وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش وترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات اصلاح وتهیه نهال وبذر

بخش تحقیقات ژنتیک وبانک ژن گیاهی ملی ایران

نشریه فنی

راهنمای روش های عملی کشت بافت گیاهی

نگارش

فرانک روزبه

۱۳۹۴

ای که با نامت جهان آغاز شد
دفتر ما هم به نامت باز شد
دفتری کز نام تو زیور گرفت
کار آن از چرخ بالاتر گرفت

عنوان نشریه: راهنمای روش های عملی کشت بافت گیاهی

نام ناشر: موسسه تحقیقات اصلاح وتهیه نها ل وبذر

تعداد صفحات: ۵۱

ویراستاران: محمد جعفر آقایی، حمید رضا عبدی، اسماعیل بیضایی

تدوین کننده (گان): فرانک روزبه

آدری: کرج بلوار شهید فهمیده، موسسه تحقیقات اصلاح وتهیه نهال وبذر، بخش تحقیقات ژنتیک وبانک ژن گیاهی ایران، تلفن:۰۲۶-۳۲۷۰۱۲۶۰

این نشریه از نظر فنی به تأیید کمیته انتشارات موسسه تحقیقات اصلاح وتهیه نهال وبذر رسیده وتحت شماره ۴۷۴۲۸ مورخ ۱۳۹۴/۵/۶ در مرکز اطلاعات ومدارک علمی وتحقیقاتی کشاورزی به ثبت رسیده است.

پیشگفتار

طبق گزارش سازمان فائو، برای تامین غذای جمعیت ۹ میلیارد نفری جهان در سال ۲۰۵۰، تولید باید دو برابر میزان کنونی باشد و برای رسیدن به این هدف باید برموانعی مانند محدودیت زمین‌های کشاورزی، کمبود آب و قیمت بالای انرژی غلبه کرد. از این رو رقابت بر سر زمین‌های کشاورزی و منابع آب، قیمت بالای انرژی و تغییرات آب و هوایی همگی نشان می‌دهد که باید با منابع کمتر، غذای بیشتری برای مردم سرتاسر جهان تولید شود. به عقیده متخصصان علوم کشاورزی یکی از راهکارهای مفید که می تواند در تعدیل مشکل تامین غذا و حفظ سلامت محیط زیست کمک نماید، تکثیر انبوه گیاهان از طریق کشت بافت و مهندسی کردن آنها از طریق فناوری های زیستی است.تکنیک کشت بافت امکاناتی را برای تکثیر گیاهان فراهم می‌آورد که از طریق روش‌های سنتی قابل دسترس نیستند. لذا بکارگیری این فناوری در کشاورزی می‌تواند با هدف بهره‌وری بیشتر از منابع موجود، کشاورزی پایدار، سلامت محیط زیست و در جهت کمک به روش‌های سنتی موثر واقع شود. بر این اساس و با توجه به نقش کشاورزی دانش بنیان در توسعه پایدار، این نشریه به منظور فراهم آوردن اطلاعات پایه و آزمایشگاهی مورد نیاز برای کشت بافت و ریزازدیادی گیاهان تهیه و ارائه شده است. در ابتدا توضیح مختصری در مورد کشت بافت گیاهی و اهداف آن آورده شده و سپس به سازماندهی فضای داخلی آزمایشگاه کشت بافت، تجهیزات آزمایشگاه کشت بافت، تهیه محیط های کشت گیاهی و مراحل ریز ازدیادی به عنوان ارکان اصلی موفقیت در کشت بافت پرداخته شده است.

امید است این نشریه در جهت شناخت وتوسعه تکنیک کشت بافت گیاهی در زمینه های آموزشی ،پژوهشی وتجاری مفید واقع گردد.

فرانک روزبه

عضو هیأت علمی بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ایران

فهرست مطالب

۱- کشت بافت گیاهی چیست؟	۱
۱-۱ تعریف کشت بافت	۱
۱-۲ مختصری بر تاریخچه کشت بافت	۲
۱-۳ فاکتورهای موثر در کشت بافت	۳
۱-۴ اهداف کشت درون شیشه ای	۳
۱-۵ انواع کشت درون شیشه ای	۶
۲- آزمایشگاه کشت بافت	۸
۲-۱ سازماندهی فضای داخلی آزمایشگاه کشت بافت	۸
۲-۲ تجهیزات آزمایشگاه کشت بافت	۹
۲-۳ شستن، نگهداری، استریل کردن ظروف و وسایل آزمایشگاهی	۱۲
۲-۴ تجهیزاتی که برای تهیه محیط کشت لازم است	۱۲
۲-۵ نحوۀ نگهداری از اتوکلاو	۱۶
۲-۶ کنترل کیفیت دستگاه اتوکلاو	۱۶
۲-۷ نکات ایمنی کار با اتوکلاو	۱۷
۳- محیط کشت بافت گیاهی	۱۸
۳-۱ انواع محیط کشت بافت گیاه	۱۸
۳-۲ مواد غذایی و عناصر لازم در محیط کشت	۱۸

۳-۳ انتخاب محیط کشت مناسب ۲۳

۳-۴ اجزاء محیط کشت ۲۳

۳-۵ تهیه اجزای محیط کشت به صورت استوک ۲۵

۳-۶ تنظیم کننده‌های رشد (هورمون های گیاهی) ۲۶

۳-۷ تهیه استوک هورمونها ۲۷

۳-۷-۱ تهیه استوک اکسین ۲۷

۳-۷-۲ تهیه استوک سیتوکینین ۲۷

۳-۷-۳ تهیه استوک جیبرلین ۲۷

۳-۸ ویتامین ها ۳۱

۳-۹ تهیه محیط کشت ریز ازیادی ۳۱

۳-۱۰ ضد عفونی کردن محیط کشت ۳۲

۳-۱۰-۱ اتوکلاو ۳۲

۳-۱۰-۲ مراحل چرخهٔ استریلیزاسیون در اتوکلاو ۳۲

۳-۱۰-۳ مدت زمان استریل کردن ۳۳

۳-۱۰-۴ تکات مهم در استریلیزاسیون محیط های کشت و محلولها با اتوکلاو ۳۴

۳-۱۰-۵ مزایا و معایب استرلیزاسیون محیط های کشت با اتو کلاو ۳۵

۳-۱۰-۶ میکروفیلتراسیون ۳۵

۴- کشت درون شیشه ای ۳۶

۴-۱ مراحل ریز ازدیادی ۳۶

۴-۲ مراحل انجام کشت بافت گیاه ۳۷

۴-۲-۱ تهیه ریز نمونه ۳۷

۴-۲-۲ ضدعفونی کردن ریز نمونه ۳۷

۴-۲-۳ انتقال ریز نمونه به محیط کشت در فضای هود لامینار ۳۸

۴- ۲-۴ رشد گیاه در محیط کشت تحت شرایط کاملا کنترل شده ۳۹

۴-۲-۵ واکشت کردن ریز نمونه ها ۴۱

۴-۲-۶ ریشه زایی گیاهچه ها ۴۱

۴-۲-۶-۱ ریشه زایی درون شیشه ای ۴۲

۴-۲-۶-۲ ریشه زایی برون شیشه ای ۴۳

۴-۲-۶-۳ مزایای ریشه زایی برون شیشه ای ۴۳

۴-۲-۷ سازگار کردن گیاهچه ها با شرایط خارج از شیشه ۴۴

۸ -۲-۴- انتقال گیاه به شرایط برون شیشه ای(گلخانه ومزرعه) ۴۵

۵- آلودگی های درون شیشه ای ۴۶

۵-۱ آلودگی های درونی ریزنمونه ۴۷

۵-۲ آنتی بیوتیک ها ۴۷

۶- منابع مورد استفاده ۴۹

۱- کشت بافت گیاهی چیست؟

۱-۱ - تعریف کشت بافت

کشت بافت تکثیر غیر جنسی گیاهان ، در شرایط آزمایشگاهی در محیط غذایی مناسب وتحت شرایط استریل، شامل کشت پروتوپلاست[۱]، کشت سلول[۲] ، کشت بافت[۳]، وکشت اندام[۴] می باشد.

این تکنیک بر پایه سه ویژگی گیاهان استواراست. این ویژگی ها شامل:

Totiopotency : به معنی قابلیت وتوانایی ذاتی یک سلول برای تبدیل به یک گیاه کامل در شرایط مناسب است. اگرچه هر سلول دارای خاصیت توتی‌پوتنسی است، اما این خاصیت در گیاه بروز نمی‌کند. علت آن میان‌کنش بین سلول‌هاست که در هر جاندار پرسلولی حالت خودمختاری سلول‌ها، حذف یا مهار شده تا هماهنگی لازم برای تشکیل بافت‌ها، اندام‌ها، رفتار زیستی و فیزیولوژی و کار موجود زنده برقرار شود. سلول‌ها از طریق پلاسمودسماتا سیگنال‌هایی از جمله یون‌ها و mRNA به سلول‌های مجاور می‌فرستند و به این ترتیب اعمال یکدیگر را کنترل و از خودمختاری جلوگیری می‌شود. توتی‌پوتنسی در واقع فرآیند تمایز است و هورمون‌ها در این فرآیند بیش از سایر عوامل نقش بازی می‌کنند.

Dediffrentiation : یعنی ظرفیت سلول های بالغ برای برگشت به حالت مریستمی در کشت بافت و سلول اغلب سلول‌ها تمایز یافته هستند و این سلول‌ها به تدریج آثار تمایز را از دست می‌دهند و به صورت سلول‌های شبه مریستمی برمی‌گردند. البته این بافت‌ها ابتدا به مریستم پسین و سپس ادامه تحولات آنها را تا حد مریستم‌های نخستین یا اولیه تغییر می دهد. هورمون‌ها، ویتامین‌ها و مواد غذایی موجود در محیط کشت موجب تحریک پدیده برگشت از تمایز سلول می‌شود. برگشت از تمایز به عوامل مختلفی بستگی دارد. هر چه سلول‌ها تمایزیافته‌تر باشند، برگشت از تمایز در آنها مشکل‌تر است. از جمله این سلول‌ها می‌توان به سلول‌های آوندهای چوب و آبکش، فیبرها و سلول‌های کلانشیمی اشاره کرد. سلول‌های پارانشیمی، سلول‌های همراه و سلول‌های لوله‌های شیرابه‌ای به راحتی به حالت مریستمی برمی‌گردند.

1- Protoplast culture
2- Cell culture
3- Tissue culture
4-Organ culture

سلول‌های جوان حاصل از کامبیوم‌ها که به عنوان سلول مادر چوب آبکش هستند به راحتی از تمایز برمی‌گردند. برگشت از تمایز در قسمت‌های جوان به راحتی صورت می‌گیرد و با افزایش سن برگشت از تمایز مشکل‌تر می‌شود.

Competency : شامل قابلیت ذاتی یک سلول یا بافت مشخص برای رشد در مسیر ویژه و مشخص است. مثلاً سلول هایی قادر به تولید جنین هستند که از نظر مورفوژنتیکی قابلیت جنین زایی را داشته باشند.

۲-۱ - مختصری بر تاریخچه کشت بافت

پایه واساس کشت بافت گیاهی با تئوری (Totiopotency) شوان واشلیدن[۱] در سال ۱۸۳۸ شروع شد. سپس اولین تلاش توسط هابرلنت[۲] آلمانی در سال ۱۹۰۲برای کشت سلول گیاهی صورت گرفت. کشت جنین گیاه خانواده توسط هانینگ[۴] در سال ۱۹۰۴وجوانه زنی درون شیشه ای بذور ارکیده و بررسی کشت درون شیشه‌ای قسمت نوک ریشه از فعالییت های مهم سالهای ۱۹۲۴-۱۹۲۲ این زمینه بودند. اولین موفقیت در تولید گیاه از کشت بافت در سال ۱۹۳۹ حاصل شد .

کشف کینتین در سال ۱۹۵۵ توسط میلر[۵] و همکارانش ، به عنوان یک هورمون تقسیم سلولی با عث ایجاد پیشرفت های زیادی در این زمینه شد. پس از آن تنظیم هورمونی محیط برای رسیدن به اندام زایی به وسیله تغییردادن نسبت اکسین به سیتوکینین در سال ۱۹۵۷توسط محققین دیگری گزارش شد. در سال۱۹۶۲ محیط کشت غذایی معروف MS معرفی شد. تولیدکالوس هاپلویید از دانه گرده گیاه ژنکگو[۶] در سال ۱۹۵۳ و دستیابی به اولین گیاهان هاپلوئید از دانه گرده داتوره در سال ۱۹۶۴ اتفاق افتاده است . اولین هیبرید بین گونه ای از امتزاج پروتوپلاست در دو گونه توتون توسط کارلسون[۷] در سال ۱۹۷۲از تحقیقات دیگر در این شاخه علمی بوده اند.شروع دستیابی به تکنولوژی مهندسی

1- Schwann & Schleiden
2-Haberlant
3-Cruciferae
4-Hannig
5-Miller
6-Ginkgo
7-Carlson

ژنتیک برای تولید گیاهان نوترکیب به سال۱۹۷۴ به تحقیقات رین هارد[1] برمی گـردد و دسـتیابی بـه تکنولـوژی DNA نوترکیب و تولید گیاهان تراریخت در طول دهه ۱۹۸۰و تاکنون ادامه داشته است.

۳-۱ - فاکتورهای موثر در کشت بافت

این عوامل به طور خلاصه عبارتند از:

- **محیط کشت :** شامل مواد معدنی، تنظیم کننده های رشد، منبع کربن و سایر مواد افزودنی به محیط
- **فاکتور های محیطی**: شامل : نور، دما، فتوپریود، شرایط استریل، محیط کشت
- **ریز نمونه :** شامل سن، اندازه، محل ریزنمونه روی گیاه مادری، وضعیت فیزیولوژیکی گیاه مادری
- **ژنتیک :** پاسخگویی ریز نمونه ها در کشت بافت وابسته به ژنوتیپ است.در بسیاری از موارد ژنوتیپ هـای یـک گونه پاسخ های متفاوت در شرایط یکسان درون شیشه ای از خود نشان می دهند.

۴-۱- اهداف کشت درون شیشه ای

اهدف اولیه در کاربرد فنون کشت بافت برای گیاهان عبارتند از:

- **یکنواختی ژنتیکی :** به علت این که روش‌های کشت بافت به صورت رویشی انجـام مـی‌گیـرد، لـذا از نـوترکیبی تصادفی ژنتیکی که مختص تولید مثل جنسی (با تولید بذر) است، اجتناب می‌شود. بنابر ایـن نتـایج از نظـر ژنتیکـی یکسان هستند. این موضوع در جایی که نیاز به یکنواختی ژنتیکی است و یا در جایی که لازم اسـت مطمـئن شـویم که یک خصوصیت قابل توارث حفظ شده است، حائز اهمیت مـی باشـد. بـرای تشـکیل کلـون، تکثیـر جوانـه هـای محوری، کشت نوک ساقه یا کشت مریستم معمولا مناسب است، چراکه به ندرت در این جوانه ها تغییـرات ژنتیکـی رخ می دهد.

1- Rainhard

- **انتخاب در شرایط درون شیشه[1] :** توجه به سریع تر بودن روش انتخاب درون شیشه ای، بسیاری از محققین در برنامه های به نژادی جهت تولید گیاهان مقاوم به علف کش، بیماری و تنش های محیطی از این روش استفاده می کنند.
- **حذف بیماریها و تولید گیاهان عاری از بیماری**
- **تولید ارقام (ژنوتیپ‌های) جدید**
- **ازدیاد نمونه هایی که به سختی تولید می شوند**
- **ازدیاد غیر جنسی هیبرید های عقیم**
- **تولید گیاهان هاپلوئید از راه کشت بساک و تخمک[2]:** گیاهان هاپلویید ممکن است برای بازیابی جهش های مغلوب در برنامه‌های اصلاحی استفاده شوند. تیمار های شیمیایی، باعث تولید دابل هاپلوییدهای مضاعف شده هموزیگوس شده و بنابراین لاین‌های اصلاحی خالص فراهم می‌شوند .
- **بازیابی دورگها از گونه های ناسازگار توسط کشت رویان[3]:** از فنون کشت بافت ممکن است جهت تولید گیاهان هیبرید در گونه‌های ناسازگار، از طریق کشت جنین یا تخمک استفاده شود .
- **گزینش جهش یافته‌ها از جهش‌های خودبخودی یا القایی :** احتمال داشتن تعداد زیادی گیاه یا نقاط رشد در داخل یک ظرف کشت وجود دارد. اغلب در داخل کشت های عادی، مقداری تنوع ژنتیکی وجود دارد . ضمناً، کشت را می‌توان به گونه‌ای تیمار کرد که میزان جهش به مقدار زیادی افزایش یابد. برای این منظور می‌توان از تیمارهای شیمیایی (مواد جهش‌زای هورمون‌ها) یا فیزیکی (پرتوتابی) استفاده کرد.
- **تولید متابولیت‌های ثانویه.**
- **انتقال ژن به گیاهان.**
- **تولید وتکثیر گیاه با استفاده از روش‌های درون شیشه‌ای در تمام طول سال.**

1- Invitro Selection
2-Haploid breeding
3-Embryo Rescue

- **تغییرات سوماکلونالی**[1] **:** گیاهانی که از کشت بافت ناشی می شوند بنابه روش مورد استفاده غالبا تغییرات ژنتیکی نشان می دهند. این پدیده، تغییرات ژنتیکی منحصر به فردی را در اختیار اصلاح کننده نبات برای استفاده در برنامه های اصلاحی قرار می دهد. از آنجایی که تغییرات در سلول هایی که دارای منشاء سوماتیکی (بدنی) هستند رخ می دهد، این تغییرات تحت نام تغییرات سوماکلونالی شناخته می شوند. تغییرات ژنتیکی مفیدی که از کشت بافت ناشی می شود ممکن است در اصلاح نباتات و در توسعه و پیشرفت واریته های زراعی اصلاح شده مورد استفاده قرار بگیرد
- **کشت پروتوپلاست و هیبریداسیون سوماتیکی**
- **نگهداری طولانی مدت ژرم پلاسم های گیاهی (بانک ژن گیاهی)** : نیاز به فضای کوچک و سهولت فراهم کردن شرایط مناسب موجب شده است که کشت‌های درون شیشه‌ای، روش کاربردی مناسبی جهت حفظ گیاهان مادری کلکسیون‌ها محسوب شوند .
- **تهیه گیاهان مادری درون شیشه‌ای:** امروزه بخوبی مشخص شده است که کیفیت و شرایط رشد گیاه مادری بر روی موفقیت تکثیردر کشت بافت بسیار مؤثر است. پایه های مادری در شرایط طبیعی تحت تأثیر عوامل محیطی مانند مواد غذایی، آب، عوامل بیماری‌زا، نور و دما قرار دارند. نگهداری گیاهان مادری تحت شرایط ایده‌آل معمولاً غیرممکن است. اما چنین شرایطی را می‌توان به راحتی در کشت‌های درون شیشه‌ای تأمین کرد.
- **کاربرد های ویژه:** مانند ریشه‌دار کردن در گونه‌هایی که از این نظر مشکل دارند. تولید ریز قلمه‌های ریشه‌دار شده در گونه‌های زینتی چوبی سرسخت ویاگونه‌هایی که تکثیر رویشی در آنها به سختی صورت می‌گیرد ممکن است که از طریق کشت بافت تکثیر شوند . تکنیک کشت درون شیشه‌ای در اینگونه موارد دارای مزایای آشکاری می‌باشند. همچنین کشت‌های درون شیشه‌ای برای سایرتحقیقات آزمایشگاهی که در شرایط طبیعی انجام آن مشکل یا غیر ممکن است، بسیار مناسب هستند .

1- Somaclonal variation

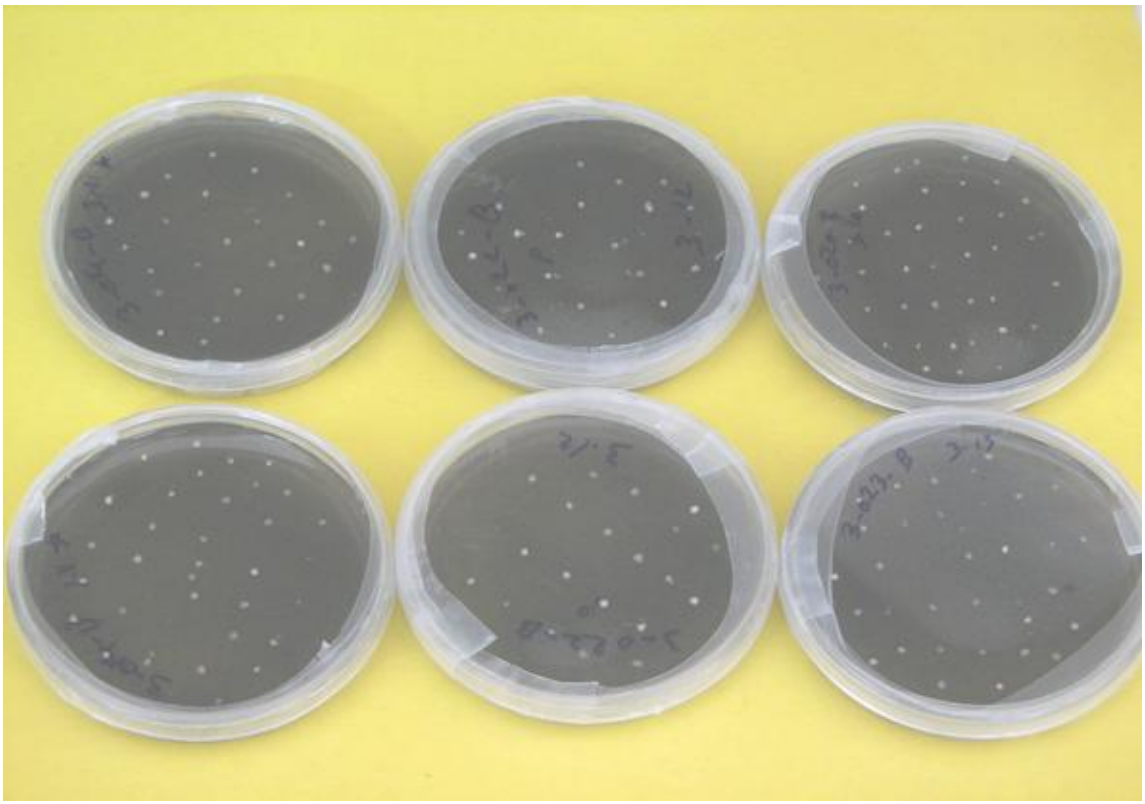
۵-۱ - انواع کشت درون شیشه ای

۱- **کشت گیاه کامل:** یک بذر ممکن است در شرایط درون شیشه‌ای کشت گردد و یک گیاهچه و در نهایت یک گیاه کامل تولید شود، مانند گل ارکیده.

۲- **کشت جنین:** در این نوع کشت، پس از حذف پوسته‌های بذر، جنین جدا شده و کشت می‌شود.گاهی کشت جنین با اهداف اصلاحی نیز صورت می گیرد. در بعضی موارد ناسازگاری بین گونه‌ها یا ارقام، منجر به سقط جنین می‌شود. چنین جنین‌هایی را در حالت نارس و قبل از سقط شدن می‌توان خارج کرده و در شرایط درون شیشه‌ای آنها را رشد داد. به عنوان مثال جنین های حاصل از تلاقی دور (بین گونه ای یا بین جنسی) که در این صورت اصطلاحاً نجات جنین[1] گویند.

۳- **کشت اندام و بافت:** در این حالت اندام یا بافت گیاهی جدا شده، در شرایط درون شیشه‌ای رشد می‌کند. مانند کشت پیاز، میانگره، مریستم، ریشه، برگ ، تخمک و پرچم. انتخاب ترکیب هورمونی و میزان قند از مهمترین عوامل موفقیت در این کشت به شمار می رود. گیاهان هاپلوئید از طریق کشت بساک یا کشت تخمک بدست می آیند هنگامی که ظهور جهش های مغلوب مورد نیاز باشد گیاهان هاپلوئید برتری‌هایی نسبت به مواد دیپلوئید دارند. به علاوه هاپلوئیدهای مضاعف شده هموزیگوس هستند و لذا بعنوان مواد خالص در برنامه‌های اصلاحی استفاده می‌شود.در کشت تخمک یا جنین نارس نور موجب قهوه ای شدن بافت ها ونهایتاً مرگ آنها می شود.در این موارد نگهداری در تاریکی تا پایان مرحله استقرار کشت ضروری است.

1- Embryo Rescue



شکل ۱- کشت تخمک چغندر قند در شرایط درون شیشه

۴- **کشت کالوس:** به تولید توده سلولی تمایز نیافته از کشت یک بافت خاص در شرایط درون شیشه‌ای، کشت کالوس گفته می‌شود. هر میلی متر کالوس از هزاران سلول تشکیل شده و هر یک از آنها توانایی تشکیل یک جنین را دارند. لذا نسبت تکثیر، می‌تواند بسیار زیاد باشد.اجرای این کشت برای تهیه کشت سلولی وکاربرد های آن توصیه می شود. معمولا در ریزازدیادی بهتر است که از تشکیل کالوس جلوگیری نمود زیرا کالوس ایجاد تنوع ژنتیکی می‌نماید.

۵- **کشت سلول:** کشت سلول‌های منفرد که به کمک آنزیم‌ها یا روش‌های مکانیکی از یک بافت گیاهی بدست می‌آید، کشت سلول نامیده می‌شود. سوسپانسیون سلولی از کشت کالوس تهیه می‌شود کالوس که یک توده سلولی تمایز نیافته است وقتی که در محیط کشت مایع قرار گیرد، سلول‌های آن از هم جدا شده وسوسپانسیون سلولی را به وجود می‌آورد.این نوع کشت برای کشت پروتوپلاست، فرآورده های گیاهی و جنین سوماتیکی به کار گرفته می شود.

۶- **کشت پروتوپلاست**: کشت پروتوپلاست را ممکن است مرحله بعدی کشت سوسپانسیون درنظر گرفت. به عبارتی با هضم دیواره سلول‌های تشکیل دهنده سوسپانسیون سلولی با آنزیم سلولاز، پروتوپلاست‌ها جدا می‌شوند. در پروتوپلاست‌ها، محتویات سلولی توسط یک غشاء با تراوایی نسبی احاطه شده است با حذف دیواره سلولی داخل نمودن مواد خارجی شامل مواد ژنتیکی پایه (DNA,RNA) یا امتزاج کامل گونه‌های مختلف امکان‌پذیر می‌شود. می‌توان این سلولها را با سلول های گونه‌های کاملا متفاوت امتزاج داد. محیط کشت پروتوپلاست باید حاوی نیازهای غذایی واسمزی سلول گیاهی باشد، تا امکان ابقاء امتزاج ودیواره سازی مجدد فراهم گردد. از این کشت در اهداف مهندسی ژنتیک بهره برداری می شود.

۲- آزمایشگاه کشت بافت

۲-۱ - سازماندهی فضای داخلی آزمایشگاه کشت بافت

مهم ترین نکته در این امر حفظ پاکیزگی وعدم آلودگی فضای کار برای تولید گیاهان است. بدین منظور توجه به نکات زیر ضروری است.

- تعیین محل مناسب برای آزمایشگاه کشت بافت از اصول مهم است. آزمایشگاه کشت بافت نباید به آزمایشگاه هایی که با میکرو اورگانیسم ها یا حشرات کار می کنند ویا محل ذخیره بذر یا دیگر اجزای گیاهی هستند، نزدیک باشد.
- آزمایشگاه کشت بافت نباید در محل پر رفت وآمد باشد.
- سقف ودیوارها دارای پوشش قابل شستشو باشند.
- بخش اجرای عملیات کشت در کم رفت وآمدترین وپاکیزه ترین ناحیه آزمایشگاه قرار گیرد وجدا از سایر قسمت های آزمایشگاه بوده ودارای درب جدا بوده واز سیستم تهویه خوب برخوردار باشد.
- از ایجاد رطوبت زیاد در اطاق کشت اجتناب شود. چون باعث افزایش آلودگی می شود.

- از نگهداری گلدان دارای گیاه در فضای آزمایشگاه اجتناب شود. چون می تواند منشاء آلودگی های میکروبی ومایت ها باشد.
- پس از کار در مزرعه یا گلخانه و قبل از وارد شدن به آزمایشگاه کشت بافت، بهتر است دوش گرفته ولباس و کفش ویژه آزمایشگاه پوشیده شود. چون مایت وحشرات از طریق مو یا لباس می تواند وارد آزمایشگاه شود.

۲-۲- تجهیزات آزمایشگاه کشت بافت

اجرای عملیات کشت بافت، نیازمند امکانات وتسهیلات لازم، مراقبت و ساماندهی خوب، مهارت در انتخاب ترکیب محیط کشت بر اساس هدف مورد نظر، انجام عملیات کشت استریل و به ویژه تربیت نیروی انسانی کارآزموده برای همکاری در اجرای عملیات آزمایشگاهی دارد.

یک آزمایشگاه استاندارد کشت بافت باید دارای تجهیزاتی برا ی انجام موارد زیر باشد.

۱- شستن، نگهداری، استریل کردن ظروف ووسایل آزمایشگاهی

۲- آماده سازی، ضدعفونی ونگهداری محیط کشت، هورمون ها وسایر مواد شیمیایی

۳- ضد عفونی کردن مواد گیاهی

۴- وسایل مورد نیاز برای کشت درون شیشه ای در شرایط استریل

۵- نگهداری کشت ها در شرایط کنترل شده محیطی

۶- گلخانه مناسب برای گیاهان حاصل از کشت بافت با شرایط محیطی تحت کنترل برای بهره برداری از این فن آوری واستمرار تولید

بر این اساس دستگاه ها، ظروف وابزار مورد نیار در آزمایشگاه کشت بافت فهرست وار به شرح ذیل است.

ردیف	نام دستگاه
۱	لامینار فلو
۲	آون
۳	اتوکلاو
۴	PH متر
۵	شیکر
۶	شیکر هیتر دار
۷	ترازوآزمایشگاهی معمولی
۸	ترازو حساس با دقت (۰/۰۱ میلی گرم)
۹	میکروسکوپ تشریح
۱۰	ژرمیناتور
۱۱	دستگاه آب مقطر
۱۲	دستگاه تصفیه آب
۱۳	یخچال آزمایشگاهی
۱۴	فریزرآزمایشگاهی
۱۵	ترولی (میز چرخدار)
۱۶	اجاق گاز

۱۷	ماکرو ویو
۱۸	پمپ مکنده
۱۹	ماشین ظرفشویی آزمایشگاهی
۲۰	اتاق رشد (فیتوترون)
۲۱	بالن ،بشر، ارلن، سیلندر جهت اندازه گیری ونمونه برداری در حجـم هـای متغیر
۲۲	لوله آزمایش در اندازه های مختلف همراه جا لوله مناسب
۲۳	پتری دیش با قطر ۵ الی۱۵ سانتی متر
۲۴	پیپت (۱تا ۱۰ سی سی)
۲۵	ظروف شیشه ای تیره درب داربرای نگهداری مواد ومحلول های استوک
۲۶	ظروف شیشه ای درب داربرای کشت گیاهچه
۲۷	قطره چکان
۲۸	پیست (آبفشان)
۲۹	سرنگ استریل
۳۰	ابزار تشریح شامل پنس، اسکالپل در اندازه های مختلف
۳۱	چراغ الکلی یا گازی یا استریلایزر
۳۲	اتاقک رشد

۳-۲- شستن، نگهداری، استریل کردن ظروف ووسایل آزمایشگاهی

- کلیه ظروف مورد مصرف در آزمایشگاه پس از تخلیه از مواد اضافه، با مواد شوینده شسته شده ودر سبد مناسب برای خشک شدن قرار داده می شوند. در صورت عدم امکان شستشوی فوری، آبکشی اولیه انجام شده ودر محل مخصوص ظروف کثیف روی سکوی محل شستشو قرار داده می شوند.
- برای شستشو، پس از آبکشی اولیه از محلول ریکا یا محلول ماده ضدعفونی کننده بنا بر میزان آلودگی استفاده می شود. در صورت استفاده از ماشین ظرفشویی، حرارت دستگاه ومواد شوینده متناسب با میزان آلودگی انتخاب شود. **پس از شستشوی کامل ، بهتر است ظروف کشت وتهیه محلول حد اقل یک بار با آب مقطر آبکشی شوند.**در آخر ظروف در سبد های مناسب قرار گرفته وحتی الامکان در قسمت سرپوشیده آزمایشگاه وبه دور از آلودگی قرار داده شوند.
- ظروف شیشه ای کشت که دارای آلودگی های باکتریایی یا قارچی هستند، ابتدا در اتوکلاو قرارداده شوند وپس از استرلیزاسیون اقدام به حذف مواد داخل ظروف کرده وسپس شستشوی مناسب انجام گیرد.
- ابزار تشریح شامل پنس، اسکالپل وقیچی پس از شستشووخشک شدن، در پوشش آلومینیوم جهت ضدعفونی در آون با دمای ۲۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴-۱ ساعت قرار داده شوند.

نکته: از قرار دادن مواد قابل اشتعال در آون جلوگیری نمایید.

- با استفاده ازاشعه ماوراء بنفش می توان هود لامینار را ضد عفونی کرد. همچنین قبل از عملیات کشت بایدکف هود لامینار با الکل ۹۶ درصد ضد عفونی گردد .

۴-۲ - تجهیزاتی که برای تهیه محیط کشت لازم است :

۴-۲-۱- میز کار برای آماده سازی محیط کشت

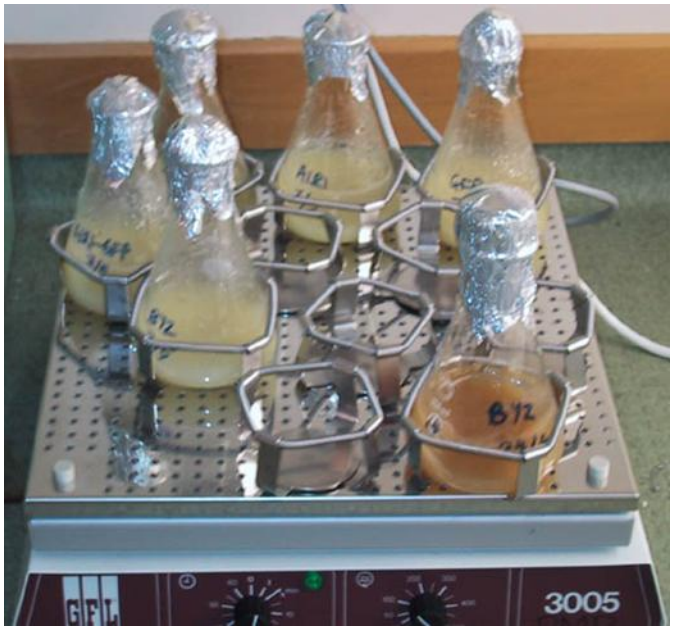
۴-۲-۲ فریزر برای نگهداری محلول های استوک[1]، برخی ویتامین ها، شیره نارگیل و....

1- stock solution

۴-۲-۳- یخچال برای نگهداری محلول های استوک به مدت کوتاه، پودر های ویتامین، هورمونها، برخی مواد شیمیایی حساس به نور ودما مانند پر اکسید نیتروژن ونگهداری کوتاه مدت نمونه های گیاهی در صورت لزوم

۴-۲-۴- ترازو برای توزین مواد شیمیایی بادقت زیاد (صدم میلی گرم)

۴-۲-۵- شیکربخاری دار برای حل کردن مواد شیمیایی



شکل۲- شیکر برای تهیه محیط کشت

۴-۲-۶- اجاق گاز یا مکروویو جهت حل کردن آگار یا مواد شیمیایی کم حل شونده

۴-۲-۷- پمپ مکنده[1] جهت تسریع ضدعفونی با فیلتر

۴-۲-۸- pH متر جهت تنظیم اسیدیته محیط کشت

۴-۲-۹- اتوکلاو برای استریل کردن محیط کشت ،آب مقطر وظروف بزرک بر حسب نیاز مثل بیوراکتور

1- vacuum pump

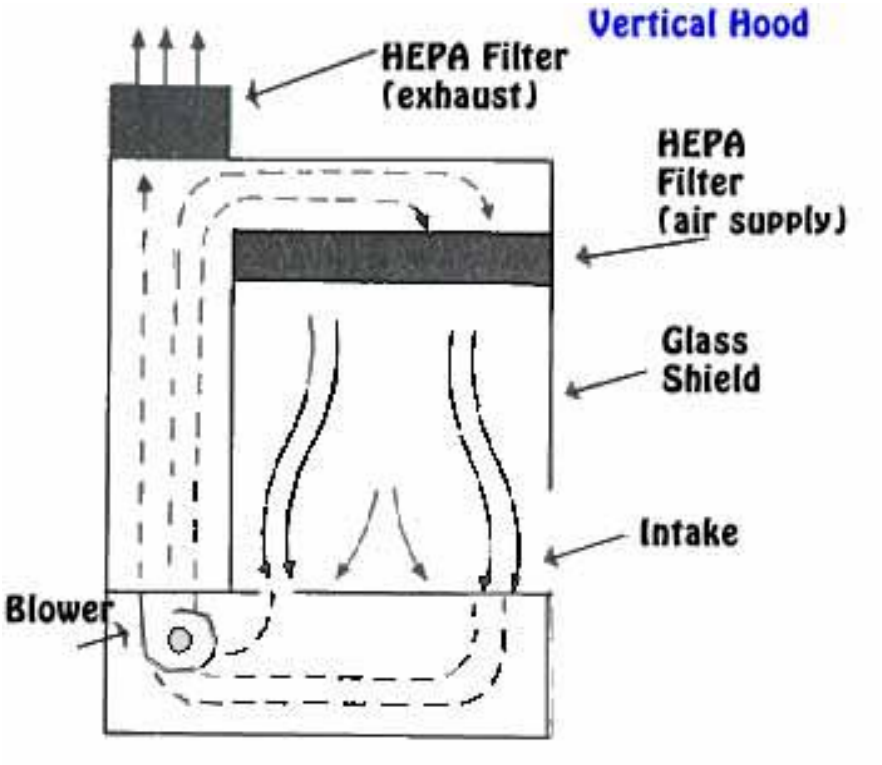
۴-۲-۱۰- ظروف پلاستیکی برای نگهداری آب مقطر

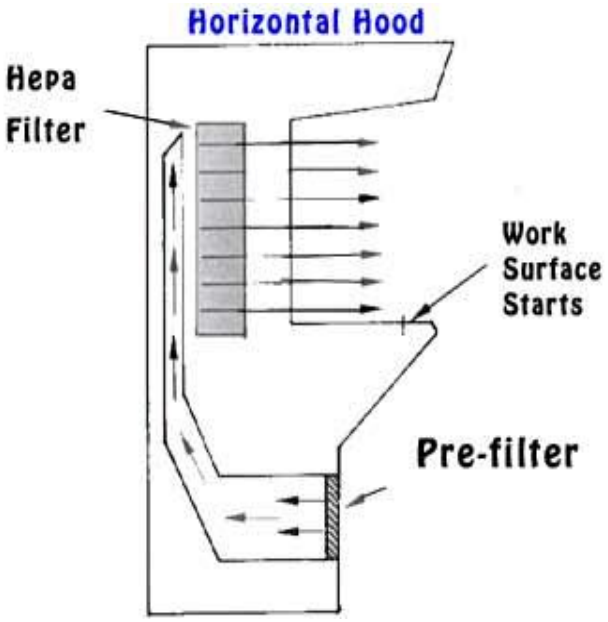
۴-۲-۱۱- ظروف مورد نیاز مانند بشر مدرج،ارلن، استوانه مدرج، لوله آزمایش، پتری دیش، بالون مدرج، پیپت

۴-۲-۱۲- ظروف کشت که بر دو نوع شیشه ای وپلاستیکی هستند. نوع پلاستیکی ارزان بوده اما یکبار مصرف است و باعث تجمع اتیلن در ظرف می شود که برای ریز نمونه مضر است. هرچند ظروف شیشه ای با کیفیت پایین نیز باعث آزاد سازی یونهای سمی مانند سدیم، سرب وآرسینیک در محیط می شوند.جهت جلوگیری از تجمع گازهای CO_2 واتیلن بهتر است درب ظروف کشت محکم بسته نشود.

۴-۲-۱۳- هود لامیناریا هود استریل[1] یکی از ابزارهای اصلی برای تهیه محیط کشت وکشت ریز نمونه در شرایط استریل در آزمایشگاه کشت بافت است. این دستگاه دارای کابین داخلی ،معمولاً از جنس استنلس استیل وکابین خارجی با اسکلت پروفیل روکش ورق فولاد وپوشش رنگ الکترو استاتیک ونمای کناری شیشه ای است وهمچنین دارای درب شیشه ای متحرک می باشد.جهت استریل کردن هوای زیر آن دارای فیلتر ۰/۲ تا۰/۳ میکرون ،فن سانتریفیوژ، برد الکترونیکی برای کارکرد دستگاه، فیلتر،کنترل سیستم روشنایی، تایمر لامپ uv ولامپ فلورسنت می باشد.این دستگاه با ایجاد یک جریان هوای نواری واستریل، سطح میز کابیبت را از نشستن ذرات خارجی و میکرو ارگانیسم ها حفظ می کند.

1-Laminar air flow cabine





شکل۳- مکانیسم تهویه هوا در دستگاه لامینار فلو

۴-۲-۱۴- اتوکلاو: وسیله ای برای استریل کردن لوازم آزمایشگاهی ومحیط کشت در فشار ودمای بالا با استفاده از بخار آب می باشد.

شکل۴- دستگاه اتوکلاو

۵-۲ - نحوۀ نگهداری از اتوکلاو

- صفحۀ کف اتوکلاو را از سوراخ آبگذر اتاقک جدا کرده، تمیز کنید.
- لوازم فرعی مثل طبقات و سینی ها را با آب و صابون بشویید.
- سطح آب ژنراتور را کنترل کنید.
- آبگذر و قسمت بیرونی آن و درزها را تمیز کنید. سوپاپ اطمینان را بررسی کنید.
- آب دستگاه را هر ۳۰ روز تعویض نمایید.
- **هر۶ ماه دستگاه توسط نمایندۀ سرویس تعمیر، بازرسی شود.**

۶-۲ - کنترل کیفیت دستگاه اتوکلاو

تست شیمیایی:

نوار TST (Time , Steam ,Temperature)

سه عامل زمان، بخار و دما را کنترل می کند و از زرد به بنفش تغییر رنگ می دهد.

نوار چسب مخصوص اتوکلاو: استفاده از نوارچسب مخصوص اتوکلاو که حاوی اندیکاتور حساس به حرارت مـورد نظـر هست که در صورت سالم بودن اتوکلاو و رسیدن به دمای مورد نظر به رنگ قهوه ای یا مشکی تغییر رنگ می دهد.

برچسب Sterility-Record: علاوه بر سنجش استریلیتی، امکان ثبت تاریخ استریلیزاسیون، نام فرد استریل کننده و نام محیط کشت بر روی این برچسب وجود دارد.

تست بیولوژیک

در این روش از ویال های حاوی باسیلوس استئاروترموفیلوس استفاده می شود. این ویال ها در اتوکلاو گذاشته و پس از زمان تعیین شده، ویال را درآورده و بافشار نوک انگشت ، نگهدارنده اسپور درون ویال را درون محیط بلاد آگار شکسته و درون انکوباتور قرار می گیرد. پس از ۱۲ ساعت ، ۲۴ و ۴۸ ساعت تغییر رنگ ان را بررسی می کنیم. عدم تغییر رنگ نشان دهنده خاصیت استریل کنندگی اتوکلاو می باشد و در صورت تغییر رنگ اتوکلاو قادر به استریل کنندگی نمی باشد.

۷-۲- نکات ایمنی کار بااتوکلاو

- از دستکش مقاوم به حرارت و محافظ چشم استفاده شود.
- بعد از آنکه فشار اتاقک اتوکلاو به صفر و دمای آن به حدود ۶۰ $^{\circ}C$ رسید درب اتوکلاو باز شود. منتظر بمانید تا ظروف کمی خنک شوند، سپس آنها را حمل کنید.
- در هنگام روشن بودن دستگاه اقدام به بارگذاری یا خارج نمودن وسایل و موادنگردد.
- در هنگام روشن بودن دستگاه و اتصال آن به پریز اقدام به تمیز نمودن آن نشود.
- پیچ های محکم کنندهٔ درب در هنگام کار دستگاه شل و سفت نشود.

۳- محیط کشت بافت گیاهی

۳-۱ - انواع محیط کشت بافت گیاه

محیط کشت هایی که بیشتر مورد استفاده قرار می گیرند عبارتند از MS ، DKW، گامبورگ(B5) ، وایت ، ناب ، هلر، نیچ ، نیومن و ....غلظت نمک در محیط کشت M.S بالا می باشد و در محیط کشت ناب کمترین غلظت نمک را شاهد هستیم .لذا در هنگام کشت گیاهان حساس به شوری ، از محیط کشت های هلر و ناب استفاده می کنیم و یا این که غلظت نمک محیط کشت MS را به نصف تقلیل داد. کاربرد و نوع محیط کشت مورد استفاده بستگی به نوع ، سن ریزنمونه و هدف از کشت دارد.

۳-۲ - مواد غذایی و عناصر لازم درمحیط کشت

۱- عناصر ماکرو : این مواد به مقداری بیش از میلی مول بر لیتر ، مورد نیاز گیاه می باشند. این عناصر شامل Ca , Mg ,S ,N , P , K , هستند. معمولا عناصر معدنی ماکرو به صورت استوک ساخته و در یخچال نگهداری می شوند .در تهیه استوک باید دقت شودکه مواد ترکیب شده ، تشکیل رسوب ندهند. به عنوان مثال در بین عناصر ماکرو، منیزیوم را معمولا به صورت استوک جداگانه تهیه می کنند.

۲- عناصر میکرو: این مواد به مقداری کمتر از ۰/۵ میلی مول بر لیتر مورد نیاز گیاه می باشند. این عناصر شامل Fe , Mn , Cu , B , Zn , Co , I , Mo می باشند. در میان این عناصر فقط آهن به صورت استوک جداگانه و بقیه عناصر به صورت یک استوک (استوک میکرو) ساخته می شوند .معمولا استوک آهن درون فویل پیچیده می شود زیرا نور تجزیه کننده آهن است. محلول استوک نمک های میکرو همانند استوک نمک های ماکرو برای کوتاه مدت در یخچال قابل نگهداری می باشند. و برای نگهداری طولانی مدت ، از فریزر استفاده می شود.

۳- هیدرات های کربن یا قند ها : افزودن قند در محیط کشت کاملا ضروری است .معمولا از قند ساکاروز ، فروکتوز و گلوکز استفاده می شود. میزان غلظت قند افزوده شده به محیط ، بستگی به نوع ریز نمونه[1] و سن آن دارد .مثلا جنین

1- Explant

های جوان به درصد بالاتری قند نیاز دارند. نکته مهمی که باید توجه کرد این است که قند ها در اثر اتوکلاو نمودن، دچار تغییر می شوند.

۴- ویتامین ها: ویتامین ها نقش کاتالیتیکی در واکنش های آنزیمی دارند. اکثر ویتامین ها توسط گیاه ساخته می شوند. لیکن اضافه نمودن برخی از ویتامین ها نظیر اسید نیکوتینیک [۱](B3)، تیامین[۲] (B1) ، پیرودوکسین [۳](B6)و... به محیط کشت ضروری است. همچنین از ویتامین C به عنوان آنتی اکسیدان استفاده می شود. ویتامین ها معمولا به صورت استوک (100X یعنی صد برابر) تهیه می شوند و بهتر است در فریزر نگهداری شوند .عموما ویتامین ها را توسط صافی ، استریل می کنند و از اتوکلاو (به دلیل حساسیت ویتامین ها به گرما) استفاده نمی شود.

۵- هورمون ها: معمولا هورمون ها در ایجاد تمایز و شکل گیری اندام ها موثر هستند. چندین گروه از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در کشت بافت از اهمیت زیادی برخوردار هستند. این تنظیم کننده‌ها شامل اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، جیبرلین‌ها، اسید آبسیزیک و اتیلن می‌باشند. در کشت درون شیشه‌ای اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها نقش بیشتری دارند. باتنظیم نسبت بین این دو هورمون می توان باعث القا شاخه زایی یا ریشه زایی شد. میزان مصرف اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در محیط کشت بستگی به نوع ریزنمونه و گونه گیاهی وهدف کشت دارد . برخی ریزنمونه‌ها اکسین کافی تولید می‌کنند و با این مقدار اکسین، تقسیم شده و رشد می‌کنند. چنین سلول‌هایی نیاز به افزودن اکسین در محله استقرار یا شاخه زایی ندارند .

۵-۱- اکسین‌ها: معروفترین اکسین ها شامل اسید ایندول استیک[۴] (IAA)، اسید ایندول بوتیریک[۵] (IBA)، اسید نفتالین استیک[۶] (NAA)، ۲و۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید[۷] (2,4-D) وتری یدو بنزوییک اسید[۸] (TIBA) می‌باشند

1- Nicotinic acid
2-Thiamine hydrochloride
3- Pyridoxine hydrochloride
4- Indole-3-acetic acid
5- Indole-3-butyric acid
6- 1-Naphthaleneacetic acid
7- 2,4- Dichlorophenoxy acetic acid
8- 2,3,5- Triodobenzoic acid

که در تشکیل ریشه نابجا (در غلظت بالا)، تشکیل ساقه نابجا (در غلظت کم)، القای جنین سماتیکی، تقسیم سلولی، تشکیل و رشد کالوس، جلوگیری از رشد جوانه جانبی و جلوگیری از رشد ریشه در غلظت های زیاد (اکسین در غلظت های زیاد باعث بیوسنتز اتیلن می شود) نقش دارند. همچنین باعث طویل شدن سلول، تورم بافت، القا جنین زایی، تقسیم سلولی میگردند. 2,4-D معمولاً برای القای تشکیل کالوس استفاده می شود

۵-۲- سیتوکینین‌ها: معمول ترین سیتوکینین‌ها بنزیل آمینوپورین[۱] (BA) ، دی متیل آلیل آمینو پورین[۲] (2ip)، کینتین [۳] وتیدیازرون[۴] (TDZ) می‌باشند که در تشکیل شاخه نابجا، جلوگیری از تشکیل ریشه، تقسیم سلولی، تشکیل و و رشد کالوس، تحریک رشد جوانه جانبی، جلوگیری از رشد طولی شاخه و جلوگیری از پیری برگ مؤثر هستند. هنگامی که در غلظت مناسب استفاده شوند، باعث تقسیم سلولی، تحریک شاخه زایی وتنظیم تمایز شده وهمچنین سنتتاز را فعال کرده وباعث تحریک فعالیت پروتیین ها وآنزیم ها می شوند.

۵-۳- جیبرلین‌ها: شامل اسید جیبرلیک (GA3)، جیبرلین ۱ (GA1)، جیبرلین ۴ (GA4)، جیبرلین ۷ (GA7) می‌باشند که باعث رشد طولی شاخه، رفع دوره خواب (بذر، جنین سماتیک، جوانه انتهایی) و جلوگیری از تشکیل ریشه نابجا می‌شوند.

۵-۴- اتیلن: سبب پیری برگ، رسیدگی میوه، تحریک یا بازدارنده تشکیل اندام‌های نابجا (بسته به زمان مصرف یا ژنوتیپ) می‌شود. آمینوسیکلوپروپان-۱-اسیدکربوکسیلیک[۵] (ACC) پیش ماده سنتز اتیلن است و توسط بافت‌های گیاهی به اتیلن تبدیل می‌شود .

۶- **اسید های آمینه** : آمید ها واسید های آمینه دارای نقش مهمی در مورفوژنسیس هستند. ال- تیروزین[۶] باعث

1- Benzylaminopurin
2- 6-(Y,Y- Dimethyl allyl amino)purine
3- Kinetine
4- Thidiazuron
5- Aminocyclopropan carboxylic acid
6- L-Tirisine

تحریک جوانه زنی و ال- آرژنین[1] باعث تسهیل ریشه زایی می شود. ال- سرین[2] در کشت میکروسپور برای تسهیل تولید هاپلوییدی و آمید هایی چون ال -گلوتامین[3] و ال-آسپاراژین[4] اثر قابل توجهی در جنین زایی سوماتیکی دارند.

۷- آگار وسایر مواد جامد کننده محیط: آگار با غلظتی حدود ۰/۶تا۰/۸ درصد و در مراحل انتهایی تهیه محیط کشت افزوده می شود. برای مقابله با شیشه ای شدن غلظت آگار را بیشتر می کنند. اگر غلظت آگار بیشتر باشد پتانسیل ماتریک تغییر می کند و جذب آب دچار اختلال می شود. همچنین جذب مواد غذایی کمتر می شود و روی رشد اثر کرده و ساقه های جانبی کمتر رشد می کنند. در کشت پروتوپلاسم از آگاروز به جای آگار استفاده می شود. درصد خلوص آگاروز بالاتر از آگار است و ژله آگاروز شفاف تر است. از سایر مواد منعقد کننده می توان به ژل رایت و آلزینات را نام برد. ژل رایت با غلظتی حدود ۰/۲ درصد به کار می رود و انعقاد آن بستگی به دادن حرارت و میزان کاتیون های نمک های دو ظرفیتی دارد.آگار به عنوان تنها ماده جامد کننده محیط کشت استفاده نمی شود .بر حسب نوع کشت یا هدف از جامد کننده های دیگر نیز استفاده می گردد. به جدول صفحه بعد توجه کنید.

جدول۱- راهنمای استفاده از جامد کننده های محیط کشت

7- L-Arginine
8- L-Serine
9- L-Glutamine
10- L-Asparagine

Prod. No.	*Desc.*	*Use*	*Gelling Temp 0C*	*pH at 1.5%*	*Ash Content*	*Typical ICP Analysis (%)*				
						Ca	Mg	K	P	Na
A 1296	Agar	General purpose agar for most research and production needs. Use at 6-12 g/L.	32-35	7.0-7.5	2-5%	0.30	0.10	0.01	0.01	0.5
A 6686	Agar Bacteriological	Bacteriological grade agar for most microbiological work. Use at 6-12 g/L.	32-39	6.5-7.5	3-7%	0.17	0.09	0.80	—	3.1
A 4550	Agar Type A	General purpose agar; good bacteriological grade agar. Use at 6-12 g/L.	26-28	7.2-7.7	5-6%	0.01	0.01	0.1	0.17	1.8
A 4675	Agar Type E	General purpose agar; Use at 5-10 g/L.	26-28	7.5-8.0	3-4%	0.02	0.02	0.07	0.13	1.2
A 4800	Agar Type M	General purpose agar; Use at 5-11 g/L.	34-36	7.0-7.5	3-6%	0.09	0.14	0.07	0.01	1.4
A 9799	Agar High Gel Strength	Use when firmer gel is required. Use at 4-8 g/L.	34-37	6.5-7.0	3-4%	0.03	0.00	0.07	0.09	0.72
A 7921	Agar Purified	High purity agar for research and protoplast culture. Use at 6-12 g/L.	30-35	6.5-7.0	2.0%	0.02	0.01	0.01	0.01	0.35
A 8678	Agar Washed	High-purity agar for research and protoplast culture. Prepared through a series of purified water and solvent washes. Use at 6-10 g/L.	25-27	7.0-7.5	2.2%	0.15	0.08	—	—	0.38
A 6560	Agarose	A low-gelling temperature agarose with excellent clarity. Use at 6-10 g/L.	26-30	7.0-8.0	<1%	—	—	—	—	—
A 0682	Alginic Acid	A polyuronic acid which forms gels. Excellent product for plating out protoplast cultures or cell suspension cultures.	—	—	—	0.17	0.01	2.3	—	10.1
A 3301	Agargel™	A blend of agar and Phytagel offering the positive aspects of both products. Produces a semi-clear gel. Use at 3.5-5.0 g/L.	26-28	7.2-7.7	4-5%	0.25	0.06	0.04	0.08	1.05
P 8169	Phytagel™	Produces a clear, colorless high-strength gel. Use at 1.5-2.5 g/L.	27-31	6.5-7.0	9.5%	0.85	0.35	1.70	0.15	0.45

۸- آب: از آنجا که ۹۵ درصد محیط کشت را آب تشکیل می دهد، به کیفیت آب بایستی توجه ویژه ای داشت. برای موارد تحقیقاتی، آبی استفاده شود که در ظروف پیرکس تقطیر شده باشد وبرای ازمایشات با سلول ، پروتوپلاست ومریستم از آب دو بار تقطیر استفاده شود. برای نگهداری آب مقطر بهتر است از ظروف پلاستیکی استفاده گردد چون ظروف شیشه ای ذرات سرب، سدیم وآرسنیک را آزاد می نمایند. در صورت استفاده از ظروف شیشه ای باید جنس آن ها پیرکس باشند. از آب لوله کشی نباید برای کشت بافت استفاده شود.

۳-۳- انتخاب محیط کشت مناسب

انتخاب صحیح محیط کشت عامل مهمی در موفقیت ریز ازدیادی گیاهان است.یک محیط کشت واحد را نمی توان برای انواع کشت ها توصیه کرد وضروری است بر حسب انواع مختلف ریز نمونه تغییراتی در عناصر ماکرو، میکرو، ویتامین ها و به ویژه هورمون ها وحتی شرایط نوری ودمایی داده شود. بنابر این فرمول یک محیط کشت به نوع ریز نمونه و هدف از کشت آن بستگی دارد. اهمیت انتخاب محیط کشت به حدی است که اکثر تحقیقات در زمینه کشت بافت گیاهان به انتخاب محیط کشت مناسب وتنظیم هورمونی درست، برای دستیابی به رشد ونمو بهینه ریز نمونه های مختلف متمرکز است.در هر حال با توجه به واکنش ویژه هر جنس، گونه یا رقم خاص به عوامل مختلف محیط کشت، لازم است شرایط برای همان گیاه بهینه شود واستنباط می شود کارایی محیط کشت وابسته به ژنوتیپ است .به عنوان مثال در کشت درون شیشه ای بادام محیط AP برای استقرار کشت رقم *Nonpareil* مناسب بوده در حالیکه برای رقم Ne plus ultra محیط MS کارایی بهتری داشته است.

۴-۳- اجزاء محیط کشت : محیط کشت مناسب برای رشد، تقسیم و تمایز سلول‌های ریزنمونه بایستی دارای آب، مواد معدنی، ویتامین‌ها، اسید های آمینه، هورمون ها، مواد قندی و سایر ترکیبات آلی باشد. علاوه بر آن محیط کشت نقش نگهداری ریزنمونه را نیز بر عهده دارد. اجزاء محیط کشت MS به عنوان متداول ترین محیط در کشت بافت گیاهی به شرح ذیل است.

Major salts (macronutrients)

Ammonium nitrate (NH_4NO_3) 1,650 mg/l

Calcium chloride ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 440 mg/l

Magnesium sulphate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 370 mg/l

Potassium phosphate (KH_2PO_4) 170 mg/l

Potassium nitrate (KNO_3) 1,900 mg/l

Minor salts (micronutrients)

Boric acid (H_3BO_3) 6.2 mg/l

Cobalt chloride ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) 0.025 mg/l

Cupric sulphate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 0.025 mg/l

Ferrous sulphate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) 27.8 mg/l

Manganese sulphate ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) 22.3 mg/l

Potassium iodide (KI) 0.83 mg/l

Sodium molybdate ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) 0.25 mg/l

Zinc sulphate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) 8.6 mg/l

$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 37.2 mg/l

Vitamins

i-Inositol 100 mg/l

Niacin 0.5 mg/l

Pyridoxine · HCl 0.5 mg/l

Thiamine · HCl 0.1 mg/l

Glycine (recrystallized) 2.0 mg/l

۵-۳- تهیه اجزای محیط کشت به صورت استوک

برای عناصر ماکرو ، میکرو ، ویتامین ها ، هورمون های اکسین و سیتو کینین، استوک(محلول غلیظ) تهیه می گردد. تهیه محلولها به صورت غلیظ در آزمایشگاه (10x, 100x, 1000x) باعث صرفه جویی در وقت وهمچنین امکان تنوع بیشتر در برنامه های پژوهشی را فراهم می کند.

عناصر ماکرو: این مواد به مقداری بیش از ۰/۵ میلی مول بر لیتر ، مورد نیاز گیاه می باشند. این عناصر شامل : Ca , Mg, S,N , P , K می باشند. معولا عناصر معدنی ماکرو به صورت استوک ساخته و در یخچال نگهداری می شوند. در تهیه استوک باید دقت شودکه مواد ترکیب شده ، تشکیل رسوب ندهند. به عنوان مثال در بین عناصر ماکرو، منیزیوم را معمولا به صورت استوک جداگانه تهیه می کنند.

عناصرمیکرو: این مواد به مقداری کمتر از ۰/۵ میلی مول بر لیتر مورد نیاز گیاه می باشند.این عناصر شاملMn , Fe Cu , B , Zn , Co , I , Mo می باشند.در میان این عناصر فقط آهن به صورت استوک جداگانه و بقیه عناصر به صورت یک استوک (استوک میکرو) ساخته می شود.

تهیه استوک کلات آهن: تهیه ۱ لیتر محلول استوک ۲۰۰ برابر کلات آهن به شرح زیر است:

۱- ۷/۴۵ گرم Na2EDTA را در ۳۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. (ممکن است حرارت لازم باشد)

۲- ۵/۲۵ گرم سولفات آهن با ۷ مولکول آب را در ۳۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید تا محلول شفاف زرد کم رنگ بدست آید. (ممکن است حرارت لازم باشد)

۳- دو محلول را با هم مخلوط کرده وبه حجم آن را به ۱ لیتر برسانید.

۴- محلول را در شیشه ای تیره جهت جلوگیر از تجزیه نور ذخیره کنید.

نکات:

- معمولا استوک آهن درون فویل پیچیده می شود زیرا نور تجزیه کننده آهن است.

- محلول استوک نمک های میکرو همانند استوک نمک های ماکرو برای کوتاه مدت در یخچال قابل نگهداری است. و برای نگهداری طولانی مدت ، از فریزر استفاده می شود.

ویتامین ها:. ویتامین ها معمولا به صورت استوک (صد برابر) تهیه می شوند عموما ویتامین ها را توسط صافی ، استریل می کنند و از اتوکلاو (به دلیل حساسیت ویتامین ها به گرما) استفاده نمی شود.

نکات قابل ملاحظه در تهیه محلول های استوک

۱- در تهیه محلول استوک ها از آب مقطر استفاده شود.

۲- استوک نیترات معمولاً رسوب می دهد و قبل از استفاده باید تا حل شدن رسوبات حرارت داده شود.

۳- محلول های استوک غیر شفاف یا دارای رسوب، حذف شوند.

۴- مشخصات هر محلول استوک شامل میزان غلظت، تاریخ تهیه ونام تهیه کننده بر روی برچسب ظرف آن ثبت شود.

۵- برداشت از هر استوک با وسیله (پیپت یا استوانه مدرج) تمیزانجام شود تا از ایجاد هر گونه آلودگی وناخالصی ممانعت گردد.

۶- مقدار برداشت از محلول استوک به میزان غلظت آن و حجم محلول کشت بستگی دارد.

۷- جهت اجتناب از اشتباه، تمام مراحل تهیه محلول های کشت در فرم مخصوص ثبت شود ودر سوابق کار نگهداری شود.

۶-۳- تنظیم کننده‌های رشد (هورمون های گیاهی)

چندین گروه از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در کشت بافت از اهمیت زیادی برخوردار هستند. این تنظیم کننده‌ها شامل اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، جیبرلین‌ها، اسید آبسیزیک و اتیلن می‌باشند.

۳-۷ - تهیه استوک هورمون ها

۱-۷-۳- تهیه استوک اکسین : اکسین های کاربردی در آزمایشگاه های کشت بافت، اسید ایندول استیک (IAA)، اسید ایندول بوتیریک (IBA)، اسید نفتالین استیک (NAA)،۲و۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید(2,4-D) وتری یدو بنزوییک اسید (TIBA) می‌باشند ..محدوده غلظت کاربردی اکسین ها بین (۱۰-۰/۰۱)میلی گرم درلیتر است.

استوک اکسین، معمولاً با توزین۱۰ میلی گرم اکسین در حجم ۱۰۰ میلی لیتر تهیه می شود. بهتر است که اکسین ها را درچند قطره هیدروکسید سدیم یا هیدروکسید پتاسیم ۱ نرمال(بیشتر از ۰/۳ میلی لیتر نشود) ابتدا حل نموده ، سپس با آب مقطردو بار به حجم برسانیم.اکسین در اتانول۹۵٪ نیز حل می شود، اما اتانول برای گیاه سمی است.

۲-۷-۳- تهیه استوک سیتوکینین : معمول ترین سیتوکینین‌های کاربردی بنزیل آمینوپورین (BA) ،دی متیل آلیل آمینو پورین (2ip)، کینتین (kin) و Thidiazuron (TDZ) می‌باشند .

محدوده غلظت کاربردی سیتوکینین ها بین(۱۰-۰/۰۱) درلیتر است. سیتوکینین ها نیز در هیدروکسید سدیم یا هیدروکسید پتاسیم ۰/۱ مولار ابتدا حل نموده ، سپس با آب مقطر به حجم می رسانیم. از دو سیتوکینین مصنوعی

(کینیتین و بنزیل آدنین) به وفور در کشت بافت استفاده می شود.لازم به ذکر است که سیتوکینین های مصنوعی در برابر نور و دما پایدار ترند.

توجه۱: کینتین وزآتین از سیتوکینین های مقاوم به حرارت هستند وتا یک ساعت در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد تجزیه نمی شوند. BA, 2ip تا ۲۰ دقیقه در دمای۱۰۰ درجه سانتی گراد تجزیه نمی شوند.

توجه۲ : محلول های ذخیرهIAA وکینتین در نور تجزیه شده و باید در تاریکی نگهداری شوند.محلول استوک تهیه شده در یخچال نگهداری شود.

۳-۷-۳- تهیه استوک جیبرلین: جیبرلین‌ها شامل اسید جیبرلیک (GA3) ، جیبرلین ۱ (GA1) ، جیبرلین ۴ (GA4) ، جیبرلین ۷ (GA7) می‌باشند که باعث رشد طولی شاخه، رفع دوره خواب (بذر، جنین سماتیک، جوانه انتهایی) و جلوگیری از تشکیل ریشه نابجا می‌شوند. معروف ترین جیبرلین ها ، GA3 می باشد. جیبرلین ها به علت این که مانع

رشد کالوس شده وهمچنین باعث القا اکسین برای ایجاد ریشه های نابجا می شوند در کشت بافت استفاده میشوند. محلول در آب هستند واز آنجاییکه در محیط اسیدی یا قلیایی به ایزومر غیر فعال تبدیل می شوند محلول استوک آن در PH=5.7 نگهداری می گردد. این مواد نسبت به دما بسیار حساس هستند و در اتوکلاو تا ۹۰٪ تجزیه می شوند . بهتر است از میکرو فیلتر برای استرلیزاسیون آن استفاده شود.

جدول۲- راهنمای تهیه محلول تنظیم کننده های رشد

Auxins									
Product Name	**Product Number**	**Molar Equivalence**		**Solution Preparation**					
		Mol. Wt.	**µM for 1mg/L**	**Solvent**	**Diluent**	**Powder Storage**	**Liquid Storage**	**Steriliz-ation***	**Working Conc. (mg/L)**
p-Chlorophenoxyacetic acid (4-CPA)	C0413	186.6	5.36	EtOH	—	RT	2-8°C	CA	0.1-10.0
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	D7299	221	4.53	—	—	RT	2-8°C	CA	0.01-6.0
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid Sodium salt	D6679	243	4.12	Water	—	RT	2-8°C	CA	0.01-6.0
Indole-3-acetic acid Free acid (IAA)	I2886	175.2	5.71	EtOH/1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.01-3.0
Indole-3-acetic acid Sodium salt	I5148	197.2	5.07	Water	Water	2-8°C	-0°C	CA/F	0.01-3.0
Indole-3-acetic acid methyl ester	I9770	189.2	5.29	—	—	2-8°C	2-8°C	—	—
Indole-3-acetyl-L-aspartic acid	I9387	290.3	3.45	0.5N NaOH	Water	-0°C	-0°C	F	0.01-5.0
Indole-3-butyric acid (IBA)	I5386	203.2	4.90	EtOH/1N NaOH	Water	2-8°C	-0°C	CA/F	0.1-10.0
Indole-3-butyric acid Potassium salt (K-IBA)	I7512	241.3	4.14	Water	—	2-8°C	-0°C	CA/F	0.1-10.0
alpha-Naphthaleneacetic acid Free acid (NAA)	N0640	186.2	5.37	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	CA	0.1-10.0
beta-Naphthoxyacetic acid Free acid (NOA)	N3019	202.2	4.95	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	CA	0.1-10.0
Phenylacetic acid (PAA)	P6061	136.2	7.34	EtOH	—	RT	2-8°C	CA/F	0.1-50.0
Picloram	P5575	241.5	4.14	DMSO	—	RT	2-8°C	CA	0.01-10.0

2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)	T5785	255.5	3.91	EtOH	—	RT	2-8°C	CA	0.01-5.0
2,3,5-Triiodobenzoic acid Free acid (TIBA)	T5910	499.8	2.00	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	F	0.05-5.0

***CA** = coautoclavable with other media components. **F** = filter sterlize. **CA/F** = coautoclavable with other media components, however, some loss of activity may occur. This can be compensated for by increasing component concentration. Component may be filter sterilized.

Cytokinins

Product Name	Product Number	Molar Equivalence		Solution Preparation					
		Mol. Wt.	µM for 1mg/L	Solvent	Diluent	Powder Storage	Liquid Storage	Steriliz-ation*	Working Conc. (mg/L)
Adenine Free base	A 5665	135.1	7.40	1.0 HCl	Water	RT	2-8°C	CA	50-250
denine hemisulfate Hemisulfate salt	A 2545	184.2	5.43	Water	—	RT	2-8°C	CA	50-250
6-Benzylaminopurine (BA)	B 3408	225.3	4.44	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	CA/F	0.1-5.0
6-Benzylaminopurine Hydrochloride	B 5920	261.7	3.82	Water	—	RT	2-8°C	CA/F	0.1-5.0
6-Benzylaminopurine (BA)	B 3274	225.3	4.44	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	CA/F	0.1-5.0
N-Benzyl-9-(2-tetrahydropyranyl)adenine (BPA)	B 2275	309.4	3.23	EtOH	—	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-5.0
N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (4-CPPU)	C 2791	247.7	4.04	DMSO	—	2-8°C	2-8°C	F	0.001-1.0
6-(gamma,gamma-Dimethylallylamino)purine (2iP)	D 7674	203.2	4.92	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	1.0-30.0
6-(gamma,gamma-Dimethylallylamino)purine (2iP)	D 5912	203.2	4.92	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	1.0-30.0
1,3-Diphenylurea (DPU)	D 7535	212.3	4.71	DMSO	—	RT	2-8°C	F	0.1-1.0
Kinetin	K 0753	215.2	4.65	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-5.0
Kinetin	K 3378	215.2	4.65	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-5.0
Kinetin	K 3253	215.2	4.65	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-5.0

Kinetin Hydrochloride	K 1885	251.7	3.97	Water	—	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-5.0
1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea	P 6186	220.2	4.54	DMSO	—	RT	2-8°C	CA/F	0.001-0.05
trans-Zeatin Free base	Z 0876	219.2	4.56	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.01-5.0
Zeatin	Z 0164	219.2	4.56	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.01-5.0
trans-Zeatin Hydrochloride	Z 2753	255.7	3.91	Water	—	-0°C	-0°C	CA/F	0.01-5.0
trans-Zeatin riboside	Z 3541	351.4	2.85	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	F	0.01-5.0

*CA = coautoclavable with other media components. F = filter sterlize. CA/F = coautoclavable with other media components, however, some loss of activity may occur. This can be compensated for by increasing component concentration. Component may be filter sterilized.

Miscellaneous Plant Growth Regulators

Product Name	Product Number	Molar Equivalence		Solution Preparation					
		Mol. Wt.	µM for 1mg/L	Solvent	Diluent	Powder Storage	Liquid Storage	Steriliz-ation*	Working Conc. (mg/L)
(±)-cis,trans-Abscisic acid (ABA)	A 1049	264.3	3.78	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-10.0
Ancymidol	A 9431	256.3	3.90	DMSO	—	2-8°C	-0°C	CA/F	1.0-10.0
Chlorocholine chloride (CCC)	C 4049	158.1	6.33	Water	—	RT	2-8°C	F	up to 500
3,6-Dichloro-o-anisic acid (Dicamba)	D 5417	221.0	4.52	EtOH/Water	—	2-8°C	2-8°C	F	0.01-10.0
Gibberellic acid (GA3)	G 7645	346.4	2.89	EtOH	—	RT	2-8°C	CA/F	0.01-5.0
Gibberellic acid Potassium salt (K-GA3)	G 1025	384.5	2.60	Water	—	2-8°C	-0°C	CA/F	0.01-5.0
Gibberellin A4 Free acid (GA4)	G 7276	332.4	3.01	EtOH	—	-0°C	-0°C	F	0.01-5.0
(±)-Jasmonic acid	J 2500	210.3	4.76	EtOH	—	2-8°C	-0°C	F	0.01-100.0
Phloroglucinol	P 1178	126.1	7.93	Water	—	RT	2-8°C	CA/F	up to 162
N-(Phosphonomethyl)glycine (Glyphosate)	P 9556	169.1	5.91	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	F	—
Succinic acid 2,2-dimethylhydrazide	S 2022	160.2	6.24	Water	—	2-8°C	2-8°C	CA/F	0.1-10.0

*CA = coautoclavable with other media components. F = filter sterlize. CA/F = coautoclavable with other media components, however, some loss of activity may occur. This can be compensated for by increasing component concentration. Component may be filter sterilized.

۸-۳- ویتامین ها

محلول پایه ویتامین ها ۱۰یا ۱۰۰ برابر غلظت تهیه می شوند. به این ترتیب که ابتدا هر یک از ویتامین ها را جداگانه وزن کرده و در آب مقطر حل ودر بالن ژوژه ۱۰۰میلی لیتر ریخته و به حجم می رسانیم.

- **نکته :** برای عناصر ماکرو ، میکرو ، ویتامین ها ، هورمون های اکسین و سیتو کینین، استوک می سازیم و برای قند هیچ وقت استوک تهیه نمی کنیم، بلکه به صورت جامد (پودر) استفاده می گردد. میزان غلظت قند افزوده شده به محیط ، بستگی به نوع ریز نمونه (Explant) و سن آن دارد. مثلا جنین های جوان به درصد بالاتری از قند نیاز دارند. نکته مهمی که باید توجه کرد این است که قند ها در اثر اتوکلاو نمودن، دچار تغییر می شوند.

۹-۳ - تهیه محیط کشت ریزازدیادی

برای تهیه یک لیتر محیط کشت MS ، ابتدا در یک بشر۲ لیتری ، ۷۰۰سی سی آب مقطرریخته، سپس با توجه به دستورالعمل های محیط کشتMS، وغلظت استوک های ذخیره، مقادیر مناسبی از استوک عناصر ماکرو و میکرو ، به آب مقطر اضافه می شود. سپس از استوک هورمون ها و ویتامین ها بر حسب غلظت ، مقدار مناسب اضافه می گردد. باید توجه شود که هورمون ها و ویتامین های حساس به حرارت راابتدا با فیلتر ۰/۲۲ میکرون ضد عفونی کرده و پس از اتوکلاو نمودن محیط کشت ، اضافه شوند. ساکارزدر غلظت مناسب با نوع ریز نمونه (۳ تا۶ درصد)بصورت پودربه سایر مواد اضافه می گردد. قبل از اضافه کردن آگار باید PH را روی ۵.۵ تا ۵.۸ تنظیم کرد. عمل تنظیم pH با استفاده از دستگاهpH متر با اضافه نمودن هیدروکسید سدیم یاپتاسیم ویا اسید کلریدریک ۱ نرمال انجام می شود.

عمل تنظیم pH بسیار مهم است، چون اگر pH محیط کشت بالاتر از۶ باشد، رشد مطلوبی صورت نمـی گیـرد و اگـر pH خیلی پایین باشد، اکسین و جیبرلین ناپایدار ، ویتامین تیامین ناپایدار ، محیط کشـت آبکـی و احتمـال ویتریفیکاسـیون بیشتر می شود. .

پس از تنظیم PH ، آگار اضافه گردد. البته دقت شود که بعد از اضافه کردن آگار ، حتما محیط کشت حرارت داده شود (تا نزدیک نقطه جوش) تا حلالیت آگار بیشتر شود.

پس از اضافه کردن آگار، توسط همزن ، مواد را مخلوط کرده تا محلولی شفاف به دست آید. سـپس محـیط کشـت را بـه درون ویال ها (شیشه های مورد استفاده) انتقال داده و در نهایت ویال هـا را در دسـتگاه اتـوکلاو (بـه منظـور اسـتریل کردن) قرار داده شوند. .گاهی بنا بر هدف کشت لازم است از بعضی مواد حساس به دما، مثل آنتی بیوتیک استفاده کـرد. در این صورت ابتدا محیط کشت را به صورت کامل اتوکلاو کرده وپس آز این که دمای آن حدود ۷۰ درجه سـانتی گـراد رسید، آنتی بیوتیک را افزوده وسپس محیط کشت استریل در ظروف کشت که قبلاً استریل شده توزیع گردد.

۱۰ -۳- ضد عفونی کردن محیط کشت: استفاده از اتوکلاو متداول ترین روش ضدعفونی کردن محیط کشت است.لازم به ذکر است ، در مواد حساس به گرما از فیلتر های میکرونی وهمچنین استرلیزاسون سریع محلول کشت را می توان در مایکرو ویو نیز انجام داد.

۱-۱۰-۳ - اتوکلاو: اگر چه اتوکلاو بهترین وسیله برای استریلیزاسیون است، ولی طولانی شدن مرحلـهٔ گرمـایی، سـبب کاهش کیفیت مواد مغذی در محیط های کشت کمپلکس محتوی قند، مواد معدنی و فلـزی مـی شـود و در نتیجـه بـه محیط های کشت زیان وارد می کند. بنابراین در چرخهٔ استریلیزاسیون باید از زمان کوتاهتر و دمای بالاتر استفاده کنـیم تا علاوه بر آن که آسیب کمتری به محیط کشت وارد می شود، برای ارگانیسم نیز کشنده تر باشد.

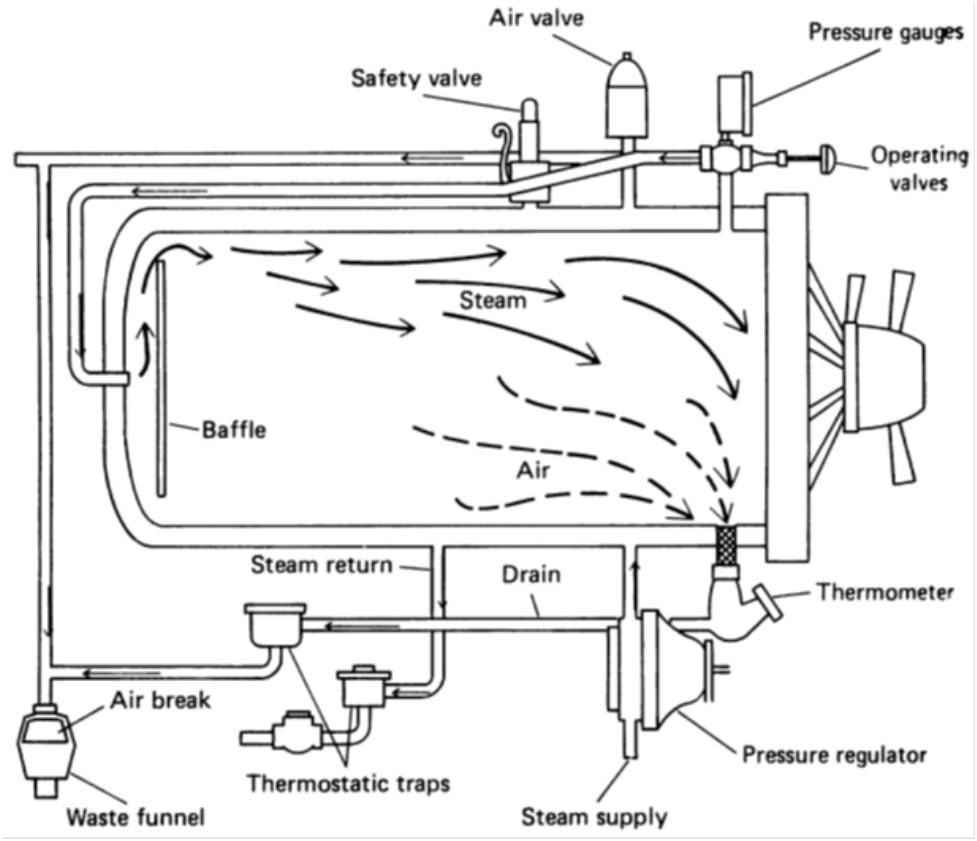
۲-۱۰-۳- مراحل چرخهٔ استریلیزاسیون در اتوکلاو

مرحلهٔ ۱ : زمان بالا رفتن دما در محفظهٔ اتوکلاو (۲۰ °C-۱۲۱°C)

مرحلهٔ ۲ : زمان نفوذ گرما به داخل ظرف محیط کشت (<۱۰۰°C -۱۲۱°C)

مرحلهٔ ۳ : زمان نگهداری در دمای مقرر (۱۲۱˚C)

مرحلهٔ ۴ : زمان پایین آمدن دمای محفظه (۱۲۱˚C-۸۰˚C)



شکل ۵- طرح شماتیک عملکرد اتوکلاو

۳-۱۰-۳ - مدت زمان استریل کردن: مدت زمان استریل کردن و دمای مورد نیاز بسته به حجم محیط کشت متفاوت است. موادی که بخشی از آنها در اثر اتوکلاو تجزیه می‌شود شامل ساکارز، کلشیسین، زآتین، اسید جیبرلیک، ویتامین های C، B1 , B2 , B3 , B5 , B12، آنتی بیوتیک‌ها ، شیره‌های گیاهی، آنزیم‌ها، فروکتوز، اسید ایندول استیک، گلوتامین، آسپارژین و سولفات آدنین می‌باشند .

مدت زمان بر اساس حجم نمونه به شرح زیرمتغیر است.

حجم محیط کشت (میلی لیتر)	حداقل زمان اتوکلاو(دقیقه)
۲۵	۲۰
۵۰	۲۵
۱۰۰	۲۸
۲۵۰	۳۱
۵۰۰	۳۵
۱۰۰۰	۴۰
۲۰۰۰	۴۸
۴۰۰۰	۶۳

۴-۱۰-۳- تکات مهم در استریلیزاسیون محیط های کشت و محلول ها با اتوکلاو

- بهتر است از لوله و ارلن درپیچ دار استفاده شود. بیشتر از ۲/۳ آنها را پر نکنید. درپیچ آنها شل باشد.
- از قرار دادن اشیاء بر روی یکدیگر پرهیز شود. باید فاصلهٔ اشیاء از یکدیگر و از دیواره های اتوکلاو حداقل ۵ سانتی متر باشد تا بخار جریان یابد.
- دمای استریلیزاسیون به دمای چمبر اتوکلاو برمی گردد نه به دمای محیط کشت. زمان لازم برای رسیدن به این دما باید در حد ممکن کوتاه باشد.
- مدت زمان استریل کردن محیط کشت به حجم نمونه بستگی دارد.

۵-۱۰-۳- مزایا ومعایب استرلیزاسیون محیط های کشت با اتو کلاو

از مزایای این روش استریل کردن، سرعت، سهولت و اطمینان به از بین رفتن کلیه عوامل بیماری‌زا، از جمله ویروس‌ها می‌باشد . از معایب این روش، کاهش pH محیط کشت (۱/۳-۰/۶)، تجزیه برخی اجزای محیط کشت (اسیدهای آمینه، هورمون‌ها و هیدرات‌های کربن) و قهوه‌ای شدن قندها (کاراملە شدن) می‌باشد. در اثر طولانی شدن مدت اتوکلاو برخی نمک‌ها ته‌نشین و آگار تجزیه می‌شود .

نکته ها

۱- محلول های کشت را بلا فاصله بعد از تهیه باید اتوکلاو کرد.در صورت عدم امکان، محلول ها تا زمان اتوکلاو در یخچال نگهداری گردند. .محیط کشت های سرد شده پیش از اتوکلاو باید تا دمای اتاق گرم شوند.

۲- بعضی از مواد مورد استفاده در محیط کشت، در حرارت تجزیه می شوند. برای استریل کردن آن ها، باید فیلتر شوند و به محلول اتوکلاو شده در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد اضافه شوند(فیلتر های ۰/۲۲ میکرون معمولااستفاده می شود).

۳- ظروف کشت را تا سردشدن کامل محیط کشت جابجا نکنید.برای حفظ رطوبت کافی در ظروف بهتر است در پوشش پلاستیکی وجای خنک قرار داده شوند.

۴- pH محیط کشت بعد از اتوکلاو نمودن ۳ /۰تا ۰/۵ کاهش می یابد. یعنی محیط کشت کمی اسیدی تر می شود.

۵- اتوکلاو کردن طولانی مدت، سبب رسوب برخی نمک ها و تجزیه آگار و قند ها می شود.

۶- مواد فرار از قبیل اتر ، اتیلن و ... در اثر اتوکلاو نمودن از بین می روند.

۶-۱۰-۳- میکرو فیلتراسیون

روش دوم استریل کردن محیط کشت، استفاده از فیلتر سرد است. این روش در مورد مواد حساس به گرما به کار می‌رود. در این روش محیط‌های کشت مایع از یک غشا ۰/۲۲ میکرونی عبور داده می‌شوند و کلیه میکروارگانیزم‌ها و ویروس‌هایی

که بزرگ‌تر از قطر منافذ فیلتر (۰/۴۵-۰/۲۲) هستند، حذف می‌شوند. جنس فیلتر استات سلولز یا نیترات سلولز است.جنس فیلتر باید مناسب حلال ماده مورد نظر باشد.

از معایب این روش می‌توان به جذب برخی مواد توسط فیلتر، عبور احتمالی برخی ویروس‌ها و وقت‌گیر بودن آن نسبت به روش قبل اشاره کرد. در این روش ابتدا باید کلیه اجزا از جمله قیف همراه با فیلتر به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شود. سپس توسط پمپ خلاء متصل به ارلن، در آن خلاء ایجاد شود و محلول از قسمت بالا وارد قیف شده و در اثر خلاء ایجاد شده محلول از غشا عبور کرده، وارد ارلن استریل شده می‌شود .

۴- کشت درون شیشه ای

انجام عملیات کشت درون شیشه حتی در یک آزمایشگاه پاکیزه بدون هرگونه آلودگی قارچی وباکتریایی باید در

اتاقک های مخصوص دارای هوای فیلتر شده ودیوارهای قابل شستشو ومجهز به لامپ های ماورای بنفش انجام شود.کابینت ها ی لامینر (هود استریل) با ایجاد یک جریان هوای نواری واستریل، سطح میز کابینت را از نشستن گرد وغبار ومیکرو ارگانیسم ها حفظ می کنند .این دستگاه ها دارای لامپ های سفید وبنفش نیز هستند.

۱-۴- مراحل ریز ازدیادی

۱- ا نتخاب مواد گیاهی

۲ – استقرار

۳- تکثیر

۴- طویل شدن شاخه

۵- القاء ریشه زایی

۶- سازگاری

۲-۴- مراحل انجام کشت بافت گیاه

۱-۲-۴- تهیه ریز نمونه : ریز نمونه ها بر اساس اهداف پروژه تحقیقاتی از قسمت های مختلف گیاه تهیه می شوند.

۲-۲-۴- ضدعفونی کردن ریز نمونه: ریز نمونه های گیاهی را ابتدا با استفاده از مواد شوینده وسپس ضد عفونی کننده ودر انتها شستشو با آب مقطر استریل، آماده کشت استریل می کنند. انتخاب نوع ماده شیمیایی، غلظت، وزمان تیماربر اساس نوع بافت وشدت آلودگی تعیین می گردد. متداول ترین مواد ضد عفونی کننده های ریز نمونه های گیاهی طبق جدول ذیل می باشند:

ماده ضدعفونی کننده	غلظت (در صد)	زمان (دقیقه)
هیپو کلریت کلسیم	۹-۱۰	۵-۳۰
هیپو کلریت سدیم	۰/۵ -۵	۵-۳۰
پر اکسید هیدروژن	۳-۱۲	۵-۱۵
اتیل الکل	۷۰-۹۵	۰/۱-۵
نیترات نقره	۱	۵-۳۰
کلرید جیوه	۰/۱-۱	۲-۱۰
کلرید بنزال کونیم	۰/۰۱-۰/۱	۵-۲۰

نکته ۱- افزودن Tween 20 یا 80 به مواد ضدعفونی کننده ریزنمونه به دلیل کاهش کشش سطحی باعث افزایش سطح تماس ریز نمونه ومواد شده وعملکرد فرایند ضدعفونی بهبود می یابد.

نکته ۲ – انجام مراحل ضدعفونی در شرایط خلاء، باعث از بین بردن حباب های هوا شده وضد عفونی مؤثر تـری رامهیـا می کند.

نکته ۳- تماس ریز نمونه با الکل ۷۰٪، به مدت چند ثانیه باعث تسهیل تماس سطحی بافت با ماده ضـد عفـونی کننـده می شود.

نکته ۴- در ریز نمونه های مسن یا نمونه های مزرعه ویا باغی، اجرای یک کشت آزمایشی در محیط شناسـایی آلـودگی ها توصیه می شود.

نکته ۵- اگر با وجود ضد عفونی و استریل سازی ریزنمونه ، آلودگی مشاهده شد یکی از عوامل زیر مسئول می باشند:

- ✓ آلودگی های داخلی بافت
- ✓ بی دقتی در کار و یا ضد عفونی نکردن میز یا هود لامینار
- ✓ الکل آلوده
- ✓ صحبت کردن در زیر هود لامینار
- ✓ رفت و آمد زیاد به اتاق کشت

۳-۲-۴- انتقال ریز نمونه به محیط کشت در زیر هود لامینار

پس از تکمیل مراحل استرلیزاسیون، ریز نمونه های مورد نظر در شرایط استریل توسط پنس استریل روی کاغذ صافی یـا پتری دیش استریل قرار داده می شود. در صورت نیاز برش داده وبا حذف بخش هـای صـدمه دیـده، در محـیط مناسـب کشت می شوند .برای اجرای یک کشت موفق توجه به نکات زیر ضروری است.

- قبل از کشت UV دستگاه لامینیر فلو را حداقل ۲۰ دقیقه روشن کنید.سپس کابینت دستگاه را با الکـل خـالص وپنبه استریل، ضدعفونی کرده وبه مدت ۱۵ دقیقه قبل از کار روشن بگذارید.

- پیش از شروع کشت دست های خود را تـا آرنـج بـا آب وصـابون شسـته وسـپس بـه الکـل ۷۰ درجـه آغشـته کنید.همچنین در فاصله عملیات هر بار دست های خود را از کابینت خارج کردید آن ها را دوبـاره بـا الکـل ۷۰ درجه ضدعفونی نمایید.
- در یک ظرف شیشه ای استریل (قطر کم وطول مناسب)بهمقدار لازم الکل اتـانول ۹۶ درجـه ریختـه وابـزار کـار مثل پنس،اسکالپل وقیچی استریل شده را در آن قرار دهید وهر بار قبـل از اسـتفاده چنـد ثانیـه آن هـا را روی شعله نگه دارید.سپس ۱۰ ثانیه صبر کنید تا سرد شوند، آنگاه کشـت را انجـام دهیـد. ابـزار کـار کشـت پـس از استفاده به ظرف حاوی الکل برگردانده شوند.
- محیط دهانه ظروف کشت را پیش از کشـت وقبـل از بـاز کـردن در ظـرف وبعـد از کشـت از روی شـعله عبـور دهید.در ضمن توجه شود درب ظرف کشت را پس از باز کردن طوری روی میز کابینت قـرار دهیـد کـه سـمت داخل درپوش بالا باشد وپس از کشت، درب ظرف رانیز پس از شعله دادن ببندید.
- در صورت استفاده از لوله آزمایش یا ارلن که دارای درپوش پنبه ای هستند، در حالی که نمونه را در یک دسـت آماده کشت دارید،با دست دیگر ظرف مورد نظر را کمی کج کنید ودرپوش آن رابه کمک انگشت کوچک دسـت اول برداشته وپس از شعله دادن دهانه ظرف ریز نمونه را در آن کشـت نماییـد. ،در ادامـه دهانـه را شـعله داده ودرپوش را همچنان که در دست نگه داشته اید، روی ظرف مورد نظر قرار دهید.
- برای انتقال بافت به پتری دیش، درپوش پتری را فقط تا حدی که انتقال صورت بگیرد باز کنید. (درپوش پتـری را کامل برندارید)

۴-۲-۴- رشد گیاه در محیط کشت تحت شرایط کاملا کنترل شده

در یک آزمایشگاه کشت بافت، ایجاد فضای کنترل شده ای از نظر نور ودما ورطوبت برای تأمین نیـاز رشـد بافـت گیـاهی ضرورت دارد. ریز نمونه کشت شده از محیط طبیعی خود در گیاه مادری جدا شده و بایـد کلیـه نیازهـای خـود را ازیـک محیط کنترل شده دریافت کند. این فضا باید قادر به تأمین شدت نور لازم، فتوپریود مناسب، دما ورطوبـت قابـل تنظـیم باشد.

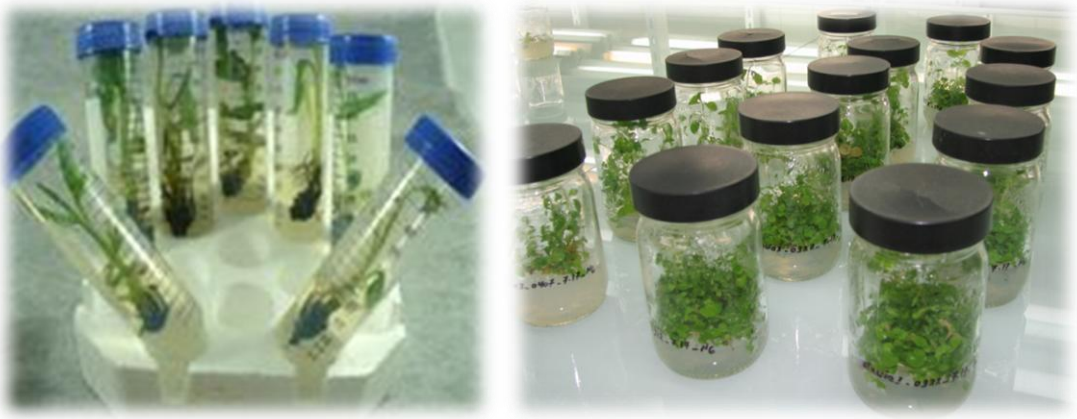
دمای محیطی که محیط کشت های حاوی ریز نمونه ها در آن قرار می گیرند، باید ۲۴ تا ۲۸ درجه سانتیگراد باشد.

(البته در مواردی مانند گونه های پیاز دار ، شکستن خواب و یا جوانه زنی ، دمای کمتری را انتخاب می کتند) .از لامپ های فلورسنت برای تامین نیاز نوری گیاه بهره می گیرند، نور بالاتر از ۱۰۰۰۰ لوکس مفید نمی باشد.چون نور زیاد، PH محیط کشت را پایین می آورد و محیط کشت را آبکی می کند.، دما را بالا می برد و اثرات منفی بر روی رشد گیاه ایجاد می کند.

در برخی موارد کنترل طول روزنیز حائز اهمیت است. فرایند هایی نظیر گلدهی و خواب به طول روز حساس هستند. تشعشع پایین را می توان با اضافه کردن قند به محیط کشت جبران کرد. رطوبت اتاق رشد[1] در شرایط کنترل شده قرار دارد. هرچند به دلیل بسته بودن درب ویال ها ، رطوبت اتاق تاثیر چندانی بر محیط کشت ندارد. اکسیژن مورد نیاز ریز نمونه را می توان با استفاده از سرپوش های فلزی برای ویال ها و همچنین قرار دادن ریز نمونه به صورت واژگون در محیط کشت ، استفاده از محیط کشت مایع ، تامین کرد.

شکل۶-اتاقک رشد با شرایط تنظیم شده برای رشد وتکثیر گیاهچه های کشت بافت

1- Growth chamber



شکل۷- رشد گیاهچه ها در شرایط درون شیشه

۵- ۲-۴- واکشت کردن ریز نمونه ها

به دلایل متفاوت وبنا بر اهداف مختلف کشت،ممکن است واکشت کردن نمونه ها ضرورت پیدا کند مثل کاهش مواد غذایی، کاهش اثرات نامطلوب تر کیبات فنلی ویا تکثیر ریز نمونه ها که در محیط های تازه ومناسب، کشت مجدد ریز نمونه انجام می شود

۶-۲-۴- ریشه زایی گیاهچه ها

اکسین ها، هورمون مسئول ریشه زایی هستند. بنابر این محیط کشت ریشه زایی، عموماً دارای یک نوع اکسین یاترکیبی از اکسین ها بر حسب ویژگی های گیاه است. معمولاً در محیط ریشه زایی غلظت نمک ها به نصف کاهش می یابد.در برخی ازگیاهان با انتقال به محیط کشت نصف غلظت وبدون اکسین نیز ریشه زایی صورت می گیرد. ریشه زایی درون شیشه ای روش متداول در آزمایشگاه های کشت بافت است.

۱-۶-۲-۴- ریشه زایی درون شیشه ای

در ریشه زایی درون شیشه ای، گیاهچه ها به صورت تک جوانه به محیط مناسب ریشه زایی که دارای یک هورمون ریشه زا ویا ترکیبی از هورمون های ریشه زا هستند، منتقل شده و زمان آن بطور معمول بین ۱۵تا ۴۵ روز بر حسب گونه گیاه ، ظهور ریشه طول می کشد. سپس گیاهچه‌های ریشه‌دار شده از محیط کشت خارج شده و آگار آن‌ها به آرامی با آب جاری شسته می‌شوند وبه گلدانهای استکانی با خاک مناسب منتقل می شوند. این گیاهچه‌ها به گلخانه‌های با رطوبت بالا جهت سازگاری، منتقل می‌شوند . در صورت نبودن گلخانه های مذکور برای کسب سازگاری تدریجی ،گلدان ها در جعبه های شفاف درب دار قرار گرفته و تدریجاً درب آنها برداشته می شود .از آنجایی که ریز نمونه ها در شرایط درون شیشه ای با رطوبت بالا رشد کرده اند، بهببود مکانیسم باز و بسته شدن روزنه ها ، یکی از مهمترین فواید سازگاری گیاهان است. در هنگام انجام عملیات سازگاری یا خودهی ، دما و نور را پایین و رطوبت بالا نگه داشته می شود.

شکل ۸- اولین مرحله انتقال گیاهچه های درون شیشه ای به گلدان

۲-۶-۲-۴- ریشه زایی برون شیشه ای

در این روش انتهای گیاهچه های تک جوانه در محلول حاوی هورمون ریشه زایی یا پودر مناسب بـرای ریشـه زایـی کـه ماده اصلی همان اکسین ها هستند برای مدت کوتاهی قرار گرفته وسپس در خاک مناسب (خـاکی کـه قـدرت نگهـداری رطوبت را داشته باشد) کشت می شوند. این گیاهچه‌ها جهت سازگاری به گلخانه‌هایی با رطوبت بالا منتقل می گردند .در صورت نبودن گلخانه های مذکور برای کسب سازگاری تدریجی ،گلدان ها در جعبه های شـفاف درب دار قـرار گرفتـه و تدریجاً درب آنها برداشته می شود.

۳-۶-۲-۴- مزایای ریشه زایی برون شیشه ای

۱- صرفه جویی در زمان وهزینه

۲ - درصد زنده مانی بالاتردر شرایط طبیعی

شکل ۹- ریشه دار کردن گیاهچه های دابل هاپلویید چغندر قند با روش برون شیشه (سـمت چـپ) ،ریشـه زایی در همان گیاهچه پس از دو هفته (سمت راست) .میزان توسـعه ریشـه در همـان گیاهچـه پـس از ۳۵ روز(پایین)

۷-۲-۴- سازگار کردن (Acclimatization) گیاهچه ها با شرایط خارج از شیشه

حساس ترین مرحله ریز ازدیاد ی گیاهان، شامل خروج ریز گیاهچه ها از محیط ظروف کشت و تطبیق با شرایط رشد فعال در محیط خارج از شیشه است، که معمولا به دلیل یکسان نبودن شرایط درون شیشه و محیط گلدان و حساس بودن گیاهچه ها، تعداد زیادی از گیاهچه ها از بین می روند .شرایط نوری وتبادل گازی گیاهچه ها در ظروف کشت محدود ورطوبت نسبی هوا نزدیک ۱۰۰ درصد است. معمولاً برگ این گیاهچه ها دارای کوتیکول کم وروزنه های آن همیشه باز است. از طرفی گیاهچه های درون شیشه ای قادر به انجام فتوسنتز نبوده وتأمین مواد معدنی وآلی مورد نیاز از طریق محیط کشت صورت می گیرد. این گیاهچه ها پس از ریشه دار شدن در آخرین مرحله ریز ازدیادی، توانایی رشد در شرایط طبیعی راندارند و باید تدریجاً آنها را برای زندگی در شرایط گلخانه ای آماده کرد.در بیشتر موارد برای حفظ رطوبت بالا سیستم آبیاری مه پاش (Mist) مفید می باشد.در کل باید سیستم رطوبتی از حالت اشباع به تدریج کاهش یابد. به عنوان مثال می توان برای کسب سازگاری تدریجی ،گلدان ها را در جعبه های شفاف درب دار گذاشته و تدریجاً درب آنها برداشته شود. برای اولین بار در ایران یک سیستم آبکشت رومیزی مجهز به هوارسانی برای مرحله تطبیق پذیری ریز گیاهچه های ازدیاد شده درون شیشه ای، طراحی وساخته شده است وگزارش شده که این دستگاه بهترین شرایط را برای سازگاری وانتقال گیاهان این ویترو را دارا می باشد.

۱۰- ایجاد سازگاری تدریجی در گیاهچه های دابل هاپلویید چغندر قند

۸ -۲-۴- انتقال گیاه به شرایط برون شیشه ای(گلخانه ومزرعه): گیاهان به دست آمده از کشت بافت که پس از طی مراحل سازگاری، تا حدی دارای مکانیسم های لازم برای زیستن در محیط طبیعی شده اند، در ابتدا به گلخانه مناسب وپس از چند ماه به مزرعه منتقل می شوند.

نکته های مهم

- برای جلوگیری از بروز آلودگی ها، به خصوص آ لودگی قارچی در زمان انتقال، لازم است گلدان ها وخاک آنها استریل شوند. همچنین گیاهچه ها قبل از کشت در گلدان به سموم(کاربوکسی تیرام۱۰-۵ میلی گرم/ لیتر)آغشته گردند.
- بهترین خاک گلدانی برای انتقال اولیه گیاهچه ها، یک مخلوط خاک سبک است.دو ترکیب زیر نمونه های مناسب می باشند.

۱- مخلوط پیت ماس، ماسه، حاک باغچه با نسبت مساوی

۲- مخلوط پیت ماس، خاک باغچه مخلوط با پرلیت با نسبت ۱:۱

- پاکیزگی فضای گلخانه و مبارزه با آفات وبیماری ها قبل از انتقال ودر حین انتقال گیاهچه های ان ویترویی از اصول مهم رسیدن به نتیجه است.چرا که این گیاهچه ها به دلایل ذکر شده، شکننده وحساس تر ودر نتیجه آسیب پذیر تر از گیاها ن معمولی هستند.
- مراقبت وتأمین شرایط ضروری این گیاهچه ها درهفته نخست انتقال به گلخانه بیشتر است.
- تعویض به موقع گلدان ها وتغذیه کودی گیاهان وکنترل عوامل بیماری زا در طی مدت ماندگاری در گلخانه، ضروری است.

شکل ۱۱- گیاهچه های این ویترویی چغندر قند در شرایط گلخانه

۵- آلودگی های درون شیشه ای

میکرو ارگانیسم ها در آزمایشگاه کشت بافت به علت اثرات زیان باری که در رشد گیاهچه ها دارند، به عنوان عوامل آلوده کننده شناخته می شوند. موفقیت در اجرای کشت مستلزم رفع آلودگی های خارجی وکنترل آلودگی های داخلی است.

عوامل آلوده کننده در آزمایشگاه کشت بافت عبارتند از:

- هوا
- آب
- محیط کشت
- افرادی که در آزمایشگاه تردد دارند.
- وسایل کار
- مواد گیاهی

۵-۱- آلودگی های درونی ریزنمونه

آلودگی های داخلی، توسط استریل سازی با تیمار شیمیایی برطرف نمی شوند و منجر به رشد ضعیف یا کلروز بافت های می گردند. این آلودگی ها اغلب در اثر باکتری های میله ای شکل ایجاد می شوند. دو راه برای مبارزه ، پیشنهاد شده است :

- استفاده از آنتی بیوتیک در محیط کشت
- استفاده از کشت مریستم.

۵-۲- آنتی بیوتیک ها

استفاده از آنتی بیوتیک به دلیل ایجاد مقاومت در باکتری ها ، هزینه زیاد و ایجاد سمیت گیاهی ،کمتر توصیه می شود.اخیراً با بهره وری از علوم نانو تکنولوژی مهار آلودگی های کشت بافتی با موادی مثل نانو ذرات نقره امکان پذیر است .این ماده در غلظت مناسب ،بدون تأثیر منفی در رشد گیاهچه، آلودگی های باکتریایی وقارچی را کنترل می کند .

نکته های مهم

- آنتی بیوتیک ها عموماً در یخچال یا فریزر نگهداری می شوند.
- آمینو گلوسیدها مانند کانامایسین رطوبت گیر بوده و باید در جای خشک قرار داده شوند.

- تمامی آنتی بیوتیک ها باید از نور مستقیم خورشید محافظت شوند.
- محلول تمامی آنتی بیوتیک ها در دمای صفر درجه سانتی گراد تا ۳ ماه قابل نگهداری هستند.

در زیر راهنمای استفاده از آنتی بیوتیک های متداول قرار دارد.

Product	Prod. No.	Mol. Wt.	Gram (+) bacteria	Gram (-) bacteria	Myco-bacteria	Myco-plasma	Toxicity to microbes (µg/ml)	Toxicity to plant tissue (µg/ml)	Working conc. (µg/ml) and applications[1]	Product Solubility	Liquid Storage
Carbenicillin	C3416	422.4	X	XX			500	>1000	up to 500 (CC,PR,EC)	Water	-0°C 2-8°C 3 days
Cefotaxime	C7039	477.4	X	XX			90	>100	up to 500 (CC,PR,EC)	Water	-0°C 2-8°C 22 days
Chloramphenicol	C1919	323.1	XX	XX	X	X	128	>1	10-35 (TS)	EtOH	2-8°C 30 days
G418 Disulfate Salt	G1279	692.7							10-500	Water	-20°C 6 mo.
Gentamicin sulfate	G6896		X	XX		XX	50	>50	up to 250 (CC)	Water	2-8°C 12 mo.
Hygromycin B	H9773	527.5							100-200	Water	2-8°C 6 mo.
Kanamycin	K4378	582.6	XX	XX		XX	100	>2	16 (SSC); up to 40 (CC,PR,EC)	Water	2-8°C 12 mo.
Paromycin	P8692	615.6	XX	X						Water	2-8°C 21 days
Penicillin G, potassium	P8306	372.5	XX	X			1005		up to 100	Water	2-8°C 4 days
Penicillin G, sodium	P8431	356.4	XX	X			1005		up to 100	Water	2-8°C 4 days
Rifampicin	R7382	823.0	XX	XX	XX		15	>25	50 (TS); up to 25 (PC,TEC)	DMSO	2-8°C 1 day
Streptomycin sulfate	S0774	1457.4	X	XX	X		100	>16		Water	2-8°C 30 days
Vancomycin	V1130	1485.7	XX				5	>100	up to 10 (PC); up to 40 (cc,EC,STM)	Water	2-8°C 7 days

XX = Effective against most species
X = Effective against certain species

[1]**Application key:** CC = callus culture; PR = plant regeneration; EC = cotyledon, hypocotyl, or leaf disc culture; TS = transformant selection; SSC = stem section culture; PC = protoplast culture; TEC = tuber explant culture; STM = shoot tip micropropagation

منابع مورد استفاده

روزبه. ف.، س.ی. صادقیان، ن. یاوری و م. مصباح.۱۳۸۴. هیبرید های بین گونه ای در چغندر قند (جنسBeta) با استفاده از روش نجات جنین. مجله چغندرقند، (۱)۲۱ :۳۰-۱۵.

روزبه ف.، ر. امیری، .م. احمدی. ۱۳۸۵. بررسی منابع مقاومت به خشکی در چغندر قند از طریق کشت بافت.گزارش نهایی. موسسه تحقیقات اصلاح وتهیه بذر چغندر قند.

روزبه. ف.، س.ی. صادقیان، م.دهقانشعار، ح.زارع مایوان وح. نادری منش.۱۳۸۵. شناسایی هیبرید های بین گونه ای چغندر قند (*B.vulgaris L.*) وگونه های خویشاوند وحشی گروه *Procombentes* با استفاده از نشانگرهای RAPD. مجله دانش کشاورزی (دانشگاه تبریز)، (۴)۱۶: ۹۵-۸۵.

روزبه ف.، د. داودی، س. تکلو، م. کاکویی نژاد، س. خیامیم.۱۳۹۲. دستیابی به لاین های مقاوم به ریزومانیا در چغندر قند با استفاده از تکنیک دابل هاپلوییدی. مجله علوم گیاهان زراعی ایران، (۳) ۴۴ :۵۱۷-۵۰۵.

یاوری نسرین.۱۳۸۰. تولید گیاهچه های کلونی فتو اتو تروفیک با به کارگیری دستگاه آبکشت. گزارش کوتاه، مجله چغندر قند۲:۱۷ ص۱۳۲.

Bhojwani S.S., Razdan M.K. 1996. Plant tissue culture: Theory and Practice, a revised Edition. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, pp767.

Channuntapipat C., Wirthensohn M., Ramesh S.A., Battle I. 2003. Identification of incompatibility in genotypes of almond (*Prunus dulcis* L.) using specific primers based on the introns of the s-alleles. Plant Breed.; 122(2): 164-168.

George E.F., Michael A., Hall,Geert-Jan De Klerk. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients .ll:Organic Additions,

Osmotic and pH Effects,and Support Systems Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, 65–113,115-173.

Mineo L. 1990. Plant tissue culture techniques., In: Tested studies for laboratory

teaching. Volume 11. Pages 151-174.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum;15: 473-497.

Randall P. N. & T. J. Evens. 2007. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant .43:370–381.

Roozbeh F., D. Davoodi, E. Majidi, M. Moosivand. 2008. Application of silver nano particles to control of tissue culture contaminations and recovery of the sugar beet double haploid plantlets. International society of Horticulture science. 4th international symposium on Acclimatization & Establishment of Micropropagated Plants. 8th-12th December . Bangalore,India.

Scholten H.J., Pierik R.L.M. 1998 .Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. Plant and Cell Reports.17: 230–235.

Sigma-Aldrich, 2013,antibiotics,agar,hormones.
URL:http://www.sigmsaldrich.com.

Smith Roberta H. 2013. Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. Elsevier. pp:183..

Takayama, SH., and M. Akita. 2008. Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation.Plant Tissue Culture Engineering. 83–100.

Thorpe TA. 2007. History of plant tissue culture. Mol Biotechnol, 37(2): 168-180

Vaishnava.A, Dept. Biotechnology,DIBNS, Dehradun. 2014. History of Plant Tissue Culture.Sciencebeing.com.