ریزازدیادی گیاهان در محیط کشت مایع با استفاده از بیوراکتورها

نسرین مشتاقی[1]، احمد شریفی[2]، عبدالرضا باقری[1]

[1] عضو هیات علمی گروه بیوتکنولوژی و به‌زراعی دانشگاه فردوسی مشهد و [2] عضو هیات علمی گروه فناوری کشت بافت‌های گیاهی جهاد دانشگاهی مشهد

Email: moshtaghi@um.ac.ir

چکیده:

ریزازدیادی گیاهان در محیط کشت مایع در شرایط استریل، روشی مناسب برای تکثیر گیاهان در سطح وسیع محسوب می‌شود. اتوماسیون ریزازدیادی به روش اندام زایی یا جنین زایی سوماتیکی در بیوراکتورها به عنوان یک روش مناسب برای کاهش زمان و هزینه های تکثیر گیاهان شناخته شده است. تاکنون از انواع متعددی از بیوراکتورها برای تکثیر بیوماس گیاهی استفاده شده است که هر کدام از آنها از مزایا و محدودیت هایی برخوردارند. هم اکنون سیستم های تعلیق موقت و بیوراکتور هوادهنده توانسته‌اند تا حدی این مشکلات را مرتفع نمایند. در این سیستم‌ها می‌توان با بهینه کردن شرایط کشت و پارامترهای مهم موثر بر رشد، به راندمان بالایی از تکثیر دست یافت. در این مقاله بیوراکتورهای مناسب برای ریزازدیادی و روش های تکثیر کلونال کم هزینه، معرفی و تجارب جهانی استفاده از آنها به منظور آشنایی محققان داخلی با تکنیک‌های جدید تکثیر گیاهان در محیط کشت‌های مایع مورد بررسی قرار گرفته است.

مقدمه:

ریزازدیادی گیاهان به روش های مرسوم عمدتا در محیط کشت های نیمه جامد انجام می شود که از موفقیت نسبی برخوردار بوده و نیاز به زمان و نیروی کار زیادی دارند. محققان درصددند تا زمان، هزینه و راندمان تکثیر گیاهان را به منظور تجاری سازی آنها کاهش دهند. در این راستا، استفاده از کشت‌های مایع در حال حرکت توصیه شده است. حرکت دائم محیط کشت سبب رسیدن اکسیژن و مواد غذایی به همه بافت‌ها شده و محیط ایده‌آلی برای رشد و تکثیر سریع گیاهان فراهم می‌کند. سیستم‌های کشت مایع، محیط یکنواخت تری برای رشد فراهم می‌کنند و مواد غذایی بدون اینکه ظروف عوض شوند قابل تجدید هستند. ضمن اینکه استریل نمودن محیط کشت با استفاده از فیلتر نیز به آسانی امکان پذیر است. در مقایسه با کشت های نیمه جامد، در این روش می‌توان از ظروف بزرگتر استفاده نمود و فاصله زمانی واکشت ها را افزایش داد. یکی از پیش نیازهای تکثیر اتوماتیک، داشتن سیستم کشتی است که در آن شاخه‌ها یا جنین‌های سوماتیکی در همان ظرف تولید شده و نیاز به انتقال مجدد به ظرف دیگری نداشته باشند. بیوراکتور یک سیستم مناسب و سریع برای کشت مایع و اجتناب از نیروی کار فراوان برای ریزازدیادی گیاهان فراهم کرده است. اتوماسیون ریزازدیادی در بیوراکتورها برای تکثیر بهینه گیاهان بستگی به فهم بهتر پاسخ های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاهی به محرک های محیطی دارد، لذا بهینه سازی عوامل شیمیایی و فیزیکی محیط کشت برای کنترل اندام زایی گیاهان در سیستم کشت مایع حائز اهمیت است [۱ و ۳]. در این مختصر، استفاده از بیوراکتورها و انواع مختلف آن به اجمال مورد بررسی قرار می گیرد.

استفاده از بیوراکتورها در تکثیر گیاهان: تکثیر وسیع گیاهان به روش کشت سلول و جنین با استفاده از بیوراکتورها برای مصارف صنعتی بسیار اهمیت دارد. بیوراکتورها محیط استریلی را برای کشت متراکم و کنترل دقیق شرایط کشت ازجمله تلاطم، هوادهی، دما، اکسیژن حل شده و pH فراهم می‌کنند. بافت‌های گیاهی عموما با سه هدف، تکثیر بیوماس، تولید متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌ها در بیوراکتورها کشت می شوند [۳].

در حال حاضر اتوماسیون ریزازدیادی در بیوراکتورها پیشرفت‌های خوبی داشته و باعث کاهش هزینه‌های ریزازدیادی شده است. از نظر سابقه، استفاده از بیوراکتورها برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ جهت ریزازدیادی و برای تکثیر بگونیا استفاده شده است. از آن زمان به بعد کاربرد آن برای تکثیر بسیاری از گونه‌ها و اندام های گیاهی شامل شاخه‌ها، ریزغده‌ها، پیازها، کورم‌ها و جنین های سوماتیکی اثبات شده است [۴، ۵ و۷].

انواع بیوراکتور: بیوراکتورهایی که برای تکثیر وسیع اختصاص یافته‌اند دارای سیستم هایی برای کشت سلول، بافت، توده‌های اندامزا و جنین‌زا در سوسپانسیون مایع هستند. تا اواسط دهه ۱۹۷۰ بیشتر از بیوراکتورهای میکروبی و عموما از نوع تانک‌های با همزن صاف استفاده می شده اما امروزه بیوراکتورهای متنوعی وجود دارد و امکان انتخاب بیوراکتور متناسب با فعالیت خاص

را فراهم می‌کند. بیوراکتورها بر حسب نوع همزن و شکل ظرف به سه گروه بیوراکتورهایی با همزن مکانیکی (Stirred tank bioreactors، Rotating drum bioreactors و Spin filter bioreactors)، بیوراکتورهایی با همزن پنوماتیکی (Simple aeration bioreactors، Bubble column bioreactors، Airlift bioreactors و Ebb and flow bioreactors) و بیوراکتورهای بدون همزن (Gaseous phase bioreactors و Overlay aeration bioreactors) تقسیم بندی می‌شوند که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارند و تلاش های زیادی برای بهبود خصوصیات آنها انجام شده است. با این حال برخی مشکلات نظیر حساسیت بعضی بافت‌ها به ضربات مکانیکی در بیوراکتورهای حاوی همزن و تشکیل کف و حباب در بیوراکتورهای هوادهی از معایب آنها محسوب می‌شود. اصولا طراحی و نحوه عمل بیوراکتورها براساس برخی پارامترها نظیر خوب مخلوط شدن، انتقال موثر اکسیژن، حداقل تلاطم، کنترل موثر محیط فیزیکی و شیمیایی انجام می‌شود. این پارامترها باید به خوبی در این سیستم ها کنترل شوند. اما اغلب استفاده از محیط کشت مایع با مشکلات تکنیکی نظیر عدم هوادهی و خفگی، افزایش جذب آب، نیروهای ضربه زننده و نیاز به تجهیزات پیچیده روبرو است. برای اجتناب از چنین مشکلاتی روش های دیگری نظیر استفاده از پل کاغذی، بلوک های سلولزی یا اسفنج، بیوراکتورهای مه پاش و سیستم های تعلیق موقتی توسعه یافته‌اند [۲، ۳ و ۶].

سیستم‌های تعلیق موقتی در ریزازدیادی گیاهان: استفاده از سیستم های تعلیق موقتی در ریزازدیادی بر اساس اصولی مشابه بیوراکتورهای مه پاش استوار است و تماس موقتی گیاه و محیط کشت مایع بر تماس دائمی آنها ترجیح داده می شود. سیستم های تعلیق موقتی که برای ریزازدیادی گیاهان استفاده می شوند به چهار گروه، ۱) ماشین‌های tilting و rocker، ۲) سیستم هایی با تعلیق کامل مواد گیاهی و تجدید محیط کشت، ۳) سیستم هایی با تعلیق نسبی و تجدید محیط کشت و ۴) سیستمهایی با تعلیق کامل و انتقال دهنده های پنوماتیکی برای انتقال محیط کشت بدون تجدید آن (سیستم های تجاری RITA و BIT) طبقه بندی می شوند [۱].

سیستم‌های تعلیق موقتی در ریزازدیادی گیاهان برای تکثیر شاخه، ریز قلمه، ریز غده و جنین زایی سوماتیکی استفاده می‌شود [۱]. مدت زمان تعلیق، حجم مواد غذایی و حجم ظرف کشت از عوامل موثر بر راندمان تکثیر در این روش هستند. غوطه وری موقت عموما کیفیت مواد گیاهی را بهبود می بخشد و بدین ترتیب باعث افزایش بنیه شاخه و فراوانی جنین های سوماتیکی نرمال می‌شود. افزایش بیش از حد آب که یک مشکل جدی در کشت های مایع محسوب می‌شود، در این روش کشت حذف شده و با تنظیم مدت زمان تعلیق کنترل می‌شود. مواد گیاهی که از طریق تعلیق موقت تکثیر می‌شوند، نسبت به آنهایی که در محیط کشت نیمه جامد تکثیر می شوند قادر به سازگاری بهتری هستند [۱].

نقش بیوراکتورها در اتوماسیون تکثیر: اتوماسیون ریزازدیادی با استفاده از بیوراکتورها هزینه های ریزازدیادی را کاهش داده‌اند. در بیوراکتورها از کشت بافت های اندام زا در تراکم بالا برای تولید نشاء در سطح وسیع استفاده شده است. همچنین کشت متراکم ساختارهایی چون ریزغده‌های سیب زمینی و سوخک‌های سوسن برای تولید بافت های اندام‌زا در بیوراکتورها انجام شده است که می‌توان آنها را بطور مستقیم در زمین کشت کرد. ریزازدیادی بوسیله تکثیر شاخه جانبی نیز در بیوراکتورها انجام شده است اما نیاز به نیروی کار زیادی دارد. این روش نیز امروزه با بهینه کردن بیوراکتورهایی چون Air lift column، Ebb and flood و بیوراکتورهای تعلیق موقت به عنوان روشی برای تکثیر شاخه و جوانه زایی در سطح وسیع به شمار می‌آید. علیرغم تمام روش های بکار رفته برای ریزازدیادی گیاهان در بیوراکتورها، جنین زایی سوماتیکی مناسب تر تشخیص داده شده است زیرا ساختارهای جنینی یکنواخت هستند و نیاز به برش شاخه و کشت بصورت انفرادی ندارند. لذا به عنوان یکی از روش های مناسب برای تکثیر در سطح وسیع گیاهان در بیوراکتورها محسوب می‌شود. برای کاربردی شدن این روش هنوز به کار بیشتری نیاز است. هم اکنون پیشرفته‌ترین کارهای ریزازدیادی با استفاده از بیوراکتورهای تحقیقاتی در خصوص گیاهان بگونیا، داوودی، لیلیوم، ارکیده، سیب زمینی، سیر، سیب و انگور انجام شده است [۱ و ۳].

نتیجه گیری:

با توجه به اهمیت ریزازدیادی گیاهان در شرایط کنترل شده توجه روزافزونی به گسترش این صنعت شده است. روش های مرسوم تکثیر گیاهان و استفاده از محیط کشت های نیمه جامد با صرف هزینه و زمان زیادی انجام می‌شود و راندمان تکثیر نسبتا پایینی دارند اما امروزه با توسعه کشت مایع و استفاده از بیوراکتورها خصوصا سیستم‌های تعلیق موقت و بیوراکتور هوادهنده، امکان تکثیر گیاهان در سطح وسیع با صرف هزینه، زمان و نیروی کار کمتری انجام می‌گیرد. امید است بتوان این

سیستم ها را در ایران نیز برای بسیاری از گیاهان که تکثیر آنها به روش های معمول مشکل است و یا ارزش تجاری بالایی دارند، توسعه داد.

منابع:

1- Etienne, H. and M. Berthouly. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 215 231.

2- Mehrotra, S., M. K. Goel, A. K. Kukreja and B. N. Mishra. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. African Journal of Biotechnology 6 :1484-1492.

3- Paek, K.Y., D. Chakrabarty and E.J. Hahn. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plant. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81: 287-300.

4- Paek, K.Y., E.J. Hahn and S.H. Son. 2001. Application of bioreactors of large scale micropropagation systems of plants. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 37: 149 157.

5- Park, S.Y., H.N. Murthy and K.Y. Paek. 2000. Mass multiplication of protocorm like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in Phalaenopsis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63: 67 72.

6- Sajc, L., D. Grubisic and G.V. Novakovic. 2000. Bioreactors for plant engineering: An out for further research. Biochem. Eng. J. 4: 89 99.

7- Takayama, S. and M. Misawa. 1981. Mass propagation of Begonia hiemalis plantlet by shake culture. Plant Cell Physiol. 22: 461 467.