بسمه تعالی

کشت بافت گیاهی، کاربردها و چشم‌انداز آینده

کشت بافت گیاهی اصطلاح گسترده‌ای است که به کشت هر قسمت از گیاه (سلول‌ها، بافت‌ها یا اندام‌ها) و جدا از گیاه در محیط‌های کشت مصنوعی، در شرایط استریل و در محیط‌های کنترل شده اشاره دارد. این مجموعه تکنیک‌ها به عنوان یک رویکرد تجربی، جهت نشان دادن نظریه‌ی سلولی به وجود آمده‌اند؛ نظریه‌ی سلولی بیان می‌کند که همه‌ی موجودات زنده از سلول‌ها که واحدهای اساسی ساختاری و تولیدمثلی هستند، تشکیل شده‌اند و همچنین کشت بافت گیاهی بر اساس مفهوم همه‌توانی[1] سلول ها ، یعنی پتانسیل ژنتیکی یک سلول برای تولید یک جاندار کامل چندسلولی، تعریف می‌شود.

[1] Totipotency

بیشتر بدانید

تاریخچه کشت بافت گیاهی

اولین گزارش از موفقیت کشت بافت در سال ۱۹۰۲ بود که گاتلیب هابرلند[۲] توانست سلول‌های مزوفیل گیاهی را با خاصیت همه‌توانی سلول ها کشت، تولید و حفظ نماید. از آن زمان به بعد، کشت بافت به طور مداوم با گزارش‌هایی که استفاده از آن را در برنامه‌های اصلاحی، تولید زیست‌دارو و حفظ تنوع زیستی ژنتیکی نشان می‌داد، توسعه داده شد. گیاه‌شناس آلمانی گاتلیب هابرلند به عنوان پدر کشت بافت گیاهی شناخته می‌شود. وی بعدها کار خود را در این حوزه ادامه داده و بافت پارانشیم نردبانی[۳] رشد کرده روی محلول نمکی را توسعه داد. دقیقاً دو سال بعد هانینگ[۴] (۱۹۰۴) رویان‌های بالغ را جدا کرده و آن‌ها را در شرایط آزمایشگاهی روی یک محلول قندی و نمکی معدنی رشد داد. این امر نقطه عطف توسعه کشت رویان بود. پس از آن در دهه ۱۹۵۰ بود که از صنعت کشت بافت در مقیاس وسیع برای تولید صنعتی گل ارکیده استفاده شد.

[2] Gottlieb Haberlandt
[3] Palisade tissue
[4] Hanning

الزامات کشت بافت گیاهی

نیازهای اساسی کشت بافت گیاهی به صورت شماتیک در شکل ۱ نشان داده شده است.

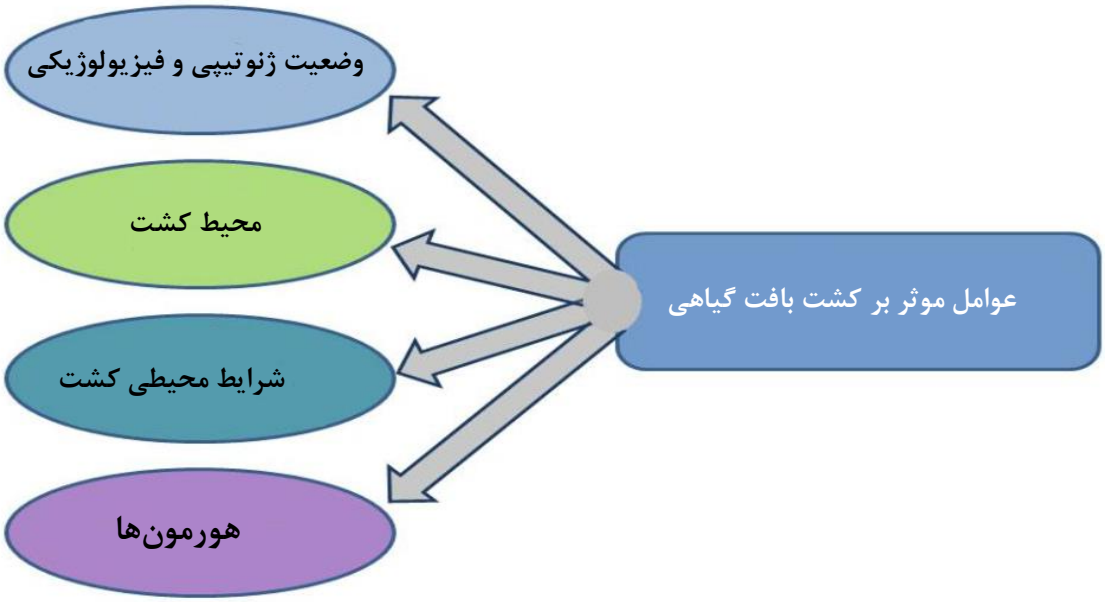
با توجه به مرحله‌ی جداکشت‌های[5] استفاده شده (جداکشت: بخش زنده و کوچکی که از بافت گیاه جدا شده و در محیط کشت مغذی قرار داده می‌شود)، از دو حالت محیط کشت در کشت بافت استفاده می‌شود؛ در ابتدا برای قرار دادن جداکشت‌ها، محیط کشت جامد به کار می‌رود اما در صورت مطلوب بودن سوسپانسیون سلولی، می‌توان آن را مستقیماً در محیط مایع نیز قرار داد. محیط جامد فقط یک فاز ژله‌ای از محیط مایع است. به طور کلی گیاهان یا جداکشت‌ها به سه ماده مغذی اصلی نیاز دارند؛ که شامل انواع یون‌ها ، مکمل‌های آلی و یک منبع کربن ثابت است.

محیط‌های کشت، شامل سه جزء زیر است:

۱. نیازهای اساسی- یون‌ها به صورت ترکیب پیچیده‌ای از نمک‌ها.
۲. مکمل‌های اضافی- مکمل‌های آلی مانند ویتامین‌ها و آمینواسیدها.
۳. منابع کربن- معمولاً به صورت سوکروز تأمین می‌شود.

[5] Explants

به جز این موارد، یک محیط کشت کامل حاوی هورمون‌های اکسین[۶] و سیتوکینین[۷] است که به عنوان هورمون رشد گیاهی استفاده می‌شوند ترکیب محیط کشت روی ظاهر بافت‌هایی که از جداکشت‌ها رشد می‌کنند، بسیار اثرگذار است. اکسین اضافی ممکن است باعث تکثیر سریع ریشه شده و میزان بیش از حد سیتوکینین ممکن است باعث تشکیل ساقه شود. بنابراین باید در طول مرحله اولیه، تعادل حفظ شود تا یک رشد سازمان‌دهی نشده یا کالوس تولید شود.



شکل ۱- نیازهای اساسی کشت بافت گیاهی

[6] Auxin
[7] Cytokinin

برای دست‌یابی به یک کشت موفقیت‌آمیز، کل فرآیند باید در شرایط استریل با استفاده از یک هود جریان آرام[8] مجهز به فیلتر هپا انجام گردد. منبع جداکشت‌ها قبلاً به شدت توسط محیط آلوده شده است، بنابراین بخشی که باید برای استفاده خارج شود، با ضدعفونی‌کننده‌ها که معمولاً الکل و هیپوکلریت سدیم یا کلسیم هستند، استریل می‌شوند.

فرآیند کشت بافت گیاهی

رشد جداکشت‌ها به دو خاصیت بنیادی سلول‌های گیاهی یعنی همه‌توانی و انعطاف‌پذیری[9] سلول بستگی دارد. این دو ویژگی سلول‌های گیاهی، ظرفیت سلول‌های زنده را برای تبدیل شدن به یک سلول جدید که پس از فرآیندهای تمایز قادر به تشکیل بافت‌ها، اندام‌ها، دستگاه‌ها و افراد کامل است، تعیین می‌کند.

مراحل مهم قبل از شروع فرآیند کشت بافت:

۱. **آماده‌سازی محیط**: اولین و ابتدایی‌ترین مرحله کشت بافت، نیاز به محیط مغذی دارد؛ این محیط می‌تواند با در نظر گرفتن نوع جداکشت، مایع یا جامد باشد. محیط باید شامل تمام اجزای اساسی مانند عناصر میکرو و ماکرو، آمینواسیدها، ویتامین‌ها، منبع آهن و منبع کربن باشد.

[8] Laminar flow cabinet
[9] Plasticity

۲. **تکثیر کشت آسپتیک**: این روش طراحی شده برای ایجاد مانعی بین میکروارگانیسم‌های موجود در محیط و کشت سلولی استریل و به مجموعه‌ای از روش‌ها برای کاهش احتمال آلودگی از این منابع بستگی دارد.

۳. **فرایند تلقیح جداکشت** : همانطور که قبلاً گفته شد، تمام مراحل پیش از این در شرایط استریل انجام شدند و در این مرحله، جداکشت‌های مورد نظر در محیط استریل شده قرار داده می شوند.

۴. **رشد جداکشت**: محیط‌های دارای جداکشت به صورت استریل مهر و موم شده و در اتاق برای رشد بیشتر در زیر نور پراکنده در ۲۵ ± ۲ درجه سانتیگراد با رطوبت نسبی ۵۰ تا ۶۰٪ نگهداری می‌شوند.

۵. **مقاوم‌سازی ریزگیاهان**: همانند شرایط مصنوعی، رطوبت و سایر نیازها، معین می‌شوند و از آنجا که گاهی اوقات این گیاهان حاصل از جداکشت‌ها آماده نیستند تا با شرایط مزرعه کنار بیایند، برای سازگاری با شرایط مزرعه مقاوم می‌گردند.

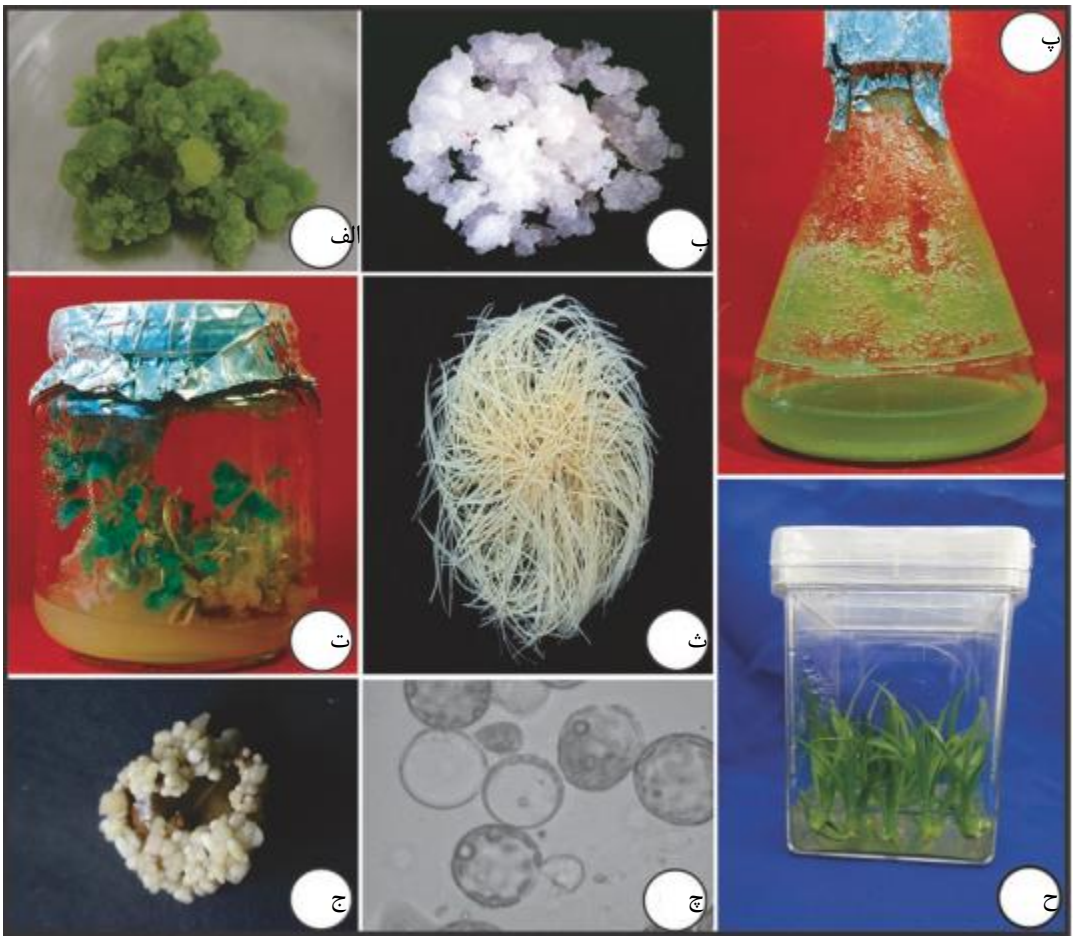
بیشتر بدانید

کشت‌های گیاهی مختلفی وجود دارد که با عناوینی همچون ریزازدیادی[10] گیاه، جهش‌زایی، تراریختی ژنتیکی و غیره شناخته می شوند. همه ی این روش ها کشت گیاهی دو فرآیند به نام های اندام‌زایی[11] و رویان‌زایی سوماتیک[12] را احتیاج دارند.

اندام‌زایی: فرایند تشکیل اندام‌های گیاهی از یک جداکشت با ماهیت بافتی تعیین شده آن مرتبط است و این بدان معنی است که یک اندام بافتی منفرد به یک گیاه کاملاً جدید، تکوین می‌یابد. این فرایند دو نوع است که نوع اول یک روش مستقیم است؛ یعنی ساقه‌ها مستقیماً از جداکشت‌ها به دست می‌آیند و در روش دوم، اندام‌زایی غیر مستقیم از کالوس تشکیل شده از جداکشت‌ها رخ می‌دهد. در این حالت، هر عضوی مانند ریشه، ساقه یا برگ به طور مستقیم یا غیرمستقیم از توده‌های سلولی مریستم یا تمایز نیافته (کالوس) ایجاد می‌شوند. این روش شامل تولید کالوس و تمایز مریستم اکتسابی[13] به اندام‌ها است.

رویان‌زایی سوماتیک: روش بازتولید گیاه در آزمایشگاه است که به طور عمده برای تکثیر کلونال (تکثیر نسخه‌های یکسان ژنتیکی یک رقم با تولید مثل غیرجنسی، تکثیر کلونال نامیده می‌شود و جمعیت گیاهی که از یک فرد منفرد با تولید مثل غیرجنسی به دست می‌آید، یک کلون را تشکیل می‌دهد) پایدار استفاده می‌شود (شکل ۲).

[10] Micropropagation
[11] Organogenesis
[12] Somatic embryogenesis
[13] Adventitious meristem



شکل ۲- (الف) کالوس میکسوتروف گیاه *Catharanthus roseus* (ب) کالوس هتروتروف این گونه. (پ) کشت غوطه‌ور آن. (ت) بازسازی این گیاه از کالوس. (ث) کشت ریشه این گونه. (ج) رویان‌زایی سوماتیک در قهوه کانفورا (*Coffeacanephora*). (چ) پروتوپلاست قهوه کانفورا. (ح) ریزازدیادی گیاه *Agave fourcroydes*

مراحل کشت بافت گیاهی

آماده‌سازی کشت بافت گیاهی: انتخاب یک جداکشت مناسب از یک گیاه سالم و قوی از اصول اساسی کشت است. اگرچه از هر بخش از گیاه می‌توان به عنوان جداکشت استفاده کرد، رشد و استقرار موفقیت‌آمیز آن به بهینه‌سازی و نیاز فیزیولوژیک گیاه در محیط بستگی دارد. برای اینکه شانس رشد جداکشت به حداکثر برسد، باید شرایط کشت مناسب، تغذیه کافی، کنترل درجه حرارت و آبیاری فراهم گردد. در هنگام کشت، جداکشت‌ها بیشتر در

معرض عفونت هستند، بنابراین از ضدقارچ، ضدباکتری و حشره‌کش‌ها استفاده می‌شود تا از عفونت میکروارگانیسم‌های موجود در سراسر بافت جلوگیری کند.

مرحله استقرار: حذف آلودگی میکروبی از سطح جداکشت از اصول اساسی کشت است. این گام مرحله‌ای بسیار مهم و دشوار در سیستم تکثیر آزمایشگاهی است، زیرا کاملاً به وضعیت فیزیولوژیک جداکشت‌ها بستگی دارد. در این مرحله، بافت گیاه از طریق ضدعفونی (محصولات ضدباکتری و ضدقارچ) به صورت سطحی استریل می‌شود؛ ماهیت شیمیایی مواد ضدعفونی‌کننده بستگی به نوع جداکشت‌ها تفاوت دارد. رایج‌ترین ضدعفونی‌کننده‌هایی که برای گندزدایی در کشت بافت استفاده می‌شوند، هیپوکلریت سدیم، اتانول و هیپوکلریت کلسیم هستند.

مرحله تکثیر: در این مرحله تعداد واحدهای کشت به تعداد دلخواه افزایش می‌یابد. مجدداً مرحله تکثیر با توجه به گونه یا ژنوتیپ‌های گیاه به یک تکنیک و پروتکل خاص نیاز دارد. به عنوان مثال، ساقه‌های جانبی سیب‌زمینی شیرین از طریق اندام‌زایی تکثیر می‌شوند، در حالی که قهوه برای تکثیر کارآمد، به رویان‌زایی سوماتیک احتیاج دارد.

آماده‌سازی جداکشت‌ها برای شرایط خارج آزمایشگاهی[14]: این مرحله می‌تواند همراه با انتشار و تکثیر جداکشت‌ها در همان محیط‌های قدیمی یا جدید انجام شود. گاهی اوقات لازم است که محیط تغییر کند و در چنین مواردی نیاز است که محیط با اصلاح تغذیه‌ای و تنظیم‌کننده رشد تغییر کند تا طبق پروتکل، باعث ریشه‌دهی یا ایجاد

[14] *Ex vitro*

ساقه شود. گیاهان برای فاز خارج آزمایشگاهی با اصلاح ترکیب محیط و تبادل گاز در داخل کشت تنظیم شده آماده می‌شوند.

سازگاری گیاه[15]: این مرحله سازگاری گیاهان آزمایشگاهی است تا با خارج از محیط آزمایشگاه روبه‌رو شوند. بنابراین بسیار مهم است که شدت نور، دما، رطوبت اتاق و رطوبت بستر در حد مطلوب حفظ شود. در شرایط آزمایشگاهی، یک رطوبت بالا به طور ثابت حفظ می‌شود تا ریشه‌های فعال تشکیل شوند و سازگاری را در یک محیط واقعی که از دست دادن آب بیشتر است، تسهیل کند.

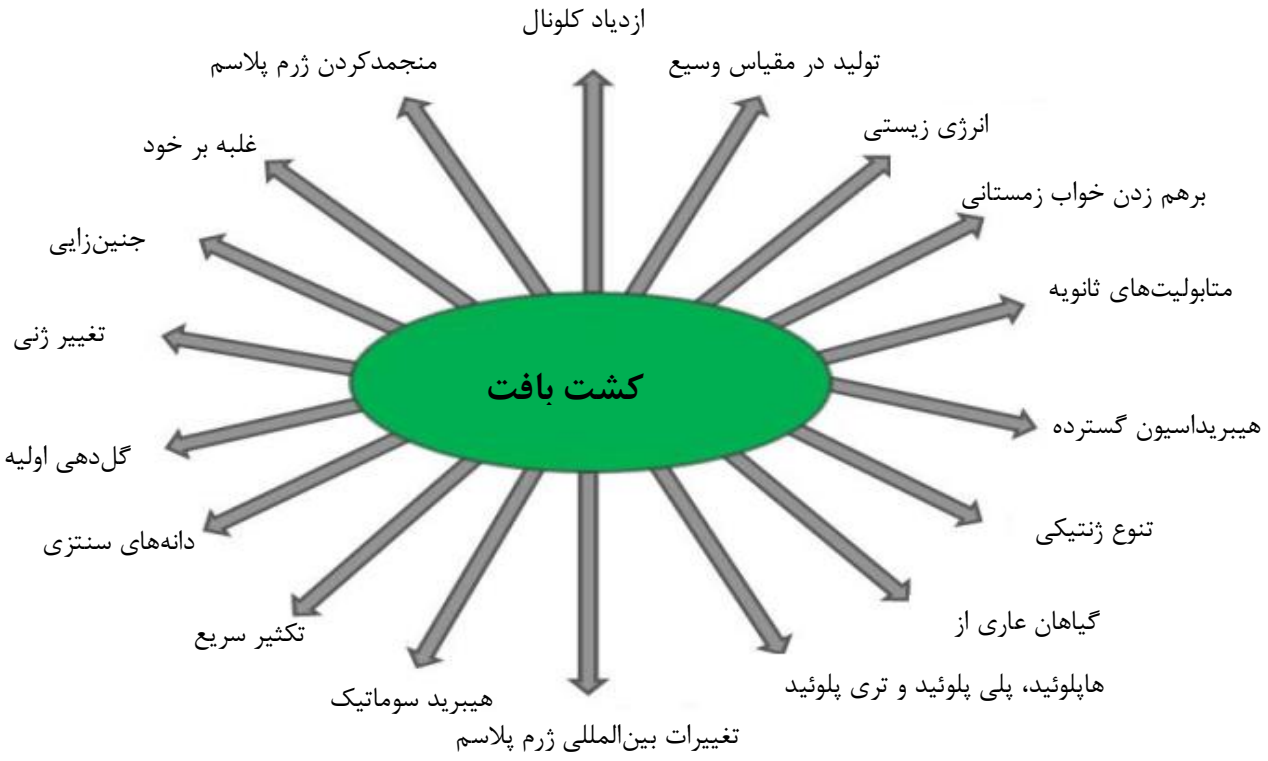
بیشتر بدانید

کاربرد و پتانسیل کشت بافت گیاهی

استفاده از کشت بافت گیاهی را می‌توان براساس رفتار سلول‌های گیاهی، اصلاح گیاه، تکثیر کلونال، تولید محصول، ذخیره ژرم‌پلاسم و گیاهان عاری از پاتوژن بررسی کرد (شکل ۳). کشت بافت گیاهی کاربردهای گسترده‌ای دارد و برای بسیاری از تحقیقات دانشگاهی علوم گیاهی کاربردی ضروری است. در دانشگاه از کشت بافت گیاهی برای بررسی ماهیت همه‌توانی سلول‌های گیاهی و تجزیه و تحلیل نقش هورمون‌های تمایز سلولی در اندام‌زایی استفاده می‌شود. از گیاه مبتنی بر کشت بافت می‌توان در مطالعه گونه‌های مهندسی شده ژنتیکی استفاده کرده و تنظیم ژن را در گونه‌های تراریخته بررسی کرد.

[15] Acclimatization

تکنیک‌های کشت بافت کاربردهای دیگری نیز در حوزه علوم گیاهی کاربردی، کشاورزی و بیوتکنولوژی گیاهی دارند (شکل ۳). ایده اصلی استفاده از کشت بافت گیاهی این است که رشد گیاهان همسان‌سازی شده به شکل سلول‌های معلق آسان بوده و می‌توان آن‌ها را برداشت کرد. سلول‌های مهندسی ژنتیکی شده از گیاهان کامل تراریخته نیز به فرآیند کشت بافت نیاز دارند. تشکیل رویان‌های هاپلوئید سوماتیک به این تکنیک‌ها نیاز دارد، بنابراین این روش در علوم گیاهی دانشگاهی و کاربردی اهمیت زیادی دارد.



شکل۳- استفاده و چشم اندازهای متفاوت کشت بافت گیاهی

اومیکس و کشت بافت گیاهی

ژنومیکس[16] (مطالعه ساختار، عملکرد و تنظیم ژن و تکنیک‌های مربوط به آن)، ترنس‌کریپتومیکس[17] (مطالعه ترنس‌کریپتوم یا مجموعه رونوشت ژن‌هایی که در یک جاندار رونویسی می‌شوند)، پروتئومیکس[18] (مطالعه مجموعه پروتئین‌های ترجمه شده در یک جاندار)، و متابولومیکس[19] (مطالعه تمام متابولیت‌های موجود در یک جاندار) برای مطالعه فرآیندهای بیولوژیکی در گیاهان ضروری شده است. آگاهی در مورد ژنوم‌ها، ترنس‌کریپتوم‌ها، پروتئوم‌ها و متابولوم‌های گیاهی در درک فرآیندهای تکوینی پیچیده، مانند اندام‌زایی، جنین‌زایی یا تمایز در آزمایشگاه و تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در شرایط آزمایشگاهی تأثیر مثبتی گذاشته است. علاوه بر این، متابولومیکس می‌تواند برای بررسی متابولیسم ثانویه نه تنها در طی فرایندهای ریخت‌زایی، بلکه به طور عمده در کشت سلول، بافت و اندام گونه‌های گیاهی که تولید کننده متابولیت‌های ثانویه مطلوب از نظر صنعتی و دارویی هستند، بسیار مفید باشد.

اپی‌ژنتیک در کشت بافت گیاهی

تغییرات اپی‌ژنتیکی (تغییرات قابل وراثت در عملکرد ژن که شامل تغییر در توالی DNA نمی‌باشند) بر بازسازی گیاه در شرایط آزمایشگاهی تأثیر می‌گذارد، و همچنین تغییراتی را که اغلب در سلول‌ها یا گیاهان بازسازی شده

16 Genomics
17 Transcriptomics
18 Proteomics
19 Metabolomics

مشاهده می‌شود، توضیح می‌دهد. با توجه به تأثیر این تغییرات اپی‌ژنتیکی در کشت‌های بافت، گنجاندن پروتکل‌هایی در رابطه با تجزیه و تحلیل تغییرات هیستون و تنظیم بیان ژن که در ارتباط با اپی ژنتیک می باشند، مناسب به نظر می‌رسد.

تکثیر و حفاظت

کشت بافت، روش جایگزینی برای مدیریت منابع ارزشمند مانند متابولیت‌های ثانویه است و از طریق ریزازدیادی، به تکثیر گونه‌های در معرض خطر و حفظ تنوع زیستی گیاهان از حداقل مواد گیاهی موجود، کمک می‌کند. بدون شک، ریزازدیادی یا تکثیر کلونال آزمایشگاهی، یکی از گسترده‌ترین‌کاربردهای تجاری کنونی کشت بافت است. اگرچه از کشت بافت می‌توان برای ریزازدیادی تقریباً هر گونه گیاهی استفاده کرد، اما این روش فقط برای گیاهانی توصیه می‌شود که از نظر اقتصادی سودآور باشند. در میان گونه‌های گیاهی که در حال حاضر در سطح تجاری با ریزازدیادی تکثیر می‌شوند، گیاهان زینتی مقام اول را به خود اختصاص داده‌اند. ریزازدیادی گیاهان از طریق سه روش مختلف انجام می‌گیرد:

۱- با تقویت تکثیر جوانه‌های انتهایی یا جانبی و سپس ریشه‌زایی آن‌ها،

۲- با القای تشکیل جوانه نابه‌جا[۲۰] و ریشه‌زایی متعاقب آن،

۳- با تشکیل رویان سوماتیک، بلوغ و جوانه‌زنی.

[20] Adventitious bud

هر کدام از این روش‌ها می‌تواند با توجه به زمینه ژنتیکی یا ظرفیت بازسازی، محیط کشت و شرایط انکوباسیون در مورد گونه‌های گیاهی مختلف با بازدهی متفاوت به کار رود.

بیشتر بدانید

اصلاح نژاد گیاهان و بهبود ژنتیکی

تکنیک‌های کشت بافت گیاهی قطعاً می‌توانند ابزار کمکی قدرتمندی برای برنامه‌های اصلاح نژاد گیاه و بهبود ژنتیکی باشند. تنوع ژنتیکی تشخیص داده شده در بافت کالوس و کشت‌های سلولی می‌تواند به دلیل تغییرات ژنتیکی یا اپی‌ژنتیکی باشد و یک احتمال مهم برای بازیابی انواع سوماکلونال یا جهش‌یافته‌هایی با ویژگی‌های خاص زراعی یا صنعتی را نشان دهد که می‌تواند در سطح سلول یا گیاه به نمایش گذاشته شود. تنوع سوماکلونال[۲۱] ابزاری مفید در کمک به القای تغییرات جزئی یا تمایز درون گونه است. این تکنیک‌ها زمانی مورد نیاز هستند که لازم است جداکشت‌ها در معرض دوز دقیقی برای انجام جهش مورد نظر قرار بگیرند. هزاران یا میلیون‌ها سلول، قطعه‌ای از کالوس یا سوسپانسیون سلولی را تشکیل می‌دهند و می‌توان آن‌ها را برای جداکردن سلول‌های مقاوم در شرایط کنترل‌شده، تحت فشار انتخابی تنش‌های مختلف قرار داد. سلول‌های مقاوم بازیابی شده، ممکن است گیاهان مقاوم کامل را در محیط کشت مناسب بازسازی نمایند. به این ترتیب می‌توان گیاهانی را تولید کرد که در برابر خشکی، شوری و سرما و یا در برابر تنش‌های زیستی تأثیرگذار بر بازده محصول، مقاوم باشند.

[21] Somaclonal

حفظ و نگهداری ژرم‌پلاسم گیاه

حفاظت از ژرم‌پلاسم[۲۲]، از انقراض گونه‌های مختلف گیاهی جلوگیری و از میراث گیاهی کشورها محافظت می‌کند. ژرم‌پلاسم‌های گیاهان منابع ژنتیکی‌ای هستند که برای برنامه‌های اصلاح نژاد و بهبود محصولات، جمع و نگهداری می‌شوند و گنجینه‌های واقعی حفظ شده از تنوع ژنتیکی را نشان می‌دهند که پرورش‌دهندگان گیاهان از آنجا به جستجوی خصوصیات مطلوب خاصی که برای افزایش عملکرد محصولات انتخاب می‌شوند، شروع می‌کنند.

کشت بافت گیاهی ابزاری برای تولید ترکیبات فعال زیستی

اصطلاح متابولیت ثانویه به ترکیبی اشاره دارد که توسط گیاهان، میکروارگانیسم‌ها یا جانوران تولید می‌شود اما برای رشد آن‌ها مورد نیاز نیست. انسان مدت‌هاست که از محصولات متابولیسم ثانویه گیاهی برای تأمین نیازهای مختلف استفاده می‌کند. یک متابولیت ثانویه به طور معمول با ساختار شیمیایی متنوع و پیچیده، مشخص می‌شود که معمولاً شامل مراکز کایرال متعدد و پیوندهای ناپایدار است و این باعث می‌شود سنتز شیمیایی آن چالش برانگیز باشد. بنابراین، مولکول‌های فعال زیستی معمولاً از منابع طبیعی خود استخراج می‌شوند. با این حال، از آنجا که بیشتر گیاهان منبع وحشی هستند، برداشت از زیستگاه‌های طبیعی آن‌ها، خطر بهره‌برداری بیش از حد

[22] Germplasm conservation

و همچنین ایجاد تنگنا در تولید ترکیبات را به همراه دارد. از عوارض بعدی می‌توان به سرعت کم رشد بسیاری از گیاهان منبع، غلظت کم ترکیبات فعال مورد نظر در آن‌ها و نیاز به تنش زیستی یا غیرزیستی برای القای بیوسنتز ترکیبات ثانویه اشاره کرد. این عوامل باعث می‌شوند که استخراج متابولیت‌های ثانویه از گونه‌های گیاهی منبع، بسیار ناکارآمد بوده و به ضرورت رویکردهای جدید در تولید متابولیت‌های ثانویه تأکید نماید.

کشت آزمایشگاهی سلول‌ها و بافت‌های گیاهی تحت شرایط کنترل شده، بستر مناسبی برای تولید محصولات طبیعی گیاهی ارائه می‌دهد. تکثیر آزمایشگاهی (ریزازدیادی) گیاهان یا کشت آزمایشگاهی اندام‌های گیاهی (معمولاً ریشه‌ها) یا کالوس به طور معمول می‌تواند گیاهانی را با توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه فراهم نماید. بنابراین ریزازدیادی به یک سرمایه‌گذاری تجاری سودآور تبدیل شده است و با تسهیل تولید تعداد زیادی گیاه مشابه در طول سال، تولید قطعات تکثیری[۲۳] عاری از بیماری و افزایش قابل توجه نرخ تکثیر، مزایای قابل توجهی نسبت به روش‌های متداول تکثیر باغی فراهم می‌کند.

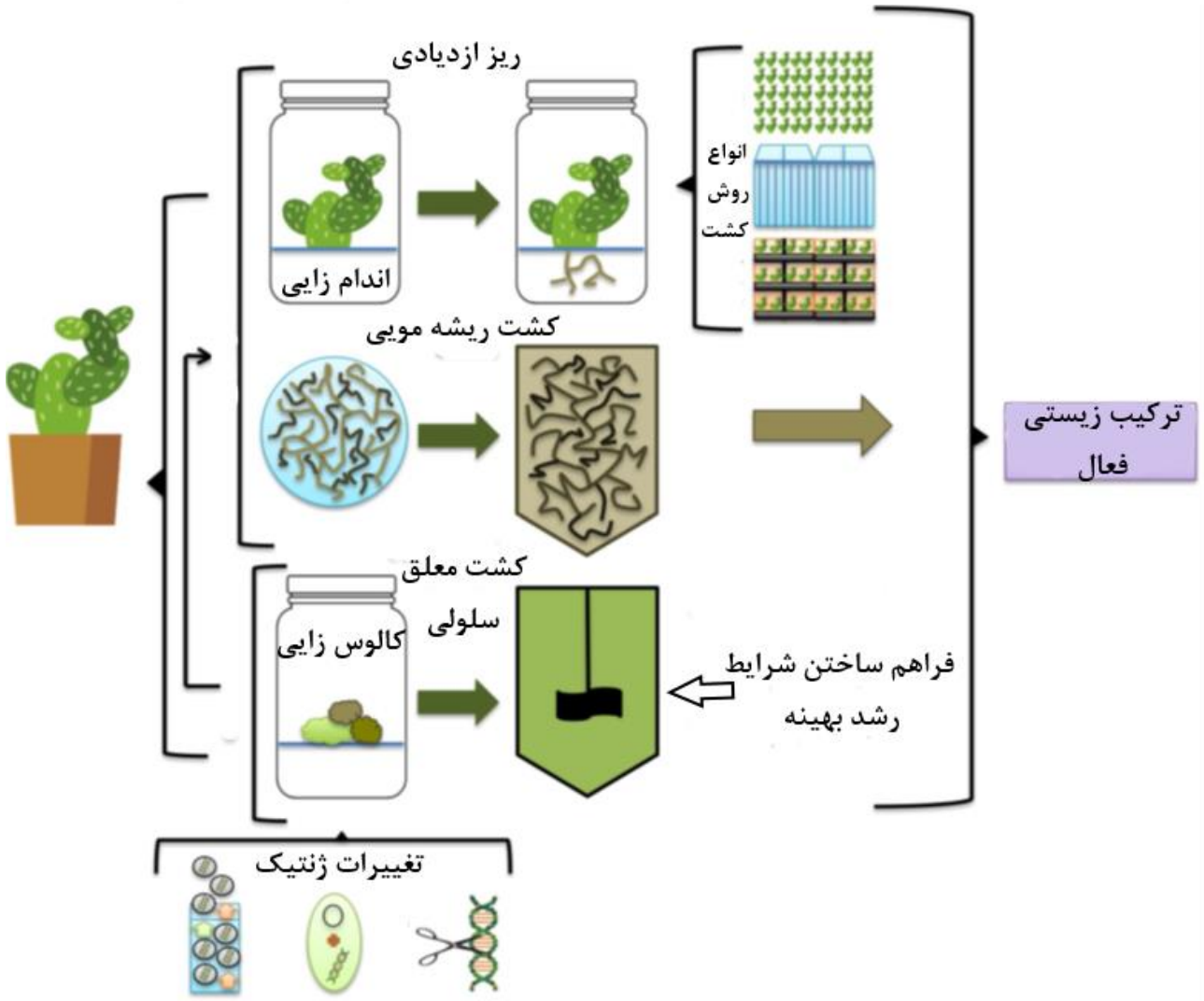
پیشرفت‌های اخیر در کشت سلول‌های گیاهی که نتیجه تجربیات حاصل از کشت سلول‌های میکروبی و جانوری هستند، منجر به افزایش مقیاس مؤثر از مرحله آزمایشی به مقیاس صنعتی شده است. اکنون کشت سلول‌های گیاهی یک روش کارآمد برای تولید چندین محصول طبیعی با ارزش به شمار می‌رود.

[23] Propagules

روش‌های کشت بافت گیاهی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه

روش‌های مختلفی برای کشت بافت گیاهی وجود دارد؛ دو مورد که بیشترین استفاده را داشته‌اند در شکل شماره ۴ ارائه شده‌اند. اندام‌زایی که به تولید اندام‌های گیاهی (ریشه‌ها یا ساقه‌ها) اشاره دارد، می‌تواند به طور مستقیم از مریستم‌ها یا به طور غیرمستقیم از سلول‌های تمایززدایی شده (کالوس) انجام گردد. کشت‌های حاصل بعداً می‌توانند برای تولید انبوه گیاهان (ریزازدیادی) یا رشد اندام‌های خاص (به عنوان مثال ریشه در کشت ریشه مویین) مورد استفاده قرار بگیرند. کالوس‌زایی[۲۴] در پاسخ به قرار گرفتن قطعات جداشده از گیاه در برابر تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد و توده بی‌شکلی از سلول‌ها را تولید می‌کند. سپس می‌توان از کالوس برای بازسازی گیاهان کامل استفاده کرد یا متابولیت‌های مهم را با کشت سلولی غوطه‌ور، در مقیاس وسیع تولید نمود.

[24] Callogenesis



شکل ۴- روش‌های رایج کشت بافت گیاهی شامل اندام‌زایی و کالوس‌زایی که برای تولید ترکیبات فعال زیستی در مقیاس وسیع بکار می‌روند (برای توضیحات بیشتر به متن مراجعه شود).

همانطور که در جدول ۱ ذکر شده است، تمام روش‌های کشت بافت گیاهی مجموعه‌ای از مراحل را دنبال می‌کنند.

ابتدا گیاه مورد نظر باید انتخاب شود؛ این امر به طور کلی به هدف مطالعه بستگی دارد، اما گیاهان عاری از بیماری

و حشرات ترجیح داده می‌شوند. در صورت نیاز، می‌توان از برخی پیش‌تیمارها (قارچ‌کش‌ها و آفت‌کش‌ها) استفاده

کرد. گام بعدی شروع کشت در شرایط آزمایشگاهی است. این فرآیند نیاز به برش قطعات کوچک گیاه

(جداکشت‌ها) یا استفاده از بذرها و استریل کردن سطحی آن‌ها با مواد شیمیایی دارد. سپس جداکشت‌ها در محیط کشت مناسب قرار گرفته و برای مدت زمان کوتاهی انکوبه می‌شوند. جداکشت‌های آلوده، دور ریخته شده و آن‌هایی که سالم مانده‌اند مرحله بعدی را ادامه می‌دهند. در ادامه، مراحل بسته به نوع کشت مورد نظر، متفاوت است. در اندام‌زایی، در این فاز تکثیر انجام می شود که در آن جداکشت‌ها در محیط کشت مناسب برای ساقه یا ریشه کشت می‌شوند، و به همین ترتیب در کالوس‌زایی، کالوس تکثیر می‌گردد. در مرحله بعد، کشت‌های کالوس و ریشه برای تولید در مقیاس وسیع با استفاده از بیوراکتورها کشت می‌شوند، درحالی‌که ساقه‌های تکثیر یافته به منظور ریزازدیادی به محیط‌های کشت تقویت‌کننده ریشه منتقل می‌شوند. سرانجام، گیاهان ریزازدیادشده برای رشد گیاهان منفرد با قابلیت فتوسنتز، مقاوم‌سازی می‌شوند. مقاوم سازی فرایندی است که طی آن ریزازدیادشده سازگاری لازم به شرایط خارج آزمایشگاهی را بدست می آورد. مقاوم‌سازی گیاه به تدریج انجام می‌شود تا امکان سازگاری گیاهان با شرایط خارج آزمایشگاهی را فراهم کند. به طور معمول گیاهان از رطوبت بالا به پایین و از شدت نور کم به زیاد منتقل می‌شوند. بخش‌های زیر تحولات جدیدی را در کشت بافت گیاهی که امکان تولید مؤثرتر ترکیبات زیست‌فعال را فراهم می‌کند، پوشش می‌دهد.

جدول ۱- لیست مراحل کشت بافت در آزمایشگاه

مرحله	نام	توضیحات
۰	پیش ازدیادی	انتخاب گیاه مناسب پیش تیماری گیاه
۱	ابتدایی	انتخاب جداکشت (نوک ساقه، نوک مریستم، جوانه جانبی، مریستم گل و غنچه) استریلیزاسیون سطحی(سدیم هیپوکلریت، اتانول، آب مقطر استریل‌شده، شوینده)
۲	ازدیاد	ریزازدیادی: القای ساقه سایر: تکثیر کالوس ریشه
۳	ازدیاد۲	ریزازدیادی: القای ریشه سایر: تولید در مقیاس وسیع در بیوراکتور
۴	مقاوم‌سازی	سازگاری با شرایط خارج ازآزمایشگاه

تولید متابولیت‌های ثانویه با کشت بافت گیاهی به عوامل مختلفی بستگی دارد که از جمله آن‌ها مواد مغذی تأمین شده برای رشد گیاه است. غلظت بهینه مواد مغذی، تعیین‌کننده رشد جداکشت‌ها و تجمع متابولیت‌های ثانویه است. نوع محیط کشت مورد استفاده، غلظت نمک محیط کشت و نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شده از عوامل کلیدی هستند که باید برای هر کشت، معین شوند. غلظت نمک‌های موجود در محیط کشت مورد نیاز یک گیاه خاص با توجه به نیازهای ویژه کشت متفاوت است. انتخاب یک محیط مناسب برای کشت سلول و اندام ضروری است. سه مورد از محبوب‌ترین محیط‌های کشت مورد استفاده MS[۲۵]، B5[۲۶] و WPM[۲۷] هستند که در جدول ۲ ذکر شده‌اند.

[25] Murashige and Skoog media
[26] Gamborg B5 medium
[27] Woody Plant Medium

جدول ۲- لیست محیط‌های کشت رایج استفاده شده در کشت بافت گیاهی

محیط کشت	مقدار نمک(g/L)	مقدار نیتروژن(mM)
WPM	2.68	14.70
B5	3.28	26.75
MS	4.63	60.01

محیط پایه MS حاوی بالاترین محتوای نمک و نیتروژن است. نیتروژن یک عنصر اساسی است که رشد جداکشت‌ها را تقویت می‌کند؛ زیرا به طور مستقیم روی تولید آمینواسید و نوکلئیک‌اسید در سلول‌ها تأثیر می‌گذارد. محیط پایه MS (۱۹۶۲) متداول‌ترین محیط کشت گیاه است. همانطور که در جدول ۲ ارائه شده است، محتوای نمک بسیار بالایی دارد؛ با وجود این، محیط ترجیحی برای رشد گونه‌های متعدد است. غلظت‌های مختلف نمک MS در رشد گونه‌های مختلف تأثیرگذار است. به طور کلی، غلظت‌های کم نمک باعث تحریک ریشه‌زایی می‌شود.

بیشتر بدانید

رآکتورهای زیستی گیاهی جهت تولید مواد برای مصارف پزشکی و دامپزشکی

طی چند دهه‌ی گذشته، تقاضا برای استفاده از مولکول‌های درمانی نوترکیب جهت کاربردهای بالینی به‌طور چشم‌گیری افزایش یافته است. بیوتکنولوژی این امکان را فراهم می‌کند تا ارگانیسم‌ها را با ویژگی‌های خاص بسازیم و از آن‌ها به عنوان بیوراکتور برای تولید انواع مختلف پروتئین‌های انسانی و حیوانی برای کاربردهای پزشکی و دامپزشکی استفاده کنیم. در حال حاضر، از باکتری‌ها، مخمرها و همچنین کشت سلول‌های پستانداران و حشرات برای سنتز پروتئین‌ها استفاده می‌شود. روند تولید پروتئین غیر خودی در شیر جانور تراریخته و در سیستم‌های فاقد سلول نیز در حال توسعه است. استفاده از سیستم‌های گیاهی به عنوان بیوراکتور برای تولید مواد مختلف در صنعت داروسازی یکی از گرایش‌های مهندسی متابولیسم است.

گیاهانی که پتانسیل بیوشیمیایی طبیعی و بالایی دارند می‌توانند منبعی عالی برای تولید مواد مختلف مانند قندها، ترکیبات فنولی، اسیدهای چرب، استروئیدها، آلکالوئیدها و سایر ترکیبات فعال زیستی باشند. بسیاری از این ترکیبات از نظر دارویی و پزشکی ارزش بالایی دارند.

با ما همراه باشید

باشگاه دانش آموزی زیست فناوری

stbioclub.ir

باشگاه دانش آموزی زیست فناوری
Biotechnolgy Student Club