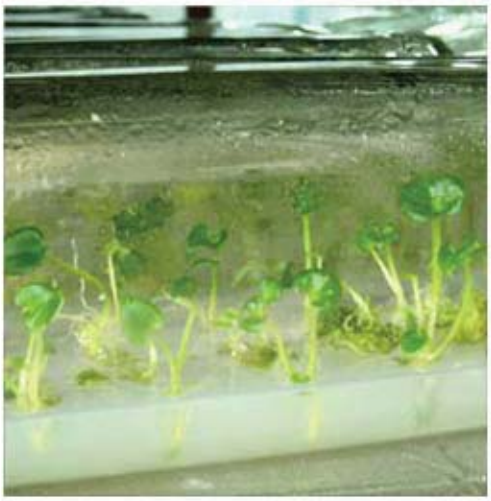
معاونت خدمات شهری
سازمان پارکها و فضای سبز شهر تهران

کشت سلول و بافت گیاهی



معاونت آموزش و پژوهش

بسم الله الرحمن الرحیم

تهیه explants یا جداکشت

گیاهی که از آن به عنوان جداکشت استفاده می شود باید سالم، بدون بیماری و آفت باشد . گیاهی که خشبی نشده به کشت بهتر جواب می دهد.

برای آنکه گیاه به مرحله بلوغ برسد ، ۳ مرحله را باید طی کند:

الف) مرحله نونهالی یا Juvenity ب) مرحله انتقال یا بینابینی ج) مرحله بلوغ یا Maturity

از طرفی مسن شدن به دو گونه تعریف می شود:

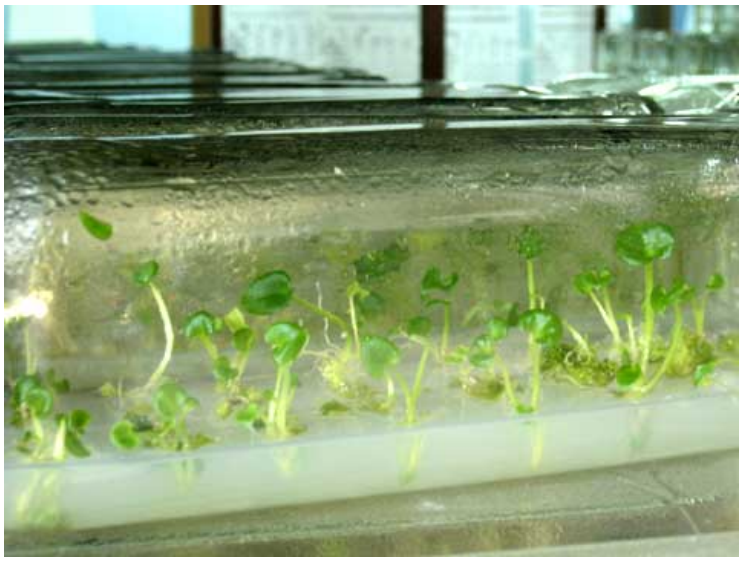
- مسن شدن سنی Cronological aging
- مسن شدن فیزیولژیک Physiological aging

مسن شدن فیزیولوژیک در گیاهان مختلف فرق می کند. مثلاً در گیاه گردو ۱۰ سال طول می کشد تا پاجوش آن گل بدهد. خصوصیات گیاه در هر یک از ۳ مرحله بالا دو طی کشت بافت فرق می کند. مثلاً اگر گیاه در مرحله نونهالی باشد به راحتی ریشه می دهد.

لازم به ذکر است هر چه سن گیاه کمتر باشد و از قسمتهای جوان گیاه جداکشت تهیه شود، کشت بافت آن موفق تر است.

انواع کشت

۱- کشت سلول Cell culture : به کشت سلولها در محیط های مایع (بدون آگار) در ظرفهایی که معمولاً با تکان دادن تهویه می شوند، کشت سلولی گویند.



۲- کشت پروتوپلاست : به سلولهای گیاهی بدون دیواره سلولی، پروتوپلاست گفته می شود (دیواره سلولی با روشهای مکانیکی یا شیمیایی از سلول جدا می شود.) از کشت پروتوپلاست برای ایجاد تغییرات ژنتیکی ، هیبریداسیون سلولی استفاده می شود. علیرغم وجود مشکلات تکنیکی که استفاده از پروتوپلاست را در پاره ای از مطالعات محدود کرده است، در حال حاضر از پروتوپلاست در زمینه های تحقیقاتی متعددی به شرح زیر استفاده می شود:

الف) ایجاد پیوند پروتوپلاستی بین دو یا چند سلول و تهیه گیاهان دورگ با کشت پروتوپلاستهای متحد شده، در برخی مواردی که به دلیل ناسازگاری جنسی و یا فیزیکی امکان تهیه گیاه دورگ با روشهای ژنتیکی معمولی میسر نیست می توان با روش پیوند پروتوپلاست نسبت به ایجاد گیاهان دورگ اقدام نمود.

ب) وارد کردن موادژنتیکی خارجی به داخل سلول پس از حذف دیواره سلولی، پروتوپلاست مجزاشده می تواند با فرآیندی مشابه با فرآیند آندوسیتوز در بعضی از سلولهای جانوری مواد خارجی را به داخل سیتوپلاسم جذب نماید. با اسفاده از این روش می توان اندامکهایی مانند کلروپلاست ، میتوکندری ، DNA، پلاسمید و ... را وارد پروتوپلاست کرد.

ج) مطالعه نحوه سنتز و ترشح دیواره سلولی. پروتوپلاست کشت شده به سرعت دیواره سلولی تشکیل می دهد.

۳- **کشت گرده و تخمک** : از این روش برای تولید گیاهان هاپلوئید در شرایط invitro استفاده می شود . هدف از کشت بساک یا گرده تولید گیاهان هاپلوئیدی از راه تحریک تولید جنین از تقسیمات دانه های گرده نابالغ می باشد. سلولهای گیاهان هاپلوئید دارای مجموعه کاملی از کروموزمهای تکی است . کروموزمهای منفرد این هاپلوئیدها را می توان با استفاده از کلشی سین به صورت دوبل درآورد و در نتیجه دیپلوئیدهای هموزیگوت بارور تولید می شوند. با استفاده از کلشی سین گیاه 2n را می توان 4 n کرد.

٤- کشت تک جوانه Single node : منظور از کشت تک جوانه ، جداکردن یک جوانه به همراه قسمتی از شاخه به منظور تشکیل ساقه از طریق نمو جوانه است. این روش طبیعی ترین روش تکثیر رویشی گیاهان در invitro می باشد . هر جوانه ای در محور برگ مشابه با جوانه نوک شاخه، می توان روی محیط کشت رشد داده شود.

٥- کشت رأس شاخه Shoot tip culture : رأس شاخه یا قسمت انتهایی ساقه در واقع شامل هر سیستم انتهایی ساقه همراه با چندین پریموردیوم برگهای مجاور می باشد. از این روش برای تکثیر در سطح وسیع استفاده می شود.

٦- کشت مریستم : تنها نقطه ای در گیاه که عاری از آلودگی ویروسی است، مریستم می باشد. چرا که سرعت و قدرت تقسیم در مریستم به حدی زیاد است که ویروسها فرصت تقسیم و رشد پیدا نمی کنند. کشت مریستم عمدتاً در گیاهان باغی مورد استفاده قرار می گیرد هر چند برای تعداد زیادی از گیاهان زراعی مثل سیب زمینی ، شبدر و تنباکو نیز از این روش استفاده شده است . گیاهان عاری از ویروس در برخی گونه ها مثل گیلاس ، تمشک و انگور نیز از طریق کشت مریستم به دست آمده است .

۷- کشت اندام و بافت : به کشت اندامها و بافتهای مختلف گیاهی نظیر بساک، تخمدان، آوند، ریشه .... در محیط های مغذی گفته می شود.

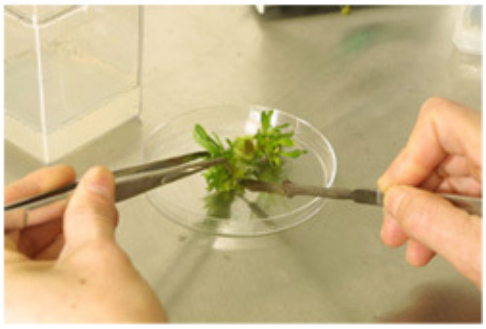
۸- کشت کالوس(یا توده های سلولی تمایز نیافته) : کشت قطعات جدا کشت گیاهان بر روی محیط های حاوی آگار که منجر به تولید توده های سلولی آمورف (بی شکل) می گردد را کشت کالوس گویند.
فرآیند ایجاد کالوس از یک قطعه گیاهی کشت شده را می توان به ۳ مرحله تکاملی تقسیم کرد: اول شروع تشکیل کالوس، دوم تقسیم سلولی، و سوم تکثیر و تمایز سلولهای کالوس. در مرحله تشکیل کالوس ، همزمان با آماده شدن سلولها برای تقسیم، متابولیسم سلولی افزایش می یابد.
یکی از عمده ترین مشکلات استفاده از کشت کالوس، ایجاد تنوع می باشد. استفاده عمده کشت کالوس در جایی است که بتوان سلولهای کالوس را از هم جدا نموده و آنها را جهت تمایز به جنین های سوماتیکی القاء نمود. از نظر ریخت شناسی این جنین ها شبیه جنین های بذری (زیگوتی) می باشند. اما برخلاف جنین های بذری ، جنین های سوماتیکی از لحاظ ژنتیکی شبیه گیاهان مادری می باشند. یعنی تفرق ژنتیکی وجود ندارد. نکته جالب توجه در این مورد، تولید بذر مصنوعی (سوماتیکی) می باشد که از طریق قرار دادن جنین های سوماتیکی در یک پوشش مناسب، تهیه می شوند.

۹- کشت جنین : استعداد گیاهان گلدار برای تولید جنین به تکامل سلول تخم بارور شده محدود نبوده بلکه در بافتهای رویشی کشت شده این گیاهان نیز می توان جنین ایجاد نمود. این پدیده برای نخستین بار در کشت سوسپانسیون سلولهای هویج توسط استوارد (Steward) و همکارانش گزارش شده است. امروزه معلوم شده است که تولید جنین یک پدیده عمومی در گیاهان عالی بوده و در بافتهای کشت شده بیش از ۳۰ تیره گیاهی، تولید جنین از سلولهای رویشی به طور تجربی میسر شده است.

۱۰- کشت جنین نارس : کشت جنین نارس به دست آمده از بذور دو کاربرد اصلی دارد. در بعضی موارد ناسازگاری بین گونه ها یا ارقام، بعد از تشکیل جنین اتفاق می افتد و منجر به سقط جنین می شود. چنین جنین هایی را در حالت نارس و قبل از سقط شدن می توان خارج کرده و در شرایط درون

شیشه ای آنها را رشد داد. در موارد دیگری ، به دلیل ریزش بذر پس از رسیدن و از دست رفتن آنها، بذر بالغ ایجاد نمی گردد یا اینکه بذور در حال تشکیل قبل از بلوغ توسط حمله آفات از بین می روند. کشت جنین نسبتاً ساده است. جنین، یک گیاه کامل مینیاتوری است لذا به تمایز مجدد نو ساقه یا ریشه نیازی نمی باشد.

بازززائی (Regeneration)



تکنیک های کشت بافت گیاهی به اندازه ای پیشرفت کرده است که با اجرای آن می توان گونه های گیاهی را در شرایط درون شیشه بازززائی و تولید نمود. سلولها، بافتها و اندامهای مختلف انتخاب شده از گونه های گیاهی متعدد را می توان به طور موفقیت آمیزی کشت کرد و از آنها گیاهان کامل تولید نمود. بدون بازززائی ، مطالعات رشد و تمایز ، تولید گیاهانی با اطلاعات ژنتیکی مختلف ، کشت بساک، تکثیر سریع گونه های گیاهی مطلوب ، حذف بیماریهای گیاهی با استفاده از کشت مریستم و بسیاری از مطالعات مربوط به تنظیم کننده های رشد انجام پذیر نخواهد بود. بازززائی و تولید گیاهان توسط کشت بافت را می توان به یکی از دو روش زیر انجام داد:

۱) رویانزائی سوماتیک، در اینجا اولین اصل، قطبی شدن سلول گیاهی است. به این صورت که تمامی واکوئل ها در یک قطب و تمامی میتوکندریها در قطب مقابل آن قرار می گیرند. از قطب بالایی که محل تجمع واکوئلهاست، شاخه و از قطب پائینی ریشه به وجود می آید. جنین زائی می تواند مستقیم یا غیر مستقیم باشد. در نوع مستقیم ، بدون تشکیل کالوس جنین زائی صورت می گیرد و در نوع غیرمستقیم، باتکشیل کالوس رویانزائی صورت می گیرد.

۲) اندامزائی، در این روش گیاه بدون جنین زائی به اندامزائی می رود و باید دانست در کشت بافت اگر اندامی نظیر ریشه یا شاخه به وجود آمد، این اندام نابجاست چون از مریستم به وجود نیامده است.

توجه: قابل توضیح است که رویانزائی سوماتیک با رویانزائی زیگوتی (تخمی) قابل مقایسه است ، به این صورت که در رویانزائی سوماتیک، رویان از سلولهای پیگیری یا جسمی به وجود می آید نه از سلول تخم.

کاربردهای کشت بافت

- در باغبانی

کاربرد های کشت بافت در باغبانی به شرح زیر است:

الف) ریزازدیادی یا Micropropagation ، برای این کار باید مراحل زیر را طی کرد:

۱) رفع آلودگی Disinfection ۲) تثبیت Establishment ۳) شاخه زائی

۳) ریشه زائی ۵) سازگاری با محیط

اولین مرحله در کشت بافت رفع آلودگی است به این معنی که قطعه جداکشت باید سترون گردد. بهترین روش استفاده از هیپوکلریدسدیم (وایتکس) است که باتوجه به نوع جداکشت (نوشاخه- ساقه- برگ...) از رقتهای مختلف وایتکس استفاده می شود.

سپس نمونه را چند بار (۲ تا ۳ بار) با آب مقطر استریل شستشو می دهیم. در ادامه نمونه ها را با کاغذ صافی استریل خشک کرده و در مرحله بعدی تثبیت جداکشت در محیط کشت انجام می گیرد. سپس ظروف نمونه های کشت شده را در اتاقک رشد قرار می دهیم (شدت نور و میزان دمای محیط در اتاقک رشد قابل تنظیم است). جداکشت پس از تثبیت در محیط شروع به شاخه زائی می کند . باید دانست که از همین شاخه ها نیز می توان به عنوان جداکشت استفاده کرد.

معمولاً ماهی یک بار نمونه ها واکشت می گردند (یعنی محیط کشت آنها عوض می شود). دلایل واکشت کاری عبارتند از : - به دنبال کاهش غلظت مواد غذایی در محیط، توازن مواد تشکیل دهنده آن به هم می خورد.

- با مصرف مواد غذائی، مواد دفعی و سمی در محیط کشت افزایش می یابد.
- همانطور که می دانیم در محیط کشت اول اصولاً از سیتوکنین ها استفاده می شود (به علت تحریک تقسیمات سلولی) و به دنبال آن اگر هدف تمایز باشد، نمونه ها را به محیط های کشت دارای اکسین می بریم و با توجه به اینکه هورمونها گران قیمت هستند. آنها را در واکشت های بعدی و باتوجه به نیاز ، به محیط کشت اضافه می نمائیم.

- برای تحریک ریشه زائی در نمونه هایی که به خوبی شاخه زائی کرده اند آنها را به محیط های غنی از اکسین می بریم. باید به این مسئله توجه داشت که تثبیت از سخت ترین مراحل کار است. پس از ریشه دار شدن گیاه می توان آن را به گلدان منتقل کرد. خاک گلدان باید از جنس پرلیت (خاک آتشفشانی) و پیت (خاک مردابی) باشد. نسبت پرلیت به پیت باید ۳ به یک باشد. پس از شستشوی ریشه های گیاه و پاک کردن آگار موجود در سطح آن ، گیاه را به گلدان منتقل می کنیم. در ابتدا رطوبت محیط باید ۱۰۰٪ باشد به همین دلیل در هفته اول بعد از انتقال باید روی گلدان سرپوشی قرارداد (ساده ترین کار گذاشتن یک لیوان یکبار مصرف شفاف روی گیاه است) .گیاه باید کم کم با محیط سازگار شود. همانطورکه می دانیم گیاهی که قبلاً در محیط کشت به سر می برده گیاهی هتروتروف بوده (از مواد غذایی محیط کشت استفاده می کرده است) که باید به گیاهی اتوتروف تبدیل شود (یعنی فتوسنتز کرده و قند تولید نماید).

ب) عاری سازی گیاهان از ویروس

ج) تولید متابولیتهای ثانویه : اگر در تولید گیاهان داروئی از روشهای کشت بافت استفاده شود می توان گیاهانی تولید کرد که خواص داروئی بیشتری دارند به این ترتیب که به عنوان جداکشت از قطعاتی استفاده شود که متابولیتهای ثانویه بیشتری تولید می کنند در نتیجه گیاهان باززائی شده حاصل، متابولیت ثانویه بیشتری تولید می نمایند.

- در اصلاح نباتات

سلولهای گیاهان هاپلوئید فقط دارای یک سری کامل از کروموزمها بوده و کاربرد آنها در برنامه های اصلاح نباتات (که به منظور انتخاب صفات مطلوب اجرا می شوند) بسیار مفید واقع می گردد. فتوتیپ گیاهان هاپلوئیدعبارت از تظاهر یک نسخه از اطلاعات وراثتی می باشد که در آن هیچ گونه نهفتگی صفات بوسیله ژنهای غالب وجود ندارد.

کاربردهای کشت بافت در اصلاح نباتات عبارت است از:

الف) تنوع سوماتیکی (Somaclonal variation)

وقوع این پدیده از دیدگاه اصلاح نباتات مؤثر و مناسب است چرا که می توان سلولهائی با توانائی های خاص ایجاد کرده و کشت داد(به طور مثال می توان نمونه های مقاوم به خشکی ایجاد نمود).

ب) ایجاد دابل هاپلوئید

تکنیک های متعددی جهت دو برابر کردن عدد کروموزمی گیاهان هاپلوئید وجود دارد. از جمله باززائی با استفاده از روشهای کشت بافت گیاهی ، که در این روش می توان از بافت برگ مسن گیاهان هاپلوئید استفاده کرد. از طرفی عدد کروموزومی را می توان با اضافه کردن کلشی سین به جنین یا گیاه هاپلوئید، دوبله کرد.

ج) نگهداری جرم پلاس [1](Germ plasm) به حالت منجمد یا Cryopreservative

در سالهای اخیر توجه زیادی به چگونگی ذخیره کردن جرم پلاسم شده است، چرا که عوامل گوناگونی از جمله هجوم آفات نباتی و پاتوژنها، شرایط اقلیمی ، ناسازگاریهای محیطی و بلایای طبیعی موجب نابودی جرم پلاسم می گردد . از طرفی بذر اکثر محصولات زراعی مهم تحت شرایط سیستم های متداول ، قوه نامییه خود را در مدت کوتاهی از دست می دهند. بنابراین باتوجه به موارد بالا ضرورت وجود بانک ژن آشکار میگردد. در بانک ژن ذخایر ژنتیکی هر کشور حفظ و نگهداری میگردد.

شرایط نگهداری جرم پلاسم باید به گونه ای باشد تا تقسیم سلولی در آن متوقف شود. برای نیل به این هدف مواد گیاهی باید در ازت مایع (۱۹۶-) انبار شوند. نگهداری جرم پلاسمها در این دما برای مدت زمانی نا محدود امکان پذیر است. باید دانست که یخ زدن در ازت مایع از نوع شیشه ای است یعنی متابولیتهای متابولیکی کاهش می یابد ولی در فریزرهای معمولی، یخ زدن از نوع کریستالی است.

د) تولید بذر مصنوعی Artificial seed

یکی از اهداف رویانزایی سوماتیک ، تولید بذر مصنوعی است . پس از آنکه یکی از سلولهای پیکری (سوماتیک)، مانند سلولهای پارانشیم یا حتی قطعات رویان تخمی به رویانزایی رفت ، مراحل تشکیل رویان را می گذراند (شامل مرحله پیش رویانی، مرحله رویان گویچه ای، مرحله تمایز سلولی و مرحله

۱- سلولهای زایشی که حاوی اطلاعات وراثتی هستند..

تشکیل رویان لپه دار). در مرحله رویان لپه دار، رویان را به کپسولهای کوچکی که دارای محیط کشت و مهار کننده های رشد است، انتقال داده در این حالت به آن بذر مصنوعی گفته می شود. می توان به جای مهار کننده های رشد، بذر ها را در سرما قرار داد. سرما مانع رویش رویان می گردد. پوشش روی بذرهای مصنوعی از ماده ای ژله ای به نام آلژنیات سدیم است.

هـ) انتقال ژن و مهندسی ژنتیک

به مجموعه روشهایی که توسط آنها همانند سازی و ساخت قطعاتی از DNA انجام می پذیرد تا جهت مقاصد صنعتی ، پزشکی و تحقیقی مورد استفاده قرار گیرد، مهندسی ژنتیک گفته می شود.

به دنبال موفقیت در انجام کشت بافت ، روشهای انتقال ژن ابداع و به کارگرفته شد. دراین روشها، ژنهای خاصی به یک سلول یا پروتوپلاست اضافه می گردد. به طور مثال با انتقال ژن مقاوم به سرما به گیاه، گیاهان مقاوم به سرما ایجاد می گردد.

- در تکثیر تجاری گیاهان زینتی

یکی از کاربردهای مهم کشت بافت گیاهی، سرعت بخشیدن به تکثیر رویشی گیاهان زینتی می باشد. با استفاده از تکنیک های کشت سلول، امکان تولید سریع گیاهان مشابه وجود دارد.

مراحل اصلی فرایند تکثیر درون شیشه (Invitro)

الف) تهیه کشت های استریل. این مرحله اغلب به دلیل آلودگی و تولید ترکیبات فنولی توسط جداکشت ، مشکل است با این حال در این مرحله باید تعداد مناسبی ریز نمونه زنده مانده و روی محیط کشت رشد کنند.

ب) تکثیر تعداد زیادی اندامک هوایی. عموماً افزودن سیتوکینین، تولید اندامک هوایی از جوانه های جانبی موجود و یا جوانه های نابجای برگ، ساقه یا دمبرگ ونیز تشکیل جنین های سوماتیکی را افزایش می دهد.

ج) انتقال گیاهان به خاک، عموماً از یک اکسین برای ریشه دار نمودن اندامک هوائی حاصل استفاده می شود. برای اکثر گیاهان این مرحله با قراردادن آنها در گلخانه در خاک گلدان انجام می گیرد.

د) قلمه های ریشه دار شده از لوله های آزمایش برداشته شده و آگار آنها به آرامی شسته می شود. این قلمه های ریشه دار شده در خاک گلدان با رطوبت بالا و در سایه کشت می شوند، معمولاً بعد از دو هفته می توان آنها را در شرایط نور بیشتر و رطوبت کمتر قرارداد.

در اغلب گیاهان ریزازدیادی نسبت به روشهای تکثیر مرسوم، مزیت دارد. سودمندی اصلی تکثیر غیر جنسی ، تولید گیاهان یکسان ژنتیکی از یک رقم می باشد. گیاهان مادری مطلوب را می توان انتخاب نمود و هزاران کلون یکسان از آنها تولید کرد. اهمیت این مسئله زمانی مشخص می شود که هدف تکثیر یک گل بارنگی خاص باشد. تکثیر از طریق بذر باعث تنوع رنگ خواهد شد. اما تکثیر غیرجنسی گیاه گل قرمز تنها تولید گیاهان گل قرمز می کند.

ریز ازدیادی در برخی نمونه های زینتی

دراین بخش روش کشت چند نمونه گیاه زینتی ، به عنوان الگو، ارائه شده است.

ریز ازدیادی ژربرا Micropropagation Of Gerbera

جنس ژربرا از خانواده Compositae ، دارای حدود ۳۰ گونه علفی و چند ساله می باشد، منشأ این گیاه جنوب و شرق آفریقا، شمال آمریکا و آسیا (نپال و منچوری) می باشد. دوره رویشی گیاه به حالت روزت ۷

تا ٢٦ برگی بوده و دوره زایشی که در نهایت منجر به تولید گل می گردد، به دنبال آن شروع می شود. اکثر واریته های تجاری از G Jamesonii مشتق شده اند. تولید گلهای شاخه بریده ژربرا از ابتدای قرن بیستم در فرانسه شروع شده و مناطق زیر کشت آن در اروپا از ١٤٠ هکتار در سال ١٩٥٧ میلادی، به ٦٠٠ هکتار در سال ١٩٨٦ افزایش یافته است. کشورهای اصلی تولید کننده این گل در سال ١٩٩٢ ، کشور هلند با ١٤٨ هکتار، ایتالیا با ١٢٠ هکتار ، آلمان ٧٠ هکتار و فرانسه ٣٠ هکتار می باشند. کاشت این گل در خارج از اروپا نیز گسترش یافته به طوری که در ژاپن ٣٠ هکتار، و در کره و تایوان ٥٠ هکتار از زمین های کشاورزی زیر کشت این گل می باشند.

روشهای ریزازدیادی

الف) ریز ازدیادی از طریق انشعابات جانبی:

١- مرحله استقرار یا Establishment از طریق نوک ساقه

ابتدا گیاه را در یک گلدان به نحوی که بخش های بالائی ریزوم با خاک پوشیده نشود کشت می دهیم و از آبیاری اضافی در طول چند روز اولیه استقرار گیاه جلوگیری می نماییم. سپس گیاه را از سطح خاک جدا و فقط برگهای رشد نیافته انتها و نوک ساقه را باقی می گذاریم. پس از جداکردن هر قطعه به آرامی با برس نرم آن را تمیز می نماییم. ٢٠ میلی متر انتهای ساقه را با اسکاپل جدا و به محیط کشت تکثیر محتوی ٢/٥ میکرومول کینتین ،٢/٥ میکرومول BA و ٢/٥ میکرومول IAA در فتوپرید ٨-١٦ ساعت با شدت نور 60 $\mu mol/m^2/s$ به مدت ٤-٦ هفته در دمای ٢٥ درجه سانتیگراد نگهداری می کنیم (محیط پایه، MS می باشد) . برای کشت گل آذین های نارس آنها را به مدت ٣٠ ثانیه در اتانول ٧٠٪ و بلافاصله ٩٠ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم١/٥ درصد قرار می دهیم و در پایان، به مدت ٤٥ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو می دهیم. هر گل آذین را به ٥ تا ١٠ قطعه جدا کشت تقسیم و به محیط کشت تکثیر محتوی ٢/٥ میکرومول KIN ، ٢/٥ میکرومول BA و ٢/٥ میکرومول IAA به مدت ١٢ هفته (مثل شرایط قبل) قرار می دهیم.

۲- مرحله ریشه زایی

پس از جداسازی ، هر قطعه ساقه ۲ برگی را به مدت ۳ هفته همانند شرایط قبل به محیط MS ۱/۲ حاوی ۰/۲۵ تا ۱ میلی مولار NAA یا ۲/۵ تا ۷/۵ میکرومول IBA یا IAA (بسته به نوع کلون) ، منتقل می کنیم. محیط محتوی IBA و NAA منجر به تولید ریشه های زیاد و کلفت می شود. در حالیکه در محیط حاوی IAA فقط چند ریشه نازک تولید می شود.

ب – تکثیر از طریق باززایی جوانه

بعد از کشت در محیط تکثیر، برگها را به نحوی جدا کنید که جوانه های جانبی حفظ شوند. برگها را در تماس با محیط کشت تکثیر محتوی ۱۰ تا ۱۵ میکرومول BA و ۰/۵ تا ۲/۵ میکرومول NAA در بتری دیش قرار دهید. برای برگهای کاملاً توسعه یافته از محیط کشت حاوی ۰/۵ میکرومول TDZ استفاده کنید و پتری دیش ها را در شرایطی مشابه مراحل قبلی به مدت ٤ تا ٦ هفته قرار دهید. سپس کالوسهای باززایی شده را به محیط کشت تکثیر دارایی مقادیر هورمون کمتر یعنی ۲/۵ میکرومول Kin، ۲/۵ میکرومول BA و ۲/۵ میکرومول IAA منتقل کنید.

ریزازدیادی سیکلامن یا نگونسار Micropropagation of Cyclamen Persicum

جنس سیکلاس از خانواده پامچال ، دارای ۱۹ گونه می باشد که در مناطق مدیترانه و مجاور آن پراکنده اند. گیاهان این جنس دارای غده و گلهای زیبا می باشد. امروزه فقط C.persicum به عنوان یک گیاه تجاری

مورد استفاده قرار می گیرد. تکثیر انبوه با کشت بافت روش مناسب ومؤثری جهت تکثیر این گیاه می باشد.

روشهای ریزازدیادی

الف) باززائی گیاه از طریق جنین زائی بافتهای دانه رست استریل

جداکشت اولیه در واقع دانه رست های استریل ۷ هفته ای کشت شده روی محیط کشت MS با ۱/۳ غلظت و محتوی ۳٪ ساکارز می باشد که ابتدا به مدت ۳ هفته در تاریکی و متعاقب آن ٤ هفته در دوره نوری ١٦ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۰ درجه سانتی گراد رشد داده می شوند.

جدا کشتهای دمبرگ و غده روی محیط کشت MS محتوی ۳٪ ساکارز و جداکشتهای لپه و ریشه روی محیط کشت MS محتوی ٦٪ ساکارز ، ٥ میکرومول 2,4- D و ٥/. میکرومول کینتین در ۲٥ درجه سانتی گراد در تاریکی کشت می شوند.

برای جنین زائی ، کالوس حاصل از جداکشتها را به محیط کشت MS بدون تنظیم کننده رشد منتقل کنید. برای ادامه رشد رویشی، گیاهچه ها را به محیط کشت MS با ۳٪ ساکارز و ۱/. میکرومول کینتین منتقل نمایید.

ب) ریزازدیادی از طریق اندامزائی به منظور اصلاح نژاد سیکلامن گل زرد

دانه رستهای استریل جوان واجد یک لپه سبززرد که از آمیزش بین واریتهای زراعی با گل زرد و سایر واریته ها به دست می آیند، جهت کشت انتخاب می شوند. از هر اندامی به جز ریشه ، به عنوان جداکشت می توان استفاده نمود ولی بهترین اندام بافت غده می باشد. برای تشکیل ساقه ، جداکشتهای غده به هشت قطعه تقسیم می شوند و روی محیط کشت MS با ۱/۳ غلظت ، محتوی ۳٪ ساکارز و ۱ میکرمول BA یا ۰/۱ میکروکول NAA و ۱ میکرومول BA کشت می شوند. برای به دست آوردن گیاهچه، ساقه ها را به محیط کشت MS با ۱/۳ غلظت ، محتوی ۳٪ ساکارز و ۰/٥ میکروکول NAA منتقل نمایید.

ریزازدیادی میخک

Micropropagation of Dianthus

تولید میخک در کشور با مشکلاتی مواجه است که مهمتر از همه سالم نگه داشتن بوته در دوران گلدهی و عاری بودن گل از آفات و بیماریهاست. در گلخانه های قدیمی و سنتی ، تولید گل سالم و استاندارد ، مشکل به نظر می رسد.

باتوجه به اینکه سرعت تکثیر میخک با روشهای سنتی کم است و نیز امکان انتقال بیماریها و به خصوص ویروسها با روشهای معمولی تکثیر وجود دارد و با عنایت به اینکه با روشهای کشت درون شیشه ای ، امکان انتقال بیماریها حداقل بوده ، سرعت تکثیر بالا و در عین حال نیاز به مواد گیاهی به عنوان پایه های مادری ، حداقل می باشد لذا به دست آوردن محیط های کشت مناسب و ارزان قیمت برای تکثیر درون شیشه ای میخک لازم و ضروری به نظر می رسد.

روشهای ریزازدیادی

جداکشتها از گیاهان مادر در حال رشد فعال جدا شده و با استفاده از هیپو کلریت سدم ۲/۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شده و سپس ۳ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو شدند.

سپس جداکشتها به محیط کشت MS پایه یا ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار منتقل شد. برای ریشه زایی اندامهای هوایی تولید شده، از محیط کشت MS همراه با هورمون IBA استفاده شد . بهترین درصد باززایی در هر جداکشت در محیط پایه MS تغییر یافته حاوی ۰/۳ میلی گرم دو لیتر NAA و یک میلی گرم هر لیتر BAP به دست آمد. برای حذف آلودگی می توان از مریستم جهت کشت ، و هم چنین آنتی بیوتیکها و قارچ کشها استفاده کرد.

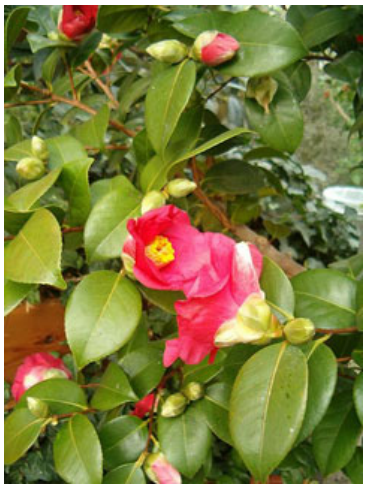
ریز ازدیادی ارکیده **Micropropagation of orchis**

در تکثیر غیر جنسی ارکیده ها، بسته به نوع ارکیده از روش های قلمه زدن و تقسیم بوته (در روش سنتی) و کشت بافت (در روشهای امروزی) استفاده می شود. در ارکیده های نوع منوپودیال، از روش قلمه زدن و در ارکیده های سمپودیال ، از روش تقسیم بوته استفاده می گردد. در حال حاضر در اغلب ممالک ، از روش کشت بافت به عنوان روشی معمول در تکثیر ارکیده ها استفاده می شود. مزایای تکثیر ارکیده ها به روش کشت بافت به شرح زیر است:

- تکثیر انبوه رقمها و هیبریدهای ممتاز در کوتاهترین زمان در مقایسه با تکثیر به روش سنتی .
- تولید گیاهان عاری از ویروس به طریقه کشت مرسیتم از گیاهان آلوده.
- ایجاد ارقام جهش یافته مرغوب.

برای کشت بافت ارکیده از برگ، جوانه های جانبی و انتهایی ساقه و ریشه استفاده می شود. نتایج نشان می دهد که جداکشت های حاصل از جوانه های جانبی و انتهایی رشد بهتری دارند. محیط کشت استفاده شده MS می باشد که برای جامد کردن آن از آگار به میزان ۸ گرم در لیتر استفاده می شود.

ریزازدیادی کاملیا **Micropropagation of Camellia Japonica**



مهمترین عواملی که باعث گران بودن برخی از گیاهان زینتی می شود عبارتند از: کند بودن رشد گیاه ، بالا بودن هزینه تولید بذور هیبرید، عدم تولید بذرکافی توسط گیاه مادری ویا عدم امکان استفاده از بذر تولید شده به دلیل دگر گشن بودن گیاه ، در صورت مواجه شدن با چنین مشکلاتی ، اصلاح گران نباتات می توانند تکنیک های کشت بافت را به عنون یکی از ابزارهای مطمئن مورد توجه قرار دهند.

تکثیر کاملیا جاپونیکا در ایران منحصراً از طریق قلمه صورت می گیرد. کندی رشد و سخت ریشه زائی این گیاه دست به دست هم داده مانع از تکثیر آن در مقیاس انبوه می گردد. بدین معنی که حتی در صورت ریشه دار شدن قلمه ، سرعت رشد گیاه به حدی نیست که شاخه های زیادی تولید نماید تا بتوان از آنها به عنوان منبعی جهت سیکل بعدی تکثیر در کوتاه مدت استفاده نمود و علت گران بودن کاملیا نیز به همین دلیل است. بررسی منابع نشان می دهد که با استفاده از تکنیک های کشت درون شیشه می توان از هر سه شاخه در مدت زمان نسبتاً کوتاهی سرشاخه های متعددی تولید و تکثیر نمود.

روشهای ریزازدیادی

در یک آزمایش ، برای تهیه جداکشت از گیاهانی با عمر بیش از ٦٠ سال استفاده شد. بهترین جداکشت در مرحله استقرار ، قطعات گرهی (nodal section) و بهترین محیط در این مرحله WPMتشخیص داده شد. برای شاخه زایی از هورمون BA با غلظت ٤ میلی گرم در لیتر استفاده شد که بهترین نتیجه را داشت. ریشه زایی در محیط های فاقد هورمون در حالی که غلظت عناصر پرمصرف به نصف کاهش یافته بود، بهترین نتیجه را بهمراه داشت. قراردادن برگهای کشت شده به طریق کشت درون شیشه در محلول یک میلی گرم در لیتر IBA (به مدت ٣٠ دقیقه) و سپس انتقال به محیط WPM بدون هورمون، تحت تیمار تاریکی به مدت ١٤ روز ، موجب تولید کالوس در سطح برگها گردید.

ریز ازدیادی بنفشه آفریقایی Micropropagation of Saintpaulia

تکثیر سنتی این گیاه از طریق قلمه برگ صورت می گیرد لکن تحت شرایط مناسب هورمونی ، باززائی با جداکشتهایی از دمگل، قطعات برگ و یا حتی یافته های اپیدرمی انجام می شود.

تکثیر سنتی بنفشه افریقائی

روش کار تجاری: برگهای بالغ جداشده و با ماده پاک کننده (شوینده) شسته می شوند. سپس حدود ۱۵ دقیقه در محلول ۲-۱٪ هیپوکلریت سدیم قرار می گیرند سپس چهار تا پنج بار با آب سترون آب کشی می شوند . حواشی برگها حذف و باقی مانده آن به مربع هایی با مساحت ۱۰ میلی متر بریده می شوند. سپس هر قطعه روی محیط کشت MS کشت می شود. غلظت آگار در این محیط ۰/۹ ٪ و ساکارز ۳٪ می باشد همچنین به عنوان تنظیم کننده رشد از بنزیل آدنین (۰/۸ میلی گرم در لیتر) و IAA (۲ میلی گرم در لیتر) استفاده می شود. قابل ذکر است که محیط های کشت باید در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد و شرایط ۱۰۰۰ لوکس روشنایی و تحت تیمار ۱٦ ساعت روشنایی و ٦ ساعت تاریکی قرار گیرند. پس از رشد اندامهای هوایی و به منظور ریشه زایی موفق باید در واکنشهای بعدی (تغییر محیط کشت و تهیه محیط کشت جدید برای جداکشت) از محیط های بدون هورمون استفاده کرد.

مزایا و معایب ریزازدیادی

مزایای ریزازدیادی به شرح زیر است:

۱- سرعت تکثیر بسیار بالا. در گونه هایی که به آسانی باززائی می کنند با کشت انتهای شاخه و واکشت جوانه های جدید باززائی شده، تعداد بسیار زیادی گیاهچه در مدت زمان کم ، حاصل می شود.

۲- نبود محدودیت فصلی برای تولید گیاه. این مورد به ویژه برای گیاهان گلخانه های کاربرد دارد.

۳- تولید گیاهانی که ازدیاد آنها مشکل است. با این روش می توان ارقام جدید و گونه های با این شرایط را به بازار عرضه کرد.

٤- ریز ازدیادی گیاهان منحصر به فرد ممتازی که در مزرعه و فقط با بذر تکثیر می شوند. بنابراین با گزینش گیاهان مزرعه ای با فرمها و تولیدات مطلوب ، می توان آنها را با ریز ازدیادی و به فرم رویشی تکثیر کرد تا امکان به دست آوردن بذر کافی از این گیاهان وجود داشته باشد.

٥- نگهداری لاینهای خالص خود ناسازگار برای استفاده در تولید بذر هیبرید. ریز ازدیادی برای نگهداری لاینهای خالص ، روشی را فراهم می کند که نیاز به گرده افشانی دستی ندارد. گیاهچه ها فقط زمانی اجازه بلوغ پیدا می کنند که مرحله گلدهی آنها برای تولید بذر لازم باشد.

٦- تولید پایه های عاری از ویروس در گیاهانی نظیر توت فرنگی ، سیب زمینی ، میخک و غیره با کشت مرستیم.

٧- رفع موانع مطلق جوانی زنی بذر، در تعدادی از گونه های گیاهی جوانه زنی در شرایط طبیعی مطلقاً امکان پذیر نیست. در این موارد استفاده از کشت بافت ضروری است.

٨- جلوگیری از سقط جنین در حالت ناسازگاری : در بعضی موارد ناسازگاری بین گونه ها یا ارقام، بعد از تشکیل جنین اتفاق می افتد و منجر به سقط جنین می شود. چنین جنین هایی را در حالت نارسی و قبل از سقط شدن می توان خارج کرده و در شرایط درون شیشه ای آنها را رشد داد .

٩- کشت بافت کاربردهای صنعتی نیز دارد به این معنی که با استفاده از کشت بافت توانایی سنتز و تولید ترکیبات مفید به مقدار قابل توجهی افزایش می یابد. این ترکیبات شامل : داروهای آلکالوئیدی، ترکیبات ضد میکروبی، ویتامینها، حشره کشها، آنزیمها، مطبوع کننده های اغذیه و شیرین کننده ها می باشد.

معایب ریز ازدیادی:

١- گیاهچه های تولید شده ظریف، دارای کوتیکول نازک و ریشه های موئین کمی هستند که نیاز به جابجایی ماهرانه توسط افراد تعلیم دیده دارند.

٢- نیاز به وسایل گران قیمت برای تولید در مقیاس وسیع.

٣- نیاز به مراقبت کامل گیاهان مادری برای جلوگیری از آلودگی به حشرات و پاتوژنها.

منابع :

- کوروش وحدتی (۱۳۸۳) جزوه کشت بافت گیاهی ، دانشکده کشاورزی کرج.
- مرتضی خشخوی (۱۳۸۲) ازدیاد نباتات، مبانی و روشها ، جلد ۳ – ترجمه . انتشارات دانشگاه شیراز.
- مرتضی خشخوی (۱۳۷۳) فنون کشت بافت برای گیاهان باغبانی – ترجمه . انتشارات دانشگاه شیراز.
- باقری هدایت و آزادی پژمان (۱۳۸۱) کشت بافت گیاهی ، تکنیکها و آزمایشها – ترجمه، انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه مشهد.
- احمد معینی و دانیال کهریزی (۱۳۸۲) کشت بافت گیاهی – ترجمه، انتشارات سازمان بسیج دانشجویی .
- عبدالرضا باقری و مهری صفاری (۱۳۷٦) مبانی کشت بافت گیاهی – ترجمه . انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد .
- قدیر نوری قنبلانی (۱۳۷۱) تجربیاتی در زمینه کشت بافتهای گیاهی – ترجمه . انتشارات دانشگاه تبریز.
- تعیین مناسب ترین محیط کشت برای تولید بیشترین شاخساره ریشه داد شده در کشت بافت میخک . پایان نامه کارشناسی ارشد (۱۳۷۸) – موسی ترابی گیلگو و سیروس سیما و اسلام مجیدی . دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.
- ازدیاد کاملیا به روش کشت بافت . پایان نامه کارشناسی ارشد (۱۳۷٤) حسن حسن آبادی و اسلام مجیدی . دانشگاه تربیت مدرس.
- تکثیر ارکیده های سیمبیدیوم و کاتلیا، به روش کشت بافت پایان نامه کارشناسی ارشد (۱۳۷۵) . سعداله علیزاده اجیرلو و اسلام مجیدی. دانشگاه تربیت مدرس.

- Bajaj Y.P.S.(1997) Biotechnology in Agriculture and Forestry 40. Springer.
- DEBRGH P.C. & ZIMMERMAN R.H.(1991) Micro Propagation. QKLUWER ACADEMIC pub.