

## تولید ریزغده‌های سالم سیب‌زمینی در سیستم بیوراکتور تناوبی

### Mass production of potato microtubers in a periodical bioreactor

اسلام مجیدی هروان<sup>۱</sup> و داریوش داوی<sup>۲</sup>

#### 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 آسکریا 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 ذیر بینوکولر و در شرایط سترون شده حدود ۰/۰ 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، ۰/۵ میلیگرم در لیتر جیبریلیک اسید و ۰/۳ 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 جیبریلیک 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 پیشنهاد ۳۰۰ میلیلیتری سرعت رشد، وزن تر و وزن خشک به ترتیب ۴۰/۶ و ۸۸/۰ 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 ۱۲۰ میلیمتر به ۱۵/۳ و ۹۰ میلیمتر می‌باشد. ریزغده زایی به خوبی افقاء 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 تکه‌داری در یخچال، تقریباً ۱۰۰٪ جوانه زایی داشته و آماده‌گی کشت در گلخانه یا مزرعه را داشتند.

واژه‌های کلیدی: ریزغده‌زایی، بیوراکتور تناوبی، سیب‌زمینی.

#### مقدمه

در سال ۱۳۷۹ سطح زیر کشت این محصول در ایران ۱۶۰۰۰ هکتار با متوسط عملکرد ۲۱/۵ تن در هکتار بوده است که تولید محصولی معادل ۳۶۵۰۰۰ تن را شامل شده است.<sup>۱</sup> در طول سالیان گذشته منشاء بذری ارقام مختلفی از

اولین بار جان مالکوم (John Malcolm) در سال‌های ۱۸۱۰-۱۸۱۱ 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 دریافت: ۱۳۸۲/۳/۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۲/۱۲/۲۱

۲- عضو هیات علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

۱- استاد پژوهش پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

مرحله بعدی تکثیر، با استفاده از روش تولید ریز غده میتوان میلیون‌ها ریز غده از هر کشت در سال تولید کرد (Sarkar, 2001a, 2001b).

در روش‌های کشت بافت 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 عکس العمل 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 هوای انباسته 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 می‌باید (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

سیب‌زمینی از خارج وارد کشور گردیده و پس از تکثیر اولیه و تولید بذور گواهی شده، جهت کشت بین تولید کنندگان توزیع گردیده است. منشاً بذور ارقام از کشورهای اروپائی (عمدها 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 بذر 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 (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 انتهایی ساقه‌های در حال رشد استفاده می‌شود که بافت مریستم مستقیماً رشد کرده و تولید گیاه، بدون گذر از مرحله کالزالی می‌کند و نتیجه‌اً کلون به صورت خالص حفظ و نگهداری می‌شود (Espinoza 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 انتهایی مریستم و کشت آن، موجب تولید گیاهان عاری از ویروس از گیاهان مادری آلوده می‌گردد. جداسازی و کشت مریستم در شرایط کاملاً استریل انجام می‌گردد و نیاز به دقت بالائی دارد. گیاه عاری از بیماری حاصل می‌تواند وارد چرخه تکثیر شده و تعداد انبوی گیاهک تولید کند که در

حال با توجه به مشکلات عدیده تأمین بذر سالم سبب‌زنی 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 غده‌ی از رقم سبب زمینی 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 سدیم کشی، به مدت ۲۵ تا ۴۰ دقیقه در محلول ۰/۵٪ هیپوکلرید استریل، غده‌ها در جعبه‌های چوبی حاوی ماسه شسته شده، کشیده شدند. آبیاری، در دمای تقریبی ۲۵ درجه سانتیگراد گلخانه، هر ۳ الی ۴ روز یک بار انجام شد و هر هفته نسبت به سپاهشی با سوم 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 روشانی 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 بجهت جداسازی و کشت مریستم مورد استفاده قرار گرفتند.

#### جدا سازی و کشت مریستم

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

(Griffiths, Lizzarraga et al., 1990; 1991) 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 مخل می‌سازد (Postman, 1999).

از گیاهان تولید شده در داخل محیط کشت و در شرایط آزمایشگاهی، امکان تولید ریز غده وجود دارد. بدین منظور می‌توان شرایط فیزیکی، شیمیائی رشد را تغییر داده و مناسب ترین شرایط را برای القاء غده‌زائی و رشد غده‌ها فراهم ساخت (Hu and Wang, 1983). عامل عمده القاء غده‌زائی در شرایط کنترل شده استفاده از استریل آدنین در محیط کشت است (Sevet et al., 2001). ترکیبات دیگری نیز مانند کلروکلین کلراید، تری آزوں، 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، پناس، نور، تاریکی و درجه حرارت از عوامل مؤثر در غده‌زایی هستند. غلظت ۱-۸٪ ساکاروز موجب افزایش غده‌زائی 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 شباه روز 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 غلاظت و ترکیب هورمون‌های گیاهی مؤثر در رشد و تکثیر شاخه‌ها از نفتالین استیک اسید، بتزیل 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 انتهائی را به اندازه ۰/۰ 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 ۳/۲ ساکاروز قرار داده شد. شرایط رشد محیطی در کلیه مراحل تحقیق در اتاق رشد با طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت نور باشد 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	نفتالین استیک اسید NAA	بتزیل 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 سبیل‌زمینی مؤثر می‌باشد (Griffiths et al., 1990 et al., Lizzaraga et al., 1991) (Salazar, 1983; Dhingra 1988; 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 کنترل کننده رشد است لذا هورمون جیرلیک اسید و نفتالین‌استیک اسید همراه با دو نوع سیتوکینین بنزیل آمینو پورین و کیتین انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج حاصل از اعمال تیمارهای مختلف هورمونی در رشد شاخصه‌های 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٪ معنی دار است (جدول ۲).

به منظور پرآوری شاخه و تولید ریزغده روش کشت بیوراکتور (داودی و روزبه، ۱۳۷۸) با کشت در درون ظروف شیشه‌ای ۳۰۰ میلیلتری مقایسه گردیده است. بدین منظور ۳-۵ سرشاخه سبیل‌زمینی از ظرف کشت استریل را در شرایط استریل به ظرف بیوراکتور منتقل کرده و مجموعه کامل آن در اتاق رشد در شرایط رشدی فوق الذکر قرار داده شد. جهت القاء ریزغده، پس از چهار هفته محیط غذائی تازه با فرمولاسیون پایه و ویتامین‌های MS باضافه ۵ میلیگرم در لیتر BAP و ۸۰ گرم در لیتر ساکارز؛ بدون دستیکاری ظرف کشت، جایگزین محیط غذائی مرحله تکشیر 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 میلیلتری با استفاده از t-test انجام گردید.

## نتایج و بحث

بررسی‌های نشان می‌دهد که کشت مریستم توأم با حرارت درمانی به خوبی در کنترل و

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات رویشی سبیل‌زمینی رقم آگریا تحت تیمارهای هورمونی

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

صفت Trait	منج تغیرات S.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS	F مقدار F value
Shoots No.	تعداد شاخه‌های Shoots No.	تیمار هورمونی خطا	25 53	138.92 63.42
	طول شاخه Shoot Length	تیمار هورمونی خطا	25 53	6713.63 1981.28
Nuds/Shoot	تعداد گره در ساقه Nuds/Shoot	تیمار هورمونی خطا	25 53	18745.6 10423.3
	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	تیمار هورمونی خطا	25 53	0.00183 0.00337

\* و \*\*: به ترتیب غیر معنی دار و سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

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

طول شاخه نیز همانند تعداد شاخه در نیمار بتزیل 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 بتزیل 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 ۲۱، جدول ۳) موجب بهبود رشد طولی شاخه گردید ولی ترکیب کینتین با نفتالین استیک اسید، القاء کننده رشد طولی شاخه مناسب برای سیب زمینی نبود و بتزیل 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 ریزنمونه، تأثیر مناسبی نداشت (Dhingra et al., 1988; Sarkar, 2001b).

تعداد گره در ساقه سیب زمینی رقم آگریا تحت تیمارهای هورمونی مختلف بررسی شد. غلظت‌های ترکیبی از هورمون‌های مختلف در تعداد گره در ساقه سیب زمینی، تأثیر داشته و اختلاف در تعداد گره در تیمارهای مختلف در سطح ۵٪ معنی دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که ترکیب بتزیل 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 بتزیل آمینو پورین مورد استفاده قرار گیرد که موجب افزایش صفات دیگر مؤثر در تکثیر انبوه (طول شاخه، تعداد شاخه در ریزنمونه) سیب زمینی می‌گردد. تأثیر مثبت بتزیل آمینو پورین بر شاخص‌های تکثیر سیب زمینی در شرایط این ویترو توسط سایر محققین نیز گزارش گردیده است

محیط کشت حاوی ۰/۱ میلیگرم در لیتر نفتالین استیک اسید با مقادیر ۲ و ۳ میلیگرم در لیتر بتزیل 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 تقاضوت 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 ریزنمونه 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 بala باشد کارایی تکثیر افزایش می‌یابد لذا نتایج نشان می‌دهد که میانگین تعداد شاخه تولید شده از هر ریزنمونه در تیمارهای هورمونی ترکیبی بتزیل 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 آنی 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 سیب زمینی 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).

در تولید تریز ماده خشک گیاهی اختلاف معنی دار نداشته‌اند (جدول ۲). با وجود آین، نیشترين مقدار ماده خشک تولیدی به تیمارهای بتریز آمینو پورین تعلق دارد.

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

- نتایج حاصل از ابتداء گیری وزن خشک ساقه‌های تولید شده نشان داد که تیمارهای هورمونی

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی شاخه‌های سیب زمینی در محیط کشت در تیمارهای هورمونی مختلف

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

ردیف	ردیف	ردیف	ردیف	ردیف	ردیف
Treatment No.	Shoots No.	Shoot lenght	Nuds No.	عدد گره	وزن خشک
1	12a	12a	21a	15a	
2	20a	20ab	12a	9a	
3	7ab	7ab	9a	2a	
4	9abc	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 معنی دار بین میانگین‌ها است (گروه بندی دانکن،  $\alpha=5\%$ ).  
Means with same letters have non significant differences (Dunkan Grouping,  $\alpha=5\%$ ).

تصویر ۱): تعداد و طول شاخه در بیوراکتور (به ترتیب ۵۰ و ۱۷ میلیمتر)، نسبت به ظروف ۳۰ میلیلیتری (به ترتیب ۱۵/۳ و ۹ میلیمتر) بیشتر بود که چندین برابر افزایش را نشان می‌دهد (جدول ۴). در روش بیوراکتور

نتایج نشان داد که رشد در ظروف کشت درسته ۴۰/۸ میلیلیتری با وزن تیماره و وزن خشک به ترتیب ۳۶۴ و ۲۶ گرم نسبت به شیستم کشت بیوراکتور به ترتیب ۱۴۰/۸ گرم به شدت کاهش نشان داد (جدول ۴) و

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 می باشد ضمن این که در هر بار انبوهای از ساقه های ریشه دار شده تولید می شود. نسبت تعداد شاخه تولید شده در هر دوره کشت در مقایسه با ظروف ۳۰۰ میلیلیتری ۵۳۳ به ۱۸ بود که حدود ۳۰ برابر افزایش را نشان داد (جدول ۴ و تصویر ۱).

از محیط کشت مایع استفاده می شود و ریشه و اندام های هوایی گیاه مدت کوتاهی (۱۰-۱۵ دقیقه) در تماس با محیط کشت بوده، سطح تماس اندام های گیاهی با محیط کشت بیشتر و تهییه به نحو مطلوبی انجام گرفته و اتیلن از محیط حذف می گردد. بنابراین فضای کافی جهت رشد در اختیار می باشد و نتیجتاً گیاه از سرعت رشد بالائی برخوردار است. طول دوره رشد برای رسیدن به حداقل طول شاخه، تعداد گره و ماده خشک

جدول ۴- میانگین، انحراف معیار و نتایج آزمون t صفات مؤثر در بهره وری سیستم بیوراکتور و سیستم رایج

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

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

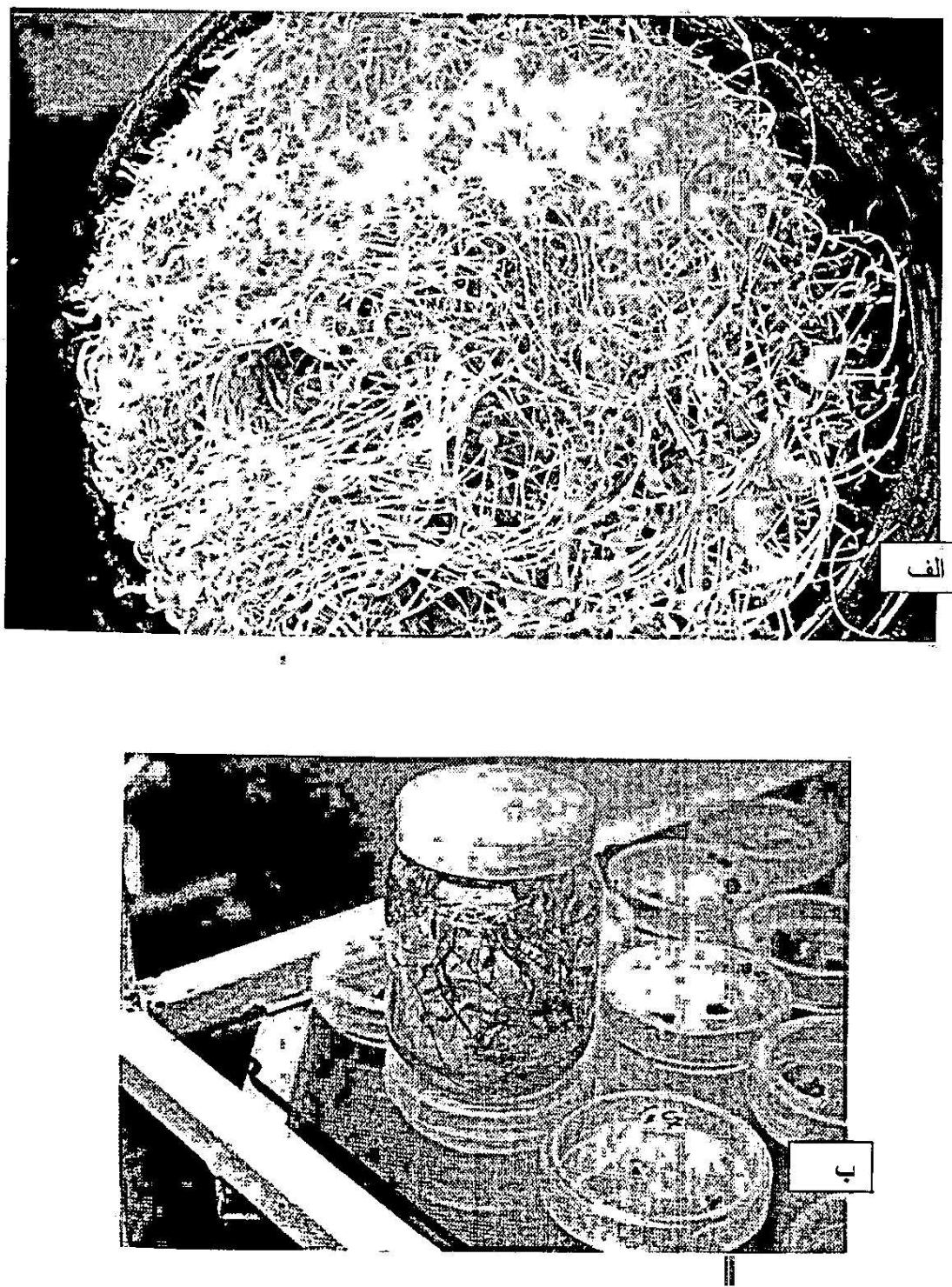
و \*\*\*: به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح ۰/۰۰۱ احتمال.

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 میلیلیتری می باشد. علاوه بر تعداد، اندازه ریزغده های تولید شده نیز در این سیستم بزرگتر بوده است.

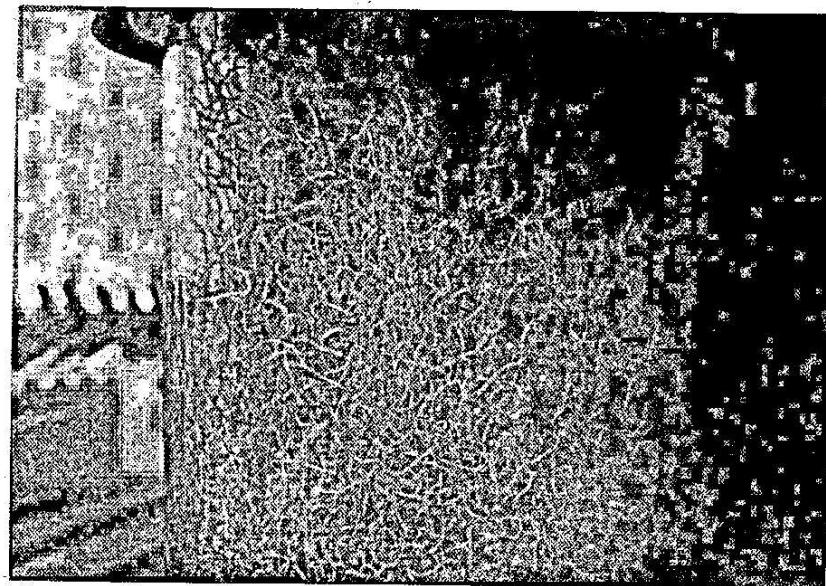
نتایج نشان داد که پرآوری ساقه و تکثیر انبوه تک شاخه های حاصل از کشت مرسیتم با استفاده از محیط پایه MS مناسب ترین رشد را از نظر تعداد شاخه، طول شاخه و تعداد گره در ساقه تولید می نماید که این صفات

ظرف بیوراکتور سه لیتری به فاصله چهار هفته در مرحله تکثیر، ابناشته از شاخه های سیب زمینی گردید (تصویر ۲) 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 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



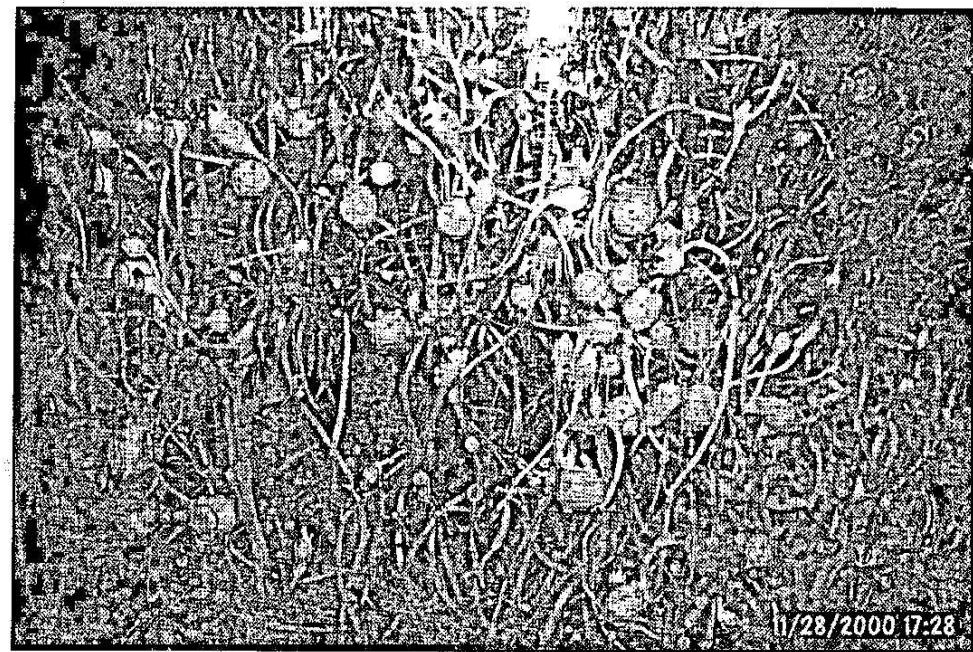
تصویر ۱- مقایسه پرآوری شاخه حاصل از (الف) کشت قطعات تک گره در ظرف کشت بیوراکتور و  
(ب) ظرف کشت ۳۰۰ میلیلیتری

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 ریز غده مورد توجه قرار گیرد تنها با تعویض محیط کشت تکثیر رویشی با محیط کشت غده زائی می‌توان در طول مدت ۲۶ روز دیگر حداکثر 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. معمولاً 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 جبهه کاربردی بسیار بالاتی 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 (۱۰ میلیگرم در لیتر) همراه با بنزیل آمینو پورین (دو تا سه میلیگرم در لیتر) نسبت به استفاده از کنتین و اسید جیرلیک، برتری داشته و اختلاف موجود از نظر آماری نیز در سطح ۱٪ معنی دار بود. لذا در زوند 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 متجرب 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 گلستان بود و از نسبت پرآوری بسیار بالاتی برخوردار بود. از طرفی دیگر

### منابع مورد استفاده

- داودی، د. و ف. روزبه، ۱۳۷۸). طراحی و ساخت یک بیوراکتور تناوبی ساده برای ریز ازدیادی از طریق شاخه‌زنی. مجموعه مقالات نخستین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، جلد سوم: ۱۱۶۱-۱۱۰۰.
- 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.

- Espinoza, N. R. Lizarraga, C. Siguenas, F. Buitron, and J. H. Dodds 1991. Cultivo de tejidos: micropagación, conservación y exportación de germoplasma de papa. Guía de Investigación CIP 1. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 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 micropagation 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. 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.