

# کشت بافت گیاهی Plant Tissue Culture

## تعریف

- تکنیک کشت سلول، بافت، اندام یا بخشی از گیاه
- در شرایط استریل و کنترل شده با دسترسی به مواد غذایی مورد نیاز

# چرا کشت بافت انجام می شود؟

1. یک ریزنمونه می تواند در عرض کمتر از یک سال به چندین هزار گیاه تبدیل شود.
2. این روش گیاه مادری را از بین نمی برد، در نتیجه گیاهان نادر و با ارزش را می توان با اطمینان تکثیر نمود.
3. در گونه های حساس به بیماری ها ریزنمونه های عاری از ویروس (مریستم های تازه تشکیل اغلب عاری از ویروس هستند) منجر به تولید گیاهان عاری از ویروس خواهد گردید.

4. بافت های گیاهی می توانند به صورت منجمد در بانک های ژن نگهداری شده و سپس از طریق کشت بافت باززایی شوند.

5. گیاهان کشت شده در محیط های مناسب با سهولت بیشتری صادر می شوند. ضمن این که عاری از ویروس بوده، فضای کمی اشغال می کنند.

6. کلون های کشت بافتی شبیه به اصل هستند.  
‘true to type’ or ‘off-type’  
???

...

# اساس و مبنای کار

# شرایط مورد نیاز

- **بافت گیاهی مناسب** (برخی بافت ها پاسخ بهتری به کشت بافت نشان می دهند)
- **محیط کشت مناسب** (حاوی منبع انرژی و نمک های غیرآلی که رشد سلول را باعث می شوند که به صورت مایع یا نیمه جامد می باشد)
- growth medium (liquid or semi-solid)**
- **شرایط استریل** (به دلیل اینکه میکروارگانیسم ها در چنین شرایطی سریع تر از بافت های جانوری و گیاهی استقرار می یابند)
- Aseptic (sterile) conditions**
- **تنظیم کننده های رشد** (در گیاهان عمدتاً اکسین ها و سائتوکنین ها)
- Plant Growth Regulators (auxins & cytokinins)**
- **واکشت های متوالی** (به منظور تنظیم مواد غذایی و ممانعت از تشکیل متابولیت های مضر)
- Sub-culturing**

# ***Plant sources***

# **منابع گیاهی**

- Mother plant

گیاه مادری

- Explants

ریز نمونه



## Mother or donor plant

### گیاه مادری یا گیاه دهنده



گیاه مادری:

- توجه به شرایط قبل از انتخاب نمونه، آبیاری کافی، تیمارهایی به منظور آماده سازی و شرایط رشدی و فیزیولوژیک

# Explants

ریز نمونه

- بخشی از گیاه که به منظور انجام کشت بافت جدا می شود (از مهمترین قسمت های کار می باشد)

- اندازه ریزنمونه
- منبع تهیه ریزنمونه
- شرایط گونه مورد نظر
- سن فیزیولوژیک: قسمت های جوان تر گیاه به شرایط کشت واکنش بهتری نشان میدهند
- **Physiological age**

- میزان آلودگی
- **Degree of contamination**
- آلودگی خارجی: غوطه وری ریزنمونه در محلول هیپوکلریت سدیم
- **External infestation**
- آلودگی داخلی: جداسازی بافت ها و قسمت های آلوده
- **Internal infection**

• ریشه های به دلیل تماس با خاک در کشت بافت مشکل ساز هستند

- گیاهان علفی بهتر جواب میدهند
- **Herbaceous plants**
- شاخه های ترد بهتر از شاخه های چوبی هستند

# محیط کشت Media

## نقش محیط کشت

- فراهم ساختن آب
- فراهم سازی مواد معدنی مورد نیاز ریزنمونه
- در اختیار گذاشتن تنظیم کننده های رشد گیاهی
- در اختیار گذاشتن ویتامین ها
- در اختیار گذاشتن ترکیبات آلی
- امکان بهره مندی از نسبت مناسب گازها و تبادل گازی مناسب
- بستری برای نگهداری و جمع آوری متابولیت ها

## اجزای محیط کشت

- |                           |                 |
|---------------------------|-----------------|
| ➤ H <sub>2</sub> O        | آب              |
| ➤ Mineral elements        | عناصر معدنی     |
| ➤ Carbohydrate source     | منبع کربوهیدرات |
| ➤ Vitamins                | ویتامین ها      |
| ➤ Gelling agent           | عامل ژلی کننده  |
| ➤ Plant growth regulators | تنظیم کننده رشد |
| ➤ Chelates                | کلات ها         |
| ➤ Amino acids             | آمینواسیدها     |
| ➤ Organic nitrogen        | نیتروژن آلی     |
| ➤ Complex substances      | ترکیبات پیچیده  |
| طبیعی                     |                 |

| Basic elements اجزاء اصلی                                                                                                                                                                                     | Optional elements اجزاء اختیاری                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• H<sub>2</sub>O</li> <li>• mineral elements</li> <li>• carbohydrate source</li> <li>• Vitamins</li> <li>• gelling agent</li> <li>• plant growth regulators</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• chelates</li> <li>• osmotic agents</li> <li>• charcoal</li> <li>• amino acids</li> <li>• organic nitrogen</li> <li>• complex substances</li> </ul> |

## Media

## محیط کشت

Distilled water

آب مقطر

عناصر شامل 17 عنصر ضروری است

به منظور تامین انرژی و منبع کربنه ساکاروز ترجیح داده  
می شود  
sucrose

محیط کشت باید استریل شود

(autoclave at 120-110 C at 15 psi- 15 min)

محیط کشت با  $\text{pH} = 5.6\_5.8$

# Mineral elements

# عناصر معدنی

## Macro elements عناصر ماکرو

(در مقادیر  $mM$  اضافه می شود)

Nitrogen (به شکل آمونیوم و نیترات)

Phosphorus

Potassium

Magnesium

Calcium

Sulphur

Sodium

Chloride

## Micro elements عناصر میکرو

(در مقادیر  $\mu M$  اضافه می شود)

Iodine

Boron

Manganese

Zinc

Molybdenum

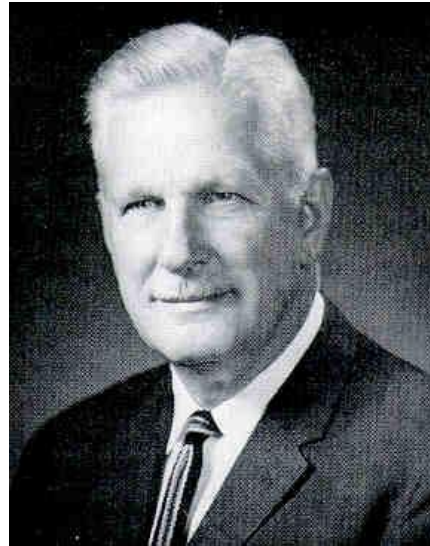
Copper

Cobalt

Aluminum

Iron

## Murashige and Skoog stock solutions



## Macro elements

|                                           |          |
|-------------------------------------------|----------|
| $\text{NH}_4\text{NO}_3$                  | 1.65 g/l |
| $\text{KNO}_3$                            | 1.9 g/l  |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.37 g/l |
| $\text{CaCl}_2 \cdot \text{aq}$           | 0.33 g/l |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 0.17 g/l |

## Micro elements

|                                                     |            |
|-----------------------------------------------------|------------|
| KI                                                  | 0.83 mg/l  |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                             | 6.2 mg/l   |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$           | 22.3 mg/l  |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           | 8.6 mg/l   |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 mg/l  |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$           | 0.025 mg/l |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$           | 0.025 mg/l |
| $\text{Na}_2\text{EDTA}$                            | 37.3 mg/l  |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           | 27.8 mg/l  |

# Chelates

# کلات ها

□ قابلیت تشکیل باند با کاتیون های فلزی (خصوصا آهن) را دارند که باعث حفظ و نگهداری آن در محلول میگردند

➤ EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid

➤ EDDHA: Ethylene diamine-di(o-hydroxyphenyl) acetic acid

# Vitamins

# ویتامین ها

ویتامین هایی که اغلب در کشت بافت اضافه می شوند  
شامل

- Nicotinic acid (vitamin B3)
- Pyridoxine (vitamin B6)
- Thiamine (vitamin B1)
- Myo-Inositol
- Vitamin C (ascorbic acid) به عنوان آنتی اکسیدانت

➤ در مقادیر 1-100 میلی گرم در لیتر

# عامل ژلی کننده Gelling agent

- آگار: محصول طبیعی استخراج شده از جلبک ها Agar
- ژلرایت: یک پلی ساکارید که از باکتری *Pseudomonas* elodea به دست می آید Gelrite



# تنظیم کننده های رشد گیاهی

## Plant growth regulators

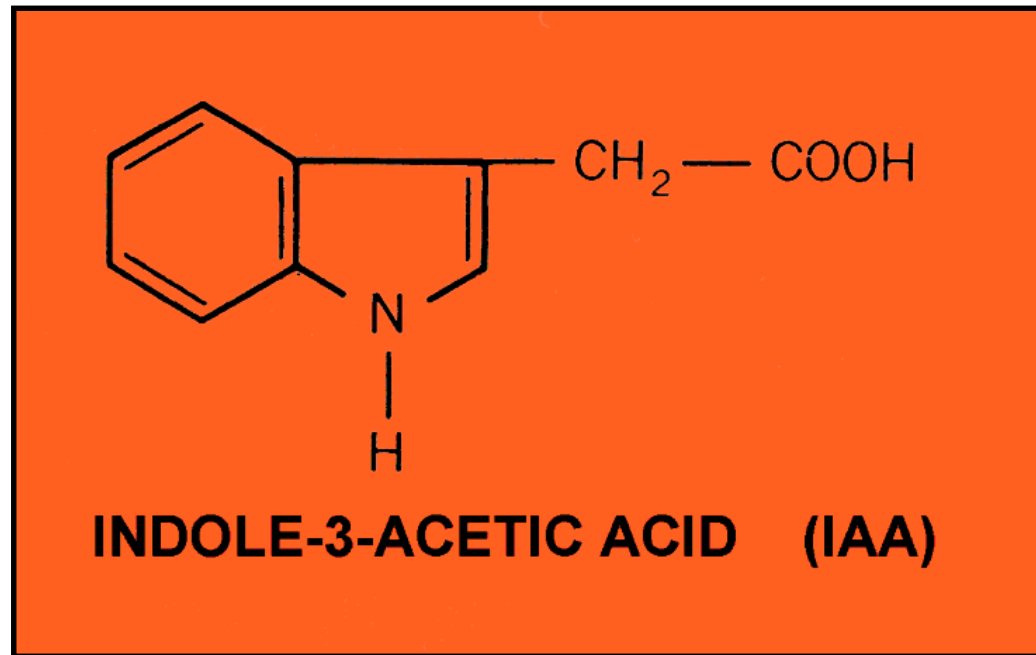
گروه بزرگی از هورمون های گیاهی امروزه در کشت بافت کاربرد دارند

AUXINS (Natural, Synthetic, Biosynthesis, inhibitors)  
CYTOKININS (Biosynthesis)  
GIBBERELLINS (Biosynthesis and inhibitors)  
ABSCISIC ACID  
ETHYLEN (Blocking of ethylene action)

✓ توجه به برهم کنش بین تنظیم کننده های مختلف

# Natural Auxins

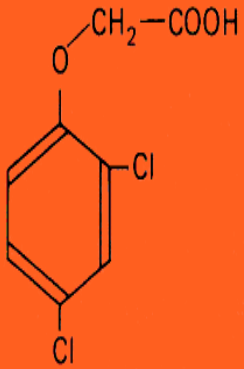
اکسین طبیعی



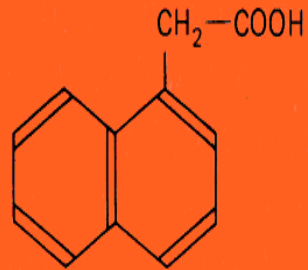
فرم اصلی هورمون اکسین در گیاهان

# اکسین های مصنوعی

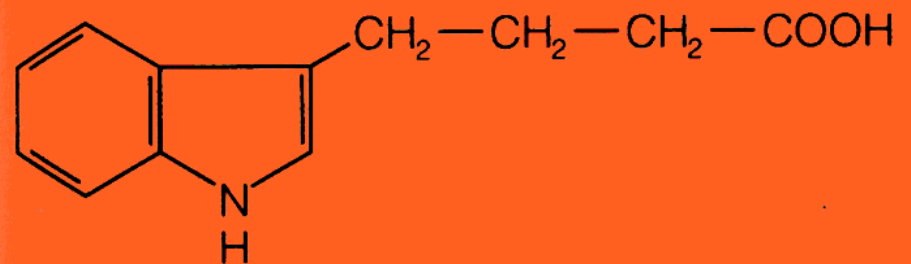
## Synthetic Auxins



**2,4-D**



**NAA**



**IBA**

## سایر اکسین ها

**2-naphthoxyacetic acid (NOA)**

**4-chlorophenoxyacetic acid (4-CPA)**

**2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA)**

**2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)**

**3,6-dichloroanistic acid (Dicamba)**

**4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (Picloram)**

# Auxin inhibitors

# بازدارنده اکسین

ترکیبی که معمولا مورد استفاده قرار می گیرد  
2,3,5-Tri-iodobenzoic acid (TIBA) نام دارد

TIBA



# Cytokinins

➤ سایتوکینین ها به میزان زیادی در ریشه گیاهان تولید می شود و سپس با شاخساره منتقل می گردد

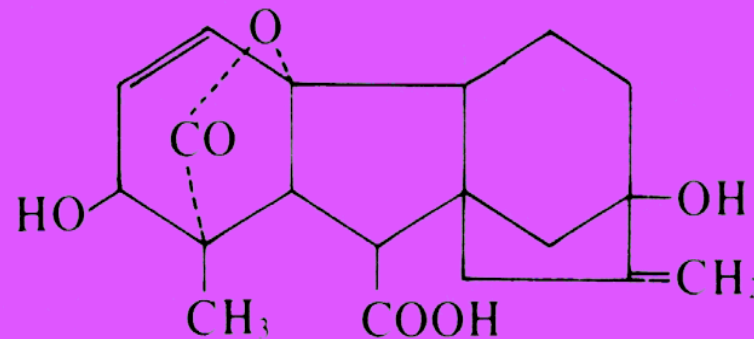
➤ نقش مهمی در تشکیل شاخه و اندام زایی (Organogenesis) در کشت بافت ایفا می کنند

➤ تحریک آغازش و تشکیل شاخه / سوخ  
➤ تحریک رشد شاخساره

- ✓ Kinetin
- ✓ Zeatin
- ✓ Benzyladenine
- ✓ Diphenylurea (DPU)
- ✓ Thidiazuron (TDZ)

# Gibberellins

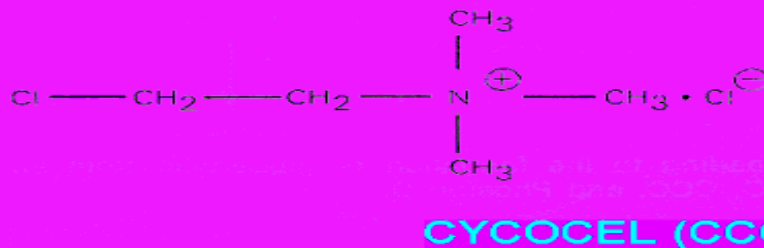
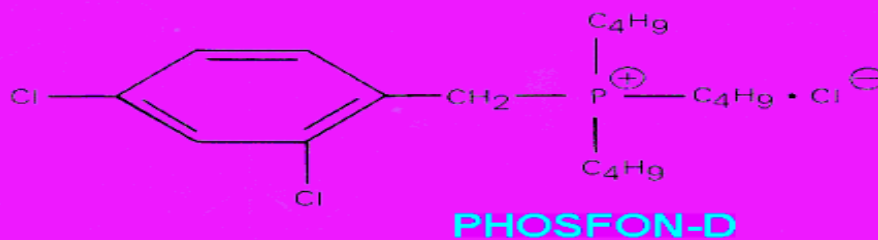
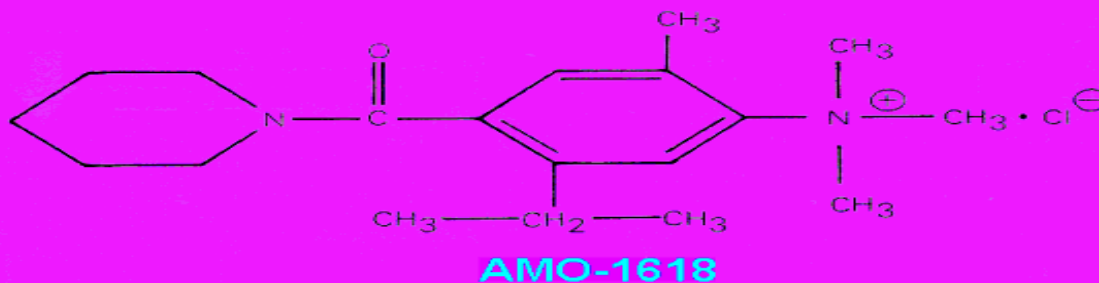
- نقش اصلی تحریک رشد طولی در مریستم انتهایی گیاهان
- به منظور تحریک رشد در شاخه های کوتاه برنج
- معمول ترین فرم استفاده آن در کشت بافت اسید جیبرلیک  
Gibberellic acid (GA3) است



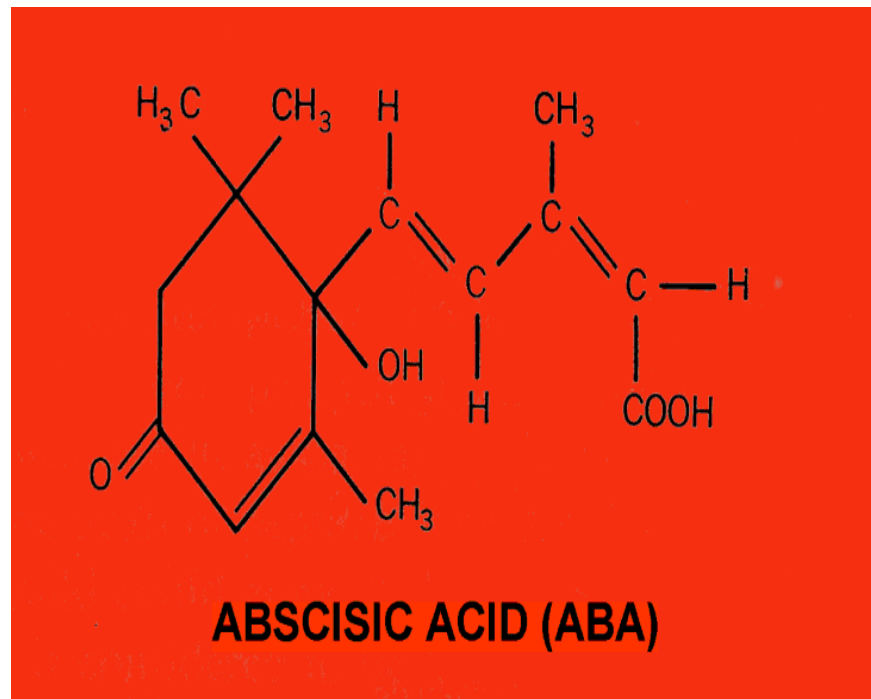
**GIBBERELLIC ACID**

# کند کننده های رشد گیاهی

## Gibberellin biosynthesis inhibitors

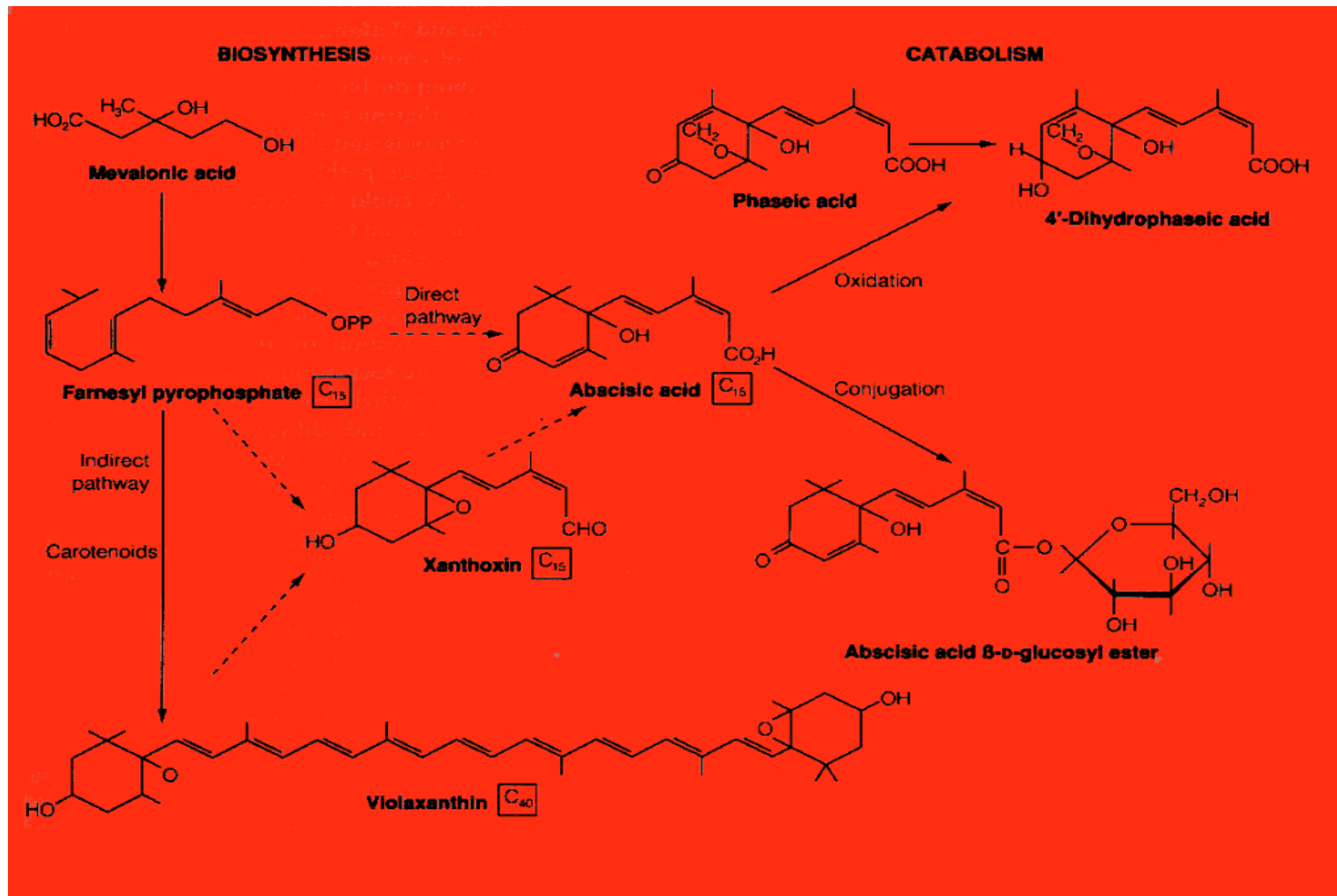


# Abscisic acid (ABA)

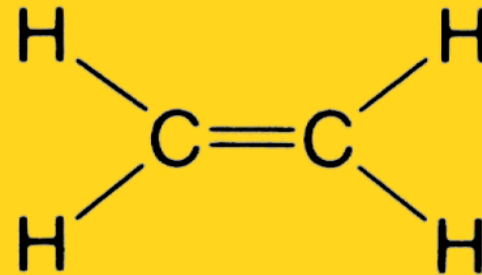


➤ آبسازیک اسید یک **بازدارنده** رشد بسیار قوی می باشد  
➤ در کشت بافت به میزان زیادی در **جنین زایی بدنی** به منظور تسریع بالغ شدن جنین ها و تبدیل آنها به گیاهچه به کار می رود

# اسید آبسزیک از موالونیک اسید **Mevalonic acid** ساخته می شود و نقش مهمی در روابط آبی، پیری و نمو جنین گیاهان ایفا میکند

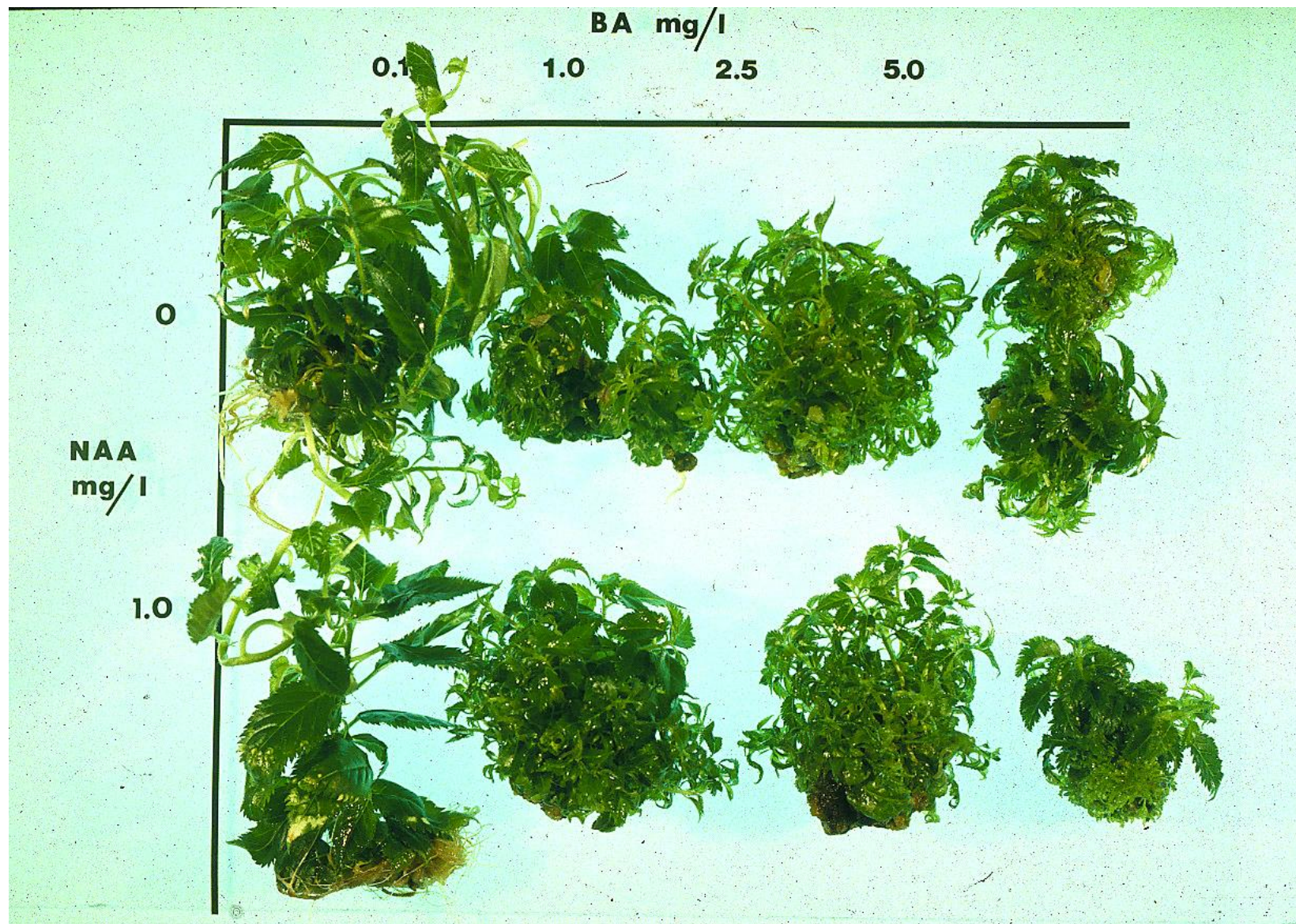


# Ethylene



Ethylene

➤ بیوسنتز آن تحت تاثیر بازدارنده هایی نظیر  
Amino Oxyacetic و Aminoethoxy Vinyl Glycine (AVG)  
Acid (AOA) قرار میگیرد



# pH

- pH را معمولا بین 5/6 تا 5/8 تنظیم می کنند
- این محدوده دسترسی نمک ها را تحت تاثیر قرار میدهد
- بر جذب اجزای محیط کشت تاثیر میگذارد
- بر خاصیت ژلی آگار موثر است
- بعد از اتوکلاو میزان آن کمی تغییر می یابد

## عامل اسمزی Osmotic agent

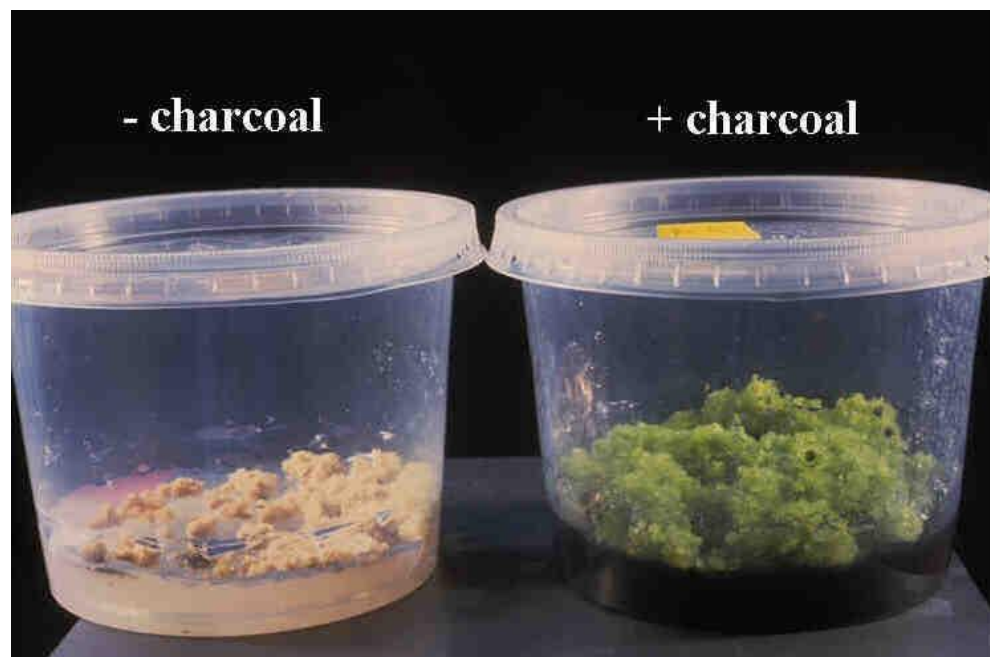
- ❖ پتانسیل اسمزی محیط کشت بر میزان دسترسی آب و سایر اجزا تاثیر میگذارد
- ❖ تاثیر ساکاروز (بیش از 2%) اغلب بر تنظیم اسمزی است نه تامین انرژی
- ❖ در بسیاری موارد مانیتول **Manitol** (به عنوان قند الکلی متابولیزه نشده) به عنوان عامل اسمزی بررسی و توصیه شده است

## ذغال Charcoal

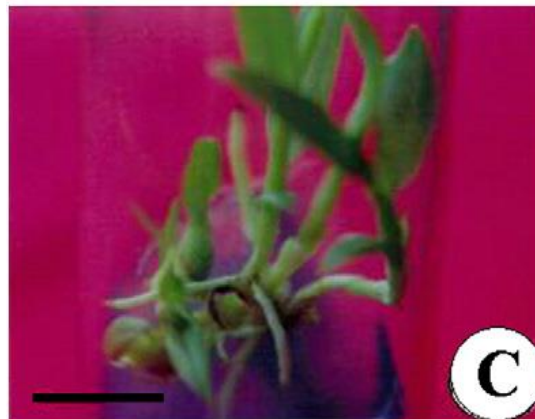
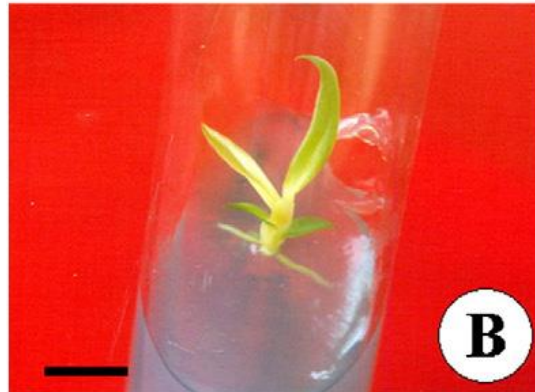
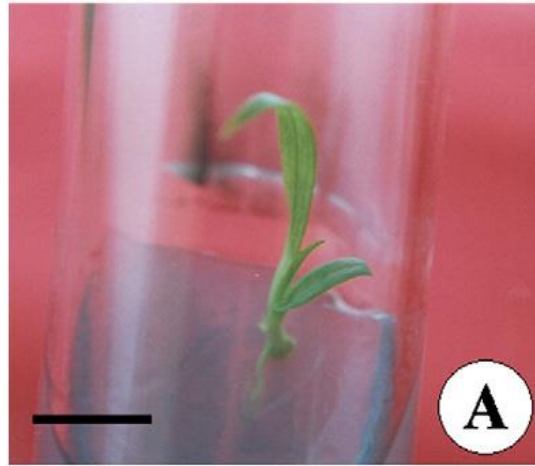
○ تاریک سازی محیط کشت  
(محیط مناسب ریشه  
زایی)

○ جذب ملکول های مزاحم و  
مشکل ساز موجود در  
محیط یا ریزنمونه

○ انواع مختلف ذغال ظرفیت  
جذب مختلفی دارند (میزان  
تخلخل)



تاثیر ذغال بر رشد و نمون ارکیده



□ جمع آوری اجزاء مورد نیاز

□ مخلوط کردن اجزاء، تنظیم pH، افزودن آگار، گرم کردن

□ ریختن محیط کشت در ظروف

□ آماده سازی جهت اتوکلاو

## جمع آوری اجزاء مورد نیاز





مخلوط کردن اجزاء، تنظیم pH، گرم کردن





## ریختن محیط کشت در ظروف





**آماده سازی جهت اتوکلاو**

# اتوكلاوها **Autoclaves**



شرایط استریل (گندزدا)

**Asepsis**



آلودگی

**Contamination**

• اندام یا محیط عاری از هرگونه عامل بیماری زا  
Axenic ( aseptic = sterile)

• از بین بردن میکروارگانیسم ها و اسپورهای آنها توسط گرما،  
صافی، مواد شیمیایی و سایر تکنیک ها  
Sterilization (Asepsis)



➤ ویروس ها به 35 گروه یا خانواده تقسیم می شوند. حدود 700 ویروس تا کنون شناخته شده است.

➤ بیماری های ویروسی خسارات بسیار زیادی را به گیاهان در حوزه کشاورزی و خصوصا به محصولات باغبانی وارد میکنند

➤ در کشت بافت کار کردن با مواد عاری از ویروس اهمیت بسیار زیادی دارد. چنانچه ریزازدیادی با استفاده از مواد گیاهی آلوده به ویروس انجام شود میلیون ها گیاه آلوده تولید خواهد شد

➤ می توان بعد از شاخص سازی برای ویروس های خاص، گیاهان مناسب را تکثیر نمود

➤ یکی از راه های تولید گیاهان عاری از ویروس کشت مریستم می باشد

➤ به منظور عاری سازی نمونه ها از ویروس ها لازم است که مشخص شود مواد گیاهی با چه ویروسی آلوده شده اند

## باکتری ها

• معمولاً امکان داشتن محیط کشتی عاری از باکتری ها میسر نیست

• گاهی اوقات علائم آلودگی باکتری یابی در سطح مواد گیاهی یا محیط کشت قابل مشاهده است. **اما اغلب علائم قابل مشاهده خیلی دیر و پس از چند واکشت در محیط کشت ظاهر می شوند** و گاهی نیز این علائم اصلاً مشاهده نمیشوند و مشکلاتی را در مراحل اولیه سازگار سازی گیاهچه ها ایجاد میکنند.

• البته توجه شود که تمام باکتریها بیماری را نبوده و برخی خواص مفیدی را نیز دارا می باشند.

# علايم آلودگی باکتریایی



- bacteria

+ bacteria

## گونه های باکتری که اغلب در کشت بافت مشاهده میگردند

***Agrobacterium***  
***Bacillus***

**3 %**

**13 %**

***Enterobacter***  
***Pseudomonas***

**12 %**

**19 %**

***Lactobacillus***  
***Staphylococcus***

**11 %**

**26 %**

## قارچ ها

منابع اصلی آلودگی قارچی شامل:

❖ عدم گندزدایی کافی سطوح کار

❖ آلوده شدن نمونه ها در حین انتقال به آزمایشگاه

❖ انتقال قارچ ها توسط حشرات ناقل آن

✓ آلودگی های قارچی به راحتی توسط چشم غیر مسلح  
رویت میگردد

# تکنیک های گندزدایی

- گندزدایی سطحی مواد گیاهی
- گندزدایی محیط کشت
- گندزدایی ظرف ها، ابزار و محیط

# گندزدایی سطحی مواد گیاهی

مثالی از گندزدایی مواد گیاهی:

- **برش** مواد گیاهی تا رسیدن به اندازه دلخواه و مناسب ظرف کشتی که برای آزمایش مورد استفاده قرار میگیرد

- **شستشوی** ماده گیاهی توسط آب شهر
- تکان دادن در **الکل** به مدت چند ثانیه
- غوطه ور سازی در آب مقطر استریل 3 بار

- **HgCl<sub>2</sub> (0.1 - 1%) : 3-5 min**
- غوطه ور سازی در آب مقطر استریل 3 بار

- **Bleach 7-15% : 10-30 min**
- **شستشو با وایتکس**
- غوطه ور سازی در آب مقطر استریل 3 بار

1. آب شهری (Tap water): حذف گرد و غبار، به همراه شوینده ها به منظور ضد عفونی سطحی
2. اتانول: 70% و اسرشت سازی پروتئین ها. 95% حل کردن لایه های واکس و چربی.
3. وایتکس (NaOCl) و یا  $\text{Ca(OCl)}_2$ : با توجه به وجود یون کلر در هر دو ماده تاثیر گذار است
4. محلول  $\text{HgCl}_2$  (نقره با افزودن آمونیوم رسوب می دهد)
5. مواد خیس کننده

# گندزدایی محیط کشت

➤ اتوکلاو کردن: مواد متحمل به حرارت

➤ دمای 112 درجه (فشار 50 کیلو پاسکال) – دمای 120 درجه (فشار 100 کیلو پاسکال)

➤ گندزدایی با فیلتر: مواد حساس به گرما

غشا پلاستیکی استریل می شود سپس محلول مورد نظر از آن گذرانیده شده و با عبور از منافذ با اندازه  $0.22\mu\text{m}$  فیلتر می گردد

# گندزدایی توسط فیلتر Filter sterilization

Non sterile liquid

Autoclaved filter

Screw thread

Filter (pore size  $0.2 \mu\text{m}$ )

Rubber 'O'-ring

Cap

Sterile liquid

## گندزدایی ابزار، ظروف و شرایط محیطی

- ظروف شیشه ای: اتوکلاو، گرمای خشک (180 درجه به مدت چند ساعت)، اشعه
- ظروف پلاستیکی: اشعه یا اتوکلاو
- کاغذ: گرمای خشک
- ابزار کار: شعله - گرمای خشک
- سطح میز کار: شستشو با الکل
- هوای محیط کار: هود لامینار (HEPA-filtered)

# اتوكلو





**آون (گرمای خشک)**

## *laminar flow* هود لامینار

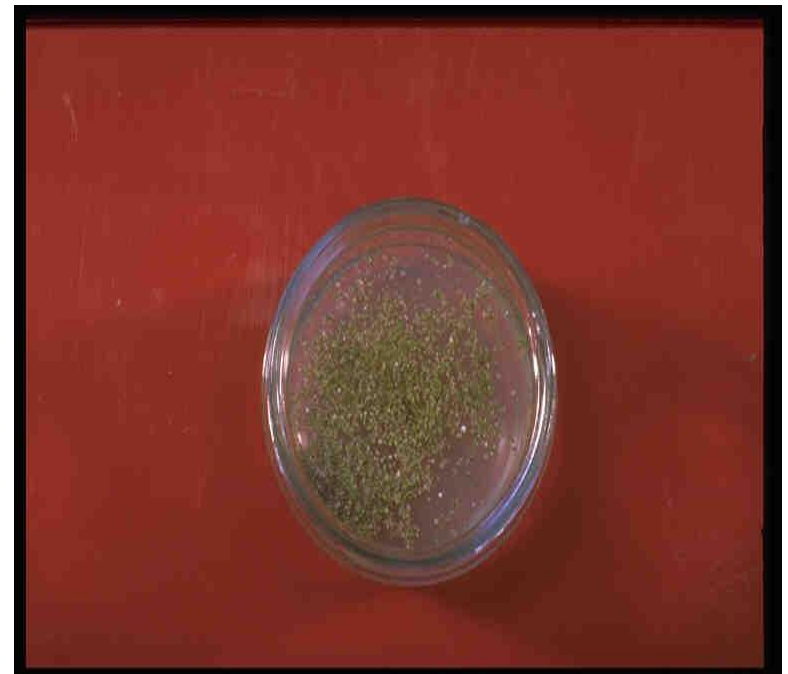


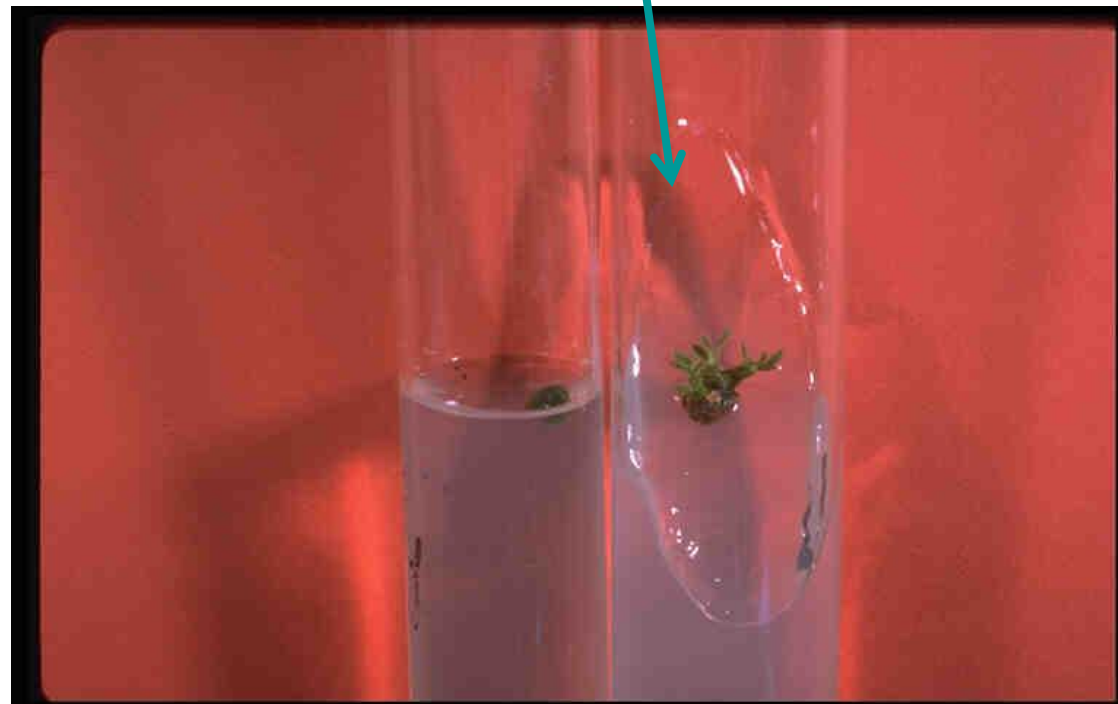
## ابزار استریل کردن



## ظرف های کشت

---





# وسایل و ابزار کشت



*هود لامینار* *laminar flows*



اتاق اتوکلاو

اتاق نگهداری محیط کشت

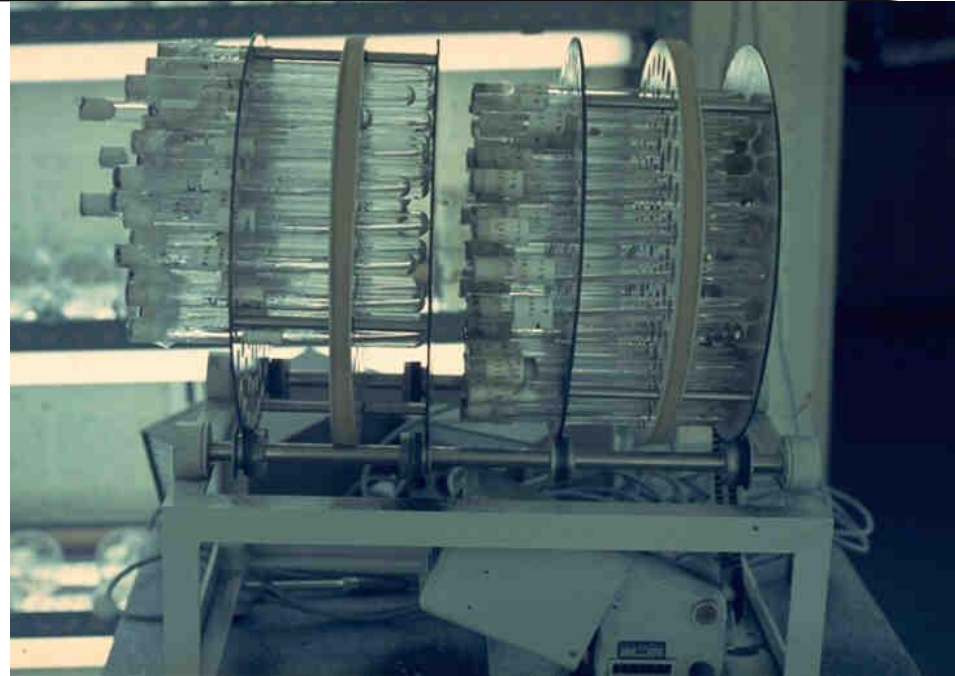


## شیکر ارلن مایر



## شیکر ظروف و شیشه آلات





چرخاننده (روتور) لوله آزمایش