اختلالات گیاهان تکثیر شده به روش کشت بافت

مهدی رضایی / عضو هیئت علمی مؤسسه

عبدالرضا کاوند / معاون تحقیقات کنترل و گواهی نهال

مقدمه

تولید نهال استاندارد و گواهی شده به عنوان مهم‌ترین نهاده در باغبانی می‌تواند نقش مهمی در افزایش کمیت و کیفیت محصولات باغبانی ایفا نماید. نهالستان‌ها و شرکت‌های کشت بافتی تولید کننده پایه‌های رویشی مهم‌ترین اجزاء زنجیره تولید نهال محسوب شده و از این‌رو افزایش آگاهی عمومی کارکنان و کارشناسان این مجموعه های تولیدی می تواند نقش مهمی در ارتقاء صنعت باغبانی کشور داشته باشد. در سال‌های اخیر با تأسیس واحدهای کشت بافت گیاهی در کشور، استفاده از پایه های رویشی بیش از پیش توسعه یافته و معاونت تحقیقات کنترل و گواهی نهال بنابر وظیفه ذاتی خود، اقدام به کنترل و نظارت بر تولیدات این شرکت ها نموده است. علیرغم محاسن بسیار زیاد پایه های رویشی حاصل از کشت بافت، در صورت عدم رعایت شرایط بهینه در آزمایشگاه و گلخانه، ممکن است مواد گیاهی تولید شده دچار اختلالاتی از لحاظ ظاهری (مورفولوژیک)، فیزیولوژیک و ابتلا به بیماری‌ها شوند. در این مقاله به اختصار، عمده ترین مشکلات مربوط به این محصولات و روند کنترل و نظارت بر آن‌ها توسط کارشناسان معاونت تحقیقات کنترل و گواهی نهال، تشریح می‌شوند.

۱- مشکلات مربوط به گیاهان درون شیشه (In Vitro)

وقوع یک یا چند اختلال در فرآیند کشت بافت گیاهان زینتی و درختان میوه می‌تواند باعث بالا رفتن هزینه های تولید شود. با توجه به اینکه گیاهان درون شیشه زخمی شده، کامل نبوده، به جای فتوسنتز در برگ از شکر به عنوان ماده غذایی استفاده کرده، دوز بالایی از اکسین و سیتوکینین را دریافت می‌کنند و تعادل آب آنها به دلیل میزان بالای بخار آب به هم خورده است، ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی و ژنتیکی در آنها دور از انتظار نیست. همچنین بسیاری از تفاوت های به ظاهر کوچک میان آزمایشگاه ها می تواند عامل تولید گیاهان با کیفیت مطلوب یا نامطلوب باشد. از این تفاوت ها

می تـوان بـه شـرکت تولیـد کننـده (برنـد) و غلظـت آگار، ، نـوع ظرف و درب آن و سـاختار قفسـه ها در اتاقـک رشـد (فاصلـه ظروف بـا لامپ ها، تهویـه و فاصلـه قفسـه ها) اشـاره کـرد. عـلاوه بـر ایـن، عوامـل دیگری نیـز می تواننـد اثرات مسـتقیم یا غیر مسـتقیم بر شـرایط اکولـوژی درون ظروف کشـت بافت داشـته باشـند. لازم به ذکر اسـت که اسـتفاده از مواد اولیـه ی بـا کیفیت جهت تهیـه محیط کشـت از اهمیت زیـادی برخوردار اسـت زیـرا اسـتفاده از مـواد بی کیفیت می تواند با افزایش فشـار اسـترس یـا فراهـم نکردن مقدار مواد لازم برای رشـد و باززایـی گیاهچه، بازددهی کشـت بافـت را پاییـن آورند.

مهـم‌ترین مشـکلات موجـود در بیشـتر آزمایشـگاه های کشـت بافت از چهـار نـوع هسـتند: ۱- آلودگـی بـه عوامـل بیمـاری زا ۲- مشـکلات فیزیولوژیکـی ۳- تنـوع با منشـا اپی ژنتیک ۴- تنوع سـوماکلونال. در این مقالـه عمدتـاً اختـلالات فیزیولوژیکی و تنوع سـوماکلونال و عوامل دخیل در ایجـاد ایـن ناهنجاری هـا مـورد بحـث و بررسـی قرار خواهنـد گرفت.

۱-۱ - آلودگی به عوامل بیماری زا

منشـا رایج‌تریـن آلودگی هـا در محیـط کشـت، قارچ‌هـا و باکتـری‌هـا می باشـند. مشـکلات مربـوط بـه آلودگـی‌هـای قارچی بـه دلیـل این که مـی‌تـوان آنهـا را بـا اسـتریل‌کردن مـواد اولیـه و یا آمـاده سـازی گیاهان مـادری در شـرایط بهداشـتی برطـرف نمـود در بیشـتر مـوارد دارای اهمیت زیـادی نیسـتند. بدترین نوع آلودگی در کشـت بافت آلودگـی های باکتریایی هسـتند. بسـیاری از افـراد بر ایـن باورند که تمامـی آلودگی هـای باکتریایی بـه دلیل عدم رعایت مسـائل بهداشـتی رخ می دهند ولی شـواهد بسـیاری وجـود دارنـد کـه نشـان می دهنـد باکتری هـای درونـزاد نیـز در ایجـاد آلودگـی نقـش دارند.

۱-۲ - مشکلات فیزیولوژیکی

گیاهـان موجـودات ثابـت و بی تحرکـی بوده کـه در معـرض تغییرات محیطـی هسـتند. بنابرایـن تغییـرات سـلولی سـریع، اسـتراتژی مهمـی بـرای زنـده مانـدن گیاهـان می باشـند. در محیـط کشـت درون شیشـه، ریزنمونه هـا وارد شـرایط محیطـی جدیـدی شـده و بنابرایـن سـریعاً فیزیولـوژی و متابولیسـم خـود را تغییـر می دهنـد. گیاهان تکثیر شـده در محیـط درون شیشـه اغلـب بـه دلیـل کشـت در ظـروف کوچـک دارای شـرایط فیزیولوژیکـی غیرطبیعی هسـتند. چنیـن ناهنجاری هایـی زمانی بـروز می کننـد کـه گیاهـان در زمیـن (عرصـه) یـا در شـرایط گلخانه ای کشـت می شـوند. در قسـمت ذیل به مهم‌تریـن مشـکلات فیزیولوژیکی گیاهـان درون شیشـه پرداختـه می شـود.

۱-۲-۱ - شیشه ای شدن

یکـی از مهـم‌تریـن عوامـل ناهنجاری هـای فیزیولوژیـک در محیـط درون شیشـه، اشـباع شـدن فضـای ظـرف از بخـار آب مـی باشـد. دیگـر عواملـی کـه مـی توانند شیشـه ای شـدن را تشـدید نمایند، شـامل عوامل تغذیـه ای (مـواد معدنـی و کربوهیدرات هـا)، سـطوح بـالای تنظیـم کننده هـای رشـد و شـدت کـم نـور می باشـند. در بدتریـن شـرایط، ایـن ناهنجـاری هـای فیزیولوژیکـی بـه از میـان رفتن گیـاه منجر می شـوند. ایـن گیاهـان پـس از شیشـه ای شـدن، نکـروزه شـده و از بیـن می روند. گیاهچه های شیشـه ای حالت نیمه شـفاف و پر آب داشـته و می درخشند (شـکل ۱). در مراحـل اولیـه ایـن ناهنجاری، قسـمت هوایی گیـاه در یک نظـر اجمالـی دارای برگ هـای طبیعی می باشـد ولـی این ظاهـر فریبنده بـوده بـه طـوری کـه در اغلـب مـوارد ایـن برگ هـا دارای لایـه واکسـی نبـوده و روزنه هـای آنهـا فعـال نیسـت (شـکل ۲). این یکـی از مهمترین مشـکلات انتقـال ایـن گیاهـان از محیـط درون شیشـه به گلخانه اسـت. بـه عبـارت دیگـر آخریـن مرحلـه از کشـت درون شیشـه و اولیـن مرحله خـارج از شیشـه (In Vivo) بسـیار مهـم و بحرانـی هسـتند. بنابراین، اگر در آخریـن مرحلـه از کشـت درون شیشـه، انـدام هوایـی دارای برگ های فعـال باشـد، بسـیاری از مشـکلات در گلخانه حل می شـود. ایـن اختلال کـه عمدتـاً در برگ هـا نمایـان اسـت، دو فرآینـد مهم شـامل فتوسـنتز و تبـادل گاز (CO_2 و بخـار آب) که توسـط برگ‌ها انجام می شـود را مختل می کنـد. علائـم شیشـه ای شـدن را با شـدت کمتـر می توان در سـاقه و ریشـه نیـز مشـاهده نمـود. کاهش در میـزان چوبـی شـدن، جهت گیری غیرطبیعـی میکروفیبریل هـا و رسـوب کالـوز به جـای سـلولز در آبگیری بیـش از حـد بافت هـا، عملکـرد ناصحیـح روزنه هـا (شـکل ۳) در پدیـده شیشـه ای شـدن دخیـل هسـتند. در کل، تمامـی عواملـی کـه بتواننـد تا حـدی رطوبـت نسـبی را در سـطح بـرگ کاهش دهنـد، مسـتعد افزایش کیفیـت گیاهـان تولیـد شـده در محیط درون شیشـه هسـتند. در قسـمت ذیـل بـه نقش برخـی عوامل در ایجاد شـرایط غیـر طبیعی بـرای گیاهان درون شیشـه اشـاره شـده است.

- شرایط فیزیکی محیط کشت

افزایـش غلظـت آگار می توانـد باعـث کاهش شیشـه ای شـدن شـود ولـی از سـوی دیگـر می تواند نـرخ تکثیر را پایین آورد. بررسـی ها نشـان داد کـه پاسـخ گیاهـان کشـت شـده بـه جایگزینـی آگار بـا دیگـر عوامل ژلـه ای کننـده، بسـته به غلظـت و گونه مـورد تکثیر متفاوت بـود. کاهش رطوبـت نسـبی محیط به وسـیله اسـتفاده از رطوبت گیرها باعـث افزایش رسـوب واکـس و کاهـش شیشـه ای شـدن مـی شـود. یکـی دیگـر از راه هـای کاهش رطوبت نسـبی محیط، قـرار دادن ظروف کشـت بر روی صفحـات خنک اسـت که باعـث تبدیل بخـار آب به مایع بـر روی محیط آگار شـده و کاهـش شیشـه ای شـدن را در پی خواهد داشـت.

– اجزای ارگانیک و غیر ارگانیک محیط کشت

– علاوه بر وضعیت فیزیکی محیط کشت، مواد محلول مختلف نیز می توانند ریخت زایی گیاه را تحت تاثیر قرار دهند. سوکروز مهمترین کربوهیدرات در محیط کشت درون شیشه است. در گیاه میخک، گیاهان کشت شده بر روی محیط کشت با بیش از سه درصد سوکروز، برگ های شیشه ای کمتری تولید کردند ولی جایگزین کردن قسمتی از سوکروز به وسیله مانیتول باعث ایجاد برگ های آبدار شد. به نظر می رسد که واکنش گونه های مختلف به بالا رفتن سطوح کربوهیدرات در محیط کشت متفاوت است. به طوری که برخی پاسخ مثبت، برخی پاسخ منفی و برخی نسبت به تغییر سطح کربوهیدرات بی تفاوت هستند. محیط های کشت غنی از مواد غذایی (مانند MS کامل) شیشه ای شدن را در برخی گونه ها افزایش می دهند. بنابراین با استفاده از سطوح پایین تر مواد معدنی یا به کارگیری فقط نیمی از نمک های محیط کشت MS می توان این شرایط را بهبود بخشید. کاهش میزان NH_4^+ در محیط کشت می تواند منجر به افزایش چوبی شدن و کاهش شیشه ای شدن شود. نشان داده شده است که افزایش میزان کلسیم می تواند باعث کاهش شیشه ای شدن در گیاهان علفی و چوبی شود. هرچند برخی شواهد نیز نشان می دهند که افزایش میزان کلسیم می تواند با فعال کردن پراکسیدازها و القای تشکیل کالوز مرتبط بوده و باعث اختلال در فرایند لیگنینی شدن شود.

– نور و دما

گیاهان کشت شده در محیط درون شیشه با کربوهیدرات ها تغذیه شده و بنابراین هتروتروفیک هستند.کیفیت، طول دوره و شدت نور، می تواند رشد شاخساره و ریخت زایی را تحت تأثیر قرار دهد. در کل، نور می تواند بر اندازه برگ و ساقه، مسیر ریخت زایی، تشکیل رنگدانه و شیشه ای شدن تأثیرگذار باشد. دماهای بهینه برای کشت بافت گیاهی توسط تعداد زیادی از محققین بررسی شده و بیشتر آنها دماهای میان ۲۰ تا ۲۷ درجه سانتیگراد را توصیه کرده اند. دمای بهینه محیط، بستگی به گونه مورد نظر دارد. عدم وجود دمای بهینه می تواند باعث القای بدشکلی، صفحه ای شدن، مرگ و افزایش آلودگی شود. شدت و کیفیت نور فاکتورهای مهمی برای فتوسنتز هستند. حتی در مورد ریزنمونه های کشت بافتی که تا حدودی هتروتروف هستند نشان داده شده است که طیف کامل نور برای رشد شاخساره بسیار مهم است. به دلیل اینکه نور قرمز، قرمز دور و آبی در بسیاری از پاسخ های فیزیولوژیکی دخیل هستند، کیفیت نور می تواند کشت درون شیشه را تحت تاثیر قرار دهد. نور آبی می تواند القای کشت بافت را تحریک یا از آن جلوگیری کند. در تحقیقی مشاهده شد که ریشه زایی در ریز قلمه های کشت شده تحت نور قرمز دور افزایش یافت در حالی که نور قرمز تکثیر شاخه را تشدید کرد. بهترین منبع نور برای اتاقک رشد، نور LED می باشد به دلیل اینکه میزان انرژی پایینی را مصرف کرده و گرمای کمی تولید می کند.

– تنظیم کننده های رشد

مطالعات نشان داده است که میزان تنظیم کننده های رشد موجود در محیط کشت می تواند بر روی شیشه ای شدن گونه های مختلف تأثیرگذار باشد. در تحقیقی مشاهده شد که افزایش میزان BA به همراه ۳ میلی مولار $MgSO_4$ باعث کاهش شیشه ای شدن در گیاهچه های سیب، به و گلابی شد. کاهش میزان سیتوکینین ها و همچنین افزایش میزان NAA در محیط کشت گیاهچه های بید مجنون (*Salix babylonica*) باعث شیشه ای شدن شاخساره شد. همچنین گزارش شده است که افزایش میزان BA در محیط کشت *Malus* sp. می تواند باعث ایجاد برگ های شیشه ای، کم شدن میزان کلروفیل، ایجاد کلروپلاست های غیرنرمال و کم شدن تعداد روزنه شود. بنابراین بهینه کردن میزان تنظیم کننده های رشد در محیط کشت می تواند نقش بسزایی در جلوگیری از ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی در گیاهان پرورش یافته در محیط درون شیشه شود.

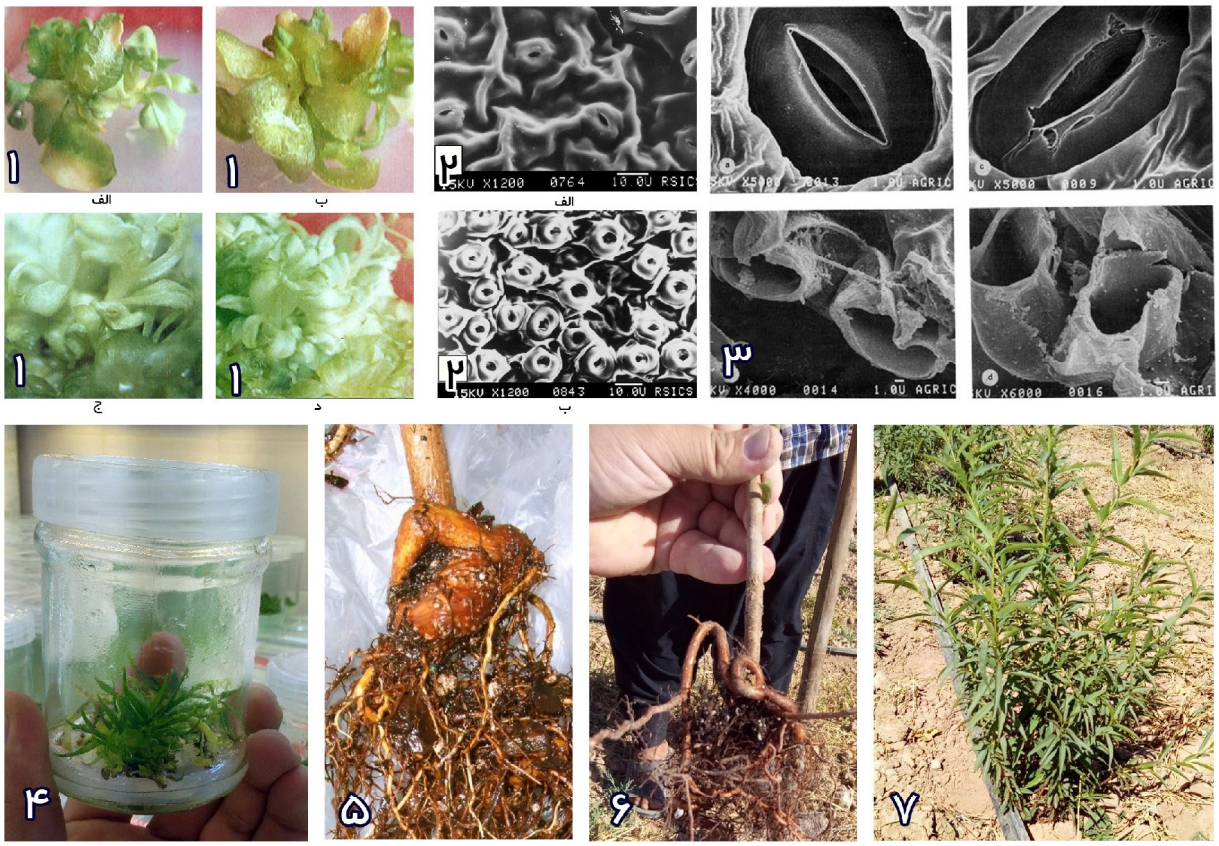
۱-۲-۲ – نکروز شدن نوک گیاهچه (STN)

دیگر ناهنجاری فیزیولوژیکی در کشت بافت، نکروزه شدن جوانه انتهایی می باشد. به احتمال فراوان مهم‌ترین فاکتور کنترل‌کننده این پدیده اکولوژی ظرف مورد استفاده است. در اتمسفر اشباع از بخار آب، انتقال فعال عناصر غذایی وجود نداشته و در واقع بسیاری از محققین نکروزه شدن جوانه انتهایی را با کمبود کلسیم در آن ناحیه مرتبط می دانند.

در مراحل اولیه کشت بافت، غیاب ریشه به عنوان منبع تولید کننده سیتوکینین طبیعی، باعث کاهش میزان سیتوکینین درونی گیاه شده و این مسأله باعث اختلال در تقسیم سلولی و نکروز شدن مریستم انتهایی می شود. در پی این رخداد، به دلیل اینکه محل ساخت اکسین و آبسیزیک اسید مریستم انتهایی است، میزان این دو هورمون کاهش یافته و ریشه زایی نیز با مشکل مواجه می شود. فرو کردن نوک گیاهچه ها در محلول بنزیل آدنین قبل از قراردادن آنها در محیط ریشه دهی در جلوگیری از STN مؤثر می باشد. از دیگر عوامل مؤثر بر نکروز شدن نوک شاخساره می توان به تهویه کم ظرف کشت، کمبود عنصر بر و زیاد شدن فاصله زمانی میان واکشت ها اشاره کرد.

۱-۳ –تنوع سوماکلونال

رشد سلول های گیاهی در شرایط درون شیشه و باززایی آنها به



شکل –۱ مراحل مختلف شیشه ای شدن از A تا D در گیاه میخک در شرایط درون شیشه (اقتباس از Hazarika, ۲۰۰۶). شکل –۲ اسکن الکترونی پوشش واکس اپی کوتیکولار بر روی سطح برگ (a) در گیاه گلخانه ای و (b) گیاه درون شیشه (اقتباس از Hazarika, ۲۰۰۶)شکل –۳ تصویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) از روزنه های طبیعی (شکل بالا و پایین سمت چپ) و غیر طبیعی (شکل بالا و پایین سمت راست) در گیاه میخک (اقتباس از Ziv, ۱۹۹۱). شکل –۴ گیاهچه شیشه ای شده شکل –۵ احاطه شدن طوقه توسط ریشه که می تواند باعث اختلال در انتقال آب و مواد غذایی در آوندها شود. شکل –۶ بد شکلی J-hooked (قلابی شدن ریشه). شکل –۷ جارویی شدن پایه کشت بافتی

گیاهان کامل، یک فرآیند غیرجنسی است که فقط شامل تقسیم میتوز بوده و به صورت تئوری نبایستی باعث ایجاد موتاسیون و تنوع شود. از موتاسیون به عنوان تغییرات قابل توارث در توالی DNA یاد می شود که حاصل تفرق ژنتیکی یا نوترکیبی نیست. محیط کشت درون شیشه می تواند موتاژن بوده و گیاهان بازززا شده از کشت اندام، کالوس، پروتوپلاست و جنین زایی سوماتیکی ممکن است تنوع در DNA و تنوع فنوتیپی نشان دهند. از زمان اولین مشاهده و گزارش تنوع سوماکلونال در سال۱۹۵۹ توسط (Braun) این مسأله به‌عنوان یک مشکل اساسی گیاهان کشت بافتی شناخته شده است. همچنین ممکن است که تنوع ایجاد شده مفید بوده و باعث ایجاد صفاتی مانند مقاومت به بیماری‌ها، افزایش کیفیت و عملکرد شود و بتوان از آنها در فعالیت های به‌نژادی استفاده کرد.

تغییرات‌ژنتیکی در موتانت‌ها می تواند حاصل القاء توسط موتاژن‌های فیزیکی یا شیمیایی بوده و یا از طریق کشت بافت ایجاد شود. به موتاسیون‌های القاءشده توسط باززایی از طریق کشت بافت، تنوع سوماکلونال گفته می شود.

واریانت‌های سوماکلونال ممکن است به طور پایدار یا موقتی از گیاه مادری متفاوت باشند. تغییرات موقتی می تواند نتیجه اثرات فیزیولوژیکی یا اپی ژنتیکی بوده که از طریق جنسی قابل توارث نبوده و قابل بازگشت هستند در صورتی که واریانت های پایدار، از طریق جنسی و غیر جنسی قابل توارث هستند. این واریانت های پایدار ممکن است حاصل تکثیر یک تنوع از پیش موجود در گیاه مادری یا القای تنوع (موتاسیون) به واسطه کشت بافت باشند.

۱-۳-۱ – تنوع از پیش موجود

گیاهان شیمر، تنوع در سطح پلوئیدی، اختلالات و بازآرایی های کروموزومی القا شده به‌وسیله کشت بافت، تغییر در مکانیزم های تنظیم کننده چرخه سلولی و فعال شدن عوامل ترانسپوزونی فاکتورهایی هستند که تنوع از پیش موجود را القاء می‌کنند. در این

مقاله به دلیل محدودیت فضا، تنوع القا شده به‌واسطه کشت بافت مورد بحث قرار می گیرد.

۱-۳-۲ - تنوع القا شده بواسطه کشت بافت

در طول کشت درون شیشه، روش تکثیر، ژنوتیپ، ماهیت بافت مورد استفاده به عنوان ماده اولیه، نوع و غلظت تنظیم کننده های رشد، تعداد و طول دوره واکشت ها از عواملی هستند که فراوانی تنوع را تعیین می کنند. هر کدام از این عوامل در قسمت ذیل مورد بررسی قرار می گیرند.

- روش تکثیر درون شیشه

در کل در روش های تکثیر درون شیشه، هرچه ساختار سازمان یافته گیاه بیشتر آسیب ببیند، شانس وقوع جهش بیشتر می شود. برخی از سیستم های کشت مانند کشت نوک مریستم و جوانه های جانبی کمترین اختلال سلولی را ایجاد می کنند در حالی که برخی دیگر مانند کشت پروتوپلاست و ریز نمونه های غیرمریستمی که در آنها باززایی از طریق تشکیل شاخه های نابجا از کشت کالوس یا سوسپانسیون سلولی انجام می گیرد، بیشترین اختلال را ایجاد کرده و در نتیجه احتمال ایجاد موتاسیون را بیشتر می کنند.

- نوع بافت یا ماده اولیه مورد استفاده

بافت های بسیار تمایز یافته مانند ریشه ها، برگ ها و ساقه ها در کل نسبت به ریزنمونه های گرفته‌شده از جوانه های جانبی و نوک ساقه که دارای مریستم های از قبل تشکیل‌شده هستند، تنوع بیشتری ایجاد می‌کنند. اگرچه در برخی موارد استثناء مشاهده شده است که بافت نوک ساقه نسبت به جنین زایی سوماتیکی در موز تنوع بیشتری را ایجاد کرده است که این مساله احتمالا به دلیل وجود شیمر در بافت نوک ساقه بوده است. استفاده از بافت های تمایز نیافته مانند پروکامبیوم و کامبیوم به عنوان ماده اولیه برای کشت بافت، شانس ایجاد تنوع را کاهش می دهد.

- نوع و غلظت تنظیم کننده های رشد

غلظت های بهینه و نسبت های دقیق اکسین ها و سیتوکینین ها برای ریزازدیادی بهینه ضروری هستند. رخداد های اولیه انجام گرفته به واسطه کاربرد تنظیم‌کننده های رشد در محیط کشت، ریخت زایی را از طریق ایجاد تغییر در چرخه سلولی تحریک کرده و می تواند باعث ایجاد تنوع شود. همچنین تنظیم‌کننده های رشد باعث افزایش نرخ تقسیم در سلول هایی که از نظر ژنتیکی غیرنرمال بوده اند می شود. بنابراین ترکیب ژنتیکی جمعیت سلول ها می تواند به وسیله سطوح نسبی اکسین ها و سیتوکینین ها تحت تاثیر قرار گیرد. شواهد مبتنی بر نقش مستقیم تنظیم کننده های رشد در جهش زایی قاطع نبوده و بیشتر شواهد بر نقش غیرمستقیم آنها از طریق تحریک رشد نامنظم و سریع دلالت دارد. مشخص شده است که کاربرد اکسین ها در کشت کالوس یا سوسپانسیون سلولی می تواند از طریق افزایش نرخ متیلاسیون در DNA باعث افزایش تنوع ژنتیکی شود. نسبت ناصحیح اکسین به سیتوکینین احتمال ایجاد پلی پلوئیدی را افزایش می دهد. نسبت های کمتر و بیشتر از بهینه تنظیم کننده های رشد با میزان تنوع سوماکلونال در ارتباط است.

- تعداد واکشت

افزایش تعداد واکشت و افزایش مدت زمان آن، نرخ تنوع سوماکلونال را مخصوصًا در سوسپانسیون سلولی و کشت کالوس، افزایش می‌دهد. در یک مطالعه نشان داده شد که جهش یافته‌های سوماکلونال از پنجمین واکشت به میزان ۱/۳ درصد ظاهر شدند و در واکشت یازدهم میزان آن به ۳/۸ درصد رسید. همچنین مطالعات نشان داده اند که میزان تنوع سوماکلونال در کشت های بلند مدت بیشتر است. تعداد جهش یافته ها به صورت یک تابع نمایی از تعداد واکشت ها تغییر می کند.

وجود استرس در طول کشت بافت می تواند تنوع سوماکلونال را القا نماید. ژنوم های مختلف پاسخ های متفاوتی به تنوع ایجاد شده بوسیله استرس می دهند. این مسأله نشان می دهد که تنوع سوماکلونال تحت تاثیر عوامل ژنوتیپی است. تفاوت در پایداری ژنتیکی اجزای ژنوم گیاه می توانند باعث پایداری ژنتیکی در طول کشت شوند. این مساله را می توان به DNA تکرار شونده نسبت داد بدین دلیل که کمیت و کیفیت آن در میان گونه‌های گیاهی متفاوت است.

۳- کنترل و نظارت بر محصولات کشت بافتی در ایران

بر اساس اطلاعات موجود در مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، در حال حاضر، ۲۶ شرکت کشت بافتی دارای مجوز و تحت نظارت در کشور وجود دارد که از این تعداد حدود ۱۰ شرکت سهم بیشتری از بازار تولید دارند.

این شرکت ها هم اکنون بیش از ۲ میلیون پایه رویشی تولید می کنند و فرایند تولید و محصولات آماده فروش آنها توسط کارشناسان استانی و ستادی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، حداقل ۵ مرتبه مورد بازدید و نظارت قرار می گیرند. طی مراحل نظارت، از اتاق شستشو، آزمایشگاه، اتاق هود، اتاق رشد، گلخانه سازگاری و گلخانه انتظار بازدید به عمل می آید (جدول ۱). هدف نهایی این بازرسی ها تولید مواد گیاهی استاندارد، حمایت از حقوق مصرف کننده و پایین آوردن هزینه های تولید می باشد. در حال حاضر یکی از مهمترین نیازمندی های شرکت های کشت بافتی، وجود یک

جدول ۱- مراحل مختلف کنترل و نظارت بر تولید مواد تکثیری از طریق کشت بافت

مراحل بازدید	محل بازدید	عوامل مورد بررسی
۱	اتاق شستشو و اتوکلاو	رعایت بهداشت از جانب کارکنان، مواد مورد استفاده جهت شستشو، رعایت شرایط استاندارد اتوکلاو
۲	اتاق تهیه محیط کشت	رعایت نظم و بهداشت از جانب کارکنان، دستگاه‌های اندازه‌گیری، پروتکل تهیه محیط کشت
۳	اتاق هود (تکثیر)	کنترل ورود و خروج، رعایت نظم و بهداشت از جانب کارکنان، منبع اولیه تهیه ریزنمونه، تعداد واکشت های انجام شده، میزان کارکرد فیلتر هود لامینار
۴	اتاق رشد	دمای محیط، یکنواختی توزیع نور، ثبت اطلاعات مواد گیاهی بر روی قفسه ها، علایم آلودگی به عوامل بیماریزا در محیط درون شیشه، مورفولوژی گیاهچه های درون شیشه
۵	گلخانه سازگاری	وجود حوضچه ضدعفونی، لیبل‌گذاری سینی‌های کشت، مدت نگهداری مواد گیاهی در سینی کشت، تراکم مواد گیاهی، علائم آلودگی به آفات و عوامل بیماری‌زا، علائم کمبود مواد غذایی، مورفولوژی ریشه و شاخساره گیاهچه ها، وجود علف‌های هرز در سینی کشت، اندازه گلدان و یا سینی کشت، دسته بندی گیاهچه ها بر اساس اندازه
۶	گلخانه انتظار	تاریخ تعویض و اندازه گلدان، وجود علف هرز در سینی کشت/گلدان، مورفولوژی ریشه و شاخساره گیاهچه ها، علائم آلودگی به آفات و عوامل بیماری‌زا، علائم کمبود مواد غذایی، دسته بندی مواد گیاهی بر اساس اندازه، حذف مواد گیاهی دارای ظاهر غیرطبیعی، الصاق لیبل به گیاهان آماده تحویل

منبع واحد از مواد گیاهی سالم و اصیل در کشور، جهت تهیه ریزنمونه بوده و امید است تا با همکاری بخش خصوصی و دولتی این بانک مواد گیاهی در آینده نزدیک تشکیل شود.

با توجه به بازدیدهای به عمل آمده توسط کارشناسان مؤسسه از تولیدات شرکت های مختلف طی سال های اخیر، برخی اختلالات در محصولات کشت بافتی مربوط به گروه های محصولی مختلف مشاهده شده است. از این مشکلات می توان به عدم باروری و یا تشکیل میوه های سه برچه ای، شیشه ای شدن گیاهچه (شکل ۴)، سوختگی نوک گیاهچه، انواع بدشکلی ریشه (شکل‌های ۵ و ۶) و جارویی شدن گیاه (شکل ۷) اشاره نمود. دلیل به وجود آمدن انواع بدشکلی ریشه در پایه های رویشی حاصل از کشت بافت، نگهداری طولانی مدت گیاهچه ها در سینی کشت و گلدان بوده و جهت پیشگیری از این پدیده لازم است تا در هنگام جابجایی گیاهچه از شیشه به سینی کشت و یا از سینی کشت به گلدان، ریشه ها هرس شوند. در مورد جارویی شدن نیز احتمال می رود از بین رفتن نوک گیاهچه (و متعاقباً غالبیت انتهایی) باعث فعال شدن جوانه های جانبی شده و در اثر رشد آنها گیاه ظاهر جارویی پیدا می کند. انتظار می رود تا با نظارت و پایش مستمر کارشناسان مؤسسه بر فرایند تولید در شرکت های کشت بافت و ارائه راهکارهای مناسب به تولیدکنندگان، مشکلات مشاهده شده در مورد محصولات این شرکت ها برطرف شود.

٤-جمع بندی

بنابر آنچه گفته شد اگرچه کشت بافت در شرایط بهینه روشی کارا و سریع برای ریزازدیادی، عاری سازی از عوامل بیماری زا، به‌نژادی و غیره می باشد ولی در شرایط نامناسب، چالش های بسیاری را به دنبال خواهد داشت. وقوع این چالش ها باعث ایجاد زیان مالی شده و در نهایت هزینه تولید محصول را افزایش خواهد داد. بنابراین لازم است تا پیش از شروع هر فعالیت اقتصادی، کلیه شرایط بهینه در مورد گونه مورد نظر از منابع مطمئن استخراج شده یا با اعمال تیمارهای مختلف و انتخاب بهترین نتیجه، شرایط بهینه استنباط شوند. در حال حاضر تولیدات شرکت های کشت بافتی از لحاظ کمی در وضعیت قابل قبولی قرار داشته و می تواند پاسخگوی نیاز باغبانی کشور باشد. با این وجود شایسته است تا شرکت های تولید کننده محصولات کشت بافتی با بکارگیری توصیه های کارشناسان و متخصصین، در راستای افزایش کیفی محصولات خود توجه لازم را مبذول نمایند.

پی نوشت

1- Murashige and Skoog
2 - Light-Emitting Diode
3- - Benzyl Adenine
4 - Naphthalene Acetic Acid
5 - Shoot Tip Necrosis

منابع

- Bairu, M. W., & Kane, M. E. (2011). Physiological and developmental problems encountered by in vitro cultured plants. Plant Growth Regulation, 63(2), 101-103.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., & Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regulation, 63(2), 147-173.
- Bairu, M. W., Stirk, W. A., & Van Staden, J. (2009). Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 98(3), 239-248.
- Braun, A. C. (1959). A demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 45(7), 932-938.
- Debergh, P. (1985). A few academic approaches to problems in tissue culture propagation. Arxius de l›Escola Superior d›Agricultura de Barcelona, (8), 11-13.
- Hazarika, B. N. (2006). Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. Scientia horticulturae, 108(2), 105-120.
- Neelakandan, A. K., & Wang, K. (2012). Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. Plant cell reports, 31(4), 597-620.
- Ruffoni, B., & Savona, M. (2013). Physiological and biochemical analysis of growth abnormalities associated with plant tissue culture. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 54(3), 191-205.
- Ziv, M. (1991). Quality of micropropagated plants—vitrification. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 27(2), 64-69.
- Ziv, M. (1991). Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In Micropropagation (pp. 45-69). Springer, Dordrecht.
- Ziv, M. (1995). In vitro acclimatization. In Automation and environmental control in plant tissue culture (pp. 493-516). Springer, Dordrecht.