اثر تأخیر دهنده‌های رشد گیاهی بر تولید میکروتیوبر سیب‌زمینی در محیط کشت مایع ایستا

یحیی ارباب، متین جامی معینی* و محمد آرمین

ایران، سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۱۸

چکیده

به‌منظور بررسی اثر تأخیر دهنده‌های رشد گیاهی بر تولید میکروتیوبر سیب‌زمینی در محیط کشت مایع ایستا، آزمایشی به روش کشت درون شیشه‌ای و به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار انجام شد. فاکتورهای مورد مطالعه شامل غلظت کلروکولین‌کلراید (CCC) در چهار سطح صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر و غلظت کومارین در پنج سطح صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر بودند. نتایج نشان داد که محیط کشت مایع ایستا با روش مورد استفاده دراین پژوهش را می‌توان با موفقیت برای تولید میکروتیوبر سیب‌زمینی مورد استفاده قرارداد. استفاده از تأخیر دهنده‌های رشد CCC و کومارین، باعث بهبود تولید میکروتیوبر سیب‌زمینی از طریق کاهش زمان لازم تا شروع غده دهی، افزایش تعداد میکروتیوبر در گیاهچه و افزایش وزن و قطر میکروتیوبرهای سیب‌زمینی شد. مصرف ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر CCC و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین، کوتاه‌ترین زمان غده‌زایی و بیشترین تعداد میکروتیوبر در گیاهچه‌های سیب‌زمینی را به خود اختصاص داد. با این وجود، بیشترین متوسط وزن میکروتیوبرهای سیب‌زمینی، در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر CCC و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین مشاهده گردید. بنابراین، استفاده از غلظت‌های ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر CCC و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین جهت کوتاه کردن زمان غده‌زایی و افزایش تعداد میکروتیوبر و استفاده از غلظت‌های ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر CCC و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین جهت تولید میکروتیوبرهایی با میانگین وزنی بیشتر قابل توصیه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کلرو کولین کلرید، کومارین، میکروتیوبر، محیط کشت مایع ایستا.

* نویسنده مسئول تلفن: ۰۵۱۴۱۴۴۲۲۵۳، پست الکترونیکی: mat_jami@iaus.ac.ir

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanom tubeorsum* L.) مهمترین محصول غیرغله‌ای جهان می‌باشد که پس از ذرت، برنج و گندم در رتبه چهارم اهمیت قرار می‌گیرد. مصرف سیب‌زمینی باعث فراهمی ویتامین‌های ضروری، عناصر معدنی، پروتئین‌ها و کربوهیدرات برای بدن انسان می‌شود (۶ و ۷). کشت و کار سیب‌زمینی تقریباً در اکثر کشورهای جهان متداول بوده و متجاوز از ۲۲ میلیون هکتار سطح زیر کشت این محصول با میزان تولیدی بالغ بر ۲۸۷ میلیون تن می‌باشد و با تولید متوسط ۲/۲ تن ماده خشک در هکتار از اقلام مهم محصولات غذایی جهان به شمار می‌رود (۱).

در طول سالیان گذشته، از تکنیک‌های کشت بافت گیاهی در زمینهٔ حذف عوامل بیماری‌زا و تولید غده‌های بذری سالم سیب‌زمینی استفاده شده است (۱۳). میکروتیوبرها غده‌های کوچکی هستند که تحت شرایط درون شیشه‌ای تولید می‌شوند. به‌طور کلی هر گیاهچه قادر به تولید یک میکروتیوبر با وزن ۰/۷-۰/۲ گرم و قطر ۱۰-۳ میلی‌متر می‌باشد. تولید میکروتیوبرها معمولاً در محیط کشت‌های

حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر سیتوکنین‌ها انجام می‌گیرد (۶).

تولید میکروتیوبر، یکی از روش‌های موفق تکثیر سیب‌زمینی در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد. نشان داده‌شده است که میکروتیوبرهای عاری از بیماری تولید شده در شرایط کشت بافت، عملکرد محصول سیب‌زمینی را افزایش می‌دهد. علاوه براین، میکروتیوبرها می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی سیب‌زمینی، نظیر استفاده از روش‌های ایجاد جهش یا جهت انتقال ژن توسط آگروباکتریوم مورد استفاده قرارگیرند (۶ و ۷). میکروتیوبرها می‌توانند در تعداد زیاد و در تمام طول سال در آزمایشگاه تولید و ذخیره‌سازی شوند تا بتوانند بدون انتقال به محیط جدید، مستقیماً به بازار فروش حمل‌ونقل گردند. به‌علاوه میکروتیوبرها را می‌توان مستقیماً در مزرعه بدون یک مرحله سازگاری کشت کرد (۱۲).

تعدادی از مواد تأخیر دهنده رشد گیاهی وجود دارند که برای محدود ساختن رشد گیاه قابل‌دسترس می‌باشند. عمومی‌ترین و قابل استفاده‌ترین گروه از این مواد شامل ترکیباتی هستند که از بیوسنتز جیبرلین جلوگیری می‌کنند. همچنین تعدادی از مواد متفرقه وجود دارند که آن‌ها نیز توسط اعمال دیگری غیر از متوقف ساختن بیوسنتز جیبرلین، توانایی به تأخیر انداختن رشد گیاه را دارا هستند (۴).

تأخیر دهنده‌های رشد، غده سازی گیاهان را تحت شرایط نامناسب محیطی تحریک می‌کنند و به‌طور گسترده‌ای در محیط کشت بافت و به‌منظور تحریک یا تسریع تشکیل غده، استفاده می‌شوند. بین مواد استفاده شده برای القای میکروتیوبرها، کومارین، CCC و سیتوکینین‌ها توجه کافی را به خود اختصاص داده‌اند (۱۵). اعتقاد براین است که سیتوکینین‌ها اثرات تحریک‌کنندگی قوی روی غده سازی و تشکیل بخش اصلی محرک غده سازی، به‌تنهایی و یا در ترکیب با دیگر مواد دارند (۱۰).

ارزیابی تولید میکروتیوبر سیب‌زمینی در دو رقم آلمرا و دیامانت در واکنش به غلظت‌های مختلف تیدیازرون (TDZ)، BAP و ساکارز نشان داد که بیشترین تعداد میکروتیوبر توسط رقم آلمرا و در محیط کشت MS حاوی ۸ درصد ساکارز تحت شرایط تاریکی تولید گردید (۶). در بررسی اثر سطوح مختلف بنزیل آدنین (BA) و کلرو کولین کلرید (CCC) بر تولید میکروتیوبر سیب‌زمینی، کمترین زمان لازم برای شروع غده دهی، در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین مشاهده گردید. تعداد و میانگین وزن میکروتیوبر با افزایش غلظت BA تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت و سپس با افزایش بیشتر غلظت BA، کاهش نشان داد. افزایش غلظت CCC تا ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر، تعداد میکروتیوبر را افزایش، اما متوسط وزن آن را کاهش داد (۱۴). در همین راستا، کنوال و همکاران (۱۰) نشان دادند که محیط کشت MS دارای ۸ درصد ساکارز و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، حداکثر میکروتیوبرزایی، همراه با حداکثر میانگین وزن تازه میکروتیوبر را در دوره کوتاه مایه‌کوبی دارا بود. در محیط MS حاوی ۳ و ۴ درصد ساکارز، غده‌ای تشکیل نشد.

بررسی اثر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر تولید میکروتیوبر در ارقام مختلف سیب‌زمینی نشان داد که رقم ساوالان مؤثرترین رقم جهت تولید میکروتیوبرهای باکیفیت بهتر بود. همچنین مشاهده شد که تیدیازرون در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر، بیشترین تعداد میکروتیوبر و در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، بالاترین وزن و اندازه میکروتیوبر را تولید نمود. به‌علاوه، بیشترین وزن و اندازه میکروتیوبر به ترتیب در سطوح ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین مشاهده شد (۱۱).

باتوجه به این‌که روش متداول تولید میکروتیوبر سیب‌زمینی، استفاده از محیط کشت مایع تعلیقی (استفاده از لرزاننده) می‌باشد، در پژوهش حاضر امکان تولید میکروتیوبر سیب‌زمینی در محیط کشت مایع ایستا (عدم

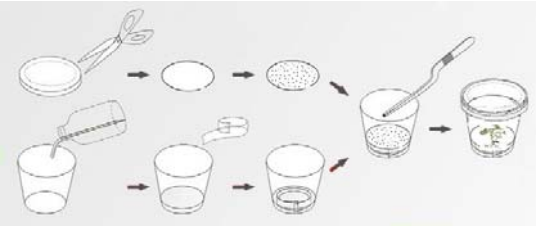
استفاده از لرزاننده) با استفاده از ترکیبات مختلف تأخیر دهنده‌های رشد گیاهی مورد بررسی قرارگرفت.

مواد و روشها

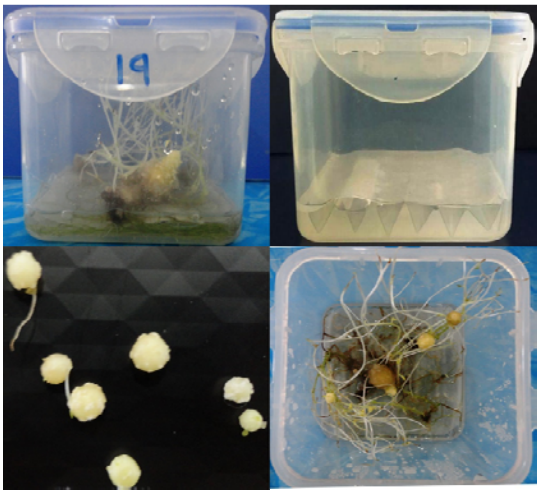
این پژوهش در سال ۱۳۹۰ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار انجام گردید. آزمایش به روش کشت درون شیشه‌ای (*In vitro*) و به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجراء شد. فاکتورهای مورد مطالعه شامل غلظت تأخیر دهنده رشد کلروکولین کلرید (CCC) در چهار سطح صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر و غلظت تأخیر دهنده رشد کومارین در پنج سطح صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر بودند. از سیب‌زمینی رقم مارفونا در این آزمایش استفاده شد.

گیاهچه‌های حاصل از کشت مریستم سیب‌زمینی رقم مارفونا از آزمایشگاه کشت بافت مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تهیه شد. جهت افزایش جمعیت گیاهچه‌ها، اقدام به ریز ازدیادی با استفاده از روش کاشت قلمه‌های تک گره در محیط کشت جامد گردید. محیط کشت مورد استفاده، محیط پایه MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و فاقد هرگونه تنظیم‌کننده رشد بود. پس از گذشت یک ماه در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعته با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس، گیاهچه‌ها به رشد کافی رسیده و جهت اجرای مرحله اصلی آزمایش مورد استفاده قرارگرفتند.

در این مرحله، ابتدا محیط کشت مایع MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز تهیه شد. سپس یک عدد کاغذ صافی که در آن سوراخ‌های متعدد و ریز ایجاد شده بود، در فاصله ۱/۵ سانتی‌متری کف ظروف کشت تعبیه شده و تثبیت گردید. محیط کشت مایع MS به ظروف کشت (تا سطح زیرین کاغذ صافی) منتقل شده و پس از بستن درب، ظروف کشت حاوی محیط کشت مایع اتوکلاو شدند. سپس سه عدد قلمه تک گره حاصل از گیاهچه‌های ریز ازدیادی شده رقم مارفونا، تحت شرایط کاملاً استریل به ظروف کشت حاوی محیط کشت مایع MS منتقل گردید (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱- مراحل انجام آزمایش



شکل ۲- تولید میکروتیوبر در محیط کشت مایع ایستا

پس از کشت کلیه تیمارها، نمونه‌ها به اتاق رشد با شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس با فتوپریود ۱۶ ساعته منتقل گردیدند. پس از سه هفته که گیاهچه‌های سیب‌زمینی به شرایط رشدی مناسب رسیدند، اقدام به تهیه محیط کشت مایع MS حاوی غلظت‌های مختلف تأخیر دهنده‌های رشد کلرو کولین کلرید و کومارین گردید. محیط کشت‌های تهیه شده فاقد هرگونه تنظیم‌کننده رشد بوده و میزان ساکارز در کلیه تیمارها ثابت و برابر با ۸۰ گرم در لیتر بود. محیط‌های کشت مایع پس از تهیه، اتوکلاو شدند. پس از استریل شدن و خنک شدن محیط‌های کشت، تحت شرایط کاملاً استریل، درب ظروف کشت حاوی گیاهچه‌های سیب‌زمینی با دقت باز شده،

محیط کشت مایع درون ظروف، تخلیه شده و اقدام به جایگزینی محیط‌های کشت جدید (محیط‌های غده‌زایی) گردید. پس از آماده‌سازی کلیه تیمارها، ظروف کشت حاوی گیاهچه‌های سیب‌زمینی جهت غده‌زایی به شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

در طی دوره القاء میکروتیوبر، به‌صورت روزانه از نمونه‌ها بازدید به عمل آمده و زمان القاء میکروتیوبر در تیمارهای مختلف یادداشت گردید. پس از گذشت دو ماه، کلیه تیمارها در رابطه با تولید میکروتیوبر مورد بررسی قرارگرفته و خصوصیاتی نظیر تعداد میکروتیوبر در گیاهچه، میانگین قطر و وزن میکروتیوبرها تعیین شد (شکل ۲).

پس از جمع‌آوری کلیه داده‌ها، تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام شد و مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن و در سطح آماری ۵ درصد صورت گرفت. جداول و نمودارها با استفاده از برنامه‌های Word و Excel ترسیم گردیدند.

نتایج

تعداد روز تا شروع غده دهی: باتوجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های آزمایش، اثر غلظت کلرو کولین کلراید (CCC) و کومارین بر تعداد روز تا شروع غده دهی معنی‌دار شد (جدول ۱). مصرف CCC باعث کاهش زمان لازم تا شروع غده دهی در گیاهچه‌های سیب‌زمینی شد. کمترین زمان تا شروع غده دهی (۱۴/۲ روز)، در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر CCC و بیشترین آن (۱۸/۸ روز) در تیمار شاهد (عدم مصرف CCC) مشاهده گردید. تفاوت بین غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر CCC معنی‌دار نبود. مصرف ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر CCC تأثیر معنی‌داری بر کاهش تعداد روز تا شروع غده دهی در مقایسه با تیمار شاهد نداشت (جدول ۲).

اضافه کردن کومارین به محیط کشت، باعث کاهش زمان غده‌زایی سیب‌زمینی شد. غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین، کمترین زمان تا شروع غده دهی (۸/۵ روز) و تیمار شاهد (عدم مصرف کومارین) بیشترین زمان تا شروع غده دهی (۲۳ روز) را به خود اختصاص داد. بین تیمارهای عدم مصرف و غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین، در رابطه با تعداد روز تا شروع غده دهی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳).

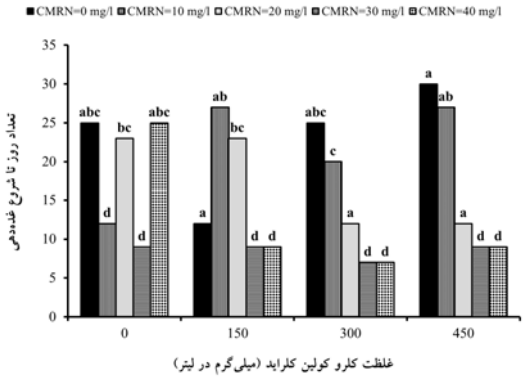
جدول ۱- تجزیه واریانس ویژگی‌های تولید میکروتیوبر سیب‌زمینی

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		روز تا شروع غده دهی	تعداد میکروتیوبر در گیاهچه	وزن میکروتیوبر	قطر میکروتیوبر
غلظت CCC	۳	۵۸/۰۰**	۱۴/۹۵**	۴۶۷۴۰/۳۲**	۱۱/۴۶**
غلظت کومارین	۴	۴۴۴/۶۱**	۱۵/۳۷**	۱۹۳۷/۱۹**	۱۰/۸۳**
غلظت CCC × غلظت کومارین	۱۲	۱۵۲/۰۱**	۶/۵۷**	۳۷۱۳/۶۴**	۳/۵۸**
خطای آزمایشی	۴۰	۷/۴۰	۰/۹۰	۷۶/۱۳	۱/۳۲
ضریب تغییرات (٪)		۱۶/۳۹	۲۲/۳۲	۷/۵۴	۱۹/۹۳

بدون علامت، غیر معنی‌دار. *، ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

اثر متقابل غلظت CCC و کومارین، تعداد روز تا شروع غده دهی را تحت تأثیر قرارداد (جدول ۱). کوتاه‌ترین زمان تا شروع غده دهی (۷ روز)، در محیط کشت حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر CCC و ۳۰ یا ۴۰ میلی‌گرم در لیتر

کومارین ثبت گردید که البته اختلاف آن با غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین در محیط کشت‌های دارای ۱۵۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر CCC معنی‌دار نبود. طولانی‌ترین زمان تا شروع غده‌زایی (۳۰ روز) نیز در شرایط مصرف ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر CCC و عدم مصرف کومارین به دست آمد (شکل ۴و ۳). در غلظت‌های صفر و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر CCC نیز عدم مصرف کومارین، باعث طولانی شدن زمان غده‌زایی گیاهچه‌های سیب‌زمینی گردید. این در حالی است که در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر CCC، مصرف ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین بیشترین زمان برای غده‌زایی (۲۷ روز) را به خود اختصاص داد (شکل ۳).

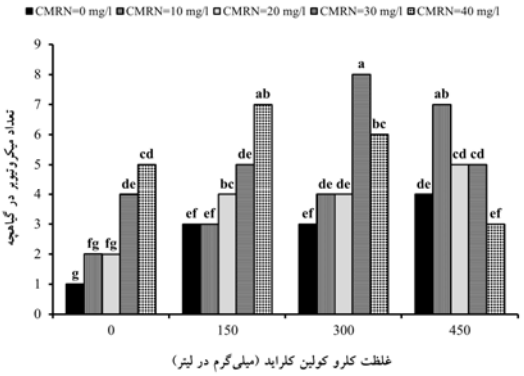


شکل ۳- اثر متقابل غلظت کلرو کولین کلراید و کومارین بر تعداد روز تا شروع غده دهی

تعداد میکروتیوبر در گیاهچه: اثر غلظت CCC بر تعداد میکروتیوبر در گیاهچه سیب‌زمینی معنی‌دار شد (جدول ۱). کاربرد CCC در محیط کشت، باعث افزایش فراوان تعداد میکروتیوبر در گیاهچه‌های سیب‌زمینی شد. بیشترین تعداد میکروتیوبر در گیاهچه (۵ میکروتیوبر در گیاهچه) به تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر CCC اختصاص یافت که از افزایش ۷۸/۵۷ درصدی نسبت به شاهد (۲/۸ میکروتیوبر در گیاهچه) برخوردار بود. تفاوت بین سطوح ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر CCC از نظر آماری معنی‌دار نشد (جدول ۲).

غلظت کومارین تأثیر معنی‌داری بر تعداد میکروتیوبر در گیاهچه داشت (جدول ۱). استفاده از غلظت‌های مختلف کومارین، باعث افزایش معنی‌دار تعداد میکروتیوبر در گیاهچه سیب‌زمینی در مقایسه با تیمار شاهد (عدم مصرف کومارین) شد. با افزایش غلظت کومارین تا ۳۰ میلی‌گرم در لیتر، تعداد میکروتیوبر در گیاهچه نیز افزایش یافت. به‌طوری که بیشترین تعداد میکروتیوبر در گیاهچه (۵/۵) در غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین و کمترین تعداد آن (۲/۷۵) در تیمار عدم مصرف کومارین مشاهده گردید. از نظر آماری بین غلظت‌های۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳).

اثر متقابل غلظت CCC و کومارین بر تعداد میکروتیوبر در گیاهچه معنی‌دار شد (جدول ۱). در هنگام استفاده از غلظت‌های۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر CCC، به ترتیب مصرف ۴۰، ۳۰ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین، بیشترین تعداد میکروتیوبر در گیاهچه را تولید کرد. تحت شرایط عدم مصرف CCC نیز غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین بیشترین تعداد میکروتیوبر در گیاهچه را دارا بود. کمترین تعداد میکروتیوبر در گیاهچه (۱ عدد) در تیمار عدم مصرف CCC و کومارین بدست آمد (شکل ۴).



شکل ۴- اثر متقابل غلظت کلرو کولین کلراید و کومارین بر تعداد میکروتیوبر در گیاهچه

جدول ۲- اثر غلظت کلرو کولین کلراید بر تولید میکروتیوبر سیب‌زمینی

کلرو کولین کلراید (میلی‌گرم در لیتر)	میانگین			
	روز تا شروع غده دهی	تعداد میکروتیوبر در گیاهچه	متوسط وزن میکروتیوبر (میلی‌گرم)	متوسط قطر میکروتیوبر (میلی‌متر)
۰	۱۸/۸ a	۲/۸ b	۴۶/۴۸ d	۵/۷۷ b
۱۵۰	۱۶/۰ bc	۴/۴ a	۱۷۰/۷ a	۷/۶۰ a
۳۰۰	۱۴/۲ c	۵/۰ a	۱۴۹/۴ b	۷/۴۱ a
۴۵۰	۱۷/۴ ab	۴/۸ a	۹۵/۸ c	۶/۳۳ b

میانگین‌های دارای حروف مشابه، مطابق آزمون چند دامنه‌ای دانکن دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد نمی‌باشند.

متوسط وزن میکروتیوبر: باتوجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های آزمایش، غلظت CCC تأثیر معنی‌داری بر متوسط وزن میکروتیوبر داشت (جدول ۱). استفاده از تأخیر دهنده رشد CCC، صرف‌نظر از غلظت آن، باعث افزایش متوسط وزن میکروتیوبر سیب‌زمینی در مقایسه با تیمار شاهد شد. بالاترین متوسط وزن میکروتیوبر (۱۷۰/۷ میلی‌گرم) در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر CCC بدست آمد که از افزایش ۲۶۷/۲۵ درصدی نسبت به تیمار شاهد (۴۶/۴۸ میلی‌گرم) برخوردار بود. افزایش غلظت CCC به ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش وزن میکروتیوبرهای تولیدی شد (جدول ۲).

اثر غلظت کومارین بر متوسط وزن میکروتیوبر معنی‌دار شد (جدول ۱). غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین، باعث افزایش قابل‌ملاحظه متوسط وزن میکروتیوبر در مقایسه با تیمار شاهد (عدم مصرف کومارین) شد. بیشترین متوسط وزن میکروتیوبر (۱۳۲/۵ میلی‌گرم) در تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین مشاهده گردید و افزایش غلظت کومارین به ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش وزن میکروتیوبرهای سیب‌زمینی شد. تیمار ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین، کمترین متوسط وزن میکروتیوبر (۱۰۱/۱۲۵ میلی‌گرم) را دارا بود، با این وجود، تفاوت آن با تیمار شاهد معنی‌دار نشد (جدول ۳).

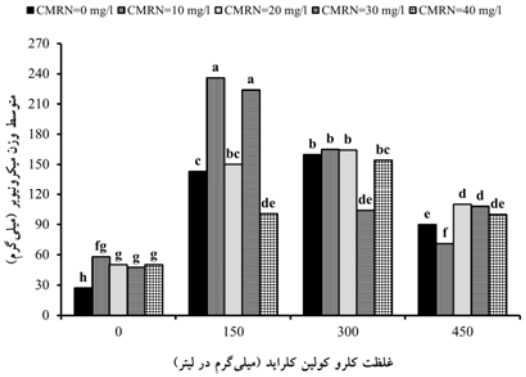
جدول ۳ – اثر غلظت کومارین بر تولید میکروتیوبر سیب‌زمینی

کومارین (میلی‌گرم در لیتر)	میانگین			
	روز تا شروع غده دهی	تعداد میکروتیوبر در گیاهچه	متوسط وزن میکروتیوبر (گرم)	متوسط قطر میکروتیوبر (میلی متر)
۰	۲۳/۰ a	۲/۷۵ c	۱۰۴/۹۲ c	۵/۹۳ b
۱۰	۲۱/۵ a	۴/۰۰ b	۱۳۲/۵۰ a	۶/۲۴ b
۲۰	۱۷/۵ b	۳/۷۵ b	۱۱۸/۵۸ b	۷/۷۹ a
۳۰	۸/۵ d	۵/۵۰ a	۱۲۰/۸۵ b	۷/۸۳ a
۴۰	۱۲/۵ c	۵/۲۵ a	۱۰۱/۱۲ c	۶/۱۰ b

میانگین‌های دارای حروف مشابه، مطابق آزمون چند دامنه‌ای دانکن دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد نمی‌باشند.

اثر متقابل غلظت CCC و کومارین بر متوسط وزن میکروتیوبر معنی‌دار بود (جدول ۱). بالاترین وزن میکروتیوبر (۲۶۳ میلی‌گرم) در شرایط استفاده هم‌زمان از غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر CCC و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین بدست آمد که اختلاف معنی‌دار با تیمار غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر CCC و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین نشان نداد. کمترین وزن میکروتیوبر (۲۷ میلی‌گرم) در تیمار فاقد بازدارنده‌های رشد CCC و کومارین مشاهده شد (شکل ۵).

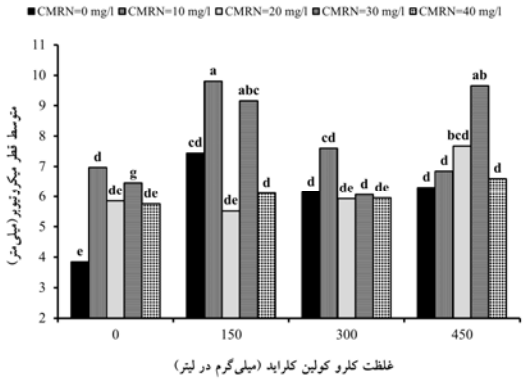
متوسط قطر میکروتیوبر: نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که اثر غلظت CCC بر متوسط قطر میکروتیوبر معنی‌دار بود (جدول ۱). استفاده از غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر CCC باعث افزایش معنی‌دار متوسط قطر میکروتیوبر در مقایسه با تیمار شاهد (عدم مصرف CCC) شد. بیشترین قطر میکروتیوبر (۷/۶۰ میلی‌متر) در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر CCC مشاهده گردید که نسبت به تیمار شاهد ۳۱/۷۱ درصد افزایش نشان داد. بین غلظت‌های صفر و ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر CCC تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲).



شکل ۵- اثر متقابل غلظت کلرو کولین کلراید و کومارین بر متوسط وزن میکروتیوبر

غلظت کومارین تأثیر فراوانی بر متوسط قطر میکروتیوبر داشت (جدول ۱). بیشترین قطر میکروتیوبر (۷/۸۲ میلی‌متر) با مصرف ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین و کمترین آن (۵/۹۳ میلی‌متر) در تیمار عدم استفاده از کومارین بدست آمد. تفاوت بین غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین در رابطه با متوسط قطر میکروتیوبر معنی‌دار نبود. همچنین بین غلظت‌های صفر، ۱۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳).

اثر متقابل غلظت CCC و کومارین، متوسط قطر میکروتیوبر را تحت تأثیر قرارداد (جدول ۱). در غلظت‌های صفر، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر CCC، بیشترین متوسط قطر میکروتیوبر با مصرف ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین بدست آمد، در حالی که در غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر CCC، مصرف ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین حداکثر قطر میکروتیوبر را تولید نمود. کمترین متوسط قطر میکروتیوبر (۳/۸۴ میلی‌متر) مربوط به تیمار عدم استفاده از CCC و کومارین بود (شکل ۶).



شکل ۶- اثر متقابل غلظت کلرو کولین کلراید و کومارین بر متوسط قطر میکروتیوبر

بحث

باتوجه به حساسیت سیب‌زمینی به ویروس، تولید گیاهان عاری از ویروس از طریق کشت درون شیشه‌ای و تکثیر آنها، منجر به کاهش هزینه‌ها و افزایش عملکرد می‌گردد. میکروتیوبر سیب‌زمینی به غده‌هایی اطلاق می‌شود که در شرایط درون‌شیشه‌ای تولید شده، وزن آن‌ها بین ۲ تا ۲۰۰ میلی‌گرم بوده و دارای ۲ یا تعداد بیشتری جوانه می‌باشند (۲).

مواد رشد گیاهی دارای اثر تسریع‌کنندگی یا بازدارندگی بر غده‌زایی بوده یا اینکه دارای هیچ‌گونه تأثیری بر غده‌زایی نمی‌باشند و تاکنون نقش واضح هریک از این مواد در غده‌زایی مبهم مانده است. اثر مواد رشد گیاهی احتمالاً ناشی از اثر متقابل مواد رشد گیاهی شناخته‌شده و ناشناخته می‌باشد. این احتمال وجود دارد که تنها یک ماده رشد گیاهی شناخته شده وجود داشته باشد، اما در حال حاضر هیچ‌گونه دلیل محکمی برای اثبات وجود این ماده در دسترس نمی‌باشد (۴).

به‌خوبی مشخص شده است که جیبرلین توانایی تحریک رشد و نمو گیاه را دارا می‌باشد (۳). گزارش شده است که میزان بالای جیبرلین موجود در گیاه سیب‌زمینی از غده‌زایی جلوگیری می‌کند. ازاین‌رو مواد کند کننده رشد نظیر CCC باعث تسریع در فرآیند غده‌زایی می‌شوند که این احتمالاً به علت کاستن از سطوح درون‌زای جیبرلین می‌باشد. جلوگیری از چرخه‌ای شدن گرانیل-گرانیل پیروفسفات به کوپالیل پیروفسفات، اولین تغییر عمل ترکیبات آنیومی تأخیر دهنده رشد گیاهی می‌باشد که منجر به جلوگیری از تشکیل جیبرلین می‌شود (۴).

مشابه با نتایج پژوهش حاضر، زکریا و همکاران (۱۴) نشان دادند که کاربرد CCC مدت‌زمان لازم برای القاء میکروتیوبر در گیاهچه‌های سیب‌زمینی را کاهش داد. آنها کمترین زمان لازم جهت آغاز غده زایی را در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر CCC گزارش نمودند. حسین و همکاران (۹) اثر کلرو کولین کلراید (CCC)، ساکارز و BAP بر غده‌زایی درون‌شیشه‌ای سیب‌زمینی را مورد مطالعه قراردادند. بیشترین القاء غده در محیط کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر CCC یا ۹۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد. محیط کشت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP با تولید ۹ غده در هر ظرف کشت، رتبه دوم را دارا بود.

در پژوهش حاضر، کوتاه‌تر بودن زمان شروع غده‌زایی و درنتیجه افزایش دوره رشد میکروتیوبر را می‌توان ازجمله دلایل بالاتر بودن متوسط وزن میکروتیوبرهای تولیدی در غلظت‌های پایین مصرف CCC ذکر نمود.

بازدارنده‌های رشد، غده‌سازی گیاهان را تحت شرایط نامناسب محیطی تحریک می‌کنند و به‌طور گسترده‌ای در محیط کشت بافت و به‌منظور تحریک یا تسریع تشکیل غده، استفاده می‌شوند. بین مواد استفاده‌شده برای القای میکروتیوبرها، کومارین، CCC و سیتوکینین‌ها توجه کافی را به خود اختصاص داده‌اند (۱۴).

کومارین یکی از ترکیبات فنولیک است که اثرات فیزیولوژیکی متعددی بر سلول‌های گیاهی دارد. در درجه اول، کومارین به‌عنوان یک ترکیب کند کننده رشد گیاهی مطرح می‌باشد. علاوه براین، کومارین تأثیر زیادی بر غده‌زایی قطعات ساقه سیب‌زمینی در شرایط درون‌شیشه‌ای دارد (۸). نتایج تحقیق الساوی و همکاران (۸) نشان داد که غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین بیشترین تأثیر را بر غده‌زایی سیب‌زمینی دارا بود.

در بررسی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی پاکلوبوترازول، اتفون، تیدیازرون و کومارین بر تولید میکروتیوبر ارقام مختلف سیب‌زمینی، نتایج نشان داد که ارقام ساوالان و سانته تعداد میکروتیوبر بیشتری در مقایسه با دیگر ارقام تولید نمودند. غلظت‌های بالای کومارین، تیدیازرون و اتفون باعث کوتاه‌تر شدن طول گیاهچه، طول میانگره و کم شدن تعداد برگ در مقایسه با شاهد گردید (۵). گزارش شده است که کومارین‌ها، غده‌زایی را در گیاهان سیب‌زمینی کاشته شده در محیط کشت درون‌شیشه‌ای تحریک کرده‌اند. روش عمل غده‌زایی تحریک شده توسط کومارین، از عمل مشابه توسط سیتوکنین متفاوت می‌باشد. زیرا سطوح بالایی از نیتروژن مانع غده‌زایی توسط کومارین شده، اما این مکانیسم در مورد غده‌زایی تحریک شده توسط سیتوکنین صورت نمی‌گیرد. علاوه براین، آلار، اترل، آمینوسیکلوپروپان کربوکسیلیک اسید (ACC) و ایندول ۳ استیک اسید (IAA)، غده‌زایی تحریک شده با کومارین را تسریع نموده، در حالی که آبسیزیک اسید و جیبرلین از آن جلوگیری به عمل می‌آورند (۴).

کیان‌مهر و همکاران (۱۱) در بررسی غده‌زایی چهار رقم سیب‌زمینی در شرایط درون‌شیشه‌ای نشان دادند که بیشترین وزن و اندازه غده به ترتیب در سطوح ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین مشاهده شد.

برخلاف نتایج پژوهش حاضر، زکریا و همکاران (۱۵) گزارش کردند که کمترین متوسط وزن میکروتیوبر در

شرایط استفاده از تأخیر دهنده رشد کومارین بدست آمد و محیط کشت MS حاوی ۴۰ میلی‌اکی‌والان پتاسیم، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BA و ۹ درصد ساکارز بیشترین متوسط وزن میکروتیوبر را به خود اختصاص داد.

نتیجه‌گیری

تولید میکروتیوبر سیب‌زمینی در محیط کشت مایع ایستا در واکنش به مصرف کلروکولین‌کلرید و کومارین نشان داد که محیط کشت مایع ایستا با روش مورد استفاده در این پژوهش را می‌توان با موفقیت برای تولید میکروتیوبر سیب‌زمینی مورد استفاده قرارداد. باتوجه به نتایج، استفاده از غلظت‌های ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر CCC و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین جهت کوتاه کردن زمان غده‌زایی و افزایش تعداد میکروتیوبر و استفاده از غلظت‌های ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر CCC و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کومارین جهت تولید میکروتیوبرهایی با میانگین وزنی بیشتر قابل توصیه می‌باشد.

منابع

۱- افکاری، الف.، ۱۳۸۸. زراعت گیاهان صنعتی، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کلیبر، ۳۰۴ صفحه.

۲- خرسندی، ص.، ۱۳۹۵. اثر غلظتهای مختلف کینتین و پوتریسین بر ریزغده‌زایی سیب‌زمینی (رقم آگریا)، ۲۹(۲)، صفحات ۳۷۶-۳۶۹.

۳- عباسپور، ح.، و رضایی، ح.، ۱۳۹۳. اثر جیبرلیک اسید بر سرعت واکنش هیل، رنگیزه‌های فتوسنتزی و ترکیبات فنلی در گیاه دارویی بادرشبو در شرایط تنش خشکی، مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۷(۵)، صفحات ۹۰۳-۸۹۳.

۴- فتحی، ق.، و اسماعیل‌پور، ب.، ۱۳۸۹. مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی، اصول و کاربرد، تألیف آر. ان. ارتکا، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۲۸۸ صفحه.

۵- کیان‌مهر، ب.، ۱۳۹۰. بررسی تأثیر برخی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر تولید گیاهچه، میکروتیوبر و مینی تیوبر در ارقام مختلف سیب‌زمینی، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد. صفحه ۷.

6- Abd Elaleem, K. H. G., Modawi, R. S., and Khalafalla, M. M., 2015. Microtuber induction of two potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties namely, Almera and Diamant. International Research Journal of Biological Sciences, 4(3), PP: 84-89.

7- Bado, S., Laimer, M., Gueye, N., Deme, N. F., Sapey, E., Ghanim, A. M. A., Blok, V. C., and Forster, B. P., 2016. Micro-tuber production in diploid and tetraploid potato after gamma irradiation of *in vitro* cuttings for mutation induction. American Journal of Plant Sciences, 7, PP: 1871-1887.

8- EL-Sawy, A. E., Bekheet, S., and Ibrahimaly, U., 2007. Morphological and molecular characterization of potato microtubers production on coumarin inducing medium. International Journal of Agriculture and Biology, 9(5), PP: 675–680.

9- Hussain, I., Chaudhry, Z., Muhammad, A., Asghar, R., Saqlan Naqvi, S. M., and Rashid, H., 2006. Effect of chlorocholine chloride, sucrose and BAP on *in vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L. cv.cardinal). Pak. J. Bot., 38(2), PP: 275-282.

10- Kanwal, A., Ali, A., and Shoaib, K., 2006. *In vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum*L.) cultivar kuroda- A new variety in *Pakistan*.Int J Agri, 8(3), PP: 337-340.

11- Kianmehr, B., Parsa, M., Otroshy, M., Nassiri Mohallati, M., and Moradi, K., 2012. Effect of pland growth regulators during *in vitro* phase of potato microtuber production. Journal of Agricultural Technology, 8(5), PP: 1745-1759.

12- Tan Nhut, D., Nguyen, N. H., and Thi Thu Thuy, D., 2006. A novel in vitro hydroponic culture system for potato (*Solanum tuberosum* L.) microtuber production. Scientia Horticulturae, 110, PP: 230-234.

13- Yu, W. C., Joyce, P. J., Cameron, D. C., and McCown, B. H., 2000. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. Plant Cell Reports, 19, PP: 407-413.

14- Zakaria, M., Hossain, M. M., Khaleque Main, M. A., Hossain, T., and Uddin, M. Z., 2008. In vitro tuberization of potato influenced by benzyl

adenine and chloro choline chloride. Bangladesh J. Agril. Res, 33, PP: 419-425.

15- Zakaria, M., Hossain, M. M., Khaleque Mian, M. A., and Hossain, T., 2014. Performance of different protocols on in vitro tuberization in potato (*Solanum tuberosum*). Bangladesh Journal of Agricultural Research, 39(1), PP: 59-66.

The effect of plant growth retardants on potato microtuber production under stagnant liquid medium

Arbab Y., Jami Moeini M. and Armin M.

Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, I.R. of Iran

Abstract

In order to study the effect of plant growth retardants on potato microtuber production under stagnant liquid medium, a factorial experiment in a completely randomized design with three replications was carried out in biotechnology laboratory of agricultural faculty, Islamic Azad University, Sabzevar Branch. Experimental factors include four concentrations of chloro choline chloride (0, 150, 300 and 450 mg l^{-1}) and five concentrations of coumarin (0, 10, 20, 30 and 40 mg l^{-1}). Results showed that stagnant liquid culture method used in this research can be successfully used for the production of potato microtuber. Use of chloro choline chloride (CCC) and coumarin, improved potato microtuber production by reduction the time required to start microtuberization, increasing the number of microtuber per plantlet and increase the weight and diameter of microtuber. The shortest time to microtuberization and the maximum microtuber number per plantlets were obtained by application of 300 mg l^{-1} CCC and 30 mg l^{-1} coumarin. However, the highest average microtuber weight was observed at media containing 150 mg l^{-1} CCC and 10 mg l^{-1} coumarin. Therefore, application of 300 mg l^{-1} CCC and 30 mg l^{-1} coumarin for shortened the microtuberization time and application of 150 mg l^{-1} CCC and 10 mg l^{-1} coumarin for production of microtubers with more average weight can be recommended.

Key words: Chloro Choline Chloride, Coumarin, Microtuber, Stagnant Liquid Medium