نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، ص. ۴۳-۳۶
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 27, No. 1, Spring 2013, P. 36-43
ISSN: 2008 - 4730

بررسی و مقایسه ظروف کشت رایج و بیوراکتور تناوبی جهت تکثیر انبوه پایه GF677 (هیبرید هلو×بادام)

سکینه باقری[1*]- محمد اسماعیل امیری[2]- داریوش داودی[3]- مهرناز انتصاری[4]

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۲۰
تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۷

چکیده

پایه GF677 به طور معمول بعنوان پایه مقاوم به کمبود آهن برای هلو و بادام استفاده می‌شود. بنابراین تکثیر انبوه از طریق کشت بافت برای تولید تجاری این پایه مهم می‌باشد. امروزه کاربرد بیوراکتورهای گیاهی در ریزازدیادی 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 تناوبی در ریزازدیادی پایه هیبرید هلو و بادام و بهینه‌سازی شرایط کشت آن می‌باشد. در این تحقیق، ۱۵-۱۰ عدد گیاهچه‌های حاصل از کشت جوانه‌های جانبی در شرایط درون شیشه با ارتفاع ۲-۱/۵ سانتی‌متر در بیوراکتورها (تک پارچه و دو پارچه) و ظروف کشت رایج کشت گردیدند. محیط کشت استفاده شده در بیوراکتورها MS تغییر یافته حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۳٪ ساکارز به صورت مایع برای تکثیر در بیوراکتور مورد استفاده قرار گرفت و تغذیه تناوبی ریزنمونه‌ها در هر ۲۴ ساعت به مدت ۱۰ دقیقه برقرار گردید. مقایسه تکثیر در مرحله پرآوری شاخه در بیوراکتور و ظروف ۳۰۰ میلی‌لیتری با ۳ تکرار انجام گرفت. نتایج نشان داد که تکثیر در بیوراکتورها از حیث تعداد شاخه، ارتفاع شاخه، وزن‌تر و وزن خشک در مقایسه با سیستم کشت رایج در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری داشتند. به طوری که در بیوراکتور متوسط حدود ۶۰۰ شاخه با ارتفاع ۷/۴۳ سانتی‌متر در مقابل ۲۰ شاخه با ارتفاع ۲/۴۷ سانتی‌متر در ظرف رایج تولید شد.

واژه‌های کلیدی: بیوراکتور تناوبی، ریزازدیادی، پایه هیبرید هلو و بادام (GF677)

مقدمه

با توجه به نقش پایه در میزان رشد رویشی، زود رسی، میزان عملکرد و مقاومت در برابر بیماری‌ها، انتخاب پایه مناسب نقش بسزایی در برنامه مدیریت باغ خواهد داشت. بطور کلی پایه‌های درختان میوه به دو روش جنسی و غیر جنسی تکثیر می‌شوند، ولی با توجه به اینکه در تکثیر جنسی تفرق صفات حاصل شده و نهال‌های حاصله از نظر خصوصیات ژنتیکی تغییر می‌یابند، از چند دهه پیش سعی بر این است تا از روش تکثیر غیر جنسی، به ویژه روش‌های کشت بافت برای تولید انبوه پایه های سالم و توسعه باغات میوه استفاده شود (۱۷). پایه رویشیGF677 به عنوان یکی از پایه‌های بسیار مناسب برای بادام و هلو در دنیا شناخته شده و مورد استفاده قرارمی‌گیرد (۱۷). این پایه دارای خصوصیات مطلوبی نظیر مقاومت به خشکی، خاک‌های آهکی، آفات و بیماری‌های گیاهی و سیستم ریشه بندی قوی می‌باشد سالانه ۷ تا ۸ میلیون اصله از این پایه‌ها به روش کشت بافت در اروپا تکثیر می‌شود و برای احداث باغات مکانیزه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۵).

اولین تحقیقات کشت درون شیشه‌ای پایه GF677 انجام شد (۲۵) و آنها توانستند با تغییراتی در محیط Knop نمونه‌های گیاهی را کشت و شاخه‌زائی نمایند ولی در خصوص مراحل انتقال به خاک گیاهچه‌های تولید شده گزارشی داده نشد. بعد از این تحقیقات فازلو و همکاران اقدام به انجام آزمایش ریشه‌زائی گیاهچه‌های تولید شده از طریق انتقال به خاک نمودند و موفقیت‌هائی را به دست آوردند (۱۵). اما ریزازدیادی در سطح وسیع یا در حد تجاری علیرغم دارا بودن مزایای فراوان نسبت به روشهای کلاسیک تکثیر، با مشکلات فنی

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
(*- نویسنده مسئول: Email: S.bagheri67@yahoo.com)
۳- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

متعددی همراه است. روش‌های رایج که براساس فعالیت آزمایشگاههای تحقیقاتی شکل گرفته‌اند شامل تعداد زیادی ظروف کشت کوچک، محیط کشت نیمه جامد یا جامد و تکثیر و دستورزی بافت گیاهی در شرایط استریل می‌باشد. بنابراین هزینه‌های تولید بالا بوده و موجب محدود شدن ریزازدیادی تجاری گردیده است (۲۶). بخش اعظم هزینه‌های جاری تولید، بخصوص در کشورهای پیشرفته مربوط به دستمزد می‌باشد و بسیاری از آزمایشگاهها مشغول تحقیق در مورد این مسئله هستند که چگونه می‌توان با کاهش تعداد دفعات واکشت، هزینه تولید را پائین آورد. استفاده از ظروف کشت بزرگ و محیط کشت مایع می‌تواند به مکانیزه کردن ریزازدیادی و کاهش هزینه آن کمک کند (۱۴). مکانیزاسیون و اتوماسیون فرآیند ریزازدیادی می‌تواند سهم عمده‌ای در غلبه بر محدودیت‌های ناشی از روش‌های پرزحمت معمول کشت بافت داشته باشد. بر این اساس توجه زیادی به اتوماسیون مراحل تکراری برش، جداسازی، واکشت و انتقال جوانه‌ها، شاخه‌ها یا گیاهچه‌ها در مراحل تکثیر و انتقال معطوف گشته است (۴، ۱۹ و ۲۹). استفاده از این روش‌ها در دو دهه اخیر موجب پیشرفت تکنولوژی ریزازدیادی گردیده است. ظروفی که برای کشت سلول، بافت یا اندام گیاهی در محیط غذایی مایع و در یک مقیاس بزرگ مورد استفاده قرار می‌گیرند بیوراکتور نامیده می‌شوند. واژه بیوراکتور معمولاً برای توصیف یک ظرف که در آن یک واکنش بیولوژیکی انجام می‌شود و یا برای یک ظرف که جهت کشت سلول-های هوازی یا ستون‌های حاوی سلول‌های تثبیت شده به کار می‌رود، استفاده می‌شود. بیوراکتورها به صورت گسترده برای تولید متابولیت-های میکروبی، حیوانی و یا گیاهی به کار می‌روند. استفاده از بیوراکتور در تکثیر گیاهان اولین بار در سال ۱۹۸۱ برای بگونیا گزارش شد (۲۶). بعد از آن بهینه‌سازی تکثیر با این روش در گیاهان سیب زمینی و هویج نیز گزارش گردید (۱۸ و ۲۶). در گیاه زینتی Nerine که تکثیر طبیعی آن اندک است استفاده از بیوراکتور مناسب بوده و داده‌ها نشان داده‌اند که در محیط‌های یکسان میزان رشد در بیوراکتور ۶ تا ۸ برابر بیشتر از محیط کشت مایع ثابت می‌باشد (۳۰). همچنین طبق برخی گزارشات تا پنج هزار جنین هویج از هر میلی‌لیتر سوسپانسیون بدست آمده است. آکیتا و همکاران با استفاده از یک بیوراکتور پانصد لیتری تولید دویست هزار گیاهچه استویا را از یک ظرف گزارش کردند (۶). گزارشاتی نیز در استفاده از بیوراکتور در کشت سلولی برای تولید جنین‌های غیر جنسی یا متابولیت‌های ثانویه وجود دارد (۲۶ و ۳۳). اگرچه استفاده از بیوراکتورها به طور عمده برای کشت‌های سوسپانسیون سلولی و تولید فرآورده‌های ثانویه بوده است، اما بهینه کردن بیوراکتورها برای جنین‌زایی غیر جنسی نیز در تعدادی از گیاهان مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۶، ۲۲، ۲۳، ۲۴ و ۲۷). در ایران امکان استفاده از بیوراکتور گیاهی برای تکثیر بهینه گیاهان میخک و آناناس (۱) سیب زمینی (۳) و همچنین گیاه موز (۲) گزارش گردیده است. کشت درمحیط غذایی مایع با استفاده از یک سیستم غوطه‌ورسازی موقت با تعداد دفعات متفاوت غوطه‌ورسازی برای بهبود کیفیت گیاه و افزایش نرخ تکثیر موز، قهوه، هوآ[1] گزارش شده است (۸، ۱۳ و ۲۸). در حال حاضر از بیوراکتورها برای ریزازدیادی تجاری در کشورهای ایالات متحده، ژاپن، تایوان، کره، کوبا، کاستاریکا، هلند، اسپانیا، بلژیک و فرانسه استفاده می‌شود (۳۲). گیاهان زینتی، پیازدار، آناناس، سیب زمینی و درختان جنگلی به این روش تکثیر می‌شوند و با استفاده از بیوراکتور توانسته‌اند قیمت واحد را برای گیاهان علفی از ۰/۱۷ دلار به ۰/۰۶ تا ۰/۰۷ دلار کاهش دهند (۳۲). با توجه به مزایای کشت در بیوراکتور و استفاده از محیط غذایی مایع از یک طرف و در دستور کار قرار داشتن بهینه سازی ریزازدیادی این پایه در برنامه‌های اصلاحی، این تحقیق جهت بررسی امکان تکثیر انبوه پایه GF677 در بیوراکتور انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

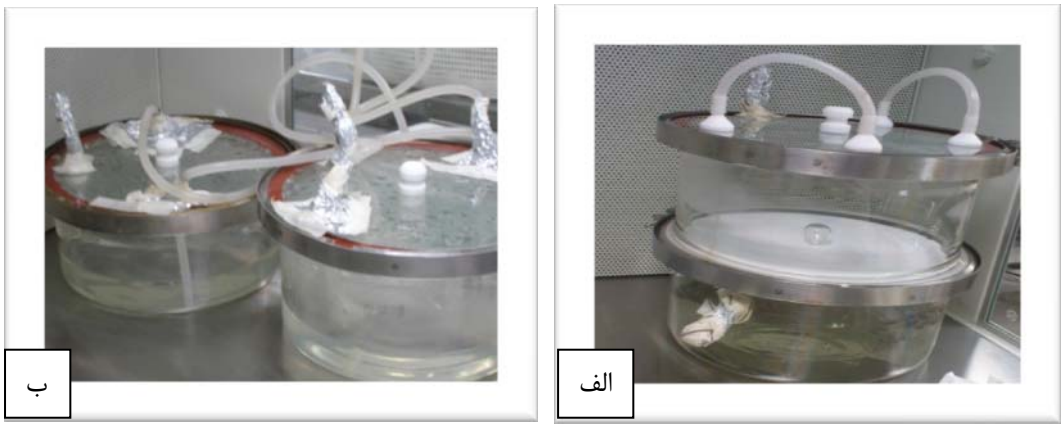
مواد گیاهی

جوانه‌های جانبی رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای که در محیط کشت MS (۲۱) همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP استقرار یافته بودند پس از رشد به بیوراکتورها و ظروف کشت رایج (ظروف استوانه‌ای ۳۰۰ میلی‌لیتری) انتقال داده شدند. بیوراکتورها حاوی ۳ لیتر محیط کشت مایع و سیستم کشت رایج (ظروف استوانه‌ای ۳۰۰ میلی‌لیتری) حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط غذایی بودند. کشت‌ها در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی در حدود ۳۰۰۰ لوکس قرار داده شدند.

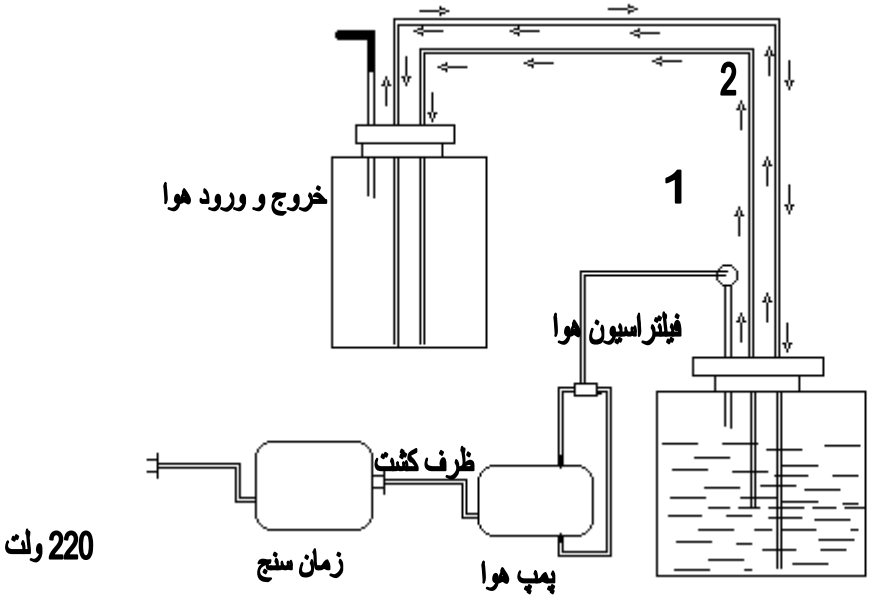
بیوراکتور

بیوراکتورهای مورد استفاده در دو نوع تک پارچه و دو پارچه با اندازه ۵ لیتر که در نحوه کارکرد، تغذیه و هوادهی مشابه بودند تفاوت بیوراکتور تک پارچه با دو پارچه در این است که در بیوراکتور تک پارچه ظرف محیط کشت و ظرف کشت روی هم تعبیه می‌شوند ولی در بیوراکتور دو پارچه ظرف کشت و ظرف محیط کشت جدا از هم می‌باشند و به وسیله شیلنگ‌های سیلیکونی با هم در ارتباط هستند (شکل ۱ a). برای برقراری سیستم بیوراکتور از پمپ هوای آکواریومی، زمان سنج با فواصل زمانی ۲۴ ساعت به مدت ۱۰ دقیقه، شیلنگ‌های سیلیکونی با قطر ۰/۵ و ۰/۸ سانتی‌متر، میکروفیلترهای یکبار مصرف با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرون، ظرف مواد غذایی، ظرف کشت و صفحه جدا کننده (شکل ۲) در ظرف کشت به صورتی که در شکل ۱ b آورده شده است استفاده به عمل آمد.

1- Hevea

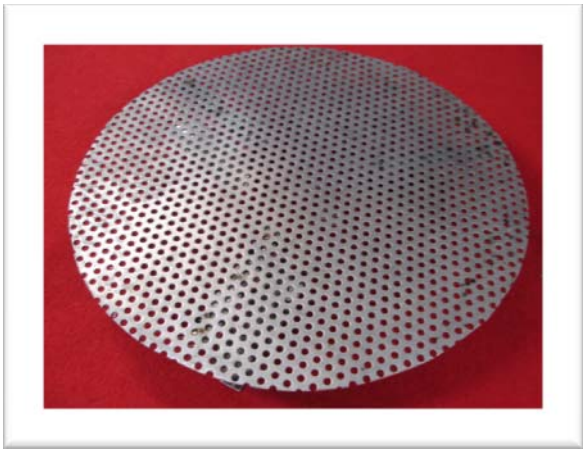


شکل a ۱- الف: بیوراکتور تک پارچه ب: بیوراکتور دو پارچه



ظرف محیط کشت

شکل b ۱- دیاگرام نشان دهنده اجزاء بیوراکتور و روابط آنها



شکل ۲- استفاده از صفحه جدا کننده در بیوراکتور برای کاهش شیشه‌ای شدن ریز نمونه‌ها

با روشن شدن پمپ توسط زمان سنج، مواد غذائی به داخل ظرف کشت پمپ شده، تا زمان معینی در آنجا نگاه داشته شده و ضمن هوادهی در این مدت (توسط یکی از شیلنگ سیلیکونی)، با خاموش شدن پمپ توسط زمان سنج، مواد غذائی به طور کامل به ظرف مواد غذائی برگردانده می‌شود. پس از تعبیه کردن اجزاء روی هم، مواد غذائی را در یک ظرف جداگانه و سیستم بیوراکتور را به صورت کامل در اتوکلاو استریل کرده، سپس کشت تعداد ۱۵-۱۰ عدد گیاهچه حاصل از جوانه‌های جانبی به ارتفاع ۲-۱/۵ سانتی‌متری در ظروف کشت را زیر هود استریل انجام داده و مجموعه کامل آن در اتاق رشد قرار داده شد. جریان محیط کشت از مخزن به اندام‌های کشت شده با دوره تغذیه‌ای هر ۲۴ ساعت یکبار به مدت۱۰ دقیقه برقرار گردید. برای بیوراکتورها، ۳ لیتر محیط غذایی و برای ظروف کشت رایج ۵۰ میلی‌لیتر مورد استفاده قرار گرفت.

محیط‌های کشت

محیط غذایی مورد استفاده در بیوراکتورها، محیط کشت پایه MS و MS تغییر یافته (جدول ۱) که حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۳٪ ساکارز به صورت مایع بودند جهت تکثیر مورد استفاده قرار گرفتند. کشت در ظروف ۳۰۰ میلی‌لیتری با محیط کشت پایه MS حاوی ۱ میلی‌گرم BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر GA_3 به صورت جامد با ۷ گرم در لیتر آگار جهت مقایسه با سیستم بیوراکتور بکار گرفته شد. پس از ۴۰ روز فاکتورهای وزن‌تر، وزن خشک و تعداد گیاهچه‌ها، ارتفاع گیاهچه‌ها و درصد شیشه‌ای شدن در بیوراکتورها اندازه‌گیری گردید. نسبت تعداد گیاهچه در هر ظرف به جمعیت پایه همان ظرف معادل با نرخ تکثیر در نظر گرفته شد و تیمارها در سه تکرار (استفاده از سه بیوراکتور) در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج

سرعت پرآوری در بیوراکتور

نتایج نشان داد که سرعت پرآوری در بیوراکتورها در مقایسه با سیستم کشت رایج در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۲). به طوری که بیشترین میانگین تعداد شاخه در بیوراکتورها مشاهده شد (جدول ۳). نسبت شاخه تولید شده در هر گیاهچه در مقایسه با ظروف کشت رایج ۶۰۰ به ۲۰ می‌باشد که حدود ۳۰ برابر افزایش را نشان داد. این نسبت از طریق شمارش گیاهچه‌های حاصل از بیوراکتور و ظروف کشت رایج بدست آمد.

جدول ۱- تغییر در عناصر ماکرو محیط کشت MS برای کاهش مشکل شیشه‌ای شدن گیاهان

درشت مغذی‌ها	MS تغییر یافته (میلی‌گرم در لیتر)	MS نرمال (میلی‌گرم در لیتر)
NH4NO3	۷۵۰	۱۶۵۰
KNO3	۹۰۰	۱۹۰۰
CaCl2	۴۵۰	۳۳۲
MgSO4	۳۶۰	۱۸۰
KH2PO4	۱۷۰	۱۷۰

طول شاخه در بیوراکتور

نتایج نشان داد که میانگین ارتفاع شاخه در بیوراکتورها در مقایسه با سیستم کشت رایج در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۲). به طوری که بیشترین میانگین ارتفاع در بیوراکتورها مشاهده شد. مطابق جدول ۳، بیشترین میانگین طول شاخه به میزان ۷/۴۳ سانتی‌متر در بیوراکتور دو پارچه و به میزان ۶/۶۷ سانتی‌متر در بیوراکتور تک پارچه مشاهده شد. میانگین طول شاخه در بیوراکتور و ظروف کشت رایج به ترتیب ۷/۴۳ و ۲/۴۷ سانتی‌متر می‌باشد که حدود ۳ برابر افزایش طول را در بیوراکتور نشان داد (جدول ۳).

وزن‌تر و وزن خشک به عنوان شاخص سرعت رشد

تکثیر در بیوراکتور از حیث وزن‌تر (گرم) و وزن خشک (گرم) در مقایسه با ظروف کشت رایج در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۲). با توجه به جدول ۳، رشد گیاهچه‌ها در ظرف کشت رایج با وزن‌تر و وزن خشک به ترتیب ۰/۹۷ و ۰/۰۹ گرم نسبت به سیستم کشت بیوراکتور به ترتیب ۶/۴۳ و ۱/۰۶۷ گرم کاهش نشان داد.

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر ظرف‌های مختلف کشت (ظروف کشت رایج و بیوراکتورها) روی تعداد شاخه، ارتفاع شاخه، وزن‌تر و وزن خشک

تیمار	درجه آزادی	تعداد شاخه (در هر ریز نمونه)	ارتفاع شاخه (سانتی‌متر)	وزن‌تر (گرم)	وزن خشک (گرم)
ظرف کشت	۲	۸۶/۵۴**	۱۲۱/۸**	۲۷۲/۹۸**	۱۳۶/۹۷**
خطا آزمایشی	۶	۷/۳۵	۱۲/۴۶	۱۳/۳۷	۱۲/۲۲

**معنی دار در سطح ۱ درصد

جدول ۳- مقایسه میانگین تعداد شاخه، ارتفاع شاخه، وزن‌تر و وزن خشک در ظرف‌های مختلف کشت

ظرف‌های کشت	تعداد شاخه (در هر ریز نمونه)	طول شاخه (سانتی‌متر)	وزن‌تر (گرم)	وزن خشک (گرم)
سیستم کشت رایج	۵/۳۳c	۲/۴۷b	۰/۹۷c	۰/۰۹c
بیوراکتور تک پارچه	۲۹/۶۷b	۶/۶۷a	۵/۱۷b	۰/۸۵b
بیوراکتور دو پارچه	۴۰/۶a	۷/۴۳a	۶/۴۳a	۱/۰۶۷a

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون برای هر عامل اختلاف معنی داری ندارند.

شکل ۲- مقایسه سرعت پرآوری شاخه الف) در بیوراکتور ب) در سیستم کشت رایج (ظروف ۳۰۰ میلی‌لیتری)

مقایسه شیشه‌ای شدن در بیوراکتور

نتایج نشان داد که میزان شیشه‌ای شدن در محیط کشت MS پایه بیشتر از محیط کشت MS تغییر یافته می‌باشد. به طوری که در محیط کشت MS پایه ۹۰ درصد و در محیط کشت MS تغییر یافته ۸ درصد شیشه‌ای شدن مشاهده شد (جدول ۴). این کاهش بخاطر تغییر در میزان عناصر ماکرو، استفاده از صفحه جدا کننده در بیوراکتورها و کاهش تعداد دفعات تغذیه مواد غذایی در روز (از سه بار به یک بار تغذیه) می‌باشد. گیاهان حاصل از محیط کشت MS تغییر یافته در مقایسه با محیط کشت MS، از نظر کیفی برتری نشان دادند (شکل ۳).

جدول ٤- مقایسه میانگین درصد شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها در بیوراکتور

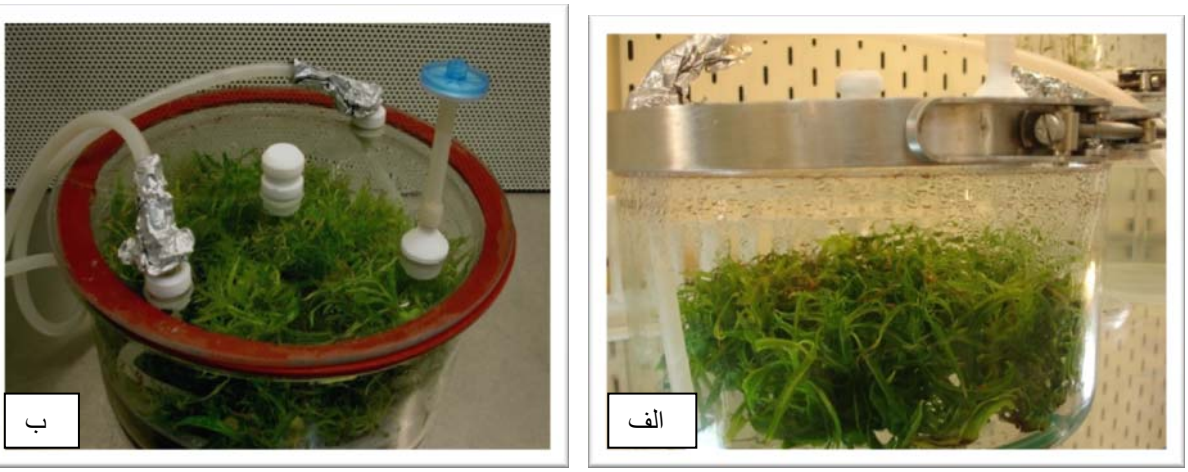
محیط کشت	شیشه‌ای شدن (درصد)
MS پایه	۹۰a
MS تغییر یافته	۸b

بحث

محیط کشت مایع برای ریزازدیادی گیاهان، محیط ایده آلی است زیرا سیستم‌های کشت مایع، محیط یکنواخت‌تری را برای رشد فراهم می‌کنند و مواد غذایی بدون اینکه ظروف عوض شوند، قابل تجدید هستند. از طرف دیگر، استریل نمودن محیط کشت مایع با استفاده از فیلتر به آسانی امکان پذیر است. در مقایسه با کشت‌های نیمه جامد، در این روش می‌توان از ظروف بزرگتر استفاده نمود و از افزایش زمان انتقال بهره برد. ریزازدیادی به کمک روش‌های مرسوم نیاز به زمان و نیروی کار زیادی دارد که برای غلبه بر این مشکل استفاده از کشت-های مایع در حال حرکت توصیه می‌شود. در این روش 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 (۱۴). استفاده از بیوراکتورها برای ریزازدیادی گیاهان، سیستم مناسبی از کشت مایع است که باعث اجتناب از کار فراوان می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد که صفات رشد رویشی از قبیل سرعت پرآوری، طول شاخه، وزن‌تر (گرم) و وزن خشک (گرم) به عنوان شاخص رشد در محیط کشت مایع بطور معنی‌دار ($P<0.01$) نسبت به محیط‌های ژله‌ای افزایش داشته است (جدول ۲). بطور کلی این برتری محیط کشت مربوط به بالا بودن پتانسیل آب محیط کشت، در دسترس و قابل جذب بودن عناصر توسط ریزنمونه‌ها، عدم تثبیت عناصر به شبکه ژل می‌باشد در روش

بیوراکتور از محیط کشت مایع استفاده می‌شود و اندام‌های هوائی گیاه مدت کوتاهی (۱۰ دقیقه) در تماس با محیط کشت بوده، سطح تماس اندام‌های گیاهی با محیط کشت بیشتر و تهویه به نحو مطلوبی انجام گرفته و اتیلن از محیط حذف می‌گردد بنابراین فضای کافی جهت رشد در اختیار می‌باشد و نتیجتاً گیاه از سرعت رشد بالائی برخوردار است (۳۱). در این پژوهش هم بهترین نتایج در بیوراکتورها حاصل شد (جدول ۳).

وضعیت فیزیولوژیکی شاخه‌های تکثیر شده در بیوراکتور به علت شرایط متفاوت محیطی یعنی ترکیب گازهای داخل ظرف، رطوبت نسبی، نحوه تغذیه و توان اتوتروفی بالفعل نسبت به شاخه‌های تولید شده در سیستم های ثابت و پیوسته، متفاوت بوده و بالطبع عکس العمل این شاخه‌ها نسبت به تیمارهای یکسان می‌تواند متفاوت باشد. به عنوان مثال تهویه هوا که در بیوراکتور انجام می‌شود یکی از عوامل ایجاد کننده این تفاوت‌هاست (۳). اتیلن تولید شده توسط گیاه موجب کاهش رشد و بروز شکل‌های غیر طبیعی در گیاه می‌شود لذا استفاده از سیستم بیوراکتور تناوبی که منجر به حذف اتیلن از محیط رشد گیاه می‌شود موجبات افزایش رشد گیاه را فراهم نموده و تعداد شاخه بیشتری از هر ریز نمونه، طول شاخه بلندتری تولید نموده است. هم چنین گیاهان رشد یافته در بیوراکتور از حیث ریشه‌دهی مستعدتر و انتقال به گلدان با موفقیت بیشتری انجام می‌گیرد. بیشترین میانگین‌های سرعت پرآوری، طول شاخه (سانتی‌متر)، وزن‌تر (گرم) و وزن خشک (گرم) در بیوراکتور دو پارچه بدست آمد (جدول ۳). نتایج این پژوهش با نتایج کشت در محیط غذایی مایع با استفاده از یک سیستم غوطه‌ورسازی موقت با تعداد دفعات متفاوت غوطه‌ورسازی برای بهبود کیفیت گیاه و افزایش نرخ تکثیر موز، قهوه، مطابقت داشته است (۸، ۱۳ و ۲۸). لورنزو و همکاران ، اثر تهویه بر افزایش کیفیت جوانه‌های موز را با بیوراکتور تناوبی مورد بررسی قرار دادند. آنها با بهبود تهویه و افزایش اکسیژن مورد نیاز گیاه و جلوگیری از تجمع گازهای $C0_2$ و C_2H_4 توانستند میزان تکثیر، ارتفاع جوانه و تعداد برگ را در مقایسه با سیستم متداول درون شیشه افزایش دهند (۲۰). ریزازدیادی سیب در بیوراکتور توسط ژو و همکاران گزارش شد (۳۰). آنها گزارش کردند که استفاده از بیوراکتور تناوبی در مقایسه با سیستم پیوسته میتواند یک سیستم مفید برای ریزازدیادی سیب باشد زیرا این سیستم می‌تواند شیشه‌ای شدن را کاهش و تولید گیاهان قوی و نرمال را افزایش دهد که این نتایج هم در این تحقیق بدست آمد. ریزازدیادی سیب در بیوراکتور تناوبی گزارش شد (۱۱ و ۱۲). ژو و همکاران شاخه‌زایی سیب را در دو نوع بیوراکتور تناوبی و پیوسته مقایسه کردند نتایج آنها نشان داد که بیوراکتور تناوبی شیشه‌ای شدن را کاهش می‌دهد و شاخه‌های بیشتر با کیفیت بهتر نسبت به سیستم پیوسته تولید می‌کند (۳۱). کابریرا جوا و همکاران با مقایسه تولید ریز غده سیب زمینی در دو سیستم کشت نیمه جامد و بیوراکتور تناوبی گزارش کردند که استفاده از بیوراکتور تناوبی باعث تولید تعداد بیشتری ریزغده با میانگین وزن بالاتر نسبت به سیستم کشت نیمه جامد می‌شود (۱۰).



شکل ۳- مقایسه شیشه‌ای شدن در بیوراکتور الف) گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت MS پایه ب) گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت MS تغییر یافته

منابع

۱- داودی د. و روزبه ف. ۱۳۷۸. طراحی و ساخت یک بیوراکتور تناوبی ساده برای ریزازدیادی از طریق شاخه‌زایی. مجموعه مقالات نخستین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. ۳: ۱۱۵۹-۱۱۵۵.

۲- فراهانی ف.، مجد ا. و ضرغامی ر. ۱۳۷۸. طراحی و ساخت بیوراکتور ناپیوسته در کشت گیاه موز (*Musa acuminate* L.). مجموعه مقالات نخستین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. ۳: ۱۱۲۰۰-۱۱۹۹.

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

4- Aitken-Christie J. 1991. Automation. In: Debergh P.C. and Zimmerman R.H. (Eds.), Micropropagation: Technology and application. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands, Pp. 363-388.

5- Aitken-Christie J., Kozai T. and Takayama S. 1995. Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. In: Aitken-Christie J., Kozai T. and Smith M.L.A. (Eds.), Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands, Pp. 1-18.

6- Akita M., Shigeoka T., Koizumi Y. and Kawamura M. 1994a. Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. Plant Cell Reports, 13:180-183.

7- Akita M. and Takayama S. 1994b. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuos liquid medium surface level control. Plant cell Reportes, 13: 184-187.

8- Alvard D., Cote F. and Teisson C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 32: 55-60.

9- Archambault J., Williams R.D., Lavoie L., Pepin M.F. and Chavarie C. 1994. Production of somatic embryos in a helical ribbon impeller bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, 44: 930-943.

10- 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.

11- Chakrabarty D., Hahn E.J., Yoon Y.S. and Paek K.Y. 2003. Micropropagation of apple root stock "M9 EMLA" using bioreactor. The Journal of Horticultural Science Biotechnology, 78: 605-609.

12- Chakrabarty D. Park S.Y., Ali M.B., Shin K.S. and Paek K.Y. 2006. Hyperhydricity in apple: physiological and ultrastructural aspects. Tree Physiology, 26: 377-388.

13- Etienne H., Lartaud M., Michaux-Ferrirere N., Carron M.P., Berthouly M. and Teisson C.1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg) using the temporary immersion technique. In Vitro Celluar Development Biology Plant, 33:81-87.

14- Etienne H. and Berthouly M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 69: 215-231.

15- Fasolo F., Malavasi F. and Ranieri R. 1987. Preliminary investigation on *in vivo* rooting of micropropagation of GF-677, peach rootstock. Acta Horticulturae, 212: 181-287.

16- Hale S.A., Young R.E., Adelberg J.W., Keese R.J. and Camper N.D. 1992. Bioreactor development for continual-flow liquid plant tissue culture. Acta Horticulturae, 319:107-112.

17- Hartmann HT., Kester DE. and Davies FT. 1990. Plant propagation, principles and practices. Prentice-Hall International, New Jersey, USA. Pp.145-89.

18- Jay V., Genestier S. and Courduroux J.C. 1994. Bioreactor studies of the effect of the medium pH on carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 36: 205-211.

19- Levin R., Gaba V., Tal B., Hirsch S., Denola D. and Vasil I.K. 1988. Automated plant tissue culture for mass propagation. Biotechnology, 6: 1035-1040.

20- Lorenzo J.C., Ojeda A., Espinosa and Carlosborroto. 2001. Field performance of temporary immersion bioreactor-derived sugarcane plants. In Vitro Celluar Development Biology Plant, 37:803-806.

21- Murashige T. and Skooge F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiology Plant, 15: 473-497.

22- Nadel B.L., Altman A. and Ziv M. 1990. Regulation of large scale embryogenesis in celery. Acta Horticulturae, 280: 75-82.

23- Scragg A.H. 1990. Fermentation systems for plant cells. In: Charlwood B.V. and Rhodes M.J.C. (Eds.) Secondary products from plant tissue culture. Clarendon Press. London. Pp. 243-263.

24- Scragg A.H. 1992. Large-scale plant cell culture: methods, applications and products. Current Opinion in Biotechnology, 3: 105-109.

25- Tabachnik L. and Kester D.E. 1977. Shoot culture for almond and almond peach hybrid clones invitro. Horticulturae Science, 12 (6): 545-547.

26- Takayama S. and Akita M. 1994. The type of bioreactor used for shoots and embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 39: 147-157.

27- Takayama S. and Akita M. 1998. Bioreactor techniques for large-scale culture of plant propagules. Advance Horticulture Science, 12: 93-100.
28-Teisson C. and Alvard D. 1995. A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion. P. 105-110. In: M. Terzi et al, (Eds.), Current issues in plant molecular and cellular biology. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands.
29- Vasil I.K. 1994. Automation of plant propagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 39: 105-108.
30- Vishnevetsky J., Azizbekova N., Ziv M and Lilien-Kipnis H. 1997. Development of the bulb and inflorescence in outdoor grown *Nerine sariensis*. Acta Horticulturae, 430: 147-154.
31- Zhu L.H. and Welander M. 2005. Optimization of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 81: 313-318.
32- Ziv M. 2000. Bioreactor Technology for Plant Micropropagation. Horticultural Reviews; Volume 24; Edited by Jules Lanick; Lohn Wiley ans Sons, Inc.
33- Ziv M., Kahavy S. and Lilien-Kipnis H. 1994. Scale-up proliferation and regeneration of Nerin in liquid cultures. Part I, The induction and maintenance of proliferating meristematic cultures by paclobutrazul in bioreactors. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 39: 109-117.