

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 مرستم 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 مرستم انتهایی ساقه اقدام گردید و در زیر بینوکولر و در شرایط سترون شده حدود ۰/۱ میلی‌متر و یا کمتر از قسمت برجسته مرستم‌ها جدا و کشت شدند. مرستم‌ها 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 شاخه‌هایی به طول ۵-۷ 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 در بسته ۳۰۰ میلی‌لیتری سرعت رشد، وزن تر و وزن خشک به ترتیب ۴۰۶/۸ و ۰/۸۸ گرم نسبت به سیستم کشت بیوراکتور به ترتیب ۳۶۴ و ۲۶ گرم به شدت کاهش می‌یابد. تعداد شاخه حاصل از رشد و طول شاخه در بیوراکتور نسبت به ظروف ۳۰۰ میلی‌لیتری به ترتیب ۵۰۰ و ۱۷۰ میلی‌متر 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: ریزغده‌زایی، بیوراکتور تناوبی، سیب‌زمینی.

مقدمه

در سال ۱۳۷۹ سطح زیر کشت این محصول در ایران ۱۶۰۰۰۰ هکتار با متوسط عملکرد ۲۱/۵ تن در هکتار بوده است که تولید محصولی معادل ۳۶۵۰۰۰۰ تن را شامل شده است. در طول سالیان گذشته منشاء بذری ارقام مختلفی از

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).

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۲/۱۲/۲۱

۲- عضو هیأت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

تاریخ دریافت: ۱۳۸۲/۳/۱

۱- استاد پژوهش پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

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 کشت بافت عوامل مختلفی شامل محیط‌های کشت، عناصر غذایی 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 می‌کنند و محیط کشت پایه MS در کشت مایع بیشترین رشد ساقه را القاء می‌کند (Carputo et al., 1995). استفاده از شدت نور بیش از ۳۰۰۰ لوکس به مدت ۱۶ 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 بیماریز آلوده شده بودند با کشت مرستم، تکثیر شده و کلیه گیاهان حاصل، بدون استفاده از تیمارهای ویروس‌زدایی، عاری از ویروس بودند. به طور معمول هر چه اندازه مرستم 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 مرستم 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

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 (عمدتاً هلند و آلمان) می‌باشد که سالانه حدود ۱۰۰۰-۲۰۰۰ تن وارد کشور شده و تا حدودی آلوده به آفات و بیماریها است و این آلودگی در طول نگهداری بذور نیز تشدید می‌گردد (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 بذور سالم یکی از نهاده‌هایی 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 (Quantum Tubers Corporation, 2000) اهمیت تولید و تأمین بذور 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 مرستم انتهائی ساقه‌های در حال رشد استفاده می‌شود که بافت مرستمی مستقیماً رشد کرده و تولید گیاه، بدون گذر از مرحله کالزائی می‌کند و نتیجتاً کلون به صورت خالص حفظ و نگهداری می‌شود (Espingozza et al., 1991).

منطقه مرستمی 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 مرستم و کشت آن، موجب تولید گیاهان عاری از ویروس از گیاهان مادری آلوده می‌گردد. جداسازی و کشت مرستم در شرایط کاملاً استریل انجام می‌گیرد و نیاز به دقت بالائی دارد. گیاه عاری از بیماری حاصل می‌تواند وارد چرخه تکثیر شده و تعداد انبوهی گیاهک تولید کند که در

حال با توجه به مشکلات عدیده تأمین بذر سالم سیب‌زمینی برای کشت و اهمیت تولید آن در داخل 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 غده‌ای از رقم سیب‌زمینی آگریا از بخش سبزی و صیفی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. غده‌هایی با صفات ظاهری مطلوب و سالم تیر انتخاب و پس از شستشو با آب لوله کشی، به مدت ۲ 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 ۴ 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 ۴۵ روزه سربرداری و حرارت درمانی شدند.

حرارت درمانی

بوته‌ها جهت حرارت درمانی به مدت ۴ هفته در فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی یا ۳۶ درجه سانتیگراد دما و ۸ ساعت تاریکی و ۳۲ 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.

جداسازی و کشت مریستم

قسمت انتهایی ساقه‌های در حال رشد به قطعاتی به طول ۵-۶ سانتیمتر بریده شده و تحت شرایط استریل در محلول ضدعفونی کننده حاوی ۲/۵٪ هیپوکلرید سدیم فعال به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند سپس سه تا چهار

(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 منظوری توان شرایط فیزیکی-شیمیایی 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 آزلون، 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 غده‌ها 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 ۸-۱۱٪ ساکاروز موجب افزایش غده‌زائی می‌شود و غلظت‌های بالای ۸٪ از غده‌زائی جلوگیری می‌کنند (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 پایین‌تر 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).

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.

بار شستشو با آب مقطر استریل انجام شده و مریستم انتهایی را به اندازه ۰/۱ میلی‌متر یا کمتر جدا 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 ۳/۳ ساکاروز قرار داده شد. شرایط رشد محیطی در کلیه مراحل تحقیق در اتاق رشد با طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت نور با شدت ۳۰۰۰ لوکس و دمای ۲۲ درجه سانتیگراد و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۱۷ درجه سانتیگراد بود.

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

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 مرستم، عاری بودن آنها را از عوامل بیماری‌زا تأیید نمود.

رشد ریز نمونه‌های گیاهی در شرایط کنترل شده تابعی از ترکیب مناسب ترکیبات غذایی و بخصوص ترکیبات کنترل‌کننده رشد است لذا هورمون جبرلیک 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 مرستم 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).

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

نتایج و بحث

بررسی‌ها نشان می‌دهد کشته مرستم توأم با حرارت درمانی به خوبی در کنترل و

جدول ۲- 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	مقدار F F value
تعداد شاخساره Shoots No.	تیمار هورمونی	25	138.92	2.19**
	خطا	53	63.42	
طول شاخه Shoot Length	تیمار هورمونی	25	6713.63	3.39**
	خطا	53	1981.28	
تعداد گره در ساقه Nuds/Shoot	تیمار هورمونی	25	18745.6	1.89*
	خطا	53	10423.3	
وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	تیمار هورمونی	25	0.00183	0.77 ^{ns}
	خطا	53	0.00337	

ns: * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار؛ معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

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

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 (جدول ۳). 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 ریز نمونه در تیمارهای هورمونی ترکیبی بنزیل آمینو پورین با غلظت پایین همراه با نفتالین استیک 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 (جدول ۳). 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 (جدول ۲).

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 (جدول ۳). 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 نیز در بعضی از تیمارها (مانند تیمارهای ۲۰ و ۲۰۱، جدول ۳) 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 (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که ترکیب بنزیل آمینو پورین با نفتالین استیک اسید، مناسبترین تیمار برای تولید تعداد گره بالا می‌باشد (گروه A، جدول ۳) 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

در تولید ماده خشک گیاهی اختلاف معنی‌دار نداشته‌اند (جدول ۲). با وجود این، بیشترین مقدار ماده خشک تولیدی به تیمارهای بنزیل آمینو پورین تعلق دارد.

(Pennazio and Redolfi, 1973; Bajaj, 1986; Sarkar, 2001b). نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن خشک ساقه‌های تولید شده نشان داد که تیمارهای هورمونی

جدول ۳- 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	تعداد شاخه	طول شاخه	تعداد گره	وزن خشک
Treatment No.	Shoots No.	Shoot lenght	Nuds No.	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٪).

Means with same letters have non significant differences (Duncan Grouping, $\alpha=5\%$).

تصویری (۱): تعداد و طول شاخه در بیوراکتور (به ترتیب ۵۰ و ۱۷ میلی‌متر) نسبت به ظروف ۳۰۰ میلی‌تری (به ترتیب ۱۵/۳ و ۹۰ میلی‌متر) بیشتر بود که چندین برابر افزایش را نشان می‌دهد (جدول ۴). در روش بیوراکتور

نتایج نشان داد که رشد در ظروف کشت درسته ۳۰۰ میلی‌تری با وزن تر و وزن خشک به ترتیب ۴۰۶/۸ و ۱/۸۸ گرم نسبت به سیستم کشت بیوراکتور به ترتیب ۳۶۴ و ۲۶ گرم به شدت کاهش نشان داد (جدول ۴ و

از محیط کشت مایع استفاده می‌شود و ریشه و اندام‌های هوایی گیاه مدت کوتاهی (۱۵-۱۰ دقیقه) 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 بالایی 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 (۲۸ روز نسبت به ۶۵ 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 ۳۰۰ میلیتری ۵۳۳ به ۱۸ بود که حدود ۳۰ برابر افزایش را نشان داد (جدول ۴ و تصویر ۱).

جدول ۴- میانگین، انحراف معیار و نتایج 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	-3.09 ^{ns}
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***

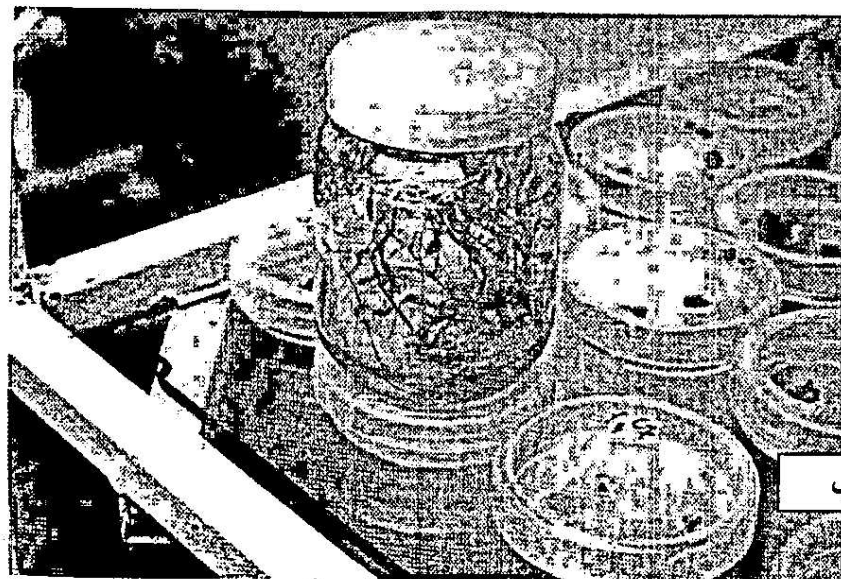
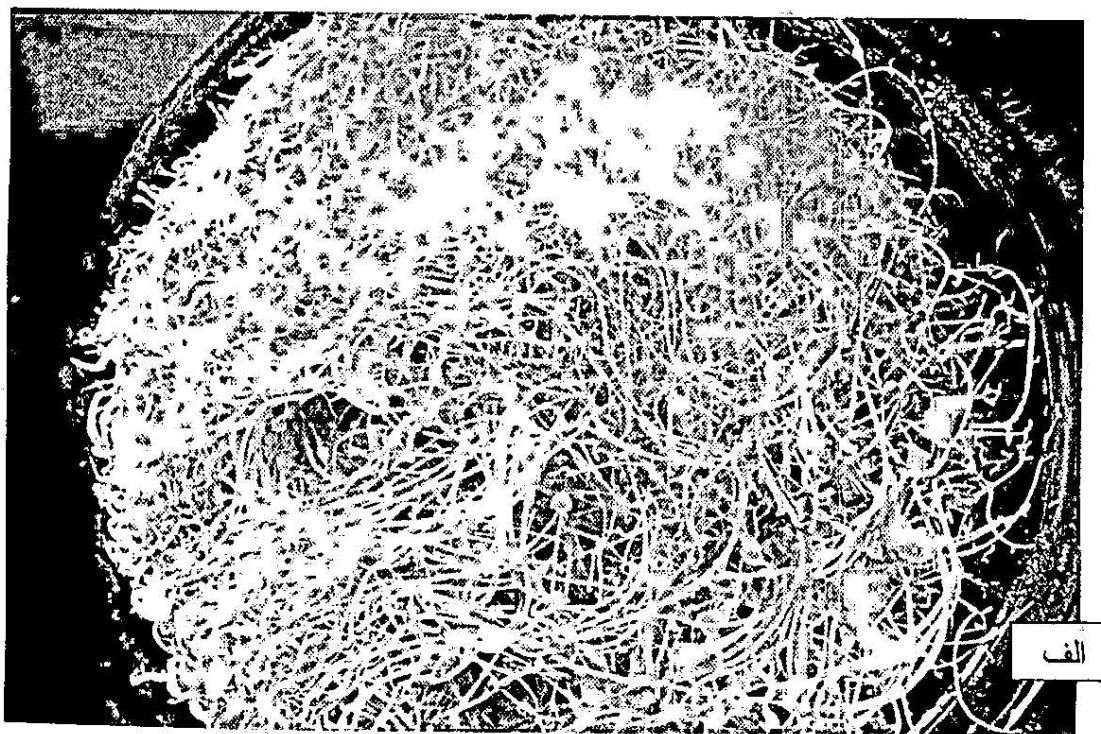
ns و ***: به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح ۰/۰۰۱ احتمال.

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

تقریباً یک چهارم محیط کشت مورد نیاز در سیستم رایج و ظروف ۳۰۰ میلیتری می‌باشد. علاوه بر تعداد، اندازه ریزغده‌های تولید شده نیز در این سیستم بزرگتر بوده است.

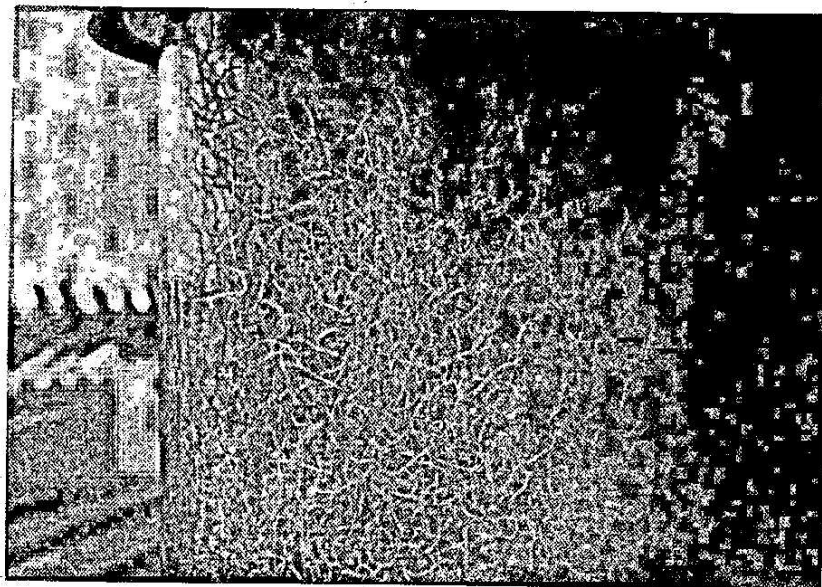
نتایج نشان داد که پرآوری ساقه و تکثیر انبوه تک شاخه‌های حاصل از کشت مرستم با استفاده از محیط پایه MS مناسب‌ترین رشد را از نظر تعداد شاخه، طول شاخه و تعداد گره در ساقه تولید می‌نماید که این صفات

ظرف بیوراکتور سه لیتری به فاصله چهار هفته در مرحله تکثیر، انباشته از شاخه‌های سیب زمینی گردید (تصویر ۲) و پنج روز پس از تعویض محیط کشت با محیط کشت ریزغده زائی و تیمار تاریکی، ریزغده‌های زیادی تقریباً در تمام ابعاد ظرف کشت تشکیل شده است (تصویر ۳). با توجه به تعداد ریزغده تولید شده در یک ظرف بیوراکتور (۵۵۰ عدد) مشخص گردید که محیط کشت مورد نیاز برای تولید یک واحد ریزغده



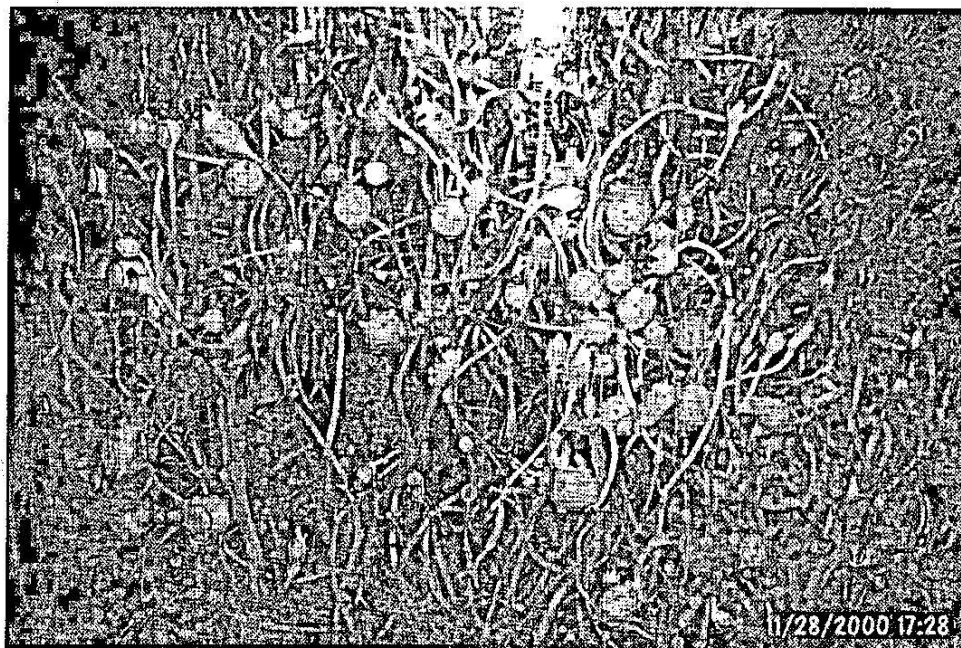
تصویر ۱- مقایسه پرآوری شاخه حاصل از (الف) کشت قطعات تک گره در ظرف کشت بیوراکتور و (ب) ظرف کشت ۳۰۰ میلیتری

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



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

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



تصویر ۳- نمای نزدیک از القاء ریزغده زایی در ظرف بیوراکتور

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

اگر تکثیر سیب‌زمینی از طریق تولید ریزغده مورد توجه قرار گیرد تنها با تعویض محیط کشت تکثیر رویشی با محیط کشت غده‌زائی می‌توان در طول مدت ۲۶ روز دیگر حداکثر ریزغده از گیاه را در داخل همان ظروف کشت به دست آورد که حدود ۵۰۰ ریزغده از هر ظرف ۳ لیتری به دست می‌آید. معمولاً هر شاخه به طور متوسط یک ریزغده 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 دست‌اندرکاران 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.

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 کنتین 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. هم‌چنین 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

References

- 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.

منابع مورد استفاده

- 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.

- 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. Quantum 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.