بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم پایه (گروه زیست‌شناسی)

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی گرایش فیزیولوژی گیاهی

بهینه‌سازی کشت بافت گیاه نخود (*Cicer arientinum*)

پژوهش و نگارش:
فاطمه ابراهیمی

استاد راهنما:
دکتر محمدباقر باقریه‌نجار

اساتید مشاور:
دکتر علیرضا ایرانبخش
دکتر مهناز اقدسی

۱۳۹۰

تعهد نامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه گلستان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱. قبل از چاپ پایان‌نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع و کسب اجازه نمایند.

۲. در انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه گلستان الزامی است.

۳. انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **فاطمه ابراهیمی** دانشجوی رشته **زیست‌شناسی گرایش فیزیولوژی گیاهی** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

سپاسگزاری

اوّل سپاس و ستایش به آستان حضرت دوست که الطاف او همواره شامل حال همه ی ماست. لازم می دانم که مراتب سپاس و امتنان خویش را از استاد راهنمای بزرگوارم، جناب آقای دکتر محمدباقر باقریه که بار همنمودهای ارزشمند خود در تمام مراحل این پایان نامه منت بزرگی بر من نهادند، ابراز نمایم.

بی شک اجرای موفقیت آمیز این تحقیق بدون مساعدت اساتید گرانقدر مشاور جناب آقای دکتر علیرضا ایرانبخش و سرکار خانم دکتر مهناز اقدسی میسر نمی گردید. بدینوسیله از کمک های صمیمانه و ارزنده ی ایشان تشکر و قدردانی می نمایم.

تقدیر و تشکر از آقای دکتر حمیدرضا صادقی پور و سرکار خانم دکتر منیژه میان آبادی که پایان نامه ی اینجانب را مطالعه و داوری فرمودند.

از جناب آقای دکتر علیرضا شاکری که بعنوان نماینده ی تحصیلات تکمیلی دانشگاه در جلسه ی دفاع از پایان نامه حضور داشتند بسیار متشکرم.

ز کلیه دانشجویان مقاطع دکتری و کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، به پاس یاری و همکاری مؤثرشان کمال تشکر را دارم.

چکیده

گیاه نخود با نام علمی *Cicer arientinum* گیاهی از خانواده‌ی *Fabaceae* از اعضای مهم خانواده حبوبات است که دارای اهمیت اقتصادی قابل توجهی در تغذیه انسان می باشد. دانه این گیاه با داشتن ارزش‌های غذایی شامل: ۶۷ – ۴۸٪کربوهیدرات، ۳۱/۵ –۱۲/۴٪ پروتئین، ۵۰ –۴۱٪ نشاسته، ۶٪ چربی و مواد معدنی مفید مثل فسفر، آهن و ویتامینهای محلول در آب مورد استفاده‌ی وسیع بسیاری از کشورهای منطقه‌ی آسیایی و اروپایی می باشدبازیابی از طریق کشت بافت یکی از روشهای مناسب و موثر برای حفظ و تکثیر گیاهان به شمار می رود. در این تحقیق وضعیت کالوس دهی، ساقه زایی و ریشه زایی گونه *arientinum Cicer* تحت اثر هورمون های بنزیل آمینو پورین (BAP)، نفتالین استیک اسید (NAA) و ایندول ۳– بوتیریک اسید (IBA) بررسی گردید. ابتدا بذر ها استریل سطحی شدند و برای به دست آوردن گیاهچه استریل به محیط کشت MS که با آگار ۸٪ جامد شده بود منتقل گردیدند. پس از ۱۰–۷ روز ریز نمونه هایی از گیاهچه استریل به محیط کشت MS حاوی ساکارز و ۳۰ سطح هورمونی مختلف شامل (mg/lit ۵، ۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰) از هورمون بنزیل آمینو پورین (BAP) به همراه (mg/lit ۰، .۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴) از هورمون NAA از طرح کاملا تصادفی با تکرار ۳ مورد آزمایش و بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر هورمون BAP در شاخه زایی بسیار بالا و بهترین غلظت برای شاخه زایی BAP ۱/۵ mg/lit +NAA ۰/۴ mg/lit می باشد. به منظور بررسی اثرات هورمون‌های ریشه زایی و تعیین بهترین غلظت برای ریشه زایی گیاه نخود، تیمارهای مختلف هورمونی شامل (mg/lit ۱/۵، ۱، ۰،۰/۵) از هورمون IBA (ایندول بوتیریک اسید) به همراه NAA در غلظتهای (۰/۵ و ۰) با تکرار ۳ مورد آزمایش و بررسی قرار گرفت. نتایج با استفاده از تست دانکن بررسی گردید. بهترین غلظت ها برای ریشه دار شدن ریز نمونه ها غلظت ۱/۵ mg/lit از هورمون IBA+ mg/lit ۰/۵از هورمون NAA می باشد. در نهایت گیاه کامل توسط تکنیک کشت بافت ایجاد شد.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آمینوپورین، نفتالین استیک اسید، کشت بافت نخود

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول مقدمه

۱-۱- مقدمه‌ای برکشت بافت گیاهی ۲

۱-۲- دورنمای تاریخی کشت بافت گیاهی ۲

۱-۳- مزایای کشت بافت گیاهی ۴

۱-۴- ریزازدیادی ۵

۱-۵- چند توانی ۶

۱-۵-۱- چند توانی چیست؟ ۶

۱-۵-۲- تاریخچه چند توانی ۶

۱-۶- انتخاب محیط کشت مناسب جهت کشت بافت ۶

۱-۷- محیط کشت MS ۷

۱-۸- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ۸

۱-۹- ویتامین‌های محیط کشت ۹

۱-۱۰- مواد ژلاتینی کننده ۹

۱-۱۱- معرفی گیاه نخود ۱۰

۱ -۱۲- اهمیت کشت بافت گیاه نخود ۱۱

۱-۱۳- پیشینه تحقیق ۱۳

۱-۱۴- اهداف تحقیق ۱۵

فصل دوم مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه محلول مادر محیط کشت ۱۸

۲-۱-۱- محلول مادر عناصر غذایی پرمصرف ۱۸

۲-۱-۲- محلول مادر عناصر غذایی کم مصرف ۱۹

۲-۱-۳- محلول مادر آهن ۱۹

۲-۱-۴- محلول مادر ویتامین‌ها ۲۰

۲-۲- تهیه محیط کشت ۲۰

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۳- ضد عفونی کردن محیط کشت وسایل ۲۱
۲-۴- تهیه محلول پایه هورمونی ۲۱
۲-۵- تهیه محلول پایه هورمون‌ها برای استفاده پس از اتوکلاوشدن محیط کشت ۲۲
۲-۶- تهیه گیاهچه استریل ۲۲
۲-۷- شرایط اطاق رشد ۲۳
۲-۸- آزمایش‌های انجام شده بر روی گیاه نخود ۲۳
۲-۸-۱- کالوس‌زایی ریز نمونه‌های ریشه، ساقه، گرهک لپه‌ای ۲۳
۲-۸-۲- بررسی شاخه‌زایی کالوس‌های حاصل از گرهک لپه‌ای در گیاه نخود ۲۴
۲-۸-۳- بررسی ریشه‌زایی ریز نمونه‌های گیاه نخود ۲۴
۲-۹- تجزیه آماری ۲۵

فصل سوم نتایج

۳-۱- گیاهچه استریل ۲۸
۳ -۲- بررسی فرآیند کالوس‌زایی ۲۸
۳-۲-۱- بررسی برهمکنش هورمون‌ها در کالوس‌زایی ۲۸
۳-۲-۲- نتایج حاصل از کالوس‌زایی ریز نمونه‌های ریشه اولیه و گرهک لپه‌ای و ساقه اولیه ۳۰
۳-۳- نتایج شاخه‌زایی ۳۵
۳-۴- نتایج ریشه‌زایی ۳۷

فصل چهارم بحث

۴-۱- جمع بندی نهائی ۴۶
۴-۲- پیشنهادات ۴۷
منابع ۴۹

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲ ـ ۱ـ محلول مادر (۲۰ ×)عناصر غذایی پر مصرف جهت تهیه محیط کشت MS.....۱۸
جدول ۲ ـ ۲- محلول مادر (۲۰۰ ×)عناصر غذایی کم مصرف جهت تهیه محیط کشت MS.....۱۹
جدول ۲ ـ ۳ـ محلول مادر (۲۰۰ ×) آهن جهت تهیه محیط کشت MS ۲۰
جدول ۲ ـ ۴ـ محلول مادر (۲۰۰ ×) ویتامین های B5 جهت تهیه محیط کشت.....۲۰
جدول ۲- ۵- غلظت‌های هورمونی دو هورمون NAA و BAP مورد استفاده در آزمایشات ۲۲
جدول ۳-۱- جدول تجزیهٔ واریانس طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل جهت کالوس زایی ریز نمونه‌های نخود بر اساس میانگین مربعات.....۳۲
جدول ۳-۲- بررسی اندازه کیفی کالوس‌ها ۳۴
جدول۳-۳- جدول تجزیهٔ واریانس طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل جهت شاخه‌زایی ریز نمونه‌های نخود براساس میانگین مربعات.....۳۶
جدول ۳-۴- جدول تجزیهٔ واریانس طرح کاملاً تصادفی درقالب آزمایشات فاکتوریل جهت شاخه‌زایی ریز نمونه‌های نخود بر اساس میانگین مربعات.....۳۹

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۳-۱- بررسی تأثیر قطعات مختلف در کالوس زایی..... ۳۱
نمودار ۳-۲- مقایسه درصد کالوس زایی ریز نمونه‌های نخود در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP/NAA..... ۳۲
نمودار ۳- ۳- بررسی اثر متقابل تیمارهای هورمونی و میزان کالوس‌دهی در ریزنمونه‌ی گرهک لپه‌ای..... ۳۳
نمودار ۳-۴- بررسی اثر متقابل تیمارهای هورمونی و میزان کالوس‌دهی در ریزنمونه‌ی ریشه..... ۳۳
نمودار ۳- ۵- نمودار مقایسه درصد شاخه‌زایی ریز نمونه‌های نخود در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌هایNAA/BAP..... ۳۷
نمودار ۳-۶- بررسی تأثیر قطعات ریزنمونه‌ی مختلف در ریشه‌زایی..... ۳۸
نمودار ۳-۷- مقایسه درصد ریشه‌زایی ریز نمونه‌های نخود در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف هورمون‌های IBA/NAA..... ۴۰

فصل اول

مقدمه

۱ـ۱ـ مقدمه‌ای بر کشت بافت گیاهی

کشت بافت یک روش جایگزین برای تولید است و به طور گسترده‌ای برای تکثیر گروه بزرگی از گونه‌های گیاهی از جمله گیاهان زراعی می‌باشد.

افزایش روزافزون جمعیت انسانی سبب شده تا بشر در فکر ابداع روش‌ها و تکنیک‌هایی باشد که ضمن افزایش کمیت و کیفیت مواد غذایی و اصلاح نژاد منابع گیاهی، ذخایر ژنتیکی موجود را حفظ نماید. کشت بافت از جمله تکنیک‌هایی است که به بشر قرن بیستم خدمات ارزنده‌ای در این خصوص ارائه داشته است (برگمن[1] ،۱۹۶۷). در حقیقت، قابلیت ژنتیکی که چند توانی نامیده می‌شود باعث تبدیل یک سلول به یک گیاه کامل می‌گردد. با انتقال این گیاهچه به گلخانه‌ها و مزرعه می‌توان انبوهی از گیاهان مورد نظر را تولید کرد. در پاره‌ای از آزمایشگاه‌های پیشرفته، روبات‌های ساخت بشر، بسیاری از کارها همانند شستشو و استریل نمودن ادوات و نیز انتقال گیاهچه‌ها را انجام می‌دهند. اخیرا یک سیستم روبات هوشمند توسط دلپلانک پیشنهاد شده است که گیاهچه‌ها توسط روبات در محیط کشت گذاشته شده، از آن جا برداشته می‌شوند و به داخل گلدان منتقل می‌گردد (مختاری و همکاران، ۱۳۸۷). اگر چه تنها حدود ۱۰۰ سال از عمر این تکنیک می‌گذرد اما چنان اثراتی را در پی داشته که امروزه به یکی از اساسی‌ترین روش‌ها در مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی تبدیل شده است. انتقال ژن و دست‌ورزی ژنتیکی در بسیاری از موارد تنها از طریق کشت بافت امکان‌پذیر است (قلامی مود و همکاران، ۱۳۸۵).

۱ـ ۲ ـ دورنمای تاریخی کشت بافت گیاهی

به‌طور کلی می‌توان موارد مهم تاریخچه کشت بافت را به صورت زیر خلاصه کرد:

نخستین کوشش برای کشت بافت گیاهی (هابرلنت[2]،۱۹۰۲).

کشت جنین در گیاهان خانواده شب بو(هانیگ[3]، ۱۹۰۴).

کشت موفقیت آمیز ریشه گوجه فرنگی(وایت[4]، ۱۹۳۹).

کشت موفق کالوس با قابلیت رشد مداوم (گاترت[5]، ۱۹۳۹).

1- Bergman
2- Haberlandt
3- Hannig
4- White
5- Gautheret

کشت بافت نوک ساقه‌های مارچوبه (لو[۱]، ۱۹۴۵).
کشت بافت نوک ساقه و تولید گیاه کامل نخود و لادن (بال[۲]،۱۹۴۶).
استفاده از آدنین در تشکیل ریشه و ساقه نابجا در تنباکو(نوب[۳]، ۱۹۳۹).
کاربرد کشت مریستم برای تولید گیاه کوکب عاری از ویروس (مورل[۴] و همکاران ، ۱۹۵۲).
تولید کالوس‌هاپلوئید در گیاه بازدانه *Gynko biloba* از راه کشت دانه گرده (تولک[۵]، ۱۹۵۳).
تولید اولین گیاه از یک سلول منفرد (موير[۶] و همکاران، ۱۹۵۴).
کشف کینتین به عنوان یک هورمون درگیر در تقسیم سلولی در نیمه هر جزء (میلر و همکاران، ۱۹۵۵).
کشف تنظیم تشکیل اندام با تغییر نسبت اکسین به سیتوکینین (اسکوگ[۷] و همکاران، ۱۹۷۵) .
استفاده از روش ریزکشتی برای رشد تک سلول‌ها در شرایط کنترل شده (جونز[۸] ، ۱۹۶۰).
معرفی محیط کشت MS (موراشیگ[۹] و همکاران، ۱۹۶۲).
تولیدهاپلوئیدهای توتون از راه کشت گرده (بورگین[۱۰] و همکاران، ۱۹۶۷).
باززایی نخستین گیاه از پروتوپلاست تنباکو (تاکبه[۱۱] و همکاران، ۱۹۷۱).
نخستین هیبرید بین گونه‌ای از امتزاج پروتوپلاست‌ها (برنارد[۱۲] و همکاران، ۱۹۷۲).
معرفی واژه تنوع سوماکلونال (لارکین[۱۳]، ۱۹۸۱).
تراریختی توتون با استفاده از آگروباکترویوم و رشد موفق گیاهان تراریخت (دبلاک[۱۴] و همکاران،۱۹۸۴).
ابداع روش انتقال ژن به کمک تفنگ ژنی و باززایی گیاهان تراریخت (کوهنل[۱۵]، ۱۹۹۱).

1- Loo
2- Ball
3- knobe
4- Morel
5- Tuleck
6- Muir
7- Skoog
8- Jones
9- Murashige
10- Bourgin
11- Takebe
12- Bernard
13- Larkin
14- Dblak
15- kouhnel

۱ـ۳ ـ مزایای کشت بافت گیاهی

جنبه‌های مختلف کشت بافت گیاهان مثل جوانه زدن بذر در شرایط درون شیشه، وضعیت کالوس‌زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی به ما کمک خواهد کرد تا در خصوص نحوه‌ی تکثیر غیر جنسی انواع گیاهان اطلاعات جدیدی کسب کنیم. از طرف دیگر با بررسی میزان و نوع مواد مؤثره یا متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه و مقایسه‌ی آن‌ها با گیاهچه‌های طبیعی به تجزیه و تحلیل مواد بیوسنتزی نیز بپردازیم تا در آینده راهکارهای جدیدی برای تکثیر و تولید مواد مؤثره به دست آوریم. چنین فرآیندهایی مستلزم اطلاعات مقدماتی و اولیه در خصوص عملکرد گیاهان در برابر هورمون‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده در تهیه‌ی محیط کشت دارند و لازم است مطالعه در مورد هزینه به‌طور مجزا صورت گیرد.

همچنین کشت بافت گیاهی ابزاری قدرتمند در جهت تکثیر سریع و نگهداری گیاهانی است که در معرض خطر انقراض می‌باشند. مطالعات ژنتیکی ضرورتی برای توسعه‌ی محصولات کشاورزی که دارای کیفیت و بازده بالایی هستند محسوب می‌شوند. برای مثال متیونین یکی از اسیدهای آمینه‌ای اساسی است که ارزش غذایی دانه‌های خانوادگی گرامینه را بالا برده است. به هر حال، بالانس صحیح در ترکیب آمینو اسید به وسیله‌ی راه‌های پرورش سنتی و مرسوم قابل دسترسی نیست، اما بهره‌برداری از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک لازم به نظر می‌رسد. به طوری که در مورد مثال اخیر با استفاده از همین روش‌ها غلظت متیونین ۱۰ – ۵٪ افزایش یافته است (بابا اوغلو و همکاران، ۲۰۰۵).

مزایای کشت بافت گیاهی را می‌توان به صورت زیر خلاصه کرد:

۱ـ تکثیر سریع گیاهچه‌ها: کشت بافت یا سلول ممکن است اجازه دهد سلول‌ها در یک کشت، قابلیت تولید گیاه کامل را بروز دهند. با یک ضریب تکثیر نسبتاً کم مثلاً ۵، طی ۹ نسل که ۱۲ ـ ۹ ماه طول می‌کشد، می‌توان تعداد قابل ملاحظه‌ای گیاهچه تولید نمود (پیری و همکاران، ۱۳۸۰).

۲ـ یکنواختی ژنتیکی: به علت این که روش‌های کشت بافت به صورت رویشی انجام می‌گیرد، لذا از نوترکیبی تصادفی ژنتیکی که مختص تولید مثل جنسی است، اجتناب می‌شود. بنابراین گیاهان تولید شده از نظر ژنتیکی یکسان هستند (احسان‌پور و همکاران، ۱۳۸۲).

۳ـ شرایط غیرآلوده: کشت درون شیشه‌ای گیاه در شرایط عاری از عوامل بیماری‌زا، منبع بزرگی از مواد گیاهی عاری از بیماری را در اختیار ما قرار می‌دهد که نه تنها به عنوان یک ذخیره گیاهی سالم محسوب می‌شود، بلکه عبور گیاهان را از قرنطینه تسهیل می‌کنند (خوشخوی، ۱۳۷۷).

۴ـ شرایط مطلوب برای رشد گیاهان درون شیشه‌ای: امروزه به خوبی مشخص شده است که کیفیت و شرایط رشد گیاه مادری بطور شگفت‌انگیزی روی موفقیت تکثیر مؤثر است. نگهداری گیاهان مادری تحت شرایط ایده‌آل معمولاً غیرممکن است. اما چنین شرایطی را می‌توان در کشت‌های درون شیشه‌ای تأمین کرد (احسان‌پور و همکاران، ۱۳۸۲).

هنگامی که نگهداری کشت‌های گیاهی در شرایط محیطی کنترل شده، مد نظر باشد، کشت‌های درون شیشه‌ای دارای مزایای آشکار می‌باشند. همچنین این کشت‌ها برای تحقیقات آزمایشگاهی بسیار مناسب هستند (پیری و همکاران، ۱۳۸۰).

۵ـ حفظ و نگهداری منابع ژنتیکی: نیاز به فضای کوچک و سهولت فراهم کردن شرایط مناسب موجب شده است که کشت‌های درون شیشه ای، روش کاربردی مناسبی جهت حفظ منابع ژنتیکی محسوب شوند (قلامی مود و همکاران، ۱۳۸۵).

۱ـ ۴ـ ریزازدیادی

ریزازدیادی یک فن در کشت بافت برای تولید تعداد زیادی از نسخه‌های یکسان یک گیاه از یک قطعه از بافت مادر است. در طی کشت بافت، با یک قطعه گیاهی شروع می‌شود. در حالی که رشد و نمو بعدی، آن را به سمت تکثیر و باززایی یک گیاه کامل جدید هدایت می‌کند (ایرانبخش، ۱۳۸۸). مهم‌ترین مزیت برای ریزازدیادی امکان تولید سریع تعداد زیادی گیاه یکسان از لحاظ ژنتیکی در مدت کوتاه‌تر از مدت زمان لازم در روش‌های مرسوم است. ریزازدیادی از زمان تهیه قطعه ریزنمونه اولیه تا به دست آوردن گیاه جدید، شامل تعدادی یا همه موارد ذیل می‌باشد:

۱ـ انتخاب مواد گیاهی مناسب

۲ـ ایجاد کشت‌های عاری از میکروب

۳ـ تکثیر

۴ـ تحریک تولید و رشد شاخه

۵ـ تحریک ایجاد ریشه
۶ـ سازگاری گیاهچه‌های به دست آمده با شرایط طبیعی (احسان‌پور و همکاران، ۱۳۸۲).

۱ـ ۵ـ چندتوانی[1]

۱ـ ۵ ـ ۱ ـ چندتوانی چیست ؟

بدن موجودات عالی از تعداد زیادی سلول تشکیل شده است. گرچه یاخته‌های یک موجود پرسلولی، از لحاظ شکل، ساختمان، اندازه و عملکرد با همدیگر تفاوت دارند، اما در حقیقت همه از یک یاخته اولیه تخم منشأ گرفته‌اند. سپس این یاخته‌ها به بافت‌ها یا اندام‌هایی با وظایف مشخص تمایز پیدا می‌کنند. سلول‌های تمایز یافته نیز پس از تمایززدایی قادر به تبدل شدن به سلولی با خاصیت جنینی هستند. توانایی ژنتیکی یک یاخته گیاهی پس از تمایززدایی جهت تبدیل شدن به یک گیاه کامل، وقتی در شرایط مناسب کشت شود را چندتوانی گویند (باقری و همکاران،۱۳۸۱).

۱ـ ۵ ـ ۲ ـ تاریخچه چندتوانی

بر اساس نظریه سلولی اشلایدن و شوان بدن موجودات زنده از سلول تشکیل شده است. گوتلیب‌هابرلنت بیان کرد که اگر یاخته‌های مجزای گیاهی، در محیط غذایی مناسب با شرایط ایده‌آل قرار گیرند، توانایی باززایی گیاهان کامل را دارند. در دو دهه بعد، با انجام اولین آزمایشات کشت بافت، نشان داده شد که عقیده هابرلنت درست بوده است. هر چند که هابرلنت نتوانست یک گیاه کامل را از یاخته‌های مجزا در محیط کشت بافت به دست آورد (باقری و همکاران،۱۳۸۱).

۱ ـ ۶ ـ انتخاب محیط کشت مناسب جهت کشت بافت

انتخاب محیط کشت مناسب، برای افراد کم‌تجربه و تازه‌کار، نسبتاً مشکل است. در سال ۱۹۷۶ محققی به نام دی فوسارد[2] روشی به نام طیف گسترده را پیشنهاد کرد.

1- Totipotency
2- De fossard

بر اساس این روش، چهار دسته مواد اصلی و ضروری محیط کشت یعنی ساکارز، نمک‌های پر مصرف، اکسین، سایتوکینین، هر کدام با ۳ غلظت در نظر گرفته می‌شود. بدیهی است در این حالت ۸۱ = $۳^۴$ ترکیب متفاوت ایجاد می‌شود. در این صورت با قرار دادن نمونه در هر کدام از این ۸۱ ترکیب و بررسی نتایج، نهایتاً یک یا چند ترکیب از این ۸۱ نوع انتخاب می‌شود[۸۱ و ۳۸، ۱۵]. انواع مختلف محیط کشت وجود دارد. محیط کشت گیاهی به صورت پیش‌ساخته نیز موجود است: MS و B (باقری و همکاران،۱۳۸۱). نیچ و نیچ (نیچ ۱۹۶۲)، هلر[1] و آندرسون[2] (آندرسون، ۱۹۷۵) کار با محیط کشت‌های از پیش بسته‌بندی شده، بسیار راحت می‌باشد. از بین این محیط‌ها، محیط کشتی که به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد، محیط کشت MS است (موراشیک و همکاران، ۱۹۶۲).

۱ ـ ۷ ـ محیط کشت MS

به‌طور عمده، گونه‌های گیاهی، محیط کشت‌های متفاوتی نیاز دارند. لذا، انتخاب بهترین محیط کشت با مشکلاتی همراه است. نتایج محققان کشت بافت گیاهی این عقیده کلی را تقویت می‌کند که اگر هیچ‌گونه اطلاعاتی در اختیار نباشد، در این صورت معمولاً کار با محیط کشت MS، شروع می‌شود (کوهنل، ۱۹۹۱). مطالعه روی گیاه دارویی آنتوریوم، توسط پژوهشگران نشان داد که محیط کشت MS در مقایسه با سایر محیط‌های کشت به کار رفته جهت اندام‌زایی گیاهان مناسب‌تر می‌باشد (زیائو، ۲۰۰۳). کاربرد محیط کشت MS به دلیل این که بسیاری از گیاهان به آن عکس‌العمل مناسبی نشان می‌دهند، بسیار متداول است (مندال و همکاران، ۲۰۰۰). کارآمد بودن محیط کشت MS احتمالاً در ارتباط با مناسب بودن اجزای تشکیل‌دهنده آن می‌باشد نیازهای کربوهیدراتی برای تولید کالوس ابتدا توسط گاترت (گاترت، ۱۹۴۱) و وایت (وایت، ۱۹۴۰). مورد بررسی قرار گرفت. برتری ساکارز به عنوان منبع کربوهیدرات که اولین بار توسط وایت (وایت، ۱۹۶۳). و دورمر[3] (دورمر، ۱۹۴۹). گزارش شده بود، توسط پژوهشگران چندی مورد تأیید قرار گرفت (صادقی و همکاران، ۲۰۰۴). هیدروکربن‌های موجود در محیط کشت به شکل مونو و دی‌ساکارید می‌باشند ولی در اغلب موارد این ساکارز است که در غلظت‌های متفاوت مورد استفاده قرار می‌گیرد (لاروزا و همکاران، ۱۹۸۱). جالب

1- Heller
2- Anderson
3- Dormer

توجه است که انواع مختلف ریزنمونه‌های گیاهی در محیط کشت‌های اتوکلاو شده دارای ساکارز، بهتر از محیط‌هایی که ساکارز به کمک فیلتر به آن‌ها اضافه شده است رشد می‌نمایند. به نظر می‌رسد که دلیل این امر آن است که در حالت اول سلول‌ها به راحتی از گلوکز و فروکتوز حاصل از هیدرولیز ساکارز در اثر اتوکلاو استفاده می‌کنند (شریفی و همکاران، ۱۳۸۳). در حقیقت، گلوکز علاوه بر تأمین انرژی مورد نیاز سلول در ساختار دیواره نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. در صورتی که در حالت دوم بایستی آنزیم اینورتاز از دیواره سلول‌های ریز نمونه ترشح شده و عمل شکستن ساکارز را انجام می‌دهد که گاهی این آنزیم یا وجود ندارد و یا به هر دلیلی ساخته نمی‌شود(باقری و همکاران، ۱۳۸۳). شایان ذکر است در طی اتوکلاو ساکارز، مقداری ماده سمی ۵ ـ هیدروکسی متیل فورفورال نیز تولید می‌گردد (ولاندره، ۱۹۷۷). یکی از اثرات قندها در محیط کشت بافت، اثر آن‌ها بر روی سنتز کلروفیل در سلول‌های نمونه مورد کشت می‌باشد (ولاندره، ۱۹۷۷).

۱ ـ ۸ ـ تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

هورمون‌ها مواد آلی هستند که توسط گیاهان ساخته شده و فرآیندهایی نظیر رشد، گلدهی، پیری و غیره را تحت تأثیر قرار می‌دهند (مورل و همکاران، ۱۹۵۲). تنظیم‌کننده‌های رشد به کمک ترکیبات آلی به صورت مصنوعی نیز ساخته می‌شوند (جون و همکاران، ۲۰۰۱). در کشت بافت حضور دو گروه از هورمون‌های گیاهی شامل سایتوکینین‌ها و اکسین‌ها حائز اهمیت زیادی می‌باشند (خوشخوی، ۱۳۷۷). به‌طوری که نسبت اکسین به سایتوکینین در محیط کشت بافت می‌تواند روند ریشه‌زایی و شاخه‌زایی را تحت تأثیر قرار دهد (چندلر و همکاران، ۱۹۷۲). در بعضی موارد از ژیبرلیک اسید نیز بر حسب نیاز استفاده می‌گردد. هورمون‌های گیاهی اضافه شده به محیط کشت بافت، توسط بافت جذب شده و سطح هورمون‌های درونی را افزایش می‌دهند. اغلب افزایش‌ها زودگذر و ناپایدارند، زیرا در این موارد بخش اعظمی از هورمون پس از جذب به سرعت غیر فعال می‌شوند (چندلر و همکاران، ۱۹۷۲).

مهم‌ترین اکسین‌های مورد استفاده در کشت بافت گیاهی عبارتند از اسید ایندول استیک، نفتالن استیک اسید، ایندول بوتیریک اسید و ۴، ۲ـ دی کلروفنوکسی استیک اسید (کوهنل، ۱۹۹۱). از جمله مهم‌ترین سایتوکینین‌ها در کشت بافت گیاهی نیز می‌توان به ۶ ـ بنزیل آمینوپورین، کینتین و زآتین