دستورالعمل تهیه محیط کشت در آزمایشگاه

علی جعفری مفیدآبادی

آماده سازی عناصر مختلف شیمیایی جهت ایجاد یک بستر غذایی مصنوعی مناسب برای کشت بافتها و سلولهای گیاهی به عنوان پایه بنیادین کاربرد روش های نوین دراصلاح گیاهان و افزایش تولید محصولات کشاورزی و غیره محسوب می شود. جهت رعایت اصول صحیح در ترکیب مواد سعی شد تا در قالب یک مثال عملی نحوه تهیه محیط کشت MS[1] مرحله به مرحله شرح داده شود. از آنجایی که اصول آماده سازی محیط کشت تقریبا برای تمامی محیط های کشت یکسان می باشد امید است این دستور العمل راهنمای مفیدی برای علاقه مندان واقع شود.

الف: نحوه تهیه محلول پایه[2] (10X) عناصر پر مصرف (عناصر ماکرو) (Macro elements)

۱- ریختن حدود ۳۰۰-۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر در یک فلاکس بالن ژوژه یک لیتری

۲- وزن نمودن عناصر پرمصرف بر اساس ستون سوم جدول شماره ۱ و حل آنهابوسیله تکان دادن بادست یا به وسیله همزن مغناطیس[3]

1- Murashige and Skoog 1922

2- Stock solution

3- Magnetic stirrer

جدول شماره ۱: مقادیر مختلف عناصر پر مصرف مورد نیاز در ترکیب یک لیتر محیط کشت MS و محلول پایه آن

عناصر پر مصرف Macro elements	مقدار لازم در یک لیترمحیط کشت بر حسب میلی گرم	مقدار لازم در یک لیتر محلول پایه (10x) بر حسب گرم
Potassium nitrate	1900	19
Ammonium nitrate	1650	16.5
Calsium chloride	440	4.4
Magnesium sulfate	370	3.7
Monophsophate potasium	170	1.7

۳- پس از حل کامل، حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده می شود. محلول آماده شده در حال حاضر دارای غلظتی به اندازه ده برابر (10x) میزان پیشنهادی عناصر پر مصرف در یک لیتر محیط کشت MS می باشد. بنابراین ۱۰۰ میلی لیتر از محلول فوق برای ساختن یک لیتر محیط کشت مزبور کافی است. باید توجه داشت که این محلول پایه می بایست ضعیفتر از محلولهای پایه عناصر دیگر ساخته شود چراکه غلظت قویتر از این‌منجر به رسوب عناصر آن می‌شود.

ب:نحوه تهیه محلول پایه (100X)عناصر کم‌مصرف (عناصرمیکرو) Minor elements

۱- ریختن حدود ۲۰-۳۰ میلی لیتر آب مقطر در یک بالن ژوژه ۲۵۰ میلی‌لیتری

۲- وزن نمودن عناصرکم مصرف بر اساس ستون سوم جدول شماره ۲ و حل آنهابوسیله تکان دادن بادست یا به وسیله همزن مغناطیسی

جدول شماره (۲): مقادیر مختلف عناصر کم مصرف مورد نیاز در ترکیب یک لیتر محیط کشت MS و محلول پایه آن

عناصر کم مصرف Minor elements	مقدار لازم در یک لیتر بر حسب میلی گرم در لیتر	مقدار لازم در محلول پایه (100X) بر حسب میلی گرم
Boric acid	6.02	620
Potasium iodide	0.83	83
Sodium molybodate	0.25	25
Cobalt chloride	0.025	2.5
Cupric sulfate	0.025	2.5

توجه: در مورد دو عنصر سولفات مس و کلرید کبالت بدلیل اینکه مقدار بسیار ناچیزی از آنها مورد نیاز است. به منظور کاهش خطا در توزین میبایست به شیوه زیر عمل کرد. برای این منظور ابتدا ۲۵ میلی گرم از هر یک از دو عنصر مزبور رادر ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و در واقع یک محلول پایه اختصاصی برای دو عنصر تهیه می شود که ۱۰ میلی لیتر آن مقدار مورد نیاز از دو عنصر مزبور (۲/۵میلی گرم از هر کدام) را برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر محلول پایه عناصر کم مصرف در خود داشته باشد .

۳- رساندن حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر بطوریکه یک میلی لیتر از محلول پایه تهیه شده مقادیر مورد نیاز عناصر کم مصرف را در خود دارا می باشد.

ج- محلول پایه آهن Iron stock (20x)

۱- ریختن حدود ۲۰-۳۰ میلی لیتر آب مقطر در یک فلاکس ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری و وزن نمودن عناصر فوق بر اساس ستون سوم جدول شماره ۳ و حل کامل آن در آب مقطر بوسیله تکان دادن با دست یا همزن مغناطیسی. بهتر است که دو ماده

Ferrous sulfate و Na2EDTA را هریک بطور جداگانه در مقداری آب مقطر حل گردند. بعد محلول سولفات آهن که تا ۶۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شده است با محلول کلرات سدیم مخلوط گردد.

جدول‌شماره ۳: مقادیر مختلف ترکیبات آهن دار مورد نیاز در تهیه یک لیتر محیط کشت MS

عناصر آهن دار	مقدار لازم در یک لیتر بر حسب میلی گرم	مقدار لازم در محلول پایه (20X) بر حسب میلی گرم
Ferrous sulfate	27.80	558
Na2EDTA	37.30	746

تذکر : چنانچه مواد مزبور به راحتی حل نشوند می بایست مختصری آنرا گرم کرده وبلافاصله آنرا با دست تکان بدهید تکرار این عمل موجب حل سریعتر آن می‌گردد.

۲- حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانیده شود به طوری که ۵ میلی لیتر از محلول پایه تهیه شده مقدار مورد نیاز دو عنصر را در یک لیتر محیط کشت دارا باشد.

د- محلول پایه برای ویتامینها Vitamins stocks

۱- *محلول پایه* Thiamine (Bl)

- ریختن حدود ۳۰-۴۰ میلی لیتر آب مقطر در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری
- حل کامل ۱۰۰ میلی گرم از ویتامین Bl در داخل ارلن مایر مزبور

حجم محلول رابا آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده به طوری که محلول پایه تهیه شده در هر میلی لیتر یک میلی گرم از ویتامین مزبور را دارااست.

۱۰۰ میکرو لیتر (۰/۱ میلی لیتر) از محلول پایه تهیه شده برای یک لیتر محیط کشت MS کافی است

۲-محلول پایه Nicotinic asid (B3)

- ریختن حدود ۳۰-۴۰ میلی لیتر اب مقطر در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری
- حل کامل ۱۰۰ میلی گرم از ویتامین B3 در داخل فلاسک مزبور
- حجم محلول را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده بطوریکه محلول پایه تهیه شده در هر میلی لیتر یک میلی گرم از ویتامین مزبور را دارا باشد.
- ۵۰۰ میکرو لیتر (۰/۵میلی لیتر) از محلول پایه تهیه شده برای یک لیتر محیط کشت MS کافی باشد

۳-محلول پایه Pyridoxine (B6)

- ریختن حدود ۳۰-۴۰ میلی لیتر آب مقطر در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری
- حل کامل ۱۰۰ میلی گرم از ویتامین B6 داخل فلاسک مزبور
- حجم محلول را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانیده بطوریکه محلول پایه درست شده در هر میلی لیتر یک میلی گرم از ویتامین مزبور را دارا باشد.
- ۱۰۰میکرو لیتر از محلول پایه تهیه شده برای یک لیترمحیط کشت (MS)کافی است.

۴- محلول پایه گلیسین (Glycin)

- ریختن حدود ۳۰-۴۰ میلی لیتر آب مقطر در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری
- حل کامل ۱۰۰ میلیگرم از ویتامین در داخل فلاسک مزبور
- حجم محلول را با آب مقطربه ۱۰۰ میلی لیتررسانده‌بطوریکه محلول پایه درست شده در هر میلی لیتر یک میلی گرم از ویتامین مزبور را دارا باشد.

- ۲ میلی لیتراز محلول پایه تهیه شده برای یک لیتر محیط کشت MS کافی است.

اینو زیتول Inositol

میزان ۱۰۰ میلی گرم از پودر اینوزیتول را در مقداری آب مقطر حل کرده و محلول حاصل را در تهیه یک لیتر محیط کشت MS استفاده می‌شود.

بعضی از آزمایشگاهها نیز به تهیه محلول ماده مزبور بهمراه ساکارز مورد نیازبرای تهیه یک لیتر محیط کشت اقدام می نمایند .

نحوه آماده سازی یک لیتر محیط کشت MS از محلول های پایه تهیه شده

۱- ریختن مقداری آب مقطر(۲۰۰-۳۰۰ میلی لیتر) در یک استوانه مدرج یک لیتری

۲- مطابق جدول زیر مقادیر لازم رااز محلول های پایه برداشته و به درون استوانه مدرج ریخته شود.

جدول شماره ۴: مقادیر محلول‌های پایه لازم در یک لیتر محیط کشت MS

محلول های پایه	میزان مورد نیاز از محلول های پایه برای تهیه یک لیتر محیط کشت
محلول پایه عناصر ماکرو	۱۰۰ میلی لیتر
محلول پایه عناصر میکرو	۱ میلی لیتر
محلول پایه عناصر آهن دار	۵ میلی لیتر
اینوزیتول	۱۰۰ میلی گرم
ویتامین B1	۱۰۰ میکرو لیتر
ویتامین B3	۵۰۰ میکرو لیتر
ویتامین B6	۱۰۰ میکرو لیتر
Glycine	۲ میلی لیتر

۳- ساکارز بر حسب میزان مورد نیاز بسته به هدف مورد نظر بـه صـورت مـتغیّر بـین ۲۰-۳۰گرم در لیتر استفاده می‌شود.

۴-رساندن حجم محلول محیط کشت به ۱۰۰۰ میلی لیتر و تکان دادن آن با دست

۵- pH محیط می‌بایست بین ۵/۶-۵/۷ تنظیم شود.

۶-آگار نیز به میزان متغییر بین ۵-۷گرم در لیتر (بسته به نوع آگار و کارخاه سازنده آن) در محیط کشت جامد استفاده می شود

۷-جوشانیدن محلول محیط کشت جهت حل کامل آگار

۸- استریلیزه کردن محیط کشت تهیه شده در اتوکلاو

۹- ریختن محیط اتوکلاو شده در پتری دیش‌های استریل در زیر دستگاه میکروفلو

چنانچه ظروف آزمایشگاهی دیگر نظیر شیشه‌های مربامورد نیاز باشد بخاطر سهولت درکار بهتر است محیط کشت جوشانده شده را قبل از اتوکلاو نمودن در ظروف مورد نظر ریخته و پس از آن محیط کشت را در درون این ظروف استریل نمود.

دستور العمل فوق برای تهیه محیط کشت فاقد هورمون های گیاهی می باشد و صرفا به عنوان مثال نوشته شده است. معمولاً در هر محیط کشت بسته به هدف مورد نظر غلظت های مناسب از هورمون‌های رشد گیاهی بکار می رود که دستور العمل تهیه محلول های پایه آن به شرح ذیل میباشد.

VI-تهیه محلولهای پایه هورمونهای گیاهی

۱- تهیه محلول پایه BAP (6-Benzylamino purine) با غلظت ۰/۵ میلی گرم در یک میلی لیتر

- مقدار ۵۰ میلی گرم از پودر BAP را در ۱-۲ میلی لیتر NaoH یک یا نیم نرمال ریخته تا کاملا حل‌گردد.

و در مرحله بعد حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شود

- محلول پایه تهیه شده دارای غلظتی برابر ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر است که میتوان بسته به میزان مورد نیاز از آن استفاده نمود.

محلول پایه BAP در یخچال نگهداری می شود استریل کردن آن بر حسب مقدار مورد نیاز بهمراه محیط کشت در اتو کلاو انجام میگیرد (قبل از انجام اتو کلاو به محیط کشت افزوده میگردد).

۲- تهیه محلول پایه 2,4-D (2,4- dichlorophenoxy acetic acid) با غلظت ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر

- مقدار ۵۰ میلی گرم از 2,4-D را پس از توزین در ۱-۲ میلی لیتر الکل اتیلیک مطلق ریخته و به همراه تکان دادن بادست آن را به آرامی گرم نموده تا کاملا حل شود.

- حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شود.

- محلول پایه تهیه شده دارای غلظتی برابر ۰/۵ میلی گرم در یک میلی لیتر است که میتوان بسته به میزان مورد نیاز از آن برداشت کرد.

۳- محلول پایه NAA (Naphthalene acetic acid) با غلظت ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر

نحوه تهیه این محلول پایه شبیه هورمون 2,4-D میباشد

۴- محلول پایه IAA (Indol acetic acid) با غلظت ۵/.میلی گرم در میلی لیتر

- مقدار ۵۰ میلی گرم از IAA را پس از توزین در ۱-۲ میلی لیتر NaOH یک نرمال ریخته تا کاملا حل‌گردد.

- حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شود

محلول پایه تهیه شده دارای غلظتی برابر ۵/. میلی گرم دریک میلی لیتراست که می توان بسته به میزان مورد نیاز از آن برداشت کرد. این محلول باید در شرایط تاریکی و در یخچال نگهداری شود. نگهداری این هورمون به حالت محلول در دراز مدت موجب

غیر فعال شدن آن می شود (زیرا این ماده در شرایط روشنایی ناپایدار بوده و خیلی سریع اکسیده می‌شود). علاوه براین محلول پایه IAA بوسیله فیلتر های استریل کننده (میکروپور) بطور یکجا استریل و نگهداری شود و برای استفاده از آن بسته به مقدار مورد نیاز بعد از عمل اوتو کلاو محیط کشت به آن اضافه می‌گردد.

۶- محلول‌پایه Kinetin با غلظت ۵/. میلی گرم در میلی لیتر

- مقدار ۵۰ میلی گرم از Kinetin را در ۱الی۲ میلی لیتر محلول HCL ۵/.نرمال ریخته و به آرامی گرم نموده تا کاملاً حل شود.

- در مرحله بعد حجم آن، با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شود

- محلول پایه تهیه شده دارای غلظتی برابر ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر می با شد که می توان بسته به میزان مورد نیاز از آن برداشت کرد . محلول پایه Kinetin در شرایط نور نا پایدار است و می بایست در شرایط تاریکی و در یخچال نگهداری شود . استریل کردن آنهابسته به مقدار مورد نیاز در درون محیط کشت دراتو کلاو انجام می گیرد .

۵- محلول پایه Zeatin با غلظت ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر

محلول پایه Zeatin شبیه Kenetin تهیه می گردد

سپاسگزاری

بدین وسیله از سرکار خانم مهندس میترا امام که در تهیه مطالب فوق نهایت همکاری را داشته اند، قدردانی میگردد.

منابع مورد استفاده

Murashige T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473-497