➢ ટીશ્યુ કલ્ચરની વ્યાખ્યા:

ટીશ્યુ કલ્ચર એ છોડ અથવા પ્રાણી કોષો, પેશી અથવા અંગના 'ઇન વિટ્રો' કલ્ચરની પદ્ધતિ છે - સામાન્ય રીતે કાચના પાત્રમાં એસેપ્ટિક સ્થિતિમાં પોષક માધ્યમ પર. ટીશ્યુ કલ્ચરને ક્યારેક 'જંતુરહિત કલ્ચર' અથવા 'ઈન વિટ્રો' કલ્ચર તરીકે ઓળખવામાં આવે છે. આ તકનીક દ્વારા જીવંત કોષોને શરીરની બહાર નોંધપાત્ર સમયગાળા માટે જાળવી શકાય છે.

સ્ટ્રીટ ('77) મુજબ ટીશ્યુ કલ્ચર એ કોષો વચ્ચે પ્રોટોપ્લાઝમિક સાતત્ય ધરાવતી અને નક્કર માધ્યમ પર વૃદ્ધિ કરતી અથવા સબસ્ટ્રેટમ સાથે જોડાયેલ અને પ્રવાહી માધ્યમ દ્વારા પોષણ ધરાવતી કોઈપણ બહુકોષીય કલ્ચરને ઓળખવામાં આવે છે.

છોડની ટીશ્યુ કલ્ચર દ્વારા છોડના ખૂબ જ નાના ભાગોમાંથી નવા છોડને કૃત્રિમ માધ્યમમાં ઉછેરવામાં આવી શકે છે, જેમ કે અંકુરની ટોચ, મૂળની ટોચ, કોલસ, બીજ, ગર્ભ, પરાગ ધાન્ય, અંડકોશ અથવા તો એક કોષ, ભલે સંવર્ધિત પેશીનો વિકાસ થાય. છોડમાં કે અસંગઠિત રીતે વધે છે તે પેશીઓની આનુવંશિક ક્ષમતા અને રાસાયણિક અને ભૌતિક વાતાવરણ પર આધાર રાખે છે.

- કલ્ચર માટે ઉપયોગમાં લેવાતા ભાગો અનુસાર એસેપ્ટિક છોડની કલ્ચર નીચેના પ્રકારના હોઈ શકે છે:

(a) જો રોપા ઉછેરવામાં આવે તો તેને છોડની કલ્ચર કહેવામાં આવે છે.

(b) જ્યારે ગર્ભનું સંવર્ધન થાય છે ત્યારે તે ગર્ભ કલ્ચર તરીકે ઓળખાય છે.

(c) જો છોડના અવયવો, જેમ કે, અંકુરની ટીપ્સ, મૂળની ટીપ્સ, પર્ણ પ્રિમોર્ડિયા, ફૂલ પ્રિમોર્ડિયા અથવા અપરિપક્વ ફળો સંવર્ધિત હોય, તો તેને અંગ કલ્ચર કહેવામાં આવે છે.

(d) છોડના અવયવોના ભાગોના કોષોના પ્રસારમાંથી અસંગઠિત પેશીઓની કલ્ચરને કેલસ કલ્ચર કહેવામાં આવે છે. એક્સિઝનને કારણે થયેલી ઈજાને કારણે એક્સ્પ્લાન્ટમાં કોષોના પ્રસારની રચના થાય છે.

(e) જ્યારે વિખરાયેલી અવસ્થામાં એક કોષ અથવા નાના કોષનું સંવર્ધન થાય છે, ત્યારે તેને સેલ સસ્પેન્શન કલ્ચર કહેવામાં આવે છે. તેને સેલ કલ્ચર તરીકે પણ ઓળખવામાં આવે છે.

સિંગલ સેલની કલ્ચરને કેટલીકવાર સિંગલ સેલ ક્લોનિંગ કહેવામાં આવે છે. કલ્ચર શરૂ કરવા માટેના છોડના ભાગને એક્સ્પ્લાન્ટ કહેવામાં આવે છે. સિંગલ એક્સ્પ્લાન્ટમાંથી મેળવેલી કલ્ચરને ક્લોન કહેવામાં આવે છે. તુલનાત્મક રીતે લાંબા સમય સુધી કલ્ચર જાળવવા માટે કલ્ચરનું માધ્યમ સમય સમય પર બદલાય છે.

આ પ્રક્રિયા તે હાનિકારક ઉત્સર્જન પદાર્થોને દૂર કરશે જે ચયાપચયને કારણે એકઠા થયા છે. પિતૃ કલ્ચરના ટુકડાને નવા માધ્યમ ઉપકલ્ચરમાં સ્થાનાંતરિત કરીને કરવામાં આવે છે. આવા ટુકડાને ઇનોક્યુલમ કહેવામાં આવે છે.

- **ટીશ્યુ કલ્ચરનો ઇતિહાસ:**

1832 માં થિયોડોર શ્વાને જણાવ્યું હતું કે જો યોગ્ય બાહ્ય પરિસ્થિતિઓ પૂરી પાડવામાં આવે તો કોષો સજીવના શરીરની બહાર સંવર્ધિત થઈ શકે છે. 1835 માં વિલ્હેમ રોક્સે મીઠાના દ્રાવણમાં ચિકનના ગર્ભ કોષોનું સંવર્ધન કર્યું. રીચિંગર (1839) એ જણાવ્યું હતું કે 1.5 મીમી કરતાં વધુ જાડા ટુકડાઓ વૃદ્ધિ માટે સક્ષમ હતા પરંતુ આ મર્યાદાથી નીચેના ટુકડાઓ વધવામાં નિષ્ફળ ગયા હતા. તેણે પોતાના પ્રયોગમાં કોઈ પોષક તત્વોનો ઉપયોગ કર્યો ન હતો.

-આર્નોલ્ડ (1885) અને જોલી (1903) એ કલ્ચરમાં સલામન્ડરના લ્યુકોસાઇટ કોષોની વૃદ્ધિ અને કોષ વિભાજનનું અવલોકન કર્યું. 1907માં અમેરિકન પ્રાણીશાસ્ત્રી રોસ ગ્રાનવિલે હેરિસને નક્કર લસિકામાં દેડકાના ચેતા કોષોનું સફળતાપૂર્વક સંવર્ધન કર્યું. હેરિસનને ટિશ્યુ કલ્ચરના પિતા તરીકે ઓળખવામાં આવે છે.

-એમજે બરોઝ (1910) પ્લાઝમામાં ચિકનનું સંવર્ધિત ગર્ભ પેશી. સસ્તન કોષો સૌપ્રથમ એલેક્સિસ કેરેલ દ્વારા સંવર્ધન કરવામાં આવ્યા હતા. પુનરાવર્તિત ઉપ-કલ્ચર દ્વારા તેઓ 34 વર્ષ સુધી પેશીઓને સંવર્ધન કરવામાં સક્ષમ હતા. અંગ સંવર્ધન સૌપ્રથમ ઇંગ્લેન્ડમાં ડીએચ ફેલ (1929) દ્વારા કરવામાં આવ્યું હતું. તેમણે પોષક માધ્યમ તરીકે નક્કર પ્લાઝ્મા અને ગર્ભના અર્કનો ઉપયોગ કર્યો.

- **પ્લાન્ટ ટીશ્યુ કલ્ચરનો ઇતિહાસ :**

જર્મન વનસ્પતિશાસ્ત્રી ગોટલીબ હેબરલેન્ડે સૌપ્રથમ પ્લાન્ટની પેશીઓને 'ઈન વિટ્રો' સંવર્ધન કરવાનો પ્રયાસ કર્યો. તેમણે 1898 માં તેમનું કાર્ય શરૂ કર્યું. તેમણે મીડિયામાં કલ્ચર માટે પાંદડાની પેલિસેડ પેશીઓમાંથી કોષો, પીથ, એપિડર્મિસ અને વિવિધ છોડના બાહ્ય વાળના કોષોનો ઉપયોગ કર્યો - જેમાં નોપનું દ્રાવણ, એસ્પરજીન, પેપ્ટોન અને સુક્રોઝ છે.

સંસ્કારી કોષો ઘણા મહિનાઓ સુધી જીવિત રહ્યા પરંતુ કોષો પ્રજનન કરવામાં નિષ્ફળ ગયા.

આ આના કારણે હોઈ શકે છે:

(a) ખૂબ જ સરળ માધ્યમનો ઉપયોગ,

(b) અત્યંત ભિન્ન કોષોની કલ્ચર અને

(c) એસેપ્ટિક તકનીકોનો ઉપયોગ કરવામાં આવ્યો ન હતો.

પછીના કેટલાક કામદારો દ્વારા સમાન પ્રયોગોમાં કોષો લાંબા સમય સુધી જીવંત રહ્યા પરંતુ તેઓ વિભાજન કરવામાં નિષ્ફળ ગયા.

-20મી સદીની શરૂઆતમાં મેરિસ્ટેમેટિક પેશીઓની કલ્ચર શરૂ થઈ હતી. આઇસોલેટેડ રુટ ટીપ્સને સૌપ્રથમ 1922માં રોબિન દ્વારા સંવર્ધન કરવામાં આવ્યું હતું. સ્વતંત્ર રીતે કામ કરતા કોટ્ટે ('22)એ પણ સમાન અવલોકનો કર્યા હતા. રોબિન અને મેનેવલ ('23) એ મૂળ સંવર્ધન કર્યું અને પેટા કલ્ચરિંગ દ્વારા 20 અઠવાડિયા સુધી કલ્ચર જાળવી રાખી.

-1934માં શ્વેતે સૌપ્રથમ સુક્રોઝ, અકાર્બનિક આયર્ન ક્ષાર, થાઇમિન, ગ્લાયસીન, પાયરિડોક્સિન અને નિકોટિનિક એસિડ વગેરે ધરાવતા માધ્યમમાં ટામેટાંના મૂળને સફળતાપૂર્વક સંવર્ધન કર્યું હતું. ગૌથેરેટ ('34) એ નોંધ્યું હતું કે સેલિક્સ કેપ્રેઆ, પોપ્યુલસ નિગ્રા વગેરેમાંથી કેમ્બિયમ કલ્ચર વધવાનું ચાલુ રાખ્યું હતું. એસેપ્ટિક પરિસ્થિતિઓ હેઠળ થોડા મહિના. તેણે પાછળથી ('37, '38) બી-વિટામિન્સ અને IAA સાથે પૂરક માધ્યમનો ઉપયોગ કર્યો.

-1937માં વ્હાઇટે મૂળ કલ્ચરના વિકાસ માટે બી-વિટામિન્સના મહત્વને માન્યતા આપી હતી. વેન્ટ અને થિમન ('37) એ ઓક્સિન (IAA) નું મહત્વ શોધ્યું. નોબેકોર્ટ ('37, '38) એ ગાજર રુટ એક્સ્પ્લાન્ટ્સની કલ્ચરમાં થોડો વધારો મેળવ્યો. તેમણે ટીશ્યુ કલ્ચરમાં મૂળના તફાવતની પણ નોંધ લીધી. 1938 માં ટેબેકો હાઇબ્રિડની ગાંઠની પેશીઓ સફળતાપૂર્વક સંવર્ધન કરવામાં આવી હતી.

-1939 માં સ્વતંત્ર રીતે કામ કરતા ત્રણ વૈજ્ઞાનિકો, યુએસએમાં વ્હાઇટ અને નોબેકોર્ટ અને ફ્રાન્સમાં ગૌથેરેટે સફળતાપૂર્વક કૃત્રિમ માધ્યમ પર સતત કોલસ પેશીનું વાવેતર કર્યું. ગૌથેરેટ ('39) એ જણાવ્યું હતું કે ગાજરની ખેતી માટે બર્થોલોટ્સના મીઠાના મિશ્રણ, ગ્લુકોઝ, જિલેટીન, સિસ્ટીન HC1 અને IAA સાથે પૂરક નોપનું સોલ્યુશન જરૂરી છે.

-વર્ણસંકર નિકોટિઆના ગ્લુકા × એન. લેંગ્સડોર્ફીએ અમર્યાદિત અને અભેદ વૃદ્ધિની નોંધ લીધી છે. તેણે બતાવ્યું કે આ પેશી વારંવાર ઉપસંસ્કૃત થઈ શકે છે. સફેદ ('39b) પોષક માધ્યમમાં હાઇબ્રિડ N. ગ્લુકા × N.langsdorfii ની પેશી કલ્ચરમાં પાંદડાવાળા કળીઓનો વિકાસ નોંધ્યો છે.

-ત્યારબાદ વિવિધ છોડમાંથી પેશીઓનું સંવર્ધન કરવામાં આવ્યું. તે નોંધવામાં આવ્યું હતું કે જૂની કલ્ચરઓ સંગઠનની વધતી જતી ડિગ્રી દર્શાવે છે. છોડના વિકાસમાં વિટામિન્સની ભૂમિકાને પણ ઓળખવામાં આવી હતી. વેટમોર અને વોર્ડલો ('51) એ ટેરિડોફાઇટ્સ (સેલાગિનેલા, ઇક્વિસેટમ અને ફર્ન) ની સફળતાપૂર્વક શૂટ ટીપ્સનું સંવર્ધન કર્યું.

-બોલ ('55) દ્વારા સેક્વોઇયા સેમિપરવિરેન્સની પેશીઓ સંવર્ધિત કરવામાં આવી હતી. ટેક્સસ અને જીંકગો બિલોબાના પરાગ તુલેકે ('59) દ્વારા સંવર્ધિત કરવામાં આવ્યા હતા. હાર્વે અને ગ્રાશમ ('69) દ્વારા શંકુદ્રુપ પેશીઓનું સફળતાપૂર્વક સંવર્ધન કરવામાં આવ્યું હતું.

-ટીશ્યુ કલ્ચરના અભ્યાસમાંથી રુટ-શૂટ સંબંધ વિશે મહત્વપૂર્ણ માહિતી મેળવી શકાય છે. કેટલાક વૈજ્ઞાનિકોએ ટીશ્યુ કલ્ચરના અભ્યાસોમાંથી વેસ્ક્યુલર ટીશ્યુના ભિન્નતાને નિયંત્રિત કરતા પરિબળો વિશે જાણ કરી હતી.

-વેન ઓબેરબેક ('41) નારિયેળના દૂધ સાથે પૂરક માધ્યમ પર દાતુરાના સંસ્કારી ગર્ભ. પોષક તત્વો તરીકે નારિયેળના દૂધ અને 2-4Dનું મહત્વ ઓળખવામાં આવ્યું હતું. નારિયેળના દૂધની ઉત્તેજક મિલકત ઝેટિનની હાજરીને કારણે છે.

-બળવાન કોષ વિભાજન પરિબળ કિનેટિન હોવાનું જણાયું હતું, જે 6 ફર્ફ્યુરીલેમિનોપ્યુરીન છે. સાયટોકિનિન એ 6-અવેજી એમિનો-પ્યુરિન સંયોજન છે, જે છોડની પેશીઓની કલ્ચરમાં કોષ વિભાજનને ઉત્તેજીત કરી શકે છે. નાળિયેરનું દૂધ ધરાવતા માધ્યમ પર મોનોકોટ પેશીઓનું સફળતાપૂર્વક સંવર્ધન કરવામાં આવ્યું હતું.

-પ્રવાહી સંવર્ધન માધ્યમ પર ટેગેટસ ઇરેક્ટા અને નિકોટિઆના ટેબેકમની કેલસ કલ્ચર જ્યારે શેકર પર ઉશ્કેરાય ત્યારે સિંગલ કોશિકાઓ અથવા સેલ એગ્રીગેટ્સનું સસ્પેન્શન ઉત્પન્ન કરે છે (Muir '53). આવા સેલ સસ્પેન્શનને સબકલ્ચર કરી શકાય છે.

-સેલ સસ્પેન્શન કલ્ચર પરના અભ્યાસો મુઇર, હિલ્ડેબ્રાન્ડ અને રિકર ('54), સ્ટ્રીટ, શિગોમુરા ('57), ટોરે અને રેઇનર્ટ ('61), રેઇનર્ટ અને માર્કલ ('62) દ્વારા હાથ ધરવામાં આવ્યા હતા. મુઇર ('53) એ સિંગલ સેલ કલ્ચર માટે પેપર રાફ્ટ નર્સ ટેકનિક વિકસાવી.

-આ પદ્ધતિમાં એકલ કોષોને ચોરસ ફિલ્ટર પેપર પર મૂકવામાં આવ્યા હતા, જે સક્રિય નર્સ પેશી પર મૂકવામાં આવ્યા હતા, જે વધતી જતી એક કોષને જરૂરી પોષક તત્વો પૂરા પાડે છે. બીજી પદ્ધતિમાં કોષોને માઇક્રો-ચેમ્બરમાં લટકાવેલા ડ્રોપ પર સસ્પેન્ડ કરવામાં આવ્યા હતા.

-બર્ગમેન ('60) નિકોટિયાના ટેબેકમ વરના સસ્પેન્શન કલ્ચર સાથે કામ કરે છે. sansum અને Phaseolus vulgaris var. 'અર્લી ગોલ્ડન રોડ' એ સિંગલ સેલ ક્લોનિંગની અગર પ્લેટિંગ ટેકનિક વિકસાવી છે. આ પદ્ધતિમાં એક કોષના અપૂર્ણાંકને ગાળણ દ્વારા અલગ કરવામાં આવ્યો હતો, તેને ગરમ અગર સાથે મિશ્રિત કરવામાં આવ્યો હતો અને પછી પાતળા સ્તરમાં પેટ્રિડિશમાં પ્લેટેડ કરવામાં આવ્યો હતો.

-મેલ્ચર્સ અને બર્ગમેન ('59) એ નોંધ્યું હતું કે એન્ટિરહિનમ માજુસના હેપ્લોઇડ શૂટની ઘણી કલ્ચરઓ પછી પ્લોઇડીમાં વધારો થયો હતો. બોલ ('46) એ એન્જીયોસ્પર્મિક છોડના અંકુરની ટોચની કલ્ચરમાં આખા છોડના પુનર્જીવનની સંભાવનાની નોંધ લીધી. વેટમોર અને વોર્ડલો ('51), મોરેલ ('60) એ 1 અથવા 2 પાંદડાવાળા પ્રિમોર્ડિયા ધરાવતા શૂટ એપીસીસની કલ્ચરમાંથી સંપૂર્ણ છોડ મેળવ્યા હતા. મોરેલ ('64) એ ઓર્કિડના સંવર્ધન માટે આ પદ્ધતિનો ઉપયોગ કર્યો હતો.

-એક કોષ જે પુનઃજનન દ્વારા સમગ્ર જીવતંત્રમાં વિકાસ કરી શકે છે તેને ટોટીપોટન્ટ સેલ કહેવામાં આવે છે. આ શબ્દ મોર્ગન દ્વારા 1901 માં બનાવવામાં આવ્યો હતો. વ્હાઇટ ('54) અનુસાર જો બહુકોષીય સજીવના તમામ કોષો ટોટીપોટેન્ટ હોય, તો આવા કોષો અલગ સ્થિતિમાં તેમની વિભાજન શક્તિ પાછી મેળવે છે અને સંપૂર્ણ છોડ ઉત્પન્ન કરી શકે છે. સજીવમાં આ ક્ષમતા દબાયેલી રહે છે.

-તે નોંધવામાં આવ્યું હતું કે એક કોષો નવા છોડ ઉત્પન્ન કરવામાં સક્ષમ છે. પરાગ અને એન્થર કલ્ચરમાંથી હેપ્લોઇડ એમ્બ્રોયો મેળવવામાં આવ્યા હતા. નિકોટિયાના અને ડાતુરાની માઇક્રોસ્પોર કલ્ચરની પદ્ધતિ નિત્શ ('74, '77) દ્વારા વિકસાવવામાં આવી હતી. તે રંગસૂત્રની સંખ્યાને બમણી કરવામાં સક્ષમ હતા અને હોમોઝાયગસ ડિપ્લોઇડ છોડ મેળવ્યા હતા.

-તમાકુ બોર્ગિન અને નિત્શ ('67), નાકાટા અને તનાકા ('68) ની એન્થર કલ્ચરમાંથી હેપ્લોઇડ પેશીઓ અને હેપ્લોઇડ એમ્બ્રોઇડ્સ મેળવ્યા હતા.

કોકિંગ ('60) એ 0.6M સુક્રોઝમાં ફંગલ સેલ્યુલેઝનો ઉપયોગ કરીને રુટ ટીપ કોશિકાઓમાંથી પ્રોટોપ્લાસ્ટ્સનું પ્રકાશન રેકોર્ડ કર્યું. તેઓ અલગ પ્રોટોપ્લાસ્ટ્સનું સંવર્ધન કરવામાં સક્ષમ હતા, જે નવી કોષની દિવાલોનું પુનર્જન્મ કરે છે અને કોષ વસાહતો અને છેવટે પ્લાન્ટલેટ્સ ઉત્પન્ન કરે છે.

-ઘણા પ્લાન્ટ સસ્પેન્શન કલ્ચર્સમાં સેલ પ્રોટોપ્લાસ્ટ્સ સફળતાપૂર્વક બહાર પાડવામાં આવ્યા હતા. ટ્યુમર ફિઝિયોલોજીના અભ્યાસ માટે પ્લાન્ટ ટિશ્યુ કલ્ચર ટેકનિકનો ઉપયોગ થાય છે.

-વ્હાઇટ અને બ્રાઉન ('42) બેક્ટેરિયા મુક્ત તાજ પિત્તની ગાંઠને સંવર્ધન કરવામાં સક્ષમ હતા. સ્કોર્ઝોનેરા હિસ્પેનિકા ગૌથેરેટ ('46) માં નોંધ્યું હતું કે કેલસ કલ્ચર કે જેને શરૂઆતમાં ઓક્સિનની જરૂર હતી, તેણે કેટલાક પ્રસારનું ઉત્પાદન કર્યું હતું જે ઓક્સિનની ઉણપ ધરાવતા માધ્યમમાં વૃદ્ધિ કરી શકે છે.

-કલ્ચરના કોષોની પોષક જરૂરિયાતો (ખાસ કરીને ઓક્સિનનો સમાવેશ થાય છે) માં થતા આવા વારસાગત ફેરફારોને હેબિટ્યુએશન કહેવામાં આવે છે. ઓક્સિન આદતવાળી કલ્ચરને એક્સોજેનસ ઓક્સિન (બુચર '77) ના પુરવઠાની જરૂર નથી. બુચરે નોંધ્યું ('77) કે જ્યારે ઓક્સિન અને સાયટોકિનિન ટેવાયેલા પેશીઓને તંદુરસ્ત છોડમાં કલમ બનાવવામાં આવે છે, ત્યારે ગાંઠો ઉત્પન્ન થાય છે.

-એપિકલ મેરીસ્ટેમનું સંવર્ધન કરીને પેથોજેન મુક્ત છોડ મેળવી શકાય છે.

-70 ના દાયકાના અંત સુધીમાં તે સ્પષ્ટ થઈ ગયું હતું કે છોડની પેશી કલ્ચર તકનીકનો કૃષિના વિવિધ ક્ષેત્રોમાં સફળતાપૂર્વક ઉપયોગ કરી શકાય છે, જેમ કે, પેથોજેન મુક્ત કલ્ચરનું ઉત્પાદન, ગૌણ ઉત્પાદનોનું ઉત્પાદન, ક્લોનલ પ્રચાર, મ્યુટન્ટ કલ્ચર, હેપ્લોઇડ સંવર્ધન અને આનુવંશિક ઇજનેરી.

-ટીશ્યુ કલ્ચર દ્વારા, પેથોજેન મુક્ત કલ્ચરઓનું નિર્માણ કરવામાં આવ્યું છે. આ ટેકનિક પ્લાન્ટ પેથોલોજીકલ તપાસ માટે મહત્વપૂર્ણ છે. કલ્ચરમાં પ્રોટોપ્લાસ્ટનો ઉપયોગ વાયરસના ચેપ અને બાયોકેમિકલ અભ્યાસ માટે થાય છે.

-સસ્પેન્શન કલ્ચરમાંથી ગૌણ ઉત્પાદનો મોટી માત્રામાં સંશ્લેષણ કરી શકાય છે. આમાંના કેટલાક પદાર્થો ઉત્સેચકો, વિટામિન્સ, ખાદ્યપદાર્થો, ગળપણ, એન્ટિ-ટ્યુમર આલ્કલોઇડ્સ અને જંતુનાશકો છે. જાપાનમાં ઔદ્યોગિક સ્તરે 'ઈન વિટ્રો' કલ્ચર પ્રાપ્ત થઈ છે.

-ઓર્કિડ અને અન્ય કેટલાક સુશોભન અને આર્થિક છોડનો ક્લોનલ પ્રચાર 'ઈન વિટ્રો' કલ્ચર દ્વારા પ્રાપ્ત થયો છે. બટાટામાં ક્લોનલ પ્રચાર પર્ણ કોષ પ્રોટોપ્લાસ્ટની સંવર્ધન દ્વારા પ્રાપ્ત થાય છે. કલ્ચરમાં મ્યુટાજેન્સનો ઉપયોગ કરીને પસંદગી રોગ પ્રતિરોધક અથવા તણાવ પ્રતિરોધક મ્યુટન્ટ છોડને પુનઃજીવિત કરવામાં આવ્યા છે.

-હેપ્લોઇડ સંવર્ધન દ્વારા થોડા કલ્ટીવર્સ ઉત્પન્ન થયા. પ્રોટોપ્લાસ્ટ ફ્યુઝન દ્વારા સંબંધિત પરંતુ લૈંગિક રીતે અસંગત પ્રજાતિઓના વર્ણસંકરનું નિર્માણ કરવામાં આવ્યું છે. આ ટેકનિક દ્વારા બટાકા અને ટામેટાં વચ્ચે હાઇબ્રિડનું ઉત્પાદન કરવામાં આવ્યું છે. બે અલગ-અલગ પ્રજાતિઓના હાઇબ્રિડ તમાકુના છોડમાંથી અલગ કોષોના કોષ સંમિશ્રણ દ્વારા ઉત્પન્ન થાય છે.

-બીજની નિષ્ક્રિયતાનો સમયગાળો બીજને કાઢીને અને તેના ગર્ભને કૃત્રિમ માધ્યમ (ગર્ભ કલ્ચર) પર સંવર્ધન કરીને ઘટાડી શકાય છે. ગર્ભનિરોધક ગર્ભનો ગર્ભ કલ્ચર દ્વારા સફળતાપૂર્વક ઉછેર કરી શકાય છે.

-પ્લાઝમિડ સાથે જોડાયેલા ઇચ્છિત અક્ષરો સાથેના વિદેશી જનીનો સામાન્ય રીતે લિપોસોમ્સ દ્વારા નગ્ન પ્રોટોપ્લાસ્ટમાં દાખલ થઈ શકે છે. પરિપક્વ છોડમાં પરિચયિત જનીનની અભિવ્યક્તિ હજુ પણ શંકાસ્પદ છે.

- **ટીશ્યુ કલ્ચરની જરૂરિયાતો:**

પોષક જરૂરિયાતો ખેતરમાં ઉગાડતા છોડને પોષક તત્વો ધરાવતા માધ્યમ (દા.ત. માટી)ની જરૂર હોય છે. એક્સ્પ્લાન્ટ તરીકે ઓળખાતા છોડના અલગ પેશી કૃત્રિમ પોષક માધ્યમ પર ઉગાડવામાં આવે છે. પોષક માધ્યમ ભૌતિક સહાયક પ્રણાલી, મેક્રો પોષક તત્વો, સૂક્ષ્મ પોષકતત્ત્વો, કાર્બન સ્ત્રોત, કાર્બનિક પૂરક અને વૃદ્ધિ નિયમનકારોથી બનેલું છે. પોષક માધ્યમોએ છોડની પેશીઓના વિટ્રો વૃદ્ધિ અને મોર્ફોજેનેસિસ માટે જરૂરી તમામ જરૂરી ખનિજો પૂરા પાડવાના હોય છે.

I. સપોર્ટ સિસ્ટમ

ઇન વિટ્રો કલ્ચર કાં તો પ્રવાહી માધ્યમમાં અથવા ઘન માધ્યમમાં. પ્રવાહી માધ્યમ (સસ્પેન્શન કલ્ચર)માં, પેશીઓ અથવા કોષો પોષક તત્વો ધરાવતા પાણીમાં સંવર્ધિત થાય છે. વાયુમિશ્રણ માટે પ્રવાહી માધ્યમને વારંવાર ઉશ્કેરવું પડે છે. નક્કર માધ્યમો જેલિંગ એજન્ટોનો ઉપયોગ કરીને તૈયાર કરવામાં આવે છે. અગર (0.5% - 1.0%) એ સૌથી વધુ ઉપયોગમાં લેવાતું જેલિંગ એજન્ટ છે કારણ કે તે ઉત્સેચકો માટે પ્રતિરોધક છે અને મીડિયા ઘટકો સાથે પ્રતિક્રિયા કરતું નથી. Agarose, જેલનું શુદ્ધ સ્વરૂપ, gellan gums પણ વપરાય છે. આધારની વૈકલ્પિક પદ્ધતિઓમાં છિદ્રિત સેલોફેન, ફિલ્ટર પેપર બ્રિજ, ફિલ્ટર પેપર વિક્સ, પોલીયુરેથીન ફોમ અને પોલિએસ્ટર ફ્લીસનો સમાવેશ થાય છે.

II. મેક્રોન્યુટ્રિઅન્ટ્સ

પોષક તત્વો એટલે કે નાઇટ્રોજન (N), ફોસ્ફરસ (P), પોટેશિયમ (K), કેલ્શિયમ (Ca), મેગ્નેશિયમ (Mg), અને સલ્ફર (S) 0.5 મિલી/લિટર કરતાં વધુ સાંદ્રતામાં જરૂરી છે. મેક્રો પોષક તત્વો તરીકે ઓળખવામાં આવે છે. મોટાભાગના માધ્યમોમાં 20-30 એમએમ પર N અને K હોય છે. જ્યારે P, Mg, S, અને Ca ની રેન્જ 1-3 mM છે.

III. સૂક્ષ્મ પોષકતત્ત્વો:

પોષક તત્વો એટલે કે, આયર્ન (Fe), મેંગેનીઝ (Mn), ઝીંક (Zn), બોરોન (B), તાંબુ (Cu), અને મોલીબ્ડેનમ (Mo) જે 0.5 મિલી/લિટર કરતા ઓછી સાંદ્રતામાં જરૂરી છે. સૂક્ષ્મ પોષક તત્વો તરીકે ગણવામાં આવે છે. આયર્ન એ તમામ સૂક્ષ્મ પોષકતત્ત્વોમાં સૌથી મહત્વપૂર્ણ છે. આયર્ન અને ઝીંકનો ઉપયોગ સામાન્ય રીતે ચીલેટેડ સ્વરૂપમાં થાય છે.

IV. કાર્બન સ્ત્રોત:

સુક્રોઝ (2-3%) સૌથી વધુ પસંદગીનો કાર્બન સ્ત્રોત છે. ગ્લુકોઝ અને ફ્રુક્ટોઝનો પણ ઉપયોગ કરી શકાય છે. ફ્રુક્ટોઝ ઓછી અસરકારક છે. અન્ય કાર્બોહાઇડ્રેટ્સમાં માયો-ઇનોસિટોલ, માલ્ટોઝ, લેક્ટોઝ, ગેલેક્ટોઝ, રેફિનોઝ અને સ્ટાર્ચનો સમાવેશ થાય છે.

V. ઓર્ગેનિક સપ્લીમેન્ટ્સ:

a. વિટામિન્સ: સૌથી વધુ ઉપયોગમાં લેવાતા વિટામિન્સ છે થિયામીન (બી1), નિકોટિનિક એસિડ, પાયરિડોક્સિન (બી6), અને માયો-ઇનોસિટોલ. થાઇમિન મૂળભૂત રીતે તમામ કોષોને વૃદ્ધિ માટે જરૂરી છે.

b. એમિનોએસિડ્સ: પ્રોટોપ્લાસ્ટ કલ્ચરઓમાં સેલ વૃદ્ધિને ઉત્તેજીત કરવા અને કોષ કલ્ચરની સ્થાપના માટે તે મહત્વપૂર્ણ છે. ગ્લાયસીન એ એમિનો એસિડનો સૌથી વધુ ઉપયોગ થાય છે. ગ્લુટામાઈન એસ્પારજીન, આર્જીનાઈન, સિસ્ટીન અન્ય સામાન્ય સ્ત્રોત છે.

c. અન્ય કાર્બનિક પૂરક: તેમાં પ્રોટીન (કેસીન) હાઇડ્રોલિસેટ, નારિયેળનું દૂધ, યીસ્ટ અને માલ્ટનો અર્ક, ગ્રાઉન્ડ કેળા, નારંગીનો રસ, ટામેટાંનો રસ, સક્રિય ચારકોલ જેવા કાર્બનિક અર્કનો સમાવેશ થાય છે. સક્રિય ચારકોલનો ઉમેરો ઝેરી સંયોજનોને દૂર કરવામાં મદદ કરે છે.

d. એન્ટિબાયોટિક્સ: સૂક્ષ્મજીવાણુઓના ચેપને રોકવા માટે, એન્ટિબાયોટિક્સ જેમ કે સ્ટ્રેપ્ટોમાસીન અથવા કેનામિસિન માધ્યમમાં ઉમેરવામાં આવે છે.

V. ગ્રોથ રેગ્યુલેટર્સ પ્લાન્ટ ટિશ્યુ કલ્ચરમાં વૃદ્ધિ નિયંત્રકોના ચાર વ્યાપક વર્ગો મહત્વપૂર્ણ છે. આમાં ઓક્સિન્સ, સાયટોકીનિન્સ, ગીબેરીલીન અને એબીએનો સમાવેશ થાય છે.

a ઓક્સિન્સ: છોડની પેશીઓમાં માત્ર કુદરતી રીતે બનતું ઓક્સિન IAA છે. ઓક્સિન્સ કોષ વિભાજન, કોષનું વિસ્તરણ, સ્ટેમનું વિસ્તરણ, ઇન્ટરનોડ્સ, ઉષ્ણકટિબંધીય, એપિકલ વર્ચસ્વ, વિસર્જન અને મૂળને પ્રેરિત કરે છે. સામાન્ય રીતે ઉપયોગમાં લેવાતા ઓક્સિન છે:

IAA (Indole 3-Acetic Acid),
IBA (Indole 3-Butyric Acid)
2,4-D (Dichloro Phenoxy Acetic Acid)
NAA (Napthylene Acetic Acid)
NOA (Napthoxy Acetic Acid)

The 2,4 -D નો ઉપયોગ કોલસ ઇન્ડક્શન માટે થાય છે જ્યારે, અન્ય ઓક્સિન્સનો ઉપયોગ રુટ ઇન્ડક્શન માટે થાય છે.

b સાયટોકિનિન

સાયટોકિનિન કોષ વિભાજનને ઉત્તેજીત કરે છે, અંકુરની રચના અને અક્ષીય અંકુરના પ્રસારને પ્રેરિત કરે છે અને મૂળની રચનાને અટકાવે છે. તેઓ આરએનએ સંશ્લેષણને સક્રિય કરવા અને પ્રોટીન અને એન્ઝાઈમેટિક પ્રવૃત્તિને ઉત્તેજીત કરવા માટે દર્શાવવામાં આવ્યા છે. સામાન્ય રીતે ઉપયોગમાં લેવાતા સાયટોકિનિન છે

BAP (6-બેન્ઝિલ એમિનો પ્યુરિન)

BA (બેન્ઝી એડિનાઇન)

2ip (આઇસોપેન્ટાઇલ એડેનાઇન)

કિનેટિન અને ઝેટીન ઇફેક્ટ

ઓફ ગ્રોથ રેગ્યુલેટર્સ:

· વધુ સાયટોકિનિન / લો ઓક્સિન રેશિયો ભાગને શૂટ કરવા માટે ફરીથી ઉત્પન્ન થાય છે.

· નીચું સાયટોકિનિન / વધુ ઓક્સિન માત્ર મૂળના ભાગમાં પુનઃજનિત થાય છે.

· મધ્યમ સાયટોકિનિન / મધ્યમ ઓક્સિન અંકુર અને મૂળ બંને માટે પુનઃજનિત થાય છે,

· મધ્યમ સાયટોકિનિન. નીચા ઓક્સિન માત્ર કોલસમાં પુનઃજનિત થાય છે.

ઓક્સિન અને સાયટોકિનિનની સાંદ્રતા તેમના ગુણોત્તર જેટલી જ મહત્વપૂર્ણ છે.

C. Gibberillins અને Abscisic acid

GA3 નો સૌથી વધુ ઉપયોગ gibberillin થાય છે. તે કેલસની વૃદ્ધિને વધારે છે અને વામન અથવા અટકી ગયેલા છોડના વિસ્તરણનું અનુકરણ કરે છે. કલ્ચરના માધ્યમમાં એબીએ જાતિના આધારે કલ્ચરના વિકાસને ઉત્તેજિત કરે છે અથવા અટકાવે છે અને ગર્ભ વિકાસના પછીના તબક્કાઓને અટકાવે છે.

- **pH**

5.0 થી 6.0 ની ઇન વિટ્રો કલ્ચર માટે યોગ્ય છે. ઓટોક્લેવિંગ f પોષક માધ્યમ pH 0.3 થી 0.5 એકમો ઘટાડે છે. 6.0 થી ઉપરનું pH સખત માધ્યમ તરફ દોરી જાય છે જ્યારે 5.0 થી ઓછું pH અગરના ઘાને અટકાવે છે. આથી, તેને 0.1N NaOH અથવા HCl ઉમેરીને એડજસ્ટ કરવું આવશ્યક છે.

- **પોષક તત્વો અને તેમની શારીરિક ભૂમિકા તત્વ કાર્યો:**

નાઈટ્રોજન (N) પ્રોટીનનો ઘટક, ન્યુક્લિક એસિડ કેટલાક સહ-ઉત્સેચકો

ફોસ્ફસ (P) ન્યુક્લિક એસિડનો ઘટક, ઉર્જા સ્થાનાંતરણ, શ્વસન અને પ્રકાશસંશ્લેષણમાં મધ્યવર્તીનું ઘટક

પોટેશિયમ (K) ઓસ્મેટિક સંભવિત, સિદ્ધાંત અકાર્બનિક કેશનનું નિયમન કરે છે. કેલ્શિયમ (Ca) સેલ દિવાલ સંશ્લેષણ, પટલ કાર્ય સેલ સિગ્નલિંગ. મેગ્નેશિયમ (Mg) એન્ઝાઇમ સહ-પરિબળ, હરિતદ્રવ્યનું ઘટક.

સલ્ફર (એસ) કેટલાક એમિનો એસિડના ઘટક (મેથિઓનાઇન, સિસ્ટીન) કેટલાક સહ-પરિબળો.

ક્લોરીન (Cl) પ્રકાશસંશ્લેષણ માટે જરૂરી

આયર્ન (Fe) સાયટોક્રોમ્સના ઘટક તરીકે ઇલેક્ટ્રોન ટ્રાન્સફર મેનાગેનીઝ (Mn) એન્ઝાઇમ કો-ફેક્ટર

કોબાલ્ટ (Co) કેટલાક વિટામિન્સના ઘટક

કોપર (Cu) એન્ઝાઇમ કો-ફેક્ટર ઇલેક્ટ્રોન ટ્રાન્સફર પ્રતિક્રિયા

ઝિંક (Zn) એન્ઝાઇમ સહ-પરિબળ હરિતદ્રવ્ય જૈવસંશ્લેષણ

મોલિબ્ડેનમ (Mo) નાઈટ્રેટ રીડક્ટેઝનું એન્ઝાઇમ સહ-પરિબળ ઘટક.

- માધ્યમની તૈયારી

છોડના અંગની પેશીઓ અને પ્રોટોપ્લાસ્ટ ઇન સામાન્ય રીતે પ્રજાતિઓથી અલગ અલગ હોય છે.માટે કોઈ એક માધ્યમ સૂચવી શકાતું નથી ઇન વિટ્રો કલ્ચર નવી સિસ્ટમ માટે યોગ્ય માધ્યમ ઘડવા માટે એક જાણીતું મૂળભૂત માધ્યમ જેમ કે MS માધ્યમ (મુરાશિગેલ અને સ્કૂગ), B5 (ગેમ્બોર્ગ એટ અલ), વ્હાઇટ મીડિયા વગેરે.

<u>MS (Murashige & Skoog) મીડિયાની રચના</u>

- મુખ્ય ક્ષાર (મેક્રોન્યુટ્રિઅન્ટ્સ) પ્રતિ લિટર

એમોનિયમ નાઈટ્રેટ (NH_4NO_3) -1650 mg/l

કેલ્શિયમ ક્લોરાઇડ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)- 440 mg/l

મેગ્નેશિયમ સલ્ફેટ ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)- 370 mg/l

મોનોપોટેશિયમ ફોસ્ફેટ (KH_2PO_4) -170 mg/l

પોટેશિયમ નાઈટ્રેટ (KNO_3) -1900 mg/l .

- નાના ક્ષાર (સૂક્ષ્મ પોષકતત્વો) પ્રતિ લિટર

બોરિક એસિડ (H_3BO_3)- 6. 2 mg/l

કોબાલ્ટ ક્લોરાઇડ ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)- 0.025 mg/l

ફેરસ સલ્ફેટ ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)- 27.8 mg/l

મેંગેનીઝ(II) સલ્ફેટ ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) -22.3 mg/l

પોટેશિયમ આયોડાઇડ (KI) -0.83 mg/l

સોડિયમ મોલીબ્ડેટ ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) -0.25 mg/l

ઝીંક સલ્ફેટ ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) -8.6 mg/l

Ethylenediaminetetraacetic એસિડ ફેરિક સોડિયમ (FeNaEDTA) -36.70 mg/L

કોપર સલ્ફેટ ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) -0.025 mg/l

- વિટામિન્સ અને કાર્બનિક સંયોજનો પ્રતિ લિટર

માયો-ઇનોસિટોલ- 100 મિલિગ્રામ/લિ

નિકોટિનિક એસિડ- 0.5 મિલિગ્રામ/લિ

પાયરિડોક્સિન - HCl 0.5 mg/l

થાઇમીન - HCl 0.1 mg/l

ગ્લાયસીન 2 મિલિગ્રામ/લિ

ટ્રિપ્ટોન -1 g/l (વૈકલ્પિક)

ઇન્ડોલ એસિટિક એસિડ- 1-30 mg/l (વૈકલ્પિક)

કિનેટિન- 0.04-10 mg/l (વૈકલ્પિક)

નાના જથ્થાત્મક અને ગુણાત્મક ફેરફારો કરીને ઇચ્છિત છોડની સામગ્રીની ચોક્કસ જરૂરિયાતોને સમાવવા માટે એક નવું માધ્યમ વિકસાવી શકે છે

- મીડિયાની તૈયારીની પદ્ધતિઓ:

હવે મીડિયા તૈયાર કરવા માટેની સૌથી યોગ્ય પદ્ધતિ વ્યવસાયિક રીતે ઉપલબ્ધ સૂકા પાવડર માધ્યમોનો ઉપયોગ કરવાની છે. પાવડર નિસ્યંદિત પાણીમાં સામાન્ય રીતે માધ્યમના અંતિમ વોલ્યુમ કરતા 10% ઓછા અને ખાંડ, અગર અને અન્ય ઇચ્છિત પૂરક ઉમેર્યા પછી ઓગળવામાં આવે છે.થી બનેલું છે 2O. પીએચ એડજસ્ટ કરવામાં આવે છે અને મીડિયા ઓટોક્લેવ્ડ છે,

મીડિયા તૈયાર કરવાની બીજી પદ્ધતિ એ છે કે કેન્દ્રિત સ્ટોક સોલ્યુશન તૈયાર કરવું. સ્ટોક સોલ્યુશન્સનો ઉપયોગ મીડિયાની તૈયારીમાં સમાવિષ્ટ પુનરાવર્તિત કામગીરીની સંખ્યામાં ઘટાડો કરે છે અને માનવ અથવા પ્રાયોગિક

ભૂલની શક્યતા ઘટાડે છે. ઉપરાંત, અંતિમ ફોર્મ્યુલેશનમાં માત્ર મિલિગ્રામ અથવા માઇક્રોગ્રામ જથ્થામાં જરૂરી મીડિયા ઘટકો (દા.ત., સૂક્ષ્મ પોષકતત્ત્વો અને હોર્મોન્સ)નું સીધું વજન કરી શકાતું નથી. આ ઘટકો માટે, નિસ્યંદિત પાણીમાં રસાયણોના જરૂરી જથ્થાને ઓગાળીને અને ત્યારબાદ અંતિમ માધ્યમમાં મંદન દ્વારા કેન્દ્રિત સ્ટોક સોલ્યુશન તૈયાર કરવું એ પ્રમાણભૂત પ્રક્રિયા છે. તમામ સ્ટોક સોલ્યુશન યોગ્ય કન્ટેનરમાં નીચા તાપમાને રેફ્રિજરેટરમાં 2°-4°C પર સંગ્રહિત થાય છે.

મેક્રોન્યુટ્રિઅન્ટ્સના સ્ટોક સોલ્યુશન્સ અંતિમ માધ્યમની સાંદ્રતાના 10 ગણા પર તૈયાર કરી શકાય છે. વરસાદને રોકવા માટે કેલ્શિયમ ક્ષાર માટે અલગ સ્ટોક સોલ્યુશનની જરૂર પડી શકે છે.

સૂક્ષ્મ પોષકતત્ત્વોના સ્ટોક સોલ્યુશન્સ સામાન્ય રીતે તેમની અંતિમ શક્તિના 100 ગણા વધારે હોય છે અને તેને રેફ્રિજરેટરમાં 1 વર્ષ સુધી સંગ્રહિત કરી શકાય છે. વિટામિન્સ 100X અથવા 1000X સ્ટોક સોલ્યુશન તરીકે તૈયાર કરવામાં આવે છે અને 2-3 મહિના માટે -20 ડિગ્રી સેલ્સિયસ પર ફ્રીઝરમાં સંગ્રહિત થાય છે. ઓક્સિન સ્ટોક સોલ્યુશન્સ સામાન્ય રીતે અંતિમ ઇચ્છિત સાંદ્રતાના 100-1000 ગણા પર તૈયાર કરવામાં આવે છે. ઓક્સિન્સ NAA અને 2,4-Dને સ્થિર ગણવામાં આવે છે અને તેને કેટલાક મહિનાઓ સુધી 4°C પર સંગ્રહિત કરી શકાય છે;

આયર્નનો સ્ટોક સોલ્યુશન એમ્બર રંગની બોટલોમાં સંગ્રહિત થાય છે. સ્થિર સ્થિતિમાં અસ્થિર હોય તેવા પદાર્થો મધ્યમ તૈયારી સમયે સ્ટોક સોલ્યુશનના અંતિમ મિશ્રણમાં તાજા ઉમેરવા જોઈએ, દૂષિત (અથવા) અવક્ષેપિત સ્ટોક સોલ્યુશનનો ઉપયોગ કરવો જોઈએ નહીં.