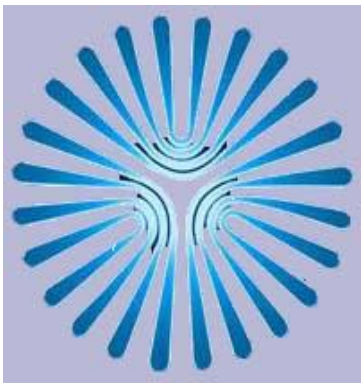


دانشگاه پیام نور
(دانشکده علوم کشاورزی)

مبانی بیوتکنولوژی و کشت بافت گیاهی

محسن فرشادفر

غلامرضا بخشی خانیکی

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: کلیات و تعاریف	**۶**
تعریف بیوتکنولوژی گیاهی	۶
کاربرد فنی بیوتکنولوژی	۶
موضوع بیوتکنولوژی	۷
ژنوم گیاه	۷
هدف بیوتکنولوژی	۱۱
اقسام بیوتکنولوژی	۱۲
تاریخچه بیوتکنولوژی گیاهی	۱۴
کشت بافت و اندام	۱۵
شکل زایی حاصل از کشت شیشه	۱۵
ژنتیک سلولهای سماتیکی و مهندسی ژنتیکی	۱۶
ننشانگرهای مولکولی	۱۷
تعرف کشت بافت گیاهی	۱۸
تاریخچه کشت بافت گیاهی	**۱۹**
اهمیت کشت بافت	۲۷
سلول گیاهی	۲۸
اجزاء سلول گیاهی	۲۹
رشد، نمو و تمایز	۳۸
عوامل مؤثر در رشد	۴۰
هورمونهای گیاهی	۴۰
فصل دوم: انواع کشت بافت گیاهی اندام‌های جنسی	**۴۳**
کشت گل	۴۵
کشت تخمدان	۴۶
کشت تخمک	۴۹
کشت آندوسپرم	۵۰
کشت بافت نوسل (خورش)	۵۱
کشت بساک	۵۲
کشت میکروسپور	۶۰
کشت جنین	۶۷
کاربرد کشت جنین	۷۲

گرده افشانی و لقاح در شیشه ۷۳
کلیات کاربرد کشت بافت گیاهی در بیماری شناسی گیاهی ۷۵
کاربرد کشت بافت گیاهی در تولید شیمرها ۸۰
القای موتاسیون در شرایط اینویترو ۸۹
نگهداری مواد گیاهی در محیط اینویترو ۹۳
بانک ژن در شیشه ۹۷
روش نگهداری کشت بافت ۹۷
مزایای نگهداری بصورت در شیشه ۱۰۴
بیوسنتزمواد، در شیشه (روش اینویترو) ۱۰۹
فصل سوم: آزمایشگاه کشت بافت و تکنیکهای عمومی **۱۱۶**
ظروف کشت ۱۱۷
اتاق کشت ۱۱۹
تکنیکهای مورد نیاز در کشت بافت گیاهی ۱۲۰
شستشوی ظروف ۱۲۰
استریل کردن ۱۲۱
فصل چهارم:آماده سازی و ترکیب محیط کشت **۱۳۰**
عناصر غذایی ۱۳۰
آماده سازی ۱۳۵
ترکیب ۱۳۹
مواد معدنی غذایی ۱۵۰
تنظیم کننده های رشد وهــورمون های گیاهی ۱۵۵
بیوسنتز ماده تنظیم کننده ۱۵۹
آبسیزیک اسید ۱۶۰
اکسین ۱۶۵
سیتوکینین ۱۷۵
جیبرلینها ۱۷۹
سایرتنظیم کننده ها ۱۸۵
اولیگوساکارینها ۱۸۵
اسید آبسسیک ۱۸۵
اتیلن ۱۸۶
ویتامینها ۱۹۳
سایرموادمتفرقه ۱۹۴

پلی آمینها ۱۹۴
فنیل اوره و مشتقات آن ۱۹۴
مخلوط ترکیباتی که منشأ گیاهی دارند ۱۹۵
اسیدهای آمینه، به عنوان منبع ازت ۱۹۷
آدنین(سولفات) ۱۹۷
زغال فعال ۱۹۸
فلوروگلوسینول ۲۰۱
محیط کشت آمادهٔ تجارتی ۲۱۰
نگهداری محیط کشت مادهٔ غذایی ۲۰۱
فصل پنجم: ریز ازدیادی و بیوتکنولوژی تولید مثل غیر جنسی ۲۰۳
روشهای تکثیر گیاهان به وسیله کشت بافت ۲۰۵
روشهای تجارتی ریزتکثیری ۲۱۱
مثالهای ریزازدیادی تجارتی درختان ۲۲۷
توت فرنگی ۲۲۷
تمشک معمولی و تمشک سیاه ۲۲۷
زغال اخته ۲۳۸
کیوی فروت(آکتینیدیا) ۲۲۸
انگورها ۲۲۸
سیب(مالوس) ۲۲۸
گیلاس (پرونوس) ۲۲۹
هلو و زرد آلو (پرونوس) ۲۲۹
گلابی(پیروس) ۲۲۹
سایر محصولات موجود برای ریزازدیادی تجارتی ۲۲۹
مسبزیجات ۲۲۹
سیر ۲۳۰
ادویه جات و گیاهان طعم افزای غذاها ۲۳۰
گیاهان دارویی (کاتارانتوس، دیجیتالیس، سولانوم لاسینیاتوم وغیره) ۲۳۰
گیاهان نادر و در معرض انقراض ۲۳۰
محصولات ریشهای و غدهای ۲۳۰
درختان میوهٔ گرمسیری ۲۳۰
فصل ششم: تواید گیاهان عاری از بیماری ۲۳۵
استفاده ازگرما و سرما ۲۳۹

کشت مریستم ۲۴۰
استفاده از گرما و کشت مریستم ۲۴۷
تولید گیاهان عاری از ویروس، به وسیلهٔ کشت کالوس و پروتوپلاست ۲۵۰
پیوند مریستم روی پایه ها(گیاهچه های)عاری از ویروس (ریزپیوندی) ۲۵۱
شناسایی ویروس ۲۵۵
تولید گیاهان عاری از باکتری و قارچ به وسیلهٔ کشت مریستم ۲۵۹
فصل هفتم: کلیات مهندسی ژنتیک ۲۶۱
انتقال ژن ۲۶۲
روشهای انتقال ژن ۲۶۵
انتقال ژن با استفاده از سیستم بیولوژیکی آگروباکتریوم ۲۶۶
انتقال ژن با استفاده از بمباران ذرهای ۲۷۲
انتقال ژن با استفاده از ریزتزریقی ۲۷۳
انتقال ژن با استفاده از لیپوزوم ها ۲۷۶
الکتروپوریشن ۲۷۷
جذب مستقیم DNA ۲۸۵
درشت تزریقی ۲۸۵
نقش بیوتکنولوژی در اصلاح نباتات ۲۷۸
کاربرد مهندسی ژنتیک برای افزایش عملکرد و بهبود راندمان گیاهی ۲۹۶
کاربرد مهندسی ژنتیک برای افزایش کیفیت ۲۹۹
کاربرد مهندسی ژنتیک برای تولید فراوردههای تجاری و صنعتی ۳۰۴
کاربرد بیوتکنولوژی برای تولید فراوردههای دارویی و واکسنهای خوراکی ۳۰۹
وضعیت کنونی بیوتکنولوژی در سطح جهان ۳۱۲
اهداف آینده بیوتکنولوژی گیاهی ۳۱۵
بیوتکنولوژی در ایران ۳۱۶
فصل هشتم: جنبه های اخلاقی بیوتکنولوژی ۳۲۷
منابع ۳۳۲

فصل اول
تعاریف و کلیات

۱- تعریف بیوتکنولوژی گیاهی[1]:

بیوتکنولوژی گیاهی عبارت از تغییر در اطلاعات ژنتیکی گیاهان، سلولها یا اندامهای گیاهی و استفاده کاربردی از ظرفیتهای به دست آمده می‌باشد. طبق تعریف مذکور بیوتکنولوژی شامل دو قسمت دستکاری ژنتیکی[2] و کاربرد فنی آن[3] می‌باشد. به طور کلی می‌توان گفت که بیوتکنولوژی شامل پنج بخش زیر است.

۱-۱- بیوتکنولوژی تولید مثل (جنسی، غیرجنسی)[4]

۱-۲- ژنتیک سلولهای سماتیکی (بدنی)[5]

۱-۳- مهندسی ژنتیک[6]

۱-۴- ژنومیکس[7]

۱-۵- پروتئومیکس[8]

۲- کاربرد فنی بیوتکنولوژی:

از بیوتکنولوژی در اصلاح نباتات، حفظ نبات و تکثیر نبات استفاده می‌شود که بعداً به طور مفصل مورد بحث قرار خواهد گرفت.

---

[1] - Plant biotechnology
[2] - Genetic manipulation
[3] - Technological utilization
[4] - Biotechnology of reproduction (sexual, asexual)
[5] - Somatic cell genetics
[6] - Genetic engineering
[7] - genomics
[8] - Proteomix

۳- موضوع بیوتکنولوژی:

علم بیوتکنولوژی روی سلول گیاه و اسیدهای نوکلیئیک آن (هسته‌ای، اورگانلها) بحث می‌کند. سلول یاد شده کوچکترین جزء گیاه است که دارای قدرت توتی‌پوتنسی[1] است. اصطلاح توتی‌پوتنسی دارای دو معنی زیر است.

الف) در ژنتیک منظور کلیه اطلاعات ژنتیکی است که یک گیاه کامل را نشان می‌دهد.

ب) در بیوتکنولوژی منظور از توتی‌پوتنسی ظرفیت تولید یک گیاه کامل است (شکل‌زایی)[2].

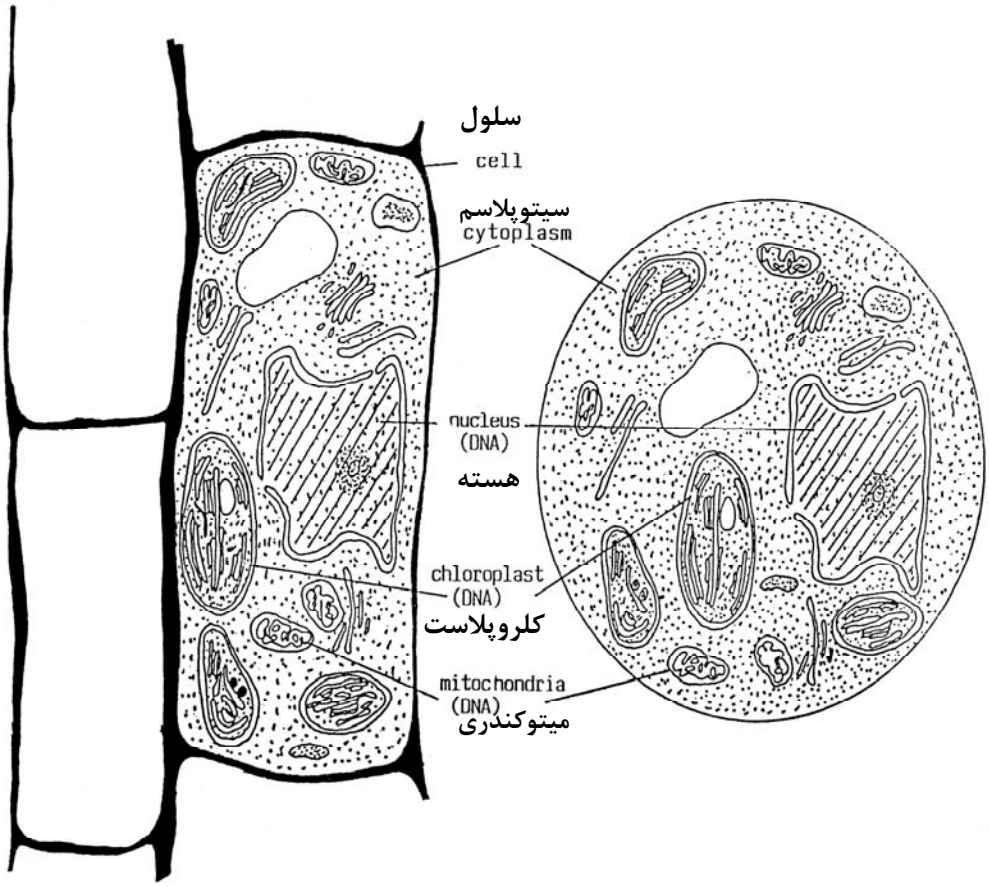
تذکر این نکته لازم است که گاهی اوقات به علم بیوتکنولوژی مهندسی ژنتیک گفته می‌شود که می‌توان آن را مهندسی ژنتیک به معنی عام کلمه در نظر گرفت و با مهندسی ژنتیک به معنی خاص که روی اسیدهای نوکینیک (DNA و RNA) کار می‌کند فرق دارد و در واقع باید گفت که مهندسی ژنتیک به معنی خاص جزئی از مهندسی ژنتیک به معنی عام یعنی بیوتکنولوژی است.

۴- ژنوم گیاه:

از نظر ژنتیکی، ژنوم گیاه بسیار پیچیده است و شامل سه ژنوم است که با یکدیگر کنش و واکنش دارند (شکل ۱-۱). علاوه بر ژنوم هسته، سیستم‌های کامل ژنتیکی در پلاستیدها و میتوکندری قرار دارند. این اندامکها اجسام غیریکنواختی هستند و هر یک دارای ساختار و کارکرد ویژه‌ای است. این اندامکها قادر نیستند که کل پروتئین خود را بسازند. ژنوم هسته اهمیت زیادی در بیوسنتز اندامکها دارد. اندازهٔ ژنوم گیاهان بین ۵×۱۰^{۵} تا ۵×۱۰^{۷} کیلوجفت باز است.

---

[1] - Totipotency
[2] - Morphogenesis



شکل۱-۱ - واکنش انواع ژنوم با یکدیگر

(نمای سلول گیاه و پروتو پلاست با توجه به DNA)

۱-۴- ژنوم هسته‌ای[1]:

ژنوم یک مجموعه کامل کروموزوم است که در هسته یک گونه معین یافت می‌شود و دارای تمام اطلاعات ژنتیکی است. بزرگترین ژنوم در هسته یک سلول گیاهی ژنوم هسته‌ای است که هم از نظر مقدار DNA و هم از نظر تعداد ژنها از بقیه بزرگتر است. ژنوم یک گیاه عالی معمولاً دارای ۵×۱۰^{۹} جفت باز DNA در یک مجموعه کروموزومی هاپلوئید است. این مقدار حدود ۳۰۰۰۰ برابر DNA موجود در ژنوم کلروپلاست و ۱۰۰۰۰ برابر DNA ژنوم میتوکندری است و به علاوه ۱۰۰۰ برابر بیشتر از DNA موجود در E.coli است. اگر ژنوم یک گیاه عالی با ۵×۱۰^{۹} جفت باز را باز کنیم حدود ۳ متر طول آن خواهد بود. در چرخه زندگی گیاه ۱۰۰ هزار ژن فعال وجود دارد که حدود ۹۹-۹۰ درصد آن در هسته و ۱۰-۱ درصد ژنها در اورگانلها هستند. ژنوم هسته شامل اینترون (توالی بدون رمز) و آگزون (توالی رمزکننده) است. فقط ۵ درصداز DNA موجود در هسته در یک زمان و برای تولید پروتئین به کار می‌رود. بنابراین مقدار کمی DNA دارای فعالیت ژنتیکی در یک گیاه کامل است.

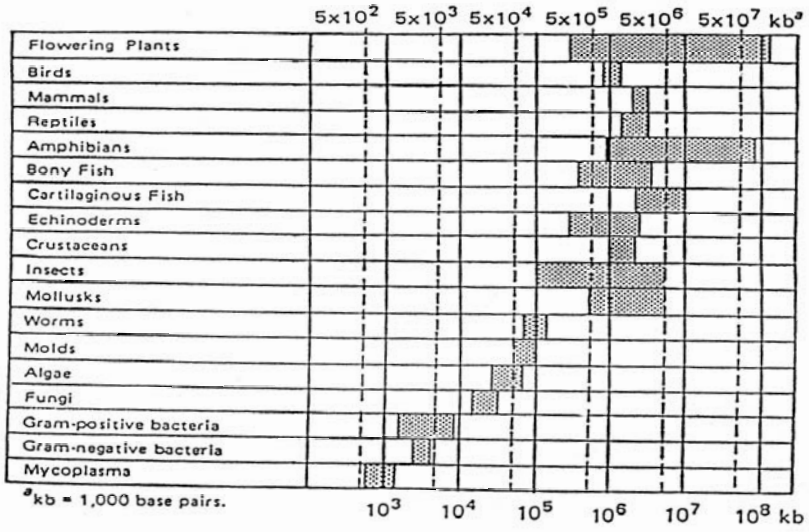
۲-۴- ژنوم اورگانلها:

DNA موجود در اورگانلها دایره‌ای است و معمولاً از هر ژنوم ۱۰-۵ نسخه وجود دارد. نسخه اورگانلها با سطح پلوئیدی آنها ارتباطی ندارد و طول آنها بین kb ۲۰۰-۵ است که تعداد ژنهای آن ۲۰۰-۱۰۰ می‌باشد. از اورگانلهای موجود در سلول ۲۰۰-۱۰۰ عدد آن میتوکندری و ۵۰-۲۰ عدد آن کلروپلاست است. بیشتر پروتئین‌های کلروپلاست توسط DNA هسته سنتز می‌شود و حدود ۱۰۰ پروتئین مخصوص کلروپلاست توسط DNA کلروپلاست ساخته می‌شود. ژنوم میتوکندریهای گیاهی

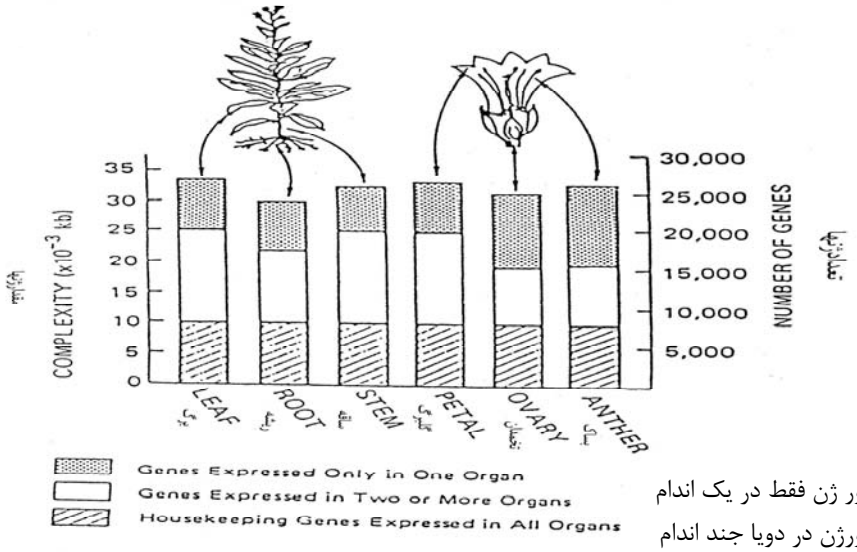
[1] - Nuclear genome

خیلی بزرگ است و بیشتر ژنوم میتوکندری DNAای است که کد نمی‌کند.
میتوکندری گیاهی tRNA و rRNA خود راکد می‌کند.
وضعیت ژنوم گیاهان را میتوان در شکل های۱- ۲-و ۱-۳ مشاهده کرد.

Size of Plant Genomes



شکل۱- ۲- مقایسه اندازه ژنوم گیاهی ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ برابر بزرگتر از ژنومهای باکتریایی هستند.



ظهور ژن فقط در یک اندام
ظهورژن در دویا جند اندام
ژنهای خانه دار در همه اندامها ظاهر می شود

شکل ۱-۳- ظهور ژن در گیاهان عالی تحت کنترل است بعصی از زنها در اعضاء بخصوصی از گیاهان ظاهر می شود وبعضی دیگر در کلیه اعضاء گیاه ظاهر می شوند

۵- هدف بیوتکنولوژی:

هدف از بیوتکنولوژی تولید ژنوتیپهای جدید دارای ارزش اقتصادی با استفاده از روشهای مختلف دستکاری ژنها می‌باشد. منظور از دستکاری ژنتیکی روشهای انتقال ژن، ژنتیک سلولی و تولیدمثل است که بایستی در تغییر یا تثبیت اطلاعات ژنتیکی DNA گیاه به کار گرفته شود.

۶- اقسام بیوتکنولوژی:

به طور کلی می‌توان روشهای مختلف بیوتکنولوژی را به پنج قسم تقسیم نمود:

الف) بیوتکنولوژی تولید مثل

ب) ژنتیک سلولهای سماتیکی

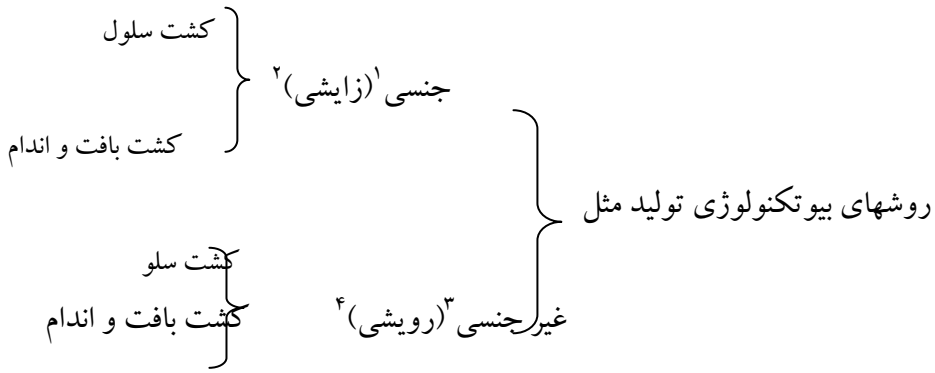
ج) ژنومیکس

د) مهندسی ژنتیک

و) پروتئومیکس

۱-۶- بیوتکنولوژی تولید مثل:

بیوتکنولوژی تولیدمثل عبارت از دستکاری گیاه در جریان تولیدمثل به وسیله کشت بافت و اندام در شیشه می‌باشد. این دستکاری در واقع یک دستکاری غیرمستقیم است زیرا در سطح بافت و سایر اندامهای گیاه کاری انجام می‌دهیم، اما مستقیماً با خود DNA سر و کار نداریم. روشهای بیوتکنولوژی تولید مثل را می‌توان به صورت زیر خلاصه نمود.



[1] - Sexual
[2] - generative
[3] - asexual
[4] - vegetative

۲-۶- ژنتیک سلولهای سماتیکی

عبارت از دستکاری گیاه در سطح سلول در کشتهای سلولی و پروتوپلاست در شیشه می‌باشد. این روش نیز یک روش غیرمستقیم است زیرا با سلول سر و کار دارد و مستقیماً با خود DNA سر و کار ندارد. روشهای ژنتیک سلولهای سماتیکی را می‌توان به صورت زیر خلاصه کرد.

روشهای ژنتیک سلولهای سماتیکی
- کشت پروتوپلاست[1]
- کشت سلول

۳-۶- ژنومیکس

۱-۳-۶- نشانگرهای مولکولی[2]

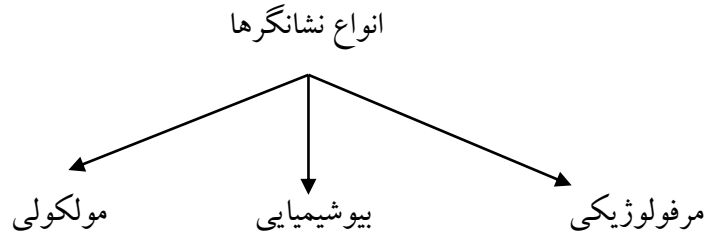
در برنامه‌های اصلاح نباتات معمولاً انتخاب بر اساس فنوتیپ صورت می گیرد. به دلیل تغییر عوامل محیطی و پیچیدگی وراثت صفات چندژنی، اگر انتخاب صرفاً بر اساس ارزیابی‌های فنوتیپی صورت گیرد، ممکن است سودمندی عمل انتخاب کاهش یابد.

در اوایل قرن بیستم استفاده از چندشکلی[3] ژنها به منظور آسان‌سازی برنامه‌های اصلاحی پیشنهاد گردید. پژوهشگران اصلاح نباتات در پی یافتن نشانگرهای ژنتیکی بودند که با صفات مورد نظر پیوستگی نشان دهند. از این نشانگرها می‌توان به عنوان معیارهای غیر مستقیم انتخاب استفاده کرد. به طور کلی برای تعیین چندشکلی از

---

[1] - protoplast culture
[2] - Molecular markers
[3] - Polymorphism

نشانگرهای مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی استفاده خواهد شد که هر یک دارای محاسن و معایب خاص خود هستند.



۲-۳-۶- نقشه‌یابی ژنوم و تجزیه QTL

۴-۶- انتقال ژن

عبارت از دستکاری گیاه در سطح مولکولی (DNA) به وسیله مهندسی ژنتیک می‌باشد. این روش یک روش مستقیم است، زیرا مستقیماً با خود DNA سر و کار دارد. تکنیکهای مهندسی ژنتیک را با عناوین مختلفی از قبیل: نوترکیبی[1]، مهندسی ژنتیک[2]، دستکاری ژن[3]، تکنولوژی ژن نامگذاری کرده‌اند که همگی به مصداق واحدی اشاره دارند.

۵-۶- پروتئومیکس

۷- تاریخچه بیوتکنولوژی گیاهی

در سال ۱۹۰۲ هابرلند[4] این فرضیه را مطرح کرد که سلولهای گیاهی تمایز یافته دارای خاصیت توتی پوتنسی هستند، این نظریه مورد تأیید قرار نگرفت. بعد از آن می‌توان تاریخچه بیوتکنولوژی (فن‌آوری زیستی) در گیاهان را به شرح زیر خلاصه نمود.

---

[1] - Resombination
[2] - Genetic engineering
[3] - Gene manipulation
[4] - Haberland

۱-۷- کشت بافت و اندام

در سال ۱۹۰۴ هانیگ[1] در محیط کشت[2] حاوی نمک و ساکارز جنین را کشت نمود (کشت جنین)[3]. در سال ۱۹۲۵ لای‌باک از کشت جنین در تلاقی‌های بین گونه‌ای[4] استفاده کرد بدین صورت که *Linum astitissimum×Linum perenne* را تلاقی داد.

در بین سالهای ۲۵-۱۹۲۰ روبین[5] و کوت[6] کشت ریشه[7] را انجام دادند. کشت ریشه گوجه فرنگی در محیط (عقیمی+ویتامینهای B+ شیره مخمر+ ساکارز+نمک) توسط وایت[8] و در سال ۱۹۳۴ صورت گرفت. در سال ۱۹۳۹ کشت کالوس[9] هویج و تنباکو با استفاده از اکسین‌ها و توسط وایت و گاثرت[10] صورت گرفت. کشت ریشه و کشت کالوس در دسته کشت اندامها قرار می‌گیرند.

۲-۷- شکل‌زایی[11] حاصل از کشت شیشه

در سال ۱۹۵۲ گیاهان عاری از ویروس و توسط مورل[12] فرانسوی با استفاده از کشت مریستم[13] به وجود آمد. در سال ۱۹۵۷ تمایز ریشه و اندام هوایی با استفاده از

---

1 - Hannig
2 - Medium
3 - Embryo
4 - Interspecific crosses
5 - Robbin
6 - Koite
7 - Root culture
8 - Gallus culture
9 - Gautheret
10 - Morphogenesis
11 - Morphogenesis
12 - Morel
13 - Meristem sulture

نسبت اکسین و سیتوکینین مربوط به شکل‌زایی توسط اسکوگ[1] آمریکایی و در تنباکو انجام شد. بنای کشت سلولهای گیاهی توسط هیلدربرند[2] سوئدی نیکل[3] و ملچرز[4] و در سالهای ۵۹- ۱۹۵۴ نهاده شد. جنین‌زایی سماتیکی[5] در کشت‌های سلولی در هویج و توسط رینرت[6] آلمانی و استوارد[7] آمریکایی در سالهای ۵۹- ۱۹۵۸ صورت گرفت. کوکینگ انگلیسی در سال ۱۹۶۰ پروتوپلاست را توسط آنزیمها جدا نمود و بالاخره در سال ۱۹۶۵ ماهش‌وری[8] گیاه داتوره را با استفاده از دانه گرده باززایی (تجدید نسل) نمود. این عمل را آندروژنز[9] در شیشه گویند.

۳-۷- ژنتیک سلولهای سماتیکی و مهندسی ژنتیک

تاکب[10] و ناگاتا[11] در ژاپن و در سال ۱۹۷۱ پروتوپلاست را جدا نموده و گیاه را باززایی نمودند. کارلسون[12] آمریکایی در سال ۱۹۷۲ دو رگ سماتیکی بین *Langsdorffii×Nicotiana tabacum* را توسط آمیختن پروتوپلاست به وجود آوردند. دیوی و پوتری‌کوس[13] سویسی در سال ۱۹۷۳ بافت خورش و کلروپلاست را منتقل کردند. در سال ۱۹۷۴ مالیگا[14] در آمریکا موفق به سلکسیون سلولهای موتانت با استرپتومایسین شد. ملچرز[15] در سال ۱۹۷۸ هیبرید بین جنسی

---

[1] - Skoog
[2] - Hilderbrand
[3] - Nickel
[4] - Melchers
[5] - Somatic embryogenesis
[6] - Reonert
[7] - Steward
[8] - Maheshwari
[9] - Androgenesis
[10] - Takebe
[11] - Nagata
[12] - Carlson
[13] - Davey and Potrykus
[14] - Maliga
[15] - Melchers

Solanum×Nicotiana را با اختلاط پروتوپلاست به وجود آورد. در سال ۱۹۸۰ دودیچ[1] هیبرید نامتقارن را با آمیختن پروتوپلاست *Nicotiana*×*Daucus* ایجاد کرد. در سال ۱۹۸۱ سابادوش[2] موفق به انتقال کروموزوم شد. سلولهای ترانس ژنتیک (تراریخته) در سال ۱۹۸۳ صورت گرفت و سبب تغییر ژنتیکی سلولهای آفتابگردان توسط ژن فازئولین[3] که از لوبیا به دست آمده بود شد. گیاهان ترانس ژنتیک (تراریخت) در سال ۱۹۸۶ به دست آمدند، این ژنها را ژنهای شیمری[4] گویند و عبارتند از: ژن Bt[5] در باکتریها، ژن Cp[6] در ویروسها، ژن لوسیفراز[7] در حشرات می‌باشد.

۴-۷- نشانگرهای مولکولی

استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در اوایل قرن بیستم با استفاده از نشانگرهای مرفولوژیکی آغاز شد. اولین پیوستگی ژنتیکی[8] در سال ۱۹۲۳ در لوبیا بین صفت اندازه دانه و رنگ دانه توسط ساکس[9] صورت گرفت. اصطلاح نشانگرهای مولکولی در سال ۱۹۸۳ و توسط تنکسلی[10] صورت گرفت اولین الکتروفورز در سال ۱۹۳۷ و توسط تیسلیوس[11] در سوئد و در محیط مایع انجام شد.

---

1 - Dudits
2 - Szabados
3 - Phaseolin gene
4 - Chimeric gene
5 - Bt= Bacillus Turringiensis
6 - CP= Coat protein
7 - Luciferase
8- Genetic Linkage
9 - Sax
10 - Tanksly
11 - Tiseliues

اولین محیط ژنی که در الکتروفورز استفاده شد ژل آگاربود که توسط گوردون[1] و در سال ۱۹۴۸ به کار گرفته شد. در سال ۱۹۵۹ مارکت و مولر[2] اصطلاح ایزوزیم را به کار بردند.

۵-۷- نقشه یابی ژنوم و تجزیه QTL

۶-۷- پروتومیکس

۸- تعریف کشت بافت گیاهی

کشت بافت گیاهی یک نام اختصاری برای کشت پروتوپلاست (Protoplast Culture)، کشنت سلول (Cell culture)، کشت بافت (Tissue culture) و کشت اندام گیاه (Organ culture) می‌باشد. این انواع مختلف کشت، به عنوان یک عامل عمومی، شامل رشد مواد گیاهی عاری از میکروب در یک محیط گندزدایی شده، مانند محیط کشت غذایی ضدعفونی شده درون لولهٔ آزمایش می‌باشد. در سال‌های اخیر روشهای کشت بافت گیاهی به یک ابزار بسیار قوی برای تکثیر و به نژادی بسیاری از گونه‌های گیاهی تبدیل شده است.

کشت بافت مبتنی سه توانایی اصلی گیاه تبدیل شده است:

۱- توانمندی(Totipotency)، قابلیت یا توانایی ارثی یک سلول گیاهی برای رشد و تبدیل به گیاهی کامل در صورت تحریک مناسب است. قدرت باززایی تاکید دارد که تمام اطلاعات مورد نیاز برای رشد و تولیدمثل موجود در داخل یک سلول قراردارد. اگرچه به لحاظ تئوری تمام سلول‌های گیاهی دارای توانمندی هستند، ولی سلول‌های مریستمی بهترین سلول‌هایی هستند که قادر به بروز این توانمندی می‌باشند.

۲- عدم تمایز (Dedifferentiation)، به معنی ظرفیت سلول‌های بالغ، برای برگشت به شرایط مریستمی و تولید یک نقطهٔ رشد جدید می‌باشد، که با تمایز مجدد که قدرت سازمان‌دهی و تشکیل اندام جدید می‌باشد، ادامه می‌یابد.

---

[1]- Gordon

[2] - Market and Moller

۳- قابلیت یا آمادگی (Competency) ، قابلیت درون‌زاد یک سلول یا بافت مشخص به رشد در مسیری ویژه را توصیف می‌کند. برای مثال سلول‌هایی که از نظر جنین‌زایی دارای شایستگی هستند قادر به توسعه به جنین‌های کاملاً فعال می‌باشند. نقطهٔ مقابل آن عدم قابلیت و یا عدم صلاحیت مورفوژنتیکی است.

۹- تاریخچهٔ کشت بافت گیاهی

فن‌آوری با پیشنهاد گوتیب هابرلند در رابطه با توانمندی سلول در آغاز قرن بیستم شروع شد. هابرلند پیشنهاد کرد که روش‌هایی برای جداسازی و کشت بافت گیاهی باید توسعه یابد و متذکر شد که، اگر محیط و مواد غذایی سلول‌های کشت شده دستکاری شود، آن سلول‌ها مراحل نمورا در رشد گیاه طبیعی تکرار خواهند نمود.

درسال ۱۸۳۸ شوان و شلیدن، تئوری توتیپوتنسی(Totipotency) را ارائه نمودند، براساس این تئوری، هر سلول، مستقل بوده و در اصل، قادر به تولید یک گیاه کامل است. در واقع، تئوری آنها، پایه و اساس کشت بافت و سلول گیاهی بود. اولین تلاش بوسیلهٔ هابرلانت در سال ۱۹۰۲ انجام شد ولی او در روش کشت بافت ناموفق بود. معذلک بین سال‌های ۱۹۰۷ و۱۹۰۹ هاریون، باروز و کارل، موفق به کشت در شیسه بافت‌های حیوانی و انسانی شدند. گرچه پژوهشگران، تحقیقاتی را در ارتباط با کشت در شیشه، بذور گیاهچه‌های ارکیده، جنین و اندام‌های گیاهی انجام دادند؛ ولی درسال ۱۹۳۹ نوبکرت، گوستریت و وایت، برای اولین بار موفق به تولید گیاه حاصل از کشت بافت شدند. بعد از جنگ جهانی دوم، پیشرفت در این زمینه، بسیار سریع بود و نتایج با ارزش ومهمی برای کشاورزی، جنگلکاری و باغبانی، به همراه داشت. (پیریک ۱۹۷۹، بوجوانی و همکاران،۱۹۸۶).

شکل۴-۱: تعدادی از محققین بیوتکنولوژی در جهان

به دلیل تأخیر درکشف هورمون‌های گیاهی، کشت بافت گیاهی، پس از کشت بافت حیوانی و انسانی، شروع شد. اولین هورمون‌های تنظیم کنندهٔ رشد که کشف شد، اکسین IAA بود که موفقیت بزرگی را برای کشت بافت در شرایط در شیشه، به وجود آورد. کشف تنظیم کنندهٔ رشد کینیتن (نوعی سیتوکینین) درسال ۱۹۵۵ انگیزهٔ بیشتری حاصل نمود. از آن زمان به بعد، پیشرفت‌های همه جانبه‌ای اتفاق افتاد. این تحقیقات، ابتدا در فرانسه و آمریکا، و بعد از آن، در سایر کشورها، توسعه یافت. افزایش چشمگیر تعداد محققین شاغل در این رشته در۵ سال گذشته، دلیلی بر اهمیت استفاده از تکنیک کشت در شیشه گیاهان عالی برای متخصصین بیماریهای گیاهی است. از آن جا که هنوز دست‌یابی به نتایج عملی در کشت بافت، برای متخصصین زراعت و اصلاح نباتات به سهولت امکان‌پذیر نیست، تعداد متخصصین شاغل در این رشته، به تبع آن، و تعداد کارهای تحقیقاتی، یقیناً در آینده افزایش خواهد یافت. شکل ۵-۱، شمایی از تاریخچهٔ کشت سلول و بافت گیاهی را نشان می‌دهد.

برای جزئیات بیشتر در مورد تاریخچهٔ کشت بافت، خوانندگان می‌توانند به کتاب‌ها و مقالات گوستریت (۱۹۸۳،۱۹۶۴،۱۹۵۹)، استریت (۱۹۷۴،۱۹۷۳)، و گمبورگ و وتر(۱۹۷۵) مراجعه نمایند. در ذیل ، فقط به ذکر چندین مورد مهم، پرداخته می‌شود:

۱۸۹۲ : گیاهان، مواد تشکیل دهندهٔ اندام‌ها را می‌سازند، که به صورت قطبی پخش می‌شوند.

۱۹۰۲: اولین کوشش در کشت بافت گیاهی (هابرلانت).

۱۹۰۴: اولین کوشش، برای کشت جنین از بعضی گیاهان خانوادهٔ شب‌بو(هانیگ).

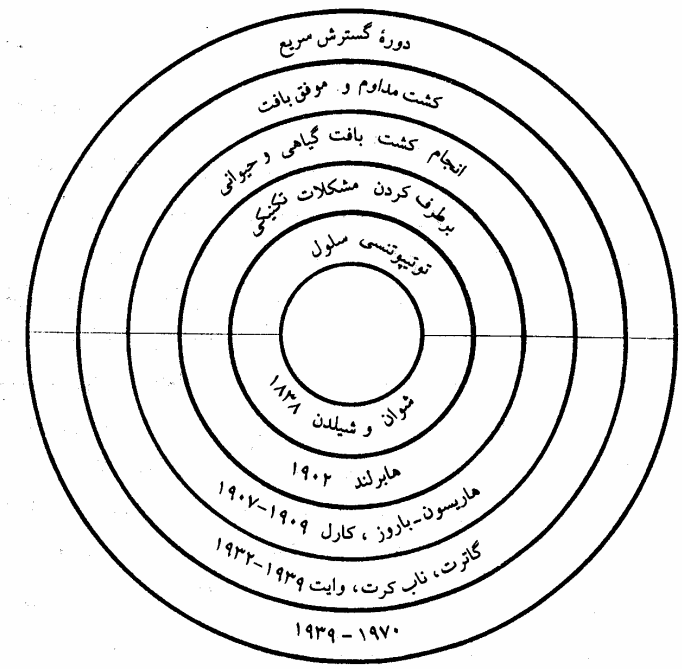
۱۹۰۹: امتزاج پروتوپلاست‌های گیاهی، که البته محصولات حاصله، نتوانستند زنده بمانند(کاستر).

۱۹۲۲: جوانه‌زنی غیرهمزیستی بذور ارکیده، در شرایط این ویترو (نادسون) .

۱۹۲۲: کشت این ویترو نوک ریشه(رابین).

۱۹۲۵: کاربرد عملی کشت جنین، در تلاقی‌های بین گونه‌ای کتان(لی باچ).

۱۹۲۹: کشت جنین کتان، به منظور اجتناب از ناسازگاری‌های حاصل از تلاقی (لی باچ).



شکل۵-۱، شمایی از تاریخچهٔ کشت سلول و بافت گیاهی را نشان می‌دهد

۱۹۳۴: کشت بافت لایهٔ زایندهٔ چندین درخت و درختچه در شرایط این ویترو، که به دلیل عدم کشف اکسین در آن کشت موفقیت‌آمیز نبود. (گوتریت).

۱۹۳۴: کشت موفقیت‌آمیز ریشه‌های گوجه فرنگی (وایت).

۱۹۳۶: کشت بافت بازدانگان مختلف(دارو).

۱۹۳۹: کشت موفق و مداوم کالوس(گوتریت،نابکرت و وایت).

۱۹۴۰: کشت این ویترو بافت زایندهٔ نارون، به منظور مطالعهٔ تشکیل ساقه‌های نابجا (گوتریت).

۱۹۴۱: استفاده از شیر نارگیل (حامل عامل تقسیم سلولی) برای اولین بار برای کشت جنین تاتوره(وان اوربیک).

۱۹۴۱: کشت در شیشه بافت‌های گال تاجی(بران).

۱۹۴۴: اولین کشت این ویتروی توتون، به منظور مطالعهٔ تشکیل ساقه‌های نابجا (اسکوگ).

۱۹۴۵: کشت نوک ساقه‌های جدا شدهٔ مارچوبه، در شرایط در شیشه (لو).

۱۹۴۶: تولید اولین گیاه کامل Lupinus و Tropaeolum از کشت نوک ساقهٔ سرشاخه (بال).

۱۹۴۸: تشکیل ریشه و ساقه‌های نابجا در تنباکو به وسیلهٔ تنظیم نسبت به آدنین (اسکوگ و سوا).

۱۹۵۰: باززایی اندام‌ها، از بافت‌های کالوس در سکویا (Sequoia sempervirens)(بال).

۱۹۵۲: تولید گیاه کوکب عاری از ویروس، به وسیله کشت مریستم (مورن و مارتین).

۱۹۵۲: اولین کاربرد ریزازدیادی (مورن و مارتین).

۱۹۵۳: تولید کالوس‌های هاپلوئید گونهٔ Ginkgo biloba از دانهٔ گرده (تولک).

۱۹۵۴: کنترل تغییرات در کاریولوژی و رفتارهای کروموزومی در کشت آندوسپرم ذرت(استراس).

۱۹۵۴: تولید اولین گیاه از یک سلول ساده (موبر و همکاران).

۱۹۵۵: کشف کینیتین، هورمون تقسیم سلولی (میلرو همکاران).

۱۹۵۶: مقدور شدن رشد گیاه، در سیستم‌های تعلیقی (کشت شناور) (چند لیتری) به منظور تولید فراورده‌های ثانویه به وسیله تالک و نایکل (استبا ۱۹۵۸).

۱۹۵۷: مشاهدهٔ تنظیم تشکیل ارگان‌ها (ریشه و ساقه) به وسیلهٔ تغییر نسبت‌های سیتوکینین به اکسین(استوگ و میلر).

۱۹۵۸: باززایی جنینهای سوماتیک، به وسیلهٔ روش این ویترو، ازهسته‌های گونهٔ Citrus ovules (محشووای ورنگازومی).

۱۹۵۸: باززایی پیش جنین، از تودهٔ کالوس و کشت شناور سلولی گونهٔ Daucus carota (هویج)(رینرت و استوارد).

۱۹۵۹: انتشاراولین دستور کار مفصل، در رابطهٔ با کشت بافت گیاهی(گوتریت).

۱۹۶۰: اولین باروری موفق خشخاش (Papaver rhoeas)درلولهٔ آزمایش(کانت).

۱۹۶۰: هضم آنزیمی دیواره‌های سلول، به منظور به دست آوردن تعداد زیادی پروتوپلاست (کوکنیگ).

۱۹۶۰: تکثیر رویشی ارکیده، به وسیلهٔ کشت مریستم(مورل).

۱۹۶۰: فیلتراسیون سوسپانسیون سلولی، و جداسازی تک سلول (برگمن).

۱۹۶۲: تولید محیط کشت معروف موراشی واسکوگ (موراشی و اسکوگ).

۱۹۶۴: تولید اولین گیاه تاتورهٔ هاپلوئید، از کشت دانهٔ گرده (گوها ومحشوواری).

۱۹۶۴: باززایی ریشه و ساقه، از بافت کالوس گونهٔ Populus tremuloides (مت).

۱۹۶۵: تمایز گیاهان تنباکو ، از سلول‌های منفرد جدا شده در ریزکشتی (Micro-culture)(واسیل و هیلدبرانت).

۱۹۶۷: القای گل در گونهٔ Lunuria annua به وسیلهٔ بهاره کردن ورنالیزاسیون در شرایط این‌ویترو(پیریک).

۱۹۶۷: تولید گیاهان هاپلوئید از دانهٔ گردهٔ تنباکو(بورگین و نیچ).

۱۹۶۹: تجزیه کاریولوژیکی گیاهان باززایی شده ازکشت کالوس تنباکو (ساکریستان و ملجرز).

۱۹۶۹: اولین جداسازی موفق پروتوپلاست، از کشت تعلیقی گونهٔ Hapupappus gracilis (اریکسون وجانسون).

۱۹۷۰: گزینش موتانت‌های بیوشیمیایی، در شرایط این‌ویترو (کارلسون).

۱۹۷۰: استفاده از کشت جنین، در تولید مونوپلوئید در جو(کاشا و کاؤو).

۱۹۷۰: اولین امتزاج موفقیت آمیز پروتوپلاست(یاور و همکاران).

۱۹۷۱: اولین گیاهان باززایی شده از پروتوپلاست (تاکب و همکاران).

۱۹۷۲: دورگ‌گیری بین گونه‌ای، ازطریق ترکیب پروتوپلاست دردو گونهٔ تنباکو (کارلون و همکاران).

۱۹۷۳: تشخیص توانایی سیتوکینین، در شکستن دورهٔ خواب در قلمه‌های جربرا (پیریک وهمکاران).

۱۹۷۴: القای شاخه‌دهی محوری به وسیلهٔ سیتوکینین در نوک ساقهٔ قطع شدهٔ جربرا (موراشی وهمکاران).

۱۹۷۴: باززایی هاپلوئیداطلسی(Petunia hybrida)ازپروتوپلاست(بیندینیگ).

۱۹۷۴: تولید هیبریدازامتزاج پروتوپلاست‌های هاپلوئید (ملچر و لابیب).

۱۹۷۴: انتقال زیستی بیولوژیکی(Biotransformation) درکشت بافت گیاه(رین هارد).

۱۹۷۴: کشف عامل تولید تومور بودن پلاسمید Ti (Ti- plasmid) در اگروباکتریوم (زانن و همکاران، اربیک و همکاران).

۱۹۷۵: گزینش مثبت، از نظر مقاومت کشت کالوس ذرت به قارچ *Helminthosporium maydis* (جنگن باخ و گرین).

۱۹۷۶: تشکیل ساقه، ازسرشاخه‌های میخک نگهداری شده در ازت مایع (سیبرت).

۱۹۷۶: دورگ گیری بین گونه‌ای به وسیلهٔ امتزاج پروتوپلاست گونه‌های Petunis hybria و P. Parodii (یاور و همکاران).

۱۹۷۶: تشخیص سنتز و تجزیهٔ octopine و nopsline درگیاه؛ به وسیلهٔ پلاسمید – Ti اگروباکتریوم (Agrobacterium tumefaciens) (بوم هوف و همکاران).

۱۹۷۷: ادغام موفقیت آمیز DNA پلاسمید-Ti از Agrobacterium tumefaciens به گیاهان (چلتون و همکاران).

۱۹۷۸: دورگ گیری سوماتیکی گوجه فرنگی و سیب زمینی (ملجر و همکاران).

۱۹۸۰: استفاده از سلول‌های کامل غیرمتحرک، برای انتقال بیولوژیکی دیجیتوکسین به دیجوکسین (Digitoxin into digoxin) (الفرمن و همکاران).

۱۹۸۱: استفاده از اصطلاح تغییرات بدنی همانند (تنوع سوماکلونال) (لارکین و سکوکروفت).

۱۹۸۱: ایزوله کردن آکسوتروف (Auxotrophs) ازطریق به گزینی در تعداد زیادی ازکلنی‌های سلولی حاصل از پروتوپلاست‌های هاپلوئید گونهٔ Nicotiana plumbagianifolia شده باعوامل جهش زا (سیدرو و همکاران).

۱۹۸۲: امکان ترکیب پروتوپلاست‌هاباDNA لخت ومتعاقباً انتقال ژنتیکی توسط DNA جدا شده (کرن و همکاران).

۱۹۸۲: امتزاج پروتوپلاست‌ها، به وسیلهٔ محرک‌های الکتریکی (زیمرین).

۱۹۸۳: دورگ‌گیری سیتوپلاسمی بین جنس‌ها درتربچه وشلغم (بلیتر و همکاران).

۱۹۸۴: انتقال سلول‌های گیاهی، به وسیلهٔDNA پلاسمید (بازکوسکی و همکاران).

۱۹۸۵: آلودگی وانتقال قطعات برگ، به وسیلهٔاگروباکتریوم و باززایی گیاهان انتقال یافته (هدرچ و همکاران).

۱۰- اهمیت کشت بافت

بررسی و مطالعهٔ شرایط زیست از جنبه‌های محیطی، اقلیمی، خاک، گیاهان، جانوران و امثال آن برای انسان‌های قرن حاضر و قرن‌های آینده، این نکتهٔ مهم و قابل توجه را یادآوری می‌نماید که انسان برای بهبود شرایط حیات خود به ویژه تولید و تامین غذا، نیاز مبرم به استفاده از فن‌آوری‌های جدید در زمینه‌های گوناگون به ویژه، علوم گیاهی و کشاورزی دارد. افزایش جمعیت جهان و کاهش منابع تولید فرآورده‌های گیاهی و دامی در جهان یک مشکل جدی و اساسی است که دانشمندان را حداقل از دههٔ گذشته تاکنون به این فکر ترغیب نموده، تا با استفاده از شیوه‌های جدید در حفظ محیط زیست و عدم تغییر بنیادی در طبیعت، دست به تولید بهتر و بیشتر محصولات گیاهی بزنند، یکی از این روش‌های مدرن استفاده از فن‌آوری کشت سلول و بافت‌های گیاهی است که از این طریق می‌توان نسبت به تکثیر گیاهان مختلف اعم از صنعتی، داروئی، مرتعی و کشاورزی اقدام نمود. از طرف دیگر کشت بافت گیاهی می‌تواند بستر مناسبی جهت حفظ و نگهداری گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مادر و یا در حال انقراض طبیعت به عنوان منابع با ارزش ژرم پلاسم محسوب شود. علاوه براین تکنولوژی کشت سلول و بافت‌های گیاهی در سال‌های اخیر به گونه‌ای توسعه یافته است که هم اکنون برای انتقال ژن‌های مطلوب، به ویژه ژن‌های ایجاد کنندهٔ مقاومت نسبت به آفات و بیماری‌های گیاهی که هر ساله بخش عظیمی از تولیدات گیاهی را نابود می‌سازد، از این روش در سطح گسترده استفاده می‌شود. بدیهی است اصلاح گیاهان به روش‌های سنتی، علاوه بر وقت‌گیر بودن، در بسیاری از موارد امکان‌پذیر نیست در حالی که تکنولوژی جدید کشت سلول و بافت گیاهی این راه را به خوبی هموار ساخته و به پیش می‌برد.

۱۱- سلول گیاهی

نام سلول نخستین بار توسط رابرت هوک در اوایل سدهٔ نوزدهم پیشنهاد شد. این دانشمند، هنگام کار با میکروسکوپ، اشیای گوناگون از جمله برشی نازک از چوب پنبه را بررسی کرد و اتاقک‌هایی تو خالی و جدا از هم را مشاهده نمود که آنها را سلول (سل) نامید. واژهٔ سل یا سلول از کلمهٔ لاتینی cella به معنی اتاقک میان تهی گرفته شده است. سلول کوچکترین واحد ساختاری و کنشی موجودات زنده و همانند اتاقکی است که به وسیلهٔ غشایی احاطه شده است. همهٔ یاخته‌ها به وسیلهٔ غشای سیتوپلاسمی احاطه شده‌اند که متشکل از یک لایهٔ دو مولکولی فسفولیپید است. همهٔ موادی که به سلول وارد و یا از آن خارج می‌شوند باید از این غشا بگذرند. یاخته‌های گیاهی، علاوه بر غشای سیتوپلاسمی، لایه‌های دیگری در خارج آن به نامهای دیوارهٔ یاخته‌ای و تیغهٔ میانی دارند. در هر یاخته، مخلوط پیچیده‌ای از مواد وجود دارد که در مجموع سیتوپلاسم نامیده می‌شود. سیتوپلاسم، علاوه بر اندامکهای متعدد، دارای انواع آنزیمها، قندها، اسیدهای آمینه و مولکولهای کوچکی به نام آدنوزین تری‌فسفات (ATP) است که در متابولیسم سلول شرکت می‌کنند. همهٔ یاخته‌ها، برای انجام واکنشهای شیمیایی، از مولکول ATP به عنوان حامل انرژی استفاده می‌نمایند. خود ATP از سوخت و ساز غذا و یا بر اثر فتوسنتز به وجود می‌آید. ساختارهای سازمان یافته‌ای که در سیتوپلاسم وجود دارند اندامک نامیده می‌شوند. در داخل سیتوپلاسم و تقریباً در مرکز سلول ساختاری به نام هسته جای دارد. تمام اطلاعات ارثی سلول در قالب مولکول DNA در هسته ذخیره شده است و برای همانند سازی DNA و یا رونویسی از آن، آنزیمهایی وجود دارند. استفاده از میکروسکوپ الکترونی اطلاعات نسبتاً وسیعی را دربارهٔ ساختار درونی سلول به‌دست داده است. بر مبنای ساختار درونی یاخته، در جهان جانداران دو نوع سلول تشخیص داده شده است:

۱. یاخته‌های پروکاریوت مانند باکتریها و جلبکهای آبی ـ سبز. در این یاخته‌ها که ساختاری ساده دارند هسته مشخص نیست و اجزاء آن به صورت رشته‌های پراکنده یا دانه‌های ریز درون سیتوپلاسم پراکنده‌اند، دیگر اجزاء سلول نیز نامشخص‌اند.

۲. یاخته‌های یوکاریوت که در بیشتر گیاهان و تمام جانوران وجود دارند. در این سلول ها هسته یکپارچه است و دیگر اجزاء سلول نیز مشخص‌اند.

هر دو نوع سلول را غشای سیتوپلاسمی احاطه می‌کند. در یاخته‌های بدون هستهٔ مشخص، غشای سیتوپلاسمی تنها لایهٔ بیرونی سلول به شمار می‌رود.

۱۲- اجزاء سلول گیاهی

سلول‌های گیاهی، ضمن دارا بودن تفاوتهای ظاهری از نظر شکل و ساختار، ویژگیهای مشترک بسیار دارند و به طور کلی از خارج به داخل شامل اجزاء زیرند:

۱. دیوارهٔ یاخته‌ای و غشای سیتوپلاسمی.

۲. سیتوپلاسم که خود شامل دو بخش زمینه (هیالوپلاسم) و اندامکهای مختلف مانند شبکهٔ آندوپلاسمی، میتوکندریها، پلاستها، ریبوزومها، لیزوزومها، دستگاه گلژی، سانتریولها، واکوئولها، ریز رشته‌ها و ریز لوله‌هاست.

۳. هسته که واجد عوامل ارثی اصلی سلول است.

۱-۱۲- دیوارهٔ سلولی

در پیرامون اغلب یاخته‌های گیاهی و بعضی از سلول های جانوری دیواره‌ای به نام دیوارهٔ یاخته‌ای وجود دارد. دیوارهٔ سلولی در یاخته‌های گیاهان ساختار نسبتاًسخت سلولوزی دارد و نوعی اسکلت بیرونی را به وجود می‌آورد که به این سلول‌ها شکل هندسی و نسبتاً ثابتی می‌دهد. این دیواره، که دیوارهٔ نخستین نیز نامیده می‌شود، به وسیلهٔ پروتوپلاسم زندهٔ سلول ایجاد می‌گردد و وجود آن اساسی‌ترین وجه تمایز بین گیاهان و جانوران است. دیوارهٔ بین دو سلول شامل سه بخش یا لایه است. هر یک از دو یاختهٔ مجاور هم دیوارهٔ نخستین را تولید می‌کند و بین آن دو، لایهٔ بین سلول به نام تیغهٔ میانی

مشترک بین دو سلول وجود دارد. جنس تیغهٔ میانی از ترکیبات پکتیکی مانند پکتین است. دیوارهٔ نخستین و لایهٔ بین یاختهها تنها لایههای دیوارهای در یاختههای سازندهٔ بافتهای نرم گیاهان است. در نتیجهٔ افزایش سن سلول ممکن است مواد دیگری ساخته شوند و از سمت داخل سلولبه صورت لایهای روی دیوارهٔ نخستین قرار گیرند که دیوارهٔ دومین یا پسین نام دارد. پس از تشکیل دیوارهٔ پسین، سلول معمولاً میمیرد و پروتوپلاست آن از بین میرود. دیوارهٔ یاختهٔ گیاهی سطح ممتدی نیست بلکه دارای منافذی به اندازههای متفاوت است. در محل این منافذ، سیتوپلاسم دو یاختهٔ مجاور مستقیماً با یکدیگر در ارتباطاند. این ارتباط در اثر رشتههای لولهای سیتوپلاسمی بسیار نازکی به نام پلاسمودسمها برقرار میشود. به علتوجود این منافذ در دیوارههای سلولوزی، پخش و تبادل مواد بین یاختهها در بافتهای گیاهی با سرعت و سهولت صورت میگیرد (شکل ۱ ـ ۱). پلاسمودسمها در دیوارههای نخستین، در سوراخهای ریز دیواره، جایی که دیواره فاقد تیغهٔ میانی است به وجود میآیند و سیتوپلاسم از طریق آنها از یاختهای به یاختهٔ دیگر ادامه مییابد.

۲-۱۲- غشای سیتوپلاسمی

در سطح بیرونی اغلب یاختههای جانوری و در درون دیوارهٔ سلولوزی اکثر یاختههای گیاهی، غشایی به ضخامت ۷۵ آنگستروم وجود دارد که از یک سو با خارج و از سوی دیگر با محتویات درون سلول در ارتباط دایمی دارد. همهٔ موادی که به سلول وارد و یا از آن خارج میشوند باید از این غشا عبور کنند. پروتئینهای مختلفی که در میان لایههای فسفولیپیدی وجود دارند برای عبور مولکولهای ویژه نقش حامل را ایفا میکنند. غشای سیتوپلاسمی از یک لایهٔ دو مولکولی (دو ردیفی) فسفولیپید ساخته شده است که هر مولکول آن شامل یک سرآبدوست و یک دم آبگریز است. استقرار این دو ردیف مولکول در مقابل یکدیگر به گونهای است که دمهای آبگریز به طرف

داخـل و در مقابـل یکـدیگر، و سـرهای آبدوسـت در طـرف خـارج قـرار گرفتـه‌انـد. مولکولهای پروتئین در سطح بیرونی یـا درونـی و یـا در تمـام غـشا وجـود دارنـد. نقـش غشای سیتوپلاسمی حفظ تراوایی انتخابی است. این غشا چـون سـدی نیمـه تـراوا عمـل می‌کند، بدین معنی که از خروج مواد آلی یاخته، ماننـد هیـدراتهای کـربن و پروتئینهـا، جلوگیری می‌نماید در صورتی که به آب و نمکهای کانی امکان مـی‌دهـد تـا درون آن نفوذ کنند. چنین غشایی که فقط بعضی مـواد از آن عبـور مـی‌کننـد، غـشای نیمـه تـراوا نامیده می‌شود. نیمه تراوا بودن غشا عامل اصلی در نقش آن است. اگر غشا کـاملاً تـراوا می‌بود، مقدار زیادی از محتویات سلول بسادگی از آن خارج می‌شد و در نتیجه فعالیـت زیستی سلول متوقف می‌گشت و اگر غشا کاملاً ناتراوا می‌بود، آب و نمکهای معـدنی و مواد ضروری جهت سوخت و ساز یاخته، نمی‌توانستند وارد آن شوند و باز هم فعالیتهای سلول متوقف می‌شد. بنابراین نیمه تراوا بودن غشای سلول شرط لازم زندگی آن است.

۳-۱۲- سیتوپلاسم

سیتوپلاسم شامل تشکیلات یاخته‌ای است که در داخل غشای سیتوپلاسمی (پلاسمایی) و در خـارج هـسته قـرار دارد. سیتوپلاسـم سـاختاری نیمـه شـفاف، بـی‌شـکل و تقریبـاً یکنواخت دارد و خاصیت شکست نور در آن کمی بیش از آب است. سیتوپلاسم، پـس از مرگ یاخته، با رنگهای اسیدی انیلین رنگ می‌گیرد، یعنی اسیدوفیل است، بر عکس سیتوپلاسم زنده تقریباً خنثی است. زمینهٔ سیتوپلاسم یـا، بـه عبـارت بهتـر، اساسـی تـرین قسمت محیط واقعی درون سـلول را هیالوپلاسـم گوینـد، زیـرا اکثـر اعمـال بیوسـنتزی سلول در همین زمینه صورت می‌گیرد.در هیالوپلاسم دو دسته عناصـر بـه حالـت شـناور وجود دارند: یک دسته ضـمایم دایمـی ماننـد میتوکنـدریها، پلاسـتها، دسـتگاه گلـژی و غیره‌اند که اندامک نامیده می‌شوند و فعالیت زیستی دارند: دستهٔ دیگر مواد غیـر دایمـی حاصل از اعمال زیست شیمیایی داخل هیالوپلاسم به نام اجـسام ضـمیمه هـستند. در هـر حـال، محـدودهٔ هیالوپلاسـم از طـرف داخـل، غـشای هـسته و از طـرف خـارج، غـشای

سیتوپلاسمی سلول است. اندامکها عبارت‌اند از: هسته، میتوکندریها، شبکهٔ آندوپلاسمی، دیکتیوزومها، ریز لوله‌ها و ریز رشته‌ها، لیزوزومها، واکوئولها و پلاستها. ذرات دیگری نیز در سیتوپلاسم دیده می‌شوند که از اندامکها کوچکترند و غشا ندارند. این ذرات را ریبوزوم می‌نامند. گر چه ریبوزومها، به علت نداشتن غشا، اندامک به شمار نمی‌آیند، اما به دلیل اهمیت ویژه‌ای که در سوخت و ساز سلول دارند در قسمت اندامکها مورد بحث قرار خواهند گرفت. سیتوپلاسم در تبادلات سلول با محیط و همچنین مراحل مختلف سوخت و ساز نقشی اساسی دارد. یکی از ویژگیهای سیتوپلاسم جنبش دایمی آن است که ممکن است چرخشی یا موضعی باشد. این حرکات را جنبش سیتوپلاسمی می‌نامند که سبب حرکت اندامکها و توزیع مواد درون سیتوپلاسم و تسهیل مواد می‌شوند. جنبش سیتوپلاسمی، که انرژی آن از فعالیتهای زیستی سلول تأمین می‌شود، از ویژگیهای یاختهٔ زنده است.

۴-۱۲- ریبوزومها

ریبوزومها ذرات کروی کوچکی هستند که به صورت آزاد یا روی شبکه‌های آندوپلاسمی درون سیتوپلاسم دیده می‌شوند. قطر این ذرات در حدود ۱۷۰ تا ۲۰۰ آنگستروم است. در ساختار شیمیایی ریبوزومها ۶۵ تا ۹۰ درصد اسیدنوکلئیک از نوع اسید ریبونوکلئیک و ۱۰ تا ۳۵ درصد پروتئین وجود دارد. با استفاده از رادیو ایزوتوپها توانسته‌اند محل تشکیل اجزاء ریبوزوم را تعیین کنند. بدین سان معلوم شده است که RNA ی ریبوزوم در هستک ساخته می‌شود و از آنجا به سیتوپلاسم منتقل می‌گردد. دو بخش ریبوزوم، پس از ساخته شدن، به یکدیگر می‌پیوندند و ریبوزوم کامل را به وجود می‌آورند. نقش اصلی ریبوزومها شرکت در ساختن پروتئینهاست، بدین معنی که ریبوزومها جایگاه ساخت پروتئینها هستند.

۵-۱۲- شبکهٔ آندوپلاسمی

این شبکه در برش عرضی به صورت مجاری ظریف غشایی تو خالی با انشعابات فراوان و مرتبط به یکدیگر و یا به شکل مخازن پهن کم و بیش متراکم و پراکنده در تمام سیتوپلاسم مشاهده می‌شوند. این مجاری متشکل از دو غشا و فضای واقع در بین آنهاست. جدار غشاها با غشای هسته‌وغشای‌سیتوپلاسمی ارتباط دارد و در حقیقت ادامهٔ آنها درسیتوپلاسم به شمار می‌آید. به بسیاری از نقاط دیوارهٔ بیرونی شبکهٔ آندوپلاسمی تعداد فراوانی دانه‌های ریبوزوم متصل‌اند، به همین دلیل شبکهٔ آندوپلاسمی در ساختار سلول به دو صورت وجود دارد: شبکهٔ آندوپلاسمی دانه‌دار یا ناصاف که واجد ریبوزوم است، و شبکهٔ آندوپلاسمی بدون دانه یا صاف که فاقد ریبوزوم است. نقش شبکهٔ آندوپلاسمی ذخیره و هدایت بعضی مواد در درون سلول است. پروتئینها در جوار ریبوزومهای واقع بر روی این مجاری ساخته شده و سپس وارد آنها می‌شوند. به علاوه مواد دیگری مانند گلوسیدها در این مجاری وجود دارند.

۶-۱۲- دستگاه گلژی

دیکتیوزومها سیستمهای غشایی ویژه‌ای هستند که از روی هم قرار گرفتن ۵ تا ۱۵ کیسهٔ گرد و تخت با وزیکولهایی در لبهٔ آنها تشکیل شده‌اند. هر کیسه را سیسترنا گویند. هر دیکتیوزوم حدود ۲ میکرون قطر و ۰/۵ میکرون عرض دارد. یاخته‌های ترشحی، دیکتیوزوم گسترده‌تری دارند. مجموعهٔ دیکتیوزومها را دستگاه گلژی می‌نامند. در داخل کیسه‌های دیکتیوزومها، مواد مختلفی ذخیره و تغلیظ می‌شوند. مواد ترشحی عموماً آمیخته‌ای از پروتئینها و هیدراتهای کربن‌اند. این مواد در داخل کیسه‌ها باقی نمی‌مانند بلکه پس از رانده شدن به داخل وزیکولهای مربوطه، همراه با جوانه‌زدن آنها، از دیوارهٔ دیکتیوزومها جدا و به داخل سیتوپلاسم آزاد می‌شوند. به طور کلی نقش دستگاه گلژی بسته‌بندی پروتئینهاست. احتمالاً پروتئینها، پس از ساخته‌شدن بر روی ریبوزومها، از طریق شبکهٔ آندوپلاسمی به دیکتیوزومها منتقل می‌شوند.

۷-۱۲- واکوئولها

واکوئول حفره یا کیسه‌ای است که غشایی به نام تونوپلاست آن را از سیتوپلاسم جدا می‌کند. درون واکوئول را مایعی به نام شیرهٔ واکوئولی پر کرده است. واکوئولهای یاخته‌های جوان کوچک‌اند و بیشتر فضای درون سلول را سیتوپلاسم اشغال می‌کند. به موازات رشد یاخته، واکوئولها نیز رشد می‌کنند و بزرگ می‌شوند. سپس تدریجاً با ادغام در یکدیگر تعدادشان کم ولی بزرگتر می‌شوند. وقتی سلول به اندازهٔ نهایی خود می‌رسد، بخش اعظم فضای آن را واکوئولها اشغال می‌کنند که سیتوپلاسم و هسته را به کنار دیواره می‌رانند. غلظت شیرهٔ واکوئولی ثابت نیست و در اثر تغییرات مقدار آب سلول تغییر می‌کند. در نتیجه غلظت شیرهٔ واکوئولی در یاخته‌های متفاوت و نیز در یک سلول در زمانهای مختلف متغیر است. واکوئولها را باید محل ذخیرهٔ آب سلول دانست که در پدیده‌های اسمزی نقشی بسزا دارند. معمولاً مواد زاید سیتوپلاسم در داخل واکوئول جمع می‌شوند.

۸-۱۲- میتوکندریها

وجود میتوکندری در سلول نخستین بار در سال ۱۹۰۰ توسط دانشمند معروف آلمانی به نام آلتمن گزارش شد. میتوکندریها ذرات‌ریزی هستند که با میکروسکوپ نوری به شکلهای کروی، میله‌ای یا رشته‌ای دیده می‌شوند. این تنوع اشکال به علت تهیه برش در زوایای متفاوت است و گرنه میتوکندری اندامکی لوله‌ای شکل به طول ۱ تا ۳ میکرون است. میتوکندری غشایی دو لایه دارد: غشای بیرونی صاف است و غشای درونی چین‌خوردگیهایی به نام تیغه (کریستا) دارد. وجود این چین‌خوردگیها سبب افزایش سطح آن می‌شود. از آنجا که فعالیتهای میتوکندری بیشتر در سطح همین غشا انجام می‌گیرد، لذا میزان چین‌خوردگی می‌تواند در فعالیت غشا مؤثر باشد. درون میتوکندری را مادهٔ یکنواخت و بی‌شکلی به نام مادهٔ زمینه‌ای پر می‌کند که در آن RNA, DNA ریبوزومها، پروتئینها، لیپیدها، نوکلئوتیدها و آب نیز وجود دارند. ریبوزومهای درون

میتوکندری مشابه ریبوزومهای سیتوپلاسمی هستند ولی از آنها کوچکترند. DNA ی موجود در میتوکندری با DNA ی هسته تفاوت دارد. ماده ژنتیکی داخل میتوکندری را میتوم (Mitom) می‌گویند. وجود DNA و ریبوزوم به میتوکندری امکان می‌دهد که بعضی از آنزیمهای تنفسی مورد نیاز را بسازد. مهمترین نقش میتوکندریها تنفس است. به این ترتیب که در آنزیمهای تنفسی موجود در سطح غشای درونی آنها سبب شکستن مولکولهای گلوکوز و اسیدهای آمینه و چربیها می‌شود و در نتیجه انرژی آزاد می‌کند. به همین علت، میتوکندریها به عنوان نیروگاه سلول نیز شناخته می‌شوند. انرژی حاصل عمدتاً به صورت ATP ذخیره می‌شود و در فعالیتهای زیستی مختلف سلول مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۹-۱۲- پلاستها

پلاستها اندامکهای کوچکی هستند که در بیشتر یاخته‌های گیاهی وجود دارند و اغلب بر حسب رنگی که دارند نامگذاری می‌شوند. پلاستهای کلروفیل دار را که سبز رنگ‌اند کلروپلاست، پلاستهای رنگین دیگر را کروموپلاست و پلاستهای بی‌رنگ را لوکوپلاست می‌نامند. لوکوپلاستها را گاهی بر اساس مادهٔ اندوخته‌ای آنها نامگذاری می‌کنند، مانند آمیلوپلاست که پلاست نشاسته‌دار است.

کلروپلاستها عموماً قرصی شکل بوده و به علت دارا بودن کلروفیل سبز رنگ اند. اندازه و شکل آنها در یاخته‌ها متفاوت است. همچنین تعداد آنها در یاخته‌های گیاهی بر حسب نوع یاخته، نوع گیاه و میزان فعالیت فتوسنتزی آن تفاوت دارد. میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که این اندامک غشایی دو لایه دارد. بخش درونی کلروپلاست شامل دو سیستم لایه‌ای و ماده در برگیرنده این دو سیستم، یعنی ماده زمینه ای دانه داراست. سیستم لایه‌ای دو بخش دارد: بخشی که گرانومها را تشکیل می‌دهد، و بخش دیگری که آنها را به هم وصل می‌کند. هر گرانوم مجموعه‌ای است از کیسه‌های پروتئینی سکه مانند که روی هم چیده شده‌اند. غشاهای درونی گرانوم به صورت کیسه‌های پهن

شده‌ای مرتب شده‌اند که آنها را تیلاکوئید می‌نامند. کلروفیل و رنگیزه‌های دیگر درون تیلاکوئید جای دارند. نقش کلروپلاستها انجام فتوسنتز است. گر چه شواهد نشان می‌دهد که کلروپلاستهای بالغ در برخی از راسته‌های گیاهان عالی تقسیم می‌شوند، یعنی هر کلروپلاست از کلروپلاست قبلی به وجود می‌آید (همانند میتوکندریها)، ولی به طور کلی اغلب تقسیماتی که منجر به افزایش تعداد پلاستها می‌شود، در مرحلهٔ پیش پلاستی رخ می‌دهد. تقسیم کروموپلاستها یا آمیلوپلاستهای بالغ هرگز دیده نشده است. لوکوپلاستها، پلاستهای بی‌رنگی هستند که در یاخته‌های بشره و دیگر بافتهای بی‌رنگ وجود دارند. بعضی از این گونه پلاستها مقدار زیادی نشاسته ذخیره می‌کنند و آمیلوپلاست نامیده می‌شوند که بیشتر مخصوص بافت پارانشیم ذخیره‌ای است .پلاستهایی که رنگدانه‌های زرد یا قرمز دارند کروموپلاست نامیده می‌شوند. درون پلاست هم مقدار اندکی ماده ژنتیکی (DNA) وجود دارد که سیتوم (Citom) نام دارد.

۱۰-۱۲- هسته

هسته بزرگترین و آشکارترین ساختار درونی سلولهای یوکاریوت است که در دو مرحلهٔ انترفاز و تقسیم دیده می‌شود. مرحلهٔ بین دو تقسیم متوالی سلول را اصطلاحاً انترفاز گویند. اندازهٔ نسبی هسته بر حسب سن و نوع یاختهٔ تغییر می‌یابد. در یاخته‌های خیلی جوان، هسته در مرکز سلول قرار دارد ولی در یاخته‌های مسن، که بخش اعظم حفرهٔ درونی آنها را واکوئول اشغال کرده، هسته کناری است و مجاور دیواره یاخته‌ای جای می‌گیرد. هسته از بخشهایی تشکیل شده است که عبارت‌اند از: غشای هسته، شیره هسته، دانه‌های کروماتین (کروموزومها) ویک یا دو هستک. غشای هسته از دو لایه تشکیل شده است که هر یک ساختاری مانند غشای سیتوپلاسمی دارد. وجود سوراخهایی در سطح غشای هسته امکان تبادل مواد بین هیالوپلاسم و شیره هسته را فراهم می‌سازد. تعداد این سوراخها هنگام فعالیت شدید متابولیسمی هسته، مانند هنگام

آغاز تقسیم یاخته، افزایش می‌یابد و هنگام عدم فعالیت سلول کاهش پیدا می‌کند. هنگام تقسیم، غشای هسته از بین می‌رود و کروموزومها به سمت دو قطب سلول حرکت می‌کنند. در پایان تقسیم، غشای تازه‌ای اطراف کروموزومها را در یاخته‌های جدید فرا می‌گیرد. شیرهٔ هسته مادهٔ ژله مانندی است که در مرحله انترفاز در آن هستک و دانه‌های کروماتین دیده می‌شوند. دانه‌های کروماتین طی تقسیم سلول به شکل میله‌های باریکی موسوم به کروموزوم در می‌آیند. تجزیهٔ شیمیایی کروماتین (کروموزوم) نشان می‌دهد که از DNA و پروتئین ساخته شده است.

۱۱-۱۲- هستک

هستکها ساختارهایی کوچک و کروی به قطر ۱ تا ۳ میکرون هستند که به صورت برجستگی یا برجستگیهایی روی یک کروموزوم یا بیشتر و در محل فرورفتگی ثانویه ظاهر می‌شوند. این نقاط را اصطلاحاً «سازمان دهندهٔ هستکی» نیز می‌نامند. هستک محل تجمع و ذخیره RNA های ریبوزومی است. این RNA ها به وسیلهٔ کروماتینی که هستک بخشی از آن است ساخته می‌شوند. پروتئینهای ریبوزومی که در سیتوپلاسم ساخته شده‌اند به هستک منتقل می‌گردند و با RNA های ریبوزومی ترکیب می‌شوند. این مجموعه‌ها از هسته خارج شده و وارد سیتوپلاسم می‌شوند و ریبوزومها را تشکیل می‌دهند.

۱۲-۱۲- تقسیم یاخته‌ای

هنگامی که اندازهٔ یاختهٔ زنده به حد معینی برسد تقسیم می‌شود و دو یاختهٔ جدید به وجود می‌آورد که اطلاعات وراثتی در آنها یکسان و همانند اطلاعات وراثتی سلول اولیه است. تقسیم سلول راهی است که طی آن موجودات زندهٔ تک یاخته‌ای بر تعداد خود می‌افزایند و نوع خود را حفظ می‌کنند. موجودات زندهٔ پر یاخته‌ای با تقسیمات پیاپی یاختهٔ تخم لقاح یافته، اندازهٔ خود را به موجود بالغ و بزرگ و پیچیده‌ای می‌رسانند

که شامل میلیونها سلول است. یاخته‌ها طی فرآیند همانندسازی و دو نیم‌شدن دقیقی تکثیر می‌یابند.

به طور کلی در یو کاریوتها دو نوع تقسیم وجود دارد که آنها را میتوز و میوز نامگذاری کرده‌اند. نتیجهٔ تقسیم میتوز افزایش تعدادیاخته‌های بدنی است که سرانجام رشد و نمو موجود را تأمین می‌کند. تقسیم میوز یا تقسیم با کاهش کروموزومی رویدادی است که طی آن یاخته‌های زایندهٔ ۲n کروموزومی به یاخته‌های جنسی n کروموزومی تبدیل می‌شوند. مجموعهٔ تغییرات یاخته‌ای که در جریان میتوز، در هسته و سیتوپلاسم حاصل می‌شود طی چهار مرحلهٔ پروفاز، متافاز، آنافاز و تلوفاز انجام می‌گیرد.

۱۳- رشد و نمو و تمایز

رشد یک گیاه عبارت است از افزایش اندازهٔ پیکر گیاه که با افزایش تعداد یاخته‌ها و حجم آنها همراه است. یاخته‌ها تمایز می‌یابند و بافتها و اندامهای مختلف را به وجود می‌آورند و نهایتاً به صورت یک گیاه بالغ ظاهر می‌شوند. رشد در حقیقت پدیده‌ای است کمی که در ابتدا انجام می‌گیرد و شامل تقسیم یاخته‌ای و بزرگ‌شدن یاخته‌هاست.

نمو که معمولاً به دنبال رشد به وقوع می‌پیوندد، پدیده‌ای کیفی است و با انجام آن بر میزان سازمان یافتگی و یا به عبارت دیگر بر میزان پیچیدگی سازمانهای درونی گیاه افزوده می‌شود. تمایز تغییراتی است که در ساختار یا عمل یک یاخته صورت می‌گیرد و آن را نسبت به یاخته‌های دیگر مشخص می‌کند. بیشتر فعالیتهای گیاه به محیط و تغییر فصلها بستگی دارد. تنظیم بسیاری از این واکنشها هنوز به طور دقیق مشخص نشده‌اند، اما کاملاً آشکار است که در رشد و نمو گیاه، عوامل درونی و بیرونی دخالت دارند و هورمونها از مهمترین عوامل درونی به شمار می‌روند. رشد در دانش زیست شناسی اصطلاحاً عبارت است از بزرگ‌شدن بخشهای تشکیل دهندهٔ یک موجود و یا تشکیل

بخشهای جدید مشابه آنچه که قبلاً وجود داشته است. رشد شامل تقسیم یاخته‌ای و بزرگ‌شدن یاخته‌هاست. نمو که معمولاً به دنبال رشد صورت می‌گیرد، به معنی گذر از مرحله‌ای از زندگی به مرحلهٔ دیگر آن با تشکیل بخشهای جدید است. تحولاتی که در حین نمو صورت می‌گیرند، عمیق‌تر و دامنه‌دارتر از رشدند، مانند تقسیم یاختهٔ تخم و تشکیل جنین از آن، یا تشکیل گل و اندامهای زایشی در گیاهان و تبدیل جوانه‌های رویشی به زایشی . رشد در مرحلهٔ تقسیم یاخته‌ای با افزایش تعداد یاخته‌ها جلوه‌گر می‌شود، در صورتی که در مرحلهٔ بزرگ شدن یاخته‌ها، رشد در نتیجهٔ افزایش میزان مواد یاخته‌ای مانند آب، پروتئینها، DNA و سایر مولکولها و مواد پیچیدهٔ یاخته‌ای حاصل می‌شود، بی‌آنکه تعداد یاخته‌ها افزایش یابد. در مرحلهٔ نمو نیز معمولاً تغییری در تعداد یاخته‌ها و حتی در وزن گیاه حاصل نمی‌شود، بلکه یک سلسله تغییرات کیفی در یاخته‌ها، بافتها و اندامها بروز می‌کند که موجب افزایش پیچیدگی سازمانهای درونی گیاه می‌شود. به طور کلی می‌توان گفت رشد پدیده‌ای کمی و نمو پدیده‌ای کیفی است.

به طور کلی رشد در گیاهان به دو طریق و در دو منطقهٔ جداگانه صورت می‌گیرد: اول با افزایش تعداد یاخته‌ها که در منطقهٔ مریستمهای اولیه و ثانویه رخ می‌دهد و دیگری با افزایش غیر قابل برگشت ابعاد آنها که در سایر مناطق یک گیاه بویژه در منطقهٔ رشد طولی آن صورت می‌گیرد. گیاهان مسن هم رشد و نمو دارند. گیاهان تا هنگام پیری به رشد خود ادامه می‌دهند. کندشدن یا توقف رشد گیاه دلیل بر از بین رفتن بافتهای مریستمی نیست، بلکه نشانهٔ این است که مواد غذایی به اندازهٔ کافی به یاخته‌های مریستمی انتهایی نرسیده‌اند و مواد زاید در این یاخته‌ها جمع شده‌اند. این امر در نتیجه عدم تعادلی است که در واکنشهای گیاهی ایجاد شده است. دورهٔ جنینی یاخته‌های مریستمی نامحدود است؛ مثلاً اگر قلمه‌ای از یک گیاه مسن را در محیط

مناسب قرار دهیم، ریشه‌های نابجا تولید می‌شوند و بدین ترتیب گیاه جدیدی شروع به رشد می‌کند.

در گیاهان معمولاً دو پدیده رشد و نمو بترتیب انجام می‌گیرند و در نتیجه از یک یاختهٔ تخم، گیاه پر یاخته‌ای کاملی با ساختاری پیچیده حاصل می‌شود. یاختهٔ تخم نخست تقسیم شده و تعداد زیادی یاخته به وجود می‌آورد، این پدیده را رشد گویند که پدیده‌ای کمی است. سپس یاخته‌های حاصل از تقسیم بزرگ شده و بر وزن و حجم آنها افزوده می‌شود، بی‌آنکه تغییری در تعدادشان حاصل آید، این پدیده نیز رشد بوده و کمی است. یاخته‌های بزرگ شده سپس تمایز حاصل کرده و بافتهای ویژهٔ جنینی را به وجود می‌آورند و این تحول را که پدیده‌ای کیفی است، نمو می‌نامیم. کاملاً آشکار است که در تشکیل جنین، هر دو پدیدهٔ رشد و نمو مشارکت دارند. تمایز مجموعه‌ای از تغیرات است که در ساختار و عمل یک یاخته حاصل می‌شود و به این ترتیب یاخته‌ای را از یاختهٔ دیگر متمایز می‌سازد؛ مثلاً تشکیل دیوارهٔ پسین در یاخته‌های گیاهی نوعی تمایز است. عوامل درونی و بیرونی در رشد گیاهان تأثیر دارند. از مهمترین عوامل درونی، هورمونها و از مهمترین عوامل بیرونی، نور و دما را می‌توان نام برد.

۱۴- عوامل مؤثر در رشد

۱-۱۴- هورمونهای گیاهی

هورمونها عهده‌دار تنظیم و هماهنگی فرایندهایی هستند که در نقاط مختلف پیکر گیاهان صورت می‌گیرند. این مواد از ترکیبات آلی هستند که در بافتهای ویژه‌ای ساخته می‌شوند و مستقیماً از یاخته‌ای به یاختهٔ دیگر و یا از طریق آوندها در سراسر گیاه انتقال می‌یابند و در محل هدف تأثیر می‌گذارند. هورمونها در رشد و نمو و فعالیتهای سوخت و سازی مؤثرند و با آنکه مقدارشان بسیار اندک است، اثر فعال کننده دارند؛ چنانکه در یک کیلوگرم مادهٔ گیاهی فقط ۶ میکروگرم اکسین وجود دارد.

به طور کلی رشد و نمو طبیعی یک گیاه، بیشتر توسط اعمال متقابل هورمونهای تحریک کننده و بازدارنده تنظیم می‌شود. بعضی از هورمونهای گیاهی محرک رشدند، در حالی که هورمونهای دیگری همین فرایندها را کند می‌کنند یا به تأخیر می‌اندازند. این سیستمهای کنترل و توازن، در جزئیات عمل خود پیچیدگی بسیار دارند. مثلاً اثر ویژهٔ هر یک از هورمونها به عواملی بستگی دارد که عبارت‌اند از: مقدار هورمون، عوامل محیطی که قبلاً رشد گیاه را در کنترل گرفته‌اند، وجود یا عدم وجود مواد غذایی ویژه و نوع بافت یا مرحلهٔ نموی که بر آن اثر گذاشته می‌شود. بدین‌سان، در حالی که مقادیر معینی از یک هورمون ویژه می‌توانند باعث افزایش طول یاخته‌ها شود، مقادیر دیگری از همان هورمون از این افزایش جلوگیری می‌کند.

۲-۱۴- نور

دربارهٔ اثر نور بر رشد گیاه مطالعات فراوانی انجام شده است. نبودن نور بر شکل بیرونی گیاه و سرعت رشد طولی آن تأثیر می‌گذارد. گیاهی که در تاریکی می‌روید، معمولاً ساقه‌ای بلند و باریک دارد. برگها گسترش نمی‌یابند. برگها و ساقه‌ها هر دو فاقد کلروفیل‌اند. اگر چنین گیاهی در معرض نور قرار گیرد، رشد طولی ساقه‌اش کاهش می‌یابد. اگر همان نوع گیاه در نور پرورش یابد، تنومند شده و برگهای آن کاملاً سبز و بزرگ می‌شوند و با فاصلهٔ کمتری در طول ساقه قرار می‌گیرند.

۱۵- فتوپریودیسم و تشکیل گل

اثر تناوب روز و شب و یا روشنایی و تاریکی در رشد و نمو و تشکیل گل و یا پدیده‌های دیگر مانند بیدارشدن دانه، ریزش برگ و غیره از وجود خاصیتی در گیاه ناشی می‌شود که آن را فتوپریودیسم گویند.

گیاهان را از نظر درجهٔ حساسیت نسبت به دورهٔ نوری به سه دسته تقسیم می‌کنند:

۱) گیاهان بی‌تفاوت که برای تشکیل گل به طول روز و شب حساسیت از خود نشان نمی‌دهند؛ مانند بعضی از گونه‌های گوجه‌فرنگی، گل میمون، میخک.

۲) گیاهان کوتاه روز گیاهانی هستند که در روزهای کوتاه گل می‌دهند و اگر آنها را در معرض نور روزانه طولانی قرار دهند، گل دادنشان متوقف می‌شود. گیاهان کوتاه روز در روزهای دراز تابستان به طور رویشی رشد می‌کنند و تا پاییز و زمستان که روزها کوتاه می‌شوند گل نمی‌دهند؛ مانند داوودی.

۳) گیاهان بلند روز فقط در دورهٔ نوری طولانی گل می‌دهند و اگر دورهٔ نوری کوتاه باشد، فقط رشد رویشی دارند؛ مانند ختمی، اسفناج، زنبق. حد فاصل بین طول روز مناسب برای رشد رویشی و طول روز مولد گل و دانه برای یک گیاه دورهٔ بحرانی نور نامیده می‌شود. گیاهان کوتاه روز، در روزهای کوتاهتر از طول روز بحرانی، و گیاهان بلند روز در روزهای بلندتر از طول روز بحرانی گل می‌دهند.

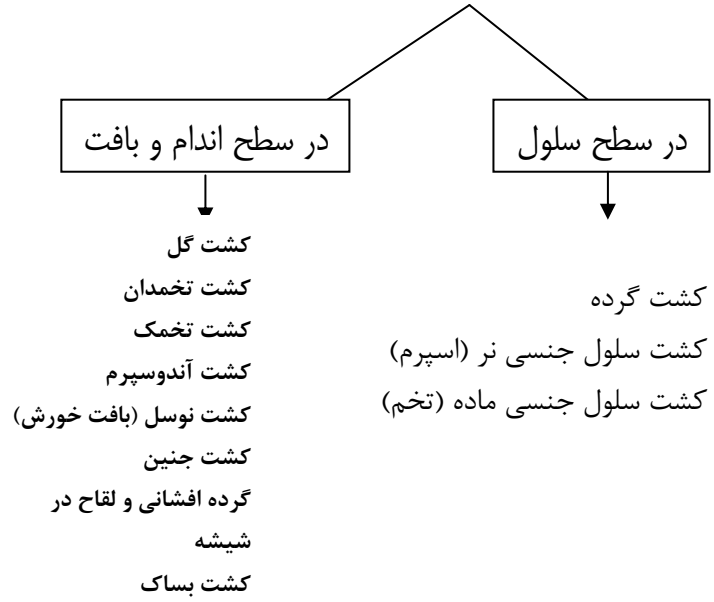
۱۶- دما

به طور کلی، با بالا و پایین رفتن دما رشد گیاه سریع یا کند می‌شود. با این حال، دمای بالا گاهی اثرات منفی دارد و از میزان رشد گیاه می‌کاهد. دمای بالا باعث خشک شدن و افزایش شدت تنفس گیاه می‌شود. دما با تأثیر بر روی فعالیتهای متابولیسمی مانند گوارش، انتقال مواد، تنفس، ساختن مواد پروتوپلاسمی و دیوارهٔ یاخته‌ای جدید در رشد اثر می‌کند. دمای بالا تعرق را نیز افزایش می‌دهد و بدین‌سان تورم و رشد را بویژه در طول روز کم می‌کند. در هر گونهٔ گیاهی، میزان دمای مؤثر بر رشد عبارت‌اند از: ۱) دمای کمینه (Min)که گیاه در حد پایینتر از آن نمی‌تواند رشد کند، ۲) دمای بهینه (optm)که در آن میزان رشد به بالاترین حد خود می‌رسد، ۳) دمای بیشینه (Max)که در حد بالاتر از آن رشد متوقف می‌شود. دمای بهینه بر حسب گیاه متغیر است.

فصل دوم
انواع کشت بافت گیاهی‌اندام های جنسی

روشهای بیوتکنولوژی تولیدمثل جنسی در گیاهان را می‌توان به صورت زیر خلاصه کرد.

روشهای بیوتکنولوژی تولیدمثل جنسی در گیاهان



دی فوسارد (۱۹۷۷) بطور کلی سه نوع کشت در شیشه (این ویترو) را در گیاهان عالی معرفی کرده است.

۱- سازمان یافته: کشت گیاه تقریباً کامل(جنین، بذر) و یا اندام‌ها کشت سازمان یافته نامیده می‌شود، که درآن، ساختمان ویژه و منظم گیاه یا اندام، حفظ می‌شود، و تقریباً شبیه به تکثیر رویشی ازطریق قلمه، تقسیم کردن، ساقهٔ رونده وجوانه جانبی یا ساقه، می‌باشد. اگرساختمان اولیه گیاه یا اندام حفظ شود، نتیجه حاصل، با گیاه مادری، مشابه خواهند بود.

۲- سازمان نیافته: اگر سلول‌ها و یا بافت‌ها از یک بخش منظم گیاهی تمایز نیافته جدا و سپس کشت شوند، رشد سازمان نیافته (به فرم کالوس) صورت خواهد گرفت. دراینجا ممکن است کالوس به صورت دستجاتی از سلول‌ها و یا سلول‌های منفرد باشد(کشت شناور یا تعلیقی).

رشد سازمان نیافته، اساساً براثر کاربرد غلظت‌های بالای اکسین و یا سیتوکینین در محیط رشد به وجود می‌آید. در کشت‌های سازمان نیافته، ثبات ژنتیکی، غالباً پایین است.

۳- حدواسط: این نوع کشت، حدواسط دونوع قبلی می‌باشد. سلول‌های یک بافت یا اندام جدا شده، ابتدا به صورت تمایز نیافته درمی‌آیند، سپس در اثر تقسیم، بافت و یا لایه‌ای از بافت کالوس را تشکیل می‌دهند، که از آن، اندام‌هایی مثل ریشه و ساقه و یا حتی گیاه کامل (جنین اولیه یا جنین) به سرعت به‌وجود خواهد آمد. این نکته را نیز باید درنظر داشت که ساختمان‌های منظم، می‌توانند از کشت‌های سازمان نیافته به‌وجود آیند. این پدیده، بابکارگیری تکنیک‌های ویژه و یا به طورخودبخود انجام می‌شود. درهمه این موارد، نتایج حاصل، کاملاً شبیه به والدین خود نیستند.

هر گیاه، شامل اندام‌های متفاوتی است، که هر یک از این اندام‌ها از معدودی بافت تشکیل شده‌اند، و بافت‌ها نیز به نوبهٔ خود، از سلول‌های اختصاصی، به وجود آمده‌اند. اگر دیوارهٔ این سلول‌ها توسط آنزیم هضم شود، پروتوپلاست حاصل می‌شود. از آن جایی که گیاه، از مواد ساختمانی بسیار متفاوتی تشکیل شده است، انواع مختلفی از کشت درشیشه نیز وجود دارد.

۱- کشت گیاه کامل: یک بذر، ممکن است درشرایط درشیشه، کشت شود، و یک گیاهچه و نهایتاً یک گیاه کامل تولید کند. مثل ارکیده.

۲-کشت جنین: دراین نوع کشت، جنین جداشده، پس ازحذف پوستهٔ بذر، کشت می‌شود.

۳-کشت اندام گیاهی: یک اندام جداشده، درشرایط در شیشه رشد می‌کند. درکشت اندام، انواع مختلفی مثل کشت مریستم، کشت نوک ساقه، کشت ریشه، کشت پرچم وغیره، قابل تشخیص هستند. غالباً قسمت جداشده (بافت یا اندام) به عنوان قلمه شناخته شده، وکشت قلمه نامیده می‌شود.

۴-کشت کالوس: اگریک بافت تمایز یافته جدا شود، و درشرایط درشیشه، تولید یک تودهٔ سلولی تمایز نیافته بنام کالوس نماید، این پدیده را کشت کالوس می‌نامند.

۵-کشت سلول: کشت سلول‌های منفرد که به کمک آنزیم‌ها یا به روش‌های مکانیکی ازیک بافت گیاهی، کالوس یا تعلیقه سلولی به دست می‌آیند، کشت سلول نامیده می‌شود.

۶-کشت پروتوپلاست: کشت پروتوپلاست‌هایی که در اثر هضم آنزیمی دیوارهٔ سلولی به وجودآمده‌اند، کشت پروتوپلاست می‌نامند.

در این بخش مهمترین روشهای کشت بافت اندامهای جنسی ارایه می شود:

کشت گل[1]

در اینجا پرایمردیای گل[2] را قبل از تعیین و تمایز جنسیت[3] جدا کرده و در شیشه[4] کشت می‌کنند. در این روش از محیط‌های کشت نیچ[5] (۱۹۵۱)، وایت[6] (۱۹۵۴) به اضافه شیر نارگیل و غیره استفاده می‌کنند. از این روش برای تعیین جنسیت در خیار استفاده شده است. در خیار چند نوع گل وجود دارد، گیاه یک پایه، گیاهی که فقط گل ماده دارد[7] و گیاهی که دارای گلهای هرمافرودیت است. در گیاهان یک پایه با استفاده از اکسین و در محیط کشت، گل نر تبدیل به ماده می‌شود. اگر از اسید جیبرلیک استفاده

---

[1] .Flower culture
[2] . Flower primordia
[3] . Sex determination
[4] . In vitro
[5] . Nitsch
[6] . White
[7] . Gynoic plant

شود، گل ماده تبدیل به نر می‌شود. بنابراین در واقع اسید جیبرلیک اثر اکسین را خنثی می‌کند. در مزارع ذرت گاهی اوقات مشاهده می‌شود که اندام نر بلال می‌دهد، علت این موضوع آن است که باد غلظت هورمون را تغییر می‌دهد و این هورمون نیز تنظیم ژن را تغییر می‌دهد و لذا ژنهای کنترل‌کننده تعیین جنسیت عوض شده و تظاهر متفاوتی پیدا می‌کنند.

کشت تخمدان[1]

کشت تخمدان عبارت است از کشت تخمدانهای جدا شده از گلهای در حال رشد در شیشه. کشت تخمدان اولین بار توسط لارو[2] و در سال ۱۹۴۲ انجام شد. این تکنیک بعداً توسط نیچ و در سال ۱۹۵۱ برای مطالعه فیزیولوژی میوه (پارتنوکارپی) گسترش یافت.

روش این تکنیک بدین صورت است که ۱۵-۲ روز بعد از گرده‌افشانی، جوانه‌های گل جدا شده و کاسه گل، جام گل و پرچمها را جدا می‌کنیم. ۴۸-۲۴ ساعت قبل از شکفتن، تخمدانهای گرده‌افشانی شده جدا می‌شوند. انتهای تخمدان را برش داده و در محیط غذایی فرو می‌بریم و سپس آنرا می‌کاریم. محیط کشت معمولاً ساده است و شامل محیط‌های کشت نیچ و وایت می‌باشد. سپس کشت‌ها را برای مدتی در درجه حرارت $2^{\circ}c$ تا 25^{+} قرار می‌دهیم.

با استفاده از این روش می‌توان رشد میوه را در لوله آزمایش حفظ کرد، اما معمولاً میوه‌ها کوچک هستند. الگوی رشد از نوع الگوی نوع Sigmoid است. در رشد میوه میزان اکسین نقش مهمی را ایفا می‌کند. در دو رگ گیری بین گونه‌ای *Triticum aestivum×T.Spelta* از این روش استفاده شده است. برای گرده‌افشانی در محیط آزمایشگاه در تنباکو نیز از این روش استفاده می‌شود. روش کار

---

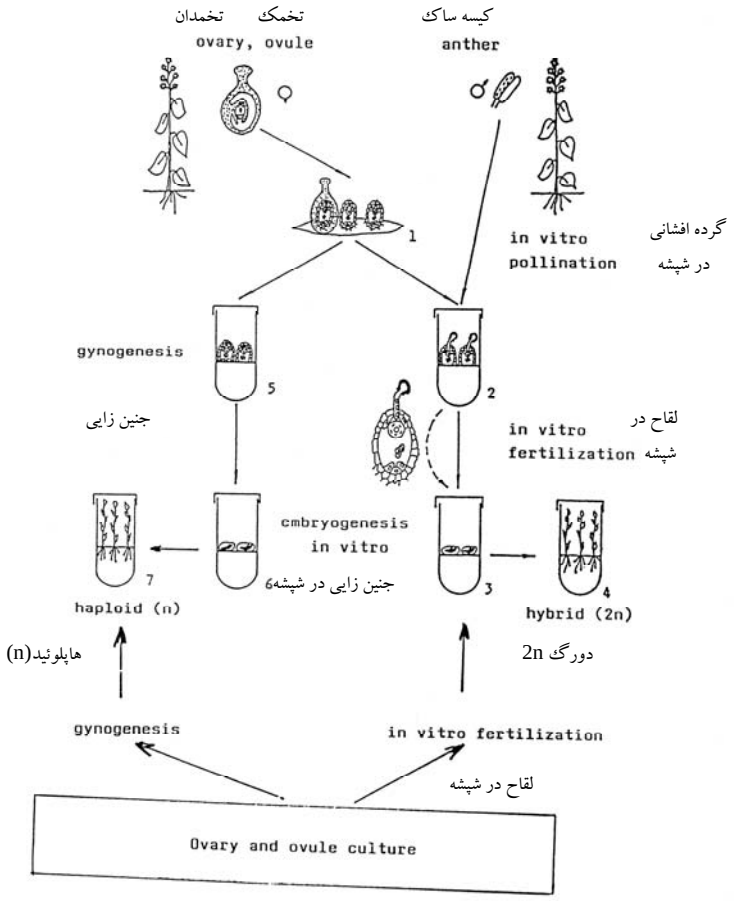
[1] .Ovary culture
[2] . Larue

بدین صورت است که تخمدان و مادگی را از نبات جدا می‌کنیم. در گیاهان خانواده چتریان برای تولید چندجنینی[1] که در آن جنین‌زایی انجام شده است، از این روش استفاده می‌شود. تولید آپومیکس‌های مصنوعی با این روش موفق نبوده است. برای تولید ژینوژنز[2] از این روش استفاده شده است. منظور از ژینوژنز تولید مصنوعی آنتوژنز[3] در سلولهای هاپلوئید تلقیح نشده کیسه جنین است. منظور از آنتوژنز فرآیند تولید گیاه کامل از سلول می‌باشد. از این روش برای تولید آپومیکس هاپلوئید استفاده شده است. آنتوژنز شامل جنین‌زایی و جوانه زدن، تمایز کالوس، تمایز بافت و تمایز اورگان است. این مراحل در واقع همان شکل‌زایی یا مرفوژنز است.

کشت تخمدان در گیاهانی از قبیل: جو، گندم، برنج، ذرت، چاودار و چغندرقند مورد بهره‌برداری قرار گرفته است. برای تحریک مصنوعی نبات از موادی شبیه اکسین و محرکهای دانه گرده (دانه گرده توسط ۵۰۰ Gy اشعه گاما مورد عمل قرار می‌گیرد) استفاده شده است. امروزه از کشت تخمدان استفاده چندانی نمی‌شود. مراحل کشت تخمدان به شرح زیر است (شکل ۱-۲).

---

1. Polyembryony
2. Gynogenesis
3. Ontogenesis



شکل ۱-۲- کشت تخمک و تخمدان

کشت تخمک[1]

کشت تخمک عبارت است از کشت کیسه جنین لقاح یافته یا تلقیح نشده که از تخمدانهای در حال رشد جدا شده است (مراجعه شود به شکل (۱-۲).

کشت تخمک شبیه کشت تخمدان است و برای اولین بار در سال ۱۹۳۲ توسط وایت[2] با کشت تخمکهای گل میمون شروع شد.

در سال ۱۹۵۸ ماهش‌وری[3] از کشت تخمک گرده‌افشانی شده گیاه *Papaver somniferum* بیست و سه روز بعد از جداسازی بذر بدست آورد. روش کشت تخمک بدین صورت است که ۲-۱ روز بعد از گرده‌افشانی، تخمدان بریده شده و باز می‌شود و تخمکهای آن در سطح محیط کشت قرار می‌گیرند.

محیط کشت نیچ (۱۹۵۱) و وایت (۱۹۵۴) شامل مخلوطی از نمکهای معدنی، اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، مواد مرکب رشد مثل آب نارگیل، کازئین هیدرولیزات، شیره مخمر، شیره‌های گیاهی مثل آب خیار و مقداری قند (حدود ۸-۶ درصد بسته به مرحله رشد و غلظت اسمزی) می‌باشد. به نظر می‌رسد که بافت جفت جنین دارای اثرات مفیدی خواهد بود (جفت جنین در تخمدان همان سلول nurse در تخمدان است).

از کشت تخمک برای دو رگ‌گیری بین گونه‌ای و بین جنسی و نیز تولید هاپلوئید استفاده می‌شود. روش کار بدین صورت است که هنگام تلاقیهای بین گونه‌ای و بین جنسی معمولاً جنین هیبرید در تخمک (بذر) در حال رشد عقیم می‌شود. با استفاده از کشت تخمک و یا ترکیبی از کشت تخمک و جنین می‌توان نتایج هیبرید بدست آورد. این کار در تنباکو صورت گرفته است. در جو و گندم تخمک و تخمدان یکی هستند زیرا تخمدان یک تخمک دارد. از کشت تخمکهای تلقیح نشده برای بدست آوردن هاپلوئیدهای ژینوژنیک در ذرت، چغندرقند، آفتابگردان و پنبه استفاده شده است. به

---

[1] . Ovul culture
[2] . White
[3] . Maheshwari

منظور توضیح بعضی از اصطلاحات موضوع آپومیکسی را مختصراً مورد بحث قرار می‌دهیم. بطور کلی می‌توان گفت که آپومیکس یعنی تولید گیاه بدون عمل گرده‌افشانی و لقاح (آپومیکس هاپلوئید).

آپومیکس بر دو قسم است:

۱- دیپلوئید ۲- هاپلوئید

۱- آپومیکس‌های دیپلوئید خود بر دو قسم هستند: الف- پارتنوژنز (بکرزایی) که فراوانی آن در حشرات بیشتر از گیاهان است. ب-چند جنینی(پلی امبریونی)

۲- آپومیکس هاپلوئید شامل: الف- آندروژنز، ب- ژینوژنز و ج- آپوگامی می‌باشد.

تولید گیاه از کیسه بساک را آندروژنز گویند، در ژینوژنز گیاه از گامت ماده بدست می‌آید. در آپوگامی گیاه از رشد سلولهای آنتی‌پودال یا متقاطر بدست می‌آید. تولید گیاه از گامت ماده کاهش نیافته را پارتنوژنز گویند. منظور از کاهش نیافته آن است که تعداد کروموزومها در تقسیم میوز کاهش پیدا نمی‌کند. اگر گیاه از رشد بافت نوسل (خورش) به وجود آید آنرا پلی‌آمبریونی (چندجنینی) گویند. در اینجا رشد بدون جنین و بدون گرده‌افشانی صورت می‌گیرد و معمولاً میوه بدون بذر است. در اینجا فقط بافت سماتیک رشد می‌کند.

کشت آندوسپرم[1]

کشت آندوسپرم عبارت است از کاشت در شیشه بافت آندوسپرم در حال رشد که از بذر گیاهان نهاندانه جدا شده است. از خصوصیات آندوسپرم آن است که در ۸۱ درصد گیاهان گلدار به صورت تری‌پلوئید است و از ترکیب ۳ سلول هاپلوئید به وجود آمده است.

[1] .Endosperm culture

آندوسپرم یک توده یکنواخت از بافتهای پارانشیمی است که فاقد تمایز آوندی یا اورگانوژنزی (اندام‌زایی) است. کاشت آندوسپرم برای اولین بار توسط لارو[1] و در سال ۱۹۴۹ از آندوسپرمهای نارس ذرت صورت گرفته است. در این روش ریز نمونه‌های آندوسپرمهای رسیده یا نارس بذر را از گیاهان تک‌لپه و یا دولپه جدا می‌کنند و در محیط کشت وایت (۱۹۵۴) قرار می‌دهند، این محیط کشت توسط رانگا سوامی[2] تغییر یافته است. کشت‌های حاصل را در تاریکی نگهداری می‌کنند. از کشت آندوسپرم برای اصلاح گیاهان تری‌پلوئید[3] در سیب درختی، موز، چغندرقند، هندوانه و غیره استفاده می‌شود. در روشهای متعارف اصلاح نباتات برای بدست آوردن گیاهان تری‌پلوئید، ابتدا باید گیاه تتراپلوئید را به وجود آورند و سپس با دیپلوئید تلاقی دهند (۲n×۴n) و بعد گیاه ۳n به وجود آورند که معمولاً عقیم هستند.

کشت بافت نوسل (خورش)[4]

نوسل یک بافت سماتیکی از بذر اولیه است که بین کیسه جنین و پوشش قرار دارد. در کشت نوسل بافت نوسل را از تخمکهای در حال رشد جدا کرده و در شیشه می‌کارند. این روش برای اولین بار در سال ۱۹۵۸ توسط رانگا سوامی هنگام مطالعه چندجنینی نوسلی[5] در Citrus Japonica به وجود آمد. در روش کشت نوسل بافت نوسل را از تخمکهای گرده‌افشانی شده یا گرده‌افشانی نشده جدا می‌کنند و در محیط کشت CH+ وایت قرار می‌دهند. از کشت نوسل برای حذف ویروس در مرکبات و نیز ریزتکثیری[6] مرکبات استفاده می‌شود.

---

1. Larue
2. Rangaswamy
3. Triploid breeding
4. Nucellus culture
5. Nucellar polyembryony
6. Micropropagation

کشت بساک[1]

کشت بساک عبارت است از کاشت بساکهای دارای دانه گرده در مراحل بخصوصی از رشد به منظور تولید آندروژنز در شیشه می‌باشد.

آندروژنز یک نوع آپومیکس هاپلوئید است بطوریکه در آن گیاه هاپلوئید از سلول هاپلوئید دانه گرده (گامت نر) سرچشمه گرفته است.

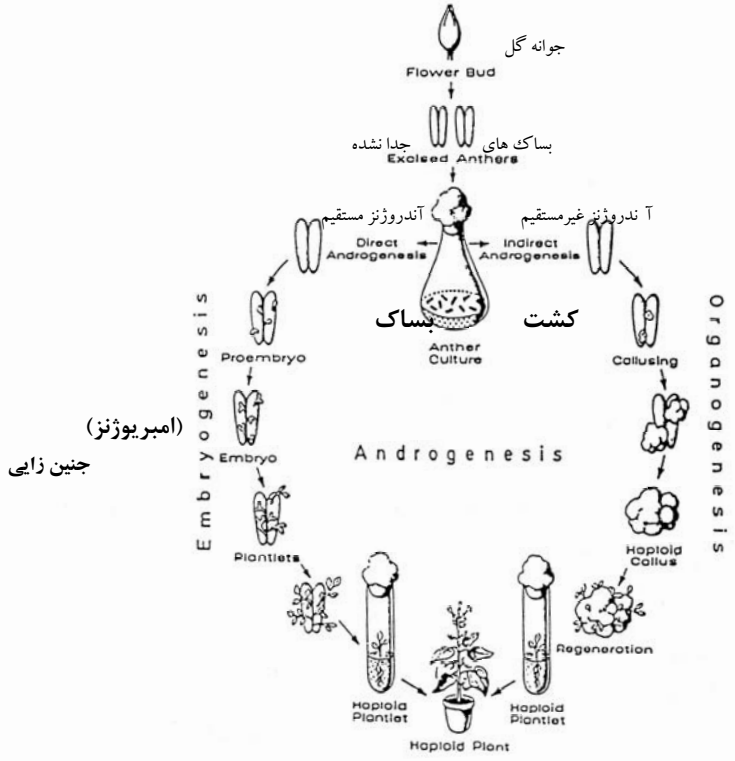
کشت بساک برای اولین بار در گیاه داتوره و در سال ۱۹۶۵ توسط گوها- مهشوری[2] صورت گرفته است. تولید گیاه هاپلوئید به صورت آندروژنز در ۳۰۰ گونه گیاهی موفق بوده است. در این روش بساکها را در مراحل بخصوص رشد که فعال هستند از گیاه جدا نموده و در محیط اصلی کشت از قبیل: محیط Ms، N_6، B_5 و غیره قرار می‌دهند. (شکل ۲-۲)

موفقیت در کشت بساک بستگی به ژنوتیپ، وضعیت فیزیولوژیکی گیاهان دهنده، مرحله رشد گرده، روش کاشت، عواملی که توسط آن بساکها را تحت تأثیر قرار می‌دهند، محیط کشت و دوشکلی[3] دانه گرده دارد. ترکیب محیط کشت برای کشت بساک در غلات در جدول ۲,۱ آمده است. همچنانکه در این جدول مشاهده می‌شود تعداد دانه گرده در بساک تنباکو حدود ۴۰۰۰۰ و در غلات حدود ۳۰۰۰ می‌باشد.

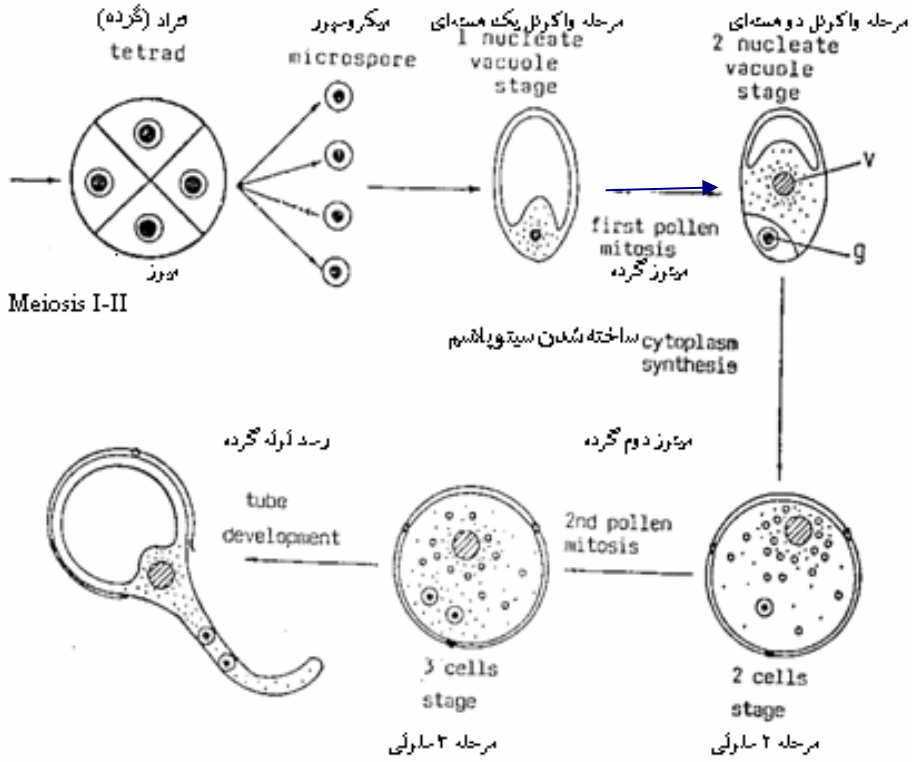
در فرآیند تقسیم میوز I و II از بساکهایی که دارای میکروسپورهای بین مرحله تتراد تا مرحله دوهسته‌ای هستند برای کشت بساک استفاده می‌شود (شکل ۳-۲).

---

1 . Anther culture
2 . Guha- Maheshwari
3 . Dimorphism



شکل ۲-۲- نمودار کشت بساک و رشد گیاه هاپلوئیداز طریق تشکیل جنین (مستقیما) یا کالوس زایی(غیر مستقیم)



شکل ۳-۲ - میوز یک و دو

جدول ۱-۲- ترکیب محیط کشت برای کشت بساک در غلات

واریته	محیط کشت پایه	ترکیبات اضافی	میلی‌گرم در لیتر
گندم	محیط کشت یک سیب‌زمینی (۱۹۷۶، Anonymous) محیط کشت دو سیب‌زمینی (Chung و همکاران، ۱۹۷۸)	کلوتامین (Debuyser, Henry، ۱۹۸۱؛ Schaeffer و همکاران، ۱۹۷۹)	۲۰۰
تریتیکاله	محیط B_5 (Gamborg، ۱۹۷۰)	D- ۴ و ۲ پرولین اکسی پرولین اسید تراماتیک IBA گلوتامین ساکارز (Sozinor و همکاران، ۱۹۸۱)	۲ ۱۰۰-۱۶۰ ۱۰۰-۱۶۰ ۵-۵۰ ۱۰۰ ۱۰۰ ۳۰۰۰۰ --
چاودار	N_6 (Chu، ۱۹۷۸)	گلوتاتیون اسید آسکوربیک D- ۴ و۲ کینتین گلوکز (Wenzel و همکاران، ۱۹۷۷)	۳۰ ۱۰ ۲ ۰/۵ ۵۰۰۰۰ --
جو	محیط N_6 سیب‌زمینی ۲ (مایع و جامد) محیط ms بدون $CoCl_2$، $6H_2O$، $FeSo_4$، $7H_2O$ (Murashige و Skoog، ۱۹۶۲؛ Linsmaier و Skooge، ۱۹۶۵)	اینوزیتول کینتین D- ۴ و۲ ساکارز (Sanderland و Zu، ۱۹۸۱) اینوزیتول تیامین IAA BAP FeNaEDTA ساکارز (Foroughi و همکاران، ۱۹۷۶)	۱۰۰۰ ۰/۵ ۱/۵ ۹۰۰۰۰ -- ۱۰۰ ۰/۴ ۱ ۱ ۴۰ ۶۰۰۰۰ --
ذرت	N_6 YU-pei (ku و همکاران، ۱۹۷۸)	کازئین هیدرولیزات پرولین – L TIBA ساکارز (Nitsch و همکاران، ۱۹۸۲) گلیسین- تیامین- اسید نیکوتینیک	۵۰۰ ۱۰۰ ۰/۱ ۶۰۰۰۰ -- ۱/۳-۰/۲۵-۷/۷

همچنین مشاهده شده است که مراحل اولیه رشد میکروسپور و نیز مراحل میانی یک هسته‌ای بدون میکروسپورها نتایج خوبی از نظر رشد بساک داشته است. از میکروسپورهای یک هسته‌ای در سه مسیر متفاوت (شکل ۴-۲) دانه گرده چند سلولی به وجود آمده است (حتی اگر هسته رویشی یا زایشی اول شروع به تقسیم نماید). از دانه‌های گرده چندسلولی[1]، بسته به ژنوتیپ، کالوس یا جنین به وجود می‌آید.

بیشتر گیاهانی که در اثر کشت بساک به وجود می‌آیند هاپلوئید هستند (اگرچه در بین آنها دیپلوئید یا تتراپلوئید نیز یافت می‌شود). مضاعف شدن مجدد گیاهان هاپلوئید به طور طبیعی، در گونه‌های مختلف متفاوت است. دو برابر شدن مجدد گیاهان هاپلوئید به صورت طبیعی و در اثر عوامل درونی مضاعف شدن مجدد[2] یا عوامل درونی میتوز[3] واقع می‌شود. معمولاً برای دو برابر کردن گیاهان هاپلوئید از کلشی‌سین استفاده می‌شود. گیاهان هاپلوئید حاصل از دو برابر شدن هاپلوئید (گرده) را هاپلوئید مضاعف[4] گویند (شکلهای ۵-.۲، ۶-۲).

آلبینیسم: یکی از مشکلات عمده کشت بساک در غلات تشکیل تعداد زیادی گیاهچه‌های آلبینو (حدود ۹۰ درصد) است. تشکیل گیاهچه‌های آلبینو ممکن است در اثر عوامل زیر باشد:

۱- آلبینو ممکن است به علت جهش یا ظهور ژنهای مغلوب باشد.

۲- تعداد پروپلاستیدهای موجود در میکروسپور کافی نباشد.

۳- فقدان وجود پروتئین‌های لازم برای تبدیل به گرانا لاملا[5]

۴- فقدان کامل ریبوزومها در پلاستیدها

---

1. Multicellular
2. endoreduplication
3. endomitosis
4. Doubled haploid
5. granalamellae

موارد استفاده از کشت بساک

۱- از گیاهان هاپلوئید می‌توان برای انتخاب ترکیبات جدید ژنتیکی مطلوب از هیبریدهای F_1 استفاده کرد.

۲- تولید گیاهان هاپلوئید یکی از روشهای مؤثر برای تولید لاینهای هموزیگوت است که سبب صرفه‌جویی در وقت می‌شود. از لاینهای هموزیگوت حاصل می‌توان برای تولید واریته‌های هاپلوئید در گیاهان دگرگشن و نیز برای تثبیت ژنوتیپهای هتروزیگوت در گیاهان خودگشن استفاده کرد (شکل ۷-۲).

۳- تولید تنوع گامتوکلون[1] که در اثر نوترکیبی میوزی به وجود می‌آید.

۴- امکان کاهش سطح پلوئیدی در گیاهان.

۵- ظاهر شدن ژنهای مغلوب در هاپلوئید

۶- استفاده از طرحهای اصلاحی افزایش و جایگزینی کروموزومی در هیبریدهای بین جنسی (شکل ۸-۲).

۷- استفاده از طرحهای اصلاحی ترکیبی در گیاهان دارای تکثیر رویشی مثل سیب‌زمینی (شکل ۹-۲).

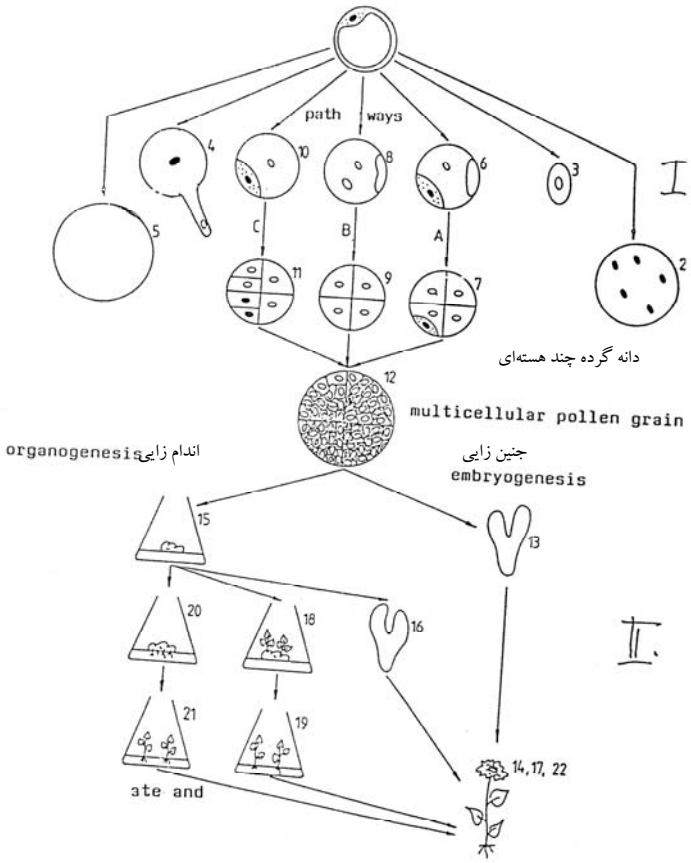
۸- ممکن است در گونه‌های دارای کروموزومهای جنسی فرمهای ابرنر[2] (YY) به وجود آید.

۹- واریته‌های هاپلوئیدهای مضاعف (DH) در گیاهانی از قبیل برنج، جو، گندم، دانه‌های روغنی و انگور ثبت شده است.

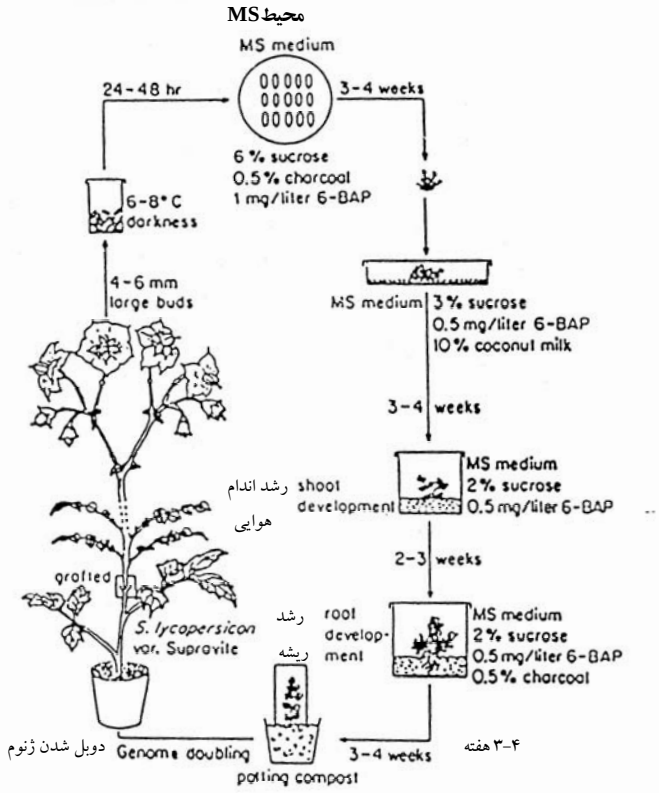
---

[1] . gametoclonal variation
[2] . Super male

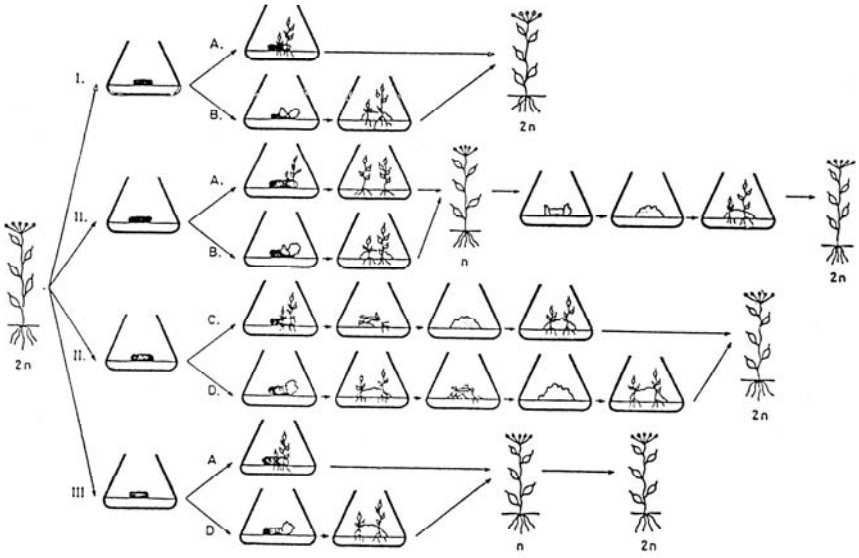
Ontogenesis of Pollen Haploid Plants
Ondrogenesis



شکل ۴-۲- تکامل گیاهان



شکل ۵-۲- روش کشت بساک در سیب زمینی



شکل ۶-۲- تولید هموزیگوتهای دیپلویید با استفاده از کشت دانه

کشت میکروسپور[1]

کاشت میکروسپور یعنی جداسازی و کشت دانه گرده در شیشه. در سال ۱۹۵۳ تالک[2] موفق شد که از دانه گرده *Ginkgo biloba* کالوس به وجود آورد. در سال ۱۹۵۲ شارپ[3] و همکارانش موفق شدند که از گرده‌های جدا شده از گوجه‌فرنگی

1 . Microspore culture
2 . Tulecke
3 . Sharp

کلونی به وجود آورد. در سال ۱۹۷۴ نیچ[1] نحوه جداسازی دانه گرده و شرایط آن در محیط کشت را توضیح داد. روش کاشت میکروسپور شامل دو مرحله متفاوت است:

۱- تحریک میکروسپور برای تغییر تکامل عادی جنسی خود و تبعیت از مسیر رویشی.

۲- نگهداری و حفظ رشد اسپوروفیتیک میکروسپورهای تحریک شده به طرف جنین‌زایی.

مراحل اصلی کشت میکروسپور به شرح زیر است:

۱- استرلیزه کردن جوانه‌های باز نشده

۲- بساکها را از قبل تحت تأثیر بعضی از تیمارها قرار می‌دهیم، به عنوان مثال بساکها را برای مدت ۳ روز در درجه حرارت 5° سانتی‌گراد قرار می‌دهیم (شوک فیزیکی) و یا اینکه بساکها را برای مدت ۳-۲ روز در محیط کشت مایع شناور می‌سازیم (شکل ۱۰-۲).

۳- بیرون آوردن دانه‌های گرده از بساک توسط فشار دادن آنها به دیواره‌های جانبی لوله‌های آزمایش و سپس غربال کردن آنها توسط الکهای نایلونی.

این الکها دارای منفذهایی هستند که قطر آنها عریض‌تر از قطر دانه‌های گرده است. به عنوان مثال منفذ الکها برای تنباکو حدود ۴۰ میکرون، در گوجه‌فرنگی ۲۵ میکرون و در ذرت ۱۰۰ میکرون است.

۴- سانتریفوژ کردن کشت شناور و دانه گرده به مدت ۵ دقیقه با سرعت پایین (مثلاً بین ۸۰۰-۵۰۰ دور در دقیقه)

۵- دانه‌های گرده مجدداً به صورت کشت شناور درآمده و در مواد ضدعفونی‌کننده شسته می‌شوند.

۶- غلظت دانه گرده حدود 10^{3} تا 10^{4} دانه گرده در میلی‌لیتر است و به لایه‌های کشت‌های شناور در ظرف پتری هوا داده می‌شود.

---

[1] . Nitch

مزایای کشت میکروسپور

۱- جلوگیری از عدم رشد دانه گرده در کشت بساک به علت مواد بازدارنده رشد که از بافت بساک تغییر ماهیت داده خارج می‌شوند.

۲- رقابتی بین بافتهای دارای سطوح پلوئیدی متفاوت نیست (n، ۲n) چون میکروسپورها n هستند و رقیب ندارند.

۳- تولید تعداد زیادی سلول که آزادانه در داخل جنین‌ها رشد می‌کنند.

۴- امکان جداسازی سلولهای گامت نر را فراهم می‌آورد.

کشت گامتهای منفرد جدا شده[1]

منظور از این نوع کشت، جداسازی، کشت و اختلاط مصنوعی یک سلول تخم و یک سلول نر (اسپرم) است. این نوع کشت در سال ۱۹۸۶ در واخنینگن[2] هلند صورت گرفت، بدینصورت که موفق شدند سلولهای نر را از گرده اسفناج جدا کنند. در سال ۱۹۹۰ لورز[3] و همکارانش با جداسازی گامتهای منفرد موفق به تلقیح گیاهان عالی در شیشه شدند. روش این نوع کشت بدین صورت است که اول، سلولهای اسپرم را از دانه گرده جدا می‌سازند. جداسازی بدینصورت است که دانه گرده را در اثر شوکهای اسمزی می‌شکنند و بعد سلولهای نر را با استفاده از میکروکاپیلاری[4] و در زیر میکروسکوپ انتخاب می‌کنند. روش دوم آن است که کیسه جنین و سلولهای تخم را جدا می‌کنند بدینصورت که:

۱- کیسه‌های جنین را که دارای بافت تخمک هستند در محلول مانیتول جمع‌آوری می‌کنند.

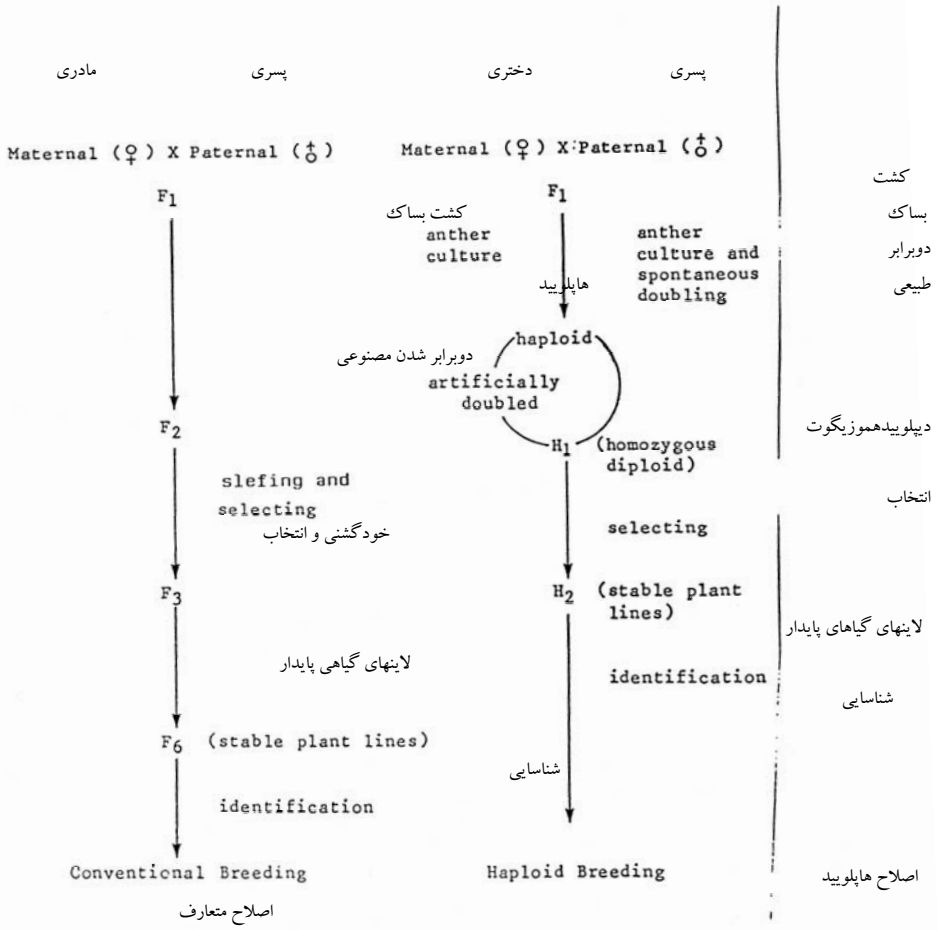
---

[1] .Single isolated gamets
[2] . Wageningen
[3] . Lorz
[4] . Microcapillary

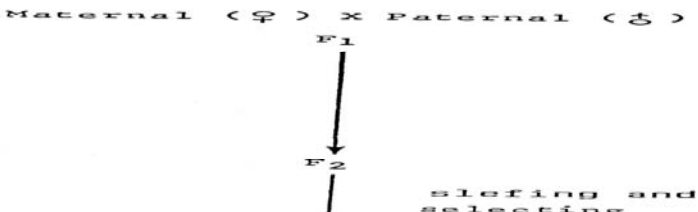
۲- بافتها را توسط محلول آنزیمهایی مثل پکتیناز، پکتولیاز، همی سلولاز و سلولاز تجزیه می‌کنند.

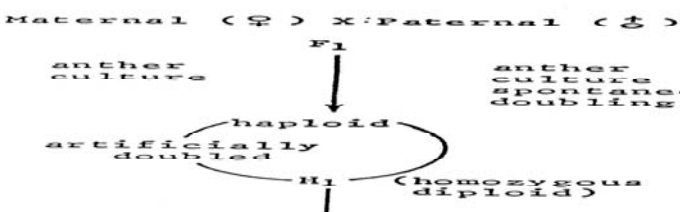
۳- جداسازی مکانیکی کیسه‌های جنین و سلولهای تخم توسط میکروسکپ و انتقال آنها توسط میکروکاپیلاری.

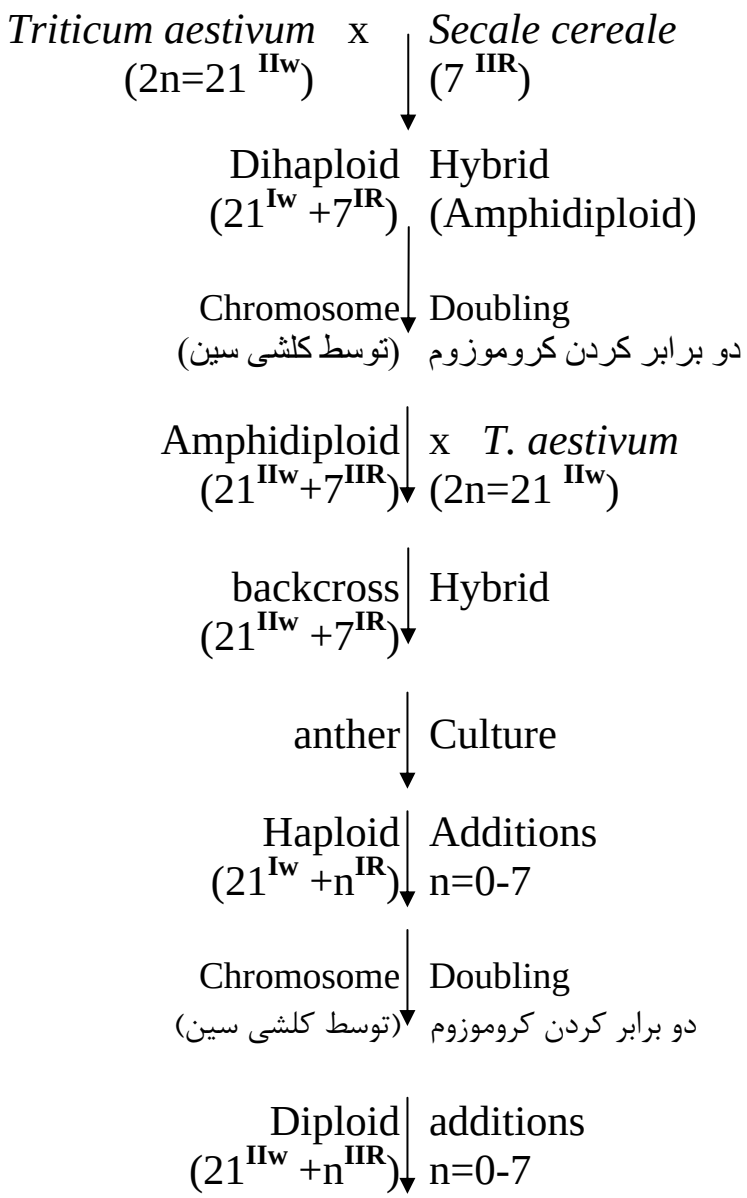
نتیجه‌ای که در اثر کشت گامتهای ایزوله شده به دست آمده است، تلقیح اسپرم و سلول تخم ذرت در شیشه و به واسطه الکتروفیوژن یا ترکیب الکتریکی بوده است.



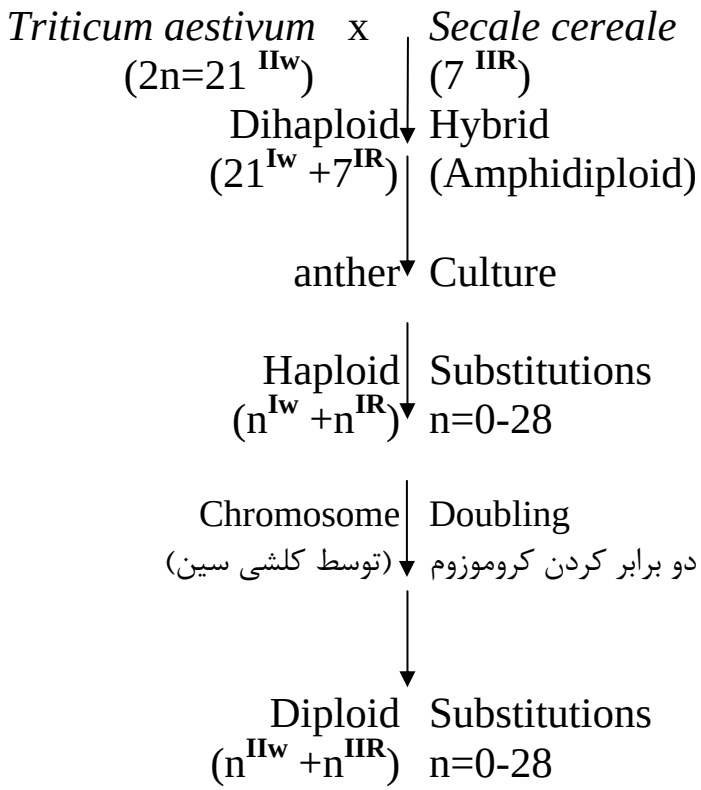
شکل ۲-۷: تولید لاینهای گیاهی پایدار در گیاهان دگرگشن با استفاده از روشهای متعارف و هاپلوئید



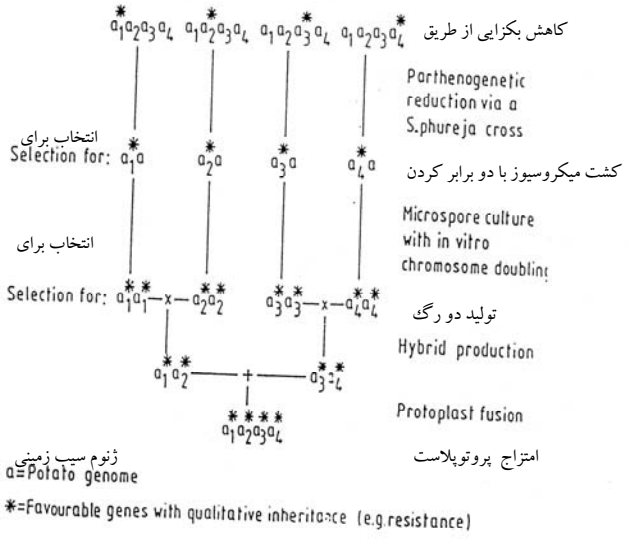




طرح اصلاحی افزایش کروموزوم گندم- چاودار

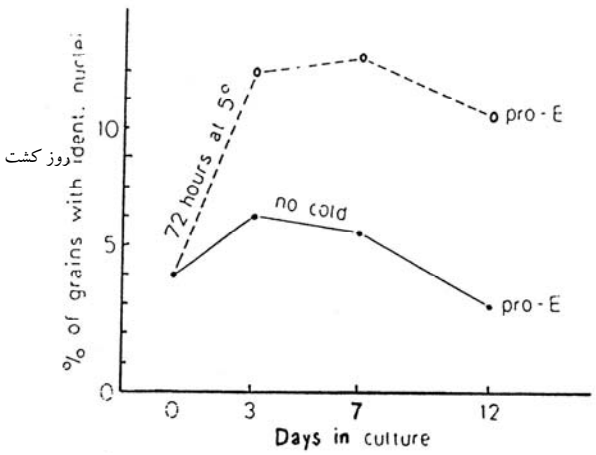


شکل ۸-۲- طرح اصلاحی جایگزینی گندم-چاودار



ژنهای مطلوب با وراثت کیفی (مثلاً مقاومت)

شکل ۹-۲- طرح اصلاح سیب زمینی با ترکیبی از تکنیکهای کشت بافت و روشهای متعارف اصلاح



شکل ۱۰-۲- اثر شوک سرما بر روی هسته

کشت جنین[1]

کشت جنین عبارت است از کاشت جنین‌های جدا شده از تخمک در حال رشد در مراحل مختلف رشد بذر. کشت جنین را به طور کلی می‌توان به دو قسم تقسیم کرد:

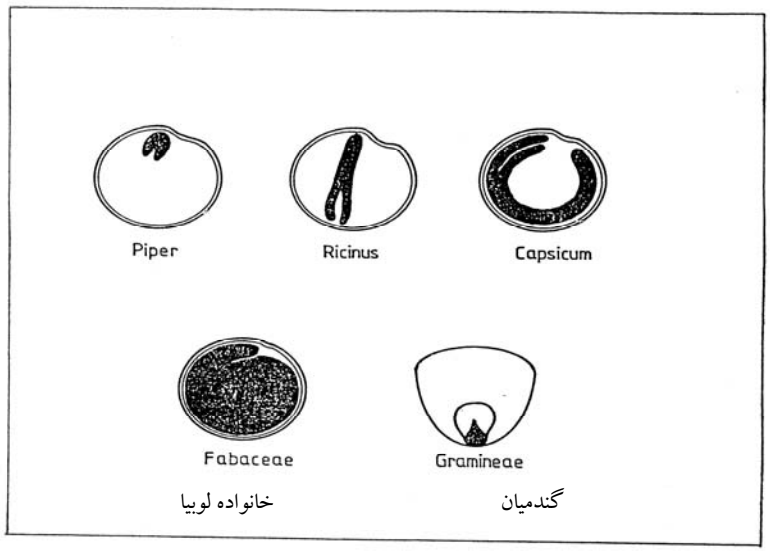
۱- **کشت جنین‌های نارس (نابالغ)[2]:** در این حالت جنین‌های نارس در مراحل اولیه رشد جنین‌زایی جدا شده و کشت می‌شوند. در محیط کشت چنین جنین‌هایی مواد غذایی بیشتری از قبیل ترکیبات متفاوت هورمونها، ویتامینها، اسیدهای آمینه و احتمالاً شیره آندوسپرم طبیعی مثل شیر نارگیل لازم است.

۲- **کشت جنین‌های رسیده (بالغ)[3]:** در این نوع کشت جنین، جنین‌های رسیده در مراحل آخر جنین‌زایی جدا می‌شوند. این جنین‌ها را می‌توان در محیط‌های کشت

---

[1] . Embryo culture
[2] . Pregerminal embryo culture = Immature
[3] . Postgerminal embryo culture= Mature

ساده نمکهای معدنی به اضافه یک منبع انرژی کشت نمود. نمونه‌هایی از جنین رسیده بذر گونه‌های متفاوت در شکل ۱۱-۲ آمده است.



Mature embryo in seed of different species

شکل ۱۱-۲- جنین رسیده بذر گونه‌های متفاوت

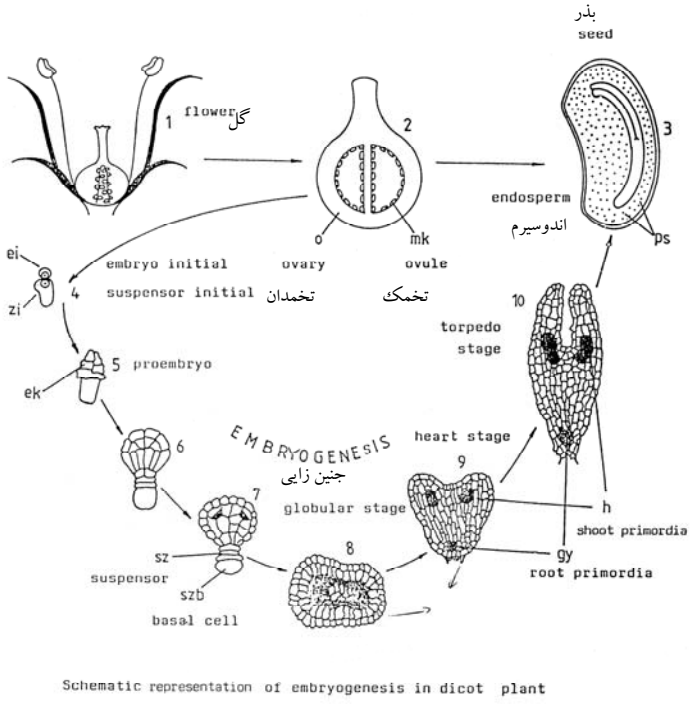
تاریخچه کشت جنین

اولین کشت جنین در سال ۱۹۰۴ توسط هانیگ[1] در گیاهان خانواده شب‌بو صورت گرفت. در سال ۱۹۲۵ اولین هیبرید بین گونه‌ای از طریق نجات جنین[2] و در تلاقی بین

[1] .Hannig
[2] . Embryo rescue

Linum perenne×*Linum austriacum* و توسط لای باچ[1] به وجود آمد. در سال ۱۹۴۵ راندولف[2] موفق به شکستن خواب بذر در گل Iris شد و در نتیجه دوره اصلاحی را از چندین سال به چندین ماه تقلیل داد. در سال ۱۹۷۰ کارتاکاو[3] موفق به تولید گیاهان هاپلوئید با استفاده از حذف کروموزوم[4] یا تکنیک بلبوزوم[5] گردید.

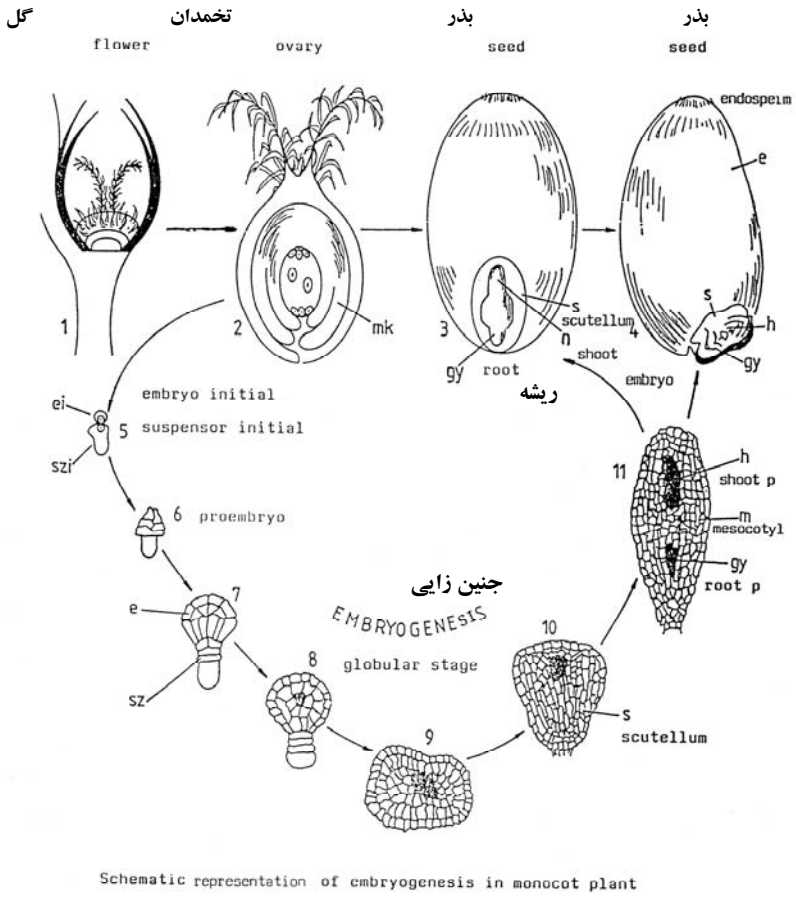
جنین‌زایی در گیاهان دولپه‌ای و تک‌لپه‌ای در شکلهای ۱۲-۲ و ۱۳-۲ آمده است.



شکل ۱۲-۲- جنین زایی در گیاهان دو لپه ای

---

[1] . Laibach
[2] . Randolph
[3] . Kartha- kao
[4] . Chromosome elimination
[5] . Bulbosum technique



شکل ۱۳-۲- جنین زایی در گیاهان تک لپه ای

روش کشت جنین

مواد لازم برای کشت جنین را می‌توان به صورت زیر خلاصه کرد:

۱- کربوهیدرات. ساکارز بهترین منبع انرژی است و حدود ۱۲-۸ درصد آن مناسب است زیرا دارای اسمولاریتی[1] بالایی است.

۲- محیط کشت بازی. می‌توان از همه محیط‌های کشت بازی که دارای نمکهای اصلی و عناصر نادر هستند استفاده کرد.

۳- منبع ازت. ازت آلی (گلوتامین) بهترین منبع نیتروژنی است.

۴- هورمونها. در بسیاری از موارد هورمونهای بیرونی[2] لازم نیستند. در کشت جنین‌های نارس از ایندول استیک اسید (IAA) و کینتین استفاده می‌شود.

۵- ویتامین‌ها برای کشت جنین‌های نارس اساسی نیستند اما در کشت جنین از ویتامینهای بیوتین، تیامین، اسید پانتوتنیک، اینوزیتول، پیریدوکسین و غیره می‌توان نام برد.

۶- شیر نارگیل منبع طبیعی تغذیه است.

۷- مواد تکمیلی. در کشت جنین‌های نارس در گونه‌های متفاوت از اسیدهای آمینه، هیدرولیزاتهای کازئین و ساکارز آندوسپرم برای تقویت رشد و نمو جنین‌های جوان[3] استفاده می‌شود.

---

[1] . Osmolarity
[2] . Exogenous
[3] . Proembryos

کاربرد کشت جنین

۱- کشت جنین‌های نارس[1]

الف- غلبه بر ناسازگاری (خودناسازگاری، دورگ‌گیری بین گونه‌ای و بین جنسی) بین جنین و بافت مادر

ب- تولید هیبریدهای بین گونه‌ای و بین جنسی به وسیله جلوگیری از عقیم شدن جنین در کشت جنین که اصطلاحاً نجات جنین نامیده می‌شود.

ج- تکنیک بلبوزوم- تولید گیاهان هاپلوئید به وسیله جلوگیری از عقیم شدن جنین هاپلوئید بعد از حذف کروموزوم در کشت جنین (شکل ۱۴-۲).

۲- کشت جنین‌های رسیده[2]

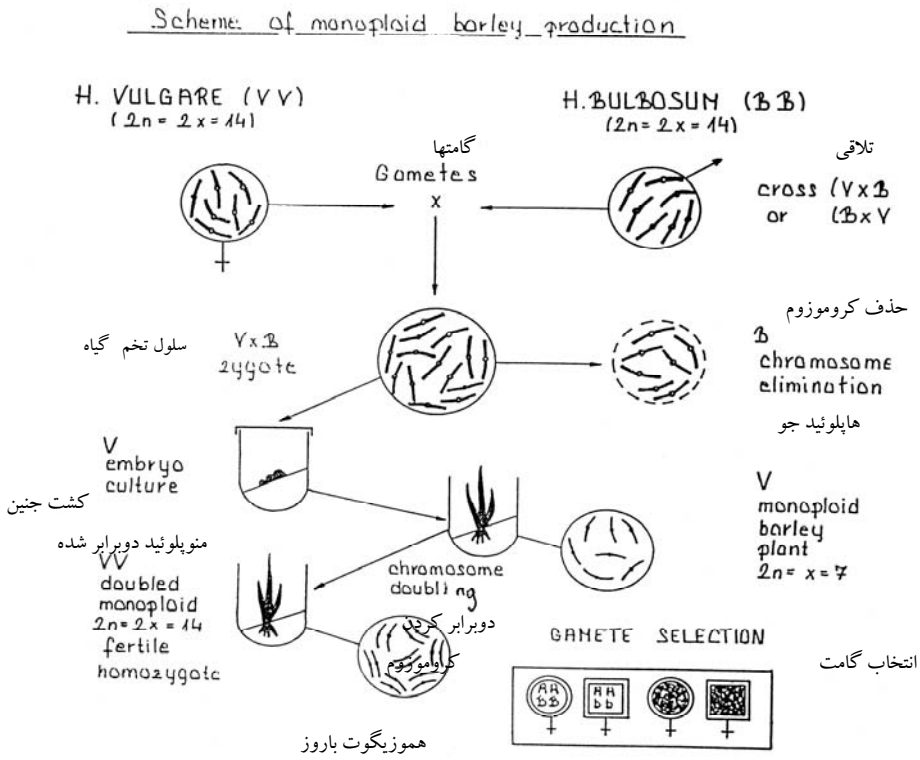
کوتاه کردن زمان اصلاح به وسیله شکستن خواب بذر توسط بازدارنده‌های درونی[3] در بذر.

اصول روش بلبوزوم تکنیک

در این روش دو گونه جو به نامهای *Hordeum vulgare* به عنوان والد مادری و *Hordeum bulbosum* به عنوان والد پدری با یکدیگر تلاقی داده می‌شوند. از زیگوت بدست آمده کروموزومهای *H. bulbosum* به سرعت از سلولهای در حال رشد جنین حذف می‌شوند. آندوسپرم برای مدت ۲ تا ۵ روز رشد می‌کند و سپس عقیم می‌شود. رشد نسبتاً کند سلولهای منوپلوئید و عقیم شدن آندوسپرم سبب می‌شود که جنین را جدا کنیم و در شیشه کشت نماییم (شکل ۱۴-۲).

---

[1] . Pregerminal culture
[2] .Postgerminal culture
[3] . Endogenous



شکل ۱۴-۲- تولید جو منو پلویید با روش بلبوزوم

گرده‌افشانی و لقاح در شیشه[1]

گرده‌افشانی و لقاح تخمدان یا تخمک کشت شده در شرایط استریل و کنترل شده و رشد بذر در لوله آزمایش را گرده‌افشانی و لقاح در شیشه گویند. این روش برای اولین بار در سال ۱۹۶۴ توسط ماهش واری- کانتا[2] در دهلی در گیاهان خانواده Solanaceae و Papaveraceae به صورت موفقیت آمیزی انجام شده در سال ۱۹۶۷ رانگاس وامی[3] در هند از این روش استفاده کرد و بر خودناسازگاری گیاه

[1] .In vitro pollination and fertilization
[2] . Maheshwari- kanta
[3] . Rangaswamy

Patunia axillaries غلبه نمود. در سال ۱۹۸۰، زنـک تلـر[1] در لهـستان از ایـن روش استفاده نمود و موفق به تولید جنین‌هـای هیبریـد در تلاقـی Melandrium × Silene گردید.

مهمترین نکاتی که باید هنگام استفاده از این روش مورد توجه قرار داد را می‌تـوان به شرح زیر خلاصه نمود:

۱- گونه‌ها، بایستی دارای تخمدان بزرگ باشند.

۲- تخمدان باید تعداد زیادی تخمک داشته باشد.

۳- تخمکها دارای قابلیت زیست باشند.

۴- تخمکها باید در مرحله مناسبی از رشد کشت شوند.

۵- جوانه زدن دانه گرده و نیز رشد لوله‌های گرده در شیشه امکان‌پذیر باشد.

۶- لوله‌های گرده را در داخل کیسه‌های جنین وارد کرد.

۷- محیط غذایی و شرایط کشت برای لقاح و رشد بذر و جنین مناسب باشد.

مراحل مختلف این تکنیک به شرح زیر است:

۱- جمع‌آوری گرده در شرایط ضدعفونی‌شده از طریق جمع‌آوری بساکهای آماده و یـا در حال شکوفا شدن.

۲- جداسازی جفت و تخمکها در شرایط ضدعفونی یک روز قبل از شکفتن گلها.

۳- شکوفا شدن بساکها در روی یـک مـاده زمینـه‌ای مناسـب (سابـسترات) و جـایگزین شدن گـرده‌هـای بدسـت آمـده در محـیط ضـدعفونی بـر روی تخمکهـا، کلالـه یـا کاغذهای صافی.

الف- در گرده‌افشانی و لقاح در شیـشه، دانـه گـرده بـر روی محـیط کـشت جوانـه می‌زند.

---

[1] . Zenkteller

ب- در گرده‌افشانی و لقاح در جفت[1]، دانه گرده بر روی جفت یـا تخمـک جوانـه می‌زند.

ج- در گرده‌افشانی و لقاح در لوله آزمایش، دانه گرده از قبل جوانه‌دار می‌شود.

۴- انتقال تخمکهای لقاح یافته به محیط کشت مناسب برای به وجود آمدن بذر.

این تکنیک روش مؤثری برای اصلاح‌کنندگان نبات با توجه به دلایل زیر است:

۱- از طریق عوامل زیر سبب غلبه بر موانع تلقیح‌پذیری[2] می‌شود.

الف- هماهنگی بین تاریخ گلدهی والدین.

ب- کوتاه بودن طول عمر دانه گرده.

ج- ممانعت از جوانه زدن دانه گرده.

د- رشد کند لوله گرده.

هـ- بازداشتن و یا ترکیدن لوله گرده در خامه که در نتیجه لوله گرده نمـی‌توانـد بـه تخمکها برسد.

۲- رویانیـدن دورگهـای بـین‌گونـه‌ای و بـین جنـسی در تلاقیهـای *Melandrium album* × *Melandrium rubrum* و *Melandrium album* × *Silence Schafta*.

۳- حذف نواحی خودناسازگار در بافتهای مادگی گل *Petunia axillaries*.

۴- تشکیل گیاهان هاپلوئید *Mimulus lutens* با استفاده از تخمک گرده‌افشانی شده با گرده *Torenia fournieri*.

کلیات کاربرد کشت بافت گیاهی در بیماری شناسی گیاهی

امروزه کاملاً مشخص شده اسـت کـه امکـان کـاربرد کـشت درشیـشه گیاهـان در بیماری شناسـی گیاهـان وجـود دارد (اینگـرام،۱۹۷۳؛ اینگـرام وهلجـسون،۱۹۸۰؛ میلـر،

---

[1] .Placental
[2] . Crossability

۱۹۸۵؛ وود، ۱۹۸۵). اگر از کشت پروتوپلاست سلول و کالوس استفاده شود، باید در نظر داشت که این کشت‌ها، ممکن است از جنبه‌های مختلفی (فیزیولوژیکی و یا گاهی اوقات ژنتیکی) با کشت گیاهان کامل، متفاوت باشند.

زمینه‌هایی که امکان استفاده از کشت درشیشه در بیماری‌شناسی گیاهی وجود دارد، به شرح زیر است (اینگرام وهلجسون، ۱۹۸۰؛ میلروماکسول، ۱۹۸۳؛ میلر،۱۹۸۵؛ وود،۱۹۸۵):

۱- بدون شک، یکی از مهم‌ترین کاربردهای عملی کشت این‌ویترو در بیماری‌شناسی گیاهی، تولید گیاهان عاری از ویروس، قارچ و باکتری می‌باشد.

۲- کشت درشیشه و پارازیت‌ها و میزبان‌ها در شرایط کنترل شده وحذف پارازیت‌های نامطلوب، فواید زیادی دارد. همچنین امکان مطالعه مؤثر ارتباط متقابل بین پارازیت و میزبان، در شرایط درشیشه، وجود دارد. به عنوان مثال، اضافه کردن و حذف ترکیبات نشان‌دار به سادگی امکان پذیراست، تنها تعداد معدودی از سلول‌های میزبان، جهت آزمایش، مورد نیاز هستند، ایجاد تغییر در رابطه با ارتباط پارازیت میزبان به راحتی از طریق تغییر در محیط کشت، امکان‌پذیر است. به طوری که تعداد سلول‌های میزبان و اندازهٔ ماده تلقیحی را می‌توان کنترل کرد، و تلقیح بدون ایجاد زخم نیز امکان‌پذیر است.

۳- با استفاده از کشت درشیشه، رفتار ویروس‌ها در سلول‌ها یا بافت‌های گیاهی، بهتر بررسی می‌شود. این رفتارها، شامل چگونگی ورود ذرات ویروس به پروتوپلاست یا سلول و ایجاد آلودگی، چگونگی تکثیر ویروس‌ها در پروتوپلاست‌ها و سلول‌ها، چگونگی واکنش میزبان به آلودگی ویروسی، نحوهٔ حرکت ذرات ویروس از سلولی به سلول دیگر، می‌باشند (میلدبرانت،۱۹۷۷؛تاکب،۱۹۷۶؛ وود،۱۹۸۵).

این حقیقت که ورود ذرات ویروس به پروتوپلاست بسیار آسان‌تر از ورود آنها به سلول می‌باشد، باعث شده است که از پروتوپلاست، به عنوان یک سیستم مدل، جهت تشخیص اثرات متقابل بین ویروس و گیاهان عالی، در سطح سلولی، استفاده شود.

۴- نماتدشناسی: کشت درشیشه، همچنین به طور مکرر، در تحقیقات مربوط به نماتد، مورد استفاده قرارگرفته است (کارسبرگ و بابینو،۱۹۷۹).

۵-گال طوقه: متخصصین کشت بافت، مدت‌های زیادی علاقه‌مند به کشت درشیشه بافت‌هایی به نام گال طوقه، بوده‌اند. برون در سال۱۹۷۴ در کتابچه راهنمای خود، اطلاعات جامعی در ارتباط با اگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) ارائه نمود. این باکتری در بافت‌های گیاهی بدون نیاز به اکسین و یا سیتوکینین، سبب القای رشد، می‌گردد. در گیاهان دولپه، سلول‌های گیاه، پس از آلودگی، به طور مستقیم رشد کرده و شروع به تقسیم سلولی کنترل نشده، می‌نمایند. ایجاد آلودگی (تلقیح) با این گونه اگروباکتریوم، بدون اضافه کردن این مواد تنظیم کننده می‌تواند منجر به تشکیل ریشه‌ها (همان طور که در مورد افزودن اکسین مشاهده می‌شود) یا اندام‌های هوایی(همان طور که در مورد افزودن سیتوکینین مشاهده می‌شود) گردد. در چند سال گذشته *A.tumefaciens* نقش بسیار مهمی در دست کاری ژنتیکی با استفاده ازDNA نوترکیب، ایفا نموده است. از طریق پلاسمید Ti این باکتری، می‌توان ژن‌های دلخواه را که در گیاه توانایی بروز دارند و قابل انتقال به نتاج بعدی هستند، به گیاه مورد نظر انتقال داد. شیلپروت (۱۹۷۴) اخیراً بررسی منابع جامعی در ارتباط با مواد بی‌شماری که امکان دست کاری ژنتیکی با استفاده از *A.tumefaciens* وجود دارد، منتشر کرده است.

نهایتاً باید در نظر داشت که تحریک ایجاد گال یا غده، منحصر به A.tumefaciens نیست (توماس ودیوی،۱۹۷۵) بلکه این کار، به روش‌های زیر نیز امکان‌پذیر است:

الف- استفاده از *Agrobacterium rhizogenes*

ب- ویروس‌های مولد زخم

ج- با استفاده از تلاقی، اگر دو گونه *N.langsdorffii* و *Nicotiana glauca* با یکدیگر تلاقی داده شوند، ضمن این که هیچ کدام از گیاهان والد تولید تومور نمی‌کنند، در نتایج حاصل از تلاقی آنها اندام‌هایی به نام تومورهای ژنتیکی ایجاد می‌شود.

۶- از القای موتاسیون، می‌توان جهت به دست آوردن گیاهان مقاوم به بیماری، استفاده نمود.

- حمل ونقل مواد گیاهی عاری از بیماری

از آنجا که امروزه گیاهان عاری از بیماری، به راحتی توسط کشت مریستم و تکثیر در درشیشه به دست می‌آیند، سؤالاتی در مورد انتقال مطمئن این مواد عاری از بیماری (صادرات، واردات و انتقال تحت شرایط ضدعفونی شده) مطرح می‌شود. اخیراً دو مقاله (خان،۱۹۸۶؛ پارلی من،۱۹۸۶) قوانین مربوط به قرنطینه وحمل و نقل بین‌المللی گیاهان حاصل از کشت بافت را مورد بررسی قرارداده‌اند. آنها در مورد موضوعات زیر، بحث نموده‌اند:

۱- اصول و قوانین قرنطینه

۲- راه‌های طبیعی ومصنوعی معرفی(ورود)گیاهان خارجی

۳- آنالیز ریسک- آفت و روش‌های حفاظتی

۴- کشت بافت، به عنوان یک روش حفاظتی

انتقال مواد گیاهی عاری از بیماری، هم برای کشورهای صادرکننده، و هم برای کشورهای وارد کننده، مهم است. اگر صادرکنندگان، عاری از بیماری بودن گیاهان حاصل از این‌ویترو را تضمین کنند؛ و واردکنندگان، این موضوع را تأیید نمایند،

مشکلات کمی به وجود می‌آید. حذف کامل خاک به عنوان منبع آلودگی‌های نامطلوب، مثل جانوران یا میکروارگانیسم‌ها، بسیار مهم است.

تأیید این که کشت درشیشه، واقعاً عاری از همهٔ آلودگی‌های داخلی می‌باشد، به سادگی امکان‌پذیر نیست. با توجه به این که انتقال ممکن است چند روز طول بکشد (مثلاً هلند به استرالیا)، به احتمال بسیار زیاد، آلودگی، توسط ادارات قرنطینه، مشاهده خواهد شد؛ مگراین که:

۱- در زمان انتقال، از وسایل سردکننده، استفاده شود.

۲- مواد آنتی بیوتیک، به محیط کشت، افزوده شود.

۳- زغال فعال، به محیط کشت، اضافه شود.

بنابراین، با توجه به نکات فوق، ممکن است نتایج زیر، حاصل شود:

۱- تنها کشت هایی که آلودگی داخلی دارند، وارد می‌گردند.

۲- تنها راه حصول اطمینان از عاری بودن مواد گیاهی از بیماری، آزمایش برای آلودگی داخلی، می‌باشد.

۳- تست ویروس، جهت اطمینان کامل از عدم آلودگی مواد گیاهی به ویروس‌های شناخته شده، ضروری است.

۴- علی رغم همهٔ احتیاط‌ها، هنوز امکان آلوده شدن، وجود دارد. یکی از مهم‌ترین دلایل سرایت آلودگی در حمل و نقل هوایی، تغییر ناگهانی فشار داخل کانتینرها هنگام پرواز و یا فرودآمدن هواپیما می باشد (ترنر،۱۹۸۳).

واکنش‌های گستردهٔ جهانی، منجر به پذیرفته شدن این اصل گردید که تنها گیاهان سالم(عاری از بیماری) قابل انتقالند. با این وجود، مأمورین قرنطینه استرالیا، هنوز نیاز به اجرای شرایط زیادی دارند،که برخی از آنها، عبارتند از:

۱- گیاهان کشت شده در شرایط این‌ویترو نیز، نیاز به مجوز ورود دارند.

۲- تعدادی از گیاهان مثل میخک، داودی، شمعدانی عطری (Pelargonium) وتوت فرنگی را فقط می‌توان از منابع مجاز تهیه کرد، که تأییدیه عاری بودن از بیماری نیز همراه آن باشد (آنونیموس، ۱۹۸۰).

۳- ظروف پلاستیکی و شیشه‌ای و همین‌طور آگار، باید شفاف بوده و کدر نباشد، تا امکان بازرسی و مشاهدهٔ داخل آنها، وجود داشته باشد.

۴- اگر ساپروفیت‌ها (که لزوماً بیماری‌زا نیستند) در مواد وارد شده وجود داشته باشد، دلالت براین نکته دارد که این مواد، احتمالاً عاری از بیماری نیستند.

۵- نباید برای جلوگیری از ظاهر شدن میکروارگانیسم‌ها، مواد آنتی بیوتیک، به محیط کشت، اضافه شده باشد.

۶- در صورت لزوم، ممکن است برخی از مواد منتقل شده، بیش از پنج روز در قرنطینه بمانند.

۷- لوله‌های آزمایش، ظروف پلاستیکی و غیره، باید به دقت مهروموم شوند. شرایط خاصی نیز برای بستن لوله‌های آزمایش وجود دارد.

۸- اگرحشرات زنده در یک محموله (مثلاً در بسته‌بندی) مشاهده شوند، تمام محموله، حتی کشت‌های این‌ویترو ضدعفونی خواهد شد.

۹- به منظورتعیین وجود آنتی بیوتیک‌ها و میکروارگانیسم‌ها، نمونه‌گیری‌ها، در طول زمان انجام می‌گیرند.

مثال‌هایی از گیاهانی که به صورت عاری از بیماری منتقل شده‌اند، عبارتنداز: مارچوبه (خان،۱۹۷۶) و مرکبات (باتون،۱۹۷۷).

کاربردکشت بافت گیاهی در تولید شیمرها

در مورد القای شیمرها توسط کشت این‌ویترو، منابع زیادی وجود ندارد. از آن جا که در گذشته، مخصوصاً هنگام کارکردن با گیاهان باغی، تصور می‌شد که شیمرها در نتیجه پیوند به وجود می‌آیند (گیاهان حاصل هیبریدهای پیوندی، نامیده می‌شدند) پیش

بینی می‌شد که شیمرها به همین طریق در این‌ویترو به دست آیند، ولی چنین چیزی صادق نیست.

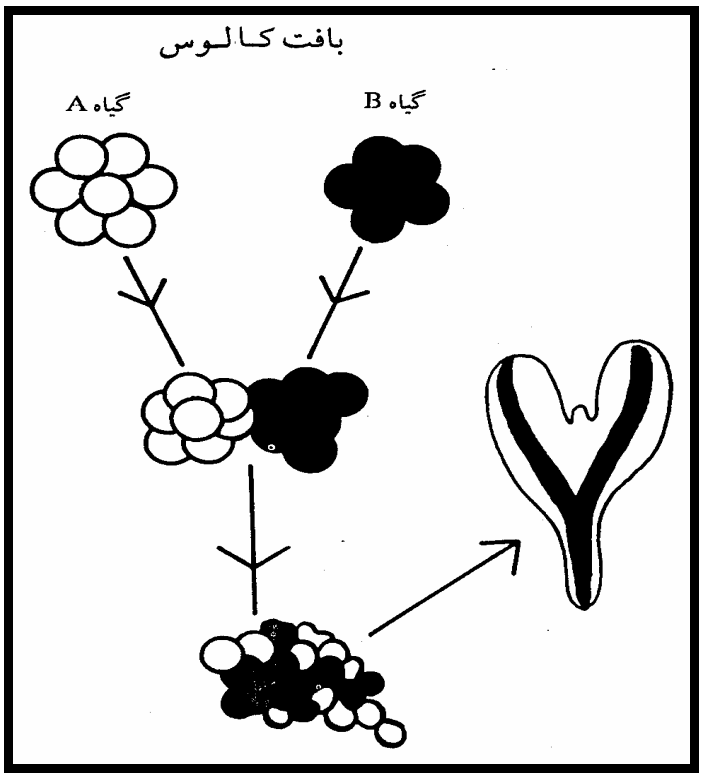
کارلسون و چالف(۱۹۷۴) برای اولین بار، تشکیل شیمر در این‌ویترو را تشریح کردند. با تشکیل اندام‌های هوایی نابجا در کالوس توتون(*Nicotiana tabacum*) و کالوس *N.langsdorffii×N.glauco* در بین ۷۰۰۰ گیاه، ۲۸ شیمر تولید شدند. همچنین مشاهده شد که شیمر کلروفیلی از کالوس توتون، به وجود می‌آید (احتمالاً جهش یافته) هستند. اکثر کالوس‌های موزاییک باعث تشکیل پروتوکلون (کلونی که از یک پروتوپلاست یا امتزاج پروتوپلاست حاصل شده باشد) و مخلوطی از پروتوکلون‌های طبیعی و تغییر یافته، می‌شوند پس از تشکیل غده در گیاهان تولید شده، آنها انواع جدیدی از گیاهان را مشاهده نمودند که احتمالاً حاصل پدیدهٔ شیمری بوده، و حداقل در برخی موارد نشان دهندهٔ وجود شیمر، بود.

مارکوتریگیانو وگویین(۱۹۸۴aو۱۹۸۴) تشکیل آزمایشی شیمر در تنباکو را به روشی کاملاً متفاوت با روش کارلسون وجالف (۱۹۷۴) تشریح کردند. مارکوتریگیانو وگویین (۱۹۸۴aو۱۹۸۴) کالوس شیمری را با مخلوط کردن سوسپانسیون سلولی که شامل مخلوطی از سلول‌ها (کلروفیلی و سفید) بود به دست آوردند. این سوسپانسیون‌های سلولی، به ترتیب از لپه‌ها، هیپوکوتیل‌ها، سلول‌ها و سوسپانسیون‌های سلولی سبز و سفید، به دست آمده بودند. هنگامی که کالوس‌های شیمری جهت تشکیل اندام‌های هوایی نابجا تحریک شدند، از مجموع ۱۳۲۱ گیاه، تنها ۴ شیمرحاصل شد. آنها منشأ شیمرها را به شرح زیر، توصیف نمودند:

۱- ناشی از روش‌های آزمایشی: مخلوط کردن دو نوع سوسپانسیون سلولی و سپس ایجاد شاخه‌های نابجا از بیش از یک سلول(شکل۱۵-۲).

۲- ناشی از موتاسیون اتفاقی(خودبخودی) که غالباً در کشت بافت، صورت می‌گردد. این توضیح را مسلماً نمی‌توان حذف نمود، چون در گیاهان آلبینو(شاهد) نیز که از سلول‌های سفید تشکیل شده‌اند، گاهی اوقات، قطعات سبز دیده می‌شود.

می‌توان نتیجه‌گیری نمود که امکان تشکیل شیمرها به کمک کشت این‌ویترو، وجود دارد، اگرچه این مسأله در کشاورزی و باغبانی اهمیت چندانی ندارد. سؤال باقی مانده، این است که آیا تشکیل شیمرهای گیاهان زینتی در این‌ویترو در سطح تجارتی مطلوب و یا امکان‌پذیر است؟



شکل۱۵-۲: شمایی از چگونگی تولید شیمر، بعد از مخلوط شدن بافت‌های کالوس دو گیاه.

- تفکیک شیمرها، و ایزوله کردن موتانت‌ها

توضیحات متفاوتی، در ارتباط با علت غیریکنواختی ژنوتیپی سلول‌ها، گاهی اوقات بافت‌ها، لایه‌ها و یا بخش‌های سلولی، در برخی گیاهان، وجود دارند:

۱- شیمرها، بدون شک، یکی از مهم‌ترین دلایل می‌باشند. دو نوع شیمر، قابل تشخیص هستند:

الف- شیمرهای لایه‌ای (Periclinal chimeras) که در آن، بافت‌هایی که از نظر ژنوتیپی یا سیتوپلاسمی متفاوتند، در لایه‌های متحدالمرکز، قراردارند.

ب- شیمرهای قطاعی (Sectorial chimeras)

۲- درحین تقسیم سلولی، گاهی اوقات در اثر اشتباه، امکان تشکیل سلول‌های جهش یافته وجود دارد، که ممکن است باقی مانده و تقسیم شوند، و یا از بین بروند.

۳- تولید به صورت اتفاقی(خودبخودی) و یا القای موتاسیون در سلول‌های موتاسیون یافته و تولید اتفاقی از قسمت‌های موتاسیون یافته گیاه.

تفکیک شیمرها به انواع سلول‌های تشکیل دهندهٔ آنها و یا ایزوله کرن موتانت‌ها، غالباً مطلوب است.

تفکیک شیمرها

دامرگیوس و گیلوت(۱۹۷۳) و جانسون(۱۹۸۰) نشان دادند که ارقام میخک وایت سایم وجکولین سایم(شیمرهای لایه‌ای) در این‌ویترو قابل تفکیک هستند. اساس این تفکیک، تشکیل شاخه‌های نابجا از یک لایه سلولی است. شیمرهای موجود در گل داوودی (بوش و همکاران،۱۹۷۶)، *Vitris vinifera* (اسکین وبارلاس،۱۹۸۳)، گل اطلسی(پلیتر و دلیس۱۹۶۹؛ بینو و همکاران،۱۹۸۴) و نوعی فرفیون (*Euphorbia pulcherrima*) (پریل و انگل حارت،۱۹۸۲) نیز به کمک کشت این‌ویترو، تفکیک شده‌اند. کامیا(۱۹۷۵) از ایزوله کردن پروتوپلاست‌های شمعدانی معطر شیمر یک گیاهان آلبینو و سبز، تولید نمود، و نشان داد که همچنین می‌توان از رشد پروتوپلاستها،

در تفکیک شیمرها استفاده نمود. سینی و نانام (۱۹۸۱) با استفاده از یک گوجه‌فرنگی هتروزیگوت شیمر شده (با مناطق سبز، زرد متمایل به سبز و سفید) نشان دادند که در اثر تشکیل شاخه‌های نابجا ژنوتیپ‌های معمولی (غیرشیمریک) تولید می‌شوند. با این روش، امکان برطرف کردن صفات شیمریک در گوجه‌فرنگی، با استفاده از تشکیل شاخه‌های نابجا و انتخاب ژنوتیپی با فعالیت فتوسنتزی بیشتر وجود دارد. در روش‌های متداول اصلاح نباتات، امکان انتخاب مؤثر ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی با کارآیی فتوسنتزی بالاتر، وجود ندارد؛ زیرا ظرفیت فتوسنتزی، مربوط به کلروپلاست‌ها می‌باشد، که فقط توارث مادری دارند. باید در نظر داشت که انتقال صفات قابل توارث موجود در سیتوپلاسم توسط سیبریداسیون(Cybridization) نیز امکان‌پذیراست.

ایزوله کردن موتاسیون‌ها

گاهی اوقات، موتاسیون‌ها به طور طبیعی اتفاق می‌افتند، که اگر مطلوب باشند (مثل رنگ جدیدی از یک گل) می‌توانند ایزوله شوند. بخش موتاسیون یافته گیاه، غالباً به حدی کوچک است که امکان تهیه قلمه از آن در شرایط در یوزه، وجود ندارد. این مسأله را میتوان در مورد *Kalanchoe blossfeldiana* توضیح داد (کارپر و پیریک،۱۹۸۱). در ارقام مختلف این گونه، گاهی اوقات از گل‌آذین به طور اتفاقی، گل‌های جهش یافته به وجود می‌آیند. اکنون که چگونگی تولید گیاهان در شرایط این-ویترو مشخص شده است، امکان ایزوله کردن قطعات کوچک جهش یافته بافت‌ها و تولید یک گیاه جهش یافته از آن، وجود دارد. کارپروپریک(۱۹۸۱) چگونگی بدست آوردن ارقام جدید را به این روش نشان داده‌اند.(شکل ۱۶-۲). به همین ترتیب، امکان ایزوله کردن موتانت‌هایی که تنها در بخش محدودی قرار دارند، وجود دارد. مثال دیگری در مورد ایزوله کردن موتانت‌ها، توسط نیکل(۱۹۷۳) ارائه شده است. وی با استفاده از نیشکر در کشت کالوس و کشت سوسپانسیون، نشان داد که انواع سلول‌های

تغییر یافته، وجود دارند. نیکل، با کشت سلول، قادر به ایزوله کردن لاین‌های مختلف سلولی شد، و گیاهانی با تعداد کروموزوم متفاوت، تولید نمود.

شکل۱۶-۲: قسمتی از گل آذین موتانت عنابی رنگ حاصل از ***Kalanchoe blossfeldiana***

تولید گیاهان تتراپلویید و تریپلویید، القای حذف کروموزومی

۱- دو برابر کردن تعداد کروموزوم‌ها که گاهی اوقات در اصلاح نباتات بسیار مطلوب است، معمولاً با استفاده از کلشی‌سین، صورت می‌گیرد. این ماده، یک آلکالویید است که از یک گیاه پاییزه به نام *Colochicum autumnale* گرفته می‌شود. برای این کار، بذر، انتهای شاخه یا قلمه، در محلول کلشی سین، فرو برده می‌شود. اغلب انجام این روش در شرایط دریوزه، منجر به ایجاد سیتوشیمر (Cytochimeras) می‌شود (هرمز و همکاران، ۱۹۸۱). استفاده از روش‌های این‌ویترو، ممکن است تشکیل شیمرها را به طور مؤثری کاهش دهد.

جدول۱-۲- کاربرد کلشی سین(برای دوبرابر کردن کروموزوم) در گیاهان و اندامهای مختلف

گونه گیاهی	مواد مورداستفاده	غلظت٪ (وزنی به حجمی)	منبع
Valeriana wallichii	کشت سلول	۰/۰۵تا۰/۲	چاوادج و بکر (۱۹۸۴)
گونه های *Vaccinium*	شاخه ها	۰/۰۱تا۰/۲	لیرن(۱۹۸۴)، پری و لیرن(۱۹۸۴)، گلدی و لیرن(۱۹۸۴)
Aranda	نوک شاخه	۰/۰۵تا۰/۰۷۵	لی ومور(۱۹۸۳)
هیبریدهای*Phalaenopsis*	نوک شاخه	۰/۰۵	گریس بچ(۱۹۸۱)
Saccharum officinale	سوسپانسیون سلولی	۰/۰۱	لیووشانگ(۱۹۷۴)، نیکل(۱۹۷۳)
هیبریدهای *Dendrobium*	پیش غده	۰/۰۱تا۰/۰۵	وجرابهایاوچایکارون (۱۹۷۴)
گونه‌های تمشک	شاخه ها	۰/۰۲تا۰/۰۸	گوپتون(۱۹۸۶)
Atractylodes lancea	شاخه ها	۰/۳	هراوکا(۱۸۸۶)

کلشی سین، ابتدا در آب حل می‌شود، و چون به گرما حساس است؛ جهت استفاده در درشیشه، باید به روش فیلتر کردن استریل شود (گریس‌بچ،۱۹۸۱). دراستفاده از کلشی سین، بایستی نه تنها به غلظت مورد استفاده، بلکه به زمان عمل نیز توجه خاصی داشت. در تیمارهای طولانی مدت، می‌توان غلظت کم کلشی سین را به کار برد، در حالی که برای تیمارهای کوتاه مدت، بایستی از غلظت‌های بالاتر استفاده کرد (پری و لیرن،۱۹۸۴). غلظت کلشی سین، بین ۰/۰۱تا ۰/۳ درصد(وزنی به حجمی) متغیر است (به جدول ۱-۲ مراجعه شود). دو برابر نمودن کروموزوم‌ها، همان طور که ونزل و فروغی وهر(۱۹۸۴) در سیب زمینی مونوپلوییدمشاهده کرده‌اند، همیشه به سادگی امکان‌پذیر نیست. با این وجود، با کاربرد کلشی سین در سیب زمینی دیپلوییدمشکلی ایجاد نمی‌شود.

۲- تتراپلوییدها، غالباً پس از تشکیل شاخه‌های نابجا و بدون استفاده از کلشی-سین، به وجود می‌آیند. و توضیح احتمالی در مورد تولید این تتراپلوییدها، وجود دارد:

- درگیاه دیپلویید، به طور طبیعی، سلول‌های تتراپلویید وجود دارند، که امکان به دست آمدن تتراپلوییدهای کامل(نه شیمریک) از آنها وجود دارد؛ چون تشکیل شاخه‌های نابجا، معمولاً از یک سلول، صورت می‌گیرد.

- در تشکیل شاخه‌های نابجا در درشیشه اندومیتوز(جدا نشدن کروموزوم‌ها پس از تقسیم سلولی) می‌تواند انجام شود(احتمالاً در اثر استفاده از سیتوکینین) و منجر به تشکیل تتراپلوییدها شود.

تعدادی از گیاهانی که در آنها پس از تشکیل شاخه‌های نابجا، دو برابر شدن کروموزوم‌ها اتفاق می‌افتد، عبارتنداز:

توتون(*Niciotiana tabacum*)	موراشی وناکانو(۱۹۶۶)
توتون رقم سامسون	دولیو(۱۹۷۲)
Brassica oleracea	هوراک وهمکاران (۱۹۷۵)
هویج(*Daucus carota*)	دودیتس وهمکاران(۱۹۷۶)
هیبریدهای *Dendrobtium*	وجرابهایا(۱۹۷۷)
Kalanchoe (شکل ۱۷-۲)	پیریک و کارپر (منتشر نشده)
هیبریدهای Lolium- Festuca	ریبزنسکی و همکاران(۱۹۸۳)
سیب زمینی(*Solanum tuberosum*)	کارپ و همکاران(۱۹۸۴
هیبریدهایSolanum	هرمز و همکاران(۱۹۸۱)

۳- امکان تولید پلی‌پلوییدها، پس از انجام هیبریداسیون سوماتیکی، وجود دارد. به عنوان مثال، از امتزاج هسته دو پروتوپلاست دیپلویید با یکدیگر، یک تتراپلویید تشکیل می‌شود.

۴- دو برابر کردن کروموزوم‌ها در هاپلوییدها، کوکر و همکاران(۱۹۷۱) و نیچ و همکاران(۱۹۶۹a) نشان دادند که دیپلوییدها به‌طور اتفاقی، در گیاهان هاپلویید تنباکو، ایجاد می شوند. کاسپرباوئر و کالینز (۱۹۷۲) قلمه‌هایی از رگبرگ میانی برگ تنباکوی هاپلویید ایزوله، پس از تشکیل شاخه‌های نابجا، ایجاد شدند. نکته قابل توجه، این است که این مسأله، فقط در برگ‌های جوان، اتفاق می‌افتد. همچنین، روشن است که امتزاج هسته‌ها در اولین مرحله تقسیم دانه گرده، می‌تواند منجر به دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌ها شود.

۵- یک تریپلویید را غالباً می‌تون از تلاقی یک دیپلویید با یک تتراپلویید، به دست آورد. تریپلوییدها (معمولاً عقیم) می‌توانند بسیار مورد توجه متخصصین اصلاح نبات باشند. در روش درشیشه، می‌توان با تولید شاخه از آندوسپرم تریپلوییدی را به دست آورد.(زهری و بوجوانی،۱۹۷۷).گیاهان کاملاً تریپلویید با منشأ آندوسپرم در *Actinidia chinensis*، *Citrus grandis*، *Putranjiva rhoxburghii*، گلابی(*Pyrus malus*) و *Santalum album* به دست آمده‌اند(بوجوانی، ۱۹۸۴).

۶- روت ولارک(۱۹۸۴) اخیراً نشان دادند که اضافه کردن ایزوپروپیل-ان(۳-کلروفنیل)کربامات می‌تواند منجر به حذف کروموزوم‌ها شود، این ماده، پس از حل شدن در DMSO به سلول‌های سویا (*Glgcline max*) اضافه شده، و در نتیجه، بخشی از سلول‌ها، هاپلویید شده است.

شکل۱۷-۲: سمت چپ گیاه تترا پلوئید* Kalanchoe blossfeldiana. *گاهی اوقات تشکیل ساقه نابجا از قلمه برگ این گیاه تترا پلوئید، تولید اکتا پلوئید(سمت راست) می‌نماید. از ۱۳۰ گیاه به دست آمده به این روش، ۸ گیاه اکتا پلوئید بوده است (پیریک، کارپر و استیگمنز، داده‌های منتشر نشده).

القای موتاسیون در شرایط این‌ویترو

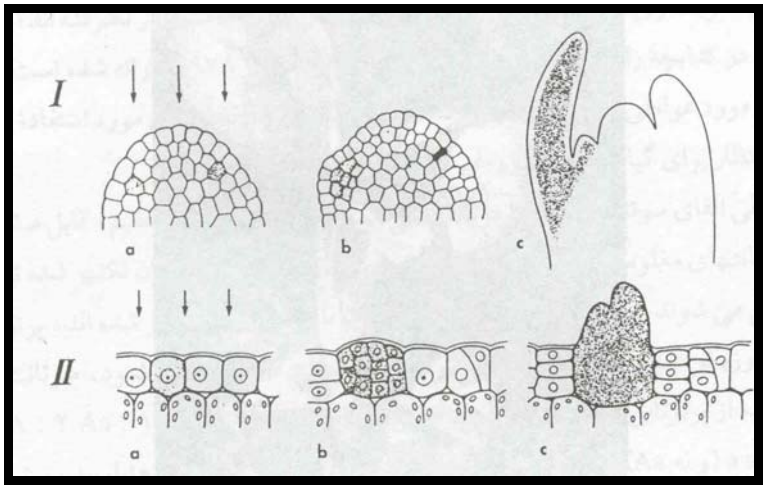
اگر بذر یا بخش‌هایی از گیاه، به همراه جوانه و گیاهان کامل، جهت به دست آوردن موتانت‌ها، پرتوتابی شوند (در معرض پرتوهای یونیزه، قرارگیرند) غالباً شیمرها، تشکیل می‌شوند. علت ایجاد شیمرها، این است که مریستم پرتو دیده (با سلول‌های جهش یافته، و غیرجهش یافته) دست نخورده باقی می‌ماند (شکل ۱۸-۲) و یک گیاه، از تنها یک سلول جهش یافته، به وجود نمی‌آید. شیمرها به جز موارد اندکی، در اکثر موارد برای متخصصان اصلاح نبات، نامطلوب هستند.

القای موتاسیون، با استفاده از مواد شیمیایی (اتیل متان سولفانات، کلشی سین) و یا موتاژن‌های فیزیکی (پرتوهای گاما، اشعهٔ ایکس و غیره) امکان‌پذیر است. روش متداول، روش پرتوتابی می‌باشد (بروئرتجز، ۱۹۸۱).

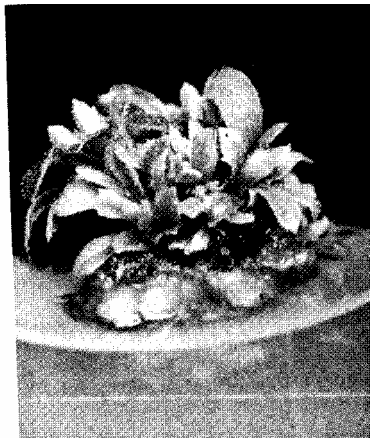
اگر پس از القای موتاسیون، موتانت‌های کامل، مورد نظر باشند؛ تولید شاخه‌های نابجا، بسیار مهم است، چون آنها معمولاً از یک سلول، منشأ می‌گیرند. شکل ۲-۵ اتفاقات پس از پرتوتابی به مریستم(تشکیل گیاه شیمریک) و یک بافت پرتوتابی شده را نشان می‌دهد، که یک سلول جهش یافتهٔ آن، تبدیل به شاخه نابجا (تولید موتانت کامل) می‌شود. با این وجود، نوریس وهمکاران(۱۹۸۳) گزارش کردند که گیاهان بنفشه آفریقایی، هنگامی که از بیش از یک سلول (لایه) منشأ گرفته و تشکیل کلون می‌دهند، به صورت شیمر باقی می‌مانند. البته بروئرتجز و فن‌هارتن(۱۹۸۵)، با نظر نوریس وهمکاران (۱۹۸۳)، موافق نیستند.

از آن جا که تشکیل شاخه‌های نابجا در بسیاری از گیاهان غیرممکن بوده و یا القای آنها در درزیوه بسیار مشکل می‌باشد، متخصصین اصلاح نبات، برای انتخاب موتانت‌ها، اخیراً به طور روزافزونی از پرتوتابی و تولید شاخه درشیشه، استفاده می‌کنند. یک بافت (برگ، دمبرگ، دمگل وغیره) معمولاً قبل از کشت این‌ویترو، پرتوتابی می‌شود. سپس قلمه‌ها در این‌ویترو، ایزوله شده، و تشکیل شاخه‌های نابجا، القا می‌گردد (شکل۱۹-۲). پس از ریشه‌دار شدن شاخه‌های حاصل(شکل۲۰-۲) گیاهان به خاک منتقل شده، و در طی مراحل بعدی رشد، از نظر موتاسیون‌ها، مورد بررسی قرارمی‌گیرند.

یکی از مثال‌های خوب در مورد فرآیند فوق، گل داوودی می‌باشد، که روزت و باکلمن(۱۹۷۶) با استفاده از پرتوتابی و کشت این‌ویترو، موتاسیون‌هایی در رنگ گل‌های آن، ایجاد کردند. روزت(۱۹۸۰) و بروئرتجز وفن هارتن(۱۹۷۸) پیشنهاد کردند که القای موتاسیون در این‌ویترو، می‌تواند ابزار بسیار مفیدی برای متخصصین اصلاح نبات باشد؛ چون با پرتوتابی، و پس از آن، تشکیل شاخه‌های نابجا، غالباً امکان وقوع موتاسیون‌های کوچک یا میکرو (در اندازه گل، رنگ گل و غیره) وجود دارد؛ در حالی که سایر صفات مطلوب، حفظ می‌شوند.



شکل ۱۸-۲: نمای شماتیک منشا اندام هوایی موتاسیون یافته بعد از اعمال اشعه. I : رأس ساقه اشعه داده شده، II : لایهٔ اپیدرم با سلول‌های موتاسیون یافته (از هسیوس و هانسر، ۱۹۷۵)



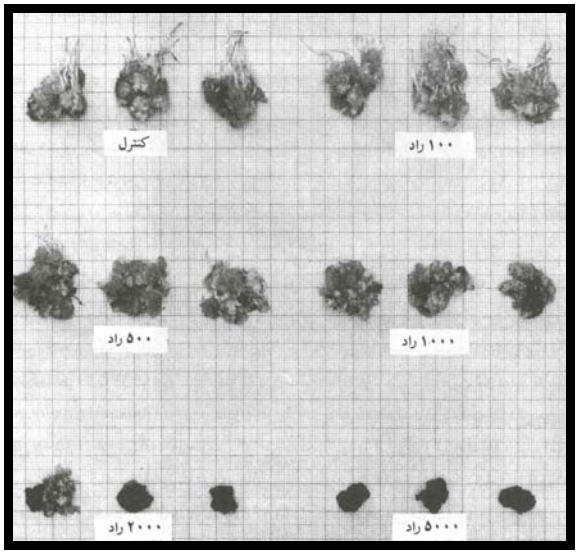
شکل ۱۹-۲: باززایی اندام هوایی نابجا از دمگل در Chrysanthemum، عکس از روزت و باکلمن(۱۹۷۶). عکس ۸ هفته بعد از جداسازی گرفته شده است.

شکل ۲۰-۲: باززایی ریشه نابجا از محل برش قاعده ساقه در *Chrysanthemum*. عکس از روزت و باکلمن(۱۹۷۶). عکس ۴ هفته بعد از جداسازی گرفته شده است.

در طی القای موتاسیون، تنها موتانت‌های غالب، معمولاً به طور مستقیم، قابل مشاهده هستند. موتانت‌های مغلوب، در اغلب موارد، فقط پس از خودگشنی گیاهان تکثیر شده توسط بذر، حاصل می‌شوند. با این وجود، در گیاهانی که به طریقهٔ رویشی تکثیر شده‌اند، پرتوتابی گیاهان هتروزیگوت، مستقیماً منجر به تولید موتانت‌های مغلوب، می‌شود. موتانت Aa(به دست آمده از پرتوتابی AA) پس از خودگشنی(خود تلقیحی) تولید 1AA: 2Aa: 1aa می‌کند. که aa (و نه AA) به عنوان موتانت مشاهده می‌شود. اگرسلول‌های هاپلویید، پرتوتابی شوند؛ معمولاً موتانت‌ها، بلافاصله قابل تشخیص هستند.

در ارتباط با اثر پرتوتابی بر پتانسیل تولید در این‌ویترو، اطلاعات کمی وجود دارد. بوریکوات وکووز(۱۹۶۷) نشان دادند که دُزهای پایین پرتوها، باعث تسریع در باززایی می‌شود(تحریک دزپایین)، اما دُزهای بالاتر، باززایی را به شدت کم می‌کنند. پیریک و استیگمانز(۱۹۷۵b) نشان دادند که پتانسیل باززایی، در کالوس پرتو دیده آنتوریوم(*Anthurium andreanum*) در این‌ویترو با افزایش دُز پرتوتابیده شده، بشدت کاهش می‌یابد(شکل۲۱-۲). این مسأله، در مورد پرتوتابی به دمبرگ‌ها در این-

ویترو نیز مشاهده شده است. به نظر می‌رسد گاهی اوقات بافت‌های کالوس نسبت به پرتوها، از گیاهان کامل یا قلمه‌ها، مقاوم‌ترند. ونکستن‌واران و پارتانن(۱۹۶۶)نشان دادند که این موضوع، در مورد توتون، صادق است



شکل ۲۱-۲: کاهش قدرت باززایی کالوس در *Anthurium andreanum* برای باززایی ساقه نابجا با افزایش دز ۱۰۰ راد باززایی اندکی افزایش یافته در حالی که در دزهای بالاتر کاهش یافته است. دزهای ۲۰۰۰ و ۵۰۰۰ راد *اکثر کالوس‌ها از بین رفته‌اند (پیریک، b ۱۹۷۶). عکس ۱۰ هفته بعد از جداسازی گرفته شده است.*

نگهداری مواد گیاهی در محیط این‌ویترو

در سال‌های اخیر، توجهات زیادی به سمت نگهداری مواد در بانک ژن، جلب شده است، نابودی گونه‌های گیاهی مختلف، می‌تواند فاجعهٔ بزرگی بخصوص برای متخصصین اصلاح نبات، باشد. نابودی منابع ژنتیکی در اثر جمع‌آوری‌های بی‌رویهٔ گونه‌های حفاظت شده، یا دست کاری رویشگاه‌های طبیعی آنها، صورت می‌گیرد. برای حفاظت از گیاهانی که به روش جنسی تکثیر می‌شوند، می‌توان بذور آنها را در ظرف‌های در بسته یا بسته‌های غیرقابل نفوذ، نگهداری نمود. نگهداری بذور(با رطوبت

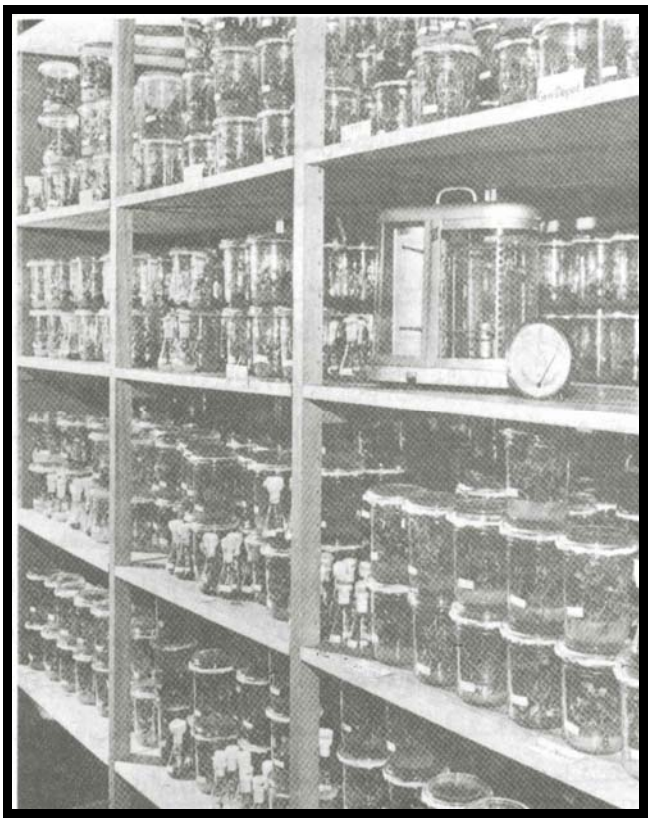
تا ۸ درصد) در حرارت پایین(۱۸- درجهٔ سانتی‌گراد و پایین‌تر) و رطوبت کم، صورت می‌گیرد. فقط هنگامی که مشکلاتی در ارتباط با جوانه‌زنی بذر وجود دارد، و یا دورهٔ حیات بذور کوتاه است، از سایر روش‌ها، مثل این‌ویترو، برای نگهداری گیاهانی که به روش جنسی تکثیر می‌شوند، استفاده می‌شود.

برای گونه‌های گیاهی که به روش رویشی زیاد می‌شوند، نیاز به استفاده از راه حل‌های دیگری می‌باشد. یک راه حل، استفاده از باغ‌های بوتانیک است؛ اما این روش، همیشه از نظر اقتصادی، عملی نیست. چنانچه گیاه تحت شرایط حفاظت نشده در مزرعه نگهداری شود، عوامل بیماری‌زا، آفات و بلاهای طبیعی، ممکن است سبب از بین رفتن آن گردند. حفاظت از این مواد ژنتیکی در شرایط کاملاً کنترل شده، نه تنها پرهزینه است، بلکه در مواردی، غیرممکن است. لذا لازم است روش‌های دیگری برای حفاظت از این مواد، جستجو شود. در ۱۰سال گذشته، استفاده از روش این‌ویترو (شکل۲۲-۲) بسیار متداول شده است.

این‌ویترو، روش بسیار مناسبی برای نگهداری مواد گیاهی می‌باشد؛ زیرا می‌توان آنها را در مقیاس کوچک، عاری از بیماری‌ها و شرایط رشد محدود، محافظت نمود. نیازمندی‌ها برای نگهداری در شرایط این‌ویترو، اساساً بسیار شبیه به شرایط تکثیر رویشی است (بجاج،۱۹۸۰؛ وایترز،۱۹۸۳؛ هنشا،۱۹۸۲):

۱- حفظ ثبات ژنتیکی: این حالت معمولاً در کشت این‌ویتروی مریستم، نوک ساقه و جنین، وجود دارد(ساکی،۱۹۸۴).

۲- عدم حضور بیماری، بایستی تضمین شود.



شکل ۲۲-۲: حفاظت از ژرم پلاسم گل داوودی در این ویترو در درجه حرارت پایین.

۳- توانایی بالقوه باززایی،نبایستی از بین برود. با این فرض، مریستم، نوک ساقه و جنین، مطمئن‌ترین مواد هستند.

۴- شانس خسارت و یا از بین رفتن مواد، کم باشد. بجاج (۱۹۸۰) معتقد است که احتمال خسارت به ساختارهای سازمان یافته، نظیر مریستم، نوک شاخه و جنین، طی انجماد مواد، بسیار کم است. معذلک هنشا(۱۹۸۲) با این نظر مخالف، و معتقد است که بافت‌های متجانس، نظیر کالوس، برای انجماد، مناسب‌تر از ساختارهای سازمان یافته، هستند. در حال حاضر برای نگهداری مواد در شرایط این‌ویترو، مریستم از سایر مواد، ترجیح داده می‌شود.

حفاظت از گیاهان به روش درشیشه، نسبت به روش این‌ویوو، مزایای زیاد دارد(هنشا،۱۹۷۴؛هنشا و اوحرا،۱۹۸۴؛ وایترز، ۱۹۸۳، ۱۹۸۰؛نیتزی؛ ۱۹۸۳؛بجاج، ۱۹۷۹a، ۱۹۷۹b):

۱- کشت درشیشه، امکان نگهداری گونه‌های گیاهی را که در معرض انقراض هستند، ممکن می‌سازد.

۲- نگهداری این‌ویتروی گیاهانی که به روش رویشی ازدیاد می‌شوند، سبب صرفه‌جویی زیادی در زمان و فضا، می‌گردد. دال(۱۹۷۶) محاسبه کرده است که برای حفاظت ۸۰۰ رقم انگور در شرایط این‌ویترو، به چند مترمربع فضا نیاز می‌باشد، در حالی که برای حفاظت از آنها در شرایط مزرعه، به یک هکتار زمین، نیاز است. اغلب نگهداری مریستم و ساقه در درشیشه، ارزان‌تر و راحت‌تراست. با افزایش هزینه‌های سوخت، ذخیرهٔ مواد گیاهی به روش این‌ویترو، اهمیت بیشتری می‌یابد. همچنین حفاظت از لاین‌های والدینی در مقیاس کم برای تولید بذر هیبرید، برای متخصصین اصلاح نبات، بسیار مهم است.

۳- نگهداری گیاهان نر عقیم که امکان ازدیاد آنها به روش جنسی وجود ندارد، در شرایط این‌ویترو، امکان‌پذیر است.

۴-در کشت این‌ویترو، امکان کاهش مؤثر رشد، وجود دارد؛ و بنابراین، تعداد واکشت‌ها، کاهش می‌یابد.

۵- چنانچه در کشت بافت، مواد عاری از بیماری(استریل) به دست آید، انجام واکشت در این‌ویترو، تنها راه مطمئن برای نگهداری این مواد عاری از بیماری است. به عبارتی، با نگهداری گیاه در این‌ویترو، لازم نیست که برای اطمینان از عاری بودن گیاه از بیماری، از کشت مریستم برای تولید گیاه، استفاده نمود.

۶- از آنجا که امکان ادامهٔ کشت مواد عاری از بیماری، امکان‌پذیر است؛ بنابراین، امکان نقل و انتقال مواد عاری از بیماری نیز وجود دارد.

۴-۵- بانک ژن در شیشه[1]

منظور از بانک ژن در شیشه، نگهداری و ذخیره بلندمدت منابع ژنتیکی توسط روشهای بیوتکنولوژیکی می‌باشد(شکل ۲۳-۲ و ۲۴-۲). این روشها بطور کلی بر دو قسم هستند:

الف- ذخیره کشت اندام هوایی و مریستم ضدعفونی شده (بانک ژن در شیشه)

ب- نگهداری به صورت منجمد[2] (بانک ژن) که شامل نگهداری دانه گرده، مریستم و تعلیقه‌های سلولی(سلولهای معلق در محیط کشت) می‌باشد.

دلیل حفظ و نگهداری ذخائر توارثی را می‌توان بصورت زیر خلاصه کرد.

تبدیل ژنوتیپهای ابتدایی به واریته پیشرفته سبب محدود شدن مبانی ژنتیکی گیاهان زراعی شده است. دلیل این امر تلاقی‌های برنامه‌ریزی شده و انتخاب برای بدست آوردن یکنواختی می‌باشد. بنابراین، نژادهای متنوع سازگار به محیط‌های بخصوص ناپدید شده و توسط واریته‌های با عملکرد بالا جایگزین شده‌اند. در گیاهانی که به صورت رویشی تکثیر می‌شوند مثل سیب‌زمینی، نیشکر، خرما، انگور و غیره نگهداری به صورت بذر کافی نیست زیرا عبور از مرحله چرخه زایشی سبب تفرق صفات در نتایج است. منظور از بانک ژن گیاهانی که به صورت رویشی تکثیر می‌شوند جلوگیری از خسارتهای حاصل از امراض است زیرا پاتوژنها در جریان چرخه رویشی افزایش می‌یابند(شکل ۲۳-۲).

روش نگهداری کشت بافت[3]

این روش شامل مراحل زیر است:

الف- شروع کشت اندامهای هوایی و مریستم و حذف پاتوژنها

---

[1] . In vitro gene bank
[2] . Cryopreservation
[3] . tissue culture storage method

ب- تکثیر و نگهداری بلندمدت به صورت در شیشه که از بقیه مراحل مهمتر است.

ج- انتقال گیاهچه‌ها از کشت در شیشه به داخل خاک

از بین سه مرحله یاد شده، کلید اصلی نگهداری به صورت در شیشه است. در این مرحله گیاهان حاصل از کشت در شیشه مرتباً از محیط کشت معمولی به محیط کشت تازه منتقل می‌شوند. هدف از این مرحله کاهش فراوانی نشاءکاری به وسیله محدودیت رشد اورگانهایی است که به صورت در شیشه کشت شده‌اند.

محدودیت رشد را می‌توان به صورتهای زیر بدست آورد:

۱- کاهش منبع انرژی در محیط کشت (محیط کشت حداقل شامل نمکهای معدنی + قند و بدون مواد آلی می‌باشد).

۲- کاهش درجه حرارت آنکوباتر به ۶ تا ۱۲ درجه سانتی‌گراد

۳- استفاده از مواد اسمززا مثل ۱۲-۸ درصد مانیتول، بطوریکه به منظور کاهش آب قابل دسترس کشت در حال رشد، سلولهای گیاهی کشت شده متابولیسم انجام ندهند.

۴- اضافه کردن مواد بازدارنده رشد به محیط کشت مثل مالیک هیدرازید، دیامینازید (B۹۹۵) و اسید ابسیسیک (ماده طبیعی بازدارنده رشد).

استفاده از مواد شیمیایی و فیزیکی می‌تواند به صورت مجزا و یا مخلوط باشد. فاصله بین انتقال اندامهای کشت شده می‌تواند از چند هفته تا یکسال باشد.

مزایای نگهداری بصورت در شیشه

۱- این روش کاهش خسارتهای حاصل از پاتوژنها، تغییرات محیطی و سایر تنش‌های محیطی می‌شود.

۲- فضای مورد استفاده کاهش می‌یابد بطوریکه می‌توان ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ لوله آزمایش را در یک مترمربع جای داد.

۳- می‌توان نسبت به حذف پاتوژنها اقدام نمود.

۴- می‌توان مانع از انتشار بیماریها و امراض از طریق مبادله جرم پلاسم شد.

۵- محدودیتی از نظر نگهداری وجود ندارد.

۶- محدودیتی از نظر تکثیر وجود ندارد، به طوریکه می‌توان میزان تکثیر را در هر ماه به ده برابر افزایش داد.

۷- احتمال تغییرات ژنتیکی پایین است.

۸- این روش مستقل از نوع واریته است و به آن بستگی ندارد.

۹- نسبتاً ساده، قابل اعتماد و سالم است.

ب- نگهداری به صورت انجماد[1]

مشکلات نگهداری در گلخانه و نیز کشت مریستم گیاهان دارای تکثیر رویشی سبب به وجود آمدن روشهای جدیدی برای نگهداری مواد گیاهی یا ذخائر توارثی شده است. منظور از نگهداری به صورت انجماد یعنی منجمد کردن و نگهداری سلولهای گیاهی، اندامها و جنین‌ها در درجه حرارتهای فوق‌العاده پایین ($-196^{\circ}c$) می‌باشد. تکنولوژی نگهداری به صورت انجماد بدین صورت است که متابولیسم کشتها را به صفر تبدیل می‌کنند. در اثر این حادثه، اولاً می‌توان مواد گیاهی را برای زمان نامحدودی نگهداری کرد و ثانیاً پایداری ژنتیکی حفظ می‌شود.

۱- نگهداری مریستم‌های جدا شده به صورت انجماد

در سال ۱۹۷۶ شخصی به اسم سیبرت[2] موفق به باززایی گیاهان از مریستم‌های گل میخک شد که به صورت منجمد نگهداری شده بودند. موفقیت این روش در سال ۱۹۷۸ در توت‌فرنگی، در سال ۱۹۸۰ در سیب‌زمینی، نخود و درختان میوه به اثبات رسید (شکل ۲۴-۲).

مراحل این روش را می‌توان به صورت زیر خلاصه کرد:

الف- جدا کردن مریستم‌ها و کشت آنها در محیط کشتهای بازی حاوی مواد نگهدارنده انجماد.

---

[1]. Cryopreservation یا Freeze- preservation

[2]. Seibert

ب- انتخاب کشت‌های سالم و قرار دادن آنها تحت تأثیر مواد نگهدارنده انجماد مثل گلیسرول، ساکارز، مانیتول و DMSO.

ج- منجمد کردن به صورت آرام یا سریع

د- قرار دادن در ازت مایع (LN_2)[1]

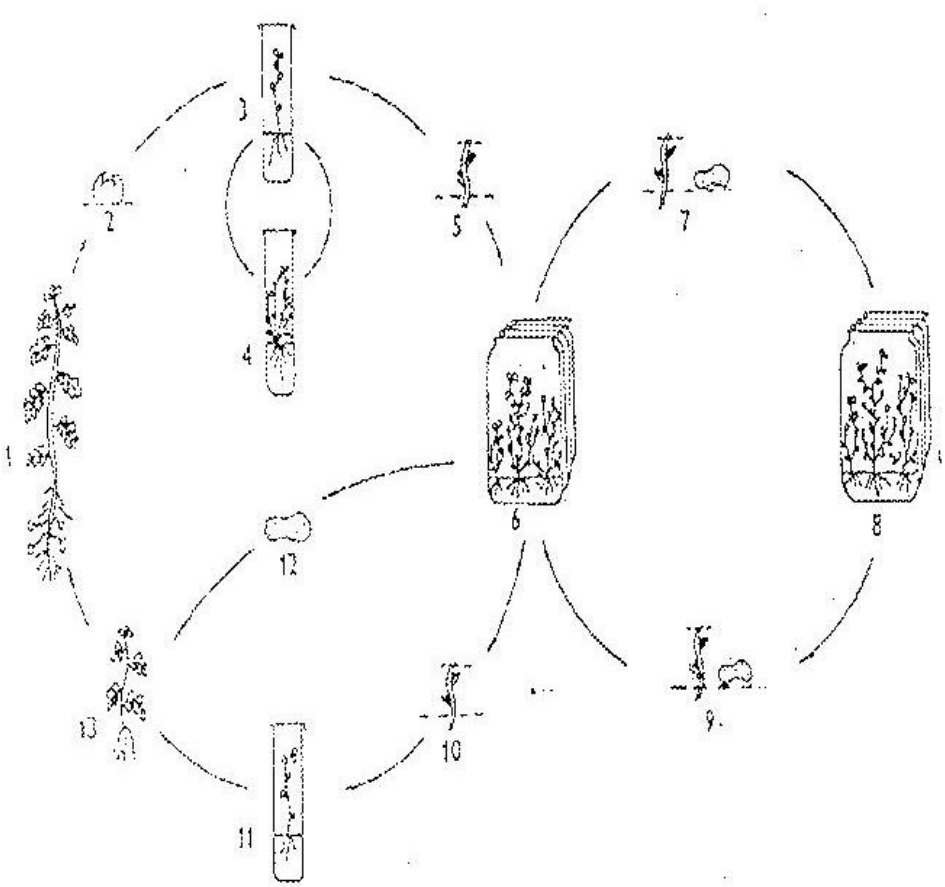
هـ- ذوب کردن در آب گرم با درجه حرارت ۳۵ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد

و- کشت مریستم در محیط کشت‌های مطلوب

ز- آخرین مرحله آزمایش قابلیت زیست است که می‌توان با توجه به افزایش اندازه، رنگ سبز، ظرفیت تکثیر، تشکیل کالوس و تولید اندامهای هوایی گیاه به وجود آن پی برد.

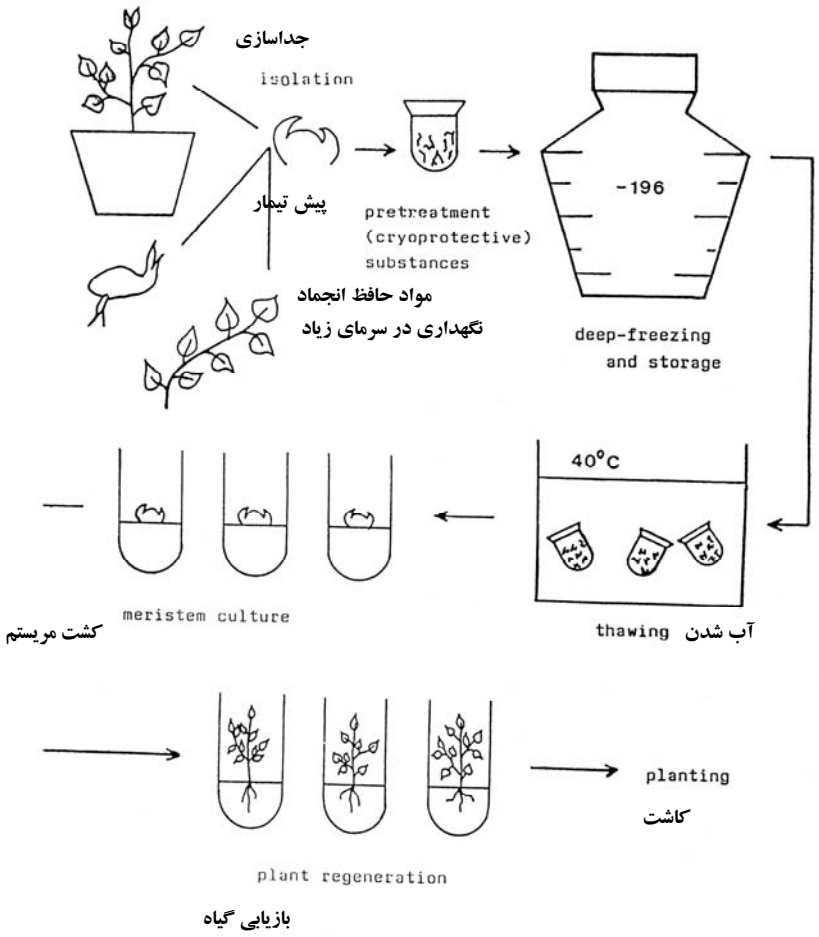
سیب‌زمینی و کاساوا دو گیاهی هستند که برای مدت ۴ سال بدینصورت حفظ و نگهداری شده‌اند. مطالعات پیرامون قابلیت زیست تغییر معنی‌داری در قابلیت زیست نشان نداده است (۴۰ درصد).

[1] . Liquid nitrogene

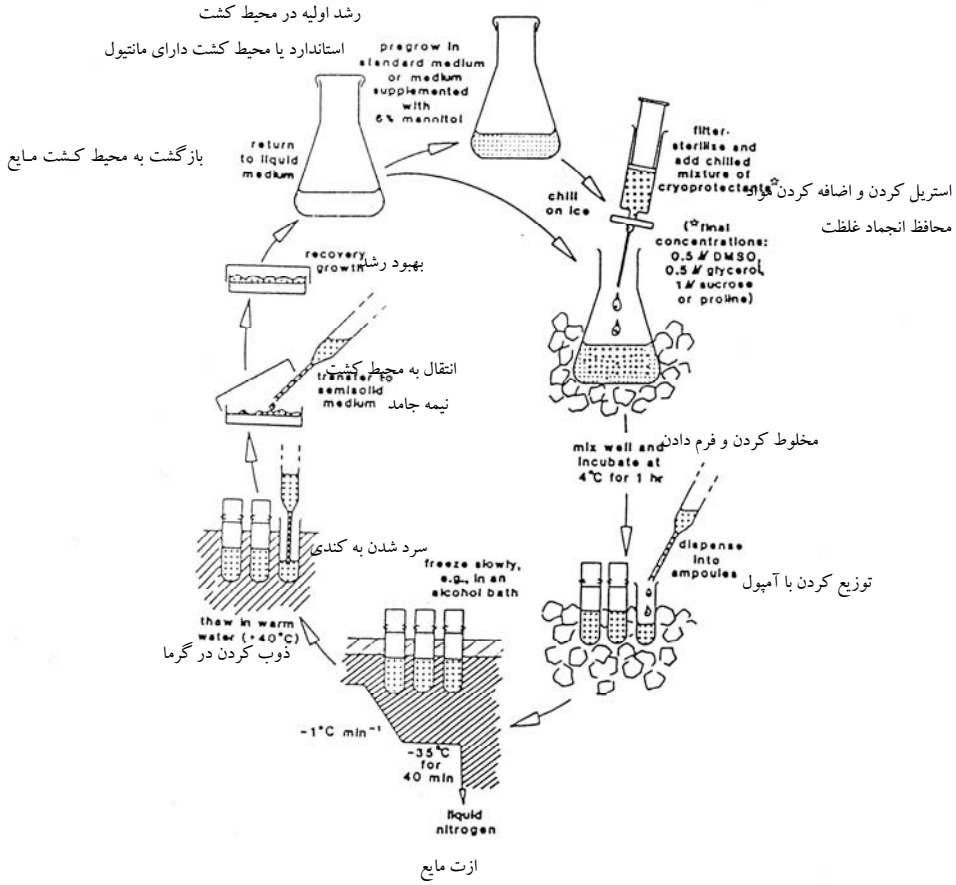


شکل۲۲b-۲ : نگهداری ژرم پلایم سیب زمینی در مدت طولانی به روش in vitro :
۱-۳: شروع کشت: ۲- انتهای مریستم؛ ۳-۴ حذف ویروی در کشت مریستم۵،۱۰- قطعات گره ای: ۷،۹- قطعات گره ای و: ۱۲- مینی تیوبر: ۶-۹ نگهداری طولانی در حالت کشت ساقه(اندام هوایی): ۶-۱۱- تبادل بین المللی مواد:۱۳- کشت

شکل ۲۳-۲- نگهداری بصورت منجمد و تاسیس بانک ژرم پلاسم



شکل ۲۴-۲: نگهداری در شیشه و ازت مایع



شکل۲۵-۲: مراحل اصلی نگهداری سلول های سماتیکی به روش منجمد کردن

۲- نگهداری دانه گرده به صورت انجماد

نگهداری دانه گرده به صورت منجمد دارای اهمیت زیادی در برنامه‌های اصلاح نباتات است. دانه گرده را می‌توان با روشهای مختلفی از قبیل: نگهداری در یخچال[۱]، نگهداری به صورت منجمد و در محلهای خشک و بدون هوا[۲] و نگهداری در LN_2[۳] حفظ کرد.

نگهداری در LN در مقایسه با نگهداری سلولها و بافتهای کشت شده ساده‌تر است، دلیل این امر آن است که اولاً میزان آب دانه گرده کمتر است، ثانیاً مواد ذخیره‌ای آن از قبیل قند، نشاسته و روغن دارای تراکم و انباشتگی بیشتری هستند ثانیاً فاقد اهمیت واکوئلی است یعنی در آن حفره نیست و ثالثاً وجود اگزین مقاوم.[۴]

دانه گرده نیاز به مواد حافظ انجماد و یا میزان بخصوصی از سرد کردن ندارد. می‌توان آنها را مستقیماً در ازت مایع قرار داد. هنگامیکه دانه گرده‌های نگهداری شده با این روش را خشک کردند، مشاهده شد که درصد دانه‌های گرده زنده زیاد است (میزان رطوبت هنگام خشک کردن کمتر از ۳۵ تا ۴۰ درصد است).

---

[1] . refrigeration
[2] . freeze and vacuum-drying
[3] . cryopreservation
[4] . resistant exine

روشهای منجمد کردن برای نگهداری به صورت منجمد مریستم‌ها یا انتهای اندامهای هوایی

گونه	روش منجمد کردن
سیب درختی	کند
گل میخک	سریع
کاساوا	کند- سریع
نخود	کند
بادام زمینی	سریع
سیب زمینی	سریع- کند
توت فرنگی	کند
گوجه فرنگی	ازت مایع- منجمد کردن با بخار

۳-نگهداری سلولهای سماتیکی کشت شده

منظور از نگهداری سلولهای سماتیکی حاصل از کشت، روشهای منجمد کردن و ذخیره سلولهای سماتیکی و بدست آوردن گیاه از سلولهای کشت شده و نگهداری شده به صورت منجمد است. در سال ۱۹۶۸ شخصی به نام کواترانو[1] سلولهای گیاه کتان را در درجه حرارت $50^{\circ}c$ - منجمد کرد و قابلیت زیست را در سطح ۱۴ درصد نگهداری نمود. تاکنون سلولهای بیش از ۳۰ گونه گیاهی به صورت منجمد نگهداری شده و مجدداً وارد کشت شده است. مراحل اصلی این روش را می‌توان به صورت زیر خلاصه کرد(شکل ۲۵-۲).

[1] . Quatrano

۳-۱: کشت‌های سلولی را تحت تأثیر تیمارهای مناسب قرار دادن

همبستگی نزدیکی بین چرخه رشد و ظرفیت بقاء گیاه وجود دارد. سلولهای نسبتاً کوچک و سیتوپلاسمی مراحل کند رشد یا مراحل اولیه و سریع رشد، دارای مقاومت بیشتری به انجماد هستند. معمولاً باید سلولهای دارای رشد سریع را برای مدت ۴ تا ۷ روز به محیط کشت حاوی مانیتول ۶ درصد منتقل کرد.

۳-۲: نگهداری به صورت انجماد

استفاده از مواد حافظ انجماد برای بقاء سلولهای منجمد شده بسیار مهم است. مهمترین مواد حافظ انجماد و غلظت آنها را می‌توان DMSO ۱۵-۵ درصد، گلیسرول، ساکارز و پرولین نام برد. هر یک از آنها در مخلوط با غلظت ۱-۰/۵ مول بکار می‌روند. مواد حافظ انجماد وارد سلول شده و نقطه انجماد را کاهش می‌دهند (مکانیسم کلاژیتو)[1].

سلولها تحت تأثیر مواد منجمد کننده قرار گرفته به داخل پیمانه‌های انجماد منتقل می‌شوند. از پیمانه‌های انجماد می‌توان آمپولهای دارای گنجایش دو میلی‌لیتر، پیمانه‌های شیشه‌ای، پاکتهای پلاستیکی و آلومینیومی را نام برد.

۳-۳: انجماد

سلولها نیاز به محافظ‌های آب‌دهی دارند بدینصورت که باید آنها را آهسته و قدم به قدم منجمد کرد تا خسارت حاصل از یخبندان حداقل می‌شود. در جریان سرد کردن باید سلول را از $1^{\circ}c$ سرد کرد تا به $35^{\circ}c$ - برسد و برای مدت ۴۰ دقیقه در این درجه حرارت و قبل از فرو بردن در ازت مایع نگهداری کرد.

[1] . Collagitive mechanism

۴-۳: ذخیره کردن

گونه‌هایی را که ذخیره می‌شوند باید در درجه حرارت پایین‌تر از $0150^{\circ}c$ - نگهداری کرد. این درجه حرارت فقط با استفاده از یخچال‌های دارای ازت مایع که دارای درجه حرارت $196^{\circ}c$ - هستند، امکان پذیر می‌باشد.

۵-۲: ذوب شدن

گیاهان منجمد شده را باید به آرامی و سریع ذوب کرد و از کریستالیزه شدن مجدد یخها جلوگیری نمود. این عمل را می‌توان با فروبردن در آب مقطر دارای درجه حرارت $40^{\circ}c$ + انجام داد. سلولهای ذوب شده را باید به محیط کشت استاندارد یا نیمه‌جامد و با استفاده از پیپت اضافه کرد.

۶-۲: آزمایش قابلیت زیست (زیست‌سنجی)

برای پی بردن به قابلیت زیست می‌توان، الف- سلولها را در سطح محیط کشت نیمه‌جامد قرار داد و از روی گروههای قابل مشاهده یا کالوسهای حاصل از سلول به قابلیت زیست آنها پی برد، ب- رنگ‌آمیزی با فلورسنت دی استات بدین صورت است که سلولهای زنده به وسیله فلورسنس در نور اشعه ماوراءبنفش و زیر میکروسکپ قابل رؤیت هستند، ج- رنگ‌آمیزی آبی با فنوسافرانین، در این روش سلولهای خسارت دیده و کشت شده مشاهده می‌شوند، د- استفاده از TTC یا تترازولیوم کلراید، در این روش سلولهای بازیافته تنفس کرده و از روی تنفس می‌توان آنها را شناسایی کرد.

۴- تکثیر دستجمعی و تجاری سیب‌زمینی

این روش در بسیاری از کشورهای جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد و مراحل آن را می‌توان به صورت زیر خلاصه کرد(شکل ۲۶-۲):

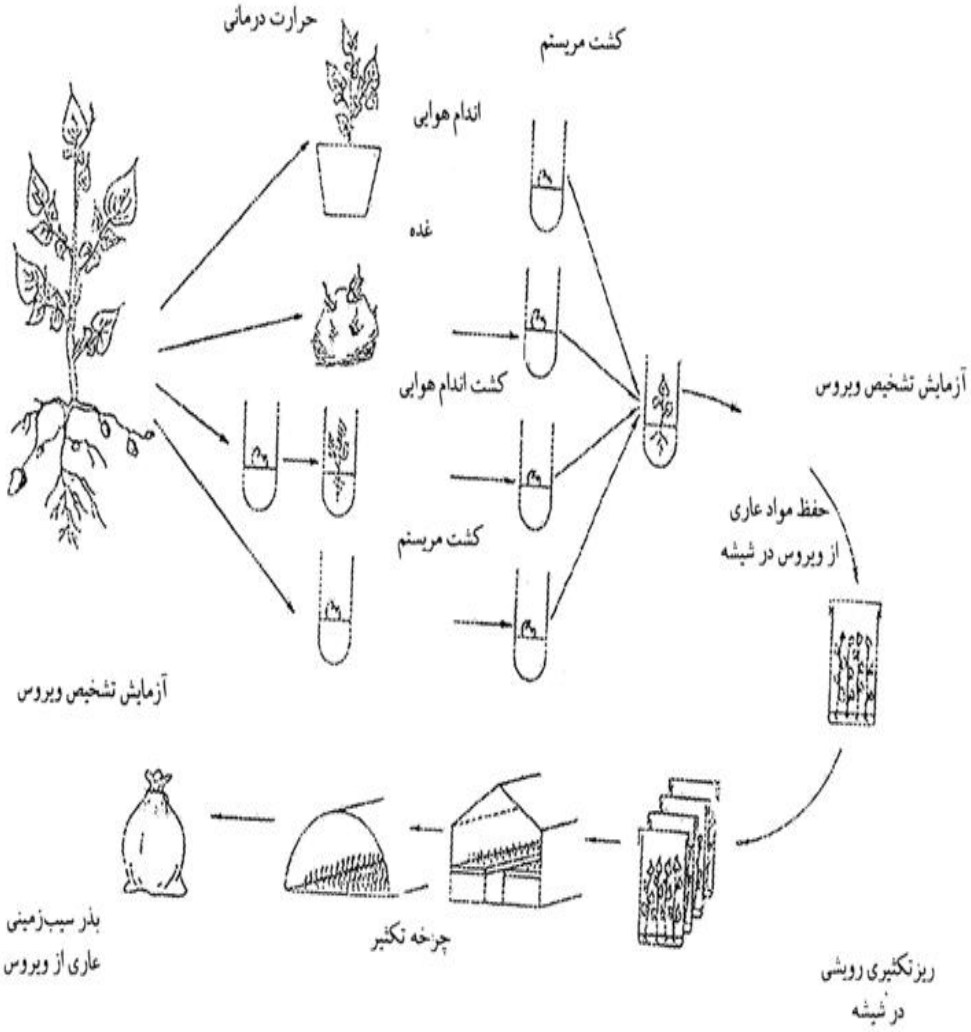
- حذف پاتوژن (کشت مریستم و استفاده از تیمار حرارتی)
- شروع کشت (کشت مریستم)

- مشخص کردن ویروسها[1] با استفاده از روش الیزا
- نگهداری بلندمدت در شیشه (کشت اندامهای هوایی، شرای حداقل کشت)
- ریزتکثیری رویشی (به وسیله جوانه‌های جانبی در قطعات کشت شده اندامهای هوایی)
- القاء مصنوعی غده‌های کوچک در شیشه (هورمونها، BA، شرایط کشت AB یا هشت درصد ساکارز)
- کشت در گلخانه (تکثیر با قلمه‌های ریشه)
- تولید غده‌های کوچک (کشت فشرده قند با فاصله ۱۰×۱۰ cm)
- تکثیر مجدد در چادرهای ایزوله شده (۳-۱ سال)
- تکثیر در مزرعه و تولید بذور سیب‌زمینی عاری از ویروس.

بیوسنتزمواد، در شیشه (روش این‌ویترو)

مدت زمانی طولانی است که در صنعت، از کشت میکروارگانیسم‌ها مثلPenicillium، Streptomyces و غیره، برای به دست آوردن موادی همانند پنی‌سیلین و استرپتومایسین که از نظر داروسازی مهم‌اند، استفاده می‌شود. گیاهان عالی نیز منبع مهمی برای تولید انواع مواد، به ویژه داروها (گلیکوزیدها، روغن‌های اتریال، استروییدها و غیره) می‌باشند. آنچه که متداول است، کاشت گیاهان دارویی و سپس استخراج ترکیبات فعال از آنها است. این عمل، به عنوان روش نرمال، باقی خواهد ماند. در عین حال این روش تولید، با مشکلاتی روبرو می‌باشند، که لازم است راه‌های دیگری برای تولید مواد بیوسنتزی طبیعی، به وجود آید (زنیک،۱۹۷۶؛آلفرمن راینهارد،۱۹۷۸):

[1] . Virus indexing



شکل ۲۶-۲- چرخه تکثیر سیب زمینی از طریق کشت بافت

۱- تولید در مزرعه، بستگی زیادی به شرایط فصلی، آب و هوا، اقلیم و آفات و بیماری‌ها، دارد.

۲- به طور طبیعی، منابع گیاهی، به ویژه در مناطق و نیمه، محدود می‌شوند؛ و بعضی از گیاهان دارویی خیلی کمیابند.

۳- ممکن است مشکلات تکنیکی، و اقتصادی، در تولید، مطرح باشد.

۴- تولید متراکم، نیاز به نیروی کار زیادی دارد؛ و لذا پرهزینه است.

۵- ممکن است به علت عدم ثبات سیاسی دو کشور، جایی که گیاهان کشت می-شوند، امکان تولید نباشد.

با توجه به مباحثات بالا، تلاش شده است که این مواد را از کشت سوسپانسیون سلولی گیاهان عالی، از طریق تجمع در سلول‌ها (بیوماس) و یا از طریق آزاد کردن در محیط کشت، تهیه نمود. اگر سلول‌های گیاهی در این‌ویترو یا این‌ویوو، موادی را تولید کنند که مستقیماً مورد نیاز خود گیاه نباشد، به این مواد، اصطلاحاً متابولیت‌های ثانویه، اطلاق می‌شود.

دو روش اصلی زیر، در رابطه با تولید متابولیت‌های ثانویه، وجود دارد(موریس وهمکاران،۱۹۸۵):

۱- رشد سریع کشت‌های سوسپانسیون درحجم بالا، و سپس تولید متابولیت‌های ثانویه، از آنها.

۲- رشد و تکثیر سلول‌ها، برای تولید ترکیبات، طی یک دورهٔ طولانی.

در بیوسنتز مواد گیاهی در شرایط این‌ویترو، اساساً گیاهانی گزینش می‌شوند که تولید متابولیت‌های مطلوب در آنها، بالا باشد؛ متعاقب انتخاب گیاه، اندام‌هایی از گیاه انتخاب می‌شود که دارای بالاترین غلظت مواد باشند. بعد از القای کالوس در قلمه‌ها، کشت سوسپانسیون سلولی، انجام می‌شود. در این روش، کشت بایستی به طور منظم نسبت به لاین‌های سلولی با تولید بالا گزینش انجام شود. البته بایستی این نکته را مدنظر

داشت که در کشت‌های سلولی، موتاسیون‌ها به طور منظم اتفاق می‌افتند، که در نتیجه آن، ممکن است عملکرد مواد، کاهش یابد. از القای موتاسیون در جهت به دست آوردن لاین‌های سلولی با تولید بالاتر استفاده شده است. تولید مواد ثانویه، به مقدار زیادی به سرعت تقسیم سلول بستگی دارد، بنابراین، عجیب نخواهد بود که عملکرد مواد بستگی به تعداد زیادی فاکتوردارد (منتل واسمیت،۱۹۸۴؛ تاباتا،۱۹۷۷؛ داگال، ۱۹۷۹) که این عوامل، عبارتنداز:

۱- مواد اولیه.

۲- فاکتورهای فیزیکی رشد، مثل روشنایی، درجه حرارت، تهویه، و غیره.

۳- ترکیب محیط کشت.

۴- بعضی وقت‌ها «سیستم کاشت دو مرحله‌ای» لازم است. مرحله اول رشد سلول‌ها در محیط کشت نگهداری؛و در مرحلهٔ دوم انتقال سلول‌ها به محیط کشت تولید(متابولیت‌های ثانویه) (موریس وهمکاران،۱۹۸۵).

روش‌های تولید مواد بیوسنتزی در این‌ویترو، به دلایل زیر سریعاً در حال توسعه است:

۱- معرفی تدریجی روش رشد و تولید مواد از سلول‌های گیاهی، در فرمانتورها و بیوراکتورها(فولر،۱۹۸۴).

۲- اپتیمم نمودن رشد سلول‌های گیاهی، در اثر تغییرات در محیط کشت و عوامل فیزیکی رشد، مثل تهویه و به هم زدن، و همچنین تلاش در جهت افزایش تولید، از طریق افزودن پیش سازه‌ها.

۳- ثابت کردن سلول‌های گیاهی، با قرار دادن آنها در مواد شبه ژله، برای افزایش تولید مواد، و تجمع مواد در محیط کشت.

۴- توجه به تولید این‌ویتروی سایر ترکیبات، مثل نماتدکش‌ها و حشره‌کش‌ها.

امید است که بتوان به تولید مـوادی دسـت یافـت کـه امکـان تولیـد آنهـا از طریـق بیوسنتز معمولی گیاهان در مزرعه، وجود ندارد. به عـلاوه، امیـد اسـت بـا دسـت کـاری ژنتیکی در سلول‌ها، بتوان خصوصیاتی را که قادر به تولید مواد خاصی هستند، در گیـاه، به وجود آورد.

۵- گزینش و تکنیک‌های به گزینی برای رشد سلول‌های گیاهی ابداع شده اسـت، که در نتیجه آن، امید است تولید متابولیت‌های ثانویه، بیشتر شود (برلین و ساس،۱۹۸۵).

۶- اهمیـت پیـدا کـردن بیوترانـسفورماسیون (انتقـال زیـستی): در ایـن تکنیـک از آنزیم‌هـایی کـه در سـلول‌هـای گیـاهی موجـود اسـت، بـرای تغییـر در وظیفـهٔ شـیمیایی ترکیبات مواد شیمیایی کـه در بیـرون مـورد اسـتفاده قـرار مـی‌گیرنـد، بـه کـار مـی‌رود (موریس و همکاران،۱۹۸۵). دو نوع بیوترانسفورماسیون، وجود دارد:

- بیوترانسفورماسیون، از طریق سلول‌های کامل(متحرک یا ثابت).
- بیوترانسفورماسیون، از طریق استفاده از ترکیبات آمادهٔ ثابت.

مثال خواب در این مورد، تبدیل digoitoxin به digoxin با اسـتفاده از سـلول-های Digitalis lanata است.

۷- افزایش تجمع متابولیـت‌هـای ثانویـه، بـا اسـتفاده از الیـستیورها،(کـانس تیبـل و ایلرت، ۱۹۸۶). الیستیورها دارای منشأ بیولوژیکی‌اند که در اثـر متقابـل گیـاه- میکـروب دخالت دارند. الیستیورها، همانند فیتوآلکسینها (الیستیورهای زنده) مواد واسـطه‌ای اسـت که در شرایط تنش، مثل فشار اسمزی یا یون‌های فلزات سـنگ (الیـستیورهای غیرزنـده) که در کشت سلولی، برای افزایش تجمع مواد، از آنها، استفاده می‌شود.

بدون شک، بیوسنتز ترکیبات در روش این‌ویترو، دارای مزایـای زیـادی اسـت، بـا این وجود، هنوز مشکلات زیادی در این ارتباط، وجود دارد، تا بتوان از این تکنیک‌هـا، در مقیاس وسیع، استفاده کرد. بعضی از این مشکلات، عبارتند از:

۱- تکثیرسلول‌های گیاهی، در مقایسه با میکروارگانیسم‌ها (حدود۱ساعت) احتیاج به زمان زیادی دارد (بین ۱۶ تا ۲۴ ساعت). این، بدین مفهوم است که سلول‌های گیاهی، تولید بیوماس نسبتاً کمتری نموده، و بنابراین، مقدار کمی متابولیت‌های ثانویه، تولید می‌شود.

۲- اگر تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه کامل، به اندام‌های خاصی مثل بافت‌های تمایز یافته (غده‌ها و مجاری شیرابه‌ای) محدود شود، تولید کم خواهد بود.

۳- کشت‌های سلولی و سوسپانسیون، از نظر ژنتیکی، ناپایدارند و اغلب، موتاسیون، سبب می‌شود که در مراحل بعدی مواد، به سطحی کمتر از تولید در مرحلهٔ شروع کشت در این‌ویترو، تنزل یابد.

۴- سلول‌های گیاهی، این خاصیت را دارند که در حالت این‌ویترو به صورت یک تودهٔ سلولی، تجمع می‌کنند؛ و برای جلوگیری از این تجمع، به هم زدن شدید، لازم است. این عمل، ممکن است باعث خسارت به سلول‌ها شود.

۵- استفاده از غلظت زیاد قند در محیط کشت(تا ۵ درصد وزنی به حجمی) باعث افزایش قابل ملاحظهٔ هزینه‌ها، می‌شود.

۶- آلودگی، می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای، فرآیند را محدود نماید. چنانچه آلودگی، در محیط کشت، اتفاق افتد؛ به دلیل قدرت تکثیر سریع آنها، این آلودگی سریعاً در کل محیط کشت، پخش می‌شود.

۷- تحقیقات بیشتری در ارتباط با بیوراکتورها، و به وجود آوردن روش‌های ایزوله کردن، نیاز است.

۸- عدم اطلاعات دربارهٔ رشد سلول‌های گیاهی، در بیوراکتورها و فرمانتورها.

مواد و وسایل مورد نیاز در آزمایشگاه کشت بافت به نوع تحقیق و آزمایش مورد نظر و سرمایهٔ در دسترس بستگی دارد. به طور کلی یک آزمایشگاه استاندارد کشت بافت باید شامل تجهیزاتی باشد برای:

۱- شستن و نگهداری ظروف و وسایل آزمایشگاهی.

۲- آماده‌سازی، ضدعفونی سازی و نگهداری محیط‌های کشت.

۳- ضدعفونی نمودن مواد گیاهی.

۴- نگهداری کشت‌ها تحت حالات کنترل شده، از نظر درجه حرارت، نور و رطوبت.

۵- دستگاه ایرفلو یا هود استریل جهت ایجاد محیط استریل، برای کار روی نمونه-های گیاهی.

۶- بررسی و مشاهدهٔ مرتب کشت‌ها.

برای انجام آزمایشات کشت بافت دو آزمایشگاه جداگانه باید در نظر گرفته شود. یک آزمایشگاه، تحت عنوان آزمایشگاه آماده‌سازی محیط‌های کشت، که برای شستن و نگهداری ظروف و آماده‌سازی محیط‌های کشت به کار می‌رود و دیگری تحت عنوان اتاق کشت(Culture room) که برای نگهداری نمونه‌های کشت شده استفاده می‌شود. امکانات و وسایل مورد نیاز در این آزمایشگاه‌ها مخصوص، و با یکدیگر متفاوت می‌باشد.

فصل سوم
آزمایشگاه کشت بافت و تکنیکهای عمومی

مقدمه

شستشوی وسایل و ظروف کشت بافت در اتاق کشت انجام می‌گیرد، پس باید محل و امکاناتی برای این کار در نظر گرفته شود. در صورت امکان از ماشین مخصوص ظرف‌شویی در این اتاق استفاده می‌شود. همچنین آب سرد و گرم و مواد لازم برای شستشو نیز در همین اتاق قراردارند. یک آون با هوای داغ برای خشک نمودن ظروف و قفسه‌هایی نیز برای انبار نمودن ظروف شسته شده در این اتاق باید وجود داشته باشد. آماده‌سازی محیط کشت نیز در همین اتاق انجام می‌شود. البته باید توجه داشت که نباید شستشوی ظروف هم‌زمان با آماده‌سازی محیط کشت انجام گیرد، زیرا در این صورت امکان آلودگی محیط‌های کشت افزایش می‌یابد.

تجهیزاتی که برای آماده‌سازی محیط کشت مورد نیازند عبارت است از:

۱- میز کار عریض برای انجام کار به حالت ایستاده.

۲- فریزر برای نگهداری محلول‌های استاک(Stock solutions)، محلول‌های آنزیم (Enzyme solutions)، شیر نارگیل (Coconut milk) و امثال آن.

۳- یخچال برای نگهداری مواد شیمیایی مختلف، نمونه‌های گیاهی، ذخیرهٔ کوتاه مدت محلول‌های استاک و غیره.

۴- ظروف پلاستیکی برای نگهداری آب مقطر.

۵- ترازویی برای وزن نمودن مواد. بهتر است از ترازویی استفاده شود که بتواند در حد چند میلی‌گرم را به آسانی وزن نماید.

۶- تکان دهنده یا شیکر بخاری‌دار برای حل نمودن مواد شیمیایی.

۷- PH متر.

۸- پمپ مکنده (Vacum pump) برای تسهیل در ضدعفونی نمودن با فیلتر.

۹- اجاق گاز برای ذوب نمودن آگار و یا در صورت امکان یک اجاق مایکروویو.

۱۰- اتوکلاو برای ضدعفونی نمودن محیط‌های کشت.

ظروف کشت

اساساً کشت این‌ویترو را می‌توان در ظروف شیشه‌ای و یا پلاستیکی، در اندازه‌ها و شکل‌های مختلف، انجام داد(شکل۱-۳). شیشه، این مزیت را دارد که دارای دوام بیشتری است، و میتواند اتوکلاو شود. پلاستیک، به‌طور طبیعی، عمر کوتاهی دارد- (پلاستیک، ارزان قیمت و معمولاً یکبار مصرف است) و همیشه برای مصرف در اتوکلاو، مناسب نیست. دوام پلاستیک، بستگی به مقاومت آن در برابر حرارت و نوع مواد شیمیایی تمیز کننده، دارد. پلاستیک، این عیب را دارد که اتیلن متصاعد می‌کند، و تجمع اتیلن در ظرف، برای نمونه‌ها، زیان‌بار است. انواع مختلفی از شیشه‌ها وجود دارند، که مصرف آنها می‌تواند با عواقب فیزیولوژیکی، همراه باشد. در تحقیقات، استفاده از پیرکس یا شیشه های مشابه (سیلیکات بر) توصیه می‌شود. شیشه‌های ارزان قیمت با کیفیت پایین می‌توانند کاتیون‌های سمی، نظیر سدیم، سرب و آرسنیک را در محیط آزاد کنند. پیرکس ترجیحاً برای کار با پروتوپلاست‌ها و کشت تک‌سلول و کشت مریستم، توصیه شده است. در باغبانی عملی، استفاده از ظروف شیشه‌ای پیرکس گران قیمت، ضرورتی ندارد؛ و اغلب می‌توان از ظروف شیشه‌ای ارزان قیمت، بدون هیچ گونه ضرری، استفاده کرد. این موضوع از نظر اقتصادی، حائز اهمیت است. از آن جا که ظروف پلاستیکی، غالباً محکم بسته می‌شوند، باید توجه شود که باعث تجمع اضافی اتیلن یا CO_2 نشود.

ظروف شیشه‌ای ذیل، برای کشت بافت، به کار می‌روند.

۱- لوله‌های آزمایش(بعضی اوقات با سرپیچ)

۲- پتری دیش

۳- ارلن مایر(برای هردونوع کشت مایع وجامد).

۴- ظروف مشهور به استوارد(بطری‌های استوارد)

۵- در باغبانی عملی حتی می‌توان از شیشه‌های شیر، آبمیوه، و مواد غذایی استفاده کرد.

شکل ۱-۳: ظروف کشت با ابعاد و اشکال مختلف مورد استفاده در کشت بافت گیاهی

در آزمایشگاه‌های تجارتی کشت بافت، خصوصاً برای ازدیاد گیاهان از انواع لوله‌ها(بخصوص پلاستیکی)، جعبه‌ها و غیره، استفاده می‌شود. چنانکه پلاستیک برای اتوکلاو کردن، مناسب نباشد؛ آنها را در کیسه‌های پلاستیکی(بدون محیط کشت) قرارداده، سرشان را بسته وتوسط اشعهٔ گاما، استریل می‌نمایند. انتقال محیط کشت استریل به این ظروف در داخل محفظه، با جریان هوای استریل، انجام می‌شود.

شکل واندازهٔ شیشه (یا پلاستیک) می‌تواند پیامدهای مهمی داشته باشد. به عنوان مثال، می‌توان یک لولهٔ آزمایش را با پتری‌دیش، مقایسه نمود. لولهٔ آزمایش دارای حجم نسبتاً زیاد و سطح تماس خیلی کم، است؛ و در نتیجه، میزان تهویه و خشک شدن، کاهش می‌یابد، به‌طوری که شانس محدودی برای آلودگی وجود دارد. از طرف دیگر پتری‌دیش دارای حجم کمتر و سطح تماس بیشتری است. تهویه آن مناسب، خشکیدن سریع‌تر، ولی امکان آلودگی آن خیلی زیاد است. بنابراین، بستن درب پتری-دیش، اهمیت بیشتری از لوله آزمایش، دارد(با پارافیلم وغیره).

به‌طورکلی، واقعیت این است که کشت‌های درظروف بزرگ‌تر، رشدونمو(تکثیر) بهتری نسبت به ظروف کوچک‌تر دارند. احتمالاً این موضوع به دلایل زیراست:

۱- حجم بزرگ‌تر می‌باشد، و در نتیجه، دقت لازم از نظر گازهای متصاعد شدهٔ سمی(CO_2)، اتیلن و غیره) بیشتر است.

۲- میزان بیشتری از مواد غذایی، در واحد سطح، دراختیار می‌باشد.پیریک و بوتر(داده‌های منتشر نشده) اخیراً دریافته‌اند که گیاهچه‌های گیاه *Phalaenopsis* درظروف شیشه‌ای، بهتر از لوله‌های آزمایش، رشد می‌کنند.

اتاق کشت

این اتاق برای نمونه‌های کشت داده شده در نظر گرفته می‌شود(شکل۲-۳). اتاق کشت باید اتاقی کاملاً تمیز و عاری از هر نوع آلودگی باشد. درجه حرارت اتاق نیز باید قابل کنترل و تنظیم باشد. برای تنظیم و نگهداری درجه حرارت اتاق در حدود ^{o}C ۲±۲۵ معمولاً از تنظیم کنندهٔ دما(air- conditioner) و گرم‌کننده-ها(heaters) استفاده می شود. اگر درجه حرارت های بالا و یا پایین‌تر مورد نیاز باشد، می‌توان از انکوباتورهای با نور فلورسنت استفاده نمود که در صورت استفاده از این انکوباتورها می‌توان آنها را حتی در خارج از اتاق کشت نیز نگهداری نمود. برای تنظیم طول فتوپریود مورد نظر نیز از تایمر استفاده می شود. نور اتاق توسط لامپ‌های

فلورسنت و یا نور گرم و یا مخلوطی از هر دو نور تنظیم می‌گردد. نمونه‌های گیاهی معمولاً در نور حدود ۱۰۰۰ لوکس رشد می‌کنند ولی بعضی نیز به نورهای بیشتری نیاز دارند و بعضی برای رشد نیازمند تاریکی هستند. برای نگهداری گیاهان در تاریکی می‌توان آنها را در کابینت‌های مخصوص که در اتاق کشت تعبیه می‌شوند نگه داشت. اتاق کشت را می‌توان با طراحی‌های خاص و بسته به اندازهٔ ظروف کشت به وسیلهٔ قفسه‌های فلزی یا چوبی طبقه بندی کرد. همچنین باید در صورت لزوم در این اتاق محلی را برای قرار دادن یک شبکه برای تهیه و نگهداری سوسپانسیون‌های سلولی از آن استفاده می‌شود در نظر گرفت. استفاده از دماسنج نیز برای کنترل درجه حرارت در این اتاق ضروری به نظر می‌رسد. در طراحی اتاق کشت بهتر است دیوارها و سقف توسط ورقه‌های یونولیت پوشیده شده و دمای اتاق توسط ترموستات متصل به یک سیستم گرمایش و سرمایش تنظیم گردد. وجود یک فشار هوای تمیز به صورت باز یافت در اتاق کشت و همچنین نصب یک لامپ UV در آن می‌تواند در کاهش آلودگی نمونه‌های کشت شده کمک نماید.

تکنیک‌های مورد نیاز در کشت بافت گیاهی

شستشوی ظروف

برای شستشوی ظروف ابتدا باید تمام محتویات آنها را خالی نمود، سپس آنها را در آب گرم حاوی مواد مخصوص پاک کننده قرارداد. این کار مخصوصاً در مواقعی که شیشه‌ها حاوی محیط کشت جامد باشند، باید سریعاً انجام گیرد، زیرا در غیر این صورت ممکن است آگار بر جدار ظروف بچسبد، که در این صورت تمیز نمودن آنها بسیار مشکل خواهد بود. در صورتی که آگار به جدار ظروف چسبیده باشد، می‌توان آنها را با درجه حرارت کم گرم نمود تا آگار ذوب شده و شستشوی آنها آسان گردد. پس از تمیز شدن کامل ظروف باید آنها را ابتدا با آب لوله‌کشی شهری و سپس با آب مقطر با دقت آبکشی نمود. ظروف آبکشی شده را می‌توان در آون با دمای ۷۵ درجهٔ

سانتی‌گراد قرارداد تا خشک و تقریباً ضدعفونی گردند. سپس آنها را در کابینت‌های مخصوص نگهداری این ظروف، انبار و نگهداری نمود. در صورتی که ظروف کشت محتوی محیط کشت، آلوده شده باشد، به منظور ممانعت از انتشار اسپور قارچ‌ها و باکتری‌های رشد کرده در محیط کشت در فضای اتاق کشت و یا آزمایشگاه، بایستی قبل از شستشو، ظروف اتوکلاو شوند.

شکل ۲-۳: اتاق کشت جهت نگهداری نمونه‌ها و رشد آنها در شرایط کنترل شده.

استریل کردن

قبل از قرار دادن بذر، بافت و یا اندام‌های گیاهی در محیط کشت، باید آنها را استریل کرد، یعنی از کلیه میکروارگانیزم‌ها، عاری نمود: استریل کردن نمونه، به روش‌های زیر انجام می‌گیرد:

۱- از بین بردن فیزیکی میگروارگانیزم‌ها: توسط هوای داغ وخشک ، بخار آب، یا تشعشع (نورماورای بنفش، یا اشعهٔ گاما).

۲- از بین بردن شیمیایی میکروارگانیزم‌ها: با استفاده از ترکیبات استریل‌کننده (اکسیداتیلن، الکل، هیپوکلریت و...) یا آنتی‌بیوتیک‌ها.

۳- حذف فیزیکی میکروارگانیزم‌ها: با استفاده از فیلتر، و یا شستشو.

استریل کردن محیط‌های کشت، معمولاً در اتوکلاو (دیگ زودپز) انجام می‌گیرد. این کار گاهی اوقات با فیلتراسیون، و به ندرت با تابش، انجام می‌شود. هر یک از این روش‌ها، مزایا و معایبی دارند (فن براگت و همکاران ۱۹۷۱).

محیط‌های کشت، ظروف شیشه‌ای و سایر مواد استریل شده، باید در یک قفسه یا جعبهٔ فلزی استریل، که قبلاً با الکل ۹۶درصد ضدعفونی شده باشد، نگهداری شوند.

استریل کردن با اتوکلاو

اغلب محیط‌های کشت، با استفاده از اتوکلاو، استریل می‌شوند. اتوکلاو(از نظر لغوی، یعنی محفظه‌ای که درب آن کاملاً بسته می‌شود) وسیله‌ای است که داخل آن، استریل توسط بخارآب انجام می‌شود. با قرار گرفتن اشیاء یا مواد در معرض بخار تحت فشار، کلیهٔ میکروارگانیزم‌ها، از بین می‌روند. به عنوان مثال، محیط کشت با حجم بیش از ۵۰ میلی لیتر به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ‌سانتی‌گراد در محیط اشباع از بخار تحت فشار قرار می‌گیرد.

اتوکلاو(شکل‌های ۳-۳ و۳-۴) وسیلهٔ گران قیمتی است، که می‌توان آن را در اندازه‌ها و انواع مختلف، تهیه نمود. اتوکلاو انواع افقی (که از قسمت جلو بارگیری می‌شود، شکل ۳-۳) و عمودی (که از قسمت بالا بارگیری می‌شود، شکل ۴-۳) دارد .

کارکردن با اتوکلاو افقی، آسان‌تر است، ولی قیمت آن، گران‌تر می‌باشد. درجه حرارت اتوکلاو، بین ۱۱۵ تا۱۳۵درجهٔ سانتی‌گراد، قابل تنظیم است. استریل کردن صحیح، بستگی به زمان، فشار، درجه حرارت و حجم ماده‌ای دارد، که قرار است استریل گردد. مزایای اتوکلاو، عبارت است از: سرعت، سهولت، از بین بردن ویروس‌ها، و عدم جذب مواد (که این مورد در استریل کردن فیلتر، صورت می‌پذیرد). معایب

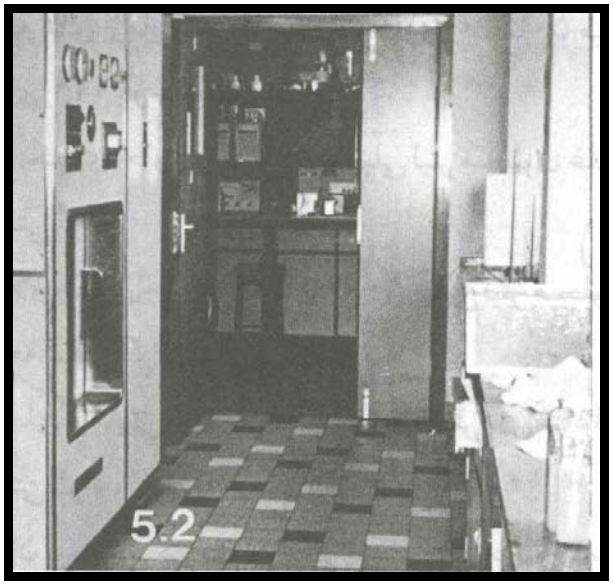
اتوکلاو عبارت است از: تغییر PH، تجزیهٔ مواد شیمیایی، و انجام واکنش‌های شیمیایی که می‌توانند فعالیت اجزای تشکیل دهندهٔ محیط کشت را کاهش دهند.

دستورالعمل‌های لازم در هنگام استفاده از اتوکلاو : (تذکر: زمان اتوکلاو کردن از هنگامی شروع می‌شود که دمای آن به حد مورد نظر رسیده باشد).

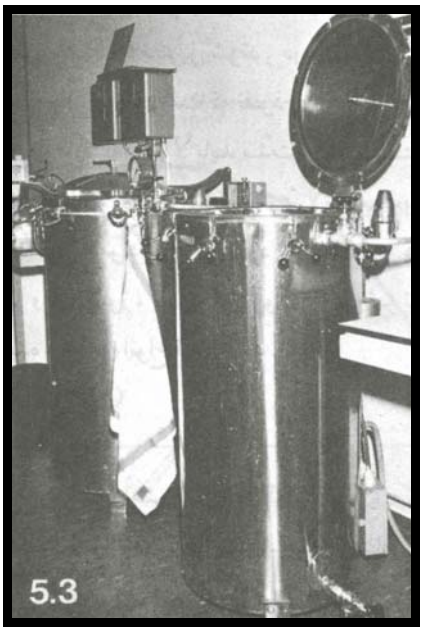
۱- قرار دادن لولهٔ آزمایش و فلاکس‌های حاوی ۲۰ تا ۵۰ میلی لیتر محلول غذایی، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی گراد.

۲- گذاردن فلاکس‌های حاوی ۵۰ تا ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول غذایی، به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی گراد.

۳- نگهداری فلاکس‌های حاوی ۵۰۰ تا ۵۰۰۰ میلی‌لیتر محلول غذایی، به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی گراد.



شکل۳-۳: اتوکلاو افقی(سمت چپ) برای استریلیزاسیون



شکل ۴-۳: دو اتوکلو عمودی، برای استریل کردن محیط کشت

۴- نهادن لوله‌های آزمایش خالی، فلاکس‌ها و فیلترهای کاغذی، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد.

موادی که امکان استریل کردن خشک آنها، وجود دارد (مثل لوله‌های آزمایش، فلاکس‌ها و پتری‌دیش‌های خالی، کاغذ و ابزار کار) به مدت ۲ تا ۳ ساعت در دمای ۱۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد، به صورت خشک، استریل می‌شوند.

همانطور که قبلاً اشاره شد، محیط‌های کشت و ظروف خالی، از قبیل شیشه‌ای، کاغذی و امثال آنها، باید به‌طور جداگانه استریل شود. در مورد فلاکس‌های کوچک و بزرگ نیز به همین ترتیب باید عمل کرد. باید توجه داشت که نفوذ حرارت در اتوکلاو بسیار مهم است؛ و موادی که حجم بیشتری دارند، اصولاً باید مدت زمان بیشتری داخل اتوکلاو قرارگیرند؛ چون برای نفوذ حرارت دراین مواد، زمان بیشتری لازم است.

اتوکلاو کردن، باعث تجزیهٔ مواد زیر می‌شود(فن براگت و همکاران ۱۹۷۱):

- ساکارز: به گلوکز و فروکتوز، تجزیه می‌شود. گاهی نیز تولید لوولوز می‌نماید که یک محیط کشت اتوکلاو شده، حاوی انواع قندهاست.

- کلشی‌سین(گریزبک ۱۹۸۱)

- زآتین(ریبوزید)

- اسیدجیبرلیک:۹۰ درصد کاهش در عکس‌العمل نسبت به جبیرلین

- ویتامین B_1 (پیرامیدین و تیازول تشکیل می‌شوند)، ویتامین B_{12}، اسیدپانتوتنیک، ویتامین C.

- آنتی بیوتیک‌ها

- شیره‌های گیاهی(کاهش فعالیت)

- آنزیم‌ها

محیط کشت مورد استفاده برای کشت پروتوپلاست (که مواد مورد نیاز آن، بسیار بیشتر از مواد تشکیل دهندهٔ محیط کشت قلمه یا کالوس، می‌باشد) غالباً توسط فیلتر، استریل می‌شود.

هم در هنگام اتوکلاو کردن، و هم پس از آن، باید نکات زیر، مورد توجه قرارگیرند:

۱- PH محیط کشت بین ۰/۳ تا۰/۵ واحد کاهش می‌یابد.

۲- اتوکلاو کردن درحرارت‌های بالا، باعث قهوه‌ای شدن (کاراملیزاسیون) قندها می‌شود، که ممکن است اثر سمی داشته باشند.

۳- اتوکلاو کردن برای مدت زمان طولانی، باعث ته‌نشین شدن نمک‌ها و تجزیهٔ آگار، می‌شود.

۴- در مورد تنظیم دقیق مدت و دما (فشار موثر) باید دقت کافی بشود. نوعی باکتری (*Bacillus stearothermophilis*) می‌تواند به عنوان شاخص بیولوژیکی،

مورد استفاده قرار گیرد (برای اطمینان از صحت عمل استریل) این باکتری‌ها در مدت ۱۲ تا۱۵ دقیقه در دمای۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، از بین می‌روند.

۵- باید در نظر داشت که مواد فرار، در اثر استفاده از اتوکلاو، از بین می‌روند (مثل اترل و اتیلن).

۶- اگر نیاز به شیب‌دار بودن سطح محیط کشت، باشد (مثلاً برای کشت جنین، یا کشت بذر ارکیده) لوله‌های آزمایش را پس از اتوکلاو کردن، باید به صورت مایل قرارداد.

۷- توصیه می‌شود در اتوکلاو، از آب بدون املاح استفاده شود؛ چون آب لوله‌کشی شهر، حاوی مقادیر زیادی کلسیم است که در کف اتوکلاو رسوب کرده، و تنظیم سطح آب و کنترل فشار را مختل می‌کند.

در سال‌های اخیر، دستگاهی ساخته شده است که مقادیر مشخص محیط کشت(۰/۵ تا ۱۶ لیتر) را تهیه و استریل می‌کند. در حین استریل کردن، محیط کشت، به هم زده می‌شود، که در نتیجه، حل شدن مواد، بهتر صورت می‌گیرد. به هم زدن، همچنین باعث سریع‌تر گرم شدن محیط کشت، و نهایتاً سرد شدن سریع‌تر آن در انتهای عمل استریل کردن می‌شود.

پس از اتوکلاو کردن، مواد حساس به گرما، اضافه می‌شوند، که برای مخلوط شدن، باید مجدداً به هم زده شوند.

محیط کشت استریل شده در داخل اتاقک تمیز، به لوله‌های آزمایش، فلاسک‌ها و ظروف مشابه، منتقل می‌گردد. امروزه دستگاه‌های اتوماتیک تهیه و استریل کردن محیط کشت نیز وجود دارند.

۳-۲-۲-۲) استریل کردن با تابش

استریل نمودن محیط کشت توسط تابش(با اشعهٔ گاما) به ندرت در کشت بافت، مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ زیرا در مقایسه با اتوکلاو کردن، هزینهٔ بسیار بالاتری در بر-

دارد. به نظر می‌رسد اگر چه اشعهٔ گاما، به خوبی اتوکلاو، عمل استریل را انجام می‌دهد، ولی رشد گیاهان در محیط استریل شده با اشعهٔ گاما، کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد. جهت توضیحات بیشتر، به کتابچهٔ راهنمای استریل کردن نوشتهٔ فن براکت (۱۹۷۱) مراجعه شود.

در مورد ظروف، جعبه‌ها و لوله‌های پلاستیکی که امکان استریل شدن آنها با اتوکلاو، وجود ندارد، از اشعهٔ گاما استفاده می‌شود. سپس محیط کشت استریل شده در داخل اتاقک تمیز، به ظروف استریل، انتقال می‌یابد.

۳-۲-۲-۳) استریل کردن با فیلتر

در استریل نمودن با فیلتر(محلول‌ها، محیط‌های کشت مایع و غیره، از یک غشا، عبور داده می‌شوند) کلیهٔ ذرات میکروارگانیزم‌ها و ویروس‌هایی که بزرگ‌تر از قطر منافذ فیلتر هستند، حذف می‌شوند. مهم‌ترین مزیت این روش، عبور مواد حساس به گرما (موادی که در اثر اتوکلاو کردن تجزیه می‌شوند) از فیلتر می‌باشد، بدون اینکه تغییری در آنها ایجاد شود. معایب این روش، عبارت است از: جذب مواد توسط فیلتر، عبور احتمالی برخی ویروس‌ها، وقت‌گیر بودن و سهل نبودن کاربرد آن، نسبت به روش اتوکلاو. همهٔ مشکلات این روش، در کتابچه فن‌براگت و همکاران(۱۹۷۱) آورده شده است. استریل کردن با فیلتر، غالباً هنگامی استفاده می‌شود، که نیاز به یک مادهٔ حساس به گرما (X) در محیط کشت باشد.

استفاده از فیلتری با جنس استات سلولز، یا نیترات سلولز با منافذی به قطر ۰/۲۲ میکرون، توصیه می‌شود.

محیط‌های کشت بدون X (مادهٔ حساس به گرما) ابتدا داخل یک فلاسک، اتوکلاو می‌شوند، و در حالی که هنوز مایع هستند(دمای بین ۴۰ تا۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد) مایعی که حاوی ماده X می‌باشد، توسط یک سرنگ زیر پوستی که مناسب با غشای فیلتر است، تزریق می‌شود. (این اعمال در داخل اتاقک تمیز انجام می‌گیرد). محیط‌های

کشت حاوی ماده X سپس به هم زده شده و محیط‌های کشت کاملی که به این ترتیب حاصل شده است به لوله‌های استریل شده، منتقل می‌گرد. امکان عبور دادن محیط کشت کامل حاوی X نیز از فیلتر، وجود دارد برای انجام این عمل قبلاً یک پمپ خلا به فیلترهای استریل کننده متصل می‌شد. مایع تحت نیروی خلا، از یک غشا عبور کرده، و به داخل فلاسک بوخنر، هدایت می‌گردید و سپس خلاً توسط یک پمپ تنفسی ایجاد می‌شد. امروزه محلول مورد نظر، با فشار، از فیلتر گذرانده می‌شود و فشار لازم توسط فشار هوا یا سرنگ تأمین می‌شود.

بدیهی است قسمت‌های مختلف فیلتر(گیره، صافی، سوزن وغیره) باید قبل از استفاده، توسط اتوکلاو، یا الکل ۹۶ درصد، استریل شوند.

در استریل کردن با فیلتر، امکان بروز مشکلاتی وجود دارد. مثلاً اگر غلظت نهایی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر برای ماده X مورد نیاز باشد(از یک محلول استوک با غلظت ۱۰۰۰) وحلالیت ماده X زیاد نباشد، مشکلاتی پیش می‌آید. در این مورد، یک میلی‌لیتر از محلول استریل صاف شده حاوی ۱۰ هزار میلی‌گرم در لیتر ماده X در آب، امکان‌پذیر نیست. لذا ۱۰ میلی‌گرم از ماده X پس از توزین، داخل اتر استریل شده، و پس از بخار شدن اتر، به محیط کشت استریل، اضافه می‌شود.

۳-۲-۲-۴) استریل کردن در مدرسه یا منزل

دستگاه اتوکلاو، معمولاً برای استفاده در منزل یا مدرسه، بسیار گران قیمت است؛ ولی به جای آن، می‌توان از دیگ زودپز که نسبتاً ارزان می‌باشد، استفاده نمود. محیط کشت، به خوبی در طی ۳۰ دقیقه، داخل دیگ زودپز، استریل می‌شود (شکل ۵-۳) وحجم‌های بزرگ‌تر مثل فلاسک‌های محتوی آب یا بسته‌های فیلتر کاغذی برای استریل شدن به این روش ، به ۶۰ تا ۷۰ دقیقه وقت نیاز دارند.

شکل۵-۳: دیگ زودپز برای استریل کردن محیط کشت.

فصل چهارم
آماده سازی و ترکیب محیط کشت

مقدمه

رشد و نموگیاه درمحیط این‌ویترو، به فاکتورهای پیچیدهٔ متعددی، بستگی دارد:

۱- ساختار ژنتیکی گیاه.

۲- عناصر غذایی، شامل آب، عناصر پرمصرف و کم مصرف و قندها.

۳- عوامل فیزیکی رشد، شامل نور، درجه حرارت، PH، غلظت O2 وCo2.

۴- بعضی مواد آلی، شامل تنظیم کننده‌های رشد، ویتامین‌ها و غیره.

ساختار ژنتیکی

ساختار ژنتیکی گیاه، یک فاکتور حساس در هر مرحله از رشد گیاه، محسوب می‌شود، و به عنوان مثال، چنانچه گیاه، دولپه یا تک‌لپه باشد، نوع برگ آن، متفاوت است، و مشخص می‌شود، چه حرارتی برای رشد وگل‌دهی آن مناسب است، رنگ و فرم گل چیست، آیا گیاه، میوه‌های پارتنوکارپی(بدون بذر) تولید می‌کند. همچنین بروز ساختار ژنتیکی گیاه، بستگی به شرایط فیزیکی و شیمیایی دارد که بایستی در شرایط این‌ویترو، آن را ایجاد کرد.

عناصر غذایی

عناصر غذایی، برای رشد و نمو گیاه، ضروری است. بدون آب و عناصرغذایی معدنی،گیاه تحت هیچ کدام از شرایط این‌ویترو و یا این‌ویوو، قادر به حیات، نیست. قندها نیز باید به محیط کشت اضافه شوند؛ زیرا در این شرایط،گیاه (یا قطعه گیاه) به طور کامل، اتوتروف (خودساز) نیست.

۴-۱-۳) عوامل فیزیکی

اهمیت عوامل فیزیکی رشد و نمو در شرایط این‌ویوو، به طور کامل برای حالت این‌ویترو نیز صادق است؛ و به همان صورت، اعمال می‌شود. این عوامل، درفرایندهایی از قبیل جذب آب، تبخیر، فتوسنتز، تنفس، رشد، گل‌دهی، تشکیل میوه، وغیره مؤثرند.

۴-۱-۴) مواد آلی

چهارمین فاکتور مهم، گروهی از مواد آلی هستند که تنظیم کننده‌های رشد، به این گروه تعلق دارند. تنظیم کننده‌های رشد که در غلظت بسیار کم مورد احتیاج هستند، توزیع انواع مواد در داخل گیاه، و بنابراین مسئوولیت تقسیم سلولی، رشد سلول وغیره را برعهده دارند. تنظیم کننده‌های رشد، خصوصاً اکسین و سیتوکینین، باعث تنظیم نمو اندام‌ها (تجدید حیات) درقسمت‌هایی ازگیاه (قلمه یا ریزنمونه) که در محیط این‌ویترو، رشد یافته‌است، می‌شوند. همچنین این مواد، در تولید جنین درکشت سوسپانسیون سلولی حائزاهمیت فراوانند. بنابراین، بسیار واضح است که تنظیم رشد نمو یک گیاه، فرایند پیچیده‌ای است که به ساختار ژنتیکی گیاه، وهمچنین به محیط اطراف آن، بستگی دارد. در زمان آماده نمودن محیط کشت، بایستی اثرات متقابل این عوامل روی یکدیگر، مدنظر قرارگیرد. این اثرات عبارت است از:

۱- اثر متقابل مواد تنظیم کنندهٔ رشد با درجه حرارت: تغییرات در شکل‌گیری اندام‌ها، می‌تواند بستگی به موجودیت (درون‌زا یا برون‌زا) اکسین یا سیتوکینین داشته باشد. بعضی اوقات، غلظت اکسین یا سیتوکینین درون‌زا، شدیداً تحت تأثیردرجه حرارت قرار می‌گیرد.

۲- اثر متقابل نور و تاریکی، با اکسین: IAA (ایندول استیک اسید) در نور، بیش از تاریکی تجزیه می‌شود.

۳- اثر متقابل ژنوتیپ، با مواد تنظیم کنندهٔ رشد: برخی ژنوتیپ‌ها برای رشد و نمو، غلظت زیاد؛ و برخی، به غلظت کم مواد تنظیم کنندهٔ رشد، نیازمندند. توانایی بالقوه بیوسنتز یک هورمون خاص، غالباً به صورت ژنتیکی، کنترل می‌شود.

۴-اثرمتقابل قند با نور: بعضی اوقات، قند و نور، می‌توانند موقتاً جایگزین یکدیگر شوند. جایگزینی، به ظرفیت فتوسنتزی درشرایط این‌ویترو نیز بستگی دارد.

قلمه‌ای که برای رشد و نمو در محیط این ویترو، قرارداده می‌شود؛ به مواد متعددی نیازدارد، که این مواد، در شکل۱-۴به صورت شماتیک نشان داده شده است. این مواد، درحال نمو در محیط این- ویوو نیز مورد نیاز می‌باشند (مثلاً آب، عناصرغذایی پرمصرف و کم‌مصرف)، مواد آلی و مخلوط‌های غیرمشخصی که گیاه در حالت این‌ویترو نیاز دارد، الزاماً در رشد طبیعی، نیاز ندارد. به عبارت دیگر، گیاه در حالت این‌ویترو هتروتروفیک (غیرخودساز) است. در هرحال، مسلم است که آب، عناصر غذایی پرمصرف و کم‌مصرف، قند به عنوان یک منبع کربنه، و غالباً دوگروه از تنظیم کننده‌های رشد (اکسین و سیتوکینین) در شرایط این‌ویترو، مورد نیاز هستند. چنانچه هرکدام از این ترکیبات موجود نباشند، معمولاً رشد و نموی صورت نخواهدگرفت، و اندام یا بافت کشت شده در محیط این‌ویترو، از بین خواهدرفت. گاهی اوقات، اندام کشت شده، قادراست نیازهای خود را سنتز وتأمین کند. به‌طور مثال، اگرگیاهی درحالت این‌ویترو، احتیاجی به اکسین نداشته باشد، به آن گیاه خودکفا از نظر اکسین می‌گویند، که اکسین‌ساز نیز نامیده می‌شود.

همانطوری که در جدول ۱-۴ نشان داده شده است، این مجموعه؛ ازآب، ترکیبات آلی(سمت چپ)، ترکیبات غیرآلی(سمت راست) وگروهی از مخلوط مواد غیرمشخص(قسمت پایین)،تشکیل می‌گردد. بعضی اوقات مخلوط‌های غنی مشخصی برای القای رشد، اضافه می‌شود. معمولاً افزودن این مواد به محیط کشت، زمانی صورت می‌گیرد که محقق، از احتیاجات غذایی وهورمونی آن گیاه، آگاه نیست. امروزه،

جدول ۱-۴ : مجموعهٔ موادی که اغلب برای القای رشد ونمو، به محیط کشت، اضافه می‌شود

<table>
<tr><td colspan="4">نیازهای غذایی و هورمونی کشت بافت و اندام‌های گیاهی</td></tr>
<tr><td colspan="4">آب</td></tr>
<tr><td rowspan="2">PH</td><td colspan="3">عناصر</td></tr>
<tr><td>پرمصرف</td><td>کم مصرف</td><td>مواد آلی</td></tr>
<tr><td></td><td>N
P
K
Ca
Mg
S</td><td>Co
Ni
Al
Mo
I
Fe
Zn
B
Mn
Cu</td><td>قند
اسیدهای آمینه
ویتامین ها
اکسین
سیتوکینین
جیبرلین
اسید آبسیزیک
اتیلن
تنظیم کننده های رشد</td></tr>
<tr><td colspan="4">عصارهٔ مخمر
شیر نارگیل
عصاره های گیاهی مخلوطی از مواد غیر مشخص
کازیین هیدرولیزشده
پپتون و تریپتون</td></tr>
</table>

محیط‌های کشت، اکثراً از مخلوطی از مواد مصنوعی به دست می‌آیند. مسلم است که پیداکردن یک محیط کشت متوازن که برای رشد بافت‌های حاصل از تیپ خاص گیاه مناسب باشد، به وقت زیادی نیازمند می‌باشد. اگر به مخلوطی در حدود ۲۰ ترکیب مختلف مورد نیاز باشد، اغلب برای پیدا کردن نسبت‌های صحیح از هرکدام در مخلوط به موارد خطا و اشتباه برمی‌خوریم.

برای افراد کم تجربه، انتخاب محیط کشت، مشکل است. به طوری که اغلب در مورد گیاهانی که در منابع علمی محیط کشت خاصی برای آنها گزارش نشده این سئوال مطرح است که از کدام محیط کشت استفاده شود؛ در این مورد، دی فوسارد(۱۹۷۶) پیشنهاد کرده است که آزمایش، با طیف گسترده انجام شود. وی، در این مورد نتیجه‌گیری می‌کند که در یک محیط کشت، غالباً چهارگروه از مواد، جنبهٔ حیاتی دارند:

از آن جا که نیازهای گیاه مورد آزمایش، قبلاً مشخص نشده‌است، این چهارگروه از ترکیبات، در ۳ غلظت (کم- متوسط- زیاد) پیشنهاد شده است.

۱- قند(ساکارز):۱ ، ۲ تا ۳ درصد.

۲- نمک‌های پرمصرف (طبق گزارش موراشی واسکوگ۱۹۶۲یک چهارم تا یک دوم میزان(غلظت کامل).

۳- اکسین(مثلاً IBA):۰/۵،۰/۰۱ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر.

۴- سیتوکینین(مثلاً BA):۰/۵،۰/۰۱ تا۵ میلی‌گرم درلیتر.

با توجه به داشتن ۳ غلظت متفاوت از هرکدام از چهار ترکیب، نهایتاً ۸۱=$۳^۴$ ترکیب خواهیم داشت، که پس از آزمایش، از بین آنها، نوع اپتیمم برای رشد، انتخاب می‌شود.

روش دیگر، آزمایش متنوع وسیعی از محیط‌های کشت است، که به آن، تکنیک MDA (Multiple drop assay) می‌گویند. این تکنیک خصوصاً برای کشت پروتوپلاست گونه‌های توتون(*Nicotiana*) و اطلسی (*petunia*) و برای پروتوپلاست مزوفیل غلات، کاربرد دارد. دراین تکنیک، از قطرات ۴۰ میکرولیتری، به عنوان واحد آزمایشی، استفاده می‌شود.

آماده سازی

تعداد زیادی مواد، و حتی در بعضی موارد، مخلوطی از مواد، به محیط کشت، اضافه می‌شوند. جهت احتراز از آلودگی لازم است که برای هر ماده، از قاشق جداگانه-ای استفاده شود. همچنین ترکیبات مصرف نشده را هرگز نباید به شیشه‌های اصلی، بازگردانید. غلظت یک ماده بخصوص را می‌توان برحسب واحدهای مختلف، بیان کرد. در ذیل به اصطلاحات کلی، اشاره می‌شود:

- درصد حجمی: برای شیر، نارگیل وگوجه‌فرنگی و غیره، به کار می‌رود: ۵درصد آب نارگیل یعنی ۵ میلی لیتر از آن، که به ۹۵۰ میلی لیتر آب اضافه شود.
- درصد وزنی: برای آگار و قندها، به کار می‌رود: ۲درصد یعنی ۲۰ گرم ماده در هر ۱۰۰۰ گرم (یک لیتر) از محلول غذایی.
- مولار: ۰/۰۱ مولار یعنی ۱/۱۰۰ مول در لیتر(یک مولار) همان وزن مولکولی برحسب گرم است.

از این واحد، غالباً برای تنظیم کننده‌های رشد، استفاده می‌شود.

- میلی‌گرم در لیتر: $۱۰^{-۷}$ به معنای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، $۱۰^{-۶}$ یعنی یک میلی‌گرم در لیتر. از این واحد نیز به میزان زیادی برای تنظیم کننده‌های رشد، استفاده می‌شود
- ppm- یا قسمت در میلیون: یک ppm یعنی یک میلی‌گرم در یک لیتر.

در ارتباط با این واحدها، غلظت یک ماده خاص در محیط را می‌توان اندازه‌گیری نمود. این کار، اساساً می‌تواند از دو راه صورت گیرد:

۱- واحدهای وزنی: مثلاً میلی‌گرم در لیتر، یا گرم در لیتر. در منابع علمی، غلظت یک گرم در لیتر، ممکن است به صورت $۱۰^{-۳}$؛ و غلظت یک میلی‌گرم در لیتر به صورت $۱۰^{-۶}$ارائه گردد. ممکن است به شکل ppm نیزگفته شود: یک ppm یعنی $۱۰^{-۶}$ یا یک میلی‌گرم در لیتر. متخصصین فیزیولوژی گیاهی استفاده از واحدهای وزنی

را غیرقابل قبول می‌دانند، زیرا مقایسهٔ فعالیت‌های فیزیولوژیکی ۱ میلی‌گرم در لیتر ازIAA و۱ میلی‌گرم در لیتر از IBA صحیح نیست. مقایسهٔ صحیح، عبارت خواهد بود از یک میکرومول از IAA با یک میکرومول از IBA، چرا که ۱ میکرومول از IAA، حاوی همان تعداد مولکول هایی است که یک میکرومول IBA دارا می‌باشد. اما در مورد یک میلی‌گرم در لیتر ازIAA، و یک میلی-گرم در لیتر ازIBA ، چنین چیزی صادق نیست. از آن جا که وزن ملکولی IAA وIBA تفاوت دارند، در بسیاری از مواد، خصوصاً تنظیم کننده‌های رشد، اساساً بایستی غلظت، به صورت مولارداده شود.

۲- غلظت مولار(M)، میلی‌مولار(mM)، یا میکرومولار(µM). یک محلول مولار (M) همان مقدار از ماده (بر حسب گرم) به اندازه وزن ملکولی خود دارد.

محیط کشت، بایدبه صورت ذیل، آماده شود: فلاسک حاوی آب مقطر، در دستگاه گرم کننده، قرارداده شود. اگر ۶۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت لازم باشد، حدود ۵۵۰ میلی‌لیتر آب، بایدگرم شود. سپس قند به میزان وزن مورد لزوم، به آن اضافه می‌شود. (دراین حالت، ظرف یا فلاسک، از محوطه گرم کننده خارج گردد.) سپس نمک‌های پرمصرف و کم‌مصرف را علاوه کرده و بعد اکسین و یا سیتوکینین و سایر ترکیبات، اضافه می‌شود. محلول به خوبی مخلوط می‌گردد، تا وقتی که، مواد حل شوند. در ادامه، محلول را به جوش آورده و آگار به میزان لازم(با استفاده ازیک قیف) اضافه می‌گردد. در هر اضافه کردن، بایستی دقت شود که از به هم چسبیدن مواد و تشکیل شدن گلوله و کف کردن، احتراز گردد. آگار را می‌توان در یک بشر، با آب سرد، مخلوط، و بعد اضافه نمود. آگار را نباید به آب درحال جوشیدن اضافه کرد؛ زیرا این کار، باعث پختن زیاد محیط کشت و بروز اثرات سوء، خواهد شد. در پایان، برای رسیدن به حجم ۶۰۰ میلی لیتر، آب اضافه خواهد گردید.PH با کاغذهای لیتموس یا PH سنج اندازه‌گیری، ودر صورت لزوم تنظیم می‌شود. پس از افزایش تمام مواد، و رسیدن حجم به۶۰۰ میلی لیتر، PH باید۶ باشد. اکنون می‌توان لوله‌های آزمایش، فلاسک‌ها و غیره را با محیط

کشت، پرکرد. لوله‌های آزمایش وظروف ارلن‌مایر، باید تا حدود۲/۳پـر شـود. فلاسـک بوخنر برای جابجایی محیط کشت به لوله‌های آزمایش وجلوگیری از تماس با دیواره‌هـا و قسمت‌های خارجی لوله‌ها، مورد استفاده قرار می‌گیرد. نکات زیربـرای آمـاده سـازی محیط کشت، اهمیت دارند:

۱- برای آماده کردن محیط کشت، حتی‌المقدور از مواد شـیمیایی، اسـتفاده شـود. برداشتن مواد، با قاشقک تمیز؛ و وزن کردن آنها با ترازوی حساس انجام شود.

۲- گاهی اوقات، به دلایل اقتصادی، می‌توان از محیط کشت آماده، استفاده کرد.

۳- آگار و قند، باید درحـد مـورد نیـاز، وزن شـوند؛ امـا عناصـر پرمـصرف و کـم مصرف را می‌توان از محلول‌های ذخیره، به کار بـرد. اغلـب محلـول‌هـای ذخیـرۀ تنظـیم کننده‌های رشد و ویتامین‌ها، به‌طور تازه آماده می‌شوند.

۴- گاهی اوقات، نگهداری محلول‌های ذخیره درحرارت پایین، سبب رسوب مواد می‌گردد که می‌تواند مشکل‌زا باشد، زیرا جوشانیدن دوباره آن، باعـث تبخیـرآب، و در نتیجه، تغییر غلظت، می‌شود.

۵- اگر رشد زیادی در طول چند هفته صورت گرفت، ممکن است مـواد غـذایی، تخلیه (کم) شده باشند؛ که بایستی واکشت (کشت مجدد) صورت گیرد.

۶- بخار دادن محیط کشت (بجای جوشـانیدن) بـرای حـل آگـار، ایمـن‌تربـوده، و تجزیۀ شیمیایی کمتری را سبب خواهد شد.

۷- موادی (محلول‌هایی) که در اثرحرارت تغییر مـی‌کننـد بعـد از آن کـه محلـول اصلی اتوکلاو شد، و تا حرارت بین ۴۵ تا۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد وخنک گردید، باید توسط استریلیزاسیون فیلتری، به آن اضافه شوند.

پاسخ به این سؤال که کدام محیط کشت را به کار بـریم، مـشکل اسـت؛ چـرا کـه کاربرد محیط کشت، به عوامل متعددی بستگی دارد:

۱- گیاه مورد آزمایش: به عنوان مثال، بعضی گونه‌ها به نمک حساس هستند؛ درحالی که گونه‌های دیگر، می‌توانند غلظت بالای نمک را تحمل کنند. بعضی گونه‌ها به افزایش ویتامین B_1 واکنش نشان می‌دهند. نیاز به تنظیم کننده‌ها، خصوصاً اکسین‌ها وسیتوکینین نیز خیلی متغییر است، و موارد دیگر...

۲- سن گیاه: بافت‌های جوان، می‌توانند بدون اکسین، ریشه‌زایی کنند؛ اما بافت-های مسن، به اکسین نیازمندند.

۳- سن اندام: اندام‌های جوان (درحال تقسیم سریع سلولی) نسبت به سایربافت‌ها، دارای نیازهای مختلف هورمونی هستند.

۴- نوع اندام مورد کشت: اگر ریشه‌ها کشت شوند، نیاز به افزودن ویتامین B_1 می‌باشد.

۵- درکشت سوسپانسیون(معلق)، چنانچه کالوس‌ها برای مدت زمان طولانی نگهداری شوند، نیاز کمتری به تنظیم کننده‌های رشد، دارند.

۶- درحالت این‌ویترو، هر مرحله، نیازهای خاص خود را دارد. به عنوان مثال، ریشه‌های نابجا، غالباً فقط بعد از اضافه کردن اکسین ظاهر می‌شوند؛ درحالی که ساقه-های نابجا، می‌توانند بعد از افزایش سیتوکینین، ظاهر شوند. زمانی که نیازهای غذایی یک گیاه نامعلوم است. به شرط این که گیاه به غلظت بالای نمک حساس نباشد، می-توان از مخلوط عناصر پرمصرف و کم‌مصرف موراشی و اسکوگ (۱۹۶۲)، استفاده کرد.

اگر گیاه، کمی به نمک حساس است؛ می‌توان از مخلوط عناصر پرمصرف وکم-مصرف هلر(۱۹۵۳) استفاده کرد؛ و چنانچه گونه به نمک خیلی حساس باشد، مخلوط عناصر پرمصرف ناب(۱۹۸۴) را می‌توان انتخاب کرد. فرم معمول قند، بین ۲-۳ درصد ساکارز (سوکروز) است. اگر یک محیط کشت جامد مورد نیاز باشد، نهایتاً ۰/۷ درصد

آگار از نوع دیفکوباکتو به عنوان مادهٔ ژله، اضافه می‌گردد. توصیه میزان اکسین وسیتوکینین، خیلی مشکل است.

ترکیب

۱) آب

به کیفیت آب، توجه زیادی باید معطوف شود؛ زیرا ۹۵ درصد از محیط کشت را آب تشکیل می‌دهد. توصیه می‌شود برای موارد تحقیقاتی، آبی به کار برده شود که در ظروف شیشه‌ای پیرکس، تقطیر شده باشد و برای تحقیقات با پروتوپلاست، سلول و مریستم، از آبی که دوبار تقطیر گردیده است استفاده می‌شود. برای اطمینان کامل از آب مقطر با کیفیت خوب، دستگاه مولد آب مقطر باید به طور منظم به منظور جلوگیری از جرم، تمیز شده و قبل از استفاده، با آب فاقد یون شسته شود. برای احتراز از ذرات بجا گذاشته شدهٔ آب یونیزه شده، در دستگاه آب مقطر، باید یک صافی بین دستگاه سازندهٔ آب یونیزه و دستگاه تقطیر، جاسازی شود.

در سال‌های اخیر، برای کشت بافت، از آبی استفاده می‌شود که توسط اسمز برگشتی خالص‌سازی شده‌است. پس از این خالص‌سازی، می‌تواند با سایر روش‌های خالص‌سازی نظیر یونیزه کردن، تقطیر و فیلتراسیون، همراه گردد. بهتر است نگهداری آب مقطر در بطری‌های پلاستیکی صورت گیرد؛ زیرا شیشه غالباً حاوی ذرات فوق‌العاده ریز سرب، سدیم و آرسنیک است، که می‌توانند در آب آزاد شوند. اگر برای ذخیرهٔ آب، اجباراً از شیشه استفاده می‌شود؛ باید حتماً از نوع پیرکس باشد. بطری‌هایی که برای ذخیرهٔ آب به کار می‌رود، باید به خوبی تمیز شوند. از آب لوله-کشی، نبایستی برای کشت بافت، استفاده شود. چنانچه آب مقطر در اختیار نباشد، می‌توان از آب بدون یون استفاده کرد. باید در نظر داشت که آب ممکن است حاوی آلوده کننده‌های آلی وحتی میکروارگانیسم‌ها باشد. در هر حال، آب فاقد یون (یونیزه)

غالباً برای تمرینات اولیه که در آن، کشت قلمهٔ بزرگ در شرایط این‌ویترو انجام می‌شود، به کار می‌رود.

۲)آگار

آگار، یکی از مشتقات نوعی علف هرزدریایی است، که به صورت آماده، وجود دارد؛ ومی‌تواند به عنوان مادهٔ مولد ژل در اکثر محیط‌های کشت استفاده شود. با وجود آن که یک محصول طبیعی وگیاهی است، توسط کارخانجات، خالص‌سازی و شسته می‌شود، به نحوی که اغلب هیچ گونه مادهٔ سمی درآن وجود ندارد. آگار یک پلی‌ساکارید با جرم ملکولی بالاست که قدرت تولید ژل در محیط کشت را دارد.

آگار،گرانترین ترکیب در محیط کشت جامد می‌باشد. آگار قابل حل، به صورت ژل درمی‌آید، که می‌تواند آب را جذب نماید (هرچه غلظت آگار بیشتر باشد، شدیدتر جذب می‌شود.) اگر غلظت آگار افزایش یابد، برای قلمه مشکل است که با مادهٔ غذایی تماس برقرار کند؛ و در نتیجه، جذب ترکیبات غذایی، محدود می‌گردد.

متخصصین کشت بافت گیاهی، اغلب ازآگار دیفکو- باکتو با غلظت ۰/۶ تا۰/۸ درصد استفاده می‌کنند؛ اگرچه سایر انواع آگار(گیبکوفیت آگار، فلو آگار و غیره) نیز وجود دارند. بعضی اوقات، از آگار دیفکو نوبل یا آگار دیفکو خالص استفاده می‌شود؛ اگرچه در بیشتر موارد، لزومی به استفاده از آن، وجود ندارد. درهنگام کشت پروتوپلاست یا سلول‌های منفرد، اغلب از آگار خالص شدهٔ گران قیمت، مثل آگاروز استفاده می‌شود. مقایسهٔ انواع گوناگون آگار تولید شده توسط کارخانه‌های مختلف سازنده، تفاوت اندکی را نشان می‌دهد.

رابرت و همکاران (۱۹۸۴) اثرات شش آگار متفاوت را روی تمایز سلولی اجزای نای مانند روی قلمه‌های *Lactuca* مقایسه کرده‌اند. اختلاف مشخصی در شمارش اجزای نای مانند، هنگام کاربرد آگاردیفکو- باکتو، گیبکوفیت و فلوآگار، وجود

نداشت، اما وقتی آگارKC-TC مورد استفاده قرارگرفت، اجزای نای مانند بیشتری تولید شد.

به طور محسوس در مقایسه با سایر آگارهای مورد آزمایش، تعداد کمتری از اجزای نای مانند در حضور آگاروز FMC تمایز پیدا کردند. باید یادآوری شود که آگار، آلوده به موادآلی وغیرآلی است (رامبرگر و تبر ۱۹۷۱).

غلظت عادی آگار، بین ۰/۶ تا۰/۸ درصداست. اگرغلظت کمتر (۰/۴ درصد) به کار رود، محیط کشت، خصوصاً زمانی که PH هم پایین است، خوب سفت نمی‌شود. اگر غلظت بالاتر(یک درصد) انتخاب شود، در این صورت، محیط کشت، خیلی سفت می‌گردد؛ و در نتیجه، قرار دادن نمونه در محیط کشت را مشکل می‌سازد. اگر غلظت ۰/۶ درصد به کاررود، ومحیط کشت هنوز سفت نباشد، لازم است که PH آن تنظیم شود. اگر PH کمتر از ۴/۵ تا۴/۸ باشد، محیط کشت با۰/۶ درصد آگار، به خوبی حالت ژله‌ای به خود نمی‌گیرد.

در کشت این‌ویترو، چنانچه غلظت آگار خیلی زیاد باشد، ممکن است اثرات نامطلوبی داشته باشد

(استولز۱۹۶۷)، همچنین نوع آگار نیز روی رشد ونمو، اثر دارد (دلبرگ ۱۹۸۳) آگارهای با کیفیت بهتر وخالص‌تر، ژله‌های بهتری تولید می‌کنند.

مواد ذیل نیز به عنوان جایگزین‌هایی برای آگار، وجود دارند:

۱- پلی مرهای مصنوعی(گز و همکاران ۱۹۷۱) مثل بیوژل پی-۲۰۰(قرص‌های پلی آکریلامید).

۲- آلژینات که می‌توان از آن برای کشت پروتوپلاست، استفاده کرد. (باناسو و روسکو،۱۹۸۲)

۳- ماده پایدارحاصل از سلولز کریستاله شدهٔ متراکم، مخصوصاً برای کشت‌های گل کلم، در ریشه‌دهی، مفید می‌باشد (جورج و همکاران ۱۹۸۳).

۴- ژل رایت (نام تجاری مرگ- ایالات متحده امریکا، شاخه‌ای از کمپانی کلکو) که یک ماده مولد ژل با خلوص خیلی بالاست. یک هتروپلی‌ساکارید آنیونی طبیعی است که ژل‌های سفت، محکم وشبیه ژل آگار را در حضور نمک‌های محلول، تشکیل می‌دهد. ژل رایت، پلی‌ساکاریدی است که دارای اسید گلوکورونیک، رامنوز، گلوکز و اواستیل است.

قدرت ژلی ژل رایت، به میزان زیادی بستگی به نمک اضافه شده، دارد. کاتیون-های دوظرفیتی، مثل منیزیوم ($MgSo_4 . vH_2O$ ، ۰/۱ درصد) یا کلسیم، اثرات خیلی بیشتری، ازکاتیون‌های یک ظرفیتی مثل سدیم یا پتاسیم، روی قدرت ژلی دارند. ژل رایت، برا ی تولید ژلاتین، به یک سیکل حرارتی و وجود کاتیون‌ها، نیاز دارد. ژل رایت، می‌تواند در حدود نصف غلظت آگار، به کار رود، برای کشت بافت گیاهی، غلظت ۰/۲ درصد ژل رایت را توصیه می‌کنند. ژل‌های ژل رایت، به طور واضحی، در مقایسه با آنهایی که از آگار به وجود می‌آیند، شفاف‌تر هستند، وسریع‌تر نیز تشکیل می‌شوند. طبق اظهار مسؤولین کارخانه‌های سازنده، ژل رایت حاوی هیچ گونه مواد آلوده‌ای(مثلاً ترکیبات فنولیک) که می‌توانند سمی باشند، نیست. برای کسب آگاهی‌های بیشتر، به گزارش هال کوییست وهمکاران (۱۹۸۳)، مراجعه شود.

۵- کوک (۱۹۷۷a) از یک جانشین آگار(یک پلی‌مر نشاسته‌ای) برای کشت سرشاخهٔ گیاه (*Nephrolepis exaltata*) استفاده کرد. این جانشین آگار(به غلظت ۱۲ گرم در لیتر) بدون گرم کردن، در آب حل می‌شود.

۶- ازمحیط کشت مایع بدون آگار نیز می‌توان استفاده کرد به نحوی که از اسفنج تمیز پلاستیکی یا نوعی پشم شیشه به عنوان نگهدارنده، استفاده شود.

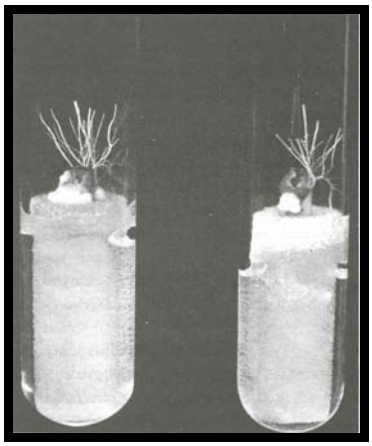
۷- کشت روی حاشیهٔ کاغذ صافی که برروی سطح محیط کشت مایع، قرارداده شده است. این روش توسط هلر(۱۹۵۳) استفاده شده است.

۸- کشت روی محیط کشت مایع حاوی مهره‌های شیشه‌ای که می‌توانند به عنوان لنگری برای قلمه‌ها عمل کنند.

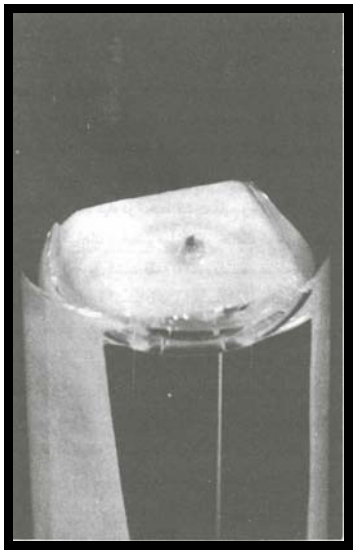
۹- از قرار دادن اسفنج ویسکوزی در زیر کاغذ صافی، می‌توان به عنوان یک حامل در محیط کشت مایع، به جای آگار، استفاده نمود (ورشان و فریز ۱۹۸۵). مزایای ویسکوز، عبارت است ازاین که:

- از آن، می‌توان در دفعات مکرر، استفاده کرد.
- امکان ارزیابی تعداد زیادی از نمونه‌ها را فراهم می‌کند.
- انجام واکشت‌ها بدون تغییر ظرف مربوطه، امکان پذیر است.
- انتقال گیاهان به خاک، آسانتراست.
- مقدار کمتری مواد شیمیایی، مورد نیاز است.

۱۰- رشد در محیط کشت، بدون استفاده از هیچ گونه وسیله برای نگهداری مواد. در این روش، سلول‌ها، بافت‌ها و غیره، به صورت غرقاب درمی‌آیند، و نیاز به هوادهی خوبی دارند. این کار را می‌توان با استفاده از به همزن انجام داد. در سال‌های اخیر، استفاده از محیط کشت دو فازه، کاملاً متداول شده است (به صورت فاز جامد و مایع). محیط کشت دو فازه، به صورت زیر، ساخته می‌شود: ابتدا محیط کشت جامد آماده می‌گردد؛ و قلمه‌ها روی آن، کشت داده می‌شود، و سپس یک لایه از محیط کشت مایع، به آن اضافه می‌گردد. بنابراین، قسمتی از قلمه‌ها در آگار جامد، قسمتی در محیط کشت مایع، و قسمتی در هوا قرار دارند. ترکیب فاز مایع محیط کشت را می‌توان مثلاً در زمان نیاز به وجود آوردن رشد طولی ساقه، به آسانی تغییر داد.



شکل۲-۴: کشت این ویترو قلمه های حاصل از ساقه گونه (*Catawbiense album*) در محیط کشت مایع. قلمه ها به صورت غیر قطبی (انتهای پایین آنها به طرف بالا) در سوراخ تعبیه شده در اسفنج پلاستیکی، جاداده شده اند. کالوس و ریشه های نابجا، در ناحیه انتهای پایین قلمه ها، تشکیل شده اند. این عکس، شش هفته پس از کشت، گرفته شده است.



شکل ۳-۴: کشت پروتوکورم ارکیده (Catlleya aurantiaca) روی حاشیه یک کاغذ صافی که توسط محیط کشت مایع در لوله آزمایش، مرطوب نگهداشته می‌شود. قسمت بالای کاغذ صافی، درست روی محیط کشت، قرار می‌گیرد.

تصمیم‌گیری در مورد انتخاب محیط کشت مایع یا جامد، به موارد ذیل، بستگی دارد:

۱- آیا گیاه مورد آزمایش برای رشد در محیط کشت مایع، مناسب است؛ در حالی که بعضی گیاهان در محیط کشت مایع رشد نمی‌کنند؛ برخی، آن را ترجیح می‌دهند. (مثلاً خانواده Bromeliaceae)

۲- چنانچه امکان رشد گیاه در محیط کشت مایع وجود داشته باشد، مسألهٔ مهم بعدی، هوادهی آن است. بیشتر گیاهان، خصوصاً اگر در حالت غوطه‌ور کشت گردند، به اکسیژن کافی نیاز دارند. این کار از طریق کشت قلمه به صورت نیمه غوطه‌ور، امکان‌پذیراست، یا اگر غوطه‌وری کامل ضرورت دارد، اکسیژن در رشد سلول‌ها، بافت‌ها و غیره به کار می‌رود، خطرات احتمالی حاصل از آن را باید مد نظر قرار داد. از طرف دیگر، رشد و نمو در محیط کشت مایع غالباً خیلی خوب صورت می‌گیرد، زیرا در حالتی که گیاهان غوطه‌ور باشند، به آسانی می‌توانند مواد غذایی، تنظیم کننده‌های رشد و غیره را از تمام جهات، جذب کنند. این، درحالی است که در کشت روی آگار، فقط قسمت انتهایی قلمه، در تماس با محیط کشت است. به علاوه، در کشت مایع، مواد تولید شده از قلمه‌ها، در محیط کشت مخلوط می‌گردد، در حالی که در محیط کشت جامد، این مواد، در نقطهٔ مشخصی، تجمع پیدا می‌کنند.

۳- رشد و تمایز اندام‌ها در محیط کشت مایع، می‌تواند کاملاً با محیط کشت جامد، متفاوت باشد .چنانچه کالوس گیاه *Anthurium andreanum* روی محیط کشت مایع رویانیده شود، تقریباً هیچ ساقه نابجایی تشکیل نخواهد شد، و در واقع، عکس آن در محیط کشت جامد، صادق است. اگر ساقه‌های Bromeliads یا Nepenthes به صورت این‌ویترو کشت شوند، بعداً تشکیل ساقه‌های جانبی در محیط کشت مایع، خیلی بهتر خواهد بود.

۴- محیط کشت مایع و همین‌طور محیط کشت جامد، می‌توانند باعث نوعی اختلال فیزیولوژیک، تحت عنوان ویتریفیکاسیون (شیشه‌ای شدن) شوند (آنونیموس،a-۱۹۷۸؛ دبرگ،۱۹۸۳، زیو وهالوی، ۱۹۸۳؛ زیو،۱۹۸۶).

درمنابع علمی، ویتریفیکاسیون، به حالت‌های نیمه شفافی، آب‌گیری زیاد و شیشه‌ای شدن، بافت‌های گیاهی کشت شده در محیط کشت، اطلاق می‌شود. حالت ویتریفیکاسیون، عمدتاً زمانی اتفاق می‌افتد که محیط کشت گیاه، دارای آب زیاد است. بنابراین، چنین حالتی معمولاً در محیط کشت مایع یا محیط کشت جامدی که غلظت آگار آن کم باشد، حادث می‌شود. این حالت برای جنس‌های Malus (سیب) و Prunus (آلو) (آنونیموس ۱۹۷۸a)، در میخک (زیو و هالوی۱۹۸۳) و آرتیشو (دبرگ و همکاران۱۹۸۱) مشاهده شده است.

وقوع و شدت ویتریفیکاسیون، توسط بسیاری از عوامل پیچیده، تحت تأثیر قرار می‌گیرد:

۱- افزایش غلظت آگار و یا قند، غالباً باعث کم شدن حالت ویتریفیکاسیون در مورد میخک و آرتیشو، می‌شود.

۲- انتخاب ظروف مناسب با تبادلات گازی، بهتر می‌تواند از این حالت ممانعت کند.

۳- با میزان بالای سیتوکینین، در ارتباط است. (هاسی ۱۹۸۶)

۴- در تابش نور کم و حرارت‌های بالا، تحریک می‌شود.

۵- از طریق استریلیزاسیون زیاد، تحریک می‌شود.

۶- بعضی انواع آگار، نسبت به پدیده ویتریفیکاسیون، حساسیت بیشتری دارند. از استفاده از این نوع تولیدات، باید احتراز کرد.

۷- در بعضی موارد، از طریق تغییر در مخلوط نمک‌های ماکرو، حالت شیشه‌ای شدن کم می‌شود. تغییر از محیط کشت MS به محیط کشت لیپویور مشکلات ویتریفیکاسیون را در جنس‌های *Malus* و *Prunus* حل می‌کند.

۸- مواد گیاهی جوان و نرم، به ویتریفیکاسیون حساسیت بیشتری دارند.

۹- استفاده از محیط کشت دو فازه، گاهی اوقات باعث کم شدن یا جلوگیری کامل از ویتریفیکاسیون، می‌شود.

به‌طور کلی، با توجه به نتایج حاصل از آزمایشات دبرگ(۱۹۸۳) و زیو و هالوی (۱۹۸۳) نتیجه گرفتند که در اصل، ویتریفیکاسیون، نتیجه رطوبت بالا در لولهٔ رشد، غلظت خیلی کم آگار در محیط کشت جامد، یا کشت، روی محیط کشت مایع است. دبرگ(۱۹۸۳) این پدیده را مورد ملاحظه قرار دارد، و نتیجه‌گیری کرد که افزایش غلظت آگار برای جلوگیری از این حالت، موارد زیر را سبب می‌شود:

۱- درنتیجهٔ کاهش یافتن جذب آب، ویتریفیکاسیون، کمتر می‌شود.

۲- از افزایش ساقه‌های جانبی، جلوگیری می‌شود.

۳- پتانسیل ماتریکس، تغییر می‌کند(جذب آب، مشکل‌تر می‌شود).

۴- سبب می‌شود که تماس قلمه با مواد غذایی، کمتر شود (افزایش مشکل جذب آب).

۵- در اختیار بودن عناصر ماکرو و میکرو که به محیط کشت اضافه شده‌اند، بسته به غلظت آگار، تغییر می‌کند.

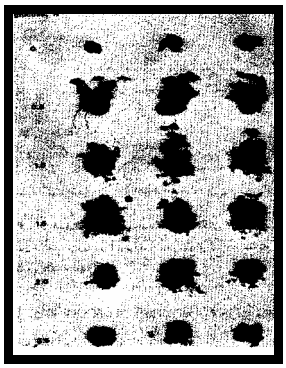
۴-۳-۳) قند

قند جزء بسیار مهمی در هر نوع محیط کشت است، و چون معمولاً شرایط رشد برای فتوسنتز کافی نیست، و یا اصولاً به علت تاریکی، فتوسنتز انجام نمی‌شود، اضافه‌تر کردن قند به محیط زیست، ضروری است. بافت‌های سبز در حالت این‌ویترو، به قدر کافی اتوتروف(خود ساز) نیستند. غلظت CO_2 در داخل لولهٔ آزمایش نیز می‌تواند

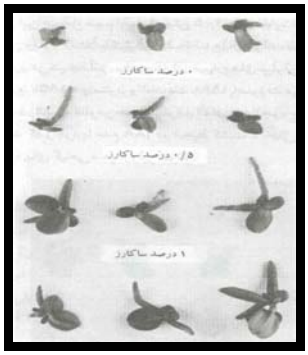
برای فتوسنتز، محدود کننده باشد (گیبسون۱۹۶۷). در عمل، اضافه کـردن CO2 خیلـی مشکل و گران است. در واقع، گاهی تبادلات ضعیف گازی، سبب می‌شـود کـه غلظـت CO2 در لوله‌های آزمایش یا سـایر ظـروف، خیلـی بـالا رفتـه، و در نتیجـه، مـسمومیت ایجاد کند. معمـولاً در کـشت ایـن‌ویتـرو، از سـاکارز بـا غلظـت ۱تـا ۵ درصـد اسـتفاده می‌شود، زیرا این قند نیز به وسیلهٔ گیاه سـنتز شـده و بـه صـورت طبیعـی در گیـاه منتقـل می‌شود. از گلوکز و فروکتوز نیز ممکن است استفاده شود. غلظـت قنـد انتخـاب شـده، بستگی زیادی به نوع و سن مواد در حال رشد، دارد. بـه عنـوان مثـال، جنـین‌هـای بـسیار جوان، به غلظت نسبتاً بالایی از قند، احتیاج دارند. معمولاً با افزایش غلظـت قنـد رشـد و نمو زیاد می‌شود، تا وقتی که به یک حد اپتیمم برسد وسپس در غلظت (خیلی) بالا کـم می‌شود (شکل ۴-۴). رشد گیاه کامل مثل گیاهچه‌های ارکیده نیز، به میزان زیاد، تحـت تأثیر غلظت قند قرار دارد (شکل ۴-۵). ساکارز یا قنـد معمـولی کـه از بـازار خریـداری می‌شود معمولاً کافی است. زیرا قند خالص شده است و طبق آزمایـشات کارخانـه‌هـای سازنده دارای ۹۹/۹۴ درصد ساکارز، ۰/۰۲ درصد آب، ۰/۰۴ درصـد سـایر مـواد(مـواد آلی و همچنین رافینوز، فروکتوز وگلوکز)است. هیچ دلیلی وجود ندارد کـه نـشان دهـد سایر مواد آن، بتوانند در محیط کشت این‌ویترو، سمیت ایجاد کنند. همان گونه که بیـان شد، قند می‌تواند در نتیجه اتوکلاو کردن، تغییراتی پیدا کند که PH یکی از این عوامل مهم است. باید این مسأله را نیز در نظر داشت که طی کـشت ایـن‌ویتـرو(مـثلاً بـا کـشت ریشه) قندها می‌توانند در محیط کشت، تغییر یابنـد. هیـدرولیز سـاکارز در نتیجهٔ آنـزیم اینورتاز (از دیواره‌های سلولی) یا از طریق آنزیم‌های خـارج سـلولی (بـورلتروم۱۹۵۷؛ و ستون و استریت ۱۹۶۸) صورت می‌گیرد. همچنین تغییـر ترکیـب قنـد محـیط کـشت در کشت کالوس هم می‌تواند اتفاق افتد (جورج و شرینگتون ۱۹۸۴) در اینجا به نظـر مـی-رسد که وجود یا عدم IAA در محیط کشت، خیلی مهم است. سایر قندها نیز می‌توانند به وسیلهٔ بافت‌های گیاهی، هیدرولیز شوند.

مارتزکی و همکاران (۱۹۷۱) نشان داده‌اند که هیدرولیز نشاستهٔ خارج سلولی در زمان رشد سوسپانسیون سلولی نیشکر، امکان پذیر است.

مشکل است بتوان گفت اتوکلاو کردن قندها در کشت این‌ویترو، قابل توصیه است یا خیر؟ در منابع هم، روی این مسأله ابهاماتی وجود دارد، در بعضی موارد، اتوکلاو کردن توصیه شده (بال۱۹۵۳) و در مواردی، توصیه نشده است.(استهزل وکاپلین ۱۹۶۹).



شکل ۴-۴: اثر غلظت گلوکز روی تشکیل ساقه های نابجا در تشکیل بافت کالوس گونه بگونیا* Begunia venosa *(پیریک و تیترو ۱۹۸۶). عکس، ۱۲ هفته بعد از کاشت، گرفته شده است.



شکل ۵-۴: اثر فوق العاده غلظت سوکروز(ساکارز) روی رشد گیاهچه هیبرید گیاه *Phalaenopsis* در کشت این ویترو (پیریک و وان نیو و کرک، نتایج منتشر نشده). عکس، ۱۴ هفته پس از کشت، برداشته شده است.

مواد معدنی غذایی

بعد از قند، مواد معدنی، مهمترین گروه مواد غذایی در رشد این‌ویترو، هستند. روش‌های زیادی برای چگونگی ترکیب کردن نمک‌های پرمصرف و کم مصرف، وجود دارد. چوست و همکارانش (۱۹۸۶) برنامه کامپیوتری را ابداع کردند که می‌توان با استفاده از آن، مقادیر نمک‌هایی را که برای یک محیط کشت که خصوصیات اصلی آن (متعلقات یونی،غلظت کامل یونی، PH) شناخته شده است، محاسبه کرد؛ یا برعکس، می‌توان با داشتن ترکیب مقادیر نمک، سایر خصوصیات محیط کشت را به دست آورد. معمولاً از محلول آلی غلیظ ذخیره برای ساختن محیط کشت، استفاده می‌شود، اگرچه امروزه محلول‌های آماده نیز در دسترس می‌باشند . محلول‌های ذخیره باید درحرارت اتاق و در تاریکی، نگهداری شوند. در تهیه محلول‌های ذخیره، ممکن است اضافه کردن نمک‌ها با هم، سبب تشکیل رسوب شود، که برای جلوگیری از این مشکل، بایستی دستورالعمل‌های مربوط به ساخت محلول‌های استاندارد را رعایت نمود. در سال‌های اخیر، از NaFe-EDTA (۳۸-۲۵ میلی‌گرم در لیتر)به عنوان منبع آهن استفاده شده است.

انتخاب مخلوط نمک‌های پرمصرف و کم مصرف، شدیداً به گیاه مورد مطالعه، بستگی دارد. کاربرد محیط کشت موراشی و اسکوگ یا MS به دلیل اینکه بسیاری از گیاهان به آن عکس‌العمل مناسبی نشان می‌دهند، بسیار متداول است. در هر حال، باید توجه داشت که این محیط کشت، الزاماً همیشه برای رشد و نمو، ایده‌آل نیست؛ زیرا میزان نمک در آن خیلی بالاست. به عنوان مثال، گیاه جنس جربرا و *Rhododendron* و *kalmia* (پنل۱۹۸۵) در کشت این‌ویترو، به نمک حساس هستند(پیریک و سگرد۱۹۷۳). برای گیاهان حساسی مثل بعضی از گونه‌های چوبی، للود و مک کون(۱۹۸۰)، محیط کشت WPM (محیط کشت مخصوص گیاهان چوبی) را ارائه کرده‌اند.

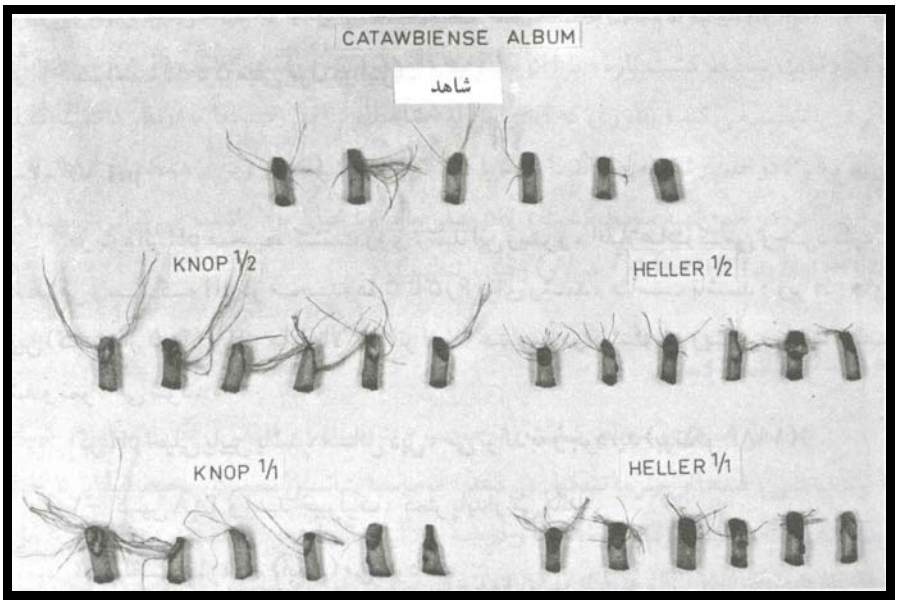
در هنگام انتخاب مخلوط نمک‌های پرمصرف و کم مصرف، باید نکات ذیل را در نظر گرفت:

۱- بعضی اوقات غلظت نهایی مهم است(شکل ۶-۴). غلظت یون‌ها بر حسب میلی‌مول در لیتر می‌باشد. محلول ناپ (۱۹۸۴)یک محیط کشت با نمک ضعیف، و محیط کشت MS یک محیط کشت با نمک قوی است.

۲- اگرچه بعضی اوقات از فرمول ازت آلی استفاده می‌شود، ولی معمول است که ازت، حدود۱۲ تا۶۰ میلی‌مول در لیتر است. بیشتر گیاهان NO_3^- را بر NH_4^+ ترجیح می‌دهند ، اگرچه در بعضی موارد عکس آن هم صادق می‌باشد. لازم است توازن صحیح NO_3^-/NH_4^+ را برای رشدونمو ایده‌آل، پیدا کرد.

۳- اگر گیاه یون‌های NH_4^+ را جذب کند، PH کاهش یافته و ممکن است آگار به صورت مایع درآید و در نتیجه به علت جذب NH_4^+، PH کم شده جذب NH_4^+ به وسیلهٔ گیاه کاهش می‌یابد و جذب ازت در فرم NO_3^- ارجحیت پیدا می‌کند.

۴- غلظت یون‌ها بر حسب میلی‌مول در لیتر، بیانگر این است که نیاز K^+ بین ۲تا ۲۶ میلی مول در لیتر می‌باشد، در حالی که نیاز به $H_2Po_4^-$، Ca^{2+}، Mg^{2+} و So_4^{2-} کم است. (۱تا۵ میلی مول در لیتر).



شکل ۶-۴: اثر ترکیب دو نمک پر مصرف در دو غلظت روی تشکیل ریشه‌های نابجا در قلمه‌های حاصل از ساقه* Rhododendron *(ناپ ۱۸۸۴؛ هلر ۱۹۵۳). نمونه‌های شاهد، بیانگر نمونه‌های عاری از نمک‌های پرمصرف در محیط کشت، است. تشکیل ریشه در حد مطلوب در مورد نمک‌های پرمصرف، و در غلظت یک دوم ناپ(۱۸۸۴) به وقوع پیوسته است. عکس، ۸ هفته بعد از کاشت، گرفته شده است.

(PH)اسیدیته

در بارهٔ اثر PH محیط کشت روی رشد این‌ویترو، اطلاعات کمی وجود دارد. به نظر می‌رسد که PH در محدودهٔ ۵ تا۶/۵ برای رشد، مناسب باشد؛ زیرا PHهای پایین (کمتر از۴/۵) و PHهای بالا (بالاتر از۷) عموماً در کشت این‌ویترو، باعث توقف رشد و نمو، می‌شود.

اگر PH خیلی پایین باشد، مسائل ذیل، می‌تواند به وجود آید (بوتنکو۱۹۶۸):

۱- اکسین IAA و اسیدجیبرلیک، کمتر پایدار می‌مانند.

۲- غلظت آگار، کم(آبکی) می‌شود.

۳- احتمال رسوب نمک‌های خاص (نمک‌های فسفات وآهن)، وجود دارد.

۴- ویتامین B_1 و اسید پانتوتنیک، کمتر پایدار می‌مانند.

۵- جذب یون‌های آمونیم، کند می‌شود.

PH قبل و بعد از اتوکلاو کردن، متفاوت است. اگر PH اولیه، بین ۵ تا۷ باشد؛ معمولاً حدود۰/۳ تا۰/۵ واحد، پایین می‌آید(اسکیروین و همکاران۱۹۸۶). در منابع کشت بافت گیاهی، بندرت از بافرها برای کنترل PH استفاده شده است. گاهی بافر فسفات سورنسون به کار برده شده است. در هر صورت، کاربرد بافرهای فسفاته در اثر اضافه شدن به محیط کشت، باعث تغییراتی خواهد شد. انگلیش و حنان(۱۹۴۵) گزارش کرده‌اند که با PH برابر با ۶، قسمتی از گلوکز در اثر اتوکلاو کردن، به فروکتوز تغییر پیدا می‌کند. به نظر می‌رسد که تبدیل ساکارز به گلوکز و فروکتوز، طی اتوکلاو کردن با PH مرتبط باشد.

در بعضی موارد، از بافرهای MES و TIRS(بنگا و درزان۱۹۸۲) نیز در کشت بافت گیاهی، استفاده شده است. تعداد دیگری از بافرها نیز آزمایش شده‌اند، که به نظر می‌رسد(خصوصاً آنهایی که توسط گیاه تجزیه می‌شوند) سمی باشند.

اگر PH در طول کشت بافت گیاهی، خیلی کاهش یابد، محیط کشت، رقیق می‌شود، ولازم است محیط کشت تازه، با PH مطلوب آماده شود. اغلب کشت بافت، خود حالتی بافری را تنظیم می‌کند؛ به طوری که PH پایین به حد مطلوب می‌رسد. باید در نظر داشت که PH اولیه برابر۶ درحین رشد، می‌تواند تا ۵/۵ یا کمتر از آن برسد(اسکیروین وهمکاران۱۹۸۶).

اگر در حین تهیهٔ محیط کشت، PH خیلی پایین یا خیلی بالا باشد، می‌توان به ترتیب، آن را با NaOH یاHCL (۱تا۰/۱مولار) رقیق، تنظیم کرد.

پتانسیل اسمزی

پتانسیل اسمزی محیط کشت را، مجموع پتانسیل‌های اسمزی آگار و سایر ترکیبات (موادمعدنی، قندها و غیره) تشکیل می‌دهد. محاسبهٔ پتانسیل اسمزی محیط غذایی، خیلی پیچیده است و وزن مولکولی نمک‌ها و درجهٔ حلالیت آنها، هر دو اهمیت دارند. در عمل، پتانسیل اسمزی نهایی را، فقط از طریق اندازه‌گیری، می‌توان

مشخص کرد. بدون شک قندها در مقایسه با نمک‌های پرمصرف اثر بیشتری روی پتانسیل اسمزی دارند. باید در نظر داشت که قند دی‌ساکارید (مثلاًساکارز) توسط اتوکلاو کردن به دو منوساکارید، تغییر می‌کند (هیدرولیزمی‌شود) و در نتیجه پتانسیل اسمزی را تغییر می‌دهد.

سهم قندها و نمک‌های پرمصرف در وضع پتانسیل اسمزی محیط‌های کشت مختلف، متفاوت است (یوشیدا و همکاران۱۹۷۳). پتانسیل اسمزی (برحسب بار، یک بار=10^5 پاسکال) نمک‌های پرمصرف و قند در چند محیط کشت، به ترتیب، به قرارذیل است:

نوع محیط کشت	پتانسیل اسمزی(بار)نمک‌های پرمصرف	قند
وایت	۰/۴۳	۱/۴۶
هیل برانت	۰/۶۷	۱/۴۶
هلر	۰/۹۶	۴/۰۵
موراشی واسکوگ	۲/۲۷	۲/۲۰

اگر پتانسیل اسمزی بیش از حدود$10^5 \times 3$ پاسکال(برابر با ۳ بار) باشد، رشد و شکل‌گیری اندام، بر اثر توقف جذب آب، متوقف می‌شود(پیریک و استیگمانز ۱۹۷۵a). پتانسیل اسمزی محیط کشت را تقریباً می‌توان به سادگی با افزودن مانیتول افزایش داد. مانیتول، یک مادهٔ غیرفعال فیزیولوژیکی است(گرینوود و برلین۱۹۷۳). افزودن مانیتول یک مولار به محیط کشت، باید در واقع پتانسیل اسمزی۲۲/۴- بار را حاصل نماید. امروزه از پلی‌اتیلن گلایکول نیز برای تغییر پتانسیل اسمزی محیط کشت، استفاده می‌شود.

۴-۵)تنظیم کننده های رشد وهـــورمون های گیاهی

از نظر تعریف، هورمون‌ها، ترکیبات آلی هستند که به صـورت طبیعـی در گیاهـان عالی ساخته می‌شوند و روی رشـدونمو، اثـر مـی‌گذارنـد. هورمـون‌هـا معمـولاً در نقـاط مختلف گیاه، فعال هستند. علاوه بر این ترکیبات طبیعـی، ترکیبـات مـصنوعی نیزسـاخته شده‌اند که با انواع طبیعی، مطابقت دارند. مجموع هورمون‌ها و ترکیبات مصنوعی تولیـد شده، تنظیم کننده‌های رشد، نامیده می‌شوند. اساساً هورمون‌ها مـسئول توزیـع ترکیبـاتی هستند که گیاه بیوسنتز می‌کند. این مواد، رشد نسبی همهٔ اندام‌ها را در گیاه، تعیین مـی-کنند.

در کشت این‌ویتروی گیاهان عالی، تنظیم کننده‌های رشد، مخصوصاً اکـسین‌هـا و سیتوکینین‌ها، خیلی بارز هستند. در واقع، می‌توان گفت که غالباً کشت این‌ویتـرو بـدون وجود تنظیم کننده‌های رشد، غیرممکن است. چگونگی تصمیم در مـورد اضـافه کـردن هورمون اکسین و یا سیتوکینین به محیط کشت جهت رشد و یا تقسیم سلولی، بستگی به نوع قلمه و گونه‌های گیاهی دارد. به عنوان مثال، قلمه‌هایی کـه خودشـان اکـسین کـافی تولید می‌کنند، به اکسین اضافی برای رشد و یا تقـسیم سـلولی نیـاز ندارنـد. همچنـین در مورد قلمه‌هایی که سیتوکینین کافی دارند، به سیتوکینین اضافی برای افـزودن بـه محـیط کشت، نیازی نیست. با توجه به رشد سلول‌ها، بافت‌ها، اندام‌ها و غیره، تقسیم بنـدی‌هـای زیر را می‌توان انجام داد:

۱- کشت‌هایی که، به اکسین و یا سیتوکینین، نیاز ندارند.

۲- کشت‌هایی که، فقط به اکسین نیاز دارند.

۳- کشت‌هایی که، فقط به سیتوکینین، نیازدارند.

۴- کشت‌هایی که، هم به اکسین، و هم به سیتوکینین، نیاز دارند.

برای گونه‌هایی که قبلاً مطالعه شده‌اند، در مورد نیاز بافت‌ها یا اندام‌های گیاه مورد نظر، به تنظیم کننده‌های رشد در محیط این‌ویتـرو، بایـد تـصمیم‌گیـری شـود، و مقـادیر

مطلق یا نسبی تنظیم کننده‌های مختلف (اکسین وسیتوکینین) مورد نیاز، مشخص شوند. سایر تنظیم کننده‌ها، مثل جیبرلین و یا اتیلن نیز ممکن است مورد نیاز باشند.

برای تنظیم کننده‌های رشد، ازمحلول‌های ذخیره، استفاده می‌شود. برای مثال، محلول ذخیرهٔ ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر معادل $۱۰^{-۴}$گرم در میلی‌لیتراست، و سایرغلظت‌های کمتر، ازطریق رقیق کردن، به دست می‌آید (یک میلی لیتر از این محلول ذخیره در لیتر، غلظت نهایی $۱۰^{-۷}$گرم درمیلی لیتر را دارد). چنانچه در محیط کشت به مقدار بین ۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کنندهٔ رشد نیاز باشد، مستقیماً به صورت خشک (جامد) اضافه خواهد شد، زیرا نمی‌توان آن را از محلول ذخیره، بدست آورد.

بعضی اوقات، در هنگام حل تنظیم کننده‌ها در آب، مشکلاتی پیش می‌آید. توصیه می‌شود که IAA، IBA و NAA به صورت نمک پتاسیم که بیشتر محلول است، به کار روند. همچنین می‌توان این سه اکسین را به کمک KOH یا NaOH، ۰/۱مولارحل نمود. سیتوکینین‌ها نیز معمولاً به کمک KOH یا NaOH، ۰/۱ مولار حل می‌شوند. این، درحالی است که جیبرلین‌ها رامی‌توان با تکان دادن شدید در آب حل نمود.

محلول‌های ذخیرهٔIAA و کینتین را باید در تاریکی نگهداری کرد؛ زیرا در نور، غیرپایدار هستند. در نتیجه، این دو تنظیم کننده در محیط کشت به وسیلهٔ نور، تجزیه می‌شوند. IBA، NAA، D- ۴ و۲ وba (سیتوکینین) در نور پایداری بیشتری دارند. نگهداری طولانی تنظیم کننده‌های رشد، سبب بروز مشکلات بعدی می‌شود. به عنوان مثالIAA در حالت محلول، به تدریج غیرفعال می‌شود، همچنین IAA به راحتی به وسیلهٔ آنزیم‌هایی نظیر(پراکسیداز، IAAاکسیداز) تجزیه می‌شود.

چنانچه در کشت بافت، از تنظیم کننده‌های رشد، خصوصاً اکسین و سیتوکینین، استفاده شود؛ گاهی اوقات، سازگاری(عادت) پیش می‌آید. سازگاری، پدیده‌ای است که در آن، در کشت این‌ویترو (که در ابتدا به تنظیم کننده برای رشد و یا شکل‌گیری

اندام، نیاز دارد) بعد از مدتی (چند واکشت) دیگر نیازی به تنظیم کننده‌ها نداشته و یا به تنظیم کنندهٔ کمتری نیاز می‌باشد. این حالت، اغلب در کشت کالوس و همچنین در مورد تشکیل جوانه‌های جانبی گونهٔ Vriesea تحت‌تأثیر سیتوکینین، به وجود می‌آید.

به‌طورکلی، سازگاری، یک تغییر دایمی نیست،به طوری که اگر گیاهانی از بافت‌های سازگار شده و ریزنمونه‌ها ایزوله شوند، این نمونه‌ها برای رشد مجدد، به تنظیم کننده‌های رشد، نیاز خواهند داشت. به عبارت دیگر، تغییرات سازگاری در ماهیت اپی‌ژنتیک (تغییرات در فعالیت ژن در مراحل مختلف رشدی گیاه- تنوع- محیطی- اکتسابی) هستند. با این وجود، هورگان(۱۹۸۶) تئوریی ارائه کرده است که طبق آن، اعتقاد دارد در بعضی موارد، سازگاری توارثی است، و ماهیت اکتسابی ندارد. به نظر می‌رسد در بعضی موارد (مثلاً تشکیل ساقه‌های جانبی در خانوادهٔ Bromeliaceae) جداسازی نوک ساقه از یک گیاه بالغ بعد از چند واکشت، دارای اثر تجدید جوانی است. این تجدید جوانی، به کاهش نیاز مجدد به تنظیم کنندهٔ رشد، منجرمی‌شود؛ که در هر حال، با پیر شدن کشت، برگشت می‌کند. بنابراین، پدیدهٔ تجدیدجوانی، تشابهاتی با پدیدهٔ سازگاری، دارد.

کلمه هورمون (Hormone) ریشه یونا نی دارد. ا ین کلمه به معنی محرک است که نخستین با ر در مبحث فیزیولوژی جا نوری به کا ر برده شد. هنگامی که مشخص شد در گیا ها ن نیز مواد محرک رشد وجود دارند واژه هورمون تحت عنوان هورمون های گیا هی (Phytohormone) به کا ر گرفته شد . بررسی های بعدی نشا ن داد که گروهی از مواد در گیا ها ن دارای نقش تنظیم کنند گی هستند به طوری که برخی از آنها اثرات تحریک کنندگی و بعضی اثرات با زدارندگی دارند. این مواد مجمو عا تحت عنوان تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (Plant Growth Regulators) PGR نامیده می‌شوند.

ماده‌ای از نظر فیزیولوژیکی تنظیم کننده رشد محسوب می‌شود که حداقل دارای سه ویژگی زیر باشد .

۱- محل ساخته شدن و محل اثر آن در گیا ه مشخص با شد .

۲- اثرات فیزیولوژیکی و مرفولوژیکی ماده با غلظت‌های کم آن در گیاه ظاهر گردد.

۳- واکنش‌هایی که تحت تا ثیر ماده ایجاد می شوند غیر قا بل برگشت باشند .

هورمون‌ها ترکیبا ت آلی هستند که برای رشد و نمو گیاه لازم‌اند و با غلظت بسیار کم اثرات عمومی یا اختصاصی خود را ظاهر می‌کنند. هورمون‌های جانوری بیشتر در جایگاه ویژه‌ای به وجود می‌آیند و عمل اختصا صی دارند و لی هورمون‌های گیاهی هم در محل ساخت و تمرکز، هم روی اندامهای دیگر مؤثر بوده و اغلب عمل اختصاصی ندارند. با وجود این بین هورمون‌های گیاهی و جانوری مرز چندان مشخصی وجود ندارد.

هورمون‌های گیا هی از راههای مختلف وارد عمل می‌شوند. بعضی از آ نها با تاثیر بر روی سیستم غشایی و هموار کردن راه ورود محلولها عمل خود را ظاهر می‌کنند و عده ای دیگر امکانات لازم را یا برای جلوگیری و یا برای تاثیر گذاری آنزیم‌ها فراهم می‌کنند . آزمایش‌های مختلف نشان داده ا ست که پدیده‌های رشد و نمو در گیاه تحت تاثیر عوامل ژنتیکی، عوامل محیطی، هورمون‌ها، ویتامین‌ها، مواد غذایی و بر هم کنش‌های موجود بین آ نها و غیره است .

هورمون‌ها ممکن است در بر گهای جوان و جوانه‌ها ، میوه‌های جوان و حتی در ریشه ساخته شوند بعضی از آنها مثلا اکسین در برگهای جوان و جوانه‌ها سا خته شده و در مریستم‌های انتهایی سا قه و ریشه به مقدار فراوان تجمع می‌یابند .

هورمون‌های گیاهی در چهار گروه اصلی به شرح زیر تقسیم بندی می‌شوند

۱- اکسین‌ها و جیبرلین ها که افزایش طول یاخته‌ای را تحریک می‌کنند

۲- سیتو کینین‌ها که در تقسیم یاخته‌ای دخا لت دارند .

۳- اتیلن، هورمون گا زی که بر رشد متسا وی القطر ساقه‌ها و ریشه‌ها تا ثیر دارد .

۴- بازدارنده‌های رشد که بین آنها آبسیزیک اسید نقش اصـــلی را ایفا می‌کند.

بیوسنتز ماده تنظیم کننده

دو روش اساسی برای مشخص کردن محل خاص بیوسنتز تنظیم کننده‌های رشد به طـور اختصا صی پذیرفته شده است .

روش اول : پیش ماده تنظیم کننده رشد گیا هی به صورت نشان‌دار شده بـا مـواد رادیـو اکنیو به بافت گیاهی داده می‌شـود و ظرفیـت و تـوان تبـدیل آن بـه تنظـیم کننـده رشـد گیاهی در محل‌های مختلف بررسی می‌شود.

روش دوم : مقا دیر مختلـف تنظـیم کننـده رشـد گیـاهی را در انـدامها و بـا فتهـای خاصی در ارتباط با رشد کنترل می‌کنند .

بیشترین دلایل مناسب بیوسنتز اکسین توسط یاخته‌هـای گیـاهی از بررسـی‌هـای کـشت بافت بدست آمده است .

مشاهدات نشان داده است که بذرهای نا رس می‌توانند جیبرلین را سنتز کنند .

گزارش‌هایی وجود دارد که نقش پلاستیدها را در بیوسنتز جیبرلین‌ها نشان می‌دهد .

محل اصلی بیوسنتز سیتوکینین‌ها در گیاهـان عـا لـی ریـشه هـا و مخـصوصاً راس ریـشه است سایر محل‌هایی که به عنوان محل بیوسنتز سیتوکینین مشخص شـده اسـت شـا مـل بذرهای در حال نمو جنین می‌باشد .

محل بیوسنتز آبسیزیک اسید در سراسر گیـاه پراکنـده اسـت در اثـر تـنش آبـی مقـادیر آبسیزیک اسید در برگ‌ها، ساقه‌ها، جوانـه‌هـا، ریـشه‌هـا و نـوک ریـشه‌هـای جـدا شـده افزایش می یابد و همچنین آبسیزیک اسید در میوه ها و بذرها هم تجمع می یابد .

لایه‌های بشره‌ای قا در بـه بیوسـنتز آبـسیزیک اسـید نیـستند. ایـن مـشاهدات کـه حـدود نود درصد آبسیزیک اسید موجود در برگ در کلروپلاست‌های یاخته‌های مزوفیل

قرار دارد منجر به ارائه این نظریه شد که آبسیزیک اسید در کلروپلاست سنتز می‌شود و صرف نظر از محل بیوسنتز آبسیزیک اسید این ماده در کلروپلاست‌ها تجزیه می‌گردد .
محل‌های مشهور بیوسنتز اتیلن با کمک مواد شیمیا یی ما نند آمینو اتوکسی وینیل گلیسین که بیوسنتز اتیلن را متوقف می‌کند مشخص می‌شود . و تمام یاخته‌های گیاه توان بیوسنتز اتیلن را در برخی از مراحل چرخه زندگی دارند.
در هر حال به علت عدم درک و شناسایی کامل آنزیم های وابسته در بیوسنتز تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بسیار مشکل است که بتوان سرعت‌های بیوسنتز تنظیم کننده‌های رشد را به طور دقیق اندازه‌گیری کرد.
مشخص شده است که موتان‌های دارای کمبود تنظیم کننده رشد گیاهی ارزش زیادی از نظر تشخیص مواد حد واسط در مسیر بیوسنتز این مواد دارند و می‌توان انتظار داشت که این گونه موتان‌ها قادرند در شناسایی آنزیم‌های مسئول تنظیم این مسیرها کمک مؤثری بنمایند.
خا لص سازی آنزیم‌های محدود کننده سرعت در بیوسنتز نظیم کننده رشد گیاهی و تشخیص و شناسایی mRNA هایی که برای این آنزیم‌ها کدگذاری را انجام می‌دهند یک مرحله مهم در بررسی تنظیم کننده رشد گیاهی است .

اثرات فیزیولوژیکی آبسیزیک اسید

اثر آبسیزیک اسید بر بازدارندگی رشد ونمو

آبسیزیک اسید بازدارنده رشد شاخه‌ها است و باعث می‌شود که میانگره‌ها افزایش طولی پیدا نکنند. خفتگی دانه‌ها و جوانه‌ها را طولانی می‌کند به همین علت قبلا آن را دورمین می نامیدند .
ABA یکی از بازدارنده‌هایی است که توسط کلاهک ترشح می شود و احتمالا در زمین گرایی ریشه‌ها دخالت دارد .چون مقدار آن تحت تاثیر روزهای کوتاه افزایش می‌یابد آن را به عنوان پیک یا پیام رسانی در نظر می‌گیرند که خفتگی پوسته‌ای دانه‌ها

را القا می‌کند و یا باعث خفتگی جوانه‌ها در پاییز می‌شود و شرایط غـده‌ای شـدن را نیـز به وسیله روزهای کوتاه مساعد می‌سازد . تراکم آبسیزیک اسید با درجـه خـواب رابطـه مستقیم دارد و تحت اثر تیمارهایی که به بیدار شدن جوانه کمک می‌کنـد کـاهش پیـدا می‌کند .

اثر آبسیزیک اسید بر بسته شدن روزنه‌ها

هنگام کمبود آب ، چند دقیقه پس از، از دست دادن آب , مقدار آن در برگها بـه طـور محسوسی با لا می‌رود و پس از ۴ ساعت به ۴۰ برابر مقـدار اولیـه مـی‌رسـد. اگـر برگهـا مجددا آب بگیرند، مقدار آن پایین آمده و به حد اولیـه مـی‌رسـد بـه نظـر مـی‌رسـد کـه آبسیزیک اسید بعضی از ویژگیهای غشا ء سلولی را تغییر می‌دهد و در نتیجـه یـون‌هـای پتاسیم می‌توانند از غشا گذشته و از سلول خارج شوند و خارج شـدن یـون‌هـای پتاسـیم سبب کاهش غلظت مواد درون سلول های محافظ می‌گردد و آب از سلول‌های محـافظ روزنه خارج شده به سلول‌های اطراف می‌رود، کاهش تورژسانس سلولی در سلول های محافظ روزنه باعث بسته شدن روزنه‌ها می‌گردد. وقتی که کمبود آب بر طـرف گردیـد آبـسیزیک اسـید محـو شـده و از بـین مـی‌رود و در نتیجـه یـون هـای پتاسـیم بـه درون سلول‌های محافظ می‌روند و غلظت مواد در درون سلول افزایش پیدا مـی‌کنـد و پدیـده عکس صورت می‌گیرد .

اثر آبسیزیک اسید بر دفاع در برابر تنش شوری و حرارت

مقدار ABA در واکنش به تنش‌های شوری ، سرما و دماهای بالا کـه هـر یـک باعـث کمبود آب می‌شوند ، افزایش پیدا می‌کند. گمـان مـی‌رود کـه سـنتز ABA در مقـادیر مشخصی تنظیم شده و به دنبال افـزایش ABA تغییـر و تبـدیلی در ظهـور ژنـی گیاهـان تحت تنش صورت می‌پذیرد. همچنین نشان داده شده است که استعمال خارجی ABA قادر است گیاهان چوبی و سخت را در برابر خسارت یخ زدگی و شوری حفظ کند.

اثر آبسیزیک اسید در رسیدن دانه‌ها

ABA در رسیدن دانه‌ها دخالت می‌کند و شرایط آن را مساعد می‌سازد، ولی بر عکس، جوانه زنی دانه را به تأخیر می‌اندازد غلظت آبسیزیک اسید در میوه‌ها بیشتر از دانه است به همین علت وقتی که دانه‌ها در درون قسمت گوشتی میوه‌ها قرار دارند آبسیزیک اسید موجود در گوشت میوه از رویش دانه در درون میوه جلوگیری می‌کند. اگر میوه هسته‌داری را که به گیاه متصل است (یا از گیاه جدا شده است) در ماسه مرطوب قرار دهند تدریجاً آبسیزیک اسید میوه وارد ماسه مرطوب می‌شود و مقدار آبسیزیک اسید در بخش گوشتی میوه کاهش می‌یابد و پس از مدت کوتاهی هسته در درون میوه رویش خود را آغاز می‌کند .

اثر آبسیزیک اسید در تشکیل گل

اسید آبسیزیک به طور غیر مستقیم در تشکیل گل در گیاه مؤثر است. تیمار با اسید آبسیزیک باعث تحریک خفیف ولی منظم رشد گل در گیاهان کوتاه روز شده تشکیل گل را در کنوپودیوم به طور کامل القا می‌نماید.

اسید آبسیزیک با غلظت زیاد از تشکیل گل در قهوه ، زیتون جلوگیری کرده و یا آن را به تاخیر می اندازد. بعلاوه این ماده مانع بنیان گذاری گل در گیاه بلند روز لولیوم شده و در گیاه کانابیس اثر جیبرلیک اسید را که باعث تشکیل گلهای ماده می‌شود خنثی می‌کند .

از نظر فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی بین دوره‌های رویشی و زایشی در گیاهان رقابت وجود دارد به این معنی که در بسیاری از گیاهان برای شروع دوره زایش لازم است که دوره رویشی کند شده و یا متوقف گردد. از این رو آبسیزیک اسید می‌تواند به طور غیر مستقیم در تشکیل گل در برخی از گیاهان دخالت داشته باشد.

اثر آبسیزیک اسید در سنتز اسیدهای نوکلئیک و پروتئین ها

مطالعاتی که با استفاده از سیستم آلفا – آمیلاز در لایه‌های حاوی آلورون جو انجام گرفته نشان می‌دهد که اسید جیبرلیک باعث شروع سنتز آنزیم‌های جدید شده و اسید آبسیزیک مانع انجام این عمل می شود. بعلاوه آکتینومیسین، در تجربیات کوتاه مدت، اثر کمی در تولید آمیلاز داشته در صورتی که ترکیبات بازدارنده سنتز پروتئین‌ها و اسید آبسیزیک دارای عمل بازدارندگی شدید می‌باشد. این تجربیات مداخله اسید آبسیزیک را در سطح ترجمه نشان می‌دهد .

پیرسون و وارنیگ در سال ۱۹۶۹ مشاهده نمودند که اسید آبسیزیک اثر بازدارندگی قابل توجهی بر روی کروماتین داشته مانع سنتز DNA و تمام گونه های RNA می‌شود ولی RNA ریبوزومی در مقابل این ماده حساسیت بیشتر و RNA محلول نسبت به آن حساسیت کمتری از خود نشان می‌دهد به عقیده این محققان اسید آبسیزیک ممکن است اختصاصاً مانع انجام عمل mRNA هایی که سنتز بعضی از آنزیمها را کد می‌کنند بشود و این عمل را فقط با جلوگیری از اتصال آنها به ریبوزومها که بدون آن واحدهای پلی زومی تشکیل نشده و سنتز پروتئین انجام نمی گیرد انجام دهند.

مکانیسم عمل آبسیزیک اسید

نقش اصلی آبسیزیک اسید در گیاهان احتمالا مربوط به بسته شدن روزنه‌ها است هنگامی که گیاه در معرض تنش آبی قرار می‌گیرد یا هنگامی که غلظت گاز کربنیک در سلول‌های محافظ در گیاه زیاد می‌شود مانند شب که فتوسنتز متوقف می‌گردد و تنفس انجام می‌شود مقدار آبسیزیک اسید افزایش پیدا می‌کند .

اثر بازدارنده آبسیزیک اسید بسیار مهم است این ماده در حقیقت نوعی ماده ضد جیبرلین است که از طویل شدن میان گره‌ها جلوگیری کرده در نتیجه رشد ساقه را به تاخیر می‌اندازد. این ماده روی کلئوپتیل و در کشت بافت گیاه نیز مؤثر است.

آبسیزیک اسید در خواب دانه‌ها و جوانه‌ها مؤثر بوده و به عنوان یک عامل خزان کننده شناخته شده است.

آبسیزیک اسید بازدارنده‌ای است که از طریق کلاهک ریشه در گیاه منتشر می‌گردد و لذا گفته می‌شود که در ژئوتروپیسم یا زمین گرایی دخالت دارد. احتمالا اثرات آبسیزیک اسید عمومی بوده و با اکسین نیز اثر متقابل دارد.

چون در دوره‌های تناوب نوری کوتاه روزی مقدار آبسیزیک اسید در گیاه زیاد می‌شود گروهی از پژوهشگران عقیده دارند که این ماده به عنوان یک پیک در فصل پاییز خواب جوانه ها و دانه‌ها را القا می‌کند و غده‌ای شدن را در روزهای کوتاه تحریک می‌نماید. لذا در گیاهان روز بلندی که در شرایط روز کوتاهی قرار می‌گیرند باعث توقف نمو گل در گیاه می‌شود .

در شرایط کمبود آب در گیاه آبسیزیک اسید فراوانی ساخته می‌شود که سبب بسته شدن روزنه‌ها می‌گردد. آبسیزیک اسید در تمام بافت‌های گیاه وجود دارد و با مواد محرک رشد گیاهی اثر متقابل دارد و لذا اثرات آن در جهت بازدارندگی است . با تغییر غلظت ماده محرک یا ماده بازدارنده رشد فعالیت‌های رشد و یا بازدارندگی در گیاه دیده می‌شود. مثلا با افزودن مقداری ماده محرک رشد به گیاه اثر بازدارندگی آبسیزیک اسید برطرف می‌گردد.

در مواردی مثل رویش دانه کاهو و رشد گیاه عدسک آبی اکسین از اثر بازدارندگی آبسیزیک اسید جلوگیری می‌کند و به نظر می‌رسد که در این رابطه مواد محرک رشد دیگری به طور مستقیم تر ی دخالت می‌کنند.

در مراحل بلوغ و رسیدن دانه مقدار آبسیزیک اسید تدریجا در دانه‌ها افزایش می یابد که به خواب دانه کمک می‌کند. دانه‌هایی که نیاز به استریفیکاسیون دارند در مراحل استریفیکاسیون میزان آبسیزیک اسید در آنها کاهش می‌یابد و مقدار جیبرلین در آنها افزایش پیدا می‌کند در مراحل خواب و فعالیت جوانه‌ها نیز این تغییرات غلظت

آبســـیزیک اسید و جیبرلین مشاهده می‌شود. در برگهـای گیاهـانی کـه تحـت شـرایط تنش مانند خشکی و یا غرقابی خاک، کمبود آب و کمبود مواد معدنی، صدمه و آسیب و زخم و غیـره قرار می‌گیرند غلظت آبسیزیک اسید افزایش پیـد ا مـی‌کنـد. آبـسیزیک اسـید در تـسریع پیـری در گیـاه دخالـت دارد. شـروع پیـری در گیـاه بـا مـسدود شـدن روزنه‌های هوایی همراه است. در برگهای مسن مقدار آبسیزیک اسید به طور فزاینده ای افزایش پیدا می‌کند که با آغاز پیری همراه می‌باشد. علایم پیری مانند تحریک کلروفیل و کاهش آن کم شدن شدت فتوسنتز، تغییر در متابولیسم نوکلئیک اسیدها و پرو تئین‌هـا آثاری هستند که آغاز کننده پیری مـی‌باشـند و علـت بـــروز آنهـا در گیـاه مـی‌توانـد آبسیزیک اسید باشد هر چنـد کـه ایـن تغییـرات مرحلـه‌ای از زنـدگی رشـدی گیـاه محسوب می‌شوند.

اثر اکسین بر رشد سلول

اکسین باعث بزرگ شدن سلول‌ها و در غلظت بالای ۰/۱ میلی مول در مورد سلول‌های توتون می‌تواند موجب هیپرتروفی سلول‌ها شود. ولی معمولا بر افزایش طولی سلول اثـر دارد.

اثر اکسین بر اندامهای مختلف به شرح زیر می‌باشد .

الف: اثر اکسین بر کلئوپتیل

چنانکه در آزمون ونت گفته شد اکـسین بـه غلظـت ۱ میکرومـول($۲*۱۰^{-۷}$ گـرم در لیتر) رشد را تحریک می‌گند .

ب- اثر اکسین بر ساقه ها

اکسین موجب رشد طولی بسیار شدید سلول‌هایی که در منطقه رشد زیر انتهایی سا قـه قرار دارند می‌شود با مقدار حدود ۵ تا ۵۰ میکرومول ($۱۰^{-۶}$ تا $۱۰^{-۵}$ گرم در میلی لیتر) بیشترین اثر را دارد و اگر غلظت از این بیشتر شود اثر سمی خواهد داشت.

ج- اثر اکسین بر ریشه ها

اکسین در مقدار ۰/۰۵ تا ۰/۵ میکرومول یا 10^{-8} تا 10^{-7} گرم در میلی لیتر اثری بازدارنده دارد . اکسین در مقادیر ضعیفتر بی اثر است و در مقادیر بسیار پا یین حدود (10^{-12} تا 10^{-9}) اثر مثبت نا مشخص دارد .

د- اثر اکسین بر برگها

اکسین بر رشد پهنک برک دولپه‌ایها اثر بازدارنده دارد و این اثر با مصرف مقدار قویتر اکسین بیشتر می‌شود بر عکس رشد دمبرگها و نیام مانند سا قه به وسیله اکسین تحریک می‌شود . پهنک تک لپه‌ای‌ها مانند ساقه‌ها عمل می کنند.

اثر اکسین بر تروپیسمها

الف- نور گرایی

نورگرایی نتیجه اختلاف رشد بین سطح تا ریک و روشن کلئوپتیل است و خمیدگی نتیجه توزیع نا منظم اکسین است .

آزمایشا ت نشا ن می دهند که پس از اینکه کلئوپتیل به مدت سه سا عت در معرض نور یک جانبه قرار گرفت ۳۰٪ از کل اکسین در سطح روشن شده در مقا بل ۷۰٪ اکسین در سطح تا ریک است. بنا بر این دلیل اینکه سطح تاریک بیشتر دراز می‌شود واضح است، زیرا اکسین به مقادیر فیزیولوژیک اثر مثبت بر دراز شدن کلئوپتیل دارد. و در مورد ریشه‌ها پدیده‌ها بر عکس‌اند زیرا افزایش اکسین در ریشه باعث کاهش رشد می‌شود بنابراین سطح تاریک که اکسین بیشتری دارد کمتر رشد می کند و سطح مقابل آن رشد بیشتری کرده و از نور دور می‌شود .

حال با ید بدانیم که نور چگونه توزیع اکسین را تغییر می‌دهد .

ساده ترین فرضیه این است که قبول کنیم در طرفی که بیشتر روشن شده است اکسین بر اثر اکسایش نوری در مقا بل نور تجزیه می شود این امر گا هی در شرایط طبیعی با روشنایی خیلی قوی و قرار گرفتن گیاه به مدتی طولانی در معرض نور قا بل قبول است

ولی در مورد نخستین خمیدگی فتوتروپیسمی کلئوپتیل قابل قبول نیست زیرا در این مورد روشنایی بسیار ضعیف و مدت آن بسیار کوتاه است و این امر نمی‌تواند توجیه کند که چرا پذیرنده محرک در نخستین خمیدگی راس کلئوپتیل است و نه در منطقه افزایش طولی بنا بر این به این نتیجه رسیده اند که نور موجب جا به جایی اکسین از سطح روشن شده به سوی سطح تا ریک می شود . مصرف IAA نشا ندار با C^{14} در مورد مقا طع کلئوپتیل گندم که از بالا به وسیله IAA رادیواکتیو تغذیه شده‌اند این نتیجه را تایید می‌کند برای تحریک جابه جایی اکسین حدود ۱۰۰ لوکس روشنایی که به طور یک جانبه به کار برده شود کفایت می‌کند .

محل تاثیر نور کا ملاً نزدیک محل تشکیل اکسین در دو سه میلیمتر اولیه بالای کلئوپتیل یعنی منطقه‌ای است که در آن جابه‌جایی‌های اکسین از یک سطح به سطح دیگر به آسانی صورت می‌گیرد .

این مسئله که پذیرنده‌های نوری چگونه نیرویی ایجاد می‌کنند که موجب کشیده شدن اکسین می‌شود هنوز روشن نیست .

ب- زمین گرایی

زمین گرایی حرکت یک اندام گیاهی در واکنش به نیروی ثقل می باشد اکسین در سطح زیرین یک کلئوپتیل افقی بیش از سطح زبرین آن وجود دارد در نتیجه سطح زیرین رشد بیشتری کرده و از زمین دور می‌شود (زمین گرایی منفی در سا قه) مطالعات انجام شده بر روی ریشه نشان می‌دهد که غلظت اکسین در سطح زیرین ریشه جوان که به طور افقی قرار گرفته باشد بیشتر است و چون رشد ریشه در غلظت زیا د اکسین کم می‌شود سطح بالایی ریشه بیشتر رشد کرده و ریشه به طرف زمین رشد می‌کند (زمین گرایی مثبت).

اثر اکسین بر لایه زاینده

اکسین بر روی مریستمهای اولیه عمل نمی‌کند ولی در تولید مریستم‌های ثا نویه دخالت می‌کند. مثلا اگر اکسین بر روی گیاه آفتا بگردانی که رأس آن قطع شده قرار گیرد، فعالیت زاینده مشخصی به طرف قاعده گیا ه منتشر می‌شود ، ولایه زاینده آبکش چوب تولید کرده و در رشد قطری اندام شرکت می‌کند اکسین اثر بافت زایی دارد که منجر به تمایز عناصر هادی می‌شود .

اثرات اکسین بر کشت بافتها

اثر اکسین بر با فتهایی از نوع لایه زاینده برای غلظت ۱ میکرومول ($۱۰^{-۷}$ تا $۱۰^{-۶}$ گرم در میلی لیتر) بیشترین حد را دارد. بنا براین در همان حدی است که موجب افزایش طولی سا قه می‌شود . با فتهای غده ای مثل بافت کرون گال نسبت به اکسین حساس نیستند ولی در مقا دیر زیا د اکسین تحت تاثیر سمیت آن قرار می‌گیرند. این امر نشان می‌دهد که با فتهای غده ای تا اندازه‌ای اکسین دارند که تکثیر آنها را تأ مین می‌کند و افزودن اکسین برون زا به آسانی منجر به فزونی اکسین در درون بافتها می‌شود .

گوتره نشان داده است که کشت دراز مدت بعضی بافتها مانند هویج در حضور مقدار بالای اکسین ($۱۰^{-۶}$ گرم در میلی لیتر) موجب تغییر شکل یا آنرژی می‌گردد. این امر در واقع غده ای شدن به طریق شیمیایی است که ما نند غده‌ای شدن با کتریایی، منجر به القای سنتز اکسین و کسب قابلیت تکثیر در آزمایشگا ه می‌شود بدون آنکه اکسین از خارج به آن افزوده گردد.

اثرات اکسین بر نمو میوه‌ها و بکرزایی (پارتنوکارپی)

رشد فرابر میوه های گوشتی از اثرات دیگر اکسین می با شد پس از گرده افشانی تکثیر فرابر تحریک می شود، و خود تخمدان مقدار زیادی اکسین ترشح می‌کند با کا ربرد اکسین به جای گرده افشانی می‌توان میوه‌های بدون دانه بدست آورد . برای این منظور

پیش از لقاح یعنی قبل از تشکیل دانه به تخمدان یا نهنج اکسین می‌دهند .

اثر اکسین بر ریزش برگها و گلها

علت ریزش برگ و میوه این است که لایه جدا کننده تشکیل می‌گردد که در اثر ژله ای شدن، سلول ها از یکدیگر جدا می‌شوند و فقط آوند ها با قی می‌مانند و سپس در اثر کوچکترین حرکت، میوه و برگ می‌ریزند. اگر بر روی دمبرگی که پهنک آن جدا شده است کمی اکسین ریخته شود دمبرگ بدون پهنک برگ تا مدتی دوام می‌آورد کار برد طولانی اکسین (بیش از ۶ سا عت) نه فقط با ز دارنده ریزش برگ نیست بلکه آن را تسریع می‌کند. در مورد دمگلها پدیده دقیقا به همین صورت روی می‌دهد و در با غبا نی با پا شیدن فراورده‌هایی از نوع اکسین مصنوعی از سقوط زودرس گلها یا میوه‌ها جلوگیری می‌کنند برعکس مقا دیر خیلی قوی اکسینهای مصنوعی به عنوان مواد ریزنده برگها به کار می‌روند.

اثر اکسین بر تمایز

اکسین ها در شکل زایی و اندام زایی گیا ه مؤثرند و این رویدادها تحت تا ثیر دزهای مختلف اکسین صورت می گیرند.

غلظتهای ضعیف اکسین (حدود $۱۰^{-۸}$ گرم در میلی لیتر) در حضور سیتوکینین آغاز طرح ریزی جوانه‌ها را امکان پذیر می‌سا زند. غلظتهای بالاتر، نمو این طرح‌های اولیه را متوقف می‌کند و طرحهای اولیه به حا لت زندگی کند در می‌آیند. از این امر استفاده‌های کا ربردی می نمایند مثلاً در مورد سیب زمینی، به منظور جلوگیری از نمو زودرس جوانه‌ها یا چشمهای آن در طی حمل و نقل و یا ذخیره کردن، اکسین به کار می‌برند .

پیوند زدن جوانه گیاه به بخشهای ریشه گیاه سبب می‌گردد که نوع سلول‌های پارانشیمی در آن تغییر پیدا کرده و به یک لایه زاینده تبدیل شود و دسته های چوب

آبکش را تولید کند. این تجربه در کا سنی هندی انجام شده و نشا ن داده شده است که جوانه باعث فعال شـدن عـده‌ای از سـلول هـا شـده و بـا فـت چـوب و آبکـش را تولیـد می کند .

اثر اکسین بر چیرگی راسی (غلیه انتهایی)

مدتها قبل از اینکه تنظیم رشد به وسیله مواد رشد گیـاهی، کـشف شـود گیـاه شناسـان می‌دانستند که جوانه انتهایـی با عث مهار جوانـه‌هـای جـانبی مـی گـردد. آزمایـشهای اولیه نشان داد که وقتی جوانه انتهایی برداشته شود، جوانه‌های جانبی رشـد مـی کننـد. بـا این حال در هر زمان تنها یکی از جوانه‌هـای جـانبی غلبـه پیـدا کـرده، رشـد بعـدی جوانه‌های جانبی را مهار می کنند. به دنبال کشف اکسین نشان داده شد که مقـادیر نـسبتا زیاد این هورمون در نوک ساقه وجود دارد .

امروزه تصور می کنند که احتما لا باز دارندگی نمو جوانه‌های جانبی اساسـا مربـوط بـه کمبـود سـیتوکینین‌هاسـت در واقـع سـایر تنظـیم کننـده‌هـای رشـد ماننـد جیبـرلین‌هـا و آبسیزیک اسید در این پدیده مداخله می کنند .

اثر اکسین بر ریشه زایی

اکسین‌ها در ریشه‌زایی مؤثرند . غلظت‌هایی از اکـسین کـه در رشـد سـا قـه مؤثرنـد در رشد ریشه اثر باز دارندگی دارند ولی در عین حال دز بـالای اکـسین یعنـی حـدود $۱۰^{-۵} - ۱۰^{-۶}$ میلی‌گرم در سا نتی متر مکعب با فعا ل ساختن تقسیم یاخته‌های دایـره محیطیه ایجاد ریشه‌ها را تحریک می کنند. این اثر یکی از کاربردهای اصـلی اکـسین یـا مواد مشابه آن را تشکیل مـی‌دهـد کـه بـرای آسـا نـی قلمـه زدن بـه کـار مـی‌رود حتـی گونه‌هایی که سابقاً قلمه زدن آنهـا امکـان پـذیر بـه نظـر نمـی‌رسـید ماننـد بازدانگـا ن را اکنون می توانند به کمک مخلوط هورمون‌ها قلمه بزنند .

با وجود این مقادیر اکسین با ید با دقت بسیار محاسبه شود و مدت به کا ر بردن آنها در قاعده قلمه‌ها نباید طولانی با شد زیرا اکسین‌ها از رشد ریشه جلوگیری می کنند اگـر

برخورد با اکسین ظهور ریشک ها را آسان می‌کند بر عکس از نمو طرحهای اولیه جوان جلوگیری به عمل می‌آورد . در ریشه زایی، نفتالین استیک اسید (NAA) مؤثرتر از IAA است .

پودرهای تجارتی که در آنها قلمه‌ها را می‌خوابانند تا تولید ریشه را آسان نمایند شامل مخلوط IBA و NAA هستند در واقع، توان ریشه زایی اکسین نمی‌تواند تنها به اکسین نسبت داده شود .

اگر قلمه درخت لیمو را در محلول IAA قرار دهند به آسانی ریشه تولید می‌کند ولی اگر انتهای قلمه را که ریشه داده است قطع کنند و آن را دوباره در محلول IAA بگذارند قادر به تولید ریشه نیست. بنابر این تصور می‌کنند که اکسین با همکاری یک یا چند ماده متمایز کننده دیگر عمل می‌کند. مجموعه موادی را که در تولید ریشه مؤثرند ریزوکالین می‌گویند. تصور می‌کنند که موادی معمولی به عناوین مختلف در تمایز ریشه‌ها همکاری می‌کنند از جمله ویتامین‌هایی مانند تیامین و بیوتین، آمینو اسیدهایی مانند آرژینین و به ویژه ترکیبات اورتودی فنولی مانند کا فئیک اسید.

اکسین های سنتتیک

ترکیبات سنتتیک خا لص بسیاری وجود دارند که به علت دارا بودن خواص فیزیولوژیکی مشا به IAA می‌توان آنها را اکسین نامید .

اکسین‌های سنتتیک از لحاظ شیمیایی گوناگون‌اند ولی برای آسانی کار می توان آنها را به پنج گروه اصلی تقسیم بندی کرد: ایندول اسیدها، نفتالن اسیدها، کلرو فنوکسی اسیدها بنزوئیک اسیدها، مشتقا ت پیکو اسید. مثالهای نخستین گروه ایندول پروپیونیک اسید و ایندول بوتیریک اسیدند. اما به نظر می‌رسد که این دو ترکیب انحصار اسنتتیک نباشند چون وجود آنها در چند گونه به طور طبیعی گزارش شده است .

گروه دوم با نفتالن استیک اسید و بتافنوکسی استیک اسید مشخص می‌شوند که هر دو آنها از اکسین‌های سنتتیک پایدارند.

معروفترین اکسین های سنتتیک عبارت‌اند از:

گروه کلرو فنوکسی اسید یعنی۲،۴- دی کلروفنوکسی استیک اسید (D- ۴ ,۲) ۲ , ۴ , ۵ – تری کلرو فنوکسی استیک اسید (T - ۵ , ۴ , ۲) و ۲- متیل – ۴ – کلرو فنوکسی استیک اسید تعدادی از اکسین‌های حقیقی که باعث افزایش رشد به شیوه‌ای مشابه IAA در غلظت‌های فیزیولوژیکی می‌شوند، وقتی که در غلظت‌های بالا به طور مناسب به کار برده شدند به عنوان علف کش شناخته می‌شوند .

اکسین‌های سنتتیک متداول در گروه بنزوئیک اسید ۲, ۳, ۶, و ۲ , ۴ , ۶ – تری کلرو بنزوئیک اسیدها و دی کامبا هستند که مورد آخری یک علف کش قوی به شمار می‌رود .

این ماده در چندین گونه از گیاهان چند ساله دارای ریشه عمیق مانند پیچک صحرایی و سیرسیوم که به راحتی توسط (D -۴ , ۲) کشته نمی‌شوند مؤثر است .

از میان معروفترین علف‌کش های گروه پیکولینیک اسید، نوعی اکسین به نا م پیکو رام یا توردون (۴- آمینو – ۳ , ۵ , ۶ – تری کلرو پیکولینیک اسید) را که از قدیمترین علف کش‌های انتخابی است می‌توان نام برد.

جایگاههای عمل اکسین

دو عقیده اساسی در رابطه با جایگاه عمل اکسین وجود دارد . وجود یکی از این مراکز بر روی دیواره یاخته به عنوان جایگا ه عمل اکسین، بر اساس عقیده‌ای است که قبلا توسط آلبرشیم و همکارانش پی ریزی شده است عقیده دیگر بر روی متابولیسم نوکلئیک اسید متمرکز شده است. بسیاری از پدیده‌های نرمی دیواره یاخته‌ای ممکن است وابسته به تیمار اکسین به شیوه ای مستقل از فعالیت‌های هسته‌ای باشد .

اکنون ما باید در ابتدا مدارکی را بررسی کنیم که نشا ن می‌دهند اکسین عمل هورمونی خود را از طریق اثر بر نوکلئیک اسید و متابولیسم پروتئین اعمال می‌کند. سپس پا سخ‌های سریع در مقابل اکسین را مورد بحث قرار خواهیم داد که بستگی به اثر مستقیم هورمون بر نوکلئیک اسید یا متابولیسم پروتئین ندارد .

اثرات اکسین بر نوکلئیک اسید و متابولیسم پروتئین

اکسین در بیوسنتز برخی از آنزیم ها مثل سلولاز و پراکسیداز مؤثر است اکسین در مرحله نسخه برداری دخالت کرده و در این مرحله آنزیم RNA پلی مراز را فعال کرده تا از روی RNA, DNA بسازد. در حقیقت اکسین در بیوسنتز DNA دخالت نمی‌کند بلکه در مرحله نسخه برداری اثر می گذارد . در مرحله‌ای که دسترسی بافت گیاهی به اکسین مدت کمی در حدود ۱/۵ تا ۳ ساعت است اکسین بر روی فعالیت و مقدار پلی مراز اثری ندارد. این مورد با بافت‌های شاهد تأیید می‌گردد. اگر این پلی مرازهای ریشه‌های دارای اکسین را استخراج کرده و بر روی کروماتین ریشه عدس اثر بدهند، ملاحظه می شود که کروماتین به پلی مراز حساس شده نسخه برداری صورت می‌گیرد. در نخستین مرحله اکسین بر روی پلی مراز اثری ندارد و هیچ گونه تفاوتی بین پلی مرازهای جدا شده از ریشه‌های شاهد و تیمار شده مشاهده نمی‌شود . اگر پلی مرازهای جدا شده را بر روی کروماتین جدا شده قرار دهند، نسخه برداری سریع‌تر انجام می‌شود. اکسین باعث سست شدن پیوند DNA و هیستون می‌گردد و به این ترتیب دسترسی DNA به پلی مرازها آسان‌تر می‌شود .

این موضوع در سال ۱۹۷۰ بر روی ریشه‌های عدس مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده است که بین IAA و مقدار RNA یک رابطه مستقیم و بین هورمون مذکور و RNase یک رابطه معکوس وجود دارد بعلاوه در سا ل ۱۹۶۵ نشا ن داده شد کهوپاسخ‌های رشدی حاصل از اثر اکسین به سنتزRNA

و پروتئین در سلول بستگی و اکتینومیسین D هر دو مانع ظهور اثر تحریک کننده در رشد طولی قطعات ساقه نخود می‌شود .

کی . جی. ال و همکا رانش کارهای وسیعی را روی اثرات اکسین بر نوکلئیک اسید و متابولیسم پروتئین در قطعات در حال بلوغ و دراز شدن هیپوکوتیل گیاهکهای سویا انجام دادند .

در این کارها اکسین موجب افزایشی قابل توجه در سنتز تما م انواع RNA به ویژه افزایش شدیدی در rRNA شد . اما از آنجا که rRNA و tRNA دارای عمر طولانی تری نسبت به mRNA هستند، انتظار می رود که آنها انواعی باشند که در پاسخ به اکسین در مدت زمان طولانی استفاده، انباشته می‌شدند.

تصور بر این است که mRNA های حاصل از اثر اکسین در سنتز H^+ – آتپاز دخالت می‌کنند و با سنتز H^+ -آتپاز جدید در اسیدی شدن دیواره نقش دارند به طور کلی در فرضیه جدید معتقدند که اکسین اولاً فعال سازی H^+ – آتپازهای موجود را بر عهده دارد ثانیاً موجب سنتز H^+ – آتپاز جدید نیز می شود.

واکنش‌های سریع به اکسین

بعضی از پا سخ‌های با فتها به اکسین به اندازه‌ای سریع‌اند که مانع از هر گونه وابستگی به اثر اکسین بر فعالیت ژن می‌گردند . مثال‌هایی از پاسخ بسیار سریع به اکسین شامل موارد زیرند

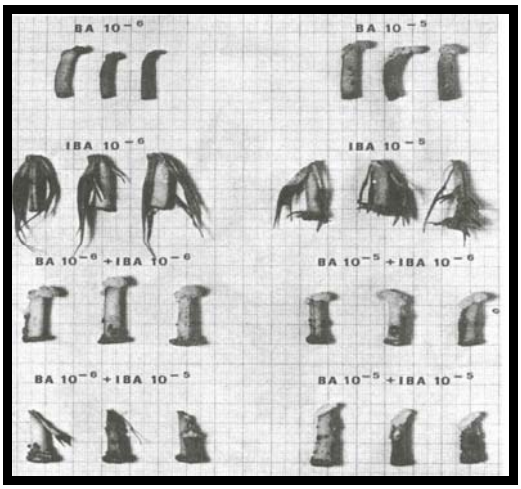
- افزایش طول قطعات کلئوپتیل و قطعات ساقه که کمتر از ۱۵ دقیقه پس از حضور غلظت افزایش دهنده رشد، قابل مشاهده است .
- جریان پرتوپلاسمی که در دو دقیقه یا کمتر به IAA پا سخ می‌دهد .
- افزایش در میزان تنفس که اغلب حدوداً ۳۰ دقیقه پس از افزودن اکسین رخ می‌دهد

در پاسخ‌های سریع معروف در مقابل اکسین، مشخصا اعتقاد بر این است که زمـا ن ایـن پاسخ‌ها کمتر از زمـان مـورد نیـاز بـرای رونویـسی، ترجمـه و عمـل فـراورده یـک ژن (آنزیم) است .

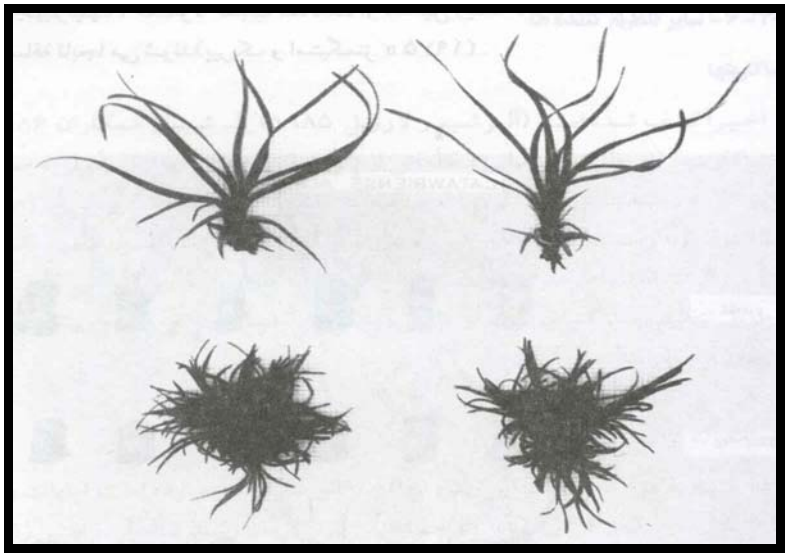
رونویسی به تنهایی به ۲ تا ۱۰ دقیقه زمان نیا ز دارد و ترجمه کـه مونتـاژ پلـی پپتیـدها بـر روی ریبوزومهاست، نیا زمند ۱/۵ تا ۵ دقیقه زمان اضافی است.

۴-۵-۳) سیتوکینین

سیتوکینین‌ها غالباً برای تحریک رشد و نمو، به کار می‌روند؛ کینیتین،BA، ۲ip و PBA استفادهٔ متداول دارند. این هورمون‌ها، به ویـژه اگـر تـوأم بـا یـک اکـسین اضـافه شـوند (شـکل۴-۹)، باعـث تحریـک تقـسیم سـلولی مـی‌شـوند. درغلظـت‌هـای بـالا (۱-۱۰میلی‌گرم در لیتر) باعث تشکیل ساقهٔ نابجا می‌شوند؛ اما معمـولاً از تـشکیل ریـشه ممانعت می‌شود. آنها از طریق کم کردن چیرگی انتهایی باعـث تحریـک تـشکیل سـاقهٔ نابجا (شکل ۱۰-۴) و عقب افتادگی پیری، می‌شوند.



شکل۹-۴: اثر BA و IBA (غلظت برحسب گرم در میلی لیتر) روی قلمه حاصل از دمبرگ جربرا Gerbera jamesonii غیر قطبی قرار داده شده است (پیریک و سرمبرز ۱۹۷۳). BA به تنهایی باعث تشکیل کالوس شده، در حالی که IBA به تنهایی باعث تشکیل ریشه نابجا شده است، وقتی BA و IBA هر دو با هم به کار برده شده باشند، تشکیل کالوس به هنگام بالا بودن غلظت BA افزایش یافته است (سومین ردیف از بالا). عکس، ۸ هفته بعد از جداسازی، گرفته شده است.



شکل ۱۰-۴: رشد و نمو ساقه‌های قطع شده گیاه Vriesea، ردیف بالا: شاهد، هیچ سیتوکینینی در ماده غذایی نیست. ردیف پایین: ۰/۰۸ میلی گرم در لیتر BA در ماده غذایی. BA چیرگی انتهایی را شکسته و متعاقب آن، شاخه‌های جانبی بخوبی نمو می‌کنند. عکس، ۸ هفته بعد از: سیتوکینین ها در تمام مراحل زندگی گیاه از رویش دانه تا تشکیل دانه مؤثرند.

اثرات فیزیولوژیکی سیتوکینین‌ها

تقسیم سلولی و تشکیل اندامها: عمـــل مهم سیتوکینیـــن‌ها در گیاهـان تحریـک تقـسیم سلولی است . ژابلونسکی و اسکوک نشان دادند که بافـت پینـه‌ای مغـز سـاقه توتـون در واکنش به کینتین یا تنها IAA رشد می‌کند و برای ادامه رشد بافت مغز ساقه باید هر دو ماده کینتین و IAA در محیط کشت حضور داشته باشند. امروزه مشخص شـــده اسـت که با تغییـــر نسبت IAA به سیتوکینین می‌توان به یکی از اندامهای بافت پینه، ریشه یا ساقه دست یافت. نسبتهای بالای سیتوکینین برای تشکیل جوانه و نسبتهای کم ستوکینین به اکسین برای تشکیل ریشه مناسب بودند با وارد کردن مقادیر مختلف دو نـوع از مـواد رشد در محیط کشت، ریخت زایی در بافت مغـــز ساقـــه توتون در محـیط کـشت مـی تواند تا حد قابل توجهی کنترل شود.

بزرگ شدن سلول‌ها و اندامها : سیتوکینین‌ها مواد افزاینده تقسیم سلولی محسوب مـی-شوند با این وجود نمونه‌های خاصی نیز وجود دارند که نشان می دهد سـیتوکینین‌هـا بـر توسعه و بزرگ شدن سلول‌ها نیز تاثیر دارند. سیتوکینین‌ها طویـل شـدن سـلول لپـه‌هـای جدا شده از تربچه، کدو، زردان، کتان و سایر گیاهان دو لپـه‌ای را افزایـــش می‌دهنـد. وقتی لپه‌ها از گیاه جدا می‌شوند، گیاهان از منبع طبیعی سیتوکینین محروم می‌شوند ولـی وقتی سیتوکینین‌ها به صورت خارجی مصرف می‌شوند توسعه سلول‌ها افزایش می‌یابد .

-ریشه زایی و رشد ریشه : بستـــه به غلظت مـاده و نـوع گیـاه سیتوکینین مـی‌توانـد ریشه‌زایی و رشد ریشه را افزایش داده و یا جلوگیری کند. رشد ریـشـــه‌هـای جانـــبی نخـــود در بخـش های جدا شده ریشـــه با غلظت‌های کم کینتـین تحریـک مـی‌شـود. در حـــالی کـــه غلظـــت‌هـــای بـــالاتر مـــانع طویـــل شـــدن و انـــشعاب جـــانبی می‌شود .

نمو جوانه و ساقه و چیرگی راسی: سیتوکینین‌ها جوانه‌های جانبی قلمه‌های سـاقه نخـود را افزایش داده و تا حدودی غالبیت انتهایی را از بین می‌برند .

سیتوکینین‌ها ممکن است یک مکانیسم تخلیه را در جوانه‌های جانبی آغاز نموده و باعث انتقال مواد غذایی محدود کننده رشد جوانه‌های جانبی شود. سیتوکینین‌ها نقش تنظیم کننده جوانه زنی بذرها را هم دارند.

تاخیر در پیری و تحریک انتقال مواد غذایی و مواد آلی

در تاریکی سرعت پیر شدن شدیدا افزایش می‌یابد. با این وجود سیتوکینین‌ها قادرند از طریق به تأخیر انداختن فرایند پیری جایگزین اثر نور شوند.

رشد میوه ها : میوه‌های جوان در حال نمو، تقسیم سلولی سریعی داشته و دانه‌های آنها منبع غنی سیتوکینین می‌باشد. سیتوکینین‌ها نقش مهمی در رشد میوه دارند.

مکانیسم عمل سیتوکینین ها

سیتوکینین‌ها در بسیاری از مراحل فیزیولوژیکی در گیاه مؤثرند ولی مهمترین اثر آنها تحریک تقسیم سلولی است. در بسیاری از مریستم‌های ریشه‌ای افزایش سیتوکینین خارجی باعث توقف تقسیم سلولی و بازدارندگی تقسیم سلولی به وسیله سیتوکینین‌ها وابسته به وجود محرکهای رشد گیاهی دیگر مخصوصا اکسین‌ها است. هورمون‌های سیتوکینین در پیشرف مراحل جنینی در نمو دانه دخالت دارند .

شباهت سا ختاری بسیاری از سیتوکینین‌ها با آدنین که یک جزء ساختمانی ملکولهای DNA و RNA می‌باشد .مؤید این نظر است که اثرات اساسی این هورمون‌ها در حد بیوسنتز پروتئین‌ها می‌باشد .

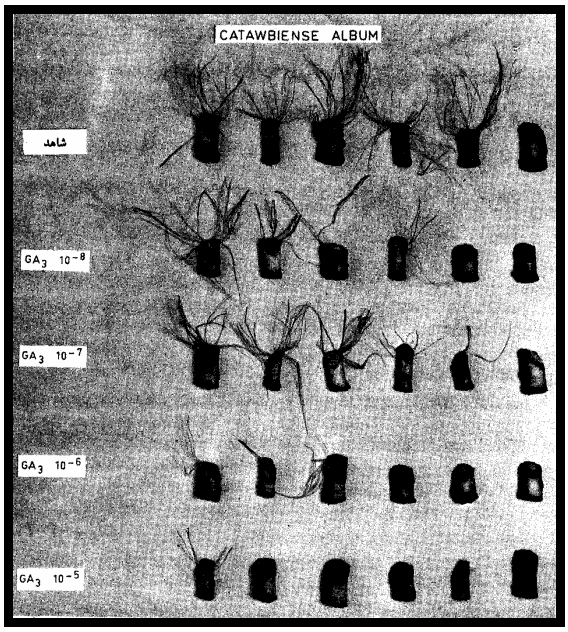
در بیوسنتز پروتئین‌ها , rRNA, mRNA و tRNA نقش دارند و tRNA انتقال اسیدهای آمینه بر روی ریبوزوم را به عهده دارد. برخی از tRNA ها دارای فعالیت سیتوکینین هستند. سیتوکینین ها در فعالیت بعضی از آنزیم ها مؤثرند به طوری که در مواردی سیتوکینین ها می توانند جای جیبرلین در تحریک بیوسنتز آلفا آمیلاز در دانه-های جو در حال رویش وارد عمل شوند. به نظر می‌رسد که سیتوکینین‌ها از تجزیه پروتئین‌ها در موقع فرارسیدن پیری جلوگیری به عمل می‌آورند . همچنین

سیتوکینین‌ها در بعضی از مراحل متابولیکی مثل متابولیسم نوکلئیک اسیدها و یا پروتئین‌ها دخالت دارند. سیتوکینین‌ها از نظر شیمیایی دارای پایه پورینی هستند که در DNA و RNA وجود دارد . این هورمون‌ها را از بخشهای فعال مریستمی گیاه جدا کرده‌اند. یعنی همان محل‌هایی که بیوسنتز نوکلئیک اسیدها و پرو تئین ها بشدت صورت می گیرد جداسازی ، برداشته شده است.

جیبرلین‌ها

معمولاً این گروه از ترکیبات، در کشت این‌ویتروی گیاهان عالی، به کار نمی‌روند. به نظر می‌رسد که این مواد در بسیاری موارد، برای کشت این‌ویترو، لازم نیستند.GA3 بیشتر از همه مورد استفاده قرار می گیرد، اما باید در نظر داشت که خیلی به حرارت حساس است، به نحوی که بعد از اتوکلاو کردن، ۹۰ درصد از فعالیت‌های بیولوژیکی آن، از بین می‌رود (وان‌بوات و همکاران ۱۹۷۱). به‌طور کلی، جیبرلین‌ها در کشت این‌ویترو، باعث رشد طولی میان‌گره‌ها و رشد مریستم یا جوانه‌ها، می‌شوند. آنها ممکن است باعث شکستن خواب جنین‌های ایزوله شده یا بذرها هم، بشوند.

جیبرلین‌ها، معمولاً سبب ممانعت از تشکیل ریشهٔ نابجا(شکل ۴-۱۱) و همین‌طور تشکیل ساقهٔ نابجا می‌شوند (پیریک واستیگمنز ۱۹۷۵a).



شکل ۱۱-۴: قلمه‌های ساقه Catawbiense album که بعد از اضافه کردن IAA ریشه‌های نابجا تولید کرده‌اند. با افزودن GA_3، کاهش پیدا کرده است. در ردیف آخر، با 10^{-5} گرم در میلی لیتر GA_3، تشکیل ریشه‌های نابجا، تقریباً به طور کامل، متوقف شده است (پیریک و استیگمنز-۱۹۷۵a). عکس ۸ هفته بعد از کشت، گرفته شده است.

اثرات فیزیولوژیکی جیبرلین

اثر جیبرلین بر رشد گیاه

جیبرلین‌ها رشد طبیعی بعضی از گیاهان کوتاه قد را امکان پذیر می‌سازند همچنین رشد طولی گیاهان طبیعی مانند برنج، کاهو، گندم و خیار را تحریک می کنند جیبرلین‌ها اثری شکفت انگیز بر بلند شدن ساقه گیاهان طوقه‌ای دارند .

موقعی که دانه‌های گندم در معرض پرتوهای گامای حاصل از یک منبع کبالت قرار گرفته و جنین آن قدرت انجام عمل تقسیم را از دست می‌دهد ، جیبرلین با تحریک فرایند رشد طولی باعث رشد گیاهک می‌شود . رشد در کلئوپتیل گندم در طی دو مرحله انجام می‌گیرد مرحله اول این رشد منحصراً رشد طولی است و اسید جیبرلیک در طی این مرحله رشد کلئوپتیل را تحریک می‌کند. اسید جیبرلیک

مانع انجام تقسیم سلولی در مریستم‌های پراکنده میانگره‌های جو دو سر شده رشد این بافتها را با تاثیر بر روی رشد طولی تحریک می‌نماید .

اثر تحریک کنندگی جیبرلین در رشد ساقه مخصوصا در ساقه‌های گیاهان طوقه ای، با افزایش ابعاد سلول و تعداد آن آشکار می‌شود .

به نظر می‌رسد کشش سلولی بیش از تقسیم سلولی دلیل تحریک رشد به وسیله جیبرلین باشد. در واقع این هورمون‌ها در گیاهان گندم یا جو که پرتو دیده‌اند و در آنها تقسیم سلولی کاملا متوقف شده است، هنوز مؤثرند. به علاوه به وسیله GA_3 نوعی همبستگی بین تحریک رشد محور زیر لپه کاهو و افزایش وزن خشک دیواره ملاحظه شده است.

این رشد طولی با نوعی افزایش قابل توجه دیکتیوزومها به وسیله نوعی تکثیر آندوپلاسمی و افزایش پلی ریبوزومها ی یاخته ها جلو می‌افتد. این تغییرات با سنتز و ترشح زیاد مواد سازنده دیواره همراه است و شبیه تغییراتی است که توسط GA_3 در یاخته‌های واجد آلورون گندمه گیاه جو القا می‌شود. در یاخته‌های فوق، این تغییرات پیش از افزایش سنتز و ترشح آلفا آمیلاز صورت می گیرد .

نتایج حاصل از مطالعه اثر جیبرلین بر روی ظهور جنسیت در گیاهان عالی مؤثر بودن این هورمون را هم بر روی تقسیم سلولی و هم بر روی رشد طولی سلول‌ها نشان می‌دهد تجربیات زیادی نشان می‌دهند که تشکیل مادگی و نافه گل به درجات مختلف تحت اثر عوامل تنظیم کننده رشد، فتو پریود و همچنین ژنوم کنترل می‌شود .

جیبرلین عامل مؤثر در تغییر جنسیت بوده مخصوصا در خانواده کدو باعث تشکیل گلهای حامل پرچم می گردد. با تغییرات میزان جیبرلین در گیاهان خانواده کدو می‌توان نسبت گلهای حامل پرچم به گلهای حامل مادگی را تغییر داد. و چون تبدیل جوانه‌های رویشی به زایشی هم در نتیجه انجام تقسیم و هم در نتیجه رشد طولی سلولها صورت می گیرد. بنابر این جیبرلین باعث انجام هر دو پدیده در سلول‌ها می گردد.

اثر جیبرلین بر فعال سازی آنزیم‌های هیدرولیز کننده

هورمون جیبرلین باعث فعال سازی آنزیم‌های هیدرولیز کننده مخصوصا آنزیم آلفا آمیلاز می‌گردد. در این آزمایش دانه جو بدون جنین را انتخاب کرده، آن را با جیبرلین آغشته می‌کنند . جیبرلین باعث آزاد شدن آنزیم آلفا آمیلاز و فعال سازی آن می‌گردد. در دانه‌های سالم و دست نخورده جیبرلین از جنین به آلورون می‌رسد. در اثر فعال شدن آنزیم آلفا آمیلاز نشاسته ذخیره‌ای دانه هیدرولیز شده و به قند های ساده تبدیل می‌گردد. در نتیجه پتانسیل آبی سلول کاهش یافته و در نتیجه باعث ورود آب و طویل شدن سلول می‌شود .

پس از تیمار بافت آلورون با اسید جیبرلیک , سنتز ریبوزوم‌ها افزایش حاصل می‌کند همچنین تشکیل سیستم‌های غشا یی مخصوصا شبکه آندو پلاسمی نیز تحت اثر جیبرلین افزایش حاصل می‌کند .

ساخت RNA ی جدید برای القا سنتز جدید هیدرولازها توسط جیبرلین ضرورت دارد.

اکتینومایسین D که بازدارنده سنتز RNA است از ساخت و آزاد شدن آلفا آمیلاز جلوگیری می‌کند، اما این در صورتی است که بازدارنده در ۷ تا ۸ ساعت اول پس از تیمار، داده شود. پس از این مدت، فرایند به اکتینومایسین D غیر حساس می‌شود. باید یاد آوری کرد که تمام mRNA مورد نیاز برای ساخت آلفا آمیلاز در حین زمان تاخیر ابتدایی تشکیل می شود . چنانکه انتظار می رود بازدارنده-های ساخت پروتئین، از جمله سیکلو هگزیمید، نیز از القای ساخت هیدرولازها توسط GA جلوگیری می کنند. جالب اینکه آبسیزیک اسید، که خود یک هورمون باز دارنده رشد است نیز از سنتز القا شده آلفا آمیلاز جلوگیری به عمل می‌آورد .

اثر جیبرلین بر تولید میوه بدون دانه

جیبرلین‌ها موجب تولید میوه‌های بدون دانه یا بکر باری در بعضی گونه‌های گیاهی می‌شوند . همچنین اگر جیبرلین ها به مقدار زیاد به کار بروند موجب رشد زیاد برگها می‌شود که در نتیجه غالبا سطح برگها به دو برابر اندازه طبیعی می‌رسد .

اثر جیبرلین بر از بین بردن خفتگی دانه‌ها

جیبرلین در بیشتر موارد خفتگی دانه‌ها را نیز بر طرف می‌کند . به ویژه در مورد دانه‌هایی که خفتگی حساس به نور دارند. مانند کاهو که جیبرلین جانشین نور سرخ می‌شود و مانند نور سرخ خفتگی این گونه دانه ها را برطرف می‌کند. در این عمل، معمولا جیبرلیک اسید GA_3 به غلظت نسبتا قوی حدود $۱۰^{-۳}$ گرم در میلی لیتر به کار برده می‌شود .

اثر جیبرلین بر از بین بردن کوتولگی گیاه

گیاهان جهش یافته زیادی وجود دارند که جیبرلین سنتز کرده و در طی سالهای متمادی تکامل یافته‌اند . گیاهانی وجود دارند که یک ژن جهش یافته داشته و به اندازه یک پنجم گیاهان عادی می‌باشند و از طریق میانگره های کوتاه، قابل تشخیص هستند . وقتی جیبرلین، به طور خارجی به این موتان ها افزوده گردد. افزایش قابل ملاحظه‌ای در اندازه آنها دیده می‌شود و این گیاهان به اندازه گیاهان طبیعی می‌رسند. همچنین، موتان‌های حساس به جیبرلین نیز وجود دارند که به استعمال خارجی جیبرلن پاسخ نداده و میزان جیبرلین آنها معادل گیاهان طبیعی می‌باشد اما پا کوتاه باقی مانده‌اند . علت چنین امری این است که احتمالا باز دارنده‌های طبیعی زیادی در گیاه وجود دارند و یا اینکه موتان‌های گیرنده‌ای وجود دارند که در واکنش به جیبرلین‌ها از رشد خود جلوگیری می‌کنند .

مکانیسم عمل جیبرلین

هورمون های جیبرلین از نظر تاثیر در گیاهان دارای طیف وسیعی هستند و انواع مختلف گیاهان اعم از چوبی و علفی نسبت به جیبرلین حساسیت و واکنش نشان می دهند. ولی برخی گیاهان نسبت به جیبرلین حساسیت نشان نمی دهند مثلا بعضی از انواع ذرت و گیاهان کاج در برابر هورمون های جیبرلین بی تفاوت هستند . افزودن جیبرلین‌ها به بعضی از گیا ها ن میوه دار مانند سیب و گلابی باعث بزرگ شدن میوه و افزایش میزان می گردد. یکی از کاربرد های اقتصا دی هورمون های جیبرلین تولید میوه‌های درشت است .

در مواردی هورمون های جیبرلین می تواند جایگزین دوره سرما برای رشد دانه و جوانه گیاهانی که برای رویش نیاز به سرما دارند شود .

هورمون جیبرلین می تواند جایگزین تناوب نوری در گیاهانی که برای تشکیل گل نیاز به تناوب نوری دارند شود. و در بعضی از گیاهان دو ساله مانند کلم و چغندر جیبرلین باعث تحریک گلدهی می‌شود .

تمام گیاهان مخصوصا گیاهان کوتاه قد در اثر افزایش جیبرلین خارجی اندازه بلندتری خواهند داشت .

هورمون‌های جیبرلین علاوه بر آن که از نظر عمل اثرات گسترده‌ای دارند از نظر غلظت نیز دارای طیف وسیعی هستند .

غلظتهای زیاد جیبرلین هیچ گاه عکس العمل منفی در گیاه ایجاد نمی‌کند و این هورمون‌ها در هر غلظتی (غیر از ریشه) دارای اثرات تحریک کنندگی هستند.

در ارتباط با اثر جیبرلین بر روی متابولیسم DNA و RNA پژوهشهای زیادی صورت گرفته است و ثا بت شده است که اثر تحریک کنندگی هورمون های جیبرلین بستگی به سنتز DNA دارد .

افزایش مقدار DNA تحت اثر جیبرلین نتیجه افزایش این ماده در ارگانل هایی مانند کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها بوده . از افزایش هسته ای ناشی نمی‌شوند.
جیبرلین ممکن است از طریق القای سنتز ملکولهای ویژه ای از mRNA که در سنتز آنزیمهای لازم برای رشد شرکت می‌نماید نیز در سطح ژنی وارد عمل شود

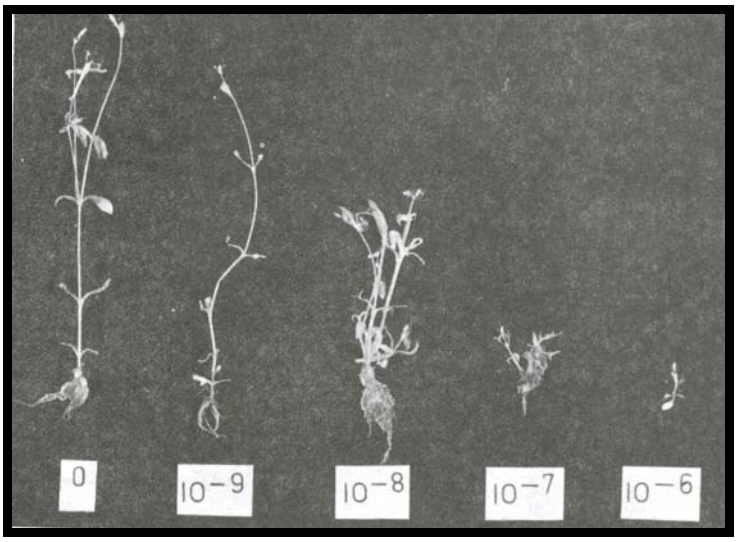
سایر تنظیم کننده‌ها

اولیگوساکارین‌ها

اخیراً کشف شده است (آلبرشیم و دارویل ۱۹۸۵؛ آلبرشیم و همکاران ۱۹۸۶) که اولیگوساکارین‌ها (از نظر ساختمانی، قطعاتی از پلی‌ساکاریدهای دیوارهٔ سلولی، محسوب می‌شوند) پیام رسان‌های شیمیایی، با خصوصیات تنظیم‌کنندگی خاص هستند. اولیگوساکارین‌ها به وسیلهٔ آنزیم‌ها، ازدیواره‌های سلولی، آزاد می‌شوند. اولیگوساکارین‌های مختلف، می‌توانند نه تنها به عنوان سیستم دفاعی گیاه علیه عوامل بیماری‌زا و سایر انواع تنش‌ها، بلکه از طریق تنظیم رشدگیاهی و تمایز داخل ریشه‌ها، گل‌ها و جوانه‌های رویشی، به عنوان تنظیم کننده نیز عمل کنند.

اسید آبسیک

در بسیاری موارد، کشت این‌ویترو ABA با اثر منفی مواجه بوده‌است (پایلت و رولند ۱۹۷۱) (شکل ۱۲-۴) و گزارش‌های موجود مبنی بر تحریک رشد کالوس وجنین‌زایی آن، احتمالاً اتفاقی است (امیراتو۱۹۸۳).



۱۲-۴. سرشاخه‌های گیاه روز بلند(Silene armeria) که در روزهای بلند (۱۶ ساعت نور در روز) رویانده شده است، بعد از طویل شدن ساقه، گل دهی، در لوله آزمایش، صورت گرفت. از چپ به راست: افزایش غلظت ABA باعث کاهش رشد و رش طولی شد، اگرچه در بالاترین غلظت ABA(10^{-6} گرم در میلی لیتر) نیز هر روز یک جوانه گل تشکیل شد. تیمار شاهد (بدون ABA) اولین تیماری بود که به گل رفت. عکس، ۸ هفته بعد از کشت، گرفته شده است.

اتیلن

مشخص شده است که کشت اندام نیز همانند کشت کالوس، قادر به تولید هورمون گازی اتیلن می‌باشد (ملی و همکاران ۱۹۸۲). از آن جایی که در بعضی موارد لوله‌های آزمایش، فلاسک و خصوصاً ظروف پلاستیکی کاملاً بسته می‌شوند؛ باید مراقب بود که تجمع اتیلن، حادث نشود. از طرف دیگر، ظروف پلاستیکی نیز تولید اتیلن می‌کنند، که بایستی در هنگام استفاده از آنها، مواظبت‌های خاص، اعمال شود. روشن کردن کبریت و ایجاد شعله نیز، تولید اتیلن می‌کند، لذا نباید این عمل را در داخل محفظه با جریان هوای استریل (اتاقک تمیز) انجام داد.

ملی و همکاران (۱۹۸۲) اثر روش‌های مختلف بستن درب ظروف مورد استفاده در کشت این‌ویترو را، روی رشد سرشاخه‌های میخک، بررسی و نتیجه‌گیری کرده‌اند که در اثر بستن درب ظروف، تجمع اتیلن، اتفاق می‌افتد، و منجر به ممانعت از رشد،

می‌شود. اگر $KMNO_4$ اضافه شود (در یک لوله جداگانه) در این صورت ۷۰ درصد از اتیلن می‌تواندحذف شود.

در منابع علمی، گزارشات متفاوتی در مورد نقش اتیلن در اندام‌زایی وجود دارد. موارد بی‌اثر بودن اتیلن روی جنین‌زایی و در بعضی موارد، اثرمثبت آن، گزارش شده است. در یک آزمایش، ملاحظه شد که وقتی که کالوس‌های توتون در نور رویانیده شدند (هاکستر ۱۹۸۱)، تولید اتیلن، در حالتی که شاخه‌های نابجا تشکیل شدند، بیشتر بود.همچنین نتایج این آزمایش، نشان داد که تشکیل اتیلن، ستگی به دورهٔ زمانی بعد از واکشت (اتیلن بیشتری در ۵ روز اول، نسبت به ۶ تا ۱۰ روز بعدی، تولید شد) و در رژیم نور/ تاریکی (اتیلن بیشتری در تاریکی نسبت به روشنایی تولید شد) دارد. نامبردگان نتیجه‌گیری کرده‌اند که اتیلن در طول ۵ روز اول کشت، جنین‌زایی را کاهش می‌دهد، در حالی که تمایز ساقه (به طور قابل رؤیت) در ۶ تا ۱۰ روز بعد از کشت، تسریع شد.

وان آرتریجک(۱۹۸۴)، و وان‌آرتریجک و همکاران(۱۹۸۶) نشان داده‌اند که با تولید گیاه جدید از قلمهٔ لاله، تولید اتیلن و اتان، به همان اندازه که بستگی به مرحله‌ای که رشد مجدد در حال انجام، دارد؛ بستگی به شرایط رشد نیز دارد. با توجه به تولید اتیلن بیشتر در دو هفتهٔ اول کشت، تعداد پیازهای نابجا، به نظر بیشتر بود. بنابراین، به نظرمی‌رسد که اتیلن(بیوسنتز اتیلن) نقش مهمی را در تشکیل پیازهای نابجا، دارد. زمانی که بیوسنتز اتیلن در لاله توسط AVG(Amino- ethoxy vinyl glycine) متوقف شد، تشکیل پیاز نابجا نیز متوقف شد. افزایش اتیلن(۱تا۱۰ پی پی‌ام) طی ۳ تا ۷ روز در دورهٔ رشد، تشکیل پیاز نابجا را تسریع می‌کند، به همان گونه که افزایش (acid 1- aminocyclopropane- 1- carbonicACC) این عمل را انجام می‌دهد.

همچنین، به‌نظر می‌رسد که اتیلن روی جنین‌زایی و تشکیل اندام در بازدانگان، اثر دارد، ورهیگن و همکاران (۱۹۸۶) نشان داده‌اند که کالوس غیرجنینی درگیاه *Picea abies*، ۱۰ برابر بیشتر از کالوس جنینی، اتیلن تولید می‌کند. کومار و همکاران (۱۹۸۶)

نشان دادند که تجمع اتیلن و CO_2 در طول اولین هفتهٔ کشت در فلاسک‌های ارلن‌مایر، تشکیل شاخه‌های نابجا را در کوتیلدون‌های جدا شدهٔ کاج (*Pinus radiate*) تسریع می‌کند. زمانی که اتیلن و CO_2 از فلاسک‌ها حذف شود، رشد مجدد ساقه نیز متوقف می‌شود.

دربعضی موارد، رشد در محیط این‌ویترو، می‌تواند به وسیلهٔ اتیلن، تسریع شود (استوتیمایر و برایت ۱۹۷۰؛ پالمر و بارکر ۱۹۷۳، مکنزی و استریت ۱۹۷۰ وبوریکت ۱۹۷۰). به نظر می‌رسدکه غلظت خاصی از اتیلن برای ایجاد تقسیم سلولی، ضروری است، مکنزی و استریت (۱۹۷۰) درکشت‌های سوسپانسیون سلولی افرا (*Acer*) مشاهده کردند که تو،فور-دی باعث تشکیل اتیلن می‌شود.

انتقال اتیلن در گیاه

اتیلن از طریق انتشار آزاد در بافتهای گیاهی حرکت می کند و در گیاهان مخصوصا در میوه های رسیده این گاز به وفور دیده می شود . وقتی که غلظت اتیلن در گیاه بسیار زیاد گردد چون در شرایط طبیعی به صورت گاز است از گیاه خارج می شود و در جوامع گیاهی بر روی گیاهان مجاور نیز اثر می گذارد . از همین ویژگی اتیلن که در شرایط طبیعی به صورت گاز است استفاده میشود و از اتیلن خارج شده از میوه های رسیده برای رسیدگی میوه های نارس استفاده می کنند در امور نگهداری ، انبار داری و حمل و نقل میوه‌ها برای رسیدگی میوه هایی که نارس می باشند از این روش استفاده می‌شود .

اثرات فیزیولوژیکی اتیلن

رسیدن میوه ها

مصریان قدیم ندانسته ازمزایای افزایش تولید اتیلن، به وسیله انجیرهای مصری نارس بریده شده ، جهت تحریک رسیدگی استفاده می‌کردند در سالهای اخیر معین شده است که اتیلن نقش مهمی در رسیدگی میوه‌های کلیماکتریک ایفا کرده است و

اصـطلاح کلیماکتـــریک بـــه میوه‌هـایی اطـلاق مـی شـود کـه در واکـنش بـه اتـیلن می‌رسند و اصطلاح غیر کلیماکتریک در مـورد میوه هایی مـطرح می‌شـود در معـرض اتیـلن تغییری در دوره رسیدن آنهـا ایجـاد نمـی شـود اتـیلن از مقـادیر نـاچیز تـا حـدود ۱- ۰/۱ میکرو لیتر بر لیتر افزایش یافته و رسـیدگی میـوه‌هـا را کـه افـزایش سـریعی در تنفس نشان می‌دهند تحریک می نماید. در حـالی کـه میـوه‌هـای غیـر کلیماکتریـک در آغاز برای مشخص کردن افزایش تنفس میوه‌ها بـه کـار رفـت امـا امـروزه نـشان دهنـده افزایش تولید اتیلن می‌باشد .

به نظر می‌رسد که در جریان رسیدن میوه عواملی مانند نوسانهای تولید اتـیلن ، غلظتهـای ACC وMACC , فعالیتهای ACC سنتـاز مالـــونیـــل – ترانسفـــراز و EFE کـا مـــلا با هـــم ارتبـــا ط دارنـــــد(یانگ ۱۹۸۷).

اتیلن در تغییر رنگ سبز پرتقال ، زیتـون و گـیلاس نقـش دارد . امـا در مـورد زیتـون یـا گیلاس؛ سنتز رنگیزه های آنتوسیانی با دادن اتیلن یا ACC تسریع نمی‌شـود . بـه عـلاوه به نظر می‌رسد که حضور یونهای Ag^{+} که اثرات اتـیلن را متوقـف مـی‌سـازد ، رسـیدن میوه گیلاس را به تاخیر بیندازد .

در گیلاس، تولید اتیلن هر چند اندک است ، در ابتدای رسیدن میوه افـزایش مـی یابـد . همچنین مقدار ACC و MACC نیز افزایش حاصل می کند .

چیرگیـــی راســـی (غلبه انتهایی)

در مدتی بیش از ۵۰ سال نشان داده شد که IAA موجب چیرگی راسی جوانـه انتهـایی بر جوانه جانبی است ولی در سال ۱۹۶۸ استانلی و همکاران نشان دادند که بازدارنـدگی رشد جوان‌های کناری در دانه رستهای نخود که راس آنها قطع شده بـود ناشـی از خـود اکسین نبوده بلکه ناشی از اتیلن بوده اسـت کـه سـنتز آن توسـط اکـسین القـا مـی‌شـود شواهدی چند در این زمینه وجود دارد که عبارت اند از :

۱- مناطق گرهی گیاهچه‌های رنگ پریده (اتیوله) نخود مکانهای سنتز اتیلن هستند
۲- تولید اتیلن در بالاترین گره در طول یک روز پس از قطع راس ۲۴٪ کاهش می‌یابد هر چند این کاهش نمی‌تواند در مناطق گرهی دارای جوانه اما بدون فلسهای برگی جوانه مشخص گردد.
۳- در تمام غلظتهای IAA ی آزمایش شده همبستگی نزدیکی بین تولید اتیلن و بازدارندگی جوانه که نتیجه آن است دیده می شود . همچنین جالب است بدانیم که کینتین اثر بازدارندگی اتیلن و IAA را بر رشد جوانه خنثی می کند .

ریزش برگها

ریزش برگها به وسیله اتیلن تحریک می‌شود، در صورتی که مقدار اکسین پایین بیاید اتیلن به عنوان باز دارنده میتوز منطقه ریزش و تحریک کننده سنتز سلولاز و پکنیناز و تسریع کننده پیری یاخته‌ها عمل می کند.

ریزش برگها نتیجه فرایندی عمومی یعنی پیری برگها و تولید اتیلن است. باز دارندگی ایجاد شده به وسیله اکسین با اثر آن بر تاخیر پیری بیان می شود. بر عکس عواملی مانند خشکی و کوتاه شدن فتوپریود، پیری برگها و در نتیجه سقوط آنها را مساعد می‌سازند.

سه دسته از شواهد نقش اتیلن در ریزش را بیان می کنند.

۱- تولید اتیلن قبل از ریزش در بسیاری از اندامهای خزان کننده گیاهان افزایش می‌یابد .
۲- تیمار طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی با اتیلن یا ترکیبات آزاد کننده اتیلن ریزش را تحریک می کند.
۳- باز دارنده‌های بیوسنتز یا فعالیت اتیلن ، از ریزش جلوگیری می کنند.

بازدارندگی افزایش طول

اتیلن مانع افزایش طول در ریشه‌ها می‌شود در عوض رشد شعاعی و تکثیر آنها را مساعد می‌سازد. همچنین از نمو شاخه‌های جوان سیب زمینی جلوگیری می‌کند.

اثر بر حرکت اکسین

اتیلن حرکت اکسین را کند می‌کند، موجب نوعی زمین گرایی یا حتی اپی ناستی می‌شود. با کند کردن حرکت اکسین به طرف پایین در یک اندام افقی شرایط رشد سطح بالایی آن را مساعد می‌سازد.

گلدهی

سالها پیش مشاهده گردید که دود حاصل از چوب باعث تسریع گلدهی در آناناس و درخت انبه می‌گردد. امروزه مشخص شده است که اتیلن ترکیب کلیدی این دود می‌باشد. که فرایند گلدهی را شتاب می‌دهد . اتیلن در بیشتر حالات از گلدهی جلوگیری می‌کند اما اثر تحریک کنندگی در آناناس و درخت انبه دارد .

پیری

محققان با استفاده از برگها و گل ها نشان دادند که استفاده از اتیلن خارجی فرایند پیری را سریع‌تر کرده و نیز تولید اتیلن در طی مراحل پیری بیشتر می‌شود .

سایر اثرات فیزیولوژیکی

علاوه بر فرایندهای فیزیولوژیکی که قبلا شرح داده شد . مشخص شده است که اتیلن در فتوسنتز تنفس – تعرق رکود – جوانه زنی بذر – ظهور جوانه – غلبه انتهایی – رشد سلول – کشت بافت – جنین زایی – اپی ناستی – ریشه زایی – اندامهای ذخیره‌ای – تشکیل آوندهای چوبی – ممانعت از گلدهی – تکامل جنسی – زمین گرایی – ریخت زایی در اثر تماس با اجسام جا مد – ترشح – جریان صمغ – تشکیل لاستیک – هیپرتروفی و سایر فرایند ها نیز مشارکت دارد (ابیلز و همکاران ۱۹۹۲).

متابولیسم اتیلن

بررسیهای مربوط به متابولیسم اتیلن در گیاه به علت فقدان اتیلن نشان دار شده با کربن ۱۴ مدتها به تعویق افتاد .

در سال ۱۹۷۵ این مشکل توسط بییر Beyer بر طرف شد . نامبرده دانه رست‌های تخود را در اتیلن نشان‌دار شده با کربن ۱۴ که کاملا خالص شده بود در انکوباتور قرار داد . تجربیات وی نشان داد که متابولیسم در بافتهای نخود به کندی صورت می گیرد .

مقدار قابل توجهی کربن رادیو اکتیو در گاز کربنیک و سایر تولیدات بافتهای گیاهی مشاهده شد. فراورده های گیاهی که در این تجربه شناسایی شدند، اتیلن و فرم پیوسته گلوکز بتا – ۲- هیدروکسی اتیلن – D – گلوکزید بود .

در دانه رست های باقلا و آلفا آلفا سرعت تشکیل اتیلن در مقایسه با دانه رست های نخود بسیار بیشتر است و در دانه رست های باقلا اکسید اتیلن نیز شناسایی شده است این ماده به روشهای آنزیمی ویا غیر آنزیمی می‌تواند به اتیلن گلیکول تبدیل شود . به احتمال قوی متابولیت اولیه در بافتهای نخود نیز اکسید اتیلن می‌باشد که آنزیم آن شناسایی شده است .

مکانیسم عمل

چون اتیلن یک ماده گازی شکل است در شرایط طبیعی بررسی مکانیسم عمل آن بسیار مشکل است. با توجه به اثراتی که اتیلن در گیاه دارد مانند ریزش برگها، گل‌ها، میوه‌ها، شاخه‌ها، ایجاد پیری، تغییر رنگ، اپی ناستی و غیره تصور می‌شود که اتیلن باعث تغییراتی در ویژگیهای غشاء های سلولی می گردد . در این باره گفته می‌شود که اتیلن با بعضی از مواد تشکیل دهنده غشاء سلولی پیوندی ایجاد می کند که در محل پیوند، پاسخ واکنش‌های ثانویه شروع می‌شود ولی در رابطه با تشکیل پیوند اتیلن و غشاء و واکنش‌های فیزیولوژیکی آن که ایجاد می‌شود . اطلاعات کمی در دست است.

مکانیسم عمل اتیلن هنوز شناخته نشده است . گمان می‌کنند که اتیلن موجب تخریب mRNA ها می‌شود و در نتیجه سنتز پروتئین را دچار اختلال می‌کند. ولی بعضی از اعمال اتیلن بسیار سریع است .

امکان دارد اتیلن مانند اکسین تراوایی غشاها را با تثبیت بر روی قطبهای چربی دوست تغییر دهد.

ویتامین‌ها

دربعضی موارد، از یک یا چند ویتامین ذیل، در کشت این‌ویترو، استفاده می‌شود (اسامی دیگر آنها و غلظت‌های به کار برده شده، برحسب میلی‌گرم در لیتر، در داخل پرانتز، آمده است):

اینوسیتول (میواینوسیتول، مزواینوسیتول،۱۰۰تا۲۰۰)، ویتامین B_1 (تیامین، آدنوزین:۰/۱تا۵)، کلسیم پانتوتنات یا اسیدپانتوتنیک (۰/۵تا۲/۵)، اسیدفولیک (ویتامین M، ۰/۵تا۱)؛ ریبوفلاوین (لاکتوفلاوین، ویتامین B_2،۰/۱تا۱۰؛ اسیداسکوربیک (ویتامین C،۱تا۱۰۰)؛ اسیدنیکوتینیک (ویتامین PP، نیاسین؛۰/۱تا۵)؛ پیریدوکسین (آدرمین، ویتامین B_6 ،۰/۱تا۱)؛ بیوتین (ویتامین H ،۰/۰۱تا۱)؛ پاراآمینواسیدبنزوییک (۰/۵تا۱)؛ توکوفرول (ویتامین E، ۱تا۵).

غلظت بالای اسید اسکوربیک که بعضی موارد اضافه می‌شود، به این معنا نیست که گیاه، چنین نیاز بالایی دارد. ویتامین C در غلظت بالا، به عنوان آنتی‌اکسیدان، به کار می‌رود. بسیاری از گیاهان قادرند که ویتامین‌ها را در حالت این‌ویترو، سنتزکنند؛ و این موضوع مورد سؤال است که آیا واقعاً همیشه افزودن مداوم مخلوط ویتامین‌ها طی کشت این‌ویترو، ضرورت دارد.

سایر موادمتفرقه

پلی آمین‌ها

آزمایشات، نشان می‌دهدکه پلی‌آمین‌ها در جریان جنین‌زایی در تمایز سلولی و نمو، دخالت دارند، به‌طوری که اساساً میزان پلی‌آمین‌های درون‌زا، خصوصاً پوترسین و اسپرمیدین در طول تشکیل جنین در هویج، افزایش پیدا می‌کند. جنین‌زایی، با افزودن ممانعت کننده‌های سنتز پلی‌آمین، متوقف شده، و با افزایش مجدد پوترسین، اسپرمیدین، برگشت پیدا می‌کند. اثرات مشابهی نیز در یونجه (*Medicago sativa*) گزارش شده است (شفیدر و مکنزی ۱۹۸۶). روگینی و وانگ(۱۹۸۶) دریافته‌اند که پلی‌آمین‌ها، کوفاکتورهایی برای تشکیل ریشه‌های نابجا، هستند. نکتهٔ جالب دیگر، این که پوترسین قادر به تطابق (همزمان کردن رشد) مرحلهٔ جنین‌زایی در هویج (*Daucus carota*) است (برولی و همکاران۱۹۸۵). بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که پلی‌آمین‌ها و آنزیم‌های وابسته به آنها، در کنترل رشدونمو گیاهی، اهمیت دارند. به نظر می‌رسد که ال-آرژنین پیش ساز پوترسین باشد و پلی‌آمین‌ها می‌توانند تبدیل متیونین به اتیلن را متوقف سازند. این مطلب، حاکی از نوعی سیستم کنترلی است که در آن، اتیلن، آرژنین و پلی‌آمین‌ها، نوعی نقش تداخلی را در کنترل سوماتیکی جنین‌زایی، بازی می‌کنند.

فنیل اوره و مشتقات آن

از زمانی که کشف شد DPU فعالیت سیتوکینینی دارد، مشخص شد که بسیاری از مشتقات اوره نیز در سیستم‌های مختلف آزمون حیاتی فعالیت‌های سیتوکینینی اعمال می‌کنند (مک و همکاران۱۹۸۶). برعکس، هورگان (۱۹۸۶) معتقد است که DPU سیتوکینین اکسیداز را ممانعت می‌کند، و ظاهراً باعث افزایش فعالیت سیتوکینینی می‌شود. در هر صورت، مسلم است که ترکیبات بالا، خصوصیات خاص خود را نشان می‌دهند؛ که در این زمینه، نیاز به تحقیقات بیشتری می‌باشد.

به نظر می‌رسد که فعال‌ترین ترکیبات پیریدیل‌اوره و تیدیازول اوره(تیدیازورون و مشتقات آن) باشند که حدود ۱۰۰۰۰ برابر از DPU فعال‌ترند، و از سیتوکینین‌های طبیعی آدنین، مثل زآتین هم فعال‌تر هستند. گزارش شده است که تیدیازورون، شاخه‌دهی را در تعدادی از گونه‌های چوبی، تحریک می‌کند، در حالی که CPPU باعث افزایش زیادی در تعداد شاخه‌های آزالیای خزان‌دارمی‌شود (رید و همکاران ۱۹۸۶). هیروکرنش (۱۹۸۶) نیز دریافتند که تیدیازورون، باعث افزایش شاخه در *Celtis occidentalis* می‌شود. غلظتی در حدود ۰/۰۵ تا ۰/۱ میکرومولار تیدیازورون، فعال‌تر از۴ تا۱۰ میکرومولار BA می‌باشد.

یک مورد جالب در درخت تبریزی مشاهده شده است. روزلیو مک‌کون(۱۹۸۶) نشان دادند که تیدیازورون (در غلظتی کمتر از ۰/۱ میکرومولار) قادر به ایجاد شاخه‌های (ساقه‌های) نابجا در کالوس‌های تبریزی است، که با کاربرد BA فقط تعدادی شاخه به دست آمد. در هرحال، جالب توجه است که تشکیل شاخهٔ جانبی در تبریزی، شدیداً در تمام تیمارهای تیدیازورون، متوقف می‌شود، ولازم است که کشت‌های مولد شاخه را برای نمو شاخه، به محیط فاقد تیدیازورون، منتقل کرد.

مخلوط ترکیباتی که منشأ گیاهی دارند

دراین مورد، می‌توان موادی را مثل شیر نارگیل (مایع آندوسپرم نارگیل)، آب پرتقال، آب گوجه‌فرنگی، آب انگور، آب آناناس، شیرهٔ درخت غان، پورهٔ موز، و غیره، نام برد. در عمل، استفاده از این مخلوط‌ها در مواقع تحقیقات بایستی احتراز شود، زیرا:

۱- ترکیب آنها، تقریباً یا کاملاً ناشناخته است.

۲- ترکیب آنها، خیلی متغیر است. به عنوان مثال، شیر نارگیل (به صورت رقیق شده ۵۰ تا ۱۵۰میلی لیتر در لیتر) نه تنها بین نارگیل‌های جوان و پیر متفاوت است، بلکه حتی بین نارگیل‌های هم‌سن نیز تفاوت دارد.

کار با شیرنارگیل، نتایج شگفت‌آوری داشته است. استفادهٔ توأم آن با اکسین، شدیداً باعث تقسیم سلولی در بافت‌ها شده است (استوارد۱۹۵۸). کوورد (۱۹۶۲) نشان داده است که شیرنارگیل حاوی ترکیبی شبیه کینیتن (یک سیتوکینین) است. ستهام(۱۹۷۴) معتقد است که نارگیل‌های رسیده، حاوی نوعی سیتوکینین، به نام نه- بتا- دی-ریبوفورانوزیل زآنتین (9- β- D- ribofuranosylzeatin) است.

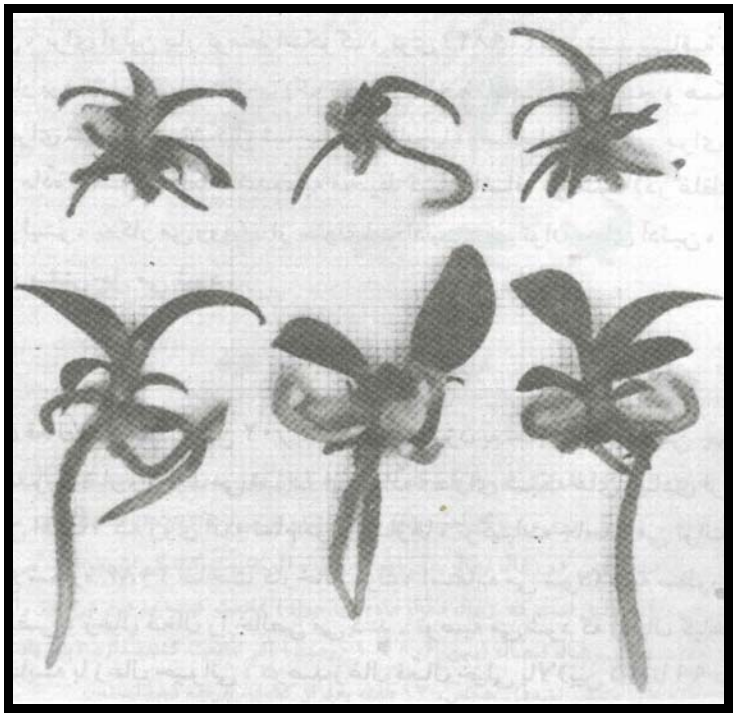
استادن و درویس(۱۹۷۵) وجود زآنتین و زآنتین ریبوزید را گزارش کرده‌اند. به‌طور کلی اصل مطلب این است که می‌توان به جای شیرنارگیل، از سیتوکینین، استفاده نمود.

تهیهٔ شیرنارگیل، به صورت زیر است: نارگیل خریداری شده از بازار را می‌توان به کمک یک متهٔ برقی، سوراخ کرد. به منظور اطمینان از سلامت شیرنارگیل، هرکدام را جداگانه در یک بشر ریخته و سپس آب میوه‌های سالم با هم مخلوط شده و به وسیلهٔ صافی ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد استریل شده و سپس صبح روز بعد مجدداً فیلتر شده و در یک ظرف پلاستیکی سرپیچ‌دار، در ۲۰- درجه سانتی‌گراد، نگهداری می‌شود.

۴-۸) مخلوط ترکیبات ازت دار،و حاوی ویتامین‌ها

از ترکیبات ذیل، و نیز اسیدهای آمینه، به عنوان منابع آلی ازت‌دار، استفاده شده است.

هیدرولیزات- کازیین(۱/ ۰تا ۱ گرم‌درلیتر)، (پپتون۰/۲۵ تا ۳ گرم‌درلیتر)، (تریپتون ۰/۲۵تا ۲ گرم درلیتر) و عصارهٔ مالت (۰/۵تا ۱ گرم‌درلیتر). این مخلوط‌ها خیلی پیچیده و حاوی ویتامین‌ها و نیز اسیدهای آمینه هستند. از عصارهٔ مخمر(۰/۲۵تا ۲ گرم‌درلیتر) نیز به علت کیفیت بالای ویتامین‌های ب، استفاده شده است. شکل(۱۳-۴)تحریک رشد گیاهچهٔ ارکیده را توسط پپتون و تریپتون، نشان می‌دهد.



شکل ۱۳-۴: اثر تحریک رشد تریپتون، روی رشد گیاهچه‌های روییده شده گونه Paphiopedilum callisum در کشت این ویترو. ردیف بالا: بدون تریپتون، ردیف پایین: تریتون ۱/۵ میلی گرم در لیتر (پیریک، نتایج منتشر شده). عکس، ۲۰ هفته بعد از کشت، گرفته شده است.

اسیدهای آمینه، به عنوان منبع ازت

درمحیط‌های کشت جدید، که معمولاً توازن مناسب NO_3^- به NH_4^+ نیاز به ازت را تضمین می‌کند، نیازی به استفاده از اسیدهای آمینه به عنوان یک منبع آلی ازته، نیست. قبلاً به دلیل عدم کفایت نسبت NO_3^- به NH_4^+ اسیدهای آمینه (یا مخلوطی از اسیدهای آمینه) اضافه می‌شدند. L – گلوتامین متداول‌ترین منبع ازت است، اگرچه از آدنین وآسپاراژین هم، احتمالاً می‌توان استفاده کرد.

آدنین(سولفات)

آدنین، برای اولین بار توسط اسگوک و توی(۱۹۴۸) در رشد ساقه ریزنمونه‌های توتون، به کار برده شد، و باعث تحریک تشکیل شاخه جابجا، شد. نیچ و

همکاران(۱۹۶۷) نیز از آدنین برای تسریع در تشکیل شاخه‌های نابجا، استفاده کردند. برای تکثیر رویشی گیاهان، این ماده به صورت آماده شده، به محیط کشت اضافه می‌شود (در غلظت‌های ۲ تا ۱۲۰ میلی‌گرم‌درلیتر، به کار می‌رود.) از سولفات آدنین، می‌توان به جای آدنین، استفاده کرد؛ چون در آب، بیشتر حل می‌شود.

زغال فعال

زغال فعال (در غلظت بین ۰/۰۲ تا ۳ درصد وزن به حجم از سوختن چوب در حرارت بالا و در حضور بخار، تولید می‌شود. این ماده، دارای شبکه‌های زاید از منافذ با سطح داخلی بزرگی است؛ که روی آن، تمام مواد(گازها، ترکیبات جامد) می‌توانند جذب شوند (اغلب از نوع شماره ۲۱۸۶ ساخت کارخانه مرک، استفاده می‌شود.) به منظور خارج ساختن هرگونه ناخالصی، زغال فعال را خالص می‌کنند. توصیه می‌شود که زغال گیاهی به کار رود؛ زیرا که در مقایسه با زغال حیوانی، درصد زغال فعال خیلی بالا (بین ۹۵ تا ۹۹ درصد) است. مهم‌ترین نکات مربوط به زغال فعال، عبارتنداز:

۱- جذب پیگمان‌های(ترکیبات شبه فنلی و ملانین) سمی قهوه‌ای و یا سیاه و سایر ترکیبات ناشناختهٔ غیررنگی. زغال فعال، همچنین قادر به جذب مواد سمی موجود در موز است. (شکل ۱۴-۴).

۲- جذب سایر ترکیبات آلی(اکسین، سیتوکینین، اتیلن، ویتامین‌ها، شلات‌های آهن، روی، وغیره) که این موضوع در بررسی انجام شهد توسط میسون و همکارانش (۱۹۸۳) ارائه شده است. جانسون (۱۹۸۳) معتقد است که زغال فعال ABA را جذب می‌کند.

۳- تغییرات نوری«محیط نوری» (The light climate) محیط کشت (تاریک نمودن محیط کشت) می‌تواند تشکیل ریشه و رشد را تحت تأثیر قرار دهد. (کلاین و باپ ۱۹۷۱).

۴- زغال فعال، می‌تواند جنین‌زایی غیرجنسی (امیراتو۱۹۸۳) و جنین‌زایی کشت دانهٔ گردهٔ شقایق نعمانی(*Anemone*) و تنباکو(*Nicotiana*) (جانسون۱۹۸۳) را تحریک کند. اورز(۱۹۸۴) و بسیاری از محققین دیگر، نشان داده‌اند که افزایش زغال فعال، غالباً باعث تشدید رشد و اندام‌زایی گونه‌های چوبی می‌شود. اثرات مفید زغال فعال شده در تولید پیازچهٔ گونهٔ *Muscaria armeniacum* نیز مشخص شده است (یک و کومینگ ۱۹۸۶).

۵- زغال فعال شده PH را تثبیت می‌کند (هیژن و همکاران ۱۹۸۳).

۶- امکان دارد زغال فعال، موادی را تولید نماید، که رشد را تحریک کند. البته این موضوع، نیاز به بررسی دارد.

بعضی از گیاهان در اثر زخمی شدن، این خصوصیت غیرمطلوب را پیدا می‌کنند که رنگ‌دانه‌های قهوه‌ای یا سیاه، ترشح می‌نمایند (معمولاً ترکیبات شبه پلی فنل اکسیده شده و تانن‌ها، که رشد و نمو را غیر ممکن می‌سازد). از تولید این ترشحات، می‌توان به صورت ذیل ممانعت نمود (آنونیموس a۱۹۷۸؛ کامتون و پریس ۱۹۸۶):

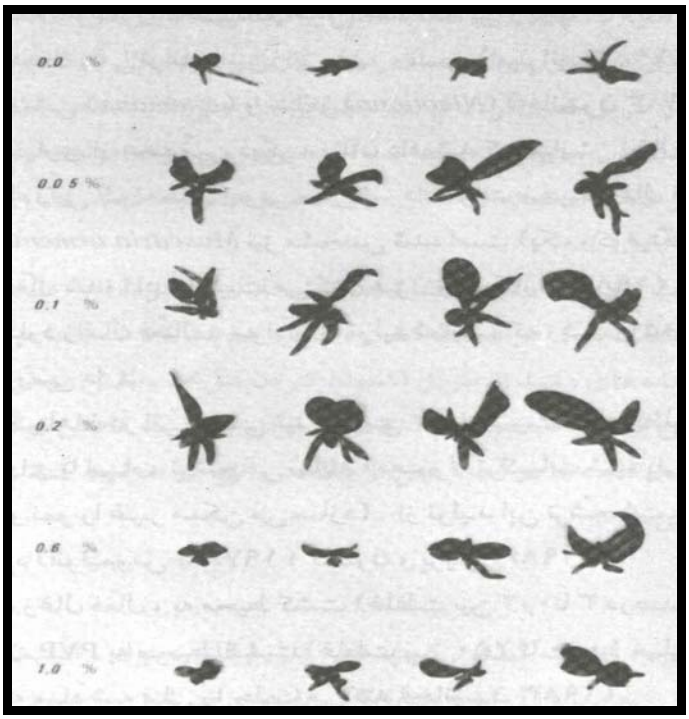
۱- افزودن زغال فعال، به محیط کشت (غلظت بین ۰/۲ تا ۳ درصد وزن به حجم).

۲- افزودن PVP به محیط کشت (غلظت بین ۲۵۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم درلیتر) PVP یک پلی‌مر است که مواد شبه فنلی را جذب می‌کند (جانسون۱۹۸۳).

۳- افزودن مواد ضداکسیدان، مثل اسید سیتریک، اسید آسکوربیک، تیواوره یا ال سیستیین. این ترکیبات، اکسیداسیون فنل‌ها را مانع می‌شوند.

۴- افزودن دی اتیل- دی تیوکربناب(DIECA) در مرحله شستشو بعد از استریلیزاسیون با غلظت دو گرم درلیتر، و یا به صورت قطراتی در زمان قرار دادن قلمه‌ها در محیط کشت، می‌تواند عمل اکسیداسیون را مانع شود (جونارد۱۹۸۶).

۵- افزودن سه اسیدآمینه گلوتامین، آرژنین و آسپانژین



شکل ۱۴-۴: افزایش مخلوط یکنواخت حاصل از موز، بدون استفاده از زغال فعال، دارای اثر ممانعت کنندگی روی رشد گیاهچه‌های تولید شده هیبرید Phalaenopsis در محیط این ویترو می‌باشد. وقتی که زغال فعال به آن اضافه شود، اثر ممانعت کنندگی آن برطرف می‌شود؛ این موضوع، به این دلیل است که زغال فعال ماده (یا مواد) ممانعت کننده موجود در موز را جذب می‌کند. غلظت بالای زغال فعال (بین ۰/۶ تا ۱ درصد) اثر ممانعت کننده دارد (پیریک و وان نیووکوک، داده‌های منتشر نشده). عکس، ۱۴ هفته بعد از کشت، گرفته شده است.

۶- در بعضی موارد، واکشت مداوم روی محیط کشت تازه، به آرامی تشکیل رنگ دانه‌ها را متوقف می‌سازد.

۷- استفاده از محیط کشت مایع، که در آن حل شدن مواد سمی، راحت‌تر و سریع‌تر است.

۸- در بعضی موارد، قهوه‌ای شدن ناشی از فعالیت نوری در انتهای پایینی ساقه‌ها را، می‌توان با نگهداری انتهای پایینی ساقه‌ها در تاریکی در خلال کشت، محدود نمود. نفوذ نور را می‌توان از طریق کدر کردن قسمت‌های خارجی شیشه‌ها یا لوله‌های

آزمایش تا سطح محیط کشت، با پیچیدن کاغذ آلومینیومی در ته لوله‌ها یـا بـا قـراردادن یک لایهٔ نازک زغال غیرفعال شده و آگار روی سطح محـیط کـشت، جلـوگیری نمـود (روجینی وهمکاران۱۹۸۶).

۹- کاهش بافت زخمی، منجر به کم شدن ترشحات می‌شود.

۱۰- کاهش غلظت نمک در محیط کشت، سبب کم شدن ترشحات می‌شود.

۱۱- تنظیم کننده‌های رشد از طریق اکسیده کردن فنل‌ها، نقـش مهمـی را در تیـره کردن محیط کشت، بازی می‌کننـد. حـذف تنظـیم کننـده‌هـا، مـی‌توانـد سـبب کـاهش ترشحات شود.

۱۲- خیساندن قلمه‌ها در آب، قبل از گذاشتن آنها در محیط کـشت روش مـؤثری در کم شدن ترشح، می‌باشد.

فلوروگلوسینول

دربعضی موارد، اضافه شدن ترکیب فنلـی فلوروگلوسـینول(Phloroglusinol) سـبب ممانعـت از تولیـد آنـزیمIAA- اکـسیداز کـه مـسؤول تجزیـهٔ IAA مـی‌باشـد، می‌شود. جونز(۱۹۷۹)، هـانتر(۱۹۷۹) و جـونز و هـاپگود(۱۹۷۹) گـزارش کـرده‌انـد کـه فلورگلوسینول می‌تواند تشکیل شاخه‌های جانبی را تحریک کند، و اگر توأم بـا اکـسین استفاده شود، به صورت سینرژیک، باعـث تـشکیل ریـشهٔ نابجـا مـی‌شـود. اثـرات مثبـت فلوروگلوسینول، به هیچ وجه مشخص نیست، زیرا آخرین تحقیقات، نشان مـی‌دهـد کـه این ماده می‌تواند فاقد اثر، یا دارای اثر منفی، روی تشکیل شاخه‌های جانبی و ریشه‌هـای نابجا، باشد.

۴-۱۰) محیط کشت آمادهٔ تجارتی

از سال ۱۹۷۵ محیط کشت آماده (پیش ساخته) در بازار وجـود دارد و کـاربرد آن را در آزمایشگاه‌ها، مدارس، صنعت و منزل، خیلی آسان‌ترکرده است. نام شـرکت‌هـای تولید کنندهٔ محیط کشت عبارتنداز:

KC Biological. Inc, USA

Flow laboratories, Scotland
Gibco, USA

نگهداری محیط کشت مادهٔ غذایی

محیط کشت را برای مدت زیاد می‌توان در حرارت کم(۵ درجهٔ سانتی‌گراد) و در تاریکی، نگهداری کرد. در طول نگهداری دراز مدت، باید دقت کافی مبذول شود که از تبخیر زیاد آب از محیط کشت ، جلوگیری شود. بنابراین، توصیه می‌شود که محیط اتوکلاو شده، در کیسه‌های پلاستیکی از قبل استریل شده و کاملاً تمیز، بسته‌بندی شوند. در صورت امکان، بایستی از نگهداری طولانی محیط کشت، احتراز نمود؛ زیرا بعضی مواد، مثل IAA در آب، ناپایدار هستند.

فصل پنجم:
ریزازدیادی و بیوتکنولوژی تولیدمثل غیرجنسی

مقدمه

ریزازدیادی(Micropropagation) نوعی تکثیر مطابق با اصل یک ژنوتیپ انتخابی با استفاده از روش‌های درون شیشه‌ای است. چندین مرحله در ریزازدیادی وجود دارد که هر کدام تحت تأثیر تعدادی از عوامل فیزیکی، تغذیه‌ای، و هورمونی قراردارند. ریزازدیادی فقط وقتی مفهوم دارد که به مقدار کافی مواد اولیه به کار رفته باشد. بنابراین، انتخاب مواد پایه نمی‌تواند بدون دقت انجام گیرد. برای بیشتر گیاهان زینتی و میوه‌جات مواد اولیه یک گیاه برگزیده است، که به خاطر یک ویژگی فنوتیپی معین، مثل مزهٔ میوه، رنگ گل، شکل بوته، و غیره انتخاب شده است. در جنگلداری و تولید سبزیجات، مواد برگزیده یا فنوتیپ انتخابی یا تک بوته‌ای با بذر برگزیده خواهد بود که به عنوان مواد اولیه برای برنامهٔ ریزازدیادی کم و بیش گسترده به کار خواهند رفت. در بسیاری از عملیات تجاری، به ویژه تکثیر گیاهان زینتی، از روند انجام یک گزینش توده‌ای مثبت در مواد ریزازدیادی که تا رسیدن در گلخانه کشت شده‌اند تبعیت می‌شود. سپس این مواد انتخابی، مجدداً در محیط کشت کاشته می‌شوند. این روش از بسیاری از مشکلات جلوگیری کرده و حتی دارای ارزش بالایی در بهبود انتخاب می‌باشد.

۱- ریزتکثیری[1] (تکثیر کلونی در شیشه)[2]

اصطلاح ریزتکثیری به دو معنی بکار می‌رود.

۱- تعریف کلی: ریزتکثیری عبارت است از تجدیدنسل (باززایی)[1] گیاهان از اورگانلها، بافتها، سلولها یا پروتوپلاست در شیشه می‌باشد.

---

[1] .Micropropagation
[2] . In vitro clonal propagation

۲- تعریف عملی: تکثیر غیرجنسی به وسیله کشت مریستم یا انـدام هـوایی[۲] در شیـشه را ریزتکثیری گویند.

هدف از ریزتکثیری عبارت است از:

۱- تولید تعداد زیادی گیاه در یک محدوده زمانی معین.

۲- تکثیر دستجمعی و یکنواخت گیاهان انتخابی از نظر صفات مطلوب.

تعریف کلون[۳]: کلون عبارت است از گروهی از گیاهان دارای ژنوتیپ مشابه که به وسیله تولیدمثل غیرجنسی به وجود آمده‌اند.

اگر گیاهان دارای ژنوتیپ مشابه به وسیله روشهای کلاسیک و استریل در شیـشه و به صورت رویشی تکثیر شوند آن را کلون کردن رویشی[۴] گویند.

تعریف پروپاگول[۵] (ریزجوانه): پروپاگول عبارت اسـت از یـک سـاختار پراکنـده (بـذر، میـوه، غـده، مریـستم، جوانـه و گیاهچـه در شیـشه) کـه از موجـود والـدینی آزاد می‌شود. پروپاگول را به ریزجوانه ترجمه کرده‌اند.

تاریخچه: در سال ۱۹۴۵ لو[۶] موفق به رشد اندام هوایی[۷] از جوانه انتهایی مارچوبه در شیشه شد. در سال ۱۹۶۴ بال[۸] موفق به رشد جوانه Lupinus albus از مریستم شد. در سال ۱۹۶۰، مورل[۹] موفق به تولیـد Protocorm بـر روی مریـستمهای گـل ارکیـده در شیشه و تکثیر پروتوکرومها با قلمه زدن شـد، کـه ایـن تکنیـک را تکنیـک Mericlon گویند. از یک جوانه انتهایی حدود ۴ میلیون گیاه از پروتوکرومهـای تکثیرشـده بازیـابی

---

[1] . Regeneration
[2] . Shoot
[3] . Clone
[4] . Vegetative Cloning
[5] .Propagule
[6] . Loo
[7] . Shoot
[8] . Ball
[9] . Morel

شـد. از سـال ۱۹۶۰ بـه بعـد تکثیـر تجـاری کلونهـا از طریـق کـشت بافـت بـرای گلهـا، سبزیجات، گیاهان زراعی، میوه‌جات، گیاهان دارویی، درختان جنگلـی و سـایر گیاهـان زراعی شروع شد. انواع مریستمهای گیاهان را می‌توان در شکل (۱-۵) مشاهده کرد.

روشهای تکثیر گیاهان به وسیله کشت بافت

تکثیر غیرجنسی گیاهان به سه روش صورت می‌گیرد:

۱- تکثیر مریستم‌های اندامهای هوایی (جانبی) به وسیله کاهش غلبه انتهایی

۲- تشکیل مریستمهای نابجا[1] یا اندام هوایی (به صورت انتهای اندام هوایی یا جنین) کـه به صورت مستقیم از ریزنمونه‌های اندامها یا به صورت غیرمستقیم از کالوس حاصـل می‌شود.

۳- بذر مصنوعی[2] یا جنین‌های سماتیکی[3]

۱- جوانه جانبی

بخش عمده‌ای از گیاهان عالی دارای مریستم در کنار برگ هستند. این مریـستم‌هـا قابلیت تبدیل به یک گیاه کامل را دارند.

مریستم عبارت است از یک ناحیه متمرکز از تقسیم فعال سلول میتوزی در گیاهـان که بافتهای دائمی از آن به وجود می‌آیند. گروهی از سلولهای تمایزنیافته به یکی از سـه صورت زیر قرار دارند.

الف- در انتهای ساقه‌ها و شاخه‌ها یا اندامهای هـوایی کـه آنهـا را مریـستم انتهـایی[4] می‌نامند.

ب- بین آوندهای چوبی و آبکشی دسته‌های آوندی (Combium).

---

[1] . Adventitious meristems
[2] . artificial seed
[3] . Somatic embryos
[4] . Apical meristem

ج- در برگهای جوان و در پایه بین گره‌ها که در اینصورت آنها را مریستم‌های اضافی[1] گویند.

کشت جوانه انتهایی[2]

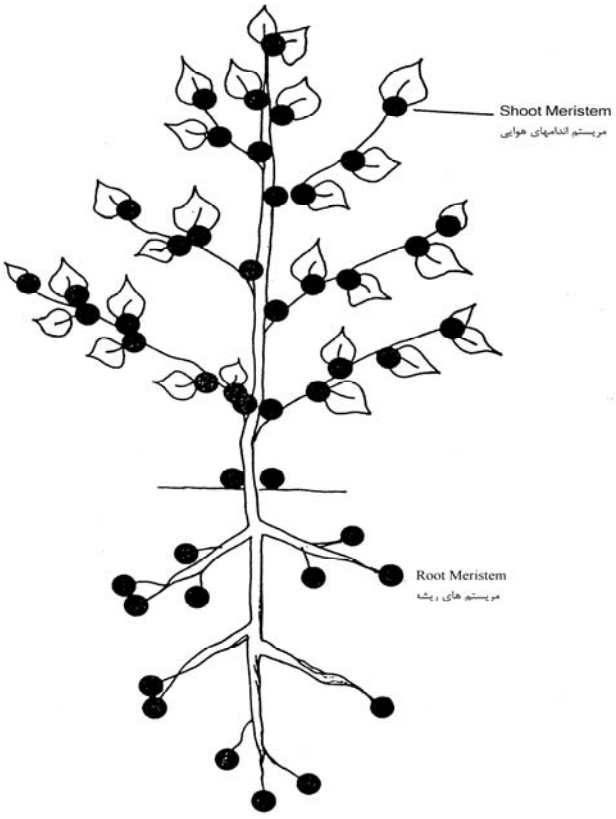
با استفاده از سیتوکینین و مریستمها، دسته‌های اندامهای هوایی به وجود می‌آیند. این دسته‌ها را می‌توان نصف کرد و قبل از آنکه ریشه بدهند می‌توان آنها را برای تبدیل شدن به گیاه کامل به محیط کشت فرعی[3] منتقل کرد. میزان تکثیر به مقدار زیادی به میزان تولید برگ بستگی دارد. در گیاهانی که به صورت بوته هستند میزان و سرعت تکثیر در هر ۴ تا ۶ هفته ۵ تا ۱۰ برابر افزایش می‌یابد. این روش در بسیاری از گیاهان علفی و نیز گونه‌های جنگلی بکار رفته است (شکل ۲-۵).

کشت گره[4] (کشت اندام هوایی)[5]

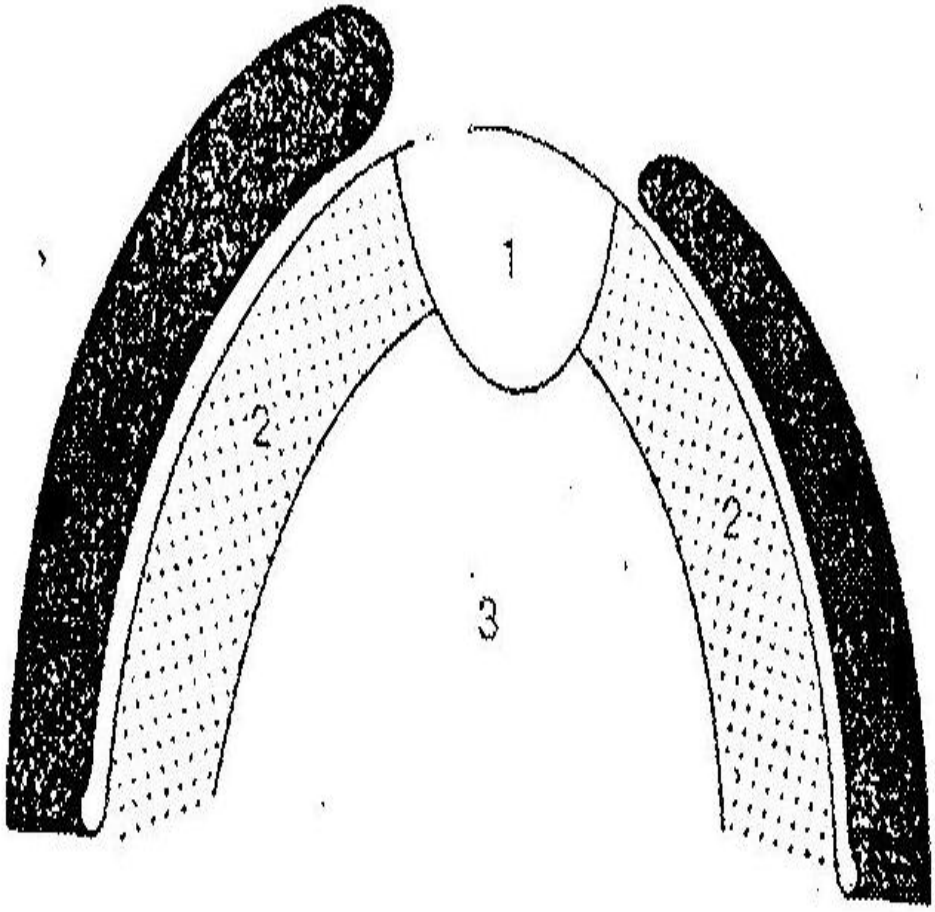
گره از مریستم گیاهانی با اندام هوایی طویل به وجود می‌آید. مریستم‌های جانبی ممکن است از غلبه انتهایی با جداسازی فیزیکی (قلمه زدن) در محیط کشت فرعی آزاد شوند. میزان تکثیر بستگی به میزان تشکیل گره در شیشه (۱۰ مرتبه در یکماه) دارد. این روش در سیب‌زمینی، خیار و نخود بکار رفته است.

---

1. Intercalary meristems
2. Shoot tip culture
3. Subculture
4. Node culture
5. Shoot culture



شکل ۱-۵- انواع مریستم های گیاهی



شکل ۲-۵: ساختمان گنبدی انتهایی برای کشت مریستم اندام هوایی

۱- آغاز گر مریستمی

۲- مریستم جانبی (منطقه ارگانو ژنز)

۳- مریستم مرکزی

۲- اندامهای هوایی نابجا[1]

عبارت است از بازیابی مریستم‌های اندامهای هوایی در بافت سماتیکی از نو[2]. از این خاصیت به مقدار زیادی در کشت بافت استفاده می‌شود. فعالیت جنینی را می‌توان در سلولهای تعداد زیادی از اندامهای گونه‌های متفاوت بطور مصنوعی تحریک کرد و در نتیجه تولید جنین و اندامهای هوایی انتهایی نمود.

این روش ترجمان در شیشه روشهای تکثیر و مؤثر قدیمی است. ریزنمونه‌ها[3] شامل قلمه‌های کوچکی است که دارای اندامهای با خاصیت توتی پوتنت می‌باشند.

بافتهای حاصل از هر اندام در یک گونه می‌تواند تحت شرایط بخصوص توتی پوتنت باشد. نحوه بازیابی بستگی به گونه، اندام مورد استفاده و محیط کشت (میزان هورمونهای تنظیم کننده رشد) دارد. میزان بالای اوکسین و سیتوکینین سبب گسترش انواع کالوسهای متعدد می‌شود. بنابراین به وضوح نمی‌توان بازیابی اندامهای هوایی حاصل از کشت اندام و بازیابی اندامهای هوایی حاصل از کالوس را از یکدیگر تمیز داد. این نکته در ارتباط نزدیک با پایداری ژنتیکی است. راجع به بذر مصنوعی بعداً صحبت خواهیم کرد. روشهای تکثیر کلونی را به صورت در شیشه می‌توان در شکل (۳-۵) مشاهده کرد.

۳- پایداری ژنتیکی[4]

امروزه به خوبی مشخص شده است که گیاهان تکثیر شده توسط کشت بافت اگر توسط اندامهای هوایی جانبی (قطعات گره)[5] تکثیر شوند بیشترین یکنواختی را دارند. اما آندسته از گیاهانی که به صورت نابجا تکثیر می‌شوند، خصوصاً توسط کالوس، معمولاً دارای درجات متفاوتی از غیریکنواختی هستند.

---

1. Adventitious Shoots
2. De novo
3. Explants
4. Genetic stability
5. Nodal segments

این غیریکنواختی یا ناهمگنی[1] را تنوع سماکلون[2] می‌نامند. دلایل یکنواختی و غیریکنواختی را می‌توان به شرح زیر تعریف کرد:

الف- اندامهای هوایی جانبی[3]. از مریستم‌های سازمان یافته به وجود می‌آیند و فراوانی جهش نیز در سطح جهش طبیعی جوانه است.

ب- اندامهای هوایی نابجا[4]. از بافتهای سازمان نیافته (کالوس، سلولهای مریستمی) تمایز یافته‌اند. تقسیم میتوز در آنها کنترل شده نیست و همانندسازی DNA و ظهور ژن در آنها سبب ناهنجاریهای کروموزومی و مولکولی شده و لذا تنوع سماکلون به وجود می‌آید.

تغییرات ژنتیکی که سبب تنوع مرفولوژیکی در گیاهان بازیافته می‌شود را نمی‌توان از نظر مرفولوژیکی در لوله آزمایش کشف کرد. این مسئله را می‌توان با استفاده از کاوشگرهای (نشانگرهای) مولکولی به عنوان مثال الکتروفورز PCR و RFLP حل کرد.

۴- شیشه‌ای شدن[5]

رشد برگها و ساقه‌های شفاف، متورم، غیرطبیعی و شکننده که معمولاً به صورت نکروز درمی‌آیند و سبب مرگ جوانه می‌شوند را شیشه‌ای شدن گویند.

این مشکل جدی است و کراراً در کشت اندامهای هوایی گیاهان علفی و جنگلی (گل کلم، کرفس، تره‌فرنگی، میخک، Prunus، Gladiolus و غیره) واقع می‌شود. شیشه‌ای شدن معمولاً در محیط‌های کشت مایع واقع می‌شود و به نظر می‌رسد که دارای همبستگی بالایی با میزان سیتوکینین باشد. برگهای شیشه‌ای فاقد لایه‌های پرچین بوده و

---

[1] .Heterogeneity
[2] . Somaclonal variation
[3] . Axillary Shoots
[4] . Adventitious Shoots
[5] . Vitrification

فقط دارای مزوفیل اسفنجی هستند. این اثر یک واکنش مرفولوژیکی به تنش‌های ساده از قبیل غرقابی، زیاد بودن آمونیاک (NH_4) و سیتوکینین می‌باشد.

۵- روشهای تجاری ریزتکثیری رویشی

لازم به ذکر است که کلمه Micro در Micropropagation به معنی کشت بافت در شیشه می‌باشد. مباحث عمده‌ای که در ریزتکثیری مطرح است را می‌توان به صورت زیر خلاصه کرد:

الف- روشهای حذف ویروس[1] (شروع کشت)

ب- روشهای کشف ویروس[2]

ج- روشهای نگهداری در شیشه و ذخیره‌سازی بلندمدت

د- نگهداری به صورت منجمد[3]

هـ- روشهای ریزتکثیری

و- کاربرد در تولیدات زراعی

مراحل ریزازدیادی

پنج مرحله در ریزازدیادی وجود دارد(دوفوزارد،۱۹۷۶): مرحلهٔ آماده‌سازی (مرحلهٔ صفر)؛ مرحلهٔ آغازین (مرحلهٔ ۱)؛ مرحلهٔ تکثیر(مرحلهٔ ۲)؛ مرحلهٔ ریشه‌دهی (مرحلهٔ ۳)؛ و مرحلهٔ جابه‌جایی(مرحلهٔ ۴)، که جزئیات آن‌ها در زیر توضیح داده می‌شود.

مرحلهٔ صفر: مرحلهٔ آماده‌سازی

در ابتدا، این مرحله برای غلبه بر مشکلات عظیم آلودگی ارائه شد. به دست آوردن گیاهان پایه در شرایط بهداشتی‌تر در گلخانه می‌تواند خطر آلودگی، به خصوص آلودگی‌های قارچی را به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش دهد. لیکن، تفسیر نتایج مربوط به

---

[1] .Virus elimination
[2] . Virus detection
[3] . Freeze preservation

آلودگی‌های باکتریایی مشکل‌تر است، چون در اغلب موارد نمی‌توانیم باکتری‌های درون‌زاد را از باکتری‌های برون‌زاد تمیز دهیم.

- پرورش گیاهان پایه **(Stock plants)** در شرایط بهداشتی‌تر

ایده‌آل این است که گیاهان پایه در گلخانه پرورش یابند. این عمل نه تنها جمعیت میکروارگانیزم‌هایی که در سطح گیاه زندگی می‌کنند، کاهش می‌دهد، بلکه به دلیل کاربرد منظم کود، قارچ‌کش، و حشره‌کش، به تولید گیاهانی با کیفیت بالا برای مرحلهٔ ۱ نیز کمک می‌کند.

- تغییر شرایط فیزیولوژیکی گیاهان پایه، منبع ها، یا

مرحلهٔ صفر شامل رویدادهای زیادی است که می‌تواند یک را به عنوان مواد اولیه، مناسب‌تر یا قابل اعتمادتر سازد. رایج‌ترین پارامترهای دست ورزی عبارتند از نور، حرارت، و تنظیم کننده‌های رشد گیاه.

نور: کنترل کردن فتوپریود در یک گلخانه امکان تولید ریزنمونه‌های با استاندارد بالاتر در طول سال را فراهم می‌نماید. این امر به خصوص برای گیاهانی که گلدهی آنها در کنترل فتوپریودی قراردارد، صادق است، مثلاً کشت درون شیشه‌ای گونه های بگونیا به طور مثبتی نه تنها تحت تأثیر درجه حرارت بالا، بلکه تحت تأثیر روزهای بلندی که برای گیاهان پایه به کار رفت نیز قرار گرفت.

کارپاول‌رید(۱۹۸۸)در ایالات متحده اثر کیفیت نور را بر مدیریت گیاهان پایه و طبعاً بر روی بازدهی گیاهان در درون شیشه نشان داد. او نشان داد که وقتی به بوته‌های اطلسی تیمار یک دوره نور قرمز(۶۰۰-۷۰۰ نانومتر) در انتهای روز اعمال گردید، به مقدار زیادی شاخه‌دهی کردند،در حالی که آنهایی که با نور قرمز دور(۷۰۰-۷۹۵ نانومتر) تیمار شدند، به صورت مستقیم رشد کرده و بدون باقی ماندند. به علاوه، کشت قطعات برگ برگرفته از بوته‌های پایه که با نور قرمز تیمار شده بودند، در هر تا سه برابر های تیمار نشده شاخه‌دهی کردند.

درجهٔ حرارت: اهمیت درجه حرارت در تأثیرگذاری بر تغییرات فیزیولوژیکی که موجب بهبود کارایی ریز ازدیادی می‌شود، در چندین گونهٔ گیاهی نشان داده شده است.

در اغلب گیاهان پیازی و درختان نواحی معتدل، شکستن خواب به تیمار سرما نیاز دارد. برای مثال، انبار کردن زنبق در ۴ درجهٔ سانتی‌گراد بر روی تولید پیازچه در درون شیشه تأثیر زیادی داشته و علاوه بر این وزن پیازچه‌ها نیز تحت تأثیر درجه حرارت قرار گرفت. در سنبل، نگهداری کشت‌ها به مدت ۷۰ روز در دمای ۱۵درجهٔ سانتی‌گراد پیازچه‌هایی سنگین‌تر از آنهایی که در مدت مشابه در دمای ۲۵درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند، تولید کردند.

وقتی که گیاهان پایهٔ برخی گیاهان چوبی در یک دورهٔ زمانی مشابه با آنچه در طبیعت برای شکستن خواب نیاز دارد، در سرمای ۴ الی ۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند، تعداد جست‌های جدید بیشتری تولید شد.

پیش تیمار با تنظیم کننده‌های رشد گیاهی: واکنش پذیری یک ریزنمونه در مرحلهٔ ۱ می‌تواند با یک تیمار مناسب توسط تنظیم کننده‌های رشد گیاه پایه، منبع ریزنمونه ، یا خود ریزنمونه کنترل شود. لیکن، تحقیقات محدودی در مورد اثر پیش تیمار با تنظیم کننده‌های رشد(هم تشدید کننده‌ها و هم جلوگیری کننده‌ها) بر واکنش ریزنمونه ها در درون شیشه انجام گرفته است. با دست وریزی گیاهان پایه فیزیولوژی آنها و طبعاً واکنش آنها را در درون شیشه می‌توان تغییرداد. مانی ودبرگ(۱۹۸۶)، در دانشگاه گنت بلژیک، محلول بنزیل آدنین (BA) (تا ۵۰۰ میلی‌گرم درلیتر) را در تنهٔ ***Magnolia soulangana*** برای بهبود موفقیت در مرحلهٔ ۱ تزریق کردند. در گونهٔ مشابه، مشخص گردیدکه جوانه زنی دانه رست‌های ***Brassica campestris*** درحضور BA کارایی باززایی بعدی ریزنمونه‌های لپه را افزایش می‌دهد.

رویکرد دیگر قرار دادن منبع ریزنمونه در یک محلول مقوی مثل محلول ساکارز، ۸- هیدروکسی کینولین سیترات حاویBA واسید جیبرالیک(GA_3) می‌باشد. این کار باعث بهبود واکنش پذیری گیاهان چوبی در مرحلهٔ ۱ می‌شود.

تیمار شوک الکتریکی ریزنمونه‌های اولیهٔ .Grevilla spp در محلول‌های حاوی سیتوکینین موجب سرعت تکثیری برابر با کشت ریزنمونه ها در محیط کشت حاوی سیتوکینین شده است.

مرحلهٔ ۱: مرحلهٔ آغازین

هدف این مرحله تولید کشت‌های عاری از آلودگی است. عواملی که در این مرحله بر روی موفقیت اثر می‌گذارند عبارتنداز:

- ریزنمونه‌ها

درغالب کارهای ریزازدیادی انتخاب ریزنمونه انتخابی از جوانهٔ انتهایی یا جانبی است (شکل ۱-۵)؛ فقط در تعداد معدودی از گیاهان ریزنمونه‌های دیگری مثل قطعات برگ در بگونیا و سینتپولیا (بنفشه آفریقایی) یا طبق گل در گونهٔ ژربرا(Gerbera) .spp به کار می‌رود.

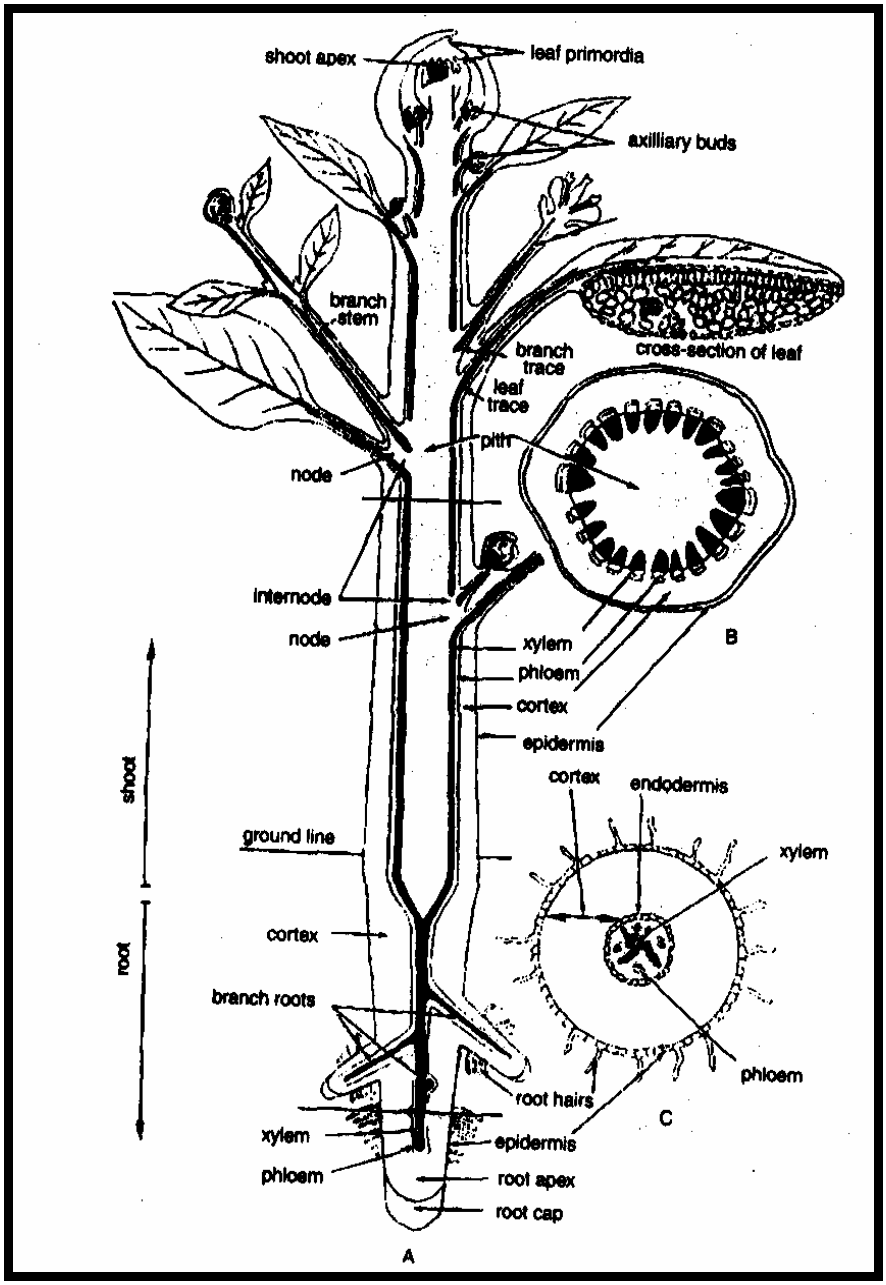
عوامل زیر میزان موفقیت در مرحلهٔ اول را تعیین می‌کنند:

۱- سن گیاه پایه

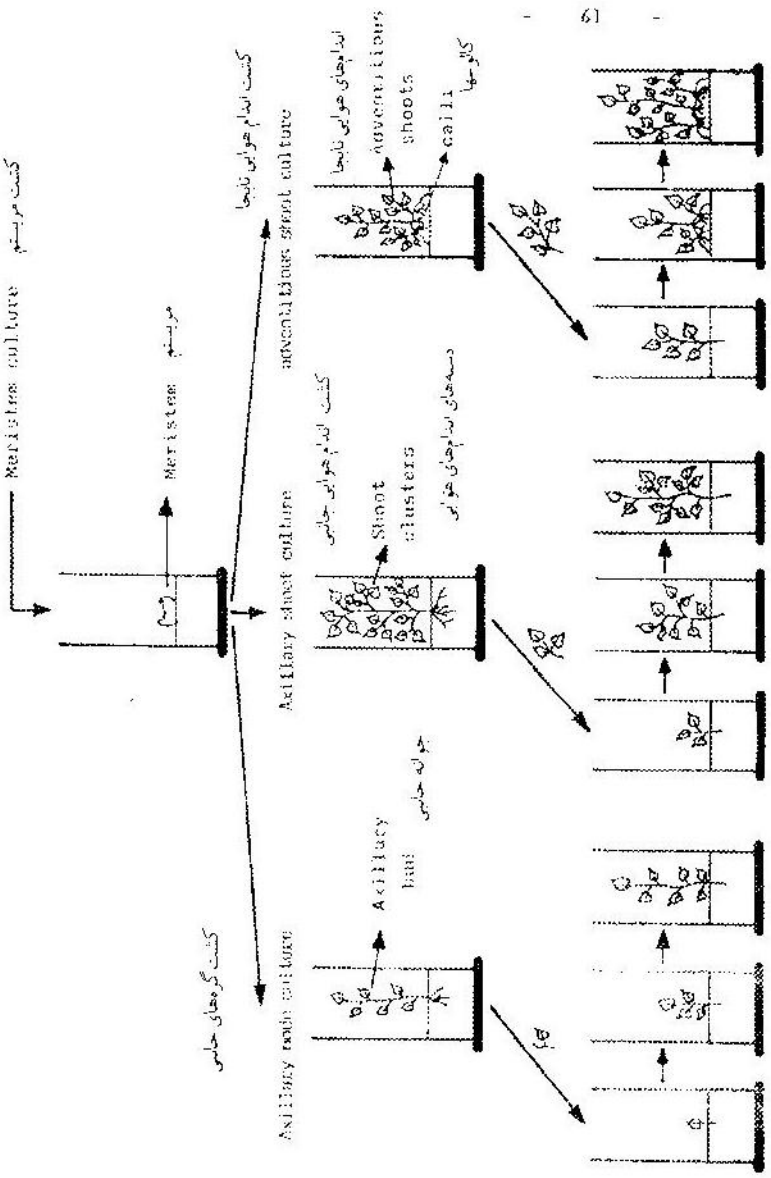
۲- سن فیزیولوژیکی ریزنمونه

۳- مرحلهٔ نموی ریزنمونه

۴- اندازهٔ ریزنمونه



شکل ۱-۵: A اندام‌ها و بافت‌های اندام یک گیاه دانه‌دار؛ B، مقطع عرضی ساقه، C، مقطع عرضی ریشه. جوانه‌های انتهایی یا جانبی منابع خوبی برای ریز نمونه هستند.



شکل ۳-۵: روش های تکثیر کلونی

عکس‌العمل‌های فوق حساسیت

وقتی بافت‌های گیاهی در موقعیت‌های تنشی مانند آسیب مکانیکی قرار داده شوند (نظیر مورد جداسازی یک ریزنمونه از گیاه پایه)، ساخت ترکیبات فنلی تحریک می‌گردد. این مسئله منجر به عکس‌العمل‌های فوق حساسیت مانند حالات زیر می‌شود:

۱- آزاد شدن محتویات سلول‌های پاره شده

۲- عکس‌العمل در سلول‌های همسایه، ولی بدون این که خودشان علائم آسیب دیدگی نشان دهند.

۳- مرگ زودرس سلول‌های خاص در محیط زخم یا در محل آلودگی به طور کلی، متابولیسم ترکیبات فنلی سه نوع واکنش ممکن در پاسخ به تنش یا آسیب دارند:

۱- اکسیداسیون ترکیبات فنلی ایجاد شده (به کوئینان‌ها و مواد پلی‌مر تبدیل می‌شوند)

۲- سنتز مشتقات مونومری

۳- سنتز مشتقات فنلی پلیمری

سنتز مشتقات فنلی مونومری در بافت‌های آسیب ندیده می‌تواند منجر به تجمع مقادیر زیادی از ترکیبات تولید شده قبلی و یا منجر به ظهور تولیدات جدیدی می‌شود که در مکانیزم حفاظتی بافت نقش ایفا می‌کنند. نقش این مواد تولیدی می‌تواند، تشکیل موانع فیزیکی(لیگنین) در مقابل هجوم یا یک بازدارندهٔ رشد میکربی (پنج کربنه، فیتوآلکسین‌ها) باشد.

به طور کلی کشت بافت‌هایی که دارای غلظت‌های نسبتاً بالایی از ترکیبات فنلی هستند مشکل است. فنل‌ها تولیداتی به شدت ناپایدار هستند که به آسانی اکسیده می‌شوند. این مواد اکسیده شده می‌توانند برای گیاه سمی باشند.

راهبردهایی که می‌توانند برای کاهش یا حذف این ترکیبات مورد قبول باشد عبارتند از:

۱- حذف ترکیبات فنلی تولیدی(با صاف کردن، یعنی شستشو در آب برای مدت طولانی، جذب آنها توسط زغال فعال یا پلی‌وینیل پیرولیدون).

۲- غیرفعال کردن آنزیم فنلاز توسط عامل کلات کننده.

۳- کاهش فعالیت فنلاز و کاهش قابلیت دسترس به آنها(مثل کاهش PH، افزودنی‌هایی به محیط کشت مثل آنتی اکسیدان‌ها- اسید آسکوربیک و اسید سیتریک، قراردادن کشت‌ها در انکوباتور در تاریکی).

بعلاوه، دربسیاری از گیاهان، برای جلوگیری (یا به حداقل رساندن) از سیاه شدن ریزنمونه‌ها در محیط کشت، باید از تنش جلوگیری کرد یا آن را به حداقل رسانید. برای دستیابی به این امر بیشتر کارها را در مرحلهٔ صفر می‌توان انجام داد، زیرا کاشت گیاهان بخشنده در شرایط بهداشتی، فرد را قادر می‌سازد که ضدعفونی ملایم‌تری را انجام داده و در نتیجه تنش را کاهش دهد.

تعدادی آنتی اکسیدان‌های مختلف به کاربرده شده‌اند، ولی همهٔ آنها مؤثر نبوده‌اند. به علاوه تعدادی فقط برای کاربرد کوتاه مدت مناسب‌اند، زیرا خود به سرعت تبدیل به اکسیدان‌های قوی مثل اسید آسکوربیک می‌شوند. دیتیوتریتول یک آنتی اکسیدان قوی است که بعد از اکسیداسیون یک اکسیدان ضعیف، باقی می‌گذارد.

بعضی از عناصر ریزمغذی، مثل Mn^{2+} (یک کوفاکتور پراکسیداز) و Cu^{2+} (قسمتی از مجموعهٔ آنزیم فنلاز) می‌توانند اکسیداسیون ترکیبات فنلی را تحریک نمایند. بنابراین، کاربرد فرمول‌های نمکی که فاقد این عناصر بوده یا مقدار عناصر در حداقل ممکن باشد قابل توصیه است.

با نگهداری کشت‌ها در تاریکی، می‌توان از فعالیت آنزیم‌های مربوط به بیوسنتز و اکسیداسیون ترکیبات فنلی هر دو جلوگیری کرد یا آن را کاهش داد. کاهش درجه

حرارت نیز می تواند فعالیت آن‌ها را کاهش دهد. کرسول ونیش(۱۹۷۵) کشت‌های اوکالیپتوس خود را به جای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد در انکوباتور ۱۶ درجهٔ سانتی‌گراد قراردادند، و با چنین کاری، موفق به غلبه بر اکسیداسیون ترکیبات فنلی شدند.

بعضی از انواع سیتوکینین (که در کشت بافت برای ازدیاد به کار می‌روند)، نظیر سیتوکینین های دارای استخلاف N_6 آدنین، می‌توانند سیاه شدن را تشدید کنند. بنابراین، بهتر است این نوع سیتوکینین به هنگام شروع باید خودداری گردد و یا به حداقل مقدار اکتفا شود.

درغلظت بالای نمک ترکیبات فنلی تولید شده در گیاه نمی‌توانند آب شویی شوند. احتمال اثر اسمزی در ممانعت از این خروج را نمی‌توان از نظر دور داشت.

مرحلهٔ ۲: تکثیر

در این مرحله ریزنمونه‌های سالم که در مرحله ۱ تولید گردیده‌اند، بر روی محیط کشت غنی از سیتوکینین قرار داده می‌شوند تا تعداد زیادی تولید کنند. این مرحله می‌تواند برای چند دوره تا به دست آوردن تعداد شاخه کافی برای مرحلهٔ ریشه دهی(مرحله ۳) تکرار شود.

درخلال این مرحله، ریزنمونه‌ها ممکن است تولیدهای کالزا(کالوژنCallogenesis) یا های شاخه‌زا (کائولوژنCaulogenesis) بنمایند.

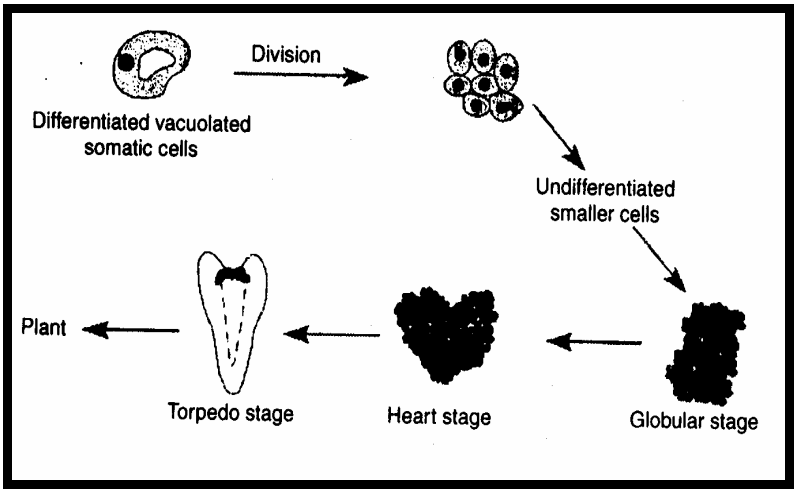
بافت پینه‌ای، ممکن است جنینک‌هایی (embryoids) تولید کند و بعد هرجنینک به یک گیاهچه تبدیل شود (جنین‌زایی سوماتیکی، به شکل ۵-۲ توجه نمایید)، و یا ممکن است مریستمک‌هایی (meristemoids) تولید نماید که بعد از رشد به تبدیل شوند (اندام زایی). البته تولید بافت پینه‌ای و به دست آوردن گیاهان ریزازدیادی شده از این طریق مطلوب نیست، مگر اینکه مخصوصاً به جنین‌های سوماتیکی برای تولید بذر مصنوعی علاقمند باشیم. کال‌زایی غالباً منجر به انحرافات

ژنتیکی به نـام تنـوع سـوماکلونال (Somaclonal variation) مـی‌شـود، و بنـابراین گیاهان حاصله ممکن است مطابق با اصل نباشند (خارج از تیپ off- types باشند).

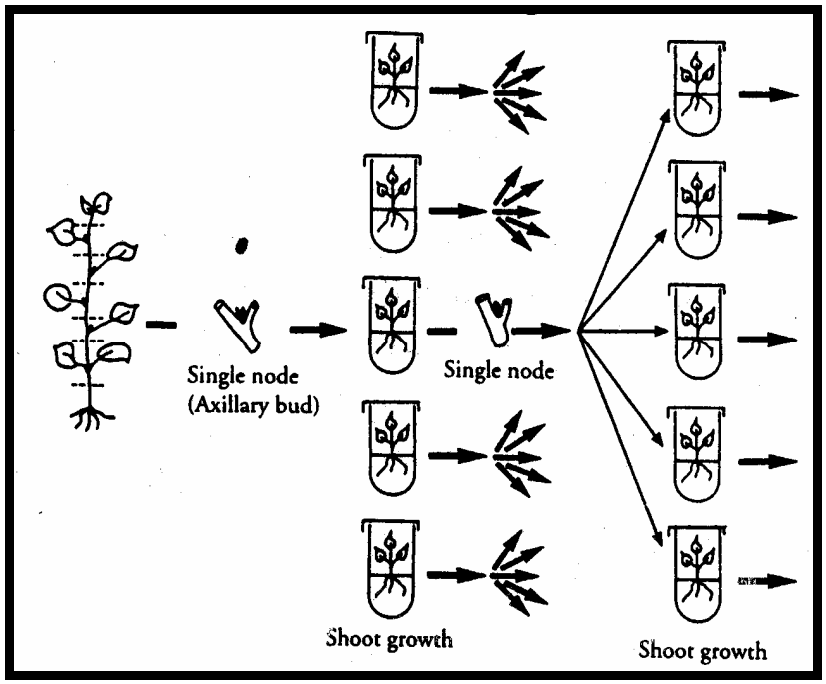
مسیر دوم، بسته به منبع ریزنمونه‌ها، به صـورت زیـر اسـت: اگـر منبـع ریزنمونـه‌هـا چیزی غیر از جوانه‌های انتهایی و جانبی باشد(مثل قطعات ریشه، قطعات بـرگ، قطعـات دم برگ)، مانند آنچه در بنفشه آفریقایی و بگونیا رکس اتفاق می‌افتد، شاخساره‌های بـه دست آمده را شاخساره‌های نابجـا (adventitious shoots) مـی‌نامنـد. اگرچـه ایـن روش سریع و برای تکثیر گیاهان مشخصی ضروری است، اما ایـن روش موجـب تولیـد تعدادی گیاه خارج از تیپ می‌شود.

بهترین و سالم‌ترین روش، شاخسارهزایـی جـانبی (axillary caulogenesis) است که مادهٔ اولیهٔ آن یک جوانهٔ انتهایی و یا یک جوانهٔ جانبی باشد(شـکل ۵-۳). ایـن روش همراه با کمترین انحرافات ژنتیکی است و بنابراین مـی‌توانـد بـرای تولیـد گیاهـان همسانه‌ای (کلن) با حداقل خطر به کار گرفته شود.

حساسیت و به تبع آن واکنش یک ریزنمونه بـسته بـه مـدت زمـان قـرار داشـتن در کشت و یا با تعداد واکشت‌ها تغییر می‌کند (دبرگ ومانی،۱۹۸۱). بعـد از واکـشت‌هـای متعدد گیاهانی کـه از ابتـدا شاخـسارههـای جـانبی ایجـاد کـردهانـد ممکـن اسـت فقـط شاخساره‌های نابجا تولید کنند. این امر بدان معنی است که روش تکثیر در یـک سیـستم مشخص ضرورتاً ثابت نیست.



شکل ۵-۵: از طریق جنین‌زایی سوماتیکی یک سلول بدنی (غیرگامتی) متمایز شده و یک ساختمان دو قطبی دارای جوانه‌های ریشه و تشکیل می‌دهد. در صورت آماده بودن شرایط فیزیکی و شیمیایی مناسب، این جنین‌های سوماتیکی می‌توانند بالغ شده و جوانه بزنند (منبع: اسمیت، ۱۹۹۲، صفحه ۵۷)



شکل ۶-۵: تولید جانبی می‌تواند با استفاده از جوانه انتهایی یا جوانه جانبی به عنوان ماده گیاهی اولیه به دست آید.

حتی وقتی یک سیستم فقط شاخساره‌های جانبی تولید می‌کند، این گیاهان ضرورتاً از ناهنجاری‌های ژنتیکی در امان نیستند دُزهای بالای سیتوکینین یا سیتوکینین نامناسب می‌توانند مسئول تنوع فراژنتیکی باشند. برای مثال:

۱- ایجاد اشکال متنوع گیاه در غلظت‌های بالای سیتوکینین بعد از چندین واکشت

۲- برگ‌های انبوه ، تعداد محدود گل با دمگل‌های بسیار کوتاه در *jamesonii* *Gerbera* که اغلب نتیجهٔ نوع سیتوکینین و در این مورد BA، است.

۳- در *Fragaria* تعداد نامحدود واکشت منجر به بی‌نظمی جدی مانند نبود یا ضعف ریزوم‌زایی، تشکیل گل زیاد، میوه‌های کوچک یا بد شکل و گیاهان غیریکنواخت در مزارع تولیدی می‌شود.

لیکن یکی از اختلالات مهم فیزیولوژیکی، آناتومیکی، و مورفولوژیکی که این مرحله با آن مواجه می‌گردد مشکل فوق آبدار شدن (قبلاً به عنوان شیشه‌ای شدن نامگذار شده بود) می‌باشد. این اختلال، که غالباً در برگ‌ها بروز می‌نماید، بر روی فتوسنتز و تبادلات گازی گیاهان متأثر اثر می‌گذارد. بیش از ۶۰ درصد گیاهان فوق آبدار نمی‌توانند به شرایط بیرون گلخانه عادت کنند.

- نوع ریزنمونه

قبلاً راجع به تأثیر نوع ریزنمونه در کشت‌های مرحلهٔ ۱ بحث شد. نوع ریزنمونه همچنین بر میزان ازدیاد بسیاری از گیاهان تأثیر دارد. برای مثال، کشت‌های *Picea sitchensis* (کاج سیتکا) برگرفته از جوانهٔ انتهایی نسبت به کشت‌های شروع شده از جوانه‌های جانبی به میزان بالاتری ازدیاد حاصل نمودند. این امر در واکشت‌های اول و دوم بیشتر مشهود بود.

به طور مشابه، درگونه‌های مختلف مشخص شد که شدت ازدیاد هرقدر که *Grevillea* ریزنمونه‌ها از جوانه انتهایی دورتر بودند کاهش بیشتری یافت. به عبارت دیگر، گره‌های دورتر کمترین شدت ازدیاد را به دست دادند.

- سیستم‌های تکثیر

انتخاب روش تکثیر، شاخساره‌های نابجا یا جانبی (یا هر دو) و نسبت تکثیرمی‌تواند اثرات طویل‌المدت در مراحل بعدی درون شیشه‌ای و عملکرد خارج از شیشه داشته باشد. در بسیاری از موارد سیستمی که بیشترین را تولید کند، بهترین انتخاب نیست. در نتیجهٔ انتخاب یک سیستم نامناسب تکثیر، تبعاتی وجود دارد که در بالا در مورد ژربرا *Gerbera jamesonii* و گونه‌های *Fragaria sp.* توضیح داده شد.

تنوع ژنتیکی: انتخاب شاخساره‌زایی نابجا یا جانبی، یا ترکیبی از هر دو، به مطابق با اصل بودن نتاج و عوامل اقتصادی بستگی دارد. برای بسیاری از گیاهان، شاخساره‌زایی نابجا موجب تولید گیاهان غیرطبیعی بیشتری نسبت به تشکیل جوانه‌های جانبی می‌شود.

نسبت تکثیر: در بسیاری از موارد، نسبت تکثیر می‌تواند با افزایش مقدار سیتوکینین یا با کاربرد یک سیتوکینین قوی بهبود یابد، چنین دخالتی ممکن است موجب اثرات مضری در مراحل بعدی ریزازدیادی بشود.

انتخاب نهایی یک سیستم تکثیر تحت تأثیر آسانی دست ورزی سیستم کشت قرار خواهد گرفت. اگر کشت‌ها یکنواخت باشند کارایی بالایی را می‌توان بدست آورد.

محیط: محیط کشت، که حاصل اثرات متقابل بین مواد گیاهی، ظرف کشت و محیط بیرونی اتاق کشت است، تأثیر به سزایی بر سیستم کشت بافت دارد. از نظر تئوری، کلیهٔ پارامترها در تمام ظروف کشت موجود در یک اتاق کشت مشابه در نظر گرفته می‌شوند و به تبع آن این وضعیت در مورد اتاق کشت‌های مختلف هم صادق است. بنابراین، هدف تهیهٔ شرایط یکنواخت برای تمام ظروف کشت است.

درانتخاب درپوش لوله‌های کشتی که تحت تأثیر غلظتCO_2 ، بخار آب و گاز اتیلن هستند، باید دقت کرد. فضای گازی بالای لوله(فضای هوای داخل لوله‌های کشت) مطابق آنچه کومار، رید و تروپه (۱۹۸۷) در کشت لپهٔ *Pinus radiata* نشان داده‌اند، می‌تواند تأثیر مهمی بر روی باززایی داشته باشد. مشاهدات مشابهی در کشت

بافت چندین گونهٔ دیگر انجام شد. بنابراین، انتخاب ظرف کشتی که در آن تبادل گازی با کمترین اتلاف رطوبت انجام شود، در بهینه کردن باززایی بیشتر سیستم‌های ریزازدیادی مفید خواهد بود.

مرحلهٔ ۳: پیش از جابه‌جایی (مرحلهٔ ریشه‌دهی)

هدف مرحلهٔ سوم آماده‌سازی گیاهچه‌ها برای جابه‌جایی از محیط مصنوعی ناخودپرور(هتروتروف) لولهٔ آزمایش به یک محیط خودپرور(اتوتروف) آزادزی در گلخانه و محل نهایی کاشت آنها می‌باشد. این آماده‌سازی ممکن است شامل ریشه‌دهی باشد ولی تغییر در فیزیولوژی گیاهچه به شکلی که فتوسنتز، جذب مواد غذایی و آب از طریق ریشه و ایجاد مقاومت به پسابیدگی و عوامل بیماری‌زا در آن تحریک شود را نیز شامل می‌گردد. در این مرحله، تکثیر به سه طریق اساسی می‌تواند انجام شود:

۱- ریزنمونه‌های منفرد را می‌توان از تودهٔ شاخساره‌های تولید شده در یک ظرف کشت گرفت و مستقیماً در یک محیط کشت ریشه‌زایی در زیر مه‌پاش یا تحت رطوبت بالا به همراه یا بدون هورمون‌های ریشه‌زایی کشت کرد. تمام بقایای محیط کشت آگار باید از ریزنمونه‌ها شسته شود تا منبع بالقوهٔ آلودگی حذف شود.

۲- افزونه‌های انفرادی را می‌توان در ظرف‌های جدید در محیط کشت ضدعفونی حاوی سیتوکینین کاهش یافته یا حذف شده، غلظت افزایش یافته اکسین، و غالباً دارای نمک غیرآلی کمتر کشت کرد. در بعضی از انواع گیاهان، ریشه‌های نابجا بعداً در افزونه‌ها ایجاد می‌شوند. تارهای کشندهٔ ریشه در محیط کشت مایع با هوادهی مناسب بهتر از محیط آگار توسعه پیدا می‌کنند. در سایر گیاهان، درصورتی که افزونه تنها یک یا دو روز در محیط اکسین نگهداری شود و سپس به محیط عاری از اکسین انتقال یابد(القاء ریشه‌زایی توسط اکسین تقویت می‌شود ولی حضور اکسین از رشد ریشه جلوگیری می‌نماید) ریشه‌زایی به بهترین وجه انجام می‌شود. یا، به سادگی افزونه را می-

توان بلافاصله در محلول ریشه‌زایی (اکسین) غوطه داد و مستقیماً در یک محیط کشت عاری از اکسین فرو برد.

۳- روش سوم منظور کردن یک مرحلهٔ طویل شدن بین مرحله ۲ و مرحله ۳ با قرار دادن افزونه‌ها به مدت دو تا چهار هفته در داخل محیط کشت آگار بدون سیتوکینین (یا در سطح بسیار کم) و در برخی موارد، اضافه کردن (یا افزایش) اسید جیبرلیک است. با افزونه‌ها سپس به صورتی که در روش‌های قبلی توضیح داده شد، رفتار خواهد شد.

انتخاب افزونه‌های یکنواخت و حذف گیاهچه‌های ناجور یا غیرطبیعی در شروع مرحلهٔ ۳ باید انجام گیرد. گاهی، کشت‌های گیاهی به مرور زمان با از دست دادن برگ‌ها، شکست در رشد، توسعهٔ سرسوختگی، به خواب رفتن، یا از دست دادن قابلیت باززایی تخریب می‌شوند. گونه‌های گیاهی که خواب توارثی یا نیاز به استراحت دارند ممکن است برای تحریک رشد جدید و طویل شدن نیاز به سرما دادن داشته باشند.

مرحله ۴: جابه‌جایی

گیاهچه‌های ریشه‌دار یا بدون ریشه از لوله‌های کشت بیرون کشیده می‌شوند، و برای حذف منبع بالقوهٔ آلودگی آگار به طور کامل شسته شده، وگیاهچه‌ها در داخل یک مخلوط خاک استاندارد ضدعفونی در گلدان‌های کوچک و با روش تقریباً سنتی نشاء می‌گردند. ابتدا برای حفاظت از خشک شدن گیاهچه‌ها را باید در سایه و رطوبت بالا در زیر سقف یا در شرایط مه پاش نگهداری کرد. برای تشکیل ریشه‌های تازه فعال ممکن است چند روز وقت مورد نیاز باشد. درجه حرارت مشابه اتاق کشت و شدت نور(۳۰ درصد نور محیط) نیز از عوامل مهم هستند. مواد غذایی خاک گلدان یکی دیگر از عوامل محدود کننده است. قانون شست (برای تعیین رطوبت خاک و حالت گاورو شدن آن مقداری از خاک را بین دو انگشت شست و سبابه گذاشته و فشار می‌دهند. در صورت شکل‌پذیری به معنی گاورو بودن تجربی یا ظرفیت مزرعهٔ تجربی

است.) حاکی از آن است که مادام که گیاهچه‌ها در زیر مه‌پاش قراردارند، هیچ مادهٔ غذایی به خاک گلدان افزوده نشود(یعنی ، سه تا چهار هفته بعد از جابه‌جایی).

وقتی که گیاهچه‌ها در محیط گلدان مستقر شدند، باید به تدریج در معرض رطوبت کمتر و شدت نور بیشتر قرار گیرند. هر گونه شرایط خواب یا استراحتی که در گیاه ایجاد شود به عنوان قسمتی از فرآیند استقرار باید برآن غلبه گردد.

ریزازدیادی تجارتی

فن آوری کشت بافت برای تکثیر انبوه برای کاربردهای صنعتی به خوبی توسعه یافته است. پانصد آزمایشگاه تجارتی ریزازدیادی در سطح جهان وجود دارد، و اغلب آنها در جوار خزانه‌های بزرگ تأسیس شده‌اند تا نیازهای مربوط به تأمین مواد گیاهی رفع شود. بیشترین موفقیت‌های تجاری در تولید ارکیده‌ها، گیاهان زینتی، و گیاهان برگساره‌ای بوده است. تعدادی از آزمایشگاه‌ها خود دارای خزانه نیستند و گیاهانی را با قرارداد برای سایر تولیدکنندگان تکثیر می‌نمایند و ممکن است خدمات اضافی دیگری مثل، تعیین بیماری‌ها و ذخیرهٔ ژرم‌پلاسم را ارائه دهند. برای گسترش ریزازدیادی به زمینه‌های جدیدی، مثل گیاهان غیرمثمره، درختان جنگلی و سبزیجات، هزینهٔ ریزازدیادی باید به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کند. مطالعهٔ هزینه‌ها نشان می‌دهد که هزینه‌های کارگری درصد مهمی از کل هزینه‌های تولید(۷۰٪-۴۰٪) را تشکیل می‌دهد.

تحقیق و توسعه(R&D) در آزمایشگاه‌های ریزازدیادی بر بهبود روش‌های ریز-ازدیادی به منظور کاهش هزینه‌های تکثیر متمرکز شده است. روش‌های کاهش آلودگی، سیستم‌های بیولوژیکی جدید ریزازدیادی (مثل جنین‌زایی سوماتیکی)، و خودکار کردن سیستم کشت بافت با استفاده از روبات‌ها در حال توسعه می‌باشند.

مثال‌هایی از ریز ازدیادی تجارتی گیاهان زینتی

- گروه **I**

گروه I شامل گونه‌هایی است که به آسانی از طریق تولید انبوه کشت می‌شوند. تعداد زیادی از این گیاهان دارای خصوصیات عاری بودن از عوامل بیماری‌های شناخته شده، تولید پایدار در طول سال، کیفیت بالا، رفتارهای بهبود یافته و سایر خصوصیات باغبانی مطلوب می‌باشند. مثال‌های این گروه آلستومریا، آنتوریوم، کالادیوم، کریسانتموم(داوودی)، دیفنباخیا، دروزرا، ژربرا، گلوکسینیا، جیپسوفیلا، فریزیا، موسا(موز)، نپتا، نفرولپیس، فیلودندرون، رادودندرون، انواع رز، بنفشهٔ آفریقایی و غیره می‌باشند.

- **گروه** II

گیاهان این گروه مستعد کشت درون شیشه‌ای بوده، در مقابل عوامل بیماری آزمایش شده‌اند، همسانه‌های برتر از آنها تولید شده، دارای ذخائر اصلاحی و مجموعهٔ رژیم‌پلاسم می‌باشند. مثال‌های این گروه بگونیا، دیانتوس، گلادیولوس(گلایول)، هامانتوس، همروکالیس، هوستا، سنبل، سوسن، یاس، پلارگونیوم(شمعدانی- مواد تست شده برای ویروس)، پتونیا(اطلسی- لاین‌های هیبرید ونر عقیم) و غیره هستند.

- **گروه** III

با بعضی مشکلات کشت می‌شوند، تحقیق و توسعه (R&D) برای این گیاهان مورد نیاز است تا سیستم‌های درون شیشه‌ای برای اطمینان از کیفیت بالای تولیدات بهبود یابد. مثال‌های این گروه عمدتاً گیاهان زینتی چوبی مثل ایسر(افرا)، چاماکیپاریس، جونیپروس، پائونیا، پوتنتیلا، سکویا، تاکزوس، و برخی ازنخل‌های زینتی مثل هویا و بسیاری از گونه‌های گیاهی بومی استرالیا مانند گرویلا می‌باشند.

۵-۳-۲) مثال‌های ریزازدیادی تجارتی درختان میوه:

توت فرنگی

میلیون‌ها بوتهٔ توت فرنگی حاصل از کشت بافت سالانه در سطح جهان تولید می‌گردد. کشت مریستم در ترکیب با گرما- درمانی (ترموتراپی) برای حذف ویروس

به کار می‌رود. کشت بافت برای افزایش تعداد لاین‌های کمیاب مثل بوته‌های نموده-سازی شده از نظر ویروس و همسانه‌های جدید به کار رفته است.

تمشک معمولی و تمشک سیاه

تمشک و تمشک سیاه توسط ریزنمونه‌های تک گره تکثیر می‌شوند. دستورالعمل‌های تثبیت شده‌ای برای تکثیر سریع گیاهان عاری از بیماری و ارقام جدید (مثل تمشک سیاه بدون خار) وجود دارد.

زغال اخته

زغال اخته به سرعت از طریق تکثیر می‌شود. تکثیر از طریق کشت بافت برای ازدیاد گیاهان برتری که برای به دست آوردن ریزنمونه از آن‌ها استفاده خواهد شد، می‌تواند به کاربرده شود.

کیوی فروت(آکتینیدیا)

مواد محدودی از کیوی فروت را با استفاده از کشت جوانهٔ انتهایی شاخساره می‌توان تکثیر نمود.

انگورها

چندین روش درون شیشه‌ای برای تکثیر انگور و حذف ویروس موجود است. کشت بافت می‌تواند به عنوان ابزاری برای تولید ریزنمونه‌های انگور(پایه‌های عاری از بیماری، همسانه‌های انتخابی و محلی، هیبریدها و ارقام جدید) پذیرفته شود. هم پیوند و هم پایه را می‌توان در درون شیشه‌ای تکثیر نمود. ظرفیت تکثیر انگورهای رومیزی جدید نیز وجود دارد.

سیب(مالوس)

کشت بافت سیب عمدتاً برای تکثیر پایهٔ مادری مورد استفاده قرار می‌گیرد. عملکرد مزرعه‌ای پیوندکه ارقام ریز ازدیادی شده قبل از تکثیر تجارتی بایستی به دقت در نظر گرفته شود.

گیلاس (پرونوس)

هم برای گیلاس و هم برای آلبالو دستورالعمل تکثیر وجود دارد. از ریزازدیادی برای تکثیر پایه‌های انتخابی استفاده می‌شود.

هلو و زرد آلو (پرونوس)

تنها تعداد معدودی از ارقام هلو و پایه‌های آن در درون شیشه تکثیر شده است. موارد بسیار معدودی از ریزازدیادی زردآلو گزارش شده است. مشکلات و بی‌ثباتی در ریشه‌زایی هر دو گونه موانع اصلی برای کاربرد ریزازدیادی در سطح تجارتی آنها می‌باشد.

گلابی(پیروس)

برای تکثیر تجارتی گلابی سیستم درون شیشه‌ای خوبی توسعه نیافته است. در هر برنامهٔ تجارتی ارتباط تنگاتنگ بین ریزازدیادی و برنامه‌های اصلاحی مطلوب است. ریزازدیادی باید به منظور تولید مواد زیر باشد:

۱- ریزنمونه‌های نموده‌سازی شده از نظر ویروس

۲- ارقام جدید

۳- دشواری ازدیاد ژنوتیپ‌های برگزیده

۴- مقادیر زیاد پایه

برای ایجاد دستورالعمل های کارآمد برای ژنوتیپ های محلی R&D باید جزء اولویت‌ها به حساب آید.

سایر محصولات موجود برای ریزازدیادی تجارتی

مارچوبه

نژادهای برتر مارچوبه با موفقیت ریزازدیادی شدند.

سبزیجات (خیار،کدو، گوجه‌فرنگی، پیاز، و غیره)

ریزازدیادی فقط برای ژنوتیپ‌های خاصی مانند لاین‌های والدینی نر عقیم مورد نیاز برای تولید بذر F_1 بکاررفته است.

سیر

تولید مواد نموده‌سازی شده از نظر ویروس و نگهداری ژرم‌پلاسم در سیر امکان پذیر شده است.

ادویه‌جات و گیاهان طعم افزای غذاها

تقاضای محدودی برای تکثیر انبوه ادویه‌جات و گیاهان طعم افزای غذاها وجود دارد چون بازار این محصولات نسبتاً کوچک است. لیکن ظرفیت‌ها برای برنامه‌های اصلاحی بالا است.

گیاهان دارویی (کاتارانتوس، دیجیتالیس، سولانوم لاسینیاتوم وغیره)

فقط برای سیستم ریزازدیادی گیاهان دارویی دستورالعمل‌هایی موجود است. لیکن برای توسعه سیستم‌های قابل اعتماد کشت سلولی به منظور تولید دارو توجه بیشتر به R&D مورد نیاز است.

گیاهان نادر و در معرض انقراض

تکثیر انبوه درون شیشه‌ای برای بازپروری گیاهان در معرض انقراض و افزایش جمعیت گونه‌ها می‌تواند به کار برود. احتمال کمی برای تجارتی کردن گیاهان حاصله وجود دارد.

محصولات ریشه‌ای و غده‌ای

مثال‌هایی از محصولات ریشه‌ای و غده‌ای در جدول ۵-۱ نشان داده شد.

درختان میوهٔ گرمسیری

مثال‌هایی از تکثیر موفقیت‌آمیز درختان میوهٔ گرمسیری از طریق کشت بافت در جدول۲-۵ نشان داده شده است.

جدول ۱-۵: کشت بافت محصولات ریشه‌ای و غده‌ای گرمسیری

محصول	ریز نمونه	نتایج
کاساوا(*Manihot esculenta)*	جوانهٔ مریستم	گیاهان نموده‌سازی شده از نظر ویروس
سیب زمینی هندی کوکو *(Xanthosoma caracu)*	جوانهٔ انتهایی شاخساره	شاخساره‌های چند تایی
(X.brasiliense)	جوانهٔ انتهایی شاخساره	گیاهان نموده سازی شده از نظر ویروس
(X.sahittifolium)	جوانهٔ انتهایی شاخساره	گیاهان نموده سازی شده از نظر ویروی
(Coleus parviflorus) سیب‌زمینی هوسا	جوانه مریستم	گیاهان نموده سازی شده از نظر ویروی
(Ipomoea batatas) سیب زمینی هندی شیرین	قطعه کورم	شاخساره ها
تارو (colocasia esculenta)	جوانه انتهایی شاخساره	گیاهان نموده سازی شده از نظر ویرویس و شاخسارهای چند تایی
یام (Dioscorea alata) (سیب زمینی هندی)	جوانه انتهایی شاخساره	شاخساره‌های چند تایی
یام (سیب‌زمینی هندی)	جوانه انتهایی شاخساره	شاخساره های چند تایی
یام (سیب‌زمینی هندی)	قطعات پیاز	شاخساره های چند تایی
Dioscorea microstachya)	قطعات گره‌ای	شاخساره های چند تایی

جدول ۲-۵: تکثیر درختان میوه گرمسیری از طریق کشت بافت

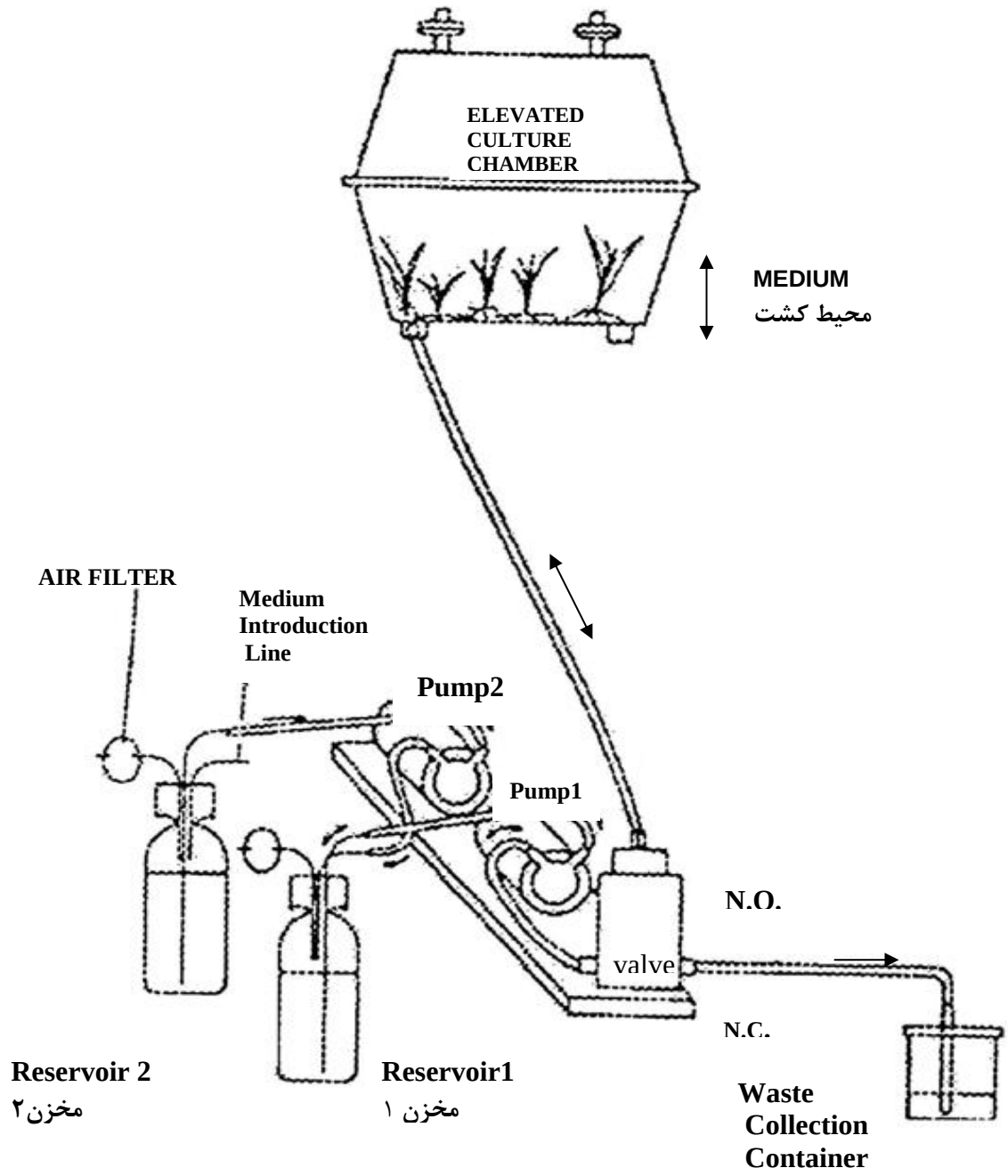
خانواده گیاهی	گونه	اسم عمومی
آناکاردیاسه	Mangifera indica	منگو (انبه)
آنوناسه	Annona cherimola	آتمویا
	Annona squamisa	کاستارد ایل (آناناس)
کاریکاسه	Carica papaya	پاپایا (خربزه درختی)
	Carica heilbommii	باباکو
موراسه	Ficus carica	انجیر
	Morus alba	مالبری (توت سفید)
	Morus indica	مالبری
موزاسه	Musa sp. AAAgroup	موز
	Musa sp. AAAgroup	پلاتین
	Musa sp. AAAgroup	بلوگوئه
میرتاسه	Eugenia jambos	رزاپل
	Eugenia malaccensis	مالی ایل
	Myrciaria caulifloras	جابوتیکابا
پاسیفلوراسه	Passiflora edulis	پشن فروت
رزاسه	Eriobotrya japonica	لوکوآت
روتاسه	Citrus aurantifolia	لیموترش
	Citrus aurantium	پرتقال ترش
	Citrus grandis	پومیو
	Citrus limon	لیموترش
	Citrus medica	سیترون
	Citrus paradisi	گریپ فروت
	Citrus rediculata	نارنگی
	Citrus sinedsis	پرتقال شیرین
	Poncirus trifoliate	پونسیروس
سولاناسه	Solanum quitoenese	نارانیلا یا لولو

۵,۱- مکانیزه کردن ریزتکثیری گیاهی

امروزه می‌توان نسبت به کلون‌گیری ۱۰۰۰ گونه گیاهی در شیشه اقدام کرد. روشهای تکثیر گیاهان به صورت کشت بافت از نظر هزینه در رقابت بسیار فشرده‌ای با روشهای مرسوم تکثیر گیاهان است. در روشهای کشت بافت، هر ۴ تا ۸ هفته نیاز به نیروی کارگر برای انتقال مواد گیاهی است. میزان هزینه هر بافت تکثیر شده حدوداً بین ۰/۱۲ تا ۰/۱۷ دلار است که حدود ۴۰ تا ۹۰ درصد آنرا هزینه کارگر تشکیل می‌دهد. وجود این هزینه سرسام‌آور نیاز شدید روشهای کشت بافت به مکانیزاسیون را آشکار کرده است. تیسرات[1] و همکارانش در سال ۱۹۸۵ یک دستگاه اتوماتیک کشت بافت به اسم Apcs[2] را به وجود آوردند که توسط رایانه کنترل می‌شود. با استفاده از این دستگاه موفق به کشت گیاهانی از قبیل اورکیده، هویج، نخل و خرما ۴ برابر بیشتر از روشهای معمول کشت بافت شده‌اند (شکل ۴,۳). فاری[3] در سال ۱۹۸۸ گزارش کرد که در مجارستان دستگاهی ساخته شده است به اسم PMS[4] که از آن برای کشت بافت استفاده می‌شود. استفاده از دستگاههای مکانیزه کشت بافت هنوز به صورت تجاری در نیامده است، شاید دلیل عمده آن این است که در استرلیزه شدن آن مشکلاتی وجود دارد (شکل ۷-۵).

---

[1] .Tisserat
[2] . Automated plant culture system
[3] . Fari
[4] . Propamatic micropropagation system



شکل ۳-۵- سیستم مکانیزه تولید محیط کشت انبوه

فصل ششم
تولید گیاهان عاری از بیماری

مقدمه

مبارزه با آلودگی‌های داخلی که به وسیلهٔ ویروس‌ها، مایکوپلاسماها، باکتری‌ها و قارچ‌ها ایجاد می‌شود، بسیار مشکل می‌باشد. معمولاًحذف این نوع عوامل بیماری‌زا به وسیلهٔ مواد شیمیایی، کاملاً غیرممکن است. گاهی اوقات، این امکان وجود دارد که تکثیر ویروس‌ها را به وسیلهٔ کاربرد ترکیبات نسبتاً گران ویرازول (ریباویرین) و ویدارابین(ضدمتابولیت‌ها) در محیط غذایی، متوقف کرد (والکی، ۱۹۸۰؛ کارتا، ۱۹۸۶؛ لانک و کاسل ۱۹۸۶). در مواردی نظیر سوسن(چون، ۱۹۸۶) و سیب(هتسون ولسین، ۱۹۸۵) مصرف ویرازول باعث تولید گیاهان عاری از ویروس شده است. افزودن آنتی-بیوتیک برای جلوگیری از آلودگی‌های باکتریایی، تقریباً بی‌اثر بوده است. باستین و همکارانش(۱۹۸۳) معتقدند که باکتری‌کش‌ها برای کاهش باکتری در کشت‌های این-ویترو، قابل استفاده نیستند؛ زیرا غلظت‌های مورد نیاز، حالت سمیت دارند، و حتی گاهی اوقات میکروارگانیزم‌ها به آنتی بیوتیک‌های اضافه شده، اصلاً عکس‌العمل نشان نمی‌دهند. همچنین کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند به صورت ناخواسته، باعث گزینش نژادهای مقاوم شود.

برخلاف آنچه که قبلاً تصور می‌شد، ویروس‌ها می‌توانند طی ازدیاد جنسی نیز منتقل شوند. درحدود ۶۰۰ ویروس گیاهی شناخته شده است که از آنها حداقل ۸۰ نوع می‌توانند از طریق تکثیر رویشی منتقل شوند(خاتاک۱۹۷۴). ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها تقریباً همیشه از طریق تکثیر رویشی منتقل می‌شوند. البته باید سعی شود که اجتماعات سالم انتخاب شوند(با توجه به علائم ظاهری یا به وسیلهٔ آزمایش). با وجود این، اگر به نظر می‌رسد که تمام اجتماع آلوده است، در این صورت بایستی سعی شود

که آلودگی از نمونه حذف می‌گردد. ویروس‌ها باعث کاهش عملکرد، و همچنین کاهش کیفیت تولیدات، می‌شوند. بنابراین، بسیار مهم است که مواد اولیه‌ای که برای تکثیر رویشی استفاده می‌شوند، عاری از ویروس باشند. منظور از عاری از ویروس بودن، به این مفهوم است که نمونه‌ها عاری از ویروس‌های شناخته شده و یا آنهایی که به وسیلهٔ آزمون ویروس قابل شناسایی هستند، باشند (کواک،۱۹۶۶).

روش های تولید گیاهان عاری از ویروس:

۱- انتخاب. انتخاب مشاهده‌ای گیاهان عاری از علائم ویروسی

۲- تیمار حرارتی (شوک حرارتی). با استفاده از حرارت می‌توان مانع از تکثیر ویروسها شد. بدین صورت که گیاهان آلوده از ویروس را در درجه حرارت بحرانی متابولیسم ویروس در انکوباتر قرار می‌دهند. روش کار بدینصورت است که گیاه دارای ویروس را در داخل آب $52^{\circ}c$ - 50 برای مدت ۳۰ دقیقه و یا در هوای $38^{\circ}c$ - 35 برای مدت ۵ روز تا چند ماه قرار می‌دهند (بطور کلی بین ۴-۲ هفته).

۳- تیمار سرما (شوک سرما). از شوک سرما برای مقابله با PSTV[1] استفاده شده است. بدینصورت که جوانه را در درجه حرارت $5^{\circ}c$ و برای مدت ۶-۳ ماه نگهداری کرده‌اند.

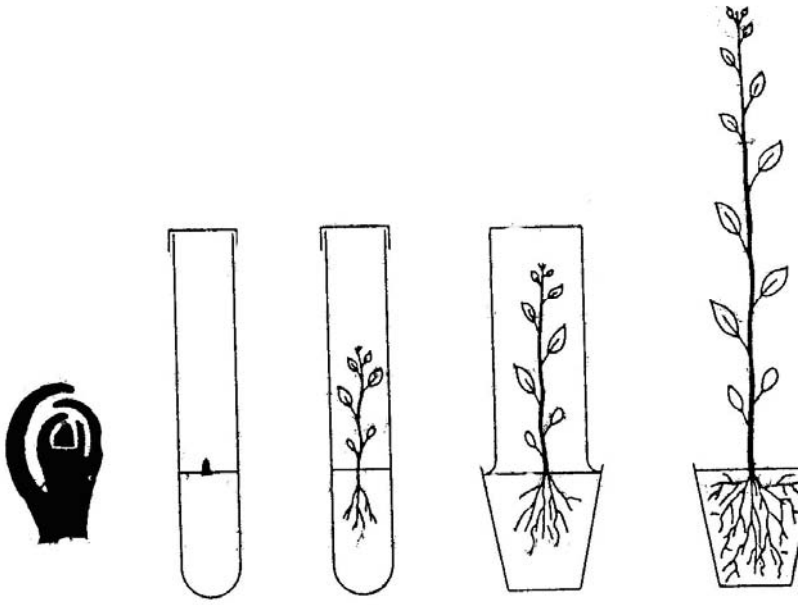
۴- کشت مریستم(شکل ۱-۶).

۵- استفاده از گرما، و سپس کشت مریستم.

۶- تشکیل اندام هوایی نابجا، و سپس کشت مریستم.

۷- پیوند مریستم روی پایه‌های عاری از ویروس، که به آن ریزپیوندی (Micro-grafting) نیز گفته شده است.

[1] .Potato spindle tuber viroids



شکل ۱-۶: شمای کشت مریستم. سمت چپ: مریستم ایزوله شده از یک سرشاخه. از این مریستم، یک گیاهچه تولید شده، که به خاک انتقال یافته است.

به منظور تهیه مقدار زیادی از مریستم‌های عاری از ویروس، ابتدا بایستی در محیط کنترل شده، جوانه‌های نابجا را تولید کرد؛ و بعد از آن، کشت مریستم انجام داد. گاهی اوقات، تولید گیاهان عاری از ویروس را می‌توان از طریق کشت کالوس این‌ویترو و پروتوپلاست نیز انجام داد. همچنین، از کشت مریستم به منظور تولید گیاهان عاری از باکتری و قارچ نیز استفاده می‌شود. اطلاعات بیشتر در رابطه با تولید گیاهان عاری از بیماری، در بخش بعدی خواهد آمد. چنانچه مشکوک به آلوده بودن گیاه به ویروس باشیم، بایستی این اقدامات را انجام داد(کواک،۱۹۷۷).

۱- ابتدا باید ویروس یا ویروس‌ها را شناسایی کرد.

۲- بایستی کوشش شود که تعدادی از ویروس‌ها، حذف شوند.

۳- گیاهان به دست آمده، می‌بایست برای عاری بودن از بیماری، مورد آزمون قرارگیرند.

۴- نهایتاً باید از هرگونه آلودگی مجدد، جلوگیری کرد.

بایستی توجه داشته باشیم که گیاهان عاری از ویروس ممکن است دوباره به ویروس آلوده شوند. اقدامات ذیل به منظور جلوگیری از آلودگی مجدد به ویروس‌ها، به کار می‌رود(کواک،۱۹۶۶؛تیلر،۱۹۸۱):

۱- گیاهان باید در گلخانه‌های عاری از آلودگی و ناقل‌های بیماری(عاری از شته) یعنی محلی که به صورت طبیعی هیچ گونه ناقل ویروسی وجود ندارد، کشت شوند.

۲- ناقلان بیماری‌ها(عمدتاً حشرات و نماتدها) بایستی کنترل شوند. منابع آلودگی نیز بطور مداوم از بین برده شوند.

۳- رعایت بهداشت: دست‌ها، لباس‌ها، کفش‌ها و همچنین گیره‌ها و ابزارهای انتقال، همه باید ضدعفونی شوند. در طول دورهٔ مراقبت گیاه، از ورود عوامل بیماری به وسیلهٔ ماشین آلات نیز جلوگیری شود.

۴- گلدان‌ها و مواد لازم، بایستی عاری از میکروب باشند.

۵- برای اطمینان کامل(در صورتی که موارد یک تا چهار سهواً رعایت نشده باشد) توصیه می‌شود که گیاهان عاری از ویروس، در محیط این‌ویترو، نگهداری شوند.

۶- گزینش مداوم گیاهان عاری از ویروس، به صورت مشاهده‌ای یا آزمایش.

در زمان انتخاب گیاهان عاری از ویروس، باید به خاطر داشته باشیم که گیاهان آلوده دارای ظاهری متفاوت از گیاهان فاقد ویروس هستند. گرچه این ظاهر بسیار متفاوت، معمولاً در نتیجهٔ حذف ویروس‌ها می‌باشد؛ ولی احتمال بروز موتاسیون‌های کوچک را نیز نبایستی از نظر دور داشت. واکی(۱۹۸۰) بروز میکروموتاسیون را بعد از کشت مریستم ریواس و سیب، گزارش نمود.

استفاده از گرما و سرما

استفاده از گرما، روش مؤثری برای غیرفعال کردن بعضی از ویروس‌هاست (کواک،۱۹۷۲؛تن هوتان وهمکارانش ۱۹۸۶). به نظر می‌رسد که گرما فقط علیه ویروس‌های ایزومتریک و بیماری‌های ناشی شده از مایکوپلاسماها مؤثر است(کواک۱۹۷۷). این که گاهی اوقات گرما روی ویروس‌ها بی‌تأثیر است، می‌تواند در نتیجهٔ حساسیت زیاد خود گیاه به گرما باشد.گاهی اوقات، به دلایل نامشخصی، گرما روی مایکوپلاسماها نیز بی‌تأثیر است. درجه حرارت و زمان مناسب را بایستی طوری انتخاب کنیم، که ضمن زنده ماندن گیاه، ویروس نیز غیرفعال شود.

گرما مخصوصاً روی ویروس‌ها و مایکوپلاسماهایی که در درختان میوه، نیشکر و کاساوا دیده شوند، مؤثراست (مورل،۱۹۶۴؛ کواک،۱۹۶۶-۱۹۷۷؛ کارتاوگامبورگ، ۱۹۸۵). این حالت برای درختان میوه، که کشت مریستم در آنها مشکل است، عمل مناسبی می‌باشد.

در گونه‌های خشبی، به جای کل گیاه، فقط جوانه‌های محوری به وسیلهٔ گرما، عاری از ویروس می‌شوند. در این گیاهان، شاخه‌ای که روی گیاهچه قلم زده شده است، پس از گذشت بیست تا چهل روز(ترجیحاً چند ماه) در یک حرارت ثابت و یا متغیر۳۷ تا ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد، انتخاب می‌شوند. جوانه‌هایی که بالقوه فاقد ویروس هستند، جدا شده، و روی پایه‌های(گیاهچه‌های) عاری از ویروس، پیوند می‌شوند. این روش، معمولاً باعث تولید درصد بالایی از گیاهان عاری از ویروس می‌شود (فریدلاند، ۱۹۸۰).

تیمار سرما (شوک سرما). از شوک سرما برای مقابله با PSTV[1] استفاده شده است. بدینصورت که جوانه را در درجه حرارت $5^{\circ}c$ و برای مدت ۶-۳ ماه نگهداری کرده‌اند.

[1] .Potato spindle tuber viroids

د- حذف ویروس با کشت مریستم. لیماست[1] و همکارانش در سال ۱۹۴۹ مشاهده کردند که تیترهای ویروس در گیاهانی که مرتباً مورد هجوم ویروسها قرار می‌گیرند در مریستم اندام هوایی کاهش می‌یابد. در سال ۱۹۵۲ در فرانسه شخصی به اسم مورل[2] موفق شد که با استفاده از کشت مریستم گیاه عاری از ویروس Dahlia را از گیاهان آلوده به ویروس به دست آورد. توضیح آنکه گسترش ویروس در سیستم گیاه با درجات متفاوتی صورت می‌گیرد بطوریکه در نواحی انتهایی رشد آن سریعتر است. موفقیت در حذف ویروس با استفاده از کشت مریستم بستگی به نوع ویروس و اندازه مریستمهای کشت شده دارد. به جای کشت مریستم اصطلاحاتی از قبیل کشت انتهای مریستم[3]، کشت انتهایی[4] و کشت انتهای اندام هوایی[5] نیز بکار می‌رود.

بکار بردن این مفاهیم مقداری به اندازه بافت مورد استفاده بستگی دارد. مریستم‌ها را می‌توان از انتهای ساقه، جوانه‌های غده یا برگهای جانبی جوانه‌ها که به صورت در شیشه یا در زیوه[6] رشد کرده‌اند، جدا نمود. اصولاً مریستم اعم از جانبی یا انتهایی عبارت از یک توده سلولی فعال و در حال تقسیم گنبدی شکل است که در گیاهی مثل سیب‌زمینی دارای قطری معادل ۰/۱ میلی‌متر و طولی معادل ۱/۲۵ میلی‌متر است.

برای ریشه‌کن کردن ویروسها اندازه مریستم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. حذف ویروس، ریشه‌دار شدن و به کالوس رفتن مریستمها همگی تحت تأثیر اندازه ریزنمونه[7] است. انتهای مریستم با قطر بین ۰/۲ تا ۰/۷ میلی‌متر دارای بیشترین شانس برای تولید گیاهان عاری از ویروس است. ریزنمونه‌هایی که طول آنها بیشتر از ۰/۷ میلی‌متر

---

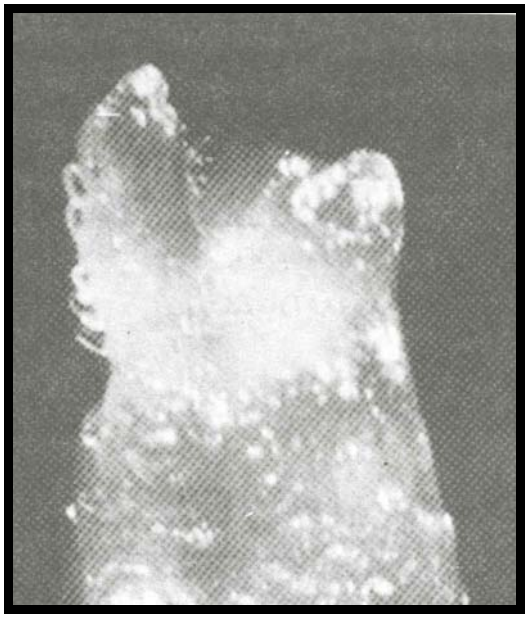
1. Limasset
2. Morel
3. Meristem- tip culture
4. tip culture
5. culture of shoot apex
6. In vivo
7. Explant

است گیاهانی تولید می‌کند که هنوز دارای ویروس است. انتهای مریستم‌های کوچکتر از ۰/۲ میلی‌متر موفق به تولید ریشه و کالوس نمی‌شوند. به عنوان مثال می‌توان به جدول ۵,۱ مراجعه کرد.

جدول ۱-۶: کشت بافت تعدادی از گیاهان جهت حذف ویروس

گونه	ویروس	اندازه مریستم	درصد حذف ویروس
Cassava	موزائیک	۰/۴	۶۰
نخود	موزائیک	۰/۴-۰/۵	۹۰-۱۰۰
سیب‌زمینی	PVA , PVY	۰/۲	۱۰۰
سیب‌زمینی	PVX , PVS	۰/۳	۵۰

به منظور اطلاع از این که چگونه از ابتدا کشت مریستم به عنوان روشی برای بدست آوردن گیاهان عاری از ویروس استفاده شد، مروری کوتاه بر تاریخچهٔ آن، لازم به نظر می‌رسد. وایت(۱۹۳۴a) نشان داد که ویروس موزاییک توتون (TMV) به صورت ناهمگنی در قسمت‌های مختلف ریشهٔ توتون، توزیع شده است؛ به طوری که تجمع آنها به سمت نوک ریشه کم، و نوک ریشه فاقد ویروس است. لیماست وکورنوت(۱۹۴۹) نیز چنین وضعیتی را در ساقهٔ گیاه توتون، گزارش کردند.در این حالت نیز مریستم انتهایی، فاقد ویروس بود. البته بعداً شواهد نشان داد که همیشه نوک ریشه و مریستم ساقه، فاقد ویروس نیستند. در سال ۱۹۵۲مورال و مارتین، ایدهٔ جالبی از کشت مریستم انتهایی کوکب آلوده به ویروس در محیط این‌ویترو، ارائه دادند. آنها اولین کسانی بودند که از کشت مریستم انتهایی کوکب و سیب زمینی آلوده به ویروس، گیاهان عاری از ویروس، به دست آوردند (شکل ۲-۶).



شکل ۲-۶: مریستم سیب زمینی با دو برگ اولیه

بعد از کشف مورل، بسیاری از منابع علمی، به اهمیت آن، اشاره نمودند. گرچه کشت مریستم مخصوصاً در باغبانی مورد استفاده قرارمی‌گیرد؛ در عین حال، برای تعداد زیادی از گیاهان زراعی، مثل سیب زمینی، شبدر(*Trifolium*)، چچم(*Lolium*)، تنباکو(کونگر، ۱۹۸۱) نیز از این روش، استفاده شده است. گیاهان عاری از ویروس بعضی از گونه‌های خشبی، مثل گیلاس، تمشک، گونه‌های *currents*، *forsythia* و انگور نیز از طریق کشت مریستم، به دست آمده است.

بعد از این اکتشافات طبیعتاً این سؤال مطرح شد که چرا ویروس‌ها به صورت ناهمگنی در گیاه پخش می‌شوند، و چگونه می‌توان علی‌رغم این که در بعضی گونه‌ها قطعات ویروس در مریستم پیدا می‌شود (کواک،۱۹۷۷) به کمک کشت مریستم گیاهان عاری از ویروس، به دست آورد. کواک (۱۹۶۶) معتقد بود در مریستم، بین تولید قطعات ویروس از یک طرف، و تولید سلول از طرف دیگر، رقابت وجود دارد. در

بافت‌های مریستمی، در هنگام تقسیم سلولی، ظرفیت برای سنتز اسیدهای نوکلییک، به مصرف تولید سلول می‌رسد؛ که این امر، مانع از تکثیر ویروس می‌شود. در سلول‌های زیر مریستم، سلول‌ها به جای تقسیم شدن، از نظر اندازه، بزرگ می‌شوند. تکثیر ویروس‌ها به صورت بی‌وقفه‌ای انجام می‌شود. هم چنین کواک (۱۹۶۶) پیشنهاد دیگری را ارائه کرد که فقدان بافت‌های آوندی در مریستم، ممکن است مانع از انتقال ویروس شود. عدم وجود بافت‌های آوندی و فقدان احتمالی فضاهای بین سلولی در بافت‌های مریستم، برای خیلی از افراد، توضیح قابل قبولی بود که چرا تعداد ویروس‌ها آنقدر در مریستم، پایین است.

در دهۀ ۱۹۵۰ تصور می‌شد(کواک،۱۹۷۷) که احتمالاً وجود غلظت بالای اکسیژن و سیتوکینین، مانع از نفوذ قطعات ویروس، و یا باعث غیرفعال شدن آنها، می‌شود. این تئوری، هرگز دلایل و شواهد مناسبی را ارائه نکرد. مولر و استیس اسمیت(۱۹۶۹) پیشنهاد کردند که آنزیم‌هایی برای تکثیر ویروس‌ها مورد نیاز هستند؛ درحالی که این آنزیم‌ها، در بافت‌های مریستمی، وجود ندارند؛ البته این موضوع نیز نیاز به اثبات دارد. مارتین تانگوی و همکاران (۱۹۷۶) پیشنهاد کردند که غلظت کم ویروس‌ها در مریستم، در نتیجه وجود بعضی از مواد بازدارنده طبیعی است. این مواد، می‌توانند دلیلی باشند براین که علی‌رغم تکثیر جنسی بذور، اغلب عاری از ویروس، باقی می‌مانند البته این فرضیه نیز هنوز نیاز به اثبات دارد. بنابراین، توضیح در مورد چگونگی تولید گیاهان عاری از ویروس از طریق کشت مریستم، هنوز کامل نیست.

نحوۀ اجرا

بهتر است در هنگام کشت مریستم با ساقه‌های در حال رشد، این کار را شروع کنیم. در زمان جدا کردن، اگر مریستم فعال باشد(قسمت انتهایی ساقه و قسمت پایین‌تر از نوک ساقه، سریعاً حجیم می‌شود) شانس حذف ویروس، بیشتر است. ساقه‌ها بایستی قبلاً کاملاً تمیز شده باشند، وتا حد امکان، تمام برگ‌های ساقه جدا شوند، وسپس

ساقه‌ها (یا جوانه‌ها در صورتی که هیچ برگی جدا نشده است) برای مدت کوتاهی در الکل ۷۰ درصد، فروبرده شود. این کار، به منظور بیرون راندن حباب‌های هوایی که در سطح اندام‌ها حبس شده‌اند، انجام می‌شود. بعد از این مرحله، عمل استریل، از طریق ضدعفونی با محلول رقیق شدهٔ ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم انجام شده و نهایتاً به وسیلهٔ آب مقطر استریل، شسته می‌شود. سپس تعداد اندکی برگ زیر استریومیکروسکپ(با بزرگ نمایی ۲۰-۴۰) جدا می‌شود. ادامهٔ فرآیند استریل کردن، با استفاده از غلظت کمتر هیپوکلریت سدیم، و یا کوتاه کردن زمان استریل، انجام می‌شود؛ و مجدداً نمونه‌ها، با آب مقطر شسته می‌شوند. در بعضی آزمایشگاه‌ها، از الکل ۷۰ درصد(حجم به حجم) برای ضدعفونی نوبت دوم، استفاده می‌شود؛ که در این صورت نیازی به شستشوی مجدد نمی‌باشد. چنانچه از آب برای شستشو استفاده شود، در این صورت ممکن است قطرات آب، جدا کردن نمونه‌ها را مشکل‌تر کند(انعکاس نور، بینایی ضعیف). برگ‌های باقی مانده و جوانه‌های آغازین برگ، زیر استریومیکروسکپ، جدا می‌شوند. اغلب از سوزن و تیغ جراحی، برای این مرحله، استفاده شود. نوک ساقه، محکم به وسیلهٔ یک دست گرفته شده(انگشت تمیز یا انبرک) و با دست دیگر، عملیات انجام می‌شود. در حین عملیات، سوزن بایستی به طور منظم استریل شود. وقتی که مریستم عملاً عاری از ویروس است، همراه یک یا دو جوانه آغازین برگ (معمولاً یک سوم از ماده) به وسیلهٔ تیغ، قطع شده، و بلافاصله روی محیط کشت(برای جلوگیری از خشک شدن) انتقال داده می‌شود. مریستم با جوانهٔ آغازین برگ، بسیار کوچک است(۰/۱میلی‌متر قطر، و۰/۲تا۰/۴ میلی‌متر طول).

اگرفقط مریستم جدا شود، شانس زیادی برای بدست آوردن گیاهان عاری از ویروس، وجود دارد. همان گونه که در میخک، نشان داده شده است(مورل،۱۹۶۴،استون،۱۹۶۳) شانس بقای مریستم بدون جوانه آغازین برگ، خیلی کم است. هم چنین جدا کردن مریستم‌های بزرگتر(با جوانه‌های آغازین برگ بیشتر)

احتمال به دست آوردن گیاهان عاری از ویروس را کاهش می‌دهد(کارتا و گامبورگ،۱۹۷۵).

گرچه در کل، تمام مریستم‌های ساقهٔ گیاهان، به عنوان مواد اولیه مناسب هستند، به نظر می‌رسد که شانس موفقیت، به نوع جوانهٔ ساقه(انتهایی یا محوری) و یا به موقعیت (پایینی یا بالایی)جوانه‌ها، بستگی دارد(اسیتر وچین،۱۹۸۳).

همان گونه که به وسیلهٔ وان اس(۱۹۶۴) در میخک نشان داده شده است، همچنین درصد گیاهان عاری از ویروس به مقدار زیادی، بستگی به فصل رشد دارد. به منظور اطمینان از تشکیل مناسب ریشه در ساقه‌ها، گاهی اوقات توصیه می‌شود که جدا کردن مریستم در فصل خاصی انجام شود. ساقه‌های سیب زمینی (میلروستاکالیت،۱۹۶۹) و میخک، وقتی که مریستم‌ها در فصل بهار جدا شده باشند، به خوبی تولید ریشه می‌کنند.

ترکیب محیط کشت، ساده نیست؛ زیرا مریستم، بسیار کوچک، و رشد آن، مشکل است. هر یک از گونه‌های مختلف گیاهی و حتی گاهی اوقات ارقام مختلف یک گونه، نیاز به یک محیط غذایی خاصی دارند. محیط کشتی که برای ایزوله کردن قلمه‌ها استفاده می‌شود، معمولاً با محیط کشت تولید ریشه متفاوت است. چون تصمیم‌گیری در مورد محیط کشت مناسب(در صورتی که هیچ منبع علمی در دسترس نباشد) نیاز به کار زیادی دارد، کشت مریستم باید زمانی استفاده شود که یک کلون کاملاً آلوده بوده، وگرما تأثیر مورد نظر را نداشته باشد. اکیداً توصیه می‌شود که در زمان انتخاب محیط کشت، از تجارب دیگران و همچنین سایر منابع علمی، استفاده شود(پیریک،۱۹۷۹؛بوجوانی و همکاران،۱۹۸۶).

مریستم‌ها معمولاً در محیط کشت جامد، ایزوله می‌شوند. گرچه گاهی ممکن است از محیط کشت مایع هم استفاه شود (با استفاه از صفحات کاغذ). PH معمولاً بین ۵/۴تا۶ در نظر گرفته می‌شود، و ساکارز نیز به عنوان یک قند(۲تا۵ درصد وزنی به حجمی) به کار می‌رود. اغلب از ویتامین‌های زیر، استفاده شده است:B_1، B_6 اسید

پانتوتنیک و اسید نیکوتنیک(استیروچین،۱۹۸۳). تنظیم کننده‌های رشد، معمولاً با غلظت پایین، به کار می‌روند(۰/۱تا۰/۵میلی‌گرم در لیتر). اکسین ممکن است به منظور تشکیل ریشه، ضروری باشد؛ اکسین و سیتوکینین به منظور تحریک تقسیم سلولی، گاهی GA_3 به منظور توسعهٔ ساقه، به کار می‌رود (مورل،۱۹۶۴). مثلاً گاهی اوقات در *Pelargonium* سیتوکینین مدتی بعد از ایزوله کردن استفاده می‌شود زیرا اگر بلافاصله پس از ایزوله کردن اضافه شود موجب قهوه‌ای شدن می‌شود (دبرگ و مین،۱۹۷۷).

حرارت معمولی رشد، بین ۲۱ تا۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد می‌باشد. اکثر گیاهان غده‌ای، نیاز به حرارت پایین‌تری دارند. از حرارت بالا(۳۵ تا۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد) فقط به منظور غیرفعال کردن ویروس‌ها (معمولاً به صورت متناوب درجه حرارت بالا و پایین) استفاده می‌شود(واکی،۱۹۸۰). مریستم‌ها عمدتاً در نور فلورسنت، کشت داده می‌شوند (طول روز، بین ۱۴تا۱۶ساعت، با تشعشع حدود ۸ تا۱۲وات درمترمربع). گاهی اوقات، نورفلورسنت به وسیلهٔ مقدار کمی نور قرمز روشن، تکمیل می‌شود (استیروچین،۱۹۸۳). در بعضی موارد، تشعشع کمتری در چند روز اول بعد از ایزوله کردن، بایستی استفاده شود (دبرگ ومین،۱۹۷۷).

گاهی اوقات، این مشکل وجود دارد که مریستم، تولید یک ساقه مناسب می‌نماید؛ ولی این ساقه، فاقد ریشه خواهد بود. مورل(۱۹۶۴) این مشکل را از طریق پیوند ساقه‌های عاری از ویروس که از گیاهچه‌های عاری از ویروس کوکب در محیط این‌ویترو به دست آورده بود، برطرف نمود. زمانی که گیاه، مسن‌تراست؛ بدون هیچ مشکلی، امکان برداشت قلمه، وجود دارد. اگر تنها یک ساقهٔ عاری از ویروس در دسترس باشد؛ در این صورت، این امکان وجود دارد که نمو جوانه‌های جانبی را تحریک کرد، تا بتوان تعداد زیادی ساقه‌های عاری از ویروس، به دست آورد.

درصد مریستم‌های ایزوله شده که تولید گیاهان عاری از ویروس می‌کنند، متغیراست؛ اما در کل، خیلی کم هستند. درصد موفقیت کم؛ به علت ضایعات وارده در نتیجهٔ آلودگی، خسارت، خشک شدن و قهوه‌ای شدن، می‌باشد. تلفات و عدم موفقیت اولیه، می‌تواند به علت محیط کشت نامناسب و مشکلات مربوط به پدیدهٔ خواب، باشد. اگر نهایتاً گیاهان عاری از ویروس، به دست آمدند؛ باز هم بایستی برای اطمینان از عاری بودن ویروس، آنها را آزمون نماییم. برای تولید مجموعه‌ای از گیاهان عاری از ویروس، در صورتی که امکان از طریق تکثیر رویشی مقدور باشد یک گیاه عاری از ویروس کافی می‌باشد. تولید انبوه گیاهان عاری از ویروس، کلاً بستگی به روش‌های تکثیر رویشی، دارد.

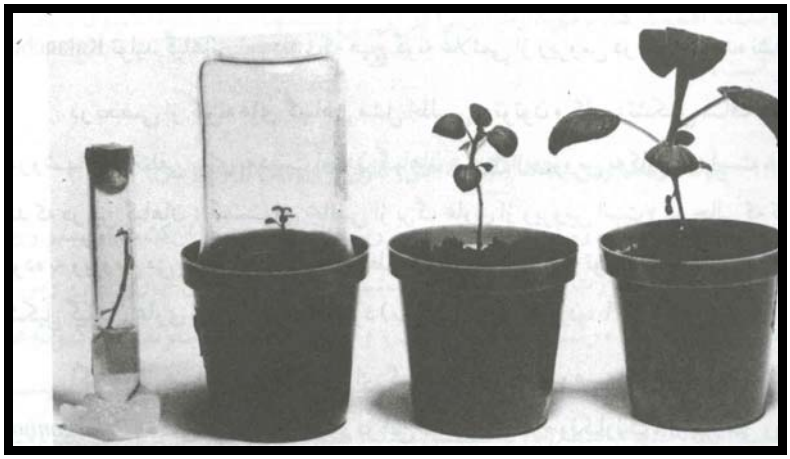
استفاده از گرما و کشت مریستم

هـ- کشت مریستم بعد از شوک حرارتی. بعضی از ویروسها مثل PVX و PVS را نمی‌توان تنها با کشت مریستم حذف کرد. بعضی دیگر از ویروسها نیز به حرارت مقاوم هستند و لذا نمی‌توان آنها را با شوک حرارتی حذف نمود. استفاده از شوک حرارتی قبل از بریدن جوانه به حذف ویروسهایی که نمی‌توان به آسانی آنها را توسط کشت مریستم یا شوک حرارتی به تنهایی حذف کرد، کمک می‌کند. بعد از استفاده از شوک حرارتی جوانه‌های نسبتاً بزرگتر ممکن است عاری از ویروس باشند. در این صورت می‌توان مریستم‌های بزرگتر را به شرط آنکه دارای درجه بقاء بهتری باشند جدا نمود (جدول ۲-.۶).

جدول۲-۶- حذف ویروس در گیاهان غذایی با استفاده از کشت انتهای مریستم

گیاه زراعی	ویروس حذف شده
سیر	ویروس موزائیک کوتاه زرد پیاز
تربچه	ویروس موزائیک شلغم
کلم پیچ	ویروس موزائیک شلغم و ویروس گل کلم
سویا	ویروس موزائیک سویا
سیب درختی	ویروسهای پنهان
موز	ویروس موزائیک خیار (CMV)
نخود	ویروس موزائیک بذرزاد نخود
نیشکر	ویروس موزائیک
سیب‌زمینی	ویروس پیچیدگی برگ، PVS, PVM, PVG, PVA

برای افزایش شانس به دست آوردن گیاهان عاری از ویروس در موارد مشکل(مخصوصاً زمانی که بیشتر از یک ویروس وجود دارد) اغلب از گرما در ابتدای کشت مریستم، استفاده می‌شود. به این وسیله، تراکم ویروس‌ها کاهش یافته، و یا نقاط عاری از ویروس، افزایش می‌یابد. طول دورهٔ استفادهٔ گرما(۳۵ تا۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد) بین پنج تا ده هفته، متغیر است(کواک،۱۹۷۷). روش فوق، در گیاهانی نظیر سیب-زمینی(شکل ۳-۶)، گل داوودی، میخک و توت فرنگی، به صورت موفقیت‌آمیزی، انجام شده است. برای مثال، مورل(۱۹۶۴) توصیه نموده که غده‌های سیب‌زمینی قبل از شروع کشت مریستم یک ماه در ۳۷ تا ۳۸ درجهٔ سانتی‌گراد، نگهداری شوند.



شکل ۳-۶: گیاهچه تولید شده از مریستم سیب زمینی در لوله آزمایش، که بعداً به خاک منتقل شده است.

تشکیل ساقه‌های نابجا، بعد از کشت مریستم

در سال ۱۹۶۲ بریدلی(به مورل،۱۹۶۴مراجعه شود) در محیط این‌ویترو، تشکیل غده‌های نابجا را از کشت فلس‌های غدهٔ گیاه *Lilium longiflorum* گزارش نمود. هیلدبرانت((۱۹۷۱) در رابطه با گلایول، به نتایج مشابهی دست یافت. تکثیر جنین‌های حاصله از بافت‌های نوکلؤوس مرکبات نیز باعث تولید گیاهان عاری از ویروس، شده است (باتون و برمن، ۱۹۷۱a,b,c؛ بیترز وهمکاران،۱۹۷۲). واکی و همکارانش(۱۹۷۴) نشان دادند که مریستم‌های جوانهٔ گل درگل کلم، قادرند که در شرایط کنترل شده، تولید گیاهان عاری از ویروس نمایند. موری وهمکاران(۱۹۸۲) نشان دادند که ساقه‌های نابجا که در شرایط این‌ویترو از قلمه‌های گیاه توتون آلوده به ویروس موزاییک توتون بدست آمدند، عاری از ویروس بودند. نتایج مشابهی نیز در بارهٔ انگور، گزارش شده است(بارلاس وهمکاران،۱۹۸۲).

به دست آوردن گیاهان عاری از ویروس از طریق تشکیل ساقه‌های نابجا به وسیلهٔ کشت این‌ویترو در گیاه زنبق و سنبل، بسیار موفقیت‌آمیز بوده است (آلن،۱۹۷۴؛ آسجس و همکاران،۱۹۷۴). به همین دلیل، فلس‌های سنبل آلوده به ویروس، امکان

تولید غده‌های نابجا در شرایط کنترل شده را می‌دهند. زمانی که اندازهٔ مریستم حدوداً یک میلی‌متراست، برای نمو بیشتر، به محیط کشت دیگری منتقل می‌شود. هاکارت وهمکاران(۱۹۸۳) پیشنهاد کردند که روش تولید ساقه‌های نابجا همراه (به صورت ترکیب) با کشت مریستم در گیاهان Kalanchoe تولید گیاهانی نمودند، که هیچ گونه علائمی از ویروس در آنها مشاهده نشد.

در بعضی از گونه‌های گیاهی مثل اطلسی و توتون و کلم، تشکیل ساقه‌های نابجا به روش‌های مختلفی برای به دست آوردن گیاهان عاری از ویروس به کار رفته است. ملاحظه شد که در این گیاهان، قسمت‌های خاصی از برگ عاری از ویروس است؛ در حالی که کل گیاه، تشکیل گیاهان عاری از ویروس، می‌شود(موراکی وکارلون،۱۹۷۹).

اگر روش ساقه‌های نابجا برای گیاهانی که خصوصیات شیمری دارند، مثل *Pelargonium* رنگارنگ به کار رود، در این صورت فرم رنگارنگ، از بین می‌رود؛ زیرا تشکیل ساقه نابجا معمولاً فقط از یک سلول(لایه) اتفاق می‌افتد(کاسل و همکاران، ۱۹۸۰).

تولید گیاهان عاری از ویروس، به وسیلهٔ کشت کالوس و پروتوپلاست

در سال ۱۹۶۲ کوپر(به هیلدبرانت،۱۹۷۷ مراجعه شود) نشان داد که با انجام چند بار واکشت، می‌توان کالوس توتون را فاقد ویروس نمود. ظاهراً بافت‌های کالوس می‌توانند از آلودگی به ویروس، اجتناب ورزند. به نظر می‌رسد که سلول‌های فعال مریستمی جوان، نسبت به سلول‌های پیر و غیرفعال، به ویروس موزاییک توتون، مقاوم‌تر هستند. نتیجهٔ آزمایش کوپر، بعداً به وسیلهٔ چندر و هیلدبرانت(۱۹۶۷) تأیید شد. ابو- ال- نیل و هیلدبرانت(۱۹۷۱) پرچم‌های ایزوله شده از گیاه *Pelargonium* را کشت نمودند و از آنها کالوس و گیاهچه‌هایی به دست آوردند که فاقد ویروس بود. نتیجهٔ مشابهی در کالوس سیب زمینی که به ویروس X سیب زمینی آلوده بود، به دست آمد.

واکی(۱۹۷۸) معتقد است که می‌توان کالوس *Nicotiana rustica* را به وسیلهٔ استفاده از گرما، عاری از ویروس، نمود.

موری وهمکارانش(۱۹۸۲)، پروتوپلاست برگ‌های توتون را که به ویروس موزاییک توتون آلوده بود، ایزوله کردند؛ و از این پروتوپلاست، گیاهان عاری از ویروس را بدست آوردند، ایزوله کردن پروتوپلاست از مناطق سبز تیرهٔ برگ‌های توتون(با اجزای ویروسی بسیار اندک و یا فاقد آن) که آلوده به ویروس موزاییک توتون هستند نیز، تولید گیاهان عاری از ویروس، می‌کند.

البته نمی‌توان چنین فرض کرد که تولید گیاهان عاری از ویروس از طریق کالوس و پروتوپلاست، اهمیت کاربردی دارند؛ زیرا در این نوع کشت‌ها، بروز موتاسیون، یک امر معمولی است.

پیوند مریستم روی پایه‌ها(گیاهچه‌های)عاری از ویروس (ریزپیوندی)

چنانچه امکان القای رشد مریستم و یا تولید ریشه از ساقهٔ حاصل از کشت مریستم وجود نداشته باشد؛ در این صورت، امکان پیوند مریستم روی گیاهچه‌های عاری از ویروس که در محیط کنترل شده رشد داده شده است، وجود دارد. ریزپیوندی درگونه-های چوبی، بسیار مهم است؛ زیرا اغلب در این گروه از گیاهان، کشت مریستم امکان-پذیر نیست. مفهوم اصطلاح ریزپیوندی، از کارهای مورل و مارتین با گل کوکب، منشأحاصل کرده است(۱۹۵۲).

اولین ریز پیوندی موفق؛ به وسیلهٔ موراشی و همکاران (۱۹۷۲) و ناوارو وهمکاران(۱۹۷۵) انجام شد. آنها روی مرکبات کار می‌کردند، و از این طریق توانستند دو ویروس را در این گیاه، حذف نمایند. لیز و همکاران(۱۹۸۵) بررسی را روی ریزپیوندی در مرکبات، ارائه نموده‌اند. از این روش درگیاهان دیگر، مثل زردآلو و انگور(انونیموس، ۱۹۸۰)، اکالیپتوس(دامیانو و همکاران،۱۹۸۶)،کاملیا(*Camellia japonica*) (کرز،۱۹۸۵)، هلو(موسدا،۱۹۸۹؛موسدا و همکاران،۱۹۷۹)، سیب(هوانگ

ومیلیکان، ۱۹۸۰) نیز بعداً استفاه شد. ریزپیوندی در زردآلو و انگور به وسیلهٔ استفاده از گرما انجام شد. مونارد و همکارانش (۱۹۸۳) وکارتا(۱۹۸۶) استفاده از ریزپیوندی را در گیاهان میوه‌دار، مورد ارزیابی قرارداده‌اند. برای آنالیز جامع‌تر پدیدهٔ خودسازگاری یا خودناسازگاری، که در طول ریزپیوندی در محیط کنترل شده اتفاق می‌افتد، به مقاله جونارد(۱۹۸۶) مراجعه شود.

و- شیمی درمانی ضد ویروس[1].

در این روش می‌توان با استفاده از مواد شیمیایی ضدویروس در محیط کشت نسبت به حذف یا کاهش غلظت ویروس در گیاه اقدام نمود.

مواد شیمیایی ضدویروس عمدتاً عبارتند از:

۱- آنالوگهای بازی نوکلئوتید از قبیل: آنالوگهای پورین (8-azaguanine)، آنالوگهای پریمیدین (5-fluoro- uracil , 2-tiouracil)

۲- آنالوگهای اسیدهای آمینه مثل Para- fluoro phenylalanine

۳- آنتی‌بیوتیکها مثل آکتینومایسین-D و جنتامایسین

آنالوگهای بازی در حذف ویروس PVX موفق بوده‌اند. یکی دیگر از مواد شیمیایی جدید به اسم Virazole که اسم تجاری آن Ribavirin است و یک نوکلئوزید مصنوعی به اسم (1- β - *D* - *ribofuranosyl* - 1,2,4*triazole* - 3- *Carboxamide*) است، نیز موفقیتهایی در شیشه نشان داده است. اضافه کردن ویرازل در محیط کشت باززایی نبات سبب به وجود آمدن تنباکوهای عاری از ویروسهای CMV , PVY در بین گیاهان آلوده شده است. همچنین ویرازول سبب به وجود آمدن گیاهان عاری از ویروسهای PVM, PVS, PVX, PVY در سیب‌زمینی‌های آلوده شده است. ویرازول از جمله

[1] . Antiviral chemotherapy

موادهای شیمیایی است که سبب حذف طیف وسیعی از ویروسهای گیاهی شـده اسـت. برای درمان ویروس aids نیز از ویرازول استفاده شده است. (جدول۳-۶)

جدول ۳-۶: مواد شیمیایی بازدارنده ویروسهای گیاهی

ترکیب	ماهیت	ویروس بازداشت شده
S-آزاگوانین	آنالوگ پورین	ویروسهای CMV و AMV با پاشیدن روی برگ
۲-تیواوراسیل	آنالوگ پریمیدن	ویروسهای PVX را باز می‌دارد
سیتوویرین	متابولیت استرپتومایسس	مانع از آلودگی PVY در تنباکو می‌شود
بلاستی سیدین	ضد قارچ	مانع از تکثیر TMV در برگ و BMV در جو می‌شود
فرمایسین	آنالوگ بازی آدنوزین	مانع از تکثیر TMV در برگهای ریزنمونه می‌شود
آکتینومایسین D	آنتی‌بیوتیک	مانع از ویروسهای گیاهی RNA مثل TMV می‌شود
جنتامایسین	آنتی بیوتیک	مانع از ویروسهای ساخته شده در پروتوپلاست گیاه می‌شود.

۵,۳- کشف ویروس

شناسایی و کشف ویروسها کار مشکلی است، بـه همـین دلیـل آزمایـشهای زیـادی برای شناسایی و کشف ویروسها پیشنهاد شده است که از آن میان می‌توان موارد زیـر را نام برد: الف- آزمایشهای مشاهده‌ای ب- آزمایش‌هـای زیـستی[1] مثـل تلقـیح بـا شـیره و انتقال شته.

الف- آزمایشهای مشاهده‌ای[2]

ب- آزمایشهای حیاتی[3]: در این روش از آزمایشهای انتقـال شـته[1] و مایـه‌کـوبی یـا تزریق شیره[2] استفاده می‌شود. از گیاهان شاهد نیز استفاده می‌شود و توسط علائمی که بر روی آنها حاصل می‌شود ارزیابی می‌شوند.

---

[1] .Biotest
[2] . Visual tests
[3] . Biotest

ج- تشخیص مصونیت[3]: این روش شامل دو تکنیک سرم‌شناسی و میکروسکپ الکترونیکی است.

د- روشهای زیست‌شناسی مولکولی: این روش شامل: الکتروفورز پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و نیز دورگ‌گیری اسیدهای نوکلئیک و RFLP می‌باشد.

تشخیص مصونیت

۱- **سرولوژی:** این روش معروف به روش الیزا[4] است. این روش نیاز به آنتی سرمهایی (تک کلونی- چندکلونی) دارد که در اثر تزریق شیره گیاهی خالص شده به وجود آمده است. روش الیزا در سال ۱۹۷۶ توسط ولر[5] و همکارانش به وجود آمد. ارزیابی این روش بر اساس واکنش آنتی‌سرم (آنتی‌بادی) و آنتی‌ژن می‌باشد. اگر شیره گیاهی دارای ویروس باشد کمپلکس آنتی‌بادی- آنتی‌ژن به وجود می‌آید. در طول دومین واکنش سرولوژیکی آنزیم متصل به آنتی‌بادی به پلیت[6] اضافه می‌شود. تغییر رنگ عکس‌العمل آنزیم به اضافه ماده پیش‌ساز (بعد از اضافه کردن ماده پیش‌ساز) توسط متومتری اندازه‌گیری می‌شود. تغییر رنگ یا بی‌رنگ شدن پلیت نشان دهنده میزان ویروس است.

۲- **میکروسکپ الکترونیکی:** در این روش از میکروسکپ PALIE[7] استفاده می‌شود. استفاده از این روش در کشف ویروسهای سیب‌زمینی مثل M, S, Y, X موفق بوده است.

---

1 . Aphid transmission
2 . Sap inoculation
3 . Immuno- diagnostic
4 . enzyme- linked immuno sorbent assay= elisa
5 . Voller
6 . Plate
7 . Protein- A linked immuno electron microscopy

شناسایی ویروس

تشخیص گیاهان (عاری از ویروس‌های شناخته شده)، به صورت مشاهده‌ای، امکان‌پذیر نیست؛ زیرا آلودگی‌های ویروسی پنهان زیادی می‌باشند. بنابراین، بایستی امکان بدست آوردن گیاهان عاری از ویروس، به صورت زیر، بررسی شود(هاکارات وهمکاران، ۱۹۸۰؛ ری متروسونی بورن، ۱۹۸۱؛ مات، ۱۹۸۰ ؛ مات و شرینگ، ۱۹۸۱):

۱- گیاهان آزمون (آزمایشهای حیاتی- Bio Test): شیرهٔ پروردهٔ گیاهی که برای آزمایش مورد نظر است؛ بر روی برگ گیاه آزمون که قبلاً به وسیلهٔ پودر کربوراندوم تمیار شده است، مایه کوبی می‌شود. اگر در شیرهٔ پرورده، ویروس وجود داشته باشد؛ پس از چند روز، گیاه آزمون، شروع به نشان دادن علائم ویروسی می‌کند. گیاهان آزمون، عبارتنداز :

Chenopodium ، *Chenopodium quinoa*،*Gomphrena globosa* *amaranticolor*

و بسیاری از گونه‌های مختلف توتون. ضعف این آزمون، طولانی بودن و امکانات زیاد مورد نیاز برای انجام آن، می‌باشد.

۲- آزمایشهای مشاهده ای

۳- تشخیص مصونیت (Immuno- Diagnostic)

۳- الف- میکروسکپ الکترونی: در این روش از میکروسکپ PALIE[1] استفاده می‌شود. استفاده از این روش در کشف ویروسهای سیب‌زمینی مثل M, S, Y, X موفق بوده است در عمل به دلیل گران بودن، از این روش کمتر استفاده می‌شود؛ زیرا فقط معدودی آزمایشگاه وجود دارد که دارای تجهیزات اختصاصی و پرسنل خبره، هستند..

[1] . Protein- A linked immuno electron microscopy

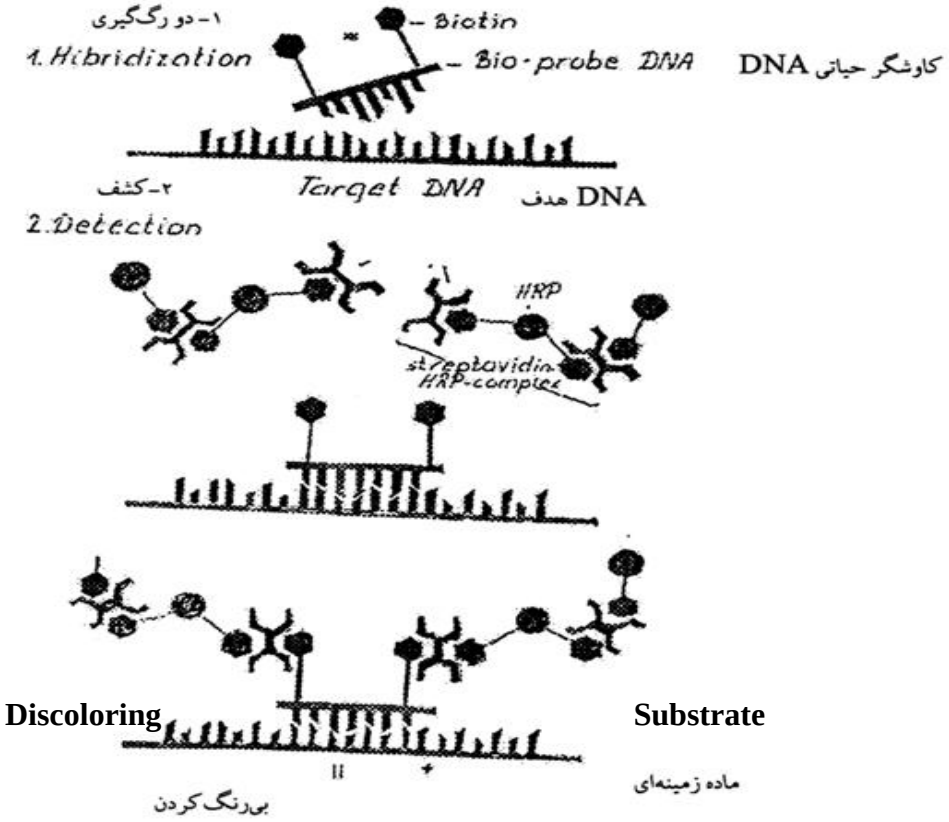
۴- ب- سرولوژی: اگر یک خرگوش به وسیلهٔ یک گیرندهٔ پروتئینی مثل یک ویروس گیاهی تزریق شود، در این صورت آنتی‌بادی مخصوص تشکیل می‌شود. اگر یک قطره از شیرهٔ پروردهٔ سانتریفوژ شدهٔ گیاهی، به آنتی‌سرم خون خرگوش اضافه شود، در صورت وجود ویروس، رسوب تشکیل می‌شود. بر مبنای همین پدیده، تعداد زیادی روش‌های حساس سرولوژیکی به وجود آمده‌اند. یکی از این روش‌ها، روش ELISA(Enzyme- linked immunosorbent assay) است. جزئیات استفاده از روش سرولوژیکی، به وسیلهٔ کارتا(۱۹۶۸) و لاتگ و کاسل(۱۹۶۸) ارائه شده است.

سرولوژی: این روش معروف به روش الیزا[1] است. این روش نیاز به آنتی سرمهایی (تک کلونی- چندکلونی) دارد که در اثر تزریق شیره گیاهی خالص شده به وجود آمده است. روش الیزا در سال ۱۹۷۶ توسط ولر[2] و همکارانش به وجود آمد. ارزیابی این روش بر اساس واکنش آنتی‌سرم (آنتی‌بادی) و آنتی‌ژن می‌باشد. اگر شیره گیاهی دارای ویروس باشد کمپلکس آنتی‌بادی- آنتی‌ژن به وجود می‌آید. در طول دومین واکنش سرولوژیکی آنزیم متصل به آنتی‌بادی به پلیت[3] اضافه می‌شود. تغییر رنگ عکس‌العمل آنزیم به اضافه ماده پیش‌ساز (بعد از اضافه کردن ماده پیش‌ساز) توسط متومتری اندازه‌گیری می‌شود. تغییر رنگ یا بی‌رنگ شدن پلیت نشان دهنده میزان ویروس است (شکل ۵-۶).

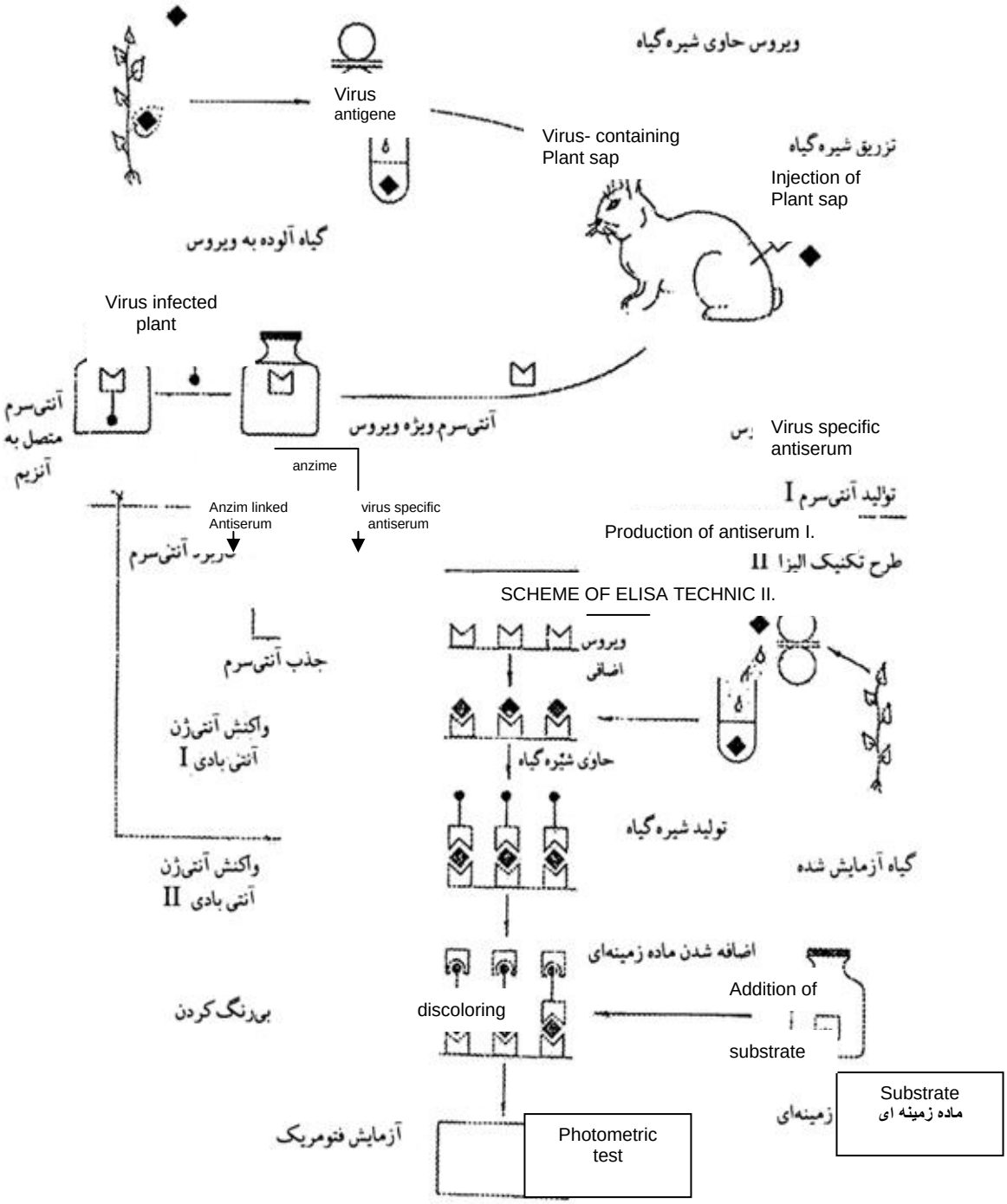
۵- **روشهای مولکولی:** این روش شامل: الکتروفورز پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و نیز دورگ‌گیری اسیدهای نوکلئیک و RFLP می‌باشد (شکل۴-۶).

---

[1] . enzyme- linked immuno sorbent assay= elisa
[2] . Voller
[3] . Plate



شکل ۴-۶- استفاده از دورگ گیری DNA برای تشخیص



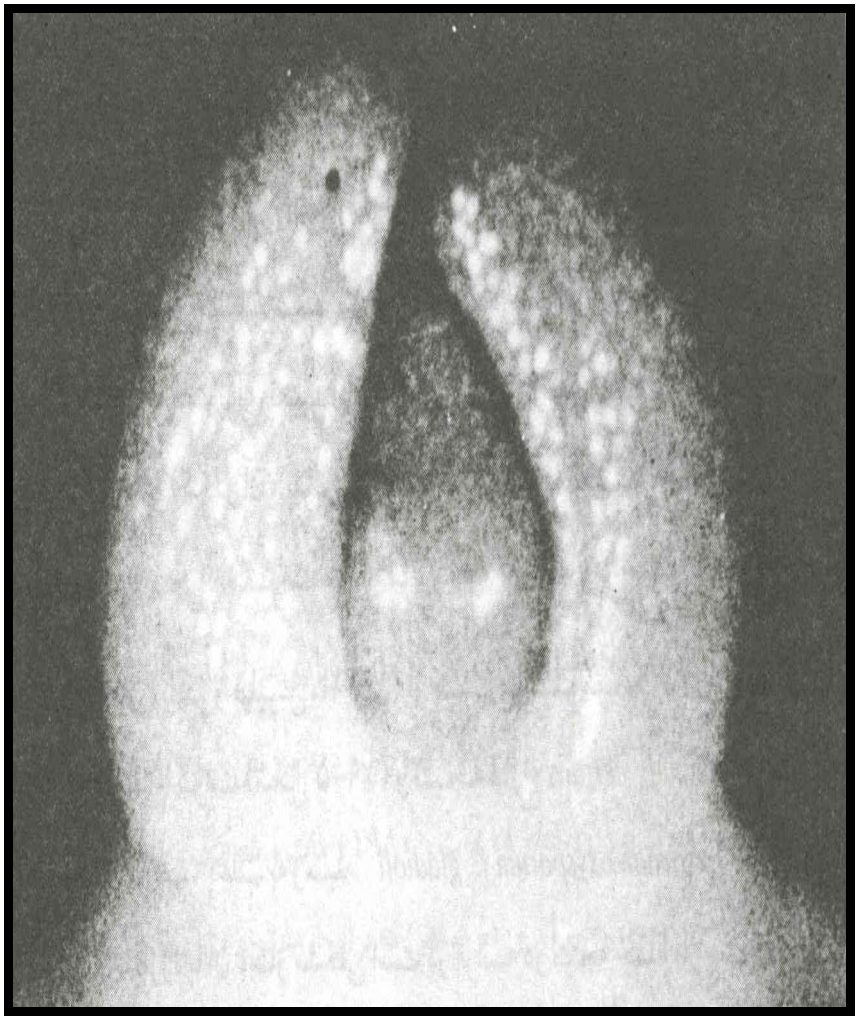
شکل ۵-۶: روش الیزا (ELISA) جهت شناسایی ویروس ها

تولید گیاهان عاری از باکتری و قارچ به وسیلهٔ کشت مریستم

به نظرمی‌رسد که تولید گیاهان عاری از باکتری و قارچ نیز به وسیلهٔ کشت مریستم، امکان‌پذیر است(لاموت و لرستن،۱۹۷۲؛ ترامیر،۱۹۶۵). مهم‌ترین جنس‌های باکتری که بایستی حذف شوند، عبارتنداز :*Erwinia*، *Pseudomonas* ، *Xanthomonas* و*Bacillus* ومهمترین جنس قارچ‌ها، عبارتنداز: *Fusarium*، *Verticillium*، *Phialophora* و*Rhizoctonia*. گاهی اوقات برای تعیین این که آیا گیاه عاری از باکتری یا عاری از قارچ است، یک محیط کشت غنی(که در آن، پپتون، تریپتون یا عصارهٔ مخمر، اضافه شده است) به کار می رود.

اولین تحقیق (بیکروفیلیپس،۱۹۶۲) از کشت مریستم میخک برای تولید گیاهان عاری از قارچ، انجام گرفت و نتیجتاً قارچ *Fusarium roseum f. cerialis* حذف شد.گیاه کوکب، اغلب به وسیلهٔ*Fusarium oxysporum f. gladioli* موردحمله قرار می‌گرد، که مبارزه با آن، کار مشکلی است. ترایمر(۱۹۶۰) به طریق موفقیت‌آمیزی، گیاهان آلوده نشده را به وسیلهٔ کشت مریستم، به دست آورد؛ و سپس آنها را در جایی که قارچ وجود نداشت، تکثیر نمود (شکل ۶-۶).

در سال ۱۹۷۷ رودل نشان داد که در میخک،دو قارچ (Fusarium oxysporlum *f* dianthi و Phialophora) و دو گونه باکتری *Pseudomonas carophylli* و *Pectobacterium parthenii* را می‌توان از طریق کشت مریستم، حذف نمود. تیلر(۱۹۸۱) توانست گیاه Pelargonium عاری ازباکتری را، از گیاهانی که آلوده به باکتری *Xant homonas Pelargonii* بودند، بدست آورد. همچنین کشت مریستم به صورت موفقیت آمیزی برای حذف باکتری *Xanthomonas begonia* در هیبریدهای بگونیا *Begonia elatior* (هانینگ ولانفان،۱۹۷۴؛رویتر،۱۹۷۸؛مونکوزین،۱۹۷۹؛تیلر،۱۹۸۱) به کاربرده شده است.



شکل ۶-۶: مریستم انتهایی میخک با دو جوانه آغازین برگ، که به منظور به دست آوردن گیاهان عاری از بیماری، در محیط این ویترو، ایزوله شده است.

فصل هفتم
کلیات مهندسی ژنتیک

مقدمه

برطبق تعریف سازمان خواربار جهانی(فائو)، بیوتکنولوژی شامل هر نوع استفادهٔ تکنیکی از سیستم‌های بیولوژیکی، ارگانیسم‌های زنده و یا مشتقات آنها، به منظور ایجاد و تغییر فرآورده‌ها جهت مصارف خاص می‌باشد. این مفهوم نه تنها شامل تکنولوژی DNAی نوترکیب نظیر مهندسی ژنتیک برای تولید ارگانیسم‌های تراریخته می‌باشد، بلکه سایر جنبه‌های بیوتکنولوژی غیرتراریخته نظیر ژنومیکس، پروتئومیکس، اصلاح به کمک نشان‌گرها، ریزازدیادی و ابزارهای تشخیصی را نیز شامل می‌شود.

تعریف فدراسیون بیوتکنولوژی اروپا از بیوتکنولوژی شامل استفادهٔ تلفیقی از علوم بیوشیمی، میکروبیولوژی و مهندسی به منظور نائل شدن به استفادهٔ صنعتی از قابلیت میکروارگانیسم‌ها، سلول‌های کشت شده و اجزای متعلق به آنها می‌باشد. فرهنگستان علوم ایالات متحده، بیوتکنولوژی را به عنوان استفادهٔ کنترل شده از عوامل بیولوژیکی نظیر میکروارگانیسم‌ها یا اجزای سلولی برای استفادهٔ مفید از آنها تعریف می‌کند.

در مجموع می‌توان گفت بیوتکنولوژی شامل هر تکنیکی است که از ارگانیسم-های زنده و یا بخشی از آنها برای تولید و تغییر فرآورده‌های خاص استفاده می‌کند، تا حیوانات و گیاهان را بهبود بخشیده و یا میکروارگانیسم‌ها را برای مصارف خاص توسعه دهد. این تعریف از بیوتکنولوژی هر دو نوع بیوتکنولوژی، کلاسیک و مدرن را در برمی‌گیرد. بیوتکنولوژی کلاسیک شامل صنعت تخمیر، تکثیرسریع گیاهان، کنترل بیولوژیکی آفات، تولید واکسن‌های حیوانی و غیره می‌باشد که اکثراً جنبه تجاری دارند. بیوتکنولوژی مدرن که اخیراً بسیار مورد توجه قرارگرفته است شامل استفادهٔ تجاری از تکنیک DNAی نوترکیب، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و فرآیندهای زیستی

جدید می‌باشد. بیوتکنولوژی مدرن قابلیت زیادی برای برطرف نمودن بسیاری از مشکلات کشورهای در حال توسعه دارد. تحقیقات گسترده در بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، خصوصاً در سطح مولکولی و بیولوژی سلولی، منجر به ایجاد روش‌های جدید انتقال ژن برای غلبه بر موانع موجود اصلاح کلاسیک گردیده است.

مهندسی ژنتیک نیز به عنوان بخش مهمی از بیوتکنولوژی، شامل روش‌هایی برای انتقال اطلاعات ژنتیکی خاص از یک موجود به موجود دیگر با روش‌هایی غیر از تولیدمثل جنسی می‌باشد. مهندسی ژنتیک براساس دست ورزیهای ژنتیکی در سطح سلولی و مولکولی استوار است و یک روش غیرجنسی انتقال ژن بین موجودات می‌باشد. مهندسی ژنتیک دو مرحله را دربرمی‌گیرد:

۱- انتقال ژن یا قطعه‌ای از DNAی مورد نظر به داخل یک ناقل (Vector) کوچک خود تکثیر شونده (تولید DNAی نوترکیب).

۲- انتقال DNAی نوترکیب به داخل سلول میزبان برای تکثیر(همسانه‌سازی ژن یا Gene cloning).

انتقال ژن

انتقال هدایت شدهٔ مطلوب از یک موجود به موجود دیگر و تلفیق و بیان پایدار آن ژن در ژنوم موجود میزبان را تراریزش ژنتیکی یا تراریختـه نمودن ژنتیکی(Transformation) می‌نامند. ژن انتقال یافته را ترانس ژن و گیاهان حامل ژن های پایدار حاصل از منابع خارجی را گیاهان تراریخته می‌نامند.

مهندسی ژنتیک و دستورزی گیاهان زراعی به منظور تولید گیاهان مقاوم در برابر آفات و امراض نباتی و بی‌نیاز از کاربرد سموم خطرناک، تحولی در کشاورزی ایجاد کرده که تنها با انقلاب سبز قابل مقایسه است. از زمان ابداع فناوری DNAی نوترکیب و مهندسی ژنتیک بیش از دو دهه می‌گذرد. این فناوری از بدو پیدایش، چشم اندازهای امید بخشی را در کشاورزی به وجود آورد و امروزه همه کشورها بر کلیدی بودن

زیست فناوری به عنون یک راهکار اساسی و مؤثر در سامان بخشیدن به اقتصاد، محیط زیست، بهداشت انسان و دام و از همه مهم‌تر در ایجاد امنیت غذایی میلیون‌ها انسان گرسنه، اذعان دارند. اگرچه هنوز هم در برخی از کشورهای اروپایی از کاربرد این فناوری در صحنه‌های اقتصادی به خصوص در زمینهٔ تولیدات غذایی جلوگیری به عمل می‌آورند، اما دانشمندان معتقدند که امروزه حتی منازعات موجود در جوامع بشری هم نمی‌تواند مانع گسترش حیرت‌آور بیوتکنولوژی گردد. به طوری که فراورده‌های غذایی بیوتکنولوژی با سرعت فزاینده‌ای در حال افزایش بوده و گیاهان تراریخته از سال ۱۹۶۶ تا سال ۲۰۰۵ سطحی بالغ بر ۹۰ میلیون هکتار را در جهان به خود اختصاص داده‌اند و تبادل جهانی آنها از مرز ۲۷ میلیارد دلار در سال ۲۰۰۵ میلادی گذشته است.

اصلاح نباتات کلاسیک سبب پیشرفت قابل توجهی در زمینهٔ بهبود گیاهان زراعی شده است. در این روش‌ها از تلاقی‌های مختلف و تولیدمثل جنسی برای انتقال اطلاعات ژنتیکی از یک گیاه به گیاه دیگر استفاده شده است. هدف این روش‌ها ایجاد تنوع ژنتیکی در جوامع گیاهی، انتخاب گیاهانی با ترکیب ژنتیکی مطلوب و افزایش تنوع در واریته‌های گیاهی بوده است. اما روش‌های اصلاح نباتات کلاسیک وقت‌گیر هستند و برای تولید یک واریته جدید از گندم یا برنج باید بیش از ۱۰ سال وقت صرف شود. در صورتی که می‌توان این زمان را با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک کاهش داد. اما این به مفهوم کوتاه بودن زمان ارائه یک واریته نیست، بلکه دورهٔ اصلاحی آن کوتاه‌تر می‌گردد. البته در این روش نیز لازم است چند سال زمان برای ارزیابی مزرعه‌ای گیاهان تراریخته صرف شود.

در اصلاح نباتات کلاسیک اکثر تلاقی‌ها درون گونه‌ای است و به ندرت تلاقی بین گونه‌ها و بین جنس‌ها امکان پذیر است. در حالی که از طریق مهندسی ژنتیک می‌توان بدون توجه به این موانع ژن را از هر گونه گیاهی، جانوری و یا حتی میکروارگانیسم به گیاه انتقال داد.

در روش‌های اصلاح نباتات کلاسیک معمولاً به همراه ژن‌های مطلوب انتقال یافته، ژن‌های دیگری نیز که پیوستگی شدیدی با ژن مورد نظر دارند، انتقال می‌یابند. در صورتی که این ژن‌های شدیداً پیوسته دارای اثرات نامطلوبی باشند، حذف آنها از گونه گیاهی مشکل و یا غیرممکن است. در صورتی که در روش‌های مهندسی ژنتیک تنها ژن مطلوب جداسازی شده و انتقال می‌یابد. به این ترتیب مشکل ناشی از ژن‌های نامطلوب پیوسته حذف می‌شود. با توجه به مطالب ذکر شده، اهمیت مهندسی ژنتیک در اصلاح گیاهان زراعی قابل توجه است.

از جمله اهداف اصلی مهندسی ژنتیک، تولید گیاهان تراریخته مقاوم به تنش‌های زیستی و غیرزیستی است. زیرا تنش‌های زیستی و غیرزیستی از عوامل اصلی کاهش عملکرد محصولات کشاورزی در مناطق مختلف جهان هستند و تولید واریته‌های مقاوم به این تنش‌ها از دغدغه‌های مهم بشر برای افزایش عملکرد این گیاهان خصوصاً از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک است. اکثر محصولات تنها به ۲۰٪ پتانسیل ژنتیکی خود می‌رسند که این موضوع به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نسبت داده می‌شود. از ۱/۳ تریلیون دلار ظرفیت تولیدی سالانهٔ غذا در جهان، حدود ۴۲-۳۱٪ آن (۵۰۰میلیون دلار) به خاطر تنش‌های زیستی نظیر حشرات، بیماری‌ها و علف‌های هرز از دست می‌رود و حدود ۲۰-۶٪ آن (۱۲۰میلیون دلار) بر اثر خسارت‌های بعد از برداشت توسط حشرات و بیماری‌های قارچی و باکتریایی از بین می‌روند. ۲۰-۶٪ دیگر نیز بر اثر تنش‌های غیرزیستی نظیر خشکی، سیل، یخبندان و کمبود مواد غذایی و شوری از بین می‌روند. درصد این خسارت‌ها در کشورهای در حال توسعه به مراتب بیشتر از کشورهای توسعه یافته می‌باشد. با توجه به آمار ذکر شده یافتن راهی برای مقابله با این تنش‌ها اجتناب ناپذیر است.

روش‌های انتقال ژن

انتقال ژن در گیاهان عموماً بر مبنای تراریزش یک سلول اولیه استوار است که این سلول اولیه یک دانه گرده، جنین رویشی، تخمک و یا یک سلول ساختاری گیاه می‌باشد. بنابراین برای انتقال ژن، دست آوردن یک سیستم باززایی مؤثر ضروری است. همان طوری که قبلاً با مفهوم توتیپوتنسی آشنا شدید، اکثر گیاهان تک لپه و دو لپه از چنین استعدادی برخوردارند و می‌توان از بخش‌های مختلف گیاهان برای تأمین سلول اولیه استفاده نمود. میزان باززایی در گیاهان به گونهٔ گیاهی، واریته و حتی ژنوتیپ آن نیز بستگی دارد.

از ابداع اولین ژن انتقال ژن به گیاهان با استفاده از آگروباکتریوم تومی فاشینس بیش از ۲۰ سال می‌گذرد. این روش در ابتدا محدود به چند گونهٔ خاص خانوادهٔ سولاناسه (Solanaceae) می‌شد، ولی هم اکنون با استفاده از این روش، اکثر گیاهان قابل تراریزش هستند. روش‌های متعددی پس از آگروباکتریوم ابداع شده است که هر یک کاربرد خاصی داشته اند؛ ولی به طور کلی می‌توان روش‌های انتقال ژن به گیاهان را به دو طریقهٔ اختصاصی و غیراختصاصی تقسیم‌بندی نمود. در روش‌های غیر-اختصاصی، انتقال ژن خاصی مدنظر نیست و بیشتر به منظور تکمیل ژنومی گونه‌ها صورت می‌گیرد. در انتقال اختصاصی ژن هدف خاصی مدنظر نیست و از انواع روش-های مستقیم به کمک دانه گرده، بذر، جنین و پروتوپلاست و روش‌های غیرمستقیم به کمک واسطه‌های انتقال ژن صورت می‌گیرد.

انتقال غیر اختصاصی

در انتقال غیراختصاصی، انتقال ژن‌ها به پروتوپلاست‌ها صورت می‌گیرد. الحاق پروتوپلاست‌ها و تشکیل هیبریدهای سوماتیکی از این نوع است. از آنجایی که مستقیم‌ترین روش انتقال ژن به سلول های گیاهی از طریق جذب DNAی پلاسمیدی است، اما در حال حاضر کاربرد آن بر مبنای قابلیت دسترسی به ژن‌های خالص شده

استوار است. ولی اکثر صفات زراعی توسط ژن‌های منفردی کد نمی‌شوند و بیشتر آنها ناشی از عکس‌العمل بین ژن‌های مختلف می‌باشند، لذا علاقهٔ زیادی به تکنیک الحاق پروتوپلاست و انتقال تمامی ژنوم وجود دارد. با استفاده از این روش انتقال بلوک بزرگی از DNA به داخل سلول‌های گیاهی امکان پذیر است. در این روش غشای پروتوپلاست‌ها با یکدیگر امتزاج یافته و تشکیل هیبریدهای پروتوپلاست‌ها به کاربرد و یا از اسفروپلاست‌های باکتریایی و یا لیپوزوم‌ها استفاده نمود. الحاق پروتوپلاست‌ها به سه روش مختلف شامل استفاده از مواد شیمیایی، شوک الکتریکی و یا اشعه لیزر انجام می‌شود. روش شوک الکتریکی عاری از سمیت سلولی مواد شیمیایی نظیر پلی‌اتیلن گلیکول و پلی وینیل الکل می‌باشد. به نظر می‌رسد شوک الکتریکی بهترین روش حتی نسبت به اشعهٔ لیزر باشد، زیرا امکانات آن در هر آزمایشگاهی فراهم است. علاوه براین، تعداد هیبریدهای به دست آمده در یک زمان معین در روش شوک الکتریکی بیشتر می‌باشد.

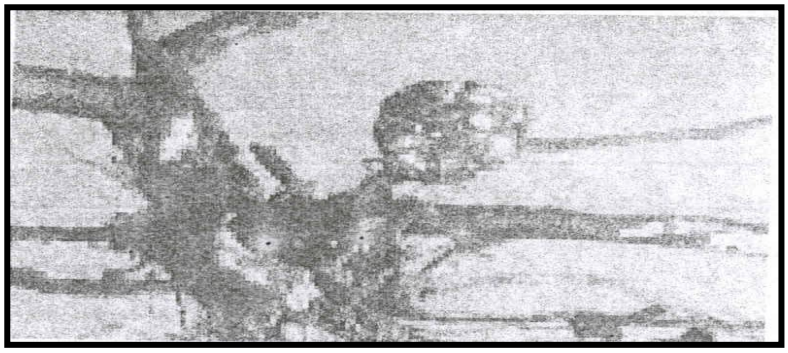
انتقال اختصاصی

در انتقال اختصاصی ژن بر خلاف غیراختصاصی، تنها انتقال یک ژن مدنظر است. انتقال اختصاصی ژن در گیاهان با استفاده از گونه‌های آگروباکتریوم که دارای سیستم بیولوژیکی انتقال ژن هستند، انجام می گیرد. البته چندین روش دیگر نیز برای انتقال اختصاصی ژن وجود دارد که به آنها اشاره خواهد شد و آنها را جزء سیستم‌های انتقال اختصاصی و مستقیم ژن به صورت مصنوعی طبقه‌بندی می کنند. این سیستم‌ها عبارتند از جذب مستقیم DNA، الکتروپوریشن(Electroporation)، انتقال با استفاده از لیپوزوم‌ها و تفنگ ژنی.

انتقال ژن با استفاده از سیستم بیولوژیکی آگروباکتریوم

تاکنون از آگروباکتریوم تومی‌فاشینس به عنوان واسطهٔ انتقال ژن به طیف وسیعی از گیاهان استفاده شده است و گیاهان تراریخته متعددی با این روش تولید شده‌اند.

استفاده از این باکتری برای انتقال ژن و تراریزش گیاهان به عنوان یک روش ساده و راحت شناخته شده است. آگروباکتریوم یک مهندسی ژنتیک طبیعی در گیاهان است. این باکتری خاکزی و گرم منفی است که عامل بیماری گال و طوقه در گیاهان دولپه می‌باشد. گال یا تومور اغلب توسط این باکتری در محل طوقه(اتصال بین ریشه و ساقه) شکل می‌گیرد. محل طوقه عموماً در قسمت سطحی خاک یا روی خاک قرار دارد و مستعد بیشترین صدمه و جراحت نسبت به سایر بخش‌ها است. بنابراین محل مناسبی برای آلودگی توسط باکتری‌های خاکزی نظیر آگروباکتریوم تومی‌فاشینس به شمار می‌رود. آگروباکتریوم قادر است در محل زخم وارد گیاه شود و گال یا تومور تولید نماید. سلول‌های آلوده در محل زخم تکثیر می‌شوند و سبب مسدود شدن سیستم آوندی و مرگ گیاهان جوان می‌شوند (شکل ۱-۷).



شکل ۱-۷: تولید گال در گیاهان

سلول‌های تغییریافته قادرند بر روی محیط کشت فاقد هورمون‌های اکسین و سیتوکینین رشد نمایند. علاوه بر این، ترکیبات شیمیایی به نام اوپین‌ها (pines) نظیراکتوپین (Octopine) و نوپالین (Nopaline) را تولید می‌کنند که از دو اسید-آمینه تشکیل شده‌اند. آرژینین و آلانین تشکیل اکتوپین و آرژینین و گلوتامین تشکیل

نوپالین را می‌دهند. نوپالین و اکتوپین در سلول‌های معمولی مشاهده نمی‌شوند. نوع اوپین بستگی به نژاد آگروباکتریوم دارد. اوپین‌ها کاتابولیزه می‌شوند و به عنوان منبع انرژی برای باکتری‌های آلوده کننده به کار می‌روند. اطلاعات لازم برای تشکیل گال طوقه توسط آگروباکتریوم تومی‌فاشینس در گیاهان بر روی یک پلاسمید بزرگ ۲۰۰ هزار جفت بازی قرار دارد که پلاسمید القا کننده تومور(Ti پلاسمید) نامیده می‌شود (شکل ۲-۷). بررسی‌های انجام شده نشان داده است که تمام پلاسمید Tiبه داخل سلول‌های گیاهی منتقل نمی‌شود، بلکه تنها بخشی از آن به نامT- DNA (Transfer DNA) به داخل ژنوم سلول‌های گیاهی تلفیق می‌شود. دو جزء اصلی که در آلودگی و تشکیل تومور نقش دارد، ناحیهٔ T-DNAو ناحیه ژن‌های(Virulence genes)Vir می‌باشد. T- DNAدر طی فرآیند انتقال، برش داده می‌شود و به داخل سلول گیاهی منتقل می‌گردد. شواهد نشان دهندهٔ این است که تلفیق T-DNA در مکان‌های تصادفی برروی کروموزوم انجام می‌شود. برروی T-DNA ژن‌هایی موجود است که از جمله آنها می‌توان به ژن‌های سنتز کنندهٔ اوپین‌ها، ژن‌هایی برای سنتز اکسین و سیتوکینین اشاره نمود. وجود ژن‌های سنتز کنندهٔ هورمون‌های گیاهی عامل اصلی برای تشکیل تومور و رشد سرطانی سلول‌های ناحیهٔ گال می‌باشد. در طرفین T-DNA دو توالی ۲۵ نوکلئوتیدی به نام بازوهای چپ و راست وجود دارد که برای شناسایی و برش ناحیهٔ T-DNAضروری هستند و حذف آنها منجربه عدم انتقال ناحیهٔ T-DNA می‌شود. ناحیهٔ ژن‌های Vir برای ایجاد بیماری‌زایی وانتقال T-DNA نقش اصلی را برعهده دارند. این ژن‌ها به صورت سیسترونی و برروی پلاسمید Ti قراردارند و ژن‌های لازم برای انتقالT-DNA در این ناحیه قرار گرفته است. این ژن‌ها، آنزیم‌هایی را سنتز می‌کنند که برای برش، انتقال و تلفیقT-DNA لازم هستند. ژن‌هایVir به صورت طبیعی در مقادیر خیلی پایین در آگروباکتریوم درون خاک بیان می‌شوند. مجاورت باکتری در مقابل سلول گیاهی و یا ترشحاتی که از بافت‌های گیاهی خارج می‌شود، به

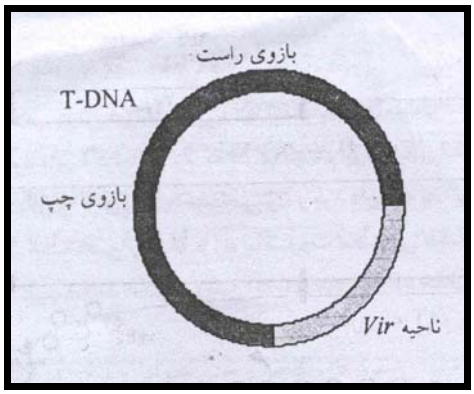
عنوان یک سیگنال برای افزایش بیان ژن‌هایVir عمل می‌کند. ترکیبات فنلی نظیر استوسیرینگان از بافت‌های زخمی گیاه ترشح می‌شوند و باعث القای ژن‌هایVir در باکتری می‌شوند. مجموعهٔ ۳۰ کیلوبازی ناحیهٔ Vir متشکل از ۶ اپرون می‌باشد که ژن‌هایVirA، VirB، VirGوVirD برای انتقال T-DNA و ژن-هایVirEو VirC برای افزایش کارایی انتقال ضروری هستند.

دستهٔ دیگری از ژن‌های کروموزومی نیز به نام (Chromosomal virulence)*Chv* در اتصال آگروباکتریوم به سلول گیاه و تشکیل کلونی باکتریایی نقش دارند. در این جایگاه مکان‌های ژنی شامل ، chvB،Chv، Cel، attوPsca وجود دارند که دارای نقش‌های مختلف هستند.

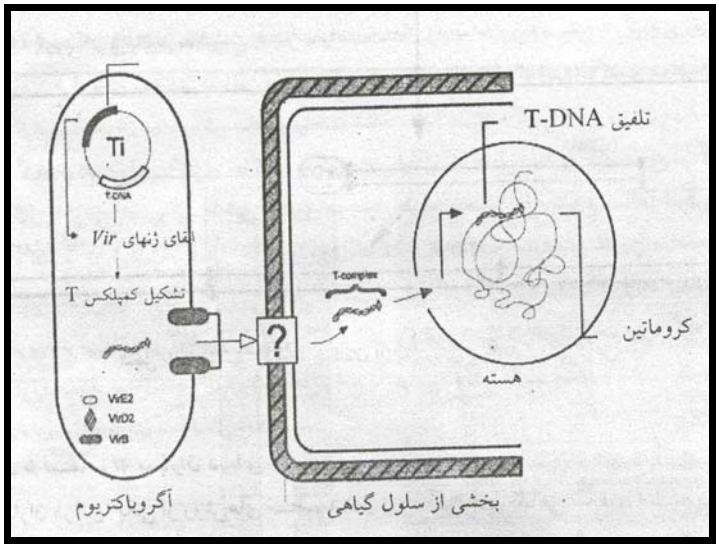
مکان‌های ژنی Tms وtmr برروی T-DNA قراردارند و اندازهٔ تومورها را کنترل می‌کنند. سلول های گال در محیط کشت فاقد اکسین قادر به رشد و تکثیر هستند. مکان ژنی tmr حامل ژن تولید کنندهٔ پروتئینی با وزن مولکولی ۲۷۰۰ دالتون به نام آنزیم ایزوپنتیل ترانسفراز(ipt)است که در سنتز سیتوکینین نقش دارد. مکان ژنی tms نیز در سنتز اکسین نقش دارد و چنانچه موتاسیونی در این مکان صورت گیرد، میزان اکسین تولید شده شدیداً کاهش می‌یابد و ممکن است باکتری حاصل قادر به تولید گال نبوده و یا گال‌های بسیار کوچکی تولید نماید و افزودن اکسین به گال‌های ریز موجب رشد سریع گال‌ها می‌شود.

از آنجایی که ناحیهٔ T-DNA از پلاسمید Ti آگروباکتریوم جدا شده و به درون ژنوم سلول گیاهی تلفیق می‌شود؛ بنابراین پتانسیل مناسبی برای استفاده از آگروباکتریوم برای انتقال اطلاعات ژنتیکی به سلول‌های گیاهی فراهم است و قراردادن ژن مورد نظر در هر جایی ما بین دو ناحیهٔ بازوی چپ و راست منجر به انتقال ژن‌های مورد نظر می‌شود (شکل های ۳-۷ و۴-۷). البته انتقال ژن با استفاده از پلاسمید طبیعیTi با مشکلاتی مواجه است. از جمله این که سلول‌های دریافت کننده ، تقسیم سلولی طبیعی

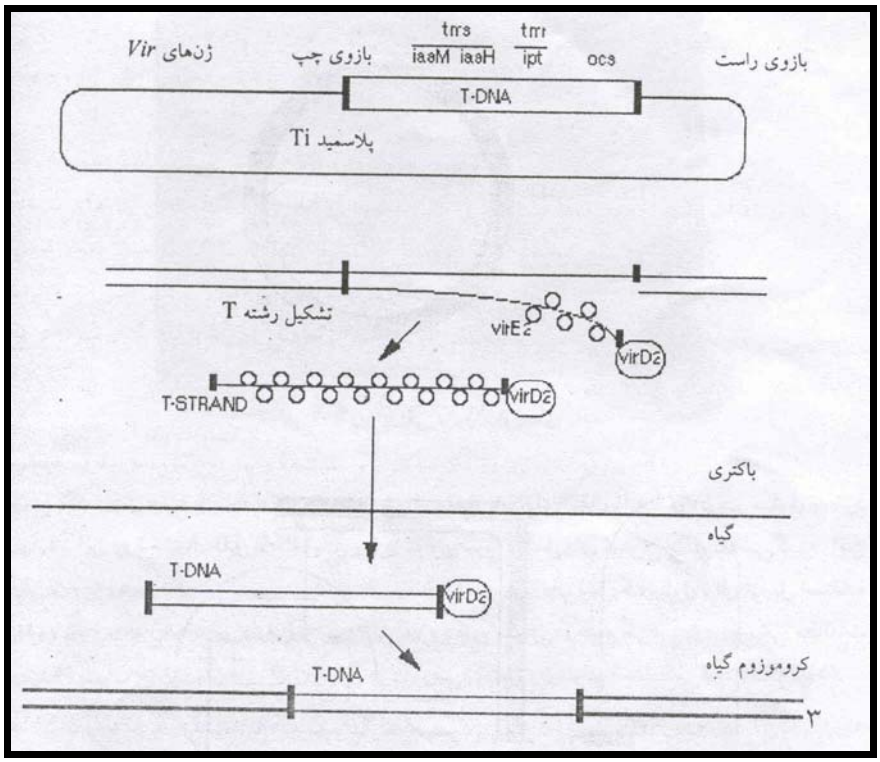
خود را از دست می‌دهند و تومور تولید می‌کنند. این حالت سرطان‌زایی T-DNA سبب شده که پلاسمید Ti تیپ وحشی برای اهداف انتقال ژن مناسب نباشد. بنابراین از ناقلین دیگری استفاده می‌شود که برای این هدف مناسب باشند.



شکل ۲-۷: پلاسمید Ti



شکل ۳-۷: نحوه برش T-DNA و انتقال آن به درون ژنوم سلول گیاهی.



شکل ۴-۷: تشکیل رشته T و انتقال آن به درون ژنوم سلول های گیاهی.

T-DNA طبیعی، ژن‌های سرطان‌زا یا انکوژن‌ها (Oncogenes) را دربردارد که برای تومورزایی و ساخته شدن اوپین ضروری می‌باشند، اما برای انتقال T-DNA ضروری نیستند. به همین دلیل می‌توان این ژن‌های سرطان‌زا را حذف نمود و بدین وسیله T-DNA را خلع سلاح کرد. این پلاسمیدهای خلع سلاح شده قادرند T-DNA را به گیاهان منتقل نمایند، اما تومور ایجاد نخواهند کرد. ژن‌های مطلوب خارجی را می‌توان بین بازوهای چپ و راست قرارداد و این پلاسمید مهندسی شده را برای انتقال به گیاه مجدداً به درون آگروباکتریوم فرستاد. پلاسمید Ti طبیعی

آگروباکتریوم را نمی‌توان به دلیل اندازهٔ بزرگ، خاصیت تومورزایی، فقدان مکان‌های برشی و عدم وجود ژن گزینش‌گر به طور مستقیم استفاده نمود؛ به همین دلیل از پلاسمیدهای دستورزی شده‌ای نظیر ناقلین دوتایی (Binary vectors) برای انتقال ژن خارجی استفاده می‌شود. ناقلین دوتایی از دو پلاسمید خود تکثیر شوندهٔ مستقل در آگروباکتریوم تشکیل شده‌اند. یک پلاسمید ژن مورد نظر را حد فاصل دو توالی بازوی چپ و راست در خود جای داده است و یک پلاسمید Ti کمک کننده نیز حاوی ژن‌های *Vir* به منظور انتقال ژن به سلول‌های گیاهی تعبیه شده است. علاوه براین، از ژن‌های گزینش‌گر نظیر ژن‌های مقاوم به کانامایسین و آمپی‌سیلین نیز در این پلاسمیدها استفاده شده تا شناسایی ژن انتقال یافته امکان‌پذیر باشد.

انتقال ژن با استفاده از بمباران ذره‌ای

روش بمباران ذره‌ای یکی از روش‌های مستقیم انتقال ژن به گونه‌های گیاهی مختلف است. برای انتقال ژن به سلول‌ها و DNA مورد نظر، در این روش از ریز پرتابه‌های آغشته به بافت‌های گیاهی استفاده می‌شود. این روش برای اولین بار توسط سان فورد و کلین در سال ۱۹۸۷ ابداع شده و از آن برای انتقال ذرات به درون بافت اپیدرمی پیاز استفاده گردید. اولین تراریخته‌ای که با استفاده از این روش گزارش شده‌اند، گیاه سویا و توتون بوده است. این روش به تفنگ ژنی و یا بیولیستیک نیز معروف است. دراین روش، DNAی مورد نظر را برروی ذرات بسیار ریز طلا و یا تنگستن رسوب می‌دهند و سپس آنها را با فشار زیاد به سمت هدف پرتاب می‌کنند. برخی از این ریز پرتابه‌ها به تصادف وارد سلول می‌شوند و DNA گیاهی را به درون سلول منتقل می‌کنند. قطر این ریز پرتابه‌ها حدود ۰/۵ تا ۵ میکرومتر است و بدون خسارت زیادی وارد سلول گیاهی می‌شوند. عموماً برای ایجاد فشار بالا جهت پرتاب از گاز هلیوم که گازی سبک است، بسیار سریع منبسط می‌شود و فشار بالایی را ایجاد می‌کند، استفاده می‌شود (شکل ۵-۷ و ۶-۷). ازجمله مزایای این روش می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

۱. روش استفاده انتقال ژن اس.

۲.نیاز به نانقلین بیولوژیکی ندارد.

۳.با موفقیت برای تراریزش سلول‌های گیاهی و حتی حیوانی و میکروارگانیسم‌ها به کاربرده شده است.

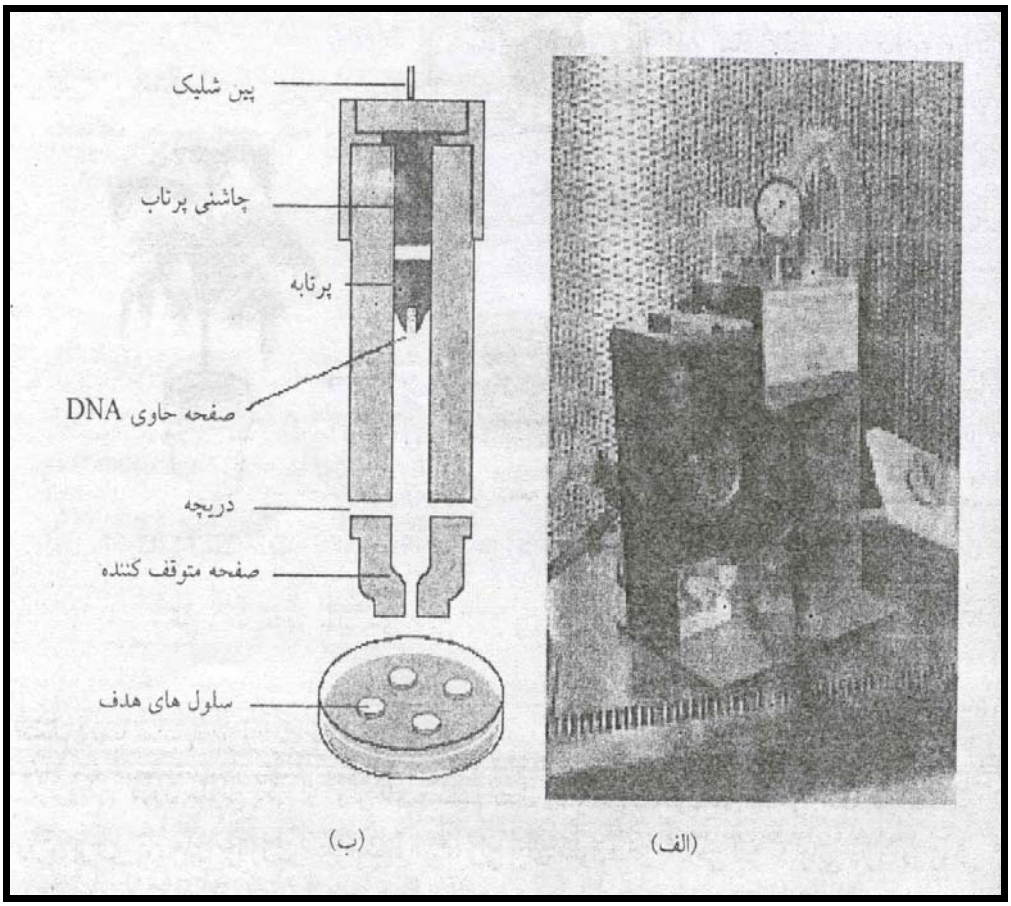
۴. جذبDNA وابسته به بافت و ژنوتیپ نیست.

۵. ذرات ریز حاوی DNA به راحتی از موانع سلولی ازطریق پرتاب، به سمت بافت هدف، عبور می‌کنند.

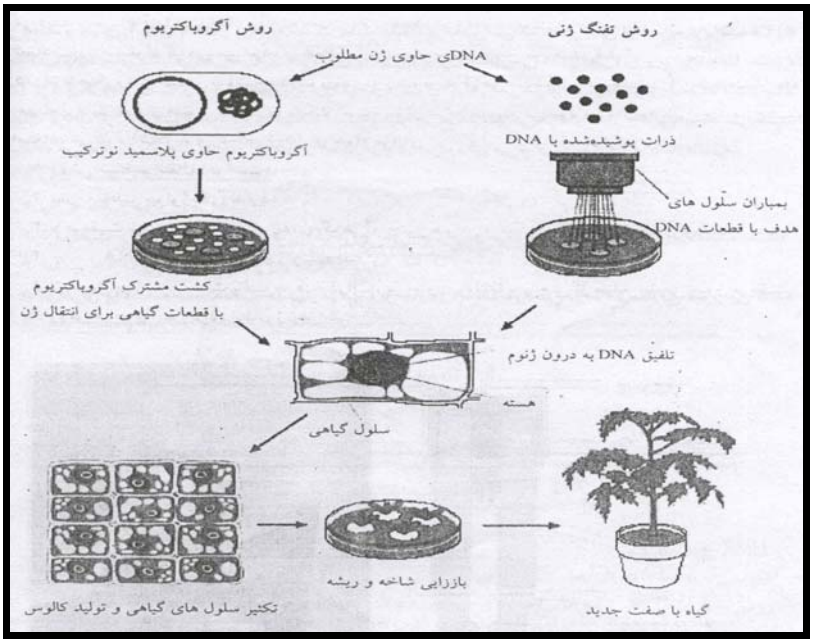
۶. روش ساده و ایمن برای انتقال ژن‌ها است.

انتقال ژن با استفاده از ریزتزریقی

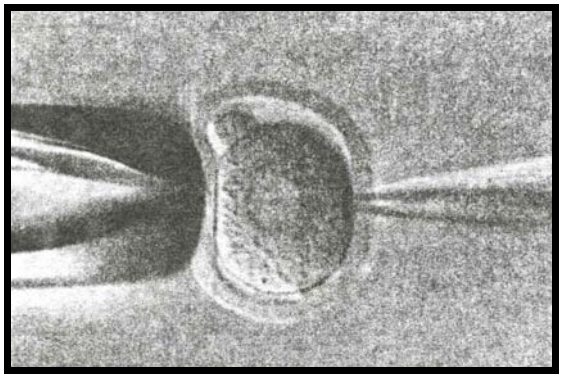
ریزتزریقی درون سلولی یکی از روش‌های مستقیم انتقال ژن به درون سلول‌های گیاهی است. در ابتدا این روش برای سلول‌های جانوری استفاده شده است، ولی برای سلول‌های گیاهی نیز کارایی دارد. در روش ریز تزریقی از سوزن‌های بسیار ریز برای انتقال DNA به ارگانل‌های خاص درون سلول استفاده می‌شود. این سیستم یک روش سریع و ساده است و محدودیتی در مقدارDNA ی انتقال یافته به درون هر سلول وجود ندارد. در این روش انتقال دقیقDNA به درون هسته و یا سایر ارگانل‌های سلولی صورت می‌گیرد. این روش از محدودیت‌هایی نیز برخوردار است، از جمله این که در هر زمان تنها یک سلول برای تزریق استفاده می‌شود و نیاز به مهارت خاصی دارد. البته این روش کاربردهای متنوعی درعلوم گیاهی دارد. در برخی مطالعات از این روش برای انتقال رنگ‌های فلوروسانس جهت بررسی انتقال درون سلولی استفاده می‌شود (شکل ۷-۷).



شکل ۵-۷: تصویر کلی دستگاه تفنگ ژنی (الف)، ساختار و اجزای آن (ب)



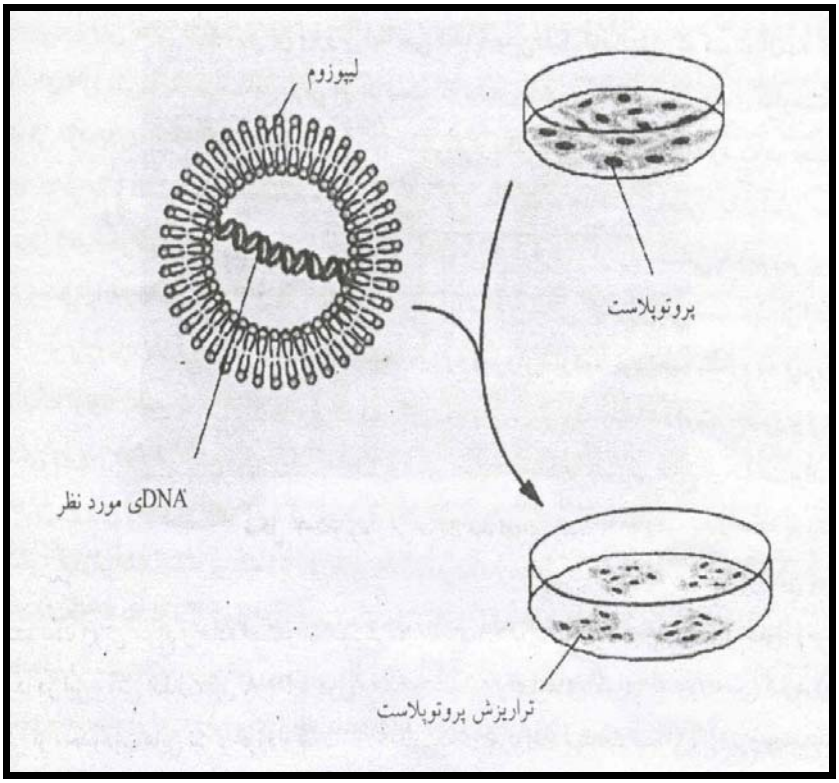
شکل ۶-۷: نمودار مقایسه‌ای روش انتقال ژن به کمک آگروباکتریوم و تفنگ ژنی.



شکل ۷-۷: ریز تزریقی درون سلول‌های زنده.

انتقال ژن با استفاده از لیپوزوم ها

لیپوزوم‌ها در واقع وزیکول‌هایی با غشای دولایه فسفولیپیدی می‌باشند که قابلیت تلفیق به درون غشای پلاسمایی را دارند. می‌توان RNA یا DNA را درون لیپوزوم‌ها احاطه کرد و آن‌ها را به درون پروتوپلاست‌ها فرستاد. استفاده از لیپوزوم‌ها برای انتقال و تراریزش و یا تلفیق لیپوزوم‌ها به صورت مستقیم اصطلاحاً لیپوفکشن (Lipofection) نام دارد. البته این روش برای گونه‌های خاصی که در آن‌ها) صورت می‌گیرد، کاربرد دارد. Endocytosisاندوسیتوزیس(شکل ۸-۷).



شکل ۸-۸: شمایی از انتقال ژن به کمک لیپوزوم.

الکتروپوریشن

در این روش از پالس‌های الکتریکی برای انتقال DNA به درون سلول‌های گیاهی استفاده می‌شود. قرارگرفتن سلول‌ها در معرض شوک‌های الکتریکی در زمان خیلی کوتاه سبب انتقال موفق DNA می‌شود.

جذب مستقیم DNA

به داخل سلول‌ها می‌باشد.DNAقدیمی‌ترین روش انتقال ژن در سلول سلول‌های جانوری، جذب مستقیم روش جذب مستقیم به دلیل سادگی و سرعت کار برای مطالعات پایه‌ای ژن‌ها در کشت سلولی بسیار حائز اهمیت است. قرار دادن جنین، بافت-ها و سلول‌ها در محیط غلیظ سبب می‌شود که همراه جذب ناگهانی آب، به داخل سلول‌های حاوی DNA مقداری از DNA نیز منتقل شود. این روش در بیشتر موارد برای بیان برخی ژن‌های خاص به کاربرده شده است. در رابطه با سلول‌های گیاهی ساده‌ترین حالت این است که بذر یا گرده خشک را در محلول آبی حاوی DNA قرار می‌دهند تا همزمان با جذب یکباره آب مقداری از DNA وارد سلول‌های بذر یا دانه گرده شود. بازدهی این روش برای سلول‌های گیاهی پایین است، چون علاوه بر غشای سلولی باید از دیواره سلولی نیز عبور کند. بنابراین جذب مستقیم در پروتوپلاست‌هایی که دیواره آن‌ها هضم شده است، راحت‌تر می‌باشد. در این روش نیاز به را می‌توان با استفاده از کلرید کلسیم، پلی اتیلن DNAناقل برای انتقال ژن نیست و جذب گلیکول و یا شوک الکتریکی افزایش داد. در این روش معمولاً احتیاج به مقدار زیادیDNA است.

درشت تزریقی

این روش برای اولین بار توسط سویفرو همکاران در سال ۱۹۸۰ برای تراریخته کردن چاودار به کار گرفته شد. دراین روش از سرنگ‌هایی که قطرشان بزرگتر از سلول است، استفاده می‌شود و DNA در محل مریستم گل‌های نابالغ به ساقه تزریق می‌شود. بدین وسیله DNA برخی گیاهان در محل بعدی در اختیار بافت‌های مولد دانه گرده قرار می‌گیرد. این روش در غلات تولید بذوری خواهند کرد که حاویDNAی مورد نظر هستند، به غیر از چاودار که جواب خوبی نداده است.

نقش بیوتکنولوژی در اصلاح نباتات

انواع گیاهان تراریخته

تولید گیاهان تراریخته با اهداف خاص و بیشتر به منظور افزایش مقاومت به تنش-های زیستی و غیرزیستی برای افزایش عملکرد صورت گرفته است. ازجمله تنش‌های زیستی می‌توان به آفات، بیماری‌ها و نماتدها اشاره نمود که سالانه بخش عظیمی از محصولات زراعی را از بین می‌برند. تنش‌های غیرزیستی نیز شامل تنش‌های خشکی، شوری، قلیائیت خاک، سرما و عناصر سنگین می‌باشند که بر طبق آمار حدود ۹۰٪ زمین‌های مزروعی دنیا به نوعی در معرض یکی و یا ترکیبی از این تنش‌ها می‌باشند. علاوه بر این، گیاهان تراریختهٔ دیگری نیز نظیر گیاهان مقاوم به علف‌کش و گیاهانی با ویژگی‌های بهبود یافته نیز تولید شده‌اند که در ادامه، بحث خواهند شد.

مقاومت به تنش های زیستی نظیر آفات و بیماری ها

طبق برآوردهای انجام شده، آفات تقریباً یک سوم محصولات زراعی سالانه را از بین می‌برند. به رغم پیشرفت‌های انجام شده در تکنولوژی کنترل آفات، همواره این موجودات به عنوان خطری جدی برای تولید محصولات زراعی به شمار می‌روند. انواع بسیاری از آفات و بیماری‌ها نظیر ویروس‌ها، قارچ‌ها، باکتری‌ها، حشرات، لاروها و نماتدهای گیاهی سبب کاهش عملکرد محصولات زراعی در نواحی مختلف جهان می‌شوند. به عنوان مثال، برخی از انواع لاروهای خاکی سالانه ۷ میلیارد دلار به

محصولات زراعی آمریکا خسارت وارد می‌کنند و خسارت حشرات از این هم بسیار بیشتر است. کاهش خسارت آفات و بیماری‌ها یکی از دغدغه‌های کشاورزان هر منطقه‌ای است. در گذشته از عملیات زراعی و روش‌های اصلاحی نظیر هیبریداسیون برای تولید واریته‌های با مقاومت بهتر به آفات و بیماری‌ها استفاده می‌کردند یا این که از کنترل شیمیایی و بیولوژیکی برای از بین بردن آفات کمک می‌گرفتند. کاربرد سموم آفت‌کش و یا استفاده از حشرات شکارچی از جمله تلاش‌های انجام گرفته برای کاهش خسارت آفات بوده است. اما امروزه بیوتکنولوژی مدرن و مهندسی ژنتیک امکان انتقال ژن‌های مقاوم به آفات و بیماری‌ها را از هر منبعی به گیاه فراهم نموده است و حتی در برخی موارد، انتقال ژن و استفاده از DNAی نوترکیب تنها راه‌کار برای تولید واریته-های مقاوم می‌باشد. اولین تلاش‌های مهندسی ژنتیک برای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به آفات و ویروس‌ها صورت گرفته است، زیرا مقاومت به اکثر آفات و ویروس‌ها یک صفت تک ژنی است و تنها با انتقال یک ژن، امکان ایجاد مقاومت در گیاه میزبان وجود دارد. اما بررسی‌های انجام شده نشان داده است که مقاومت به بیماری‌های قارچی حاصل کنش متقابل چندین ژن است و در آینده راه‌بردهای مهندسی ژنتیک به سمت انتقال همزمان چندین ژن به گیاهان برای ایجاد مقاومت به این بیماری‌ها خواهد بود. ایجاد مقاومت به آفات درگیاهان یک زمینه درحال رشد در مهندسی ژنتیک می‌باشد، اگر چه آفات از روش‌های تهاجمی جدیدی برای کسب مقاومت استفاده می‌کنند و نسبت به روش‌های کنترل و مبارزه مقاوم می‌شوند ولی امروزه گیاهان مقاوم به آفات از طریق مهندسی ژنتیک تولید شده‌اند که اکثراً در مراحل آزمایشات مزرعه‌ای برای رهاسازی به محیط می‌باشند. تولید گیاهان مقاوم به آفات و بیماری‌ها مستلزم انجام یک سری آزمایشات و مراحل می‌باشد. اولین مرحله در تولید گیاهان مقاوم، شناسایی واریته‌هایی از گیاهان و یا ارگانیسم‌هایی است که مقاومت خاصی به عامل بیماری از خود نشان می‌دهند. پس از شناسایی منبع مقاومت اقدام به شناسایی و جداسازی ژن‌های

مقاومت کرده و سپس می‌توان با استفاده از فناوری DNA ی نوترکیب و روش‌های مهندسی ژنتیک، ژن‌های مورد نظر را به گیاهان میزبان منتقل نمود.

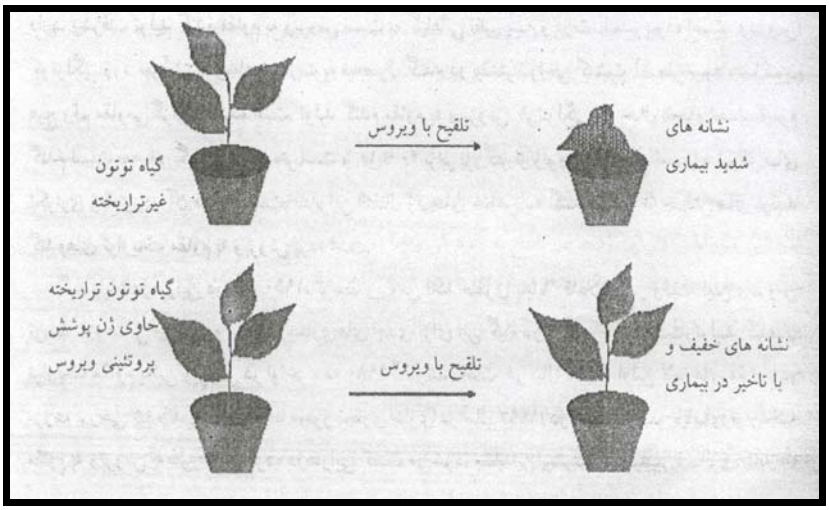
مقاومت به ویروس ها

ویروس‌ها یکی از مخاطرات اصلی و مهم کشاورزی هستند. ایجاد مقاومت به ویروس‌ها در برخی واریته‌های مهم زراعی نظیر سیب زمینی، گوجه فرنگی، خیار و برخی دیگر از گیاهان از جمله اهداف اصلی محققان بخش کشاورزی است. ویروس‌ها نه تنها باعث ایجاد بیماری در گیاهان می‌شوند، بلکه از عوامل جدی بیماری‌زا در انسان، حیوانات و حشرات محسوب می‌شوند. مطالعات وسیعی بر روی ویروس‌ها صورت گرفته است، زیرا ویروس‌ها یکی از اجزای مهم در بیولوژی مولکولی هستند و کمک زیادی به محققان در جهت پیشبرد اهداف مولکولی کرده‌اند. تولید گیاهان مقاوم به ویروس یکی از موفق‌ترین کارهای عملی انجام شده در انتقال ژن به گیاهان است. به دلیل اندازه نسبتاً کوچک ژنوم ویروس‌های گیاهی کاربرد ابزار مولکولی برای کنترل بیماری‌های ویروسی به طور خاص موفقیت‌آمیز بوده است. چندین روش برای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس به کاربرده شده است و راه برد استفاده از بیان بخشی از ژنوم ویروس درگیاه، مؤثر بودن این راهبرد را به اثبات رسانده است. انتقال ژن کد کننده پوشش پروتئینی ویروس و یا انتقال هم زمان چندین ژن برای ایجاد مقاومت به ویروس از راه‌بردهای مؤثر شناخته شده است. بیان ژن پروتئین پوششی ویروس و یا سایر ژن‌های ویروسی نظیر رپلیکاز (آنزیم نسخه‌بردار و یروس) سبب حفاظت در برابر آلودگی‌های ویروسی شده است. پوشش پروتئینی ویروس نظیر یک واکسن در گیاه عمل می‌کند و گیاه را به مقابله با ویروس وادار نموده و ایجاد مقاومت می‌نماید. انتقال ژن کد کننده پوشش پروتئینی ویروس به گیاه سبب ایجاد مقاومت کلی به ویروس در گیاه می‌شود. پوشش پروتئینی ویروس نقشی در بیماری‌زایی ویروس ایفا نمی‌کند به

همین دلیل انتقال ژن کد کننده آن به گیاه صدمه‌ای وارد نمی‌نماید. مزیت این روش در آن است که تولید پوشش پروتئینی سبب القای مقاومت در گیاه می‌شود بدون این که گیاه در معرض ویروس حقیقی قرار بگیرد. این روش ایجاد مقاومت در چندین گونه گیاهی با موفقیت انجام شده است. علت اصلی این نوع مقاومت به حفاظت تقاطعی یا توانایی یک ویروس برای جلوگیری از اثر رقابتی ویروس دیگر اطلاق می‌شود. فرضاً اگر نژاد حساس به ویروس یک گیاه زراعی را با نژاد ملایمی از ویروس تلقیح نماییم آن نژاد حساس گیاه زراعی نسبت به نژادهای بیماری‌زاتر ویروس مقاوم خواهد شد. اولین گیاه مقاوم به ویروس توتون تراریخته مقاوم به ویروس موزائیک توتون است که از طریق بیان پوشش پروتئینی ویروس در توتون تولید شده است. حضور پروتئین پوششی ویروس مانع از تکثیر ویروس در نقطه آلودگی خواهد شد به عبارتی مانع از حذف پوشش پروتئینی ویروس رقیب در نقطه آلودگی می‌شود. اکثر سیستم‌هایی که در آنها مقاومت RNA به واسطه پروتئین پوششی گزارش شده است بر علیه ویروس-های تک رشته‌ای مثبت با یک پروتئین پوششی بوده است(شکل ۹-۷). از این روش در چند محصول زراعی نظیر توتون گوجه فرنگی و سیب زمینی استفاده شده است. علاوه بر پوشش پروتئینی از ژن رپلیکاز ویروسی نیز برای ایجاد مقاومت به ویروس استفاده شده است. از این روش برای ایجاد مقاومت به ویروس TMV در توتون و PVXدر سیب زمینی استفاده شده است.

اولین گیاه تراریخته مقاوم به ویروس که در بازار وارد شده است، کدوی مقاوم به ویروس موزائیک می‌باشد. سیب زمینی نیز به عنوان یک گیاه بسیار حساس به ویروس شناخته شده است. از جمله ویروس‌های خسارت زننده به این گیاه می‌توان به ویروس موزائیک سیب زمینی و ویروس پیچش برگ سیب زمینی اشاره نمود. اپیدمی ویروس پیچش برگ در سال ۱۹۹۶ سبب از بین رفتن محصول سیب زمینی مردم ایداهو گردید. این ویروس به کمک شته منتشر می‌شود و به نحوی به سیب زمینی خسارت می‌زند که

دیگر قابل عرضه در بازار نیست. محققان مکزیک با همکاری محققان مونسانتوی کانادا اقدام به تولید واریته‌های سیب زمینی مقاوم به این ویروس نموده‌اند و تحقیق در زمینه تولید ارقام مقاوم به ویروس همچنان ادامه دارد. ویروس لکه پری در سیب زمینی



شکل ۹-۷: شمایی از مقاومت گیاهان تراریخته حاوی ژن پوشش پروتئینی ویروس به بیماری

شیرین نیز سبب از بین رفتن محصول سیب زمینی شیرین می‌شود. محققان در سال ۱۹۹۱ اقدام به تولید واریته‌های مهندسی شده از سیب زمینی شیرین برای ایجاد مقاومت به این ویروس نموده‌اند. سیب زمینی شیرین یکی از محصولات غذایی اصلی مردم آفریقا به شمار می‌رود. تولید سیب زمینی شیرین مقاوم به ویروس لکه پری از طریق وارد نمودن ژن پوشش پروتئینی و ژن رپلیکاز (آنزیم نسخه‌بردار RNAی ویروس) انجام شده است. آنزیم رپلیکاز برای همانندسازی مولکول‌های ویروسی به کار برده می‌شود. آزمایش‌های مزرعه‌ای حاکی از موفقیت آمیز بودن تولید واریته‌های سیب زمینی شیرین مقاوم به ویروس لکه پری است.

گندم نیز به عنوان یک گیاه زراعی و منبع اصلی تغذیه مردم جهان در معرض خطر ابتلا به ویروس قرار دارد. پیشرفت تولید گندم مقاوم به ویروس نسبت به گیاهانی نظیر پنبه و ذرت کمتر بوده است. ویروس کوتولگی زرد جو سبب ایجاد خسارت به محصول گندم در بیشتر نواحی کشت آن می‌شود و تاکنون هیچ رقم مقاومی گزارش نشده است. تولید گندم مقاوم به ویروس کوتولگی در حال انجام است. ژنوم گندم نسبت به سایر گیاهان پیچیده‌تر است و ۱۰ تا ۲۰ برابر بزرگتر از ژنوم پنبه یا برنج است و توالی‌های تکراری زیادی در آن موجود است. بنابر این انتقال ژن‌های خاص به گندم یکی از چالش‌های تولید گندم تراریخته مقاوم به ویروس بوده است.

گیاه پاپایا در هاوایی در دهه ۱۹۵۰ توسط ویروس حلقوی پاپایا (*Papaya*)کاملاً از بین رفت. این ویروس توسط شته منتقل می‌شود و یکی از بیماری‌های جدی برای این گیاه در سراسر جهان است. تولید گیاهان تراریخته مقاوم به این ویروس در اواخر دهه ۱۹۸۰ آغاز شده است. در سال ۱۹۹۲ اولین لاین‌های مقاوم در مزرعه بررسی شده‌اند و پس از اخذ مجوز تجاری سازی در سال ۱۹۹۷ در حال حاضر پاپایای تراریخته مقاوم به ویروس به صورت گسترده در هاوایی کشت می‌شود. مشابه این پیشرفت در فیلیپین مالزی تایلند ویتنام و اندونزی نیز صورت گرفته است. محققان به دنبال تولید درختان و درختچه‌های میوه مقاوم به ویروس نیز بوده‌اند. به عنوان مثال تمشک مقاوم به ویروس کوتولگی در بهار سال ۲۰۰۰ وارد آزمایش‌های مزرعه‌ای شده است.

۷-۴-۱-۳) مقاومت به قارچ ها

بیماری‌های قارچی یکی از عوامل اصلی خسارت به درختان میوه و سبزیجات شناخته شده‌اند و باعث ایجاد علائمی نظیر پژمردگی، پوشش‌های کپکی، زنگ، ایجاد لکه، پوسیدگی و زخم بر روی گیاه می‌شوند. تحقیق در زمینه راه بردهای مهندسی ژنتیک برای مقابله با قارچ‌ها بسیار با ارزش است زیرا می‌تواند جایگزین مناسبی برای

قارچ کش‌هایی نظیر متیل بروماید بوده که هم اکنون کاربرد آن خسارت زیادی به محیط زیست وارد می کند.

گیاهان درمقابله با آلودگی قارچ‌ها ترکیباتی در خود تولید می کنند؛ ازجمله این ترکیبات می‌توان به ترکیبات پروتئینی نظیر دی فنسین(Defenesin) اشاره نمود که تحمل گیاه را در مقابل باکتری‌ها و قارچ‌ها افزایش می‌دهد. این ترکیبات در اکثر موجودات نظیر حشرات، پستانداران، ماهی و گیاهانی نظیر یونجه و نخود فرنگی مشاهده شده است که دارای فعالیت ضد قارچی می‌باشند. اولین کاربرد دی فنسین در تولید سیب زمینی تراریخته‌ای بوده که دی فنسین یونجه در آن بیان شده است. آزمایش‌های مزرعه‌ای و گلخانه‌ای بر روی این گیاه نشان داده که این گیاه نسبت به پاتوژن قارچی ورتیسیلیوم مقاوم است. پروتئین‌های ضد باکتری و ضد قارچی را می‌توان از برخی منابع نظیر حشرات و گیاهان جداسازی نمود.

به گزینی برای شناسایی ژن‌های کاندید را می‌توان از طریق استعمال عوامل میکروبی در محیط کشت شناسایی نمود. تاکنون تعداد زیادی از ژن‌های گیاهی که در تولید پروتئین‌های ضد میکروبی نقش دارند، شناسایی شده‌اند. اکثر این ژن‌ها در پاسخ به آلودگی و یا در مواجهه با ماکرومولکول‌های میکروبی در سطح نسخه برداری فعال می‌شوند. فراورده این ژن‌ها شامل آنزیم‌های هیدرولیتیک نظیر کیتیناز، گلوکاناز، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزوم و پروتئین‌های ضدقارچ و غیره می‌باشند.

آنزیم‌های هیدرولیز کننده نظیر کیتیناز و گلوکاناز موجب تخریب دیواره سلولی قارچ‌ها می‌شوند. اولین ژن کیتیناز از باکتری خاک زی *Seratia marcescens* جداسازی شده و به صورت پایدار در توتون بیان شده است. البته ژن کیتیناز گیاهی نیز از لوبیا قرمز جداسازی شده است.

فیتوالکسین‌ها نیز متابولیت‌های ثانویه‌ای با وزن مولکولی کم و فعالیت ضد میکروبی می‌باشند که توسط گیاهان در پاسخ به آلودگی سنتز می‌شوند و در مقاومت گیاهان به بیماری‌ها سهیم هستند. از جمله این پروتئین‌ها می‌توان به تیونین، پرماتین، اسموتین و زیماتین اشاره کرد که بر علیه قارچ یا باکترین مؤثر هستند.

در موز و کاساوا نیز محققان به دنبال جداسازی ژن‌های مقاوم به بیماری‌های قارچی نواحی نظیر بیماری قارچی سیگاتوکای موز بوده‌اند. برای مثال در موز چندین ژن ضد قارچی شناسایی و انتقال داده شده است. لاین‌های مقاوم بدست آمده از نظر مقاومت به این بیماری و بیماری پاناما تحت شرایط مزرعه و گلخانه بررسی شده‌اند.

یکی از پاتوژن‌های قارچی در گندم و جو نیز قارچ *Botrytis cinerea* می‌باشد. محققان را به جو وارد کرده اند تا مقاومت به این قارچ ایجاد نمایند. این گیاه هنوز در مرحله آزمایش‌های مزرعه‌ای قرار دارد.

مقاومت به بیماری بلایت سیب زمینی که توسط قارچ *Phytophtora infestans* ایجاد می‌شود در اولویت تحقیقاتی سیب زمینی قرار داشته است. این بیماری باعث ایجاد خسارت جدی به محصول سیب زمینی در دنیا شده است. در سال ۱۹۹۵ اپیدرمی بلایت سیب زمینی حدود ۶۵۰۰۰ هکتار از محصول سیب زمینی ایرلند یا تقریبا ۲۰٪ تولید این کشور را از بین برده است. تحقیق برای تولید سیب زمینی تراریخته‌ای که آنزیم گلوکز اکسیداز را بیان می‌کند و باعث ایجاد مقاومت به بلایت Phytophtora می‌شود، در حال انجام است ولی تا کنون هیچ فرآورده‌ای به مرحله تجاری نرسیده است.

همچنین سیب زمینی با استفاده از ژن بتا- L -۳- اندوگلوکاناز حاصل از سویا نیز تراریخته شده است و باعث ایجاد مقاومت به Phytophtora شده است. مطالعات دیگری نیز گزارش کرده‌اند که بیان اسموتین در سیب زمینی سبب شده است تا خسارت کمتری بر اثر پاتوژن Phytophtora به سیب زمینی وارد شود. تحقیقات

دیگری در حال انجام است تا ژن‌های مقاوم به پاتوژن قارچی سبب ایجاد سیگنال‌هایی در گیاه می‌شود که ژن‌های مقاوم را فعال می‌نمایند. یکی از مواد تولیدی چیتوزان است که رشد قارچ را متوقف می‌کند و سیستم دفاعی طبیعی را در گیاه سیب زمینی فعال می‌کند.

در برنج نیز بیماری بلاست (Blast) وشیت بلایت (Sheath bligth) جزء بیماری‌های قارچی مهم می‌باشند. محققان گونه‌های تراریخته‌ای تولید کرده‌اند که مقاوم به شیت بلایت بوده‌اند و هم اکنون در مرحله آزمایش مزرعه‌ای قرار دارند. البته تحقیقاتی در حال انجام است تا مقاومت چند گانه به شیت بلایت قارچی و لارو ساقه خوار برنج ایجاد شود.

مقاومت به باکتری ها

بیشتر باکتری‌هایی که برروی گیاهان زندگی می‌کنند، برای میزبان‌های گیاهی خود مضر نیستند و در حقیقت مفید می‌باشند. ولی باکتری‌هایی نیز وجود دارند که سبب ایجاد بیماری در میزبان خود می‌شوند. بیشتر محصولات زراعی نسبت به بیماری‌های باکتریایی حساس هستند و باکتری‌ها به ندرت گیاهان معینی نظیر سرخس‌ها، خزه‌ها و مخروطیان را مورد حمله قرار می‌دهند. آلودگی باکتریایی در گیاهان سبب ایجاد لکه-هایی برروی برگ یا میوه شده و در نهایت باعث ایجاد پوسیدگی‌های نرم، زرد شدن، پژمردگی، توقف رشد، تومور و یا زخم می‌شود.

سیب زمینی به بیماری ساق سیاه و پوسیدگی نرم بسیار حساس است؛ این بیماری توسط پاتوژن باکتریایی *Pectobacterium atrosepticum* ایجاد می شود. یک خانواده از آنزیم‌ها تحت عنوان لیزوزایم‌ها شناسایی شده‌اند که سبب تخریب آنزیمی دیواره سلولی باکتری‌ها می‌شوند. گیاهان سیب زمینی تراریخته‌ای تولید شده‌اند که ژن لیزوزایم را با پروموتور مناسب بیان کرده و مقاومت بالایی به این پاتوژن نشان می‌دهند.

- مقاومت به آفات

مشکلات زیست محیطی ناشی از مصرف سموم شیمیایی در تولید غذا از عواملی هستند که خطری جدی برای سلامت و امنیت غذایی انسان‌ها به شمار می‌روند. بیشترین نگرانی درباره مصرف مواد شیمیایی در تولید محصولات غذایی، مربوط به کاربرد آفت کش‌ها است. بنابراین تولید گیاهان مقاوم به آفات به منظور کاهش مصرف سموم شیمیایی در کشاورزی حائز اهمیت است.

تولید گیاهان تراریخته مقاوم به آفات با استفاده از چندین منبع ژنی شامل بازدارنده پروتئاز، بازدارنده آلفا-آمیلاز، لکتین و سموم باکتریایی حاصل شده است. اولین پیشرفت در مهندسی گیاهان تراریخته مقاوم به آفات از طریق استفاده از سموم باکتریایی خصوصاً سم Bt از باکتری باسیلوس تورینجسیس بدست آمده است. در ابتدا ایجاد مقاومت به حشرات با استفاده از این سم در توتون و گوجه فرنگی(۱۹۸۷) گزارش شده است.

تقریباً ۴۰ ژن مقاوم به آفات از میکروارگانیسم ها بدست آمده و به گیاهان زراعی منتقل شده‌اند. باسیلوس تورینجسیس، با فعالیت حشره کشی پروتئین‌های کریستالی به نام Bt تولید می‌کند که برای برخی از بال پولک داران، دوبالان و قاب بالان سمی است. پروتئین‌های کریستالی Bt که حین تشکیل اسپور در باکتری تولید می‌شوند، وقتی وارد معده حشرات می‌شوند، توسط پروتئازهای خاصی تجزیه شده و قطعات سمی آزاد شده از آن‌ها موجب تخریب دیواره معده حشرات می‌شود. محققان از همین فعالیت حشره کشیBt بهره گرفته و توانستند ژن کنترل کننده این پروتئین کریستالی را از باکتری جداسازی و با اندکی دستورزی آن را به گیاه منتقل نمایند. یکی از این ژن‌های جداسازی شده تحت عنوانCrylab در ذرت بیان شده و باعث ایجاد مقاومت بر علیه کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت گردیده است. علاوه بر آن، Crylab نیز در سیب زمینی و پنبه به ترتیب برای ایجاد مقاومت برعلیه سوسک کلرادوی سیب زمینی و کرم غوزه پنبه به کاربرده شده و موفقیت چشم‌گیری را ایجاد کرده است.

ژن‌های مقاوم به حشرات تنها از میکروارگانیسم به دست نیامده‌اند بلکه برخی گیاهان نیز ترکیباتی تولید می‌کنند که دارای فعالیت حشره‌کشی می‌باشند. از جمله می‌توان به بازدارنده‌های پروتئاز و بازدارنده‌های آلفا-آمیلاز و همچنین لکتین‌ها اشاره نمود.

بازدارنده‌های پروتئاز قادرند از هضم پروتئین توسط حشره جلوگیری کرده و سرعت رشد حشره را کاهش دهند. احتمالاً این پروتئین‌ها در گیاه به صورت یک محافظ طبیعی علیه آفات مضر به کار می‌روند. بازدارنده پروتئاز لوبیای چمش بلبلی اولین ژن گیاهی بوده که به طور موفقیت آمیزی در مهندسی ژنتیک مقاومت به آفات استفاده شده است. بازدارنده CPTI از اعضای خانواده بازدارنده پروتئازهای سرین با حداقل مسمومیت برای پستانداران می‌باشد و طیف وسیعی از فعالیت آفت‌کشی دارد. اولین ژن بازدارنده آلفا آمیلاز نیز ازلوبیا(*Phaseolus vulgaris*) جداسازی شده است و برعلیه آمیلازهای معده حشره عمل می‌کنند.

لکتین‌ها نیز گلیکوپروتئین‌هایی هستند که ترکیبی از پروتئین و کربوهیدرات می‌باشند و با اتصال به بخش سطحی روده حشره باعث ایجاد مسمومیت می‌شوند. لکتین‌ها عموماً فعالیت ضد شته دارند. یکی از لکتین‌های جداسازی شده از گیاهان، لکتین GNA است که از گل حسرت بدست آمده و سبب مرگ حشره نمی‌شود، بلکه قدرت باروری آن را کاهش می‌دهد. این لکتین در سیب زمینی و گوجه فرنگی بیان شده و برعلیه حشرات مکنده و نفوذ کننده عمل می‌کند.

زمانی که حشرات از مواد گیاهی تغذیه می‌کنند، این سموم تأثیر منفی خود را بر سیستم بدن حشره بر جای می‌گذارند. اما باید برای گونه‌های دیگری که از آن گیاه تغذیه می‌کنند، غیر سمی باشند. گزینه دیگر برای ایجاد مقاومت، تغییر در سیستم هضم و متابولیسم آفات می‌باشد. علاوه براین، افزایش توانایی طبیعی گیاه برای مقابله با خسارت حشرات نیز قابل توجه است. به عنوان مثال، تولید ترکیبات مومی در برگ مانع

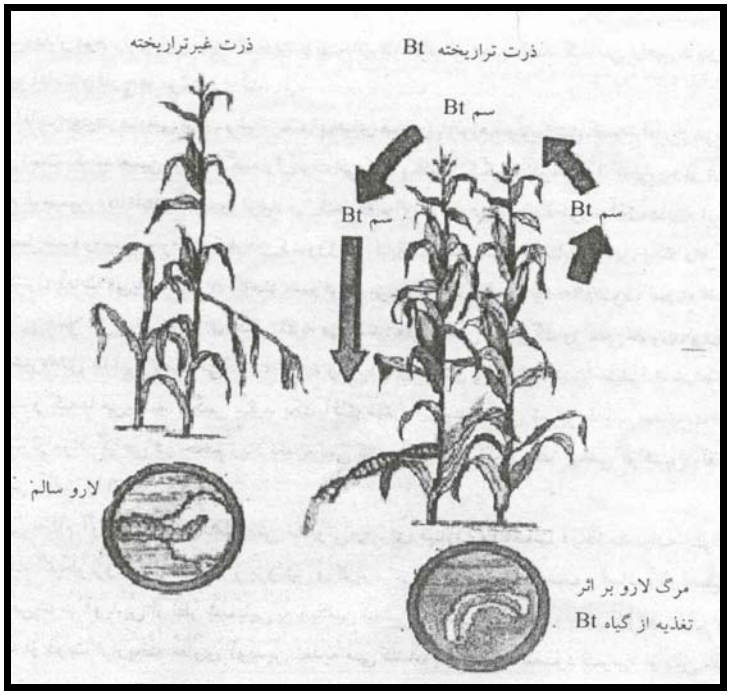
از ورود حشره شده و تغذیه آن را از گیاه مشکل می‌نماید. برخی گیاهان به صورت طبیعی پوشش‌های مومی تولید می‌کنند و تراریزش ژنتیکی به منظور افزایش تولید موم مدنظر بوده است. محققان توانسته‌اند مقدار موم را در این گیاهان تا بیش از ۱۵ برابر افزایش دهند که این راه برد در جهت افزایش مقاومت به آفات و قارچ‌ها مؤثر می‌باشد.

لارو آفات محیط مناسبی برای رشد پاتوژن‌های قارچی فراهم می‌کنند. قارچ فوزاریوم از جمله قارچ‌هایی است که به همین ترتیب گیاه را آلوده می‌کند و کیفیت گیاهان را کاهش می‌دهد. این قارچ، سمی به نام فومنسین(Fumonisin) را تولید می‌کند که برای موجودات مزرعه‌ای مهلک است. این ترکیب به کبد متصل شده و سبب سرطان کبد در کشاورزان آفریقایی شده است. بنابرین یک راه کاهش آلودگی قارچی، کنترل آفات می‌باشد. میزان کاهش فومنسین در ذرت Bt حدود ۹۰٪ بوده است. البته Bt برعلیه حشراتی عمل می‌کند که از آن گیاه تغذیه می‌کنند؛ ولی آفاتی که برگ را نمی‌خورند و به صورت نفوذی از شیره‌های غذایی تغذیه می‌کنند، نیاز به راه بردهای متفاوتی دارند. این حشرات شامل شته‌ها، مگس سفید و کنه‌ها می‌باشند. مگس سفید یک آفت مهم در سیب زمینی شیرین و پنبه محسوب می‌شود. این حشرات از مواد گیاهی در حجم زیاد تغذیه نمی‌کنند و بنابراین مقدار سم گیاهی توکسین آن قدر زیاد نیست که این آفات را از بین ببرد.

ترکیبی به نام آویدین(Avidin) روش متفاوتی را برای مبارزه با آفات در ذرت ارائه کرده است. آویدین یک گلیکوپروتئین است که از پروتئین و کربوهیدرات درست شده است و اساساً در سفیده تخم‌مرغ یافت می‌شود. آویدین از نظر شیمیایی به ویتامین بیوتین متصل شده و آن را غیرقابل دسترس می‌کند. حشراتی که از ذرت تراریخته حاوی آویدین تغذیه می‌کنند، به خاطر کمبود بیوتین از بین می‌روند. بررسی-های انجام شده روی موش نشان می‌دهد که این ترکیب برای موش سمی نیست ولی باید ارزیابی‌های بیشتری به منظور تضمین امنیت آن برای مصرف انسان صورت گیرد.

ذرت تراریخته برای تولید آویدین برای مصارف تجاری در بخش فراورده‌های صنعتی طبقه‌بندی شده است.

از بین روش‌های بیان شده، بهترین روش برای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به آفت، بیان پروتئینBt در گیاه است که تحت عنوان سم Bt شناخته می‌شود. پروتئین‌های کریستالی Bt یا دلتا - اندوتوکسین که توسط این باکتری تولید می‌شود، برای بسیاری از آفات حشره‌ای سمی است. دلتا –اندوتوکسین به صورت اختصاصی به پروتئین‌های گیرنده در روده حشره متصل می‌شود و سلول‌ها را تخریب نموده و حشره را در عرض چند روز از بین می‌برد (شکل‌های ۱۰-۷ و ۱۱-۷). چندین نوع مختلف Bt حاوی بسیاری از توکسین‌های مختلف شناسایی شده‌اند و ژن‌های آن‌ها جداسازی شده است. بیش از صد گزارش در مورد شناسایی ژن‌های Bt به ثبت رسیده است. Bt ذرت، ذرت شیرین، سویا، سیب زمینی ، کلزا و پنبه از جمله گیاهانی هستند که امروزه در ایالات متحده به صورت تجاری کشت می‌شوند و در حداقل ۱۱ کشور دیگر نیز آزاد شده‌اند.



شکل ۱۰-۷: شمایی از مرگ لارو براثر تغذیه از ذرت Bt.

شکل ۱۱-۷: پنبه غیرتراریخته (سمت راست)، پنبه تراریخته Bt، مقاوم به کرم غوزه خوار (سمت راست).

مقاومت به نماتدها

تاکنون بیش از ۱۵۰۰۰ گونه نماتد شناسایی شده است. نماتدها، کرم‌های۰/۵ میلی‌متری هستند که بر روی ریشه‌های گیاهی تغذیه می‌کنند. معمول‌ترین نوع این پارازیت‌ها که در سراسر جهان وجود دارند، نماتد گره ریشه‌ای است. هرگونه گیاهی

نظیر گیاهان زراعی، زینتی و درختان دارای حداقل یک نوع نماتد می‌باشند. میزان خسارت نماتدها به محصولات زراعی حدود ۱۰٪ تخمین زده شده است که دارای ارزشی معادل ۸۰ میلیون دلار می‌باشد. ترکیباتی به نام سیستاتین (Cystatin) در برنج و آفتابگردان شناسایی شده‌اند که برعلیه نماتدها عمل می‌کنند. انتقال این ژن‌ها به گونه-هایی نظیر موز، سویا و سیب زمینی حدود ۷۰٪ خسارت نماتدها را کاهش داده است. گزینش به کمک نشانگرها برای تولید گیاهان مقاوم به نماتد استفاده شده است. گیاهان تراریخته امکان افزایش مقاومت ژنتیکی به این آفت قدیمی گیاه را فراهم نموده و مصرف مواد شیمیایی نماتدکش را در کشاورزی کاهش می‌دهد.

مقاومت به علف کش ها

علف‌های هرز یکی از آفات زیستی گیاهان زراعی به شمار می‌روند. از جمله اثرات منفی علف‌های هرز، رقابت آن‌ها با گیاه زراعی برای نور خورشید، آب، فضا و مواد غذایی خاک است. اگر علف‌های هرز در کنار گیاه زراعی رشد نمایند، از عوامل رشدی گیاه زراعی استفاده نموده و سبب کاهش عملکرد محصولات زراعی می‌شوند؛ علاوه بر کاهش عملکرد اقتصادی، سبب خسارت‌های دیگری نیز به گیاه زراعی می‌شوند. برای مثال، علف هرز تاجریزی سیاه در سویا یا گراس‌های دیر ظهور در ذرت سبب اختلال در تجهیزات و ادوات برداشت می‌شوند. معمول‌ترین روش مدیریت علف‌های هرز استفاده از علف کش‌ها می‌باشد.

کاربرد علف‌کش در کشاورزی مدرن نقش به سزایی دارد و درصد خسارت ناشی از علف‌های هرز را در مزرعه کاهش می‌دهد. اما از طرفی کاربرد این سموم به طور بی‌رویه‌ای توسط کشاورزان در کنترل علف‌های هرز مزارع صورت گرفته و سبب آلودگی‌های زیست محیطی و آب‌های زیرزمینی شده است که به همان اندازه سلامتی انسان را نیز تهدید می‌کند.

به همین دلیل محققان به فکر تولید گیاهان مقاوم به علف کش افتادند تا به نحوی الگوی مصرف سموم علف‌کش را تغییر دهند. از طریق دستورزی‌های ژنتیکی توانسته‌اند هر دو گیاه مقاوم یا متحمل به علف‌کش و یا از بین برنده علف هرز را تولید کنند. این تکنولوژی امکان کاربرد و اسپری علف‌کش‌ها را برروی گیاهان مقاوم از مرحله ظهور تا گلدهی فراهم می‌کند و بنابراین کاربرد علف‌کش مؤثرتر است. تاکنون شش نوع گیاه مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت (Glyphosate)، آمونیوم گلوفوزینات (*Glufosinate ammonium*)، ایمیدازولینون (Imidazolinone)، سولفوفیل اوره (Sulfonylurea)، ستوکسی‌دیم (Sethoxydim) و بروموکسینیل (Bromoxynil) تولید شده‌اند. احتمالاً بهترین نوع مقاومت به علف‌کش از نظر مهندسی ژنتیک، مقاومت به گلایفوسیت می‌باشد که با نام تجاری رانداپ (Roundup) شناخته می‌شود. مقاومت به گلایفوسیت یک صفت ژنتیکی است که در سراسر جهان حائز اهمیت است. تاکنون، سویا، ذرت، پنبه، کلزا، چغندر قند و گندم به علف‌کش گلایفوسیت مقاوم گردیده‌اند. اگر چه گلایفوسیت حدود ۲۶ سال است که به عنوان یک علف‌کش استفاده شده است، ولی گیاهان مقاوم به گلایفوسیت در چند سال اخیر تولید شده و در سطح وسیعی خصوصاً در پنبه و سویا کشت می‌شوند. ذرت، سویا، برنج، چغندر قند، ذرت شیرین و کلزا به صورت ژنتیکی برای تحمل به علف‌کش آمونیوم گلوفوزینات تراریزش شده‌اند. بذور این گیاهان به صورت تجاری تحت نام Liberty Link به فروش می‌رسند. سویا، پنبه و کتان تراریخته متحمل به علف‌کش سولفونیل اوره نیز هم اکنون به صورت تجاری موجود هستند. سویا و ذرت تراریخته مقاوم به ستوکسی دیم نیز تحت نام تجاری Poast Plus، Poast و Head line برای کنترل بسیاری از گراس‌های نامطلوب تولید شده است. علف‌کش بروموکسینیل نیز با نام تجاری برای پنبه سمی است و برای کنترل پهن برگ‌ها استفاده می‌شود. بنابراین Buctris در مزارع ذرت، سورگوم و غله‌های دانه ریز استفاده می‌شود. با ایجاد

مقاومت به این علف‌کش در پنبه می‌توان از آن برای کنترل علف‌های هرز پهن برگ در مزارع پنبه استفاده کرد.

برخی معتقدند که گسترش وسیع ژن‌های مقاوم به علف‌کش منجر به افزایش نامناسب استفاده از علف‌کش در کشاورزی می‌شود. ولی هدف اصلی تولید گیاهان مقاوم به علف‌کش کاهش مصرف سموم اختصاصی و خطرساز و استفاده از سموم شیمیایی کم خطر و مناسب با محیط زیست می‌باشد. به عنوان مثال، یکی از علف‌کش‌هایی که مقاومت به آن در گیاهان مدنظر بوده، علف‌کش گلایفوسیت است. گلایفوسیت یک علف‌کش عمومی با طیف گسترده است و به منظور کنترل علف‌های هرز در شرایط مختلف کشاورزی و باغبانی برای گیاهان زراعی و زینتی به کار می‌رود. گلایفوسیت دارای اثر بازدارندگی روی EPSP است و مانع سنتز اسیدهای آمینه آروماتیک در گیاهان می‌شود. ژن‌های جهش یافته EPSP از باکتری *Salmonella typhimurium* به دست می‌آیند که با تولید بسیار زیاد EPSP نرمال موجب ایجاد مقاومت می‌شوند. علاوه براین، مقاومت به گلایفوسیت با استفاده از ژن Gox نیز حاصل شده است که علف‌کش را خنثی می‌نماید. این ژن از یک نژاد باکتری به نام آکروموباکتر *Achromobacter* جداسازی شده است. سودمندترین علف‌کش‌ها در کشاورزی آن‌هایی هستند که دارای کم‌ترین مسمومیت در پستانداران و بیشترین اثر بر روی گیاهان باشند. مسیرهای بیوسنتز اسیدهای آمینه ضروری در گیاهان مثال‌های خوبی از متابولیسم اختصاصی گیاهان هستند که اصلاً با سیستم پستانداران هم‌خوانی ندارند و هدف مناسبی برای انتخاب نوع علف‌کش و ایجاد مقاومت در آن می‌باشند.

مقاومت به تنش‌های غیرزیستی

با ورود به هزاره جدید، آینده‌نگری برای تغذیه انسان دشوار است. برای دستیابی به این امر، باید حاصل‌خیزی زمین‌هایی را که از قبل تحت کشت هستند، افزایش داده و همچنین بتوان در زمین‌هایی که به علت شوری یا کم آبی، قابل کشت نیستند،

کشاورزی کرد. تنش‌های غیرزیستی نظیر خشکی، درجه حرارت‌های بالا و پایین، سمیت شیمیایی و تنش اکسیداتیو از جمله عوامل خطرساز برای کشاورزی و کاهش عملکرد محصولات زراعی هستند و متوسط عملکرد را بین ۱۰ تا ۵۰٪ در اکثر گیاهان کاهش می‌دهند. از بین این‌ها شوری و خشکی پراکندگی بیشتری دارند. عموماً تحمل به تنش به کمک خانواده‌ای از ژن‌ها و نه به کمک یک ژن منفرد ایجاد می‌شود. تولید گیاهان تراریخته همراه با عملکرد مطلوب در برابر این تنش‌ها به دلیل پیچیدگی‌های ژنتیکی فرایندهای درگیر مشکل‌تر است و به ندرت انتظار می‌رود که تنها یک ژن موجب بالا رفتن میزان رشد گیاه در پاسخ به این تنش‌ها شود. موارد استثنایی نظیر ژن‌های مسئول تنظیم اسمزی در تنش‌های آبی یا ژن‌هایی که موجب تشکیل کمپلکس با آلودگی‌های فلزات سنگین خاک را می‌دهند، وجود دارد. بنابر این تولید گیاهان مقاوم به تنش‌های غیرزیستی یکی از راه‌های مقابله با هر یک از تنش‌های محیطی است که در این زمینه مهندسی ژنتیک کمک شایانی نموده است.

تنش‌هایی نظیرخشکی، سرما، شرایط قلیایی وشوری پیامدهای مشترکی دارند، یعنی تنش کمبود آب سلولی و یا تنش اسمزی هستند. گیاهان در پاسخ به کمبود آب ترکیباتی با وزن مولکولی کم و با نام حفاظت کننده‌های اسمزی، تولید می‌کنند. این ترکیبات پتانسیل اسمزی درون سلول‌ها را کاهش داده و به حفظ تورژسانس سلولی کمک می‌نمایند. این محلول‌های سازگار شامل کربوهیدرات‌ها، پلیول (قندها و الکل-ها)، اسیدهای آمینه (پرولین) و ترکیبات آمونیوم چهارگانه نظیر گلایسین بتائین می‌باشند که چندین ژن گیاهی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز این اسمولیت‌ها نظیر پرولین، گلایسین بتائین و قند ا جداسازی و به درون سلول‌های گیاهی کلون شده‌اند.

ژن‌هایی که در پاسخ به سرما بیان می‌شوند، تحت نام ژن‌های تنظیمی سرما شناخته می‌شوند و سبب افزایش تحمل به سرما و یخزدگی می‌گردند. افزایش بیان این ژن‌ها در

آرابیدوپسیس سبب افزایش مقدار پرولین و سایر قندهای محلول برای افزایش تحمل به یخزدگی و حفاظت گیاه در مقابل تنش می‌شود. در این شرایط میزان آب سلولی در سطح بالایی حفظ می‌شود. در نتیجه محققان توجه خاصی به مولکول‌های حفاظت کننده اسمزی داشته‌اند. افزایش میزان تولید قندهای حفاظت کننده در گیاهان سبب افزایش تحمل به تنش‌های خشکی نیز شده است. برای مثال مانیتول(نوعی قند الکل) را در آرابیدوپسیس و توتون تولید کرده‌اند که باعث افزایش تحمل به شوری در این گیاهان شده است.

راه‌بردهای دیگری نیز برای افزایش تحمل به تنش به کار گرفته شده‌اند. افزایش تحمل به سرما و جوانه زدن نرمال تحت شرایط شوری در آرابیدوپسیس که با آنزیم کولین اکسیداز مهندسی شده است، گزارش شده است. برنج تراریخته‌ای نیز تولید شده که نوعی پروتئین شبیه LEA ازجو در آن بیان شده است و نسبت به شاهد از مقاومت بیشتری در شوری و خشکی برخوردار بوده است. برنج تراریخته دیگری که در آن بیان آنزیم گلوتامین سنتتاز افزایش یافته، دارای ظرفیت تنفس نوری (بخشی از فرایند فتوسنتز) بیشتری بوده و نسبت به شوری تحمل بالایی داشته است.

کاربرد مهندسی ژنتیک برای افزایش عملکرد و بهبود راندمان گیاهی

بهبود عملکرد گیاهی و مدیریت خاک و نهاده‌های کشاورزی از اهداف دیگر بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک گیاهان است. این روش‌ها شامل ایجاد مقاومت به علف‌کش‌ها، مصرف بهینه نیتروژن، تنظیم هورمون‌های گیاهی و تلاش برای افزایش عملکرد می‌باشند.

افزایش عملکرد: اغلب عملکرد بیشتر با بیوماس بیشتر، تعداد غده بیشتر، بذور بزرگتر و صفات دیگر مرتبط است که هریک نتیجه‌ای از تغییرات ژنتیکی در گیاه می‌باشد. به عبارتی با تغییر برخی صفات زراعی می‌توان به افزایش عملکرد کمک نمود؛ برای مثال، سیب زمینی تراریخته‌ای که پروتئین بیشتری تولید می‌کند، دارای غده-

های بزرگتری نیز خواهند بود که سبب افزایش عملکرد می‌شود. برخی از راه بردها نیز به صورت مستقیم بر روی مسیرهای متابولیکی نظیر فتوسنتز متمرکز شده‌اند تا از این طریق میزان عملکرد را افزایش دهند. نمونه دیگری از افزایش عملکرد در برنج تراریخته‌ای بدست آمده است که حضور یک ژن آنتی سنس مانع بیان پروتئین‌های خاصی می‌شود که در تنظیم پر شدن دانه دخالت دارند. بنابر این دوره پر شدن دانه را در گیاه طولانی می‌نمانید. این برنج میزان عملکرد را تا ۴۰٪ افزایش می‌دهد و در حال حاضر در ابتدای مراحل ارزیابی مزرعه‌ای است.

مصرف بهینه نیتروژن: کاربردهای بیوتکنولوژی برای افزایش صفات زراعی نظیر اندازه، عملکرد، میزان شاخه‌دهی، اندازه دانه و تعداد آن بسیار محدودتر از سایر کاربردهای بیوتکنولوژی بوده است. کاربرد بیش از حد کودهای کشاورزی به منظور افزایش عملکرد و بهبود صفات گیاهی از معضلات بخش کشاورزی و محیط زیست است. از طرفی بر سلامت انسان‌ها نیز تأثیر به سزایی دارد . به هیمن دلیل محققان در نظر دارند تا از واریته‌هایی استفاده کنند که نیاز کودی کمتری داشته و با حداقل مصرف کود بیشترین بازده را به همراه داشته باشند. در همین راستا ژنی را از جلبک *Chlorella sorkiniana* جداسازی کرده‌اند که سنتز کننده آنزیمی به نام گلوتامات دهیدروژناز است و راندمان ورود نیتروژن را به درون پروتئین‌های گیاهی افزایش می‌دهد. در برخی گیاهان، این آنزیم راندمان مصرف نیتروژن را بالا می‌برد؛ بنابر این کود ازته کمتری برای رشد این گیاهان مصرف می‌شود. زمانی که این ژن به گندم وارد گردید، موجب تولید بیوماس بیشتر، افزایش سرعت رشد و وزن دانه بالاتری گردید و تعداد سنبله‌ها در گیاه را افزایش داد.

تنظیم هورمون‌های گیاهی: پنج گروه از هورمون‌های گیاهی تحت عنوان اکسین، سیتوکینین، جیبرلین، اسید آبسیسیک و اتیلن در گیاهان شناسایی شده‌اند. هورمون‌های گیاهی نیز یکی دیگر از کاندیداهای دستورزی‌های ژنتیکی بوده‌اند تا رشد و نمو

گیاهی، تشکیل میوه و رسیدگی، طویل شدن ساقه، توسعه برگ، جوانه زدن، خواب و تحمل شرایط نامطلوب را تحت تأثیر قرار دهند. این گروه‌های هورمونی به شدت با یکدیگر اثر متقابل دارند و غلظت یکی بر دیگری تأثیر دارد. برای مثال نسبت هورمون اسید آبسیسیک به جیبرلین یکی از عوامل کلیدی در القای خواب و یا جوانه زدن بذور می‌باشد.

اخیراً آنزیمی در مسیر تولید هورمون اکسین شناسایی شده است که محققان در حال دستورزی تولید اکسین از طریق این آنزیم می‌باشند. زمانی که اکسین بیشتر از حد معمول تولید شود، شاخه‌دهی ممانعت می‌شود و برگ‌ها دچار پیچش می‌شوند. در این شرایط میزان نور دریافتی کاهش می‌یابد. به همین دلیل کاهش بیان این آنزیم به ممانعت از بروز این اثرات نامطلوب کمک می‌کند.

هورمون اسید آبسیسیک در گندم، میزان جوانه‌زنی را کاهش داده و تحمل به تنش خشکی و سرما را افزایش می‌دهد. افزایش تولید اسید آبسیسیک، جوانه‌زنی را به تأخیر انداخته و یک صفت مفید در اقلیم‌هایی است که باران بهاری به صورت پراکنده و یا همراه با تأخیر آغاز می‌شود. تولید اسید آبسیسیک در پاسخ به تنش‌های محیطی نیز افزایش می‌یابد و یک خانواده از آنزیم‌ها به نام پروتئین کینازها میزان تولید آن را تحریک می‌کنند. دستورزی این مسیرهای آنزیمی نیز یکی از اهداف تحقیقاتی در گیاهان مناطقی است که تنش‌های محیطی مواجه هستند. انتخاب واریته‌های گیاهی با اسید آبسیسیک بالا یا گیاهان مهندسی شده برای تولید مقدار بیشتر این هورمون سبب افزاش تحمل به سرما و خشکی شده است. واریته‌های پا کوتاه و با عملکرد بالا در گندم عامل ایجاد انقلاب سبز در دهه ۱۹۶۰تا ۱۹۷۰ بودند و عملکرد گندم را تا دو برابر افزایش دادند. این واریته‌ها مقاومت بیشتری نسبت به ورس داشته و علت اصلی این پاکوتاهی ناشی از کاهش پاسخ این گیاه به هورمون جیبرلین بوده است. محققان علوم گیاهی نشان داده‌اند که ژنRht باعث پاکوتاهی در بسیاری از گیاهان شده و عملکرد

آنها را افزایش می‌دهد. این راه برد برای بسیاری از گیاهان دیگر نیز از طریق مهندسی ژنتیک قابل استفاده است.

اتیلن یک هورمون گیاهی است که در رسیدن میوه‌ها و سبزی‌ها مؤثر است. کنترل مقدار و زمان تولید اتیلن باعث شروع و تأخیر در رسیدگی می‌شود. تغییر مقدار و زمان تولید اتیلن از له شدن میوه جلوگیری کرده و مدت زمان برداشت تا عرضه به بازار و ماندگاری آنها را افزایش می‌دهد. به همین منظور دستورزی‌های ژنتیکی با هدف تنظیم آنزیمی که پیش ساز تولید اتیلن را می‌شکند، انجام گرفته است. با تنظیم زمان و میزان تجزیه این پیش ساز، زمان رسیدگی قابل کنترل است. این تکنولوژی در گوجه فرنگی، تمشک، هندوانه، توت فرنگی، گل کلم و کلم بروکلی به کاربرده شده است.

کاربرد مهندسی ژنتیک برای افزایش کیفیت

کاربرد مهندسی ژنتیک برای تغییر صفات کیفی گیاهان به منظور افزایش کیفیت تغذیه‌ای، تغییر مواد حساسیت‌زا و ویژگی‌های مرتبط با سلیقه مصرف کنندگان قابل توجه است. با شروع مهندسی ژنتیک، گیاهانی با ارزش غذایی تغییر یافته تولید شده و فرآورده‌های با ارزشی تولید نموده‌اند. اگر چه هنوز تعداد کمی از آن‌ها به مرحله تجاری رسیده‌اند ولی میزان پیشرفت در این بخش قابل توجه است. برای مثال برنج تراریخته‌ای تولید شده که میزان آهن و بتاکاروتن (پیش ساز ویتامین A) در آن بیشتر است و پتانسیل مناسبی برای تغذیه مردم در کشورهای در حال توسعه دارد و می‌تواند مشکلات تغذیه‌ای این کشورها را مرتفع نماید.

برنج حاوی مقادیر بالای آهن و بتاکاروتن، افزایش ویتامین E در روغن‌های نباتی، تغییر ترکیب اسید چرب در روغن‌های سویا و کلزا از جمله این تغییرات کیفی می‌باشند. افزایش ترکیبات تغذیه‌ای که در افزایش سلامتی و جلوگیری از بیماری‌ها حائز اهمیت هستند، نیز مد نظر مهندسی ژنتیک است. برای مثال به افزایش میزان ایزوفلاون ها در سویا و لیکوپن در گوجه فرنگی می‌توان اشاره نمود.

دو راه برد برای افزایش آهن در غلات از طریق مهندسی ژنتیک دنبال شده است. یکی از آن‌ها انتقال ژن کد کننده فریتین(یک پروتئین ذخیره‌ای آهن) به غلات می‌باشد. افزایش بیان این ژن، ظرفیت ذخیره‌ای آهن را در گیاهان تا سه برابر افزایش می‌دهد. با استفاده از همین راه برد توانسته‌اند برنجی تولید کنند که بتا کاروتن(پیش ساز ویتامین A) بیشتری در خود تولید می‌نماید و تحت عنوان برنج طلایی معروف شده است.

روش دیگر برای افزایش میزان آهن، کاهش مقدار اسید فیتیک است که باعث جذب آهن و مواد معدنی دیگر شده و آن‌ها را از دسترس خارج می‌کند. در یک آزمایش، ذرت تراریخته‌ای به دست آمده که مقدار اسید فیتیک آن پایین است و برای تهیه نان ذرت مکزیکی استفاده شده است. بررسی‌های علمی نشان داد که میزان جذب آهن بر اثر تغذیه از این نان حدود ۴۹٪ بیشتر از نانی است که توسط ذرت معمولی تولید می‌شود. در حالی که گیاهان اولین منبع غذایی برای ویتامین E هستند، ولی حاوی مقادیر نسبتاً کمی از این ویتامین می‌باشند. در سال‌های اخیر فناوری مهندسی ژنتیک برای افزایش مقدار ویتامین E در روغن‌های نباتی به کاربرده شده است. در این شرایط بیشتر بذور دارای مقادیر بالای گاماتوکوفرول و ۲۰ برابر بیشتر از بذور طبیعی خواهند بود. این ماده پیش ساز آلفا توکوفرول است که فرم فعال ویتامین E می‌باشد. ولی مقادیر کمی از فرم گاما به فرم فعال ویتامین تبدیل می‌شود. محققان ژن مسئول بیان آنزیمی که گاماتوکوفرول را به آلفا توکوفرول تبدیل می‌کند ،شناسایی و کلون نموده‌اند. این ژن به آرابیدوپسیس منتقل شده است. دانه‌های روغنی نظیر خردل و کلزا نیز مهندسی شده‌اند تا حاوی بتاکاروتن بوده و ارزش غذایی بیشتری داشته باشند، اما هنوز این پروژه در مراحل آزمایش می‌باشد.

پروتئین‌ها نیز نقش مهمی در تکمیل تغذیه انسان ایفا می‌کنند و در رشد و سلامتی انسان بسیار مؤثر هستند. در مناطقی که غلات کشت و کار نمی‌شوند، بیشتر مردم برای

تأمین پروتئین مورد نیاز خود به سبزی‌های نشاسته‌ای نظیر ریشه‌ها، غده‌ها و ریزوم‌ها وابسته هستند تا کالری مورد نیاز خود را تأمین نمایند. این گیاهان معمولاً عملکردهای بالایی دارند ولی میزان پروتئین این گیاهان بسیار کمتر از آن چیزی است که هر فرد به آن نیاز دارد. بهبود مقدار و کیفیت پروتئین در گونه‌های گیاهی مورد مصرف انسان‌ها از طریق تغییر در ترکیب اسیدهای آمینه امکان پذیر است. برای مثال، یک ژن تولید آلبومین دانه به درون سیب زمینی وارد شده تا مقدار پروتئین آن را افزایش دهد. غده‌های تراریخته حدود ۳۵ تا۴۵٪ پروتئین بیشتری داشته و مقدار اسیدهای آمینه ضروری در آن افزایش یافته است. علاوه براین، گیاهان تراریخته غده‌های بیشتر و عملکرد بیشتری داشته‌اند.

در زمینه تلاش برای تولید روغن‌های سالم‌تر، ترکیب اسیدهای چرب سویا و کلزا به چندین روش تغییر یافته است. روغن‌هایی از سویا و کلزا تولید شده‌اند که میزان اسیدهای چرب اشباع آن‌ها به حداقل و یا صفر رسیده است. در کلزا تغییراتی نظیر تولید اسیدهای چرب با زنجیره های متوسط، افزایش اسیداستئاریک و عاری از اسیدهای چرب ترانس صورت گرفته است. روغن سویا نیز به گونه‌ای تغییر یافته که حاوی ۸۰٪ اسید اولئیک بیشتری است و اسید چرب اشباع کمتری (یک سوم) نسبت به روغن زیتون دارد و اسیدهای چرب ترانس نیز ندارد. روغن سویا با اسیدهای چرب اشباع کمتر(۷٪ در مقایسه با ۱۴٪ در روغن سویا) و اسید لینولئیک بیشتر و بدون اسیدهای چرب ترانس نیز تولید شده است که پایداری آن را برای استفاده به عنوان یک جزء غذایی افزایش می‌دهد. علاوه براین، محققان روغن آفتابگردانی با مقدار اسید اولئیک بالا نیز تولید نموده‌اند.

بیوتکنولوژی در جهت افزایش منابع تغذیه‌ای گیاهی نیز عمل نموده و توانسته برای بهبود سلامتی یا ممانعت از بیماری‌های انسانی گام‌های مؤثری بردارد. برای مثال، تحقیق جدیدی نشان داده که لوتئین (Lutein)سبب حفاظت در مقابل بیماری‌های

چشمی می‌شود و لیکوپن نیز به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی در ممانعت از سرطان نقش دارد. برهمین اساس محققان توانسته‌اند در آزمایشگاه، گوجه فرنگی تولید کنند که میزان لیکوپن آن ۲/۵ برابر بیشتر از لیکوپن در گوجه‌های معمول است. علاوه براین، سویایی تولید شده که ایزوفلاون بیشتری در ترکیب خود دارد. ایزوفلاون از اهمیت دارویی خاصی برخور دارند. علاوه بر این، تولید کلزایی با آنتی اکسیدان بتاکاروتن، لوتئین و لیکوپن بیشتری نیز مدنظر محققان این علم بوده است.

البته محدودیت‌هایی نیز در این زمینه وجود دارد؛ برای مثال، برخی مواد غذایی گیاهی مطلوب ممکن است اثرات مضری نیز داشته باشند. علاوه براین، محققان به طور کامل مسیرهای بیوسنتزی و فعالیت‌های آنزیمی آن‌ها را کشف نکرده‌اند. محدودیت دیگر، کمبود اطلاعات درباره امنیت و فواید بالقوه مواد غذایی گیاهی می‌باشد.

برخی گیاهان خصوصاً غلات و حبوبات دارای ارزش غذایی می‌باشند اما برخی از آن‌ها حاوی موادی هستند که با جذب مواد غذایی و هضم آن‌ها تداخل ایجاد می‌کنند و گاهی سمی نیز هستند. دستورزی ژنتیکی برای کاهش این مواد ضد تغذیه‌ای نظیر فیتات(اسید فیتیک) در غلات و حبوبات، گلیکوآلکالوئیدها نظیر سولانین و چاکونین در سیب زمینی، توماتین، سولانین، لکتین و اگزالات در گوجه فرنگی و گیاهان دانه‌ای، گوسیپول در پنبه دانه، تریپسین و سایر بازدارنده‌های پروتئاز در سویا و تانین و رافینوز در حبوبات مدنظر می‌باشد.

فیتات در غلات و حبوبات به مقدار زیادی یافت می‌شود و میزان جذب آهن، روی، فسفر و سایر مواد معدنی را در انسان و حیوانات کاهش می‌دهد. فیتات برای خوک و مرغ غیر قابل هضم است؛ وجود آنزیم فیتاز سبب آزاد شدن فسفر از فیتات می‌شود. برهمین اساس، مطالعات نشان داده که فیتاز در وعده‌های غذایی جذب فسفر را بهبود می‌بخشد و میزان دفع فسفر کاهش می‌یابد.

ذرت تراریخته‌ای با فیتات پایین تولید شده که فسفر قابل دسترس آن حدود ۵ برابر بیشتر از ذرت غیر تراریخته‌ای است. در گندم نیز مهندسی ژنتیک برای افزایش بیان آنزیم فیتاز سبب شده که بذور آن حدود ۲ تا ۴ برابر فعالیت فیتازی بیشتری داشته باشند. بنابراین، امکان بهبود قابلیت هضم گندم خصوصاً در بین حیوانات وجود دارد.

دانشمندان به دنبال راه‌هایی هستند که مواد سمی نظیر گلیکوآلکالوئیدها را نیز کاهش دهند. به همین منظور ژن‌های آنتی سنس را به گیاه سیب زمینی منتقل کرده‌اند تا فعالیت آنزیم UDP - گلوکز کوزیل ترانسفراز را که یک آنزیم کلیدی در تولید گلیکوآلکالوئید آلفا چاکونین است، ممانعت نمایند. این ماده سمی می‌تواند سبب ایجاد سوء هاضمه یا اختلالات سیستم عصبی شود. یافته‌های اولیه نشان داده است که سیب زمینی تراریخته مورد نظر، میزان گلیکوآلکالوئید کمتری تولید نموده است.

برخی مردم حساسیت فوق‌العاده زیادی به مواد خاصی نظیر گرده، غذا و یا میکروارگانیسم‌ها دارند. این مواد به عنوان آلرژن در گیاهان مصرفی و غیر مصرفی وجود دارند. تقریباً یک نفر در هر پنج نفر از یکی از حساسیت‌ها، تنگی نفس و یا هر دوی آنها رنج می‌برد. مواد حساسیت زای غذایی نیز سبب ایجاد نشانه‌هایی از بیماری می‌شوند. بررسی‌ها نشان داده که ۲٪ بزرگسالان و ۲ تا ۸٪ کودکان به غذاهای خاصی حساسیت دارند. حساسیت غذایی یک مشکل معمول‌تر از آلرژی است. برخلاف آلرژی‌ها، حساسیت غذایی با سن افزایش می‌یابد. شیر، تخم مرغ، فندق، سویا، ماهی، گردو و گندم، هفت نوع از مواد غذایی حساسیت‌زا هستند. گیاهان غیرتغذیه‌ای نظیر چاودار و گیاهانی که گرده‌های خود را در هوا پخش می‌کنند نیز سبب ایجاد آلرژی می‌شوند. بیشتر مواد غذایی حساسیت‌زا انواعی از پروتئین‌ها هستند که امکان تغییر ساختار و یا حذف این پروتئین‌ها وجود دارد. اصلاح نباتات کلاسیک توانسته گونه‌هایی با حساسیت‌زایی کمتر تولید نماید که برای دستورزی‌های ژنتیکی مناسب‌تر می‌باشند. خنثی نمودن مواد حساسیت‌زا در غذاهای دانه‌ای اصلی، تأثیر به سزایی در

مصرف این دانه‌ها برای میلیون‌ها انسانی که نمی‌توانند از آن‌ها تغذیه کنند، برجای می‌گذارد.

گندم تراریخته‌ای تولید شده که در آن بیان ژن سنتز کننده تیوردوکسین (آنزیمی که باعث کاهش پیوندهای دی سولفید درون مولکول‌های پروتئینی می‌شود) افزایش یافته است و خصوصیات آلرژی‌زایی پروتئین‌های را کاهش داده است. محققان علاوه براین، به دنبال بررسی پتانسیل تکنولوژیDNA نوترکیب برای کاهش آلرژی‌زایی آلرژن‌های غیر غذایی نیز بوده‌اند. در همین راستا میزان پروتئین LOSP5 دردانه گرده چاودار کاهش یافته است تا میزان آلرژی‌زایی گرده کاهش یابد. اگر چه مهندسی ژنتیک، پتانسیل مناسبی برای کاهش آلرژی‌زایی غذاها دارد ولی احتمال وارد نمودن آلرژن‌های جدید به محصولات نیز وجود دارد. البته تعیین و ارزیابی آلرژی‌زایی محصولات تراریخته یکی از فعالیت‌های در حال انجام است.

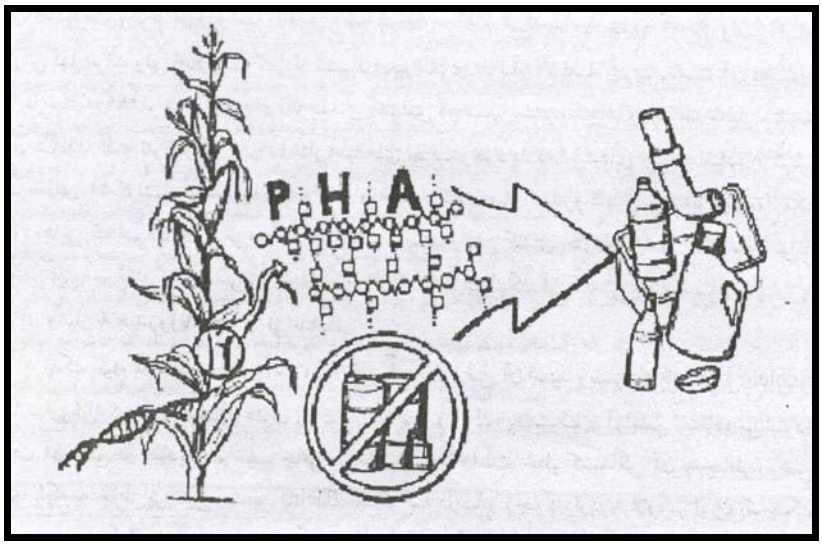
کاربرد مهندسی ژنتیک برای تولید فراورده‌های تجاری و صنعتی

فراورده‌های نفتی در بسیاری از موارد جایگزین خوبی برای محصولات بدست آمده از گیاهان می‌باشند، اما هنوز محصولات گیاهی دارای مقبولیت خاصی هستند. از جمله فراورده‌های گیاهی می‌توان به پنبه، ابریشم، پشم، روغن کتان، چوب پنبه، چوب و کاغذ اشاره نمود. تلاش‌های انجام گرفته برای تغییر خصوصیات مواد گیاهی با استفاده از روش‌های کلاسیک با محدودیت‌هایی مواجه بوده است. بنابراین بیوتکنولوژی روش جدیدی برای تغییر این مواد جهت مصارف صنعتی ارائه داده است. کاربردهای تجاری گیاهان تراریخته که هم اکنون در حال توسعه است شامل پروتئین‌های تشخیصی برای اهداف صنعتی و دارویی، اسیدهای چرب و روغن‌های تغییر یافته برای بیماران و صنایع تولیدی، بیوپلی‌مرهای تجزیه‌پذیر به عنوان جایگزین پلاستیک و مواد خاص نظیر رنگ دانه‌ها و طعم دهنده‌ها می‌باشد.

پروتئین‌ها: تولید پروتئین‌های صنعتی از طریق گیاهان با بازار خوبی مواجه است. یک دسته از این پروتئین‌ها، آنزیم‌ها می‌باشند که در طیف وسیعی به عنوان پاک کننده ، تولید خمیر کاغذ و افزودنی‌های غذایی استفاده می‌شوند. به عنوان مثال، آنزیم سلولاز باکتریایی در آرابیدوپسیس در آزمایشگاه تولید شده است. این آنزیم در تولید الکل برای تخریب دیواره سلولی استفاده می‌شود. از آن جایی که این آنزیم به دمای بالایی برای فعالیت خود نیاز دارد، بنابر این در گیاهان تراریخته به صورت غیرفعال است و تا زمانی که از گیاه استخراج نشود، غیر فعال باقی می‌ماند. آنزیم دیگر زایلناز(Xylanase) قارچی است که در کلزای تراریخته تولید شده است، اما میزان تولید آن به حدی پایین است که برای تولید تجاری مناسب نیست.

اولین فراورده‌های تجاری که در گیاهان تراریخته تولید شده‌اند شامل آویدین و بتا گلوکورونیداز است که در ذرت تراریخته تولید شده است. همان‌گونه که در ابتدا توضیح داده شد، آویدین یک گلیکوپروتئین است که در سفیده تخم مرغ یافت می‌شود. ذرت تراریخته می‌تواند آویدین را در مقدار بالا تولید نماید. این ترکیب دارای کاربرد پزشکی است و از آن در کیت‌های تشخیصی بیوشیمیایی استفاده می‌شود و مقدار آن خیلی بیشتر از آن چیزی است که در تخم مرغ تولید می‌شود. از بتاگلوکورونیداز نیز به عنوان یک پروتئین در تشخیص‌های بیوشیمیایی استفاده می‌شود.
پلاستیک های زیستی: امروزه مواد شیمیایی نفتی در صنایع تولید پلیمر و پلاستیک به کار برده می‌شوند. دانشمندان و محققان تلاش‌های بسیاری انجام داده‌اند تا منابع قابل تجدید این ترکیبات را که اثر مضر کمتری بر محیط زیست داشته باشند، ایجاد کنند. تا اینکه اخیراً یک پلاستیک مشتق از گیاه به نام پلی هیدروکسی آلکانوات (PHA) مستقیماً در گیاهان تولید شده است(شکل ۱۲-۷). در سال ۱۹۹۲، محققان ژن‌های لازم برای تولید پلاستیک را استخراج نموده و آن‌ها را به آرابیدوپسیس منتقل نمودند و اولین پلی‌مر گیاهی را تولید کردند. این تکنولوژی در ذرت نیز به کار برده شد تا این

فرآورده تنها در برگ و ساقه بیان شود و منابع غذایی دانـه عـاری از آن باشـند. البتـه در تنظیم این تکنولوژی نیز مشکلاتی وجود داشت، بـه عنـوان مثـال سـنتز ایـن فـراورده در کلروپلاست بهتر از مکـان‌هـای دیگـر درون سـلول اسـت (مکـان فتوسـنتز). ممانعـت از فتوسنتز که موتور اصلی متابولیسم گیاهی است، سبب به تأخیر انداختن رشـد و کـاهش عملکرد می‌شود. در نتیجـه خـالص نمـودن ایـن ترکیـب نیـاز بـه هزینـه بـالایی از مـواد شیمیایی و انرژی دارد. تا کنون هزینه انرژی تولید پلاستیک‌های زیـستی در ذرت بـیش از ۳۰۰ برابر تولید پلاستیک بر مبنای سوخت فسیلی است. در عین حال کمپانی مونسانتو اولین کمپانی تجاری است که تولید این پلاستیک زیستی (PHA) را آغاز کرده است.



شکل ۱۲-۷: تولید PHA (پلی هیدروکسی آلکانوات) در ذرت

پتانسیل دیگر پلیمرهـای گیـاهی خـصوصاً بـرای تهیـه فیبرهـا بررسـی شـده اسـت. باکتری‌ها نیز مهندسی شده‌اند تا پلی‌مرهایی تولید نماینـد کـه مـشابه بـا فیبرهـای ابریـشم طبیعی، الاستین، کلاژن و کراتین باشد. با توسعه این تکنولوژی، امکان مهندسی گیاهان

برای تولید پلیمرهای منحصر به فرد مشابه با فیبرهای طبیعی وجود دارد، با این وجود هنوز میزان تولید پایین است.

اسیدهای چرب و روغن‌ها: همان طوری که در بخش بهبود ارزش غذایی اشاره شد، امکان تغییر ترکیب اسیدهای چرب و مقدار روغن گیاهان وجود دارد. بر همین اساس اسیدهای چرب جدید و با ارزش تجاری در گیاهان تولید شده است. این اسیدهای چرب در تغذیه مفید هستند و یا به عنوان پیش‌سازی برای سنتز بیشتر ترکیبات پیچیده نظیر نایلون استفاده می‌شوند. محققان با استفاده از بیوتکنولوژی توانسته‌اند، مقدار اسیدهای چرب روغن‌های گیاهی خوراکی را تغییر دهند و این تغییرات به سمت تغییر لینولئیک برای سلامتی ضروری هستند، در حالی که برخی نظیر اسید اروسیک در کلزا سمی می‌باشند. غلظت یک اسید چرب در روغن‌های گیاهی وابسته به اسیدهای چرب و لیپیدهای دیگر است و معمولاً با مقادیر قابل توجهی پروتئین در بذور ذخیره می‌شوند. بنابر این راندمان تولید با محدودیت‌هایی مواجه است. در آینده انتظار می‌رود بتوان روغنی را در گیاهان تولید نمود که مستقل از کیفیت و پروتئین دانه باشد. کاربرد صنعتی این روش اساساً بر روی راه‌اندازی سیستم‌هایی است که از طریق آن بتوان محتوای کل اسیدهای چرب و نوع آن‌ها را تغییر داد. اگر چه محققان ترکیب اسید چرب حدود ۸۰۰۰ روغن گیاهی را گزارش نموده‌اند ولی اطلاعات کمی از مسیرهای بیوسنتزی تقریباً ۵۰۰ اسید چرب به دست آورده‌اند.

درسال ۱۹۹۰ برخی از ژن‌های آنزیم‌های کلیدی در مسیر سنتز (اسید های چرب ساده ۸ کربنی تا زنجیره‌های ۲۴ کربنی با پیوندهای دوگانه و حاوی گروه‌های هیدروکسیل و سایر اجزاء) یکی از فراورده‌هایی که هم اکنون به مرحله تجاری رسیده است، روغن کلزای حاوی اسید لوریک بالا می‌باشد. علاوه بر این، محققان روغن سویایی تولید نموده‌اند که اسید لینولنیک آن کاهش یافته است تا پایداری آن بالا رفته و نیاز به هیدروژناسیون جزئی ندارد.

کرچک گیاه منحصر به فردی است که تقریباً ۹۰٪ روغن آن اسید ریسینولئیک(Ricinoleic acid) می‌باشد. روغن کرچک اغلب به عنوان روان ساز در صنایع رنگ، پلاستیک و آرایشی استفاده می‌شود؛ اما مصرف آن حتی در مقادیر کم سبب چاقی می‌شود و کشنده است. خطر کشندگی آن به خاطر روغن آن نیست، بلکه به خاطر پروتئین ریسین (Ricin) است که در بذور وجود دارد. علاوه براین، کرچک در بسیاری از افراد آلرژی‌زا است، خصوصاً برای آن‌هایی که با آن سر و کار دارند. بنابر این کاشت تجاری کرچک در اکثر نواحی محدود شده است. به همین منظور در زیست فناوری از تکنولوژی آنتی سنس برای جلوگیری از تولید پروتئین ریسین استفاده شده است و خاصیت آلرژی‌زایی و سمی آن را کاهش داده است. کاربرد دیگر مهندسی ژنتیک در کرچک برای تولید روغن اپوکسی می‌باشد. روغن اپوکسی از لحاظ ساختاری مشابه با اسید ریسینولئیک است و تنها یک تغییر کوچک برای تحریک تولید آن لازم است. بازار روغن اپوکسی در جهان تقریباً ۳۰۰ میلیون دلار تخمین زده شده است.

گیاه مطلوب دیگر در مهندسی ژنتیک، گیاه جوجوبا(Jojoba) است. جوجوبا یک گیاه بیابانی است که ابتدا در جنوب شرقی آمریکا، آرژانتین و فلسطین اشغالی پرورش داده شده است و حاوی مقادیر بالایی از استرهای مومی است. روغن جوجوبا در صنایع آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود. موم جوجوبا به شدت پایدار است و در دمای بالا فاسد و یا تجزیه نمی‌شود. بذور جوجوبا حدود ۴۴ تا ۵۶٪ موم دارد. روغن لازم برای تولید روغن را از جوجوبا جداسازی و کلون کرده و به آرابیدوپسیس انتقال داده‌اند. این گیاهان تراریخته بذوری تولید نمودند که ۴۹ تا ۷۰٪ روغن آن‌ها به صورت موم است.

۷-۸) کاربرد بیوتکنولوژی برای تولید فراورده‌های دارویی و واکسن‌های خوراکی

هم اکنون علم داروسازی بـه دنبـال تولیـد مـواد دارویـی مـؤثر و فـراوان در منـابع گیاهی است که به راحتی مانع بیمـاری شـوند. یکـی از ایـن زمینـه‌هـا کـاربرد مهندسـی ژنتیک برای تولید فراورده‌های دارویی نظیر واکسن‌ها، آنتی بادی‌های تولیـدی در گیـاه و پروتئین‌های انسانی می‌باشد.

تولید واکسن‌ها یکی از بزرگترین یافته‌های داروسازی مدرن است. تهیه واکسن به روش کلاسیک شامل تلقیح پاتوژن ضعیف شده یا کشته شده بیماری یا بخشی از آن بـه موجودات است. پاتوژن در سیستم ایمنی به عنوان یک آنتی ژن خارجی عمل می‌کند و فعال سازی سیستم ایمنی سبب تولید ترکیبات آنتی بادی بر علیه آنتی ژن می‌شود. یکی از پتانسیل‌های کاربرد بیوتکنولوژی در تولید واکسن‌هـا و داروهـا در گیاهـان تراریختـه می‌باشد؛ برخی معتقدند که واکسن‌های خوراکی نسبت به روش کلاسیک دارای مزیت می‌باشند؛ زیـرا نیـاز بـه خـالص سـازی ندارنـد و مـشکلات مربـوط بـه تزریـق را مرتفـع می‌نمایند. محققان در حال تولید واکسن‌هایی هستند که از گیاهان استخراج مـی‌شـوند و مانع بیماری‌های انسانی و حیوانی می‌شوند. تحقیقات نشان داده که گیاهان مهندسی شده می‌توانند آنتی ژن‌هایی بیان کنند که قادر به تحریک سیستم ایمنی بدن می‌باشند. عـلاوه بر این، آنتی ژن‌های گیاهی پاسخ مناسب‌تری در میزبان تولید می‌کنند. از برخی گیاهـان نظیر ذرت، اسفناج، توتون، کاهو، گوجه، باقلا و سیب زمینی بـرای تولیـد واکـسن‌هـای گیاهی استفاده شده است.

اولین یافته‌ها در سال ۱۹۹۰ نشان داده کـه گیاهـان مـی‌تواننـد آنتـی ژن‌هـای فعـال بیولوژیکی را تولید کنند. در این کار، توتون تراریخته‌ای تولیـد شـده کـه آنتـی ژنـی را برای یکی از پروتئین های سطحی باکتری *Streptococcus mutans dehtal* بیان می‌کند. زمـانی کـه عـصاره ایـن گیـاه بـه مـوش خورانـده شـد، آنتـی‌بـادی‌هـای فعـالی بیولوژیکی بر علیه این باکتری‌ها در موش القا شد. امروزه چنـدین نـوع واکـسن ژنـی یـا واکسن خوراکی در چندین گیاه دیگر بیان شده‌اند. مثال‌هایی از بیماری‌هـای حیـوانی و

انسانی که پروتئین‌های واکسن آن‌ها در گیاهان تراریخته بیان شده است شامل انواع گزش‌ها، ویروس روده‌ای سمور، سرطان روده بزرگ، وبا، پوسیدگی دندان‌ها، هپاتیت، ویروس فلج، بیماری‌های دهان و یا سایر آلودگی‌های میکروبی بوده است.

اولین یافته از واکسن‌های خوراکی مؤثر در سال ۱۹۹۵ گزارش گردید و اولین آزمایشات کلینیکی واکسن‌های خوراکی گیاهی بر روی انسان در سال ۱۹۹۸ انجام شد. این آزمایش نشان داد که سیب‌زمینی‌های تراریخته حاوی واکسن، باعث القای یک پاسخ ایمنی در بدن می‌شوند. واکسن‌های خوراکی باید بقای خود را در هنگام هضم حفظ نمایند تا پاسخ ایمنی مؤثری را تحریک کنند. البته تلاش‌هایی در حال انجام است تا غذاهای مناسبی برای دریافت واکسن انتخاب شوند؛ به طوری که این واکسن‌ها در گیاهانی تولید شوند که مردم تمایل به مصرف آن خصوصاً به صورت خام داشته باشند. بنابر این درجه پذیرش این واکسن‌ها بالا می‌رود. از جمله گیاهانی که مد نظر بوده‌اند موز، سیب زمینی شیرین، سیب‌زمینی و گوجه فرنگی را می‌توان نام برد.

یکی از واکسن‌های خوراکی تولید شده موز تراریخته‌ای است که برای مقابله با بیماری هپاتیت B تولید شده است. ویروس این بیماری از طریق خون وارد بدن می‌شود. البته آزمایش‌هایی که بر روی موش انجام شده است حاکی از تأثیر موفقیت آمیز بودن این واکسن برعلیه بیماری هپاتیت B است.

در سال ۲۰۰۱ محققان دانشگاه توماس جفرسون، اسفناج ترایخته‌ای تولید نمودند که پروتئین های بازدارنده HIV (ایدز) را بیان می‌نمودند. با این کشف امکان تولید یک واکسن مطمئن و ارزان برای ایدز وجود دارد. تولید واکسن در گیاهان از چند نظر حائز اهمیت است. اول این که به کمک یک ویروس گیاهی معمول می‌توان به راحتی ژن تولید کننده یک پروتئین خاص را به داخل گیاه فرستاد. واکسن‌هایی که به این ترتیب تولید می‌شوند، ارزان‌تر بوده و خیلی راحت‌تر از آزمایشگاه به دست می‌آیند. علاوه بر این، واکسن‌های گیاهی دارای امنیت بیشتری از لحاظ بهداشتی هستند، زیرا

ابتدا برای تولید واکسن‌ها از کشت‌های سلولی حیوانی و یا حتی کشت بافت‌های انسانی استفاده می‌شد که امکان آلودگی آن بیشتر است. در حالی که واکسن‌های تولیدی در گیاهان با چنین مشکلی مواجه نخواهند شد.

علاوه بر تولید گیاهانی که به عنوان واکسن‌های خوراکی توسط انسان و یا حیوانات مصرف می‌شوند، دانشمندان به دنبال تولید آنتی بادی‌های خاصی در گیاهان نیز بوده‌اند. ولی تاکنون تمام کاربردها و مصارف آن‌ها در سطح آزمایشگاه بوده است. آنتی بادی‌های تولیدی در گیاه باید در معرض آزمون‌های تشخیصی قرار گیرند و سپس برای مصارف انسان و حیوان توصیه شوند. اولین موفقیت استفاده از آنتی‌بادی‌های گیاهی برای جلوگیری از بیماری در سال ۱۹۹۸ گزارش شده است. در این مطالعه از یک آنتی‌بادی مونوکلونال تولید شده در *Streptococcus mutans* ایجاد می‌شود، استفاده شده است که سبب تأخیر یا ممانعت از پیشرفت بیماری‌های دندان می‌شود.

آنتی بادی‌هایی که با سرطان مقابله می‌کنند، نیز تولید شده‌اند. به عنوان مثال، یک آنتی بادی تک زنجیره FV در مقابل آنتی ژن‌های سرطان‌های جنین(یک آنتی ژن نشان‌گر تومورها) در برنج و گندم بیان شده است. تأثیر این آنتی بادی در دانه به مدت حداقل ۵ ماه باقی است. استفاده از گیاهان تراریخته برای تولید آنتی بادی‌های تشخیصی نیز در ژاپن گزارش شده است. به همین منظور توتون تراریخته‌ای تولید شده که یک آنتی ژن مرکزی ویروس هپاتیت B را بیان می‌کند. به این ترتیب میزان هزینه آزمایش خون فرد دهنده از نظر وجود ویروس هپاتیت کاهش می‌یابد. بر طبق برآورد انجام شده، برگ توتون تراریخته برای تست ۶۴ تا ۱۰۲ هزار نفر به کاربرده می‌شود که بستگی به غلظت آنتی ژن در برگ دارد.

کاربرد بیوتکنولوژی برای پالایش محیط زیست و حفاظت از آن

محققان به دنبال استفاده از بیوتکنولوژی برای حفاظت و پالایش محیط زیست می‌باشند. گونه‌های گیاهی معینی یافت شده‌اند که توانایی جذب و سمیت زدایی عناصر

و مواد سمی را دارند و برای فعالیت‌های زیست محیطی مفید می‌باشند. گاهی گیاهان تراریخته به عنوان یک بیوسنسور برای ظهور و یا ردیابی حضور مواد سمی معین به کار برده می‌شوند.

علاوه بر این، محققان به دنبال تولید گیاهان تراریخته‌ای هستند که به عنوان سیستم‌های اخطار دهنده عمل می‌کنند و قادرند حضور مواد مضر را شناسایی و ردیابی کنند. برای مثال باکتری‌هایی نظیر *Pseudomonas putida* را مهندسی نموده‌اند که به تری نیتروتولوئن (TNT) حساسیت بالایی دارند. این باکتری‌های حساس حاوی پروتئینی می‌باشند که در حضور ماده TNT یک رنگ فلورسانس سبز را ایجاد می‌کنند. این باکتری می‌تواند تمام زمین‌های آلوده به مواد انفجاری را بدون هیچ گونه خطایی شناسایی کند. اگرچه استفاده از باکتری به عنوان یک عامل شناسایی کننده با مشکلاتی نظیر مدیریت و ذخیره‌سازی مواجه است ولی کاربرد این روش در گیاهان مزیت‌هایی نسبت به باکتری خواهد داشت.

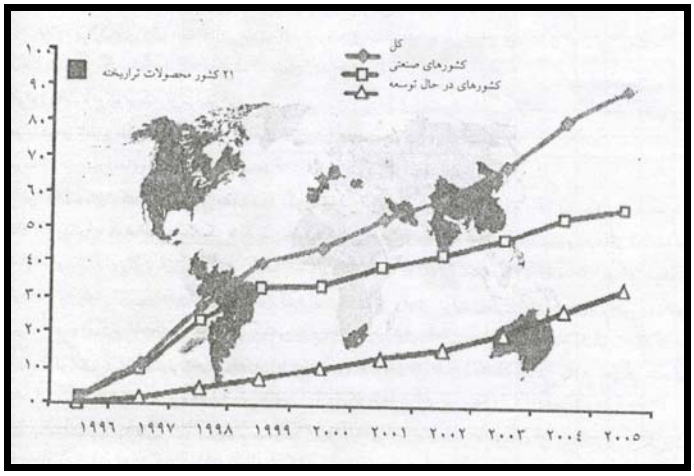
وضعیت کنونی بیوتکنولوژی در سطح جهان

- وضعیت محصولات تراریخته در جهان

سطح زیر کشت محصولات تراریخته در جهان از ۱/۷ میلیون هکتار در سال ۱۹۹۶ به حدود ۹۰ میلیون هکتار در سال ۲۰۰۵ رسیده است. امروزه بیش از ۸ میلیون کشاورز در ۲۱ کشور اراضی کشاورزی خود را تحت کشت گیاهان تراریخته برده‌اند. ۸ کشور بزرگ نظیر ایالات متحده، آرژانتین، کانادا، برزیل، چین، پاراگوئه، هندوستان و آفریقای جنوبی حدود ۹۹٪ سطح زیر کشت گیاهان تراریخته را به خود اختصاص داده‌اند. سهم سطح زیر کشت در کشورهای در حال توسعه نیز از ۱۴٪ در سال ۱۹۹۷ به ۳۴٪ در سال ۲۰۰۴ رسیده است.

تعداد کشورهایی که گرایش به کاشت محصولات تراریخته نشان داده‌اند از ۱۷ کشور در سال ۲۰۰۴ به ۲۱ کشور در سال ۲۰۰۵ رسیده است که براساس گزارش

ISAAA (جیمز، ک، ۲۰۰۵) ایران نیز یکی از کشورهایی بوده که در سال ۲۰۰۵ به جمع کشورهای کشت کننده محصولات تراریخته پیوسته است (شکل ۱۳-۷).



شکل ۷-۱۳: نمودار افزایش سطح زیرکشت محصولات بیوتکنولوژی از سال ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۵ (اقتباس از کلایو جیمز، ۲۰۰۵).

- وضعیت محصولات تراریخته در کشورهای پیشرفته

در سال ۱۹۹۶ اولین محصولات بیوتکنولوژی در ایالات متحده وارد بازار شد و بعد از آن محصولات تراریخته دیگری نظیر ذرت، سویا و پنبه در سال ۲۰۰۴ به ترتیب حدود ۴۶، ۸۶ و ۷۶٪ از کل سطح زیرکشت این محصولات زراعی را در آمریکا تشکیل می‌دادند.

۸ کشور دیگر نیز علاوه بر ۵ کشور اصلی دارای تولید تجاری فراورده های بیوتکنولوژی می باشند که شامل آفریقای جنوبی، مکزیک، استرالیا، هندوستان، رومانی، اسپانیا، فیلیپین و اروگوئه هستند. فعالیت‌های تحقیقاتی و توسعه ای در بخش بیوتکنولوژی شامل آزماشات مزرعه ای، گلخانه‌های و آزمایشگاهی است که در ۶۳ کشور جهان در حال انجام است.

روند فعلی بیوتکنولوژی گیاهی مؤید این است که سطح زیر کشت و ارزش محصولات بیوتکنولوژی در حال افزایش است و روز به روز بازارهای جدیدی خصوصاً در کشورهای در حال توسعه ایجاد می شود. تاکنون حدود ۷۰ محصول بیوتکنولوژی در ایالات متحده به صورت تجاری در آمده اند که دارای ویژگی های مفیدی می باشند. این محصولات حدود ۱۰۹ میلیون هکتار از اراضی کشورهایی نظیر ایالات متحده، آرژانتین، استرالیا، برزیل، کانادا، چین، مکزیک و آفریقای جنوبی را به خود اختصاص داده‌اند.

- وضعیت محصولات تراریخته در کشورهای در حال توسعه از نظر استفاده از بیوتکنولوژی در کشورهای در حال توسعه نظرات متضادی وجود دارد. برخی اعتقاد دارند که بیوتکنولوژی به هیچ طریقی برای کشورهای در حال توسعه مفید نیست ولی عده زیادی اعتقاد دارند که بیوتکنولوژی در توسعه کشورهای فقیر بسیار مؤثر است. البته در حال حاضر قدرت بیوتکنولوژی تنها در چند کشور محدود متمرکز شده است و در سایر کشورها این علم هنوز در مراحل تحقیقاتی و شروع مرحله تجاری باقی مانده است.

هندوستان حداقل ۲۰ آکادمی و مرکز تحقیقاتی دارد که حدود ۱۶ گیاه زراعی را تحت پوشش قرار داده است.

دولت پاکستان بیوتکنولوژی مدرن را از سال ۱۹۸۱ زمانی که انستیتوی هسته‌ای کشاورزی و بیوتکنولوژی اولین دوره آموزشی خود را در زمینه DNAی نوترکیب آغاز نمود، شروع کرد. این دوره منجر به ایجاد مرکز عالی بیولوژی مولکولی شد. پاکستان در دو زمینه پنبه مقاوم به آفت و برنج مقاوم به قارچ، تلاش‌های فراوانی انجام داده و مطالعات آزمایشگاهی برروی لاین‌های نیشکر، سویا، گوجه فرنگی، پنبه و انبه تراریخته در دست انجام است.

مالزی نیز در جنبه‌های مختلف بیوتکنولوژی پیشرفت‌هایی حاصل کرده است. این کشور چهارچوب‌های فعالیت بیوتکنولوژی خود را در سه بخش تحقیقاتی ژنومیکس، بیولوژی مولکولی و مواد دارویی و طبیعی متمرکز نموده است. سازمان کشاورزی مالزی،

در حال توسعه تحقیقات و توانایی خود در زمینه بیوتکنولوژی می‌باشد و تاکنون در مورد گیاهانی نظیر موز، فلفل، نخل روغنی، خشخاش، آناناس، برنج و توتون تراریخته به موفقیت‌هایی دست یافته است. اندونزی، فیلیپین، تایلند و کره جنوبی نیز از جمله دیگر کشورهای آسیایی هستند که در بخش‌هایی از بیوتکنولوژی به پیشرفت‌هایی رسیده‌اند.

اهداف آینده بیوتکنولوژی گیاهی

طی ۱۰ تا ۲۰ سال آینده چند زمینه تحقیقاتی زیر در ارتباط با بیوتکنولوژی گیاهی مهم خواهند بود و مسلماً بیوتکنولوژی گیاهی نقش مهمی در دستیابی به این اهداف تحقیقاتی خواهد داشت:

۱- آپومیکسی برای تثبیت قدرت هیبریدی.

۲- سیستم‌های نرعقیمی از طریق تراریختی برای تولید بذور هیبرید در گیاهان خودگرده افشان.

۳- پارتنوکارپی برای تولید میوه‌ها و سبزی‌های بدون بذر.

۴- کوتاه کردن دوره اصلاحی درختان میوه و جنگلی.

۵- تبدیل گیاهان یک ساله به چند ساله جهت پایداری سیستم‌های کشاورزی حفاظت خاک از خطر فرسایش.

۶- Biofarming یا تولید بسیاری از مواد دارویی از طریق بیوتکنولوژی گیاهی.

۷- تولید صنعتی آنزیم‌ها و هورمون‌ها در سیستم‌های گیاهی.

۸- تولید واکسن‌های خوراکی و آنتی بادی از طریق گیاهان.

۹- استفاده وسیع از بیوتکنولوژی جهت پاک سازی محیط زیست از آلوده کننده‌ها.

۱۰- بهره‌گیری از بیوتکنولوژی گیاهی جهت افزایش تنوع و حفاظت از ذخائر ژرم پلاسم گیاهی.

۱۱- تولید موجودات جدید هم زیست، آنتی بیوتیک‌ها و همچنین برقراری ارتباطات آنتاگونیستی جدید بین گیاهان و موجودات (قارچ‌ها، باکتری‌ها و حشرات) از طریق مهندسی گیاهان و میکروارگانیسم.

بیوتکنولوژی در ایران

موقعیت جغرافیایی و شرایط اقلیمی ایران به گونه‌ای است که در یک منطقه خشک و نیمه خشک کره زمین قرار گرفته، از نظر منابع آبی و زمین‌های کشاورزی غنی نیست و به سختی می‌توان احتیاجات غذایی جمعیت رو به رشد را تأمین کرد. مصاحبه‌های مسئولان اجرایی و از جمله وزرای کشاورزی و بازرگانی و آمارهای منتشر شده در طی پنج سال اخیر بیان‌گر آن است که سالانه به طور متوسط ۱/۲ تا ۱/۵ میلیارد دلار محصولات کشاورزی به ویژه غلات و مواد روغنی، به کشور وارد می‌شود. از طرفی هدف اصلی از تشکیل مراکز علمی و تحقیقاتی در کشور، پیدا کردن راه حل‌های علمی برای معضلات و مشکلات اساسی جامعه است. با توجه به توانایی‌های گسترده بیوتکنولوژی و تجربه موفق کشورهایی چون هند، کره و ... در زمینه رسیدن به خود-کفایی محصولات کشاورزی و تولید دارو باید امکانات مراکز تحقیقاتی بیوتکنولوژی را با اختصاص منابع لازم در جهت تحقق بخشیدن به اهداف تأمین نیازهای اساسی و راهبردی کشور بسیج نمود.

ایجاد، توسعه و بومی کردن علوم پایه در رشته‌های مختلف بیوتکنولوژی در ایران از یک سوء موجب گسترش و رشد این فن‌آوری در کشور می‌شود و از سوی دیگر با ایجاد تحرک در سایر رشته‌های علمی و دیگر فن‌آوری‌ها، بر رشد علمی و ارتقای مهارت‌های نیروی انسانی در جامعه می‌انجامد. طبق اطلاعات موجود، نیروی انسانی در بخش بیوتکنولوژی ایران بیش از ۱۴۰۰ نفر محقق است. در همین ارتباط حدود ۴۶ دانشگاه یا مرکز تحقیقاتی و انستیتو در ایران وجود دارند که به نوعی فعالیت‌های مرتبط با

بیوتکنولوژی را انجام می‌دهند. از این تعداد حدود ۱۹ مرکز تحقیقاتی آن وابسته به کشاورزی و منابع طبیعی است که عمدتاً بر اساس سرمایه‌های دولتی حمایت می‌شوند.

خوشبختانه سند ملی زیست فناوری که نتیجه تلاش بیش از ۲۰۰ نفر صاحب نظر و متخصص در رشته‌های مختلف این فن‌آوری است، در تاریخ ۱۳۸۳/۱۱/۴ به تصویب هیأت دولت رسیده است. براساس این سند، شورای عالی زیست فن‌آوری به ریاست رئیس جمهور و به منظور : (۱) تعیین سیاست‌ها و راه‌بردهای اجرایی، ترویجی، تحقیقاتی و منابع انسانی، (۲) هدف‌گذاری و تعیین خطوط کلی زیست فن‌آوری، (۳) بررسی و تصویب ساختار نظام مدیریت زیست فن‌آوری کشور و (۴) نظارت بر پیشرفت برنامه‌های اجرایی سند ملی زیست فن‌آوری، تشکیل شده است. در سند فوق اهداف کلان کشور در سه مورد کوتاه مدت، (تا پایان سال ۱۳۸۵)، میان مدت (تا پایان برنامه چهارم توسعه ۱۳۹۰-۱۳۸۵) و بلند مدت (تا پایان برنامه پنجم توسعه ۱۳۹۵-۱۳۹۰) تهیه و تنظیم شده است. اهداف کوتاه مدت مورد اشاره در سند عبارتنداز: سازمان‌دهی نظام مدیریت زیست فن‌آوری کشور، بسترسازی و ظرفیت‌سازی برای ایجاد، انتقال و توسعه فرآیندهای تولید فرآورده‌های زیستی و ورود به بازارهای جهانی با اولویت کشورهای منطقه و اسلامی، تکمیل پروژه‌های نیمه تمام زیست فن‌آوری، توسعه شبکه ملی آزمایشگاه‌های تحقیقات زیست فن‌آوری، ارتقای سطح آموزش و پژوهش و تربیت نیروی انسانی مورد نیاز، به کارگیری دانش فن‌آوری زیستی گیاهی مورد نیاز برای افزایش و بهبود کیفیت تولید محصولات راه بردی نظیر گندم، برنج، دانه‌های روغنی، چغندرقند و گیاهان علوفه‌ای و دارویی، تولید فرآورده‌های تشخیصی و درمانی و بهبود کیفی و کمی غذای دام، به کارگیری روش‌های زیست فن‌آوری پزشکی در پیش‌گیری، تشخیص و درمان بیماری‌ها، دستیابی به استانداردهای جهانی در زمینه تضمین کیفیت، استفاده از زیست فن‌آوری برای حفظ تنوع زیستی و ذخائر ژنتیکی و پاک سازی محیط زیست، توسعه زیست فن‌آوری

در بخش صنعت و معدن، تشویق سرمایه‌گذاری بخش خصوصی، دستیابی به دانش ارزیابی خطرات زیست فن‌آوری.

اهداف میان مدت نیز عبارتنداز: صدور ۳۰٪ از فرآورده‌ها خدمات زیست فن‌آوری تولید شده در کشور، افزایش سهم تولیدات زیست فن‌آوری از کل تولید ناخالص ملی به میزان دوبرابر سال ۱۳۸۲، افزایش نسبت نیروی انسانی از ۲۰ نفر در میلیون به ۵۰ نفر در میلیون، افزایش تعداد بنگاه‌های خصوصی و تعاونی زیست فن‌آوری با حداقل ۲۰۰ بنگاه و اشتغال‌زایی ۷۰۰۰ نیروی متخصص، به کارگیری زیست فن‌آوری جهت تشخیص بیماری‌های ژنتیکی نظیر سرطان و بیماری‌های وراثتی، کشت حداقل سه گیاه تراریخته در کشور به مساحت حداقل نیم درصد سطح زیر کشت آن‌ها در جهان، به کارگیری زیست فن‌آوری برای تولید فرآورده‌های غذایی، بهداشتی، صنعتی، معدنی و انرژی، دست‌یابی به دانش تولید حیوانات تراریخته، رشد سه برابر استفاده از زیست فن‌آوری برای حفظ ارتقاء و پاک سازی محیط زیست در راستای توسعه پایدار کشور، تکمیل و سازمان‌دهی ب انک‌های ژن گیاهی ملی، میکروارگانیسمی، تنوع زیستی، ژن انسانی و ناقلین و ثبت و کاتالوگ کردن حداقل ۵٪ از نمونه‌های هر یک از بانک‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی.

اهداف بلند مدت نیز در چند محور در نظر گرفته شده است که مهم‌ترین آن‌ها عبارتنداز: ارتقای سهم بازار خدمات و فرآورده‌های زیست فن‌آوری به میزان ۵۰٪ برنامه میان مدت، افزایش سهم بازار فرآورده‌های جدید به میزان ۲۰٪، تربیت نیروی انسانی به میزان دو برابر برنامه میان مدت، ایجاد زمینه لازم برای فعالیت شرکت‌های خصوصی با حداقل ۳۰۰ واحد تا پایان برنامه، توسعه فعالیت‌های پژوهشی، تولیدی و کاربردی در حوزه پزشکی و کشاورزی، به کارگیری نتایج محقق در حوزه حفظ و ارتقای پاک‌سازی محیط زیست و حفظ تنوع زیستی و ذخائر ژنتیکی در برنامه میان مدت.

وظایف اساسی مراکز تحقیقات بیوتکنولوژی

۱- سیاست‌گذاری و تعیین الویت‌های تحقیقات بیوتکنولوژی، مهندسی ژنتیک ، زیست شناسی ملکولی و علوم وابسته با هماهنگی و همکاری واحدهای مربوطه و تهیه طرح جامع بیوتکنولوژی کشاورزی جمهوری اسلامی ایران.

۲- تحقیقات در زمینه شناخت مواد اولیه، امکانات و استعدادهای قابل بهره‌برداری با استفاده از روش‌های جدید بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در کشور.

۳- مطالعه و بررسی و ارزیابی در زمینه روش‌های جدید بیوتکنولوژی از جنبه‌های اقتصادی، اجتماعی، مسائل زیست محیطی و زیست ایمنی و قابلیت اجرا در ایران .

۴- تحقیق در زمینه بهبود فرآورده‌ها و عملیات کشاورزی با استفاده از فن‌آوری زیستی به نوعی که متضمن سلامت بیشتر محیط زیست بوده باشد و از آلاینده‌های محیطی اجتناب گردد .

۵- هدایت و تصویب ونظارت بر اجرا و بخش‌های زیست فن‌آوری موسسه و واحدهای تابعه

۶- ثبت اختراعات، اکتشافات و ابداعات در مراجعه داخلی و اخذ امتیاز در کشورهای مختلف

۷- حفظ حقوق متقابل مؤسسه و افرادی که به نحوی با این مؤسسه در ارتباط هستند، به منظور تعیین حقوق مالکیت معنوی و دستاوردهای احتمالی آن‌ها(کلیه کارکنان مؤسسه–همکاران و دانشجویان).

۸- مطالعه پیش نویس معاهدات بین‌المللی که به نحوی با حقوق مالکیت معنوی و کشاورزی و بیوتکنولوژی مرتبط هستند و تهیه نظریه کارشناسی و ارائه آن به مراجع ذیربط.

۹- تحقیق در مورد جنبه‌های اجتماعی، اخلاقی، فرهنگی و مذهبی کاربرد فن‌آوری زیستی و فن‌آوری های جدید در زمینه کشاورزی.

۱۰- همکاری و ارتباط مستمر با مؤسسات مشابه، سایر مؤسسات تحقیقاتی تحت پوشش سازمان تات(تحقیقات، آموزش و ترویج)، دانشگاه‌ها و سایر مراکز علمی داخلی، خارجی و بین‌المللی از طریق تبادل اطلاعات، اجرای طرح‌های تحقیقاتی مشترک و بازدید و تشکیل گردهمایی‌ها و نشست‌های مشترک و ...

۱۱- بررسی فنی و علمی فن‌آوری‌های جدید جهت خرید و انتقال تکنولوژی به داخل و ارائه پیشنهاد و مراجع ذیربط و عقد قرارداد در صورت تصویب.

۱۲- تشویق بخش خصوصی به سرمایه‌گذاری و تأمین آزمایش‌های زیست فن‌آوری و ارائه خدمات، صدور مجوزهای لازمه و نظارت عالیه مؤسسه بر حسن انجام امور.

۱۳- تهیه و تنظیم بودجه سالیانه مؤسسه برای اظهار نظر شورای سازمان و تصویب هیأت امناء.

۱۴- همکاری با هیأت ممیزه سازمان در زمینه ارزشیابی و علمی و تحقیقاتی پژوهندگان مؤسسه به مراکز تحقیقاتی.

۱۵- فعالیت در جهت هماهنگ نمودن فعالیت‌های ژنتیکی کشور همراه با سیستم پیش آگاهی در منابع ژنتیک گیاهی.

۱۶- تهیه و تصویب دستورالعمل‌ها برای سلامت تحقیقات و تولید ارگانیسم یا گیاهانی که مورد ژنتیکی آن‌ها تغییر یافته با هماهنگی شورای عالی سیاست گذاری.

۱۷- بررسی در زمینه اثرات کارهای تحقیقاتی در این رابطه که به افزایش تولید در سطح کشور منجر شده است.

۱۸- انجام سایر اموری که بر طبق قوانین و ضوابط از طرف مراجع ذیربط به مؤسسه ابلاغ می‌شود.

وظایف بخش‌های مختلف

وظایف بخش ژنوم

۱- شناسایی و رده‌بندی ریز سازواره‌های مرتبط با کشاورزی با استفاده از نشان-گرهای DNA.

۲- همکاری با مراکز بانک ژن جهت تهیه شناسنامه نمونه‌های نگهداری شده در بانک‌های ژن با استفاده از نشان‌گرهای DNA.

۳- رده‌بندی گیاهان زارعی باغی و زینتی و تفکیک و تشخیص ارقام و واریته‌ها با استفاده از نشان‌گرهای DNA.

۴- تشخیص روابط فیلوژنتیک بین ارقام زارعی و گونه‌های وحشی با استفاده از نشان‌گرهای DNA.

۵- انگشت نگاری DNA و رده‌بندی حشرات مفید و زیان‌آور در کشاورزی با استفاده از نشان‌گرهای DNA.

۶- پژوهش در مورد شار ژنی و تلفیق با استفاده از نشان‌گرهای DNA.

۷- تجزیه ملکولی گیاهان تراریخته در سطح DNA.

۸- نشان‌مند کردن ژن‌ها.

۹- تهیه نقشه‌های ژنتیک و اشباع ملکولی، تلفیقی و فیزیکی گیاهان، حشرات و ریز سازواره‌ها.

۱۰- جداسازی ژن‌ها و تعیین جایگاه کروموزومی آن‌ها و تعیین جایگاه ژنی و تعیین اجزای ژن مانند پیش بردها، پایانه‌ها، اینترون‌ها و توالی‌های کد کننده.

۱۱- دست ورزی ژن‌ها از قبیل تغییر کدون، تغییر پیش برد، تغییر پایانه، تعویض آن‌ها و...

۱۲- استفاده از نشان‌گرهای DNA، در انتخاب به کمک نشان‌گرها در برنامه‌های اصلاح نباتی با همکاری سایر مؤسسات پژوهشی.

۱۳- تعیین نشان‌گرهای DNA، کاوش‌گرها، پیش بردها، مواد زیستی و کلون‌های مورد نیاز تحقیقات کشاورزی .

۱۴- دست کاری و اصلاح ژنتیک ریز سازواره جهت اصلاح خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک و استفاده از آن‌ها به عنوان مواد مؤثره در تولید سموم وغیره.

۱۵- آزمایش ملکولی واردات گیاهی جهت احراز وضع آلودگی آن‌ها (قرنطینه) حسب تقاضای مراجع ذیربط.

وظایف بخش زیست ایمنی و ذخایر ژن، پلاسمید و ریز سازواره‌ها

۱- جمع‌آوری، شناسایی و رده‌بندی ریز سازواره‌های ایران و نگهداری و توزیع آن‌ها.

۲- تهیه و ارائه بانک اطلاعاتی قابل دسترسی برای همگان در چهارچوب ضوابط مربوط.

۳- تهیه و گردآوری ریز سازواره‌های دیگر از کشورهای خارجی و بین‌المللی، نگهداری و توزیع مناسب آن‌ها بر اساس ضوابط آن‌ها.

۴- جمع‌آوری، تکثیر و نگهداری انواع پلاسمیدهای نوترکیب ژن‌های و سایر قطعات DNA.

۵- توزیع مواد ژنتیک (پلاسمید، ژن پیشبر و...) بر طبق ضوابطی که به تائید مراجع ذیربط برسد.

۶-BAC و YACتهیه، نگهداری و توزیع کتابخانه‌های ژنومی.

۷- تهیه و تدوین مقررات صدور مجوز برای کشت مزرعه‌ای گیاهان تراریخته و نظارت کامل بر اجرای آن.

۸- نظارت و اعمال مقررات بر مسائل مرتبط با زیست ایمنی کشاورزی در کل کشور.

۹- انجام امورمربوط به زیست ایمنی به نمایندگی از وزارت جهاد کشاورزی.

۱۰- مطالعه و اظهار نظر در مورد مقررات زیست ایمنی سایر کشورها، مقررات بین‌المللی مرتبط با تجارت جهانی از جنبه زیست ایمنی و ارائه پیشنهاد و نظریه کارشناسی به مسئولین ذیربط در مورد ورود به معاهدات، تصویب مقررات و غیره.

- وظایف بخش کشت بافت و انتقال ژن

۱- ذخیره و نگهداری اندام‌هایی از گونه‌های زراعی، باغی و زینتی که دارای مصارف تحقیقاتی هستند و یا روش دیگری برای نگهداری آن‌ها وجود ندارد.

۲- بهینه‌سازی روش‌های کال‌زایی و باززایی گیاهان تهیه پروتوپلاست و سوسپانسیون سلولی.

۳- کشت اندام‌های گیاهی و تهیه گیاهان عاری از ویروس (کشت مریستم).

۴- کشت دانه گرده و پرچم و استفاده از سایر روش‌ها به منظور تولید گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئید.

۵- بررسی پدیده تنوع سوماکلونی و بهره‌گیری از آن جهت ایجاد واریته‌های مطلوب.

۶- گزینش لاین‌های سلولی متحمل به تنش‌های زنده و غیرزنده تحت شرایط کنترل شده.

۷- استفاده از روش‌های مختلف مانند بمباران ژنی، پروتوپلاست، الکتروپوریشن، آگروباکتریم، ریزتزریقی و غیره برای تراریزش یا انتقال ژن‌های مطلوب به منظور بهبود صفات کمی و کیفی گیاهان.

۸- همکاری با سایر مؤسسات تحقیقات تابعه سازمان تات(تحقیقات، آموزش و ترویج) و دانشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی دیگر جهت غربال و آزمایشات مزرعه‌ای گیاهان تراریخته تا هنگام صدور گواهی واریته.

۹- انجام سایر پژوهش‌های مرتبط با کشت بافت و انتقال ژن و سایر وظایف محوله بر طرف مرجع ذیربط.

وظایف بخش ژنتیک و زیست شناسی سلولی وملکولی

۱- بررسی و پژوهش در مورد چرخه سلولی در سطح ملکولی و عوامل کنترل کننده آن.

۲- بررسی و پژوهش در مورد مرگ برنامه ریزی شده سلول در سطح سلولی و ملکولی و پدیده پیری .

۳- بررسی و پژوهش در مورد آپومیکسی و ژنتیک آن.

۴- بررسی و پژوهش سیتولوژیکی و ژنتیکی سلول و پدیده خاموشی ژن.

۵- تهیه نشان‌گرای سیتولوژیکی و استوک‌های آنیوپلوئیدی، پلی‌پلوئیدی و نگهداری و استفاده از آن‌ها به کمک سایر مؤسسات تحقیقاتی.

۶- انجام تلاقی‌های دور (به منظور انتقال صفات مطلوب از گونه‌های وحشی به گونه‌های زراعی) با همکاری سایر مؤسسات تحقیقاتی.

۷- شناسایی ژن‌های مفید از نظر کشاورزی.

۸- انجام سایر پژوهش‌های ژنتیک و زیست شناسی سلولی- ملکولی و سایر وظایفی که از طرف مسئولین ذیربط ارجاع می‌شود.

وظایف بخش فیزیولوژی، بیوشیمی و پروتئین

۱- تحقیق در مورد رابطه ریزسازوارها و گیاهان.

۲- بررسی و پژوهش و دست کاری درمورد مسیرهای متابولیک در گیاهان.

۳- تحقیق در جهت درک مکانیزم مولکولی تنش‌های غیرزیستی مانند شوری، سرما، خشکی و مقاومت گیاهان درمقابل تنش‌های زیستی و ...

۴- تحقیق در مورد کانال‌ها ناقل‌های یونی.

۵- شناسایی و جداسازی پروتئین‌های دخیل در اعمال زیستی گیاهان، حشرات و زیرسازوارها.

۶- پژوهش در تأثیر عوامل مختلف بر تولید و تظاهر پروتئین‌های دخیل در بافت‌ها و اندام‌های گیاهان، حشرات و سایر سازوارهای مهم در کشاورزی.

۷- تحقیق در زمینه صفات، تغییر یافته فیزیولوژیک گیاهان تراریخته.

۸- تحقیق در زمینه جای‌گزینی نشان‌گرهای قابل انتخاب مبتنی بر مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها با سایر روش‌های غیر مبتنی بر آنتی بیوتیک.

۹- تحقیق در مورد امکان تثبیت ازت توسط غلات.

۱۰- تحقیق درمورد نقش پیش‌برها و اختصاصی بودن بافت آن‌ها و نقش شرایط طبیعی در تظاهر آن‌ها.

۱۱- انجام مطالعات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مورد نیاز طرح‌ها و پروژه‌های مختلف با همکاری مجریان طرح و سایر مؤسسات تحقیقاتی.

۱۲- مطالعات الکتروفیزیولوژیک تظاهر ژن در اووسیت قورباغه و مخمر ...

۱۳- جداسازی، خالص‌سازی و تکثیر ریز سازواره‌های مورد استفاده برای فرآوری محصولات غذایی و کشاورزی.

۱۴- تولید فرآورده‌های نوترکیب مورد نیاز کشاورزی و صنایع کشاورزی با استفاده از ریزسازواره‌های دست ورزی تولید شده.

۱۵- تهیه حشره کش‌ها، علف کش‌ها، قارچ کش‌ها و نماتدهایی با منشاء زیستی.

۱۶- بهبود روش‌ها و فرآیندهای تخمیر در صنایع کشاورزی.

۱۷- تحقیق در زمینه تولید پروتئین‌های تک سلولی و ریزسازواره‌های مورد نیاز در کشاورزی مانند باکتری‌های ریزوبیوم در سطح انبوه.

۱۸- تحقیق در زمینه تولید آنتی بادی‌های مورد نیاز در بخش‌های زیست فن‌آوری کشاورزی و تولید آن‌ها.

۱۹- تولید آنتی بادی‌های مونوکلونال و پلی‌کلونال جهت تشخیص بیماری‌ها و تأمین نیاز بخش‌های تحقیقاتی.

وظایف بخش خدمات فنی تحقیقات

۱- تشکیل بانک‌های اطلاعاتی با همکاری سایر بخش‌های مؤسسه در زمینه زیست فن-آوری کشاورزی و علوم وابسته و ارائه خدمات به بهره برداران.

۲- انجام طرح‌های تحقیقاتی در زمینه آمار و بانک‌های اطلاعاتی و رایانه‌ای.

۳- تشویق و ترغیب پژوهش‌گران سایر بخش‌ها به بهره‌برداری از بانک‌های اطلاعاتی.

۴- احداث پایگاه اطلاع رسانی و اتصال دائم به اینترنت.

۵- احداث شبکه داخلی (اینترنت) و تضمین فعالیت آن از طریق افزایش بهره‌برداری توسط کاربران طبق ضوابط.

۶- تهیه بانک‌های نرم افزاری و نصب آن‌ها روی شبکه داخلی.

۷- اداره کتابخانه مؤسسه و خرید کتب، نشریات، بانک‌های اطلاعاتی و نصب بانک‌های اطلاعات روی شبکه داخلی.

۸- تأمین خدمات تخصصی و فنی تجهیزات مورد استفاده واحدها و همکاری در انتخاب دستگاه‌ها و تجهیزات مناسب آزمایشگاهی.

۹- بررسی جنبه‌های اقتصادی تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی.

۱۰- تهیه کتب و دستورالعمل‌های آموزش روش‌ها و فنون زیست فن‌آوری و ترویج آن‌ها در بین محققین، اساتید دانشگاه‌ها و دانشجویان و عموم مردم.

۱۱- تلاش به منظور آماده‌سازی جو فرهنگی و روانی جامعه در مورد پذیرش فرآورده-های مهندسی ژنتیک مبتنی بر آگاهی‌های علمی.

۱۲- انتشار نتایج و تحقیقات به صورت نشریات و کتب و برگزاری سخنرانی‌های، سمینارها و گردهمایی‌ها.

۱۳- تحقیق در مورد جنبه‌های اجتماعی، اخلاقی، فرهنگی و مذهبی کاربرد فن‌آوری زیستی و فن‌آوری جدید در کشاورزی.

۱۴- برآورد اعتبارات لازم جهت اجرای برنامه‌های تحقیقاتی و پشتیبانی بیوتکنولوژی کشاورزی.

فصل هشتم
جنبه‌های اخلاقی و زیست محیطی بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک

مقدمه

جریان ژن پدیده‌ای اجتناب ناپذیر است که از همان ابتدای پیدایش گیاهان وجود داشته است. پخش گرده و بذر گیاهان سبب این جریان ژن می‌گردد. در صورتی که گرده‌های پخش شده بتوانند در باروری گیاهان دیگر شرکت کرده و یا بذرهای پراکنده شده آن‌ها بتوانند در ناحیه دیگری جوانه بزنند و گیاهان باروری تولید نمایند، پدیده جریان ژن مشاهده می‌شود. در طبیعت، این جریان ژن همواره موجب شده است تا انتقال اطلاعات ژنتیکی از یک گونه به گونه دیگر سبب تکامل گونه‌ها و شکل‌گیری گونه‌های جدید شده است. با ابداع مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان تراریخته، خطر احتمالی انتقال این اطلاعات ژنتیکی جدید به گونه‌های نزدیک وجود دارد. یکی از اثرات سوء کاشت گیاهان تراریخته، انتقال اطلاعات ژنتیکی جدید موجودات تراریخته به خویشاوندان وحشی و گونه‌های نزدیک آن است. البته این انتقال اطلاعات همیشه نامطلوب نیست، در عین حال بایستی به فکر جلوگیری از جریان ژنی ناخواسته بود.

تولید آفات مقاوم

یکی از پیشرفت‌های بشر در مهندسی ژنتیک، تولید گیاهان تراریخته مقاوم به آفات در سال‌های اخیر بوده است. این فن‌آوری نه تنها سبب افزایش عملکرد و ثبات بیشتر تولیدات کشاورزی شده، بلکه باعث کاهش هزینه کاربرد سموم شیمیایی و کاهش اثرات سوء این آفت کش‌ها بر محیط زیست و سلامت انسان و دام شده است. تولید گیاهان Bt یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌های علمی بشر برای مقاومت به آفات بوده است. در ابتدا تصور می‌شد که مقاومتی در بین جمعیت حشرات نسبت به این سم وجود ندارد، ولی برای اولین بار در سال ۱۹۷۹ مقاومت پروانه آزاد (*Plutella*

interpunctella) به این سم گزارش گردید و همین امر محققان را واداشت که مطالعه بیشتری در مورد مدیریت گیاهان تراریخته و نحوه کاشت آنها به کار گیرند تا از بروز مقاومت در جمعیت‌های طبیعی حشرات به این سم بکاهند. هدف از مدیریت گیاهان تراریخته Bt، کاهش میزان ایجاد مقاومت در جمعیت آفات می‌باشد. در صورت مدیریت مؤثر می‌توان به حفظ فراوانی کم ژن‌های مقاومت در جمعیت آفات و هم زمان با آن، کاهش جمعیت آفت برای به حداقل رساندن کاهش محصول کمک نمود. در صورت مبارزه شدید با آفات، میزان مقاومت جمعیت حشره افزایش می‌یابد و فراوانی ژن‌های مقاومت در جمعیت آفات بالا می‌رود.

تاثیر برتنوع زیستی

از زمانی که محصولات تراریخته ابداع شده‌اند، این محصولات از مقبولیت خاصی برخوردار بوده و کشاورزان زیادی به دنبال کاشت این محصولات بوده‌اند. عقیده بر این است که با معرفی محصولات تراریخته در کل تنوع زیستی افزایش یافته است، زیرا آلل کاملاً جدید در واریته‌های تراریخته وارد شده و پایه ژنتیکی محصولات زراعی گسترده‌تر شده است. با این حال عده‌ای معتقدند که میزان تنوع در برخی محصولات زراعی به خاطر رها سازی محصولات تراریخته کاهش یافته است. به عنوان مثال، تنوع ژنتیکی موجود در برخی محصولات زراعی نظیر پنبه و ذرت در ایالات متحده کاهش یافته است، زیرا ذرت و پنبه Bt سهم زیادی از سطح زیرکشت این محصولات را به خود اختصاص داده‌اند و کشاورزان گرایش زیادی به کشت این محصولات دارند. چنین کاهشی در تنوع کلی، هنگامی که محصولات تراریخته برای نخستین بار وارد یک منطقه می‌شوند، قابل انتظار است. زیرا این محصولات دارای مزایایی هستند که بسیار مورد استقبال کشاورزان قرار می‌گیرند و گیاهان غیر تراریخته چنین مزیت‌هایی ندارند. این محصولات تا زمانی که مفید باشند عموماً در تمام دنیا استفاده خواهند شد و تا حدی آثار مثبت و منفی آنها برتنوع زیستی محصولات زراعی

خنثی خواهد بود. در مجموع پیش بینی اثر فن آوری گیاهان تراریخته بر تنوع زیستی به دلیل تأثیر عوامل مختلف دشوار است.

تبادل ژنتیکی گیاه زراعی با علف هرز و تولید ابر علف هرزها

گیاهان زراعی دارای خویشاوندانی به عنوان علف هرز هستند که قادر به تلاقی با آنها بوده و با این محصولات زراعی تکامل هم سو دارند. این علف‌های هرز فرصت‌های بسیاری را برای تکامل بعدی محصولات زراعی فراهم می‌آورند. این گونه‌های وحشی منابع ژنی در حال تکامل فراوانی نیز برای گیاهان زراعی مربوطه فراهم می‌آورند. با این حال تبادل ژنتیکی ممکن است باعث ایجاد علف‌های هرز مهاجمی شود که آن چنان شباهت فنولوژیکی و بذری به گیاهان زراعی دارند که نمی‌توان آنها را ریشه‌کن نمود. این گونه‌ها تحت عنوان ابر علف هرزها (Super weeds) معروف هستند. همین بحث در گیاهان تراریخته نیز مد نظر است. یعنی امکان فرار ژن در گیاهان زراعی حاصل از مهندسی ژنتیک به علف‌های هرز و سپس ظهور گسترده گیاهان وحشی می‌باشد. تولید ابر علف هرزها یکی از مخاطرات مهم مهندسی ژنتیک در بحث تولید گیاهان تراریخته مقاوم به علف کش‌ها و آفات و بیماری‌ها است.

گیاهان تراریخته و امنیت غذایی

گیاهان تراریخته حاوی ژن‌های ایجاد کننده حساسیت نظیر مقاومت به آنتی بیوتیک و توالی‌های پروموتوری اقتباس شده از ویروس‌ها می‌باشند. این ژن‌ها نگرانی جدی را برای سلامتی انسان ایجاد کرده و ممکن است به صورت معکوس از طریق مصرف گیاهان تراریخته و فرآورده‌های آن تأثیر بگذارند. این پدیده تا آنجایی گسترش پیدا کرده که در کشورهای پیشرفته برخی رستوران‌ها، غذاهای مهندسی شده را از لیست سفارشات خود حذف نموده‌اند و برخی مدارس ارائه فرآورده‌های مهندسی شده را منع کرده‌اند. از طرفی تقاضا برای غذاهای طبیعی و عالی در بسیاری از

سوپرمارکت‌ها افزایش یافته است. بنابراین، این مورد یک نقطه شروع برای رد بیوتکنولوژی است.

یکی از خطرات بالقوه گیاهان مقاوم به ویروس، سیستم ناقل آن است که به عنوان آفت گیاه عمل می‌کند و دیگری تولید شدن ویروس یا بیماری‌های جدید است. گزارش‌های مختلفی از نوترکیبی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای در دست است که منجر به تولید نوع جدیدی از ویروس شده است.

اثرات اجتماعی و اقتصادی

نگرانی‌هایی درباره توسعه نتایج و به کارگیری گیاهان تراریخته وجود دارد که ناشی از آثار سوء احتمالی این تکنولوژی است. در این ارتباط سؤالاتی مطرح است که نیاز به جواب دارند. از جمله این که آیا گیاهان تراریخته یک راه حل اساسی برای رفع گرسنگی مردم جهان محسوب می‌شوند و آیا این گیاهان مخاطرات احتمالی غیر قابل انکاری برای محیط و سلامتی انسان به همراه دارند؟ علاوه بر این گیاهان تراریخته می‌توانند وسیله‌ای برای بهبود تساوی استفاده از پیشرفت تکنولوژی در جهان باشند، ولی همواره این نظریه وجود دارد که تکنیک‌های جدید باعث ایجاد چالش در نظام‌های موجود می‌شود و تغییری را در توازن کلاسیک طبیعت و انسان ایجاد می‌کند. البته برطبق نظریه بورلاگ (۱۹۹۷) این نوع نظریه باید واقعیت نزاع برای تأمین غذای جمعیت در حال رشد، جایگزین شود.

کشاورزان زیادی علاقه وافری به کاشت محصولات تراریخته نشان داده‌اند. این پدیده منجر به کاهش درآمد بازارهای جهان سوم از طریق جایگزینی این محصولات شده است. به نظر می‌رسد که بخش فقیرتر اجتماع جایگاهی در این تکنولوژی پیدا نکرده است. اخیراً بسیاری از کمپانی‌های بزرگ از تکنولوژی خاتمه دهنده بذر برای جلوگیری از مصرف مجدد بذور برای کاشت در سال بعد استفاده می‌کنند. بنابراین بسیاری از کشاورزان به طور بالقوه تحت سلطه کمپانی‌های تولید بذر قرار دارند. اگر

چه این پدیده از آثار سوء اجتماعی و اقتصادی این تکنولوژی محسوب می‌شود، ولی می‌تواند یک جنبه اخلاقی و بشر دوستانه داشته باشد و پراکنش ترانسژن‌ها را محدود نماید.

منابع

۱- احسان پور، علی اکبر و امینی، فریبا. ۱۳۸۲، کشت سلول و بافت گیاهی، جهاد دانشگاهی، واحد اصفهان، ۱۸۲ص.

۲- پیریک، آر، ال، ام. مبانی کشت بافت‌های گیاهی، ترجمه: دکتر عبدالرضا باقری، با همکاری: مهندس مهری صفاری، دانشگاه فردوسی مشهد، ۱۳۷۶، ۴۰۶ ص.

۳- تاجی، اکرم؛ پی کومار، پراکاش و لاکشامانن، پراکاش، اصلاح نباتات درون شیشه-ای، ترجمه دکتر غلامعلی رنجبر، وزارت جهاد کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳۸۴، ۱۹۵ص.

4- Albershcim and Darvill. 1985. Scient.Am. 253(3):44-54.
5- Albershcim et al .1986. HorSci. 21 :84.
6- Alfermann and Reinhard. 1978 . production of natural compounds by cell culture methods.
7- Allen. 1974 Acta Hort. 36:235-239
8- Ammirato. 1983. In: Evans et al. 1983:82-123.
9- Anonymous. 1978a. In vitro multiplication of woody species. Round Table Conf. Gem-bloux Belgium centre Rech. Agron. Etat:1-295.
10- Anonymous. 1980. Seed Nursery Trader78:7.
11- Bajaj. 1979a. Euphytica 28:267-285.
12- Bajaj. 1979b.In:sharp et al. 1979: 745-774.
13- Bajaj. 1980. In:Rao et al. 1980: 50-67.
14- Bajaj.1983a .In :Sen and Giles. 1983 :19-41.
15- Ball.1953. Bull. Torrey Bot. Club 80:409-411.
16- Barlass et al. 1982. Ann. Appl. Biol. 101:291-295.
17- Bastiaens et al. 1983. Meded. Fac . landbouwwet.Gent 48: 13-24.
18- Berlin and Sasse. 1985. Adv. Biochem.Engin. Bitechn. 31:99-132.
19- Bino et al. 1984. Heredity 52:437-441.

20- Bonga and Durzan. 1982. Tissue culture in forestry. M. Nijhoff and W. Junk Publ., The Haguc, the Netherlands:1-420.
21- Bonga and Durzan. 1982. Tissue culture in forestry. M. Nijhoff and W. Junk Publ., The Haguc, the Netherlands:1-420.
23- Bouriquet and Couvez. 1967. Bull. Soc. Bot. Ifranca 114:61-72
24- Bouriquet and Couvez. 1967. Bull. Soc. Bot. lirance 114: 61-72.
25- Bradley et al. 1985 In : Henke. 1985: 307-308.
26- Bradley et al. 1985. In: Henke. 1985:307-308.
27- Braun. 1974. The biology of cancer. Addison Wesley, Reading : 1-169.
28- Braun.1974. The biology of cancer. Addison Wesley, Reading:1-169
Bridge,England:1-1334.
29- Bridgen and Staby. 1983. In: Evans et al. 1983:816-827.
30- Bridgen and Staby. 1983. In: Evans et al. 1983:816-827.
31- Broertijes, C. and Van Harten, A.M.(1978). Application Breeding Methods in the Improvement of Vegetatively Propagated crops. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company.
32- Broertjes and Harten, van. 1978. Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops.Elsevier, Amsterdam:1-316.
33- Broertjes and Harten, van. 1985. Euphytica 34: 93-95.
34- Broertjes and Harten, van. 1985. Euphytica 34:93-95.
35- Broertjes. 1981. Natuur en Techniek 49:420-439.
36- Broertjes. 1981. Natuur en Techniek 49:420-439.
37- Broertjes. And Haeten , van. 1978. Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops. Elsevir, Amsterdam: 1-316.
38- Burstrom. 1975. Physiol. Plant. 10:714-751.
39- Burstrom.1957. Physiol. Plant. 10:714-751.
40- Bush et al. 1975. Am. J.Bot. 63:729-737.
41- Bush et al. 1976. Am. J. Bot. 63:729-737.
42- Butenko. 1968. Plant tissue culture and plant morphogenesis. Israel Program for Scientific Translations. Jerusalem :1-291.

43- Butenko. 1968.Plant tissue culture and plant morphogenesis. Israel Program for Scientific Translations. Jerusalem:1-291.
44- Button. 1977. Outlook on Agric. 9:155-159.
45- Button. 1977. Outlook on Agric. 9:155-159.
46- Carlson. 1973. Science 180 :1366-1368.
47- Carlson. And Chaleff. 1974. In:Ledoux.1974:245-261.
48- Cassells et al. 1980. In:Ingram and Helgeson. 1980: 125-130.
49- Chaussat et al. 1986. Physiol. Veg.24:283-291.
50- Cocking. 1977a. Proc.8th Conger. Eucarpia Interspecific Hybrid. Plant Breed.: 229-235.
51- Cresswell,R.J. and Nitsch,C.(1975). Organ culture of Eucalyptus grandis. Planta 125:87-90.
52- Daub.1986.Ann. Rev. Phytopath. 24:159-186.
53- De Fossard, R.A.(1976).Tissue Culture for plant propagators. Australia:University of new England, Armidale.
54- Debergh et al. 1981. Physiol .plant.53:181-187.
55- Debergh, .C. and Maene, L.J.(1981).Ascheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Horticulturae 14:335-345.
56- Debergh.1983. Physiol. Plant. 59:270-276.
57- Dougall.1979.In :sharp et al .1979:727-743.
58- Dumet, D.(1994). Cryoconservation des massifs d,embryons somatiques de palmier a huile (Elaeis guineensis Jacq) par deshydration-vitrification. Etude du role du saccharose pendant le pretraitment. phD thesis, Luniversite P.et M.Curie,paris.
59- Englis and Hanahan.1945. J.Am. chem. Soc. 67:51-54.
60- Fowler.1984.In: vasil. 1984: 167-174.
61- Fridlund. 1980. In:Anonymous.1980a:86-92.
62- Gamborg and wetter. 1975. Plant tissue culture methods. Pubil. NRC-CNRC. Ottawa, Canada :1-110.
63- Gas et al .1971.C.R.Acad. Sci .272:407-410.
64- Gautheret. 1939.C.R. Acad Sci. 208:118-120.
65- Gautheret. 1940.C.R. Acad Sci.210:632-634.
66- George and sherrington.1984. Plant propagation by tissue culture. Eversley, United kingdom:1-709.
67- George et al. 1983. Plant Cell Rep.2:189-191.

68- Gibson. 1967.Austr. J.Biol.Sci.20:837-842.
69- Greenwood and Berlyn. 1973. Am.J. Bot .60:42-47.
70- Griesbach. 1981. Plant Cell Tissue Organ Culture 1:103-107.
71-Haberlandt.1902. Sitzungsber. Akad. Wien Math. Nat. Klasse 111(1) :69-92.
72- Hakkaart et al. 1980. Vakb1. Bloem.35(2):24-25.
73- Hakkaart et al. 1983. Vakb1. Bloem.38(33):38-39.
74- Heinz. 1973. Induced mutations in vegetatively propagated plants:53-59.
75- Heller.1953.Ann. Sci.Bot. Veg. paris 14:1-223.
76- Henshaw and O,Hara. 1984. In: Mantell and Smith. 1984:219-238.
77- Henshaw.1974. Abstr. 3 rd Int. congr. Plant Tissue and Cell Culture, Leicester:212.
78- Henshaw.1982.Proc.5 th Int.Congr. Plant Tissue Cell Culture 5 : 789-792.
79- Hermsen et al.1981. Euphytica 30:239-246.
80- Hiroaka.1986.Int.Congr. Plant Tissue Cell Culture Abtr.6:37.
81- Horgan.1986. Int. Congr. Plan Tissue Cell Culture Abstr. 6:295.
82- Howland and Hart. 1977. In:Reinert and Bajaj. 1977:731-756.
83- Hu and Wang. 1983. In:Evans et al.1983:177-227.
84- Hughes. 1981. In:Conger.1981:5-50.
85- Hussey.1986. In: Withers and Alderson. 1986:69-84. In Collecting plant Genetic Diversity:Technical Guidelines, Guarino, L., Ramanatha Rae, REID,r.(Eds)(pp.115-123). New York: CAB International. In plant Cell and Tissue Culture, Vasil, I.K. and Thorpe, T.A., (Eds.), (pp.195-230) Dordercht: Kluwer Academic Publishers.
86- Ingram and Helgeson. 1980. Tissue culture methods for plant pathologists. Blackwell Scient. Pub1., Oxford: 1-272.
87- Ingram and Macdonald. 1986. In:Anonymous.1986:241-258.
88- Ingram.1973.In:Street.1973:392-421.
89- Johhansson.1983.Physiol.Plant.59:397-403.
90- Johri and Bhojwani.1977.In:Reinert en Bajaj.1977:398-411.
91- Jonard .1986. In: Bajaj. 1986:31-48.

92- Jones,W.N.(1937).Chimaeras:A summary and some special aspects. Botanical Reviw 3:545-562.
93- Jones.1979.Scientia Hortic.30:44-48.
94- Kahan.1976.Plant Diseasc Rep.60:459-461.
95- Kameya.1975.Jap.J.Gen.50:417-420.
96- Karper and Pierik. 1981.Vakb1.Bloem.36(44):44-45.
97- Kartha and Gamborg. 1975. Pytopathology 65:826-828.
98- Kartha, k.k.(Ed) (1985). Cryopreservation of plant cells and Organs. Boca Raton, FL:CRC Press.
99- Kartha,K.K. and Engelmann,F.(1994). Cryopreservation and germplasm storage.
100- Kartha.1985.Cryopreservation of plant cclls and organs.CRC Press Inc., Boca RATON,U.S.A.; 1-276.
101- Kasperbauer and Collins. 1972. Crop.Sci.12:98-101.
102- Klein and Bopp.1971.Nature 230:474.
103- Kochar et al. 1971.J.HERED.62:59-61.
104- Kovoor.1962.c.r.Acad .Sci .255:1991-1993.
105- Krusberg and Babineau.1979. In:Sharp et al. 1979:401-419.
106- Kumar et al. 1986. Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.6:11.
107- Kumar, P.P.,Reid, D.M., and Thorpe, T.A.(1987). The role of ethylene and carbon dioxide in differentiation of shoot-buds in excised cotyledons of pinus radiata in vitro. Physiologia plantarum 69:244-252.
108- Lamotte and Lersten.1972.Am.J.Bot.59:89-96.
109- Limasset and Cornuet.1949.C.R.Acad. Sci.paris 228:1888-1890.
110- Mackenzie and Street. 1970.J.Exp. Bot.21:824-834.
111- Maene, L.J. and Debergh, P.C.(1986). Optimisation of plant micropropagation. Medical Facility landbouww Gent 51:1479-1488.
2 112- Marcotrigiano and Gouin.1984. Ann. Bot.54:513-52.
113- Marcotrigiano and Gouin.1984a. Ann. Bot.54:503-511.
114- Maretzki et al.1971. plant physiol.48:521-525.
115- Martin-Tanguy et al. 1976. C.R. Acad. Sci. 282:2231-2234.
116- Matsubaraet al. 1974.J.Jap. Soc.Hort. Sci. 43:63-68.

117- Mele et al. 1982. Proc.5th Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture 5:69-70.
118- Mellor and Stace-smith. 1969. Can.J.Bot. 47:1617-1621.
119- Miller. 1985.In:Dixon.1985: 215-229.
120- Misson et al. 1983. Meded. Fac.Landbouwwet. Rijksuiv. GENT 48:1151-1157.
121- Moncousin. 1979. Revue Hort. Suisse 52:361-363.
122- Morel and Martin. 1952. C.R. Acad.Sci.235:1324-1325.
123- Morel and Martin. 1955.C.R.Acad. Agri. France 41:427-475.
124- Morel.1964.Rev. Hort. Ann.Soc.Nat.Hort. France 136:733-740.
125- Morris et al. 1985. In:Dixon. 1985:127-167.
126- Murakishi and Carlson. 1979. In Vitro 15:192(Abstr.114).
127- Murashige and Skoog. 1962. Physiol. Plant. 15:473-497.
128- Murashige et al. 1972. HortScience 7:118-119.
129- Nickell.1973. Hawaiian Plant. Record 58:293-314.
130- Nitsch et al. 1967. Phytomorphology 17:446-453.
131- Nitsch et al. 1969a. C.R. Acad. Sci. 269:1257-1278.
132- Nitsch et al. 1969b. C.R. Acad. Sci. 269:1650-1652.
133- Nitzsche. 1983. In: Evans et al. 1983:782-805.
134- Nobecourt. 1939. C.R. Séance Soc. Biol. 130:1270-1271.
135- Norris et al. 1983. Science 220:75-76.
136- Palmer and Barker. 1973.Ann. Bot. 37:85-93.
137- Parliman. 1986. In:Zimmerman et al.1986:271-282.
138- Pelletier and Delise. 1969. Ann. Amelior. Plantes 19:353-355.
139- Pennrll. 1985. Grower 103(8, Suppl.): 98-101.
140- Perry and Lyrene. 1984. J.Am. Soc. Hort. Sci. 109:4-6.
141- Pierik and Segers. 1973. Z. Pflanzenphysiol. 69:204-212.
142- Pierik and Sprenkels. 1975a. Scientia Hort. 3:1-20.
143- Pierik and Sprenkels. 1984. Vakb1. Bloem. 39(21): 44-45.
144- Pierik et al. 1984. Vakb1. Bloem. 39(3):33.
145- Pierik. 1979. In vitro culture of higher plants. Bibliography. Ponsen en looyen, Wageningen, the Netherlands:1-149.
146- Pilet and Roland. 1971. Cytobiologie 4:41-61.
147- Read et al. 1986. HortSci. 21:796.

148- Read, P.E.(1988). Stock plant influence micropropagation success. Acta Horticlturae 226:41-52.
149- Roberts et al. 1984. Plant Tissue Culture letters 1:22-24.
150- Roest and Bokelmann. 1976. Vakb1. Bloem. 31(9):36-37.
151- Roest and Bokelmann. 1980. Potato Res. 23:167-181.
152- Romberger and Tabor. 1971. Am. J. Bot. 58:131-140.
153- Roth and lark. 1984. Theor. App1. Genet. 68:421-431.
154- Rugini and Wang. 1986. Int. congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr. 6:374.
155- Rugini et al.1986. HortSci. 21:804.
156- Russell and McCown.1986. Int. Congr Tissue Cell Culture Abstr. 6:49.
157- Sakai. 1984. Hortic. Rev.6:357-372.
158- Schafer-Menuhr, A., Schumacher, H-M, and Mix-Wagner, G. (1994). Langzeitlagerung alter kartoffelsorten durch Kryokonservierung der Leristeme in flussigem Stickstoff. Landbauforschung Volkenrode 44:301-313.
159- Seeni and Gnanam. 1981. Can. J.Bot.59:1941-1943.
160- Shigematsu and Matsubara. 1972.J. Jap. Soc. Hort. Sci. 41:196-200.
161- Skirvin et al. 1986. Plant Cell Rep. 5:292-294.
162- Skoog and Tsui. 1948. Am. J.Bot. 35:782-787.
163- Smith, R.H.(1992). Plant Tissue Culture: Techniques and experiments. San Diego Academic press, Inc.
164- Stehsel and Caplin. 1969. Life Sci. 8:1255-1259.
165- Steward. 1958. Am. J.Bot. 45:709-713.
166- Stone. 1967. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 64:13-14.
167- Stoutemeyer and Britt. 1965. Am.J.Bot. 52:805-810.
168- Stoutemeyer and Britt.1970. BioSci. 20:914.
169- Tabata. 1977. In : Barz et al. 1977:6-16.
170- Takebe. 1976. News1. I.A.P.T.C.19:2-6.
171-Theiler. 1981. Obstbau 6:97-103.
172- Thomas and Davey. 1975. From single cells to plants. Wykeman Pub1., London:1-172.
173- Tramier. 1965.C.R.Seanc.Acad. Agric. France 51:918-922.
174- Turner. 1983. Australian Hortic. 81:95-99.

175- Vasil.1978. News1. I.A.P.T.C. 26:2-10.
176- Venketeswaran and Partanen. 1966. Radiation Bot. 6:13-20.
177- Verhagen et al. 1986. Int. Conger. Plant Tissue Cell Culture Abstr. 6:58.
178- Walkey et al. 1974. J.Hort. Sci. 49:273-275.
179- Walkey. 1980. In:Ingram and Helgeson. 1980. 109-117.
180- Wenzel and Foroughi-Wehr. 1984. In: vasil. 1984:293-301.
181- Wenzel. 1983. Acta Hort.131:15-22.
182- Wersuhn and Fritze. 1985. Biochemie Physiol. Pflanzen 180:79-83.
183- White. 1934. Plant Physiol. 9:585-600.
184- White.1934a. phytopath. 24:1003-1011.
185- Withers, LA. And Engelmann, F.(1995). In vitro conservation of pland genetic resources. In Biotechnology in Agriculture, Altman, A., (Ed.) (pp. 57-88). New York: Marcel Dekker Inc.
186- Withers. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. Rep. Int. Board plant Gen.
187- Withers. 1983. Span 26:72-74.
188- Withers. L.A.(1995). Collecting for genetic resources conservation.
189- Wood. 1985. In:Dixon.1985:193-214.
190- Yoshida et al. 1973. Plant Cell Physiol. 14:329-339.
191- Zenk. 1976. Vortrage Rhein. Westf. Akad. Wiss. N257:27-55.
192- Ziv and Halevy. 1983. Hort. Sci. 18:434-436.
193- Ziv. 1986. In:Withers and Alderson. 1986:187-196.