بررسی و مقایسه پرآوری دو رقم زردآلو از طریق سیستم کشت بیوراکتور تناوبی و سیستم کشت رایج

آسیه زارع خفری[*1]، رضا ضرغامی[*2]، رحیم قره شیخ بیات[3]، لیلا فهمیده[4]، مهدی نیک راد[5]

[*1] دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی در کشاورزی دانشگاه زابل

[*2]دانشیار بخش کشت بافت و سلول، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج وزارت جهاد کشاورزی، کرج، ایران

[3]استادیار پژوهشکده میوه های معتدله و سردسیری سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج وزارت جهاد کشاورزی، کرج، ایران

[4]دانشیار بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه زابل

[5] دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم باغبانی –بیوتکنولوژی

[*]نویسنده مسئول: Asyehzare@gmail.com، Rezazarghami2001@yahoo.com

چکیده

ریز ازدیادی از طریق کشت بافت برای تولید دو رقم زرد آلو (قیصی و اردوباد) حایز اهمیت می‌باشد. امروزه کاربرد بیوراکتورهای گیاهی در تکثیر انبوه گیاهان می‌تواند هزینه تولید را کاهش داده و آن را توجیه اقتصادی نماید. بر این اساس، هدف از اجرای این تحقیق بررسی امکان استفاده از بیوراکتور نیمه پیوسته در ریزازدیادی دو رقم زردآلو و بهینه سازی شرایط کشت می‌باشد. در این تحقیق، از بیوراکتور تناوبی و محیط کشت جامد رایج استفاده گردید. در این پژوهش مقایسه دو محیط کشت جامد و مایع (بیوراکتور) جهت پرآوری دو رقم زردآلو صورت گرفت. محیط کشت مورد استفاده QL بود که حاوی یک میلی گرم در لیتر GA3، 5/0 میلی گرم BAP و ۰/۰۱ میلی گرم IBA در لیتر می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در سیستم بیوراکتور در رقم اردوباد میانگین تعداد شاخه و طول بزرگترین شاخه به ترتیب۱۱/۳۳ و ۰۸/ ۴سانتی‌متر در مقایسه با محیط کشت جامد که میانگین تعداد و طول بزرگترین شاخه اردوباد به ترتیب ۱/۶ و ۳ سانتی‌متر بود و در رقم قیصی در کشت بیوراکتور میانگین تعداد شاخه و طول بزرگترین شاخه به ترتیب ۱۷/۶۶ و ۵ سانتی‌متر و در کشت رایج میانگین تعداد و طول بزرگترین شاخه قیصی به ترتیب ۱۲/۸ و ۲/۸ سانتی‌متر بود، که نتایج بیانگر آن می‌باشد اختلاف معنی داری بین کشت بیوراکتور و کشت رایج در هر دو رقم وجود دارد.

کلمات کلیدی: اردوباد، بیوراکتور نیمه پیوسته، قیصی، ریزازدیادی.

مقدمه

زردآلو با نام علمی (*Prunus armeniaca L.*) یکی از محصولات مهم باغبانی کشور بوده و سالانه حجم زیادی از این محصول تولید می‌شود و ایران با سطح زیر کشت ۵۹ هزار هکتار و تولید۴۳۲ هزار تن دومین تولید کننده این محصول در دنیا می‌باشد (FAO ,۲۰۱۷). فن‌آوری کشت بافت برای تکثیر انبوه در کاربردهای صنعتی به خوبی مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌است. ریزازدیادی تجارتی گیاهان به منظور عاری نمودن آنها از عوامل بیماری‌زا، تولید پایدار در طول سال، کیفیت بالا، تولید گیاهان یکسان ژنتیکی و سایر خصوصیات زراعی و باغبانی مطلوب انجام شده است. کاربرد این روش در بسیاری از گیاهان مهم اقتصادی امکان پذیر است. بعنوان مثال می توان به تولید سریع و انبوه سیب زمینی، توت فرنگی، موز، نخل روغنی، خرما، مارچوبه و نیشکر از گیاهان زراعی و باغی، اوکالیپتوس و سپیدار از درختان جنگلی، دیفن باخیا، دراسنا، انجیر زینتی(فیکوس)، ارکیده، فیلودندرون، داودی، شمعدانی، رز، میخک، کوکب، ژربرا و سینگونیوم از گلها و گیاهان زینتی در سطح دنیا اشاره کرد که منجر به معرفی پروتکل و تولید انبوه شده است. این

IrHC2019

روش علاوه برتکثیر سریع و تولید گیاهان عاری از عوامل بیماریزا، در اکثر گیاهان چند ساله باعث کاهش دوره نونهالی و زود بازدهی آنها می‌شود بعلاوه برای تکثیر آنها به فضای بسیار کمتری نیاز می‌باشد. در کشت بافت یکی از عوامل مهمی که در تکثیر و شاخه‌زایی نقش بسیار مهمی را دارد نوع محیط کشت می‌باشد. محیط‌های کشت مورد استفاده را به دوگروه محیط‌های مایع (استفاده از بیو راکتور) و محیط‌های جامد تقسیم نمود. کشت در بیوراکتور یکی از روش-هایی است که بیشترین شانس را برای گسترش دارد بطوریکه گزارش‌های مختلفی در مورد گسترش استفاده از آن برای ازدیاد گیاهان باغی و دارویی در سطح وسیع وجود دارد (Paek *et al*., 2005). استفاده از بیوراکتور منجر به توسعه تکنولوژی مناسب برای گسترش تکثیر گیاهان در سطح وسیع گردید. همانند گسترش وسیع ریزازدیادی، از بیوراکتور برای تکثیر و تولید بیوماس گونه‌های گیاهی مختلفی استفاده شده است. فرآیند خودکار نمودن کشت بافت به استفاده از کشت مایع در بیورآکتورها بستگی دارد (Sakamoto *et al*., 1995). همانگونه که بیورآکتور با محیط کشت مایع، برای جلوگیری از دخالت دست و تکثیر سریع و کارای بسیاری از گونه‌های گیاهی مهم طراحی شده است، می‌تواند روشی برای تولید گیاهان در مقیاس صنعتی باشد (Mehrotra *et al*., 2007). از مزایای استفاده از محیط کشت مایع در بیوراکتور برای ریزازدیادی می‌توان به این موارد اشاره نمود: موجب کاهش هزینه‌ها و افزایش خودکار نمودن پروسه می شود (Mehrotra *et al*., 2007). محیط کشت بسیار یکنواخت‌تری را فراهم نموده است. محیط کشت را می توان به آسانی تعویض نمود بدون اینکه نیازی به عوض نمودن ظرف‌ها باشد، می توان از اولترافیلتراسیون برای استریل نمودن استفاده کرد، تمیز نمودن ظرف‌ها پس از پایان دوره کشت بسیار آسان تر است، از ظرف‌های بیشتر و حجم بیشتر هر ظرف می توان استفاده نمود در صورتی که محیط کشت دارای آگار نیاز به سطح صاف دارد، زمان انتقال کاهش می-یابد، بافت‌ها در محیط مایع رشد بهتری نسبت به محیط کشت دارای آگار دارند، امکان برداشت منظم یا کلی ساقه‌ها برای سازگاری وجود دارد، معمولا نرخ رشد و نرخ ازدیاد در محیط مایع بیشتر از محیط جامد است (Paek *et al*., 2005)، تماس نزدیک بافت گیاه با محیط کشت، جذب مواد غذایی و هورمون های گیاهی را تحریک و آسان می‌نماید (Sandal, *et al*., 2001)، عدم ظهور یا بیان کمتر فعالیت غالبیت انتهایی به دلیل تکان خوردن بافت گیاهی در محیط کشت منجر به القا تولید جوانه های جانبی زیادی در این محیط می‌گردد و درنتیجه موجب کنترل اجزا محیط کشت، جداسازی مکانیکی و القا خودبخودی جوانه زنی به عنوان سیستمی زایا برای مرحله انتهایی رشد گیاه می‌گردد (Kuria *et al*., 2008). بیوراکتور محفظه ای است استریل، محتوی مواد غذایی یا محلول غذایی و سیستم جریان هوا که برای کشت متراکم و داشتن بیشترین کنترل شرایط رشد، هوادهی، دما، اکسیژن نامحلول، pH و طراحی شده است (Paek *et al*., 2005). ساختار استاندارد یک بیوراکتور عبارت است از محفظه کشت که فضای مطلوب مورد نیاز برای واکنش بافت با محیط کشت و رشد در شرایط ضدعفونی را ایجاد می کند. همزن بر روی یک میله گردان نصب می‌شود و به صورت مکانیکی حرکت می‌کند. کار اصلی همزدن و آماده نمودن مخلوط محیط کشت جهت تامین اکسیژن در سوبستراهای معدنی برای رشد بافت های کشت شده می باشد. براساس عادت رشدی گیاهان، ساقه‌های تکثیر شده در طی رشد توده‌های متراکمی تشکیل نمی‌دهند و درنتیجه در بیشتر موارد برای تکثیر ساقه در بیوراکتورها نیازی به استفاده از همزن مکانیکی نیست. فیلتر هوا یک فیلتر قابل اتوکلاو است که امکان ورود هوای استریل را به محفظه بیوراکتور می‌دهد. در بیوراکتور یک بخش اندازه گیری pH، اکسیژن نامحلول، دما، نرخ جریان گاز، میزان قند و ... نیز وجود دارد (Mehrotra *et al*., 2007).

مواد و روش‌ها

برای مقایسه رشد گیاهچه‌ها در بیوراکتور با محیط جامد به طور همزمان از گیاهچه‌های عاری از ویروس تکثیر شده در محیط جامد درون شیشه ای برای کشت قطعات گیاهی در بیوراکتوراستفاده شد. به این منظور در این تحقیق مقایسه

IrHC2019

دو محیط کشت جامد و مایع (بیوراکتور) جهت پرآوری دو رقم زردآلو انجام گردید. محیط کشت مورد استفاده QL بود که حاوی یک میلی گرم در لیترGA3، ۰/۵ میلی گرم BAP و ۰/۰۱ میلی گرم IBA در لیترمی‌باشد. و کشت در محیط جامد حاوی محیط پایه QL و با اضافه نمودن آگار استفاده گردیده است. بیوراکتور مورد استفاده ازنوع نیمه پیوسته (شکل ۱) با توجه به زمان تنظیمی برای دستگاه، محلول غذایی در فاصله‌های زمانی تنظیم شده در دسترس گیاه قرار گرفت. تنظیمات در بیوراکتور به گونه ای انجام شد که سه مرتبه در شبانه روز هر۷ساعت و ۴۰ دقیقه یکبار محلول غذایی به مدت ۱۰ دقیقه در اختیار گیاهچه‌ها قرار گیرد. شرایط محیطی اتاق رشد همان شرایط دمایی ۲۴-۲۳ درجه سانتی گراد فتوپریود ۱۶/۸ و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس بوده است. پس از ۲۱ روز بیوراکتور و شیشه‌ها از اتاق رشد خارج شدند، گیاهچه‌های رشد یافته در بیوراکتور را نیز از محفظه بیوراکتور خارج شدند و در محیط جامد کشت شدند.

نتایج و بحث

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که سرعت ریزازدیادی در بیوراکتورها در مقایسه با سیستم کشت رایج در هر دو رقم اردوباد و قیصی تفاوت معنی داری داشت (جدول۱). به طوری که بیشترین میانگین تعداد شاخه جانبی و بزرگترین طول شاخه در هر دو رقم، در سیستم کشت بیوراکتورها مشاهده شد. به طوری که نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در سیستم بیوراکتور در رقم اردوباد میانگین تعداد شاخه و طول بزرگترین شاخه به ترتیب۱۱/۳۳ و ۴/۰۸ سانتی‌متردر مقایسه با سیستم کشت رایج که میانگین تعداد و طول بزرگترین شاخه اردوباد به ترتیب ۱/۶ و ۳ سانتی‌متر بود و در رقم قیصی در سیستم کشت بیوراکتور میانگین تعداد و طول بزرگترین شاخه به ترتیب ۱۷/۶۶ و ۵ سانتی‌متر و در کشت رایج میانگین تعداد و طول بزرگترین شاخه قیصی به ترتیب ۱۲/۸ و ۲/۸ سانتی‌متر بود (شکل ۳ و ۴). علاقه به کاهش هزینه‌های تولید گیاهان ریزازدیادی شده تحریک کننده پژوهش روی یک سیستم های کشت جدید in vitro مفید برای اتوماسیون کل فرآیند است. Cabrera jova و همکاران (۲۰۰۵) تولید ریز غده سیب زمینی را در دو سیستم کشت بیوراکتور تناوبی و نیمه جامد مقایسه کردند و این نکته را که استفاده از بیوراکتور تناوبی سبب تولید تعداد بیشتری ریزغده با میانگین وزن بالاتری نسبت به سیستم کشت نیمه جامد می‌شودرا گزارش کردند. باقری و همکاران (۱۳۹۲) استفاده از سیستم بیوراکتور تناوبی برای تکثیر پایه GF677 را گزارش کردند که نتایج آن‌ها نشان داد که تکثیر در بیوراکتورها از حیث شاخص‌های فیزیولوژیکی مانند تعداد شاخه، ارتفاع شاخه در مقایسه با سیستم کشت رایج تفاوت معنی داری دارد که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت داشت.

Farahani و Majd (۲۰۱۲) استفاده از سیستم بیوراکتور تناوبی را برای تکثیر موز گزارش کردند. در این مطالعه بالاترین میزان تکثیر و افزایش وزن برای تکثیر موز در سیستم بیوراکتور تناوبی مشاهده شد که با نتایج به دست آمده از این پژوهش برای تکثیر دو رقم زردآلو مطابقت داشت. محیط کشت مایع برای ریزازدیادی گیاهان، محیط ایده آلی است. پرآوری به کمک روش‌های مرسوم نیاز به زمان و نیروی کار زیادی دارد که برای غلبه بر این مشکل استفاده از کشت‌های مایع (بیوراکتور) در حال حرکت توصیه می‌شود. در این این نوع سیستم کشت میزان رشد و تکثیر شاخه‌ها به خاطر بهبود هوادهی افزایش می‌یابد. حرکت دائم کشت سبب رسیدن بهتر اکسیژن و مواد غذایی به همه بافت‌ها شده و رشد را بهبود می‌بخشد (Etienne *et al.*, 2002). وضعیت فیزیولوژیکی شاخ های تکثیر شده در بیوراکتور به علت شرایط متفاوت محیطی در بیوراکتور(ترکیب گازهای داخل ظرف، رطوبت نسبی، نحوه تغذیه....) نسبت به شاخه‌های تولید شده در سیستم‌های پیوسته و ثابت، متفاوت است. دو عامل ایجاد کننده این تفاوت ها یکی تهویه هوا است که در بیوراکتور انجام می‌شود و دیگری اتیلن تولید شده توسط گیاه است که موجب کاهش رشد، ریزش برگ و بروز شک های غیر طبیعی در گیاه می‌شود لذا استفاده از سیستم بیوراکتور تناوبی منجر به حذف اتیلن از محیط رشد گیاه می-شود و سبب افزایش رشد گیاه می‌شود به گونه‌ای که تعداد شاخه بیشتر و طویل‌تری از هر ریز نمونه به دست می‌آید

IrHC2019

(مجیدی و داودی، ۱۳۸۲). البته باید این نکته ذکرشود در این نوع سیستم کشت نسبت به کشت‌های رایج احتمال شیشه‌ای شدن به خاطر تماس مستقیم ریزنمونه‌ها با محیط مایع افزایش می‌یابد. به طور کلی این نوع سیستم‌های کشت برای گیاهانی که تکثیر آن‌ها با روش‌های معمول دشوار است، راندمان تکثیر پایین و ارزش تجاری بالایی دارند توصیه می‌شود.

جدول «۱» مقایسه میانگین تعداد شاخه و طول بزرگترین شاخه در دو محیط کشت مختلف

فرم های مختلف محیط کشت	تعداد شاخه		طول بزرگترین شاخه (سانتی متر)	
	رقم اردوباد	رقم قیصی	رقم اردوباد	رقم قیصی
مایع (بیوراکتور)	۱۱/۳۳	۱۷/۶۶	۴/۰۸	۵
جامد	۱/۶	۱۲/۸	۳	۲/۸

شکل 1- بیوراکتورتناوبی

شکل 2- پر آوری در سیستم بیوراکتور دو رقم اردوباد و قیصی

IrHC2019

شکل 4- پرآوری رقم قیصی در سیستم کشت رایج

شکل 3- پرآوری رقم قیصی در سیستم بیوراکتور

منابع

باقری، س.، امیری، م.، داودی، د.، و انتصاری، م. ۱۳۹۲. بررسی و مقایسه ظروف کشت رایج و بیوراکتور تناوبی جهت تکثیر انبوه پایه GF 677 (هیبرید هلو × بادام). نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)، ۲۷(۱): ۴۲-۳۶.

مجیدی، ا. و داودی، د.۱۳۸۲ . تولید انبوه ریزغده های سیب زمینی با استفاده از سیستم بیوراکتور تناوبی. مجله علوم زراعی ایران. ۵ (۴): ۳۰۲-۳۱۴.

Cabrera jova, M., Gomezkosky, R., Perez, B., SantosPino, A., Medero Vegna C., Pez torres, J., Rayas Caberera, A., Agarci, M. G. and Lac, J. 2005. Production of yam microtubers using a temporary immersion system. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 83: 103-107.

FAO Stat. 2017. FAO statistical databases.

Farahani, F and Majd, A. 2012. Comparison of liquid culture methods and effect of temporary immersion bioreactor on growth and multiplication of banana (Musa, cv. Dwarf Cavendish). African Journal of Biotechnology, 11(33): 8302-8308.

Etienne, H and Berthouly, M. 2002.Temporary immersion systems in plant micropropagation.

Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 69: 215-231.

Kuria, P., Demo, P., Nyende, A. B., Kahangi, E.M. 2008. Cassava starch as an alternative cheap gelling agent for the in vitro micro-propagation of potato (SolanumtuberosumL.). African Journal of Biotechnology, 7(3): 301-307.

Mehrotra, S., Goel, M. K., Kukreja, A. K. and Mishra, B. N. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. African Journal of Biotechnology, 6 (13):1484-1492.

Mohamed, M. A. H., Alsadon, A. A., Al and Mohaidib, M. S. 2009. Corn and potato starch as an agar alternative for Solanumtuberosummicropropagation. African Journal of Biotechnology, 8(19).

Paek, K. Y., Chakrabarty, D. and Hahn, E. J. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 81: 287–300.

Sakamoto, Y., Onishi, N. and Hirosawa, T. 1995. Delivery systems for tissue culture by encapsulation. Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, Kluwer Academic Publishers215-243.

Sandal, I., A. Bhattacharya and P.S. Ahuja. 2001. An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation. Plant Cell Tissue Organ Cult., 65: 75-80.

IrHC2019

Study and comparison of apricot two cultivars using a periodic bioreactor culture system and common culture system

Asieh Zare Khafari [1]*, Reza Zarghami [2], Rahim Qara Sheikh Bayat[3], Layla fahmideh[4], Mehdi Nikarad[5]
*[1]Ph.D. student of biotechnology at Agriculture University of Zabol
[*2] Associate Professor the Iranian Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran
[3] Assistant Professor the Institute of Fruit and Grain Fruits of the Organization for Research, Karaj, Iran
[4] Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Zabol University
[5] Graduates of Master of Science in Horticulture - Biotechnology
[*] *asyehzare@gmail.com,* Rezazarghami2001@yahoo.com*

Abstract
Micropropagation is important for the production of two cultivars of apricot (Qaisi and Ordubad) through tissue culture. Today, application of plant bioreactors in mass propagation of plants can reduce the cost of production and justify it economically. Accordingly, the aim of this study is to investigate the possibility of using semi-continuous bioreactor in micropropagation of two apricot cultivars and optimizing culture conditions. In this study, a temporary immersion bioreactor system and a common solid culture medium were used. In this research, a comparison of two solid and liquid media (bioreactors) done to prolifration apricot two cultivars. The culture medium used was QL containing 1 mg / L GA3, 0.5 mg BAP and 0.01 mg IBA per liter. The results of the mean comparison showed that in the bioreactor in Ordubad cultivar, the average number of shoot and length of the largest shoot were 11.33 and 4.08 cm respectively, compared to the solid culture medium that the mean number of shoot and length of the largest shoot of Ordubad were 1.6 and 3 cm respectively, and also in the Qaisi cultivar, the average number of shoot and length of the largest shoot were 17.66 and 5 cm respectively and in conventional cultivation, the average number of shoot and length of the largest shoot were 12.8 and 8.2 cm respectively. The results indicate that there is a significant difference between bioreactor culture and common culture in both cultivars.
Keywords: Semi-continuous bioreactor, Apricot, Ordubad, Qaisi, Micropropagation.

Key words: Ordobad, Semi-continuous bioreactor, Qaisi, Micropropagation.

IrHC2019