

Tissue culture techniques

تکنیک ها و کاربردهای کشت بافت

ریز ازدیادی

Micro-propagation

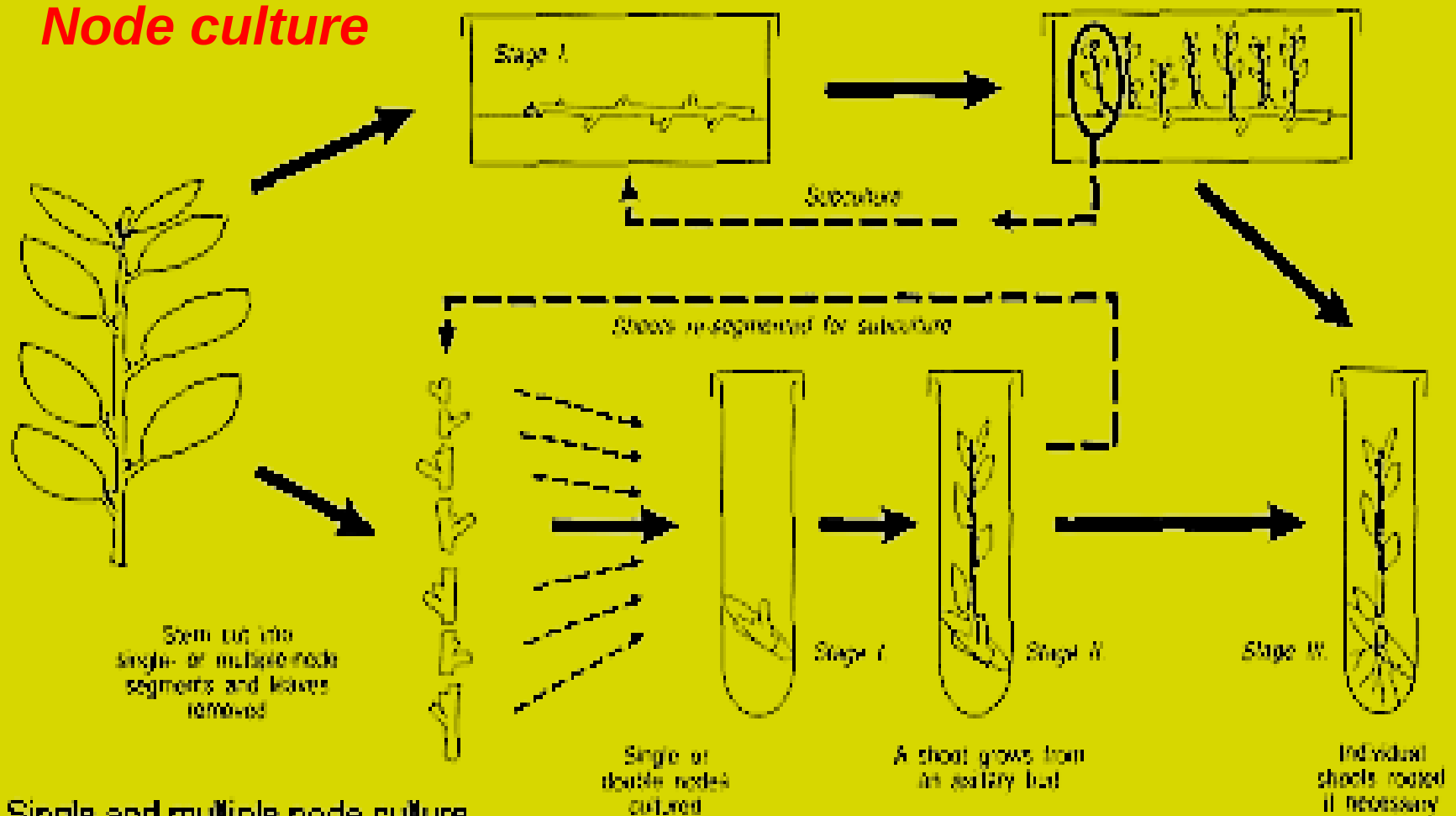
➤ ریز ازدیادی شامل تکثیر مشابه اصل ژنوتیپ مورد نظر با استفاده از تکنیک های درون شیشه ای است.

➤ تولید انبوه باعث کاهش قیمت تمام شده هر گیاهچه میگردد.

کشت گره

Node culture

With some plants, it is possible to culture stem segments consisting of multiple nodes



Single and multiple node culture
(George, 1993)

○ کشت تعليق ياخته ای شامل ياخته ها و مجموعه های ياخته ای می باشد که در یک محيط آبگونه غير ساکن در حال تعليق و رشد هستند.

○ فاکتورهای که کشت کالوس را تحت تاثير قرار میدهند در موفقيت سوسپانسیون سلولی نیز تاثير دارند.

○ گونه های دولپه پاسخ بهتری نسبت به گونه های تک لپه به کشت سلول داشته اند.

هم زدن Agitation

- مجموعه سلولی را به اندازه های با تراکم کم کاهش میدهد
- تنظیم یکنواختی سلول ها و توده سلولی در محیط کشت
- تنظیم تبادل گازی

محیط کشت

- مشابه کشت کالوس

- اغلب محیط Gamborg B5

کاربرد کشت های سلولی و تعلیق یاخته ای

- بررسی فاکتورهای موثر بر تولید متابولیت های مختلف
- نقش ترکیبات و متابولیت های مختلف
- تولید متابولیت های ثانویه

Secondary metabolites

متابولیت های ثانویه

❖ متابولیت های اولیه ترکیباتی هستند که گیاه جهت زنده مانی به آنها نیاز دارد:
کربوهیدرات ها پروتئین ها – چربی ها

❖ متابولیت های ثانویه ترکیباتی هستند که نقش کلیدی در متابولیسم گیاه ندارند

❖ برخی ترکیبات ثانویه نقش محافظت کننده از میکروب ها و حیوانات را برای گیاه دارند

❖ متابولیت های ثانویه در صنایع داروسازی، به عنوان رنگ و طعم دهنده غذاها و در عطریجات به کار می روند
❖ این ترکیبات شامل ترپن ها، گلیکوسیدها، ترکیبات استروئیدی، آکالوئیدها و .. می باشند

تولید رنگدانه

➤ برخی کشت های سلولی منجر به تجمع رنگدانه های خاصی می گردد.

➤ به عنوان مثال *Lithospermum erythrorhizon* تولید رنگدانه قرمز رنگ shikonin می کند که در صنایع آرایشی به کار می رود.

➤ سایر کشت های سلولی در تولید آنتوسیانین، رنگ های آبی فلاونوئید به کار میروند که در صنایع غذایی به کار می روند.



کشت کالوس *Oxalis reclinata* در روشنایی زرد رنگ و در تاریک رنگدانه
قرمز آنتوسیانین تولید می کند

Protoplast culture

کشت پروتوپلاست

دیواره سلول گیاهی

- وظیفه اصلی دیواره سلولی تنظیم فشار دیواره بر پروتوپلاست و جلوگیری از جذب بیش از حد آب و ترکیدن سلول است.
- دیواره سلولی ترکیبی از سلولز، همی سلولز، پکتین، پروتئین و لیپید است.
- سلولز پلی مر **D-glucose**، همی سلولوز شامل گزیلان (پلی مری از چند منوساکارید) است.
- پکتین پلی ساکاریدی حاوی گالاکتاز، آرابینوز و گالاکتورونیک اسید است.

دلایل انجام کشت پروتوپلاست یا امتزاج آن

➤ با امتزاج پروتوپلاست می توان هیبریدهای گیاهی تولید نمود که به دلیل ناسازگاری در حالت طبیعی یا سایر روش های اصلاحی نمی توانند تشکیل شوند.

➤ پروتوپلاست جدا شده کاندیدای مناسبی جهت وارد ساختن اجزای بیگانه به سیتوپلاسم است. این اجزا شامل هسته، میتوکندری، کلروپلاست، DNA ، پلاسمید، باکتری و ویروس ها می باشد.

➤ پروتوپلاست می تواند به منظور مطالعه دیواره سلولی استفاده گردد.

تهیه پروتوپلاست

- تهیه محلول با فشار اسمزی مورد نیاز سلول
- آزاد سازی پروتوپلاست به شکل مکانیکی یا آنزیمی
- خالص سازی
- سنجش قوه نامیه
- تعیین غلظت پروتوپلاست حاصله
- کشت در محیط مناسب
- باززایی

➤ قبل از حذف دیواره سلول باید سلول ها را در یک محلول ایزوتونیک پلاسمولیزکننده قرار داد.

➤ مانیتول یا سوربوتول 13% از الکل های گیاهی هستند که توسط گیاهان تولید میگردند و معمولا برای این منظور استفاده می گردند.

➤ بهتر است قبل از شروع کار غلظت های مختلف این مواد را آزمود (8-15% وزنی به حجمی)

جداسازی مکانیکی پروتوپلاست

➤ برش بافت های پلاسمولیز شده خارج سازی پروتوپلاست

➤ این روش عملی سخت است که کارایی پائینی دارد.

➤ مزیت این روش این است که تاثیرات منفی آنزیم ها بر متابولیسم پروتوپلاست اعمال نمی گردد.

جداسازی آنزیمی پروتوپلاست

✓ کاربرد آنزیم ها کارایی بیشتری در حصول پروتوپلاست یکسان و یکدست پس از حذف بقایای سلولی دارد

✓ پروتوپلاست از منابع مختلف مثل مواد گیاهی گلخانه، مزرعه، گیاهان ریزازدیادی شده و ... حاصل می گردد.

قاعده کلی:

- تهیه مواد گیاهی استریل
- غوطه وری در شرایط اسمزی مناسب
- تسهیل نفوذ آنزیم
- تیمار آنزیمی
- خالص سازی پروتوپلاست های جدا شده (حذف بقایای آنزیم ها و اجزای سلول)
- انتقال به محیط کشت مناسب

خالص سازی پروتوپلاست جدا شده از اجزای سلولی و بقایای آنزیم ها جهت انتقال به محیط مناسب

- پروتوپلاست ها با گذراندن از یک صافی نایلونی (اندازه منافذ 64 میکرومتر) از بقایای ناخواسته، سلول های هضم نشده، دیواره سلولی و ... خالص می گردند.
- سپس 5 دقیقه سانتریفیوژ انجام می شود.
- پروتوپلاست در ته لوله جمع می شود.
- پروتوپلاست در محیط کشت حل شده
- (حاوی 13% مانیتول) و این پروسه 3 بار تکرار می شود.
- پروتوپلاست جهت سنجش قوه نامیه و غلظت مورد بررسی قرار می گیرد.

سنجش قوه نامیه پروتوپلاست

UV microscopy /Fluorescein diacetate ➤

ردياب های فلورسانس: فقط درون پلاسمای پروتوپلاست های دارای قوه نامیه تجمع می یابند و توسط میکروسکوپ قابل تشخیص هستند.

Evans blue ➤

رنگ آبی ایوان: پروتوپلاست های سالم و دارای قوه نامیه رنگ آبی را از خود خارج می سازند. نفوذ ناپذیری سلول به رنگ آب ایوان حاکی از زنده بودن سلول می باشد.

Endosperm culture

کشت اندوسپرم

✓ به استثنای **Orchidaceae** ، **Podostemaceae** و **Trapaceae** در سایر نهاندانگان بافت اندوسپرم تشکیل می شود که تا زمان نمو کامل جنین یا حتی بلوغ بذر به عنوان منبع غذایی ایفای نقش می کند.

✓ بافت اندوسپرم تریپلوئید و حاوی ترکیب سه سلول دو سلول از مادر و یک سلول از پدر

کاربردهای کشت اندوسپرم

- ✓ از سال 1965 تاکنون گیاهان تریپلوئید متعددی از گونه های گیاهی حاصل شده اند.
- ✓ در صورتی که حضور بذر در گیاه اهمیتی نداشته باشد یا بی بذری صفتی مطلوب به شمار رود می توان با تولید گیاهان تریپلوئید محصولات باارزشی را تولید نمود.
- ✓ سلول های اندوسپرم تریپلوئید و دارای توان توتیپوتنسی بالایی هستند که منجر به تولید گیاهان سه گان در یک مرحله می گردد.
- ✓ بافت اندوسپرم حاوی مواد غذایی بوده که در حین جوانه زنی به بذر منتقل می شود. در نتیجه امکان بررسی بیوسنتز و متابولیسم ترکیبات اصلی گیاهی را نیز فراهم می سازد.

□ به منظور کشت اندوسپرم بالغ باید میوه را استریل نموده، اندوسپرم را به همراه جنین و در شرایط استریل خارج نمود

□ به منظور کشت اندوسپرم نابالغ بذر ها را استریل کرده و بافت اندوسپرم با دقت در شرایط استریل و زیر میکروسکوپ از آن خارج می گردد.

□ بهتر است بافت اندوسپرم عاری از بقایای جنین باشد

□ در غیر این صورت در نمونه های کالوس حاصل شده بافت تریپلوئید اندوسپرم مخلوط با بافت دیپلوئید جنین بودن و کشت خالص و همگنی حاصل نمی گردد.

کشت گامت ها Gametophyte culture

هدف

✓ تولید گیاهان هاپلوئید با القای جنین زایی از تقسیمات مکرر گامت نر یا دانه گرده نابالغ.

✓ کروموزم های سپس توسط کلشی سین دوبرابر می گردد.

✓ نتیجه دستیابی به گیاهان دیپلوئید هموزایگوس بارور است.

➤ گیاهان هاپلوئید حاصله یک کپی از کروموزوم ها دارند در نتیجه تمام صفات را بروز می دهند چون نسخه مقابل شان جهت پوشش دادن صفات را ندارند

➤ کشت بساتک را اغلب آندروژنیز می نامند **Androgenesis**
➤ اگر نمونه اولیه تتراپلوئید باشد نمونه حاصله دیپلوئیدی است که دی هاپلوئید نام دارد **Di-haploid**

✓ میکروسیپور: قبل از وقوع اولین تقسیم میتوز در دانه گرده
✓ دانه گرده: بعد از وقوع میتوز

کشت پساک Anthr culture

گیاهان مادری

➤ در کشت بساک توجه به وضعیت فیزیولوژیک گیاهان مادری حائز اهمیت می باشد (فتوپریود، دما، کاربرد آفت کش ها و ...)

➤ به منظور کشت بساک از گل ها در هنگام شروع شکوفایی استفاده می گردد.

➤ برخی گزارش ها حاکی از موفقیت بیشتر کار با نمونه هایی است که در شرایط روز کوتاه و شدت نورهای بالا رشد یافته اند.

مرحله رشدی بساک و دانه گرده

✓ مرحله رشدی بساک از جمله عوامل مهم در حصول گیاهان هاپلوئید از کشت بساک است.

واکنش گیاهان مختلف

➤ قبل از تقسیم میتوز Pre-mitotic

در برخی گیاهان بهترین پاسخ زمانی بوده که بساک تقسیم میوز را صورت داده ولی هنوز تقسیم میتوز گرده شروع نشده (*Hyoscyamus*)

➤ در حین تقسیم میتوز Mitotic

در برخی گیاهان بهترین پاسخ زمانی بوده که بساک در زمان شروع تقسیم میتوز گرده بوده (*Nicotiana tabacum*)

➤ بعد از شروع تقسیم میتوز Post-mitotic

در برخی گیاهان بهترین پاسخ زمانی بوده که بساک بعد از تقسیم میتوز گرده بوده (*Atropa belladonna*)

پیش تیمارها

تحقیقات نشان داده که پیش تیمار گل ها و گل آذین در مرحله مورد نظر نقش مهمی در بهبود تولید جنین داشته است

➤ پیش تیمار دمایی:

2-30 روز در دمای 3-10 درجه سانتی گراد (*Nicotiana Datura*) یا
35 درجه (*Capsicum*)

➤ غوطه وری گل آذین های در آب به مدت چند روز

➤ سانتریفیوژ بساک ها 3-5 دور در ثانیه

➤ استفاده از خلا

➤ بساک های جدا شده روی محیط حاوی آگار یا محیط مایع کشت شده تا بساک مراحل نمو خود را طی کند

➤ دانه گرده از بساک جدا گردیده

➤ دانه گرده را توسط روش مکانیکی یا آزاد شدن طبیعی دانه گرده برداشته و سپس روی محیطی مایع کشت می شود

مزایا و معایب گیاهان هاپلوئید

مزایا

✓ فنوتیپ = ژنوتیپ

✓ حضور یک سری از کروموزوم ها

✓ تسهیل غربال گری موتانت ها

✓ دیپلوئید های هموزایگوس پس از دو برابر سازی کروموزوم ها حاصل می شود

✓ زمان لازم برای رسیدن به این گیاهان چند هفته است در حالی که در روش های اصلاح سنتی چند نسل خودگشتی لازم است

عیب

○ ممکن است دانه گرده حاوی ژن های کشنده ای باشد که در صورت لقاح با تخمک هیچ گاه فرصت تظاهر نیابد

دوبرابر کردن تعداد کروموزم ها

➤ باززایی از طریق کشت بافت:

برگ های مسن قابلیت تولید گیاهان هاپلوئید و دیپلوئید را دارند

➤ القای شیمیایی توسط کلشی سین Colchicine

با استفاده از این ماده بر جنین گیاه هاپلوئید امکان دسترسی به گیاه دیپلوئید میسر می گردد

فروبری بساک گیاهچه های تازه تشکیل شده در کلشی سین 0.5% به مدت 24-48 ساعت

یا استفاده از کلشی سین 0.4% بر لانولین به منظور کاربرد بر جوانه های جانبی

➤ استفاده از برخی علف کش ها مثل Oryzaline یا Amiprophos-methyl

اصلاح توسط روش موتاسیون

نگهداری و انتقال ژرم پلاسما