,4.D (با سطوح ۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) به همراه KIN (با سطوح ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) بود. آزمایش دوم هم در شرایط محیط کشت MS با تیمار نانو کربن در غلظت‌های (۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) و اعمال تیمارهای هورمونی 2,4.D با غلظت‌های (۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) به همراه BAP (با غلظت‌های ۰، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر) اجرا گردید. در این آزمایش‌ها، تیمارها در ۳ تکرار اعمال شدند. هر دو شیشه‌ی حاوی ۵ ریز نمونه به عنوان یک تکرار در

^۱ Germinated seeds

نظر گرفته شد صفاتی چون درصد کالوس زایی، وزن کالوس، مساحت کالوس و همچنین رنگ کالوس مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۱۰ بررسی تاثیر تنظیم کننده های رشدی سیتوکینینی KIN و BAP به همراه هر یک از اکسین های IAA، IBA و NAA بر اندام زایی کینوا

به منظور بررسی اندام زایی تحت تیمارهای هورمونی، ابتدا بهترین کالوس های مرحله قبل که کالوس هایی با طول ۰/۵ تا ۱ سانتی متر و ۱۰ روزه بودند، انتخاب شدند و در قالب سه آزمایش فاکتوریل جداگانه در محیط کشت MS تیمار شده با تنظیم کننده های رشدی مختلف کشت گردیدند. فاکتورهای اعمال شده در آزمایش اول هورمون های BAP (با غلظت های ۰، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر)، KIN (با غلظت های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) و IAA (با غلظت های ۰، ۰/۱ و ۰/۲ میلی گرم در لیتر) بودند. در آزمایش دوم از هورمون های BAP (با غلظت های ۰، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر)، KIN (با غلظت های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) و IBA (با غلظت های ۰، ۰/۱ و ۰/۲ میلی گرم در لیتر) استفاده شد. آزمایش سوم نیز با اعمال هورمون های BAP (با غلظت های ۰، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر)، KIN (با غلظت های ۰، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) و NAA (با غلظت های ۰، ۰/۱ و ۰/۲ میلی گرم در لیتر) اجرا گردید. در این بخش نیز، تیمارها در ۳ تکرار اعمال گردیدند و هر دو شیشه حاوی ۵ ریز نمونه به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. در این آزمایش ها، صفاتی چون درصد شاخه زایی، تعداد و طول شاخه ها و تعداد و طول ریشه های تولید شده اندازه گیری و ثبت شد.

۳-۱۱ تجزیه تحلیل آماری

داده های حاصل از اندازه گیری صفات با نرم افزار SAS مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفت. رسم نمودارها با نرم افزار اکسل و مقایسات میانگین صفات با نرم افزار MSTATC و SAS با روش آزمون حداقل اختلافات معنی دار (LSD) انجام شد.

فصل چہارم: نتیجہ و بحث

۴-۱ آزمایش اول: ارزیابی تاثیر روشنایی و نوع محیط کشت بر جوانه زنی بذور کینوا

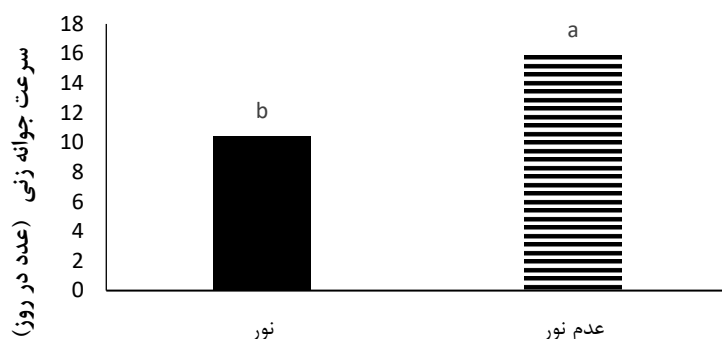
جوانه زنی بذری که عنوان یک فرآیند بیولوژیکی پیچیده، بحرانی ترین عامل تعیین کننده موفقیت یا شکست استقرار گیاه است که تحت تاثیر عوامل مختلف محیطی و ژنتیکی قرار می گیرد (کادر و جوتز ۲۰۰۴؛ مامدی و همکاران، ۲۰۱۷). نتایج جدول تجزیه واریانس داده های جوانه زنی نشان داد که در بین صفات مورد بررسی، تنها صفت سرعت جوانه زنی بذور کینوا از آثار ساده روشنایی و نوع محیط کشت به طور معنی داری (در سطح یک درصد) تاثیر پذیرفت (جدول ۴-۱).

جدول ۴-۱ نتایج تجزیه واریانس صفات مرتبط با جوانه زنی بذور کینوا تحت سطوح مختلف روشنایی و نوع محیط کشت

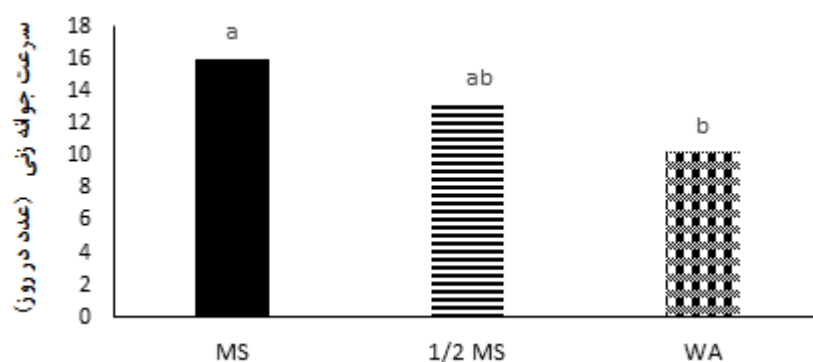
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		حداکثر جوانه زنی (GMX)	سرعت جوانه زنی	میانگین جوانه زنی
روشنایی	۱	۱/۱۵ ^{ns}	۵۶/۱۸**	۰/۵ ^{ns}
محیط کشت	۲	۳/۶۲ ^{ns}	۲۹/۱۸**	۰/۰۵ ^{ns}
روشنایی × محیط کشت	۲	۱/۰۴ ^{ns}	۸/۲۴ ^{ns}	۰/۵ ^{ns}
خطا	۱۲	۱/۸۸	۰/۹۱	۰/۲۰
ضریب تغییرات (%)		۲۰/۲۲	۷/۲۱	۶

** بیانگر معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد و ns عدم معنی داری را نشان می دهد

بر اساس نتایج مقایسه ای میانگین اثر ساده عامل روشنایی، بیشترین و کمترین سرعت جوانه زنی به ترتیب به بذور کشت شده در شرایط تاریکی، با متوسط ۱۵/۸۷ عدد بذری که جوانه زده در روز و بذور کشت شده در شرایط روشنایی با میانگین سرعت ۱۰/۰۴ عدد جوانه زنی در روز تعلق داشت (شکل ۴-۱). حسامی و همکاران (۲۰۱۶) نیز بیشترین میزان جوانه زنی بذور کینوا را در محیط کشت MS و در شرایط تاریکی گزارش نمودند. بر اساس نتایج مقایسه ای میانگین اثر ساده نوع محیط کشت، بیشترین سرعت جوانه زنی در محیط MS مشاهده شد. البته اختلاف معنی داری با محیط MS ۱/۲ با محیط MS نبود (شکل ۴-۲).



شکل ۴-۱ مقایسه میانگین سرعت جوانه زنی بذور کینوا در شرایط روشنایی و تاریکی القدامی و همکاران (۲۰۲۰)، نیز تفاوت جوانه زنی بذور کینوا را در محیط‌های کشت مختلف گزارش نمودند و آن را به تأثیر تنوع عناصر معدنی سازنده‌ی آن‌ها مرتبط دانستند. بر اساس گزارش این محققین، دلیل مطلوب بودن محیط پایه‌ی MS نسبت به سایر محیط‌ها برای جوانه زنی و رشد بذور کینوا در ارتباط با محتوای نیتروژن و پتاسیم این محیط است (القدامی و همکاران ۲۰۲۰). با در نظر گرفتن تمایل نیتروفیلی بیشتر کینوا، وجود نترات به شکل آمونیوم بیشتر در محیط MS نسبت به محیط White به رشد بهتر بذور کینوا انجامید.



شکل ۴-۲ مقایسه میانگین سرعت جوانه زنی بذور کینوا کشت شده در محیط‌های مختلف

۴-۲ کالوس زایی

ترکیب محیط پایه نقش بسیار مهمی در کالوس‌زایی، تنظیم و تحریک فرآیندهای رشدی ریزنمونه‌های کینوا دارد (برحداد و همکاران، ۲۰۰۳؛ گریگیدو و همکاران، ۲۰۰۲). در این راستا، تعادل تنظیم‌کننده‌های رشدی برونزا (به‌ویژه اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها) در شرایط محیط کشت این گیاه، تاثیر زیادی در تعیین سرنوشت مورفولوژیکی کالوس دارد.

۴-۲-۱ آزمایش دوم: بررسی تاثیر هورمون‌های رشدی (2,4-D و BAP) و

نانوکربن MWCNTs بر کالوس زایی گیاه کینوا

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، نشان داد که آثار ساده، متقابل دو جانبه و سه جانبه‌ی هر سه فاکتور نانوکربن و هورمون‌های 2,4-D و BAP در سطح احتمال یک درصد برای صفات درصد القا، محیط و وزن کالوس معنی‌دار بود. به عبارتی همه صفات مورد بررسی در بخش کالوس‌زایی به‌طور معنی‌داری از تیمارهای آزمایشی تاثیر پذیرفتند (جدول ۴-۲).

جدول ۴-۲ نتایج تجزیه واریانس صفات مرتبط با کالوس زایی گیاه کینوا از ریز نمونه‌ی هیپوکوتیل تحت سطوح مختلف

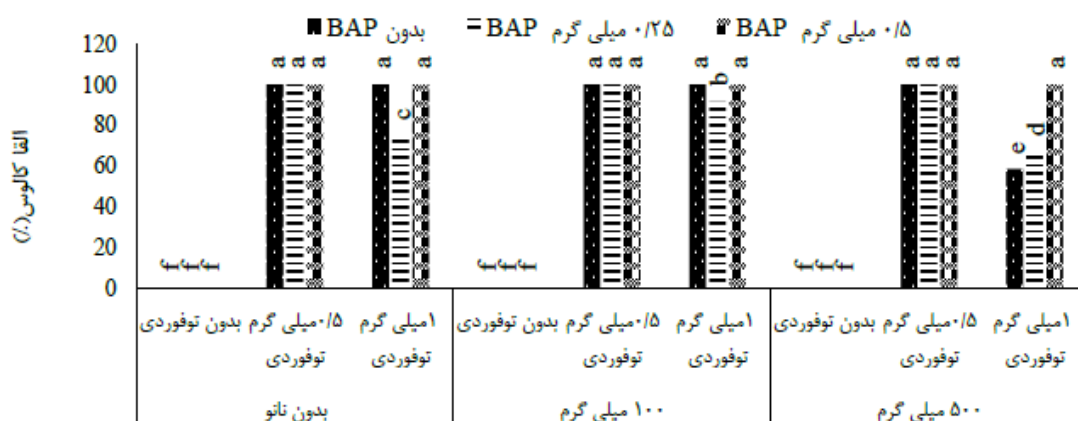
تیمار هورمون‌های 2,4-D و BAP در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نانوکربن

منابع تغییرات			درجه آزادی	میانگین مربعات
وزن کالوس	مساحت کالوس	درصد القای کالوس		
۰/۵۹**	۰/۴۳۲**	۴۰۱/۲۳**	۲	نانوکربن
۳۴/۴۷**	۰/۴۶۷**	۸۰۴۷۰/۶۷**	۲	2,4-D
۰/۳۶**	۰/۴۰۶**	۳۷۸/۰۸**	۲	BAP
۰/۱۹**	۰/۱۹۸**	۴۰۱/۲۳**	۴	نانوکربن × 2,4-D
۰/۹۹**	۰/۶۹۸**	۱۶۹/۷۵**	۴	نانوکربن × BAP
۰/۲۸**	۰/۲۸۳**	۳۷۸/۰۸**	۴	BAP × 2,4-D
۰/۶۰**	۰/۳۷۱**	۱۶۹/۷۵**	۸	نانوکربن × 2,4-D × BAP
۰/۰۰۷	۰/۰۰۳	۲۳/۱۴	۵۴	خطای آزمایش
۶/۷۰	۸/۷۱	۷/۶۷		ضریب تغییرات (/.)

** بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

۴-۲-۱-۱ درصد القای کالوس

یافته‌های مقایسه‌ای میانگین اثر متقابل سه جانبه‌ی تیمارهای نانوکربن، 2,4-D و BAP بر درصد القای کالوس در گیاه کینوا، مبین نقش تاثیرگذار هورمون 2,4-D، بر کالوس‌زایی کینوا بود به طوری که در شرایط عدم مصرف 2,4-D هیچ کالوسی در ریز نمونه‌های هیپوکوتیل کینوا تولید نگردید (شکل ۳-۴). درحالی که با مصرف این هورمون در حضور سایر تیمارها کالوس‌زایی با روند متفاوتی شروع شد. به این ترتیب که در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D، صرف نظر از سطوح متفاوت هورمون BAP و نانوکربن، همه‌ی ریز نمونه‌ها کالوس‌زایی نمودند.

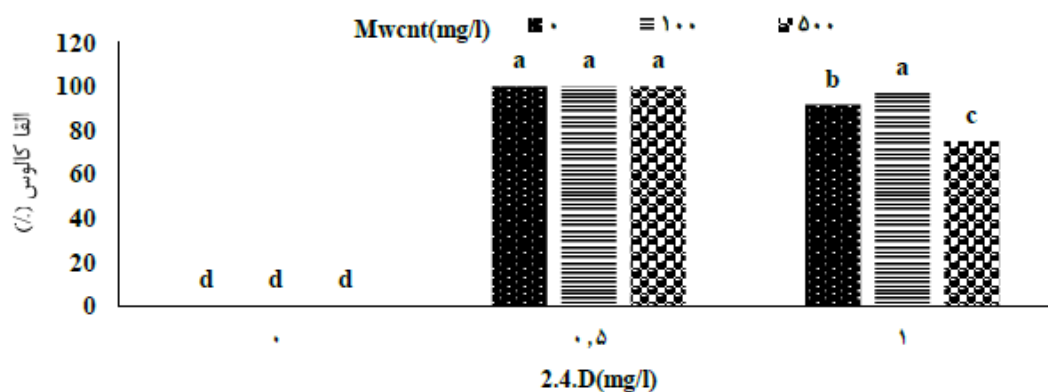


شکل ۳-۴ مقایسه میانگین میزان القای کالوس در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف نانوکربن، BAP و 2,4.D

با افزایش سطح هورمون 2,4-D، به ۱ میلی گرم در لیتر، با لاترین میزان القای کالوس (۱۰۰ درصد) در محیط حاوی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانو کربن و کمترین (عدم مصرف) و بیشترین (۰/۵ میلی گرم در لیتر) سطح هورمون BAP حاصل گردید (شکل ۳-۴). در تطابق با این پژوهش، در تحقیقی که در کالوس‌زایی نخل خرما انجام شد، اظهار گردید که اگر چه استفاده از اکسین 2,4-D برای کالوس‌زایی ضروری می‌باشد، اما اثر سمی غلظت‌های بالای 2,4-D با ایجاد پیری در ریزنمونه‌ها، نتایج رضایت بخشی را به دنبال ندارد (مسمودی و همکاران، ۱۹۹۹). بر طبق گزارش تلاحیگو و تومی (۲۰۱۷)، کاربرد غلظت ۰/۲ میلی گرم در

لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون 2,4-D به عنوان مناسب ترین ترکیب هورمونی جهت القای کالوس در کینوا معرفی شد. ایزا و همکاران (۲۰۰۵)، نیز گزارش نمودند که با اعمال تیمار هورمونی 2,4-D با غلظت ۰/۴۵ میلی گرم در لیتر، بالاترین (۸۴٪) القای کالوس در گیاه کینوا مشاهده شد. در حالی که حسامی و همکاران (۲۰۱۶)، نیز گزارش نمودند که کاربرد ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر BAP در محیط پایه ی MS، از بالاترین راندمان (۹۳/۳۳٪) القای کالوس در ریزنمونه های هیپوکوتیل کینوا برخوردار بود.

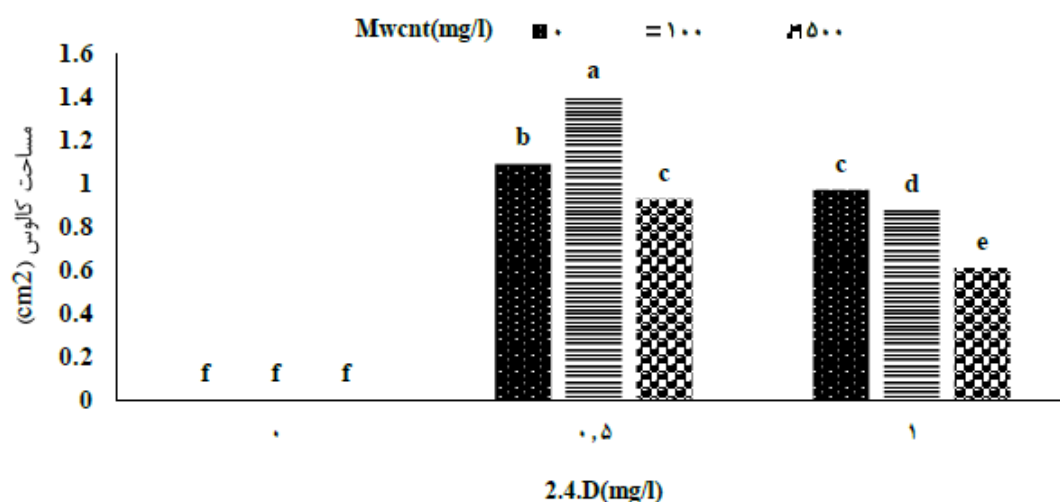
علاوه بر تیمار هورمونی 2,4-D، در تحقیقی که توسط چوتیپاجیت و همکاران (۲۰۱۸)، در برنج انجام شد، درصد القای کالوس در محیط های کشت غنی شده با نانو کربن (کروی به قطر ۴۰ تا ۶۰ نانومتر) با افزایش غلظت نانو کربن (از ۰ به ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) درصد القای کالوس از ۹۳/۷۵ به ۸۶/۵۱٪ کالوس کاهش یافت و این یافته نشان می دهد که افزودن میزان بالای نانو کربن در محیط کشت، به علت داشتن سطح تماس بالا و جذب هورمون های محیط کشت سبب کاهش القا و رشد کالوس می گردد. در حالی که کاربرد غلظت بهینه ی نانو کربن در محیط کشت، افزایش درصد القای کالوس، وزن و مساحت کالوس را در پی داشت که با یافته های این پژوهش نیز مبنی بر تاثیر مثبت کاربرد مقادیر بهینه ی نانو کربن در محیط کشت به همراه تیمارهای هورمونی مناسب، مطابقت داشت (شکل ۴-۴).



شکل ۴-۴ مقایسه میانگین میزان القای کالوس در ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف نانو کربن و 2,4-D در شرایط کاربرد سیتوکینین BAP

۴-۲-۱-۲ مساحت کالوس

با توجه به نتایج مقایسه‌ی میانگین اثرمتقابل هورمون 2,4-D و نانوکربن، مشاهده شد که علاوه بر کالوس-زایی، رشد کالوس ها نیز تحت تاثیر کاربرد سطوح مناسب اکسین و نانو کربن قرار گرفت (شکل ۴-۵).



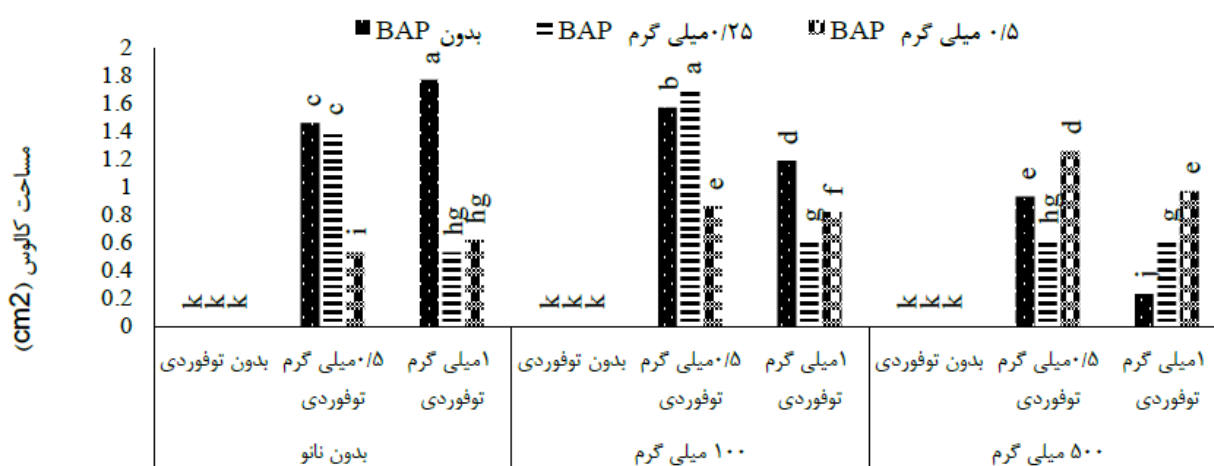
شکل ۴-۵ مقایسه میانگین مساحت کالوس های رشدیافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف نانوکربن و 2,4-D در شرایط کاربرد سیتوکینین BAP

یکی از مزایای کاربرد اکسین‌ها، تحریک فعالیت میتوزی سلول‌های ریز نمونه در شرایط کشت بافت است و کاربرد سیتوکینین‌ها در مقادیر بهینه به تحریک کالوس‌زایی کمک می‌کند.

در پژوهش حاضر، نظر به معنی‌داری اثر متقابل سه جانبه‌ی تیمارهای آزمایش (2,4-D، BAP، نانو کربن) بر تغییرات مساحت کالوس های رشد یافته از ریز نمونه‌های هیپوکوتیل، مناسب‌ترین ترکیب تیماری جهت افزایش این صفت، در شرایط کاربرد سطوح بالا (۱ میلی‌گرم در لیتر) و متوسط (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) هورمون 2,4-D به ترتیب به همراه عدم مصرف و مصرف ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BAP در محیط‌های کشت عاری از نانوکربن و غنی شده با سطح متوسط نانو کربن (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) حاصل شد (شکل ۴-۶). نتایج حاصله همچنین نشان داد که با افزایش غلظت نانو کربن به ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر

روند رشد کالوس ها و در نتیجه، مساحت آن ها در اغلب ترکیبات هورمونی به طور معنی داری کاهش داشت (شکل ۴-۶).

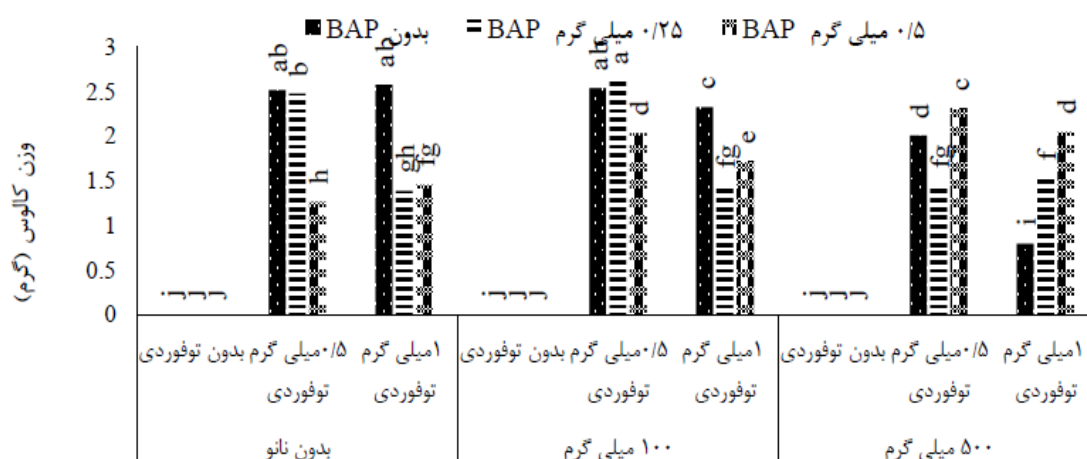
بنابر گزارش تلاحیگو وتومی (۲۰۱۷)، قطورترین کالوس های رشد یافته از ریز نمونه های هیپوکوتیل کینوا، در شرایط کاربرد ۰/۲ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D، تولید گردیدند که این نتیجه با یافته های ایزا و همکاران (۲۰۰۵)، در گیاه کینوا مطابقت داشت.



شکل ۴-۶ مقایسه میانگین مساحت کالوس های رشد یافته از ریز نمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف نانوکربن، 2,4-D و BAP

۴-۲-۱-۳ وزن کالوس

با عنایت به معنی دار شدن اثر متقابل سه جانبه ی تیمارهای مورد بررسی، مقایسه میانگین برهم کنش سه جانبه ی تیمارها نشان داد که در شرایط عدم مصرف نانوکربن در محیط کشت، وزین ترین کالوس ها در محیط های کشت حاوی ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D، به تنهایی (۲/۵۷ گرم) و یا با مصرف ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP، (۲/۵۳ گرم) تولید گردیدند (شکل ۴-۷).



شکل ۴-۷ مقایسه میانگین وزن کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف نانوکربن، 2,4-D و BAP

نتایج ارزیابی مقایسه‌ی میانگین ترسیم شده در شکل (۴-۷) نشان داد که ریز نمونه‌های کشت داده شده در محیط‌های غنی شده با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوکربن، با تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، به تنهایی (۲/۵۱ گرم) و یا در ترکیب با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (۲/۶ گرم) نیز کالوس هایی با بیشترین وزن را تولید نمودند. این در حالی است که کاربرد ترکیبات هورمونی مذکور در محیط‌های کشت حاوی سطوح بالاتر نانوکربن (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، در افزایش وزن کالوس های تولیدی موفق نبوده و نتایج آماری مشابهی را موجب نگردیدند (۴-۷). حسامی و همکاران (۲۰۱۶)، نیز گزارش نمودند که حداکثر وزن کالوس (۱/۲۲ گرم) در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه مقادیر جزئی (۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر) سیتوکنین، BAP به دست آمد.

۴-۲-۲ آزمایش سوم: بررسی تاثیر هورمون‌های رشدی (2,4-D و KIN) و نانوکربن MWCNTs بر

کالوس زایی گیاه کینوا

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، بیانگر معنی‌داری آثار ساده، متقابل دو جانبه و سه جانبه‌ی کلیه‌ی فاکتورهای مورد بررسی (نانوکربن و هورمون‌های 2,4-D و KIN) در سطح احتمال یک درصد برای صفات درصد

القای کالوس، محیط و وزن کالوس بود. به عبارتی صفات مورد بررسی در بخش کالوس‌زایی به‌طور معنی-داری از تیمارهای اعمال شده تاثیر پذیرفتند (جدول ۳-۴).

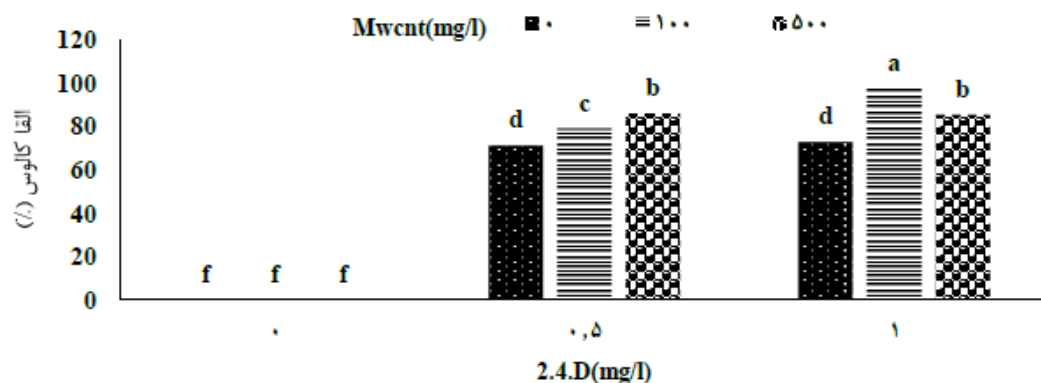
جدول ۳-۴ نتایج تجزیه واریانس صفات مرتبط با کالوس‌زایی گیاه کینوا از ریز نمونه‌ی هیپوکوتیل تحت سطوح مختلف تیمار هورمون‌های 2,4-D و KIN در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نانوکربن

منابع تغییرات			درجه آزادی		میانگین مربعات	
					محیط کالوس	وزن کالوس
					درصد القای کالوس	
نانوکربن	۲	۳۰۲۵/۰۱**	۰/۴۲**	۰/۳۵**		
2,4-D	۲	۶۷۱۱۹/۴۴**	۸/۱۹**	۳۹/۶۶**		
KIN	۳	۲۸۹۶/۹۱**	۰/۹۲**	۰/۶۲**		
نانوکربن × 2,4-D	۴	۷۴۴/۴۴**	۰/۱۹۸**	۱/۰۱**		
نانوکربن × KIN	۶	۲۲۲۳/۷۶**	۰/۷۲**	۲/۰۱**		
KIN × 2,4-D	۶	۱۵۶۵/۴۳**	۰/۳۲**	۰/۳۱**		
نانوکربن × 2,4-D × KIN	۱۲	۱۸۸۹/۵۰**	۰/۳۴**	۰/۸۷**		
خطای آزمایش	۷۲	۳۰/۵۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۶		
ضریب تغییرات(%)		۹/۶۶	۷/۹۳	۶/۷۴		

** بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد

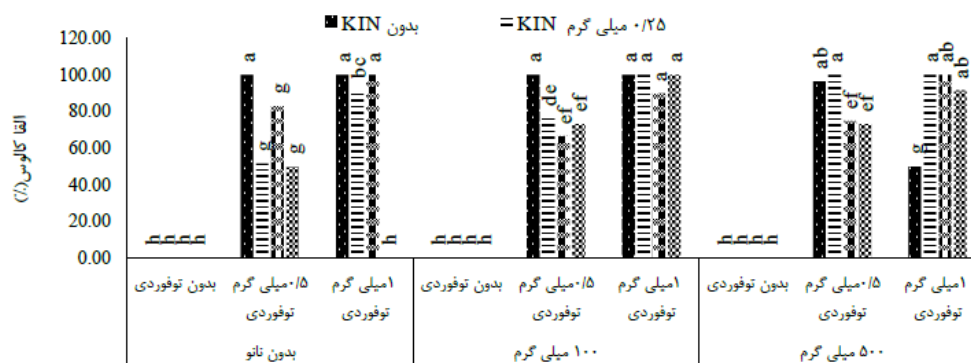
۴-۲-۱-۲ درصد القای کالوس

نتایج مقایسه‌ی میانگین غلظت‌های مختلف هورمون‌های 2,4-D و سطوح نانوکربن، نشان داد که کاربرد ترکیب تیماری ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D، در محیط MS غنی شده با ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوکربن، سبب بالاترین میزان القای کالوس (۹۷ درصد)، در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل کینوا بود (شکل ۴-۸).



شکل ۴-۸ مقایسه میانگین میزان القای کالوس در ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف نانوکربن و 2,4-D در شرایط کاربرد سیتوکینین KIN

همچنین کاربرد سطوح مختلف تیمار نانوکربن (۱۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم)، در هر یک از سطوح ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر از اکسین 2,4-D، درصد القای کالوس را به طور معنی داری نسبت به شرایط عدم مصرف نانوکربن در محیط کشت، بهبود بخشید (شکل ۴-۸). در بررسی برهم کنش ترکیبات سه جانبه ای انواع هورمون و سطوح نانوکربن مشخص گردید که همانند نتایج حاصله از آزمایش قبل هیچ کالوسی، از ریز نمونه های هیپوکوتیل کشت شده در محیط های فاقد اکسین 2,4-D، حاصل نگردید (شکل ۴-۹). با این حال در شرایط کاربرد سیتوکینین KIN، کاربرد بالاترین سطح هورمون 2,4-D (۱ میلی گرم در لیتر)، به همراه ترکیب تیماری سطوح مختلف دو عامل KIN و نانوکربن، در مجموع نتایج رضایت بخش تری را در زمینه ی تولید کالوس نشان داد (شکل ۴-۹).

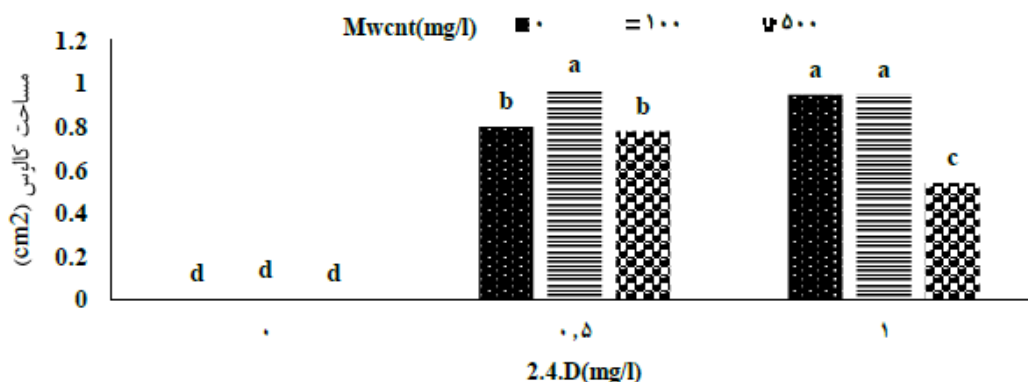


شکل ۴-۹ مقایسه میانگین میزان القای کالوس در ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف نانوکربن، KIN و 2,4-D

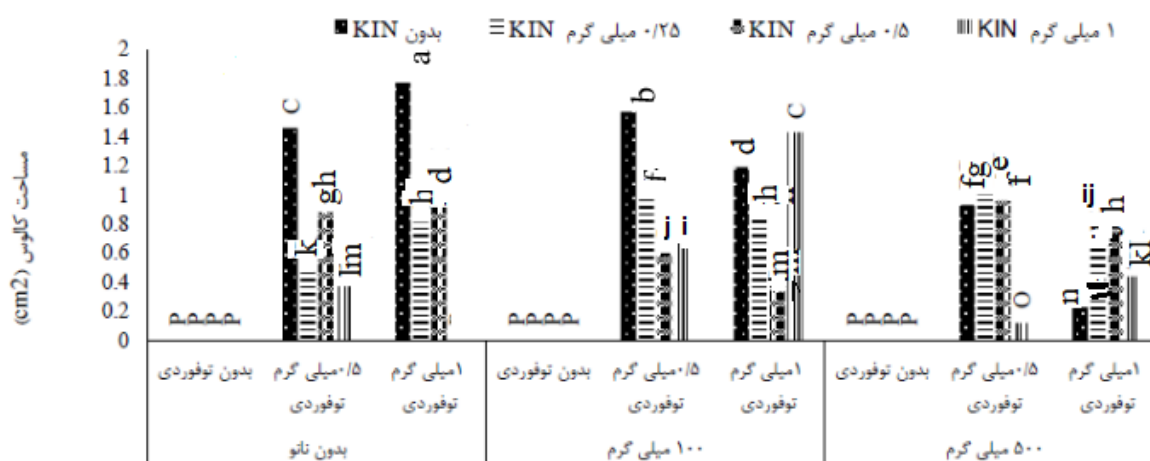
علاوه براین، اگرچه در ریز نمونه های کشت شده در سطوح مختلف تیمار نانوکربنی، الگوی یکسانی از نظر کالوس زایی مشاهده نگردید، با این حال، در پی افزایش غلظت نانوکربن در محیط کشت، در شرایط اعمال هورمون 2,4-D، به ویژه با کاربرد سطوح مختلف سیتوکنین KIN، درصد کالوس زایی دچار افت معنی داری در عملکرد نشد (شکل ۴-۹). نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج حسامی و همکاران (۲۰۱۶)، مبنی بر تاثیر مثبت افزودن مقداری سیتوکنین در محیط دارای اکسین و دریافت پاسخ منطبق بود، اما به لحاظ غلظت هورمون های بکار رفته کمی متفاوت بود. الخیری و همکاران (۱۹۹۲)، نیز بر تاثیر مثبت کاربرد KIN، به همراه 2,4-D، در کالوس زایی اسفناج (*Spinacia Oleraceal.*) تاکید نمودند.

۴-۲-۲-۲ مساحت کالوس

براساس نتایج مقایسه ای میانگین اثر متقابل دو جانبه ای تیمارهای 2,4-D و نانوکربن، اعمال ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوکربن در محیط کشت ریز نمونه های هیپوکوتیل کینوا در هر دو سطح ۰/۵ و ۱ میلی گرم از هورمون 2,4-D بالاترین میزان این صفت را تولید نمود (شکل ۴-۱۰). با این وجود، کاربرد بالاترین سطح هورمون 2,4-D به تنهایی (در شرایط عدم مصرف تیمار نانوکربن در محیط)، نیز توانست این برتری را به لحاظ آماری حفظ نماید (شکل ۴-۱۰).



شکل ۴-۱۰ مقایسه میانگین مساحت کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف نانوکربن و 2,4.D در شرایط کاربرد سیتوکینین KIN در بررسی نتایج مقایسه‌ی میانگین‌های حاصل از اثر متقابل سه جانبه‌ی تیمارهای مورد بررسی بر این صفت مشخص گردید که با افزایش سطح نانوکربن در محیط کشت، میزان رشد کالوس ها به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۴-۱۱) و در اغلب ترکیبات هورمونی به کار رفته در این پژوهش، کالوس های رشد یافته تحت سطوح بالا و متوسط 2,4-D، در شرایط عدم حضور KIN از مساحت بالاتری برخوردار بودند (شکل ۴-۱۱).



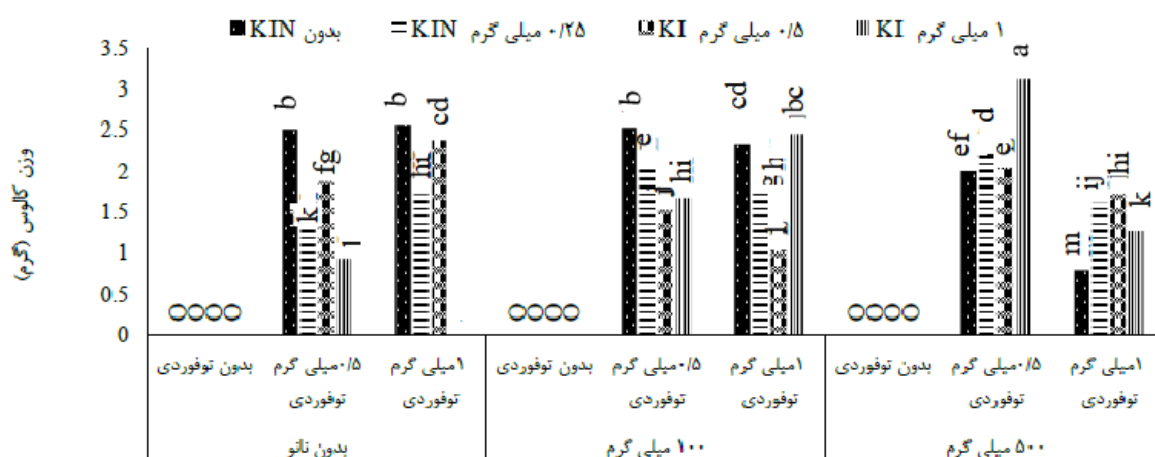
شکل ۴-۱۱ مقایسه میانگین مساحت کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف نانوکربن، 2,4.D و KIN

با این حال، در بین سطوح مختلف کاربرد سیتوکنین KIN، در شرایط کاربرد غلظت ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر از این هورمون، روند رشد کالوس ها از ثبات بیشتری برخوردار بود (شکل ۴-۱۱). سیتوکنین ها در محیط کشت غالباً برای تحریک رشد و نمو به کار می روند و همراهی آن ها با اکسین ها در محیط کشت، تقسیم سلولی را سرعت می بخشد، به طوری که مراحل اولیه ی چرخه ی سلولی به هر دو تنظیم کننده نیاز دارد (ورنر، ۲۰۰۹).

حسامی و همکاران (۲۰۱۶)، بیان داشتند که میزان بقای کالوس های کوچک در مقایسه با کالوس های بزرگتر و با تعداد سلول بیشتر، کمتر است. دراین راستا ایزا و همکاران (۲۰۰۵)، گزارش نمودند که مساحت قابل قبول کالوس های تولید شده از ریز نمونه های هیپوکوتیل کینوا در محیط پایه MS، با حضور سطوح بالاتر اکسین ها (سطح ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D) و سطوح پایین سیتوکنین KIN، مشاهده گردید.

۴-۲-۲-۳ وزن کالوس

با توجه به نتایج مقایسه ی میانگین اثر متقابل سه جانبه ی، 2,4-D و KIN و نانوکربن، وزین ترین کالوس ها (۳/۱۲۵ گرم) در محیط کشت حاوی بالاترین میزان نانوکربن (۵۰۰ میلی گرم در لیتر)، به همراه کاربرد ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی گرم در لیتر KIN به دست آمد (شکل ۴-۱۲). در همین شرایط (محیط غنی شده با ۵۰۰ میلی گرم در لیتر نانوکربن)، با افزایش غلظت 2,4-D در محیط کشت به ۱ میلی گرم در لیتر، در کلیه ی سطوح اعمال هورمون KIN، افت معنی داری در صفت وزن کالوس مشاهده شد. که این افت (۰/۸ گرم)، در شرایط عدم مصرف KIN در محیط کشت چشمگیرتر بود (شکل ۴-۱۲).



شکل ۴-۱۲ مقایسه میانگین وزن کالوس های رشد یافته از ریز نمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف نانوکربن، 2,4-D و KIN

با این وجود در شرایط عدم مصرف نانوکربن و نیز کاربرد سطح متوسط این تیمار (۱۰۰ میلی گرم در لیتر)، با افزایش سطح اکسین (۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D)، روند متفاوتی مشاهده شد و کالوس های حاصله، در مجموع از متوسط افت کمتری در وزن کالوس برخوردار بودند (شکل ۴-۱۲). به طوری که در شرایط کاربرد ۱۰۰ میلی گرم در لیتر نانوکربن در محیط کشت، با افزایش سطح هورمون اکسین به ۱ میلی گرم در لیتر، به همراه افزایش سطح KIN (کاربرد ۱ میلی گرم در لیتر) نه تنها هیچ کاهشی در وزن کالوس مشاهده نگردید، بلکه کالوس های حاصله افزایش وزن معنی داری را نسبت به ترکیبات هورمونی (KIN×2,4-D) مشابه در سطوح دیگر نانوکربن نشان دادند (شکل ۴-۱۲). حسامی و همکاران (۲۰۱۶)، نیز تولید وزین ترین کالوس های حاصل از ریز نمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا را در محیط MS، حاوی هر دو هورمون 2,4-D (۲ میلی گرم در لیتر) و KIN (۰/۵ میلی گرم در لیتر)، گزارش نمودند.

۴-۳- اندام زایی

۴-۳-۱ آزمایش چهارم: بررسی اثر تنظیم کننده های رشد IAA، KIN و

BAP بر اندام زایی گیاه کینوا

۴-۳-۱-۱ شاخه زایی

نتایج جدول تجزیه واریانس درصد شاخه زایی کالوس های حاصل از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا بیانگر معنی داری آثار ساده ی هریک از تیمارهای هورمونی (KIN، BAP و IAA)، در سطح احتمال یک درصد برای این صفت بود (جدول ۴-۴). همچنین کلیه ی آثار متقابل دوجانبه و سه جانبه ی تیمارهای هورمونی نیز در سطح احتمال یک درصد معنی دار بودند (جدول ۴-۴).

جدول ۴-۴ نتایج تجزیه واریانس صفات شاخه زایی و ریشه زایی گیاه کینوا در شرایط کشت بافت تحت تاثیر هورمون های

میانگین مربعات					درجه آزادی	منابع تغییرات
طول ریشه	تعداد ریشه	طول شاخه	تعداد شاخه	درصد شاخه زایی		
۵۶/۲۵**	۵/۲۷**	۱۳۸/۱۶**	۴۵/۴۱**	۱۰۵۸۸**	۲	KIN
۱۰۶/۲۵**	۴۲/۹۷**	۱۲۳/۰۴**	۳۶/۰۸**	۸۶۱۳**	۲	BAP
۵۴/۱۱**	۷۰/۶۰**	۶۳/۸۶**	۱۴/۳۰**	۳۳۰۵**	۲	IAA
۷۱/۷۴**	۸/۰۶**	۴۲/۷۷**	۱۸/۰۳**	۲۹۳۵**	۴	KIN × BAP
۳۲/۶۴**	۱۰/۱۹**	۱۶/۸۶**	۳/۹۷**	۸۹۸**	۴	KIN × IAA
۱۲/۲۵*	۲/۴۸ ^{NS}	۲۵/۵۸**	۴/۰۳**	۸۳۶**	۴	BAP × IAA
۷/۷۹**	۱/۲۴ ^{NS}	۷/۷۵**	۱/۲۸**	۲۵۰**	۸	KIN × BAP × IAA
۱/۴۸	۱/۰۱	۰/۵۲	۰/۱۴	۳۰/۸۴	۵۴	خطا آزمایش
۲۳/۴۷	۳۰/۰۸	۲۹/۹۳	۳۰/۲۱	۲۶/۹۹		ضریب تغییرات (%)

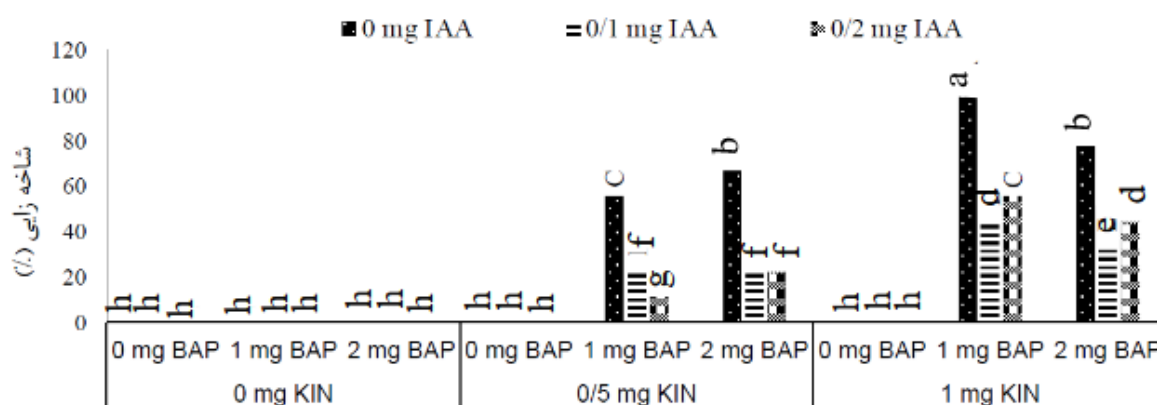
IAA، KIN و BAP

* و ** به ترتیب بیانگر معنی داری در سطح ۵ و ۱ درصد و NS عدم معنی دار را نشان می دهد.

در پژوهش حاضر، نتایج مقایسه ی میانگین برهم کنش سه تیمار هورمونی بر درصد شاخه زایی گیاه کینوا،

نشان داد که بیشترین درصد شاخه زایی (۱۰۰ درصد) در محیط های کشت تیمار شده با ترکیب تیماری ۱

میلی گرم در لیتر KIN به همراه ۱ میلی گرم در لیتر BAP، در شرایط عدم حضور IAA به دست آمد (شکل ۴-۱۳). کاربرد مقادیر ۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر KIN، به همراه ۲ میلی گرم در لیتر BAP، هر دو در شرایط عدم حضور IAA، نیز به ترتیب با القای ۷۸ و ۶۷ درصد شاخه‌زایی در رتبه دوم ترکیبات تیماری مؤثر بر این صفت قرار گرفت (شکل ۴-۱۳). با توجه به نتایج، در محیط‌های کشت تیمار نشده با سیتوکنین KIN، در هیچ یک از ترکیبات تیماری دو هورمون BAP و IAA، شاخه‌زایی اتفاق نیفتاد. ضمن این که عدم مصرف BAP، در هریک از دو شرایط مصرف ۰/۵ و ۱ میلی گرم KIN، در کلیه سطوح مصرف و عدم مصرف IAA نیز نتیجه مشابهی را ایجاد نمود (شکل ۴-۱۳).

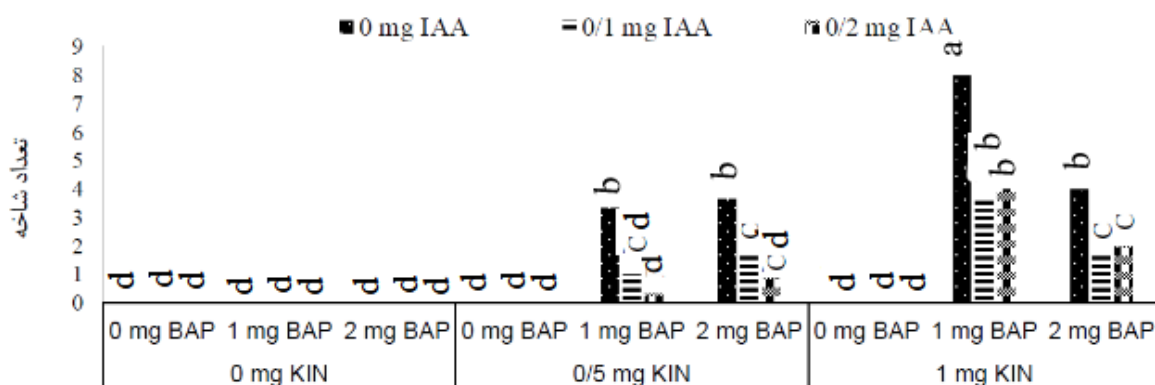


شکل ۴-۱۳ مقایسه میانگین میزان شاخه‌زایی در کالوس‌های رشد یافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف BAP، KIN و IAA

به طور کلی، در واکنش‌های هورمونی، ممکن است یک هورمون اثر هورمون دیگر را تشدید یا خنثی کند و مشخص شده است که هورمون‌ها روی هم اثر متقابل داشته و آثار یکدیگر را تقویت می‌کنند (دل پوزا و همکاران، ۲۰۰۵). طبق گزارش لمادی و همکاران (۲۰۰۶) و رامیرز و همکاران (۲۰۰۱)، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ضمن تاثیرگذاری بر تکثیر سلول‌ها در شرایط محیط کشت، در کنترل اندام‌زایی نیز مؤثر هستند. در پژوهش انجام شده توسط حسامی و همکاران (۲۰۱۶)، بر تاثیر مثبت کاربرد سیتوکنین‌های BAP (با میزان ۱ میلی گرم در لیتر) و KIN (با میزان ۱ میلی گرم در لیتر) به همراه سطوح کم اکسین در القای شاخه‌زایی ۸۷ درصدی در کالوس‌های کینوا تاکید شد.

۴-۳-۱-۲ تعداد شاخه

نتایج تجزیه واریانس داده‌های صفت تعداد شاخه نشان داد که اثر ساده و آثار متقابل دو و سه جانبه‌ی هر سه فاکتور (KIN، BAP و IAA)، در سطح احتمال یک درصد برای این صفت معنی‌دار بود (جدول ۴-۴). بر این اساس، نتایج مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل سه جانبه‌ی تیمارهای هورمونی بر تغییرات تعداد شاخه‌ی تولید شده، نشان دهنده‌ی برتری کاربرد ترکیب تیماری ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN و BAP، و عدم کاربرد IAA، در افزایش (۸ عدد) معنی‌دار این صفت، نسبت به سایر ترکیبات تیماری بکار رفته در این پژوهش بود (شکل ۴-۱۴). با توجه به نتایج، در کلیه‌ی سطوح مصرف هورمون‌های سیتوکینینی KIN و BAP، تعداد شاخه‌های تولید شده در شرایط عدم اعمال IAA، به طور معنی‌داری نسبت به سطوح مصرف این هورمون افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۴-۱۴).



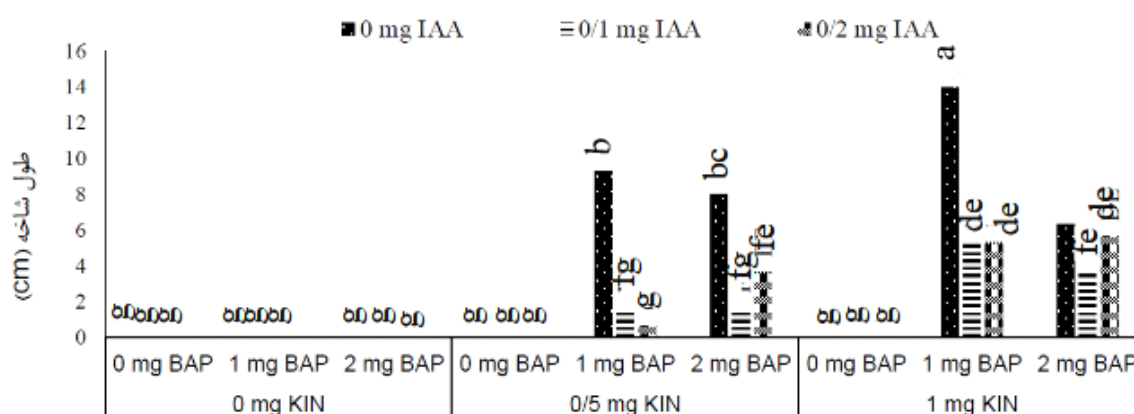
شکل ۴-۱۴ مقایسه میانگین تعداد شاخه‌های تولید شده از کالوس‌های رشد یافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف KIN، BAP و IAA

با این حال در بالاترین سطح اعمال KIN (۱ میلی‌گرم در لیتر)، در شرایط کاربرد ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، در ترکیب با سطوح مختلف مصرف IAA (۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر)، میزان افت تعداد شاخه نسبت به ترکیبات تیماری ۱ و ۰/۵ گرم در لیتر KIN و سطوح ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و عدم مصرف IAA، تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل ۴-۱۴). احمد و همکاران (۱۹۹۹)، نیز با تحقیق در

کشت بافت گیاه کینوا، گزارش کردند که اعمال ۱ میلی گرم در لیتر BAP، در محیط کشت، به تولید حداکثر تعداد شاخه (۳-۴ عدد) در این گیاه منجر شد. در حالی که رگلا دو و همکاران (۲۰۲۰)، تعداد شاخه های تولید شده در دو رقم کینوای چایلو و ویلا را تحت کاربرد تیمار هورمونی ۲ میلی گرم در لیتر BAP، به طور متوسط به ترتیب ۷/۹۶ و ۴/۱۰ عدد گزارش نمودند.

۴-۳-۱-۳ طول شاخه

با عنایت به معنی دار شدن کلیه آثار ساده، متقابل دو و سه جانبه ترکیبات هورمونی (KIN، BAP و IAA)، بر طول شاخه ی ثبت شده در این پژوهش، نتایج مقایسه ی میانگین برهم کنش سه جانبه ی کلیه تیمارها نشان داد که طویل ترین شاخه ها (۱۴ سانتی متر) تحت اعمال ترکیب تیماری ۱ میلی گرم در لیتر KIN و BAP، در شرایط عدم حضور IAA تولید گردیدند که الگوی هم روندی را با افزایش تعداد شاخه کینوا در شرایط مشابه، نشان داد (جدول ۴-۴، شکل ۴-۱۵).



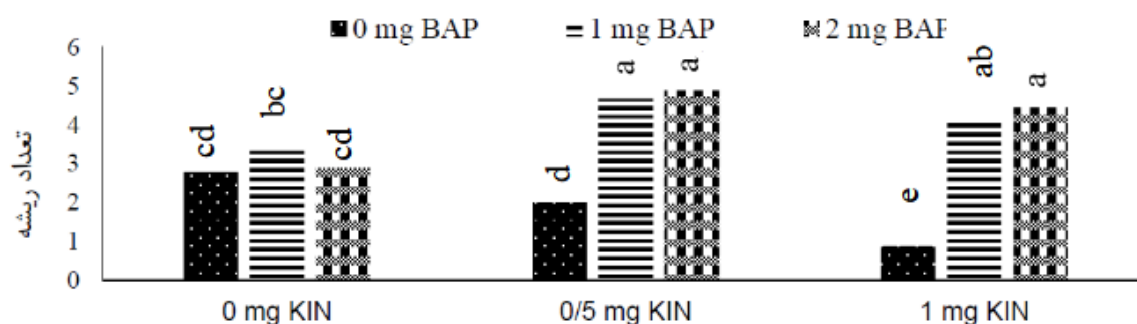
شکل ۴-۱۵ مقایسه میانگین طول شاخه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف BAP، KIN و IAA

بر اساس نتایج حاصله، کاربرد ترکیبات هورمونی ۰/۵ میلی گرم در لیتر KIN، به همراه ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر BAP، در شرایط عدم مصرف IAA، نیز به ترتیب با تولید شاخه هایی به طول (۹/۳ و ۸ سانتی متر) به طور مشترک در رتبه دوم تولید شاخه های طویل قرار گرفتند (شکل ۴-۱۵). هبا شاهین (۲۰۱۹)، و

القدامی و همکاران (۲۰۲۰)، نیز به طور جداگانه به تاثیر مثبت کاربرد KIN و BAP، در طولیل شدن شاخه های کینوا در محیط کشت اشاره کردند.

۴-۳-۱-۴ تعداد ریشه

بر اساس نتایج تجزیه واریانس صفت تعداد ریشه، در بین منابع تغییر مختلف، تنها آثار ساده‌ی هر یک از هورمون‌های (KIN، BAP و IAA)، و برهم‌کنش دو جانبه‌ی KIN با دو هورمون BAP و IAA بر این صفت در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴-۴). بر اساس نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین تعداد ریشه‌های تولید شده در اثر برهم‌کنش ترکیبات تیماری BAP و KIN، کمترین تعداد ریشه در شرایط اعمال ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN و عدم مصرف BAP تولید گردید (شکل ۴-۱۶). در حالی که بیشترین تعداد ریشه به طور مشترک در سطوح اعمال ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN، در ترکیب با هر دو سطح مصرف BAP (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، مشاهده شد (شکل ۴-۱۶).

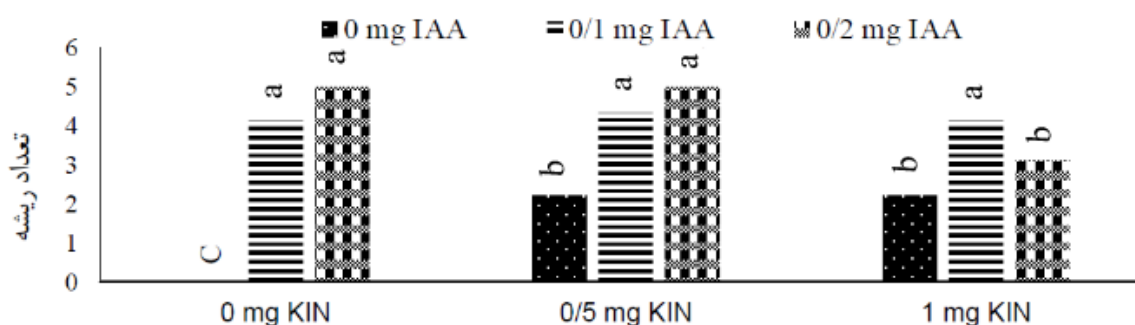


شکل ۴-۱۶ مقایسه میانگین تعداد ریشه‌ی تولید شده از کالوس‌های رشد یافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا

تحت تیمار غلظت‌های مختلف KIN و BAP

علاوه براین، یافته‌های مقایسه میانگین اثر متقابل هورمون‌های KIN و IAA، نشان داد که صفت تعداد ریشه، در کلیه‌ی سطوح مصرف و عدم مصرف KIN، در شرایط کاربرد هورمون IAA، نسبت به شرایط عدم کاربرد این هورمون افزایش معنی‌داری داشت. هرچند میزان این افزایش بین دو سطح (۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم

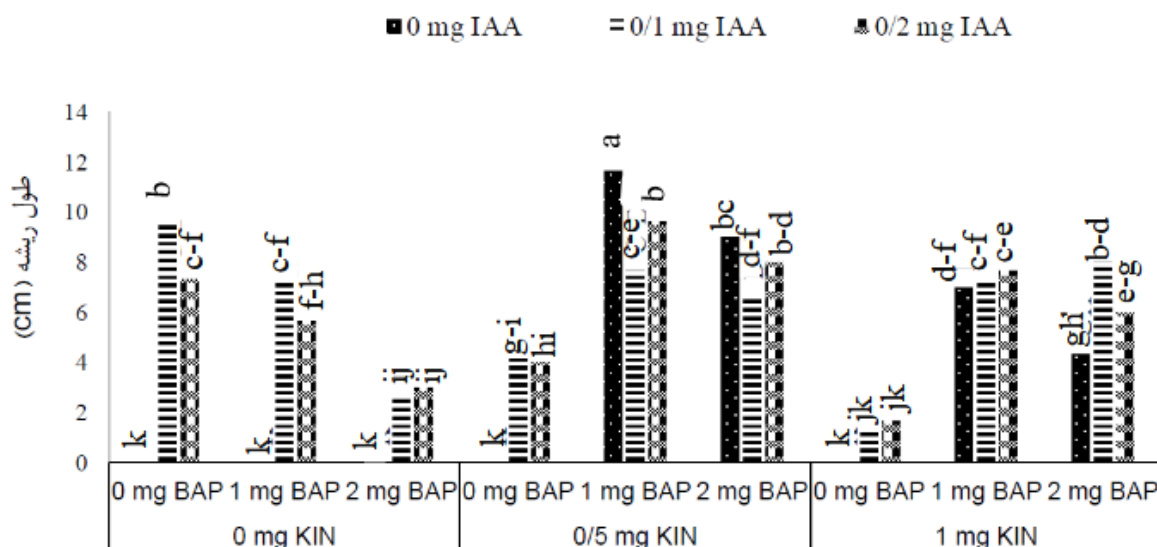
در لیتر) کاربرد این اکسین معنی‌دار نبود و مشترکا در گروه برتر آماری از نظر تولید تعداد بیشتر ریشه قرار داشتند (شکل ۴-۱۷).



شکل ۴-۱۷ مقایسه میانگین تعداد ریشه‌ی تولید شده از کالوس‌های رشدیافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف KIN و IAA
با این حال این روند در ترکیب تیماری ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN، به همراه مصرف ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IAA، مشاهده نشد. همچنین براساس نتایج در محیط‌های کشت فاقد هر دو هورمون KIN و IAA، هیچ ریشه‌ای تولید نگردید (شکل ۴-۱۷). ایزا و همکاران (۲۰۰۵)، نیز بر تاثیر مثبت کاربرد هورمون IAA، بر ریشه‌زایی ریزنمونه‌های کینوا در شرایط کشت بافت تاکید نمودند.

۴-۳-۱-۵ طول ریشه

نتایج تجزیه واریانس داده‌های طول ریشه نشان داد که به استثنای برهم‌کنش دو هورمون BAP و IAA، که در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود، سایر آثار ساده و متقابل دو و سه جانبه‌ی تیمارهای هورمونی (KIN، BAP و IAA)، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند (جدول ۴-۴). بر این اساس، نتایج مقایسه‌ی میانگین این صفت نشان داد که بر طبق نمودار (۴-۱۸)، طول‌ترین ریشه‌ها در محیط حاوی ترکیبات هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN، به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، در شرایط عدم مصرف IAA، تولید شدند.



شکل ۴-۱۸ مقایسه میانگین طول ریشه های رشد یافته از کالوس های ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف IAA, BAP و KIN

همچنین کاربرد ۰/۱ میلی گرم در لیتر IAA به تنهایی و نیز ترکیب تیماری ۰/۵ میلی گرم در لیتر KIN، ۱ میلی گرم در لیتر BAP و بالاترین سطح اکسین IAA (۰/۲ میلی گرم در لیتر) نیز توانستند با کسب رتبه دوم، در تولید ریشه های طویل موفق عمل کنند (شکل ۴-۱۸). علاوه بر این مشخص گردید که با افزایش غلظت KIN، از ۰/۵ به ۱ میلی گرم در لیتر در کلیه سطوح مصرف BAP، به ویژه در شرایط مصرف ۰/۲ میلی گرم در لیتر IAA و عدم مصرف آن، ریشه های تولید شده، از متوسط طول کمتری برخوردار بودند (شکل ۴-۱۸). حسامی و همکاران (۲۰۱۶)، نیز کاربرد غلظت های بهینه ای اکسین ها به همراه سیتوکینین ها را در تولید و رشد ریشه ها مؤثر دانستند.

۴-۳-۲ آزمایش پنجم: بررسی اثر تنظیم کننده های رشد IBA، KIN و

BAP بر اندامزایی گیاه کینوا

۴-۳-۲-۱ شاخه زایی

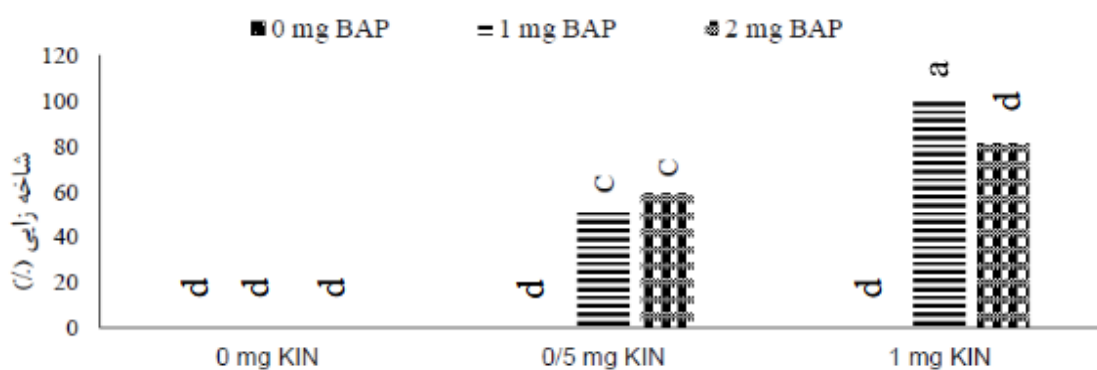
نتایج تجزیه واریانس صفت درصد شاخه‌زایی، بیانگر معنی‌داری اثر ساده‌ی هر یک از هورمون‌های (IBA، KIN و BAP)، در سطح احتمال یک درصد بود. همچنین آثار متقابل دو جانبه‌ی تیمار KIN با هورمون‌های BAP و IBA نیز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند (جدول ۴-۵).

جدول ۴-۵ نتایج تجزیه واریانس صفات شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گیاه کینوا در شرایط کشت بافت تحت تاثیر هورمون‌های IBA، KIN و BAP

میانگین مربعات					درجه آزادی	منابع تغییرات
طول ریشه	تعداد ریشه	طول شاخه	تعداد شاخه	درصد شاخه‌زایی		
۵۲/۲۶**	۱۸/۳۹**	۳۰۸/۲۰**	۸۱/۰۶**	۲۵۱۱۵**	۲	KIN
۵۷/۴۹**	۱۶/۲۰**	۲۹۲/۹۲**	۷۱/۲۷**	۲۱۴۹۳**	۲	BAP
۲۹۱/۴۹**	۸۳/۹۱**	۹/۵۶**	۱/۵۹**	۳۴۲**	۲	IBA
۴۰/۱۰**	۷/۴۹**	۱۰۱/۰۷**	۲۷/۲۰**	۶۶۸۰**	۴	KIN × BAP
۱۸/۴۹**	۲/۶۲**	۹/۹۵**	۲/۱۴**	۲۸۱**	۴	KIN × IBA
۴۰/۰۶*	۵/۰۸**	۴/۲۶**	۱/۱۲*	۱۱۶ ^{ns}	۴	BAP × IBA
۲۵/۶۳ ^{ns}	۳/۴۱**	۳/۹۵**	۰/۹*	۱۷۹ ^{ns}	۸	KIN × BAP × IBA
۴/۲۷	۰/۷۴	۰/۸۵	۰/۳۲	۹۶/۰۳	۵۴	خطا آزمایش
۲۸/۲۷	۲۴/۸۹	۲۵/۶۰	۳۰/۵۱	۳۰/۰۱		ضریب تغییرات (%)

* و ** به ترتیب بیانگر معنی‌داری در سطح ۵ و ۱ درصد و ns عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.

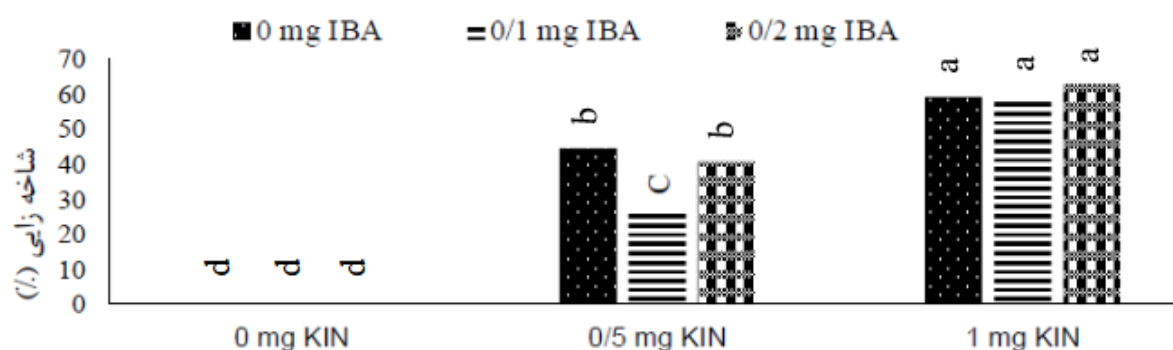
نتایج مقایسه‌ی میانگین برهم‌کنش دو تیمار سیتوکینینی KIN و BAP بر درصد شاخه‌زایی کینوا نشان داد که بیشترین میزان این صفت (۱۰۰ درصد) در تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد (شکل ۴-۱۹). همچنین در بالاترین سطح مصرف KIN (۱ میلی‌گرم در لیتر)، کاربرد ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، درصد شاخه‌زایی را تا میزان ۸۱/۴۸ درصد کاهش داد.



شکل ۴-۱۹ مقایسه میانگین میزان شاخه‌زایی در کالوس‌های رشدیافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف BAP و KIN

بر اساس نتایج، عدم مصرف KIN در کلیه سطوح مصرف و عدم مصرف BAP هیچ‌گونه شاخه‌زایی را القاء نکرد (شکل ۴-۱۹). ریگلادو و همکاران (۲۰۲۰)، نیز با کاربرد توام سیتوکنین‌های KIN و BAP در حضور یک اکسین، درصد شاخه‌زایی ۹۳ درصد، را برای رقم کوهستانی کینوا گزارش نمودند. جورج و همکاران (۲۰۰۰)، در بررسی نقش هورمون BAP در القاء شاخه‌زایی، محدوده ۱ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر را برای القای این صفت مناسب دانسته و تاکید کردند که کاربرد غلظت‌های بالاتر از مقادیر بهینه برای BAP می‌تواند با ایجاد سمیت در محیط موجب تاخیر در شاخه‌زایی گردد.

در پژوهش حاضر، نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل دو هورمون KIN و IBA نیز بر تاثیر سیتوکنین KIN در شاخه‌زایی کینوا در شرایط محیط کشت تاکید داشت. و بالاترین سطح KIN (۱ میلی‌گرم در لیتر) در کلیه سطوح مصرف IBA بیشترین درصد شاخه‌زایی را موجب شد (شکل ۴-۲۰).

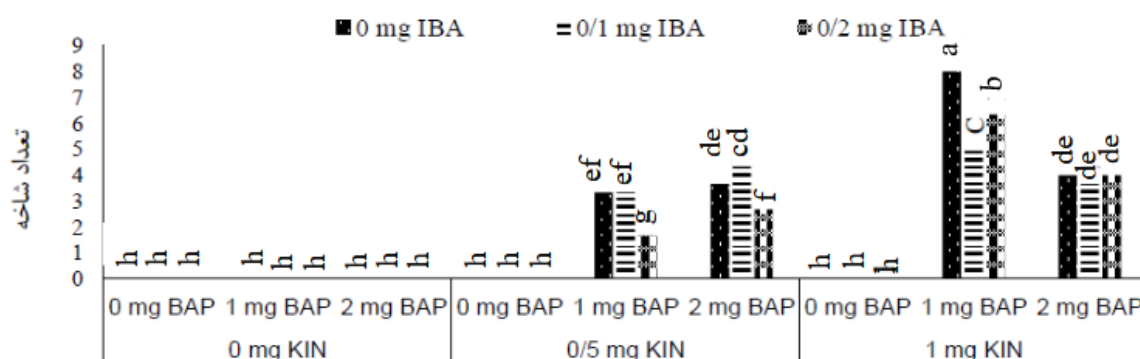


شکل ۴-۲۰ مقایسه میانگین میزان شاخه‌زایی در کالوس‌های رشد یافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف IBA و KIN

۴-۳-۲ تعداد شاخه

نتایج تجزیه واریانس صفت تعداد شاخه‌ای تولید شده از کالوس‌های حاصل از ریز نمونه‌ی هیپوکوتیل کینوا، نشان داد که نه تنها آثار ساده‌ی هر یک از تیمارهای هورمونی (KIN، BAP و IBA)، برای این صفت معنی‌دار بود، بلکه این صفت به طور معنی‌داری تحت تاثیر برهم‌کنش دو جانبه و سه جانبه‌ی این تیمارها نیز قرار گرفت (جدول ۴-۵).

مقایسه میانگین برهم‌کنش سه جانبه‌ی ترکیبات تیماری نشان داد که در بالاترین سطح هورمون KIN (۱ میلی‌گرم در لیتر)، اعمال ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در شرایط عدم حضور هورمون IBA، توانست شرایط مناسبی برای تولید حداکثر تعداد شاخه (به طور متوسط ۸ عدد به ازای هر ریزنمونه) در هر ریزنمونه را فراهم نماید (شکل ۴-۳۵). علاوه بر این در همین ترکیب تیماری (۱ میلی‌گرم در لیتر KIN و BAP)، مصرف ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA نیز با تولید ۶ عدد شاخه به ازای هر ریزنمونه، در رتبه دوم از نظر این صفت قرار گرفت.



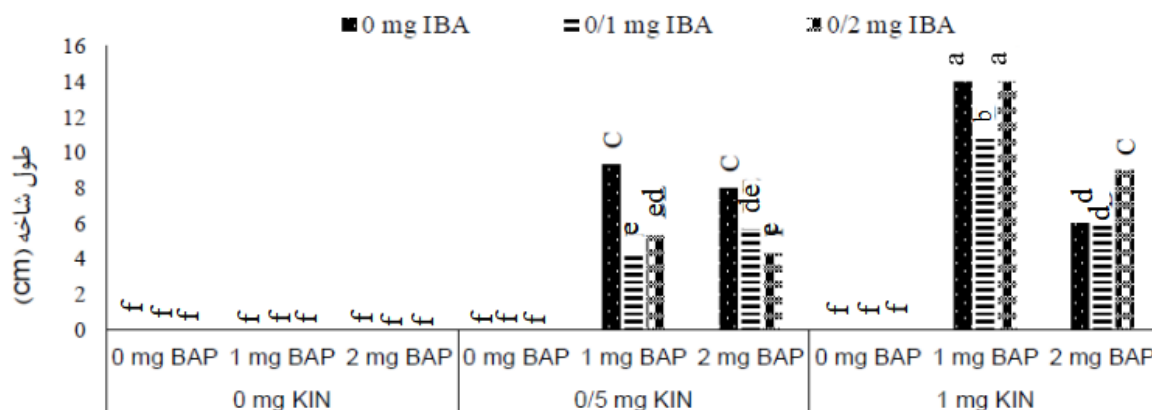
شکل ۴-۲۱ مقایسه میانگین تعداد شاخه تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف IBA, KIN و BAP

نتایج حاصله از مقایسه میانگین این برهم کنش سه جانبه نشان داد که شرایط عدم مصرف سیتوکنین KIN یا BAP، در محیط کشت، نتیجه ی عدم شاخه زایی را در پی داشت (شکل ۴-۲۱). بنابراین بر طبق یافته های خان و همکاران (۲۰۱۷) و حسامی و همکاران (۲۰۲۰)، حضور سیتوکنین ها در محیط کشت، در شاخه زایی اثر گذاشته و تشکیل آن ها را بهبود می بخشد و نسبت بین تنظیم کننده های رشد، تمایز یابی بین سلول و اندام زایی را ممکن می سازد.

۴-۳-۲-۳ طول شاخه

در این پژوهش، صفت طول شاخه به طور معنی داری تحت تاثیر اثر ساده ی هورمون های (KIN, BAP و IBA)، و آثار متقابل دو جانبه ی این هورمون ها و نیز اثر سه جانبه ی هر سه تیمار هورمونی قرار گرفت (جدول ۴-۵).

بر این اساس، مقایسه میانگین نتایج ثبت شده برای طول شاخه های تولید شده تحت تاثیر برهم کنش سه جانبه ی کلیه ی تیمارهای مورد بررسی نشان داد که طول ترین شاخه ها (۱۴ سانتی متر) به طور مشترک در محیط های کشت تیمار شده با ۱ میلی گرم در لیتر KIN، ۱ میلی گرم BAP، با ۰/۲ میلی گرم در لیتر) و بدون حضور IBA تولید گردیدند (شکل ۴-۲۲).



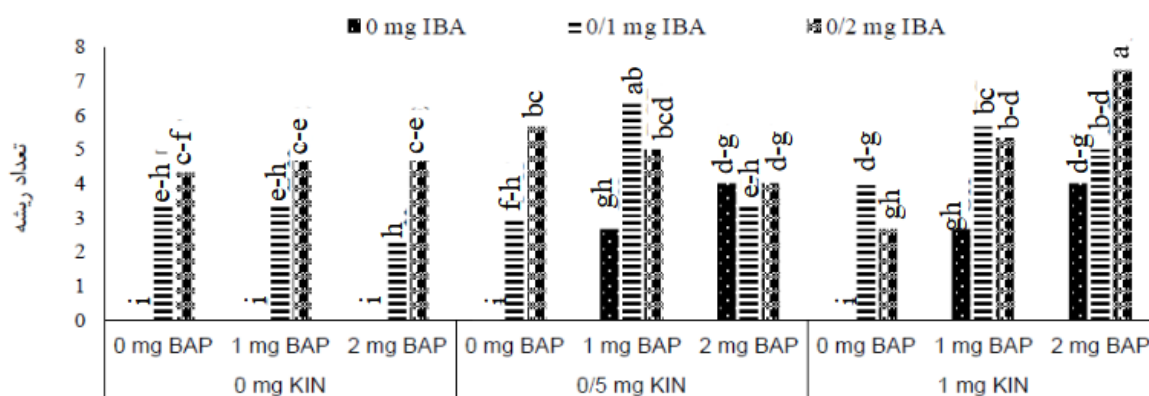
شکل ۴-۲۲ مقایسه میانگین طول شاخه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف IBA، KIN و BAP

نتایج حاصله نشان داد که با افزایش غلظت KIN در محیط کشت از ۰/۵ به ۱ میلی گرم در لیتر، در شرایط مصرف ۱ میلی گرم در لیتر BAP، شاخه های تولید شده در کلیه سطوح مصرف و عدم مصرف IBA از افزایش طول معنی داری برخوردار بودند (شکل ۴-۲۲). در حالی که این نتیجه، در سطح کاربرد ۲ میلی گرم در لیتر BAP، تنها با اعمال ۰/۲ میلی گرم در لیتر IBA محقق شد (شکل ۴-۳۶). حسامی و همکاران (۲۰۱۶)، نیز طویل ترین شاخه ها را در محیط MS تیمار شده با سطوح ۱ میلی گرم در لیتر BAP و KIN در ترکیب با ۰/۲ میلی گرم در لیتر IBA مشاهده و گزارش نمودند. همچنین در پژوهش هباشاهین (۲۰۱۹)، به تاثیر مثبت سیتوکینین KIN در تولید شاخه های طویل در شرایط کشت بافت کینوا تاکید شد. این نتیجه در پژوهش القدامی و همکاران (۲۰۲۰)، با مصرف سیتوکینین BAP (در غلظت ۳ میلی گرم در لیتر) بر صفت شاخه زایی گیاه کینوا، مورد تاکید قرار گرفت.

۴-۲-۳-۴ تعداد ریشه

در پژوهش حاضر، تعداد ریشه های تولید شده از کالوس های کینوا در شرایط کشت بافت به طور معنی داری از آثار ساده ای هر یک از تیمارهای هورمونی (KIN، BAP و IBA)، و نیز برهم کنش های دو جانبه و سه جانبه این تیمارها تاثیر پذیرفت (جدول ۴-۵).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه تیمارهای هورمونی بر تعداد ریشه‌ی تولید شده نشان دهنده‌ی اثرپذیری این صفت به ترکیبات خاص تیماری بود به طوری که بیشترین تعداد ریشه‌ی تولید شده در شرایط کاربرد ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه بالاترین غلظت اکسین IBA (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) به کار رفته در این پژوهش، مشاهده گردید (شکل ۴-۲۳). علاوه بر این کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم IBA نیز با تولید تعداد ریشه بالا در گروه برتر آماری قرار گرفت (شکل ۴-۲۳).



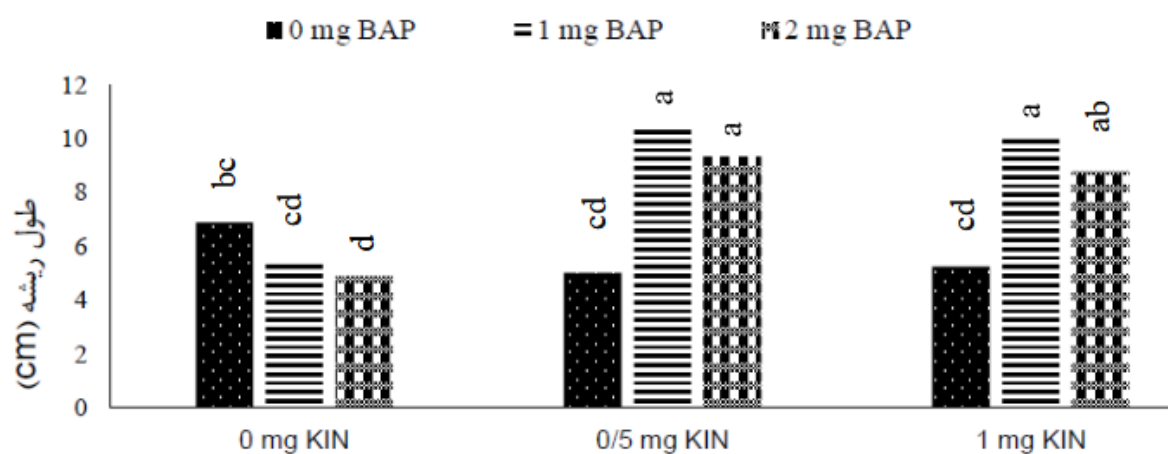
شکل ۴-۲۳ مقایسه میانگین تعداد ریشه تولید شده از کالوس‌های رشدیافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف IBA، KIN و BAP بر طبق نتایج حاصله، عدم مصرف هورمون IBA در هر یک از سطوح BAP، در شرایط عدم مصرف KIN، هیچ ریشه‌ای تولید نگردید. ضمن اینکه کالوس‌های کشت شده در محیط‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر KIN در شرایط عدم مصرف BAP و IBA نیز ریشه‌ای تولید نکردند (شکل ۴-۳۷). در سایر پژوهش‌ها نیز نوع و غلظت هورمون‌های مختلف به ویژه اکسین‌ها در گونه‌های گیاهی مختلف، نتایج متفاوتی را در ریشه‌زایی موجب شده‌اند. بن عزیز و همکاران (۲۰۱۷)، گزارش کردند که کاربرد اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها سبب تعادل رشدی در کالوس‌ها گردیده و اعمال اکسین بالا به همراه عدم مصرف یا مصرف کم سیتوکینین، محرک ریشه‌زایی است. در پژوهش تلاحیگو و همکاران (۲۰۱۷)، کاربرد

غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با BAP به تقویت ریشه‌زایی در کالوس های کینوا منجر شد، در حالی که در مطالعه رگلا دو و همکاران (۲۰۲۰)، محیط MS حاوی مقادیر ۰/۵ تا ۱ میلی گرم در لیتر IAA به عنوان مناسب ترین محیط برای ریشه‌زایی گیاه کینوا معرفی شد.

۴-۳-۲-۵ طول ریشه

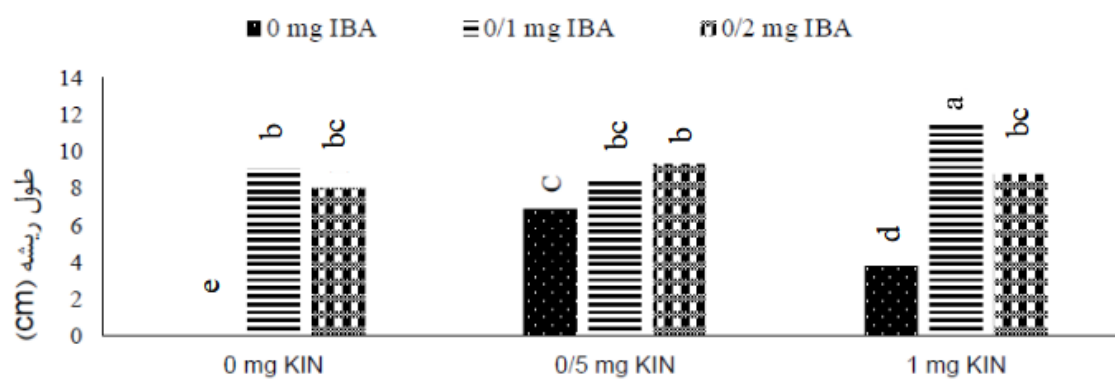
نتایج تجزیه واریانس طول ریشه های باززا شده در پژوهش حاضر مبین معنی داری آثار ساده هر یک از تیمارهای هورمونی (KIN، BAP و IBA)، و نیز آثار متقابل هورمون KIN با هر یک از دو هورمون BAP و IBA (در سطح یک درصد) بود (جدول ۴-۵). همچنین اثر متقابل دو جانبه هورمون BAP و IBA نیز در سطح ۵ درصد معنی دار بود. با این حال صفت طول ریشه به طور معنی داری تحت تاثیر برهم کنش ۳ جانبه ی این هورمون ها قرار نگرفت (جدول ۴-۵).

مقایسه میانگین طول ریشه های رشد یافته تحت تاثیر تیمارهای هورمونی KIN و BAP نشان داد که بیشترین میانگین طول ریشه (۱۰/۳۳ سانتی متر) در شرایط کاربرد مقادیر متوسط هر یک از دو هورمون KIN (۰/۵ میلی گرم در لیتر) و BAP (۱ میلی گرم در لیتر) به دست آمد (شکل ۴-۳۸). ضمن اینکه ترکیبات تیماری ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر KIN، به ترتیب به همراه ۲ و ۱ میلی گرم در لیتر BAP نیز با تولید ریشه های طویل در گروه برتر آماری قرار گرفتند (شکل ۴-۲۴).



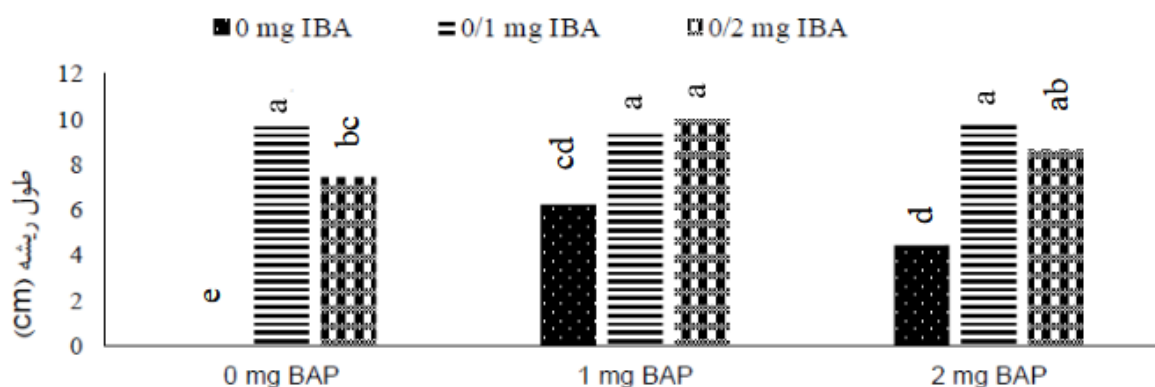
شکل ۴-۲۴ مقایسه میانگین طول ریشه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف KIN و BAP

همچنین نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل دو جانبه هورمون های KIN و IBA نشان داد که طویل ترین ریشه ها در بالاترین سطح کاربرد KIN به همراه غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA تولید شدند (شکل ۴-۲۵).



شکل ۴-۲۵ مقایسه میانگین طول ریشه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف KIN و IBA

ضمن اینکه نتایج مقایسه میانگین برهم کنش دو جنبه‌ی هورمون‌های BAP و IBA حاکی از نقش موثر کاربرد هورمون IBA در افزایش طول ریشه‌های تولید شده بود. به طوری که طول‌ترین ریشه‌ها در هر یک از سطوح مصرف و عدم مصرف BAP، تنها در شرایط کاربرد IBA تولید گردیدند (شکل ۴-۲۶).



شکل ۴-۲۶ مقایسه میانگین طول ریشه‌های تولید شده از کالوس‌های رشدیافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف BAP و IBA

۴-۳-۳ آزمایش ششم: بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد NAA، KIN و

BAP بر اندام‌زایی گیاه کینوا

۴-۳-۳-۱ شاخه‌زایی

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های درصد شاخه‌زایی نشان دهنده‌ی معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) آثار ساده و آثار متقابل دو و سه جانبه‌ی هر سه فاکتور هورمونی (KIN، BAP و IBA)، برای این صفت بود (جدول ۴-۶). با عنایت به معنی‌داری اثر متقابل سه جانبه‌ی فاکتورها، بیشترین درصد شاخه‌زایی در ترکیب تیماری کاربرد ۱ میلی گرم در لیتر KIN و BAP در شرایط عدم حضور NAA ایجاد شد (شکل ۴-۴۱). کاربرد ۵/۰ و ۱ میلی گرم در لیتر KIN در ترکیب با ۲ میلی گرم در لیتر BAP نیز در شرایط عدم

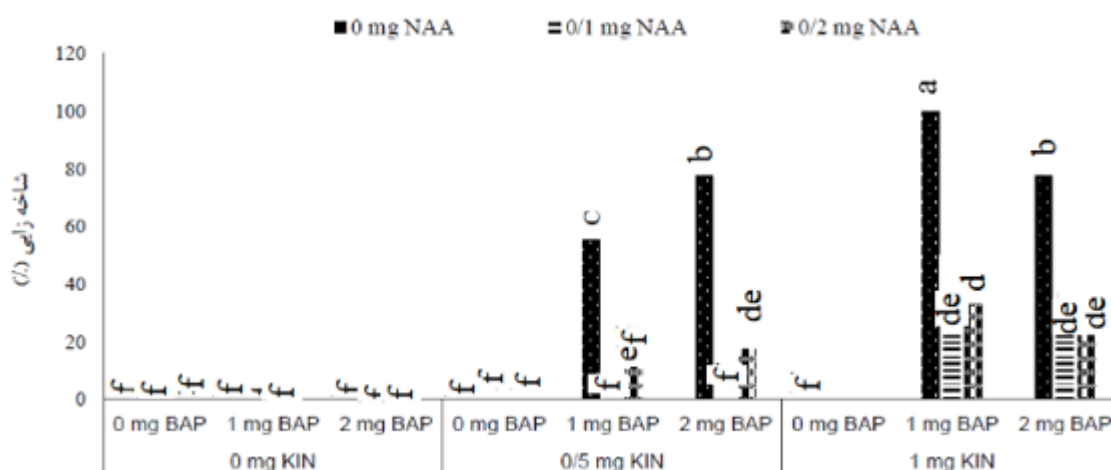
حضور NAA در محیط کشت، در رتبه‌ی دوم تولید شاخه درکالوس‌های رشد یافته از ریز نمونه‌ی هیپوکوتیل قرار گرفت (شکل ۴-۲۷).

جدول ۴-۶ نتایج تجزیه واریانس صفات شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گیاه کینوا در شرایط کشت بافت تحت تاثیر هورمون‌های

NAA، KIN و BAP

میانگین مربعات					درجه آزادی	منابع تغییرات
طول ریشه	تعداد ریشه	طول شاخه	تعداد شاخه	شاخه زایی		
۱۲۸/۷۷**	۱۷/۴۴**	۱۰۷/۲۰**	۲۴/۰۶**	۶۵۱۵**	۲	KIN
۶۲/۱۱**	۸/۷۷**	۹۴/۹۲**	۱۸/۲۷**	۵۴۸۶**	۲	BAP
۱۲/۴۸**	۴/۵۹**	۸۸/۵۶**	۲۷/۲۸**	۶۸۰۳**	۲	NAA
۱۷/۶۶**	۲/۷۲**	۳۳/۰۷**	۷/۷۶**	۱۹۰۶**	۴	KIN × BAP
۱۷/۸۱۸**	۱/۷۵**	۲۳/۹۵**	۸/۴۷**	۱۷۴۲**	۴	KIN × NAA
۲۵/۰۳**	۴/۲**	۳۱/۲۶**	۸/۳۷**	۱۷۰۰**	۴	BAP × NAA
۱۰/۱۴ ^{ns}	۱/۲۳**	۱۰/۹۵**	۳/۴۴**	۵۲۸**	۸	KIN × BAP × NAA
۰/۷	۰/۰۹	۰/۴۲	۰/۰۸	۲۱/۲۴	۵۴	خطا آزمایش
۳۰/۳۵	۲۹/۷۲	۲۹/۳۵	۳۰/۰۸	۲۸/۰۲	ضریب تغییرات (%)	

* و ** به ترتیب بیانگر معنی داری در سطح ۵ و ۱ درصد و NS عدم معنی دار را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۲۷ مقایسه میانگین میزان شاخه‌زایی در کالوس‌های رشدیافته از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت‌های مختلف BAP، KIN و NAA

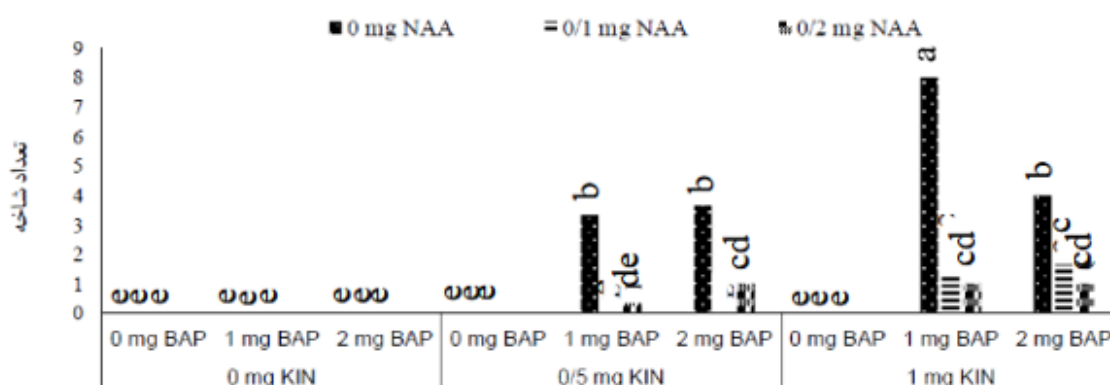
براساس نتایج حاصله، در شرایط عدم حضور هر یک از سیتوکینین‌های KIN و BAP در هر یک از سطوح مصرف و عدم مصرف NAA هم شاخه‌زایی القا نگردید. این نتیجه در حضور ۰/۵ میلی گرم در لیتر KIN به

همراه مصرف ۱ و ۲ میلی گرم BAP، هر دو در شرایط مصرف ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA بدست آمد (شکل ۴-۲۷).

احمد و همکاران (۱۹۹۹)، گزارش نمودند که حداکثر تشکیل شاخه در گیاه کینوا، در محیط حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BAP مشاهده شد. تورز تورک و همکاران (۲۰۰۲)، نیز ظهور حداکثر تعداد شاخه را در محیط MS تیمار شده با ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی گرم در لیتر TDZ گزارش نمودند. در پژوهشی مشابه، توسط رگلادو و همکاران (۲۰۲۰)، در دو رقم کینوا، در بین ترکیبات تنظیم کننده‌ی رشد مختلف، برای القاء شاخه‌زایی، کاربرد ۱ میلی گرم در لیتر KIN یا BAP هر یک با ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA را در شاخه‌زایی دو رقم چایلو و ویلا مؤثر دانستند.

۴-۳-۲ تعداد شاخه

در پژوهش حاضر نتایج تجزیه واریانس داده‌های تعداد شاخه‌ی ثبت شده در شرایط کاربرد تیمارهای هورمونی (KIN، BAP و NAA)، نشان داد که اثر ساده‌ی این عوامل و نیز آثار متقابل دو و سه جانبه‌ی آن‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴-۶). معنی‌دار بودن آثار متقابل بدان معناست که در هر سطح یک هورمون، تعداد شاخه‌ی تولید شده در سطوح یا ترکیب سطوح مختلف هورمون‌های دیگر، روند یکنواخت و یکسانی نداشته است. نتایج مقایسه‌ی میانگین ناشی از برهم‌کنش سه جانبه این فاکتورها بیانگر این واقعیت بود که بیشترین تعداد شاخه‌ی تولید شده (۸ عدد) در کالوس‌های کشت داده شده در محیط حاوی ۱ میلی گرم در لیتر KIN و BAP و در شرایط عدم حضور NAA ایجاد شد (شکل ۴-۲۸).

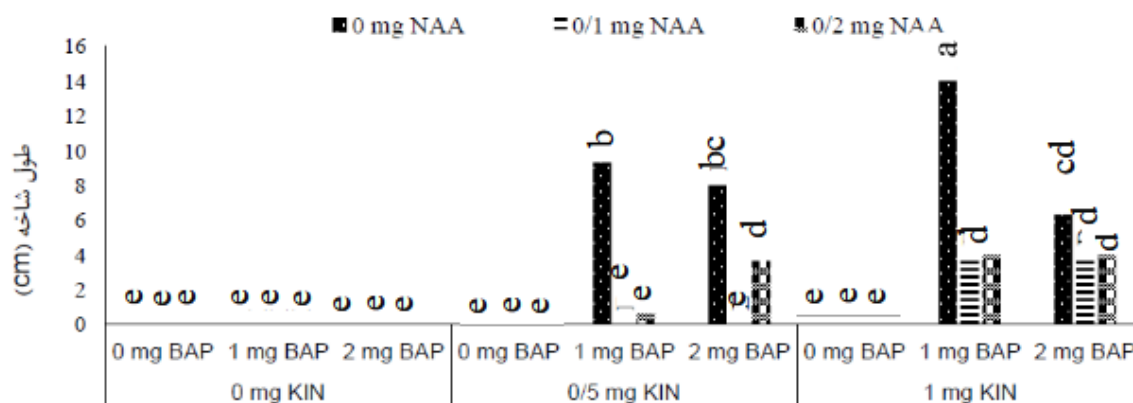


شکل ۴-۲۸ مقایسه میانگین تعداد شاخه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف BAP, KIN و NAA

ضمن این که در همین ترکیب تیماری، با افزایش غلظت KIN از ۰/۵ به ۱ میلی گرم در لیتر، تعداد شاخه های تولید شده، به طور معنی داری افزایش یافت همچنین این افزایش غلظت KIN (از ۰/۵ به ۱ میلی گرم در لیتر) در اغلب ترکیبات تیماری BAP و IBA هم با ثبات یا افزایش تعداد شاخه های تولید شده همراه بود (شکل ۴-۲۸).

۴-۳-۳-۳ طول شاخه

بر اساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس صفت طول شاخه های تولید شده، به طور معنی داری (در سطح ۱ درصد) از کلیه منابع تغییر این جدول، تاثیر پذیرفت (جدول ۴-۶). نتایج مقایسه ای میانگین برهم کنش سه جانبه ای هر سه تیمار هورمونی (KIN, BAP و NAA)، برای این صفت نشان داد که طولی ترین شاخه ها (۱۴ سانتی متر) در محیط های کشت تیمار شده با ترکیب تیماری ۱ میلی گرم در لیتر KIN و BAP در عدم حضور NAA تولید گردیدند (شکل ۴-۲۹).

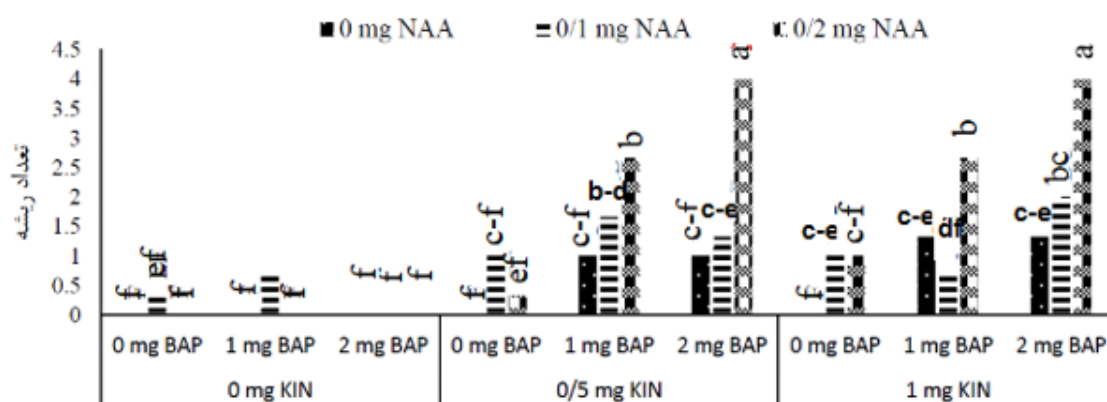


شکل ۴-۲۹ مقایسه میانگین طول شاخه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف BAP, KIN و NAA

براساس این نتایج محیط های حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر KIN به همراه ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر BAP هر دو در شرایط عدم حضور NAA نیز تا حدودی بر افزایش طول شاخه مؤثر بودند. با این حال، در بالاترین سطح کاربرد KIN (۱ میلی گرم در لیتر) در کلیه سطوح BAP تیمار شده، افزایش غلظت هورمون NAA، به افزایش طول شاخه منجر نشد (شکل ۴-۲۹).

۴-۳-۴ تعداد ریشه

در پژوهش حاضر، با توجه به معنی داری کلیه آثار ساده، متقابل دو و سه جانبه تیمارهای هورمونی (در سطح احتمال یک درصد) بر تعداد ریشه تولید شده از کالوس ها، روند تغییرات این صفت بر اساس نتایج مقایسه میانگین برهم کنش سه جانبه تیمارهای هورمونی، نشان داد که بیشترین تعداد ریشه تولید شده (۴ عدد) به طور مشترک در شرایط کاربرد ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر KIN هر یک در ترکیب با بالاترین سطح کاربرد BAP (۲ میلی گرم در لیتر) و مصرف ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA مشاهده گردید (جدول ۴-۶، شکل ۴-۳۰).



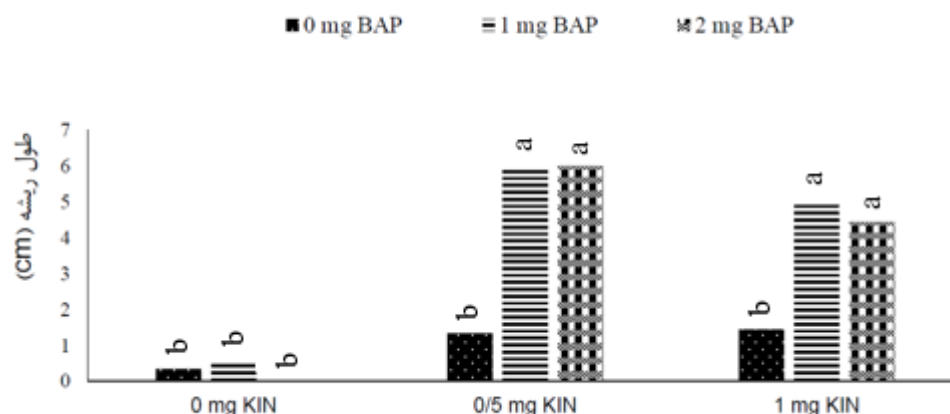
شکل ۴-۳ مقایسه میانگین تعداد ریشه های تولید شده از کالوس های رشد یافته از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف BAP، KIN و NAA

براساس نتایج حاصله در (شکل ۴-۳)، در هریک از شرایط مصرف ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر KIN در ترکیب با سطوح مصرف BAP (۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) تعداد ریشه های تولید شده، تنها در بالاترین سطح مصرف اکسین NAA (۰/۲ میلی گرم در لیتر) تفاوت آماری معنی داری را نشان دادند.

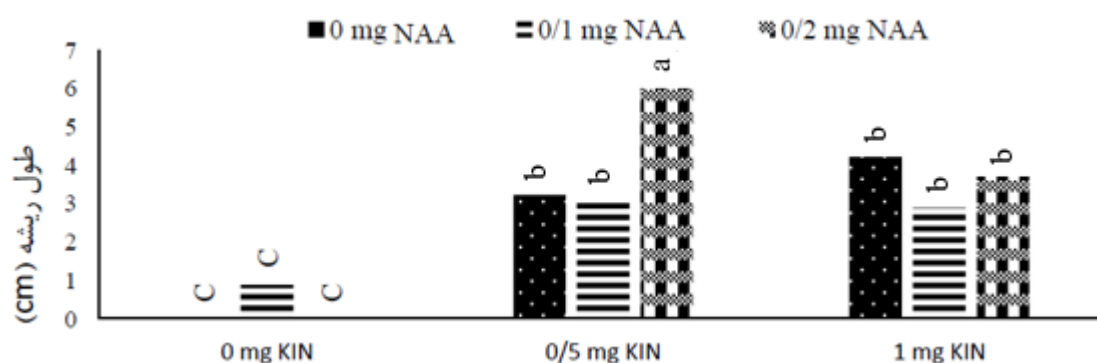
۴-۳-۳-۵ طول ریشه

نتایج تجزیه واریانس طول ریشه های تولید شده، نشان داد که آثار ساده و متقابل دو جانبه ی کلیه ی فاکتورهای هورمونی مورد مطالعه (KIN، BAP و NAA)، در سطح ۱ درصد بر این صفت معنی دار بود (جدول ۴-۶). با این حال روند تغییرات در طول ریشه ها به طور معنی داری از برهم کنش سه جانبه ی تیمارها تاثیر نپذیرفت (جدول ۴-۶).

با عنایت به معنی دار شدن اثر متقابل هورمون های KIN و BAP نتایج مقایسه ی میانگین های طول ریشه، نشان داد که سطوح مصرف این هورمون ها به طور معنی داری افزایش طول ریشه را نسبت به شرایط عدم مصرف این هورمون ها در پی داشت (شکل ۴-۳۱).

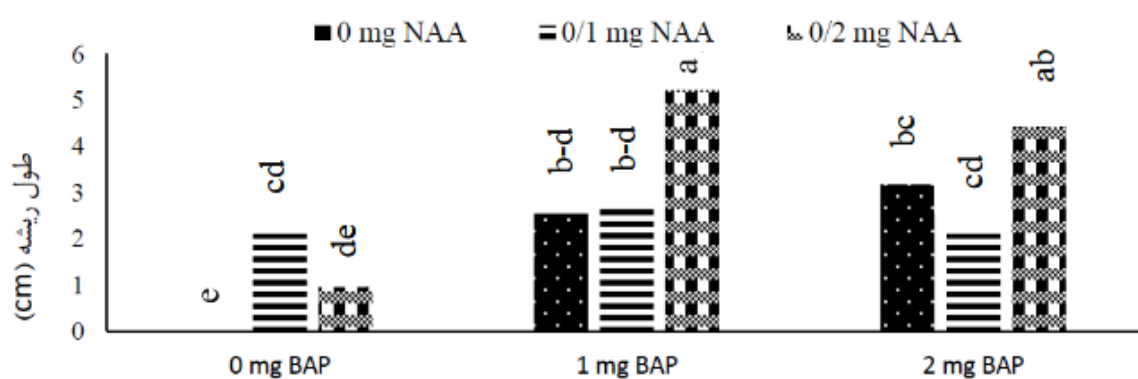


شکل ۴-۳۱ مقایسه میانگین طول ریشه های رشد یافته از کالوس های حاصل از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف BAP و KIN. همچنین معنی دار بودن اثر متقابل هورمون های KIN و NAA، مبین این واقعیت بود که در هر سطح هورمون KIN، طول ریشه های رشد یافته در سطوح مختلف هورمون NAA، روند یکنواخت و یکسانی نداشتند (شکل ۴-۴۶). به طوری که تنها در سطح ۰/۵ میلی گرم در لیتر KIN، با افزایش غلظت هورمون NAA به بالاترین سطح کاربرد NAA (۰/۲ میلی گرم در لیتر)، تفاوت معنی داری در میزان طول ریشه مشاهده گردید (شکل ۴-۳۲).



شکل ۴-۳۲ مقایسه میانگین طول ریشه های رشد یافته از کالوس های حاصل از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف KIN و NAA

با این حال این روند در بررسی برهمکنش سیتوکنین BAP با NAA تا حدودی متفاوت بود (شکل ۴-۳۳). با توجه به نتایج مقایسه‌ی میانگین این اثر متقابل، کاربرد غلظت های ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر BAP در ترکیب با بالاترین سطح کاربرد NAA (۰/۲ میلی گرم در لیتر) به تولید طویل ترین ریشه‌ها نسبت به سایر ترکیبات آماری منجر شد.



شکل ۴-۳۳ مقایسه میانگین طول ریشه های رشد یافته از کالوس های حاصل از ریزنمونه های هیپوکوتیل گیاه کینوا تحت تیمار غلظت های مختلف NAA و BAP

تیجہ کیری کھی

با توجه به ارزش غذایی بذور کینوا، بررسی کشت بافت این گیاه با اهداف استفاده در کارهای اصلاحی و تحقیقات زیست فن آوری یک ضرورت به نظر می رسد. در این پژوهش، بررسی جوانه زنی بذور کینوا در کشت بافت نشان داد، که حداکثر سرعت جوانه زنی در شرایط تاریکی و در محیط MS و $MS \frac{1}{2}$ بدست آمد. بررسی کالوس زایی شامل درصد کالوس زایی، مساحت کالوس، وزن کالوس و رنگ و تراکم کالوس ها نشان داد که استفاده از هیپوکوتیل به عنوان ریز نمونه برای کالوس زایی مناسب است. همچنین جهت کالوس زایی از ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل، حضور D-2,4 در محیط کشت ضروری است. براساس نتایج حاصله، تیمار D-2,4 و سطوح مختلف سیتوکنین BAP در محیط‌های کشت حاوی نانو کربن (در طیف وسیعی از ترکیبات تیماری) درصد کالوس زایی ۱۰۰ درصد و یا بالا حاصل گردید. همچنین کالوس های القا شده از وزن و مساحت بالایی نیز برخوردار بودند. با این حال، کاربرد BAP سبب شد تا کالوس های سفید رنگ و غیر متراکم بدست آید که در مرحله اندام زایی از آن ها استفاده نشد. کالوس زایی در حضور KIN با D-2,4 و نانوکربن نشان داد که با وجود درصد کالوس زایی بالا در برخی ترکیبات، مناسب ترین کالوس ها برای باززایی در محیط ۱ میلی گرم در لیتر D-2,4 و ۰/۵ میلی گرم در لیتر KIN و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر نانوکربن بدست آمد. بنابراین استفاده از KIN، و نانوکربن در کالوس زایی دارای آثار مثبت است. بررسی اندام زایی با سه هورمون اکسین IBA، IAA و NAA، به همراه استفاده از KIN و BAP نشان داد که بدون حضور سیتوکنین ها شاخه زایی در هیچ کدام از محیط ها صورت نگرفت. در آزمایشات استفاده از IBA، IAA و NAA، بیشترین شاخه زایی با بیشترین تعداد شاخه و طویل ترین شاخه‌ها در محیط حاوی ۱ میلی گرم در لیتر KIN و BAP بدست آمد. کاربرد NAA، در سطوح مصرف KIN و BAP به تولید بیشترین تعداد ریشه در شرایط کاربرد ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر KIN هریک در ترکیب با بالاترین سطح کاربرد BAP (۲ میلی گرم در لیتر) و مصرف ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA منجر شد، ضمن اینکه طویل ترین ریشه ها در شرایط حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر KIN تولید گردیدند.

۴-۵ پیشنهادات

براساس ارزیابی های انجام شده دراین پژوهش، پیشنهاد می شود موارد زیر در تحقیقات بعدی در این گیاه مورد بررسی قرار گیرند:

- ۱) بررسی سایر ارقام و گونه های کینوا به ویژه ارقام دارای سطوح مختلف ساپونین
- ۲) استفاده از ریزنمونه های دیگر در ارزیابی کارایی آن ها
- ۳) کاربرد سایر محیط های کشت با تغییر در مواد و بررسی سطوح دیگر تیمارنانوکربن .
- ۴) کاربرد ترکیبات دیگر تنظیم کننده ی رشد .
- ۵) تحقیق برروی سایر سطوح (غلظت های) اعمال هورمون در تحقیقات باززایی بعدی .

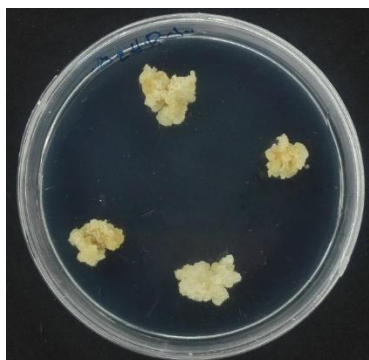
پوست



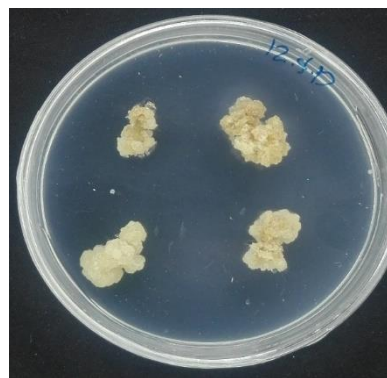
ب



الف



د



ج

شکل (۴-۲) ریز نمونه هیپوکوتیل و گیاه شاهد: تصویر الف- گیاه ۱۲ روزه کینوا را نشان می دهد که حاصل کاشت بذردر محیط MS می باشد و ریز نمونه ها از آن به عنوان گیاه شاهد، استحصال شده است. تصویر ب- ریز نمونه های جدا شده از قسمت هیپوکوتیل ساقه گیاه می باشد که در قطعات ۱ سانتی متری برش داده شد و در هر ظرف پتری چهار ریز نمونه در محیط کشت پایه MS، جامد قرار گرفت. تصویر ج- کالوس حاصل از مرحله قبل (تصویر ب) در محیط کشت پایه MS با تیمار هور مونی 2.4.D با غلظت ۱ میلی گرم را نشان می دهد. تصویر د- کالوس حاصل از هیپوکوتیل ساقه در محیط کشت پایه MS با تیمار هور مونی 2.4.D با غلظت ۰/۵ میلی گرم را نشان می دهد.

منابع

- اطرشی م. و مرادی ک. (۱۳۹۳) "بررسی کالوس زائی و اندام زائی غیرمستقیم گیاه فلفل دلمه ای در شرایط کشت درون شیشه ای" مجله پژوهش های گیاهی، شماره ۳، جلد ۲۷.
- امام م. (۱۳۹۷) "راهکارهای کلیدی برون رفت از مشکلات «ریزازدیادی» درختان جنگلی" مجله طبیعت ایران، شماره ۱، دوره ۸: جلد ۳.
- باقری، م. (۱۳۹۷) "دستنامه زراعت کینوا" ویرایش اول، چاپ اول، موسسه تحقیقات اصلاح و بذرونهال کرج، ص ۵۶.
- باقری، ع.، صفاری، م. (۱۳۹۳) کتاب "مبانی کشت های بافت های گیاهی" جلد اول، چاپ هفتم انتشارات دانشگاه فردوسی، مشهد، ص ۴۲۴.
- حجتیان فر م. و باقری ع. و مشتاقی ن. و جلالی جواران م. (۱۳۹۵) "ریزازدیادی تاج خروس زینتی تریکالر *Amaranthus tricolor* در شرایط درون شیشه ای" چهارمین کنفرانس بین المللی پژوهشهای کاربردی در علوم کشاورزی، تهران.
- خرمی زاده، م.، فلک، ر.، تهرانی، م.، بروک، ا. (۱۳۸۸) کتاب "مبانی و اصول مقدماتی تکنیک های کشت سلولی" جلد اول، چاپ اول، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی، تهران، ص ۱۸۸.
- طالبی م. و اعتصام ف. و سید طباطبایی ب. (۱۳۹۰) "باززایی غیرمستقیم پروانش از طریق کشت ریز نمونه های برگ و ترکیبات مختلف تنظیم کننده های رشد گیاهی" مجله علوم و فنون کشت های گلخانه ای، شماره ۸، دوره ۲.
- مامدی آ. و توکل افشاری ر. و سپهوند ن. و اویسی م. (۱۳۹۴) "بررسی تاثیر دما بر جوانه زنی بذر گیاه کینوا (*Chenopodium quinoa Willd*) تحت تنش شوری" مجله علوم گیاهان زراعی ایران، شماره ۴، دوره ۴۶.
- نوروزی ا. و باقری ع. و مشتاقی ن. و شریفی ا. (۱۳۹۶) "بهینه سازی اندام زایی غیر مستقیم گیاه آنتوریوم (*Anthurium scherzerianum*)" نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)، مشهد، شماره ۲، جلد ۳۱.

Ahmad, S. and Spoor, W., 1999. Effect of NAA and BAP on callus culture and plant regeneration in Curly kale (*Brassica oleracea* L.). *Pak J Biol Sci*, 2, 109-112.

Al Gethami, F. R. and El Sayed, H. E. S. A., 2020. In vitro: Influence of Various Concentrations of Plant Growth Regulators (BAP & NAA) and Sucrose on Regeneration of *Chenopodium quinoa* Willd. *Plant. Asian J. Biol*, 34-43.

Al Gethami, F. R. and El Sayed, H. E. S. A., 2020. Assessment Various Concentrations of ZnO-Nanoparticles on Micropropagation for *Chenopodium quinoa* Willd. *Plant. JABB*, 33-42.

Al-Khayri, J. M., Huang, F. H. and Morelock, T. E., 1991. Regeneration of spinach from leaf callus. *HortScience*, 26, 913-914.

Angeli, V. et al., 2020. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): An overview of the potentials of the “Golden Grain” and socio-economic and environmental aspects of its cultivation and marketization. *Foods*, 9, 216.

Bazile, D., Fuentes, F. and Mujica, Á., 2013. Historical perspectives and domestication of quinoa.

Choukr-Allah, R. et al., 2016. Quinoa for marginal environments: toward future food and nutritional security in MENA and Central Asia regions. *Plant Sci*, 7, 346.

Chutipaijit, S. and Sutjaritvorakul, T., 2018. Application of activated charcoal and nanocarbon to callus induction and plant regeneration in aromatic rice (*Oryza sativa* L.). *Chemical Speciation & Bioavailability*, 30, 1-8.

Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A. and García-Lara, S., 2018. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248, 1-18.

Eisa, S., Koyro, H., Kogel, K. and Imani, J., 2005. Induction of somatic embryogenesis in cultured cells of *Chenopodium quinoa*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 81, 243-246.

Fehér, A., 2019. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in plant science*, 10, 536.

Gómez-Ramírez, A. et al., 2017. Surface chemistry and germination improvement of Quinoa seeds subjected to plasma activation. *Sci Rep*, 7, 1-12.

Bastidas, E. et al., 2016. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), from nutritional value to potential health benefits: An integrative review. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 6.

Henarejos-Escudero, P. et al., 2017. Development of betalain producing callus lines from colored quinoa varieties (*Chenopodium quinoa* Willd). *J Agric Food Chem*, 66, 467-474.

Hesami, M., Condori-Apfata, J. A., Valderrama Valencia, M. and Mohammadi, M., 2020. Application of artificial neural network for modeling and studying in vitro genotype-independent shoot regeneration in wheat. *applied sciences*, 10, 5370.

Hesami, M. and Daneshvar, M. H., 2016. Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in *Chenopodium quinoa* willd. *Indo Am J Agric Vet Sci*, 4, 25-32.

- Hu, Y. et al., 2017. Chemical characterization, antioxidant, immune-regulating and anticancer activities of a novel bioactive polysaccharide from *Chenopodium quinoa* seeds. *Int J Biol Macromol*, 99, 622-629.
- Khan, N. et al., 2017. Development of an efficient callus derived regeneration system for garlic (*Allium sativum* L.) from root explant. *J Plant Breed Agric*, 1, 3.
- Kumari, K., Rai, A. and Vashistha, P., 2019. Plant Tissue Culture and Its Role in Modern Agriculture. *Biomolecule Reports*, 9, 1-4.
- Lutz, M. and Bascuñán-Godoy, L., 2017. The revival of quinoa: a crop for health. Superfood and Functional Food-An Overview and its Utilization to Processed Foods (V. Waisundara, M. Shiomi, Eds.) In *Tech Open*, 37-54.
- Mahler, R. L., 2004. Nutrients plants require for growth. Iniversity of Idaho. College of Agricultural and Life Science. CIS, 1124.
- Mohyuddin, S. et al., 2019. Quinoa is beneficial to the comprehensive nutritional value of potential health. *Pak J Biol Sci*, 70.
- Westfall, C. S., Muehler, A. M. and Jez, J. M., 2013. Enzyme action in the regulation of plant hormone responses. *J Biol Chem*, 288, 19304-19311.
- Bin Azizan, M., 2017. The Effect of BAP and NAA Treatment on Micropropagation of *Cucumis sativus*. L. *International Journal of Science and Research*, 6, 170-176.
- Pandey, K. et al., 2018. Effects of carbon-based nanomaterials on seed germination, biomass accumulation and salt stress response of bioenergy crops. *PLoS One*, 13, e0202274.
- Regalado, J. et al., 2020. Micropropagation protocol for coastal quinoa. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142, 213-219.
- Shahin, H., 2019. Callus formation and production of secondary metabolites by seedling explants of *Chenopodium quinoa*. *Egyptian Journal of Botany*, 59, 451-460.
- Telahigue, D. and Toumi, L., 2017. Influence of medium and growth regulators on callogenesis of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and effect of hydrous stress induced by PEG 6000 on the callus. *Horticultural Biotechnology Research*.
- Zaytseva, O. and Neumann, G., 2016. Carbon nanomaterials: production, impact on plant development, agricultural and environmental applications. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3, 1-26.

Abstract

Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) is considered as a food grain to high nutritional value and as a medicinal plant. Evaluation of quinoa seed germination under light and type of culture medium treatments showed that the highest quinoa seed germination rate (15/87day) was observed in the dark and in MS and ½ MS. Callus formation in quinoa plant using hypocotyl explant on MS medium supplemented with 2,4-D (0, 0.5 and 1 mg/l), nanocarbon (0, 100 and 500 mg/l) and cytokinin hormones including BAP and KIN (0, 0.25, 0.5 and 1 mg/l) showed that no callus was observed on 2,4-D-free medium. Callus formation by adding BAP showed that the highest percentage of callus formation, weight and area (2.57G and 1.7 Area, respectively) was obtained in medium containing 0.5 mg/l 2,4-D and medium supplemented with BAP produced friable and white callus which was not suitable for regeneration. The cream color and compact calli which selected to organogenesis were produced on the medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l KIN and 500 mg/l nano carbon. Organogenesis in selected calli on MS medium supplemented with both cytokinins BAP and KIN (0, 0.5 and 1 mg/l) incorporated with the three auxins IAA, IBA and NAA (0, 0.1 and 0.2 mg/l), separately showed that no shoot regeneration was observed in media free- cytokines. The organogenesis results using IAA showed that the highest shoot regeneration and number of shoot and the longest shoot were observed on medium free-IAA. While the highest length and numbers of roots were obtained at IAA consumption levels. The addition of IBA for organogenesis showed that the highest shoot regeneration and number of shoot and the longest shoot were observed on medium free-IAA, but supplemented with 1 mg/l BAP and KIN. The highest number of roots in this experiment was obtained in medium containing 2 mg/l BAP, 0.2 mg/l IBA and 1 mg/l KIN, while the longest roots were obtained on medium supplemented with 0.5 and 1 mg/l KIN incorporated with 1 mg/l BAP. By adding NAA in organogenesis media showed that the highest shoot regeneration and number of shoot and the longest shoot were obtained on medium supplemented with 1 mg/l BAP and KIN, while the longest and highest number of roots were observed on medium supplemented with 1 mg/l BAP and 0.2 mg/l NAA and 1 mg/l KIN and 0.2 mg/l. In general, the hypocotyl explant can be used to obtain an improved instruction to the indirect micropropagation of quinoa.

Keywords: Callus induction, Quinoa, Regeneration, In vitro germination, Rooting



Shahrood University of Technology
Faculty of Agriculture
Msc thesis in Agricultural Biotchnology

By:

Marzieh Hassanzadeh Khosh

Superviser:

Dr. Mahdieh Parsaeiyan

Advisores

Dr. Ziba Ghasimi Hagh

2021