

قسمتهای مختلف آزمایشگاه کشت بافت :

۱- اتاقک محل تهیه نمونه ها و محیطهای کشت

۲- اتاقک استریل و کشت نمونه های گیاهی

۳- اتاقک رشد نمونه های گیاهی

۴- گلخانه رشد و تولید مواد گیاهی

محیط کشت بافت گیاهی (محیط MS) :

این محیط شامل چند استک و مواد به شرح ذیل میباشد :

مقدار mg/l	نوع ماده	استک	مقدار mg/l	نوع ماده	استک
0.83	KI	D	1650	NH ₄ NO ₃	A
27.8	FeSO ₄ , 7H ₂ O	E	1900	KNO ₃	
37.3	Na ₂ EDTA		370	MgSO ₄ , 7H ₂ O	
0.5	Pyridoxin Hcl		170	KH ₂ PO ₄	
0.5	Thiamin Hcl	F	440	CaCl ₂ , 2H ₂ O	B
0.5	Nicotini acid		6.2	H ₃ BO ₃	C
100	Myo - Inositol		22.3	MnSO ₄ , 4H ₂ O	
1	Ascorbic acid		0.025	CoCl ₂ , 6H ₂ O	
			0.025	CuSO ₄ , 5H ₂ O	
30	Sucrose	جهت تأمین هیدراتهای کربن محیط کشت	8.6	ZNSO ₄ , 7H ₂ O	
6.7	Agar	جهت جامد کردن محیط کشت	0.25	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	

PH محیط کشت روی ۵/۷ تنظیم میگردد .

در هر ظرف شیشه ای از استکها ۴۰-۳۰ میلی لیتر ریخته میشود .

گاهی اوقات به عنوان مثال جهت ریشه زایی به محیط کشت هورمون نیز اضافه میشود .

بعد از آماده کردن استکها باید نمونه ها استریل شوند که از دستگاه اتوکلاو استفاده میشود .

استریلیزاسیون بافت گیاهی :

نکاتی که هنگام استریلیزاسیون بافت های گیاهی ضروری است:

- ۱- شستشوی با آب قبل از عملیات ضدعفونی
- ۲- قراردادن بافتها به مدت چند ثانیه در **الکل ۷۰٪** برای از بین بردن حبابهای هوا در سطح بافت .
- ۳- افزودن ماده **Tween-20** جهت کاهش کشش سطحی و امکان تماس بیشتر ماده دترژنت با سطح بافت .
- ۴- حرکت دادن بافت در داخل محلول ضدعفونی در طول عمل استریلیزاسیون و انجام عملیات استریلیزاسیون در خلاء تا از ایجاد حباب هوا جلوگیری شود .
- ۵- **هیپوکلریت سدیم NaClO** : این ماده جهت استریل کردن سطوح بافت گیاهی به کار می رود
هیپوکلریت سدیم ماده ای قوی بوده و معمولاً به مقادیر **۱-۲/۵ درصد** استفاده می شود .
- ۶- **هیپوکلریت کلسیم Ca(ClO)₂** : این ماده نیز جهت استریل کردن سطوح بافت گیاهی استفاده میشود ، کمتر از هیپوکلریت سدیم در بافت نفوذ می کند و به مدت طولانی قابل نگهداری نیست .
هیپوکلریت کلسیم معمولاً به مقادیر **۱۰-۳/۵ درصد** به کار می رود .
- ۷- **کلرومرکوریک HgCl₂** : به وسیله این ماده سطوح بافت گیاهی را ضدعفونی می نمایند
کلرومرکوریک ماده ای بسیار سمی بوده و هنگام کار با آن باید دقت شود . میزان استفاده آن معمولاً **۰/۰۵-۰/۰۱ درصد** می باشد .



تعریف کشت بافت گیاهی :

کشت بافت گیاهی یک نام اختصاری برای **کشت پروتوپلاست** Protoplast culture و **کشت بافت** Tissue culture ، **کشت سلول** Cell culture ، **کشت اندام گیاه** Organ culture میباشد . این انواع مختلف کشت به عنوان یک عامل عمومی ، شامل رشد

مواد گیاهی عاری از میکروب در یک محیط گندزدایی شده ، مانند محیط کشت غذایی ضدعفونی شده درون لوله آزمایش میباشد . در سالهای اخیر روشهای کشت بافت گیاهی به یک ابزار بسیار قوی برای تکثیر و به نژادی بسیاری از گونه‌های گیاهی تبدیل شده است .

کشت بافت مبتنی بر سه توانایی اصلی گیاه می‌باشد :

۱- توانمندی Totipotency :

قابلیت یا توانایی ارثی یک سلول گیاهی برای رشد و تبدیل به گیاهی کامل در صورت تحریک مناسب است قدرت باززایی تاکید دارد که تمام اطلاعات مورد نیاز برای رشد و تولید مثل موجود در داخل یک سلول قرارداد . اگرچه به لحاظ تئوری تمام سلول های گیاهی دارای توانمندی هستند ، ولی سلولهای مرستمی بهترین سلولهایی هستند که قادر به بروز این توانمندی میباشند.

۲- عدم تمایز Dedifferentiation :

به معنی ظرفیت سلول های بالغ ، برای برگشت به شرایط مرستمی و تولید یک نقطه رشد جدید میباشد ، که با تمایز مجدد که قدرت سازماندهی و تشکیل اندام جدید میباشد ، ادامه میابد .

۳- قابلیت یا آمادگی Competency :

قابلیت درون زاد یک سلول یا بافت ، مشخص به رشد در مسیری ویژه را توصیف می کند . برای مثال سلولهایی که از نظر جنین‌زایی دارای شایستگی هستند قادر به توسعه به جنین های کاملاً فعال می باشند . نقطه مقابل آن عدم قابلیت و یا عدم صلاحیت مورفوژنتیکی است .



تاریخچه کشت بافت گیاهی :

فناوری با پیشنهاد **گوتیب هابرلند** در رابطه با توانمندی سلول در آغاز قرن بیستم شروع شد . هابرلند پیشنهاد کرد که روش هایی برای جداسازی و کشت بافت گیاهی باید توسعه یابد و متذکر شد که ، اگر محیط و مواد غذایی سلول های کشت شده دستکاری شود ، آن سلولها مراحل نمورا در رشد گیاه طبیعی تکرار خواهند نمود .

در سال 1838 **شوان و شلیدن** ، تئوری **توتیپوتنسی** Totipotency

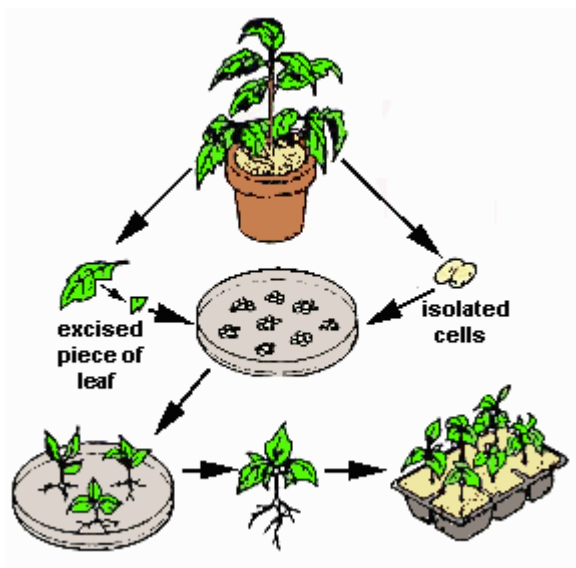
را ارائه نمودند ، بر اساس این تئوری هر سلول مستقل بوده و قادر به

تولید یک گیاه کامل است. در واقع تئوری آنها پایه و اساس کشت بافت و سلول گیاهی بود . اولین تلاش بوسیله **هابرلاند** در سال 1902 انجام شد ولی او در روش کشت بافت ناموفق بود . بین سال های 1907 و 1909 **هاربون** ، **باروز** و **کارل** ، موفق به کشت در شیشه ، بافتهای حیوانی و انسانی شدند .

گرچه پژوهشگران تحقیقاتی را در ارتباط با کشت در شیشه بذور گیاهچه های ارکیده ، جنین و اندامهای گیاهی انجام دادند ، ولی در سال 1939 **نوبکرت** ، **گوستریت** و **وایت** ، برای اولین بار موفق به تولید گیاه حاصل از کشت بافت شدند . بعد از جنگ جهانی دوم ، پیشرفت در این زمینه بسیار سریع بود و نتایج باارزش و مهمی برای کشاورزی ، جنگلکاری و باغبانی ، به همراه داشت . (**پیریک 1979** ، **بوجوانی و همکاران 1986**) . در دهه ۶۰ میلادی با معرفی **محیط کشت موراشی و اسکووک** تحولی در علم کشت بافت صورت گرفت .

در ایران علم کشت بافت با واردات کشت بافت خرما از دهه ۷۰ شمسی آغاز گردید . مهمترین کار کشت بافت در ایران کار بر روی سیب زمینی است که ریزغده های عاری از ویروس انجام میگردد . همچنین تکثیر پایه های درختان میوه مانند تکثیر پایه مالینگ ، گیاهان زینتی می باشد .

اهمیت کشت بافت :



بررسی و مطالعه شرایط زیست از جنبه های محیطی، اقلیمی ، خاک ، گیاهان ، جانوران و امثال آن برای انسانهای قرن حاضر و قرن های آینده ، این نکته مهم و قابل توجه را یادآوری می نماید که انسان برای بهبود شرایط حیات خود به ویژه تولید و تامین غذا نیاز مبرم به استفاده از فن آوریهای جدید در زمینه های گوناگون به ویژه علوم گیاهی و کشاورزی دارد .

افزایش جمعیت جهان و کاهش منابع تولید فرآورده های گیاهی و دامی در جهان یک مشکل جدی و اساسی است که دانشمندان را حداقل از دهه گذشته تاکنون به این فکر ترغیب نموده تا با استفاده از شیوه های جدید در حفظ محیط زیست و عدم تغییر بنیادی در طبیعت ، دست به تولید بهتر و بیشتر محصولات گیاهی بزنند .

یکی از این روش های مدرن استفاده از **فن آوری کشت سلول و بافت های گیاهی** است که از این طریق میتوان نسبت به تکثیر گیاهان مختلف اعم از صنعتی ، دارویی ، مرتعی و کشاورزی اقدام نمود . از طرف دیگر کشت بافت گیاهی می تواند بستر مناسبی جهت حفظ و نگهداری گونه ها و ژنوتیپهای مادری و یا در حال انقراض طبیعت به عنوان منابع با ارزش ژرم پلاسما محسوب شود .

علاوه براین **تکنولوژی کشت سلول و بافت های گیاهی** در سال های اخیر به گونه ای توسعه یافته است که هم اکنون برای انتقال ژنهای مطلوب ، به ویژه ژنهای ایجادکننده مقاومت نسبت به آفات و بیماریهای گیاهی که هرساله بخش عظیمی از تولیدات گیاهی را نابود می سازد ، از این روش در سطح گسترده استفاده می شود . بدیهی است اصلاح گیاهان به روش های سنتی ، علاوه بر وقت گیر بودن ، در بسیاری از موارد امکان پذیر نیست در حالیکه تکنولوژی جدید کشت سلول و بافت گیاهی این راه را به خوبی هموار ساخته و به پیش می برد .

مزایا و معایب کشت بافت :

از مزایای کشت بافت میتوان به موارد ذیل اشاره نمود :

✚ سرعت رشد گیاهان

✚ تولید تعداد زیادی گیاه در فضای کم

✚ رفع محدودیت زمان و فصل جهت تکثیر گیاهان

و از معایب آن :

✚ هزینه بالا آزمایشگاه کشت بافت

✚ نیاز به نیروی متخصص

✚ تغییرات ناگهانی مانند عدم باروری ، بروز علائم گوناگون و ... که باعث تغییرات ژنتیکی و هیپوژنتیکی می شود .

کاربرد کشت بافت :

۱- ایجاد گیاهان عاری از ویروس مانند مرکبات

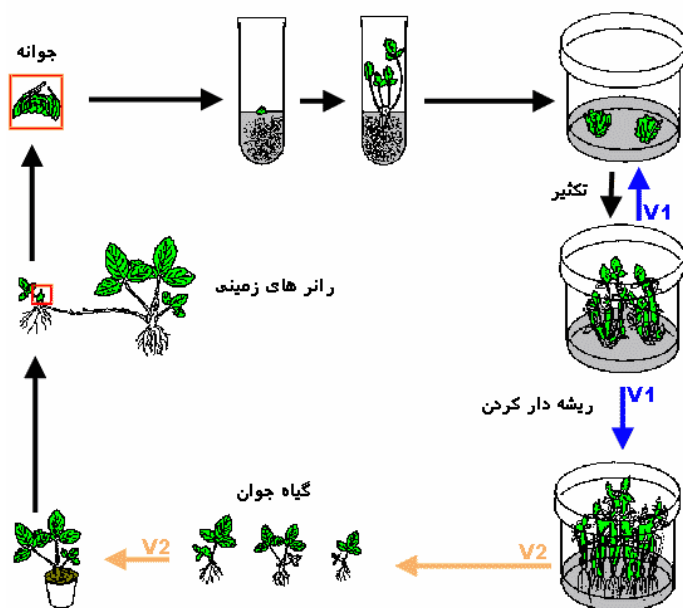
۲- حفظ و نگهداری ژرم پلاسما گیاهی و ایجاد بانک ژن

۳- ازدیاد انبوه و سریع هم گروهها (تکثیر کلونی)

۴- تغییر و اصلاح گیاهان

۵- تولید فرآورده های ثانویه (متابولیت ها)

انواع کشت بافت :



۱- کشت گیاه کامل : یک بذر ممکن

است در شرایط آزمایشگاهی کشت شود و یک گیاهچه و در نهایت یک گیاه کامل تولید کند .

۲- کشت مین : در این نوع کشت ،

جنین جدا شده و پس از حذف پوسته بذر کشت می شود.

۳- کشت اندام گیاهی : در این کشت ، انواع مختلفی مثل کشت مریستم ، کشت ریشه ، کشت نوک

ساقه قابل تشخیص هستند .

۴- کشت کالوس : اگر یک بافت تمایز یافته جدا شود و در شرایط آزمایشگاهی تولید یک توده سلولی

تمایز نیافته به نام **کالوس** نماید ، این پدیده را کشت کالوس می نامند .

۵- کشت سلول : کشت سلولهای منفرد که به کمک آنزیمها یا به روشهای مکانیکی از یک

بافت گیاهی یا سوسپانسیون سلولی بدست می آیند .

۶- کشت پروتوپلاست : کشت پروتوپلاستهایی که در اثر **هضم آنزیمی دیواره سلولی** بوجود آمده اند

، کشت پروتوپلاست نام دارد .

محیط کشت و نحوه آماده سازی آن :

رشد و نمو گیاه در محیط کشت بافت تحت کنترل عوامل ذیل می باشد :

- ۱- **ساختار ژنتیکی** : بستگی به نوع گیاه دارد که برخی از گیاهان مثل انگور به راحتی و برخی دیگر مثل گردو به سختی کشت میگردند .
- ۲- **عناصر غذایی** : شامل آب ، عناصر پرمصرف و کم مصرف ، قندها و ...
- ۳- **عوامل فیزیکی رشد** : شامل نور ، درجه حرارت ، PH و ...
- ۴- **مواد آلی** : شامل تنظیم کننده های رشد ، ویتامین ها و ...

خصوصیات و نوع مواد کشت بافت گیاهی :

در تحقیقاتی که توسط محققین صورت گرفته است اغلب محیط مناسب یک نوع کشت بافت گیاهی مشخص شده است ولی در شرایطی که اطلاعاتی وجود نداشته باشد از روش **دی فوساد** استفاده میشود که در محیط کشت ۴ عامل اصلی ذیل بایستی وجود داشته باشد :

- ۱- **قندها** (ساکارز) به میزان ۲-۴٪ .
- ۲- **نمکهای پرمصرف** (محیط موراخی و اسکوگ) $1/4 - 1/2$ غلظت کامل .
- ۳- **اکسین** ۰,۰۱ ، ۰,۵-۵ میلی گرم در لیتر .
- ۴- **سیتوکنین** ۰,۰۱ ، ۰,۵-۵ میلی گرم در لیتر .

انتخاب ظروف کشت :

ظروف کشت بافت گیاهی اغلب **ظروف شیشه ای** میباشد زیرا دوام بیشتری دارند ، قابل اتوکلاو کردن میباشند و چندین نوبت میتوان از آنها استفاده نمود و بهتر است از نوع **پیرکس** باشند زیرا شیشه های ارزان قیمت کاتیونهای سمی مانند سرب ، سدیم ، آرسنیک و ... آزاد میکنند .

ظروف پلاستیکی عمر کوتاهی دارند و در اثر حرارت تولید اتیلن میکنند .

اندازه ظروف نیز مهم است زیرا ظروف با حجم زیاد هرچند باعث رشد و نمو بهتر به دلیل کاهش متصاعد شدن گازهای سمی و مواد غذایی بیشتر میشوند ولی از سوی دیگر میزان محیط کشت بیشتری مصرف مینمایند.

چند اصطلاح :

درصد حجمی : عبارت است از لیتر جسم حل شده بر لیتر محلول ضرب در ۱۰۰

$$100 \times (\text{لیتر محلول} / \text{لیتر جسم حل شده}) = \text{درصد حجمی } V\%$$

درصد وزنی : عبارت است از مقدار ماده حل شونده در ۱۰۰ گرم محلول

$$100 \times (\text{جرم محلول} / \text{جرم ماده حل شونده}) = \text{درصد جرمی } W\%$$

ppm :

برای محلولهای بسیار رقیق ، معمولاً غلظت بر حسب قسمت در میلیون (ppm) بیان می شود و عبارت است از وزن جسم حل شده بر حسب میلی گرم در یک لیتر از محلول

$$\text{لیتر محلول} / \text{میلی گرم ماده حل شونده} = \text{ppm}$$

غلظت مولار (مولاریته CM) :

غلظت مولار رایج ترین روش برای بیان غلظت است و مولاریته یک محلول عبارت است از مقدار مول های جسم حل شده در یک لیتر از محلول

$$\text{حجم محلول (لیتر)} / \text{مقدار ماده حل شونده (مول)} = \text{غلظت مولار (M)}$$

درصد وزنی - حجمی :

$100 \times \text{حجم محلول به میلی لیتر} / \text{وزن ماده حل شده به گرم} = \text{درصد وزنی - حجمی } (V/W)$. این غلظت برای بیان ترکیب محلولهای آبی رقیق و واکنش گره های جامد به کار می رود بنابراین یک محلول آبی ۵٪ از نیترات نقره محلولی می باشد که از حل کردن ۵ گرم نیترات نقره در مقدار کافی آب مقطر برای تولید ۱۰۰ میلی لیتر محلول استفاده شده است .

اجزای تشکیل دهنده محیط کشت :

این ترکیبات به نوع گیاه و مرحله ازدیادی بستگی دارد و شامل :

۱- **نمک های کانی :** شامل عناصر میکرو و ماکرو مانند فسفر ، ازت ، پتاس ، کلسیم ، بر ، آهن ، مس ، منگنز ، کبالت و ... می باشد .

۲- **ترکیبات آلی :** کربوهیدرات ها ، ویتامین ها ، هورمون ها و تنظیم کننده های رشد (اکسین و سایتوکنین) .

۳- **مواد پیچیده طبیعی :** مانند کازئین ، شیرنارگیل ، افشره مخمر ، آب گوجه فرنگی و ... این نوع مواد در گذشته بیشتر استفاده می شده است .

۴- **مواد کمکی بی اثر :** مانند آگار که فقط جهت جامد کردن محیط کشت کاربرد دارد .

۵- **آب :** حدود ۹۵٪ محیط کشت را شامل میشود . آب مورد استفاده در محیط کشت بافت بایستی آب مقطر باشد زیرا PH آن خنثی است و این آب در ظروف پلاستیکی نگهداری شود تا ترکیبات مسموم کننده مانند سرب ، آرسنیک و سدیم به آب اضافه نشود .

آگار :

از جلبک های دریایی تهیه میشود . غلظت آگار در محیط کشت بافت گیاهی بین ۰٫۸-۰٫۶ در لیتر میباشد . اگر غلظت آگار کم باشد (کمتر از ۰٫۴) محیط ژله ای نمیشود و در غلظت های بالا محیط خیلی سفت شده و امکان استفاده نمونه گیاهی فراهم نمیگردد . از مواد جایگزین آگار در محیط کشت میتوان به ژلرایت ، آلژینات ، پلیمرهای مصنوعی و ... اشاره نمود .

قند (ساکارز) :

قند جزء بسیار مهم محیط کشت است زیرا در شرایط کشت آزمایشگاهی گیاه اتوتروف نبوده و فتوسنتز به خوبی صورت نمیگیرد . غلظت قند محیط کشت حدود ۵-۱ درصد است . میزان قند محیط کشت بستگی به نوع و سن مواد در حال رشد دارد مثلاً جنین های در حال رشد به قند بیشتری نیاز دارند .

تنظیم کننده های رشد :

اکسین ها و سایتوکینین ها در کشت درون شیشه ای نقش اساسی دارند .

- **اکسین ها :** مانند IBA , Naa و غلظت آن بین ۰,۰۱-۱۰ میلی گرم در لیتر می باشد .
- **سایتوکینین ها :** نقش مهمی در شاخه زایی و تعداد گیاهچه ها دارد مانند Kin , BA , BAP و غلظت آن بین ۱-۱۰ میلی گرم در لیتر است .
- **جیبرلین ها :** این گروه از هورمون ها با قرار گرفتن در اتوکلاو تجزیه میشوند بنابراین کمتر در بسترهای کشت بافت استفاده میشوند .

ویتامین ها :

بر اساس **نوع گیاه** مقدار و نوع ویتامین متفاوت است . از انواع ویتامین های محیط کشت بافت میتوان به اینوسیتول و فرواینوسیتول (۱۰۰-۲۰۰ میلی گرم در لیتر) ، ویتامین B1 (تیامین و آدنوزین ۵-۱۰,۱ میلی گرم در لیتر) ، اسید پانتونیک اسید فولیک ، ریبوفلاوین ، اسید آسکوربیک و ... اشاره نمود .

سایر مواد متفرقه :

- **پلی آمین ها :** کوفاکتورهایی برای تشکیل ریشه های نابجا هستند و در کنترل رشد و نمو گیاهی اهمیت دارند .
- **فنیل اوره و مشتقات آن :** مانند تیدیا زرون TDZ که نقش سایتوکینینی دارد .
- **اسیدهای آمینه به عنوان منبع ازت :** مانند گلوتامین ، آدنین ، آسپارژین و ... که در محیط های کشت جدید که توازن مناسبی بین نیترات و آمونیوم وجود دارد از این مواد استفاده نمیشود .
- **زغال فعال (Charcol) :** جهت تثبیت PH ، جذب پیگمان های سمی قهوه ای و سیاه و یا ترکیبات ناشناخته غیر رنگی ، تغییرات نوری و تاریک نمودن محیط کشت جهت تشکیل ریشه و رشد ، جذب مواد بازدارنده مانند ABA در محیط کشت با غلظت بین ۳-۰,۰۲ درصد وزن به حجم استفاده میشود .

➤ **فلوروگلوسینول :** از ترکیبات فنلی است و سبب ممانعت از تولید آنزیم IAA اکسیداز میشود ، تشکیل شاخه‌های جانبی را تحریک میکند و استفاده توأم با اکسین به صورت **سینرژیک** باعث تشکیل ریشه نابجا میشود .

PH محیط کشت :

PH مناسب محیط کشت بافت بین **۵-۶,۵** است . PH کمتر از ۴,۵ و بالاتر از ۷ توقف رشد را خواهیم داشت .

در PH پایین :

- ✚ پیداری اکسین و اسیدجیبرلیک کاهش می‌یابد .
- ✚ غلظت آگار کم شده و محیط آبکی میشود .
- ✚ جذب عناصری مانند فسفات و آهن مختل میگردد .
- ✚ باعث کاهش پایداری ویتامین‌ها میگردد .

نگهداری محیط کشت :

در درجه حرارت کم مانند **۵ درجه و تاریکی** میتوان تا مدتی محیط کشت را نگهداری نمود . البته بهتر است این مدت **زیر ۱ هفته** باشد زیرا : نگهداری طولانی محیط کشت باعث کاهش مقدار آب محیط شده و غلظت عناصر و همچنین میزان PH محیط تغییر میکند .

استریل کردن محیط کشت :

قبل از قراردادن بذر ، بافت و اندام گیاهی در محیط کشت باید آن را استریل نمود که به روش‌های ذیل انجام میگردد :

۱- استریل فیزیکی :

توسط هوای داغ و خشک ، بخار آب ، تشعشع اشعه گاما استریل محیط کشت صورت میگیرد . استریل کردن به وسیله تابش به دلیل کاهش رشد گیاهان کمتر مورد استفاده قرار میگیرد .

دستگاه اتوکلاو :

در این روش محیط کشت در درجه حرارت ۱۳۵-۱۱۵ به مدت ۲۰ دقیقه قرار میگیرد .

✚ **مزایای این روش :** سرعت ، سهولت ، از بین بردن ویروسها ، عدم جذب مواد میباشد .

✚ **معایب این روش :** تجزیه مواد شیمیایی ، تغییر در PH ، انجام واکنشهای شیمیایی است . اتوکلاو باعث تجزیه ساکارز ، کلشی سین ، ژئاتین ، اسیدجیرلیک ، ویتامینها ، آنتی بیوتیکها ، آنزیمها و عصاره های گیاهی میگردد .

۲- حذف فیزیکی با استفاده از فیلتر یا شستشو :

از معایب این روش : جذب مواد ، عبور احتمالی برخی از ویروسها ، وقت گیر بودن و عدم تسهیل کار است .

۳- استریل شیمیایی :

استفاده از ترکیبات استریل کننده مثل هیپوکلریت کلسیم ، کلرور جیوه و

نحوه بستن درب لوله های آزمایش و ظروف کشت :

به منظور جلوگیری از خشک شدن و آلودگی محیط کشت لازم است در لوله های آزمایش و ظروف کشت به وسیله پوششهای معمولی ، درپوشهای آلومینیومی و یا پلاستیکی ، گلوله های پلاستیکی و ... بسته شود . از سوی دیگر برای جلوگیری از کم شدن اکسیژن و تجمع دی اکسید کربن و اتیلن در محیط کشت امکان مبادله گازها با محیط بیرون وجود داشته باشد .

ضد عفونی مواد گیاهی :

برای کشت بافت از دو نوع ماده گیاهی میتوان استفاده کرد : **مواد گیاهی داخل گلخانه و مزرعه** که احتمال آلودگی مواد شرایط مزرعه بیشتر است . بطور کلی ۴ منبع آلودگی در کشت بافت گیاهی وجود دارد :

❖ گیاه (آلودگی داخلی و خارجی)

❖ محیط کشت (عدم ضد عفونی مناسب آن)

❖ هوا

❖ عدم دقت محقق

مهمترین منبع آلودگی کشت بافت آلودگی خود گیاه است که باید قبل از قرار گرفتن در محیط کشت ضد عفونی شوند .

در صورتی که از فرآیند ضد عفونی اطمینان داشته باشیم ، آلودگی های احتمالی نمونه ها به دلایل ذیل میباشد :

❖ آلودگی داخلی نمونه های گیاهی

❖ بی دقتی در فرآیند کار

❖ نقص جریان هوای استریل

❖ آلوده بودن الکل مورد استفاده

❖ قراردادن لوله ها و سایر وسایل آزمایشی در محیط غیراستریل

❖ استفاده از اندامهای گیاهی قرار گرفته در سطح خاک و عدم استریل مناسب آنها

❖ رفت و آمد زیاد افراد به اتاق کار

❖ آلودگی اتاقهای رشد

ضد عفونی شیمیایی مواد گیاهی :

۱- رفع آلودگیهای سطحی :

❖ **الکل اتانول** : قراردادن بافتها به مدت چند ثانیه در الکل (اتانول) ۷۰٪ .

❖ **هیپوکلریت سدیم NaClO** : این ماده جهت استریل کردن سطوح بافت گیاهی به کار می رود

هیپوکلریت سدیم ماده ای قوی بوده و معمولاً به مقادیر ۲/۵-۱ درصد استفاده می شود .

❖ **کلرید جیوه محلول در آب** : ماده ای سمی است و مواد گیاهی در غلظت حدود ۰,۰۱-۰,۰۱ برای

مدت ۱۲-۲ دقیقه در آن قرار داده میشود .

۲- آلودگیهای داخلی :

❖ کشت مریستم

❖ اضافه کردن آنتی بیوتیک

فصل اول

تاریخچه

شروع علم کشت بافت گیاهی به سال ۱۸۳۸ و با ارائه تئوری سلولی توسط شلایدن و شوان می باشد. این تئوری عنوان میکند سلول به عنوان کوچکترین واحد بیولوژیکی بوده و در گیاهان می توان آن را وادار به ایجاد گیاه کامل نمود که این خصوصیت سلول **توتی پتانسی** Totipotency خوانده می شود که پایه و اساس کشت بافت گیاهی می باشد.

جدا کردن سلول گیاهی و کشت آن در محیط کشت مجزا در اوایل قرن بیستم و توسط گیاه شناس بزرگ آلمانی به نام آقای **هابرلنت** انجام گرفت که به همین دلیل او را **پدر علم کشت بافت** می نامند. هر چند به دلیل عدم شناسایی تنظیم کننده های رشد گیاهی موفق به تولید گیاه کامل نشد.

در اواسط دهه ۱۹۳۰ **دو کشف مهم** در کشت بافت گیاهی صورت گرفت که یکی شناسایی اکسین به عنوان یک تنظیم کننده طبیعی رشد و دیگری تشخیص اهمیت ویتامین B در رشد گیاهان بود.

در سال ۱۹۷۵ آقایان **اسکوک و میلر** به نکته مهمی در خصوص نقش هورمونها در شکل گیری اندامها دست یافتند. آنها ثابت کردند تمایز ریشه و ساقه در بافت کالوس تحت تأثیر غلظتهای دو هورمون اکسین و سایتوکینین و نسبت بین آن دو است، بطوریکه غلظتهای بالای اکسین موجب ریشه زایی و غلظتهای بالای سایتوکینین موجب شکل گیری شاخساره شده و در غلظتهای مساوی بین این دو هورمون بافت در حالت کالوس می ماند و اندام زایی صورت نمیگیرد که این فرآیند رشد و نمو اندام را **ارگانوژنزی** Organogenes یا **اندام زایی** می گویند.

در سال ۱۹۶۲ **موراشیک و اسکوک**، محیط کشت جدیدی موسوم به محیط MS با غلظت بالای نمکهای معدنی معرفی نمودند که در حال حاضر در بسیاری از آزمایشات کشت بافت گیاهی از آن استفاده می شود.

تحقیقات کشت بافت از اواسط دهه ۱۹۷۰ رشد چشمگیری پیدا کرد و بطور مثال امتزاج پروتوپلاسم گونه های مختلف برای تولید دورگه های سوماتیک (Cybrid یا دورگ سیتوپلاسمی) که فرآیند ناسازگاری طبیعی تشکیل گونه های جدید از طریق آمیزش جنسی را مرتفع نمود و برای تلاقی گونه های ناسازگار جنسی استفاده

شد که بهترین مثال آن امتزاج پروتوپلاسمی بین گوجه فرنگی و سیب زمینی توسط ملچرز و همکاران در اواخر دهه ۱۹۷۰ و تولید گیاه جدید پوماتومی باشد.

در دهه‌های ۱۹۷۰ و ۱۹۸۰ با تغییر آگاهانه و اختصاصی در خصوصیات گیاهان از طریق مهندسی ژنتیک، کشت بافت گیاهی به عنوان یک ابزار جایگاه خاصی پیدا کرد و در سال ۱۹۷۷ انتقال DNA پلاسمید نوعی باکتری به نام آگروباکتریوم تومفاسینس *Agrobacterium Tumefaciens* به گیاهان توسط چیلتون و همکاران صورت گرفت.

فصل دوم

طراحی تجهیزات آزمایشگاه کشت بافت

تمام انواع کشت بافت گیاهی دو گام اساسی را در بر می گیرند :

- ۱- گام اول جدا نمودن بخش کوچکی از گیاه به نام ریزنمونه ها .
- ۲- گام دوم قرار دادن بخش جدا شده در یک محیط ویژه به نحوی که توانایی بروز استعداد ذاتی یا القاء شده خود (تولید گیاه کامل) را داشته باشد .

هر دوی این گامها بایستی در شرایط ضدعفونی و عاری از میکروارگانیسم ها نظیر قارچها و باکتریها انجام شود به همین منظور باید آزمایشگاههای کشت بافت به دور از آزمایشگاههایی که با میکروارگانیسم ها و حشرات سروکار دارند و با محلهای نگهداری و ذخیره بذل و مواد گیاهی احداث شود .

فضاهای کاری :

یک آزمایشگاه مناسب کشت بافت معمولاً دارای دو اتاق بزرگ و یک اتاق کوچک است . یک اتاق بزرگ جهت کارهای عمومی کشت بافت نظیر آماده سازی محیط کشت و قرار گرفتن دستگاهها و تجهیزات مورد نیاز مانند اتوکلاو ، یخچال فریزر ، میزهای کاری و ... اختصاص می یابد . اتاق بزرگ دیگر که مجهز به سیستمهای کنترل شرایط محیطی مانند نور ، دما ، طوبت و ... می باشد جهت نگهداری کشت ها استفاده می شود و اتاق کوچک برای ضدعفونی کردن وسایل و ادوات مورد نیاز است .

بطور کلی یک آزمایشگاه کشت بافت دارای بخشهای ذیل می باشد :

۱- جایگاه شستشو :

دارای ظرفشوییهای بزرگ که معمولاً با سرب به دلیل جلوگیری از خوردگی مواد اسیدی و قلیایی پوشیده شده است ، دارای جریان آب سرد و گرم ، آب مقطر و آب دیونیزه شده ، دستگاههای خشک کن ، حمام اسیدی ، ماشین ظرفشویی و ... می باشد .

۲- جایگاه تهیه محیط کشت :

فضای بزرگی است جهت نگهداری مواد شیمیایی ، ظروف کشت ، میزهای آزمایشگاه ، PH متر ، اتوکلاو ، یخچال فریزر ، آون و سایر تجهیزات مورد نیاز کشت بافت گیاهی .

برای تهیه محیط کشت بایستی مواد شیمیایی کاملاً خالص بوده و توزین مواد به دقت صورت گیرد و برای اطمینان بیشتر برنامه گام به گام ساخت محیط کشت نوشته و مرحله به مرحله کنترل گردد .

۳- جایگاه انتقال :

اتاق انتقال بایستی استریل شده باشد و یا جهت انتقال حداقل از یک دستگاه لامینار (هود جریان هوا) که دارای برق ، گاز ، هوای فشرده و خلاء می باشد استفاده نمود .

در **دستگاه لامینار** هوا با فشار از بیرون وارد دستگاه شده و با عبور از فیلتر گرد و خاک و فیلتر HEPA که دارای منافذ کمتر از 0.3 میکرومتر است و باعث حذف باکتریها و قارچها می گردد هوای پاک جهت کشت آماده می شود . همچنین دارای لامپ UV (فرابنفش) است که جهت استریل قسمت داخلی کاربرد دارد و ۱۵-۲۰ دقیقه قبل از کار بایستی روشن شود و لامپ فلورسنت جهت روشنایی از دیگر قسمتهای این دستگاه است .

۴- جایگاه نگهداری کشت ها :

تمام انواع کشت های بافت باید در شرایطی که در آن دما ، رطوبت ، جریان هوا و طول مدت و کیفیت نور به خوبی کنترل می گردد ، نگهداری شوند .

کشت های پروتوپلاسم ، کشتهای کم تراکم تعلیق سلولی ، کشت های پرچم به شرایط محیط کشت حساسند . در اتاقکهای نگهداری کشت معمولاً محدوده دما بین ۱۵-۳۰ درجه بوده و مدت **روشنایی** اغلب ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور بین ۲۰۰۰-۴۰۰ لوکس (۲۰۰-۴۰ فوت کندل) و **رطوبت** بین ۳۰-۹۸ درصد (**همگی بسته به نوع کشت**) می باشد . افزایش رطوبت باعث افزایش آلودگی اتاقک نگهداری می شود .

چنانچه بخواهیم با توجه به نوع کشت تاریکی برای کشت بافت ایجاد نماییم می توانیم از ظروف کشت مات استفاده نموده و یا ظروف کشت را با فویل آلومینیومی مستور نماییم .

لوازم اولیه در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی :

- ۱- میز کار آزمایشگاهی
- ۲- شیر گاز
- ۳- همزن گرم کننده (جهت حل کردن مواد)
- ۴- انواع ظروف شیشه ای جهت کشت و آماده سازی مواد مانند پتريدیش ، ارلن ، استوانه مدرج ، لوله آزمایش ، بشر و ...
- ۵- اتوکلاو
- ۶- PH متر
- ۷- ترازوی حساس
- ۸- میکروتوم (جهت برش دادن بافتهای کشت شده)
- ۹- پمپ تخلیه متصل به فیلتر ریز و درشت
- ۱۰- ابزارهای کوچک مانند قاشقک ، اسکالپل (چاقوی آزمایشگاهی) ، پنس و
- ۱۱- قفسه
- ۱۲- انکوباتور مجهز به کنترل نور و درجه حرارت
- ۱۳- دستگاه یون زدایی آب با منبع مربوطه
- ۱۴- دستگاه تقطیر آب
- ۱۵- سانتریفوژ و اسپکتروفتومتر
- ۱۶- آون الکتریکی برای خشک کردن ظروف پس از شستشو
- ۱۷- مواد شیمیایی جهت ساخت محیط کشت
- ۱۸- ذره بین چراغ دار (بینوکلار) و یا میکروسکوپ
- ۱۹- پیپتور یا سمپلر و ...

ظروف کشت بهتر است از جنس شیشه ای **پیرکس** باشد . ظروف شیشه ای نو را باید قبل از استفاده با آب پر کرده و همراه مواد شوینده دو مرتبه اتوکلاو نموده و بین این دو مرحله و پس از آن کاملاً آبکشی نمایم زیرا این ظروف بر آزاد میکنند که باعث تغییر در محیط کشت می گردد .

برخی از عملیات آزمایشگاه اولیه :

۱- وزن کردن :

تهیه محیط کشت نیاز به توزین دقیق مواد تشکیل دهنده آن دارد که برای این منظور از ترازوهای مختلف استفاده می شود که بهترین آن **ترازوی الکتریکی کفه بالا** است . ترازو باید در یک سطح صاف قرار گیرد و تراز شده و به دور از لرزش و جریان هوا باشد و نباید وزن بیش از ظرفیت ترازو بر روی آن قرار گیرد .

۲- اندازه گیری مایعات :

برای اینکار از ظروف شیشه ای مدرج مانند استوانه های مدرج ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی لیتری استفاده میشود و برای مقادیر بسیار کم (میکرولیتر) از وسیله ای به نام **سمپلر** یا پیتیتور استفاده می شود .

۳- تمیز کردن شیشه آلات :

بیشتر ظروف شیشه ای را با آب گرم 70°C و آبکشی با آب مقطر و آب دوباره تقطیر شده انجام می شود ولی ظروف بسیار آلوده و چرک را حدود ۳-۴ ساعت در حمام اسید کرومیک یا اسید سولفوریک قرار می دهند .

لازم به ذکر است ظروف کشت حاوی محیط کشت را قبل از شستشو باید ابتدا اتوکلاو نموده و مواد کشت را در یک پلاستیک ضخیم ریخته سپس ظروف را شستشو نمود .

فصل سوم

تهیه محیط کشت

موامل مؤثر بر رشد و نمو ریز نمونه ها :

۱- نوع گیاه :

ساختار ژنتیکی گیاه تا حد زیادی به شرایط فیزیکی و شیمیایی بستگی دارد مثلاً همانطور گیاهی مثل انگور در شرایط طبیعی *In vivo* به راحتی قابل تکثیر است در محیط کشت بافت گیاهی نیز نمونه های آن راحت رشد می نمایند و برعکس آن گردو می باشد .

۲- مواد غذایی :

شامل آب ، عناصر معدنی پرمصرف و قندها می باشد که گیاه چه بصورت طبیعی و چه در محیط کشت *In vivo* بدون آنها قادر به زندگی و ادامه حیات نمی باشد . قندها منبع انرژی محیط کشت هستند زیرا قطعه گیاهی به طور کامل اتوتروف و قادر به فتوسنتز نمی باشد .

۳- عوامل محیطی :

این عوامل مانند دما ، رطوبت ، نور ، PH ، اکسیژن و دی اکسید کربن می باشند که در یک گیاه شرایط محیطی مناسب آن جهت کشت بافتش نیز لازم است .

۴- مواد آلی ویژه :

مانند تنظیم کننده های رشد گیاهی و ویتامین ها . تنظیم کننده های رشد در **غلظت کم** کاربرد داشته و توزیع مواد درون گیاه ، تقسیم سلولی ، رشد سلول و ... را به عهده دارند .

اجزای محیط کشت :

یکی از مهمترین عوامل دخیل در رشد و نمو بافتهای گیاهی کشت شده ، مواد تشکیل دهنده محیط کشت می باشد . نیازهای غذایی سلولهای گیاهی در شرایط درون شیشه ای شباهت زیادی با نیازهای غذایی گیاه کامل دارد که شامل :

- ۱- آب
- ۲- عناصر پرمصرف و کم مصرف
- ۳- ویتامین ها
- ۴- اسیدهای آمینه و یا دیگر مواد نیتروژن دار
- ۵- قندها به عنوان منبع کربن و انرژی
- ۶- سیستم حمایت کننده یا عامل ژلی
- ۷- مواد تنظیم کننده رشد گیاهی و برخی مواد آلی ناشناخته

در حال حاضر قریب به ۲۶۰ نوع محیط کشت بافت گیاهی موجود است که محیط کشت موراشیک و اسکوگ معروف به **محیط MS** بیشترین کاربرد عملی را دارد .

عوامل مؤثر در انتخاب نوع محیط کشت :

- ۱- **سن گیاه و سن بافت :** مثلاً بافتهای جوان بدون اکسین نیز می توانند ریشه زایی نمایند ولی بافتهای مسن به اکسین برون زاد نیاز دارند .
- ۲- **نوع اندام مورد کشت :** مثلاً در کشت بافت ریشه نیاز به ویتامین B₁ می باشد .
- ۳- **نوع کشت :** در کشت سوسپانسیون (معلق) چون کالوس برای مدت بیشتری نگهداری می شود ، نیاز کمتری به تنظیم کننده های رشد می باشد .
- ۴- **مرحله کشت :** مثلاً ریشه های نابجا اغلب بعد از اضافه شدن اکسین در حالیکه ساقه های نابجا بعد از افزایش سایتوکنین ظاهر می شوند .

در شرایطی که محیط کشت مناسب شناسایی نشده بود و یا افراد کم تجربه و تازه کار باشند از روش **دوفوسار** De fossard و همکاران (۱۹۷۶) (روش طیف گسترده) استفاده می شود که شامل چهار دسته مواد اصلی و

ضروری محیط کشت یعنی: اکسین، سایتوکنین، نمکهای عناصر معدنی و مواد آلی شامل ساکارز، اسیدهای آمینه و ویتامین ها می باشد.

اجزای تشکیل دهنده محیط کشت:

۱- آب:

قریب به ۹۵٪ محیط کشت را آب تشکیل می دهد. آب مورد استفاده بایستی کاملاً خالص و دارای بالاترین کیفیت باشد و حداقل **استاندارد نوع دوم درجه بندی** آب از نظر مواد شیمیایی را داشته باشد:

یعنی عاری از مواد تب آور، گازها و مواد آلی بوده و هدایت الکتریکی آن کمتر از ۱ میکروموس بر سانتیمتر باشد. برای تهیه این نوع آب ابتدا آب را یون زدایی deionization نموده و سپس آن را در ظروف شیشه ای تقطیر می نماییم.

بهتر است آب مقطر را در بطریهای پلاستیکی نگهداری نماییم زیرا ظروف شیشه ای غالباً حاوی ذرات ریز سرب، سدیم و آرسنیک می باشند که می تواند در آب آزاد شوند.

۲- عامل ژلی:

کار با محیط کشت مایع به دو جهت مشکل ساز است:

❖ یکی این که حمل و نقل و جابجایی آن بسیار مشکل است

❖ دوم این که ریز نمونه ها در این نوع محیط غوطه ور شده و با کمبود اکسیژن مواجه می شوند.

بنابراین لازم است محیط کشت را به صورت جامد یا نیمه جامد درآورد که برای این منظور از **آگار** (از مشتقات دیواره سلولی گروهی از جلبکهای قرمز) استفاده می شود که پلی ساکاریدی با جرم مولکولی بالا است

آگار شامل دو بخش **آگاروز** (۷۰٪) ایجاد حالت ژل می کند و **آگاروپکتین** (۳۰٪) است و در دمای 100°C ذوب شده و در دمای 35°C جامد می شود و از پایداری خوبی برخوردار است و توسط آنزیمهای گیاهی تجزیه نمی شود.

غلظت عادی آگار در محیط کشت بین ۰/۸-۰/۶ درصد است. در غلظت کمتر (۰/۴٪) و خصوصاً زمانی که PH هم پایین است خوب سفت نمی شود. از جایگزین های آگار در محیط کشت می توان به فیتازل، ژلاتین، پلیمرهای مصنوعی مثل بیوژل، انواع نشاسته و ... اشاره نمود.

محیط کشت مایع می تواند باعث نوعی اختلال فیزیولوژیکی آبکی شدن یا شیشه ای شدن بافت های گیاهی (ویتریفیکاسیون vitrification) شود.

۳- کربوهیدراتها (منبع کربن و انرژی):

بافت های گیاهی درون محیط کشت بافت (حتی بافت های سبز) به قدر کافی اتوتروف نبوده و قادر به فتوسنتز نمی باشند بنابراین لازم است به محیط کشت قند اضافه گردد تا علاوه بر تأمین انرژی مورد نیاز رشد و نمو کشت بافت، واحدهای ساختمانی مولکولهای بزرگتر مورد نیاز را نیز فراهم نماید.

بهترین منبع کربوهیدراتها، ساکارز (شکر معمولی) است که اغلب با غلظت ۵-۱ درصد استفاده می شود البته غلظت قند بستگی زیادی به نوع گونه، جنس، سن مواد گیاهی و نوع کشت دارد. مثلاً در کشت پروتوپلاست کمتر و در کشت بساک و جنین مقدار بیشتری از قند استفاده می شود.

۴- عناصر معدنی:

بعد از قندها، عناصر معدنی مهمترین گروه مواد غذایی در کشت درون شیشه ای بافت های گیاهی می باشند. انتخاب مخلوط عناصر پرمصرف و کم مصرف تا حد زیادی به گیاه مورد کشت بستگی دارد. کاربرد محیط کشت MS به دلیل این که بسیاری از گیاهان به آن واکنش مثبت نشان داده اند، متداول است. نمونه کشت برخی از گیاهان مانند ژربرا، آزالیا و برگ بوی کوهی به مقدار زیاد نمک های معدنی حساس هستند.

محیط ناپ یک محیط کشت با نمک ضعیف و محیط MS با نمک قوی است.

بیشتر گیاهان نیتروژن به شکل نترات NO_3^- را بر آمونیوم NH_4^+ ترجیح می دهند. میزان یون پتاسیم K^+ در محیط های کشت مختلف ۲-۲۶ میلی مول در لیتر می باشد و نیاز به فسفات $H_2PO_4^-$ ، کلسیم Ca^{2+} ، منیزیم Mg^{2+} ، سولفات SO_4^{2-} و به مراتب کمتر و در حدود ۵-۱ میلی مول در لیتر است.

۵- هورمون ها و تنظیم کننده های رشد گیاهی :

اساساً هورمونها مسئول توزیع ترکیبات سنتز شده توسط گیاه هستند . اضافه کردن هورمونها به محیط کشت بستگی به نوع ریز نمونه و گونه گیاهی دارد .

۵-۱- اکسین :

اکسین طبیعی در کشت بافت ایندول^۳ استیک اسید IAA است که معمولاً با غلظت ۱۰-۰/۰۱ میلیگرم در لیتر اضافه میشود در حالیکه اکسین های مصنوعی مانند IBA و Naa فعال تر بوده و در غلظت ۱۰-۰/۰۰۱ میلیگرم بر لیتر استفاده می شوند . اکسین ها در کشت بافت گیاهی معمولاً باعث تقسیم سلولی ، تشکیل ریشه های نابجا و جنین زایی در کشت های سوسپانسیون می شوند .

۵-۲- سایتوکنین :

سایتوکنین ها شامل کینتین ، زآتین ، بنزیل آدنین BA و ... غالباً برای تحریک رشد و نمو در بافتهای کشت و در غلظت بیشتر نسبت به اکسین جهت تولید شاخساره بکار می روند . غلظت مورد استفاده آنها معمولاً در حدود ۱-۱۰ میلیگرم در لیتر می باشد .

۵-۳- جبرلین ها :

معمولاً در کشت بافت گیاهی کمتر استفاده می شوند و بطور کلی در کشت درون شیشه ای باعث رشد طولی میان گره ها و رشد مریستمها یا جوانه ها و شکستن خواب جنین های جدا شده یا بذرها می شوند . علت عدم استفاده زیاد آن در محیط های کشت بافت گیاهی کاهش فعالیت بیولوژیک جبرلین تا ۹۰٪ در اثر اتوکلاو کردن محیط های کشت می باشد .

۵-۴- سایر هورمونها و تنظیم کننده های رشد گیاهی :

- ✚ اسید آبسزیک ABA در بسیاری موارد اثر منفی بر رشد و نمو کشت بافت گیاهی دارد .
- ✚ تجمع اتیلن در اثر بسته بودن درب ظروف کشت بافت منجر به ممانعت از رشد و نمو میشود .

🚩 **پلی آمین ها** گروه تازه ای از تنظیم کننده های رشد هستند مانند پوترسین ، کاداورین (دی آمین) ، اسپرمیدین (تری آمین) و اسپرمین (تترا آمین) که بر بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهی را تأثیر می گذارند و در محیط کشت بافت استفاده می شوند .

🚩 **الگوساکارین ها** نیز به عنوان پیام رسانان شیمیایی مورد استفاده قرار می گیرند .

۶- ویتامین ها :

کشت بافت گیاهی همانند گیاه کامل به ویتامین ها به عنوان کاتالیزور فرآیندهای متابولیکی خود جهت ادامه رشد و نمو نیاز دارد .

تیامین (ویتامین B₁) ، اسید نیکوتینیک (ویتامین B₃) ، پیرو دوکسین (ویتامین B₆) و میواینوسیتول نسبت به سایر ویتامین ها بیشتر مورد استفاده قرار می گیرند که در میان اینها نیز **تیامین (B₁)** اهمیت ویژه ای دارد .

۷- منابع آلی نیتروژن :

اسیدهای آمینه گاهی به عنوان منبع آلی نیتروژن به محیط کشت اضافه می شود ولی در محیط های کشت جدید معمولاً **توازن مناسب نیترات به آمونیوم** وجود دارد و نیازی به استفاده از آن در محیط کشت نیست .

اسیدهای آمینه بسیار سریعتر از نیتروژنهای معدنی جذب سلول می شوند و در استقرار کشتهای سلول و پروتوپلاست اهمیت دارند . **گلو تامین متداول ترین اسید آمینه می باشد** و نیز آدنین و آسپارژین نیز زیاد استفاده می شود .

۸- ترکیبات متفرقه :

➤ **فیل اوره و مشتقات آن :** مانند تید یازرون TDZ که نقش سایتوکنینی دارد .

➤ **(Charcol) فعال :** جهت تثبیت PH ، جذب پیگمان های سمی قهوه ای و سیاه و یا

ترکیبات ناشناخته غیر رنگی ، تغییرات نوری و تاریک نمودن محیط کشت جهت تشکیل ریشه و رشد ، جذب مواد بازدارنده مانند ABA در محیط کشت با غلظت بین ۰.۰۲-۳ درصد وزن به حجم استفاده میشود .

➤ **فلوروگلوسینول :** از ترکیبات فنلی است و سبب ممانعت از تولید آنزیم IAA اکسیداز میشود ، تشکیل شاخه های جانبی را تحریک میکند و استفاده توأم با اکسین به صورت **سینرژیک** باعث تشکیل ریشه نابجا میشود .

محلول های ذخیره :

برای تهیه هر نوع محیط کشتی بایستی **مواد و عناصر مربوطه با یک نسبت وزنی یا حجمی مشخص با هم ترکیب شوند** . استفاده از محلولهای ذخیره باعث کاهش دادن عملیات تکراری در تهیه محیط کشت و نیز کاهش خطاهای توزین تک تک مواد برای تهیه غلظت های مربوطه در هر بار می شود .

باید توجه داشت در تهیه محلولهای ذخیره نمکها بصورت جداگانه آماده و اضافه شوند زیرا اضافه کردن آنها با هم سبب ایجاد رسوب می شود .

۱- عناصر پرمصرف :

محلول ذخیره عناصر پرمصرف معمولاً ۲۰-۱۰ برابر غلیظ تر از غلظت مورد نیاز در محیط کشت بافت تهیه میشود . و یدید پتاسیم KI بصورت جدا از سایر عناصر پرمصرف تهیه میگردد و نیز برای نمکهای کلسیم نیز محلول ذخیره جداگانه ای تهیه می شود تا از رسوب جلوگیری گردد . محلول ذخیره عناصر پرمصرف را در دمای $4^{\circ}\text{C} - 2$ و در محیط تاریک چندین هفته میتوان نگهداری نمود .

۲- عناصر کم مصرف :

محلول ذخیره عناصر کم مصرف بجز آهن با غلظت ۱۰۰۰ برابر تهیه می گردد . نگهداری این محلولها در یخچال یا فریزر به مدت یکسال امکان پذیر است .

آهن بیشتر بصورت شلات Chelate و به فرمول اتیلن دی متیل تتر استات آهن- سدیم (Fe-Na EDTA) می باشد .

برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر محلول ذخیره آهن (x200) در محیط MS به همراه سدیم به شکل ذیل عمل میگردد:
ابتدا ۷۴۶ میلیگرم شلات سدیم را در ۲۵ میلی لیتر آب دوباره تقطیر و در حال جوش حل نموده و حجم آن را

به ۵۰ میلی لیتر می رسانیم. در ظرف دیگر مقدار ۵۵۶ میلیگرم سولفات آهن در ۲۵ میلی لیتر آب دوبار تقطیر حل نموده و با هم زدن به مدت یک ساعت به رنگ زرد طلایی درمی آید. دو محلول را در حالیکه بطور پیوسته هم می زنیم با هم مخلوط می نماییم.

۳- اسیدهای آمینه و ویتامین ها :

محلولهای ذخیره اسیدهای آمینه و ویتامین ها را در دمای صفر درجه فقط برای ۱۵ روز میتوان نگهداری نمود بطور مثال برای تهیه ۲۰ میلی لیتر محلول ذخیره اسید آمینه گلايسين (x1000) مقدار ۴۰ میلیگرم گلايسين را در ۲۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر حل می نماییم.

۴- محلول ذخیره تنظیم کننده های رشد :

بطور کلی محلول ذخیره تنظیم کننده های رشد ۱۰۰-۱۰۰۰ برابر غلظت مورد نیاز در محیط کشت تهیه می شوند محلول ذخیره اکسین ها را در دمای 4°C در یخچال برای چندین ماه و در فریزر (20°C-) به مدت نامحدودی می توان نگهداری نمود. بهتر است محلولهای ذخیره تنظیم کننده های رشد تازه تهیه گردد.

نکته قابل توجه این است که اغلب تنظیم کننده های رشد را ابتدا بایستی در یک حلال مناسب مانند اتانول یا سود ۱ نرمال حل نموده سپس در آب حل کنیم. جیرلین ها به راحتی در آب حل می شوند.

آماده سازی محیط کشت :

روش تهیه یک لیتر محیط کشت MS به قرار ذیل می باشد :

۱- حدود ۳۰ گرم ساکارز را در ۲۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر حل نموده و ۱-۲ گرم زغال فعال به آن اضافه نموده و توسط صافی با استفاده از قیف بوختر و پمپ خلأ آن را صاف میکنیم.

۲- در ظرف دیگر مقداری آب ریخته (مثلاً حدود ۳۰۰ میلی لیتر) و از انواع محلولهای ذخیره ای قبلاً ساخته شده به شرح ذیل به آن اضافه می کنیم :

نمکهای پرمصرف ۵۰، نمکهای کم مصرف ۱، یدید پتاسیم ۱، شلات آهن سدیم ۵، ویتامین های B₁، B₃، B₆ ۱، گلايسين ۱، میواینوسیتول ۲ میلی لیتر.

۳- اضافه کردن غلظت مورد نظر تنظیم کننده های رشد به محلول بند ۲ بر اساس فرمول زیر :

$$\text{غلظت مورد نیاز} \times \text{حجم محیط کشت} = \frac{\text{مقدار محلول ذخیره مورد نیاز بر حسب میلی لیتر}}{\text{غلظت محلول ذخیره}}$$

۴- مخلوط نمودن محلولهای فوق در یک ظرف استوانه ای مدرج ۱ لیتری و رساندن حجم محلول به یک لیتر و هم زدن مداوم آن .

۵- تنظیم PH محلول در حدود ۵/۵-۶/۵ به وسیله سود یا اسید کلریدریک .

۶- اضافه کردن ۸-۶ گرم آگار به محیط کشت که برای حل شدن آگار بایستی محیط کشت را تا دمای 60°C حرارت دهیم .

۷- ریختن محیط کشت در ظروف کشت در حجمهای مورد نیاز ۲۵-۴۰ میلی لیتری و گذاشتن درپوشهای آن و پوشاندن درپوش ها با فویل های آلومینیومی و قرار دادن در اتوکلاو در فشار ۱۵ پوند بر اینچ و دمای 121°C به مدت حدود ۲۰-۱۵ دقیقه .

PH محیط کشت :

PH محیط کشت در محدوده ۵-۶/۵ برای رشد مناسب است . PH کمتر از ۴/۵ و بیشتر از ۷ باعث توقف رشدونمو در کشت درون شیشه ای می گردد .

اگر PH خیلی پایین باشد مشکلات ذیل بوجود می آید :

۱- پایداری ترکیباتی مانند اکسین IAA ، اسید جیبرلیک ، ویتامین B₁ کاهش می یابد .

۲- آگار به خوبی سفت نشده و محیط کشت شل و آبکی می شود .

۳- احتمال رسوب برخی نمکهای خاص مانند نمکهای فسفات و آهن وجود دارد .

۴- جذب یون آمونیوم کند می شود .

پتانسیل اسمزی محیط کشت :

پتانسیل اسمزی محیط کشت مجموع پتانسیل اسمزی آگار و سایر ترکیبات (مواد معدنی ، قندها و ...) می باشد .
 قندها در مقایسه با نمکها اثر بیشتری روی پتانسیل اسمزی محیط کشت بافت دارند .

اگر پتانسیل اسمزی بیش از 3×10^5 پاسکال (۳ بار) باشد توقف جذب آب توسط ریزنمونه را داریم و رشد و اندام زایی متوقف می شود .

کنترل قهوه ای شدن بافت :

بافتهای کشت شده برخی گیاهان بویژه چندساله‌های چوبی در اثر آلودگی به پاتوژن ها یا جراحات ناشی از بریدن ریزنمونه ، رنگدانه های قهوه ای و یا سیاه رنگ تولید می نمایند که این رنگدانه ها در اثر اکسیداسیون ، ترکیبات فنلی و تانن ها در اثر فعالیت ، آنزیمهای پلی فنل اکسیداز تولید نموده و رشدونمو بافت گیاهی را مختل و اغلب باعث مرگ آن می شوند .

به طرق مختلف می توان این مشکل را رفع نمود از جمله :

- ۱- افزودن زغال فعال به محیط کشت ۳-۲٪ درصد وزن به حجم
- ۲- افزودن ترکیبات پلیمری به محیط کشت (۱۰۰۰-۲۵۰ میلی گرم در لیتر)
- ۳- افزودن آنتی اکسیدانها مثل اسید سیتریک ، اسید آسکوربیک و ... به محیط کشت (۵۰۰-۱۵۰ میلیگرم در لیتر)
- ۴- افزودن اسیدهای آمینه مانند گلوتامین ، آرژنین ، آسپارژین به محیط کشت .

فصل چهارم

تهیه ریز نمونه های گیاهی :

ریز نمونه قطعه ای از بافت گیاهی است که در داخل محیط کشت قرار میگیرد و ممکن است بذر ، اندام (ریشه ، ساقه ، برگ ، گل ، پیاز) ، بافت (مریستم ، پارانشیم) و یا سلول (میکروسپور) باشد .

سلولهای یک توده کالوس از نظر شکل ، اندازه ، رنگدانه و گاهی از نظر بیان ژنی با هم تفاوت دارند . این سلولها با داشتن یک واکوئل بزرگ در مرکز و یک هسته در کنار از بقیه متمایزند .

سلولهای مریستمی هم اندازه بوده و کوچک و فاقد واکوئل اولیه و سیستوپلاسمی هستند و یک هسته مرکزی دارند (شبه مریستمی) که این شبه مریستمها در محیط کشت میتوانند ریشه های نابجا ، اندام هوایی و حتی جنینهای سوماتیکی تولید کنند .

انواع کشت بافت :

۱- **کشت گیاه کامل :** یک بذر ممکن است در شرایط آزمایشگاهی کشت شود و یک گیاهچه و در نهایت یک گیاه کامل تولید کند .

۲- **کشت مین :** در این نوع کشت ، جنین جدا شده و پس از حذف پوسته بذر کشت می شود .

۳- **کشت اندام گیاهی :** در این کشت ، انواع مختلفی مثل کشت مریستم ، کشت ریشه ، کشت نوک ساقه قابل تشخیص هستند .

۴- **کشت کالوس :** اگر یک بافت تمایز یافته جدا شود و در شرایط آزمایشگاهی تولید یک توده سلولی تمایز نیافته به نام کالوس نماید ، این پدیده را کشت کالوس می نامند .

۵- **کشت سلول :** کشت سلولهای منفرد که به کمک آنزیمها یا به روشهای مکانیکی از یک بافت گیاهی یا سوسپانسیون سلولی بدست می آیند .

۶- کشت پروتوپلاست : کشت پروتوپلاستهایی که در اثر **هضم آنزیمی دیواره سلولی** بوجود آمده‌اند ، کشت پروتوپلاست نام دارد .

موامل مؤثر در انتخاب ریزنمونه :

۱- ژنوتیپ :

گونه هایی که در شرایط طبیعی به راحتی تولید اندامهای مختلف می نمایند مثل بنفشه آفریقایی ، بگونیا رکس ، در کشت درون شیشه‌ای نیز تقریباً به راحتی اندامهای مختلف تولید می کنند . معمولاً گیاهان دو لپه ای نسبت به تک لپه ایها و نهاندانگان نسبت به گیاهان بازدانه بهتر تولیدمثل میکنند .

۲- هدف نهایی کشت بافت :

به عنوان مثال اگر هدف تکثیر **کلون** باشد ، ریزنمونه از جوانه انتهایی و جانبی و یا ساقه هوایی گرفته میشود یا برای گیاهان یا **کالوس هاپلوئید** از بساک یا دانه گرده به عنون ریزنمونه کشت استفاده می شود .

۳- سن گیاه مادری :

بافتهای جنینی معمولاً دارای توانایی تکثیر بالایی هستند بنابراین در کشت بافت غلات از جنین ها و بذور استفاده می شود . هر چه گیاه پیرتر باشد ، اغلب توان تکثیر کشت بافت آن هم پایین است .

۴- سن بافت یا اندام :

بافت جوان تر (از نظر فیزیولوژیکی) در مقایسه بافت مسن تر، پاسخ بهتری به کشت درون شیشه‌ای نشان میدهد و همچنین بافتهای جوان تر آلودگی میکروبی کمتری داشته و استریل سطحی آنها بسیار آسان تر است .

۵- وضعیت سلامت گیاه :

ریزنمونه باید از گیاه سالم و گیاه تحت عدم تنش غذایی و رطوبتی تهیه شود . معمولاً آلودگی قسمتهای هوایی گیاه نسبت به اندام زیرزمینی و قسمتهای داخلی نسبت به قسمت خارجی گیاه کمتر است . هر چه ریزنمونه کوچکتر باشد به همان نسبت احتمال آلودگی آن کمتر است .

۶- سال و فصل :

معمولاً جوانه ها یا اندامهای هوایی انتخاب شده در فصل بهار که در آغاز رشد هستند پاسخ بهتری نسبت به جوانه های در حال خواب دارند . علاوه بر این فصلهای مختلف یک سال نیز بر روی آلودگی ریز نمونه ها مؤثر است بطوریکه با گذشت هر فصل دوره رشد آلودگی نیز ممکن است بیشتر شود .

۷- شرایط رشد :

موفقیت یا عدم موفقیت کشت بافت گیاهی به شرایط رشد گیاه مادری بستگی دارد و شرایطی از قبیل اقلیم ، تنش ها ، عوامل محیطی ، آلودگی ها (آفات و بیماریها) و ... تأثیر زیادی دارند .

۸- وضعیت فیزیولوژیکی :

وضعیت فیزیولوژیکی ریزنمونه ها تأثیر زیادی روی تقسیم سلولی و تکثیر در محیط کشت درون شیشه ای دارد به عنوان مثال تهیه ریزنمونه از گیاهان در مرحله رشد رویشی در مقایسه با گیاهان در مرحله زایشی راحت تر تکثیر می یابند گرچه استثنائاتی نیز وجود دارد .

۹- موقعیت ریزنمونه روی گیاه :

مثلاً هرچه ریزنمونه از قسمت بالاتر درخت جدا شده باشد ، احتمال تشکیل ریشه نابجا کمتر خواهد بود زیرا قطعات بالایی نسبت به قسمتهای پایینی مسن تر هستند .

۱۰- اندازه ریزنمونه :

بطور کلی ، القای رشد در ساختارهای بسیار کوچک نظیر سلول ، توده سلولی و مریستم در مقایسه با ساختارهای بزرگتر مثل برگ ، ساقه و غده خیلی مشکل است و محیط کشت باید دارای برخی ترکیبات اضافی باشد . قسمتهای مختلف گیاه که دارای ذخایر غذایی زیادی هستند مثل غده ها و جوانه ها عموماً خیلی راحتتر در کشت درون شیشه ای تکثیر می یابند .

۱۱- زخم:

افزایش سطح زخم باعث افزایش جذب عناصر غذایی و تنظیم کننده های رشد میشود در حالیکه همزمان تولید اتیلن نیز افزایش می یابد بنابراین در انتخاب ریز نمونه ها مؤثر است .

نحوه قرار دادن ریزنمونه ها روی محیط کشت :

ریزنمونه ها را می توان به صورت **عمودی** ، **افقی** و یا **مایل** کشت نمود که در هر صورت **حفظ قطبیت ریزنمونه ضروری است** به این معنی که همیشه باید قسمت بالای ریز نمونه به سمت بالا و طرف مقابل آن در داخل محیط کشت قرار گیرد به ویژه در قلمه هایی که جهت تولید ریشه های نابجا کشت می شوند .

برخی مواقع ریزنمونه های غوطه ور شده در داخل محیط کشت نیاز به اکسیژن بیشتری دارند که میتوان آنها را **وارونه** کشت نمود . ریشه ها و ساقه ها عموماً در حالت وارونه راحت تر و سریعتر تکثیر می یابند .

کشت ریزنمونه به صورت **مایل** موجب تماس بیشتر با محیط کشت میگردد و در نتیجه مواد غذایی و تنظیم کننده های رشد بیشتری جذب ریزنمونه می شود . در مواردی که هدف تشکیل ساقه از جوانه های جانبی ساقه باشد ، بهتر است ریز نمونه به صورت **افقی** روی محیط کشت قرار داده شود .

جمع آوری و نگهداری ریزنمونه ها :

پرورش گیاه مادری در گلخانه باعث میشود همیشه ریزنمونه در دسترس باشد ولی چنانچه ریزنمونه را بخواهیم از گیاهان پرورش یافته در محیط باز تهیه کنیم بایستی در شرایط مناسب نگهداری شوند .

در **گیاهان چوبی** (درختان و درختچه ها) بهتر است شاخه ها جمع آوری شده و آنها را در کیسه های پلاستیکی در دمای 4°C و شرایط تاریکی ، بدون افت در قابلیت زنده ماندن برای چند هفته نگهداری نمود .

برش دادن ریزنمونه ها :

اندامهای گیاهی جمع آوری شده بایستی انتقال به محیط کشت به قطعات کوچک برش داده شوند . مواد گیاهی بزرگ را پس از ضدعفونی با **اسکالپل استریل** در یک محیط مرطوب (مثلاً روی کاغذهای صافی مرطوب) به سادگی میتوان برش داد .

زخمی که در اثر برش ایجاد می شود تمایز و تقسیم سلولی و در پی آن تشکیل کالوس را تحریک میکند و در جایی که تشکیل کالوس مطلوب نیست باید حداقل امکان از ایجاد زخم اجتناب شود .

وسایل برش مانند اسکالپل بایستی در زمان برش ضدعفونی شوند که بهترین حالت ضدعفونی آن **فرو بردن در الکل ۹۵٪ سپس نگه داشتن آن در معرض حرارت غیرمستقیم برای چند ثانیه** است .

جراحات ناشی از برش مواد گیاهی باعث تولید پلی فنل اکسیداز شده و اکسیداسیون ترکیبات فنلی را تحریک نموده و باعث قهوه‌ای شدن ریزنمونه میگردد که با نگهداری گیاهان جمع آوری شده در تاریکی یا نور کم به مدت چند هفته قبل از تهیه ریزنمونه ها ، میتوان میزان این عارضه را کاهش داد .

فصل پنجم

کنترل آلودگی

مهمترین مسأله ای که در کشت بافت گیاهی بایستی رعایت شود این است که هر نوع عمل مرتبط با کار کشت در شرایط کاملاً ضد عفونی شده و استریل صورت گیرد. میکروارگانیزم های آلوده کننده در محیط کشت بسیار سریعتر از ریزنمونه های گیاهی رشد می یابند لذا بافت های گیاهی کشت شده به محض آلوده شدن دچار فساد شده و از بین می روند.

منابع آلودگی:

۱- ریز نمونه ها:

مهمترین منبع آلودگی خود ریزنمونه ها هستند. سطوح گیاهی پوشیده شده با لایه مومی و کرکهای اپیدرمی می توانند میکروارگانیزم ها را به دام انداخته و آلودگی گیاه را بیشتر کنند. پیازها، سرشاخه های با رشد کند، جوانه های در حال خواب، ریشه ها، کورمها، غده ها، ریزومها بیشترین آلودگی خارجی و داخلی را دارند.

بطور کلی انواع آلودگی ریزنمونه ها عبارتند از:

۱-۱- آلودگی سطحی:

عوامل آلوده کننده سطحی بیشتر شامل قارچها، کپکها، باکتریها و مخمرها هستند. کاهش آلودگی سطحی گیاه مادری به عملیات ضد عفونی درون آزمایشگاه کشت بافت گیاهی کمک زیادی میکند. گیاهان پرورش یافته در گلخانه در نقایسه با گیاهان هوای آزاد منابع بهتری برای گرفتن ریزنمونه هستند.

۱-۲- آلودگی داخلی:

مایکروپلاسمها، ویروسها و میکروارگانیزم های شبه ویروس بدون آشکار کردن علائم ممکن است در بافت گیاهی وجود داشته باشند. آلودگی داخلی را نمیتوان با استفاده از ضد عفونی کننده های خارجی برطرف نمود.

برای مبارزه با این مشکل دو راه وجود دارد:

🚩 **کشت مریستم:** زیرا میکروارگانیزم ها در درون سلولهای ناحیه مریستم وجود ندارند.

🚩 **استفاده از آنتی بیوتیکها در محیط کشت.**

۲- حشرات:

هجوم حشرات از مشکلات بزرگ آزمایشگاههای کشت بافت گیاهی است به خصوص کنه ها که در هر جایی مانند روی لباس و موی افراد، مجاری هوا و فیلترهای اتاقک استریل و ... می توانند زندگی کنند. هر چند خود بطور مستقیم باعث آلودگی نمی شوند ولی با انتقال میکروارگانیزم ها باعث آلودگی می شوند.

۳- پرسنل آزمایشگاه و بازدیدکنندگان:

باید میزان رفت و آمد به آزمایشگاه به حداقل برسد.

۴- وسایل و تجهیزات:

کلیه لوازم مورد استفاده در کشت بافت مانند ظروف کشت، اسکالپل، پنسها و ... می توانند آلوده کننده باشند که در زمان استفاده بایستی به نحو مطلوب ضدعفونی شوند.

ضد عفونی سطحی مواد گیاهی:

برای ضد عفونی سطحی ریز نمونه ها از مواد شیمیایی استفاده میشود که برای میکروارگانیزم ها سمی بوده ولی برای مواد گیاهی نسبتاً غیر سمی هستند.

از جمله این مواد می توان به موارد ذیل اشاره نمود:

۱- الکل:

برای ریز نمونه ها از **الکل اتیلیک ۷۰٪** استفاده می شود زیرا الکل ۹۶٪ باعث دهیدراته شدن بافت گیاهی میشود مدت زمان استفاده و فرو بردن ماده گیاهی در الکل فقط چند ثانیه است. پس از آن باید از مواد دیگر ضد عفونی کننده مانند هیپوکلریت کلسیم نیز بایستی استفاده شود.

۲- هیپوکلریت سدیم NaOCl:

در منازل با نام **وایتکس** شناخته می شود. و معمولاً برای ریزنمونه ها از هیپوکلریت سدیم یک درصد استفاده میشود. هیپوکلریت ۱۰٪ ماده فعال را به نسبت ۱ به ۹ با آب ترکیب می نمایند و نمونه ها را بین ۳۰-۵ دقیقه در آن قرار می دهند که پس از آن بایستی نمونه گیاهی کاملاً با آب استریل شستشو داده شود.

۳- هیپوکلریت کلسیم Ca(OCl)_2 :

به شکل پودر است و در آب به خوبی حل می شود. جهت استریل ریزنمونه ها غلظت ۱۰۰-۳۵ گرم در لیتر آن آماده می شود و ریز نمونه ها به مدت ۳۰-۵ دقیقه در آن قرار داده می شوند.

۴- کلرید جیوه HgCl_2 :

ماده بسیار سمی است و در غلظت ۱-۰/۱ درصد (وزن به حجم) برای مدت ۱۰-۲ دقیقه استفاده می شود.

۵- پراکسید هیدروژن H_2O_2 :

به صورت محلول ۱۲-۳ درصد (حجم به حجم) به تنهایی و یا ماده ضدعفونی دیگر به مدت ۱۵-۵ دقیقه استفاده می شود.

۶- سایر مواد:

گاز کلر برای ضدعفونی بذور استفاده می شود و مواد دیگر مانند: سدیم دی کلروایزوسیانورات، ایزوتیازولون، آنتی بیوتیکها، قارچ کشها و باکتریها.

ضدعفونی وسایل و تجهیزات:

۱- استفاده از آون هوای داغ: دمای $160 - 180^\circ\text{C}$ به مدت ۴-۲ ساعت.

۲- اتوکلاو: به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه با دمای 121°C و فشار ۱۵ پوند. لازم به ذکر است در زمان اتوکلاو کردن درب ظروف نباید بسته باشد.

وسایل کوچکتر مانند انبرکها ، اسکالپل ، پنس ، قاشقکها و ... را باید در یک فویل آلومینیومی پیچیده و یا درون جعبه های مخصوصی قرار داده و اتوکلاو نموده تا طی مرحله خنک شدن از آلودگی آنها جلوگیری شود.

روشهای جهت استریل نگهداشتن وسایل در طول استفاده وجود دارد مانند :

✚ قرار دادن وسایل درون الکل ۹۵٪ بطوریکه $\frac{1}{3}$ طول آنها بیرون از الکل باشد .

✚ استفاده از استریل کننده های شیشه ای که وسایل فلزی به مدت ۱۰ ثانیه در داخل توده ای از دانه های کوچک شیشه ای با دمای 250°C قرار می گیرد .

ضد عفونی کردن محیط کشت :

قبل از قراردادن بذر ، بافت و اندام گیاهی در محیط کشت باید آن را استریل نمود که به روش های ذیل انجام میگردد :

۱- استریل فیزیکی :

توسط هوای داغ و خشک ، بخار آب ، تشعشع اشعه گاما استریل محیط کشت صورت میگیرد . استریل کردن به وسیله تابش به دلیل کاهش رشد گیاهان کمتر مورد استفاده قرار میگیرد .

دستگاه اتوکلاو :

در این روش محیط کشت در درجه حرارت ۱۳۵-۱۱۵ به مدت ۲۰ دقیقه قرار میگیرد .

✚ مزایای این روش : سرعت ، سهولت ، از بین بردن ویروسها ، عدم جذب مواد میباشد .

✚ معایب این روش : تجزیه مواد شیمیایی ، تغییر در PH ، انجام واکنش های شیمیایی است . اتوکلاو باعث تجزیه ساکارز ، کلشی سین ، زئائین ، اسیدجیرلیک ، ویتامین ها ، آنتی بیوتیکها ، آنزیم ها و عصاره های گیاهی میگردد .

۲- حذف فیزیکی با استفاده از فیلتر یا شستشو :

از معایب این روش : جذب مواد ، عبور احتمالی برخی از ویروسها ، وقت گیر بودن و عدم تسهیل کار است

۳- استریل شیمیایی :

استفاده از ترکیبات استریل کننده مثل هیپوکلریت کلسیم ، کلروکسید و

بازیافت کشت های آلوده :

گاهی با تمام دقتی که برای ضد عفونی ریزنمونه ها ، وسایل و ابزار کار می شود ولی باز هم تعدادی از کشت ها علائم آلودگی را نشان می دهند که می توان به روش زیر این کشت ها را نجات داد :

درب کشت آلوده را برداشته و روی آن محلول ۱-۵٪ درصد هیپوکلریت سدیم پر کرده و مدت ۵۰-۱۰ دقیقه به حال خود می گذاریم بماند (با توجه به شدت آلودگی) ، سپس بافت گیاهی را از محلول هیپوکلریت سدیم برداشته و قاعده آن را تمیز کرده و با حذف برگهای اضافی آن را به محیط کشت جدید انتقال می دهیم البته نمونه ها قبل از کشت در محیط جدید با آب استریل کاملاً شستشو می شوند .

فصل ۶

ریزازدیادی

تعریف ریزازدیادی :

عبارت است از تولید انبوه گیاه با استفاده از قسمتهای بسیار ریز بافتها و اندامهای گیاهی در شرایط استریل و درون ظروف کشت با کنترل محیط و مواد غذایی که اغلب با یک جوانه شروع می شود .

این نوع کشت متفاوت از کشتهایی است که در آنها بافتهای سازماندهی نشده مثل کالوس تولید می شوند . فراوان ترین گیاهان تکثیر شده با این شیوه **فیلکوس** ، **سینگونیوم** ، **سیب زمینی** ، **توت فرنگی** و **ژربرا** هستند .

موارد استفاده ریزازدیادی :

۱- ازدیاد انبوه گیاهان :

در ریزازدیادی تکثیر کلونها با سرعت زیاد در مدت نسبتاً کوتاه صورت می گیرد . به عنوان مثال در یک مورد تکثیر زنبق دشتی با تعداد اولیه ۳۰ کشت آغاز و پس از ۸ ماه در فضایی بالغ بر ۱/۸۶ متر مربع ، ۲۰۰۰۰ گیاه تولید شد .

۲- کنترل عوامل مواد بیماریزا :

امکان حذف عوامل بیماریزا از طریق ریزازدیادی گونه ها یا کلون ها نسبت به گیاهان مادری آسان تر است .

۳- نگهداری مواد گیاهی :

جهت فراهم نمودن امکان ارسال مواد ریزازدیادی و انبارداری درازمدت کلونها ، نگهداری گونه های کمیاب و در خطر انقراض در دمای پایین حدود ۴-۵ درجه سانتیگراد و شدت نور کم می توان نگهداری نمود .

معایب ریزازدیادی :

۱- غیر اقتصادی بودن ریزازدیادی برخی گونه ها و هزینه های بالای آنها .

۲- نیاز به داشتن مهارت های ویژه .

- ۳- گاهی عدم دسترسی به مواد ازدیادی مناسب .
- ۴- خطر میکروارگانیزمهای بیماریزا در ظهور گونه ها و کلونهای جدید .
- ۵- ایجاد تغییرات خاص ژنتیکی واپی ژنتیکی برخی اوقات در گیاهان .

انواع باززایی :

۱- طویل شدن مریستم انتهایی :

از این روش برای تولید گیاهان عاری از ویروس استفاده می شود و فقط مریستم انتهایی (طول کمتر از ۰.۵ میلیمتر) همراه با چند برگ زیر آن به عنوان ریزنمونه استفاده می شود با اجرای این روش فقط یک گیاه جدید بدست می آید .

۲- پرآوری شاخساره جانبی :

با جلوگیری از رشد مریستم انتهایی ، نقاط جانبی تحریک به رشد می شوند که بیشتر از طریق تغییر تنظیم کننده های رشد به ویژه سایتوکینین در محیط غذایی اعمال می شود و تعداد گیاهان بصورت تصاعدی افزایش می یابد .

۳- آغازش شاخساره نابجا :

عبارت است از انگیزش مستقیم شاخساره های نابجا بر روی ریشه ، برگ ، فلس های پياز و دیگر اندامهای گیاهی این باززایی بر روی ساقه گیاهان دولپه ای نادر است . شاخساره های نابجا ممکن است پس از زخم زنی به صورت باززایی از توده های کالوس محل زخم پدید آیند اما در بسیاری از گیاهان می توان قسمتهای کشت شده را به تشکیل شاخساره های نابجا وادار نمود . مانند بنفشه آفریقایی .

۴- اندام زایی :

آغازیدن اندامهای نابجا مانند شاخساره ، ریشه ، غده چه ، پيازچه از میان توده سلولهای تمایز نیافته کالوس می باشد که این سلولها ساختارهای شبه مریستمی تولید و تحت شرایط ویژه کشت اندامهای مختلف از آنها بوجود می آیند .

۵- جنین زایی :

دوره ای است که از یک تک سلول تخم بارور شروع و به آغازش ونمو یک جنین ختم میگردد . هنگامی که قرار است یک یا تعداد کمی ژنوتیپ به تعداد زیادی تکثیر شوند از جنین زایی سوماتیکی استفاده می شود زیرا در این روش تعداد ماده ازدیادی بیشتری تولید می شود ، کار کمتری لازم دارد چون ایجاد ریشه به عنوان یک مرحله جدا لازم ندارد و نیز از جنین های پوشش داده برخی گیاهان به عنوان بذر مصنوعی می توان استفاده کرد.

سیستم های رایج ریزازدیادی :

۱- کشت مریستم :

ریزنمونه قسمت کوچکی از نوک شاخه شامل برجستگی مریستمی (بخش گنبدی شکل) و تعدادی از پرموردیمهای برگ است و هدف تولید گیاهچه های کوچک و ریشه دار عاری از بیماریهای قارچی ، باکتریایی ، ویروسی و شبه ویروسی است . طول ریزنمونه بین ۰.۲۵-۱ میلیمتر می باشد . این روش در گیاهان علفی مانند میخک ، سیب زمینی ، توت فرنگی ، داوودی که نسبتاً آسان ریشه زایی دارند ، موفق بوده است .

۲- ریز پیوندی :

قسمت بسیار کوچکی از نوک شاخساره (حدود ۰.۱۸ - ۰.۱۴ میلیمتر) که شامل مریستم و سه پرموردیوم برگ است در شرایط آزمایشگاهی بر روی پایه (گیاهچه حاصل از جوانه زنی بذر و یا یک قلمه ریشه دار) پیوند زده می شود . از این روش ابتدا جهت تولید گیاهان عاری از ویروس به ویژه در مرکبات ، سیب و هسته دارها استفاده شد .

۳- کشت نوک شاخساره :

بسیار شبیه ازدیاد به وسیله قلمه است ولی قلمه های مورد استفاده بسیار ریز هستند و موفقیت در این روش به نوع ریز نمونه و کاربرد مناسب تنظیم کننده های رشد بستگی دارد . ریز نمونه حدود ۲-۰.۵ میلیمتر طول دارد .

۴- کشت تک گره :

این ریزنمونه ها از بندهای جوانه های جانبی که در اصل **قلمه جوانه - برگ** (تک گره) می باشند بدست می آیند . از این روش برای ریزازدیادی گیاهان روزت مانند ژربرا و خانواده آناناس و همچنین گیاهان آلوده بخصوص دارای آلودگی داخلی **استفاده نمی شود** .

۵- آغازش شاخساره :

بدست آوردن نوک شاخساره های جدید (نابجا) از دو طریق تولید **مستقیم** بر روی ریزنمونه و تولید **غیرمستقیم** از کالوس تشکیل شده بر روی سطوح بریده شده امکان پذیر است . **نوع ریزنمونه و وضعیت هورمونی** مهمترین عوامل مؤثر بر آغازش شاخساره های نابجا هستند .

۶- کشت بذر و هاگ :

استفاده از کشت درون شیشه ای می تواند برای بهبود جوانه زنی بذور بسیار ریز مفید می باشد . مثلاً در ارکیده که بذره های بسیار ریز فاقد لپه و آندوسپرم با جنین های توسعه نیافته دارند و جهت جوانه زنی و تولید گیاهچه نیاز به همزیستی با قارچ رایزوکتونیا دارند .

انواع ریزنمونه ها :

- ۱- **قطعات کوچک اندامها :** مانند قطعات برگ در بنفشه آفریقایی .
- ۲- **ریزنمونه های شاخساره :** مانند ارکیده ها و سرخسها .
- ۳- **لپه یا محور ریزلپه ای :** در سوزنی برگانی مانند دوگلاس و کاج نوئل .
- ۴- **دسته برگهای جوان سوزنی برگان :** برای باززایی شاخه از درختان مسن سوزنی برگ .
- ۵- **قطعات گل آذین نارس :** در تک لپه ایها مانند گلایل ، زنبق .
- ۶- **فلسه های پیاز گیاهان تک لپه در نزدیکی صفحه پایگاهی .**
- ۷- **لایه نازک بافت غده سیب زمینی :** که از ناحیه کورتکس برداشته می شود .

واکنش ریزنمونه بستگی زیادی به **میزان تنظیم کننده های رشد در محیط کشت** دارد .

تولید بذره‌های مصنوعی (بذره‌های سوماتیکی) :

در تولید بذره‌های مصنوعی بدلیل عدم یکنواختی جنینهای جنسی (بذره‌ها) می‌توان از جنینهای سوماتیکی که دارای یکنواختی ژنتیکی هستند استفاده نمود.

بذره‌های مصنوعی متشکل از یک یا چند جنین سوماتیکی دارای پوشش حفاظتی و قسمت مغذی است مواد ژله‌ای مختلفی برای پوشش بذره‌های مصنوعی آزمایش شده که بهترین آنها آلژینات است. بافتهای در برگیرنده جنین در بذر مصنوعی بایستی علاوه بر نقش تغذیه‌ای و حفاظتی، تبادلات گازی را نیز در بذر فراهم کنند.

کاربردهای بذره‌های مصنوعی در ازدیاد گیاهان :

- ۱- تکثیر دورگه‌های مصنوعی مانند دورگه‌های پروتوپلاست.
- ۲- حفظ و ذخیره ژرم پلاسما.
- ۳- تکثیر گیاهان حاصل از دستکاری ژنتیکی.
- ۴- ازدیاد ژنوتیپ‌های ناپایدار، عقیم و یا دارای باروری کم.
- ۵- تکثیر گیاهانی که بذور حقیقی تولید نمی‌کنند و یا بذور آنها جوانه نمی‌زند.

مراحل تولید بذر مصنوعی :

- ۱- کشت ریزنمونه در محیط درون شیشه‌ای.
- ۲- تشکیل کالوس جنین‌زا در محیط جامد.
- ۳- تکثیر سلول و تولید انبوه جنین در کشت سوسپانسیون.
- ۴- تیمار جنین‌ها با اسیدآبسیزیک جهت تحریک رکود و القای مقاومت به خشکی.
- ۵- آبیگری و کاهش رطوبت داخلی جنین.
- ۶- پوشش دار کردن جنین.
- ۷- قرار دادن پوسته مکمل.

مراحل ریزازدیادی :

محیط کشت دو وظیفه مهم دارد : **اول** تأمین مواد غذایی ضروری برای تداوم رشد ریزنمونه ها و **دوم** هدایت رشد و نمو از طریق کنترل هورمونی .

۱- استقرار :

عوامل مؤثر در موفقیت استقرار یک ریزنمونه در محیط کشت شامل : **گزینش ریزنمونه ، حذف میکروارگانیزمهای آلوده کننده ، شرایط کشت (نور ، دما ، مواد محیط کشت)** و... میباشد .

گزینش ریزنمونه ها اهمیت بیشتری دارد زیرا به عنوان مثال ریزنمونه های جوانتر از بافتهای مسن و بالغ تر و یا جوانه های گل و گل آذین نارس و ... بهتر باززایی می شوند .

نوع مواد محیط کشت نیز مؤثر است مثلاً تشکیل شاخساره های جانبی به غلظت کم اکسین و سایتوکینین نیازمند است و یا تولید کالوس به مقادیر زیاد اکسین همراه با مقادیر کم سایتوکینین نیاز دارد .

دما و نور معمولاً برای استقرار اهمیت چندانی ندارد .

۲- تکثیر :

این مرحله شامل **افزایش مواد ازدیادی** به منظور ریشه زایی بعدی آنها در مرحله گیاهچه ای در محیط جدید است . موفقیت در این مرحله شامل تولید گیاهچه های یکنواخت و بدون ریشه با اندازه مناسب است در این مرحله بیشتر از **محلول رقیق آگار** استفاده می شود .

استفاده از نسبت مناسب تنظیم کننده های رشد در تولید نوع ازدیادی مؤثر است مثلاً برای تولید شاخساره های نابجا نسبت مساوی و کم اکسین و سایتوکینین ، برای تولید شاخساره های جانبی با حداقل کالوس غلظت زیاد سایتوکینین و کم اکسین (نسبت ۱۰۰ به ۱) لازم است .

۳- پیش انتقال :

این مرحله شامل **آماده سازی گیاهچه ها برای انتقال و استقرار در خارج محیط مصنوعی** و سر بسته است . در این مرحله شرایط به نحوی تغییر می کند که آغازیدن ریشه و طویل شدن شاخساره صورت گیرد مثلاً غلظت

سایتوکنین کم و اکسین زیاد می شود . از عوامل مؤثر در ریشه زایی تنش آبی ، زغال فعال ، اکسیژن ، نور ، کاهش PH ، کاهش غلظت نمکهای معدنی و ... می باشند . ویتامین D و اکسین اثر سینرژیک در تحریک ریشه زایی دارند . در برخی موارد موادی مانند پوتوسین ، پلی آمین و.... برای تحریک ریشه زایی لازم است . قند در محیط ریشه زایی از اهمیت زیادی برخوردار است . در محیط جامد آگار تارهای کشنده تشکیل نمی شوند .

ع- انتقال :

عبارت است از مرحله انتقال گیاهچه ها از محیط کشت مصنوعی به محیط اتوتروپی گلخانه و سرانجام محیط طبیعی می باشد . لازم است گیاهچه ها دوره سازش یا خوگیری را طی نموده تا قادر به بقا باشند زیرا گیاهچه ها در مطلوبترین شرایط دمایی ، غذایی ، عدم آلودگی ، رطوبت و قرار داشته و ضعیف ، ترد و شکننده میباشند .

برای خوپذیری قبل از انتقال بایستی به مرور رطوبت نسبی شرایط درون شیشه ای را کاهش داد ، تشعشع و دما را پایین آورد و توسعه تارهای کشنده در شرایط درون شیشه ای را می توان با قرار دادن ریشه ها در محیط کشت مایع بهبود بخشید .

شیشه ای شدن در ریزازدیادی :

در این حالت معمولاً همراه با آبکی شدن ، نیمه شفاف و اغلب متورم شدن ساقه و برگهای گیاهچه که یک مشکل عمومی در ریزازدیادی است که می تواند در شدتهای مختلف اتفاق بیافتد . به عنوان مثال برگهای شیشه ای شده فاقد طبیعی و دارای مزوفیل با فضای بین سلولی بزرگتر می باشند و لایه کوتیکول این برگها بسیار نازک و دارای روزنه های کمتری می باشند .

کارهایی مانند کاهش بخار آب ، اتیلن ، کلرید آمونیوم ، تنظیم کننده های رشد باعث کاهش شیشه ای شدن می گردد .

شیشه ای شدن همیشه نامطلوب نیست مثلاً در صنوبر کشت هایی که حداقل ۲۴ روز در آب غوطه ور بودند و شیشه ای شده بودند جوانه های بیشتری از سایر مواد داشتند .

ناهنجاری در گیاهان حاصل از ریزازدیادی :

کشت درون شیشه ای چون هزینه بر است بنابراین بایستی تغییرات نامطلوب در مواد ازدیادی به حداقل برسد .

از جمله ناهنجاری های گیاهان ناشی از ریزازدیادی :

- ۱- تغییرات آناتومیکی ، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در گیاهان به دلیل از بین رفتن بافتهای شیمر ، تغییر در تعداد و جابجایی کروموزومی و جهشهای هسته ای و سیتوپلاسمی .
- ۲- تغییرات در تعداد و مورفولوژی برگها ، پیچ خوردن پهنک برگ ، از بین رفتن رنگیزه و ابلقی .
- ۳- وجود یا عدم وجود کرک در اندامها ، پاکوتاهی .
- ۴- تغییرات مورفولوژیکی ، زائل شدن قدرت باروری ، عدم تولید گل و تغییر زمان گلدهی .

دلیل بسیاری از ناهنجاریهای گیاهان حاصل از ریزازدیادی شرایط کشت به ویژه مواد تشکیل دهنده آن است مثلاً سایتوکینین که برای انگیزش شاخساره به کار می رود ممکن است باعث ناهنجاریهایی مانند کاهش ریشه‌دهی یا تولید گیاهان پاکوتاه (عادت به رزت) شود .

فصل ۷

کشت کالوس

کالوس زایی :

کالوس توده‌ای از سلولهای پارانشیمی بی شکل با دیواره سلولی نازک است که در محل‌های زخمی شده گیاهان در شرایط طبیعی و یا ریزنمونه‌ها در کشت درون شیشه‌ای تشکیل می‌گردد. تقسیم سلولی در سراسر توده کالوس اتفاق نمی‌افتد و محدود به قسمتهای خارجی شده و قسمتهای میانی کالوس به صورت بافت پیرتر در می‌آیند و همزمان با رشد توده کالوس مراکز مریستمی فعال نیز تشکیل می‌شوند.

اهمیت تشکیل کالوس :

- ۱- مرحله اساسی در کشت درون شیشه‌ای بسیاری از بافتها و سلولی گیاهی و برخی روشهای مهندسی ژنتیک است.
- ۲- کالوسهای تشکیل شده در کشت درون شیشه‌ای تکثیر شده و باعث اندام زایی و یا جنین زایی رویشی شده و قابلیت تبدیل شدن به گیاه کامل را دارند.
- ۳- کالوس به عنوان بافت هدف برای دستکاریهای ژنتیکی مورد استفاده قرار میگیرد و برای باززایی بافتهای تراریخت لازم است.
- ۴- کالوس نرم عموماً برای ایجاد کشت سوسپانسیون سلولی استفاده می‌شود.

انواع کالوس :

تنوع کالوس تحت تاثیر بافت والدی ریزنمونه، سن کالوس و شرایط رشدی می‌باشد.

- ۱- **از نظر رنگ :** کالوسهای تیره، کالوسهای روشن.
 - ۲- **از نظر بافت :** کالوسهای نرم، ترد و شکننده مثل هویج و کالوسهای سفت و متراکم مثل آنتوریوم
 - ۳- **از نظر جنین زایی :**
- ➡ **کالوسهای جنین زا :** رشد آهسته و تدریجی کمتری دارند و دارای ظاهری سازمان یافته، صاف و رنگ سفید بوده و واکنش زیادی به باززایی نشان می‌دهند.

✚ کالوسهای غیر جنین زایی: رشد سریعتر، تردی بیشتر، ظاهری بلوری و زرد تا قهوه ای دارند و قادر به ایجاد جنین رویشی نمی باشند.

بافت کالوس توده ای **یکنواخت نیست** بلکه مخلوطی از نواحی سفت و نرم، حاوی نواحی گره ای تا سازمان یافته، ریشه و ساقه ها و می باشد. **دلیل این غیر یکنواختی** وجود شیب مواد غذایی، مواد تنظیم کننده رشد و گازها بین توده سلولهای کالوس است.

استقرار کشت کالوس:

برای موفقیت در تثبیت کشت کالوس ۴ موضوع مهم وجود دارد:

- ۱- **انتخاب مواد مادری مناسب:** به گیاهچه ها و گیاهان قوی و سالم نیاز است.
- ۲- **انتخاب ریزنمونه و روش تهیه:** ریزنمونه ها در شرایط استریل و توسط ابزار ضد عفونی شده از ماده گیاهی برتر جدا می شوند.
- ۳- **محیط های کشت و شرایط رشدی مورد نیاز:** بافت کالوس عموماً در محیط کشت جامد مناسب حاوی ۱۰-۶ گرم در لیتر آگار پس از ۲-۳ هفته ابتدا به صورت نقاط برجسته در اطراف محل برش خورده تشکیل می شوند.
- ۴- **بهینه سازی شرایط کشت:** در صورت عدم تشخیص محیط بهینه برای تشکیل کالوس بهتر است از **محیطهای استاندارد MS یا LS** که غنی از نیترات، آمونیوم و فسفات هستند استفاده شود و با غلظتهای متغیر اکسین و سایتوکینین آزمایش گردد.

کشتهای کالوس معمولاً در دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتیگراد، شدت نور کم فلورسنت و تناوب ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری می شوند.

مراحل رشد کالوس و واکشت:

رشد بافت کالوس همانند موجودات تک سلولی به شکل منحنی سیگموئیدی (S شکل) و دارای ۵ مرحله است:

- ۱- **فاز تاخیر:** سلولها جهت تقسیم آماده می شوند.

۲- فاز تصاعدی : تقسیم سلولی و رشد کالوس به صورت تصاعدی افزایش می یابد و بیشترین تقسیم سلولی در این مرحله است .

۳- فاز خطی : تقسیم سلولی کاهش یافته و سلولها بیشتر از اندازه بزرگ می شوند .

۴- فاز کند : کاهش تدریجی رشدونمو کالوس .

۵- فاز سکون : رشد متوقف ، تعداد سلولها ثابت می باشد .

کاهش رشد کالوس به دلایل ذیل میباشد :

- ۱- تخلیه مواد غذایی محیط
- ۲- خشک شدن آگار
- ۳- تولید ترکیبات سمی توسط سلولها
- ۴- کاهش اکسیژن در داخل بافت کالوس می باشد .

در شروع مرحله سکون واکشت کالوس به دلایل ذیل لازم است :

- ۱- کاهش یا تخلیه عناصر غذایی به دلیل مصرف توسط نمونه های گیاهی .
- ۲- افزایش پتانسیل اسمزی به دلیل کاهش آب محیط و افزایش تبخیر و تعرق .
- ۳- پر شدن محیط کشت توسط نمونه گیاهی .
- ۴- تغییر نیاز غذایی و هورمونی نمونه گیاهی .
- ۵- تجمع برخی مواد سمی مانند ترکیبات فنلی در محیط کشت .
- ۶- کاهش PH محیط کشت و رقیق شدن آگار .

تعیین وضعیت رشد کالوس :

۱- وزن تر و خشک

۲- قابلیت زیست : بررسی سرعت رشد و تعداد سلولهای زنده بافت کالوس .

۳- شاخص میتوزی : عبارت است از درصد سلولهایی که در فاز میتوزی و در حال تقسیم هستند .

۴- شمارش تعداد سلولها : به کمک دستگاه هموسیتمتر .

۵- کیفیت ظاهری : با تخمین قطر و رنگ کالوس میتوان ارزیابی نمود که در صورت نامناسب بودن محیط کشت رشد کالوس کند بوده و رنگ آن قهوه ای می شود .

باززایی گیاهان از کالوس :

توده های سلولی پاراننشیمی را در حالت اندام زایی ، **مریستموئید** (شبه مریستم) و در حالت جنین زایی را **شبه جنین** (جنین زا) می گویند .

۱- جنین زایی :

جنین های غیر جنسی در شرایط درون شیشه ای از سلولهای واحد و یا گروهی از سلولها از انواع مختلف **بافت های گامتوفیت** (جنین نر زا یا آندروژنیک از کشت میکروسپورها و جنین ماده زا یا مگاسپورها) و یا **رویشی** (بافت رویشی یا توده کالوس) بوجود می آیند و می توانند باززا شده و گیاه کامل را بوجود آورند . همه سلولها توانایی تبدیل شدن به جنین را ندارد و فقط گروه کوچکی به نام سلولهای جنین زا وجود دارند .

با توجه به منشأ سلولهای جنین زا دو نوع جنین زایی رویشی وجود دارد :

۱-۱- جنین زایی مستقیم :

تولید جنین رویشی به طور مستقیم از سلولهای ریزنمونه و بدون گذر از مرحله کالوس است . مانند بافت خورش ارقام چند جنینی مرکبات ، پوشنیه غلات ، تخمکهای انگور و ...

۱-۲- جنین زایی غیر مستقیم :

ابتدا پرآوری کالوس از ریزنمونه قبل از تمایز زایی جنین می باشد . **تنظیم کننده های رشد** نقش مهمی در القای این مرحله دارند .

در بافت کالوس سلولهای جنین زایی که از آنها جنین بوجود می آید دارای اندازه کوچک ، هسته بزرگ ، سیتوپلاسم متراکم ، واکوئل کوچک و مملو از دانه های نشاسته می باشند . **بخشهای مختلف گل و بافت های مختلف گل و بافت های زایشی** بهترین منبع تهیه ریزنمونه ها برای جنین زایی رویشی هستند .

اکسین و نیتروژن نقش اساسی در جنین زایی رویشی دارند. اولین مرحله قابل تشخیص در جنین زایی، مرحله کروی شدن است. تقریباً ۲۱-۱۸ روز پس از القای جنین زایی می توان گیاهچه های کوچک را مشاهده نمود. اکسین برای القای جنین ضروری است ولی برای تشکیل جنین و نمو بعدی آن مضر است به استثنای خانواده گندمیان.

جنین زایی معمولاً در دو مرحله صورت می گیرد:

➤ **مرحله آماده سازی :** شامل یک دوره تشکیل کالوس و انگیزش سلولهای دارای قابلیت جنین زایی در حضور غلظت های بالای اکسین است.

➤ **مرحله انگیزش :** شامل نمو توده های جنین زا به جنین در غیاب اکسین و یا مقدار کم آن است.

۲-اندام زایی :

با کشت ریزنمونه های بافتهای گیاهی در شرایط عاری از آلودگی و با تغییر غلظت مواد تنظیم کننده رشد در محیط کشت مناسب، اندام مورد نظر تشکیل می شود. در بیشتر موارد ابتدا **ساقه زایی** (کالوژنز) صورت گرفته سپس ساقه های تمایز یافته برای **ریشه زایی** (ریزوژنز) به محیط ویژه دیگر منتقل می شوند. اندام زایی عمدتاً به منبع ریزنمونه و مواد تنظیم کننده رشد بستگی دارد.

دستکاری ژنتیکی کالوس :

کشت کالوس یکی از مراحل مهم در فرآیند دستکاری ژنتیکی گیاهان است. سلولهای کالوس به عنوان منبع دستکاری از طریق بمباران ذره ای و آگروباکتریوم مورد استفاده قرار می گیرند. در بیشتر موارد، پس از دستکاری ژنتیکی و قبل از تمایزیابی ساقه ها، ریشه ها و یا جنین ها در طی القای باززایی گیاه، کالوس تشکیل می شود.

برای دستکاری ژنتیکی **دو لپه ایها** توسط **آگروباکتریوم** از ریزنمونه های ضد عفونی شده برگها ، لپه ها ، ساقه ها ، بذور جوانه زده و کشت های کالوس استفاده می شود . در بیشتر موارد از کالوسهای حاصل از بافتهای جنین زای گیاهان تک لپه (مانند ذرت) برای دستکاری ژنتیکی مستقیم از طریق بمباران ذره ای استفاده میشود .

تنوع سوماکلونال :

تفاوت در اجزای تشکیل دهنده محیط های کشت باززایی گیاهان ، نتایج متفاوتی در ژنوتیپ ها و فنوتیپهای گیاهان باززا شده می توانند باعث شوند که به این پدیده **تنوع سوماکلونال** می گویند . **منشاء و نحوه وقوع تنوع** بستگی به گونه گیاهی و بافت مورد استفاده در ریزنمونه ها دارد .

تنوع سوماکلونال را می توان به دو دسته طبقه بندی کرد :

۱- تغییرات ژنتیکی :

شامل تغییرات دائمی در ژنوم گیاه است که به ایجاد گیاهان با ژنوتیپ جدید منجر می شود که برخی مانند تغییر شکل برگ و یا گیاه فاقد کلروفیل (ابلقی) به آسانی قابل تشخیص هستند .

فرآیندهای مولکولی زیر مسئول تغییرات ژنتیکی مرتبط با تنوع سوماکلونال هستند :

۱-۱- تغییر در سطح پلوئیدی :

از متداولترین انواع تنوع سوماکلونال در اثر **تغییر در تعداد کروموزومها** است مانند پلی پلوئیدی ، آنیوپلوئیدی ، میکسوپلوئیدی که در اثر فرآیندهای غیر معمول در زمان تقسیم میتوز رخ می دهد . البته همیشه اینگونه نخواهد بود زیرا در یک محیط کشت سلولهای دیپلوئید نسبت به سایر سطوح پلوئیدی بهتر با شرایط باززایی سازگار شده و تشکیل مریستم از این سلولها محتمل تر است .

۳-۱- تغییرات ساختمانی در DNA هسته ای :

عامل اصلی ایجاد تنوع سوماکلونال است که می تواند محدوده وسیعی از سطح کروموزومی را دستکاری کند و شامل انواع تغییر ساختمانی کروموزوم مانند حذف شدگی ، وارونگی ، مضاعف شدن و جابجایی است . فعال شدن ترانسپوزون ها (عناصر جهنده) عامل دیگر تنوع سوماکلونال است . این عناصر قطعات متحرکی از DNA هستند که توانایی درج در نواحی کدکننده را دارند و موجب تخریب ژن می شوند .

۳-۱- نوک‌تریبی شیمی :

گیاهان باززا ممکن است ترکیب شیمی متفاوتی داشته و یا اصلاً شیمرباشند .

۲- تغییرات اپی ژنتیک :

این تغییرات اغلب دخالتی در تغییرات ژنوتیپ نداشته و قابل انتقال به نسل بعد نیستند و با تداوم ازدیاد رویشی باقی می ماند . تمایز دقیقی بین تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی نمی توان قائل شد . تغییرات اپی ژنتیک از متداولترین تغییرات فنوتیپی هستند مانند بازجوانی یا بازگشت به دوره نونهالی در گیاه که باعث جلو افتادن گلدهی و افزایش ریشه زایی نابجا می شود . تغییرات اپی ژنتیکی ممکن است در اثر متیله شدن DNA ، تقویت DNA و یا فعال شدن ترانسپوزون ها ایجاد شوند .

اهمیت و روشهای کاهش تنوع سوماکلونال :

مهمترین کاربرد تنوع سوماکلونال در اصلاح نباتات و افزایش تنوع ژنتیکی گیاهان است .

تغییرات سوماکلونال اغلب مطلوب نیستند زیرا باعث عدم یکنواختی کلونی ها در تکثیر به روش کشت بافت می گردند .

برای کاشت و یا اجتناب از تنوع سوماکلونال راههایی وجود دارد:

- ۱- کاشت تعداد واکشت ها در ریزازدیادی .
- ۲- ایجاد ریزنمونه های جدید در هر کشت و آغازش و ایجاد کلونی .
- ۳- اجتناب از به کار بردن 2-4-D در محیط کشت .

گزینش درون شیشه ای :

تغییرات سوماکلونال باعث شد تا از روشهای کشت درون شیشه ای برای ایجاد جهش و گزینش مستقیم جهش یافته های ژنتیکی حاوی خصوصیات مطلوب مانند **مقاومت در برابر عوامل نامساعد** از قبیل سرما ، خشکی ، شوری ، ترکیبات شیمیایی ، یونهای سمی ، عوامل بیماریزا و استفاده گردد .

فصل ۱۲

کشت جنین

کشت جنین :

عبارت از جداسازی جنین نارس یا رسیده از تخمک ، بذر و یا کپسول در شرایط استریل و قرار دادن آن در محیط غذایی مصنوعی مناسب جهت تولید گیاه کامل می باشد .

روشهای کشت جنین :

بر اساس مرحله نمو جنین ۳ نوع کشت جنین وجود دارد :

۱- کشت جنین ناقص :

جنین ناقص بین مرحله پیش جنینی تا جنین قلبی شکل قرار دارد و از تخمک جداسازی و کشت می شود و اغلب هدف ، مطالعه مراحل تمایز و نیازهای غذایی جنین در حال رشد است .

۲- کشت جنین نابالغ :

این نوع جنین بین مرحله قلبی شکل تا نیمه اندازه نهایی است و از بذر نارس اغلب بدست می آید و هدف ، جلوگیری از سقط جنین به منظور یک گیاه زنده است .

۳- کشت جنین بالغ :

جنین بالغ جنینی است که لپه های آن به اندازه کامل رسیده و اغلب از بذر بدست می آید و برای حذف موانع جوانه زنی بذر استفاده می شود .

جداسازی و کشت جنین :

معمولاً در کشت جنین مشکل ضدعفونی وجود ندارد زیرا جنین در یک محیط عاری از عوامل میکروبی نمو می یابد و فقط لازم است میوه ، بذر و یا کپسول حاوی جنین قبل از جداسازی ضدعفونی سطحی شود .

جداسازی جنین در بذور ریز بایستی زیر میکروسکوپ و به کمک ابزار بسیار حساس و دقیق صورت گیرد تا آسیبی به جنین وارد نشود. در مواردی که جداسازی جنین به تنهایی مشکل باشد، می توان از کشت تخمدان یا تخمک به همراه جنین استفاده کرد.

عوامل مؤثر در کشت جنین :

۱- ژنوتیپ :

در برخی گونه های گیاهی رشد جنین آسان و در برخی مشکل است .

۲- شرایط رشدی گیاه مادری :

بهبود رشد گیاه مادری در شرایط کنترل شده ، معمولاً منجر به نمو بهتر آندوسپرم و در نتیجه رشد بهتر جنین جدا شده می گردد .

۳- مرحله نمو جنین :

جنین های کوچک و تمایز نیافته معمولاً در محیط درون شیشه ای رشد نمیکنند .

۴- ترکیب محیط کشت :

جنین نابالغ نسبت به بالغ به محیط کشت پیچیده تری نیاز دارد . معمولاً از یک محیط کشت جامد با $PH=5-6$ استفاده می شود . محیط کشت مونیر که دارای مقادیر بالای پتاسیم و کلسیم بوده و میزان آمونیوم و آهن در آن کاهش یافته مناسب کشت جنین است که غلظت عناصر کم مصرف دو برابر محیط MS است .

میزان نیاز به قند با بزرگتر شدن جنین کاهش می یابد و معمولاً در کشت جنین از هورمونهای اکسین و سایتوکینین استفاده نمی شود (مگر هدف تولید کالوس باشد) . استفاده از اسید جیبرلیک در غلظتهای پایین (۰.۱ میلیگرم در لیتر) باعث تسریع رشد جنین بدون تحریک جوانه زنی می شود بخصوص هنگامی که دوره رکود وجود دارد . غلظت آگار در محیط کشت جامد معمولاً بین ۰.۸-۰.۶ درصد میباشد . وجود اسید آمینه مخصوصاً گلو تاتیون و آسپارژین برای رشد جنین نابالغ ضروری است .

۵- شرایط نگهداری کشت :

درجه حرارت مطلوب برای نگهداری کشت بسته به گونه گیاهی معمولاً بین ۲۸ - ۲۲ درجه سانتیگراد است و برای شکستن دوره رکود نیاز به دمای پایین ۴ درجه سانتیگراد می باشد . گاهی اوقات لازم است جنین های کشت شده به مدت ۲ - ۱ هفته در تاریکی نگهداری شوند و به منظور تشکیل کلروفیل در روشنایی قرار گیرند . گاهی نیاز کشت جنین به اکسیژن بیش از غلظت آن در هوا است .

تکنیک نشای جنین :

تکنیک جداسازی جنین یک گونه در شرایط آزمایشگاهی و قراردادادن آندوسپرم گونه دیگر در اطراف آن که باعث می شود جنین به راحتی رشد کند را **تکنیک نشای جنین** گویند . مثلاً در جو

اهمیت و کاربردهای کشت جنین :

مهمترین موارد استفاده از کشت جنین عبارتند از :

۱- مطالعات بیولوژیکی :

مطالعه فرآیندهای متابولیکی و شیمیایی مانند رکود ، جوانه زنی بذر ، رشد اندامهای اولیه (ریشه چه و ساقه چه) و در زمانیکه جنین در داخل محفظه تخمک یا تخمدان و بذر قرار دارد مشکل است که بنابراین از کشت جنین استفاده می شود .

۲- رفع موانع جوانه زنی بذر :

گاهی به دلیل ناقص بودن جنین ، جوانه زنی طبیعی بذر امکان پذیر نیست مانند موز وحشی ، گوش فیل و....

۳- تکثیر گیاهان انگلی :

گاهی جوانه زنی بذر بدون انگلهای اجباری امکان ندارد ولی باکشت جنین این کار عملی می شود مثلاً بذر ارکیده که بسیار ریز است بدون همزیستی با نوعی قارچ رایزوکتینیا در شرایط طبیعی جوانه زنی نخواهد داشت .

۴- کوتاه کردن دوره اصلاحی :

گاهی عواملی مانند پوسته سخت بذر ، آندوسپرم ، کندی جذب آب و اکسیژن باعث میگردد تا جوانه زنی انجام نشده و باعث افزایش دوره اصلاحی گیاه می گردد که با کشت جنین این موارد مرتفع میشود .

۵- تولید گیاهان هاپلوئید :

به عنوان مثال در **تلاقی بین دو جوی معمولی و بولبوزوم** پس از عمل لقاح کروموزومهای گونه بولبوزوم حذف شده در نتیجه جنین هاپلوئید جو باقی می ماند که با کشت درون شیشه ای جنین ، گیاه هاپلوئید بوجود می آید .

۶- جلوگیری از سقط جنین در بذور طبیعی :

مثلاً در بذور طبیعی حاصل از تلاقی درختان هسته دار زودرس مانند هلو ، گیلان ، زردآلو ، آلو ، انتقال آب و مواد غذایی به جنین های نارس قطع شده و باعث سقط جنین می شود که با کشت جنین این درختان از سقط جنین بذور آن جلوگیری می شود .

۷- جلوگیری از سقط جنین در اثر ناسازگاری :

در تلاقی بین گونه ها و جنسهای دور و همچنین گیاهان با سطح پلوئیدی متفاوت ، آندوسپرم غالباً رشد نکرده که باعث سقط جنین می شود و اجتناب از این پدیده فقط با تکنیک کشت جنین امکان پذیر است .

۸- ذخیره ژرم پلاسما :

گاهی حتی اگر نمو جنین و جوانه زنی طبیعی آن نیز مشکل نباشد ولی بدلیل بزرگ بودن بذر مثل نارگیل جهت حفظ ژرم پلاسما نیاز به کشت جنین است .

۹- تکثیر غیرجنسی :

گاهی جنین های جدا شده به عنوان ریزنمونه برای تشکیل کالوس یا جنین سوماتیکی مورد استفاده قرار میگیرند مثلاً در غلات و مخروطیان . در این حالت جنین های جوان تر اغلب پاسخ بهتری به کشت می دهند .

فصل ۱۳

کشت آندوسپرم

آندوسپرم بافت اختصاصی است که اغلب در گیاهان گلدار از ادغام سه هسته هاپلوئید (یک گامتوفیت نر و دو گامتوفیت ماده) بدست می آیند بنابراین بافتی تریپلوئید است ولی در برخی نهاندانگان مانند تیره گل آویز، آندوسپرم دیپلوئید است. معمولاً غیرفعال شدن آندوسپرم یا عدم وجود آن موجب سقط جنین میگردد.

اهمیت کشت آندوسپرم:

- ۱- کشت آندوسپرم بهترین منبع تولید گیاهان تریپلوئید است و جایگزینی مناسب برای تلاقی بین تتراپلوئیدها و دیپلوئیدها می باشد.
- ۲- کشت آندوسپرم سیستمی عالی برای مطالعات مورفوزنیکی است زیرا هم بافتی تریپلوئید است و هم توده ای همگن از بافت پارانشیمی است که در آن تمایز عناصر آوندی وجود ندارد.
- ۳- کشت آندوسپرم سیستمی ایده آل برای مطالعه متابولیسم موادی مانند نشاسته، پروتئین و چربی است زیرا مقدار زیادی از این مواد را دارا می باشد.

جداسازی و کشت آندوسپرم:

آندوسپرم ممکن است بصورت بالغ یا نابالغ جداسازی و کشت شود.

برای کشت آندوسپرم بالغ، آندوسپرم و جنین در شرایط استریل جداسازی و کشت می شوند و برای آندوسپرم نابالغ، بذره‌های ضدعفونی شده، بافت آندوسپرم به کمک استروسکوپ جدا شده و بصورت جدا از جنین کشت می شود زیرا اگر جنین جدا نشود کالوس حاصل از آندوسپرم (تریپلوئید) با کالوس حاصل از جنین (دیپلوئید) مخلوط می گردد.

نقش جنین در ازدیاد آندوسپرم بالغ قابل تأمل است زیرا برخی عوامل حاصل از جوانه زنی جنین برای فعالیت آندوسپرم بالغ ضروری هستند مانند جریان مواد شبه جیبرلین از جنین به آندوسپرم در زمان جوانه زنی جنین که باعث سنتز یا فعال سازی آنزیمهای اصلی جوانه زنی می شوند.

عوامل مؤثر در کشت آندوسپرم :**۱- ژنوتیپ :**

گیاهانی که بهترین پاسخ را به این نوع کشت داده اند اغلب از خانواده فرفیون ، صندل ، دارواش هستند .

۲- مرحله نمو آندوسپرم :

مثلاً آندوسپرم غلات در صورتی تکثیر می یابد که یک دوره نموی مناسب پس از گرده افشانی گذرانده باشد که این دوره در گیاهان مختلف ، متفاوت است .

۳- ترکیب محیط کشت :

از انواع محیطهای کشت پایه مانند MS , B5 , DCR ، وایت ، اینچ برای کشت آندوسپرم استفاده شده است. در اغلب گیاهان ساکارز با غلظت ۲-۴ درصد باعث بهترین رشد در کالوس آندوسپرم میگردد و مواد شبه سائیتوکنینی در عصاره گوجه فرنگی عامل تحریک کالوس زایی آندوسپرم در برخی مواقع است .

۴- شرایط فیزیکی :

نور ، درجه حرارت ، PH محیط کشت ، مهمترین عوامل فیزیکی مؤثر رشد آندوسپرم در کشت درون شیشه ای هستند . مثلاً آندوسپرم کیوی و ذرت در تاریکی و آندوسپرم کتان تحت تأثیر نور رشد بهتری دارند .

تشکیل کالوس :

به عنوان نمونه در محیط درون شیشه ای حاوی 2-4-D ، کینتین و عصاره مخمر ، پرآوری آندوسپرم بالغ ذرت ۱۰-۱۲ روز پس از تلقیح شروع می شود و اگر جنین در این مرحله برداشته شود ، پرآوری و تکثیر به سراسر بافت آندوسپرم کشیده میشود و بدین ترتیب پس از چند روز توده ای از بافت کالوس تولید می شود .

اندام زایی :

القای اندام زایی همواره یک مشکل جدی در کشت آندوسپرم بوده است . برای اولین بار شکل گیری اندام هوایی از آندوسپرم در مورد درختچه ای به نام **بالارت گیلانی** به وسیله جواهری و بوجوانی در سال ۱۹۶۵ بوده است .

تشکیل جوانه ها مستقیماً بر روی آندوسپرم و یا ابتدا سلولهای آندوسپرم به توده کالوس تکثیر شده سپس اندام زایی صورت می گیرد و برای تمایز جوانه ساقه از بافت آندوسپرم اغلب وجود **سایتوکنین برون زاد** ضروری است. مثلاً در کشت آندوسپرم کیوی، تیدیازرون TDZ تنها سایتوکنین محرک اندام هوایی است.

در **گیاهان اتوتروف**، اندام زایی از بافت آندوسپرم معمولاً بطور غیرمستقیم و از طریق توده کالوس صورت میگیرد.

جنین زایی:

گاهی در کشت آندوسپرم، بسته به ژنوتیپ گیاه مادری و ترکیب محیط کشت گیاهان تریپلوئید از طریق جنین زایی سوماتیکی نمو می یابند که ممکن است مستقیماً بر روی بافت آندوسپرم و یا بطور غیرمستقیم از طریق کالوس جنین زا تولید شود.

کاربردهای کشت آندوسپرم:

- ۱- تولید گیاهان تریپلوئید مانند گیاهان مهم اقتصادی تریپلوئید شامل سیب، موز، چغندر قند، گردو، پرتقال، هندوانه، چای و
- ۲- عدم در دسترس بودن گیاهان تتراپلوئید برای تولید تریپلوئیدها.
- ۳- عدم تولید بذر در گیاهان تریپلوئید جهت تکثیر.
- ۴- توانایی حمایت از رشد جنین های جوان (به ویژه جنین های هاپلوئید).
- ۵- استفاده به عنوان بافت پرستار برای تغذیه و افزایش بقای جنین های سوماتیک حاصل از نرزاری یا ماده زایی.
- ۶- استفاده جهت بررسی مسیرهای بیوسنتزی و استخراج برخی از محصولات طبیعی مثل نشاسته، پروتئین، چربی و متابولیت های ثانویه.

کشت بذری عملی :**۱- شستشوی اولیه بذری زیر شیر آب****۲- زیر لامنیار :**

✚ شستشو به مدت ۱ دقیقه با الکل ۷۰٪

✚ شستشو ۳ بار با آب مقطر استریل

✚ شستشو با هیپوکلریت سدیم یا کلسیم ۱۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه

✚ شستشو ۲ بار با آب مقطر استریل

✚ کشت بذری در محیط کشت هر نفر ۵ محیط

✚ پس از کشت درب ظروف با پنبه ، فویل آلومینیوم ، پارافیلیم بسته شود

✚ انتقال به اتاقک رشد

کشت جنین عملی : کشت جنین مرکبات همراه بذری و یا به تنهایی انجام می شود .**۱- شستشوی اولیه بذری زیر شیر آب****۲- زیر لامنیار :**

✚ شستشو با الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه

✚ سه بار آب مقطر استریل شستشو داده می شود

✚ قرار دادن در هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه

✚ شستشو با آب مقطر استریل ۳ بار

✚ حذف پوسته رویی بذری

✚ کشت تعدادی درون لوله آزمایش

✚ برخی از بذرها حذف لپه ها و کشت جنین به تنهایی

✚ انتقال به اتاق رشد