کشت بافت،

راهی برای تولید گیاهان

عاری از ویروس

سعید صداقتیان
دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
s.sedaghatian@ut.ac.ir

مقدمه

مطالعه بر روی ویروس‌های گیاهی از سال ۱۸۸۶ شروع شده است؛ زمانی که مایر گزارش کرد که بیماری موزائیک توتون به وسیله تزریق عصاره از گیاهان توتون آلوده به گیاهان سالم قابل انتقال است. بیجرنیک در سال ۱۸۹۸ نتیجه گرفت که موزائیک توتون توسط یک موجود ناشناخته ایجاد می‌شود که او آن‌ها را ویروس نامید.

ویروس یک مجموعه از یک یا چند نوکلئیک اسید است که در داخل یک پوشش پروتئینی محافظت می‌شود و در بعضی از موارد این پوشش علاوه بر پروتئین ممکن است لیپید هم داشته باشد. این پکیج توانایی تکثیر و همانند سازی در داخل سلول میزبان را دارند.

ویروس‌ها فاقد ساختار سلولی هستند و رشد و نمو در ویروس ها صورت نمی‌گیرد، در نتیجه ویروس زنده نیست و در زمره موجودات زنده قرار نمی‌گیرد اما ویروس‌ها در واقع بخشی از شبکه حیات را تشکیل می‌دهند. ویروس‌ها تنها درون سلول موجودات دیگر قادر به تکثیر هستند و همه آن ها انگل اجباری‌اند.

بیماری‌های ویروسی گیاهی باعث کاهش شدید عملکرد محصولات از لحاظ کمی و کیفی در سراسر جهان می‌شوند. کاهش محصول و خسارت اقتصادی ناشی از آن را می‌توان از طریق کنترل همه گیری با استفاده از روش‌هایی که منابع آلودگی ویروس را کاهش داده یا از انتشار ویروس جلوگیری می‌کنند، محدود نمود.

اهمیت تولید گیاهان عاری از ویروس

بیماری‌های ویروسی باعث خسارت‌های زیادی در عملکرد محصول می‌شوند و برای مدت طولانی محدودیتی برای توسعه پایدار تولید کشاورزی بوده‌اند. روش‌های متعددی برای کنترل بیماری‌های ویروسی وجود دارد که همگی معطوف به پیشگیری از آلودگی هستند؛ زیرا نمی‌توان آن‌گونه که برای مبارزه با قارچ‌ها و باکتری‌ها از قارچ‌کش و یا باکتری‌کش استفاده می‌شود برای ویروس‌ها نیز در سطح مزرعه‌ای و با صرفه اقتصادی استفاده کرد. استراتژی‌های کلی کنترل بیماری‌های ویروسی همگی پیشگیرانه و به منظور جلوگیری از آلوده شدن گیاه در مزرعه و یا استقرار ویروس در منطقه می‌باشند که عبارتند از:

۱) ریشه کنی منبع آلودگی برای جلوگیری از دسترسی ویروس به محصول
۲) کاهش گسترش بیماری با کنترل ناقلین ویروس
۳) به‌کارگیری گیاهان سالم و کاشت بذور عاری از ویروس
۴) استفاده از گیاهان مقاوم به ویروس

کاشت بذر و نهال سالم یکی از اساسی‌ترین اقداماتی است که برای پیشگیری از بیماری‌های گیاهی به ویژه آلودگی‌های ویروسی در مزرعه انجام می‌گیرد. این اقدام، به ویژه در مورد بیماری‌های ویروسی که بذر زاد هستند حائز اهمیت بیشتری است؛ چرا که بذر می‌تواند مایه آلودگی اولیه برای بیماری باشد و پس از کاشته شدن در مزرعه، بیماری توسط ناقلین دیگر مثل حشرات به گیاهان

سالم منتقل شده و تمام مزرعه را آلوده نماید. بنابراین جلوگیری از آلودگی توسط بذر آلوده در این نوع بیماری‌ها می‌تواند در کاهش خسارت محصول و جلوگیری از آلودگی اولیه مؤثر باشد.

دربرنامه‌های به نژادی گیاهان مختلف نیز مقایسه عملکرد ارقام اصلاح شده زمانی به واقعیت نزدیک‌تر خواهد بود که ارقام و لاین‌های مورد آزمایش عاری از ویروس باشند. از طرف دیگر در نگهداری و توزیع ژرم پلاسم گیاهان در بانکهای ژن نیز لازم است ژرم پلاسم نگهداری شده در کلکسیون‌های بانک ژن تماماً عاری از آلودگی باشند تا موجبات توزیع و گسترش آن به مناطق دیگر فراهم گردد.

در تمام موارد ذکر شده تکنیک‌های درمان گیاهان به منظور حذف ویروس و یا عامل آلودگی از آن‌ها، روش‌های عاری سازی بذور و اندام‌های تکثیری دیگر و فرآیندهای کشت بافت گیاهی با هدف تهیه گیاهان سالم و به دنبال آن به دست آوردن بذور سالم می‌توانند به کمک محققین بیایند.

کشت بافت گیاهی چیست؟

کشت بافت تکثیر غیر جنسی گیاهان، در شرایط آزمایشگاهی در محیط غذایی مناسب و تحت شرایط استریل، شامل کشت پروتوپلاست، کشت سلول، کشت بافت و کشت اندام می‌باشد.

این تکنیک بر پایه سه ویژگی گیاهان استوار است. این ویژگی‌ها عبارتند از:

Totipotency: به معنی قابلیت و توانایی ذاتی یک سلول برای تبدیل به یک گیاه کامل در شرایط مناسب است. اگرچه هر سلول دارای خاصیت توتی پوتنسی است، اما این خاصیت در گیاه بروز نمی‌کند. علت آن میان کنش 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 برقرار شود.

Dediffrentiation: یعنی ظرفیت سلول‌های 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 تغییر یافته و سپس ادامه تحولات آن‌ها را تا حد مریستم‌های نخستین یا اولیه تغییر می‌دهد.

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

فاکتورهای موثر در کشت بافت

این عوامل به طور خلاصه عبارتند از:

محیط کشت: شامل مواد معدنی، تنظیم کننده‌های رشد، منبع کربن و سایر مواد افزودنی به محیط

فاکتورهای محیطی: شامل نور، دما، فتوپریود، شرایط استریل، محیط کشت

ریزنمونه: شامل سن، اندازه، محل ریزنمونه روی گیاه مادری، وضعیت فیزیولوژیکی گیاه مادری

ژنتیک: پاسخگویی ریز نمونه‌ها در کشت بافت وابسته به ژنوتیپ است. در بسیاری از موارد ژنوتیپ‌های یک گونه پاسخ‌های متفاوت در شرایط یکسان درون شیشه‌ای از خود نشان می‌دهند. یکی از اهداف کشت درون شیشه‌ای، حذف بیماری‌ها و تولید گیاهان عاری از بیماری است.

انواع کشت درون شیشه‌ای

کشت گیاه کامل: یک بذر ممکن است در شرایط درون شیشه‌ای کشت گردد و یک گیاهچه و در نهایت یک گیاه کامل تولید شود؛ مثل گل ارکیده.

کشت جنین: در این نوع کشت، پس از حذف پوسته‌های بذر، جنین جدا شده و کشت می‌شود.

کشت اندام و بافت: در این حالت اندام یا بافت گیاهی جدا شده، در شرایط درون شیشه‌ای رشد می‌کند.

کشت کالوس: به تولید توده سلولی تمایز نیافته از کشت یک بافت خاص در شرایط درون شیشه‌ای، کشت کالوس گفته می‌شود.

کشت سلول: کشت سلول‌های منفرد که به کمک آنزیم‌ها یا روش‌های مکانیکی از بافت گیاهی بدست می‌آید، کشت سلول نامیده می‌شود.

کشت پروتوپلاست: کشت پروتوپلاست را ممکن است مرحله بعدی کشت سوسپانسیون در نظر گرفت. به عبارتی با هضم دیواره سلول‌های تشکیل دهنده سوسپانیسون سلولی با آنزیم سلولاز، پروتوپلاست‌ها جدا می‌شوند.

محیط کشت بافت گیاهی

محیط کشت‌هایی که بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از: MS، DKW، گامبورگ(B۵) ، وایت، ناب، هلر، نیچ، نیومن و..

.غلظت نمک در محیط کشت MS بالا می‌باشد و در محیط کشت ناب کمترین غلظت نمک را شاهد هستیم. لذا در هنگام کشت گیاهان حساس به شوری، از محیط کشت‌های هلر و ناب استفاده می‌کنیم و یا اینکه غلظت نمک محیط MS را به نصف تقلیل می‌دهیم. کاربرد و نوع محیط کشت مورد استفاده بستگی به نوع، سن ریزنمونه و هدف از کشت دارد.

مواد غذایی و عناصر لازم در محیط کشت

۱) **عناصر ماکرو:** این مواد به مقداری بیش از ۰/۵ میلی مول بر لیتر، مورد نیاز گیاه می باشند. این عناصر شامل: کلسیم (Ca)، پتاسیم (K)، فسفر (P)، نیتروژن (N)، گوگرد (S) و منیزیم (Mg) هستند. معمولاً عناصر معدنی ماکرو به صورت استوک ساخته و در یخچال نگهداری می شوند.

۲) **عناصر میکرو:** این مواد به مقداری کمتر از ۰/۵ میلی مول بر لیتر مورد نیاز گیاه می باشند. این عناصر شامل آهن (Fe)، مولیبدن (Mo)، مونو اکسید کربن (CO)، روی (Zn)، بور (B)، مس (Cu)، ید (I) و منگنز (Mn) می‌باشند.

در میان این عناصر فقط آهن به صورت استوک جداگانه و بقیه عناصر به صورت یک استوک (استوک میکرو) ساخته می‌شوند.

۳) **هیدرات‌های کربن یا قندها:** افزودن قند در محیط کشت کاملاً ضروری است. معمولاً قند ساکاروز، فروکتوز، گلوکز استفاده می‌شود. میزان غلظت قند افزوده شده به محیط، بستگی به نوع ریز نمونه و سن آن دارد. مثلاً جنین‌های جوان به درصد بالاتری قند نیاز دارند. نکته مهمی که باید توجه کرد این است که قندها در اثر اتوکلاو نمودن، دچار تغییر می‌شوند.

۴) **ویتامین‌ها:** ویتامین‌ها نقش کاتالیتیکی در واکنش‌های آنزیمی دارند. اکثر ویتامین‌ها توسط گیاه ساخته می‌شوند. لیکن اضافه نمودن برخی از ویتامین‌ها نظیر اسید نیکوتینیک (B۳)، تیامین(B۱)، پیرودوکسین (B۶) و... به محیط کشت ضروری است. همچنین از ویتامین C به عنوان آنتی اکسیدان استفاده می‌شود.

۵) **هورمون‌ها:** معمولاً هورمون‌ها در ایجاد تمایز و شکل گیری اندام‌ها موثر هستند. چندین گروه از تنظیم کننده‌های 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. با تنظیم نسبت بین این دو هورمون می‌توان باعث القا شاخه‌زایی یا ریشه‌زایی شد. میزان مصرف اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در محیط کشت بستگی به نوع ریزنمونه و گونه گیاهی و هدف کشت دارد.

اکسین‌ها: 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 غلظت‌های 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.

سیتوکینین‌ها: در تشکیل شاخه نابجا، جلوگیری از تشکیل ریشه، تقسیم سلولی، تشکیل و رشد کالوس، تحریک رشد جوانه جانبی، جلوگیری از رشد طولی شاخه و جلوگیری از پیری برگ موثر هستند. هنگامی که در غلظت مناسب استفاده شوند باعث تقسیم سلولی، تحریک شاخه‌زایی و تنظیم تمایز شده و همچنین سنتتاز را فعال کرده و باعث تحریک فعالیت پروتئین‌ها و آنزیم‌ها می‌شوند.

جیبرلین‌ها: باعث رشد طولی شاخه، رفع دوره خواب (بذر، جنین سماتیک، جوانه انتهایی) و جلوگیری از تشکیل ریشه نابجا می‌شوند.

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

۶) **اسیدهای آمینه:** آمیدها و اسیدهای آمینه دارای نقش مهمی در مورفوژنسیس هستند. ال- تیروزین باعث تحریک جوانه‌زنی و ال- آرژنین باعث تسهیل ریشه‌زایی می‌شود. ال- سرین در کشت میکروسپور برای تسهیل تولید هاپلوئیدی و آمیدهایی چون ال- گلوتامین و ال- آسپاراژین اثر قابل توجهی در جنین‌زایی سوماتیکی دارند.

۷) **عامل ژله‌ای کننده:** آگار و سایر مواد جامد کننده محیط؛ آگار با غلظتی حدود ۰/۶ تا ۰/۸ درصد و در مراحل انتهایی محیط کشت افزوده می‌شود. برای مقابله با شیشه‌ای شدن غلظت آگار را بیشتر می‌کنند. اگر غلظت آگار بیشتر باشد، پتانسیل ماتریک تغییر می‌کند و جذب آب دچار اختلال می‌شود. همچنین جذب مواد غذایی کمتر می‌شود و روی رشد اثر کرده و ساقه‌های جانبی کمتر رشد می‌کنند.

۸) **آب:** از آنجا که ۹۵ درصد محیط کشت را آب تشکیل می‌دهد، به کیفیت آب بایستی توجه ویژه‌ای داشت. برای موارد تحقیقاتی، آبی استفاده شود که در ظروف پیرکس تقطیر شده باشد و برای آزمایشات با

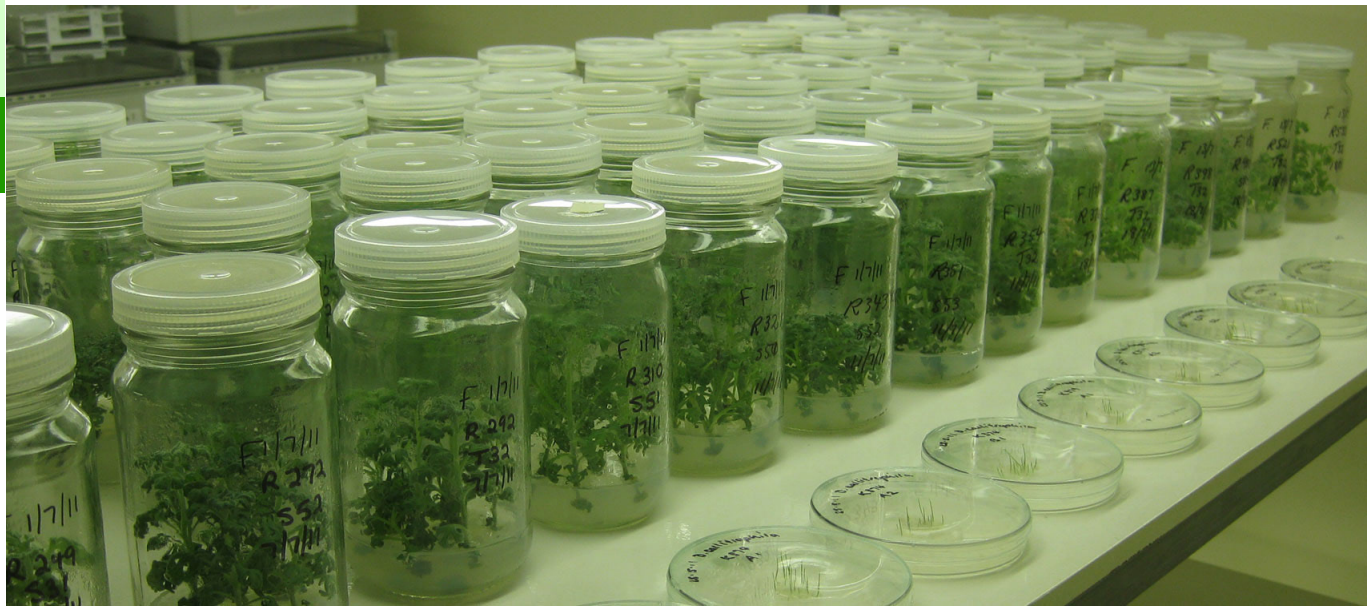
سلول، پروتوپلاسم و مریستم از آب دو بار تقطیر استفاده شود. برای نگهداری آب مقطر بهتر است از ظروف پلاستیکی استفاده گردد؛ چون ظروف شیشه‌ای ذرات سرب، سدیم و آرسنیک را آزاد می‌نمایند. در صورت استفاده از ظروف شیشه‌ای باید جنس آن‌ها پیرکس باشند. از آب لوله کشی نباید برای کشت بافت استفاده شود.

انتخاب محیط کشت مناسب

انتخاب صحیح محیط کشت عامل مهمی در موفقیت ریز ازدیادی گیاهان است. یک محیط کشت واحد را نمی‌توان برای انواع کشت‌ها توصیه کرد و ضروری است بر حسب انواع مختلف ریزنمونه تغییراتی در عناصر ماکرو، میکرو، ویتامین‌ها و به ویژه هورمون‌ها و حتی شرایط نوری و دمایی داده شود. بنابراین فرمول یک محیط کشت به نوع ریزنمونه 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 و تنظیم هورمونی درست، برای دستیابی به رشد و نمو ریزنمونه‌های مختلف متمرکز است.

اجزای محیط کشت

محیط کشت مناسب برای رشد، تقسیم و تمایز سلول‌های ریزنمونه بایستی دارای آب، مواد معدنی، ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه، هورمون‌ها، مواد قندی و سایر ترکیبات آلی باشد. علاوه بر آن محیط کشت نقش نگهداری ریزنمونه را نیز بر عهده دارد. محیط کشت MS به عنوان متداول‌ترین محیط کشت در کشت بافت گیاهی است.



روش گرمادرمانی، روشی موثر در تولید گیاهان عاری از ویروس

تیمار گرما برای خلاصی از عوامل آلودگی در گیاه استفاده می‌شود. گیاهان و ویروس‌ها واکنش یکسانی به تیمار گرمایی نشان نمی‌دهند اما باید تعادلی به وجود آید که هم به گیاه اجازه رشد داده شود و هم بیشترین میزان حذف ویروس را داشته باشیم. همانطور که می‌دانیم در شرایط رشد طبیعی به موازات رشد انتهایی ساقه، ویروس نیز به بافت های جدید منتقل می‌شود. اگر گیاه بتواند در درجه حرارت‌های بالا رشد کند، در این صورت احتمال کاهش سرعت همانند سازی ویروس وجود دارد و در نتیجه انتهای ساقه می‌تواند سریع‌تر از ویروس رشد کرده و عاری از ویروس گردد.

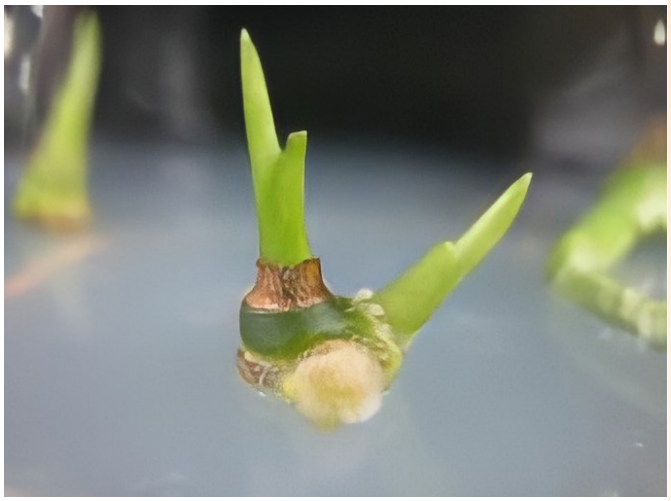
سپس می‌توان انتهای ساقه را که عاری از ویروس است قطع و آن را کشت نمود. دمایی که معمولاً استفاده می شود ۳۶ تا ۳۷ درجه سلسیوس برای چند روز (تا ۷ روز) در ماه است. در واقع گرمای ۳۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس قادر به غیر فعال کردن ویروس‌ها و عدم صدمه به گیاهان است. مدت زمان گرمادهی از چند ساعت تا چند ماه متغیر است. جهت کاهش آسیب به گیاه، استفاده از دوره‌های تناوبی گرما توصیه می‌شود.

به دلیل اینکه معمولاً تعداد عوامل بیماری‌زا در نقاط مریستمی اندک است یا وجود ندارد. سرعت رشد سلول‌های مریستمی بالاست و به ویروس‌ها و سایر عوامل بیماری‌زا اجازه تکثیر نمی‌دهد و در نقاط مریستمی بافت‌های آوندی وجود ندارد و عوامل بیماری‌زا قابل انتقال به نقاط مریستمی نیستند.

کشت مریستم جهت دستیابی به گیاهان عاری از ویروس

تنها نقطه‌ای در گیاه که عاری از آلودگی ویروس است مریستم می‌باشد؛ چرا که سرعت و قدرت تقسیم در مریستم به حدی زیاد است که ویروس ها فرصت تکثیر و همانند سازی پیدا نمی‌کنند. کشت مریستم عمدتاً در درختان هسته دار مورد استفاده قرار می‌گیرد. هر چند برای تعداد زیادی از گیاهان زراعی مثل سیب زمینی، شبدر، توتون و همچنین گیاهان پیازی از این روش استفاده شده است.

گیاهان عاری از ویروس در برخی گونه‌ها مثل گیلاس، تمشک، انگور از طریق کشت مریستم بدست آمده است. در کشت مریستم اندازه ریزنمونه بسیار کوچک (۰/۲ تا ۰/۷ میلی متر) می‌باشد که شامل مریستم و آغازه‌های برگ است.



تکنیک‌های درون شیشه ای (in vitro) مؤثرترین روش‌ها را برای حذف ویروس ارائه می‌دهد. روش‌های مبتنی بر ترموتراپی in vitro، از جمله ترکیب ترموتراپی با کشت مریستم، شیمی درمانی، ریز پیوندی یا سرمادرمانی کشت مریستم، تقریباً برای حذف مؤثر ویروس‌های مختلف تمام محصولات مهم اقتصادی با موفقیت انجام شده است. (Wang et al., ۲۰۱۶)

تولید گیاهان عاری از ویروس برای کنترل بیماری‌های ویروسی، وارد کردن ارقام جدید از کشورهای دیگر، مبادله مواد اصلاح شده بین کشورها یا مناطق داخل کشور و حفظ ژرم پلاسم گیاهی ضروری است. با دانش امروزی، تکنیک کشت بافت تنها روش موثر برای حذف ویروس است. روش مبتنی بر ترموتراپی در شرایط درون شیشه‌ای از جمله ترکیب ترموتراپی با کشت مریستم برای حذف موثر ویروس‌های مختلف هلو با موفقیت انجام شده است. از کشت نوک مریستم در سطح گسترده‌ای برای تولید گیاهان عاری از ویروس در بسیاری از گونه‌های گیاهی استفاده شده است. گرمادرمانی همراه با کشت نوک مریستم از روش‌های اصلی تولید گیاهان عاری از ویروس است. از موانع کشت بافت، می‌توان به آلودگی محیط کشت اشاره کرد. آلودگی‌های آزمایشگاهی اغلب ناشی از محیط (که شامل هوا هم می‌شود)، کاربر، ریزنمونه، محیط کشت و تکنیک‌های ناموثر ضد عفونی است. این آلودگی‌ها خود شامل انواع باکتریایی، قارچی، حشرات، مخمرها، ویروس‌ها و غیره می‌شود. همچنین فناوری کشت بافت (ریز ازدیادی) در مقایسه با روش‌های سنتی تکثیر گران‌تر است، به سرمایه گذاری بالا نیاز دارد و در بعضی از موارد هزینه تولید هر واحد گیاهی خارج از توان مالی است.

منابع

۱. ضرغامی و همکاران، (۱۳۹۶)، ایجاد پروتکل تکثیر نیمه انبوه هلو ارقام عاری از ویروس، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

۲. روزبه و همکاران، (۱۳۹۴)، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

3. http://www.plantago.blogfa.com/post/109