تاریخ چاپ: تابستان ۱۳۹۱

القای کالوس و باززایی گیاه از کشت مریستم سیب‌زمینی[۱]

*راضیه رستمی، پروانه ابریشمچی، مهرداد لاهوتی: دانشکدهٔ علوم، دانشگاه فردوسی

چکیده

همه ساله بیماری‌ها و به‌خصوص ویروس‌های گیاهی باعث از بین رفتن بخش عمده‌ای از محصولات کشاورزی می‌گردند. کشت مریستم یکی از مهم‌ترین روش‌های تولید گیاهان عاری از ویروس است. هدف از این پژوهش ارائه روشی مؤثر برای القای کالوس و باززایی گیاه از کشت بافت مریستم سیب‌زمینی[۱] بوده است. ایجاد کالوس در مریستم جانبی سیب‌زمینی در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) دارای 2,4-D با غلظت‌های۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر و کینتین با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، القا شد. تولید بهینهٔ کالوس درغلظت ۲ میلی‌گرم در لیترD-2,4 و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین مشاهده گردید. گیاهچه‌ها بعد از گذشت ۹ هفته از کشت باززایی شدند. بهترین محیط برای ایجاد ساقه و رشد آن، محیط MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر-2,4 D و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین بود. بیش‌ترین میزان برگ و ریشه و نیز رشد ریشه‌ها در محیط کشت MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیترD-2,4 و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین، تولید گردید.

مقدمه

سیب‌زمینی یکی از اعضای تیرهٔ سیب‌زمینیان[۲] است. سردهٔ *سیب‌زمینی*[۳] دارای ۱۲ گونه است که به شکل‌های علفی، درختچه‌ای و بوته‌های پیچان در نقاط مختلف ایران از شمال تا جنوب و از شرق تا غرب پراکنده‌اند [۳]. سیب‌زمینی یکی از محصولات غذایی مهم دنیا است که از نظر اقتصادی در بسیاری از کشورها اهمیت زیادی دارد و غذای بسیاری از مردم جهان را تشکیل می‌دهد. سیب‌زمینی علاوه بر انرژی و پروتئین، سرشار از آهن، منیزیم، پتاسیم و ویتامین‌های C و B است. سیب‌زمینی بعد از ذرت، گندم و برنج بیش‌ترین گیاه زراعی است که در جهان کشت می‌شود و از مهم‌ترین دو لپه‌ای‌ها محسوب می‌شود [۳۵].

در بسیاری از کشورهای در حال توسعه میزان محصول سیب‌زمینی بسیار پایین‌تر از پتانسیل ذاتی تولید آن است، زیرا بیماری‌های سیب‌زمینی و از جمله ویروس‌های گیاهی باعث از بین رفتن و کاهش محصول آن می‌شوند [۱۶]. مهم‌ترین این ویروس‌ها عبارتند از: ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی (PLRV)[۴]، ویروس X سیب‌زمینی (PVX)[۵] و ویروس Y سیب‌زمینی (PVY)[۶] [۸]، [۱۴]. کاهش محصول در آلودگی‌های ویروسی

واژه‌های کلیدی: سیب‌زمینی، کشت مریستم، باززایی گیاه

دریافت ۸۷/۱۰/۱۱ پذیرش۹۰/۱۲/۱۰

*نویسنده مسئول

۱. *Solanum tuberosum* L. var. *premier* ۲. *Solanaceae* ۳. *Solanum*
۴. Potato leaf roll virus ۵. Potato virus X ۶. Potato virus Y

Archive of SID
www.SID.ir

ممکن است به بیش از ۷۵ درصد برسد. بنا بر این در این کشورها مبارزه با عوامل بیماری‌زا و افزایش محصول از این طریق ضروری به‌نظر می‌رسد. ریزازدیادی[۱] سیب‌زمینی از طریق کشت مریستم روش مفید و کارآمدی برای حذف آلودگی‌های ویروسی آن است [۵۰]، [۱۵]، [۳۸]. ریزازدیادی یك کشت ضدعفونی شده از سلول‌ها، قطعات بافت‌ها یا اندام‌هاست که به‌طور معمول برای تولید انبوه محصولات کشاورزی با کیفیت استفاده می‌شود [۲۲]. در واقع نظریهٔ پرتوانی[۲] سلول‌های گیاهی که توسط شوان و شلیدن[۳] (۱۸۳۸) ارائه شد، پایه و اساس کشت سلول و بافت‌های گیاهی را تشکیل می‌دهد [۲]. هابرلنت[۴] در سال ۱۹۰۲ ایده و مفهوم کشت سلول را ابداع کرد. وی پدر کشت بافت گیاهی لقب گرفته است. مفهوم ریزازدیادی اولین بار توسط جی. ام. مورل[۵] در سال ۱۹۶۰ برای توصیف گیاهان عاری از ویروس سیمبیدیوم[۶] به جامعهٔ علمی ارائه شد. در دههٔ ۱۹۸۰ ریزازدیادی به یک صنعت تبدیل شد و هم‌اکنون دانشمندان زیادی در سراسر جهان به اصلاح و تکثیر گیاهان از طریق تکنیک‌های کشت بافت مشغولند [۲۰]، [۳۴].

در زمینهٔ ریزازدیادی سیب‌زمینی از طریق کشت مریستم، کارهای زیادی انجام شده است. کونوور و ولیتز[۷] (۱۹۷۸) اثرات سه تنظیم کنندهٔ رشد متفاوت (NAA[۸]، IAA[۹]، IBA[۱۰]) را در پنج غلظت مختلف (۰، ۰/۰۵، ۰/۱۵، ۰/۲۵ و ۰/۳۵ میلی‌گرم در لیتر) بر کشت بافت مریستم سیب‌زمینی بررسی کردند. در تحقیق آنان بیشینهٔ طول گیاهچه در محیط کشت دارای ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده گردید. هم‌چنین بیش‌ترین تعداد گره‌ها و بیشینهٔ تعداد برگ‌ها به‌ترتیب درمحیط کشت دارای ۰/۳۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IAA گزارش شد [۴۱].

فیک[۱۱] و همکاران (۱۹۹۲) گزارش کردند که حذف ویروس X سیب‌زمینی باعث افزایش تعداد، وزن و قطر غده‌های سیب‌زمینی می‌شود [۱].

شاکیا[۱۲] و همکاران (۱۹۹۳) مشاهده کردند که هنگامی که مریستم‌های سیب‌زمینی در محیط MS[۱۳] دارای NAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) و BA[۱۴] (۱ میلی‌گرم در لیتر) کشت داده شوند، به گیاهچه های سالم نمو می یابند. این گیاهان عاری از ویروس بوده و می توانند توسط کشت قطعات گرهی و مریستم های جانبی تکثیر شوند [۳۸].

نجیب[۱۵] و همکاران (۱۹۹۵) اعلام کردند که با استفاده از غده‌های بذری سیب‌زمینی عاری از ویروس، تولید محصول حدود ۴۰% افزایش می‌یابد [۸].

دودیتس[۱۶] و همکاران (۱۹۹۷) در کشت مریستم سیب‌زمینی بیش‌ترین میزان تولید کالوس را در محیط کشت MS دارای 2,4-D[۱۷] (۲/۵ میلی‌گرم در لیتر)، و بیش‌ترین میزان تولید بخش هوایی را در محیط کشت دارای BAP[۱۸] (۵ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) اعلام کردند [۱۵].

---

۱. Micropropagation ۲. Totipotency ۳. Schwan & Schliden ۴. Haberlandt
۵. G.M.morel ۶. *Cymbidium* ۷. Conover & Wlitz ۸. Naphthalene acetic acid
۹. Indoleacetic acid ۱۰. Indole Butyric acid ۱۱. Fik ۱۲. Shakya
۱۳. Murashig & Skooge ۱۴. Bezyle adenine ۱۵. Nagib ۱۶. Dudits
۱۷. 2,4 dichlorophenoxiacetic acid ۱۸. Benzyle amino porine

Archive of SID
www.SID.ir

بیماری‌های ویروسی سیب‌زمینی در ایران اولین بار در سال ۱۳۳۰ توسط استیارت[۱]، کارشناس بلژیکی، از اطراف تبریز گزارش شد و پس از آن اولین قدم مثبت در راه شناسایی بیماری‌های ویروسی سیب‌زمینی درایران در سال ۱۳۴۳ توسط مهندس علیرضا کریمی برداشته شد [۱].

بنا به اهمیت افزایش محصول سیب‌زمینی از طریق تکنیک‌های کشت بافت هدف این پژوهش ایجاد یک روش مؤثر برای القای کالوس در مریستم سیب‌زمینی و سپس باززایی گیاهچه از این کالوس‌ها است. این گیاهچه‌ها کم‌تر آلوده هستند و می‌توانند در تحقیقات بعدی استفاده شوند. به‌طور کلی از تمام مریستم‌های گیاه برای تولید گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زا می‌توان استفاده کرد [۲]، اما از آن‌جا که در استفاده از مریستم‌های جانبی نسبت به مریستم انتهای ساقه احتمال وقوع پدیدهٔ تنوع سوماکلونال[۲] و در نتیجه بروز ناهنجاری‌های ریخت‌شناختی در گیاهچه‌های باززایی شده کم‌تراست [۵]، [۳۶]، [۵۱] و این روش یکی از مهم‌ترین روش‌های ازدیاد ارقام ممتاز سیب‌زمینی به شمار می‌رود [۱۴]، در این تحقیق از مریستم‌های جانبی به‌عنوان جداکشت استفاده شد.

تنظیم کننده‌های رشد گیاهی[۳] و به‌خصوص هورمون‌های گروه اکسین و سیتوکینین نقش بسیار مهمی در کنترل تقسیم و تمایز سلول‌های گیاهی بر عهده دارند [۴]. دانشمندان با کاربرد این مواد در محیط های کشت و تغییر دادن مقادیر آنان در این محیط‌ها سعی در ایجاد شرایطی بهتر برای دست‌یابی سریع و آسان به اهداف مورد نظرخود داشته‌اند. در این بررسی به‌منظور دست‌یابی به مقادیر بهینه هورمون‌های 2,4-D (یک اکسین مصنوعی) و کینتین (یک سیتوکینین مصنوعی) در القای کالوس و باززایی گیاهچه‌ها، اثرات مقادیر مختلف این مواد بر کشت بافت مریستم سیب‌زمینی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

غده‌های بذری سیب‌زمینی رقم (Premier) از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان تهیه و در گلدان کشت داده شدند. پس از یک ماه گیاهچه‌های سیب‌زمینی رشد کرده و مریستم‌های جانبی این گیاهچه‌ها به ابعاد تقریبی ۲ میلی‌متر به‌عنوان جداکشت استفاده شدند.

مریستم‌های جانبی به‌همراه مقداری از بافت ساقه به‌دقت از گیاهچه‌ها جدا شدند و بعد از شست‌شوی سطحی، با الکل۷۰% و هیپوکلریت سدیم۱۰% ضدعفونی شدند [۱۲]، [۳۰]، [۴۴]. بافت ساقهٔ اطراف مریستم‌ها به‌دقت جدا و مریستم‌ها به‌کمک سوزن تشریح به لولهٔ آزمایش دارای محیط کشت MS جامد و مقادیر مختلف هورمون‌های گیاهی 2,4-D (۰ ، ۰/۵ ، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم درلیتر) و کینتین (۰، ۰/۵، ۱و ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر)، منتقل شدند [۴۷]. همهٔ عملیات ضدعفونی کردن، برش و انتقال جداکشت‌ها به محیط کشت، در زیر

۱. Steiart ۲. Somaclonal variation ۳. Plant growth regulators

Archive of SID

www.SID.ir

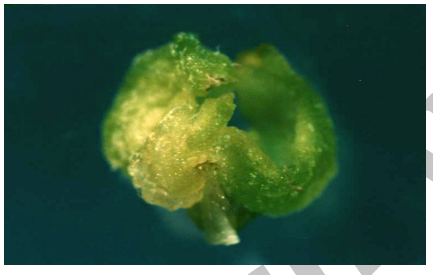
دستگاه لامینیار و با کمک ذره‌بین انجام شد. برای هر تیمار ۱۰ تکرار در نظر گرفته شد. لوله‌های آزمایش ابتدا به‌مدت یک هفته در تاریکی (انکوباتور) و حرارت ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس به دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و حرارت ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد در اتاقک کشت، منتقل گردیدند [۱۸]، [۳۹]، [۳۲].

پس از القا شدن کالوس و اندام در جداکشت‌ها، وزن‌تر و خشک کالوس و همچنین ارتفاع بخش هوایی، تعداد برگ، تعداد و طول ریشه‌های نوپدید اندازه‌گیری شد و داده‌های حاصل به‌کمک نرم‌افزار آماری Jmp تجزیه و تحلیل آماری شد. مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون HSD (Tukey) در سطح اطمینان ۹۵% (α= ۰/۰۵) انجام شد. در این بررسی انتقال گیاهچه‌های باززایی شده به گلدان انجام نشد.

نتایج

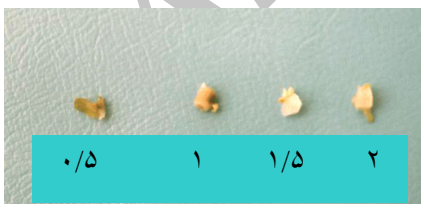
نتایج مربوط به کالزایی در تیمارهای هورمونی مختلف

تولید کالوس یک هفته بعد از کشت در انکوباتور صورت گرفت. در محیط کشت بدون هورمون (شاهد) کالوس‌هایی به‌رنگ سبز و دارای بافتی گرانولار ایجاد شدند (شکل ۱).



شکل ۱. کالزایی در محیط کشت پایه MS فاقد هورمون

در تیمارهای دارای مقادیر مختلف 2,4-D (بدون کینتین)، کالوس‌هایی به‌رنگ کرم و دارای بافتی نرم ایجاد شدند که حتی با انتقال به نور سبز نشدند (شکل۲). بیشینهٔ وزن تر و خشک کالوس در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ایجاد شد (شکل‌های ۳ و ۴).

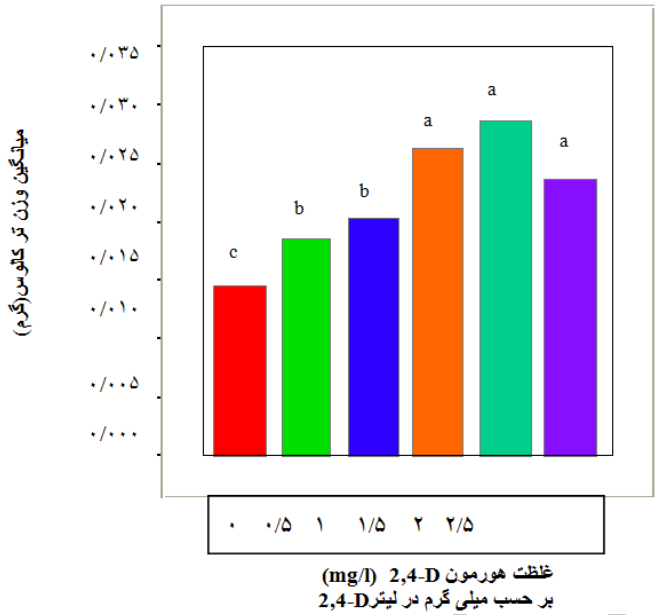


شکل۲. تولید کالوس در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D (فاقد کینتین)

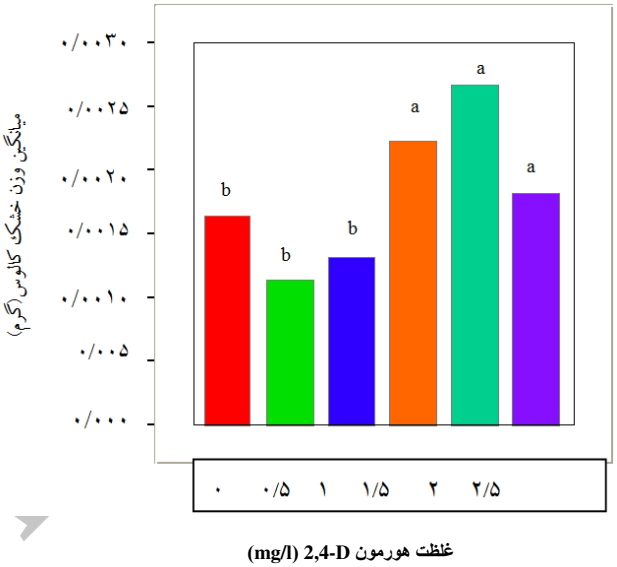
در محیط کشت های دارای کینتین و 2,4-D (توأم) نیز کال هایی سبزرنگ و گرانولار ایجاد شدند (شکل۴).

در محیط‌های کشت دارای مقادیر مختلف کینتین (فاقد 2,4-D) کالوس‌هایی به رنگ سبز و دارای بافتی گرانولار، ایجاد شدند (شکل۵).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۳. نمودار تغییرات میانگین وزن تر کالوس ایجاد شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D (حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار آماری است (α=۰/۰۵))

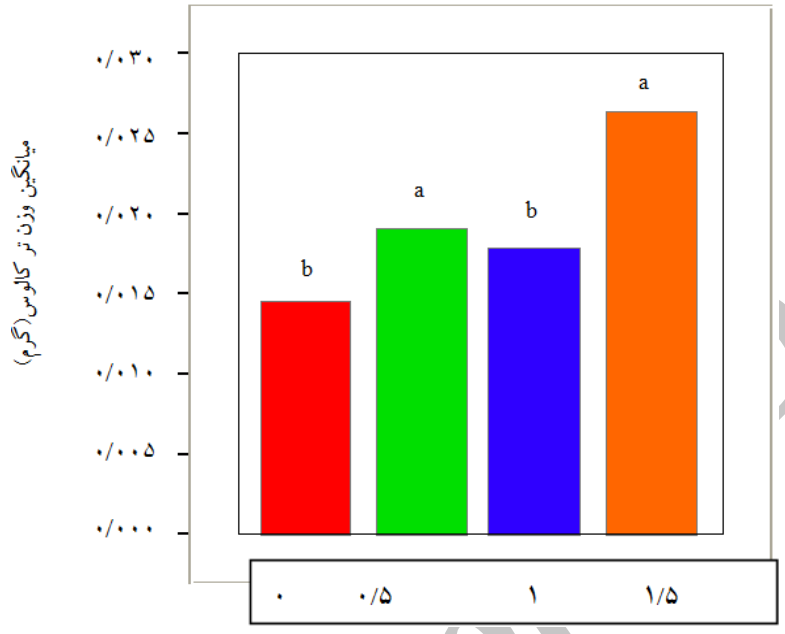


شکل۴. نمودار تغییرات میانگین وزن خشک کالوس ایجاد شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D (حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار آماری است (α=۰/۰۵))

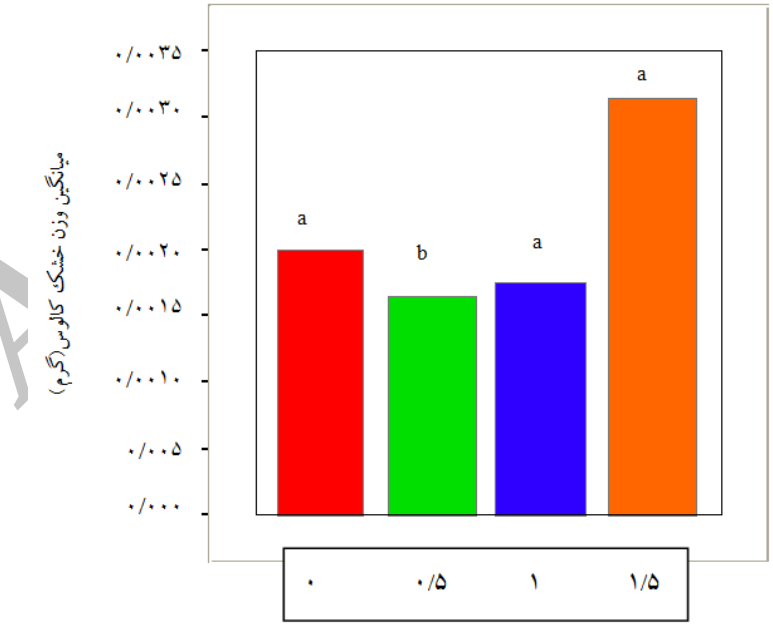
شکل۵. تولید کالوس در محیط کشت پایه MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین

www.SID.ir

در محیط کشت دارای غلظت‌های مختلف کینتین (فاقد 2,4-D)، بیش‌ترین وزن خشک و تر کالوس در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر این هورمون مشاهده شد (شکل‌های ۶ و ۷).

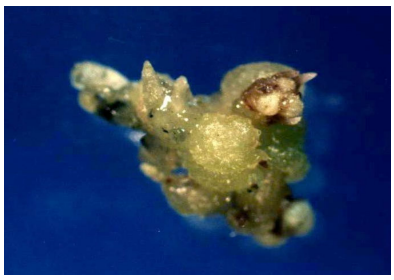


شکل۶. نمودارتغییرات میانگین وزن تر کالوس ایجاد شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف هورمون کینتین (حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار آماری است (α=۰/۰۵))



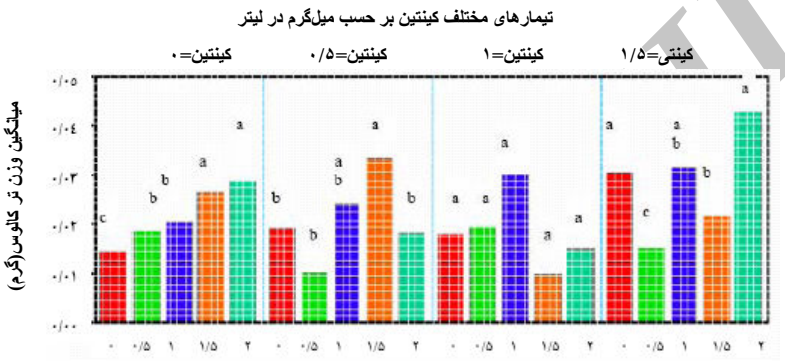
شکل۷. نمودار تغییرات میانگین وزن خشک کالوس ایجاد شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف کینتین (حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار آماری است (α=۰/۰۵))

www.SID.ir

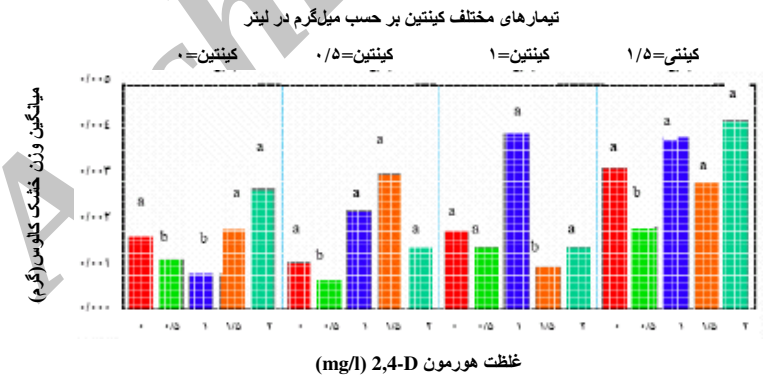


شکل۸. تولید کالوس در محیط کشت پایه MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

در محیط‌های کشت دارای هر دو هورمون حداکثر وزن تر و خشک کالوس در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر2,4-D و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین مشاهده شد (شکل های ۹ و ۱۰).



شکل ۹. نمودار تغییرات میانگین وزن تر کالوس‌های ایجاد شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت های مختلف 2,4-D و کینتین (حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معني دار آماري است (α=۰/۰۵))

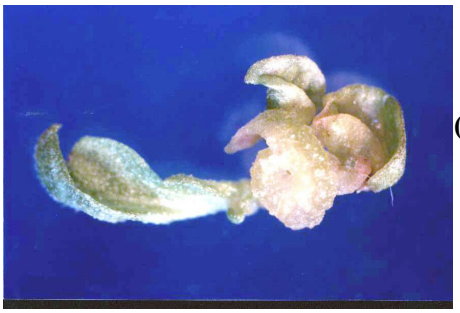


شکل۱۰. نمودار تغییرات میانگین وزن خشک کالوس‌های ایجاد شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف 2,4-D و کینتین (حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معني دار آماري است (α=۰/۰۵)).

نتایج مربوط به اندامزایی در تیمارهای مختلف هورمونی

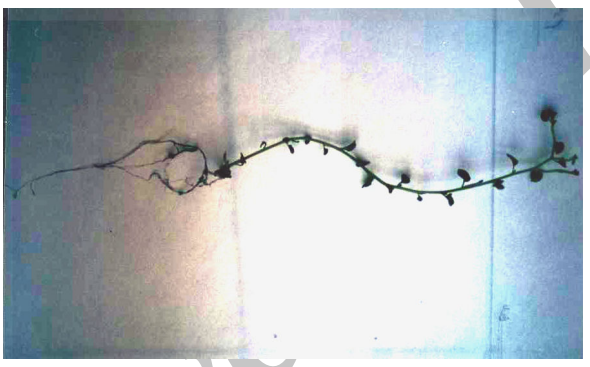
در محیط بدون هورمون (شاهد)، باززایی بخش هوایی (ساقه‌زایی) انجام شد، ولی ریشه‌زایی صورت نگرفت (شکل۱۱).

www.SID.ir

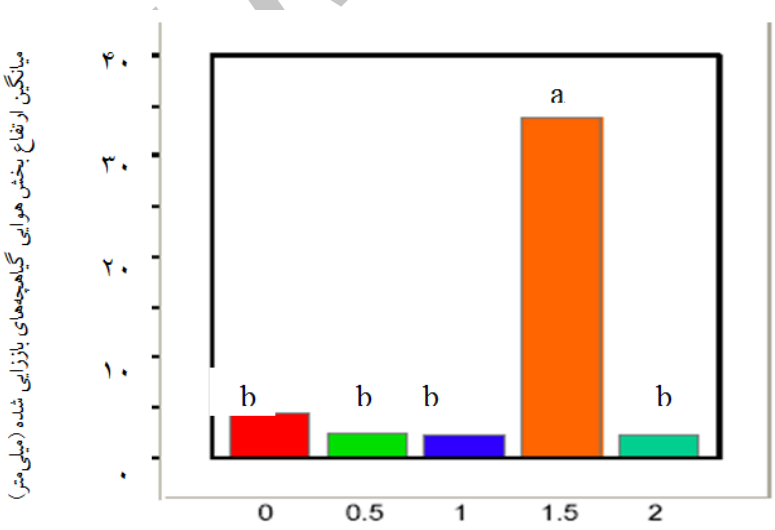


شکل۱۱. باززایی بخش هوایی در محیط کشت شاهد (فاقد هورمون)

در محیط کشت دارای مقادیر مختلف 2,4-D (فاقد کینتین)، ارتفاع بخش هوایی، تعداد برگ‌ها، طول و تعداد ریشه‌های باززایی شده در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون به‌طور چشمگیر و معنی‌داری بیش‌تر از شاهد و سایر تیمارها بود (شکل‌های ۱۲ تا ۱۶).

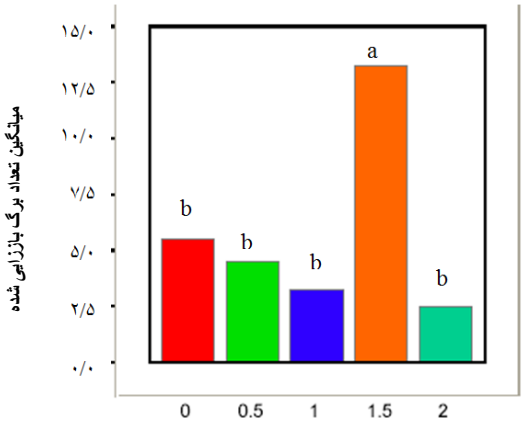


شکل۱۲. اندام‌زایی در محیط کشت پایه MS دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

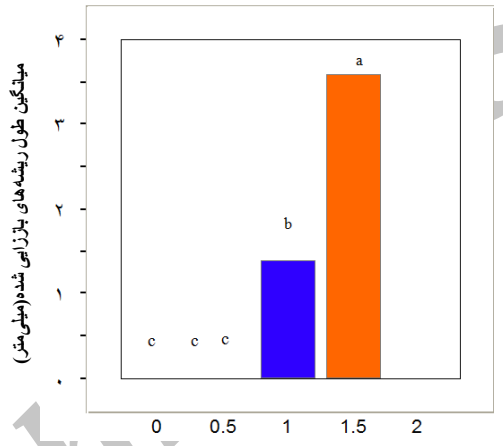


شکل ۱۳. نمودار تغییرات میانگین طول بخش هوایی باززایی شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف 2,4-D (حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی آماری است (α=۰/۰۵))

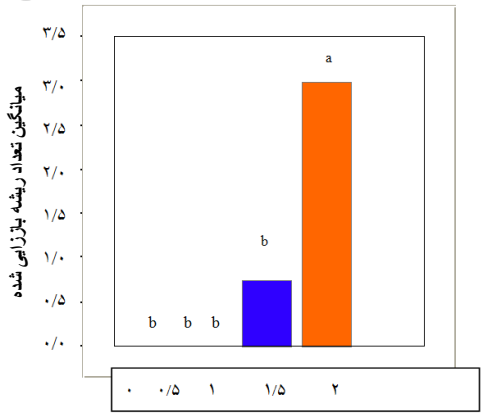
www.SID.ir



شکل۱۴. نمودار تغییرات میانگین تعداد برگ‌های باززایی شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف 2,4-D (حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار آماری است (α=۰/۰۵))



شکل۱۵. تغییرات میانگین طول ریشه‌های باززایی شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف 2,4-D (حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار آماری است (α=۰/۰۵))

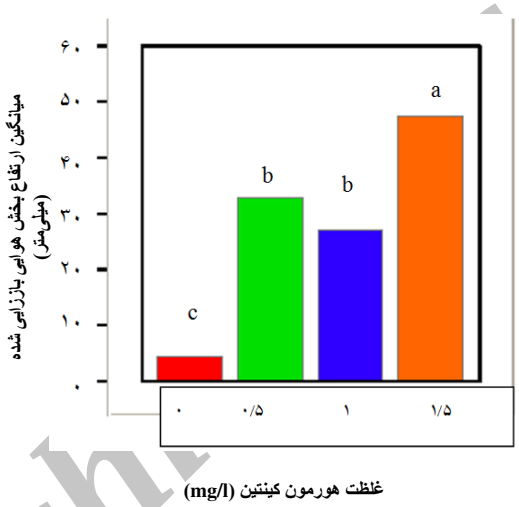


شکل۱۶. تغییرات میانگین تعداد ریشه‌های باززایی شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D (حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار آماری است (α=۰/۰۵))

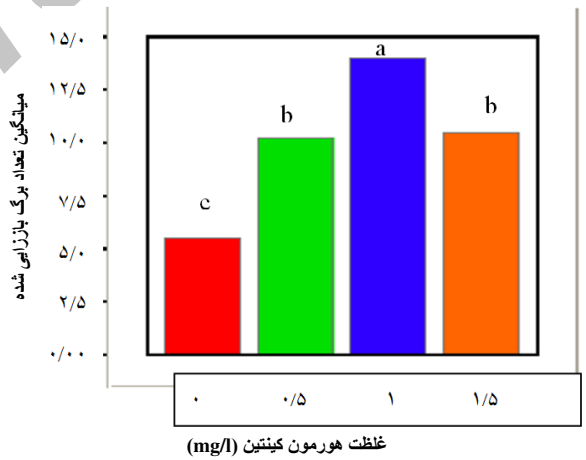
Archive of SID
www.SID.ir

در محیط کشت حاوی کینتین (فاقد 2,4-D)، بیشترین ارتفاع بخش هوایی در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و بیشترین تعداد برگ در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر این هورمون تشکیل شد (شکل های۱۷، ۱۸ و ۱۹). بیشینهٔ طول و تعداد ریشهٔ باززایی شده، در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین مشاهده شد (شکل‌های۲۰ و ۲۱).

شکل۱۷. باززایی بخش هوایی در کالوس حاصل از کشت مریستم سیب‌زمینی در محیط کشت پایه MS دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

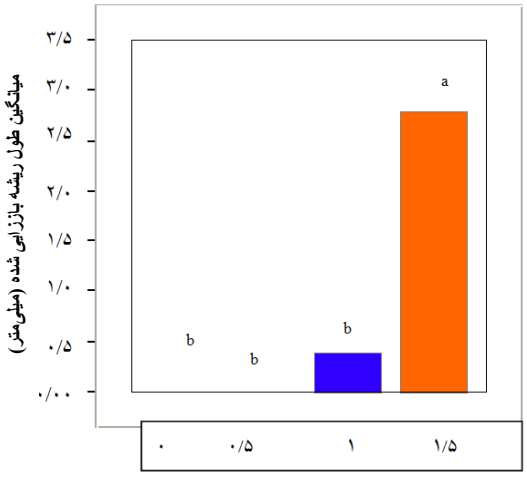


شکل۱۸. نمودار تغییرات میانگین ارتفاع بخش هوایی گیاهچه‌های باززایی شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف کینتین ((حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار آماری است (α=۰/۰۵))

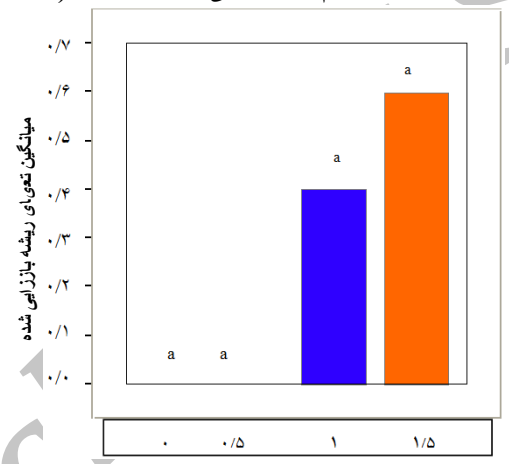


شکل۱۹. نمودار تغییرات میانگین تعداد برگ‌های باززایی شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف کینتین (حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار آماری است(α=۰/۰۵))

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۲۰. نمودار تغییرات میانگین طول ریشه‌های باززایی شده در محیط کشت MS دارای غلظت‌های مختلف کینتین (حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار آماری است (α=۰/۰۵))

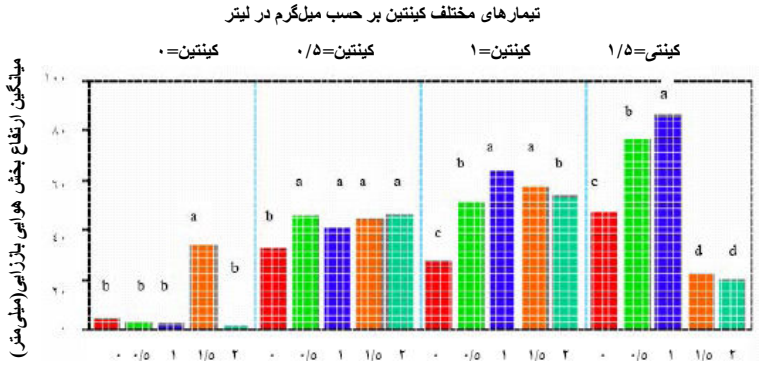


شکل۲۱. نمودار تغییرات میانگین تعداد ریشه‌های باززایی شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف هورمون کینتین (حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار آماری است (α=۰/۰۵))

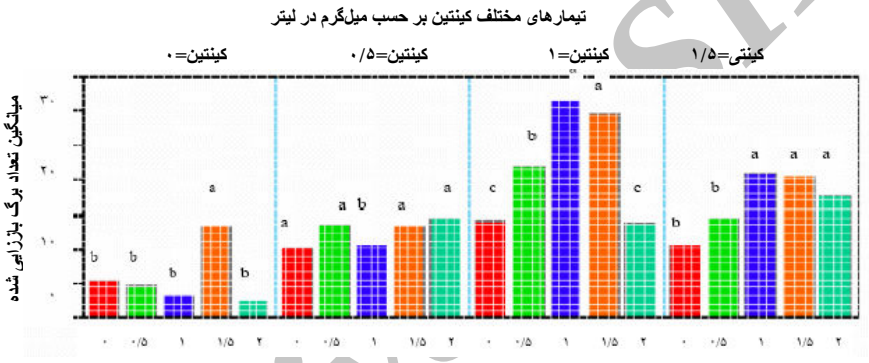
در محیط کشت دارای هر دو هورمون 2,4-D و کینتین، بیشترین ارتفاع بخش هوایی در محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین مشاهده شد. بیشترین تعداد برگ تشکیل شده در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین مشاهده شد (شکل های ۲۲، ۲۳ و ۲۴). بیشترین تعداد ریشه و طویل‌ترین ریشه در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین مشاهده شد (شکل‌های۲۵ و ۲۶).

شکل۲۲. باززایی گیاهچه در محیط کشت پایه MS دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

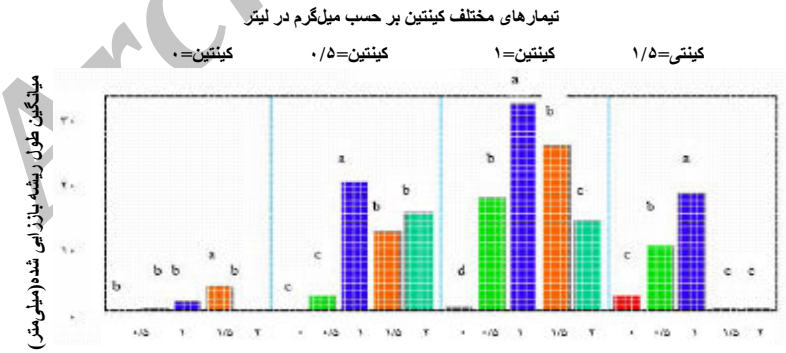
www.SID.ir



شکل ۲۳. نمودار تغییرات میانگین ارتفاع بخش هوایی باززایی شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف 2,4-D و کینتین (حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار آماری است (α=۰/۰۵))

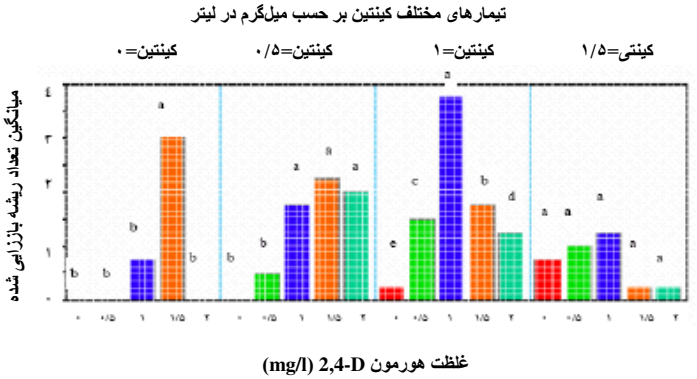


شکل۲۴. نمودار تغییرات میانگین تعداد برگ‌های باززایی شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف 2,4-D و کینتین (حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار آماری است(α=۰/۰۵))



شکل۲۵. نمودار تغییرات میانگین طول ریشه‌های باززایی شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف 2,4-D و کینتین (حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار آماری است (α=۰/۰۵))

www.SID.ir



شکل۲۶. نمودار تغییرات میانگین تعداد ریشه‌های باززایی شده در محیط کشت پایه MS دارای غلظت‌های مختلف 2,4-D و کینتین (حروف مشابه نشان‌دهندهٔ عدم تفاوت معنی‌دار آماری است (α=۰/۰۵)).

جدول۱. بررسی زمان لازم برای تولید کالوس و اندام و ویژگی‌های کالوس ایجاد شده در مریستم سیب‌زمینی در تیمارهای مختلف هورمونی

کینتین بر حسب میلی گرم در لیتر	2,4-D بر حسب میلی گرم در لیتر	زمان شروع کال زایی	رنگ و بافت کالوس	زمان آغاز اندامزایی
۰	۰	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته چهارم
۰	۰/۵	هفته اول	کرم و ترم	هفته پنجم
۰	۱	هفته اول	کرم و ترم	هفته پنجم
۰	۱/۵	هفته اول	کرم و ترم	هفته پنجم
۰	۲	هفته اول	کرم و ترم	هفته پنجم
۰/۵	۰	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته ششم
۰/۵	۰/ ۵	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته چهارم
/۵	۱	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته چهارم
۰/۵	۱/۵	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته چهارم
۰/۵	۲	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته چهارم
۱	۰	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته چهارم
۱	۰/۵	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته چهارم
۱	۱	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته چهارم
۱	۱/۵	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته چهارم
۱	۲	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته چهارم
۱/۵	۰	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته چهارم
۱/۵	۰/۵	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته چهارم
۱/۵	۱	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته چهارم
۱/۵	۱/۵	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته چهارم
۱/۵	۲	هفته دوم	سبز گرانولار	هفته سوم

www.SID.ir

بحث

کشت مریستم به طور موفقیت‌آمیزی در سیب‌زمینی (*Solanum tubrossum* L.) برای ایجاد گیاهان عاری از عوامل بیماری زا به کار گرفته شده است [۳۱]، [۲۱]، [۲۶].

طبق جدول ۱، در تیمارهای مختلف 2,4-D (فاقد کینتین)، برای تولید کالوس، زمان کم‌تری مورد نیاز بود (یک هفته). در این تیمارها اندام‌زایی در مدت زمان طولانی تری روی داد (هفتهٔ پنجم تا ششم). به‌طور کلی مشخص شده است که در مریستم سیب‌زمینی تولید کالوس تقریباً بعد از گذشت دو هفته و اندام‌زایی بعد ازگذشت چهار هفته از کشت، آغاز می گردد [۳۳].

هاکو[۱] (۲۰۱۰)، در بررسی باززایی گیاهچه از کشت جوانه‌های روی غدهٔ سیب‌زمینی مشاهده کرد که در محیط کشت MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA گیاهچه‌ها در کم‌ترین زمان (سه هفته بعد از کشت) باززایی شدند [۲۷].

در این بررسی مشاهده شد که 2,4-D در محیط کشت بدون کینتین، اثر معنی‌داری بر افزایش وزن تر و خشک کالوس‌ها داشته است. حداکثر وزن خشک و تر کالوس در محیط کشت حاوی 2,4-D (فاقد کینتین) در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. این نتایج با نتایج به‌دست آمده به‌وسیلهٔ خاتون و باری[۲] (۲۰۰۳)، مطابقت دارد. این دانشمندان نیز در کشت قطعات گرهی سیب‌زمینی حداکثر تولید کالوس را در این غلظت هورمونی مشاهده کردند [۳۵]. دودیتس و همکاران (۱۹۹۷) بیشینهٔ تولید کالوس را در جداکشت‌های مریستمی سیب‌زمینی در تیمار دارای ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D گزارش کردند [۱۵]. 2,4-D یکی از هورمون‌های گیاهی بسیار مؤثر در تولید کالوس است [۱۰]. مشخص شده است که 2,4-D هم به‌عنوان يك اکسین عمل می‌کند و هم متابولسیم اکسین درون‌زا (IAA) را درسلول‌های هویج تحت تأثیر قرارمی‌دهد. در پروتوپلاست‌های یونجه نیز IAA درون‌زا (هم به‌فرم آزاد و هم به‌فرم همیوغ) در پاسخ به 2,4-D افزایش می‌یابد [۴۸]. اکسین یکی از هورمون‌های گیاهی است که برای فعال‌سازی تقسیم سلولی در سلول‌های گیاهی تمایزیافته هم در *شبشه* و هم در زیوه نیاز است [۳۹]. اکسین در تنظیم مرحلهٔ رونویسی ژن‌ها عمل خود را اعمال می‌کند. یکی ازاهداف احتمالی عمل اکسین از این لحاظ القای بیان ژن cdc_2 است که پروتئین کیناز کلیدی و مهم در سیکل سلولی را به رمز درمی‌آورد، نشان داده شده است که در پروتوپلاست‌های سلول‌های برگ یونجه اکسین به تنهایی می‌تواند موجب انباشتگی این پروتیئن گردد، ولی برای فعال‌سازی این کیناز حضور سیتوکینین هم ضروری است [۴۸]. بنا بر این با افزایش غلظت 2,4-D در محیط کشت، افزایش تقسیمات سلولی در سطح زخمی جداکشت و در نتیجه افزایش وزن تر و خشك کالوس مورد انتظار خواهد بود. تاثیر مثبت 2,4-D در القا و رشد کالوس دارای یک حد آستانه است و پس از این حد، افزایش غلظت این هورمون در محیط کشت اثر بازدارندگی در میزان تقسیم سلولی خواهد داشت و

۱. Hoquei ۲. Khatun & Bari

Archive of SID

www.SID.ir

در نتیجه موجب کاهش وزن تر و خشک کالوس خواهد شد. چنان‌که از نتایج این بررسی برمی‌آید، افزودن 2,4-D به محیط کشت تا غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر اثر تقویت کننده و بیش از آن (در ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D)، اثر ممانعت‌کننده در افزایش وزن تر و خشک کالوس داشته است.

با افزودن کینتین به محیط کشت‌های دارای 2,4-D، وزن تر و به‌خصوص وزن خشک کالوس‌ها افزایش یافت. حداکثر این افزایش در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. در تکثیر آزمایشگاهی (*Solarium laciniatum*) از طریق کشت مریستم‌های رأسی نیز حداکثر تولید کالوس در محیط MS دارای BAP (10^{-5}مولار) و NAA (10^{-6}مولار) مشاهده شد [۹]. سیتوکینین هم مانند اکسین به‌عنوان عنصری دخیل در سیکل سلولی شناخته شده است [۴]. وجود ترکیبی از این دو هورمون برای انجام تقسیمات سلولی در سطوح زخمی جداکشت‌ها در محیط‌های کشت ضروری است. سیتوکینین برای فرایندهایی لازم است که بعد از تکمیل همانندسازی DNA و قبل از آغاز میتوز انجام می‌گیرد [۴۲]. این فرایند ممکن است تولید پروتئین‌هایی باشد که برای تقسیم سلول لازم هستند و یا پروتئین‌هایی که در چرخهٔ میتوزی دخالت دارند. در واقع تشکیل پروتئین‌های مختلف هنگام افزودن سیتوکینین ملاحظه شده است. این امر حتی وقتی از ساخته شدن mRNA جدید در اثر مواد بازدارنده جلوگیری شود، اتفاق می‌افتد. بنا بر این احتمال دارد که سیتوکینین‌ها mRNAهای از پیش ساخته شده‌ای را کنترل کنند که عمل‌شان برای تقسیم سلولی اختصاصی است. سیتوکینین‌ها شبیه اجزای ساختمانی اسیدهای نوکلئیک هستند و احتمالاً در پیوند دادن tRNA به ریبوزوم طی ساخته شدن پروتئین‌ها دخالت دارند [۴]. بنا بر این با توجه به این اثرات هورمونی می‌توان انتظار داشت که ترکیبی از اکسین و سیتوکینین در محیط کشت منجر به افزایش بیش‌تر تقسیمات سلولی در سطح زخمی جداکشت و افزایش وزن تر و خشك کالوس گردد [۴۳].

از طرف دیگر مشخص شده است که 2,4-D از سنتز کلروفیل و تولید پروتوکلروفیلید a در برگ‌های ۶ تا ۸ روزهٔ جو ممانعت می‌کند. اثرات مشابهی نیز در مورد کلرامفنیکل گزارش شده است. نتایج کار دانشمندان مشخص کرده است که 2,4-D ممکن است مشابه کلرامفنیکل از طریق سنتز یک پروتئین پلاستیدی بازدارنده عمل کند. به‌نظر می‌رسد که این پروتئین از عمل آنزیم‌های مورد نیاز برای سنتز دلتاآمینولوولینیک‌اسید (پیش‌ساز بیوسنتز کلروفیل در کلروپلاست)، جلوگیری می‌کند [۳۷]. در پژوهش حاضر ایجاد کالوس‌های کرم رنگ در تیمارهای مختلف هورمون 2,4-D که حتی پس از ورود به نور سبز نمی‌شوند، می‌تواند با این نحوه اثر هورمون قابل توضیح باشد. در این مورد نتایج مشابهی توسط خاتون و باری (۲۰۰۳) به‌دست آمده است [۳۵].

سلول‌های بافت کالوس خاصیت پرتوانی دارند و می‌توانند در محیط کشت مناسب (حتی بدون کاربرد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی) به انواع سلول‌ها و بافت‌های گیاهی متمایز شوند [۲]. در پژوهش حاضر هم در محیط کشت شاهد (بدون هورمون) بخش هوایی باززایی شد ولی ریشه‌زایی صورت نگرفت. در برخی دیگر از تحقیقات انجام شده نیز نشان داده شده است که در جداکشت‌های گرهی برخی از انواع سیب‌زمینی بدون استفاده

Archive of SID
www.SID.ir

از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، ممکن است ریشه تشکیل شود ولی در این حالت ویژگی‌های ریشه نسبت به ریشه‌هایی که با افزودن هورمون‌های گیاهی به محیط کشت باززایی می‌شوند، ضعیف‌تر است [۹]، [۲۶]. کومار[۱] و همکاران (۲۰۰۷) در کشت بافت مریستم توت‌فرنگی برای باززایی گیاهچه‌های عاری از ویروس مشاهده کردند که در محیط کشت MS مایع بدون هورمون بخش‌های هوایی نازکی تکامل پیدا کردند ولی ریشه‌ها در محیط کشت MS نیمه‌جامد دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۱ میلی‌گرم در لیتر GA_3[۲] باززایی شدند [۱۱]. نشان داده شده است که مقادیر پایین کینتین برای آغاز ریشه‌زایی لازم است. این مقادیر اندک ممکن است در سلول‌های جداکشت موجود باشند، در حالی‌که مقادیر بالای این هورمون ممکن است بازدارندهٔ ریشه‌زایی باشند [۴۵].

در محیط کشت دارای 2,4-D (فاقد کینتین)، حداکثر اندام‌زایی (ارتفاع بخش هوایی، تولید برگ، تعداد و طول ریشه) در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر این هورمون اتفاق افتاد، در حالی که در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر این هورمون کم‌ترین اندام‌زایی صورت گرفت (شکل های ۱۳ تا ۱۶). احتمالاً این مشاهدات نقش مقادیر بالای 2,4-D در مهار اندام‌زایی گیاهان را تأیید می‌کند [۴]، [۴۲].

در محیط‌های کشت دارای هر دو هورمون (کینتین و 2,4,D)، در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین، اندام‌زایی در کوتاه‌ترین زمان ممکن ایجاد شد (جدول ۱) ولی در مراحل بعدی رشد اندام‌ها کند شد که نشان می‌دهد این تیمار برای آغاز اندام‌زایی مناسب است، ولی در ادامهٔ مسیر رشد تأثیر زیادی ندارد. دانشمندان دیگر هم برای القای باززایی بخش هوایی در کشت بافت سیب‌زمینی از ترکیب هورمون‌های BA+NAA+Kin استفاده کرده‌اند [۲۱]. جامی معینی[۳] و همکاران (۲۰۱۱) در کشت تک‌گره‌های سیب‌زمینی مشاهده کردند که ترکیب NAA (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) و GA_3 (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) برای تکامل و باززایی گیاهچه‌ها بسیار مؤثر است [۲۸]. این یافته‌ها با نتایج تحقیقات شجاعی[۴] و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد [۴۹].

در این بررسی حداکثر ارتفاع بخش هوایی درمحیط کشت دارای ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4,D و بیش‌ترین تعداد برگ‌ها در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۱ میلی‌گرم درلیتر2, 4, D ایجاد شدند. در کشت مریستم جانبی ژئودرم ارغوانی[۵] (R.B.R.) بیش‌ترین ارتفاع بخش هوایی در ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA تشکیل شد [۷]. در تحقیق دیگری در کشت قطعات گرهی و بین گرهی سیب‌زمینی بیشینهٔ تشکیل بخش هوایی در ۳ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد [۳۶]. الووایا[۶] (۱۹۸۲) در کشت مریستم سیب‌زمینی بیشینهٔ باززایی گیاهچه را در ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر زآتین[۷] مشاهده کرد [۱۳]. در تحقیقات شاه‌زمان[۸] و همکاران (۲۰۰۱) بیشینهٔ تعداد برگ در مریستم سیب‌زمینی در ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP تشکیل شد [۳۱].

۱. Kumar ۲. Gibberellic acid ۳.Jami Moeini ۴. Shojaei
۵. *Geoderum purpureum* J. ۶. Alhowaria ۷. Zeatin ۸. Shahzaman

Archive of SID

www.SID.ir

این نتایج نشان می‌دهند که نسبت بالای سیتوکینین به اکسین برای تشکیل بخش هوایی مناسب است. هم‌چنین به منظور افزایش طول بخش هوایی در مقایسه با ایجاد برگ‌ها نیاز به سیتوکینین بیش‌تری است (درست مشابه رها شدن جوانهٔ جانبی از خفتگی در اثر افزایش میزان سیتوکینین در آن) [۴]، [۶].

در این تحقیق مشخص شد که تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (فاقد کینتین) از نظر القای ریشه‌زایی بسیار مؤثر است، ولی از نظر رشد ریشه‌های ایجاد شده اثر کم‌تری دارد. به‌طور کلی از اکسین به‌عنوان القا کنندهٔ ریشه‌زایی در محیط‌های کشت استفاده می‌شود [۱۷]، [۱۰]. بنا بر این پیشنهاد می‌شود در تکنیک‌های کشت بافت از این تیمار به‌عنوان القاکنندهٔ ریشه‌زایی استفاده شود و به‌منظور حداکثر رشد ریشه‌ها تیمارهای هورمونی دیگری به کار گرفته شود.

موهاپترا[۱] و روت[۲] (۲۰۰۴) در کشت مریستم جانبی ژئودرم ارغوانی بیش‌ترین میزان تشکیل ریشه و رشد آن‌ها را در ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA مشاهده کردند [۷]. در بررسی حاضر بهترین محیط برای باززایی ریشه و رشد آن، محیط دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین (به‌صورت توأم) تعیین شد. چنان‌که در شکل‌های ۲۵ و ۲۶ مشاهده می‌شود، کینتین باعث تقویت اثر 2,4-D در ریشه‌زایی شده است. این نتایج با نتایج کارهای میژن[۳] (۱۹۸۸)[۲۱] و یاسمین[۴] و همکاران (۱۹۹۳) [۴۵] و یاسمین و اسمورو[۵] (۲۰۰۳) [۴۶] مطابقت دارد. مشخص شده است که اکسین و سیتوکینین علاوه بر افزایش تقسیمات سلولی در طویل شدن سلول‌های ریشه [۴۰]، [۲۴]، [۲۹] و تسریع روند تمایز بافت‌های آوندی و تشکیل کامبیوم آوندی در ریشه نقش دارند و از این طریق به رشد ریشه کمک می‌کنند [۲۳]، [۲۲].

به‌طور کلی از تحقیقات دانشمندان چنین برمی‌آید که بر اساس نوع گونهٔ گیاهی، نوع هورمون استفاده شده در محیط کشت، مرحلهٔ نموی گیاه مادری و نوع جداکشت غلظت مناسب هورمون برای القای کالوس در جداکشت‌ها و باززایی گیاهچه از این کالوس‌ها متفاوت خواهد بود. بنا بر این با توجه به هدف مورد نظر در عملیات کشت بافت و نوع جداکشت استفاده شده، باید از تیمار هورمونی مناسب استفاده کرد [۵۲]، [۳۲].

منابع

۱. ا. بهداد، *بیماری‌های گیاهان زراعی ایران*، چاپخانه نشاط اصفهان (۱۳۵۹) ۲۵۰ صفحه.

۲. آر. ال. ام پیریك، *مبانی کشت بافت های گیاهی*، ترجمهٔ عبدالرضا باقری و مهری صفاری، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد (۱۳۷۶) ۳۰۰صفحه.

۳. ا. قهرمان، *کورموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی)*، مرکز نشر دانشگاهی تهران (۱۳۷۳) ۲۸۰صفحه.

---

۱. Mohaptra ۲. Rout ۳. Mission ۴. Yasmin ۵. Smooro

Archive of SID
www.SID.ir

۴. ت. س. مور، *بیوشیمی و فیزیولوژی هورمون‌های گیاهی*، ترجمهٔ مهرداد لاهوتی، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد (۱۳۸۲) ۳۵۹ صفحه.

5. A. Ghaffoor, G. BahraShah, K. Waseem, "Invitro response of potato (Solanum tuberosum L.) to various growth regulators", Biotechnology, 2 (2000) 191-197.
6. A. Iftektekhar, A. Sh. Shamima, M. Anisuzzaman, M. F. Alam, "Effect of growth regulators on meristem culture and plantlet stablishment in sweet potato (ipomea batatas(L.)Lam)", Plant omics journal, 3(2010) 35-39.
7. A. Mohaptra, G. R. Rout, "Effect of cytokinin and auxin on micropropaga tion of Geoderum purpureum R. Br.", Journal of Applied Horticulture, 6 (2004) 27-29.
8. A. Nagib, S. A. Hossain, M. F. Alam, M. M. Hossaini, R. Islam, R. Saltana, "Virus free potato tuber seed production through meristem culture in tropical Asia", Journal of Plant Science, 2 (2003) 616-622.
9. A. J. Conner, "Tissue culture of Solarium laciniatum", New Zeland Jounal of Botany, 20 (1982) 1-6.
10. B. C. Jarvis, S. Yasmin, "Plant growth regulators and adventitious root development in relation to auxin", Biol. Pl. 29 (1987) 189-198.
11. B. Kumar, M. Hossain, R. Islam, "Virus free plantlets production of strawberry through meristem culture", World Journal of Agricultural Science, 3 (2007) 757-763.
12. B. Malaurie, O. Pungu and M. F. Trouslot, "Effect of growth regulators concentrations on morphological development of meristem-tips Dioscorea cayensis-D.rotundata complex and D. prahensilis", Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 41 (1995) 229-235.
13. B. S. Alhowaria, "Plant regeneration from callus culture in potato", Euphitica, 31 (1982) 755-759
14. C. N. Paet, A. B. Zamora, "Efficiency of thermotherapy and group culture of isolated potato meristems for the elimination of infections of PLRV, PVY and PVS", Philipine Journal Of Crop Science, 15 (1990) 113-118.
15. D. Dudits, L. Bogre, L. Gyroyey, "Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells in vitro", J. Cell Sci. 99 (1997) 475-484.

Archive of SID
www.SID.ir

16. D. Jones, J. Hyman, M. Tumeseit, P. Smith, M. C. M. Perombelon, "Blacfkleg potentioal of potato seed determination of tuber contamination by Erwinia carotovora subsp", artroceptica by immunoflourescence cloning staning and stock and tuber sampling, Annuals of Applied Biology, 124 (1994) 557-568.

17. D. J. Batten, P. B. Goodwin, "Interaction of gibbrellic acid and indol-3-acetic acid on root formation In pea (Pisum Sativum L.) Epicotyle Cutting", Planta, 143 (1978) 331-332.

18. D. Q. Binh, L.E. Heszky , G. Gyulai , E. Kiss, A. Csillag,. "Plant regeneration from callus culture of Puccinella distance (L.) Parl.", Plant Cell , Tissue and Organ Culture, 18 (1989) 195-200.

19. E. A. Fik, T. M. N. El-Din, A. M. M. Mandy, A. S. Ali, "Elimination of potato virus X and comprison of microtuber productivity of some infected potatoes in vitro", Ann. Agri. Sci. 30 (1992) 195-209.

20. F. A. Ahmad, M. Sh. Haque, H. Banu, M. M. Rahman, A. K. A. F. Aruquzzaman, "Novel micropropagation system, online Journal of Biological Science", 1 (2001) 1106-1111.

21. F. Shirin, M. Hossain, M. F. Kabir, M. Roy and S. R. Sarker, "Callus induction and plant regeneration from internodal and leaf explant of four potato cultivar", World Journal of Agricultural Science, 3 (2007) 1-6.

22. G. R Rout, S. Samantary, "In vitro manipulation and propagation of medicinal plants", Biotechnol. Adv., 18 (2000) 91-120.

23. G. T. John, S. L. Loomis, "Auxin- cytokinin control of vascular tissue formation in isolated roots of Raphanus", American Journal of Botany, 54 (1976) 1098-1106.

24. I. Hossain, A. Muhammad, Z. Chaudhry, R. Asghar, S. M. Saqlan Naqvi, H. Rashid, "Morphogenic potential of three potato (Solanum tuberosum L.) cultivars from divers explants", a perequisite for genetic manipulation, Pakistan J. Bot. , 37 (2005) 889-898.

25. J. P. Mission, "Multiplication in Thuja plicate by in vitro culture of juvenile and aged tissues", Canadian Journal Research, 18 (1988) 473-477.

26. M. H. Eddriss, M. A. Badawy, S. Fathi, T. Elbar, "Propagation of potato using tissue culture techniques", Acta Horticulturae, 1 (2006) 434-438.

27. M. E. Hoque, "Invitro regeneration potentiality of potato under different hormonal condition", World Journal of Agricultural Sciences, 6 (2010) 660-663.

Archive of SID

www.SID.ir

28. M. Jami Moeini, M. Armin, M. R. Asgharipour, S. Karimi Yazdi, "Effects of different plant growth regulators and potting mixes on micropropagation minituberization of potato plantlets", Advands in Evironmental Biology, 5 (2011) 631-638.
29. M. R. Karim, "Seed potato production an tissue culture technology in Bangladesh", Seminar in Seed potato production and tissue culture technology in Bangladesh, 29 June,(2009).
30. M. Mangal, S.V. Bhardwaj, D. R. Sharma, R. Kaur, A. Mangal, "Use of meristem tip culture to eliminate virus from carnation plants", Indian J. Exp. Biol. 40 (2000) 119-122.
31. M. Shahzaman, A. Qurashi, G. H. Raziuddin, A. khabir, N. Gul, "Meristem culture of potato (Solanum tuberosum L.) For production of virus free plantlets", Journal of Biological Science, 1 (2002) 898 -899.
32. M. Tapia, "Effect of light on callus induction", Agro Cienecia, 12 (1996) 149-154.
33. M. A. Anjum, A. Hhakoomat, "Effect of culture medium on direct organogenesis from different explants of various potato genotype", Biotechnology, 3 (2004) 187-193.
34. N. Kaya, "A study of the alkaloids in callusing plant tissues from a range of Turkish cultivars of Papaver Somniferum", Th. J. of Agriculture and Forestry, 23 (1999) 377-381.
35. N. Khatun, M. A. Bari, R. Islam, S. Huda, N. A. Siddique, M. H. Rahman, M. U. Mollah, "Callus induction and plant regeneration from nodal segment of potato cultivar Diamandt", Journal of Biological Science, 3 (2003) 1101-1106.
36. N. Shamima, M. Monzur Hossain, A. Khatun, M. Firozalam, R. Karim, "Mondal Induction and evaluation of somaclonal variation in potato (solanum tuberosum L.)", Journal of Biological Science, 3 (2003) 183-190.
37. P. R. Shewry, N. J. Pinfield, A. K. Stobart, "The effect of 2.4-dichlorophenoxyacetic acid and (2-chloroethyle)-trimethylammo chloride on chlorophyll synthesis in barley leaves", Planta, 101 (1971) 352-359.
38. P. Shakya, M. Panjit, A. Manandhar, S. D. Joshi, "Elimination of three viruses from potato cv. Cardinal by meristem culture", J. Inset. Agric. and Anim. Sci. 13 (1993) 89-93.
39. R. Kodou, Y. Fujime, N. Fukoda, K. Amimoto, "Effects of plant growth regulators and cold storage of bulb on callus formation of garlic", Tec. Bull. 47 (1995) 99-106.

Archive of SID
www.SID.ir

40. R. Ray, X. D. Wang, K. M. Nolan, B. G. Rolfe, "Root meristems in Medicago truncatula tissue culture arise from vascular-drived procambial-like cells in a process regulated by ethylene", Journal of Experimental Botany, 57 (2006) 2227-2235.

41. R. A. Conover, R. Wlitz, "Progress in breeding papayas with tolerance to papaya ring-spot virus", Proc. Fla . state Hort.soc., 21 (1978) 182-184.

42. R. L. Jarret, P. M. Hasegawa, H. T. Erickson, "Effect of medium component on shoot formation from cultured tuber discs of potato", J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105 (1980) 238-242.

43. S. Gurel, E. Gurel, Z. Kaya, "Callus development and indirect shoot regeneration from seedling explants of sugar beet (Beta vulgaris L.) cultured in vitro", Turk Bot. 25 (2000) 25-29.

44. S. Mederos-Molina, "Invitro propagation of Maytenus canariensis (Loes.) Kand.&Sund. From apical meristem culture", Plant Cell tissue and Organ Culture,12 (2000) 99-108.

45. S. Yasmin, B. Ahmed, R. Soomro, M. R. Aslam, "The influence of ethrel, ABA, and kinetin on adventitious root formation on mungbean hypocotyls and their interaction with IBA", Sci. Khyber, 6 (1993) 117-126.

46. S. Yasmin, R. Smooro, "Influence of ABA, gibberellin and kinetin on IAA induced adventitious root development on hypocotyls cutting of Mungbean", Biotechnology, 2 (2003) 37.

47. T. Murashig, F. Skooge, "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures", Phisiol. Plant. 15 (1962) 473-497.

48. T. Pasternak, P. Miscolzi, F. Ayaydin, T. Dudits, A. Feher, "Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-drived cells of alfalfa", Plant Growth Regul. 32 (2000) 129-141.

49. T. Roodbar Shojaei, N. A. Sepahvand, M. Omidi, H. R. Abdi, S. Mohajeri Naraghi, "The effect of plant growth regulators, cultivar ant substrate combination on production of viruss free potato minitubers", African Journal of Biotechnology, 8 (2009) 4864-4871.

50. V. A. Bapat, P. S. Roa, "Shoot apical meristem culture of Pharbitis nil", Plant Science Letters, 10 (1977) 327-334.

Archive of SID

www.SID.ir

51. V. Rosenberg, A. Tsakhna, K. Liiv, "Somaclonal variation in potato meristem cultureand possibility to use this phenomenon in seed potato production and breeding", Agronomy research, 8(2010) 697-704.

52. W. J. Stiekema, F. Heidekamp ,J. Louwerse, H. Verhoeven, P. Dijkhuis, "Introduction of foreign genes into potato cultivars Bintje and Desiree using an Agrobactrium tumifacience binary vector", Plant Cell Reports, 7 (1988) 47-50.

Archive of SID

www.SID.ir