Archive of SID

"مجله علوم زراعی ایران"
جلد پنجم، شماره ٤، زمستان ۱۳۸۲

تولید ریزغده‌های سالم سیب‌زمینی در سیستم بیوراکتور تناوبی
Mass production of potato microtubers in a periodical bioreactor

اسلام مجیدی هروان[۱] و داریوش داوی[۲]

چکیده

تکثیر رویشی ارقام سیب‌زمینی با استفاده از روش کشت بافت با روش‌های مختلف و برای اهداف معینی انجام می‌گیرد. در این بررسی شرایط بهینه رشد و تکثیر گیاهان سالم تولید شده از کشت مریستم سیب‌زمینی رقم آگریا به روش‌های کشت معمول و بیوراکتور تناوبی مورد مطالعه قرار گرفت. ابتدا غده‌های به ظاهر سالم و عاری از عوامل بیماریزا، در شرایط سترون و رشد کنترل شده در داخل جعبه کشت شده و شاخه‌های حاصل از رشد، تحت تیمار حرارت درمانی قرار گرفتند. سپس به تهیه مریستم انتهائی ساقه اقدام گردید و در زیر بینوکولر و در شرایط سترون شده حدود ۰/۱ میلیمتر و یا کمتر از قسمت برجسته مریستم‌ها جدا و کشت شدند. مریستم‌ها در محیط کشت پایه MS، حاوی ۰/۱ میلیگرم در لیتر نفتالن استیک اسید، ۲/۵ میلیگرم در لیتر جیبرلیک اسید و ۳٪ ساکاروز رشد کرده و تک شاخه‌هائی به طول ۷-۵ سانتیمتر تولید نمودند که جهت تکثیر بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. محیط کشت پایه MS حاوی هورمون جیبرلیک اسید (۱ میلیگرم در لیتر) و یا نفتالن استیک اسید (۰/۱ میلیگرم در لیتر) همراه با سیتوکینین بنزیل آمینو پورین (۳ میلیگرم در لیتر) برای تکثیر به کار برده شد. تکثیر اولیه سر شاخه‌ها و تولید ریزغده در ظروف ۳۰۰ میلیلیتری و بیوراکتور تناوبی انجام گرفت. نتایج حاصل نشان داد که در ظروف کشت دربسته ۳۰۰ میلیلیتری سرعت رشد، وزن تر و وزن خشک به ترتیب ٤۰٦/۸ و ۰/۸۸ گرم نسبت به سیستم کشت بیوراکتوربه ترتیب ۳٦٤ و ۲٦ گرم به شدت کاهش می‌یابد. تعداد شاخه حاصل از رشد و طول شاخه در بیوراکتور نسبت به ظروف ۳۰۰ میلیلیتری به ترتیب ۵۰۰ و ۱۷۰میلیمتر به ۱۵/۳ و ۹۰ میلیمتر می‌باشد. ریزغده زایی به خوبی القاء گردید و هر ظرف بیوراکتور سه لیتری به طور متوسط حدود ۵۵۰ عدد ریزغده، در مقابل ۴ عدد در ظرف رایج، تولید نمود. این ریزغده‌ها پس از یک ماه نگهداری در یخچال، تقریباً ۱۰۰٪ جوانه زایی داشته و آمادگی کشت در گلخانه یا مزرعه را داشتند.

واژه‌های کلیدی: ریز غده‌زایی، بیوراکتور تناوبی، سیب‌زمینی.

مقدمه

اولین بار جان مالکوم (John Malcolm) در سال‌های ۱۸۱۰- ۱۸۰۰ میلادی در مأموریت سیاسی از طرف دولت هند شرقی، سیب‌زمینی را به ایران آورد که سال‌ها به نام آلوی مالکوم نامیده می‌شد(Laufer, 1938).

در سال ۱۳۷۹ سطح زیر کشت این محصول در ایران ۱٦۰۰۰۰ هکتار با متوسط عملکرد ۲۱/۵ تن در هکتار بوده است که تولید محصولی معادل ۳٦۵۰۰۰۰ تن را شامل شده است.

در طول سالیان گذشته منشاء بذری ارقام مختلفی از

تاریخ دریافت: ۱۳۸۲/۳/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۲/۱۲/۲۱

۱ـ استاد پژوهش پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی
۲ـ عضو هیأت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

www.SID.ir

Archive of SID

سیب‌زمینی از خارج وارد کشور گردیده و پس از تکثیر اولیه و تولید بذور گواهی شده، جهت کشت بین تولید کنندگان توزیع گردیده است. منشأ بذور ارقام از کشورهای اروپائی (عمدتا هلند و آلمان) می‌باشد که سالانه حدود ۱۰۰۰-۲۰۰۰ تن وارد کشور شده و تا حدودی آلوده به آفات و بیماریها است واین آلودگی در طول نگهداری بذور نیز تشدید می گردد (شاهمرادی ۱۹۸۵). استفاده از غده‌های بذری سالم به طور متوسط تا ۳۰٪ افزایش در عملکرد محصول را موجب می‌شود (Murashige, 1980; Mosley et al., 2000). حال با توجه به اینکه بذر سالم یکی از نهاده‌هائی است که در تولید و عملکرد در واحد سطح از طریق تأمین تعداد بوته مناسب، رشد مناسب گیاه و تعداد ساقه در بوته مؤثر می‌باشد (Quanatum Tubers Corporation, 2000) اهمیت تولید و تأمین بذر مناسب ارقام برای کشت مشخص می‌شود.

کشت بافت به عنوان یک روش، امکان تکثیر انبوه گیاهان را فراهم می‌سازد و در تکثیر و نگهداری منابع ژنتیکی سیب‌زمینی و سایر گیاهان غده‌ای در شرایط کنترل شده به کار گرفته شده است. در این روش از کشت مریستم انتهائی ساقه‌های در حال رشد استفاده می‌شود که بافت مریستمی مستقیماً رشد کرده و تولید گیاه، بدون گذر از مرحله کالزائی می کند و نتیجتاً کلون به صورت خالص حفظ و نگهداری می‌شود (Espingoza et al., 1991).

منطقه مریستمی در شاخه‌های اصلی و جانبی در حال رشد به دلیل عدم وجود بافت آوندی و سرعت تقسیم بالا، عاری از ویروس می‌باشد (Lizarraga et al., 1991). لذا جداسازی قسمت محدب انتهائی مریستم و کشت آن، موجب تولید گیاهان عاری از ویروس از گیاهان مادری آلوده می گردد. جداسازی و کشت مریستم در شرایط کاملاً استریل انجام می گیرد و نیاز به دقت بالائی دارد. گیاه عاری از بیماری حاصل می‌تواند وارد چرخه تکثیر شده و تعداد انبوهی گیاهک تولید کند که در مرحله بعدی تکثیر، با استفاده از روش تولید ریزغده میتوان میلیون‌ها ریز غده از هر کشت در سال تولید کرد (Sarkar, 2001a , 2001b).

در روش‌های کشت‌بافت عوامل مختلفی شامل محیط‌های کشت، عناصر غذائی مکمل و شرایط فیزیکی لازم برای رشد به کار گرفته شده است. به عنوان مثال ارقام سیب‌زمینی در محیط کشت مایع یا نیمه جامد عکس‌العمل رشد مناسبی را ایجاد می کنند و محیط کشت پایه MS در کشت مایع بیشترین رشد ساقه را القاء می کند (Carputo et al., 1995). استفاده از شدت نور بیش از ۳۰۰۰ لوکس به مدت ١٦ ساعت در روز نیز رشد شاخه‌ها را افزایش می‌دهد (Sarkar et al., 1997).

هم چنین استفاده از درپوش‌های مناسب ظروف کشت، رشد و تکثیر گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. درپوش‌های پلاستیکی احتمالاً به دلیل عدم تبادل هوا و انباشته شدن اتیلن در داخل ظروف کشت، موجب کاهش رشد و بروز شکل‌های غیر طبیعی در برگ‌ها می‌شوند و استفاده از درپوش‌های پنبه‌ای بهینه شدن رشد را فراهم می‌سازد (Naik and Sakar, 1996, Sarkar et al., 1999) زیرا مقدار اتیلن درون ظرف کاهش می‌یابد(Perl et al., 1988).

گیاهان ارقام سیب‌زمینی که به بیش از ۲۰ نوع ویروس بیماریزا آلوده شده بودند با کشت مریستم، تکثیر شده و کلیه گیاهان حاصل، بدون استفاده از تیمارهای ویروس‌زدایی، عاری از ویروس بودند. به طور معمول هر چه اندازه مریستم کوچک‌تر باشد، درصد ریز نمونه‌های رشد یافته کمتر است، اما شانس عاری از ویروس بودن نمونه‌های رشد کرده بالاتر است (Mellor and Stace, 1977; Lizarraga et al., 1980). با وجود این که گیاهان حاصل از کشت مریستم سیب‌زمینی عاری از ویروس هستند اما تیمار گیاهان با یکی از روش‌های حرارت درمانی یا شیمی درمانی، موجب می‌شود تا نسبت به عاری از ویروس بودن گیاهان حاصله، اطمینان کامل داشت

www.SID.ir

Archive of SID

(Griffiths, 1990; Lizzarraga et al., 1991). حرارت درمانی در سنتز mRNA ویروسی و تولید یا فعال شدن پروتئین‌های پوششی یا پروتئین‌های حرکتی تأثیر سوء می‌گذارد و تشکیل پیکره ویروس و حرکت آن را مختل می‌سازد (Postman, 1999).

از گیاهان تولید شده در داخل محیط کشت و در شرایط آزمایشگاهی، امکان تولید ریز غده وجود دارد. بدین منظورمی‌توان شرایط فیزیکی- شیمیائی رشد را تغییر داده و مناسب‌ترین شرایط را برای القاء غده‌زائی و رشد غده‌ها فراهم ساخت (Hu and Wang, 1983). عامل عمده القاء غده‌زائی در شرایط کنترل شده استفاده از بنزیل آدنین در محیط کشت است (Sevet et al., 2001). ترکیبات دیگری نیز مانند کلروکلین کلراید، تری آزول، NAA، جاسمونیک اسید و هورمون‌های دیگر، موجب تحریک غده‌زائی و رشد غده می‌گردند (Tover et al., 1985; Chandra et al., 1992; Hussey and Stacey, 1988). علاوه بر هورمون‌های گیاهی، ترکیبات دیگری نیز غده‌زائی و رشد غده ها در محیط کشت را تحت تأثیر قرار می‌دهند. به طور مثال نوع و غلظت قندها، ترکیبات ازته، پتاس، نور، تاریکی و درجه حرارت از عوامل مؤثر در غده‌زایی هستند. غلظت ۸-۱٪ ساکاروز موجب افزایش غده زائی می‌شود و غلظت‌های بالای ۸٪ از غده‌زائی جلوگیری می‌کند (Hu and Wang, 1983; Hussey and Stacey, 1984). از طرفی افزایش ساکاروز تأثیری در تعداد غده تولید شده ندارد ولی اندازه و وزن غده را بهبود می‌بخشد (Sarkar and Naik,1997). بهترین درجه حرارت حدود ۲۰ درجه سانتیگراد است و درجه حرارت‌های بالاتر و پائین‌تر موجب جلوگیری از غده‌زائی می‌شوند (Hu and Wang, 1983). در حضور سیتوکینین در محیط کشت، تاریکی شبانه‌روز موجب تحریک غده‌زائی و افزایش آن می‌گردد. ولی در محیط بدون هورمون، هر چه طول فتوپریود بیشتر باشد غده‌زائی بهتر انجام می‌گیرد (Sarkar et al., 1997).

حال با توجه به مشکلات عدیده تأمین بذر سالم سیب‌زمینی برای کشت و اهمیت تولید آن درداخل کشور، این تحقیق جهت دستیابی به دانش فنی تولید انبوه ریزغده‌های سالم که به عنوان منشاء غده‌های بذری قلمداد می‌شوند انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

تعدادی غده از رقم سیب زمینی آگریا از بخش سبزی و صیفی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. غده‌هائی با صفات ظاهری مطلوب و سالم تر انتخاب و پس از شستشو با آب لوله کشی، به مدت ۲۰ تا ۲۵ دقیقه در محلول ۵٪ هیپوکلرید سدیم فعال قرار داده شدند. پس از شستشو با آب مقطر استریل، غده‌ها در جعبه‌های چوبی حاوی ماسه شسته شده، کشت شدند. آبیاری، در دمای تقریبی ۲۵ درجه سانتیگراد گلخانه، هر ۳ الی ٤ روز یک بار انجام شد و هر هفته نسبت به سمپاشی با سموم رایج اقدام گردید. به منظور رشد جوانه‌های جانبی و تولید شاخه‌های فرعی برای مریستم برداری، بوته‌های ۳۰ الی ٤٥ روزه سربرداری و حرارت درمانی شدند.

حرارت درمانی

بوته‌ها جهت حرارت درمانی به مدت ٤ هفته در فتوپریود ١٦ ساعت روشنائی با ٣٦ درجه سانتیگراد دما و ٨ ساعت تاریکی و ٣٢ درجه سانتیگراد دما قرار داده شدند. ساقه‌های جوان رشد یافته از بوته‌ها در طول حرارت درمانی جهت جداسازی و کشت مریستم مورد استفاده قرار گرفتند.

جدا سازی وکشت مریستم

قسمت انتهایی ساقه‌های در حال رشد به قطعاتی به طول ٦-٥ سانتیمتر بریده شده و تحت شرایط استریل در محلول ضدعفونی کننده حاوی۲/۵٪ هیپوکلرید سدیم فعال به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند سپس سه تا چهار

www.SID.ir

Archive of SID

بار شستشو با آب مقطر استریل انجام شده و مریستم انتهائی را به اندازه ۰/۱ میلیمتر یا کمترجدا نموده و روی پل کاغذی در ۱۰ میلیلیتر محیط کشت مایع MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۰/۱ میلیگرم در لیتر NAA، ۲/۵ میلیگرم در لیتر جیبرلیک اسید و ۳٪ ساکاروز قرار داده شد. شرایط رشد محیطی در کلیه مراحل تحقیق در اتاق رشد با طول دوره روشنایی ۱٦ ساعت نور با شدت ۳۰۰۰ لوکس و دمای ۲۲ درجه سانتیگراد و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۱۷ درجه سانتیگراد بود.

ساقه‌های حاصل از رشد مریستم، پس از تأیید سلامتی آن‌ها با انجام آزمون ELISA، به روش تکثیر قلمه‌های تک جوانه و در شرایط رشدی مشابه تکثیر گردیدند.

به منظور تعیین مناسب‌ترین غلظت و ترکیب هورمون‌های گیاهی مؤثر در رشد و تکثیر شاخه‌ها از نفتالین استیک اسید، بنزیل آمینو پورین، کینتین و جیبرلیک اسید در مقادیر مختلف استفاده شده است (جدول ۱). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گردید.

جدول ۱- تیمارهای هورمونی اعمال شده برای مرحله رشد و تکثیر سیب زمینی در شرایط *in vitro* (میلیگرم در لیتر)

Table 1. Hormonal treatments in growth and multiplication stage of potato in vitro condition (mg/l)

No. شماره تیمار	نفتالن استیک اسید NAA	بنزیل آمینوپورین BAP	کینتین Kin	اسید جیبرلیک GA3
1	-	1	-	-
2	-	1	-	1
3	-	2	-	-
4	-	2	-	1
5	-	2	-	2
6	-	3	-	-
7	-	3	-	1
8	0.1	1	-	-
9	0.1	2	-	-
10	0.1	2	-	1
11	0.1	2	-	2
12	0.1	3	-	-
13	0.1	3	-	2
14	-	-	1	-
15	-	-	1	2
16	-	-	2	-
17	-	-	2	1
18	-	-	2	2
19	-	-	3	-
20	-	-	3	1
21	-	-	3	2
22	0.1	-	1	-
23	0.1	-	1	1
24	0.1	-	1	2
25	0.1	-	3	-
26	0.1	-	3	2

www.SID.ir

Archive of SID

به منظور پرآوری شاخه و تولید ریزغده روش کشت بیوراکتور (داودی و روزبه، ۱۳۷۸) با کشت در درون ظروف شیشه‌ای ۳۰۰ میلیلیتری مقایسه گردیده است. بدین منظور ۵-۳ سرشاخه سیب‌زمینی از ظرف کشت استریل را در شرایط استریل به ظرف بیوراکتور منتقل کرده و مجموعه کامل آن در اتاق رشد در شرایط رشدی فوق الذکرقرار داده شد. جهت القاء ریزغده، پس از چهار هفته محیط غذائی تازه با فرمولاسیون پایه و و یتامین‌های MS باضافه ۵ میلیگرم در لیتر BAP و ۸۰ گرم در لیتر ساکارز؛ بدون دستکاری ظرف کشت، جایگزین محیط غذائی مرحله تکثیر شده و ظرف بیوراکتور و سایر کشت‌ها در ۲۰ درجه سانتیگراد و تاریکی قرار داده شد. مقایسه نتایج آزمایش مربوط به دو سیستم بیوراکتور و سیستم رایج یعنی ظروف ۳۰۰ میلیلیتری با استفاده از t-test انجام گردید.

نتایج و بحث

بررسی‌ها نشان می‌دهد که کشت مریستم توأم با حرارت درمانی به خوبی در کنترل و حذف عوامل بیماریزا در سیب‌زمینی مؤثر می‌باشد (Griffiths et al., 1990 et al., Lizzaraga et al., 1991; Salazar, 1983; Dhingra 1988). در این تحقیق نیز آزمون ELISA روی چند نمونه از ساقه‌های حاصل از حرارت درمانی و کشت مریستم، عاری بودن آن‌ها را از عوامل بیماری‌زا تأیید نمود.

رشد ریز نمونه‌های گیاهی در شرایط کنترل شده تابعی از ترکیب مناسب ترکیبات غذائی و بخصوص ترکیبات کنترل‌کننده رشد است لذا هورمون جیبرلیک اسید و نفتالین استیک اسید همراه با دو نوع سیتوکینین بنزیل آمینو پورین و کینتین انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج حاصل از اعمال تیمارهای مختلف هورمونی در رشد شاخساره‌های حاصل از کشت مریستم رقم آگریا نشان می‌دهد که تعداد شاخه حاصل از کشت گره‌های ساقه، تحت تأثیر غلظت‌های مختلفی از ترکیبات هورمونی قرار داشته است و مقدار هورمون مصرفی و نوع آن در تولید تعداد شاخه مؤثر بوده و اختلاف موجود از نظر آماری در سطح ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۲).

جدول۲- تجزیه واریانس صفات رویشی سیب زمینی رقم آگریا تحت تیمارهای هورمونی

Table 2. ANOVA for vegetative traits of potato (cv. Agria) under hormonal treatments

صفت Trait	منبع تغییرات S.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS	مقدارF F value
تعداد شاخساره	تیمار هورمونی	25	138.92	2.19**
Shoots No.	خطا	53	63.42	
طول شاخه	تیمار هورمونی	25	6713.63	3.39**
Shoot Length	خطا	53	1981.28	
تعداد گره در ساقه	تیمار هورمونی	25	18745.6	1.89*
Nuds/Shoot	خطا	53	10423.3	
وزن خشک اندام هوایی	تیمار هورمونی	25	0.00183	0.77ns
Shoot dry weight	خطا	53	0.00337	

ns، * و**: به ترتیب غیر معنی دار؛ معنی دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

Ns, * and ** : Non significant, significant at the 5% and 1% levels of probability, respectively.

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت حاوی ۰/۱ میلیگرم در لیتر نفتالین استیک اسید با مقادیر ۲ و ۳ میلیگرم در لیتر بنزیل آمینو پورین و تیمار هورمونی ۳ میلیگرم در لیتر کینتین و ۱ میلیگرم در لیتر اسید جیبرلیک بالاترین تأثیر در تولید تعداد شاخه را داشته‌اند و میانگین تعداد شاخه تولید شده تفاوت معنی‌داری نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی داشت (جدول۳). کم‌ترین میانگین تعداد شاخه تولید شده در تیمارهای هورمونی نفتالین استیک اسید (۰/۱ میلیگرم در لیتر) همراه با کینتین (سه میلیگرم در لیتر) و اسید جیبرلیک (دو میلیگرم در لیتر) به دست آمده است که ریز نمونه را در جهت تولید کالوس و رشد و تکثیر آن هدایت کرده و از تولید شاخه جلوگیری شده است (Hu and Wang, 1983; Sarkar et al., 1999; Hussey and Stacey, 1981).

در مراحل تکثیر گیاه برای رسیدن به تولید انبوه گیاهان، تعداد شاخه یکی از عوامل مؤثر بوده و هر چه تعداد شاخه حاصل بالا باشد کارایی تکثیر افزایش می‌یابد لذا نتایج نشان می‌دهد که میانگین تعداد شاخه تولید شده از هر ریزنمونه در تیمارهای هورمونی ترکیبی بنزیل آمینو پورین با غلظت پایین همراه با نفتالین‌استیک اسید (۰/۱ میلیگرم در لیتر) و یا اسید جیبرلیک (یک میلیگرم در لیتر) نسبت به سایر تیمارها در سطح بالاتری قرار داشته و اختلاف معنی‌داری نشان داد (جدول۳). ترکیب کینتین (سه میلیگرم در لیتر) همراه با اسید جیبرلیک (یک میلیگرم در لیتر) نیز کار آئی بالائی داشته و قابل استفاده در روند تکثیر گیاه می‌باشد که با نتایج برخی محققین دیگر نیز مطابقت دارد (Sarkar, 2001a; Sarkar et al., 1999).

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که رشد طولی شاخه در سیب‌زمینی نیز تحت تأثیر غلظت و نوع هورمون‌های مورد استفاده قرار دارد و تیمارهای مختلف هورمونی موجب تحریک در رشد متفاوتی گردید و اختلاف موجود بین تیمارها از نظر آماری در سطح ۱٪ معنی‌دار بود (جدول۲).

طول شاخه نیز همانند تعداد شاخه در تیمار بنزیل آمینو پورین (سه میلیگرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید (۰/۱ میلیگرم در لیتر) از رشد طولی مناسبتری برخوردار بود و میانگین طول شاخه نسبت به سایر تیمارها در گروه متمایز و بالاتری (A) قرار گرفت (جدول۳). هم چنین تیمار بنزیل آمینو پورین با اسید جیبرلیک نیز از القاء رشد طولی بهتری برخوردار بود هر چند که استفاده از ترکیب مناسب کینتین با اسید جیبرلیک نیزدر بعضی از تیمارها (مانند تیمارهای ۲۰ و ۲۱، جدول۳) موجب بهبود رشد طولی شاخه گردید ولی ترکیب کینتین با نفتالین استیک اسید، القاء کننده رشد طولی شاخه مناسب برای سیب‌زمینی نبود و بنزیل آمینو پورین نسبت به آن برتری داشت و مورد استفاده قرار گرفت چون این تیمارها در تعداد گره در شاخه و تعداد شاخه در هر ریز نمونه، تأثیر مناسبی نداشت(Dhingra et al., 1988; Sarkar, 2001b).

تعداد گره در ساقه سیب‌زمینی رقم آگریا تحت تیمارهای هورمونی مختلف بررسی شد. غلظت‌های ترکیبی از هورمون‌های مختلف در تعداد گره در ساقه سیب‌زمینی، تأثیر داشته و اختلاف در تعداد گره در تیمارهای مختلف در سطح ۵٪ معنی‌دار بود (جدول۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که ترکیب بنزیل آمینو پورین با نفتالین استیک اسید، مناسبترین تیمار برای تولید تعداد گره بالا می‌باشد (گروهA، جدول۳) هم چنین کینتین با اسید جیبرلیک (دو میلیگرم در لیتر) نیز تعداد گره بیشتری تولید کرد (گروه A) و میانگین تعداد گره در ساقه این تیمارها نسبت به سایر تیمارها برتری نشان داد ولی با توجه به این که تعداد گره در ساقه تنها یکی از اجزاء مؤثر در تکثیر انبوه گیاه است این تیمار نمی‌تواند همانند تیمار بنزیل آمینو پورین مورد استفاده قرار گیرد که موجب افزایش صفات دیگر مؤثر در تکثیر انبوه (طول شاخه، تعداد شاخه در ریز نمونه) سیب‌زمینی می‌گردد. تأثیر مثبت بنزیل آمینو پورین بر شاخص‌های تکثیر سیب‌زمینی در شرایط این ویترو توسط سایر محققین نیز گزارش گردیده است

www.SID.ir

Archive of SID

Pennazio and Redolfi, 1973; Bajaj, 1986; Sarkar, 2001b).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن خشک ساقه‌های تولید شده نشان داد که تیمارهای هورمونی در تولید ماده خشک گیاهی اختلاف معنی‌دار نداشته‌اند (جدول۲). با وجود این، بیشترین مقدار ماده خشک تولیدی به تیمارهای بنزیل آمینو پورین تعلق دارد.

جدول۳- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی شاخساره‌های سیب‌زمینی در محیط کشت در تیمارهای هورمونی مختلف

Table 3. Mean comparison of traits of potato shoots under different hormonal treatments

شماره تیمار Treatment No.	تعداد شاخه Shoots No.	طول شاخه Shoot lenght	تعداد گره Nuds No.	وزن خشک Dry weight
1	12a	12a	21a	15a
2	20a	20ab	12a	9a
3	7ab	7ab	9a	2a
4	9ab	9abc	7a	7a
5	14abc	13abc	20b	20ab
6	19abc	21abcd	6b	12ab
7	16abcd	2bcd	23b	5ab
8	5abcd	6cde	17b	13ab
9	2abcde	19cdef	16b	3ab
10	6abcde	17cdef	14b	16ab
11	23abcde	16cdef	19 b	25ab
12	13abcde	10cdef	2 b	11ab
13	1abcde	5cdef	3 b	22ab
14	11bcde	3Cdef	5 b	6ab
15	17bcde	14def	1 b	23ab
16	24cde	18def	22 b	18ab
17	21cde	11def	24b	17ab
18	10cde	23def	10 b	24b
19	22de	22def	13 b	1b
20	4de	1def	15 b	8b
21	3de	24def	4 b	19b
22	18de	4def	18b	10b
23	8de	8def	8b	14b
24	15de	15def	11b	4b
25	26de	25def	25b	21b
26	25e	26def	26b	26b

- حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است (گروه بندی دانکن؛ ٪۵= α).

- Means with same letters have non significant differences (Dunkan Grouping, α=5%).

نتایج نشان داد که رشد در ظروف کشت دربسته ۳۰۰ میلیلیتری با وزن تر و وزن خشک به ترتیب ۴۰۶/۸ و ۰/۸۸ گرم نسبت به سیستم کشت بیوراکتوربه ترتیب ۳۶۴ و ۲۶ گرم به شدت کاهش نشان داد (جدول ۴ و تصویر ۱). تعداد و طول شاخه در بیوراکتور (به ترتیب ۵۰۰ و ۱۷۰میلیمتر) نسبت به ظروف ۳۰۰ میلیلیتری (به ترتیب ۱۵/۳ و ۹۰ میلیمتر) بیشتر بود که چندین برابر افزایش را نشان می‌دهد (جدول ۴). در روش بیوراکتور

www.SID.ir

Archive of SID

از محیط کشت مایع استفاده می‌شود و ریشه و اندام‌های هوائی گیاه مدت کوتاهی (١٥-١٠دقیقه) در تماس با محیط کشت بوده، سطح تماس اندام‌های گیاهی با محیط کشت بیشتر و تهویه به نحو مطلوبی انجام گرفته و اتیلن از محیط حذف می‌گردد. بنابراین فضای کافی جهت رشد در اختیار می‌باشد و نتیجتاً گیاه از سرعت رشد بالائی برخوردار است. طول دوره رشد برای رسیدن به حداکثر طول شاخه، تعداد گره و ماده خشک نیز از عوامل اصلی در تکثیر گیاه هستند که این مدت در سیستم کشت بیوراکتور به مراتب کمتر است (٢٨ روز نسبت به ٦٥ روز)، لذا چرخه تکثیر در طول سال چندین بار قابل تکرار می‌باشد ضمن این که در هر بار انبوهی از ساقه‌های ریشه دار شده تولید می‌شود. نسبت تعداد شاخه تولید شده در هر دوره کشت در مقایسه با ظروف ٣٠٠ میلیلیتری٥٣٣ به ١٨ بود که حدود ٣٠ برابر افزایش را نشان داد (جدول ۴ و تصویر ١).

جدول۴- میانگین، انحراف معیار ونتایج آزمون t صفات مؤثر در بهره‌وری سیستم بیوراکتور و سیستم رایج

Table 4. Mean, Standard Deviation and T- Test results for traits involved in efficiency of bioreactor and routin systems

سیستم System صفت Trait	بیوراکتور Bioreactor	رایج Routin	آزمون t T-Test
	Mean ± SD	Mean ± SD	
وزن تر اندام گیاهی (گرم) Shoots wet weight	412.83 ± 68.00	15.37 ± 1.05	-8.18***
وزن خشک گیاهی(گرم) Dry weight	39.46 ± 17.94	0.35 ± 0.03	-3.09ns
تعداد شاخه (در ظرف) Shoots No.	533.34 ± 59.65	17.72 ± 4.39	-14.94***
تعداد ریزغده (در ظرف) Microtubers No.	543.66 ± 94.85	3.64 ± 0.73	-9.8607***
وزن ریزغده Microtubers weight	109.86 ± 21.94	2.24 ± 1.12	-8.4853***

ns و ***: به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح ٠/٠٠١ احتمال.

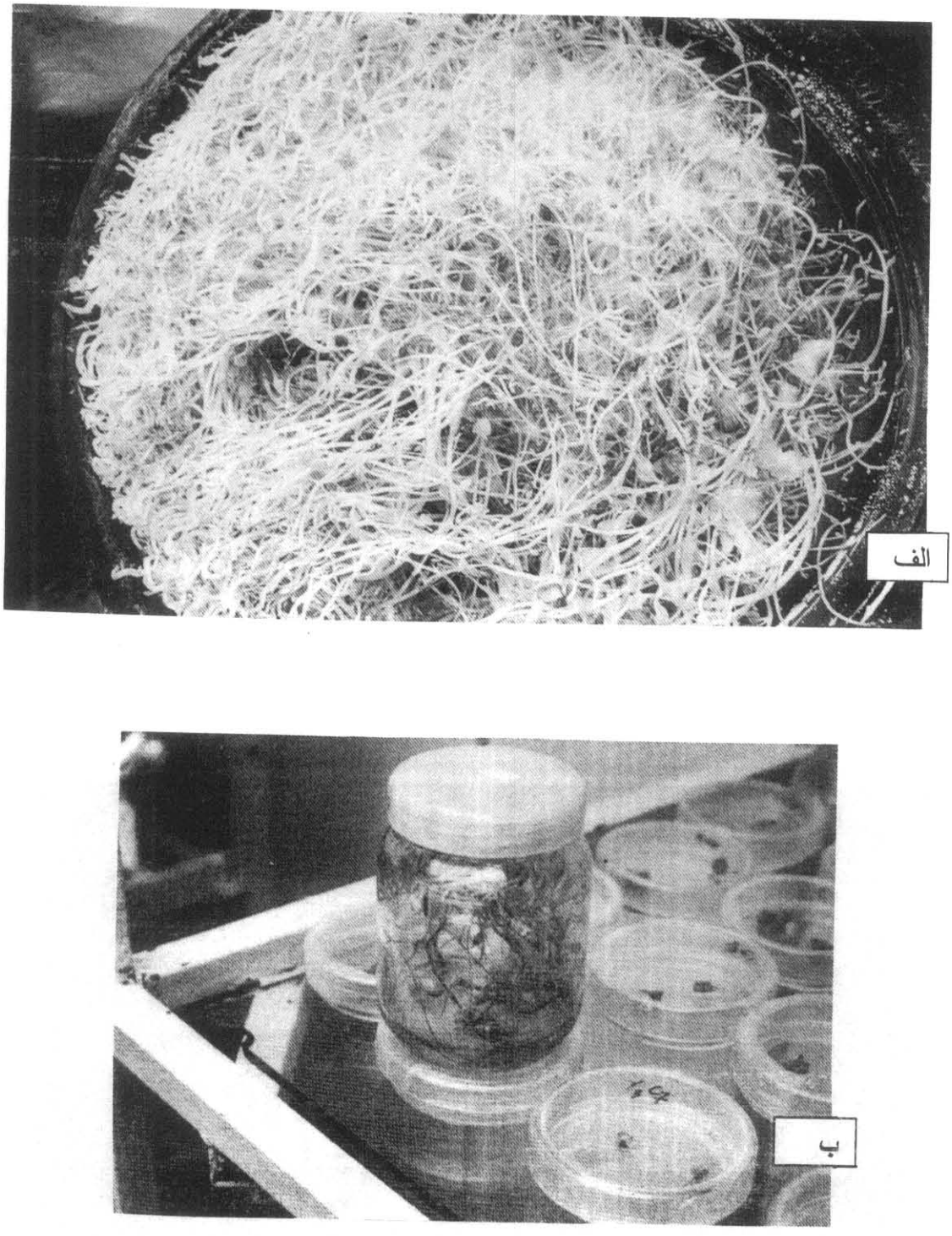
ns and ***: Non significant and significant at the 0.001 level of probability, respectively.

ظرف بیوراکتور سه لیتری به فاصله چهار هفته در مرحله تکثیر، انباشته از شاخه های سیب زمینی گردید (تصویر ٢) و پنج روز پس از تعویض محیط کشت با محیط کشت ریزغده زائی و تیمار تاریکی، ریزغده های زیادی تقریباً در تمام ابعاد ظرف کشت تشکیل شده است(تصویر ٣). با توجه به تعداد ریزغده تولید شده در یک ظرف بیوراکتور(٥٥٠ عدد) مشخص گردید که محیط کشت مورد نیاز برای تولید یک واحد ریزغده تقریباً یک چهارم محیط کشت مورد نیاز در سیستم رایج و ظروف ٣٠٠ میلیلیتری می باشد. علاوه بر تعداد، اندازه ریزغده های تولید شده نیز در این سیستم بزرگتر بوده است.

نتایج نشان داد که پرآوری ساقه و تکثیر انبوه تک شاخه‌های حاصل از کشت مریستم با استفاده از محیط پایه MS مناسب‌ترین رشد را از نظر تعداد شاخه، طول شاخه و تعداد گره در ساقه تولید می‌نماید که این صفات

www.SID.ir

Archive of SID

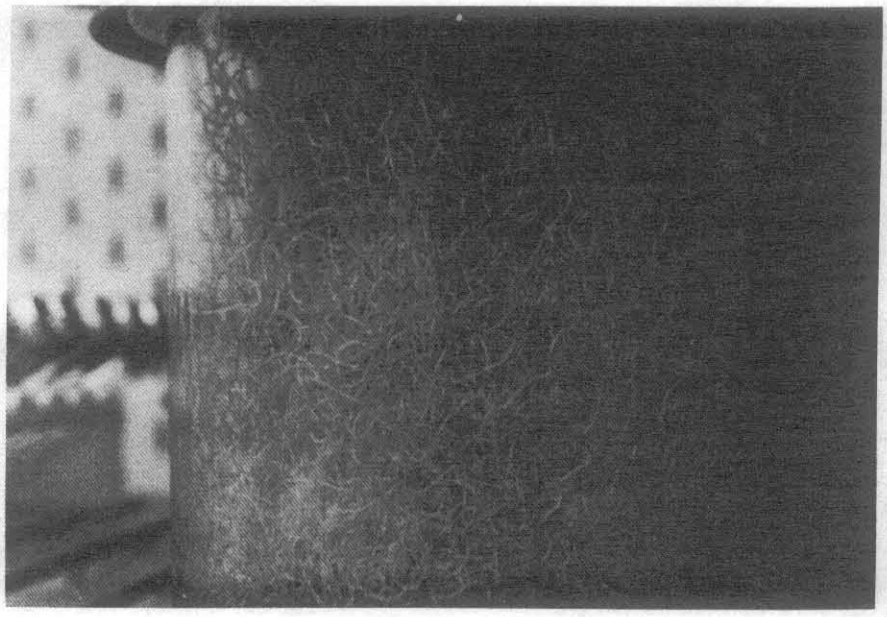


تصویر ۱- مقایسه پرآوری شاخه حاصل از (الف) کشت قطعات تک گره در ظرف کشت بیوراکتور و (ب) ظرف کشت ۳۰۰ میلیلیتری

Fig. 1. Comparison of shoot proliferation in (upside) single nude culture in bioreactor, and (down) in 300 ml culture container

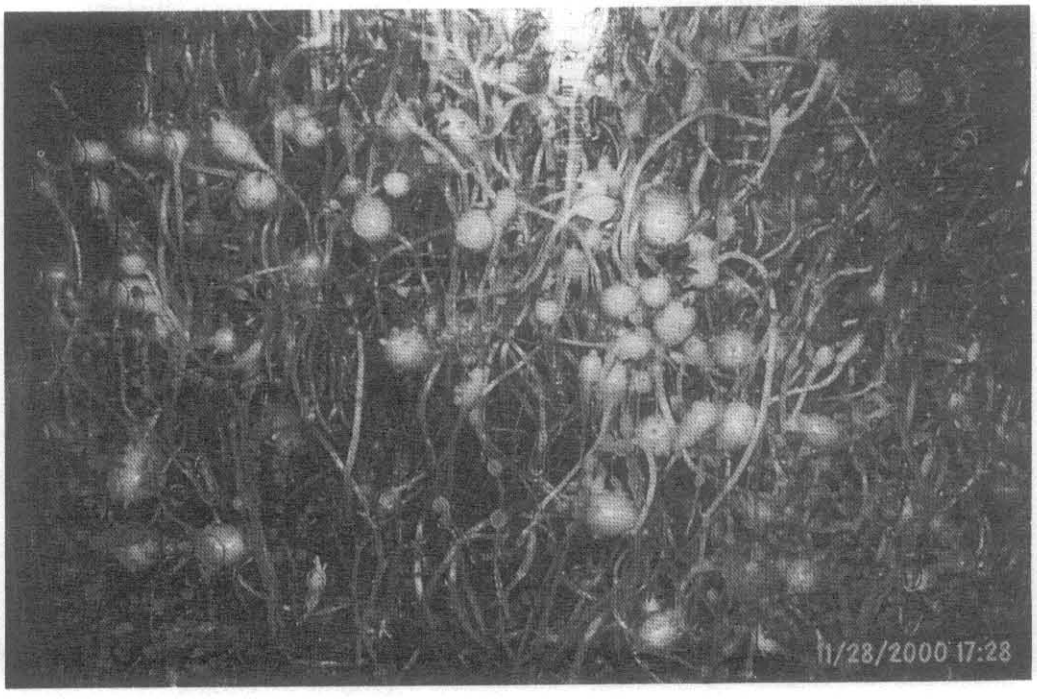
www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۲- پرآوری شاخه در سیستم بیوراکتور. آماده برای ریزغده زایی

Fig. 2. Shoot proliferation in bioreactor system. Ready to microtuberization



تصویر۳- نمای نزدیک از القاء ریزغده‌زایی در ظرف بیوراکتور

Fig. 3. Close-Up of microtuber induction in bioreactor container

www.SID.ir

Archive of SID

در تیمار هورمونی نفتالین استیک اسید (۰/۱ میلیگرم در لیتر) همراه با بنزیل آمینو پورین (دو تا سه میلیگرم در لیتر) نسبت به استفاده از کینتین و اسید جیبرلیک، برتری داشته و اختلاف موجود از نظر آماری نیز در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. لذا در روند تکثیر سیب‌زمینی از طریق کشت بافت از محیط کشت پایه MS با بنزیل آمینو پورین و نفتالین استیک اسید استفاده می‌شود و نسبت پرآوری گیاه بسیار بالا بوده و از نظر زمان رشد و تعداد گیاه تولید شده از هر گره کشت شده بسیار مناسب می‌باشد.

اتیلن تولید شده توسط گیاه موجب کاهش رشد و بروز شکل‌های غیر طبیعی در گیاه می‌شود لذا استفاده از سیستم بیوراکتور تناوبی که منجر به حذف اتیلن از محیط رشد گیاه می‌شود موجبات افزایش رشد گیاه سیب‌زمینی را فراهم نموده و تعداد شاخه بیشتری از هر ریز نمونه، طول شاخه بلندتر، و تعداد گره بیشتری تولید نموده است. هم چنین طول دوره تکثیر کوتاه‌تر شده و در مدت ۲۸ روز گیاه به حداکثر رشد رویشی رسید و دارای ریشه‌های مناسب جهت انتقال به گلدان بود و از نسبت پرآوری بسیار بالائی برخوردار بود. از طرفی دیگر اگر تکثیر سیب‌زمینی از طریق تولید ریز غده مورد توجه قرار گیرد تنها با تعویض محیط کشت تکثیر رویشی با محیط کشت غده زائی می‌توان در طول مدت ۲۶ روز دیگرحداکثر ریز غده از گیاه را در داخل همان ظروف کشت به دست آورد که حدود ۵۰۰ ریز غده از هر ظرف ۳ لیتری به دست می‌آید. معمولا هر شاخه به طور متوسط یک ریز غده تولید می‌کند حال با توجه به میانگین تعداد شاخه حدود ۵۰۰ عدد در هر ظرف، چنین تولیدی در هر ۲ ماه، دارای صرفه اقتصادی و جنبه کاربردی بسیار بالائی است.

تشکر و قدردانی

از کلیه دست اندرکاران کمیسیون بیوتکنولوژی، شورای پژوهش‌های علمی کشور، سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی که از طریق تصویب طرح‌های ملی شماره ۱۶۹۰ و ۱۰۵۳ و تأمین اعتبارات مورد نیاز امکان اجرای این تحقیق را فراهم نمودند سپاسگزار هستیم.

References

منابع مورد استفاده

داودی، د. و ف. روزبه، (۱۳۷۸). طراحی و ساخت یک بیوراکتور تناوبی ساده برای ریز ازدیادی از طریق شاخه‌زائی. مجموعه مقالات نخستین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، جلد سوم: ۱۱۶۱-۱۱۵۵.

Bajaj, Y. P. S, 1986. Biotechnology in agriculture and forestry. 2: Crops . Springer Verlag, Berlin: 1-608.

CHANDRA, R.; RANDHAWA, G.J.; CHAUDHART, D.R. & UPADHYA, M.O. 1992. Efficacy of triazoles for *in vitro* microtuber production in potato. *Potato Research,* Wageningen, **35:** 339-341.

Carputo, D.; T. Cardi, T.; Chiari, G. Ferraiolo, and L. Frmsciante, 1995. Tissue culture response in various wild and cultivated solanum germplasm accessions for exploitation in potato breeding. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **41:** 151-158.

Dhingra, S.; A. Phokela and K. N. Mehrotra. 1988. Cypermethrin resistance in the population of Heliothis armigera Hubner. National Academy of Science Letters, **11:** 123-125.

www.SID.ir

Archive of SID

Espinoza, N. R. Lizarraga, C. Siguenas, F. Buitron, and J. H. Dodds 1991. Cultivo de tejidos: micropropagacion, conservaciony exportacion de germoplasma de papa. Guia de Investigacion CIP 1. Centro Internacional de la Papa, Lima, Peru. 19p.

George, R. 1978. Vegetable Production in Iran. World Crops, September/ October. PP: 208-209.

Griffiths, H. M., S. A. Slack and J. H. Doddos. 1990. Effect of chemical and heat therapy on virus concentrations *in vitro* potato plantlets. Can. J. Bot. **68:** 1515-1521.

HU, C. Y. and P.J. Wang 1983. Meristem, shoot tip, and bud cultures. In Evans, D. A; Sharp, W. R; Ammirato, P.V; Yamada, Y. (Ed's). Handbook of plant cell culture. MacMillan, New York. PP: 177-227.

Hussey, G. and N. J. Stacey 1997. In vitro propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.), Ann. Bot., **48:** 787-96.

Hussey, G. and N. J. Stacey. 1984. Factors affecting the formation of in *vitro* tubers of potato *Solanum tuberosum* L. Ann. Bot. **53:** 565-578.

Laufer, B. 1938. The American Plant Migration. Part 1: The Potato Anthropology Series. Field Museum of Natural History. Volume 28, No. 1. Publication 418. Chicago.

Lizarraga, R. E.; L. F. Salazar, W. H. Roca, and L. Schilde – Rentscheler 1980. Elimination of potato spindle tuber viroid by low temperature and meristem culture. phytopathol. **70:** 754 -755.

Lizarraga, R., E.; U. Panta; y., Jayashinge and J. H. Doddos 1991. Tissue culture for elimination of pathogens. CIP Research Guide 3. International Potato Center (CIP), Lima, Peru.

Mellor, F. C. and R. Stace – Smith. 1977. Virus – free potatoes by tissue culture. In: Plant Cell, Tissue, and Organ Culture; (Ed.) by J. Reinert and Y. P. S. Bajaj. Springer – Verlag. Berlin, Heidelberg, New York. PP: 616-635.

Mosley, A.R., S.R. James, K.A. Rykbost, D.C. Hane, C.E. Stanger, C.C. Shock, J.J. Pavek, D.C. Corsini, J.M. Miller, Jr., S.L. Love, R.E. Thornton, D.G. Holm and R.E. Voss. 2000. Century Russet: A High-yielding Fresh Market Cultivar with Verticillium Resistance. Amer J of Potato Res: **77:** 161-165.

Murashige, T. 1980. Plant growth substances in commercial uses of tissue culture. In: F. Skoog (editor), Plant growth substances 1979. Springer-Verlag, Berlin, pp. 426-434.

Murashige, T. and F. C. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, **15:** 473-497.

Naik, P. S. and D. Sarkar 1996. Culture identity by use of edible colors in commercial micropropagation of potato. J. Indian Potato Asso. **23** (314): 149-152.

Naik, P, S. and D. Sarkar, 1997. Influence of light- induced greening on storage of potato microtubers. Biologia Plantarum . **39** (1): 31-34.

Naik, P, S.; D. Sarkar, and P. C. Gaur, 1998. Yield components of potato microtubers in vitro production and field performance. Ann. Appl. Biol. **133** (1): 91-99.

www.SID.ir

Archive of SID

Pennazio, S. and P. Redolfi. 1973. Factors affecting the in vitro culture of potato meristem tips. Potato Res. **16:** 20-29.

Perl, A., D. Aviv, and E. Galun, 1988. Ethylene and *in vitro* culture of potato: suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of an alien gene. Plant Cell Reports, **7:** 403-06.

Postman, J.D. 1999. Effect of three viruses on multiplication of raspberry in vitro. Spread of blueberry viruses in NCGR field collection. 50th Annual Western Small Fruits Pest Conference, Skamania, Washington.

Quantum Tubers Corporation in Association with American Ag- Tec international, Ltd., Devalan, Wisconsin, USA Copyright 1999, 2000. Quanatum Tubers Corporation; Last Modified: 9/26/00.

Salazar, L. F. 1983. Detection of viruses with Elisa. (Ed.) International Potato Center (CIP), Lima, Peru.

Sarkar, D; P. S. Naik, and R. Chandra. 1997. Effect of different light sources on potato microtuberization. Indian Potato J. **23** (1/2): 8-14.

Sarkar, D.; S. K. Kaushik, and P. S. Naik, 1999. Minimal growth conservation of potato microplants: silver thiosulfate reduces ethylene- induced growth abnormalities during prolonged storage *in vitro*. Plant Cell Reports. **18** (11): 897-903.

Sarkar, D. 2001a. About potato tissue culture. J. DSE- PGR and Biotechnol. **6:** 1-5.

Sarkar, D. 2001b. About potato tissue culture. J. DSE- OGR and Biotechnol., **5:** 1-15

Shahmoradi. Z. 1985. Potato Production in Iran. International potato course: production, storage, and seed technology. Report of Participants. International Agriculture Center, Wageningen, Netherlands, 10 P.

Tovar, P.; R.; Estrada, , L. Schilde-Rentschler and J. H. Dodds, 1985. Induction and use of *in vitro* potato tubers. CIP Circular **13** (4): 1-5.

www.SID.ir