

دستنامه علمی - شماره ۵

کشت بافت گیاهی و کاربردهای آن در کشاورزی

نویسندگان:

مهندس مهدیه یوسفی آرا

دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد

مهندس آزاده خادم

عضو هیأت علمی گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان زینتی سازمان جهاد دانشگاهی استان خراسان رضوی

دکتر مالک قاسمی

استادیار و عضو هیأت علمی گروه اصلاح و ژنتیک پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری،
مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مازندران، رامسر، ایران

دکتر کمال قاسمی بزدی

دانشیار و عضو هیأت علمی بخش به‌نژادی، مؤسسه تحقیقات پنبه کشور،
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

مهندس مهرناز انتصاری

دانشجوی دکتری مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی دانشگاه زنجان

مهندس میترا امام

استادیار و عضو هیأت علمی گروه زیست‌فناوری مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور،
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

دکتر عباس قمری زارع

دانشیار و عضو هیأت علمی گروه زیست‌فناوری مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور،
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

انتشارات:

کمیته بیوتکنولوژی وزارت جهاد کشاورزی

ستاد توسعه زیست‌فناوری

با حمایت مالی «صندوق حمایت از سرمایه‌گذاری زیست‌فناوری»

این دستنامه علمی به شماره ۵۴۱۸۳ در تاریخ ۹۷/۶/۳

در مرکز فناوری اطلاعات و اطلاع‌رسانی کشاورزی به‌ثبت رسیده است

۱۳۹۷

سرشناسه:	یوسفی آرا، مهدیه. ۱۳۶۱ -
عنوان و پدیدآور:	کشت بافت گیاهی و کاربردهای آن در کشاورزی / نویسندگان: مهدیه یوسفی آرا، آزاده خادم، مالک قاسمی، کمال قاسمی بزدی، مهرناز انتصاری، میترا امام، عباس قمری زارع، خدمات نشر انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۱۳۹۷.
ناشر:	سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی؛ با مشارکت: کمیته بیوتکنولوژی وزارت جهاد کشاورزی؛ ستاد توسعه زیست فناوری؛ صندوق حمایت از سرمایه گذاری زیست فناوری
مشخصات ظاهری:	۹۲ ص. مصور.
شابک:	۹۷۸-۹۶۴-۳۲۴-۴۰۵-۷
موضوع ۱:	گیاهان - کشت بافت ها
موضوع ۲:	گیاهان - تکثیر آزمایشگاهی
شناسه افزوده:	خادم، آزاده، نویسنده همکار
شناسه افزوده:	قاسمی، مالک، نویسنده همکار
شناسه افزوده:	قاسمی بزدی، کمال، نویسنده همکار
شناسه افزوده:	انتصاری، مهرناز، نویسنده همکار
شناسه افزوده:	امام، میترا، نویسنده همکار
شناسه افزوده:	قمری زارع، عباس، نویسنده همکار
رده بندی کنگره:	۱۳۹۷: ۵۹۵/۹۷۲۵ QK۷۲۵
رده بندی دیویی:	۵۸۱/۰۷۲۴



خدمات نشر انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد	
مشهد، میدان آزادی، پردیس دانشگاه، سازمان مرکزی جهاد دانشگاهی	
ص. پ. ۱۳۷۶-۹۱۷۷۵ تلفن: ۳۸۸۳۲۳۶۷ دفتر پخش: ۳۸۸۴۲۲۳۰	
www.jdmpress.com info@jdmpress.com	
کشت بافت گیاهی و کاربردهای آن در کشاورزی	
نویسندگان: مهدیه یوسفی آرا، آزاده خادم، مالک قاسمی، کمال قاسمی بزدی، مهرناز انتصاری، میترا امام، عباس قمری زارع	
چاپ اول ۱۳۹۷ / ۲۰۰۰ نسخه	چاپ و صحافی چاپخانه دانشگاه فردوسی
شابک ۹۷۸-۹۶۴-۳۲۴-۴۰۵-۷	ISBN: 978-964-324-405-7
کلیه حقوق نشر برای ناشر محفوظ است.	
قیمت: ۱۲۰.۰۰۰ ریال	

فهرست

پیشگفتار.....	۵
مقدمه.....	۷
۱. کلیات کشت بافت گیاهی.....	۹
۱-۱ مزایای کشت بافت گیاهی.....	۹
۱-۲ کاربردهای کشت بافت گیاهی.....	۱۰
۱-۲-۱ تکثیر درون‌شیشه‌ای.....	۱۰
۱-۲-۲ حفاظت گونه‌های گیاهی از طریق نگهداری در سرما.....	۱۱
۱-۲-۳ القای تنوع ریشی و گزینش سلول‌ها در محیط‌های کشت بافت برای تولید گیاهانی با ویژگی‌های سودمند.....	۱۱
۱-۲-۴ پرورش سلول‌های گیاهی در مقیاس وسیع در کشت مایع برای تولید ترکیبات ارزشمند.....	۱۲
۱-۲-۵ تلاقی گونه‌های دور وابسته به هم توسط دورگ‌گیری سوماتیکی و امتزاج پروتوپلاست.....	۱۲
۱-۲-۶ تولید گیاهان دابل‌هپلوئید.....	۱۳
۱-۲-۷ تولید مواد گیاهی سالم و عاری از ویروس، باکتری و قارچ.....	۱۳
۱-۲-۸ باززایی گیاهان حاصل از فنون مهندسی ژنتیک.....	۱۳
۱-۲-۹ باروری درون‌شیشه‌ای.....	۱۳
۱-۳ خصوصیات آزمایشگاه کشت بافت گیاهی و تجهیزات موردنیاز.....	۱۴
۱-۳-۱ اتاق تهیه محیط کشت.....	۱۴
۱-۳-۲ اتاق توزیع محیط کشت و کشت نمونه گیاهی.....	۱۸
۱-۴ مواد موردنیاز برای کشت بافت گیاهی.....	۲۱
۱-۴-۱ محیط کشت.....	۲۱
۱-۵ مراحل و شرایط کشت بافت گیاهی.....	۲۲
۱-۵-۱ مراحل اصلی انجام کشت بافت‌های گیاهی.....	۲۳
۲. وضعیت کشت بافت گیاهی در جهان و ایران.....	۲۵
۳. کشت بافت گیاهان باغی.....	۲۹
۳-۱ انواع روش‌های متداول ریزازدیادی گیاهان باغی.....	۳۰
۳-۱-۱ تکثیر درون‌شیشه‌ای.....	۳۰
۳-۱-۲ پیوند نوک شاخه یا ریزپیوندی.....	۴۰
۳-۲ تکنیک نجات جنین و کشت تخمک.....	۴۳
۳-۳ مهمترین کاربردهای کشت جنین در گیاهان باغی.....	۴۴
۳-۳-۱ تولید هیبریدهای جدید و یا کمپاب.....	۴۴
۳-۳-۲ کوتاه‌نمودن دوره اصلاح گیاهان باغی.....	۴۵
۳-۳-۳ ازدیاد گیاهان نادر.....	۴۵

۳-۴	امتزاز پروتوپلاست.....	۴۵
۳-۵	انتخاب گیاهان جهش یافته.....	۴۷
۳-۶	انتخاب گیاهان حاصل از شیمر (بافت ناهمسان).....	۴۷
۴	کشت بافت گیاهان زراعی.....	۴۹
۴-۱	تولید گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئیدها در گیاهان زراعی.....	۴۹
۴-۲	ریزازدیادی گیاهان زراعی.....	۵۲
۴-۲-۱	روش فعال سازی نمو مریستم های موجود براساس حذف غالبیت انتهایی.....	۵۲
۴-۲-۲	روش القای تشکیل جوانه های نابه جا به طور مستقیم بر روی بافت های ریزنمونه.....	۵۲
۴-۲-۳	روش جنین زایی سوماتیکی.....	۵۳
۴-۲-۴	روش تمایز جوانه های نابه جا در بافت کالوس.....	۵۳
۴-۳	کاربرد کشت بافت در سلکسیون گیاهان زراعی.....	۵۳
۴-۳-۱	انتخاب درون شیشه ای جهت تحمل به خشکی.....	۵۴
۴-۳-۲	انتخاب درون شیشه ای جهت تحمل به شوری.....	۵۴
۴-۳-۳	انتخاب درون شیشه ای جهت تحمل به فلزات سنگین.....	۵۵
۴-۳-۴	انتخاب درون شیشه ای جهت تحمل به تنش های دمایی.....	۵۵
۴-۳-۵	انتخاب درون شیشه ای جهت تحمل به بیماری ها.....	۵۵
۴-۴	کشت مریستم و تولید گیاهان عاری از ویروس.....	۵۶
۴-۵	کاربرد کشت بافت در مهندسی ژنتیک.....	۵۹
۴-۶	حفاظت و نگهداری ذخایر ژنتیکی گیاهی.....	۵۹
۵	کشت بافت گیاهان زینتی.....	۶۱
۵-۱	ریزازدیادی گیاهان زینتی.....	۶۲
۵-۱-۱	انواع روش های متداول ریزازدیادی گیاهان زینتی.....	۶۳
۵-۱-۲	ریزازدیادی گیاهان زینتی با استفاده از بیوراکتورها.....	۶۷
۵-۱-۳	تولید بذرهای مصنوعی.....	۶۸
۵-۲	کشت بافت در حفاظت گیاهان زینتی.....	۶۸
۵-۳	کشت بافت در اصلاح موتاسیونی گیاهان زینتی.....	۶۹
۵-۳-۱	تولید گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئید.....	۷۱
۵-۴	کشت بافت در مهندسی ژنتیک.....	۷۱
۵-۵	چشم انداز اقتصادی کشت بافت گیاهان زینتی در ایران.....	۷۲
۶	کشت بافت گیاهان دارویی.....	۷۵
۶-۱	کاربردهای کشت بافت گیاهی در گیاهان دارویی و اهمیت آن.....	۷۵
۶-۱-۱	ریزازدیادی، تکثیر انبوه و سریع گیاهان دارویی.....	۷۶
۶-۱-۲	حفاظت گونه های گیاهان دارویی از طریق نگهداری در سرما.....	۸۰
۶-۱-۳	تولید متابولیت های ثانویه در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی و کشت اندام.....	۸۱
۶-۲	پیشرفت های جهانی کشت بافت گیاهان دارویی و چشم انداز آینده آن.....	۸۳
	فهرست منابع.....	۸۵

پیشگفتار

به طور کلی هر گونه فعالیت هوشمندانه بشر در خلق، بهبود و عرضه محصولات گوناگون با استفاده از موجودات زنده به ویژه از طریق مهندسی ژنتیک، در حوزه زیست فناوری قرار می گیرد. زیست فناوری یکی از محورهای اساسی توسعه در بسیاری از کشورها قلمداد شده است. در زیست فناوری کشاورزی حوزه های مختلفی همچون کشت بافت گیاهان، مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان و حیوانات اصلاح شده ژنتیکی یا تراریخته برای ایجاد صفات برتر، تهیه کیت های تشخیصی گیاهی، دام، طیور و آبزیان به منظور شناسایی مولکولی بیماری های مختلف، تولید کودهای زیستی برای افزایش حاصلخیزی خاک و کاهش مصرف کودهای شیمیایی، تولید داروها و واکسن های نو ترکیب به منظور تأمین سلامت و بهداشت دام و طیور، استفاده از زیست مهارگرها برای کنترل و مدیریت آفات و بیماری های گیاهی، به نژادی مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ها، مکان یابی ژن های کنترل کننده صفات مختلف، پیش بینی ژنومی و گزینش به کمک نشانگر و موارد بسیار دیگر مطرح و به کار گرفته می شود. زیست فناوری دارای توان عظیمی برای افزایش امنیت غذایی، سلامت انسان و سلامت محیط زیست می باشد. در قرن بیست و یکم با توجه به افزایش جمعیت و نیاز به تأمین مواد غذایی، زیست فناوری کشاورزی مورد توجه خاص قرار گرفته است. کشت بافت گیاهی یکی از شاخه های مهم زیست فناوری است.

در بخش اول این دستنامه علمی، به کاربردهای مختلف کشت بافت در کشاورزی، روش ها و مواد مورد نیاز کشت بافت گیاهی اشاره شده است و در بخش دوم، نگاهی به وضعیت کشت بافت گیاهی در جهان و ایران داشته ایم و در سایر بخش ها، کاربردهای

کشت بافت به‌طور اختصاصی در گیاهان باغی، زراعی، زینتی و دارویی مطرح شده است. مطالب این دستنامه علمی درجهت روشننگری کارشناسان، کشاورزان و سایر مسئولان ذیربط درارتباط با بهره‌برداری مفید از فنون کشت بافت گیاهی تدوین و گردآوری شده است. در پایان لازم می‌دانم از همکاری ستاد توسعه زیست‌فناوری معاونت علمی محترم ریاست جمهوری برای حمایت از این کمیته در انتشار نشریات و نیز به‌خاطر کمک‌های ایشان به وزارت جهاد کشاورزی در اجرایی کردن برنامه‌های زیست‌فناوری تشکر و قدردانی نمایم.

کمیته بیوتکنولوژی وزارت جهاد کشاورزی

مقدمه

به کشت مواد گیاهی عاری از میکروب اعم از بذر، جنین، بافت، سلول و پرتوپلاست گیاهان عالی در محیط ضدعفونی شده درون ظروف استریل مانند لوله آزمایش، کشت درون شیشه‌ای گیاهی یا کشت بافت گیاهی گفته می‌شود. از کشت درون شیشه‌ای گیاهی به منظور تکثیر رویشی گیاهان یا ریزازدیادی، به‌نژادی گیاهی، تولید فرآورده‌های بیوشیمیایی، بیماری‌شناسی گیاهی، نگهداری و انبار کردن بافت‌های گیاهی، پژوهش‌های علمی و غیره استفاده می‌شود. ریزازدیادی یکی از مهمترین جنبه‌های تجاری استفاده از کشت درون شیشه‌ای است و مزایای زیادی نسبت به روش‌های متداول ازدیاد رویشی دارد. هدف ریزازدیادی تولید انبوه گیاهچه‌های همسان از نظر ژنتیکی با رشدونمو طبیعی، درکمترین زمان و با کمترین هزینه است. باتوجه به اهمیت و گسترش کشت درون شیشه‌ای گیاهی در باغبانی، کشاورزی و جنگلداری و ضرورت افزایش آگاهی عموم و کارشناسان بخش کشاورزی در این زمینه، کمیته بیوتکنولوژی کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی اقدام به انتشار دستنامه علمی کشت بافت گیاهی و کاربردهای آن در عرصه‌های مختلف کشاورزی نمود. در این دستنامه در بخش اول به کاربردهای مختلف کشت بافت در کشاورزی، روش‌ها و مواد موردنیاز کشت بافت گیاهی اشاره شده است و در بخش دوم نگاهی به وضعیت کشت بافت گیاهی در جهان و ایران داشته‌ایم و در سایر بخش‌ها کاربردهای کشت بافت به‌طور اختصاصی در گیاهان باغی، زراعی، زینتی و دارویی مطرح شده است.

۱. کلیات کشت بافت گیاهی

کشت سلول و بافت گیاهی که با عنوان‌های کشت این‌ویتر^۱ (درون شیشه‌ای) و یا کشت استریل نیز مطرح می‌شود، ابزاری مهم در مطالعات پایه و کاربردهای تجاری است. در حال حاضر، به عملیاتی نظیر کشت سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌های استریل و اجزای آنها تحت شرایط مطلوب فیزیکی و شیمیایی در آزمایشگاه، «کشت بافت گیاهی» اطلاق می‌شود. استفاده از فناوری کشت بافت برای تکثیر رویشی گیاهان یا ریزازدیدی مهمترین کاربرد تجاری این فناوری است. با این فناوری می‌توان از یک گیاه، میلیون‌ها گیاه جدید، با کیفیت خوب و در زمان کوتاه تولید کرد.

۱-۱ مزایای کشت بافت گیاهی

۱. معمولاً بهترین ارقام برای کشت بافت انتخاب می‌شوند و این در احیای باغات اهمیت ویژه دارد.
۲. کشت بافت باعث تکثیر ارقام با ژنوتیپ یکسان می‌شود که این به معنی ایجاد باغات یکنواخت و قابل مکانیزاسیون است.
۳. گیاهان تکثیرشده به‌روش کشت بافت از سرعت رشد بالایی نسبت به گیاهانی برخوردارند که به روش‌های سنتی تکثیر می‌شوند.
۴. ازدیاد آن گروه از گیاهانی که با روش‌های سنتی به‌سختی تکثیر شده و یا از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه نیستند مثل گیاهان درحال انقراض.

1. *In vitro*

۵. تولید گیاهانی دقیقاً یکسان از گیاهانی که به‌خوبی گل یا میوه می‌دهند و یا دارای سایر صفات مطلوب هستند.
۶. تولید سریع‌تر گیاهان بالغ. با فنون کشت بافت در اکثر گیاهان چندساله از جمله خرما و گردو دوره نونهالی و زودباردهی آنها کاهش می‌یابد.
۷. تولید چندین گیاه در شرایط نبود بذر یا لزوم گرده‌افشانی برای تولید بذر.
۸. غلبه بر موانع جوانه‌زنی در برخی گیاهان. در تعدادی از گونه‌های گیاهی، جوانه‌زنی در شرایط خارج آزمایشگاه، مطلقاً امکان‌پذیر نیست. به‌علاوه، در برخی از گونه‌های گیاهی، خواب بذر وجود دارد که اغلب به‌علت پوسته بذر و یا آندوسپرم است. با حذف پوسته بذر در شرایط کشت بافت، جوانه‌زنی بلافاصله صورت می‌گیرد.
۹. از بین رفتن اثر اقلیم‌ها از نظر فصل و زیستگاه و آب‌وهوا؛ در تمام طول سال می‌توان گیاه کشت بافت را تولید کرد.
۱۰. حمل‌ونقل مواد گیاهی را راحت‌تر می‌کند.
۱۱. نگهداری درازمدت از مواد گیاهی.
۱۲. فنون کشت بافت در تولید گیاهان عاری از ویروس، مهندسی ژنتیک، دورگ‌گیری سوماتیکی، اصلاح نباتات و مطالعات پایه استفاده می‌شوند.
۱۳. مطالعه سریع‌تر اساس مولکولی سازوکارهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تولیدمثلی گیاهان در شرایط کنترل‌شده کشت بافت ممکن می‌شود.

۱-۲ کاربردهای کشت بافت گیاهی

۱-۲-۱ تکثیر درون‌شیشه‌ای

یکی از مهمترین مزایای تکثیر از طریق کشت بافت نسبت به سایر روش‌های مرسوم، تولید تعداد زیادی گیاه با محتوای ژنتیکی یکسان و کیفیت یکنواخت، در زمان کوتاه‌تر و فضای نسبتاً محدود می‌باشد.

مهمترین روش‌های تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاهان، ریزازدیادی، اندام‌زایی از طریق کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی است:

۱. ریزازدیادی^۱

تکثیر گیاهان یکسان از نظر ژنتیکی (کلون) در شرایط این ویترو را ریزازدیادی می‌نامند. ریزازدیادی امکان تکثیر سریع و انبوه ژنوتیپ‌های مطلوب و تولید گیاهان یکسان عاری از بیماری به‌خصوص عاری از ویروس‌ها را فراهم می‌سازد.

۲. اندام‌زایی از طریق کالوس

کالوس یک توده سلولی کم‌وییش سازمان‌نیافته، با دیواره سلولی نازک می‌باشد که معمولاً از سلول‌های پارانشیمی به‌وجود آمده است. تولید کالوس، قابلیت باززایی کالوس و ریشه‌زایی گیاهیچه به عوامل متعددی بستگی دارد که مهمترین آنها ژنوتیپ، ریزنمونه و شرایط فیزیولوژیک آن، نوع محیط کشت و عناصر غذایی، عوامل فیزیکی و شرایط محیطی از قبیل: نور، دما و pH، تنظیم‌کننده‌های رشد و ویتامین‌ها می‌باشد.

۳. باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی

جنین‌زایی سوماتیک فرایندی است که طی آن گروهی از سلول‌ها یا بافت‌های سوماتیک به جنین تبدیل می‌شوند. این جنین‌ها شبیه جنین‌های زیگوتی (جنین‌های حاصل از لقاح جنسی) هستند و در محیط کشت مناسب می‌توانند به گیاه تبدیل شوند. کاهش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد روی محیط کشت سبب رشد و جوانه‌زایی جنین‌های سوماتیکی می‌شود.

۲-۱-۲ حفاظت گونه‌های گیاهی از طریق نگهداری در سرما

با تکیه بر کشت بافت و سلول می‌توان برای نگهداری کالتیوارهای موردنظر در بانک ژن یا برای نگهداری طولانی‌مدت اندام‌های تکثیر گیاه در محیط نیتروژن مایع، اقدام نمود. در این روش با استفاده از نیتروژن مایع (-196°C) فرایند تقسیم سلولی و سایر فرایندهای متابولیکی و بیوشیمیایی متوقف شده و در نتیجه می‌توان بافت یا سلول گیاهی را مدت زمان بیشتری نگهداری و حفظ نمود.

۳-۲-۱ القای تنوع رویشی و گزینش سلول‌ها در محیط‌های کشت بافت برای تولید گیاهانی با ویژگی‌های سودمند

تاکنون برای ایجاد تنوع و انتخاب گیاهان واجد صفات تغییر یافته و جدید از قبیل گیاهان مقاوم به شوری، خشکی، گرما، سرما و مقاومت به آفات و بیماری‌ها و یا بهبود کیفیت مواد

1. Micropropagation

غذایی از این روش‌ها استفاده گردیده است که در بعضی از زمینه‌ها، رقم‌های تجاری نیز تولید شده است.

۴-۲-۱ پرورش سلول‌های گیاهی در مقیاس وسیع در کشت مایع برای تولید ترکیبات ارزشمند

گیاهان در طول زندگی خود برخی از مواد آلی شیمیایی پیچیده تولید می‌کنند که در رشد و نمو و فعالیت‌های حیاتی گیاه نقشی ندارند که به آنها متابولیت‌های ثانویه^۱ گفته می‌شود. متابولیت‌های ثانویه کاربردهای مختلفی در صنایع گوناگون و به‌ویژه پزشکی دارند. اسانس‌ها و مواد معطر، مواد مؤثره دارویی، فرمون‌ها، حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها، قارچ‌کش‌ها، هورمون‌های گیاهی و مواد آللوپاتیک (ایجادکننده انواع مقاومت‌ها و یا بازدارنده رشد و نمو) از این جمله هستند.

تولید انبوه و سریع این مواد پیچیده در مقیاس زیاد از روش‌های شیمیایی آزمایشگاهی، مشکل و یا غیرممکن می‌باشد. بنابراین، استفاده از تکنیک‌های کشت بافت‌های گیاهی برای تولید آسان و انبوه متابولیت‌های ثانویه، یک راه‌حل مناسب و ارزان‌تر برای این مشکل می‌باشد. از جمله ابزارهایی که برای کشت وسیع سلول‌های گیاهی به‌منظور تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه به کار رفته‌اند، بیورآکتورها هستند.

۵-۲-۱ تلاقی گونه‌های دور وابسته به هم توسط دورگ‌گیری سوماتیکی و امتزاج پروتوپلاست

دورگ‌گیری سوماتیکی^۲ و امتزاج پروتوپلاست^۳ در جنس‌ها و گونه‌هایی انجام می‌شود که تلاقی‌پذیری ندارند. این کار به‌منظور اصلاح ژنتیکی گونه‌های گیاهی و در جهت افزایش تنوع ژنتیک و ایجاد صفات و یا گیاهان جدید و تولید سیب‌زدها (دورگ‌های سیتوپلاسمی) استفاده می‌شود. این فنون با رفع محدودیت تلاقی‌های بین گونه‌ای و بین جنسی از طریق کشت تخمک نارس یا بالغ، گرده‌افشانی در محیط مصنوعی^۴ و یا به کارگیری فنون نجات (یا کشت) جنین^۵ می‌توانند به‌عنوان مکمل روش‌های اصلاح سنتی عمل نمایند.

1. Secondary metabolites
2. Somatic hybridization
3. Protoplast Fusion
4. *In vitro* Pollination
5. Embryo rescue

۶-۲-۱ تولید گیاهان دابل هاپلوئید

از بافت‌های زایشی گیاهان جهت کشت هاپلوئیدی^۱ استفاده می‌شود. بافت‌های زایشی از جذابیت خاصی برخوردارند، زیرا حاوی سلول‌های هاپلوئید با تعداد کروموزوم گامتی (n) در سلول‌های سوماتیک دیپلوئید هستند. با به کارگیری فنون کشت بافت، از سلول‌های هاپلوئید می‌توان گیاهان هاپلوئید تولید نمود. گیاهان هاپلوئید می‌توانند مجموعه کروموزومی خود را برای تولید گیاهان دابل هاپلوئید هموزیگوس با تیمارهایی خاص دوبرابر سازند.

کشت بساک^۲ و تخمک^۳ بر روی محیط‌های غذایی مصنوعی امکان به دست آوردن هاپلوئیدها را میسر می‌سازد. این روش، طول دوره به‌نژادی را از حدود ۱۲-۱۰ سال (در برنامه‌های به‌نژادی سنتی و کلاسیک) به ۶-۷ سال کاهش می‌دهد و لاین‌های صددرصد خالص (هموزیگوس) ایجاد می‌نماید. بنابراین، روش دابل هاپلوئیدی می‌تواند سریع‌تر از روش‌های سنتی، رقم جدید را معرفی نماید.

۷-۲-۱ تولید مواد گیاهی سالم و عاری از ویروس، باکتری و قارچ

مزیت اصلی ریزازدیادی، به دست آوردن مواد گیاهی عاری از ویروس و یکنواخت از نظر ژنتیکی می‌باشد. با استفاده از بافت‌های مریستمی نوک ساقه‌چه و جوانه‌های جانبی اندام‌های با منشأ ساقه می‌توان مواد گیاهی عاری از ویروس و یکنواخت از نظر ژنتیکی به دست آورد.

۸-۲-۱ باززایی گیاهان حاصل از فنون مهندسی ژنتیک

در سال‌های اخیر فناوری کشت بافت برای دست‌ورزی ژنتیکی در سطح کروموزوم مورد استفاده قرار گرفته است که دارای پتانسیل منحصربه‌فردی برای تکمیل روش‌های مرسوم اصلاح نباتات می‌باشد. در همه این فنون، سلول گیاهی یا بافت گیاهی در یک محیط غذایی مصنوعی کشت داده می‌شود، تا بدین طریق از قطعات بافت یا سلول‌های جداشده، پروتوپلاست و یا بافت جنینی، گیاه کاملی حاصل شود.

۹-۲-۱ باروری درون‌شیشه‌ای

یکی از زمینه‌های فناوری کشت سلولی، استفاده از آنها در به‌نژادی گیاهی می‌باشد که کاربرد روش‌های سلکسیون سنتی را در تهیه لاین‌ها و ارقام جدید گیاهان تسهیل و تسریع می‌نماید.

1. Haploid culture

2. Anther culture

3. Ovule culture

باروری درون‌شیشه‌ای^۱ نیز، از روش‌هایی است که غلبه بر مشکل خودناسازگاری^۲ را که در بین تعدادی از گونه‌های گیاهی وجود دارد، ممکن می‌سازد.

۳-۱ خصوصیات آزمایشگاه کشت بافت گیاهی و تجهیزات مورد نیاز

به‌طور کلی یک آزمایشگاه کشت بافت قسمت‌های زیر را دارد:

- انبار برای نگهداری وسایل اضافی و مواد ذخیره
 - آزمایشگاه یا اتاق تهیه محیط کشت
 - اتاق توزیع محیط کشت و کشت نمونه گیاهی^۳
 - اتاق رشد^۴ یا اتاقک رشد^۵
 - اتاق ظرفشویی و اتوکلاو - اتاق ترازوها، یخچال، فریزر و ...
 - اتاق تکسین‌ها
 - گلخانه (برای سازگاری و رشد بعدی گیاهان تکثیرشده)
- تجهیزات و وسایل لازم برای تأسیس یک آزمایشگاه تخصصی کشت بافت به‌شرح زیر است. البته برای کار در مقیاس کوچکتر می‌توان وسایل ساده‌تری مورد استفاده قرار داد.

۳-۱-۱ اتاق تهیه محیط کشت

برای تهیه محیط کشت به وسایل مختلفی نیاز است:

- انواع ظروف شیشه‌ای در سایزهای مختلف (بشر، ارلن، مزور یا استوانه مدرج، بطری‌های در پیچ‌دار یا در آبی، ...)
- انواع ظروف پلاستیکی در سایزهای مختلف (بشر، مزور، ارلن، ...)
- همزن با گرمکن^۶ (شکل ۱-۱) همراه با انواع مگنت (با اندازه‌های مختلف)
- انواع ترازوی حساس (از ۰/۱ گرم تا ۰/۰۰۰۱ گرم) یک رقم تا چهار رقم اعشار (شکل ۱-۲)
- دستگاه تولید آب مقطر^۷ یا تولید آب دیونیزه^۸

1. *In vitro* fertilization
 2. Self incompatibility
 3. Culture room
 4. Growth room
 5. Growth chamber
 6. Heater- Stirrer
 7. Distilled water
 8. Deionized water



شکل ۱-۱ همزن مغناطیسی با گرمکن.



شکل ۱-۲ ترازوی حساس.

به دستگاه تولید آب مقطر (شکل ۱-۳) دو شلنگ متصل شده که یکی از آنها به فلکه آب وصل می‌شود و دیگری که مازاد آب از آن خارج می‌شود، به این صورت که وقتی فلکه آب را باز می‌کنیم آب وارد دستگاه می‌شود و شروع به تقطیر می‌کند و آب مطلوب و مناسب از لوله اول به دست می‌آید و مازاد آن از لوله دوم خارج می‌شود.



شکل ۱-۳ دستگاه تولید آب مقطر.

- پی‌اچ‌متر^۱، اتوکلاو^۲، اجاق مایکروویو و ...
- پی‌اچ‌متر (شکل ۱-۴) دارای یک سنسور، صفحه نمایشگر آنالوگ و مقداری بافر برای مرطوب نگه داشتن سنسور است. کاربرد آن: تعیین محدوده pH مواد محلول.



شکل ۱-۴ پی‌اچ‌متر.

1. pH-meter
2. Autoclave



شکل ۵-۱ اتوکلاو.

اتوکلاو (شکل ۵-۱) ظرفی است که در آن: آب، محیط کشت، ظروف شیشه‌ای، پنس، اسکالپل، کاغذ صافی و غیره به وسیله بخار آب تحت فشار، استریل می‌گردند. با قراردادن اشیاء یا مواد در معرض بخار تحت فشار، کلیه میکروارگانیسم‌ها از بین می‌روند. برای مثال، محیط کشت با حجم بیشتر از ۵/۰ میلی لیتر به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 121°C در محیط اشباع از بخار آب قرار می‌گیرد. استریل کردن صحیح بستگی به زمان، فشار، درجه حرارت و حجم ماده‌ای دارد که قرار است اتوکلاو شود.

چسب اتوکلاو^۱. برای اطمینان از صحت عمل استریل کردن اتوکلاو، از چسب اتوکلاو (شکل ۶-۱) استفاده می‌شود. روی این چسب، نوارهای سفیدی وجود دارد که پس از اتوکلاوشدن به رنگ سیاه درمی‌آیند. معمولاً قطعه‌ای از این چسب را روی بطری حاوی محیط کشت و یا پلاستیک حاوی ابزار کار که قرار است داخل اتوکلاو قرار بگیرد، می‌چسبانند. در این صورت حتی در صورت عدم حضور در کنار اتوکلاو نیز از اتوکلاوشدن وسایل و محیط کشت مطمئن خواهیم بود.

1. Autoclave tape



شکل ۶-۱ چسب اتوکلادو.

آون (شکل ۷-۱) دارای بدنه با ورق فولادی و رنگ کوره‌ای می‌باشد. محفظه داخلی از جنس فولاد ضدزنگ با طبقات متحرک می‌باشد، که در این طبقات تمام ظروف شیشه‌ای که از جنس پیرکس و مقاوم به حرارت هستند و وسایل فلزی کشت مانند پنس و اسکالپل (تیغ یا چاقوی برش بافت) ضدعفونی می‌شوند.



شکل ۷-۱ آون.

۲-۳-۱ اتاق توزیع محیط کشت و کشت نمونه گیاهی

مهمترین دستگاه موجود در اتاق کشت، هود استریل یا لامینار می‌باشد. از لامینار برای توزیع محیط کشت، گندزدایی و کشت و واکشت نمونه‌های گیاهی و نیز استریل کردن مواد با فیلتر استفاده می‌شود.

برای کاهش آلودگی اطراف لامینار معمولاً آنرا داخل اتاق تمیز و جداگانه‌ای قرار می‌دهند که این اتاق به اتاق کشت معروف است. بسته به اندازه اتاق و نیز بزرگی آزمایشگاه کشت بافت، می‌توان چندین لامینار را داخل آن قرار داد.

هود استریل یا لامینار^۱

هود استریل (شکل ۸-۱) که بیشتر به آن لامینار گفته می‌شود، محفظه‌ای است که هوای مکیده شده از محیط خارج قبل از ورود به آن، با عبور از فیلترهای بسیار ریز تصفیه می‌شود. به این فیلترها، فیلتر هپا^۲ گفته می‌شود. این فیلتر اجازه عبور به ذرات بزرگتر از 0.3 میکرون را نمی‌دهد.

جریان هوا در داخل لامینار به صورت لایه‌ای است و به همین دلیل لامینار نامیده می‌شود. فشار زیر لامینار مثبت است و بنابراین ذرات آلودگی نمی‌توانند از جلو وارد لامینار شوند. لامینار باید سالانه توسط کارخانه سازنده بازدید و سرویس شود و فیلتر آن در صورت آلودگی تعویض گردد.



شکل ۸-۱ هود استریل.

-
1. Laminar air flow cabinet
 2. HEPA: High Efficiency Particulate Air



شکل ۹-۱ استریلایزر.

استریلایزر با گلوله‌های شیشه‌ای^۱

این نوع استریلایزر (شکل ۹-۱) برای استریل کردن پنس و اسکالپل به کار می‌رود. دمای استریلایزر قابل تنظیم بوده و تا حدود 300°C بالا می‌رود. استریلایزر را حدود ۲۰ دقیقه قبل از آغاز کار و معمولاً همراه با روشن کردن لامینار روشن می‌کنیم. زمانی که استریلایزر به دمای مورد نظر رسید، می‌توان با قراردادن ابزار کار به مدت ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه درون گلوله‌های شیشه‌ای، آنها را استریل نمود. برای کاهش حرارت ابزار کار می‌توان آنها را پس از خارج کردن از استریلایزر، درون اتانول ۹۶ درصد فرو برد.

هود شیمیایی^۲

هود استریل یا لامینار را نباید با هود شیمیایی اشتباه گرفت. محفظه هود شیمیایی (شکل ۱۰-۱) استریل نیست و فن موجود در بالای هود شیمیایی هوا را از پایین به سمت بالا هدایت می‌کند. بنابراین، فشار داخل محفظه هود شیمیایی برخلاف لامینار که فشار مثبت دارد، منفی است. از هود شیمیایی برای کار با اسیدها، مواد سمی و فرار و مواد بدبو مانند فنول، متانول، مرکاپتواتانول و... استفاده می‌گردد.

1. Glass bead sterilizer
2. Fume hood



شکل ۱-۱۰ هود شیمیایی.

۱-۴ مواد مورد نیاز برای کشت بافت گیاهی

۱-۴-۱ محیط کشت^۱

در شرایط آزمایشگاهی اولین چیزی که نیاز داریم یک بستر مناسب برای رشد گیاه می باشد، به این بستر اصطلاحاً محیط کشت می گویند. در محیط کشت کلیه مواد غذایی زیر می تواند وجود داشته باشد:

عناصر ماکرو، عناصر میکرو، هیدرات های کربن یا قندها، ویتامین ها، هورمون ها، آمینواسیدها همچون گلیسین و ترکیبات پیچیده مثل پیتون، هیدرولیزات کازئین، شیر نارگیل، پلی آمین آگار، آب.

عناصر ماکرو

این مواد به مقداری بیش از ۵/۰ میلی مول برلیتر، مورد نیاز گیاه می باشند. این عناصر شامل: پتاسیم، فسفر، نیتروژن، گوگرد، منیزیم و فسفر می باشند. معمولاً عناصر معدنی ماکرو به صورت استوک ساخته و در یخچال نگهداری می شوند. در تهیه استوک باید دقت شود که مواد ترکیب شده، تشکیل رسوب ندهند. به عنوان مثال، در بین عناصر ماکرو، منیزیم را معمولاً به صورت استوک جداگانه تهیه می کنند.

1. Medium

عناصر میکرو

این مواد به مقداری کمتر از ۰/۵ میلی مول برلیتر مورد نیاز گیاه می باشند. این عناصر شامل روی، بر، مس، منگنز، آهن، مولیبدن، ید و کبالت می باشند. در میان این عناصر فقط آهن به صورت استوک جداگانه و بقیه عناصر به صورت یک استوک (استوک میکرو) ساخته می شود. معمولاً استوک آهن درون فویل پیچیده می شود زیرا نور تجزیه کننده آهن است. محلول استوک نمک های میکرو همانند استوک نمک های ماکرو برای کوتاه مدت در یخچال قابل نگهداری است و برای نگهداری طولانی مدت، از فریزر استفاده می شود.

قندها یا هیدرات های کربن

به دلیل نور کم در محیط درون شیشه ای، فتوسنتز چندانی صورت نمی گیرد، لذا افزودن قند در محیط کشت کاملاً ضروری است. معمولاً از قند ساکاروز، فروکتوز و گلوکز استفاده می شود. میزان غلظت قند افزوده شده به محیط، بستگی به نوع ریزنمونه^۱ و سن آن دارد. مثلاً جنین های جوان به درصد بالاتری قند نیاز دارند. نکته مهمی که باید توجه کرد این است که قندها در اثر اتوکلاو، دچار تغییر می شوند.

ویتامین ها

اکثر ویتامین ها توسط گیاه ساخته می شود؛ لیکن اضافه نمودن برخی از ویتامین ها نظیر نیکوتینیک اسید (B3)، تیامین (B1)، پیرودوکسین (B6) و... به محیط کشت ضروری است. همچنین از ویتامین C به عنوان آنتی اکسیدان استفاده می شود. ویتامین ها معمولاً به صورت استوک 100X (یعنی صدبرابر) تهیه می شوند عموماً ویتامین ها را توسط صافی، استریل می کنند و از اتوکلاو (به دلیل حساسیت ویتامین ها به گرما) استفاده نمی شود.

هورمون ها

معمولاً هورمون ها در ایجاد تمایز و شکل گیری اندام ها مؤثر هستند، مهمترین هورمون های گیاهی که در کشت بافت استفاده می شوند عبارت اند از: اکسین، سیتوکینین، جیبرلین. البته گاهی هم از آبسزیک اسید استفاده می گردد. سیتوکینین از مهمترین هورمون ها در تمایز بافت ها می باشد. از جیبرلین، معمولاً در کشت جنین استفاده می شود چون جیبرلین از اندام زایی^۲ جلوگیری می نماید، البته از جیبرلین ها مانند جیبرلیک اسید^۳ (GA3) برای رشد

1 Explant 2. Organogenesis 3. GA3: Gibberellic acid

طولی میانگره‌ها و افزایش طول جوانه‌های رویشی نیز استفاده می‌شود. اکسین کاربرد زیادی در کشت بافت دارد و شامل IAA^۱، IBA^۲، NAA^۳ و 2,4-D^۴ است. IAA اکسین طبیعی است که به دلیل ناپایداری در مقابل نور و دما، درون فویل نگهداری می‌شود. از 2,4-D استفاده چندانی در کشت بافت نمی‌شود چون این ماده سبب ایجاد موتاسیون می‌شود و نیز مانع فتوسنتز می‌باشد، ولیکن از 2,4-D در القای جنین‌زایی سوماتیکی بهره می‌گیرند.

۵-۱ مراحل و شرایط کشت بافت گیاهی

آماده‌سازی بافت گیاهی برای کشت بافت تحت شرایط ضدعفونی و در زیر کابینت با جریان لامینار دارای فیلتر هوای HEPA انجام می‌شود. سپس این بافت در ظروف استریل همچون پتری‌دیش‌ها یا فلاسک‌های استریل در یک اتاق رشد با شرایط دمایی و شدت نور کنترل‌شده پرورش داده می‌شود.

محیط کشت‌های جامد و مایع عموماً دارای ترکیبی از نمک‌های غیرآلی به‌همراه مقدار کمی ریزمغذی‌های آلی، ویتامین‌ها و هورمون‌های گیاهی هستند. محیط کشت جامد از محیط‌های کشت مایع همراه با اضافه‌کردن عوامل ژل‌کننده که معمولاً آگار خالص و تصفیه‌شده است ساخته می‌شوند.

۵-۱-۱ مراحل اصلی انجام کشت بافت‌های گیاهی

۱. تهیه ریزنمونه و استریل‌سازی آن
۲. انتقال ریزنمونه به محیط کشت در زیر هود لامینار
۳. رشد گیاه در محیط کشت تحت شرایط کنترل‌شده
۴. واکشت کردن ریزنمونه‌ها
۵. سازگار کردن ریزنمونه‌ها با شرایط برون‌شیشه‌ای^۵
۶. انتقال گیاه به شرایط برون‌شیشه‌ای

1. IAA: Indole-3-acetic acid
2. IBA: Indole-3-butyric acid
3. NAA: Naphthaleneacetic acid
4. 2,4,D: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
5. *in vivo*

۲. وضعیت کشت بافت گیاهی در جهان و ایران

طی چند دهه گذشته شرکت‌های کشت بافت گیاهی متعددی در سراسر دنیا تأسیس شده است و به تکثیر انواع مختلفی از گیاهان پرداخته‌اند. طبق آمار فائو (۲۰۰۵) از تکنیک ریزاندیادی در ۲۱ کشور آفریقایی، ۱۹ کشور آسیایی، ۹ کشور اروپایی و ۹ کشور آمریکایی برای تکثیر تجاری گیاهان استفاده می‌شود. تولیدکنندگان عمده جهانی عبارت‌اند از هلند (۳۱٪)، ژاپن (۲۳٪)، آمریکا (۱۲٪)، ایتالیا (۱۱٪)، تایلند (۱۰٪) و بقیه کشورها (۱۳٪). کشورهای اصلی صادرکننده و سهم آنها از بازار جهانی عبارت است از: هلند (۵۴٪)، ایتالیا (۱۴٪)، کلمبیا (۹٪)، فلسطین اشغالی (۴٪)، اسپانیا (۲٪)، کنیا (۱٪) و بقیه کشورها (۱۶٪). چهار کشور اصلی صادرکننده شامل هلند، ایتالیا، کلمبیا و فلسطین اشغالی ۸۰٪ بازار جهانی را در اختیار دارند و سهم کشورهای در حال توسعه در آفریقا، آسیا و آمریکای لاتین کمتر از ۲۰٪ است (دل‌مینی و همکاران، ۲۰۰۵).

در این راستا، شرکت‌های بزرگ برای داشتن بازار مطمئن سعی می‌کنند تا با تحقیقات مستمر و با هدف بهبود و بهینه کردن عوامل مؤثر بر رشد و تکثیر در شرایط این‌ویترو، یافتن مواد مصرفی جایگزین ارزان‌تر، استفاده از فناوری‌های نوین در کشت بافت نظیر بیوراکتور، استفاده از نیروی ارزان در کشورهای جهان سوم، هزینه‌های تولید را کاهش دهند. همچنین این شرکت‌ها برای ایجاد تنوع در محصولات خود اقدام به اصلاح و معرفی ارقام جدید به‌ویژه در مورد گیاهان زینتی می‌نمایند. شرکت‌های بزرگ در این صنعت به‌منظور حفظ بازار موجود

و ترغیب مصرف کنندگان جدید، دارای پشتوانه برنامه‌های اصلاحی قوی هستند که توانایی عرضه ارقام جدید و متنوع را فراهم کرده است و از علم بیوتکنولوژی به‌خوبی در این زمینه بهره برده‌اند.

فناوری کشت بافت در کشورهای قاره اروپا گسترش چشمگیری داشته است به‌طوری‌که در مجموع بیش از ۴۳۰ واحد در حوزه کشت بافت در اروپا مشغول فعالیت هستند که از این میان، در حدود ۲۹۰ واحد به‌صورت تحقیقاتی و عمدتاً با نظارت مستقیم سازمان‌های دولتی فعالیت می‌کنند و ۱۴۰ شرکت خصوصی نیز تکثیر تجاری گیاهان مختلف را برعهده دارند. در این میان گیاهان زینتی بیشترین سهم تولید از طریق فناوری کشت بافت را به‌خود اختصاص داده‌اند (اورپوردين، ۲۰۰۳). در آلمان، تکثیر تجاری گیاهان با استفاده از فناوری کشت بافت از سال ۱۹۸۴ آغاز شده و پس از گذشت ۷ سال فعالیت مستمر در این حوزه، میزان تولید سالانه گیاهچه‌های کشت بافتی به ۲۰ میلیون گیاهچه در سال رسیده است. این روند تا سال ۲۰۰۴ ثابت باقی مانده است و در طول این مدت، ۸ شرکت تجاری در حدود ۹۲ درصد از کل تولید کشت بافتی این کشور را به‌خود اختصاص داده‌اند (وینکلن و همکاران، ۲۰۰۶).

در میان کشورهای در حال توسعه، کشور هند به‌عنوان یکی از مهم‌ترین تولیدکنندگان محصولات کشت بافتی شناخته شده است. در این کشور در حدود ۱۰۰ واحد تجاری فعال در حوزه کشت بافت گیاهی حضور دارند به‌طوری‌که هریک از این واحدها سالانه حداقل یک میلیون گیاهچه کشت بافتی تولید می‌کنند و در این میان ۲۰ واحد کشت بافتی با ظرفیت تولید سالانه ۵ تا ۱۰ میلیون گیاهچه حضور دارند. مزایای کاربرد فناوری کشت بافت در تکثیر و اصلاح گونه‌های گیاهی موجب شده است تا این حوزه از صنعت کشاورزی مورد حمایت دولت هند نیز قرار گیرد به‌طوری‌که تا سال ۲۰۱۱، ۱۵۰ پروژه در زمینه تحقیق و توسعه فناوری کشت بافت در این کشور با موفقیت اجرا شده است. رشد چشمگیر صنعت کشت بافت در کشور هند سبب شده است تا در طول سال‌های ۱۹۹۹ تا ۲۰۱۱، میزان تولید از طریق روش‌های کشت بافت در این کشور سالانه ۳۵٪ افزایش داشته باشد (سینگ و شتی، ۲۰۱۱). در جنوب‌شرقی آسیا نظیر کشورهای تایلند، مالزی و سنگاپور نیز فناوری کشت بافت عمدتاً با هدف تکثیر گیاهان زینتی گسترش یافته است.

طبق گزارش سرویس بین‌المللی دستیابی و استفاده از بیوتکنولوژی کشاورزی (ISAAA)، در کشور تایلند سالانه بیش از ۵۰ میلیون گیاهچه از طریق فناوری کشت بافت تولید می‌شوند که گونه‌های زینتی ارکیده سهم بزرگی از آنرا به خود اختصاص می‌دهند. کشت بافت موفقیت‌آمیز گونه‌های ارکیده موجب شده است که کشور تایلند به عنوان یکی از مهم‌ترین کشورهای صادرکننده این گیاه در سطح دنیا شناخته شود. همچنین در کشور فیلیپین، ریزازدیادی موز به منظور تکثیر انبوه این گیاه گسترش چشمگیری داشته است. با توجه به اینکه بیماری‌های ویروسی به عنوان مهم‌ترین مانع تکثیر زایشی گیاه موز به شمار می‌رود، تولید گیاهان موز عاری از ویروس مانند ویروس‌های تاج دسته‌ای موز (BBTV) و موزائیک برگچه‌ای موز (BBRMV) از جمله مزایای مهم تولید تجاری این گیاه از طریق کشت بافت است. علاوه بر آن، تکثیر ارقام پربازده نخل روغنی و رفع موانع دورگ‌گیری آنها از طریق فناوری کشت بافت منجر به افزایش ۳۵ درصدی عملکرد سالانه نخلستان‌های کشور مالزی شده است (سوه و همکاران، ۲۰۰۹) (شکل ۱-۲).

در کشورهای آفریقایی، نجات جنین یکی از روش‌های مؤثر کشت بافت در بهبود عملکرد ارقام برنج بوده است، به طوری که با ابداع این روش، امکان دورگ‌گیری بین گونه‌های برنج *Oryza glaberrima* و *Oryza sativa* از طریق جداسازی و کشت جنین‌های حاصل در شرایط درون‌شیشه‌ای فراهم شده است. همچنین به کارگیری فنون کشت بافت به منظور بهبود عملکرد مزارع موز کنیا و جلوگیری از شیوع بیماری‌های ویروسی در این مزارع موفقیت‌آمیز بوده است (کابونگا و همکاران، ۲۰۱۲).

استفاده از فنون کشت بافت با هدف تکثیر تجاری بیش از بیست سال است که در ایران آغاز شده است و متخصصان این حوزه توانسته‌اند موفقیت‌های قابل توجهی را در این زمینه کسب کنند. در حال حاضر، ۶۷ شرکت داخلی در زمینه تولید گردو، خرما، پایه‌های درختان میوه دانه‌دار و هسته‌دار شامل سیب، مرکبات، هلو و گیلان، گیاهان زینتی شاخه‌بریده و گلدانی و انواعی از گیاهان دارویی فعالیت دارند. با توجه به موفقیت‌های شرکت‌های فعال در حوزه کشت بافت گیاهی، پیش‌بینی می‌شود در عرصه گیاهان زینتی، باغی، دارویی و درختان جنگلی بتوان از روش کشت بافت به منظور تولید صنعتی استفاده نمود.



شکل ۱-۲ بخش های مختلف یک واحد تجاری کشت بافت نخل روغنی در مالزی با ظرفیت تولید سالانه دو میلیون گیاهچه (اقتباس از سوه و همکاران، ۲۰۰۹).

۳. کشت بافت گیاهان باغی

فنون سنتی به‌نژادی گیاهان، پیشرفت‌های قابل‌توجهی را در اصلاح ارقام با پتانسیل بالای تولید به‌وجود آورده‌اند ولی این فنون قادر نیستند میزان تولید میوه و محصولات باغی را نسبت به افزایش تقاضا برای این محصولات بالا ببرند. لذا نیاز ضروری به استفاده از فنون کشت بافت برای سرعت‌دادن به توسعه برنامه‌های اجرایی احساس می‌شود. استفاده از پایه‌های کوتاه‌کننده در درختان میوه در سالیان گذشته موردتوجه قرار گرفته است. امکان احداث باغ‌های یک‌دست با استفاده از نهال‌های بذری امکان‌پذیر نیست و درواقع مدیریت استفاده از پایه‌های مقاوم در باغ به‌تناسب شرایط اقلیمی و محیطی مستلزم تکثیر پایه‌های مقاوم، پاکوتاه و رویشی خواهد بود. کشت بافت گیاهان باغی از ابتدا با میوه‌هایی با بافت علفی مانند توت‌فرنگی، موز و آناناس کلید زده شد، و سپس درمورد گیاهانی مانند مرکبات، سیب و سایر درختان میوه توسعه پیدا کرد و به‌دنبال آن ریزازدیادی گیاهان باغی به‌عنوان وسیله‌ای برای تولید گیاهان عاری از بیماری، افزایش سریع گیاهان، حذف محدودیت زمان تکثیر، تسريع و تکمیل برنامه‌های اصلاح گیاهان باغی، بررسی‌های فیزیولوژی و اخیراً بیوتکنولوژی در آمد. کاربرد کشت بافت در صنعت میوه کاری از اقبال بسیاری برخوردار است. اغلب درختان میوه مانند مرکبات، کیوی، فروت، انگور، سیب، گلابی، گیلان، هسته‌دارها مانند هلو و شلیل و خرما و گردو قابلیت تکثیر تجاری از این روش را دارند. با توجه به نکات ذکر شده در این بخش سعی شده تا کاربردهای اصلی کشت بافت در گیاهان باغی مانند، پیوند نوک شاخه، تکثیر درون‌شیشه‌ای، تلاقی گونه‌های درحال انقراض از طریق نجات جنین، ازدیاد گیاهان نادر و امتزاج پروتوپلاست مورد بررسی قرار گیرد.



شکل ۱-۳ مرحله ریزازدیادی گیاهچه‌های سیب رقم گالا (علیزاده، ۱۳۹۵).

۱-۳ انواع روش‌های متداول ریزازدیادی گیاهان باغی

۱-۱-۳ تکثیر درون‌شیشه‌ای

تکثیر رویشی از پرکاربردترین فناوری‌های کشت بافت در گیاهان باغی است که از سه طریق انجام می‌شود، که در زیر مورد بررسی قرار می‌گیرد.

• کشت جوانه انتهایی و جانبی

سیب یکی از اولین گیاهان چوبی است که با موفقیت به‌صورت درون‌شیشه‌ای تکثیر شده است. پرآوری شاخه در سیب بر پایه محیط حاوی سیتوکینین مانند BAP (۰/۵ تا ۲ mg/l) به‌عنوان تنظیم‌کننده اصلی و در غلظت پایین‌تر اکسین‌ها مانند IBA (۰/۱ تا ۰/۵ mg/l) و در برخی مواقع جیبرلین (۰/۲ تا ۰/۵ mg/l) می‌باشد (شکل ۱-۳) (علیزاده، ۱۳۹۵).

تکثیرگونه‌های گلابی با بذر به‌دلیل دگرگشتن بودن گلابی، گوناگونی ژنتیکی را بهبود خواهد بخشید اما نهال‌های حاصل از بذر شبیه به اصل نبوده و تفرق صفات در پایه‌های بذری مشاهده می‌شود و همچنین مدت زمان لازم تا زمان باردهی در نهال‌های حاصل از بذر در مقایسه با پایه‌های رویشی طولانی‌تر خواهد بود. به‌همین دلیل، تکثیر ارقام گلابی از طریق کشت بافت، از نظر تجاری اهمیت ویژه‌ای دارد. در محیط کشت ریزازدیادی گلابی، سیتوکینین BAP (۰/۵ تا ۲ mg/l) و همچنین 2ip و TDZ استفاده می‌شود. ترکیب سیتوکینین‌های یادشده به‌همراه GA3 (۰/۵ mg/l) برای افزایش ارتفاع جوانه‌های جانبی تولیدشده مؤثر خواهد بود (Bell and Reed, 2002) (شکل ۲-۳).

اگرچه اکثر ارقام زیتون از طریق قلمه، پاجوش و پیوند قابل تکثیر هستند ولی تهیه نهال سالم زیتون به‌آسانی و بدون استفاده از فناوری کشت بافت امکان‌پذیر نیست. در مرحله



شکل ۲-۳ مرحله ریزازدیادی (الف) و مرحله ریشه‌زایی (ب) گیاهچه‌های گلابی رقم نطنز (حاج‌صادقیان نجف‌آبادی، ۱۳۹۵).

پراوری اغلب ارقام زیتون، محیط کشت MS یا OM مورد استفاده قرار می‌گیرد (Niaz et al., 2014). برای مرحله پراوری ترکیبات محیط کشت براساس رقم مورد بررسی طراحی می‌شود. به‌طور معمول، محیط MS یا OM در ترکیب با 1 mg/l GA3 و BAP یا محیط WPM در ترکیب با 0.005 mg/l IBA و 2 mg/l BAP برای ریزازدیادی زیتون درون‌شیشه‌ای ایرانی مناسب است. NAA و IBA از اکسین‌های اصلی است که در ریشه‌زایی زیتون تأثیر دارد ولی IBA (به‌میزان 0.8 تا 1.5 mg/l) همراه با شرایط تاریکی، در



ریشه‌دار کردن قلمه‌های زیتون درون‌شیشه‌ای مؤثرتر است. در بعضی از ارقام سخت ریشه‌زای زیتون، قراردادن گیاهچه‌ها در محیط نیم‌غلظت MS یا WPM بدون هورمون، یک دوره قبل از مرحله ریشه‌زایی، باعث آمادگی گیاهچه‌ها برای ریشه‌زایی می‌شود (درانی، ۱۳۹۱) (شکل ۳-۳).

شکل ۳-۳ ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای گیاه زیتون (درانی، ۱۳۹۱).



شکل ۳-۴ مراحل تکثیر درون‌شیشه‌ای گیلاس. (الف) مرحله ریزازدیادی؛ (ب) ریشه‌زایی؛ (ج) گیاهچه‌های سازگار شده گیلاس رقم Gzila5 (مهدویان و همکاران، ۱۳۸۹).

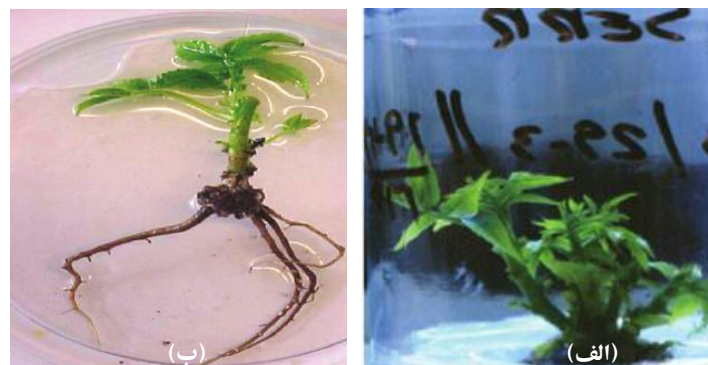
مشکلی که در حال حاضر در باغ‌های گیلاس کشور وجود دارد، رشد بیش‌ازحد درختان روی پایه بذری آلبالو تلخ است. بنابراین، تولید پایه‌های کوتاه‌کننده و سالم، مقاوم در برابر بیماری و با عملکرد بالا موجب افزایش عملکرد باغ‌های گیلاس خواهد شد. تولید پایه‌های پاکوتاه و با عملکرد بالا از طریق کشت بافت یکی از راهکارهای مناسب در انجام این مهم است. به‌طور معمول، از تمامی محیط کشت‌های MS، WPM و DKW برای مرحله پرآوری در ارقام مختلف گیلاس استفاده شده است، اما محیط MS همراه با BAP و GA3 (۰/۵ تا ۱ mg/l) در مرحله پرآوری و محیط MS بدون هورمون یا همراه با IBA (۰/۵ تا ۱ mg/l) برای مرحله ریشه‌زایی تقریباً در تمامی ارقام رضایت‌بخش بوده است (شکل ۳-۴) (مهدویان و همکاران، ۱۳۸۹، فلاح‌پور و همکاران، ۱۳۹۴).

پایه‌های TETRA، GN و GF677 پایه‌های ارزشمند و سازگار با اکثر ارقام میوه‌های هسته‌دار مانند هلو، بادام و شلیل می‌باشد. این پایه‌ها به‌روش غیرجنسی مانند قلمه‌زدن و خوابانیدن و پاجوش قابل تکثیر هستند، ولی با روش‌های نوین کشت بافت می‌توان آنها را با راندمان بسیار بیشتر و عاری از هرگونه آلودگی تکثیر کرد. تکثیر پایه‌های GF677 در بیورکتور تناوبی همراه با محیط MS تغییر یافته و ترکیب BAP (۱ mg/l) و GA3 (۰/۲ mg/l) موفقیت‌آمیز بود، به‌طوری‌که در مدت ۴۰ روز به‌طور متوسط ۶۰۰ جوانه با ارتفاع ۷/۴۳ سانتی‌متر در مقایسه با ۲۰ جوانه در ظروف رایج تولید می‌شود (شکل ۳-۵) (باقری و همکاران، ۱۳۹۲).



شکل ۳-۵ (الف) تکثیر انبوه پایه Gf677 (هیبرید هلو و بادام) در بیوراکتور
تناوبی؛ (ب) ظروف رایج. (باقری و همکاران، ۱۳۹۲)

باتوجه به تفاوت گیاهان تولیدشده گردوی حاصل از بذر، تنها راه رسیدن به یک ساختار ژنتیکی از درخت بالغ برگزیده و ازدیاد انبوه آن، استفاده از روش‌های تکثیر غیرجنسی است. استفاده از روش کشت بافت برای ریزازدیادی نهال گردو، امکان تکثیر انبوه گیاه را در فاصله زمانی کم فراهم کرده و از مشکلات موجود در قلمه‌زنی پایه‌های بالغ آن می‌کاهد (شکل ۳-۶). از ریزنمونه‌های مختلفی مانند: ساقه، ریشه، برگ، جوانه و نیز لپه و اندوسپرم برای کشت در شرایط آزمایشگاهی استفاده می‌شود. کشت ریزنمونه‌های جوانه جانبی در محیط DKW همراه BAP (۱ تا ۱/۵ mg/l) به‌طور معمول برای ریزازدیادی گردو استفاده می‌شود (امام، ۱۳۸۲).



شکل ۳-۶ ریزازدیادی (الف)، و ریشه‌زایی (ب) درون‌شیشه‌ای در گیاه گردو (Riosleal et al., 2007).

ریزنمونه‌های مختلفی مانند قطعات برگ، ساقه، ریشه، دانه گرده و مریستم رأسی و میانی به‌عنوان ریزنمونه اولیه برای تولید کالوس و باززایی گیاه انگور استفاده می‌شود. علاوه بر این، از ریزنمونه جوانه جانبی برای تکثیر انبوه به‌طور مستقیم هم استفاده می‌شود. برای مثال، قراردادن ریزنمونه‌های قسمت‌های میانی و پایینی شاخه ارقام بیدانه و شاهرودی، در محیط MS حاوی BAP (۰/۵ تا ۱ mg/l) به‌تنهایی یا همراه با IBA (۰/۱ mg/l) باعث پرآوری و ریزازدیادی آنها می‌شود (کلاته جاری و همکاران، ۱۳۸۴). همچنین استفاده از کیتوسان (با غلظت ۴۰ mg/l) نیز در این مرحله برای افزایش پرآوری انگور بی‌دانه قرمز مورد استفاد قرار گرفته است. برای ریشه‌زایی ریزقلمه‌های درون‌شیشه‌ای، از محیط MS ۱/۲ همراه با ۰/۰۵ تا ۰/۵ mg/l IBA استفاده می‌شود (صادقپور و ناصری ۱۳۹۳).

پسته گیاهی دوطایه است، ازدیاد آن به‌طور سنتی از طریق کاشت بذر انجام می‌شود که به‌دلیل اختلاف ژنتیکی بین پایه‌های حاصل، نیاز به تولید کلون‌های یکنواخت با عملکرد بالا و مقاوم از طریق کشت بافت وجود دارد. کشت سرشاخه‌ها و جوانه‌های گیاه پسته معمولاً با عوارضی نظیر قهوه‌ای‌شدن، نکروزه‌شدن و کاهش نرخ رشدونمو همراه می‌باشد. محیط کشت MS یا DKW ۱/۲ همراه با BAP (۲ mg/l) و NAA و IBA (۰/۱ mg/l) برای القای رشد جوانه‌های جانبی پسته مناسب می‌باشد (Minghao et al., 2011)، شاخه‌های ایجادشده در محیط کشت بعد از انتقال به محیط DKW ۱/۲ همراه با IBA (۳ mg/l) و NAA (۰/۲ mg/l) ریشه‌دار شده و آماده انتقال به خاک خواهند شد (Delijam et al., 2016) (شکل ۷-۳).



شکل ۷-۳ مرحله شاخه‌زایی (الف) و ریشه‌زایی (ب) گیاه پسته. (Delijam et al., 2016)



شکل ۳-۸ (الف) گیاه حاصل از رشد جوانه‌های جانبی عنب در محیط کشت مرحله شاخه‌زایی؛ (ب) گیاهچه‌های رشدیافته برای انتقال به محیط ریشه‌زایی. (ملکی قوچه، ۱۳۹۲)

با در نظر گرفتن تولید کم پاجوش در گیاه عنب و همچنین درصد پایین جوانه‌زنی بذور و ریشه‌زایی قلمه‌ها، میزان تکثیر رویشی در این گیاه پایین است و با توجه به خصوصیات مهم عنب شامل قابلیت رشد و تولید در زمین‌های کم‌آب، شور و سبک، نیاز به تکثیر آن را از طریق کشت بافت تأیید می‌کند. ریزنمونه اولیه برای تکثیر عنب به‌طور معمول جوانه جانبی است که جهت شاخه‌زایی در محیط کشت MS همراه با BAP (۱ تا ۲ mg/l) و IBA (۰/۲ mg/l) کشت می‌شوند. گیاهچه‌های رشدیافته بعد از افزایش ارتفاع به محیط کشت MS ۱/۲ همراه با IBA یا NAA (۲ mg/l) جهت ریشه‌زایی انتقال داده می‌شوند (شکل ۳-۸) (ملکی قوچه، ۱۳۹۲).

• جنین‌زایی سوماتیکی

جنین‌زایی سوماتیکی کاربردهای زیادی در گیاهان باغی دارد که می‌توان به حفاظت از منابع ژنتیکی، انتقال ژن برای بهبود کمیت و کیفیت میوه‌های آنها و بررسی تنوع سوماکلونال اشاره کرد. سیب از جمله درختان میوه‌ای است که برنامه‌های اصلاحی و انتقال ژن زیادی بر روی آن انجام می‌گیرد و یکی از بهترین روش‌ها برای این منظور استفاده از جنین‌های سوماتیکی است. در بین فاکتورهای مؤثر بر جنین‌زایی سوماتیکی در سیب نوع ریزنمونه (که معمولاً از ریزنمونه کوتیلدون، برگ یا بذری استفاده می‌شود) و محیط کشت مصرفی (به‌خصوص اکسین‌ها) اهمیت بیشتری دارند. بالاترین سرعت جنین‌زایی سوماتیکی ثانویه در ریزنمونه‌های کوتیلدون سیب در محیط MS با ترکیبی از هورمون‌های NAA (۵/۳ میکرومولار)،



شکل ۹-۳ مراحل تشکیل جنین‌های سوماتیکی و باززایی گیاه از بافت مریستم گیاه موز رقم Vallery. (مرادی و همکاران، ۱۳۹۴)

BAP (۰/۹ میکرومولار)، Kin (۰/۹ میکرومولار) و یا TDZ (۱۰ میکرومولار) به‌تنهایی و در شرایط تاریکی به‌دست آمده است (Daigny *et al.*, 1996).

ریزنمونه‌های مختلفی مانند: برگ، دمبرگ، پیچک، پرچم، بافت پوشش بذری، پروتوپلاست و تخمدان برای جنین‌زایی سوماتیکی در انگور استفاده می‌شود. کشت ریزنمونه تخمدان انگور به‌عنوان بهترین ریزنمونه جهت جنین‌زایی سوماتیکی بر روی محیط کشت MS همراه با 2,4-D (۴/۵ میکرومولار) و BAP (۱/۱ میکرومولار) و سپس انتقال کالوس‌های جنین‌زا به محیط MS حاوی IAA (۲ mg/l) و BAP (۱ mg/l) موجب تمایز بهتر جنین‌ها می‌شود.

از ریزنمونه‌های مریستم میانی، رأسی و حتی گل‌آذین نر گیاه موز برای ریزنمونه اولیه جهت جنین‌زایی سوماتیکی استفاده می‌شود. با کشت مریستم انتهایی و جانبی نمونه‌ها بر روی محیط کشت MS همراه با BAP (۲/۵ mg/l) به‌مدت ۹ هفته کالوس‌های باززایی حاصل می‌شود که با کم کردن غلظت BAP به نصف میزان اولیه، تعداد شاخه‌های جانبی افزایش می‌یابند (شکل ۹-۳). تکثیر خرما (*Phoenix dactylifera* L.) به سه روش بذری، پاجوش و کشت بافت ممکن است. افزایش بذری، به‌دلیل مشکلات مربوط به تعداد زیاد گیاه نر تولیدی، هتروزیگوت بودن و تفرق صفات، بیشتر برای برنامه‌های به‌نژادی به کار می‌رود. از سوی دیگر، استفاده از پاجوش نیز با محدودیت‌هایی مانند تعداد کم پاجوش در گیاه و سخت ریشه‌دهی روبه‌رو است. به‌دلیل معایب این دو روش در افزایش خرما، استفاده از یک روش مناسب و اقتصادی برای افزایش انبوه



شکل ۳-۱۰ (الف) مرحله باززایی گیاه از کالوس مریستم؛ (ب) ریشه‌زایی ریزنمونه‌های خرما رقم *Khalas*. (Junal and Saeed., 2009)

و سریع این گیاه دارای اهمیت زیاد می‌باشد. مریستم شاخه انتهایی، مریستم انتهایی برگ یا قطعات رأس ساقه از ریزنمونه‌های مورد استفاده در باززایی گیاه خرما است (شکل ۳-۱۰). ریزنمونه‌ها بعد از جداسازی در محیط کشت MS یا MS تغییر یافته به همراه ۰/۱ تا ۱ mg/l پی‌کلروفونکسی‌اسید (P-CPA)، ۱۰۰ mg/l NAA یا 2,4-D و ۳ mg/l BAP یا 2iP و ۳ گرم در لیتر زغال فعال وارد مرحله کالوس‌زایی می‌شوند. کالوس‌های حاصل سپس به محیطی حاوی ۱۰ mg/l 2,4-D برای جنین‌زایی و در نهایت به محیط MS همراه با ۶۰ گرم ساکارز و ۲ میلی گرم IBA برای افزایش طول جنین‌ها انتقال داده می‌شود (دامن‌کشان و همکاران، ۱۳۹۱).

باززایی و تکثیر انبوه گیاهان شبیه به اصل

تکثیر انبوه کلون یا گیاهان شبیه به اصل در اغلب درختان میوه کاربرد دارد. در روش کشت بافت بجز موارد نادر، گیاه تولیدشده دقیقاً مشابه گیاه مادر است، لذا با این روش می‌توان واریته‌های مرغوب را تکثیر کرد (مشابه تکثیر از طریق قلمه)، در درختان دوپایه، در روش تکثیر بذر تنها درصد کمی از گیاهان تولیدشده ماده بوده و چون از لحاظ ژنتیکی با والد خود متفاوت است، مشخص نیست که گیاه تولیدشده از نوع مرغوب است یا خیر.

برای اولین بار تکثیر کیوی از طریق کشت بافت در سال ۱۹۷۵ توسط هارادا انجام شد. وی تشکیل شاخه، ریشه، و جنین را در شرایط درون‌شیشه‌ای از قطعات ساقه و ریشه گزارش داد. وی با چند دوره کشت دریافت، زاتین که نوعی سیتوکین است، بیشترین تأثیر را در تشکیل شاخه دارد (کومار و شارما، ۲۰۰۲).

بر اساس پژوهش حسینی و همکاران (۱۳۸۹)، در مورد کیوی بهترین روش ضد عفونی ریزنمونه‌ها، ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰٪، سپس محلول هیپوکلریت سدیم ۶٪ به مدت ۲۰ دقیقه می‌باشد. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS کامل مایع بهتر رشد کردند. برای پرآوری محلول، BAP ۲ mg/l بهتر بود. برای ریشه‌زایی نیز می‌توان از محلول NAA ۱ mg/l در محیط MS ½ استفاده نمود (شکل ۱۱-۳).

روش عمومی ازدیاد توت‌فرنگی، روش غیرجنسی است که می‌تواند از طریق تقسیم بوته و به‌طور مرسوم به کمک ساقه‌های رونده انجام شود. در عمل، یک گیاه مادری تنها تعداد محدودی گیاهچه با قابلیت رشد مناسب تولید می‌کند و این روش کاملاً وابسته به فصل بوده و پتانسیل تولید را می‌کاهد. از این‌رو، استفاده از روش کشت بافت به‌منظور افزایش سرعت و عملکرد بسیار قابل توجه می‌باشد. محیط کشت MS همراه با ویتامین‌های B5 در ترکیب با BAP (۲ mg/l) و یا TDZ (۱ mg/l) در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، و به کاربردن میزان برابری از هر دو هورمون IAA و BAP (۲ mg/l) در باززایی از ریزنمونه مرستمی مؤثر هستند. گیاهچه‌های باززاشده پس از انتقال به محیط MS یا MS ½ بدون هورمون یا همراه با میزان کمی IAA یا NAA (۰/۲ mg/l) ریشه‌دار شده و آماده انتقال به خاک خواهند شد (شکل ۱۲-۳) (مدنی و همکاران، ۱۳۹۱).

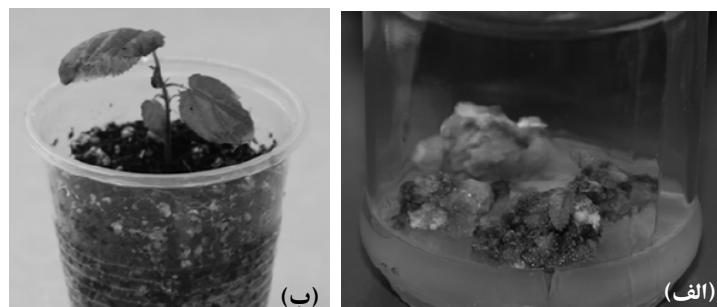
تکثیر فندق به‌طور عمده از طریق جداسازی پاجوش است. اگرچه خواباندن و قلمه‌زدن نیز استفاده می‌شود، اما روش‌های سنتی پر زحمت و هزینه‌بر و وقتگیر است. برای باززایی فندق از ریزنمونه‌های مختلفی مانند هیپوکوتیل، کوتیلدون، ساقه و... استفاده می‌شود. محیط کالوس‌زایی فندق به‌طور معمول شامل محیط MS و هورمون اکسین 2,4-D (۰/۵ mg/l) برای ریزنمونه‌های کوتیلدون، و هورمون IBA (۰/۱ mg/l) در ترکیب با Kin (۰/۱ mg/l) برای ریزنمونه‌های برگ می‌باشد. کالوس‌های تولیدشده در محیط حاوی BAP (۱ mg/l) باززا شده و در نهایت گیاهچه‌های باززاشده در محیط دارای NAA (۲ mg/l) و BAP (۰/۵ mg/l) ریشه‌دار می‌شوند (شکل ۱۳-۳) (حضرتی و همکاران، ۱۳۹۵؛ ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۳).



شکل ۱۱-۳ مراحل مختلف کشت بافت کیوی فروت. (حسینی، ف و همکاران، ۱۳۸۹)



شکل ۱۲-۳ گیاه توت‌فرنگی حاصل از باززایی مستقیم هیپوکوتیل (الف) و باززایی غیرمستقیم از هیپوکوتیل (ب). (مدنی و همکاران، ۱۳۹۱)



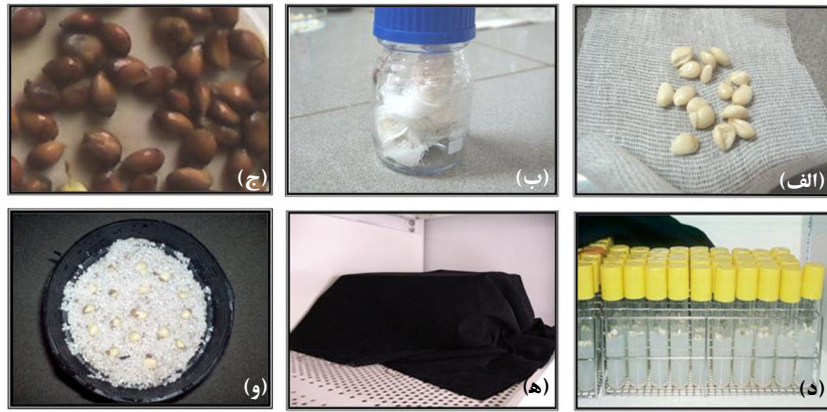
شکل ۱۳-۳ باززایی گیاهچه فندق (الف) و گیاه کشت بافتی فندق در مرحله سازگاری (ب). (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۳)

۳-۱-۲ پیوند نوک شاخه^۱ یا ریزپیوندی^۲

پیوند نوک شاخه (STG)، یکی از روش‌های ریزپیوندی است که در آن اندازه پیوندک بین ۲ تا ۳/۰ میلی‌متر است و به‌منظور حذف عوامل بیماری‌زای آوندی استفاده می‌شود. گاهی در منابع مختلف از آن به‌عنوان پیوند مرستم هم ذکر می‌شود.

در این روش، ابتدا بذر گیاهی که به‌عنوان پایه موردنظر است در لوله آزمایش کشت شده و پس از حدود دو هفته اپی‌کوتیل سربرداری می‌شود. سپس مرستم پیوندک موردنظر

1. Shoot tip grafting (STG)
2. Micrografting



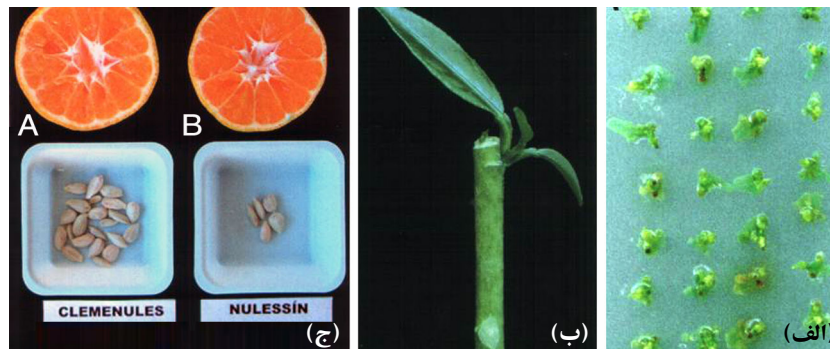
مراحل تولید پایه اتیوله. (الف) بذر کامل؛ (ب) بذر از هر دو پوسته خارج شده؛ (ج) ضدعفونی بذر؛ (د) کشت بذر در محیط پرلیت؛ (ه) کشت بذر در محیط MS؛ (و) فراهم آوردن شرایط تاریکی برای اتیوله شدن پایه.



تولید پیوندک به همراه گرمادرمانی در شرایط درون شیشه‌ای

شکل ۳-۱۴ مراحل تولید پایه و پیوندک. (قاسمی و همکاران، ۱۳۸۹)

در شکافی که در زیر میکروسکوپ بر روی پایه ایجاد شده قرار داده می‌شود. در محیط کشت مناسب، پس از ۲-۳ هفته پیوند جوش خورده و نهال حاصل که ترکیبی از نهال بذری و مریستم می‌باشد، به احتمال زیاد عاری از ویروس است. پیوند نوک شاخه با پیش تیمار گرمادرمانی، بهترین فنون قابل دسترس جهت عاری کردن درختان مرکبات از عوامل بیماریزا در برنامه‌های سالم‌سازی است و امکان حذف عوامل بیماریزایی که ضمن گرمادرمانی

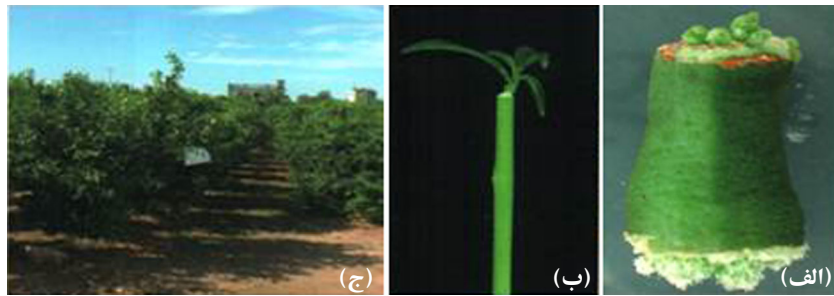


شکل ۱۵-۳ باززایی گیاهان پرتوتابی شده. (الف) نوک شاخه‌های پرتوتابی شده نارنگی کلمانتین داخل پتری‌دیش؛ (ب) رشد نوک شاخه پرتوتابی شده بعد از ریزپیوندی؛ (ج) مقایسه وضعیت نارنگی کلمانتین نولز قبل (A) و بعد از پرتوتابی (B). (ناوارو و جوارز، ۲۰۰۷)

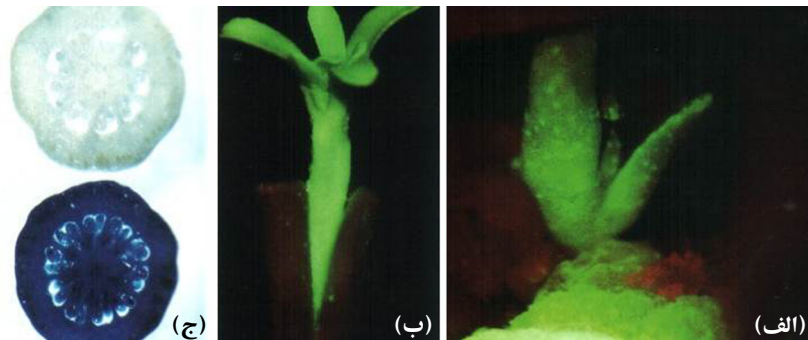
از بین نرفته‌اند را فراهم می‌کند، علاوه بر آن، گیاهان حاصل از آن برخلاف گیاهان بازایی شده از جنین‌های نوسلار^۱ خصوصیات نونهالی نداشته و همگی شبیه به اصل^۲ می‌باشند. همچنین این درختان ۱۵ الی ۲۰ درصد محصول بیشتر و با کیفیت مطلوب‌تر درمقایسه با نمونه‌های آلوده تولید می‌کنند.

به منظور احداث باغ‌های جدید مرکبات با درختانی سالم و باکیفیت، کنترل بیماری‌های قابل انتقال از طریق پیوند ضروری به نظر می‌رسد. برای تولید چنین درختانی اجرای سه برنامه مختلف ولی در عین حال مرتبط لازم است: سالم‌سازی^۳، قرنطینه^۴ و گواهی کردن^۵ (ناوارو، ۱۹۹۳). در برنامه‌های سالم‌سازی هدف بازایی درختان سالم از واریته‌های محلی می‌باشد درحالی‌که در برنامه‌های قرنطینه اولویت، وارد کردن ارقام خارجی مطلوب، بدون معرفی آفات و بیماری‌های جدید می‌باشد. به کمک فنون ریزپیوندی، به عنوان محور اصلی دو برنامه فوق، تولید گیاهان سالم برای اهداف بعدی تأمین می‌شود. در برنامه‌های گواهی، سلامت مواد اولیه گیاهی نگهداری شده در خزانه که به عنوان هسته اولیه فرایند ازدیاد تجاری محسوب می‌شوند، تضمین می‌گردد (قاسمی و همکاران، ۱۳۹۳).

1. Nucellar embryo
2. True to tipe
3. Sanitation
4. Quarantine
5. Certification



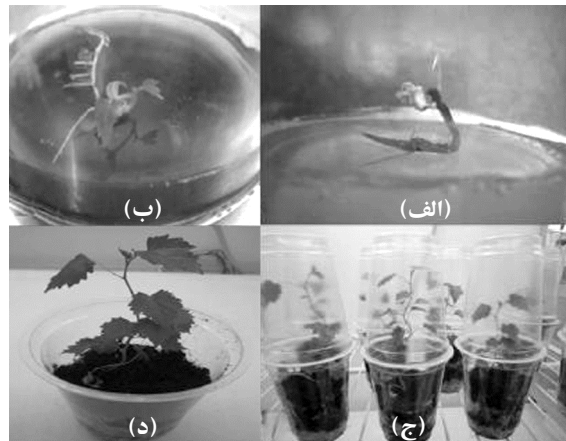
شکل ۱۶-۳ باززایی گیاهان کلمانتین حاصل از پدیده تنوع سوماتیکی. (الف) بافت میانگرهی کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای از گیاه بالغ کلمانتین نولز؛ (ب) گیاه ریزپیوندی شده؛ پیوندک از جوانه‌های کوچک حاصل از بافت میانگرهی است؛ (ج) ارزیابی مزرعه‌ای پتانسیل تنوع سوماتیکی. (ناوارو و جوارز، ۲۰۰۷)



شکل ۱۷-۳ باززایی گیاهان انتقال ژن شده. (الف) نوک شاخه‌ای که انتقال ژن شده؛ (ب) نوک شاخه انتقال ژن یافته به عنوان پیوندک، روی پایه تروریر سیترنج ریزپیوندی شده است؛ (ج) مقایسه میوه‌های پرتقال آناناس شاهد (بالا) و انتقال ژن یافته (پایین). (ناوارو و جوارز، ۲۰۰۷)

۳-۲ تکنیک نجات جنین و کشت تخمک

فنون نجات جنین به عنوان روشی مفید و مطمئن جهت تولید گیاهان هیبرید از گیاهانی باغی که در شرایط طبیعی آمیزش‌های سخت یا غیرممکن دارند، به کار می‌رود. در این روش، جنین هیبرید قبل از نابود شدن در شرایط آزمایشگاهی کشت و نگهداری می‌شود.



شکل ۳-۱۸ جنین جوانه زده انگور وارپته فلیم سیدلس با دو برگ اولیه (فاقد کلروفیل). (الف) دو هفته پس از جوانه زنی؛ (ب) گیاهچه رشد یافته شش هفته پس از جوانه زنی جنین؛ (ج) گیاهان رشد یافته طی مراحل سازگاری؛ (د) گیاه سازگار شده دوازده هفته پس از جوانه زنی جنین. (اقتباس از عبادی و همکاران، ۱۳۹۳)

۳-۳ مهمترین کاربردهای کشت جنین در گیاهان باغی

۳-۳-۱ تولید هیبریدهای جدید و یا کمیاب

مفیدترین کاربرد کشت جنین، به دست آوردن هیبریدهای کمیاب است. به نژادگران به منظور افزایش تعداد نتاج بی دانه در گونه‌هایی مانند انگور و مرکبات و امکان پذیر ساختن تلاقی‌هایی که در حالت طبیعی نتاجی از آنها به دست نمی‌آید از روش نجات جنین استفاده می‌کنند (شکل ۳-۱۸). در بسیاری از تلاقی‌های بین گونه‌ای و بین جنسی لقاح به طور طبیعی انجام شده اما بدلیل نمو غیرطبیعی یا ناچیز آندوسپرم، جنین قبل از بلوغ از بین می‌رود و دانه‌های قابل رویش تولید نخواهد شد. حل این مشکل با کشت جنین امکان پذیر می‌باشد. به عنوان مثال، انگورهای بی دانه به طور گسترده برای مصارف تازه خوری و تهیه کشمش در آسیا، اروپا و آمریکا کشت می‌شوند. انجام کارهای به نژادی برای ایجاد ارقام جدید بی دانه از دیرباز مورد توجه به نژادگران قرار داشته است اما در روش‌های به نژادی به دلیل سقط جنین، به نژادگران به اجبار رقم بی دانه را به منزله والد پدری استفاده می‌کنند که این امر سبب تولید درصد پایینی از نتاج بی دانه می‌شود (عبادی و همکاران، ۱۳۹۳؛ قاسمی و همکاران، ۱۳۸۲).

۳-۳-۲ کوتاه نمودن دوره اصلاح گیاهان باغی

در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی (به‌علت دوره طولانی خواب دانه که اغلب ناشی از پوسته بذر یا آندوسپرم است) با کشت جنین می‌توان سرعت جوانه‌زنی را افزایش و طول این دوره را کاهش داد. تاکنون پژوهشگران انواع محیط‌های کشت مانند محیط MT، ER، WPM، SH، BD، NN، MS و B5 با حالات متفاوت جامد، مایع Emershad و دبل‌فاز را برای بهبود فنون نجات جنین استفاده کرده‌اند و نتایج متفاوتی را باتوجه به ارقام استفاده‌شده به‌دست آورده‌اند. پژوهش‌هایی که تاکنون به‌منظور شناسایی محیط‌های کشت مناسب برای کشت تخمک‌های انگور انجام گرفته است، مشخص کرده محیط‌های کشت NN و ER از سایر محیط‌های کشت مقایسه‌شده WPM، MS، BD و B5 سودمندترند. در بررسی‌های انجام‌شده روی حالات محیط کشت مشخص شده است که استفاده از حالت مایع (بدون آگار) برای برخی ارقام مناسب‌تر است (عبادی و همکاران، ۱۳۹۳).

۳-۳-۳ ازدیاد گیاهان نادر

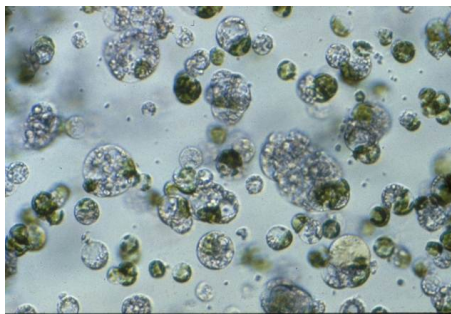
دانه‌های *Musa balbisiana* گونه وحشی موز و یک رقم نارگیل با نام Makapumo که در حالت طبیعی قادر به جوانه‌زنی نمی‌باشد با استفاده از این فنون جوانه زده و به گیاه تبدیل می‌شوند (یاوری و روزبه، ۱۳۸۲).

۳-۴ امتزاج پروتوپلاست

برای غلبه بر مشکلات مربوط به به‌نژادی معمول، روش‌های دیگری ابداع شده‌اند که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌عنوان مثال، بعضی از جنس‌های وابسته نزدیک به مرکبات حقیقی ممکن است خصوصیتی داشته باشند که اگر به جنس سیتروس انتقال یابند مناسب خواهد بود. مثلاً ژن مقاومت به فیتوفترا و نماتد مرکبات، که در گروه مرکبات حقیقی یافت نمی‌شود، در جنس سورینیا بوکسی‌فولیا^۱ وجود دارد. اما از آنجا که جنس‌های سیتروس و سورینیا از نظر تلاقی با هم ناسازگار می‌باشند، دورگ‌گیری معمول در بین آنها غیرممکن است. بنابراین، از روش دیگری برای دورگ‌گیری آنها باید استفاده شود. تولید هیبرید از طریق امتزاج پروتوپلاست‌های جداسازی‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای، بدون توجه به سیکل زایشی و سپس رشد و نمو هتروکاریون حاصل به یک گیاه هیبرید (سیبرید). در این روش، نقش

1. *Severinia boxifolia*

جنسیت در دورگ گیری به طور کامل حذف می شود و هسته و سیتوپلاسم سلول هر دو والد در سلول هیبرید امتزاج می یابد (شکل های ۱۹-۳ و ۲۰-۳).



شکل ۱۹-۳ نمای میکروسکوپی از پروتوپلاست های درحال امتزاج مرکبات. (اقتباس از گروسر و گمیتز، ۱۹۹۰)



جنین حاصل از امتزاج پروتوپلاست در مرکبات



گیاهچه حاصل از امتزاج پروتوپلاست در مرکبات



درخت حاصل از امتزاج پروتوپلاست در مرکبات



میوه پوملو متحمل به شانکر مرکبات حاصل از امتزاج پروتوپلاست

شکل ۲۰-۳ مراحل مختلف تولید گیاه دورگ سوماتیکی در مرکبات. (اقتباس از گمیتز و گروسر ۱۹۹۲)

۵-۳ انتخاب گیاهان جهش یافته

عموماً گیاهان باغی به خصوص مرکبات مستعد جهش هستند، این جهش ممکن است در کل گیاه، یک شاخه و یا یک جوانه منفرد اتفاق افتد. اغلب جهش‌ها تولید صفات نامطلوب می‌کنند، اما به ندرت جهش‌های مفید از جمله میوه زودرس و یا گوشت میوه با عصاره بهتر و تولید میوه بدون بذر به وجود می‌آید. از معایب این روش به نژادی، می‌توان به بروز صفات نامطلوب بر اثر آسیب کروموزوم‌ها، نیاز به جمعیت‌های زیاد گیاهی و انتخاب مزرعه‌ای طولانی مدت و در نهایت امکان عدم ثبات چنین خصوصیتی اشاره نمود (داویس و آلبریگو، ۱۹۹۴).

۶-۳ انتخاب گیاهان حاصل از شیمیر (بافت ناهمسان)

شیمرها نیز اغلب بر اثر جهش ایجاد می‌شوند، اما ممکن است در اثر تقسیم نامنظم میتوز، کراسینگ اور رویشی و یا ترکیب مصنوعی بافت نامتشابه حاصل از پیوند نیز به دست آیند. به عنوان مثال، در مرکبات بر اثر شیمیر، پریکلینال بافت ژنتیکی پوست با بذر یا سایر بخش‌های درونی متفاوت خواهد بود. در این صورت، از طریق کشت بافت از بافت‌های مختلف، می‌توان گیاه متفاوتی به دست آورد. در مورد شیمیر مریکلینال مثال معروف آن گریپ فروت صورتی رنگ «مارش»^۱ می‌باشد که بذر آن تولید درختان مارش معمولی می‌کند (داویس و آلبریگو، ۱۹۹۴). همچنین نارنج بیزاریا که نیمی از آن نارنج و نیمی دیگر بادرنگ می‌باشد، به ظاهر از جوانه‌های نابه جایی که از پینه محل پیوند نارنج روی پایه بادرنگ ایجاد شده بود، پدید آمده است (هارتمن و همکاران، ۱۹۹۷).

1. Pink Marsh

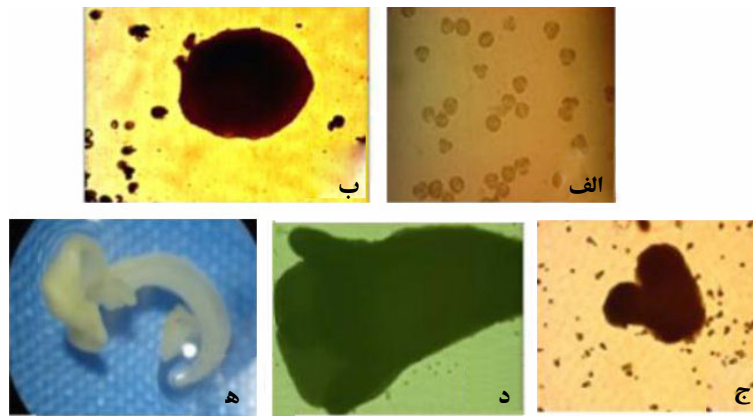
۴. کشت بافت گیاهان زراعی

روش کشت بافت با کاربردهای گسترده آن، در زمینه گیاهان زراعی به عنوان ابزاری برای کمک به اصلاح کنندگان زراعی به کار می‌رود. از مهم‌ترین کاربردهای کشت بافت در گیاهان زراعی می‌توان به تولید گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئید، باززایی و جنین‌زایی گیاهان تراریخته، ریزازدیادی با هدف تولید گیاهان عاری از ویروس، تنوع سوماکلونال و نگهداری ژرم پلاسما و غیره اشاره کرد که در زیر به تفکیک مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

۴-۱ تولید گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئیدها در گیاهان زراعی

کشت بساک و تخمک بر روی محیط‌های غذایی مصنوعی امکان به دست آوردن هاپلوئیدها را میسر می‌سازد. با به کارگیری فنون کشت بافت، از سلول‌های هاپلوئید می‌توان گیاهان هاپلوئید تولید نمود و در این گیاهان با اعمال تیمارهایی خاص مجموعه کروموزومی برای تولید گیاهان دابل هاپلوئید هموزیگوس دوبرابر می‌شود.

قاسمی بزدی (۱۳۹۰) اثر ترکیبات و غلظت‌های مختلف هورمون‌های 2,4-D، NAA و BAP در محیط کشت MS به همراه ویتامین‌های B₅ و همچنین اثر پیش تیمارهای سرمایی ۱، ۳ و ۱۰ روزه در ۴°C را بر درصد کالوس‌زایی و اندازه کالوس ریزنمونه تخمک و تخمدان تلقیح‌نشده پنبه مورد بررسی قرار داد. براساس نتایج، ریزنمونه‌های تخمک ارقام ساحل و کوکر-۳۱۲ زودتر از سایر ارقام شروع به کالوس‌دهی نمودند و به همراه رقم خرداد حجم کالوس بیشتری تولید کردند. افزایش مدت زمان القای پیش تیمار سرمایی به ۱۰ روز، نقش مثبتی در کالوس‌زایی تخمک پنبه داشت و منجر به تولید کالوس بیشتر گردید. از طرفی، القای

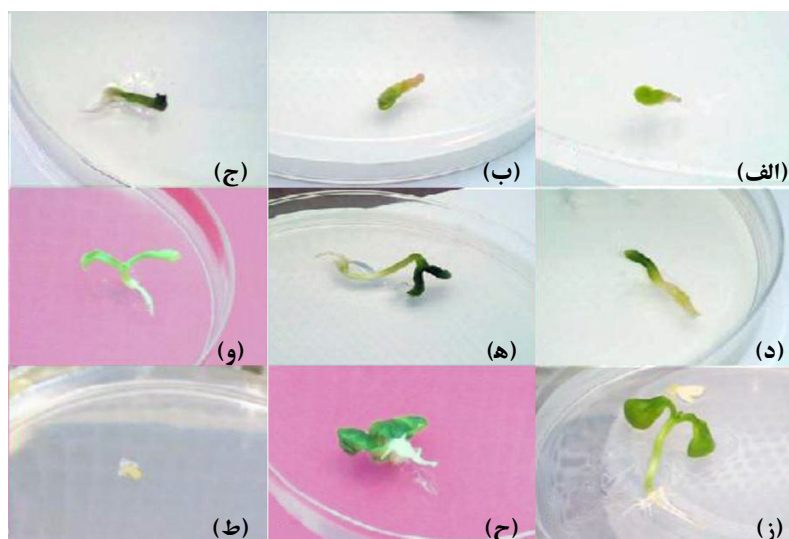


شکل ۱-۴ مراحل مختلف جنین‌زایی میکروسپور در کلزا. (الف) میکروسپور سه‌لوپی؛ (ب) جنین کروی؛ (ج) جنین قلبی؛ (د) و (ه) جنین نیزه‌ای و نرمال. (شریفی و معینی، ۱۳۹۵)

مدت زمان تیمار سرمایی کمتر از ۳ روز اثر کاهشی شدیدی بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های تخمک پنبه نشان داد.

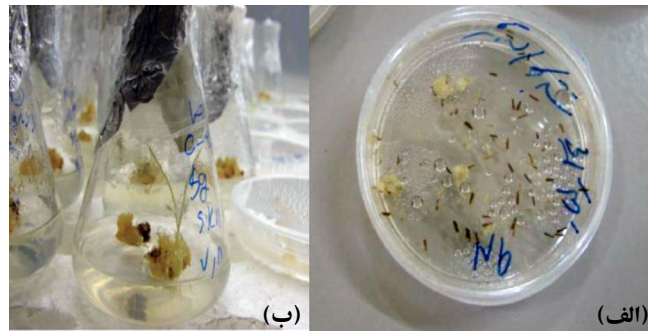
در کلزا از روش‌های مختلفی برای جنین‌زایی و تولید گیاه هاپلوئید استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال، اشعه گاما (دوز ۱۰ گری) باعث افزایش جنین‌زایی در بساک‌های کشت شده و کاهش جنین‌زایی در میکروسپورهای کلزا می‌شود. استفاده از اتیل‌متان‌سولفونات (EMS) با غلظت ۱/۰ درصد به مدت ۹۰ دقیقه برای بیشترین تعداد جنین‌زایی و غلظت ۳/۰ درصد EMS بهترین غلظت برای افزایش تولید جنین‌های نرمال و بالابردن میزان باززایی بود (توکلی و عنایتی شریعت پناهی، ۱۳۹۰).

البته باززایی گیاهچه‌های طبیعی از جنین‌های به‌دست‌آمده از کشت میکروسپور، یکی از مراحل مهم در تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف‌شده است. عوامل محیطی متعددی از قبیل دمای اتاق رشد، فقدان تنظیم‌کننده‌های رشد مانند آبسزیک‌اسید و نیز شدت نور و مرحله انتقال جنین‌ها به محیط باززایی بر فراوانی باززایی گیاه مؤثر هستند. به‌همین دلیل، بهترین روش برای غلبه بر جنین‌زایی ثانویه، انتقال جنین‌های لپه‌ای شکل به محیط B5 حاوی جیبرلیک‌اسید است (شکل ۱-۴) (شریفی و معینی، ۱۳۹۵).



شکل ۴-۲ جنین‌های باززایی شده از مراحل مختلف جنینی. (الف) کروی؛ (ب) نوک‌پیکانی؛ (ج) نوک‌اژدری؛ (د) شلاقی؛ (ه) قلبی؛ (و) اژدری؛ (ز) لپهای؛ (ح) بی‌شکل؛ (ط) نکروزه.

پرتوتایی دانه گرده (اشعه ماورای بنفش، اشعه گاما و ایکس) گسترده‌ترین روش مورد استفاده برای القای بکرزایی در گیاهان هاپلوئید می‌باشد. بکرزایی از طریق گرده‌افشانی با دانه گرده پرتودیده برای اولین بار با کشت جنین در گونه‌های مختلف توتون مورد استفاده قرار گرفت. از فنون پرتوتایی گرده برای القای جنین هاپلوئید در گیاهان زیادی مانند هندوانه، خربزه، خیار، کدوخورشتی، کدوخلوایی، کدوتنبل و غیره گزارش شده است (ناصرترابی و همکاران، ۱۳۸۸). دوزهای مختلف اشعه بر حسب گونه می‌تواند اثرات متفاوتی را نشان دهد. به‌عنوان مثال، در کدو بالاترین تعداد جنین (حدود ۸۲٪) مربوط به دوزهای ۷۵ و ۵۰ گری اشعه گاما بود و هیچ جنینی در ۲۰۰ گری به‌دست نیامد (شکل ۴-۲) (ابراهیم‌زاده و همکاران، ۱۳۹۳). کلشی‌سین جهت دابل کردن هاپلوئیدهای تولیدشده به محیط کشت کالوس‌زایی اضافه می‌شود. در بیشتر آزمایشات، میزان استفاده از آن ۱۰۰ mg/l به‌مدت ۱-۳ روز در گندم و ۶۰ mg/l به‌مدت ۷ روز است که تعداد دابل هاپلوئیدها را به‌میزان زیادی افزایش خواهد داد (شکل ۴-۳) (خزایی و همکاران، ۱۳۹۳).



شکل ۳-۴ (الف) تولید کالوس از بساک برنج؛ و (ب) تولید گیاه سبز حاصل از بساک برنج. (خزایی و همکاران، ۱۳۹۳)

۴-۲ ریزازدیادی گیاهان زراعی

در ریزازدیادی از روش‌های مختلفی جهت تکثیر گیاهان می‌توان استفاده نمود که در این بخش به کاربرد هر کدام از روش‌ها در گیاهان زراعی اشاره خواهد شد:

۴-۲-۱ روش فعال‌سازی نمو مریستم‌های موجود براساس حذف غالبیت انتهایی

این روش به‌عنوان روش اصلی مورد استفاده در ریزازدیادی است و در حال حاضر به‌طور گسترده‌ای در تولید مواد گیاهی عاری از ویروس در گیاهان زراعی و محصولات سبزی و صیفی مختلفی نظیر چغندر قند، توتون، نیشکر، گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی، خیار، فلفل، کدو، توت‌فرنگی و غیره استفاده گردیده است. فناوری ریزازدیادی با استفاده از این روش در تعدادی از محصولات کشاورزی نظیر سیب‌زمینی به مرحله صنعتی رسیده است. کاربرد روش فعال‌سازی نمو مریستم‌های موجود در گیاهان اجازه می‌دهد از یک مریستم سیب‌زمینی بیش از 10^5 گیاه در سال به‌دست آید. در نتیجه، این فناوری، تولید ریزغده‌های سیب‌زمینی عاری از ویروس را میسر می‌سازد که مواد بذری بسیار باارزشی محسوب می‌شوند.

۴-۲-۲ روش القای تشکیل جوانه‌های ناب‌جا به‌طور مستقیم بر روی بافت‌های ریزنمونه

این روش، تاکنون به‌عنوان یکی از رایج‌ترین روش‌های ریزازدیادی بوده که در تکثیر گیاهان عالی استفاده شده است و می‌توان به تکثیر گیاهان پیازدار، خانواده کلمیان^۱، پیاز، سیر، گوجه‌فرنگی و توت‌فرنگی اشاره نمود.

1. Brassicaceae

۳-۲-۴ روش جنین‌زایی سوماتیکی

این روش که براساس تمایز ساختارهای شبه‌جنینی از سلول‌های سوماتیکی پایه‌ریزی می‌شود و یک روش کاربردی نیز می‌باشد؛ درحال حاضر، جهت تکثیر تعدادی از نمایندگان خانواده غلات (گندم و جو)، یونجه، ترب و گیاهان دیگری از خانواده‌های مختلف به کار برده می‌شود.

۴-۲-۴ روش تمایز جوانه‌های ناب‌جا در بافت کالوس

چهارمین روش ریزازدیادی گیاهی که براساس تمایز جوانه‌های ناب‌جا در بافت کالوس اولیه زیرکشت شده می‌باشد، به‌ندرت در تولید و تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاهان استفاده می‌شود. درمورد کارهای ریزازدیادی، این روش فقط جهت آن‌دسته از گیاهانی استفاده می‌شود که برای آنها پایداری ژنتیکی بافت کالوس اثبات شده است و تنوع بین گیاهان باززایی شده سطح تغییرات طبیعی را افزایش نمی‌دهد. ازجمله این گیاهان می‌توان به گوجه‌فرنگی، مارچوبه^۱ و تعدادی از محصولات زراعی اشاره نمود. ازطریق کشت کالوس، گیاهان چغندرقد، تعدادی از گیاهان خانواده کلم، ذرت، برنج، گندم و غلات دیگر، آفتابگردان و کتان تکثیر شده‌اند و شرایط مناسب جهت باززایی گیاهان از کالوس خیار، سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی بهینه گردیده‌اند (قاسمی بزدی و احمدی، ۱۳۸۸).

۳-۴ کاربرد کشت بافت در سلکسیون گیاهان زراعی

تنوع سوماتیکی درون‌شیشه‌ای یکی از مهم‌ترین کاربردهای کشت بافت در گیاهان زراعی است. در طول دهه گذشته مطالعات بیشماری نشان داده است که تنوع سوماکلونال و گامتوکلونال ایجادشده به‌وسیله کشت درون‌شیشه‌ای سلول‌های گیاهی نیز می‌تواند منشأ تنوع ژنتیکی قابل‌بهره‌برداری در برنامه‌های اصلاح گیاهان زراعی مقاوم به عوامل مختلف باشد. بنابراین، اگر روش‌های کشت بافت و سلول‌های گیاهی با به‌نژادی متداول در گیاهان زراعی همراه گردد، مشکل غربال ژنوتیپ‌ها از نظر میزان تحمل و مقاومت به عوامل مختلف بدون داشتن معیار معتبر و ثابت برطرف می‌شود و انتخاب گیاهان متحمل و مقاوم در مدت زمان کمتری امکان‌پذیر می‌شود.

1. Asparagus

۴-۳-۱ انتخاب درون‌شیشه‌ای جهت تحمل به خشکی

به‌منظور فراهم‌نمودن شرایط مربوط به اثر تنش خشکی در حالت درون‌شیشه‌ای، می‌توان از محیط‌های کشت حاوی مواد فعال اسمزی کاهش‌دهنده پتانسیل آب خارجی استفاده نمود. بدین‌منظور، در کارهای تحقیقاتی مربوط به سلکسیون جهت ایجاد مقاومت به خشکی معمولاً از پلی‌اتیلن گلیکول استفاده می‌شود که دارای مواد فعال اسمزی غیرقابل نفوذ به سلول می‌باشد. در آزمایشی، مقایسه میزان رشد کالوس تعدادی از ژنوتیپ‌های سویا در حضور پلی‌اتیلن گلیکول جهت تشخیص لاین‌های متحمل نسبت به خشکی پیشنهاد شد. آنالیز رشد بافت‌های کالوس ده رقم سویا بر روی محیط کشت‌های حاوی صفر، ۱۵ و ۲۰ درصد پلی‌اتیلن گلیکول ۸۰۰۰، همبستگی مقاومت به خشکی در گیاهان با تحمل سلول‌های کشت‌شده نسبت به پلی‌اتیلن گلیکول را مورد تأیید قرار داد. همچنین جهت به‌دست‌آوردن لاین‌های سلولی سازگار شده نسبت به تنش آبی، از محیط کشت‌های حاوی ۹۹ تا ۸۸۰ میلی‌مول مانیتول^۱ به‌عنوان ماده اسمزی استفاده شد. در این مورد نیز، سلول‌های سازگار شده در شرایط اسمزی تحمل بالایی نسبت به تنش نمک داشتند (قاسمی بزدی و احمدی، ۱۳۸۸).

۴-۳-۲ انتخاب درون‌شیشه‌ای جهت تحمل به شوری

شوری منجر به کم‌آبی سلولی، باعث استرس اسمزی و حذف آب از سیتوپلاسم و در نتیجه کاهش سیتوزولی و حجم حفره‌ای می‌شود. تنش شوری اغلب ایجاد هر دو استرس یونی و همچنین اسمزی در گیاهان می‌کند و در نتیجه سبب تجمع و یا کاهش متابولیت‌های ثانویه خاص در گیاهان می‌شود (Mahajan et al., 2005).

قاسمی بزدی (۱۳۸۸) تحمل به شوری ژنوتیپ‌های مختلف پنبه را در شرایط درون‌شیشه‌ای مورد ارزیابی قرار داد. همچنین کالوس‌زایی ریزنمونه‌های ارقام پنبه ساحل، سپید، نامبر ۲۰۰، باریادنس و خرداد بر روی محیط کشت‌های با ترکیبات مختلف هورمونی 2,4-D و BAP را مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که بیشترین کالوس‌زایی مربوط به ریزنمونه‌های جنین نارس و رقم نامبر ۲۰۰ بر روی محیط کشت حاوی ۵/۰ mg/l 2,4-D بدون BAP بود. بیشترین میزان رشد نسبی کالوس مربوط به ریزنمونه جنین نارس در رقم خرداد مشاهده گردید و میزان رشد نسبی کالوس در تمام ارقام و ریزنمونه‌ها با افزایش غلظت شوری

1. Manitol

کاهش چشمگیری داشت. براساس نتایج در تحمل به شوری، رقم خرداد بیشترین تحمل را نشان داد.

۴-۳-۳ انتخاب درون شیشه‌ای جهت تحمل به فلزات سنگین

وجود مقادیر زیاد یون‌های فلزات در خاک، که به‌صورت سمیت بر گیاهان تأثیر می‌گذارد، یا کمبود یون‌های قابل استفاده توسط گیاهان به‌عنوان مواد غذایی، می‌توانند به‌عنوان عوامل تنش یونی (معدنی) در گیاهان باشند. حالت تنش در گیاهان می‌تواند به‌وسیله یون‌های فلزات سنگینی نظیر روی، کادمیوم، مس و جیوه که اغلب در خاک مشاهده می‌شوند القا گردد. از طریق سلکسیون مستقیم در شرایط درون شیشه‌ای، لاین‌های سلولی سورگوم مقاوم به آلومینیوم، هویج مقاوم به آلومینیوم و منگنز، کشت‌های سلولی سوسپانسیون ارزن مقاوم به کادمیوم و غیره انتخاب گردیده‌اند.

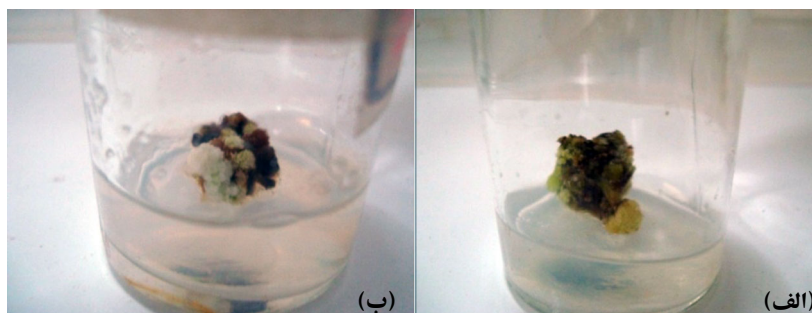
۴-۳-۴ انتخاب درون شیشه‌ای جهت تحمل به تنش‌های دمایی

یکی از عوامل تنش در گیاهان ممکن است درجه حرارت‌های نسبتاً بالا یا پایین باشد. اولین آزمایشاتی که در این زمینه درخصوص امکان استفاده از سلول‌های گیاهی کشت شده جهت انتخاب لاین‌های سلولی متحمل به درجه حرارت‌های پایین مطرح شدند، در سال ۱۹۷۶ توسط دیکس و استریت^۱ منتشر گردیدند. در ادامه، آزمایشاتی بر روی کشت‌های سوسپانسیون توتون و فلفل انجام گردید و پس از کشت سلول‌ها بر روی محیط کشت حاوی آگار، به مدت ۲۱ روز در معرض درجه حرارت‌های ۳°C و ۴°C قرار گرفتند. در بین کلون‌های انتخاب شده، لاین‌هایی مشاهده گردیدند که مقاومت به سرمای بالا را به‌طور پایدار حفظ کردند.

۴-۳-۵ انتخاب درون شیشه‌ای جهت تحمل به بیماری‌ها

در حال حاضر، چشم اندازه‌های واقعی کاربرد سلکسیون سلولی جهت افزایش مقاومت به بیماری‌ها کاملاً مشهود می‌باشد. اگر درمورد سلکسیون سیب‌زمینی جهت مقاومت به بیماری‌ها در طول یک سال در شرایط مزرعه نیاز به ارزیابی ۵۰ تا ۱۰۰ هزار نمونه می‌باشد، در شرایط درون شیشه‌ای در طول یک آزمایش می‌توان حدود ۲۰ میلیون پروتوپلاست استخراج شده از ۹ گرم برگ سیب‌زمینی را مورد آزمایش قرار داد.

1. Dix & Street



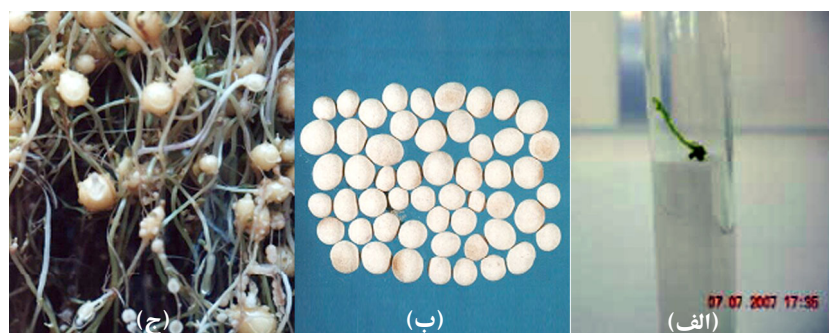
شکل ۴-۴ (الف) کالوس‌های تشکیل‌شده بر روی ریزنمونه جنین ارقام پنبه گلستان؛ (ب) کوکر-۱۰۰ در حضور غلظت‌های مختلف توکسین قارچ ورتیسیلیوم در محیط کشت. (قاسمی بزدی، ۱۳۹۴)

طی تحقیقی توسط قاسمی بزدی (۱۳۹۴)، ابتدا شرایط مناسب برای کالوس‌زایی یا باززایی ارقام مختلف پنبه ایجاد گردید. پس از آن کشت قارچ ورتیسیلیوم (*Verticillium dahliae*) انجام شد و توکسین موردنظر استخراج گردید. در ادامه شرایط تحمل ریزنمونه‌های ارقام پنبه و کیفیت کالوس‌های ایجادشده از ارقام مختلف در حضور غلظت‌های مختلف توکسین ورتیسیلیوم بررسی شد و کالوس‌های حاصل‌شده از ژنوتیپ‌های مختلف پنبه از لحاظ تحمل به قارچ ورتیسیلیوم مقایسه شدند و کالوس‌های متحمل‌تر انتخاب شدند (شکل ۴-۴). با بررسی رشد نسبی کالوس‌ها، اثرات معنی‌داری از نظر تحمل آنها به توکسین تحت تأثیر رقم و غلظت توکسین مشاهده شد. بیشترین میزان رشد نسبی کالوس‌ها مربوط به رقم گلستان در محیط کشت بدون توکسین بود، درحالی‌که کالوس‌های رقم ساحل در غلظت توکسین ۳۰٪، کمترین میزان رشد نسبی را نشان دادند.

۴-۴ کشت مریستم و تولید گیاهان عاری از ویروس

مزیت اصلی ریزازدیادی، به‌دست‌آوردن مواد گیاهی عاری از ویروس و یکنواختی از نظر ژنتیکی می‌باشد. با استفاده از بافت‌های مریستمی نوک ساقه‌چه و جوانه‌های جانبی اندام‌های با منشأ ساقه می‌توان به این هدف نایل گردید.

باوجود اینکه گیاهان حاصل از کشت مریستم سیب‌زمینی عاری از ویروس هستند اما تیمار گیاهان با یکی از روش‌های حرارت درمانی یا شیمی درمانی، موجب می‌شود نسبت به عاری‌بودن



شکل ۴-۵ (الف) گیاهچه رشد یافته از مریستم رأسی سیب زمینی؛ (ب) مینی تیوبر تولید شده در شرایط گلخانه‌ای؛ (ج) میکروتیوبر سیب زمینی درون شیشه‌ای. (انتصاری و همکاران، ۱۳۹۱)

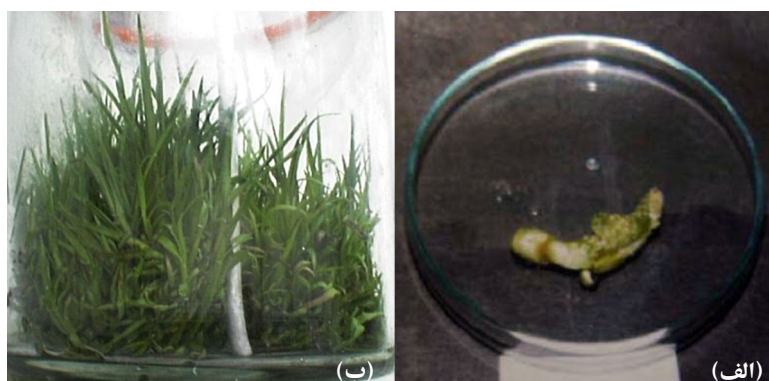
از ویروس گیاهان حاصله اطمینان داشت، در سیب زمینی معمولاً از روش حرارت درمانی به مدت ۴ هفته در فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی با 36°C و ۸ ساعت تاریکی و 32°C استفاده می‌شود. برای رشد مریستم جدا شده و تولید گیاهچه‌های عاری از ویروس سیب زمینی درون شیشه‌ای بسته به رقم از محیط کشت‌های متفاوتی استفاده می‌شود. طبق گزارش‌های انجام شده، 0.5 mg/l IAA همراه با 3 mg/l BAP برای سیب زمینی استانبولی استفاده شده است (عالم رحمتی، ۱۳۸۸).

در صورتی که هدف از کشت بافت سیب زمینی تولید میکروتیوبر درون شیشه‌ای باشد، غده‌زایی می‌تواند با کمک عوامل محیطی و غیر محیطی در گیاه القا شود. به عنوان مثال، شرایط تاریکی کامل، دمای حدود 25°C ، ساکارز بالا (حدود ۶ تا ۸ درصد) و تنظیم کننده‌های رشدی به خصوص سیتوکینین‌ها از مهم‌ترین عوامل غده‌زایی در ارقام تجاری سیب زمینی مشخص شده‌اند. محیط کشت MS مایع حاوی ۵ تا 10 mg/l BAP در بیشتر ارقام سیب زمینی درون شیشه‌ای غده‌زایی را القا کرده‌اند (شکل ۴-۵) (انتصاری و همکاران، ۱۳۹۱).

نیشکر نزدیک به ۷۰ درصد شکر جهان را تأمین می‌کند. روش تکثیر غالب در این گیاه به صورت غیرجنسی بوده که استفاده از کشت بافت و افزایش نرخ جوانه‌های تولیدی از اهمیت ویژه‌ای در تولید انبوه این گیاه اقتصادی برخوردار است. به‌نژادگران برای اجرای آزمایش‌های مزرعه‌ای نیاز به ۳۰ تا ۴۰ هزار قلمه نیشکر در هر هکتار دارند که این تعداد قلمه را می‌توان از کشت یک جوانه انتهایی نیشکر در شرایط کنترل شده کشت بافت در مدت

۹ ماه به دست آورد. درحالی که با روش های قدیمی و معمول در مدت مشابه فقط ۱۰۰ عدد قلمه تولید می گردد. تکثیر نیشکر به طریق غیرجنسی (قلمه) نه تنها مدت زمان زیادی می طلبد بلکه خطر اشاعه بیماری های مختلفی به خصوص بیماری های ویروسی (مانند موزائیک نیشکر) را افزایش می دهد. بنابراین، با کشت مریستم انتهایی ساقه (شامل گره اول تا گره هشتم) می توان به گیاه نیشکر عاری از بیماری دسترسی پیدا کرد. در صورت استفاده از ریزنمونه مریستمی قراردادن مریستم ها در محیط کشت MS حاوی 2,4-D به میزان ۳ mg/l به تنهایی یا همراه با ۱ mg/l کیتین می تواند محیط مناسبی برای القای کالوس باشد. در نهایت به محیط کشت MS بدون هورمون یا همراه با ۱ mg/l کیتین جهت شاخه زایی مریستم ها و گیاه کامل انتقال خواهند یافت (کلانتری و همکاران، ۱۳۹۴).

علاوه بر ریزنمونه های مریستم رأسی که برای تولید گیاهان عاری از بیماری استفاده می شوند برای باززایی و تولید انبوه نیشکر به طور معمول از ریزنمونه جوانه جانبی استفاده می شود. در نیشکر نیز ریزازدیادی در سطح وسیع مورد توجه محققین بوده است. استفاده از بیواکتورهای تناوبی برای تکثیر جوانه های جانبی نیشکر حاوی محیط کشت مایع MS همراه با ۳ mg/l BAP و ۰/۲ mg/l NAA با سیکل تغذیه سه بار در شبانه روز قابلیت رقابت با نتایج به دست آمده در شرایط کشت درون شیشه ای ثابت را دارد (شکل ۶-۴) (رستمی و همکاران، ۱۳۹۲).



شکل ۶-۴ (الف) جوانه رشدیافته اولیه نیشکر؛ (ب) تولید انبوه قلمه های عاری از بیماری نیشکر در بیوراکتور تناوبی. (رستمی و همکاران، ۱۳۹۲)

۴-۵ کاربرد کشت بافت در مهندسی ژنتیک

به کمک فناوری‌های مهندسی ژنتیک، روش‌های مؤثر انتقال ژن به گیاهان انجام گرفت و باتوجه به اینکه کشت بافت گیاهی، یک گام اساسی جهت گسترش گیاهان تراریخته^۱ محسوب می‌شود، طی ده سال اخیر قدم‌های بزرگی در توسعه روش‌های صنعتی مربوط به کشت بافت از سلول‌های مجزای گیاهان جهت فراهم آوردن دست‌ورزی^۲ و انتقال ژن^۳ برداشته شده است (قاسمی بزدی و احمدی، ۱۳۸۸).

انتقال ژن به گیاهان به‌منظور به‌نژادی آنها، وابسته به توسعه روشی کارا برای باززایی نوساقه‌های زنده و سبز از بافت‌های کشت‌شده و روش تراریختی مناسب می‌باشد. درواقع، کشت بافت قسمت مهمی از فرایند انتقال ژن به گیاهان زراعی است و هدف اصلی از کشت بافت اکثر گیاهان زراعی را می‌توان باززایی ریزنمونه‌های تغییرژنتیک‌یافته به حساب آورد. باتوجه به گیاه و به‌خصوص ریزنمونه مورد بررسی، محیط کشت و هورمون‌های مختلفی موردنیاز خواهد بود. قاسمی بزدی و احمدی‌خواه (۱۳۸۷) تعدادی از عوامل مؤثر بر همکشتی ریزنمونه‌های مختلف ارقام کلزا با سویه AGL0 اگروباکتریوم حاوی ژن MiAMP1 جهت مقاومت به اسکروتینا را مورد بررسی قرار دادند. درمجموع، همکشتی با اگروباکتریوم درصد باززایی ریزنمونه‌ها را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش داد. درمورد تیمار درجه حرارت، بیشترین فراوانی باززایی ساقه‌چه‌ها درمورد ریزنمونه‌های تراریخت‌نشده مشاهده شد و همکشتی با اگروباکتریوم باعث کاهش درصد باززایی گردید. همچنین مدت زمان همکشتی ریزنمونه‌ها با اگروباکتریوم نیز برروی میزان باززایی آنها تأثیر داشت، به‌طوری‌که درمورد تیمار ریزنمونه‌ها با اگروباکتریوم به‌مدت ۴۸ ساعت، فراوانی باززایی به‌طور معنی‌داری نسبت به ریزنمونه‌هایی که به‌مدت ۲۴ ساعت مورد تیمار واقع شده بودند کاهش یافت.

۴-۶ حفاظت و نگهداری ذخایر ژنتیکی گیاهی

روش‌های کشت بافت فرصتی را برای جمع‌آوری مواد گیاهی در شرایط درون‌شیشه‌ای، حذف ویروس، تکثیر سریع، حفاظت در شرایط درون‌شیشه‌ای و انتقال ژرم‌پلاسماها فراهم کرده‌اند.

1. Transgenic plants 2. Manipulation 3. Gene transformation

روش‌های اصلی حفظ ژرم پلاسما سیب زمینی در شرایط درون شیشه‌ای شامل تولید میکروتیوبر و حفاظت آن، رشد آهسته و حفاظت در شرایط انجماد می‌باشد (Donnelly *et al.*, 2003). نگهداری سلول‌های سوماتیکی گیاهان در حالت انجماد^۱ در ازت مایع (دمای °C-۱۹۶-) زمینه دیگری از فعالیت در بیوتکنولوژی است که از اوایل دهه ۱۹۷۰ گسترش زیادی یافته است. به عنوان نمونه، در حال حاضر شرایط نگهداری در حالت انجماد جهت سلول‌های کشت شده بیش از ۳۰ گونه گیاهی شامل کشت‌های کالوس (حدود ۱۰ گونه)، پروتوپلاست‌های منفرد (۸ گونه)، مریستم (۲۵ گونه) و نوک ساقه‌چه (۱۳ گونه) در بخش کشت بافت و ریخت‌زایی مؤسسه فیزیولوژی گیاهی آکادمی علوم روسیه بهینه‌سازی گردیده و نگهداری می‌شوند. در بانک انجماد^۲ مؤسسه فیزیولوژی گیاهی آکادمی علوم روسیه، سلول‌های هویج از حدود ۲۵ سال قبل در ازت مایع قرار داده شده‌اند و مریستم‌های سیب زمینی نیز بیش از ۱۵ سال است که در ازت مایع نگهداری می‌شوند.

1. Cryopreservation methods
2. Cryobank

۵. کشت بافت گیاهان زینتی

گل‌ها و گیاهان زینتی اولین گیاهانی هستند که ریزازدیادی تجاری درخصوص آنها انجام شده است و امروزه بیشترین سهم از بازار جهانی محصولات ریزازدیادی را به خود اختصاص داده‌اند. تاکنون بیش از ۱۵۶ نوع گیاه زینتی از طریق کشت بافت در آزمایشگاه‌های مختلف دنیا تولید و تکثیر شده‌اند (روت و همکاران، ۲۰۰۶) (جدول ۱-۵). به عنوان مثال، آنتوریوم‌های متعلق به شرکت Anthura، که ۱۲ هکتار از گلخانه‌های این شرکت را به خود اختصاص داده‌اند، تنها از طریق کشت بافت تکثیر شده‌اند. همچنین شرکت میوشی ژاپن با استفاده از فناوری کشت بافت موفق شده است که سالانه ۳ میلیون گیاه زینتی تولید کرده و محصولات خود را به نقاط مختلف جهان صادر کند.

جدول ۱-۵ اسامی و نحوه فعالیت تعدادی از شرکت‌های بین‌المللی فعال در حوزه کشت بافت گیاهان زینتی

نام شرکت	محل فعالیت	گیاهان تکثیر شده
Anthura	هلند	آنتوریوم، ارکیده
Miyoshi & Co., Ltd.	ژاپن	داوودی، ژربرا، جیپسوفیلا، گلایل، لیلیوم
Lapanday Foods Corporation	فیلیپین	ارکیده، داوودی، بگونیا، بنت‌قنسل، لیلیوم، آنتوریوم، اسپاتی‌فیلوم
TERI, Micropropagation Technology Park	هند	رز، داوودی، میخک، ژربرا، شمعدانی، فیکوس، یوکا
Rise n' Shine Biotech Pvt Ltd	هند	ژربرا، میخک، داوودی، ارکیده

در سال‌های اخیر در داخل کشور نیز تعدادی از شرکت‌ها فعالیت‌های خود را در زمینه تکثیر گیاهان زینتی با استفاده از فنون کشت بافت آغاز کرده‌اند و اکنون تولید تجاری برخی از گیاهان زینتی از قبیل رُز، ژربرا و بنفشه آفریقایی را در اولویت فعالیت‌های خود قرار داده‌اند (جدول ۲-۵).

جدول ۵-۲ اسامی و نحوه فعالیت تعدادی از شرکت‌های داخلی فعال در حوزه کشت بافت گیاهان زینتی

نام شرکت	محل فعالیت	گیاهان تکثیر شده
شرکت نهال گستر رویان	قزوین	آنتوریوم، ژربرا، لیسیانثوس، بنفشه آفریقایی و پایه درختان میوه
شرکت سلول فناوری دارو	کرج	رز عطری، رزبری، پایه سیب مالینگ، انگور و استویا
واحد کشت بافت نیشا	ساری	بنفشه آفریقایی، بگونیا رکس، استویا
مرکز بیوتکنولوژی دکتر رستگار	تهران	گل محمدی، رز و ژربرا
شرکت کشت بافت خانه سبز	شیراز	رز، نسترن، ژربرا، بنفشه آفریقایی
شرکت گلزاران شمال ایرانیان	رشت	پالونیا

۵-۱ ریزازدیادی گیاهان زینتی

با پیشرفت‌هایی که به‌منظور بهینه‌سازی روش‌های ریزازدیادی گیاهان صورت گرفته است، هزینه‌های تولید تجاری گیاهان زینتی از طریق کشت بافت به‌میزان قابل توجهی کاهش یافته است. صرفه‌جویی در هزینه‌ها از طریق بهینه‌سازی هریک از مراحل اصلی کشت بافت گیاهان زینتی امکان‌پذیر است (شکل ۵-۱).



شکل ۵-۱ مراحل ریزازدیادی ژربرا. (الف) ریزنمونه کاپیتول کشت‌شده در شرایط این‌ویترو؛ (ب) گیاهچه‌های باززاشده؛ (ج) گیاهان سازگار شده به شرایط طبیعی. (اقتباس از طرح پژوهشی انجام‌شده در گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی)



شکل ۵-۲ ریزازدیادی گیاه لیلیوم با استفاده از ریزنمونه‌های TCL
فلس پیاز. (الف) گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از پیازک‌های القاشده؛
(ب) گیاهچه سازگار شده در شرایط طبیعی. (اقتباس از شریفی و
همکاران، دردست چاپ)

۵-۱-۱ انواع روش‌های متداول ریزازدیادی گیاهان زینتی

باززایی مستقیم

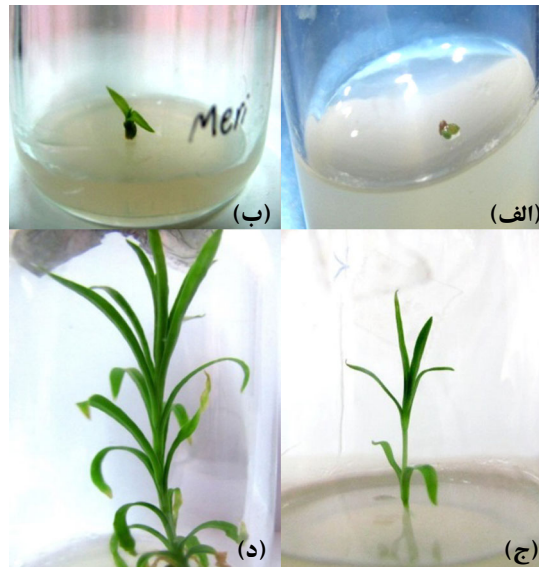
القای شاخه در ریزنمونه‌های گیاهی از جمله روش‌های مؤثر ریزازدیادی گیاهان زینتی محسوب می‌شود و تحقیقات گسترده‌ای نیز در این زمینه انجام شده است. باززایی مستقیم فلس‌های پیاز برخی از گیاهان زینتی پیازی، مانند لیلیوم، آماریلیس و نرگس، نیز به‌عنوان یکی از روش‌های مؤثر در تکثیر این گیاهان شناخته شده است. با استفاده از این روش، پیازک‌های کوچک بر روی بخش پایه فلس پیاز این گیاهان تشکیل می‌شود که هر یک از این پیازک‌ها در نهایت گیاهچه جدید را تولید خواهند کرد. تلاش‌های صورت گرفته به‌منظور تکثیر پیاز لیلیوم در شرایط درون‌شیشه‌ای نشان می‌دهد که استفاده از ریزنمونه‌های فلسی با لایه سلولی نازک در افزایش ضریب تکثیر پیاز لیلیوم مؤثر است؛ به‌طوری‌که ریزنمونه‌های فلسی دارای صفحه پایگاهی و با قطر ۳ میلی‌متر، ۱۰۰ درصد باززایی نشان دادند و در هر ریزنمونه به‌طور میانگین ۱۰ پیازک تولید شد (شریفی و همکاران، دردست چاپ) (شکل ۵-۲).



شکل ۳-۵ ریزازدیادی گیاه آنتوریوم با استفاده از کشت جوانه. (الف) گیاهچه‌های ریشه‌دار شده؛ (ب) گیاهچه‌های سازگار شده در شرایط طبیعی. (اقتباس از طرح پژوهشی انجام شده در پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان زینتی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی)

(الف) کشت جوانه

تکثیر گیاهان زینتی از قبیل رُز، آنتوریوم، سینگونیوم، داوودی و بگونیا با استفاده از کشت گره و جوانه انتهایی موفقیت‌آمیز بوده است (لارا و همکاران، ۲۰۰۴) (شکل ۵-۳). نتایج تلاش‌هایی که به منظور ریزازدیادی گونه‌های رُز انجام شده است، نشان می‌دهد که علاوه بر رقم گیاهی مورد استفاده، نوع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نوع نمک محیط کشت بر شاخه‌زایی و ریشه‌زایی گیاهچه‌های رُز مؤثر است (یاری و همکاران، ۱۳۹۰)، به‌طوری که گیاهچه‌های *R. canina* و *R. beggeriana* رشد یافته در محیط کشت MS تغییر یافته حاوی کلات آهن Fe-EDDHA و ترکیب هورمونی ۱ mg/l هورمون BA به همراه ۰/۵ mg/l NAA بیشترین درصد برگ سبز را تولید کردند (مرادیان و همکاران، در دست چاپ). همچنین تحقیقات انجام شده بیانگر آن است که برای القای شاخه در ریزنمونه‌های نوک شاخه آنتوریوم (*Anthurium andreanum*) حضور هورمون BAP به‌تنهایی کافی بوده و کاربرد ترکیب آدنین سولفات در محیط کشت نیز موجب بهبود شاخه‌زایی شده است (گاتیت و همکاران، ۲۰۰۸). به‌منظور افزایش سرعت ریشه‌زایی گیاهچه‌های آنتوریوم نیز می‌توان از زغال فعال در محیط کشت استفاده نمود (مؤمن‌زاده و همکاران، ۱۳۹۳).



شکل ۴-۵ مراحل مختلف رشد مریستم گیاه میخک. (الف) یک هفته پس از کشت؛ (ب) دو هفته پس از کشت؛ (ج) چهار هفته پس از کشت؛ و (د) شش هفته پس از کشت (اقتباس از خرازی و همکاران، ۱۳۹۲)

(ب) کشت مریستم

کشت مریستم به همراه حداکثر یک یا دو آغازه برگ، در حذف ویروس‌ها و برخی از باکتری‌ها و قارچ‌های گیاهان زینتی مؤثر بوده است به طوری که کشت مریستم ژربرا و میخک موجب تولید گیاهان عاری از ویروس شده است (خرازی و همکاران، ۱۳۹۲؛ تورپ، ۲۰۱۳) (شکل ۴-۵).

باززایی غیر مستقیم و جنین‌زایی سوماتیکی

تکثیر برخی از گیاهان زینتی در شرایط این‌ویترو از طریق باززایی غیر مستقیم موفقیت‌آمیز بوده است. به عنوان مثال، کشت ریزنمونه‌های برگ گیاه گلوکسینیا (*Sinningia speciosa*) موجب تولید کالوس و القای شاخه در ۹۹٪ ریزنمونه‌ها شده است (زو و همکاران، ۲۰۰۹). تلاش‌های صورت گرفته به منظور باززایی غیرمستقیم گیاه رُز نشان می‌دهد که کالوس در ریزنمونه‌های برگ قرار گرفته در شرایط تاریکی به خوبی القا می‌شود. برخی تشکیل جوانه‌های آغازین را در کشت‌های طولانی مدت کالوس از هیبریدهای رُز گزارش کرده‌اند. تشکیل

شاخه از کشت کالوس هیبریدهای *R. persica* و *R. xanthine* نیز با موفقیت انجام شده است (کانلی و کازاز، ۲۰۰۹).

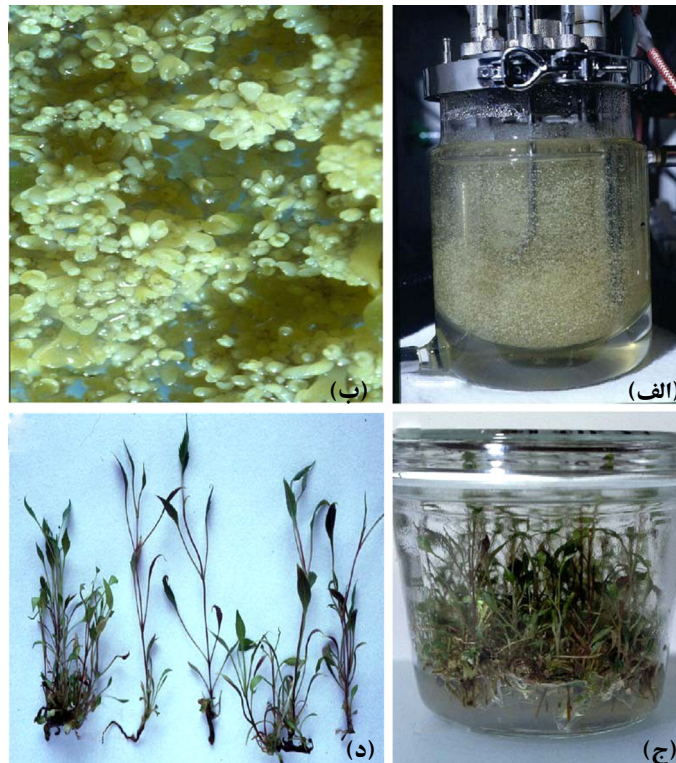
از سوی دیگر، موفقیت‌های چشمگیری در القای جنین‌های سوماتیکی در برخی از گیاهان زینتی مانند آتوریوم، داوودی، رُز، بگونیا، بنفشه آفریقایی و بنت‌قنسل نیز به‌دست آمده است (شکل ۵-۵).



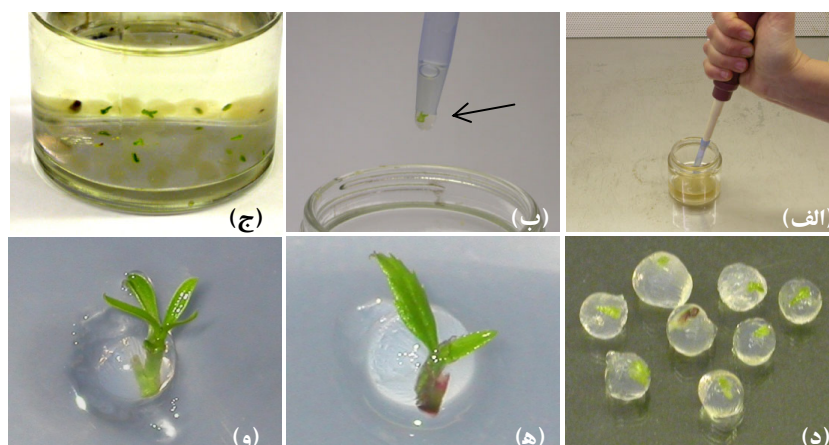
شکل ۵-۵ تکثیر بنت‌قنسل از طریق جنین‌زایی سوماتیکی. (الف) جنین‌های سوماتیکی القاشده؛ (ب) جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی؛ (ج) گیاهچه‌های حاصل از جنین‌های سوماتیکی؛ (د) گیاهان گلدار حاصل از جنین‌های سوماتیکی. (اقتباس از اوسترناک و همکاران، ۱۹۹۹)

۵-۱-۲ ریزازدیادی گیاهان زینتی با استفاده از بیوراکتورها

باتوجه به تحقیقات انجام شده، کاربرد بیوراکتورها به منظور افزایش بازدهی تکثیر گیاهان زینتی مهم مانند داوودی، ارکیده، لیلیوم، آماریلیس، بگونیا و کلماتیس مناسب ارزیابی شده است (یانگ و همکاران، ۲۰۰۰؛ مهروترا و همکاران، ۲۰۰۷). به عنوان مثال، ۵ هزار گیاهچه داوودی پس از گذشت ۱۲ هفته از کشت ریزنمونه‌ها در بیوراکتور ستونی به دست آمده است (کیم و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین پریل (۲۰۰۳) نیز تکثیر یازده رقم هیبرید کلماتیس (*Clematis tangutica*) را با استفاده از بیوراکتورها موفقیت آمیز گزارش کرده است (شکل ۶-۵).



شکل ۶-۵ تکثیر گیاه کلماتیس با استفاده از بیوراکتور. (الف) جنین‌های سوماتیکی کشت شده در بیوراکتور؛ (ب) جنین‌های سوماتیکی منتقل شده بر روی محیط کشت جامد؛ (ج) جوانه زنی جنین‌های سوماتیکی؛ (د) گیاهچه‌های حاصل از جنین‌های سوماتیکی. (اقتباس از پریل و همکاران، ۲۰۰۳)



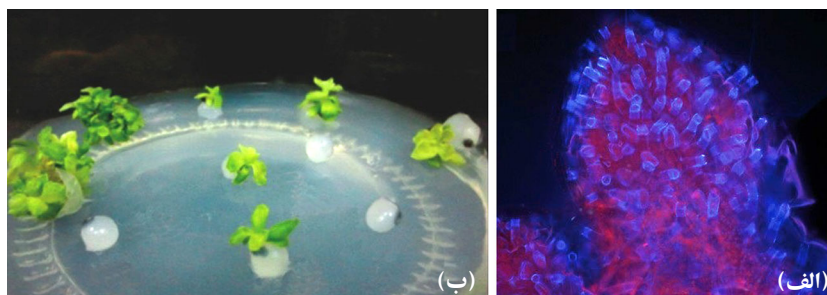
شکل ۷-۵ تولید بذرهای مصنوعی. (الف) جداسازی ریزنمونه همراه با محلول آلژینات سدیم؛ (ب) قطره آلژینات سدیم حاوی ریزنمونه؛ (ج) مقاوم سازی بذرها با استفاده از غوطه وری در محلول کلرید کلسیم؛ (د) بذرهای مصنوعی آماده؛ (ه) گیاه سه رنگ (*Photinia fraserii*)؛ (و) گیاه خرزهره (*Nerium oleander*) جوانه زده از بذر مصنوعی. (اقتباس از لمباردی و همکاران، ۲۰۰۶)

۳-۱-۵ تولید بذرهای مصنوعی

تکثیر گیاهان زینتی از طریق بذر عمدتاً با موانع بسیاری روبه‌رو است. از این‌رو فناوری تولید بذرهای مصنوعی می‌تواند به‌عنوان یکی از راهکارهای کارآمد به‌منظور تکثیر و حفاظت گیاهان زینتی مورد توجه قرار گیرد. لیلیوم، ارکیده، داوودی و سیکلامن از جمله گیاهان زینتی هستند که تولید بذر مصنوعی آنها موفقیت‌آمیز بوده است به‌طوری‌که میزان جوانه‌زنی در بیش از ۹۰٪ بذرهای مصنوعی این گیاهان مشاهده شده است (استانداردی و همکاران، ۱۹۹۸؛ سرمه و همکاران، ۲۰۱۰؛ کولوس و زالوسکا، ۲۰۱۴). جوانه‌زنی و تولید گیاه از بذرهای مصنوعی برخی دیگر از گیاهان زینتی نیز مناسب ارزیابی شده است (شکل ۷-۵).

۲-۵ کشت بافت در حفاظت گیاهان زینتی

همراه با گسترش کشت بافت گیاهان زینتی، کاربرد این فناوری در رفع محدودیت‌های حفاظت گیاهان زینتی مؤثر شناخته شده است. از جمله راهکارهای کشت بافت در حفاظت گیاهان زینتی، نگهداری ریزنمونه‌ها در شرایط رشد آهسته است. به‌طور مثال، در گیاه ختمی چینی



شکل ۸-۵ (الف) جوانه انتهایی سالم گیاه داوودی پس از خروج از حالت انجماد (تهیه شده توسط میکروسکوپ فلورسنت)؛ (ب) گیاهچه‌های باززاشده از ریزنمونه‌های حاوی یک یا چند جوانه کپسوله شده پس از حفاظت انجمادی. (تیکسیرا داسیلوا و کولوس، ۲۰۱۴)

(*Hibiscus moscheutos*). باززایی ریزنمونه‌های گره کپسوله شده پس از گذشت ۳ ماه تیمار در دمای 5°C و شرایط تاریکی به میزان ۱۰۰٪ انجام شد (وست و همکاران، ۲۰۰۶). به منظور نگهداری طولانی مدت ریزنمونه‌های گیاهان زینتی عمدتاً از روش‌های حفاظت انجمادی استفاده می‌شود. داوودی از جمله گیاهان زینتی است که حفاظت انجمادی دوازده گونه و دو هیبرید بین گونه‌ای آن به مدت ۸ ماه در نیتروژن مایع با موفقیت انجام شده است به طوری که جوانه‌های انتهایی پس از خروج از انجماد و انتقال به محیط کشت حاوی BA و NAA، به میزان ۹۴ تا ۱۰۰٪ باززایی نشان دادند (فوکائی و گوئی، ۱۹۹۱) (شکل ۸-۵). ریزنمونه‌های محور جنینی کپسوله شده کاملیا (*Camellia sinensis* L.) نیز پس از گذشت یک ساعت تیمار در نیتروژن مایع و خروج از شرایط انجماد به طور کامل باززا شدند (کاویانی، ۲۰۱۰).

۳-۵ کشت بافت در اصلاح موتاسیونی گیاهان زینتی

اصلاح موتاسیونی گیاهان زینتی با اهداف مختلفی صورت گرفته است که نشان‌دهنده موفقیت آمیز بودن اصلاح موتاسیونی به منظور تولید ارقام زینتی موتانت دارای ویژگی‌های متمایز است. در این راستا، افزایش تنوع رنگ گل‌ها به عنوان مهمترین هدف اصلاحی در این گیاهان بسیار مورد توجه قرار گرفته است به طوری که در برخی از گیاهان زینتی مهم مانند گیاه داوودی، رقم موتانت به ثبت رسیده است (سازمان بین‌المللی انرژی اتمی، ۲۰۱۳). در سایر گیاهان زینتی نیز ارقام جدیدی در پی القای موتاسیون به دست آمده‌اند (شکل ۹-۵).



شکل ۹-۵ (الف) گیاه طبیعی آلسترومریا؛ (ب) و (ج) ارقام موتانت حاصل از پرتوتابی توسط اشعه ایکس. (اقتباس از برورجس و وربوم، ۱۹۷۴)

اصلاح موتاسیونی با هدف تغییر مورفولوژی گل‌ها در گیاهان زینتی نیز موفقیت‌هایی را به‌دنبال داشته است (شکل ۱۰-۵). القای موتاسیون در یکی از ارقام داوودی دارای گل‌های بنفش با سطح زیرین نقره‌ای منجر به لوله‌ای شدن گل‌های زبانه‌ای و تولید حلقه‌ای نقره‌ای‌رنگ در مرکز گل شده که به‌عنوان یک صفت اصلاحی مطلوب عنوان شده است (داتا و همکاران، ۲۰۰۹). فقدان بساک و یا کاهش تعداد آن و نیز کاهش میزان تولید دانه‌گرده در گل‌هایی با ظاهر طبیعی از اثرات القای موتاسیون در گیاه لیلیوم بوده است (زای و همکاران، ۲۰۱۲).



شکل ۱۰-۵ اصلاح موتاسیونی میخک با استفاده از پرتوهای یونی. (الف) موتانت‌های دارای گل‌های تغییررنگ‌یافته نسبت به گیاه طبیعی؛ (بالا چپ)؛ (ب) موتانت‌های دارای گل‌های تغییرشکل‌یافته نسبت به گیاه طبیعی (بالا چپ). (اقتباس از اکامورا و همکاران، ۲۰۰۳)



شکل ۵-۱۱ مقایسه خصوصیات مورفولوژیکی گیاه دیپلوئید و تتراپلوئید *Phlox subulata*. (الف) چپ: گیاه دیپلوئید، راست: گیاه تتراپلوئید؛ (ب) چپ: غنچه گل دیپلوئید، راست: غنچه گل تتراپلوئید؛ (ج) چپ: گل دیپلوئید، راست: گل تتراپلوئید. (اقتباس از ژانگ و همکاران، ۲۰۰۸)

۵-۳-۱ تولید گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئید

نتایج بسیاری از تحقیقات انجام شده به منظور تولید ارقام زینتی پلی پلوئید حاکی از موفقیت آمیز بودن کاربرد مواد موتاسیونزا در مقایسه با شرایط طبیعی بوده است. به طور مثال، باززایی برگ گیاه دیپلوئید بنفشه آفریقایی در محیط کشت های حاوی غلظت های مختلف کلشی سین نشان داد که کاربرد 150 mg/l کلشی سین با دوبرابر کردن کروموزوم ها در ۲۸٪ گیاهچه های باززاشده، بیشترین میزان القای پلی پلوئیدی را به همراه داشته است (اسپینو و وازکوئز، ۱۹۸۱). همچنین تیمار ریزنمونه های جوانه انتهایی گیاه *Phlox subulata* با استفاده از ماده کلشی سین در شرایط این ویترو موجب القای پلی پلوئیدی در ۷۵٪ ریزنمونه ها شده است به طوری که گیاهان تتراپلوئید دارای غنچه ها و گل های بزرگتری نسبت به انواع دیپلوئید بودند (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۸) (شکل ۵-۱۱).

۵-۴ کشت بافت در مهندسی ژنتیک

علم مهندسی ژنتیک با فراهم کردن شرایط لازم برای مهندسی مسیرهای متابولیکی و به تبع آن ایجاد خصوصیات جدید در گیاهان زینتی توانسته است کمک شایانی به بهبود کارایی برنامه های اصلاحی و کوتاه کردن این فرایندها نماید. از صفات مهمی که در مهندسی ژنتیک گیاهان زینتی مورد توجه قرار گرفته است می توان به رنگ گل و کیفیت پس از برداشت گل اشاره نمود. تلاش هایی که به منظور بهبود این صفات از طریق مهندسی ژنتیک در گیاهانی



شکل ۱۲-۵ مراحل فرایند تولید رُزهای تراریخته آبی. (اقتباس از وبگاه شرکت Suntory)

نظیر رُز و میخک صورت گرفته است منجر به آزادسازی ارقام تجاری میخک آبی Moonshadow™ و Moonrust™ و رُز آبی Applause™ شده است. بررسی فرایند تولید این ارقام نشان می‌دهد که کشت بافت نقش اساسی در طی مراحل انتقال ژن به این گیاهان ایفا نموده است. به‌طوری که انتقال ژن به گیاه میخک عمدتاً از طریق بمباران ذره‌ای ریزنمونه‌های ساقه انجام می‌شود و به‌دنبال آن گیاهان تراریخته به‌وسیله باززایی ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی BA و NAA تولید می‌شوند (وینستین و همکاران، ۲۰۰۶). رُزهای تراریخته آبی نیز توسط انتقال ژن به کالوس، انتخاب و تکثیر سلول‌های تراریخته و درنهایت باززایی گیاهان تراریخته به‌دست آمده‌اند (شکل ۱۲-۵).

نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد که توجه به کشت بافت گیاهان زینتی به‌عنوان پیش‌نیاز مهندسی ژنتیک این گیاهان ضروری بوده و لازم است عوامل مؤثر بر باززایی و رشد گیاهان زینتی در شرایط این‌ویtro مورد بررسی قرار گیرد تا بهترین نتیجه به‌منظور تولید گیاهان زینتی تراریخته به‌دست آید.

۵-۵ چشم‌انداز اقتصادی کشت بافت گیاهان زینتی در ایران

صنعت تکثیر و پرورش گیاهان زینتی و گل‌های شاخه‌بریده صنعتی رو به‌رشد و درحال گسترش است و کشورهای مختلف به‌ویژه کشورهای درحال توسعه سعی می‌کنند، سهم قابل توجهی از این بازار را به‌خود اختصاص دهند اما متأسفانه سهم ایران از این تجارت مهم،

علیرغم توانمندی‌های موجود در داخل، کمتر از یک درصد سهم جهانی است. از سوی دیگر، در ایران پایه‌های گیاهی اکثر گل‌های شاخه‌بریده مهم از قبیل ژربرا، آنتوریوم، لیلیوم، میخک و آلسترومریا از کشورهای اروپایی و به‌ویژه هلند تأمین می‌شود. محدودیت منابع آبی کشور و چالش‌های موجود در توسعه اقتصادی، اهمیت تأمین پایه‌های گیاهان زینتی را به‌منظور پرورش در مقیاس وسیع و صادرات آنها خاطرنشان می‌سازد. نتایج نیازسنجی‌های صورت گرفته، چشم‌انداز روشنی را در صنعت تولید گل و گیاهان زینتی متصور می‌سازد. در این راستا، دانش فنی تکثیر گیاهان زینتی با استفاده از روش‌های کشت بافت، از طریق افزایش سود حاصله می‌تواند نقش مهمی در شکوفایی این صنعت ایفا نماید.

۶. کشت بافت گیاهان دارویی

دو مشکل اساسی در برداشت و تولید گیاهان دارویی در ایران وجود دارد:

(۱) ایران دارای یک اقلیم خشک است. بنابراین، برداشت بی برنامه و بیش از توان عرصه‌های منابع طبیعی، خطر انقراض گونه‌های در معرض خطر را دارد. بنابراین، نیاز روزافزون کشور و همچنین تجارت صادراتی این محصولات به روش‌های سنتی موجب فرسایش ژنتیکی به خصوص در مورد گونه‌های اندمیک گیاهان دارویی خواهد شد.

(۲) تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای و حتی درون جمعیتی گیاهان دارویی و اثرات شرایط اقلیمی و خاک و... بر میزان مواد مؤثر گیاهان دارویی امری آشکار است که پزشکان و داروسازان را در مورد توصیه مقدار مورد مصرف گیاهان دارویی با مشکل مواجه نموده است. برای برطرف نمودن مشکلات فوق نخست باید نسبت به اهلی کردن گیاهان دارویی اقدام و آنها را خارج از عرصه‌های منابع طبیعی و در شرایط زراعی تولید کرد. دوم باید روش‌هایی اتخاذ کرد تا کیموتایپ‌های برتر را به صورت همگون و از نظر ژنتیکی یکسان تولید نمود. دلایل مذکور و سایر محدودیت‌ها ضرورت به کارگیری فنون بیوتکنولوژی و به خصوص کشت بافت را اجتناب‌ناپذیر نموده است.

۱-۶ کاربردهای کشت بافت گیاهی در گیاهان دارویی و اهمیت آن

کشت بافت گیاهی در زمینه گیاهان دارویی کاربردهای متعددی دارد که مهمترین آنها عبارت‌اند از: ریزازدیادی، تکثیر انبوه و سریع گیاهان دارویی دارای محتوای ژنتیکی و کیفی یکنواخت از طریق ریزازدیادی، حفظ گونه‌های گیاهی در حال انقراض از طریق نگهداری در

شرایط این ویترو از طریق انجماد و تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی و کشت اندام.

۱-۶ ریزازدیادی، تکثیر انبوه و سریع گیاهان دارویی

گزارش‌های زیادی در ارتباط با به‌کارگیری فنون «کشت بافت» جهت تکثیر گیاهان دارویی وجود دارد. با این روش، برای ایجاد کلون‌های گیاهی از تیره لاله در مدت ۱۲۰ روز بیش از ۴۰۰ گیاه کوچک همگن و یک‌شکل گرفته شد که ۹۰٪ آنها به رشد معمولی خود ادامه دادند.

در زمینه ریزازدیادی گیاهان دارویی متعددی مانند اوکالپتوس، آلونهورا، باریجه، آنگوزه، رز، مارچوبه، استویا، سیر، سرخدار، نعناع، شاییزک، مورد، بارهنگ و زنجبیل تحقیقات متعددی انجام شده و امکان تکثیر سریع و انبوه برخی از گونه‌های آنها فراهم گردیده است. مهمترین عوامل مؤثر بر افزایش کارایی ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای گیاهان دارویی، ریزنمونه و ژنوتیپ گیاهی، میزان تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت و عوامل فیزیکی می‌باشد.

گیاه دارویی زوفا (*Hyssopus officinalis*) متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است. این گیاه چندساله، بوته‌ای با ساقه‌های متعدد چوبی است و یکی از مهمترین گیاهان مورد استفاده در صنایع دارویی، بهداشتی و تولید مواد غذایی است. زوفا در بهبود سرماخوردگی، سرفه، گلودرد، آسم و بیماری‌های تنفسی مؤثر است. این گیاه را می‌توان جهت درمان اختلالات عصبی مانند افسردگی و اضطراب مورد استفاده قرار داد. مطالعات نشان داده است، زوفا می‌تواند مهارکننده ویروس ایدز باشد که این ویژگی را به نوعی پلی‌ساکارید نسبت می‌دهند. محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده رشد $2,4-D$ 1 mg/l در ایجاد کالوس‌های با کیفیت مؤثر بود (زبرجدی، ۱۳۹۰).

فنون‌های کشت بافت پیشرفته برای تولید انبوه گیاهان دارویی ارزشمند از نظر کشاورزی یا اقتصادی پیشنهاد می‌شود. ازجمله گیاهان دارویی که پروتکل تکثیر آنها از طریق کشت بافت بهینه شده است، گونه‌های مختلفی از گیاه دارویی مرزه (*Satureja*) می‌باشد. باتوجه به بومی بودن و در معرض انقراض بودن گونه‌های خاصی از این گیاه، ریزازدیادی آن از طریق کشت بافت اهمیت می‌یابد. ازجمله گونه‌های مرزه *S. edmondi* و *S. isophylla* و

S. kermanshahensis و *S. euvromanica* است که روش بهینه تکثیر و ریزازدیادی گیاه مرزه *S. edmondi* از طریق کشت جوانه با موفقیت توسط عمرانی و همکاران (۱۳۹۵) انجام گرفته است. مناسب‌ترین محیط برای ریزازدیادی مرزه محیط تغییر یافته MS با ترکیب هورمونی BA و 2iP بود.

ریزازدیادی گونه درختی گُندَرشد تیس (*Sorbus aucuparia*) به‌خاطر تجدید حیات جنگل در مناطق صخره‌ای کوهستانی و ارزش دارویی-صنعتی آن از اهمیت بالایی برخوردار است. در معرض انقراض بودن گیاه، ریزازدیادی پایه‌های مسن این گونه را از طریق کشت جوانه ضروری نموده است. محیط کشت DKW با هورمون‌های BA، TDZ و IBA در غلظت‌های به‌ترتیب ۰/۵، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر مناسب‌ترین محیط کشت شاخه‌زایی و تکثیر شاخه بود (امام و همکاران، ۱۳۹۰).

گونه بادام کوهی (*Amygdalus scoparia* L.) از جنبه‌های اقتصادی، زیست محیطی و دارویی دارای اهمیت فراوانی است. از روغن بادام به‌عنوان نرم‌کننده و التیام‌دهنده و به‌شکل پماد و کرم در تسکین عوارض بیماری‌های مختلف سرخک، مخم‌لک و آگزما استفاده می‌شود. روغن بادام شیرین ملین بوده و از میوه آن در تنقلات استفاده می‌شود. شیر بادام برای رفع سرفه، تنگی نفس و ناراحتی حنجره و درمان زخم روده، مثانه و اسهال مفید بوده و برگ آن مسهل و ضد کرم و جوشانده آن برای نارسایی کبد و کیسه صفرا سودمند است (Izaddoost, 1984). محیط کشت DKW با هورمون‌های BA و IBA در غلظت‌های به‌ترتیب ۰/۵ و ۰/۱ mg/l در مرحله شاخه‌زایی و تکثیر این گونه به‌عنوان ترکیب بهینه انتخاب شد (امام و همکاران، ۱۳۸۶).

جatroفا (*Jatropha curcas*) یک گونه گرمسیری سریع‌الرشد از خانواده Euphorbiaceae است این گیاه با ارزش، دارای اهمیت اقتصادی، دارویی و صنعتی است. نظر به روغنی بودن بذر جatroفا و پایین بودن قوه نامیه آن، از کشت جوانه برای تکثیر گیاه استفاده شد. بیشترین رشد طولی و تکثیر شاخه در محیط MS با ترکیب سیتوکینین BA و اکسین IBA در غلظت‌های به‌ترتیب ۳ و ۰/۱ mg/l به‌دست آمد (امام و همکاران، ۱۳۹۴) (شکل ۱-۶).

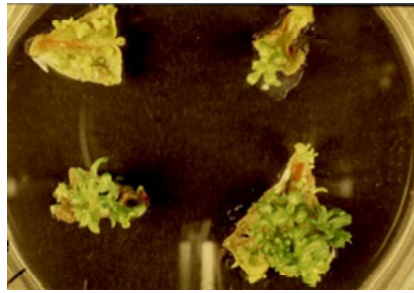


شکل ۱-۶ مراحل ریزازدیادی گیاه جاتروفا.

در گیاه آلوئه‌ورا بخش‌های مختلفی از گیاه مانند برگ، نوک شاخه، جوانه‌های جانبی، قطعه‌های ساقه و ریشه به‌عنوان ریزنمونه بررسی شده است که عمده نتایج نشان می‌دهد نوک شاخه و جوانه‌های جانبی بهترین ریزنمونه جهت ریزازدیادی آن می‌باشند. به‌علاوه، بسته به ژنوتیپ گیاه، ترکیبات مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد روی میزان شاخه‌زایی و پرآوری آن تأثیر دارد. تحقیقات نشان داده که مناسب‌ترین محیط برای باززایی و ریزازدیادی باریجه محیط تغییر یافته MS با ترکیب هورمونی BA و NAA بود (Enio Tiago de Oliveira, 2009).

گزارش‌های متعددی در زمینه تکثیر گیاهان دارویی از طریق کال‌زایی وجود دارد. در گیاه *Doiscorea alata* نوع ریزنمونه، محیط کشت و دوره فتوپریودی و در *Hyoscyamus muticus* نوع ریزنمونه و هورمون‌ها نقش تعیین‌کننده‌ای در کال‌زایی و باززایی گیاه از کالوس‌ها دارند. در آلوئه‌ورا محیط کشت پایه MS همراه با α -NAA، Naphtalene acetic acid به‌میزان ۱ mg/l و ترکیب ویتامینی شامل ۴ mg/l Thiamine Hcl، ۵ mg/l Prydoxine Hcl، ۵ mg/l Nicotinic acid و ۱۰۰ mg/l Myo-Inositol به‌میزان ۱۰۰ mg/l بهترین محیط کشت جهت القای بافت پینه (صد درصد کال‌زایی) بود.

کاسنی (*Cichorium intybus* L.) گیاه دارویی مهمی می‌باشد که به‌دلیل داشتن انواع مختلف ترکیبات دارویی حائز اهمیت می‌باشد. بهینه‌سازی کالوس‌زایی و باززایی گیاه کاسنی

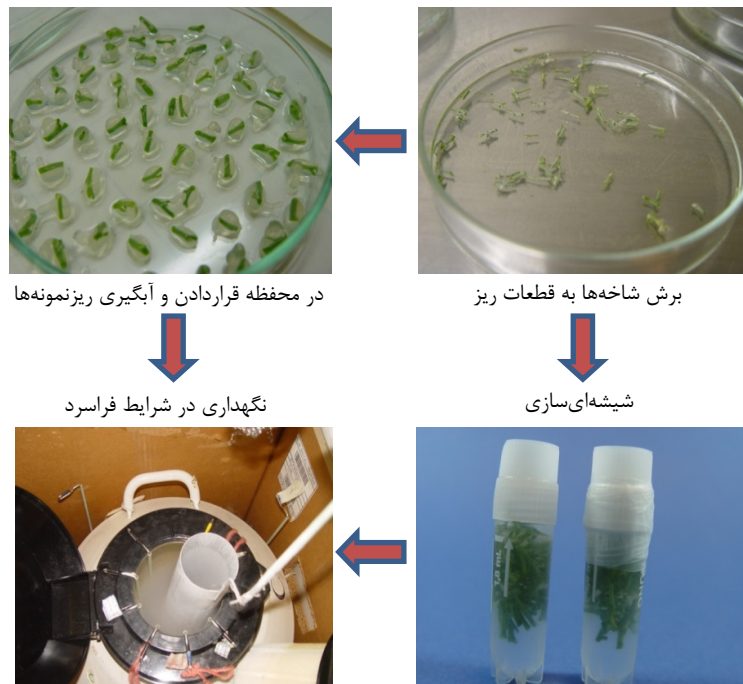


شکل ۲-۶ اندام‌زایی از کالوس.

با استفاده از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ در محیط کشت MS با ترکیب هورمونی 0.3 mg/l نفتالین استیک اسید و 1 mg/l کینتین حاصل شد (حمیرا هادیزاده، ۱۳۹۲). در سرخدار باززایی در محیط کشت MS تکمیل شده با BAP، Kin، حاصل شد (abbasian, et al, 2010). در سیکاس (*Cycas revoluta*) در محیط کشت MS نصف غلظت و BAP با ۲۰۰ لوکس نور ۱۶ ساعته تولید گیاهچه به صورت مستقیم و غیرمستقیم حاصل شد. در باریجه، رازیانه، آنغوزه، مشکک، ختمی، فندق، مریم، خشخاش، نخودی، پونه آبی *Mentha arvensis*، علف دندان *Plumbago rosea*، *Cephaelis ipecacuanha* و *Ginkgo biloba* نیز این شرایط بررسی شده است.



شکل ۳-۶ جنین‌زایی سوماتیکی گیاه دارویی.



شکل ۴-۶ حفظ ذخایر ژنتیکی گونه‌های مرزه از طریق نگهداری جوانه‌های جانبی و انتهایی آنها در نیتروژن مایع و ایجاد کرایوبانک گونه‌های منابع طبیعی کشور.

۲-۱-۶ حفاظت گونه‌های گیاهان دارویی از طریق نگهداری در سرما

نگهداری گونه‌های گیاهان دارویی در شرایط فراسرد (Cryopreservation) روشی مفید جهت حفاظت از گیاهان دارویی در معرض انقراض باشد. نیتروژن مایع بهترین و کاربردی‌ترین ماده‌ای است که با تأمین دمای -196°C برای حفظ گونه‌های گیاهان دارویی در شرایط فراسرد استفاده می‌شود. این فناوری از سال ۱۳۸۳ در مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور برای گیاهان منابع طبیعی در ایران بومی گردیده است. مثلاً براساس گزارشات منتشرشده، روش نگهداری در سرما، روشی مؤثر جهت نگهداری کشت‌های سلولی گیاهان دارویی تولیدکننده آکالوئید همچون *Rauvolfia serpentine*, *Smirnovia turkestan*,



شکل ۵-۶ باز یافت و رشد جوانه‌های گیاه *Smirnovia turkestanica* پس از نگهداری در شرایط فراسرد.

Hyoscyamus spp. است. در این روش بذر، جنین، محور جنینی، جنین مصنوعی، سلول، مریستم، جوانه‌های جانبی و انتهایی و دانه گرده قابل نگهداری است.

گیاه دم‌گاوی (*Smirnovia turkestanica* Bunge) یکی از گونه‌های گیاهی باارزش ماسه‌زارهای ایران می‌باشد. نظر به اهمیت این گونه در امر بیابان‌زدایی، مشکلات زادآوری طبیعی، نیاز به حفظ ذخایر ژنتیکی در شرایط فراسرد و ریزازدیادی آن مورد بررسی قرار گرفت. بذرها ی خراش داده شده با محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۲۵٪ w/v به مدت ۱۵ دقیقه سترون شدند و بعد در محیط پایه MS ۱/۲ کشت گردیدند. گیاهچه‌های به دست آمده پس از سه هفته از محل یقه قطع و در ۸ تیمار در محیط پایه MS با ترکیبات متفاوتی از هورمون‌های BAP، Kin، 2ip و IBA با ۴ تکرار برای شاخه‌زایی استقرار یافتند. براساس نتایج به دست آمده، محیط کشت پایه MS حاوی هورمون‌های 2iP و BAP (هر کدام به مقدار ۰/۵ mg/l) و IBA به میزان ۰/۰۱ mg/l، به عنوان بهترین محیط شاخه‌زایی و محیط کشت MS تغییر یافته بدون هورمون، به عنوان برترین محیط ریشه‌زایی تعیین گردید. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده پس از انتقال به گلدان‌های حاوی خاک عرصه به گلخانه منتقل و مراحل سازگاری طی ده روز انجام شد (ناصر و همکاران، ۱۳۸۹).

۳-۱-۶ تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط کشت سوسپانسیون سلولی و کشت اندام تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت بافت دارای مزایای متعددی است. در شرایط این ویترو تولید متابولیت ثانویه تحت تأثیر عوامل محیطی مختلف نظیر اقلیم،

آفات، بیماری‌های میکروبی، تنش‌های فصلی و جغرافیایی قرار نمی‌گیرد. رشد سلول‌ها را می‌توان به‌صورت خودکار کنترل کرد و فرایندهای متابولیکی را تنظیم نمود. فرآورده‌های مفید را می‌توان تحت شرایط کنترل‌شده تولید کرد و محصولات خالص‌تر و مطمئن‌تر به‌بازار عرضه نمود. کشت سلولی می‌تواند راهکار مناسبی برای گیاهانی باشد که طول دوره، رشدی طولانی و غیراقتصادی دارند.

از کشت سوسپانسیون ریشه گیاه *Cephaelis ipecacuanha* می‌توان سفالین و امتین را به‌دست آورد که میزان تولیدشده این آلکالوئید در کشت سلولی برابر با مقادیر تولیدی گیاهان مادری در شرایط گلخانه‌ای بود (Teshima, et al, 1988). به‌عنوان مثال، شقایق کبیر (*Papaver bracteatum*) که منبع بتائین است دو تا سه فصل وقت لازم دارد، تا به مرحله رسیدگی کامل برسد. اما تولید آن از طریق کشت سلول در محیط شیمیایی کنترل‌شده تسریع می‌گردد. به‌علاوه، از کشت سلولی می‌توان برای مطالعه بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه استفاده کرد. تاکنون کشت سلولی طیف وسیعی از گیاهان دارویی بررسی شده است و ترکیبات مهم و بسیار زیادی از این کشت‌ها جدا شده‌اند که می‌توان به فلاوونوئیدها، تانن‌ها، آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، افزودنی‌های غذایی مثل وانیل، رنگ‌های آنتوسیانینی و طعم‌دهنده‌ها اشاره نمود. محققان در برخی از گیاهان موفق شده‌اند که با استفاده از کشت سلول مقادیر بیشتری از متابولیت را نسبت به گیاه تولید کنند؛ به‌عنوان مثال می‌توان به افزایش تولید رزماریک‌اسید در کشت سلول گیاهی مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) و آنتراکینون در کشت گیاهی توت هندی یا درخت نانی (*Morinda citrifolia*) نسبت به گیاه مادری اشاره نمود. درحال حاضر واحدهای صنعتی کشت سلول گیاهی متعددی بنیانگذاری شده است. ترکیباتی مانند شیکونین به‌عنوان رنگ طبیعی استخراج‌شده از سنگدانه (*Lithospermum erythrorhizon*) بربرین از *Coptis japonica* و تاکسول از سرخدار (*Taxus baccata* L.) در مقیاس صنعتی به تولید انبوه رسیده‌اند.

از آنجا که عموماً تولید متابولیت‌های ثانویه در بافت‌های تمایز یافته بیشتر است، تلاش‌هایی در جهت کشت ساقه و ریشه به‌منظور تولید ترکیبات مهم دارویی انجام گرفته است. کشت‌های اندام نسبتاً پایدارند و ترکیبات ثانویه در اندام‌های کشت‌شده در دوره‌های زمانی

کوتاهتری نسبت به گیاه تولید می‌شوند. توانایی باکتری *Agrobacterium rhizogenes* در القای ریشه مویی در تعدادی از گیاهان منجر به استفاده از ریشه‌های موئین به‌عنوان منبعی برای تولید فرآورده‌های دارویی شده است. تولید انبوه ریشه موئین در جینسینگ در بیوراکتور ۲۰ تنی با بازدهی ۵۰۰ mg/l ساپونین در روز امکان‌پذیر شده است. در اغلب کشت‌های اندام، تولید متابولیت همراه با رشد اتفاق می‌افتد. بنابراین، امکان تولید ریشه و متابولیت در یک بیوراکتور وجود دارد. درحالی‌که در کشت سوسپانسیون سلولی عموماً مرحله تولید توده سلولی و متابولیت در دو بیوراکتور جداگانه انجام می‌شود.

در سال‌های اخیر توانایی کشت سلول‌های گیاهی در شرایط این‌ویترو برای تبدیل زیستی (Biotransformation) یک پیش‌ساز کم‌ارزش به فرآورده نهایی ارزشمند بررسی شده است. سلول‌های گیاهی می‌توانند یک منبع جایگزین مناسب برای تولید ترکیبات باارزشی باشند که سنتز آنها از طریق روش‌های شیمیایی مشکل است. در این رابطه می‌توان به تبدیل زیستی ژرانیول به نرول از طریق سلول‌های غیرمتحرک شده انگور و سوسپانسیون سلولی جعفری اشاره نمود.

۲-۶ پیشرفت‌های جهانی کشت بافت گیاهان دارویی و چشم‌انداز آینده آن

تکثیر گیاهان در شرایط آزمایشگاهی، روشی بسیار مفید جهت تولید داروهای گیاهی باکیفیت است. روش‌های مختلفی برای تکثیر در آزمایشگاه وجود دارد که ازجمله آنها، ریزازدیادی است. ریزازدیادی فواید زیادی نسبت به روش‌های سنتی تکثیر دارد. با ریزازدیادی می‌توان نرخ تکثیر را بالا برد و مواد گیاهی عاری از پاتوژن تولید کرد. گزارش‌های زیادی درارتباط با به‌کارگیری تکنیک «کشت بافت» جهت تکثیر گیاهان دارویی وجود دارد. باززایی گیاهان با استفاده از جنین‌زایی سوماتیک از یک سلول، در بسیاری از گونه‌های گیاهان دارویی به‌اثبات رسیده است. بنابراین، در این حالت باتوجه به پتانسیل متفاوت سلول‌های مختلف در تولید یک ترکیب دارویی، می‌توان گیاهانی با ویژگی برتر نسبت به گیاه اولیه تولید نمود.

فهرست منابع

فصل ۱

- امیدی م.، ب. سیدطباطبایی (۱۳۹۴). کشت بافت و سلول گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۷۶ صفحه.
- امیدی م.، ن. فرزین (۱۳۹۱). راهکارهای بیوتکنولوژی در افزایش کارایی گیاهان دارویی. ژنتیک نوین. دوره هفتم، شماره ۳، پاییز.
- باقری ع.، م. صفاری (۱۳۷۶). مبانی کشت بافت گیاهی. ترجمه. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
- باقری ه.، پ. آزادی (۱۳۸۱). کشت بافت گیاهی، تکنیک‌ها و آزمایش‌ها. ترجمه، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.
- خشخوی م. (۱۳۷۳). فنون کشت بافت برای گیاهان باغبانی. ترجمه. انتشارات دانشگاه شیراز.
- خشخوی م. (۱۳۸۲). ازدیاد نباتات، مبانی و روش‌ها. ترجمه. انتشارات دانشگاه شیراز.
- روش‌های بیوتکنولوژی اصلاح گیاهان دارویی، <http://www.crop.blogsky.com>.
- روش‌های کشت بافت به‌همراه مباحث آزمایشگاهی (دکتر مهدی شاهسونند)، باشگاه مهندسان ایران www.iran-eng.ir.
- زکی‌زاده (۱۳۹۴). ازدیاد نباتات (جزوه آموزشی)، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم کشاورزی.
- شبکه کانون‌های تفکر ایران، اهمیت بیوتکنولوژی گیاهی و حوزه‌های مختلف کاربرد آن، <http://itan.ir>.
- علیزاده م. (۱۳۹۰). راهنمای کاربران کشت بافت گیاهی و ریزازدیادی - تألیف. انتشارات نوروزی، ۳۲۰ صفحه.
- فارسی، م. (۱۳۷۷). اصول اصلاح نباتات، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۲۹۵ صفحه.
- فروتن آ.، ر. وادیدار (۱۳۸۵). کشت بافت گیاهی. ترجمه. انتشارات سپهر. ۲۹۴ صفحه.
- قاسمی بزدی ک.، ا. احمدی (۱۳۸۸). بیوتکنولوژی سلول و بافت (در ریزازدیادی و به‌زادی گیاهی). ترجمه. انتشارات مختومقلی فراغی، گرگان. ۲۵۴ صفحه.
- قاسمی بزدی ک.، م. ر. رضائی مقدم (۱۳۹۱). راهنمای عملی کشت بافت گیاهی. تألیف. انتشارات نوروزی، گرگان. ۱۵۲ صفحه.
- معینی ا.، د. کهریزی (۱۳۸۲). کشت بافت گیاهی. ترجمه. انتشارات سازمان بسیج دانشجویی.
- George, Edwin F.; Hall, Michael A.; De Klerk, Geert-Jan, eds. (2008). *Plant propagation by tissue culture. 1. The background* (3rd ed.). Springer. ISBN 978-1-4020-5004-6.

- Ramachandra Rao S, Ravishankar GA.(2002), Plant cell cultures. Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 2002, 20:101-153.
- Singh, S.K.; Srivastava, S. (2006). *Plant Tissue Culture. Campus Book International*. ISBN 978-81-8030-123-0.
- Tripathi L, Tripathi JN (2003) Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2: 243-253.

فصل ۲

- Dhlamini, Z., Spillane, C., Moss, J. P., Ruane, J., Urquia, N., and Sonnino, A.(2005). *Status of research and application of crop biotechnologies in developing countries: preliminary assessment*. FAO publications.
- O'Riordain, F.(2003). Directory of European plant tissue culture laboratories 1996–1997. In *Cost Action*, Vol. 843. Official Publications of the European Communities.
- Winkelmann, T., Geier, T., & Preil, W. (2006). *Commercial in vitro plant production in Germany in 1985–2004*. Plant cell, tissue and organ culture, 86(3): 319-327.
- Singh, G., & Shetty, S. (2011). Impact of tissue culture on agriculture in India. *Biotechnol Bioinforma Bioeng*, 1: 147-158.
- Kabunga, N. S., Dubois, T., and Qaim, M.(2012). Heterogeneous information exposure and technology adoption: The case of tissue culture bananas in Kenya. *Agricultural Economics*, 43(5): 473-486.
- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA).(2006). ISAAA publications. Available online at: <http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/14/default.asp>.
- Soh, A. C., Wong, C. K., Ho, Y. W., and Choong, C. W. (2009). *Oil palm*. In: *Oil crops*, pp. 333-367. Springer New York.

فصل ۳

- ابراهیمی ج.، م. سلوکی، م. امید، م. فروتن، الف. ز. زارع کاریزی، ع. مهرآفرین و الف. قادری (۱۳۹۳). اثر متیل جاسمونات بر تولید تاکسول در کشت درون شیشه‌ای گیاه فندق (*Corylus avellana* L.). فصلنامه گیاهان دارویی. سال چهاردهم، دوره ۲. ۵۴.
- امام م. (۱۳۸۲). بررسی تکثیر غیرجنسی گردوی بالغ ایرانی (*Juglans regia*) با کشت سرشاخه‌های انتهایی. پژوهش و سازندگی. شماره ۶۳. ص ۱۰-۱۵.
- باقری س.، م. الف. امیری، د. داودی و م. انتصاری (۱۳۹۲). بررسی و مقایسه ظروف کشت رایج و بیوراکتور تناوبی جهت تکثیر انبوه پایه GF ۶۷۷ (هیبرید هلو × بادام). نشریه علوم باغبانی، جلد ۲۷. شماره ۱.
- حاج صادقیان نجف آبادی ع. (۱۳۹۵). ریزازدیادی گلابی. رقم نطنز. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شاهد، دانشکده کشاورزی، گروه باغبانی.
- حسینی ن. م. قاسمی ب. گلچین و پ. راهداری (۱۳۸۹). تأثیر غلظت‌های مختلف محیط کشت و سیتوکینین بر پرآوری شاخه‌های پرتقال (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) در شرایط درون شیشه‌ای. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن.
- حسینی ف. م. قاسمی م. فتوکیان و پ. راهداری (۱۳۸۹). تأثیر غلظت‌های مختلف ۶-بنزیل آمینوپورین و نفتالن استیک اسید بر ریزازدیادی کیوی فروت در محیط درون شیشه‌ای. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن.

- دامن کشان ب.، ب. پناهی و م. اسعدی (۱۳۹۱). معرفی انواع ناهنجاری‌ها در درختان خرماي تکثیر یافته به‌روش کشت بافت. انتشارات واحد رسانه‌های ترویجی.
- درانی ف. (۱۳۹۱). کشت بافت و تکثیر درون‌شیشه‌ای زیتون *Olea europaea* L. سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران.
- صادق پور ص. و ل. ناصری (۱۳۹۳). تأثیر کیتوسان بر پرآوری درون‌شیشه‌ای انگور (*Vitis vinifera* L.) رقم بی‌دانه قرمز. به‌زراعی کشاورزی، دوره ۱۶، شماره ۳.
- عبادی ع. م. عالی‌فر فتاحی م. ر. مقدم و ا. استاجی (۱۳۹۳). بررسی اثر نوع و حالت محیط کشت و زمان جداسازی تخمک و جنین بر میزان موفقیت فنون نجات جنین انگور «فلیم سیدلس» مجله علوم باغبانی ایران- دوره ۴۵ شماره ۳.
- علیزاده ن. (۱۳۹۵). ریزازدیادی سیب رقم گالا. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شاهد، دانشکده کشاورزی، گروه باغبانی.
- فلاح‌پور م.، س. م. میری و ن. بوذری (۱۳۸۴). اثر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزازدیادی پایه گیلاس 6P-CAB. سومین همایش سراسری کشاورزی و منابع طبیعی پایدار.
- قاسمی م.، م. هاشمی سجادی و و. ربیعی (۱۳۹۳). کاربرد گرمادرمانی حذف ویروس تریتستیزا در پرتقال تامسون ناول. مجله به‌زراعی کشاورزی- شماره ۳.
- قاسمی م.، ذ. زمانی، ع. عبادی، ع. وزوانی و ی. ابراهیمی (۱۳۸۲). تعیین بهترین زمان برای شناسایی و نجات جنین‌های زایشی از بذور چند جنین پایه‌های مرکبات، مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، شماره ۳، جلد ۱۰، صفحه ۱۲۵-۱۱۷.
- مدنی گ.، س. قبادی، ب. الف. سیدطباطبایی، م. طالبی و الف. یامچی (۱۳۹۱). اثر تنظیم‌کننده‌های رشد و انواع ریزنمونه بر باززایی و ریزازدیادی توت‌فرنگی تجاری رقم سلوا (*Fragaria × ananassa* cv. Selva). علوم و فنون کشت گلخانه‌ای، سال چهارم، شماره ۱۵.
- مهدویان م.، ن. بوذری و ح. عبدالحی (۱۳۸۹). اثر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر پرآوری و ریشه‌زایی پایه رویشی محلب (سنت‌لوسی ۶۴). مجله به‌زادی نهال و بذر، جلد ۲۶، شماره ۱.
- ملکی قوچه‌شور ش. (۱۳۹۲). ریزازدیادی اکوتیپ‌های بومی عناب در شرایط درون‌شیشه‌ای. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی.
- مرادی ز.، م. شیدایی، ف. فراهانی و ط. نژادستاری (۱۳۹۴). بررسی روند تکوینی رویان‌زایی سوماتیک مور (*Musa acuminata* L.) رقم Vallery. دوره ۵، شماره ۲، صفحه ۵۴-۶۲.
- یاوری ن و ف. روزبه (۱۳۸۲) «کاربرد روش‌های کشت درون‌شیشه‌ای (*Invitro*) در به‌زادی گیاهان دگرگشن» جزوه کارگاه آموزشی به‌زادی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند و معاونت آموزش و تجهیز نیروی انسانی - کرج.

- Bell, R. L. and Reed, B. M. (2002). In vitro tissue culture of pear: advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation. *Acta Horticulturae*, 596: 412-418.
- Carimi F, Pasquale FD, Puglia AM (1998a) In vitro rescue of zygotic embryo of sour orange (*Citrus aurantium* L.) and their detection based on RFLP analysis. *Plant Breeding* 117:261-266.
- Davies FS, Albrigo LG (1994) *Citrus*. CAB International Walling Ford. P 254.
- Delijam, M.A., Garoosi, Gh.A., Nezami Alanagh, E. and Hosseini, R. 2016. Improving *Pistacia vera* micropropagation: with emphasis on the efficiency of minerals, vitamins and PGRs. *Journal of plant molecular breeding*, 4(1): 43-54.
- Junal, A. and Saeed, A. (2009). In vitro micropropagation of khalas Date palm (*Phoenix dactylifera*) an important fruit plant. *Fruit and ornamental plant*. 17(1), 15-27.
- Liu, J.R., Sink, K.C., and Dennis, F.G. (1983). Adventive embryogenesis from leaf explants of apple seedlings. *Hortscience*, 18: 871-873.
- Minghao, L., Jinyan, H., Qian, A., Pingping, Z., Mingli, T., and Lifang, W. (2011). Regeneration and Rapid Propagation from Stem Explants of *Pistacia Chinesis* Bunge. *International Conference on Agricultural and Natural Resources Engineering Advanced In Biomedical Engineering*, vol. 3-5. 112-118.
- Navarro, L. (1992). Citrus shoot-tip grafting In vitro. *Biotechnology in agriculture and forestry*, V.18, 327-338.
- Navarro, L. and Juarez, J. (2007). Shoot-tip grafting In vitro: Impact in the citrus industry and research applications. pp 353-364. In: Khan, I.A. (ed.), *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*, CAB international, Moncada, Valencia, Spain.
- Niaz, N., Ullah, S., Ullah, M. and Jabeen, N. (2014). Effect of growth regulators on micropropagation of different olive cultivars (*Olea europaea* L.). *Sci Lett*; 2(2): 48-52.
- Riosleal, D., Sanchez, O. M., Aviles, F., Materan, M. E., Uribe, M., Hasbun, R. & Rodriguez, R. (2007). Micropropagation of *Juglans Regia* L. In book: *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, pp. 381-390.

فصل ۴

- ابراهیم زاده ح.، لطفی م.، عزیزی نیا ش.، قنواتی ف. (۱۳۹۲). تولید گیاهان هاپلوئید *Cucurbit apepo* L. از طریق القای بکرزایی توسط گرده‌های پرتوتایی شده با اشعه گاما. *مجله زیست فناوری گیاهان زراعی*. سال سوم. شماره ۴. ۹۹-۱۰۸.
- انتصاری م. (۱۳۸۷). بهینه‌سازی تولید ریزغده‌های سالم سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) بوسیله بیوراکتور تناوبی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی.
- توکلی م.، عنایتی شریعت پناهی م. (۱۳۹۰). بررسی اثرات موتازن EMS بر القای جنین‌زایی میکروسپور و باززایی گیاهان هاپلوئید در کلزا (*Brassica napus* L.). *فصلنامه علمی پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی*. دوره ۳. شماره ۴.
- خادمی م. نظریان فیروزآبادی ف. (۱۳۹۳). تأثیر دو نوع هورمون بر تولید برگ‌های حاوی پایه جوانه در روش باززایی مستقیم گیاه چغندر قند. *دوفصلنامه فناوری زیستی در کشاورزی*. ۴-۱.
- خزایی ل.، بخشی خانیکی غ. ر.، عبادی ع. ا. جوهر علی ا. (۱۳۸۸). توسعه تولید دابل هاپلوئیدها با استفاده از کلشی‌سین در محیط کشت بساک برنج. *نشریه زراعت*. شماره ۱۰۴.
- رستمی س.، داودی د.، عنایت شریعت پناهی م. روزبه ف. (۱۳۹۲). بررسی تأثیر سیکل‌های تغذیه بر شاخص‌های رشد و تکثیر گیاه نیشکر در مینی بیوراکتور تناوبی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه زنجان.

- روزبه ف.، داودی د.، مصباح م. (۱۳۸۳). افزایش نرخ تکثیر چغندر قند در شرایط *in vitro* با استفاده از بیواکتور تناوبی. چغندر قند. جلد ۲۰. شماره ۲.
- شریفی پ.، معینی ا. (۱۳۹۵). مطالعه برخی عوامل مؤثر بر جنین‌زایی میکروسپورها و باززایی گیاهچه‌ها در کلزا (*Brassica napus* L.). زیست‌فناوری گیاهان زراعی. دوره ۶. شماره ۱۳. صفحه ۲۶-۱۳.
- صالحیان آق‌باغ ح.، باباییان جلودار ن. ع.، رنجبر غ. ع.، باقری ن. ع. (۱۳۹۱). بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشدی روی کالوس‌زایی و باززایی چند رقم برنج. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی. دوره ۴. شماره ۱۰.
- عالم رحمتی م. (۱۳۸۸). کشت درون‌شیشه‌ای سیب‌زمینی رقم استانبولی به‌منظور تولید گیاهان عاری از ویروس به‌روش کشت مرستم توام با حرارت درمانی و شیمی‌درمانی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه صنعتی اصفهان. دانشکده منابع طبیعی.
- قاسمی بزدی ک. (۱۳۹۰). بررسی امکان تولید گیاهچه‌های هاپلوئید پنبه در شرایط آزمایشگاهی. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی با شماره ثبت ۴۰۰۲۴ در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی. انتشارات مؤسسه تحقیقات پنبه کشور. ۵۶ ص.
- قاسمی بزدی ک.، احمدی‌خواه ا. (۱۳۸۷). تأثیر محیط کشت، درجه حرارت و مدت زمان هم‌کشتی با آگروباکتریوم بر باززایی ریزنمونه‌های کلزا (*Brassica napus* L.) به‌منظور بهینه‌سازی انتقال ژن. خلاصه مقالات دهمین کنگره ژنتیک ایران. مرکز همایش‌های رازی، تهران، ایران، صفحه ۲۸۴.
- قاسمی بزدی ک. (۱۳۹۵). تکثیر غیرجنسی هیبریدهای نسل F₁ پنبه با استفاده از روش‌های کشت بافت با هدف کاهش هزینه‌های کارگری تولید بذر هیبرید. انتشارات مؤسسه تحقیقات پنبه کشور. ۳۵ ص.
- کلاتری هرمزی ص.، سیاهپوش م.، رجبی معمار ح.، حمدی ح.، شمیلی م.، حمودی ج. (۱۳۹۳). باززایی دو رقم تجاری نیشکر CP48-103 و CP69-1062 از ریزنمونه‌های برگ انتهایی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. جلد ۱. شماره ۷. ۱۷۴-۱۵۵.
- گل‌جانی مقدم ر.، مطلبی م.، زمانی م.، رضائزاد ح. (۱۳۹۱). بهینه‌سازی شرایط باززایی و تراریختی گیاه کلزا، رقم Hyola308 و RGS003. زیست‌شناسی گیاهی، سال ۴، شماره ۱۱.
- مهدویان خ.، قاسمی بزدی ک.، عباسپور ح. (۱۳۹۲). تأثیر غلظت‌های مختلف توکسین قارچ ورتیسیلیوم بر رشد نسبی کالوس ارقام پنبه. مجله پژوهش‌های پنبه ایران، دوره ۱، شماره ۲، صفحات ۱۳-۱.
- ناصرترابی م.، صالحی ش.، لطفی م. (۱۳۸۸). القای جنین‌های هاپلوئید از طریق پرتو گاما در توده‌های تجاری خربزه و طالبی. ششمین کنگره علوم باغبانی ایران.
- Donnelly, D. J., W. K. Coleman., W.K., Coleman, S.E. and Pot res, Am.J. (2003). Potato microtuber production and performance: a review. American Journal of potato research. 80: 103-115.
- Ghasemi Bezdi, K. (2011). The study of callus induction in cotton (*Gossypium* Sp.) under tissue culture conditions. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 3(1): 6-11.
- Mahajan S., Tuteja N., Cold salinity. (2005). Drought stresses: An overview. Arch BiochemBiophys; 58-444:139; PMID: 16309626; DOI: 10.1016/j. abb.10.018.

فصل ۵

خرازی م.، نعمتی ح.، تهرانی فرح.، باقری ع. و شریفی الف. (۱۳۹۲). بهینه‌سازی کشت نوک شاخساره میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) در شرایط درون‌شیشه‌ای. فناوری زیستی در کشاورزی ۱۱: ۱۲-۱۹.

خرازی م.، نعمتی ح.، تهرانی فرح.، باقری ع.، شریفی الف. و آشنایی م. (۱۳۹۱). بررسی اثر نوع درپوش و تعداد دفعات واکشت بر باززایی مستقیم میخک. فناوری زیستی در کشاورزی ۱۱: ۳۵-۴۰.

شریفی ا.، کیخا آخر ف.، یزدی م. و باقری ع. اثر رقم و تیمار هورمونی بر باززایی ریزنمونه‌های TCL گیاه لیلیوم در شرایط *Invitro*. مجله علوم باغبانی (دردست چاپ).

مؤمن‌زاده غ.، باقری ع.، آرمین م. و شریفی ا. (۱۳۹۳). اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی مستقیم آنتوریوم (*Anthurium andraeanum*). اولین کنگره ملی گل و گیاهان زینتی ایران.

باری ف.، ا.، موسوی، ی.، مستوفی، ذ.، زمانی، م.، سیدی، ع.، مطلبی آذر و م. لایمر (۱۳۹۰). فناوری زیستی در کشاورزی ۱۷: ۱۰-۲۶.

- Broertjes, C., and Verboom, H. (1974). Mutation breeding of *Alstroemeria*. *Euphytica* 23: 39-44.
- Canli, F. A., and Kazaz, S. (2009). Biotechnology of roses: progress and future prospects. *Suleyman Demirel Univ. Orman Fakultesi Dergisi* 1: 167-183.
- Datta, S.K. and Chakrabarty, D. (2009). *Management of chimera and Invitro mutagenesis for development of new flower color/shape and chlorophyll variegated mutants in chrysanthemum*. In: Shu, Q.Y. (2009). *Induced Plant Mutations in Genomic Era*. FAO and IAEA Publications, Vienna, Austria.
- Espino, F. J., and Vazquez, A. M. (1981). Chromosome numbers of *Saintpaulia ionantha* plantlets regenerated from leaves cultured *Invitro* with caffeine and colchicine. *Euphytica* 30: 847-853.
- Fukai, S., Goi, M., and Tanaka, M. (1991). Cryopreservation of shoot tips of *Chrysanthemum morifolium* and related species native to Japan. *Euphytica* 54: 201-204.
- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., and Das, P. K. (2008). *Invitro* mass multiplication with pure genetic identity in *Anthurium andraeanum* Lind. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 18: 113-122.
- Kaviani, B. (2010). Cryopreservation by encapsulation-dehydration for long-term storage of some important germplasm: seed of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.], embryonic axe of persian lilac (*Melia azedarach* L.), and tea (*Camellia sinensis* L.). *Plant Omics* 3: 177.
- Kim, S. J., Hahn, E. J., Paek, K. Y., and Murthy, H. N. (2002). Application of bioreactor culture for large scale production of *Chrysanthemum* transplants. *Acta horticulturae* 187-191.
- Kulus, D., and Zalewska, M. (2014). *Invitro* plant recovery from alginate encapsulated *Chrysanthemum grandiflorum* (Ramat.) Kitam. shoot tips. *Propagation of Ornamental Plants* 14: 3-12.
- Lambardi, M., Benelli, C., Ozudogru, E. A., and Ozden-Tokatli, Y. (2006). Synthetic seed technology in ornamental plants. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues* 2: 347-354.
- Lara, A., Mosqueda, O., and Gonzalez-Olmedo, J. (2004). Determination of the effect of Pectimorf and C-751 on shoot multiplication in *Anthurium andraeanum* propagated in temporary immersion bioreactors. *CIEBA* 45: 121-128.
- Mehrotra, S., M.K. Goel, A.K. Kukreja and B.N. Mishra. (2007). Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology* 6: 1484-1492.

- Osternack N, Saare-Surminski K, Preil W and Lieberei R.(1999). Induction of somatic embryos, adventitious shoots and roots in hypocotyls tissue of *Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch: comparative studies on embryogenic and organogenic competence. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 73:197-201.
- Preil, W.(2003). Micropropagation of ornamental plants. In: *Plant Tissue Culture*: 115-133. Springer Vienna.
- Sarmah, D. K., Borthakur, M., and Borua, P. K.(2010). Artificial seed production from encapsulated PLBs regenerated from leaf base of *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl.-an endangered orchid. *Current Science* 98: 686-690.
- Standardi, A., and Piccioni, E.(1998). Recent perspectives on synthetic seed technology using non embryogenic Invitro -derived explants. *International Journal of Plant Science* 159: 968-978.
- Thorpe, T. A.(2013). History of plant cell culture. *Plant tissue culture: Techniques and Experiments*.
- Vainstein, A., Zuker, A., and Ovadis, M. (2006). U.S. Patent No. 7,129,393. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Xi, M., Sun, L., Qiu, S., Liu, J., Xu, J. and Shi, J.(2012). Invitro mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*). *Plant Cell Reports* 31: 1043-1051.

فصل ۶

- امام م.، ع. قمری زارع، ف. اسدی کرم، ک. لوکی انارکی (۱۳۹۲). ریزازدیادی گونه بادام کوهی (*Amygdalus scoparia*) از طریق کشت جوانه و جنین. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران (۱): ۷۷-۸۶.
- امام م.، ع. قمری زارع، ک. اسبهدی، ط. س. نراقی، ش. شهرزاد (۱۳۹۰). ریزازدیادی درخت جنگلی تیس (*Sorbus aucuparia*) از طریق کشت ریزنمونه جوانه گیاه بالغ. دوفصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی (۲): ۱۹-۲۶۳-۲۷۳.
- امام م.، ل. میرجانی، ط. س. نراقی، ه. کنشلو (۱۳۹۴). بررسی تأثیر محیط کشت، ژنوتیپ و تنظیم کننده های رشد گیاهی بر ریزازدیادی گیاه جاتروفا (*Jatropha curcas* L.). دوفصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی (۲): ۲۳-۱۸۲-۱۹۲.
- زبرجدی ع.، م. ملصقی، د. کهریزی (۱۳۹۱). بررسی کالزایی در گیاه دارویی زوفا *Hyssopus officinalis*. سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (گیاهی، دامی و صنعتی).
- ارغوان ص. (۱۳۹۲). ریزازدیادی گیاهان دارویی زینتی. پایگاه کشاورزی ایران زمین. وبلاگ کشاورز بار
- عمرانی صباغی س.، ر. طبایی عقدایی، م. امام، غ. بخشی خانیکی (۱۳۹۵). بررسی ریزازدیادی گیاه دارویی و انحصاری و نادر *Satureja edmondi*. دوفصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی (۱): ۱۴۲-۲۴-۱۳۴.
- شکوفه ن.، ع. قمری زارع و ش. شهرزاد (۱۳۸۹). ریزازدیادی گیاه دم گاوای (*Smirnovia turkestanica* Bunge). دوفصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی (۸): ۷۴-۱۸-۸۲.

هادیزاده ح.، م. محب‌الدینی، ب. اسماعیل‌پور و ا. چمنی (۱۳۹۴). بررسی کالزایی و باززایی گیاه دارویی کاسنی (*Cichorium intybus* L.) با استفاده از ریزنمونه‌های برگ و دم‌برگ. نشریه علوم باغبانی، جلد ۲۹ شماره ۴، ۶۲۱-۶۳۰

Abbasin, Z., S. Zamani, S. Movahedi, G. Khaksar and B.E.SayedTabatabaei.(2010). Invitro Micropropagation of Yew (*Taxus baccata*) and Production of Plantlets. Volume: 9 (1): 48-54.
Enio Tiago de Oliveira1 and Otto Jesu Crococo,(2009). Large-scale Micropropagation of *Aloe vera*. Hortscience. 44 (6): 1675-1678
Izaddoost, M., (1984). *Chemical Plant*. Tehran University Publication, 233p.
Palai, S.K., (1999). An Important medicinal plants.
Ravishankar, G.A.,(1998). Bioactive molecules and medicinal plants. *Journal of Biology Environment Science*.6: 253-261.
Roat,C.,(2000). *Physiology Molecular Biology Plants*. 18(3): 253-263.
Teshima, (1988). Markets for sslected medicinal plants and their derivatives.