

Plant Tissue Culturing (micro propagating): the steps

مراحل کشت بافت گیاهی (ریز ازدیادی)

✓ تهیه محیط کشت

✓ نمونه گیری

✓ استریل نمودن مواد گیاهی

(Direct or indirect) Organogenesis اندام زایی مستقیم یا غیر مستقیم

✓ تکثیر سریع و تثبیت شرایط کشت

(Direct or indirect) embryogenesis جنین زایی مستقیم یا غیر مستقیم

✓ ریشه زایی

✓ سازگار سازی گیاهچه ها

مرحله 1

○ نمونه گیری

○ استریل نمودن مواد گیاهی

○ فراهم نمودن شرایط غذایی، نور و سایر شرایط رشدی ایده آل



❖ انتخاب ریز نمونه از گیاه مادری
سالم و قوی (**explant**)

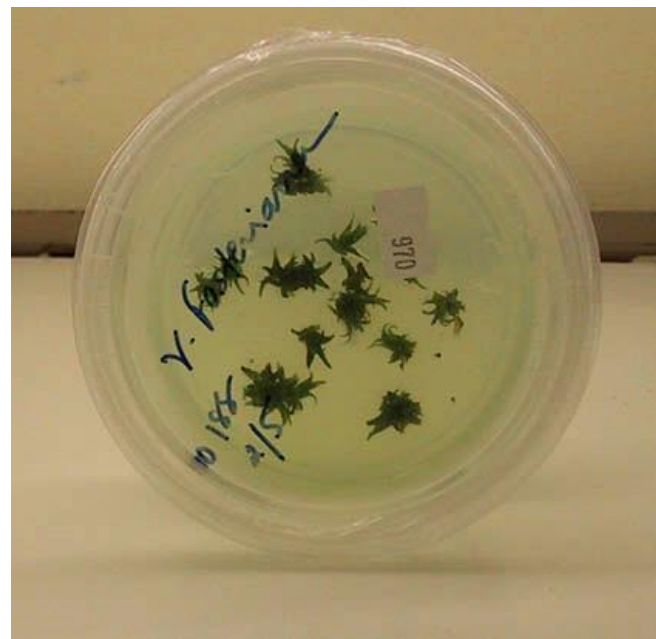
❖ اغلب مریستم های انتهایی

❖ استریل کردن جهت عاری نمودن
از هر گونه آلودگی

مرحله 2

- تکثیر سریع
- تثبیت شرایط کشت
- تولید تجاری
- عملی زمان بر و مشکل
- برای گونه های مختلف روش های مختلفی مورد نیاز است

❖ استقرار نمونه در محیط کشت
مایع یا نیمه جامد



❖ هر گونه گیاهی و گاهی واریته
های مختلف به محیط غذایی
خاص با نسبت های مختلف
عناصر و هورمون ها نیاز دارد



مرحله 3 ریشه زایی

○ ریشه زایی در این مرحله یا مرحله قبل، در لوله آزمایش یا گلخانه رخ میدهد

○ اغلب تحت تاثیر القای هورمونی می باشد

✓ کاهش غلظت **Cytokinin** و افزایش میزان اکسین

ریزازدیادی رز

گیاهان مادری، مراقبت ها، آبیاری قطره ای



قطع شاخه های حاوی جوانه های تازه



برش شاخه ها به صورتی که هر
قطعه حاوی جوانه باشد



غوطه وری در اتانول 80%، استریل
کردن در وایتکس 10% (NaOCl) به
مدت 15 دقیقه





شستشو با آب استریل

حذف دو قسمت انتهایی هر قطعه

برش گره ها

هر گره حاوی مریستم جانبی است



قرار دادن هر گره در لوله آزمایش



آماده کشت







افزایش شاخساره در کشت رز Multiplication of rose cultures







شرایط محیطی

✓ دما

✓ نور

✓ رطوبت نسبی

✓ نسبت گازها

Temperature

❖ شاید تنظیم دما برای هر گونه گیاهی امکان پذیر نباشد اما میتوان گفت برای اکثر گیاهان بهترین دمای روز $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ و دمای شب چند درجه کمتر از آن است

❖ دمای ظرف ها و بسترهای کشت حدود 5 درجه سانتی گراد بیشتر از دمای فضای گلخانه است که ناشی از اثر گلخانه ای می باشد

❖ مهمترین نکته تامین دمای یکنواخت در اتاق کشت است، با تنظیم نور و کم و زیاد کردن آن می توان بر این مساله تا حدی کنترل داشت.

Light

□ معمولاً لامپ های مهتابی به موازات قفسه ها و روی آنها قرار داده می شوند.

□ تعدادی از لامپها خارج از اتاق قرار داده می شوند تا گرمای زیادی تولید نشود.

□ پارامترهای مورد توجه در مبحث نور عبارتند از:

- Photoperiod
- Light intensity
- Spectrum

Photoperiod

○ در اکثر گیاهان طول مدت تابش نور اهمیت چندانی در مراحل رشدی ندارد

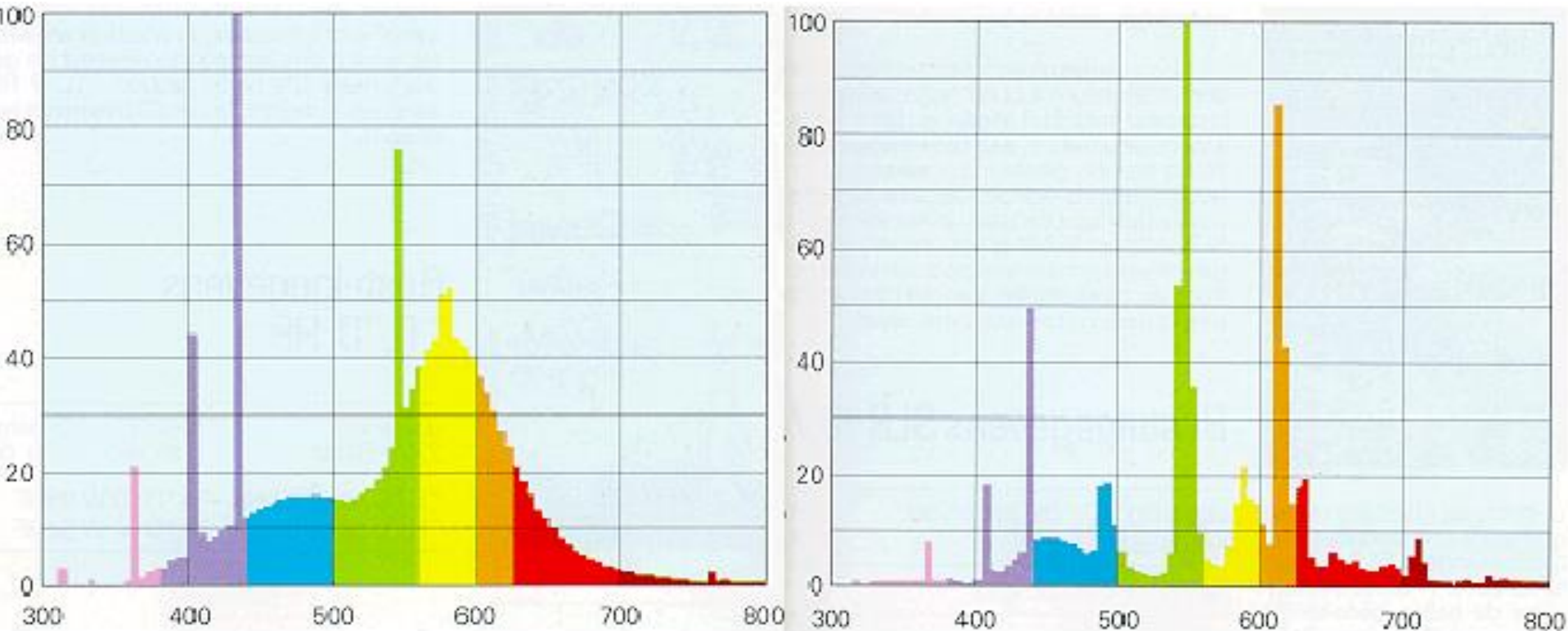
○ طول روز معمولا 16 ساعت در نظر گرفته میشود

Light intensity

- مناسب ترین شدت نور حدود $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR می باشد
- در این شرایط کشت ها فتوسنتز متوسط دارند
- به منظور ایجاد شرایط اتوتروف شدت نور بیش از $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ مورد نیاز است.
- بسته به نوع نمونه ها و هدف کشت شدت نور افزایش یا کاهش داده می شود.

Light spectrum

- واکنش گیاه به اسپکتروم (طول موج نور) به صورت تغییرات ریخت زایی تظاهر می کند
- (میزان ارتفاع گیاه و توسعه برگ آن)
- موثرترین طول موج ها نسبت آبی/قرمز و قرمز/قرمز دور هستند.



قطرات آب حاکی از آن است که رطوبت نسبی ظرف 100% است

Relative humidity (RH)

➤ رطوبت نسبی ظرف و هوای اتاق کشت باید تحت کنترل باشد.

➤ هواکش ها، سرد کردن ته شیشه و غلظت آگار از جمله عوامل کنترل کننده رطوبت نسبی هستند



مرحله 4 سازگار سازی گیاهچه ها

Infrastructure for acclimatization

ساختارها و تجهیزات مورد نیاز جهت سازگار نمودن گیاهچه ها

- Growth rooms

اتاق های رشد

- Substrates

بسترها و ترکیبات مختلف کشت

- Transplanting

انتقال

- Acclimatization tunnels

تونل های سازگار سازی

اتاق رشد

Growth rooms

□ معمولاً بعد از تولید گیاه چه های کامل آنها را در واحدهای سازگار سازی یا اتاق های رشد نگهداری می کنند

□ گیاه چه ها به تناوب در قفسه های مختلفی که به صورت طبقه طبقه روی هم قرار گرفته اند گذاشته می شوند تا فضای کافی برای رشد داشته باشند



بستر کشت

Substrates

□ گیاهان به بسترهای مختلف از قبیل پیت، مخلوط پیت با ماسه یا پرلیت، ورمیکولیت، پشم سنگ و ... منتقل می شوند.

□ بستر مورد نظر باید تهویه و نگهداشت مناسب آب را فراهم کند.



تونل های سازگار سازی

Acclimatization tunnels

➤ مهمترین شرط موفقیت گیاهان کشت بافتی فراهم نمودن شرایط محیطی مورد نیاز آنها می باشد.

➤ در شرایط گلخانه های مرطوب، سیستم های میست یا مه پاش رطوبت نسبی مورد نیاز فراهم می گردد.

➤ در زمستان و روزهای ابری نور تکمیلی توصیه می گردد.

➤ و ...



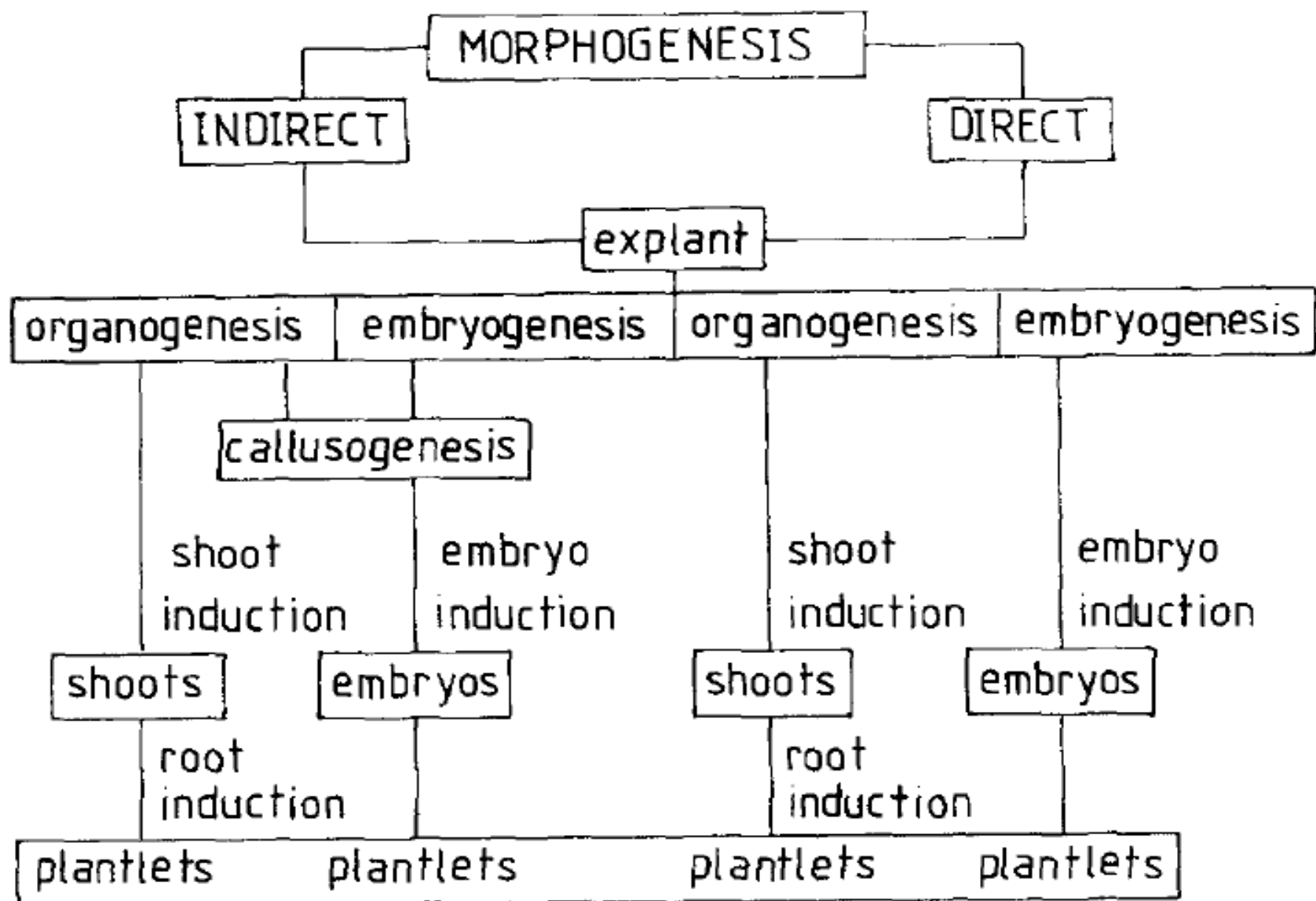
(Direct or indirect) Organogenesis

اندام زایی مستقیم یا غیر مستقیم

(Direct or indirect) embryogenesis

جنین زایی مستقیم یا غیر مستقیم





General pathways for somatic morphogenesis.

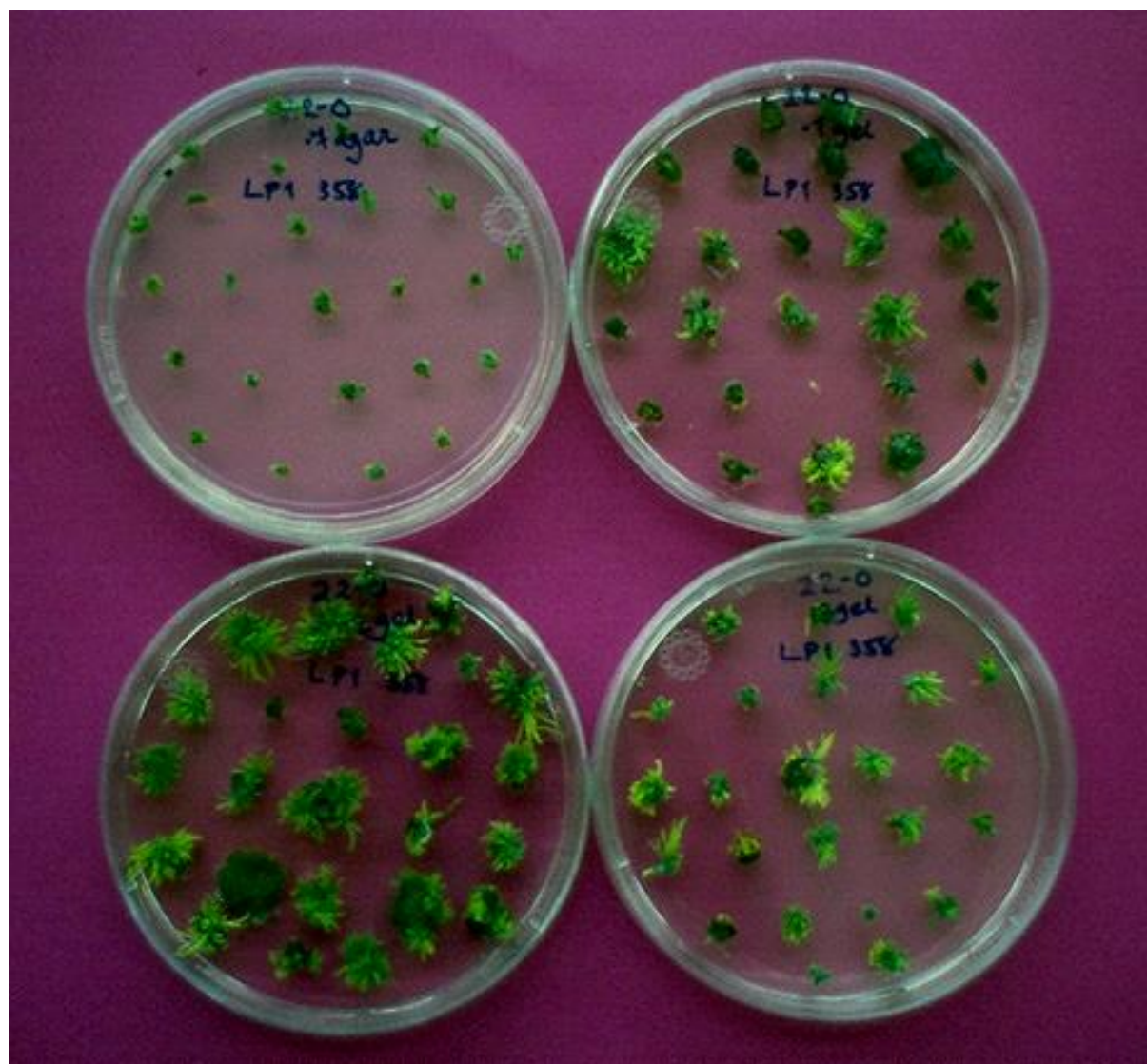
اندام زایی

Organogenesis

اندام زایی مستقیم

DIRECT ORGANOGENESIS

~~CALLUS~~





شاخه زایی نابجا در *chimera Dracaena*

نمو شاخه نابجا در *chimera Dracaena*





تشکیل جوانه/ پیازچه از فلس های پیاز *Bowiea volubilis*



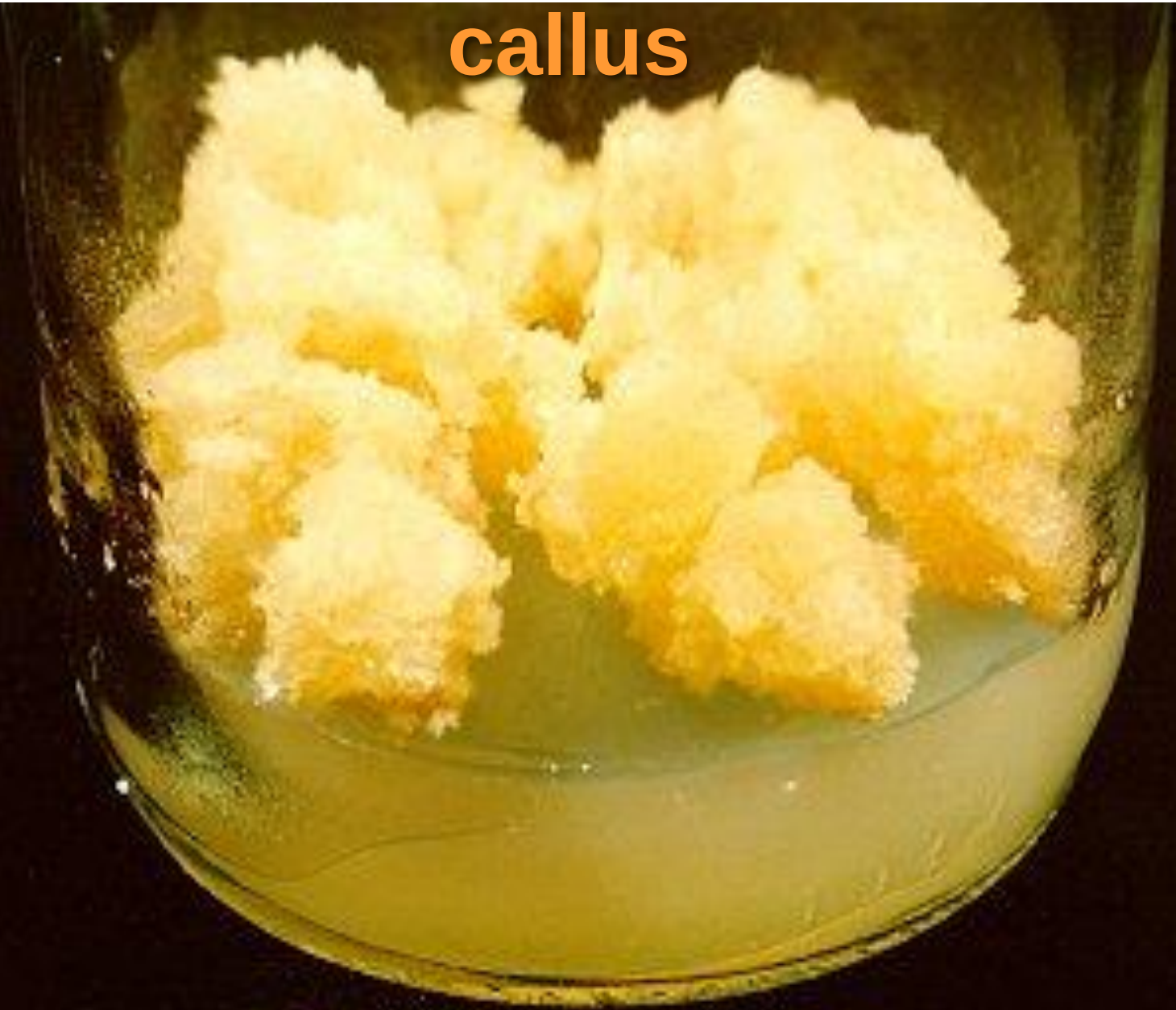


اندام زایی غیر مستقیم

INDIRECT ORGANOGENESIS

✓ CALLUS

callus

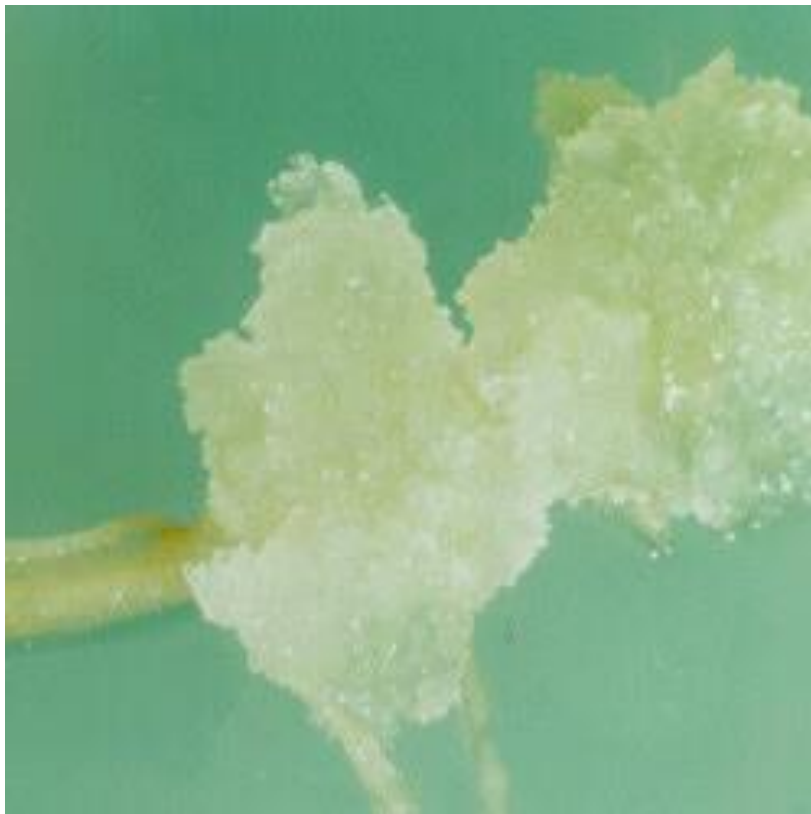


کالوس حاوی توده بی شکلی از سلول های پاراننشیمی با دیواره نازک است

انواع بافت کالوس:

➤ کالوس ها میتوانند بسیار ترد و شکننده (*Friable*) یا بسیار سخت (*Hard / lignified*) باشند.

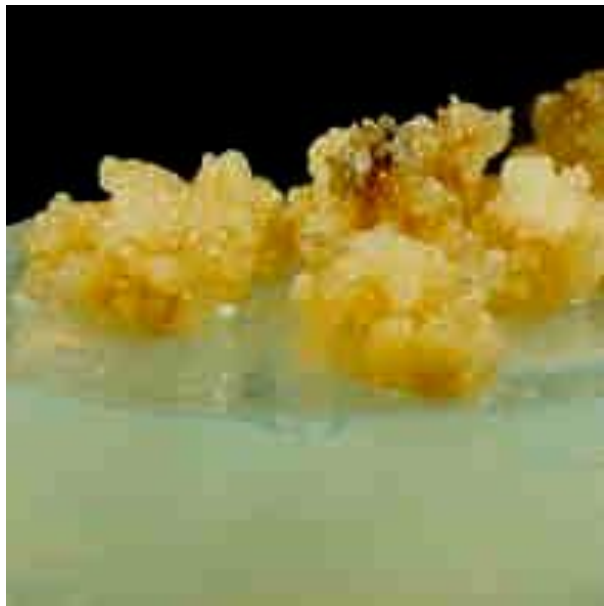
➤ رنگ آنها می تواند **زرد**، سفید، **سبز**، **قرمز** (**آنتوسیانین**) باشند.



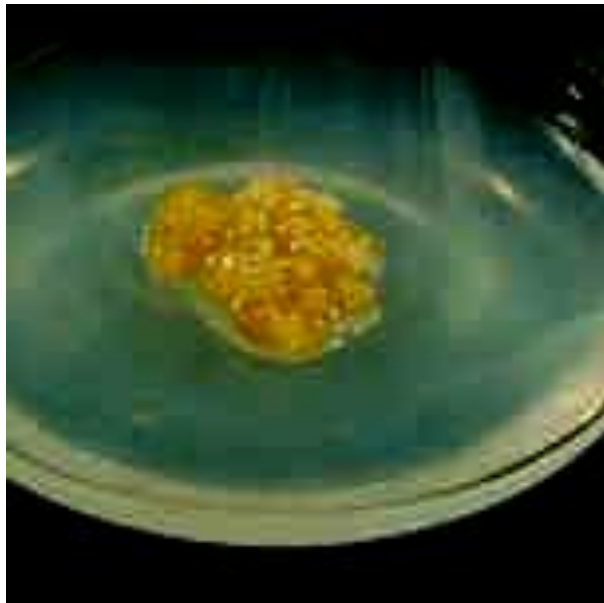
کالوس برخاسته از بافت ریشه

کالوس برخاسته از بافت جنین



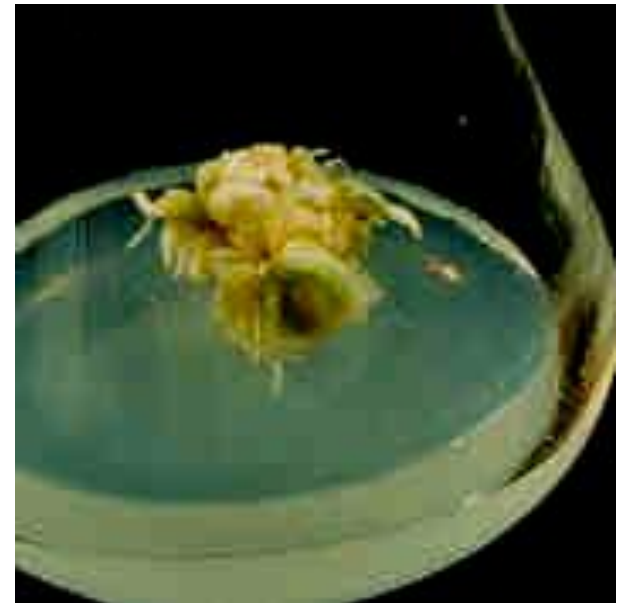


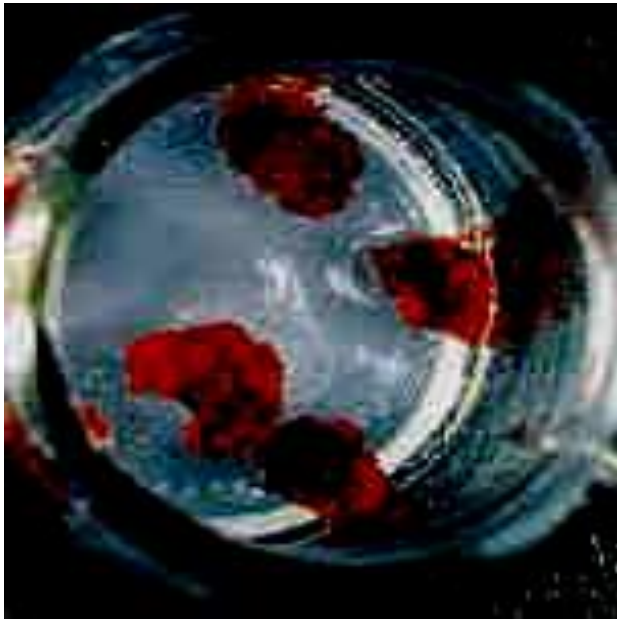
Friable callus کالوس ترد و شکننده
کالوس حاوی پلی ساکاریدها



Hard / lignified callus کالوس سخت

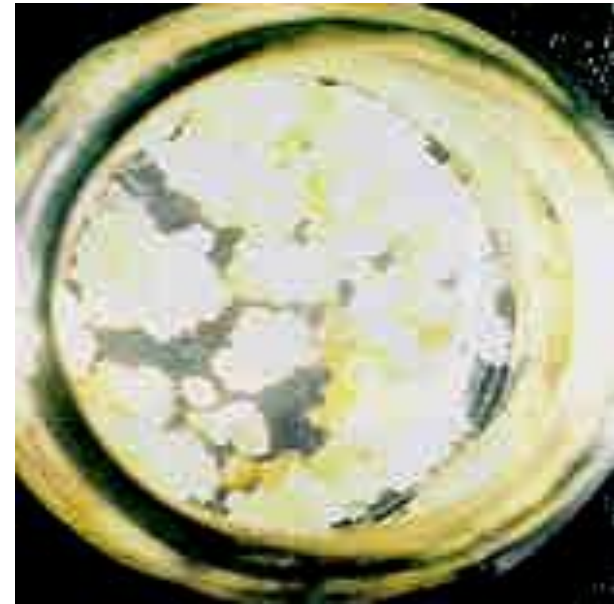
Rhizogenic callus کالوس ریشه زا





کالوس قرمز حاوی آنتوسیانین (Oxalis)

کالوس سبز (Gloriosa)



کالوس سفید (Oxalis)

کالوس زرد (Gloriosa)



القای کالوس

- ❑ زخم کردن باعث تولید کالوس در محل برش یا انتهای سلول های ریشه یا ساقه می گردد
- ❑ تولید کالوس در همه انواع سلول های زنده مشاهده گردیده است
- ❑ القای کالوس یک واکنش حمایتگر در سلول های گیاهی است پس از آن تقسیم سلولی تحریک می گردد که نتیجه تغییرات داخلی در تعادل هورمون ها است.
- ❑ حمله میکروب ها و حشرات نیز باعث تولید کالوس می گردد

❖ در کشت کالوس از قرار دادن قطعه کوچکی از ریزنمونه بر محیط کشت در شرایط استریل حاصل می شود.

عدم ثبات ژنتیکی باعث کالوس

تنوع زیادی در نوع و میزان سلول ها مشاهده شده. کالوس یکنواخت حاوی سلول های پارانشیمی کاملاً مشابه به ندرت به دست می آید. تنوع سلولی در حین تشکیل اجزای مختلف سلول رخ می دهد.

کشت کالوس مشکل عدم ثبات ژنتیکی را به همراه دارد که حتی می تواند باعث تنوع فنوتیپی در یک کشت گردد که مبنای آن ژنتیکی یا اپی ژنتیک گزارش شده است.

Epigenetic changes

تغییرات اپی ژنتیک

بیان ژن های انتخابی- هر تغییری در فنوتیپ که منجر به تغییر در DNA نگردد. این تغییرات غیر قابل توارث بوده و در نتاج مشاهده نمی گردند. ولی با تکثیر رویشی منتقل می گردند.

Genetic changes

تغییرات ژنتیکی در کروموزوم ها، ترکیبات هسته و پلی پلوئیدی فراوانی این ناهنجاری با افزایش سن نمونه و شرایط خاص محیط کشت زیاد می شود.

جنین زایی

Embryogenesis



تعریف جنین زایی

جنین های گیاهی بر اساس منشا و شکل و زمان تکامل تقسیم بندی می شوند:

منشا: Origin:

✓ **Zygotic embryos** جنین های زایشی از ترکیب گامت های نر و ماده تشکیل شده و در نهایت سلول تخم را تشکیل می دهند

✓ **Somatic embryos (syn. Asexual embryos)** ترکیب گامت ها نیاز نیست و جنین می تواند از سایر سلول ها نیز ایجاد گردد

شکل: Morphology:

یک جنین کاملاً توسعه یافته دارای دو قطب بوده که در یک انتها مریستم شاخه و در انتهای دیگر مریستم ریشه قرار میگیرد و برگ های اولیه نیز از آن تشکیل می گردند.

تکامل: Evolution:

نمو جنین شامل مراحل مورفولوژیکی است (کروی، قلبی شکل، نیزه ای شکل)

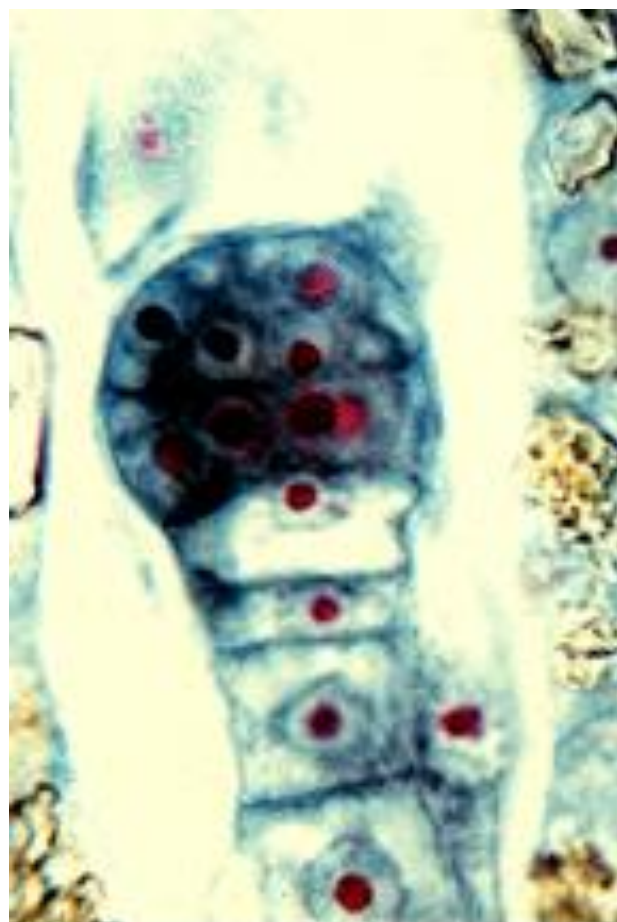
Globular, Heart shaped & Torpedo shaped

تکامل جنین در نهاندانگان

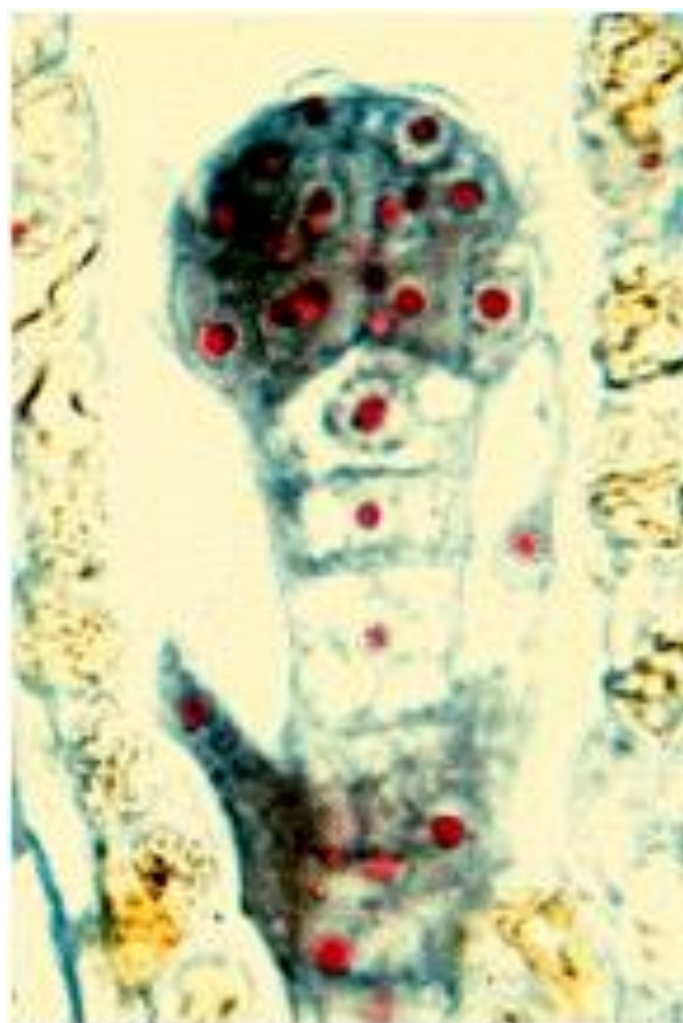
- تلقیح
- اولین تقسیم سلول تخم لقاح یافته همراه با تشکیل دیواره سلولی و تقسیم همزمان اندوسپرم
- تقسیمات اولیه سلول تخم
- جنین اولیه کروی **globular**
- افزایش تعداد اندام های درون سلولی
- تکامل کوتیلدون ها و محور ریشه و ساقه
- ✓ دولپه ها: جنین قلبی شکل **heart shaped** - جنین پیکانی شکل **torpedo** - توسعه دو کوتیلدون
- ✓ تک لپه ها: جنین سپری شکل - توسعه تک کوتیلدون
- ✓ مرحله آخر: جوانه زنی و ظهور گیاهچه



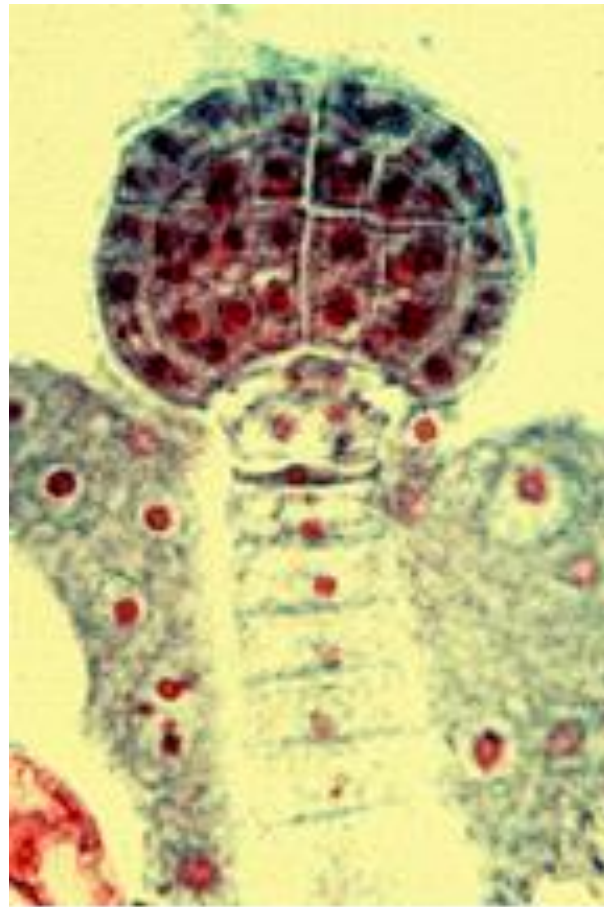
2 cell proembryo



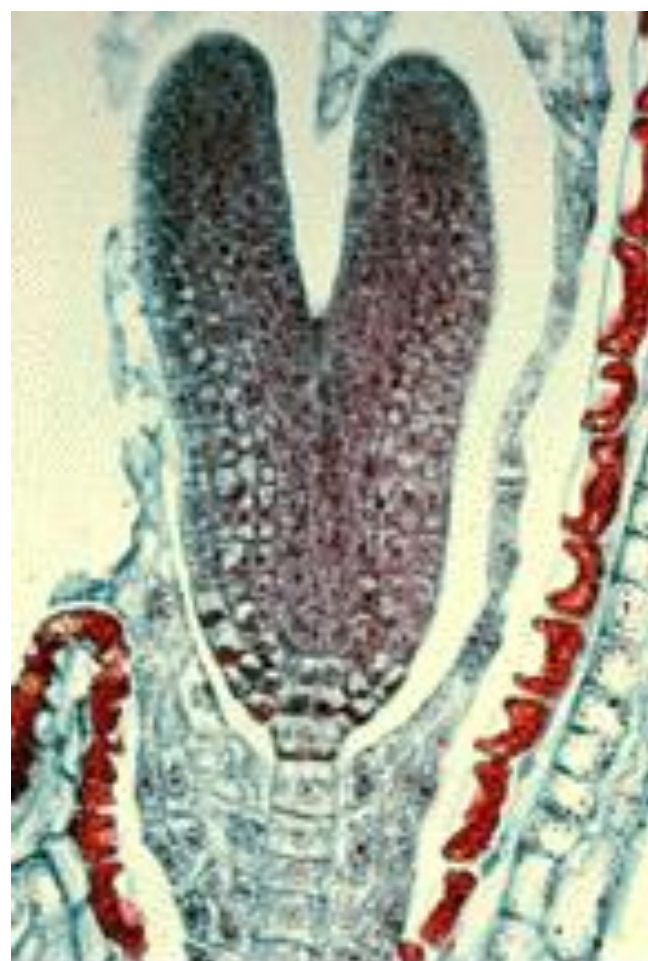
8 cell proembryo



32 cell embryo



globular embryo



heart stage
embryo



curled cotyledon
embryo

Somatic Embryogenesis

مرحله القا Induction

- به منظور تشکیل اندام پیش جنین اکسین مورد نیاز است
- معمولاً از 2,4-D استفاده می شود
- گاهی نیز NAA, Dicamba

Development نمو

- از آنجا که اکسین از نمو بعدی جنین جلوگیری میکند در این مرحله حذف میشود

- مراحل نمو مشابه جنین زایشی می باشد

- Globular
- Heart
- Torpedo
- Cotyledonary
- Germination

بلوغ Maturation

- در مرحله بلوغ به حضور ABA نیاز است تا جنین ها شکل طبیعی خود را بدست بیاورند

جوانه زنی Germination

- گاهی فقط 4-5% جوانه زنی اتفاق می افتد

- ساکاروز 10% - مانیتول 4%

- خشک کردن

✓ کاهش آبسزیک اسید

✓ درصد نهایی رطوبت 10-40%

- سرما دادن

فاکتورهای موثر

- ژنوتیپ

- تنظیم کننده های رشد

- منبع کربن

- نیتروژن

جنین زایی مستقیم

DIRECT EMBRYOGENESIS



تشکیل جنین از برگ های *Rosa hybrida*



تشکیل جنین از تخمک *Citrus*

جنین زایی غیر مستقیم

INDIRECT EMBRYOGENESIS





Aesculus hippocastanum تشکیل جنین از گل آذین