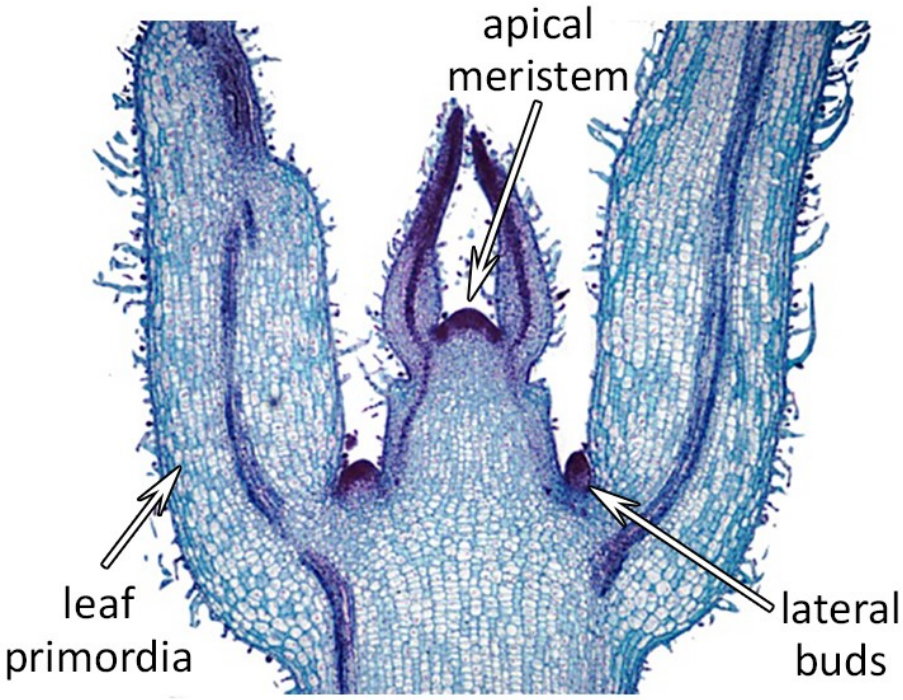
راهنمای کشت مریستم سیب‌زمینی
به منظور تولید غده‌های بذری عاری از ویروس



تهیه‌کننده

حمیدرضا عبدی

۱۳۹۸

مقدمه:

سیب‌زمینی زراعی با نام علمی *Solanum tuberosom* L. اتوتتراپلوئید و هتروزیگوس و دارای ۲n=۴x=۴۸ کروموزوم می‌باشد. سیب زمینی بعد از گندم، برنج، ذرت و جو پنجمین محصول کشاورزی دنیا می‌باشد.بر اساس آخرین آمار FAO (۲۰۰۸) ایران با تولیدی در حدود ۵ میلیون تن سیزدهمین کشور تولیدکننده سیب زمینی در جهان است. سطح زیر کشت این گیاه در دنیا در سال ۲۰۰۵ حدود ۱۹/۰۲۶ میلیون هکتار و تولید آن به ۳۲۴/۴۹ میلیون تن رسیده است(FAO, 2007). در ایران سطح زیر کشت سیب زمینی در سال زراعی ۱۳۸۶ معادل ۱۴۹ هزار هکتار و تولید آن بیش از ۴ میلیون تن بوده است که پس از گوجه‌فرنگی بیشترین میزان سطح و تولید محصول را در بین انواع سبزیجات در سال زراعی ۸۶-۱۳۸۵ داشته است (آمار نامه کشاورزی، ۱۳۸۷). عوامل ویروسی یکی از مهمترین مشکلات تولید سیب‌زمینی در ایران و جهان به شمار می‌روند. این عوامل به‌تنهایی یا به صورت ترکیبی، خسارت‌های قابل‌توجهی به محصول سیب‌زمینی وارد می‌نمایند. تاکنون حدود ۲۳ ویروس و ارگانیسم شبه ویروسی شناخته شده‌اند که در سیب‌زمینی ایجاد بیماری می‌نمایند. بنابر برخی از گزارش‌های موجود، یک گیاه منفرد سیب‌زمینی می‌تواند با چهار تا پنج نوع ویروس آلوده شود. آلودگی به ویروس‌ها یکی از دلایل مهم کاهش عملکرد در محصول سیب‌زمینی است؛ به‌طوری‌که این کاهش عملکرد بعضاً تا ۷۵ درصد نیز می‌رسد. از آنجایی که مقابله با ویروس‌های سیب‌زمینی در مزرعه تقریباً غیرممکن است، بنابراین بهترین راه مبارزه با آنها پیشگیری است که این عمل از طریق کشت بذور عاری از ویروس صورت می‌گیرد. تاکنون روش‌های مختلفی برای تولید غده های بذری عاری از ویروس سیب‌زمینی پیشنهاد شده است که مهمترین آنها عبارتند از: کشت مریستم به تنهایی یا به همراه تکنیک‌های ترموتراپی، شیمیوتراپی و الکتروتراپی. بنابراین در صورت اعمال هر تکنیکی نهایتاً می‌بایست کشت مریستم انجام گردد.

اصول و مبانی کشت مریستم

سابقه کشت مریستم در جهان به بیش از ۵۰ سال می‌رسد. در واقع در سال ۱۹۵۲ مورل و مارتین (Morel & Martin) برای حذف ویروس از گل لاله در شرایط این ویترو، کشت مریستم را ابداع نمودند. اگرچه در اوایل برای کشت مریستم، دو محیط کشت وایت (White) و گاترت (Gautherrt) بیشترین استفاده را داشتند، اما ترکیب نمکی محیط کشت MS نیز در این کشت‌ها بسیار رضایت بخش بوده است به‌طوری که در حال حاضر اکثر پژوهش‌ها با استفاده از این محیط صورت می‌گیرد. متعاقب آن Goodwin (۱۹۶۶) برای اولین بار روش کشت در محیط مایع را در کشت بافت سیب‌زمینی گزارش کرد که به دلیل کارآیی آن، این روش همچنان در کشت مریستم سیب‌زمینی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مریستم یک بافت قبه مانند با قطر تقریبی ۰/۱ میلی‌متر و طول تقریبی ۰/۳ – ۰/۲۵ میلی‌متر است که در ناحیه انتهایی نوک ساقه و در محور ساقه در زاویه برگ‌ها قرار دارد. مریستم‌ها معمولاً توسط برگ‌های کوچک و پریموردیا (ساختاری به قطر ۰/۵ – ۰/۱ میلی‌متر) پوشیده شده است. در مورد اینکه چرا ویروس‌ها در مریستم‌ها وجود ندارند و یا تعداد آنها کم است، دلایل مختلفی ذکر شده است که مهمترین آنها عبارتند از:

۱- در مریستم رقابت بین تولید قطعات ویروس از یک طرف و تولید سلول از طرف دیگر وجود دارد. در هنگام تقسیم سلولی، در بافت‌های مریستمی، ظرفیت سنتز اسیدهای نوکلئیک، صرف تولید سلول می‌شود که این موضوع باعث ممانعت از تکثیر ویروس می شود (Mellor and Stace-Smith, 1969).

۲- فقدان بافت‌های آوندی در مریستم و همچنین عدم وجود فضاهای بین سلولی در بافت‌های مریستم مانع از انتقال ویروس به این ناحیه می گردد (Mellor and Stace-Smith, 1969).

۳- در دهه ۱۹۶۰ این فرضیه مطرح گشت که احتمالاً وجود غلظت بالای اکسین و سیتوکینین، مانع از نفوذ قطعات ویروس و یا باعث غیرفعال شدن آنها می شود (Mellor and Stace-Smith, 1969).

۴- یکسری آنزیم برای تکثیر ویروس‌ها مورد نیاز است، این آنزیم‌ها در بافت‌های مریستمی وجود ندارند (Mellor and Stace-Smith, 1969).

۵- برخی مواد بازدارنده طبیعی در مریستم‌ها وجود دارد که همین مواد بازدارنده باعث می‌شود که غلظت ویروس‌ها در مریستم کم باشد (Martin-Tanguy *et al*., 1977).

در بین موارد فوق، مهمترین دلایل حذف ویروس‌ها از طریق کشت مریستم عدم وجود سیستم آوندی و پلاسمودسماتاها برای حرکت ویروس‌ها به انتهای مریستم و سرعت بالای تکثیر سلول‌های مریستمی ذکر شده است.

کشت مریستم در سیب‌زمینی

در دهه ۱۹۹۰ میلادی گزارش‌های زیادی در خصوص بهینه‌سازی سیستم کشت بافت سیب‌زمینی و ریزازدیادی آن منتشر شده است. در این گزارش‌ها، پروتکل‌های متعددی برای کشت بافت مریستم سیب‌زمینی به‌منظور تولید بذر عاری از ویروس ارائه شده است که اکثر قریب به اتفاق آنها از محیط کشت MS استفاده کرده‌اند. اما با توجه به تأثیر ژنوتیپ و ترکیبات محیط کشت بر بازدهی کشت بافت و ریزازدیادی، تحقیقات زیادی در خصوص بهینه کردن محیط مذکور در ارقام مختلف صورت گرفته است. یکی از متداول‌ترین تحقیقات در این زمینه، بررسی میزان و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد در کشت مریستم سیب‌زمینی است. در ذیل به برخی از گزارش‌های موجود اشاره شده است:

Nagib و همکاران (۲۰۰۳) تأثیر ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد کینتین، GA3 و BA را بر کشت مریستم چهار رقم سیب‌زمینی (دیامانت، کاردینال، مولتا و لالپکری) مورد بررسی

قرار دادند و صفات تعداد ساقه، تعداد ریشه، طول ساقه و طول ریشه را در گیاهان رشد یافته از کشت مریستم اندازه‌گیری نمودند. آنها گزارش کردند که ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA3 و ۰/۰۴ میلی‌گرم در لیتر کینتین بیشترین کارآیی را در این ارتباط دارد. Feistritzer برای کشت مریستم ارقام سیب‌زمینی محیط کشت MS حاوی ABA و IBA به میزان ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر را پیشنهاد کرد. Merja و Stasa (۱۹۹۷) گزارش کردند که ترکیب NAA، IAA و کینتین عملکرد بهتری برای کشت مریستم ارقام سیب‌زمینی دارد. Marani و Pisi (۱۹۷۷) استفاده از ۱ میلی‌گرم BA را در محیط تغییریافته MS به‌عنوان محیط کشت مناسب برای کشت مریستم سیب‌زمینی پیشنهاد کردند. Hoque و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند که اضافه کردن ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به محیط کشت سبب افزایش تعداد ساقه و توسعه گره‌ها و کاهش ارتفاع ساقه در کشت مریستم سیب‌زمینی می‌شود. Marani و Pisi و همچنین Bajaj و همکاران و Zaman و همکاران گزارش کردند که اضافه کردن ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به محیط کشت بازدهی کشت مریستم را به حد معنی‌داری افزایش می‌دهد. در پروتکل ارائه شده توسط مرکز تحقیقات بین‌المللی تحقیقات سیب‌زمینی (CIP) محیط کشت MS مایع حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA3 به عنوان محیط کشت برتر در کشت مریستم سیب‌زمینی پیشنهاد شده است. احمدیان و همکاران اثرژنوتیپ ،BAP و ساکارز را در تولید ریز غده سیب زمینی بررسی کردند و تفاوت معنی‌داری در سطوح مختلف BAP و اثر متقابل BAP و ساکارز گزارش نمودند. ضمن اینکه در این تحقیق اثر متقابل ساکارز و ژنوتیپ برای صفت طول ریز غده و اثر متقابل سه‌گانه ژنوتیپ، ساکارز و BAP نیز معنی‌دار بود.

همانگونه که مشاهده می‌شود در گزارش‌های مختلف نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد برای افزایش راندمان کشت مریستم سیب‌زمینی پیشنهاد شده است که این موضوع ناشی از وجود اثر متقابل شدید بین ژنوتیپ و محیط کشت در این ارتباط است.

روش کشت مریستم سیب‌زمینی

غده های سیب‌زمینی در گلدان یا مزرعه به طور جداگانه کشت و عملیات داشت بروی آنها انجام شود. پس از حدود ۱/۵ ماه از زمان کشت، ساقه‌ها برای استخراج مریستم از گیاهان مادری جدا و به آزمایشگاه منتقل شوند.

در آزمایشگاه برگ‌ها از ساقه‌ها جدا و ساقه‌های دارای گره به وسیله آب معمولی شسته شده، سپس به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و ۱۷ – ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد حاوی چند قطره توین ضدعفونی شوند. بعد از آن ساقه‌ها سه مرتبه با آب مقطر استریل در شرایط کنترل شده در زیر ایرفلو لامینار کابینت شستشو گردند.

پس از آن ساقه‌ها برش طولی داده شده و در زیر بینوکولار برگ‌های اضافی و پریموردیاها به وسیله اسکالپل جدا شده و انتهای مریستم‌ها در اندازه ۰/۵ – ۰/۲ میلی‌متر بریده شده و در لوله‌های آزمایش دارای محیط کشت پایه MS حاوی تنظیم‌کننده های رشد **BA** و **GA3** با غلظت‌های ۳ و ۱ میلی گرم در لیتر قرار گیرند. این لوله‌ها در داخل اتاق رشد با دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتیگراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شوند تا رشد نمایند.

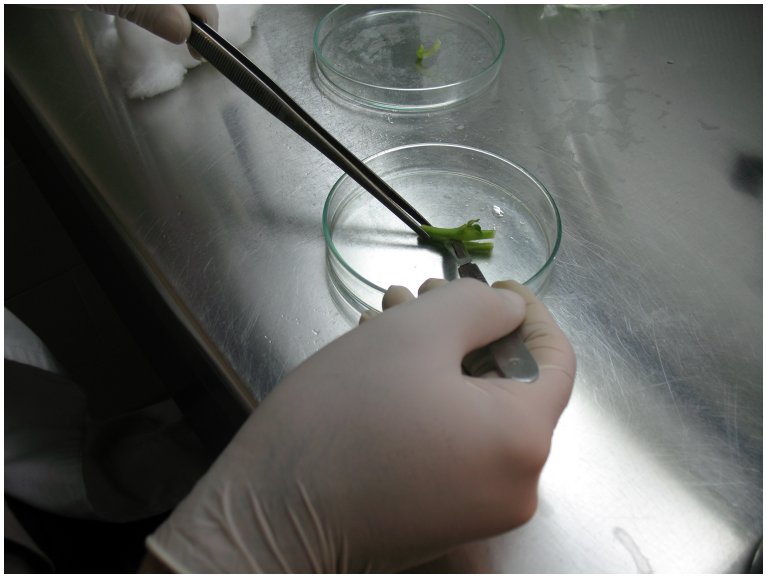
از آنجایی که اندازه مریستم‌ها کوچک بوده و غالباً در محیط جامد قادر به رشد نیستند، بهتر است برای کشت از محیط مایع استفاده شود. البته برای جلوگیری از غوطه‌ور شدن و از بین رفتن اکسپلنت‌ها از پل‌های کاغذی Mشکل در محیط کشت استفاده گردد.

در مرحله بعد، گیاهچه‌های تولید شده از کشت مریستم در محیط کشت نیمه جامد یا جامد قرار گرفته تا رشد نمایند. نهایتاً برای تکثیر گیاهچه‌های تولید شده می‌توان از کشت تک گره در محیط کشت MS بدون هیچ تنظیم‌کننده رشدی استفاده کرد.

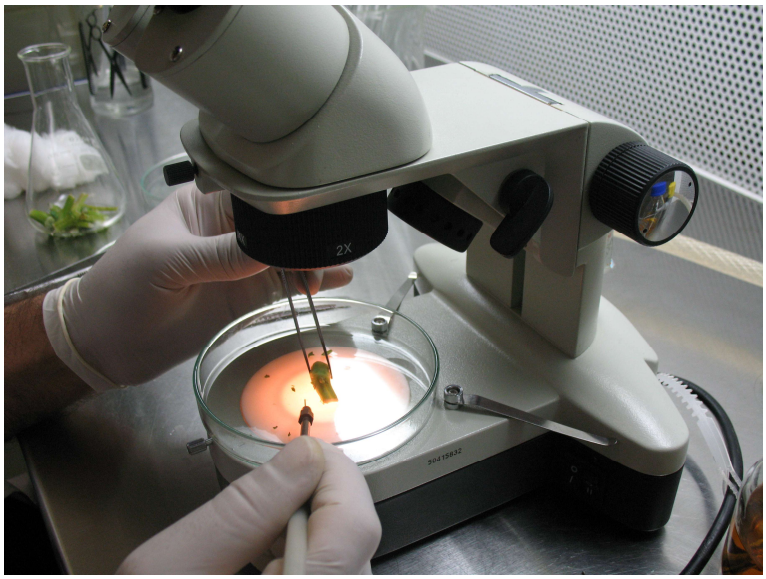
در ادامه در شکل‌های ۱ تا ۹ مراحل کشت مریستم ارائه شده است.

شکل ۱ – استریل کردن ساقه ها با هیپوکلریت سدیم

شکل ۲- وسایل مورد نیاز برای کشت مریستم در زیر هود آزمایشگاهی



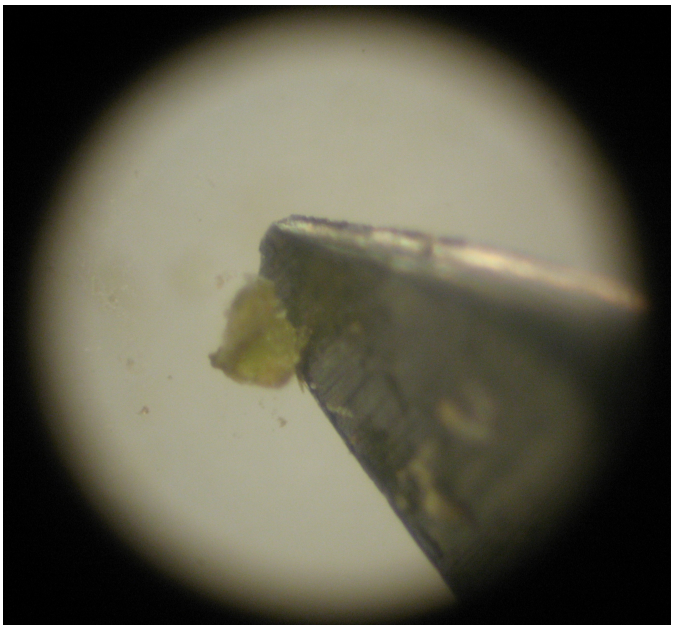
شکل ۳- برش طولی ساقه جهت استقرار بهتر آن برای مریستم برداری



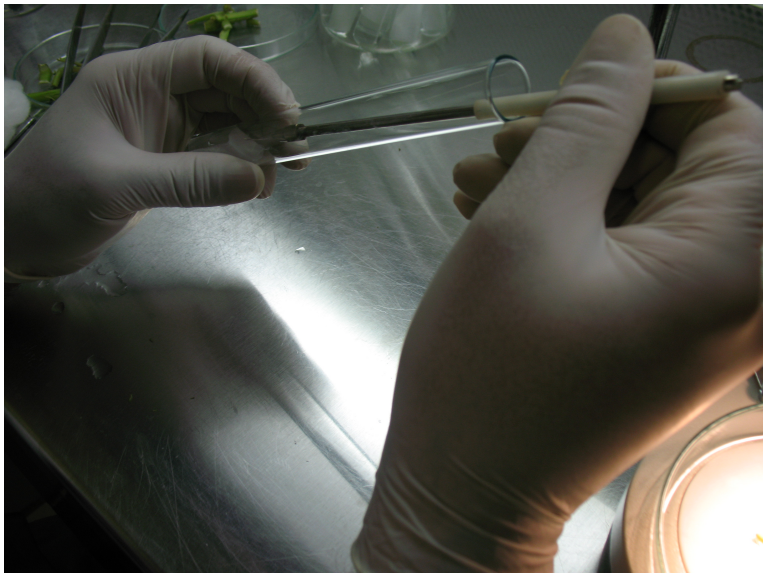
شکل ۴- کندن برگ‌های پوشاننده مریستم در زیر بینوکولار

شکل ۵– تصویر یک پریموردیا زیر بینوکولار

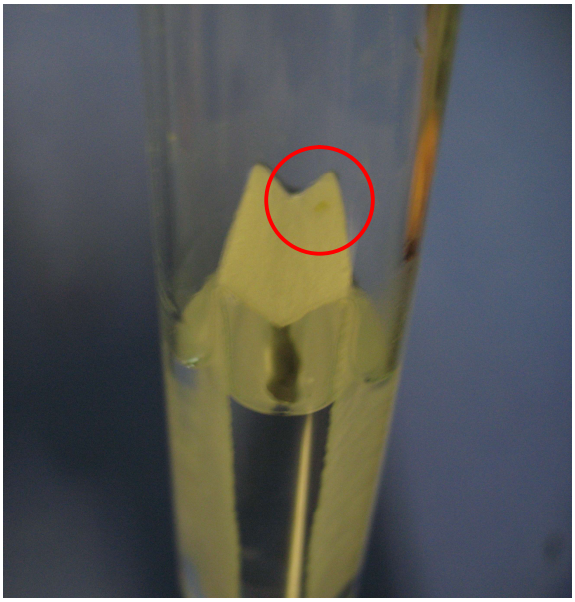
شکل ۶- نوک مریستم زیر بینوکولار (ساختار گنبدی شکل)



شکل ۷- نوک مریستم جداشده توسط اسکالپل زیر بینوکولار



شکل ۸- قرار دادن مریستم جدا شده در لوله آزمایش حاوی پل کاغذی و محیط کشت مایع



شکل ۹- مریستم کشت شده بر روی پل کاغذی

منابع مورد استفاده

-- احمدیان، ش.؛ عبدمیشانی، س.؛ ضرغامی، ر.؛ خدابنده، ن.؛ سراج‌آذری، م. و م. رنگرزجدی. اثرات ژنوتیپ، BAP و ساکارز در تولید ریزغده سیب‌زمینی از گیاهچه‌های حاصل از کشت مریستم. چکیده مقالات چهارمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات. ص ۵۵

- Bajaj, Y.P.S., 1981. Regeneration of plants from meristems freeze-preserved for 24 months. Euphytica, 30: 141-145

- Feistritzer, W. P. 1998. Procedure of potato tissue culture. FAO publication

- Goodwin, P.B., Y.C. Kim and T. Andisarwanto, 1980. Propagation of potato by shoot tip culture. Potato Res., 23: 9-18.

- Goodwin, P.B., 1966. An improve medium for the rapid of isolated potato buds. J. Exp. Botany, 17: 590-595.

- Haque, M.I., M. Aminul Islam, R.H. Sarker and A.S. Islam, 1996. In vitro Microtuber Formation in Potato (Solanum tuberosum L.). In; Plant Tissue Culture (Ed. A.S. Islam) Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi, Calutta, pp: 221-228.

- Husseey, G. and N.J. Stacey, 1981. In vitro propagation of potato (Solanum tuberosum L.). Ann. Bot., 48: 787-796.

- Marani, F. and A. Pisi, 1977. Meristem-Tip Culture and Vegetative Propagation in Potato.ISHS Acta Horticulturae 78: Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes, 56.

- Merja, D. and A. Stasa, 1997. In vitro Regeneration and Propagation of Potato and Its Genetic Homogeneity Determination By Means of

Protein Polymorphism of Tubers. ISHS Acta Horticulturae, 462: I Balken Symposium On Vegetables and Potatoes, 153.

- Naghib, A.; S.A. Hossain; M. F. Alam; M. M. Hossain; R. Islam and R. S. Sultana. 2003. Virus free potato tuber seed production through meristem culture in tropical Asia. Asian journal of plant science 2 (8). pp. 616 -622

- Potato tissue culture Techniques CIP Training Manual

- Zamman, S.M., A. Quraishi, G. Hassan, Raziuddin, S. Ali, A. Khabir and N. Gul, 2001. Meristem Culture of Potato (Solanum tuberosum L.) for Production of Virus- Free Plantlets. OnLine J. Biol. Sci., 1: 898-899.