دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

اثر بیوراکتور تناوبی بر شاخص‌های ریزازدیادی و ریزغده‌زایی سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.)

م. انتصاری[۱]، د. داودی[۲]، ع. حق نظری*[۳]، س. باقری[۱]، ا. مجیدی[۴] و ع. ا. حبشی[۵]

۱ و ۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار دانشگاه زنجان
۲، ۴ و ۵- استادیار، استاد و دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۷

چکیده

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثرات سیستم کشت، اندازه و نوع بیوراکتور تناوبی بر شاخص‌های ریزازدیادی و ریزغده‌زایی سیب‌زمینی رقم آگریا بود. دو نوع سیستم کشت ثابت و تناوبی همراه با دو نوع بیوراکتور در اندازه‌های ۵ و ۱ لیتری مورد استفاده قرار گرفتند. محیط کشت پایه MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۳۰ گرم ساکارز برای مرحله تکثیر و همراه ۱۰ میلی گرم در لیتر BAP و ۸۰ گرم ساکارز برای مرحله ریزغده‌زایی استفاده شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. صفات تعداد گره، ارتفاع شاخساره، وزن تر و خشک در مرحله تکثیر و تعداد و میانگین وزن ریزغده در مرحله ریزغده زایی مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استفاده از سیستم تناوبی در مقایسه با سیستم ثابت باعث افزایش معنی‌داری در میانگین صفات رویشی و ریزغده‌زایی شده است. هر دو نوع بیوراکتور تناوبی مورد مطالعه در این آزمایش باعث کاهش انرژی، زمان و نیروی کار لازم برای عملیات یک دوره کشت شدند. با این حال بیوراکتور تناوبی دوپارچه به دلیل آلودگی کمتر در مرحله تکثیر و سهولت تعویض محیط در مرحله ریزغده‌زایی نسبت به بیوراکتور یکپارچه برای گیاه سیب‌زمینی مناسب‌تر بود. همچنین مشخص شد با افزایش حجم ظرف کشت عملکرد رویشی و ریزغده زایی افزایش می یابد. با توجه به حجم محیط کشت، میزان کار و زمان مصرف شده در سیستم کشت ثابت در مقابل سیستم تناوبی در بیوراکتور، استفاده از سیستم تناوبی در مقیاس بالاتر اهمیت پیدا می کند. در این آزمایش با استفاده از بیوراکتور تناوبی ۵ لیتری حاوی ۳ لیتر محیط مایع و با ۵۰ ریزنمونه اولیه در طی ۴ هفته حدود ۴۵۰ ریزغده (۹ ریزغده در هر تک گره اولیه) تولید شد.

واژه های کلیدی: کشت دورن شیشه ای، بیوراکتور تناوبی، سیب‌زمینی، ریزغده

*: مرحوم دکتر علی حق نظری از داوران فعال این پژوهشنامه بودند که در تاریخ ۱۳۹۰/۲/۳ به رحمت ایزدی پیوستند. سردبیر و مدیرمسوول پژوهشنامه این ضایعه مولمه را به بازماندگان آن مرحوم تسلیت عرض نموده و علو درجات را از خداوند منان خواستار است.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.9.5.2]

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) بعد از حبوبات از نظر دارا بودن مواد معدنی رتبه دوم را دارا بوده و از نظر میزان تولید بعد از گندم، برنج و ذرت چهارمین محصول کشاورزی در دنیا به حساب می‌آید (۱۶). از جمله مشکلاتی که در تولید سیب‌زمینی وجود دارد، می‌توان به کمبود بذر سالم و عاری از بیماری به خصوص بیماری‌های ویروسی اشاره کرد (۲۱). با استفاده از تکنیک کشت بافت تقریبا ۱۰۰٪ ویروس‌ها از برنامه‌ی تولید بذر سیب‌زمینی برطرف می‌شوند. ریزغده‌های کوچک تولید شده از طریق تکنیک کشت به دلیل سهولت در نگهداری، انتقال و کشت و کار اهمیت ویژه‌ای در مسیر تولید بذر سیب‌زمینی دارند. در واقع تولید ریزغده‌های سیب‌زمینی از طریق کشت بافت انقلابی در صنعت تولید سیب زمینی در جهان بوده است (۹). در مقابل مزایای زیاد، تکنیک ریزازدیادی محدودیت‌هایی دارد که بالا بودن هزینه تولید گیاهان با استفاده از این تکنیک از جمله مهم‌ترین مشکلات موجود در این روش است. در حال حاضر بیشتر تلاش‌ها در زمینه کاهش هزینه‌ها و در نتیجه افزایش تولید موثر متمرکز شده است. مکانیزه شدن کشت بافت منوط به استفاده از محیط کشت مایع در بیوراکتورها می‌باشد (۱۲ و ۱۵).

بیوراکتورهای تناوبی با فراهم نمودن شرایط مناسب از نظر هوادهی مطلوب و غذارسانی متناوب قادر به بالا بردن عملکرد فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در گیاهان هستند (۴). این نوع از بیوراکتورها براساس یک دوره زمانی مشخص به طور مرتب ریزنمونه‌های گیاهی را در تماس با محیط غذایی قرار می‌دهد و به عنوان بهترین سیستم از نظر هوادهی و غرقاب کردن گیاهچه ها به طور متناوب معرفی شده‌اند (۲۲). تاکنون تکنیک‌های متفاوتی برای تکثیر انبوه ریزغده‌های درون شیشه‌ای و برقراری سیستم مناسبی برای تولید غده‌های بذری گزارش شده است (۱، ۲، ۸، ۱۸، ۱۹ و ۲۰).

همچنین تحقیقات کاملی با اهدافی چون بررسی تغییر در میزان ساکارز مصرفی (۲۰)، بررسی اثر تراکم کشت (۵)، ساده نمودن سیستم تغذیه در جهت کاهش هزینه‌های تولیدی (۱)، بررسی اثر سیستم تناوبی و غیرتناوبی (۵ و ۱۳) و بررسی سیستم‌های مختلف هوادهی و تغذیه در بیوراکتورهای متفاوتی چون: RITA system (17), system (1), twin flask system (8), ebb and flow nutrient mist bioreactor (6) و L-L system (10) برای افزایش عملکرد تولید ریزغده‌های سیب‌زمینی در بیوراکتور انجام گرفته است. اگرچه این سیستم‌ها در مرحله آزمایشی هستند اما کاربرد تجاری آنها شروع شده و به دلیل اهمیت استفاده بهینه از این سیستم‌ها جهت مکانیزه کردن کشت بافت هنوز نیاز به اطلاعات بیشتری برای تولید سیستم‌های کم هزینه با عملکرد بالاتر احساس می شود. بر این اساس در این آزمایش با هدف کاهش هزینه

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

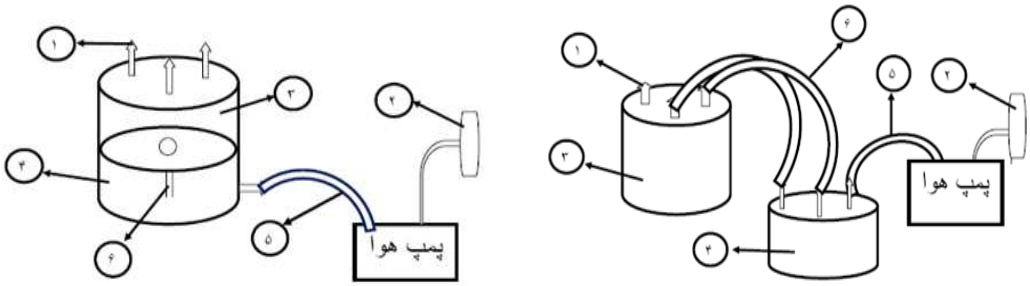
[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.9.5.2]

و بهینه‌سازی شرایط کشت در بیوراکتور تناوبی، اثر حجم و شکل بیوراکتور در تکثیر و ریزغده‌زایی سیب‌زمینی مورد بررسی قرار داده شد.

مواد و روشها

در این مطالعه از گیاهچه‌های سالم و عاری از ویروس سیب زمینی رقم آگریا موجود در گلخانه پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) استفاده شد. بدین منظور شاخه‌های ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متری از گیاهچه‌های سیب‌زمینی گلخانه‌ای جدا و بعد از انتقال به آزمایشگاه کشت بافت به قطعات کوچک حاوی یک گره و برگ، تقسیم شدند. ریزنمونه‌های تک گرهی ابتدا با اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و سپس با هیپوکلرید سدیم ۲/۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه و نهایتاً ۳ بار با آب مقطر استریل هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو و در محیط کشت MS جامد بدون هورمون انتقال داده شدند.

در این آزمایش از دو نوع بیوراکتور تناوبی تک پارچه و دو پارچه در اندازه ۵ لیتری استفاده شد. هر دو بیوراکتور از اجزای مشابهی تشکیل شده و تفاوت بیوراکتورها تنها در موقعیت قرارگیری مخزن کشت و تغذیه نسبت به هم است. به طوری که در بیوراکتور تک پارچه مخزن کشت و تغذیه متصل و در نوع دو پارچه از هم جدا بوده و توسط لوله‌های سیلیکونی قابل اتوکلاو به هم متصل شده‌اند (شکل ۱).



شکل ۱- ساختار دو نوع بیوراکتور تناوبی به ترتیب، دو پارچه و تک پارچه شامل: ۱- فیلتر هوا ۲- تایمر ۳- مخزن کشت ۴- مخزن تغذیه ۵- لوله‌های انتقال هوا ۶- لوله‌های انتقال محیط.

به منظور مقایسه کشت تناوبی از نظر اندازه ظرف، تکثیر گیاهچه‌های سیب‌زمینی در ارلن‌های ۱ لیتری که سیستم تناوبی در آنها شبیه‌سازی شده بود نیز انجام گرفت. این سیستم نیز شامل مخزن کشت ۱ لیتری و مخزن تغذیه ۰/۵ لیتری است که بوسیله لوله‌ای انتقال محیط که از طریق سوراخ‌هایی در درپوش‌های سیلیکونی تعبیه شده بود به یکدیگر مرتبط شدند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.9.5.2]

شکل ۲- بیوراکتور یک لیتری شبیه‌سازی شده با ارلن.

مخزن تغذیه بیوراکتورهای ۵ و ۱ لیتری به ترتیب با ۳ و ۰/۵ لیتر محیط کشت MS مایع همراه با ۰/۵ میلی‌گرم GA_3 و ۳۰ گرم ساکارز (به ازای هر لیتر) پر شد. تمامی اجزای بیوراکتور شامل: مخزن کشت، مخزن تغذیه همراه با محیط کشت مایع و لوله‌های انتقال محیط کشت قبل از تلقیح بوسیله اتوکلاو در فشار ۱۲۰ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. سپس ۵۰ تک گره سیب‌زمینی در هر بیوراکتور تلقیح شد. با روشن شدن پمپ، محیط کشت از مخزن تغذیه توسط لوله‌های انتقال دهنده به مخزن کشت وارد می‌شود. پس از قطع شدن پمپ با ورود هوا از فیلترهای هوا و نیروی اختلاف پتانسیل، محیط مایع درون مخزن کشت شروع به تخلیه و برگشت به مخزن تغذیه می کند. هر نوبت تغذیه ۱۰ دقیقه طول کشیده و تعداد تغذیه در روز با زمان‌بندی تنظیم شده توسط تایمر متصل به پمپ، هر ۱۲ ساعت یکبار مشخص شد. بعد از ۴ هفته محیط مرحله ریزغده‌زایی شامل ۱۰ میلی گرم در لیتر BAP و ۸۰ گرم ساکارز جایگزین محیط مرحله تکثیر شد و مخزن رشد در شرایط تاریکی کامل قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. اندازه‌گیری صفات تعداد گره، ارتفاع شاخساره، وزن‌تر و وزن خشک در مرحله تکثیر و صفات تعداد و وزن ریزغده به ترتیب ۴ و ۸ هفته بعد از تلقیح اولیه انجام شد.

نتایج و بحث

مرحله تکثیر در بیوراکتور

نتایج جدول تجزیه واریانس اثر استفاده از سیستم‌های مختلف کشت، بیوراکتور تناوبی تک پارچه، دوپارچه و ظروف رایج ۳۰۰ میلی‌لیتری مشخص کرد استفاده از سیستم‌های کشت مختلف در تمامی صفات مرحله تکثیر گیاهچه‌های سیب‌زمینی رقم آگریا باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری شده است

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.9.5.2]

(جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مرحله رویشی سیب‌زمینی رقم آگریا تحت تاثیر نوع سیستم کشت

منبع تغییرات	df	میانگین مربعات			
		تعداد گره	ارتفاع شاخساره (mg)	وزن تر (mg)	وزن خشک (mg)
اثر سیستم کشت	۲	۱۱۰/۶۴**	۱۰۵/۷*	۹۱/۴*	۵/۴۳۵*
اشتباه آزمایشی	۶	۷/۳۵	۱۲/۴۶	۱۳/۳۷	۰/۹۱۷
ضریب تغییرات (CV)		۱۵/۸۸	۱۲/۵۶	۱۴/۰۲	۱۱/۵۲

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی دار، معنی دار در سطح ۱٪ و ۵٪.

با توجه به جدول مقایسه میانگین بین دو نوع سیستم تناوبی تک پارچه و دو پارچه هیچ اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده نشد و هر دو نوع سیستم عملکرد تقریباً مشابهی در تمامی صفات نشان دادند و از نظر سرعت رشد و کیفیت گیاهچه‌های تولیدی در وضعیت مناسب‌تری نسبت به سیستم کشت ثابت قرار داشتند (جدول ۲). تیسون و الولواد (۱۷)، نیز در آزمایش مشابهی محیط نیمه جامد با نتایج بسیار ضعیفی از تعداد گره، ارتفاع شاخساره، تعداد و وزن ریزغده تولیدی با بیوراکتورهای تناوبی به عنوان سیستم شاهد مقایسه نمودند. جیمنز و همکاران (۸)، در تحقیق مشابهی با استفاده از یک سیستم تناوبی، موفق به افزایش سه برابری در ارتفاع شاخساره سیب‌زمینی در مقایسه با سیستم نیمه جامد شدند. کابرا جاوا و همکاران (۴)، همچنین مناسب بودن سیستم تناوبی را برای تکثیر و پرآوری شاخساره‌های سیب‌زمینی شیرین گزارش کرد.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر سیستم‌های کشت مختلف در مرحله تکثیر سیب‌زمینی رقم آگریا

منبع تغییرات	تعداد گره	ارتفاع شاخساره (cm)	وزن تر (mg)	وزن خشک (mg)
سیستم کشت ثابت	۱۵/۸۳b	۲۱/۳۳b	۴۱۴/۶۳b	۴۷/۲۵b
بیوراکتور تک پارچه	۲۵/۵۷a	۳۰/۶۳a	۸۴۰/۴۷a	۸۲/۳۰a
بیوراکتور دو پارچه	۲۶/۸۷a	۳۲/۳۷a	۸۷۲/۰۷a	۸۳/۱۳a

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از آزمون دانکن می باشد.

بررسی نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بکار بردن ۳ حجم ۵۰۰۰ (بیوراکتور دو پارچه)، ۱۰۰۰ (بیوراکتور دوپارچه شبیه‌سازی شده با ارلن) و ۳۰۰ میلی‌لیتری (ظروف کشت رایج حاوی محیط مایع) در مرحله تکثیر رویشی مشخص کرد عامل حجم ظرف باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری بین تمامی صفات مورد بررسی شده است (جدول ۳).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.9.5.2]

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مرحله رویشی سیب‌زمینی رقم آگریا تحت تاثیر حجم مخزن کشت

منبع تغییرات	df	میانگین مربعات			
		تعداد گره	ارتفاع شاخساره (cm)	وزن تر (mg)	وزن خشک (mg)
حجم ظرف کشت	۲	۷۶/۶۸۸**	۶۸/۵۹*	۱۶۹۵۷۱/۵*	۱۰۳۱/۷۲*
اشتباه آزمایشی	۶	۷/۴۳	۱۲/۳۷	۲۸۵۷۵/۷	۱۹۴/۵۸
ضریب تغییرات (CV)		۱۳/۵۰	۱۳/۸۸	۲۷/۹۰	۲۲/۳۲

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی دار در سطح ۱٪ و ۵٪.

با مقایسه سیستم کشت از نظر اندازه مخزن کشت، مشخص شد با افزایش حجم ظرف افزایش قابل ملاحظه‌ای در میانگین صفات مورد مطالعه حاصل می‌شود (جدول ۴). افزایش در میانگین صفات اندازه‌گیری شده را می‌توان به دسترسی بیشتر مواد گیاهی به اکسیژن و مواد غذایی با افزایش حجم ظرف مرتبط دانست. با توجه به عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین صفات مورد بررسی در بیوراکتور یک لیتری و ظروف ۳۰۰ میلی‌لیتری می‌توان به اهمیت حجم ظرف در کاربرد یک سیستم تناوبی پی‌برد. با توجه به اینکه نسبت میزان محیط کشت به تعداد گره در بیوراکتور ۵ لیتری، یک لیتری و ظروف ۳۰۰ میلی‌لیتری به ترتیب ۶۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌لیتر است می‌توان این عدم اختلاف را به کم‌تر بودن میزان محیط غذایی به ازای هر تک گره در بیوراکتور یک لیتری در مقایسه با ظروف ۳۰۰ میلی‌لیتری نسبت داد. به دلیل بالاتر بودن نسبت جمعیت اولیه به حجم ظرف در بیوراکتور یک لیتری، تجمع بیشتر CO_2 و کمبود اکسیژن در اتمسفر بالای ظرف کشت اثرات نامطلوبی ایجاد شده که باعث جلوگیری از رشد مطلوب‌تر و نمود بیشتر سیستم تناوبی در صفات مورد بررسی شده است (۲۲). بر این اساس با توجه به حجم ظرف کشت و محیط کشت در شیشه‌های ۳۰۰ میلی‌لیتری و همچنین میزان کار و زمان صرف شده در مقابل بیوراکتورهای مورد آزمایش برای کاهش زمان و هزینه استفاده از سیستم تناوبی در مقیاس بالاتر اهمیت می‌یابد.

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات رویشی تحت تاثیر حجم ظرف کشت

منبع تغییرات	تعداد گره	ارتفاع شاخساره (cm)	وزن تر (mg)	وزن خشک (mg)
300 ml	۱۵/۸۳b	۲۱/۳۳b	۴۱۴/۶۳b	۴۷/۲۵b
1000 ml	۱۹b	۲۴/۰۵b	۵۰۳/۹b	۵۷/۰۷b
5000 ml	۲۷/۷۳a	۳۲/۳۷a	۸۷۲/۰۷a	۸۳/۱۳a

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از آزمون دانکن می باشد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.9.5.2]

با توجه به اینکه اکثر مطالعات مشابه انجام شده با هدف افزایش ریزغده‌زایی در بیوراکتور انجام گرفته است (۱، ۲۰ و ۲۳) و همچنین بررسی مرحله تکثیر در بیوراکتور باعث از دست دادن ماده آزمایشی برای انتقال به مرحله ریزغده‌زایی می‌شود، اطلاعات در مورد بهینه‌سازی شرایط تکثیر بسیار محدود است و بررسی صفات رویشی در این مرحله در گزارشات مشابه پیشین اندک بوده است. در این تحقیق به بررسی کامل صفات رویشی در بیوراکتور تناوبی پرداخته شد. مرحله تکثیر در بیوراکتورها با جمعیت اولیه ۵۰ تک گره به مدت ۴ هفته انجام شد، با استفاده از سیستم تناوبی مورد استفاده گیاهچه‌ها به سرعت رشد یافتند و بعد از ۳ تا ۴ هفته گیاهچه‌هایی با ارتفاع حدود ۳۰ سانتی‌متر و ۲۵ گره در هر شاخساره تولید شد که در مقایسه با گیاهچه‌های رشد یافته با سیستم غیرتناوبی اختلاف معنی‌داری داشتند.

شکل ۳- مقایسه ظاهری اثر سیستم تناوبی تحت تاثیر دو فاکتور حجم و شکل ظرف در مرحله رویشی گیاهچه‌های سیب‌زمینی رقم آگریا.

نتایج این تحقیق مشخص کرد بیوراکتور تناوبی تشکیل جوانه‌ها و تعداد آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. همچنین افزایش می‌یابد اثر تناوب در تشکیل جوانه ها و تعداد آنها از طریق افزایش تعداد و دوره پمپاژ گزارش شده است (۵). در این تحقیق با هدف کاهش انرژی کمترین تعداد دوره تغذیه (دو بار در روز) نسبت به آزمایشات پیشین انجام شد و در مرحله تکثیر نتایج مطلوب‌تری نسبت به تحقیقات مشابه مشاهده شد (گیاهچه‌هایی با میانگین ۲۱ تا ۳۲ سانتی‌متر طول و ۱۶ تا ۲۸ گره در هر شاخساره). عبادی و همکاران (۵) با استفاده از دوره‌های ۴۰ ثانیه‌ای هر ۲۰ دقیقه بعد از ۴ هفته گیاهچه‌هایی با ۱۳سانتی‌متر طول و ۱۴-۱۳ گره تولید کردند. پیاو و همکاران (۱۳)، نیز در هر دو مرحله تکثیر و ریزغده‌زایی از ۱۲ بار تغذیه هر بار به مدت ۶۰ دقیقه استفاده کردند و موفق به تولید گیاهچه‌هایی با ۱۶/۲

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.9.5.2]

سانتی‌متر طول و ۱۳/۲ گره بعد از حدود ۴ هفته شدند. محققین دیگری همچون تیسون و الوالد (۱۷) و کارپینن و همکاران (۱۰)، به ترتیب از دوره تناوب ۴ بار در روز به مدت ۱۰ دقیقه و مدت زمان ۲ دقیقه در هر ساعت برای تغذیه گیاهچه‌های سیب زمینی استفاده کردند ولی نتایجی مشخصی در این مرحله ارائه نشده است. سومارینو و همکاران (۱۴)، مناسب ترین زمان تناوب را ۳ دقیقه هر ۶ ساعت برای خرما بیان کرد. با توجه به تفاوت در زمان تغذیه در آزمایشات مشابه و عدم گزارش دقیق در مورد صفات مرحله تکثیر و نتایج مثبت ناشی از کاهش دوره تغذیه در این تحقیق، انجام آزمایشات و مطالعه اثر دوره‌های متفاوت در بیوراکتور تناوبی ضروری بنظر می‌رسند.

مرحله ریزغده‌زایی

گیاهچه‌ها بعد از طی ۴ هفته رشد در شرایط کنترل شده در اتاق رشد با تعویض محیط کشت به شرایط تاریکی منتقل شدند، در دوره تاریکی جوانه‌ها ریشه های هوایی تولید کردند، رنگ برگ ها سبز کم رنگ و متمایل به سفید شد و رشد ثابت جوانه‌ها در تمام طول دوره ریزغده‌زایی ادامه داشت. تشکیل ریزغده ها از انتهای هفته اول شروع و تا انتهای دوره نیز تشکیل ریزغده‌های جدید ادامه داشت. نتایج مشخص کرد بکار بردن سیستم تناوبی باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری هم در تعداد و هم در وزن ریزغده‌های تولیدی شده است (جدول ۵).

جدول ۵- تجزیه واریانس صفات مرحله ریزغده‌زایی سیب‌زمینی رقم آگریا تحت تاثیر نوع سیستم کشت

منبع تغییرات	df	میانگین مربعات	
		تعداد ریزغده‌ها	وزن ریزغده‌ها (mg)
اثر سیستم کشت	۲	۱۰/۵۸**	۳۳/۳۱۰*
اشتباه آزمایشی	۶	۰/۵۵۶	۴/۳۹۶
ضریب تغییرات (CV)		۹/۱۳	۱۳/۴

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۱٪ و ۵٪.

با مقایسه میانگین صفات ریزغده‌زایی در سیستم تناوبی با سیستم رایج درون‌شیشه‌ای مشخص شد سیستم تناوبی با کم‌ترین میزان کار و انرژی بالاترین میانگین‌ها را به خود اختصاص داد. جیمنز و همکاران (۸)، در تحقیق مشابهی با استفاده از یک فلاسک ۴ لیتری موفق به تولید ۲/۸ تا۳/۱ ریزغده با سیستم تناوبی شدند. کابرا جووا و همکاران (۴)، گزارش کردند سیستم تناوبی یک ابزار مناسب برای تکثیر انبوه ریزغده‌های سیب‌زمینی شیرین بوده و باعث

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.9.5.2]

افزایش در تعداد و وزن ریزغده‌های تولیدی می‌شود. بطوری که ۴۵ تا ۴۷ درصد میکروتیوبرهای تولیدی آنها وزنی بالاتراز ۳ گرم داشتند.

اختلاف معنی‌داری بین نتایج بدست آمده از دو نوع بیوراکتور مشاهده نشد (جدول ۶). تنها نکته قابل ملاحظه در این مرحله ساختار بیوراکتور برای تسهیل در تعویض محیط ریزغده‌زائی بعد از مرحله تکثیر است. با تمامی مزایای بیوراکتور تناوبی تک پارچه از جمله، تسهیل در پمپاژ، حمل و نقل و اشغال فضای کمتر در اتاق رشد، به دلیل نوع ساختار خاص این نوع بیوراکتور تعویض محیط به سختی در آن صورت می‌گیرد و بیشتر کشت‌ها بعد از انتقال به مرحله ریزغده‌زایی با آلودگی مواجه می‌شوند. بنابراین، این نوع بیوراکتور برای مرحله ریزغده‌زایی مناسب نبوده و اگر هدف بدست آوردن گیاهچه‌های سالم برای انتقال به گلخانه و بدست آوردن مینی‌تیوبر باشد این نوع بیوراکتور می‌تواند کارایی خوبی داشته باشد (شکل ۲).

جدول ۶- مقایسه میانگین صفات ریزغده‌زایی تحت تأثیر نوع سیستم کشت

منبع تغییرات	تعداد ریزغده به ازای جمعیت اولیه	میانگین وزن ریزغده‌ها (mg)
کشت درون‌شیشه	۶[b]	۱۴۶/۱۲[b]
بیوراکتور تک پارچه	۹/۱۷[a]	۲۸۲/۴۵[a]
بیوراکتور دو پارچه	۹/۳۳[a]	۳۳۶/۵۸[a]

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از آزمون دانکن می باشد.

شکل ۴- تولید ریزغده‌های سالم سیب‌زمینی در بیوراکتور تناوبی.

براساس جدول تجزیه واریانس داده های حاصل از مرحله ریزغده‌زایی (جدول ۷) در سه ظرف در اندازه‌های ۳۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌لیتری مشخص شد، عامل حجم ظرف

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.9.5.2]

باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری در هر دو صفت مورد مطالعه شده است.

جدول ۷- تجزیه واریانس صفات مرحله ریزغده‌زایی سیب‌زمینی رقم آگریا تحت تاثیر حجم سیستم کشت

منبع تغییرات	df	میانگین مربعات	
		تعداد ریزغده‌ها	وزن ریزغده‌ها (mg)
اثر حجم ظرف کشت	۲	۶۲/۳۰۷**	۳۰/۹۳*
اشتباه آزمایشی	۶	۰/۳۶۲	۵/۴۲
ضریب تغییرات (CV)		۱۱/۵۲	۱۵/۷۱

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی دار، معنی دار در سطح ۱٪ و ۵٪.

مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۸) مشخص کرد با اینکه افزایش حجم ظرف از ۳۰۰ به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر اثر مثبتی بر میانگین وزن ریزغده‌های تولیدی داشته است ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود. اما با افزایش حجم تا ۵۰۰۰ میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری بین میانگین هر دو صفت مورد بررسی ایجاد شد و مشخص شد افزایش حجم از ۱۰۰۰ به ۵۰۰۰ میلی‌لیتر اثر مثبتی بر ریزغده‌زایی درون‌شیشه‌ای داشته است.

جدول ۸- مقایسه میانگین صفات ریزغده‌زایی تحت تأثیر حجم ظرف کشت

تیمارهای مورد آزمایش	تعداد ریزغده به ازای جمعیت اولیه	میانگین وزن ریزغده‌ها (mg)
ظرف کشت ۳۰۰ میلی‌لیتری	۶[b]	۱۴۶/۱۲[b]
بیوراکتور دو پارچه ۱ لیتری	۰/۳۲[c]	۲۰۸/۰۳[ab]
بیوراکتور دو پارچه ۵ لیتری	۹/۳[a]	۳۳۶/۵۸[a]

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.

همچنین مشخص شد با افزایش حجم ظرف از ۳۰۰ به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر نه تنها اثر فزاینده‌ای نداشته بلکه باعث کاهش تعداد ریزغده‌های تولیدی به ازای جمعیت اولیه نسبت به حجم ۳۰۰ میلی‌لیتری شده‌است. دلیل این کاهش در تعداد را به کاهش در میزان حجم مواد غذایی و اتمسفر مورد نیاز برای هر واحد گیاهی می‌توان نسبت داد. با توجه به افزایش فعالیت آنزیم‌ها و هورمون‌ها در هنگام ریزغده‌زایی، گیاهچه نیاز به ساکارز بیشتری دارد. با ذکر این نکته که این ماده غذایی ضروری در محیط کشت ریزغده‌زایی ۸۰ گرم در هر لیتر وجود دارد، میزان ساکارز در دسترس هر گیاهچه موجود در شیشه ۳۰۰ میلی‌گرمی با ۲۰ میلی‌لیتر محیط، حدود ۱/۶ میلی‌گرم خواهد بود. که این میزان براساس جمعیت اولیه در ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط موجود در بیوراکتورهای ۱ لیتری (۰/۸) مقدار قابل ملاحظه‌تری است که کاهش در میزان

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.9.5.2]

ساکارز، تنظیم کننده گیاهی و اتمسفر موجود برای هر گیاهچه می تواند عاملی برای این کاهش باشد (۷). همچنین مشخص شد با افزایش حجم ظرف و میزان محیط غذایی همراه با ثابت ماندن میزان جمعیت اولیه افزایش معنی‌داری در تعداد و وزن ریزغده‌های تولیدی ایجاد می‌شود که دلیلی بر اهمیت عامل حجم در تولید انبوه ریزغده‌های تولیدی است. به طوری که با افزایش حجم از ۱۰۰۰ به ۵۰۰۰ میلی‌لیتر اثر معنی‌داری در صفات مورد مطالعه دیده شد (۱۷). آنها با بررسی عملکرد دو بیوراکتور یک و دو لیتری گزارش نمودند افزایش حجم ظرف اثر مثبتی در افزایش تعداد و وزن ریزغده‌ها داشته است. در این آزمایش با استفاده از بیوراکتور تناوبی ۵ لیتری حاوی ۳ لیتر محیط مایع و با ۵۰ ریزنمونه اولیه در طی ۴ هفته حدود ۴۵۰ ریزغده تولید شد که در واقع در این آزمایش به ازای هر تک گره اولیه ۹ ریزغده تولید شده است که در مقایسه با گزارشات پیشین نتیجه قابل قبولی است. نتایج متفاوتی براساس تعداد ریزغده بدست آمده به ازای تک گره اولیه در جدول ۹ خلاصه شده است.

جدول ۹- مقایسه اثر زمان و تعداد ریزغده‌ها به ازای جمعیت اولیه با استفاده از سیستم‌های مختلف کشت

منابع	نوع سیستم	حجم کلی ظرف کشت (ml)	تعداد ریزغده به ازای تعداد جمعیت اولیه	مدت زمان ریزغده‌زایی (هفته)
آکیتا و تاکایاما (۳)	فرمانتور	۸۰۰۰	۵- ۹/۶	۸
جیمنز و همکاران (۸)	Ebb and Flow	۴۰۰۰	۲/۸-۳/۱	۹
مجیدی و داودی (۱۱)	(TIS)*	۳۰۰۰	۵-۵/۵	۴
عبادی و همکاران (۵)	Air lift	۱۰۰۰	۲	۶
کارپینن و همکاران (۱۰)	L-L system	۲۰۰	۱/۵-۶	۷
مطالعه حاضر	(TIS)	۵۰۰۰	۹	۴

*: Temporary Immersion System

با مقایسه دو حجم مورد بررسی در سیستم تناوبی مشخص شد افزایش حجم ظرف کشت اثر مطلوبی ایجاد می‌نماید. در واقع افزایش مواد غذایی در دسترس موجب کارایی بالاتر سیستم می‌شود و افزایش حجم ظرف این امکان را فراهم می‌آورد. این نتایج راهی برای مطالعات بیشتر در زمینه آزمایش در حجم‌های بالاتر را فراهم نمود. دو نوع سیستم تناوبی مورد مطالعه در این آزمایش هر دو با کاهش انرژی، زمان و نیروی کار مناسب شناخته شدند. با این حال بیوراکتور تناوبی دو پارچه به دلیل آلودگی کمتر در مرحله تکثیر و سهولت تعویض محیط در مرحله ریزغده‌زایی برای ادامه مطالعات مناسب‌تر شناخته شدند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.9.5.2]

تشکر و قدردانی

قدردانی می‌نمایم از زحمات استاد بزرگوارم مرحوم دکتر علی حق‌نظری که همیشه مرهون راهنمایی‌های عالمانه و لطف صبورانه‌اش خواهم بود. این تحقیق قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه زنجان و در چهارچوب طرح مصوب شماره ۸۸۰۰۴-۰۵-۰۵-۲ پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی به انجام رسیده است.

منابع:

1. Akita, M. and Y. Ohata. 1998. A simple method for mass propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a bioreactor without forced aeration, Plant Cell Rep., 18: 284-287.
2. Akita, M. and S. Takayama. 1988. Mass propagation of potato tubers using jar fermentor techniques. Acta Hort., 230: 55-61.
3. Akita, M. and S. Takayama. 1994. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semi-continuous liquid medium surface level control. Plant Cell Rep., 13: 184-187.
4. Cabrera jova, M., R. Gomezkosky, B. Perez, A. Santos Pino, C. Medero Vegna, J. Pez torres, A. Rayas Caberera, M.G. Agarci and J. Lac. 2005. Production of yam microtubers using a temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 83: 103-107
5. Ebadi, M., A. Iranbakhsh and G.H. Bakhshi Khaniki. 2007. Shoot micropropagation and microtunerization in potato (*Solanum tuberosum* L.) by the semi-continuous bioreactor. Pakistan Journal of Biological Sciences. 10(6): 861-867.
6. Hao, Z., F. Ouyang, Y. Geng, X. Deng, Z. Hu and Z. Chen. 1998. Propagation of potato tubers in a nutrient mist bioreactor. Biotechnol Tech., 12: 641-644.
7. Entesari, M. 2011. Improving production of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers by a periodical bioreactor. Thesis of degree of M.Sc. in plant breeding. Zajan University. 94-96.
8. Jimenez, E., N. Pe´rez, M. de Feria, R. Barbo´n, A. Capote, M. Cha´vez, E. Quiala and J. C. Pe´rez. 1999. Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. Plant Cell Tiss Organ Cult., 59: 19-23.
9. Kanwal, A., A. Ali and K. Shoaib. 2006. In vitro microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar kuroda-a new variety in Pakistan. Agri. Boil., 8(3): 337-340.
10. Karppinen, T.K., E. Virtanen, V. M. Rokka, and A. M. Pirttila. 2010. Novel bioreactor technology for mass propagationof potato microtubers. Plant Tiss Organ Cult., 101(2): 245-249.
11. Majidi, E. and D. Davoodi. 2001. Mass production of potato microtubers in a periodical bioreactor. Journal of Agriculture Science of Iran. 5(4): 302-315.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.9.5.2]

12. Mehrota, S.H., M.K. Goal, A.K. Kukreja and B.N. Mishra. 2007. Efficiency of liquid culture system over conventional micropropagation: A progree towards commercialization. Afr. J. Biotechnol. Vol. 6(13): 1484-1492.
13. Piao, X.C., D. Chakrabarty, E.J. Hahn and K.Y. Paek. 2003. A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. Curr Sci., 84: 1129-1132.
14. Sumaryno, I.R., P.D. Kasi and G. Ginting. 2008. Growth and differentiation of embryogenic callus and somatic embryos of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) in temporary immersion system. Indonesian Journal of Agriculture. 1: 109-114.
15. Takayama, SH. and M. Akita. 2008. Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation.Plant Tissue Culture Engineering. 83-100.
16. TariqRafique, M., J. Jaskani, H. Raza and M. Abbas. 2004. In vitro studies on microtuber induction in potato. Int. J. Agri. Boil., Vol. 6(2): 375-377.
17. Teisson, C. and D. Alvard. 1999. In vitro production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. Potato research. 42: 499-504.
18. Wang, P.J. and C.V. Hu. 1982. In vitro mass tuberization and virus free seed potato production in Tiwan. Amer. Pot. J., 59: 33-39.
19. Wattimena, G., B. McCown and G. Weis. 1983. Comparative field performance of potatoes from microculture. Am Potato J. 60: 27-33.
20. Yu, W.C., P.J. Joya, D.C. Cameron and B.H. McCown. 2000. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. Plant Cell Reports. 19: 407-413.
21. Zaree, Z. 2008. Study of physical and chemical Effect on growing of potato microtubers CV. Agria in vitro culture. Ulom tahghighat University. 54-56
22. Ziv, M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. Plant Cell Tissue Organ Cult., 81: 277-285.
23. Ziv, M. 1989. Enhanced shoot and cornlet proliferation in liquid cultured gladiolus buds by growth retardants. Plant Cell Tissue Organ Cult., 17: 101-110

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.9.5.2]

Effect of Alternative Bioreactor on Propagation and Microtuberization Parameters of Potato (*Solanumtuberosum* L.)

M. Entesar[1], D. Davoodi[2], A. Haghnazari[3], S. Bagheri[4], E. Majidi[5] and A.A. Habashi[6]

1 and 3- Former M.Sc. Student and Associate Professor, Zanjan University
2, 4 and 5- Assistant Professor, Professor and Associate Professor, Biotechnology Research Institute of Iran

Abstract

In the present research the effect of culture system, type and size of alternative bioreactor on micpropagation and microtuberization rate of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Agria were investigated. Two kind of stable and alternative systems along with two type of bioreactors in 5 and 1 lit sizes were used. Single node stem segments from *in vitro* potato shoots were inoculated on liquid medium (MS medium) supplemented with 0.5 mgl^{-1} GA_3 and %3 sucrose for propagation and 10 mgl^{-1} BAP with 8% sucrose for microtuberization were applied. A completely randomized design with three replications was used. After 4 and 8 weeks number of nodes, shoot length, fresh and dry weight for determination of micro propagation rate and number and weight of micro tubers were recorded. Results were shown growth and tuberization rate, were depended on system culture. Result illustrated that this system is more benefit than common system and the highest number of nods and tuber were obtained in using alternative system. Also both types of bioreactors were effective for mass propagation for reduction cost, energy and handle work. However, the bipartite bioreactor was more effective than the other one because pollution and medium exchange for induction of micro tuber stage was simple. In current study the results indicated that by increasing capacity of bioreactor the vegetative and tuberization rate were increased and it was directly related to high frequency and time consuming especially in alternative system. In present investigation 450 micro tuber in the alternative bioreactor with 3000 ml culture media and 50 initial explants (9 micro tuber per explants) were obtained.

Keywords: *In vitro* culture, Periodical bioreactor, Potato, Microtuber

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.9.5.2]