بسم الله الرحمن الرحيم

نوع نشریه: دستورالعمل فنی
نام نشریه: سالم‌سازی گیاهچه ارقام مختلف سیب‌زمینی به منظور تولید هسته اولیه بذر (مینی تیوبر)
نویسندگان: مرتضی ابراهیمی، رضا ضرغامی، علی اکبر حبشی، آرش مختاری
ویراستاران علمی:
ویراستاران ادبی: دکتر حسن رهنما و نسیبه چنارانی
طراحی: محمد قفلگر جداری
تهیه شده در: پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
شمارگان: ۳۰
نوبت انتشار: اول
سال انتشار: ۱۳۹۷
مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است.

شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی ۵۴۲۰۲ به تاریخ ۱۳۹۷/۰۶/۱۰ است

پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی

سالم‌سازی گیاهچه ارقام مختلف سیب زمینی به منظور تولید هسته اولیه بذر (مینی تیوبر)

دکتر مرتضی ابراهیمی، دکتر رضا ضرغامی

دکتر علی اکبر حبشی، مهندس آرش مختاری

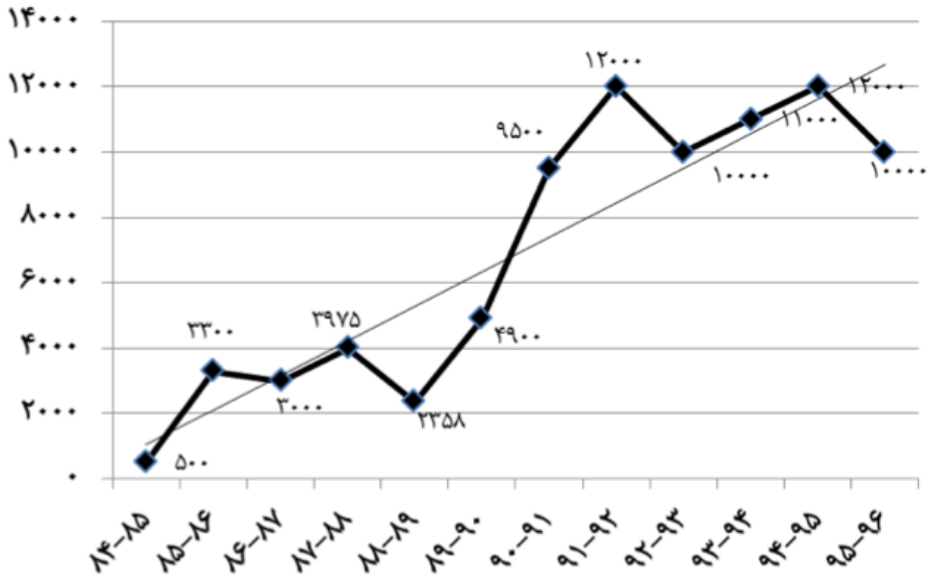
فهرست مطالب

۱ - مقدمه ۵
۲ - گیاه سیب‌زمینی ۹
۲-۱ - گرایش به تولید سیب‌زمینی ۱۰
۲-۲ - سیب زمینی به عنوان یک منبع غذایی و یک مادهٔ اولیه ۱۱
۲-۳ - تکثیر سیب‌زمینی ۱۲
۳ - بیماری‌های سیب زمینی ۱۵
۳-۱ - ویروس‌های متداول در سیب‌زمینی ۱۶
۳-۱-۱ - ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی (PLRV) ۱۷
۳-۱-۲ - ویروس M سیب زمینی (PVM) ۱۹
۳-۱-۳ - ویروس S سیب زمینی (PVS) ۲۰
۳-۱-٤ - ویروس Y سیب زمینی (PVY) ۲۱
۳-۱-۵ - ویروس x سیب زمینی (PVX) ۲۲
۳-۱-٦ - ویروس A سیب زمینی (PVA) ۲۳
٤ - گردش کار تولید گیاهچه سالم‌سازی شده ارقام مختلف سیب‌زمینی ۲٤
٤-۱ - مواد مورد نیاز ۲۵
٤-۲ - تهیه ارقام سیب‌زمینی ۲۵
٤-۳ - ضدعفونی سطحی ۲۸
٤-٤ - تیمار خواب‌شکنی ۲۹
٤-۵ - نگهداری و کشت ارقام تأییدشده سیب‌زمینی ۳۰
٤-٦ - سرزنی بوته‌ها ۳۲
٤-۷ - ترموتراپی یا گرمادرمانی ۳۳
٤-۸ - مریستم برداری ۳٤
٤-۹ - کشت مریستم ۳۵
٤-۱۰ - شیمی‌درمانی ۳۸
۵ - تأیید سلامت و اصالت ۳۹
۵-۱ - تأیید سلامت ۳۹
۵-۲ - تأیید اصالت مورفولوژیکی ۳۹
۵-۳ - تکثیر ارقام تأییدشده ٤۰
۵-٤ - معرفی شرکت‌های خصوصی ٤۱
۵-۵ - طرز تهیه محیط کشت MS ٤۲
۵-۵-۱ - تهیه محلول‌های ذخیره ٤۲
۵-۵-۲ - تهیه استوک عناصر پرمصرف با غلظت ۱۰ برابر ٤۲
۵-۵-۳ - تهیه استوک عناصر کم مصرف با غلظت ۱۰۰ برابر ٤۳
۵-۵-٤ - تهیه استوک آهن MS ٤٤
۵-۵-۵ - تهیه استوک ویتامین‌های محیط MS ٤٤
۵-۵-٦ - تهیه استوک برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ٤۵
۵-٦ - طریقه ساخت محیط کشتMS ٤٦
منابع ٤۷

۱ مقدمه

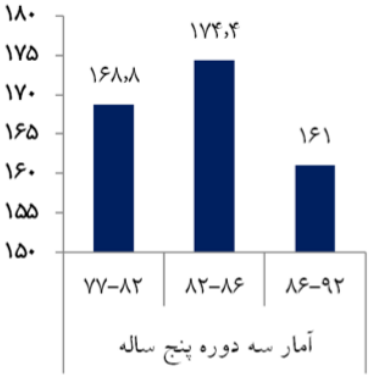
سیب زمینی با تولید بیش از ۳۷٦ میلیون تن غده، جزو چهار محصول اول جهان قرار دارد. ارزش غذایی و طعم و مزه مطلوب غده این گیاه سبب فراگیری زراعت آن در جهان شده است به گونه‌ای که برخلاف گذشته در سال‌های اخیر کشورهای آسیایی مانند چین و هند جزء بزرگ‌ترین تولیدکنندگان سیب زمینی در جهان به شمار می‌روند. در ایران نیز حدود ۱٦۰ هزار هکتار از اراضی زراعی زیر کشت این محصول قرار دارد و سالانه حدود ۵ میلیون تن سیب زمینی تولید می‌شود. با این حجم از تولید ایران در جایگاه سیزدهم جهانی قرار گرفته است. تکثیر مرسوم سیب زمینی به گونه‌ای است که در زراعت آن از غده به عنوان بذر نام برده می‌شود. چنین بذری مستعد تجمع و انتقال انواع بیماری‌های باکتریایی، قارچی، ویروسی و ویرویدی از نسل‌های قبلی به نسل جدید است. تجمع چنین عواملی درنهایت می‌تواند منجر به حذف کل محصول شود؛ بنابراین تولید بذر سالم در سیب زمینی فرآیندی بی وقفه و همه ساله است که در آن از روش‌های نوین بیوتکنولوژی استفاده می‌شود. طی سال‌های قبل از ۱۳۸٤ سعی شده تا بذر مورد نیاز با واردات از کشورهای عمدتاً اروپایی تأمین شود. واردات چنین حجمی از غده بذری نه تنها سبب خروج سالیانه مقدار زیادی ارز می‌شده بلکه در کنار به خطر افتادن امنیت غذایی کشور، سبب ورود انواع مختلفی از آفات خطرناک قرنطینه‌ای نیز شده است. پرواضح است که هزینه‌های مستقیم و غیرمستقیم کنترل چنین آفات و امراضی می‌تواند بسیار جبران ناپذیر باشد (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹٤).

در این رابطه برنامه خودکفایی تولید هسته اولیه بذر سالم در سیب زمینی یا مینی تیوبر از سال ۱۳۸٤ در کشور شروع شده و کلیه مراحل تولید گیاهچه سالم و مینی تیوبر سازی گردیده است. روند رو به رشد این فرآیند به گونه‌ای بوده که امروزه با داشتن تعداد ۲۵ آزمایشگاه فعال و تولید بیش از ۱۰ میلیون عدد مینی تیوبر (نمودار ۱) تأیید شده، تمامی غده مورد نیاز کلاس سوپر الیت از ارقام مختلف موجود در داخل کشور تأمین می‌شود. طبق برآوردها و نیز اظهارات شرکت‌های فعال، مجموع توان تولید آن‌ها امروزه به حدود ۲۵ میلیون مینی تیوبر بالغ می‌شود. ازنظر تنوع رقم نیز در سالیان گذشته سعی گردیده تا با هماهنگی وزارت جهاد کشاورزی و سازمان‌ها و مراکز ذی‌ربط، تعداد مطلوبی از ارقام مناسب سالم‌سازی و در اختیار تولیدکنندگان قرار داده شود. تعداد ارقام سالم‌سازی شده در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی از سه رقم در سال‌های نخست به ۱۱ رقم در سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۵ بالغ گردید.

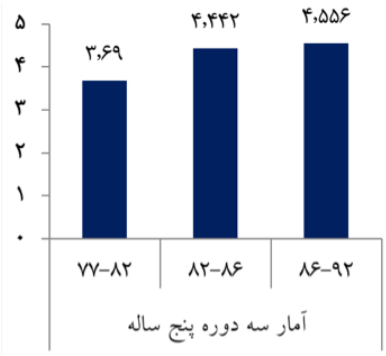


نمودار ۱- نمایش روند تولید مینی تیوبر در ایران طی سال‌های ۱۳۸٤ الی ۱۳۹٦ (نمودار افقی). تعداد مینی تیوبر (مقیاس ۱۰۰۰X)(محور عمودی). منبع: دفتر محصولات علوفه‌ای و جالیزی وزارت جهاد کشاورزی.

بررسی آمارها نشان می‌دهد که مصرف غده بذری سالم از سال‌های ۱۳۸٦ به بعد سبب گردیده تا علیرغم کاهش سطح زیر کشت، شاهد افزایش عملکرد نیز باشیم (نمودار ۲ و ۳). بر اساس آمارهای موجود، میانگین عملکرد کشت آبی سیب زمینی در کشور طی سال‌های اخیر از مرز ۳۰ تن گذشته و در سال زراعی ۹٤-۹۳ به حدود ۳۲ تن در هکتار افزایش یافته که این میزان بیش از میانگین جهانی است (آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۹٤-۱۳۹۳- وزارت جهاد). در سال زراعی ۹٤-۱۳۹۳، از مجموع حدود ۱٦۰ هزار هکتار سطح زیر کشت سیب‌زمینی، بالغبر ۵/۱٤ میلیون تن سیب زمینی برداشت شده است. این ارقام در مقایسه با سال‌های گذشته (نمودارهای ۲ و ۳) به‌خوبی افزایش عملکرد در واحد سطح را نشان می‌دهد.

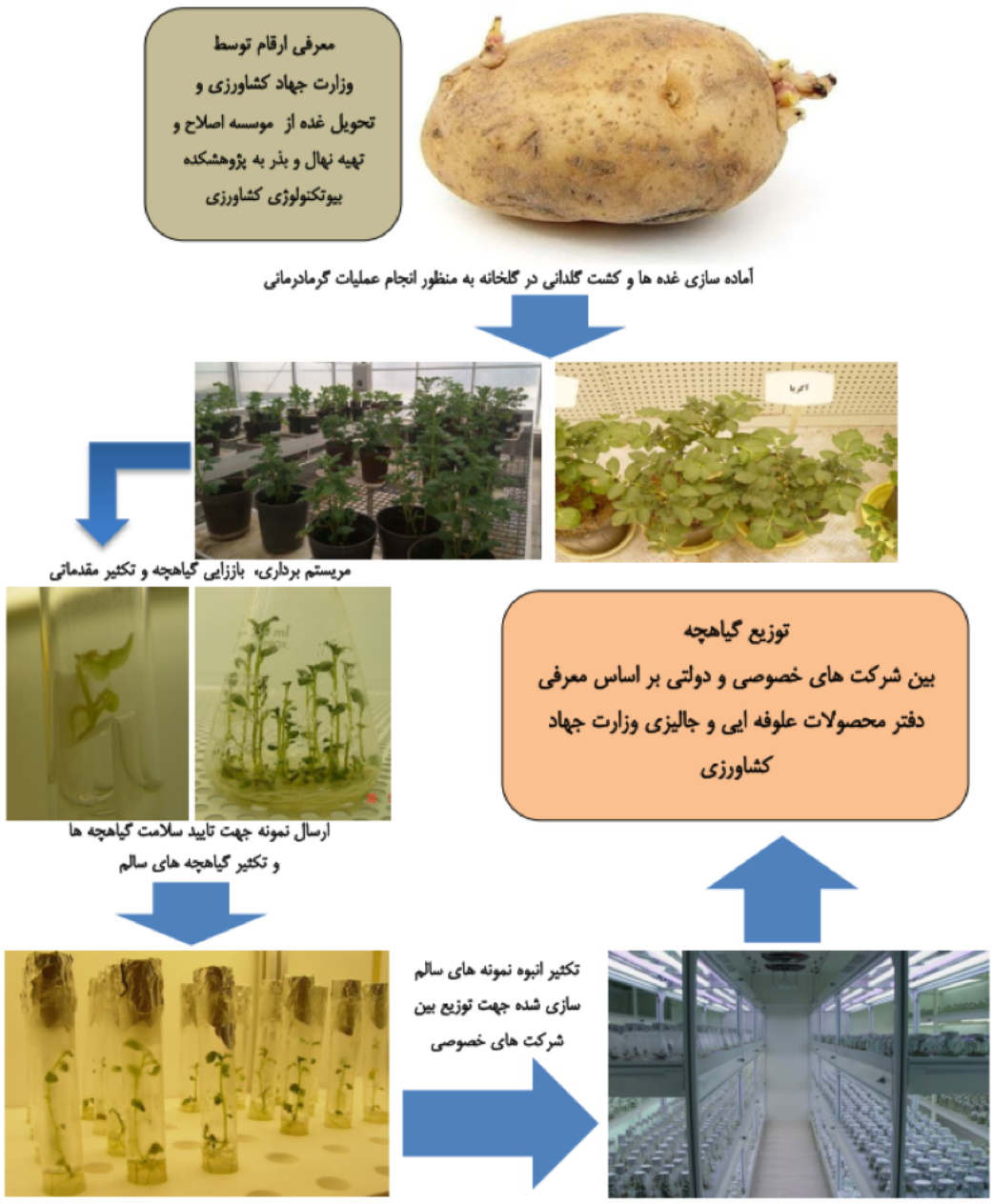


نمودار ۲- میانگین سطح زیر کشت سیب زمینی (محور عمودی- هزار هکتار) در کشور طی سه دوره پنج‌ساله ۸۲-۷۷، ۸۶-۸۲ و ۹۲-۸۶ (محور افقی)



نمودار ۳- میانگین عملکرد سیب زمینی (محور عمودی- میلیون تن) در کشور طی سه دوره پنج‌ساله ۸۲-۷۷، ۸۶-۸۲ و ۹۲-۸۶ (محور افقی).

در طی سالیان گذشته و به موازات توانمند شدن بخش خصوصی، کلیه مراحل تولید مینی تیوبر و سایر طبقات بذری، غیر از هسته اولیه، به بخش خصوصی واگذار شده است. هم اکنون شرایط لازم برای واگذاری تولید هسته اولیه بذری به شرکت‌های خصوصی فراهم شده و لذا ضروری است تا با معرفی روش‌ها و دستور العمل‌های موجود در فرآیند تولید گیاهچه سالم‌سازی شده سیب زمینی که اولین و مهم‌ترین مرحله این چرخه است، تمامی مراحل از بخش دولتی به بخش خصوصی واگذار شود؛ بنابراین، در این مجموعه سعی گردیده است تا روش استاندارد موجود در کشور جهت تهیه گیاهچه اولیه سالم‌سازی شده سیب زمینی (شکل ۱)، برای بهره‌برداری عملیاتی در بخش خصوصی به صورت گام‌به‌گام معرفی شود.



شکل ۱: فرآیند تولید گیاهچه سالم‌سازی شده ارقام مختلف سیب زمینی در ایران

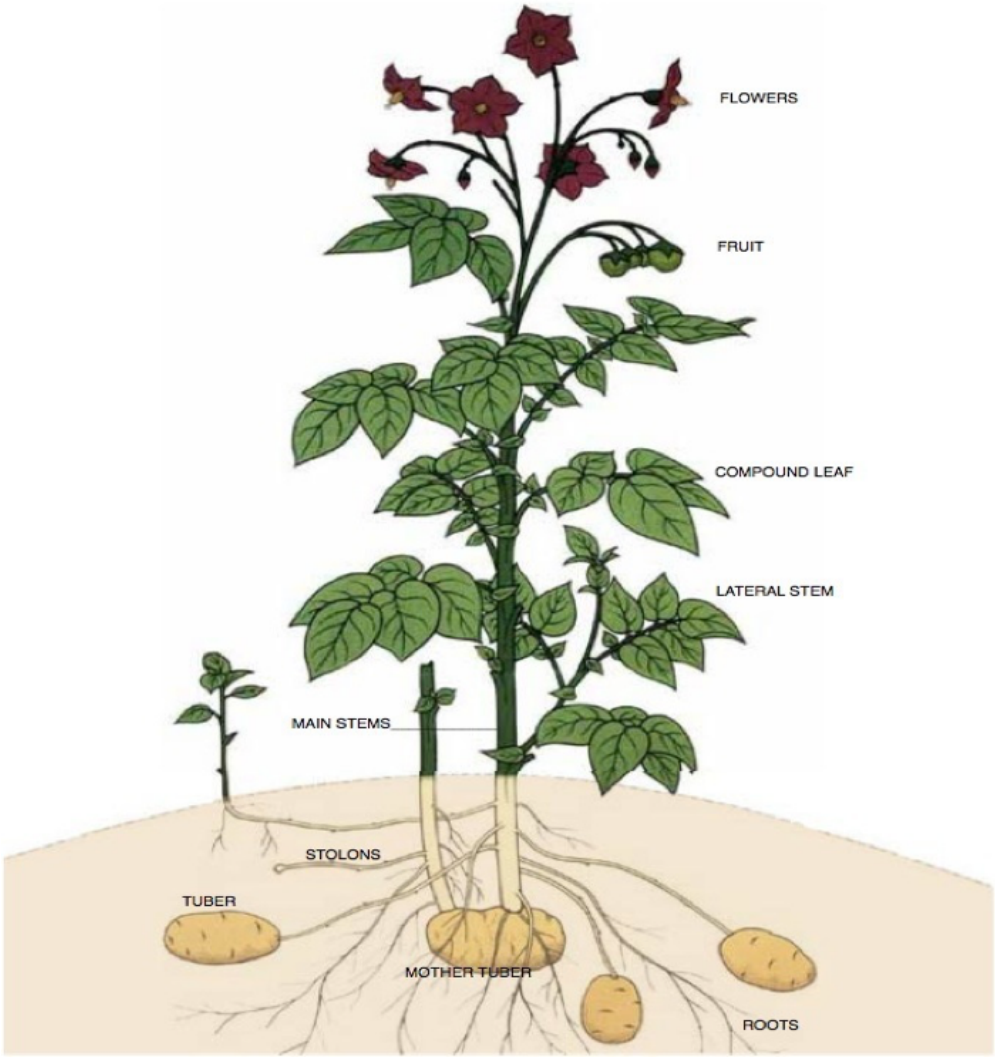
۲ گیاه سیب زمینی

سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) که با نام‌های سیب زمینی ایرلندی و سیب زمینی سفید نیز شناخته می‌شود، گیاهی یک‌ساله، از جنس Solanum و خانواده Solanaceae می‌باشد(Khurana, Minhas, & Pandey, 2003) . این گیاه بومی منطقه آندا در نزدیکی مرز پرو و بولیوی، در آمریکای جنوبی است (Pushkarnath, 1976; ROWE, 1993). سیب زمینی در اواخر قرن ۱۶ از آمریکای جنوبی به اروپا (ابتدا اسپانیا و سپس انگلستان) وارد و بعد از آن به آسیا و سایر کشورهای جهان منتقل شد (Harris, 2012). در سال ۱۵۹۶ فردی بنام بائوهین نام لاتین *Solanum tuberosum* را به گونه وارد شده به اروپا نسبت داد و پس از آن لینه در سال ۱۷۵۳ آن را تأیید کرد (Tadesse, 2000).

گونه‌های بسیار متنوعی شامل *Solanum tuberosum* L.، *S.ajanhuiri*، *S. stenotomum*، *S. curtilobum*، *S. caucha*، *S. goniocalyx*، *S. phureja*، *S. juzepczukii*، Struik & Wiersema 1999 و بالغ بر ۲۳۰ خویشاوند وحشی نیز برای این گیاه شناخته شده است (Harris, 2012).

سیب زمینی گیاهی روز کوتاه(Went, 1957) ، سردسیری (Ewing, 1981) و جزء گیاهان C۳ بوده که نقطه اشباع نوری آن پایین می‌باشد (Demagante & Vander Zaag, 1988). سیب زمینی به عنوان یک گیاه علفی، آبدار، دو لپه‌ای با استولون‌های زیر زمینی و برگ‌های متناوب بر روی شاخه‌های موجود در سطح زمین، شناخته می‌شود. یک گیاه سیب زمینی می‌تواند ۳ نوع ساقه داشته باشد: ساقه‌های برگی، استولون‌ها و تیوبرها. تیوبرها که در زیر زمین قرار گرفته‌اند، ساقه‌های گوشتی هستند که در سطح آنها چشم‌هایی وجود دارد (شکل ۲). تیوبرها به صورت تازه، محصولات غذایی فراوری شده، بذر، خوراک دام و مصارف غیر صنعتی دیگر استفاده می‌شوند (Beukema & van der Zaag, 1990; Struik & Wiersema, 1999) . یک گیاه سیب زمینی که از غده‌های بذری به وجود آمده، ۵ مرحلهٔ مختلف را طی می‌کند: مرحله تشکیل شاخهٔ برگی، مرحلهٔ رشد رویشی، مرحلهٔ ظهور غده، مرحلهٔ تورم[1] غده و در نهایت مرحلهٔ بلوغ (ROWE, 1993).

[1] - Bulking



شکل ۲- شمای کلی از بخش‌های مختلف گیاه سیب زمینی

۲-۱ گرایش به تولید سیب زمینی

سیب زمینی یکی از مهمترین منابع غذایی است که در بسیاری از کشورها در نواحی آب و هوایی مختلف ازجمله در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری کشت و کار می‌شود. این محصول پس از گندم، ذرت و برنج با تولید ۳۰۹ میلیون تن در سال مقام چهارم را در جهان به خود اختصاص داده است (Li, 2012). مطابق گزارش CIP (www.cipotato.org/market/potatofacts/growprod.htm)، سرعت رشد سالانه برای سیب

زمینی در طول سال‌های ۱۹۶۳ تا ۲۰۲۰ حدود ۲/۷۱ درصد و سیب زمینی یکی از مهمترین محصولات غذایی در سبد غذایی کشورهای در حال توسعه خواهد بود. در طول این دوره، افزایش ٤٠ درصدی در تقاضای جهانی سیب زمینی پیش‌بینی می‌شود. امروزه جمعیت جهان به طور چشمگیری رو به افزایش است. بر اساس پیش بینی‌های به عمل آمده جهان در سال ۲۰۵۰ با جمعیتی حدود ۹/۵ میلیارد نفر رو به رو است (United Nations & Affairs, 2002). تأمین غذای چنین جمعیت انبوهی با نگرانی‌های بسیاری مواجه است. در میان محصولات غذایی تأمین کننده غذای جوامع بشری، سیب زمینی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. نام گذاری سال ۲۰۰۸ توسط سازمان خواروبار جهانی فائو به نام سیب زمینی مؤید این موضوع و نشانگر پتانسیل بالای این محصول مهم غذایی در تأمین غذای میلیاردها انسان بدون غذا می‌باشد.

۲-۲ سیب زمینی به عنوان یک منبع غذایی و یک مادهٔ اولیه

سیب زمینی نه تنها می‌تواند به عنوان غذای انسان و خوراک دام استفاده شود بلکه برای تولید غدهٔ بذری و کاربردهای صنعتی نیز مصرف می‌شود. در صنایع غذایی از سیب زمینی برای تولید چیپس، سیب زمینی سرخ کرده، پودر سیب زمینی[1] و کنسرو سیب زمینی[2] و تولید نشاسته و الکل نیز استفاده می‌گردد (Khurana et al., 2003; Struik & Wiersema, 1999). قبل از جنگ جهانی دوم، در کشورهای اروپای غربی حدود ۵۰ درصد از تولید سیب زمینی به عنوان غذای دام استفاده می‌شد اما این نسبت در اواسط دههٔ ۱۹۸۰ به ۲۰ درصد کاهش یافت (Horton, 1987) و در سال‌های اخیر نیز این روند کاهشی ادامه داشته است. در سال ۲۰۰۰، میزان ۵۹/۸ درصد از سیب زمینی تولیدی به عنوان غذا، ١٤/٥ درصد به عنوان خوراک دام، ۱۱ درصد به عنوان بذر، ٤/٣ درصد در صنایع غذایی، ۸ درصد به صورت تلفات و ۲/۲ درصد در کاربردهای غیرصنعتی دیگر استفاده شد(Khurana et al., 2003). نشاستهٔ سیب زمینی در تهیهٔ بسیاری از محصولات غذایی که مردم روزانه در سراسر جهان استفاده می‌کنند، به کاربرده می‌شود. به عنوان مثال، نشاسته یکی از مهمترین مواد مصرفی در صنایع کاغذ و مقواسازی است (McDonagh, 2012).

غده‌های سیب زمینی حاوی ۷۷/۵ درصد آب، ۲۲/۵ درصد مواد جامد شامل ۲ درصد پروتئین، ١٩/٤ درصد کربوهیدرات (با ۰/٦ درصد فیبر خام)، ۱ درصد چربی و ۱ درصد خاکستر می‌باشند. سیب زمینی حاوی عناصر معدنی مهمی همچون آهن (۰/۰۱ درصد)، سولفور (۰/۱۵ درصد)، منیزیم (۱ درصد)، کلسیم (۰/۰۵

[1] - Flaks
[2] - Canned potato

درصد)، پتاسیم، بر، مس، سیلیکون، منگنز، ید و فلوئور است که برای سلامتی انسان ضروری هستند (Salaman, Burton, & Hawkes). سه نوع قند (ساکاروز، گلوکز و فروکتوز) و نیز ترکیبات نیتروژنی مختلف (آمینواسیدهای آزاد، پروتئین‌های ذخیره‌ای و نیترات) در غدهٔ سیب زمینی وجود دارند(Talburt & Smith, 1967) .

سیب زمینی حاوی چربی بسیار کمی است (حدود ۵ درصد محتوای چربی گندم و یک چهارم کالری نان). همچنین سیب زمینی جوشیده، پروتئین بیشتری نسبت به ذرت دارد و مقدار کلسیم آن نیز نزدیک دو برابر، بیشتر است. تنها یک غدهٔ سیب زمینی (با اندازهٔ متوسط) حدود نیمی از نیاز روزانهٔ یک فرد بالغ به ویتامین C را تأمین می‌کند (Al□Saikhan, Howard, & Miller Jr, 1995). این درحالی است که بعضی از محصولات زراعی پر مصرف دیگر مثل برنج و گندم فاقد این ویتامین هستند. سیب زمینی غذایی سالم و حاوی تمامی عناصر غذایی بسیار ارزشمند در سلامتی و رشد انسان است (Pushkarnath, 1976). در مقایسه با ریشه‌ها و غده‌های دیگر و نیز بسیاری از غلات، غده‌های سیب زمینی نسبت پروتئین به کربوهیدرات بالاتری دارند(Shekhawat, Paul, Khurana, Pandey, & Chandla, 1994) .

۲-۳ تکثیر سیب زمینی

سیب زمینی را می‌توان به صورت جنسی (از طریق بذر که بذر حقیقی سیب زمینی نیز نامیده می‌شود) و غیر جنسی (از طریق غده) تکثیر کرد(Beukema & van der Zaag, 1990) . وضعیت فیزیولوژیکی و سلامتی غده‌های بذری از جمله مهم‌ترین عوامل مؤثر بر عملکرد سیب زمینی به شمار می‌آیند(Wiersema, 1984) . بطورکلی در سیستم‌های سنتی، غده‌های بذری برای تکثیر و تولید سیب زمینی استفاده می‌شوند (Struik & Wiersema, 1999). حدود ۱۱ درصد از محصول جهانی سیب زمینی در سال ۲۰۰۰، به مصرف بذر رسیده (Khurana et al., 2003) و کمتر از ۱۰ درصد درصد سطح زیر کشت سیب زمینی در هر سال، برای تولید غده‌های بذری سال بعد، نیاز است (Lommen, 1995) این در حالی است که غلات تنها ۳ درصد سطح کشت خود را برای تولید بذر سال بعد نیاز دارند. این روش معایبی دارد که از آن جمله می‌توان به سرعت پایین تکثیر، ناکارآمدی، احتمال زیاد ابتلا به بیماری‌ها (قارچی، ویروسی و باکتریایی) و آفات مختلف، نیاز به کنترل شدید و نیز زمین بیشتر اشاره نمود (Beukema & van der Zaag, 1990; Struik & Wiersema, 1999). بسیاری از آفات و بیماری‌ها می‌توانند از طریق غده‌ها منتقل شده که این باعث فسادپذیری غده‌ها

می‌شود. به علاوه تأسیسات انبارداری نسبتاً مجهزی برای نگهداری غده‌ها لازم است تا شرایط فیزیولوژیکی مناسبی در زمان کاشت فراهم شود. اگر چه این نیازها باعث افزایش هزینهٔ تولید و نگهداری غده‌های بذری سیب زمینی می‌شوند اما سهولت کاشت، یکنواختی غده‌ها و رشد بالای گیاهان حاصله، از جمله مزایای استفاده از غده‌های بذری برای تکثیر سیب زمینی هستند (Gopal, Minocha, & Dhaliwal, 1998). به طور کلی ۲/۵ تا ۳ تن غده برای تکثیر و تولید سیب زمینی در هر هکتار مورد نیاز است(Khurana et al., 2003) . شرایط انبارداری می‌تواند تلفات انبارداری، کیفیت غده، قوه نامیه غده و فساد پذیری غده‌های بذری را تحت تأثیر قرار دهد.

تحقیقات بر روی بذر مینی تیوبر سابقه حداقل ٤٠ ساله در جهان دارد، اما طی ۲۰ سال گذشته تولید تجاری آن شتاب قابل توجهی نسبت به دهه‌های قبل داشته و کشورهای تولیدکننده سیب زمینی بذری از آن به عنوان هسته اولیه برای تولید کلاس‌های بذری استفاده می کنند. کشورهای استرالیا، چین و ایالات متحده از عمده‌ترین تولید کنندگان مینی تیوبر در جهان بوده و مرکز تحقیقات بین‌المللی CIP جدیدترین فناوری‌های توسعه تولید مینی تیوبر را ارائه می‌نماید.

بذر مادری توسط کشاورزان آموزش دیده برای تکثیر و تولید کلاس‌های پائین‌تر بذور گواهی شده استفاده می‌شود، سپس سایر کشاورزان از بذرهای گواهی شده برای تولید سیب زمینی خوراکی و صنعتی استفاده می‌کنند. به طور معمول برای تولید سیب زمینی بذری در سطح تجاری چندین نسل تکثیر در مزرعه ضروری است. در طی این دوره گیاهان در معرض شرایط طبیعی مانند تنش‌های زنده و غیر زنده و تأثیر غیر قابل کنترل عوامل مؤثر برکیفیت فیزیولوژیکی محیطی بر روی گیاه و خطر آلودگی گیاهان به آفت‌ها و بیماری‌های قابل انتقال از نسلی به نسل دیگر، قرار می‌گیرند. تحت این شرایط ممکن است آلودگی بروز کند؛ بنابراین حفظ و کنترل سلامت گیاه، مسئله اساسی است.

تلاش‌های مراقبتی کشاورزی در جهت رسیدن به حداکثر نرخ تکثیر و تولید محصول انبوه از غده‌هایی با اندازه بذری، حفظ سلامت بذر و برداشت غده‌ها، در زمان مناسب متمرکز می‌شود تا کنترل اقتصادی بیماری‌ها، کیفیت خوب برای تازه خوری یا فرآوری و حصول حداکثر عملکرد نیز عملی گردد.

به دلیل مشکلات مرتبط با تولید و استفاده از غده‌های سیب زمینی در کشورهای در حال توسعه، محققین اغلب به دنبال راه‌های جایگزین برای تولید مواد گیاهی با تکیه بر استفاده از بذر حقیقی سیب زمینی[1] (TPS

[1] - True Potato Seed (TPS)

) بوده‌اند. استفاده از TPS برای تولید غده بذری احتمالاً از کوه‌های آند منشأ گرفته است. بذر حقیقی سیب زمینی هزاران سال در امریکای جنوبی و به منظور تجدید ذخیره بذری و بهبود تولید استفاده شده است. در خلال قرون ۱۸، ۱۹ و ۲۰ میلادی، کشاورزان اروپا، آمریکای شمالی و آسیا از TPS برای جایگزینی مواد گیاهی فساد پذیر یا تولید مواد قابل کشت در زمان عدم دسترسی به غده استفاده می‌کردند. در مناطق کوهستانی چین؛ جایی‌که نشاءکاری میزان زیاد غده‌های بذری عملی نمی‌باشد، TPS به وفور در سال‌های ۱۹۷۰-۱۹۶۰ میلادی توسط زارعین بکار رفت تا مواد گیاهی قابل کشت خود را تأمین نمایند. جذابیت و تلاش‌های تحقیقاتی برای نمایان ساختن پتانسیل TPS در کشورهای در حال توسعه توسط مرکز بین المللی سیب زمینی (CIP) در سال ۱۹۷۷ رقم خورد. درحال حاضر، تعداد اندکی از کشورهای درحال توسعه وجود دارند که TPS در آنها مورد تحقیق قرار نگرفته و یا به عنوان ابزاری برای غلبه بر مشکلات بذر مورد توجه قرار نگرفته است.

۳ بیماری‌های سیب زمینی

در بین گیاهان زراعی، بالاترین میزان مصرف آفت‌کش‌ها به سیب زمینی تعلق دارد؛ زیرا مورد حمله تعداد زیادی آفت و بیماری گیاهی در گستره جغرافیایی وسیع قرار می‌گیرد. به دلیل استفاده معمول از غده بذری برای کشت و تکثیر سیب زمینی و احتمال آلودگی در این غده‌ها، شیوع آلودگی به سرعت رخ داده که موجب ایجاد خسارت اقتصادی در کمیت و کیفیت محصول خوراکی می‌شود.

بیماری‌های باکتریایی مانند پژمردگی باکتریایی، ساق سیاه، پوسیدگی حلقوی و جرب (اسکب) معمولی در سیب زمینی گزارش شده‌اند. جرب پوردی، بادزدگی سیب زمینی، پوسیدگی صورتی، سفیدک سطحی، لکه بومی، پوسیدگی سیاه، شانکر ساقه، پوسیدگی خشک فوزاریومی، پژمردگی ورتیسیلیومی و سیاهک از جمله بیماری‌های قارچی مهم در سیب زمینی هستند.

از بین آفات و بیماری‌های سیب زمینی، ویروس‌ها از درجه اهمیت بالایی برخوردار هستند.

ویروس‌ها عوامل بیماری‌زای بسیار ریزی هستند که فقط با میکروسکوپ‌ها الکترونی قابل دیدن بوده و تنها وقتی که وارد سلول زنده شوند فعالیت حیاتی داشته و زنده محسوب می‌شوند. ویروس‌های گیاهی، ویروس‌هایی هستند که در گیاهان تولید بیماری می‌کنند. ویروس‌ها به گیاهان زراعی خسارت

عمده‌ای وارد می‌سازند. ماده ژنتیکی اکثر ویروس‌های گیاهی آر.ان.آ[1] (RNA) است. ویروس‌ها باعث بروز تغییرات در گیاه می‌شوند. آلودگی سلول‌های گیاهی توسط ویروس‌ها به طور قابل توجهی متفاوت از عفونت سلول‌های حیوانی است. گیاهان دارای دیواره سلولی سفت و سخت متشکل از سلولز بوده و درنتیجه ویروس‌ها باید به سیتوپلاسم میزبان توسط برخی از فرآیندهای آسیب‌زا وارد شوند (نیکان، ۱۳۹۵). کاهش محصول ناشی از بیماری‌های ویروسی محدود به سالی که در آن آلودگی اتفاق می‌افتد نمی‌شود بلکه هر ساله بر میزان آلودگی محصول اضافه می‌شود؛ یعنی هر بار که بذر از محصول آلوده تهیه می‌شود، میزان آلودگی در سال بعد افزایش می‌یابد و به همان میزان عملکرد محصول سال به سال کاهش پیدا می‌کند و در اصطلاح گفته می‌شود که توده بذری اولیه تحلیل رفته است. این تحلیل عمدتاً در نتیجه افزایش تدریجی بیماری‌های ویروسی است. تحلیل بذر با علائمی مانند رشد اندک، پیچیدگی و زردی عمومی بوته‌ها مشخص می‌شود که با تعداد کم و ریزی غده‌های تولیدی همراه است و درنتیجه عملکرد کاهش پیدا می‌کند؛ بنابراین لازم است هرچند سال یک بار توده بذری سالم و جدید وارد چرخه تولید شود؛ این کار به خصوص در کشورهایی که وارد کننده بذر سیب زمینی هستند مستلزم صرف هزینه زیادی است. اگر در طول فصل رشد در مزارع تولید بذر، کنترل بیماری‌ها به خصوص بیماری‌های ویروسی به خوبی انجام شود، نیاز به واردات توده بذری جدید در چرخه تولید دیرتر اتفاق می‌افتد. مثلاً در شرایطی که کنترل بیماری‌های ویروسی به درستی انجام نشود ممکن است هر ۳ سال نیاز به استفاده از بذر جدید باشد در حالی که اگر کنترل این بیماری‌ها به خوبی انجام شود ممکن است هر ۵ سال یا بیشتر نیاز به انجام این کار باشد. سیب زمینی در مرحله رشد رویشی و قبل از گلدهی بیشترین حساسیت را به ویروس‌های گیاهی دارد و با مسن شدن بوته‌ها حساسیت آن کم می‌شود (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹٤؛ نیکان، ۱۳۹۵).

۳-۱ ویروس‌های متداول در سیب زمینی

گزارش شده است که حداقل ۳۷ ویروس به طور طبیعی سیب زمینی را آلوده می‌کنند. به طور کلی ویروس‌هایی که سیب زمینی را آلوده می‌کنند به دو گروه تقسیم می‌شوند؛ گروه نخست که عوامل اصلی بیماری در سیب زمینی محسوب می‌شوند و در محصولات دیگر و علف‌های هرز نیز ایجاد بیماری می‌کنند (مانند ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی) و گروه دیگر که عوامل بیماری‌زای عمومی بوده و به

[1] - Ribonucleic acid

طور طبیعی در گونه‌های گیاهی بسیاری ازجمله سیب زمینی ایجاد بیمـاری می‌کنند که برای نمونه می‌توان به ویروس موزاییک یونجه اشاره نمود (نیکان، ۱۳۹۵).

از بین بیماریهای ویروسی متعدد در سیب زمینی، تعداد ٦ ویروس در ایران از اهمیت بسیار بالایی برخوردار بوده که در ذیل به آنها اشاره می‌شود:

- ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی[1] (PLRV)
- ویروس M سیب زمینی[2] (PVM)
- ویروس Y سیب زمینی[3] (PVY)
- ویروس S سیب زمینی[4] (PVS)
- ویروس A سیب زمینی[5] (PVA)
- ویروس X سیب زمینی[6] (PVX)

۳-۱-۱ ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی (PLRV)

مهم‌ترین ویروس سیب زمینی است که گسترش جهانی داشته و در تمام مناطق کشت این محصول در دنیا یافت می‌شود. ویروس PLRV اولین بیماری ویروسی سیب زمینی است که مطالعه شده است. اگر کل گیاهان مزرعه به این ویروس آلوده شوند، عملکرد تا حد ۵۰ درصد کاهش خواهد یافت. ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی معمولاً در مراحل اولیه گیاهان را مورد حمله قرار می دهد (احتشامی و همکاران، ۱۳۸۷). وجود این ویروس در اکثر مناطق کشت سیب زمینی در ایران (اصفهان، همدان، خراسان، اردبیل و ...) گزارش شده است. این ویروس با نام‌های ویروس نکروز بافت آبکشی، پیچیدگی برگ سیب زمینی و نکروز شبکه‌ای سیب زمینی نیز شناخته می‌شود. مهم‌ترین ناقل این ویروس، شته سبز هلو[7] است. ماده ژنتیکی این ویروس RNA تک رشته‌ای بوده و محدود به آوند آبکش است (نیکان، ۱۳۹۵، احتشامی و همکاران،۱۳۸۷). این ویروس به روش پایا انتقال می‌یابد.

علاوه بر ایجاد بافت مرده در گوشت غده برخی ارقام، آلودگی توأم با ویروئید عامل دوکی شدن غده سیب

---

1 - Potato leaf roll virus
2 - Potato Mop Top Virus
3 - Potato virus Y
4 - Potato Spindle Tuber Viroid
5 - Potato Virus A
6 - Potato virus X
7 - *Myzus Persicae*

زمینی نیز رخ می‌دهد است که به تنهایی و به وسیله شته‌ها قابل انتقال نیست.

آلودگی به ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی شامل ۲ مرحله است (نیکان، ۱۳۹۵):

– آلودگی اولیه (سال اول): این نوع آلودگی در بوته‌هایی که ابتدا سالم بوده ولی در ادامه توسط شته حامل ویروس آلوده شده‌اند رخ داده و با ظهور علائم در قسمتی از شاخ و برگ‌ها که آلودگی در آنجا اتفاق افتاده است، شروع می‌شود. اولین علائم بیماری حدود یک ماه پس از کاشت یا هنگامی‌که رشد بوته‌ها به حدود ۱۵ سانتی‌متر می‌رسد ظاهر خواهد شد. بوته‌های بیمار غده‌های کمتر و کوچک‌تر نسبت به گیاهان سالم تولید می‌کند. برگ‌های بالایی رنگ‌پریده بوده و حالت ایستاده به خود می‌گیرند و به سمت داخل پیچیده می‌شوند. در آلودگی اولیه گاهی لبه برگ‌ها کمی حالت قرمزی نشان می‌دهد (شکل ۳).

– آلودگی ثانویه (سال دوم): این آلودگی در بوته‌هایی رخ می‌دهد که از تکثیر غده‌های بذری به دست آمده‌اند. علائم آلودگی ثانویه به صورت پیچ خوردگی شدید برگ‌ها به‌ویژه برگ‌های پایینی ظاهر می‌شود و برگ‌های آلوده حالت چرمی و شکننده پیدا می‌کنند. بوته‌های با آلودگی ثانویه ممکن است ظاهری کوتوله، راست و رنگ پریده داشته باشند. در برخی ارقام حساس بافت مردگی شبکه‌ای داخلی در غده‌ها نیز ممکن است اتفاق افتد.

شکل ۳: علائم بیماری ویروسی PLRV روی برگ (چپ) و غده سیب زمینی (راست)

۳-۱-۲ ویروس M سیب زمینی (PVM)

این ویروس دارای پیکره رشته‌ای با RNA تک رشته‌ای بوده و میزبان اصلی آن سیب زمینی است و گسترش جهانی دارد. ویروس M به صورت ناپایا از طریق شته و نیز به روش مکانیکی با شیره گیاهی حاصل از

برگ‌های جوان منتقل می‌شود. این ویروس در ایران و از استان‌های خراسان شمالی و رضوی، کرمان، همدان، فارس و اصفهان گزارش شده است. افت عملکرد از ۱۵ تا ٤٥ درصد در اثر آلودگی به این ویروس رخ می‌دهد. بد شکلی و چروکیدگی برگ‌ها، لوله‌ای شدن برگ‌های گیاه به سمت بالا و موزاییک همراه با لوله‌ای شدن برگ‌ها اغلب به آلودگی ناشی از ویروس M سیب زمینی نسبت داده می‌شود. شدت بیماری به سویه ویروس، رقم سیب زمینی و شرایط محیطی بستگی دارد (شکل ٤). در برخی از ارقام سیب زمینی نکروز دمبرگ و ساقه گیاه مشاهده می‌گردد (Abbas, Aziz-ud-Din, Qadir, & Ahmed, 2013).

شکل ٤: علائم بیماری ویروسی PVM روی برگ (بالا) و غده (پایین) سیب زمینی

۳-۱-۳ ویروس S سیب زمینی (PVS)

ویروس S سیب زمینی به صورت رشته‌ای نخی شکل است. ماده ژنتیکی این ویروس از نوع RNA تک رشته است و به وسیله شته‌ها به روش ناپایا منتقل می‌شود. ویروس S سیب زمینی تقریباً در تمام مناطق زیر کشت سیب زمینی در سراسر دنیا وجود دارد. میزان خسارت آن بسته به رقم سیب زمینی و نژاد ویروس متفاوت است. این ویروس علاوه بر کاهش مستقیم محصول اثر تشدیدکنندگی بر خسارت ویروس‌های مهم‌تر سیب زمینی مثل PVX و PVY دارد. آلودگی به PVS غالباً به صورت نهان است، ولی علائم بیماری در صورت بروز به صورت موزاییک خفیف و کم‌رنگ شدن نواحی اطراف رگبرگ‌های اصلی است. در برگ‌های مسن‌تری که در سایه هستند ممکن است به جای اینکه رنگ زرد یکنواخت به وجود آید، لکه‌های مایل به سبز ایجاد شود (شکل ۵). تنها علائم بیماری در غده‌ها کاهش انـدازه آن است که تقلیل محصول در حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد را سبب می‌شود. آب و هوای ابری علائم را تشدید می‌کند. این بیماری به روش مکانیکی منتقل می‌شود. تعدادی از نژادهای آن با شته سبز هلو و برخی گونه‌های دیگر شته‌ها انتقال می‌یابند (احتشامی و همکاران، ۱۳۸۷؛ نیکان، ۱۳۹۵)، (Abbas et al., 2013).

شکل ۵: علائم بیماری ویروسی PVS سیب زمینی

۳-۱-٤ ویروس Y سیب زمینی (PVY)

ویروس Y از جمله مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی سیب زمینی است؛ زیرا به راحتی منتقل شده و می‌تواند منجر به خسارت عمده در عملکرد شود (Abbas et al., 2013). ویروس Y سیب زمینی دارای ساختمان رشته‌ای بدون پوشش است. ویروس PVY دارای RNA است. میزان قدرت تخریبی ویروس Y سیب زمینی در ایران و جهان بالا است. این ویروس یکی از ویروس‌های مخرب در گیاهان سیب زمینی، توتون، فلفل، بادمجان و گوجه فرنگی است که می‌تواند سبب کاهش محصول به‌ویژه در زراعت سیب زمینی شود. خسارت این ویروس به میزان ۷۵-۸۰ درصد گزارش شده است. وجود این ویروس از اکثر مناطق تحت کشت سیب زمینی در ایران گزارش شده است. علائم PVY با توجه به نژادهای مختلف ویروس، مقاومت میزبان شرایط محیطی و زمان آلودگی در طی مرحله رشد گیاه متفاوت است. ویروس Y سیب زمینی به روش مکانیکی و نیز توسط چندین شته به روش ناپایا انتقال می‌یابد. مهم‌ترین شته ناقل این ویروس، شته سبز هلو است. معمول‌ترین علائم بیماری با ایجاد لکه و چروکیدگی مشخص می‌شود. آلودگی اولیه معمولاً به صورت کم‌رنگ شدن و یا زردی برگچه‌ها، ریزش برگ‌ها و گاهی نیز مرگ زودرس بوته‌ها دیده می‌شود (شکل ٦). لکه‌هایی به صورت نقاط تیره‌رنگ روی رگبرگ‌ها و یا حلقه‌های تیره در متن برگ بروز می‌نماید که ممکن است سبب تخریب بافت برگ و خشکیدگی آن شود. از علائم آلودگی ثانویه ویروس می‌توان کوتولگی بوته، پیچیدگی و تاولی شدن سطح برگ‌ها و موزاییک را ذکر کرد (Abbas et al., 2013).

شکل ٦: علائم بیماری ویروسی PVY در برگ (چپ) و غده (راست) سیب زمینی

۳-۱-۵ ویروس x سیب زمینی (PVX)

ویروس X ، شایع‌ترین ویروس مسبب موزاییک خفیف سیب زمینی است. آلودگی بوته‌ها به این ویروس غالباً به صورت پنهان و بدون علائم مشخص در شاخ و برگ است. ویروس X سیب زمینی به ویروس مخفی سیب زمینی نیز معروف است. آلودگی به این ویروس در برخی ارقام سیب زمینی به صورت نقش موزاییکی تیره و روشن در بین رگبرگ برگچه‌ها ظاهر می‌شود و گاهی به صورت نهان می‌باشد. این ویروس ممکن است باعث خشن شدن و چروکیدگی بافت برگ و موجی شدن لبه‌های برگ شود (شکل ۷). تماس مستقیم بین گیاهان در اثر عبور انسان یا ماشین‌آلات کشاورزی و حیوانات در مزرعه سبب گسترش آلودگی ویروس می‌شود. نقش شته‌ها و غده‌های بذری در انتقال PVX معلوم نشده است (احتشامی و همکاران، ۱۳۸۷، نیکان، ۱۳۹۵).

شکل ۷: علائم بیماری ویروسی PVX در برگ (بالا) و غده (پایین) سیب زمینی

۳-۱-٦ ویروس A سیب زمینی (PVA)

ویروس A سیب‌زمینی، از دسته ویروس‌های رشته‌ای حاوی ژنوم RNA تک رشته است. دمای نهایی بی اثر شدن این ویروس ٤٦ تا ٥٢ درجه سانتی‌گراد است. در دمای اتاق ۱۲ تا ٢٤ ساعت قدرت آلودگی کنندگی آن دوام دارد. نژادهای این ویروس در توتون موجب روشن شدن رگبرگ می‌شوند. برگ‌های بوته بیمار معمولاً روشن به نظر می‌رسند. به دلیل اینکه ساقه بوته‌های آلوده به طرف بیرون خمیده می‌شوند، بوته‌های آلوده باز به نظر می‌رسند (شکل ۸). انتشار بیماری از طریق شته‌ها به خصوص شته سبز هلو در مزرعه صورت می‌گیرد(Abbas et al., 2013) .

ویروس PVA در بیشتر ارقام سیب زمینی باعث ایجاد علائم پیسک و موزاییک می‌گردد که دامنه آن از خفیف تا شدید متفاوت است. این ویروس، موزاییک رگبرگی مشخصی ایجاد نموده، رگبرگ‌ها عمیق‌تر شده و حواشی برگ چروکیده می‌شود. تفاوت رشد رگبرگ‌ها و پهنک برگ باعث ایجاد علائم رگوز می‌گردد (نیکان، ۱۳۹۵).

شکل ۸: علائم بیماری ویروسی PVA سیب زمینی

٤ گردش کار تولید گیاهچه سالم‌سازی شده ارقام مختلف سیب زمینی

طبق ضوابط انتشار یافته از سوی دفتر محصولات علوفه‌ای و جالیزی وزارت جهاد کشاورزی («ضوابط ملی کشت بافت و فرآیند تولید مینی تیوبر سیب‌زمینی» پیوست نامه شماره ٣٤٨٩٦/٨٠٠ مورخ ١٣٨٩/١١/١٩ با امضای معاون تولیدات گیاهی وقت)، گردش کار جهت تهیه گیاهچه سالم‌سازی شده سیب زمینی، با شناسایی و معرفی ارقام مورد نیاز از سوی کمیته منتخب در آن دفتر محترم آغاز می‌شود. در ادامه، نامه‌ای به موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر اعلام و هم زمان نامه مربوطه به مرکز اقدام کننده سالم‌سازی ارقام مورد تأیید آن دفتر جهت اخذ غده ارسال می‌شود. در این مرحله موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر مسئول تأمین غده با اصالت از ارقام اعلام شده است. تحویل غده‌ها ترجیحاً باید در فروردین ماه هر سال صورت گیرد. شکل ٩ شمای کلی از روند گردش کار را ارائه می‌دهد.

٤-١ مواد لازم

مواد و تجهیزات لازم در فرآیند تولید گیاهچه سالم‌سازی شده سیب زمینی شامل مواد گیاهی، مواد و تجهیزات لازم برای کشت غده در گلدان و انجام عملیات گرمادرمانی و شیمی‌درمانی، مواد و امکانات مربوط به کشت مریستم و مواد مورد نیاز برای تکثیر مقدماتی گیاهچه سالم‌سازی شده در جدول ١ ذکر شده‌اند.

٤-٢ تهیه ارقام سیب زمینی

از هر رقم معرفی شده باید تعداد حداقل ٢٠ نمونه غده تحویل گرفته و برای ضد عفونی سطحی اقدام شود. پیش از ضد عفونی برچسب ارقام، بررسی و در توری‌های خاص بسته‌بندی شود. محل نگهداری غده‌ها تا شروع عملیات در سردخانه ٢ الی ٤ درجه سانتی‌گراد است. در صورت وجود خواب در غده‌ها و کمبود وقت، برای خواب‌شکنی اقدام شود.

جدول ۱: مواد گیاهی و تجهیزات لازم برای فرآیند تولید گیاهچه سالم‌سازی شده سیب زمینی غده از ارقام مختلف سیب‌زمینی

مواد گیاهی	غده از ارقام مختلف سیب‌زمینی
مواد و تجهیزات مورد نیاز برای کشت غده‌ها در گلدان و عملیات گرمادرمانی	گلدان ۵ لیتری پیت ماس با الیاف متوسط، دارای کود و اسیدیته در محدوده ۵ الی ٦ پرلیت سایز متوسط خاک زراعی مرغوب- بافت لومی شنی ریز-EC<2 ds/m آب آبیاری EC<0.7ds/m یک واحد گلخانه مجزا با قابلیت کنترل نور، دما و رطوبت فیتوترون با قابلیت کنترل نور، دما و رطوبت
مواد و تجهیزات مورد نیاز برای کشت مریستم	اجزای محیط کشت پایه MS (مطابق با جدول ٤) Folic acid D-Biotin Casein hydrolysate IAA (Indole-3-acetic acid) GA3 (gibberellic acid) Kin (Kinetin) آگار لوپ یا بینوکولر پنس اسکالپل نمره ۳ تیغ جراحی نمره ۱۱ پتری دیش 100×20 mm لوله‌آزمایش 180×25mm سوزن تزریقاتی طبی الکل 70%(v/v) NaOH 5M SDS (Sodium dodecyl sulfate) 20% هیپوکلریت سدیم توین ۲۰ آب مقطر استریل کاغذ صافی
مواد مورد نیاز برای شیمی‌درمانی	بر اساس جدول ٦

مواد مورد نیاز برای تکثیر مقدماتی و نیمه انبوه گیاهچه سالم‌سازی شده سیب‌زمینی	اجزای محیط کشت پایه MS (مطابق با جدول ۵) BAP آگار لوله‌آزمایش

غده‌های سیب زمینی از ارقام مورد درخواست باید دارای شرایط بهینه سلامتی از نظر بیماری‌های قارچی و باکتریایی بوده و فاقد هرگونه علامت ظاهری نامطلوب اعم از زخم، اسکب و یا هرگونه پوسیدگی باشند. لذا قبل از تحویل غده‌ها، کارشناس مربوطه باید فرم صورت وضعیت غده‌ها (جدول ۲) را تکمیل نموده و همراه دیگر اسناد طی صورت جلسه‌ای از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر تحویل گیرد. در این مرحله پارامترهای کلیدی مورفولوژیکی غده برای هر رقم مانند شکل و رنگ ظاهری غده، رنگ گوشت غده، میزان ماده خشک غده و وجود هرگونه علائم مشخص‌کننده ثبت شود. این اسناد برای هر رقم به صورت جداگانه تهیه شده و به همراه تصویر آزمایش مولکولی تعیین اصالت (در صورت موجود بودن با هماهنگی موسسه ثبت، کنترل و گواهی بذر و نهال) بایگانی شود. در انتهای این مرحله موارد مندرج در جدول ۳ باید توسط کارشناس ذی‌ربط در مجموعه اقدام کننده برای سالم سازی ارقام جمع‌آوری و بایگانی شود.

٤-٣ ضد عفونی سطحی

عملیات ضد عفونی بلافاصله پس از تحویل غده‌ها از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر صورت می‌گیرد. در این مرحله هر رقم به صورت کاملاً مجزا و جداگانه مورد تیمار قرار گرفته و پس از اتمام تیمار ضدعفونی و برچسب‌زنی به محل نگهداری غده‌ها انتقال داده شده و جهت ادامه کار رقم بعدی آورده می‌شود. به منظور ضد عفونی غده‌ها ابتدا بر اساس ظاهر غده‌ها قضاوت صورت گرفته و غده‌های نامطلوب و با ظاهر ناسالم حذف می‌شوند. غده‌ها به وسیله آب و مایع ظرف‌شویی شستشو شده و به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به همراه چند قطره توین ۲۰ نگهداری می‌شود. طی این مرحله هر ۳۰ ثانیه محلول به هم زده می‌شود. پس از شستشوی نهایی به مدت نیم ساعت در قارچ‌کش‌های مرسوم مانند بنومیل و یا مانکوزب قرار داده شده و سپس به‌سرعت هوا-خشک می‌شوند تا مایع آغشته به سطح پوست ناپدید شود. غده‌ها به منظور طی شدن فرآیند خواب‌شکنی به سردخانه منتقل می‌شوند.

جدول ۲: نمونه‌هایی از فرم ثبت وضعیت ظاهری غده‌های دریافتی از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر

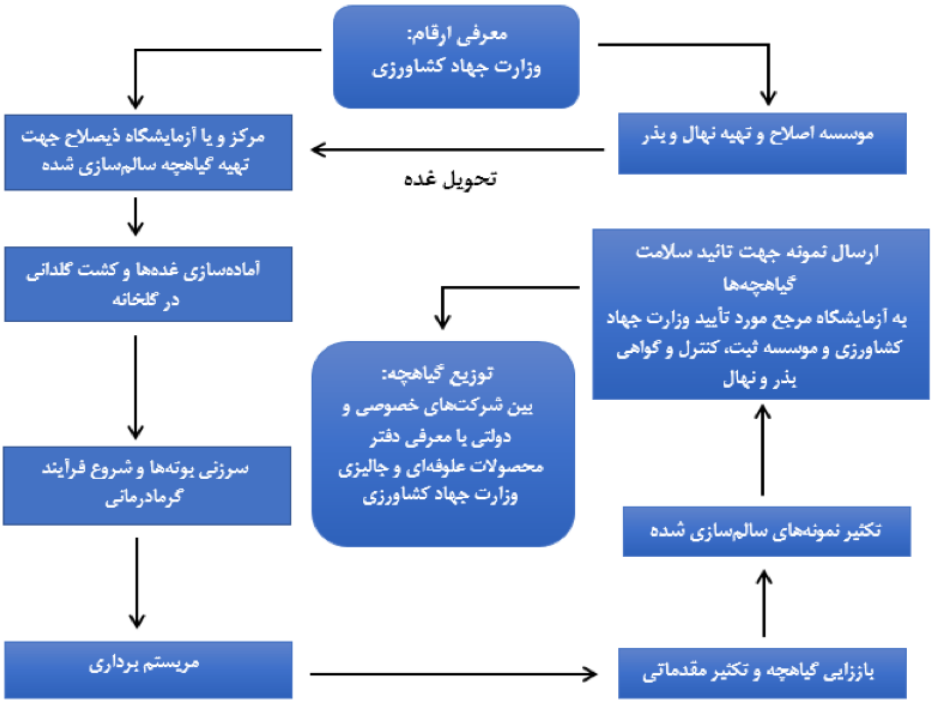
فرم شماره ۱ صورت‌وضعیت ظاهری غده‌ها

رقم: کد: تعداد: میانگین اندازه:

	علائم بیماری یا عارضه	دارد	ندارد
۱	پوسیدگی		
۲	زخم		
۳	اسکب		
٤	تغییر رنگ پوست		
٥	تغییر رنگ بافت داخل		
٦	تغییر شکل		
۷	Ring rot		
۸	Late blight		
۹	Leaf roll (net necrosis)		
۱۰	Rhizoctonia black scurf		
۱۱	PVA		
۱۲	PVM		
۱۳	PVS		
۱٤	PVX		
۱٥	PVY		
۱٦	PLRV		
۱۷	شکل ظاهری غده		
۱۸	رنگ غده		
۱۹	رنگ بافت داخل غده		
۲۰	میزان ماده خشک غده (٪)		

٤-٤ تیمار خواب‌شکنی

ترجیحاً بهتر است عملیات خواب‌شکنی غده‌ها به صورت روش‌های مرسوم و با استفاده از شوک دمایی صورت پذیرد؛ بنابراین ضروری است خواب‌شکنی غده‌ها از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر شروع شود. در صورت مشاهده غده‌های خواب مانده از ارقام سیب زمینی می‌توان از روش‌هایی مانند تیمار با جیبرلیک اسید (۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به مدت ۲ ساعت) و یا تیمار با تیواوره ۲% به مدت یک ساعت و دیگر روش‌های بهینه‌سازی شده در هر واحد تولیدی استفاده نمود. این عملیات باید به صورت مجزا برای هر رقم اجرا شود تا احتمال اختلاط و خصوصاً در این مرحله گسترش بیماری به حداقل برسد.



شکل ۹: شمای کلی فرآیند تولید گیاهچه سالم‌سازی شده ارقام مختلف سیب زمینی در ایران

٤-٥ نگهداری و کشت ارقام تأیید شده سیب زمینی

پس از جوانه‌زنی، بلافاصله باید کشت غده‌ها در خاک استریل (پیت ماس: پرلیت: خاک زراعی به ترتیب به نسبت ۰/۵:۱/۵:۳) در گلدان‌های ۵ لیتری با تغذیه کنترل شده در گلخانه تحقیقاتی صورت گیرد. دمای روز گلخانه بر روی ۲۳ درجه سانتی‌گراد و شب بر روی ۱۸ درجه سانتی‌گراد با طول روز دوازده ساعت و رطوبت اولیه ٤٥ درصد تنظیم می‌شود. در این مرحله به هر گلدان یک کد تعلق گرفته و سلامت گیاهان روییده شده به‌دقت بررسی می‌شود. گیاه سبز شده از هر کد یا رقم سیب زمینی که از سلامت ظاهری مناسبی برخوردار هستند، در برنامه سالم‌سازی به‌گونه‌ای که در ذیل اشاره می‌شود، قرار می‌گیرد و گیاه ناسالم حذف می‌شود. گیاهان هر کد باید به گونه‌ای که تماس فیزیکی نداشته باشند در گلخانه چیده شوند (شکل ۱۰).

جدول ۳: اسناد مورد نیاز جهت ثبت و نگهداری در مجموعه اقدام کننده برای سالم‌سازی ارقام مختلف سیب‌زمینی

شماره	نوع سند	ملاحظات
۱	سند شماره ۱	نامه ارقام مورد درخواست وزارت جهاد کشاورزی
۲	سند شماره ۲	صورت‌جلسه تحویل غده‌ها
۳	سند شماره ۳	صورت‌وضعیت ظاهری غده‌ها و پارامترهای کلیدی مورفولوژیکی خاص هر رقم
٤	سند شماره ٤	انجام آزمایش تأیید سلامت برای شش ویروس قرنطینه‌ای شامل PVS, PVA, PVM, PVY, PVX و PLRV برای هر رقم جهت شناسایی میزان و نوع آلودگی ویروسی
٥	فرم شماره ۱	فرم صورت‌وضعیت ظاهری غده‌ها

در برنامه نگهداری بوته‌ها، تغذیه و آبیاری بسیار اهمیت دارد. لذا ضمن آبیاری مناسب و متناسب از کودهای مرسوم در بازار استفاده شود. نمونه‌ای از کود مناسب با نسبت عناصر تشکیل دهنده آن در جدول ٤ ارائه گردیده است.

با ترکیب خاکی فوق، برنامه کود دهی گلدان‌ها حدود ۲۵ روز پس از سبز شدن شروع شده و دوره کوددهی باید هر دو هفته یک بار اجرا شود. در صورت نگهداری گلدان‌ها، برنامه کوددهی تا آخر ادامه یابد.

جدول ٤: نسبت عناصر مورد نیاز جهت کود دهی گلدان‌های سیب زمینی به تفکیک سن فیزیولوژیک گیاه

ترکیب کود	سن فیزیولوژیک		
	از کاشت تا شروع استولون‌زایی	از استولون‌زایی تا ٤-٣ هفته بعد	از هفته ١١-١٠ بعد از کاشت به مدت ٨ هفته
	درصد موردنیاز		
N	20	10	12
P2O5	20	50	12
K2O	20	10	36
MgO	1	1	1
FeEDTA	0.06	0.06	0.06
MnEDTA	0.04	0.04	0.04
ZnEDTA	0.025	0.025	0.025
CuEDTA	0.015	0.015	0.015
B	0.01	0.01	0.01
Mo	0.001	0.001	0.001

٦-٤ سرزنی بوته‌ها

یک ماه قبل از شروع اعمال ترموتراپی یا گرمادرمانی، به منظور افزایش تعداد شاخساره مورد استفاده در عملیات مریستم برداری، اقدام به سرزنی بوته‌ها شود. پس از ظهور اولین ساقه اصلی سیب زمینی و با توجه به وجود تعداد کافی جوانه جانبی در هر ساقه بسته به نوع رقم عملیات سرزنی صورت گیرد. این کار با قطع پنج سانتی‌متر رأسی هر ساقه رشد یافته و با تیغ استریل انجام می‌شود. تیغ مورد استفاده از هر گلدان به گلدان دیگر از همان رقم باید ضد عفونی شده و از هر رقم به رقم بعدی باید حذف شود. پس از ظهور نوساقه از محل جوانه‌های جانبی، عملیات گرمادرمانی یا ترموتراپی آغاز شود. یک مرحله پیش از سرزنی و نیز دو مرحله پس از سرزنی (پس از رشد نو سرشاخه‌ها و هفته دوم گرما درمانی) در کنار برنامه کود دهی اشاره شده در مرحله «نگهداری و کشت» از محلول پاشی کود آهن استفاده شود (بر اساس دستور العمل شرکت سازنده کود).

شکل ۱۰- کشت غده‌ها در خاک گلدان جهت تولید گیاه به منظور اعمال عملیات گرمادرمانی و مریستم‌برداری

٤-٧ گرما درمانی[1]

پس از شروع رشد سرشاخه‌ها از جوانه‌های جانبی، گلدان‌های حاوی گیاه به فیتوترون (شکل ۱۱) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰ تا ۸۵ درصد و طول روز ۱۲ ساعت، منتقل شود. شدت نور در این مرحله باید حداقل ۳۵۰ $\mu mol.m^2.s$ فراهم شود. گیاه به مدت حدود ٤ هفته در این شرایط قرار گیرد. ضروری است قبل از ظهور اولین علائم زردی برای مریستم برداری اقدام شود.

[1]- Thermotherapy

شکل ۱۱- گیاهان مشکوک به آلودگی از ارقام مختلف پس از عملیات سر زنی، به منظور گرمادرمانی به فیتوترون منتقل شده‌اند

٤-٨ مریستم‌برداری

طبق تعریف، مریستم منطقه‌ای از سلول‌های فعال تمایزنیافته در انتهایی‌ترین نواحی رشدی گیاه است. این سلول‌ها قابلیت تولید انواع مختلفی از بافت‌های گیاهی را دارا می‌باشند. جوانه‌های انتهایی، جانبی و ریشه‌های گیاهان حاوی سلول‌های مریستمی می‌باشند؛ اما به‌منظور تولید گیاهچه‌های سالم‌سازی شده در گیاهان از طریق کشت بافت، استفاده از مریستم‌های بسیار فعال انتهایی مدنظر است. این ناحیه حدود ۰/۱ الی ۰/۰۵ میلی‌متر از انتهایی‌ترین نقطه رشد منطقه مریستمی فعال را شامل می‌شود (شکل ۱۲).

شکل ۱۲: نمای شماتیک از منطقه مریستمی در گیاهان

عملیات سالم‌سازی گیاهچه‌های ارقام مختلف سیب زمینی با استفاده از تلفیق تکنیک‌های گرما درمانی، شیمی درمانی و مریستم برداری به شرح ذیل صورت گیرد:

٤-٩ کشت مریستم

این مرحله از حساسیت بسیار بالایی برخوردار است چراکه اگر مریستم خیلی کوچک باشد به سختی می‌تواند استقرار یابد و اگر بزرگ‌تر از حد لازم باشد احتمال آلودگی وجود دارد. قسمت‌های انتهایی ساقه، جداسازی شده و به‌وسیله اتانل ۷۰٪ (۱ دقیقه) و محلول ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم (۲۰ دقیقه)، استریل شود. تمامی ابزار قبل از ضدعفونی به مدت دو ساعت در محلول[1] SDS 20% و سپس در محلول ۵ مولار NaOH قرار داده شود و با کمک آب مقطر استریل شستشو شده و سپس برای دو ساعت متوالی در دمای ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد در آون ضدعفونی شود. به مقدار نیاز تیغ جراحی نو مهیا شود. ابتدا برگ‌ها و برگچه‌های روی منطقه مریستمی با کمک پنس و تیغ جراحی جدا شود. طی مراحل از کاغذ صافی استریل استفاده شده و پس از چند بار تعویض کاغذ و ابزار (پنس و تیغ جراحی) نمونه حاوی مریستم بر روی صفحه استریل دیگری منتقل شده و با کمک تیغ جراحی جدید و پنس استریل شده (مختص هر کد یا رقم) برای جداسازی منطقه مریستمی اقدام شود. ابزار استفاده شده در زیر لامینار در محلول‌های استریل شده SDS و NaOH به شکلی که در فوق اشاره شد، هر یک به مدت ۵ دقیقه قرار گرفته و پس از شستشو در

[1] - Sodium Dodecyl Sulfate

آب مقطر، روی شعله یا چراغ الکلی استریل شود و پس از سرد شدن بکار گرفته شود. جداسازی منطقه مریستمی با کمک بینوکولر و تحت شرایط کاملاً استریل بر روی میز لامینار صورت گیرد. اندازه متوسط مریستم بین ۰/۰۵ تا ۰/۱ میلی‌متر انتخاب شود (شکل ۱۳). جداسازی مریستم در مرحله نهایی با استفاده از سر سوزن طبی و یا تیغ نمره ۱۱ انجام شود. مریستم جداسازی شده باید به‌سرعت به محیط کشتی که از قبل به این منظور آماده شده است انتقال یابد.

شکل۱۳: نمونه‌ای از بینوکولر (ردیف بالا سمت راست) و ناحیه مریستمی قابل جداسازی (ردیف بالا

سمت چپ) در گیاه سیب زمینی. نمونه‌ای از ابزارهای جداسازی منطقه مریستمی: سوزن (ردیف پایین سمت چپ) و تیغ جراحی نمره ۱۱ (ردیف پایین سمت راست)

مریستم‌های جدا شده از هر کد یا رقم به پتری دیش‌های حاوی محیط کشت MS با ترکیب مندرج در

جدول ۵ منتقل شود.

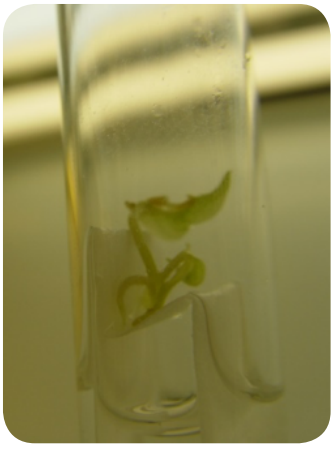
جدول ۵: اجزاء تشکیل دهنده محیط کشت مواررشیگ و اسکوگ (MS)

عناصر پرمصرف		
Ammonium nitrate	(NH_4NO_3)	1,650 mg/l
Potassium nitrate	(KNO_3)	1,900 mg/l
Calcium chloride	($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	440 mg/l
Magnesium sulphate	($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	370 mg/l
Monopotassium phosphate	(KH_2PO_4)	170 mg/l
عناصر کم‌مصرف		
Boric acid	(H_3BO_3)	6.2 mg/l
Cobalt chloride	($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.025 mg/l
Cupric sulphate	($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.025 mg/l
Ferrous sulphate	($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	27.8 mg/l
Manganese(II) sulphate	($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	22.3 mg/l
Potassium iodide	(KI)	0.83 mg/l
Sodium molybdate	($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.25 mg/l
Zinc sulphate	($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	8.6 mg/l
Ethylenediaminetetraacetic acid ferric sodium	(NaFe-EDTA)	
ویتامین‌ها و مواد الی		
Myo-Inositol	100 mg/l	
Nicotinic Acid	0.5 mg/l	
Pyridoxine · HCl	0.5 mg/l	
Thiamine · HCl	0.3 mg/l	
Glycine	2 mg/l	
تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و سایر افزودنی‌ها		
Folic acid	0.5 mg/l	
D-Biotin	0.05 mg/l	
Casein hydrolysate	100 mg/l	
IAA	0.1 mg/l	
GA3	0.2 mg/l	
Kin	0.04 mg/l	
pH	5.8	
Agar	accordingly	

به مریستم‌های حاصل از غده‌های مجزا از گیاهان مجزای هر رقم یک کد تعلق گیرد. مریستم کشت‌شده در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۳۵ µmol.m2.s نگهداری شده و هر سه هفته یک بار به محیط کشت تازه بازکشت می‌شوند. پس از اینکه مریستم به حد کافی رشد کرد، به لوله‌های آزمایش حاوی محیط

کشت MS حاوی ویتامین‌های B5 به همراه 0.5 mg/l BAP انتقال یابد (شکل ١٤) و پس از رشد کافی، ساقه‌ها قطعه قطعه گردند، به طوری‌که در هر قطعه یک جوانه جانبی و یک برگ وجود داشته باشد (روش nodal cutting).

شکل ١٤: گیاهچه اولیه حاصل از برداشت مریستم از انتهایی‌ترین نقطه رشد سرشاخه‌های گرما درمانی شده (۰/۰۵ میلی‌متر).



این قطعات روی محیط کشت MS فاقد هرگونه هورمون کشت می‌شود. برای بازکشت کردن هر گیاهچه در این مرحله، همه ابزارها باید به روشی که پیش‌تر ذکر شد ضدعفونی و خصوصاً تیغ جراحی باید تعویض شود. در این مرحله شرایط دمایی ۲۲ درجه و شدت نور حدود 70 µmol.m2.s استفاده شود. پس از گذشت حدود ۲۵ روز، هر قطعه رشد کرده و خود به یک ساقه تبدیل می‌شود. وقتی با استفاده از این روش حدود ۱۰ گیاهچه از هر کد، رقم به دست آمد، یکی از گیاهچه‌ها (از هر کد، رقم) برای تأیید عاری بودن از ویروس با آزمون ELISA و یا RT-PCR مورد بررسی قرار گیرند.

٤-١٠ شیمی‌درمانی

این مرحله فقط در صورت تأیید وجود عامل ویروسی در گیاهچه‌های حاصل از مرحله قبل به اجرا گذارده خواهد شد. پس از مریستم‌برداری شاخساره‌های ترموتراپی شده اقدام به شیمی درمانی و مریستم برداری مجدد از گیاهچه‌های تولید شده از هر کد در شرایط درون شیشه‌ای می‌شود. به منظور شیمی درمانی، گیاهچه‌های سیب زمینی در شرایط درون شیشه‌ای در محیط کشت حاوی یکی از مواد مندرج در جدول

٦ کشت شود.

جدول ٦: ترکیبات مرسوم مورداستفاده برای شیمی‌درمانی گیاهچه‌های سیب‌زمینی

نام کمپانی	غلظت	ماده شیمیایی
Sigma–Aldrich	20-25 µg ml^{-1} (dilution in water)	Ribavirin (RBV)
Sigma–Aldrich	10-20 µg ml^{-1} (dilution in 100% ethanol)	Mycophenolic acid (MPA)
Sigma–Aldrich	5-10 µg ml^{-1} (dilution in water)	Tiazofurin (TR)

۵ تأیید سلامت و اصالت

مجدداً تأکید می‌شود پیش از ارسال نمونه برای تأیید سلامت، یک مرحله تکثیر مقدماتی از هر یک از کد یا رقم موجود صورت گرفته و قسمتی از آن، جهت آزمایش تأیید سلامت ارسال شود. باقی‌مانده گیاهچه‌ها تا اخذ جوابیه نگهداری شود. برای هر کد یا رقم از پنس و تیغ جراحی مجزا و خاص آن استفاده شود تا از انتقال احتمالی آلودگی کد یا رقم بیمار به دیگر نمونه‌ها جلوگیری شود. آزمایش‌های تأیید سلامت با ارسال نمونه از هر یک از کد یا رقم‌های مختلف ارقام سیب زمینی به آزمایشگاه (های) تشخیصی مورد تأیید دفتر محصولات علوفه‌ای و جالیزی گیاهان علوفه ای وزارت جهاد کشاورزی و موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال صورت گیرد.

۵-۲ تأیید اصالت مورفولوژیکی

جهت تأیید مقدماتی اصالت ارقام با ثبت صفات مورفولوژیکی، ابتدا باید نسبت به کشت گیاهچه هر رقم سالم‌سازی شده درون شیشه‌ای به صورت مجزا در گلخانه اقدام نمود. پس از رشد مناسب گیاهچه‌های حاصل از تکثیر درون شیشه‌ای در گلخانه، شاخص مورفولوژیکی ثبت و مورد بررسی قرار گیرد. در صورت وجود اختلاف ظاهری، گلدان و کد مربوطه معدوم شود.

ارزیابی و تائید مورفولوژیکی ارقام سیب زمینی مطابق دستور العمل و با ثبت مشخصات مانند آنچه در هنگام تحویل غده صورت گرفت و به شرح ذیل برای هر رقم انجام گیرد:

ارتفاع گیاه، رنگ برگ، رنگ ساقه، تعداد و طول استولون، زمان استولون دهی، تعداد برگ به ازای هر گیاه،

نسبت تعداد ساقه به ازای هر گیاه، سطح برگ، قطر ساقه، تعداد غده به ازای هر بوته، شکل غده، رنگ غده، وزن تر و خشک غده، متوسط اندازه و عمق چشم غده، خصوصیات گل (زمان، تعداد و رنگ گل، مشخصات جوانه‌های نوری).

این خصوصیات باید از قبل برای هر رقم اندازه‌گیری شده باشد و گیاهچه‌های سالم‌سازی شده با آن‌ها مقایسه گردند.

۵-۳ تکثیر ارقام تأییدشده

در این مرحله ساقه‌های سیب زمینی که در داخل ظروف کشت رشد کرده‌اند، به صورت قطعه قطعه کردن ساقه به صورتی که در هر قطعه یک برگ و یک جوانه جانبی وجود داشته باشد (کشت تک- گره) در محیط کشت MS[1] حاوی ویتامین‌های MS، ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۸ گرم در لیتر آگار در لوله‌های آزمایش یا ظروف شیشه‌ای دهان‌گشاد[2] کشت گردند. پس از کشت، درب ظروف با درپوش و پارافیلم بسته و ظروف حاوی ریز نمونه‌ها به اتاق رشد منتقل شوند. نمونه‌های هر رقم در قفسه‌های مجزا قرار داده شود. ترجیحاً از برچسب‌های رنگی خاص هر رقم با نشانگر مشترک بین درب و بدنه شیشه استفاده شود. تعدادی از شیشه‌های حاوی گیاهچه به منظور کاهش میزان بازکشت تحت دمای حدود ۱۰ درجه سانتی‌گراد و شدت نور مشابه که در ادامه قید گردیده است، نگهداری شود. بازکشت‌های هر کد یا رقم به صورت مجزا و ترجیحاً در روزهای متفاوت صورت گیرد. اجازه بازکشت چند رقم در یک روز به کارشناس مربوطه داده نشود. مسئول تولید در مجموعه باید نظارت کامل بر عملیات داشته و جدول بازکشت نمونه‌ها با ثبت کد یا رقم و تاریخ و تعداد به امضاء کارشناس و تأیید مسئول برسد. نگهداری برای ۵-٤ هفته، تحت شرایط دمایی ۲۲ درجه سانتی‌گراد و برنامه روشنایی ۱٦ ساعت نور حدود(۷۰ $\mu mol.m^2.s$) و ۸ ساعت تاریکی انجام گیرد. این مرحله تا زمانی که تعداد گیاهچه‌ها به حد مورد نظر برسد، تکرار شود.

٤-۵ معرفی شرکت‌های خصوصی

واگذاری گیاهچه از هر کد، رقم به شرکت‌های فعال و تأیید شده درزمینه تولید مینی تیوبر با ارائه معرفی‌نامه از دفتر زراعت سازمان جهاد کشاورزی استان مربوط به هر شرکت انجام شود. دفتر محصولات علوفه‌ای و

[1] - Murashige and Skoog, 1962
[2] - Jar

جالیزی وزارت جهاد کشاورزی با اعلام نوع و تعداد رقم، برش استانی سال زراعی پیش روی را به معاونت زراعت هر استان دارای تولید کننده مینی تیوبر اعلام می‌نماید. گیاهچه‌ها باید به تعداد مشخص‌شده از هر رقم و به صورت سالم در بازه زمانی بین بهمن الی اسفندماه تحویل گردند. برای هر تحویل، با ارائه اسناد هویتی تأیید سلامت و اصالت صورت‌جلسه‌ای تنظیم و به امضاء نمایندگان هر شرکت رسانده شود.

۵-۵ طرز تهیه محیط کشت MS:

محیط کشت MS یکی از رایج‌ترین محیط‌های کشت است که در کشت بافت گیاهی کاربرد زیادی دارد. محیط کشت MS دارای ترکیبات مختلف همچون عناصر کم‌مصرف، پرمصرف و مواد آلی (ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه) است. با توجه به اینکه مواد شیمیایی مورداستفاده در تهیه هر لیتر محیط کشت MS بسیار اندک و ناچیز است لذا به‌منظور افزایش دقت در توزین مواد معمولاً محلول‌هایی با غلظت چند برابر (۱۰ یا ۱۰۰ برابر) ساخته‌شده و در تهیه محیط کشت مورد استفاده قرار می‌گیرند. این محلول‌ها اصطلاحاً استوک یا محلول ذخیره نامیده می‌شوند. برای مثال محلول‌های ماکرو با غلظت ۱۰ برابر در یک لیتر و نمک‌های میکرو با غلظت ۱۰۰ برابر در یک لیتر ساخته می‌شوند که اصطلاحاً استوک‌های ۱۰X و ۱۰۰X نامیده می‌شوند. استفاده از استوک‌ها باعث تسهیل در تهیه محیط کشت و بالا رفتن دقت کار می‌شود.

در ادامه دستور العمل طرز تهیه استوک‌های ماکرو، میکرو، آهن و ویتامین‌های مربوط به محیط MS و نیز تعدادی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ارائه می‌شود.

۵-۵-۱ تهیه محلول‌های ذخیره

در تهیه استوک، مواد شیمیایی مورد نظر در آب مقطر حل می‌گردند. در حل مواد شیمیایی باید دقت نمود تا رسوب تشکیل نشود. جهت نیل به این هدف دو نکته زیر از اهمیت ویژه برخوردار است:

- رعایت ترتیب اضافه نمودن مواد شیمیایی به محلول استوک و توجه به دستور العمل تهیه محلول‌های شیمیایی در مباحث شیمی.
- دقت شود که هر ماده شیمیایی کاملاً در محلول حل گردیده و سپس ماده شیمیایی بعدی اضافه شود.

۵-۵-۲ تهیه استوک عناصر پر مصرف با غلظت ۱۰ برابر

مواد مندرج در جدول ۷ به ترتیب زیر ابتدا در ۷۰۰ سی‌سی آب مقطر حل شده و سپس به حجم ۱ لیتر رسانده می‌شود. از میان مواد شیمیایی جدول ۷، ماده $CaCl_2$ به صورت جداگانه در آب مقطر حل و به استوک ماکرو اضافه می‌شود و نهایتاً حجم استوک به ۱۰۰۰ سی‌سی برسد. میزان ۱۰۰ سی‌سی از این استوک جهت تهیه یک لیتر محیط کشت MS کافی است.

جدول ۷: نمک‌های مورد نیاز برای تهیه استوک عناصر پر مصرف

ترکیب شیمیایی	فرمول شیمیایی	میزان مورد نیاز در محیط MS(mg/l)	میزان مورد نیاز در استوک (g/l)
نیترات پتاسیم	KNO_3	1900	19
نیترات آمونیم	$NH_4\ NO_3$	1650	16.50
سولفات منیزیم	$MgSO_4.7H_2o$	370	3.70
کلرید کلسیم	$CaCl_2.\ 2H_2o$	440	4.40
فسفات پتاسیم	KH_2PO_4	170	1.70

۵-۵-۳ تهیه استوک عناصر کم مصرف با غلظت ۱۰۰ برابر

برای تهیه این محلول، مواد شیمیایی جدول ۸ به ترتیب در یک لیتر آب مقطر حل می‌شوند. میزان ۱۰ سی‌سی از این استوک جهت تهیه یک لیتر محیط کشت MS کافی است.

جدول ۸: نمک‌های مورد نیاز برای تهیه استوک عناصر کم مصرف

ترکیب شیمیایی	فرمول شیمیایی	میزان لازم در محیط MS(mg/l)	میزان لازم در استوک (mg/l)
یدید پتاسیم	KI	0. 83	83
اسید بوریک	H_3Bo_3	6.2	620
سولفات منگنز	$MnSO_4.4H_2O$	22.3	2230
سولفات روی	$Zn\ SO_4.7\ H_2O$	8.6	860
مولیبدات سدیم	$Na_2MoO_4.2\ H_2O$	0.25	25
سولفات مس	$Cu\ SO_4.5\ H_2O$	0.025	2.5
کلرید کبالت	$CoCl_2.6\ H_2O$	0.025	2.5

۵-۵-٤ تهیه استوک آهن MS:

استوک آهن به دلیل انجام واکنش با سایر مواد شیمیایی موجود در عناصر ماکرو و میکرو و ایجاد رسوب، به صورت جداگانه تهیه می‌شود. آهن با ماده Na2.EDTA به صورت کلاته درآورده می‌شود که فرم کلاته آن در محیط کشت برای گیاه قابل استفاده است.

ابتدا هر یک از مواد ذکرشده در جدول ۹ را به طور جداگانه در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر حل کرده (در صورت

نیاز ماده FeSo٤،٧H٢O را کمی حرارت دهید) و پس از حل شدن کامل هر دو ماده، حجم هر یک را به ۱۲۵ سی‌سی رسانده و آن‌ها را به طور کاملاً هم‌زمان در ظرف دیگر باهم ترکیب نمایید.

معمولاً ٢٤ ساعت بعد از تهیه محلول، در آن رسوب تشکیل می‌شود که با استفاده از حرارت ملایم و هم زدن رسوب مجدداً حل خواهد شد. دقت نمایید که استوک آهن نباید در معرض نور قرار بگیرد.

جدول ۹: عناصر شیمیایی مورد نیاز برای تهیه استوک آهن

نام ماده شیمیایی	میزان لازم در محیط MS (mg/l)	استوک 200X (gr در ۲۵۰cc)
$FeSo_4.7H_2O$	27.8	1.39
$Na_2.EDTA$	37.3	1.865

توجه شود که استوک آهن به صورت ۲۰۰X در حجم ۱ لیتر است. مقدار کلی سولفات آهن برابر ۵/۵٦۰ گرم خواهد بود. به دلیل جلوگیری از ماندن بیش‌ازحد و استفاده از استوک جدید، مقادیر برحسب حجم ۲۵۰ سی‌سی و به میزان ۱/۳۹ (٤÷۵/۵٦) گرم سولفات آهن تهیه می‌شود. این موضوع در خصوص EDTA نیز صادق است. هر سی‌سی از استوک فوق معادل ۵/۵٦۰ میلی‌گرم سولفات آهن بوده و بنابراین ۵ سی‌سی از استوک، تأمین‌کننده مقدار ۲۷/۸ میلی گرم مورد نیاز برای تهیه ۱ لیتر محیط کشت MS است.

۵-۵-۵ تهیه استوک ویتامین‌های محیط MS:

ویتامین‌ها ترکیباتی هستند که در سیستم‌های آنزیمی نقش کاتالیزورها را به عهده داشته و در محیط‌های کشت گیاهی فقط به مقادیر بسیار جزئی مورد نیاز می‌باشند. برای تهیه استوک ویتامین‌ها (به‌جز میواینوزیتول)، هر یک از ویتامین‌های ذکرشده در جدول ۱۰ به صورت جداگانه در آب مقطر حل گردیده و به حجم ۱۰۰ سی‌سی رسانده می‌شود.

جدول ۱۰: ویتامین‌های مورد نیاز در تهیه محیط کشت MS

نام ویتامین	(mg/l)	استوک (mg در 100cc)
Myo-Inositol	100	-
Nicotinic acid	0.5	50 (1cc = 0.5 mg)
Pyridoxine HCL	0.5	50 (1cc = 0.5 mg)
Thiamine HCL	0.1	10 (1cc = 0.1 mg)
Glycine	2	200 (1cc = 2 mg)

مقدار ۱ سی‌سی از استوک هر یک از ویتامین‌ها، تأمین‌کننده مقدار مورد نیاز برای تهیه یک ۱ لیتر محیط کشت MS است. دقت نمایید که گلایسین اسیدآمینه است.

۵-۵-۶ تهیه استوک برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

مهم‌ترین و مرسوم‌ترین گروه‌های تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل ٤ گروه مهم سیتوکینین‌ها، اکسین‌ها و جیبرلین‌ها و آبسیزیک اسید می‌باشند که در غلظت-های متفاوت در محیط‌های کشت استفاده می‌شوند. فرمول شیمیایی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بسته به شرکت سازنده آن‌ها متفاوت است و ممکن است در NaOH یک نرمال، HCl یک نرمال، DMSO و یا اتانول ۹٦٪ حل شوند. معمولاً استوک تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به نحوی تهیه می‌شود که هر ۱ سی‌سی از آن برابر ۱ میلی‌گرم از ماده خشک آن باشد. برای تهیه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به روش زیر عمل می‌نماییم:

• تهیه استوک NAA [1] (نفتالین استیک اسید) (cc1= mg1)

ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از ماده خشک NAA را در یک ظرف شیشه‌ای وزن نمایید.

ماده را در بشر ۱۰۰ سی‌سی که قبلاً کاملاً تمیز و خشک گردیده، بریزید.

به‌وسیله سمپلر، ۱ تا ۲ سی‌سی از محلول NaOH یک نرمال برداشته و به‌آرامی به بشر حاوی NAA اضافه نمایید.

بشر را به‌آرامی تکان داده تا NAA به‌خوبی در حلال خود حل شود.

۲ تا ۵ سی‌سی آب مقطر را قطره‌قطره به بشر اضافه کرده و به‌آرامی تکان دهید.

بقیه آب مقطر استریل را به‌تدریج به استوک اضافه کرده و حجم محلول را به ۱۰۰ سی‌سی برسانید.

محلول استوک را در یخچال نگهداری کنید.

• تهیه استوک BAP [2] (بنزیل آمینو پورین) و KIN (کینتین) (cc1= mg1)

ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از ماده خشک BAP یا KIN را در ظرف شیشه‌ای وزن نمایید.

ماده را در بشر ۱۰۰ سی‌سی که قبلاً کاملاً تمیز و خشک گردیده، بریزید.

به‌وسیله سمپلر، ۱ تا ۲ سی‌سی از محلول NaOH یک نرمال برداشته و به‌آرامی به بشر اضافه نمایید.

---

[1] - Naphthaleneacetic acid
[2] - 6-Benzylaminopurine
[3] - Kinetin

بشر را به‌آرامی تکان داده تا تنظیم‌کننده رشد به‌خوبی در حلال خود حل شود.

۲ تا ۵ سی‌سی آب مقطر را قطره‌قطره به بشر اضافه کرده و به‌آرامی تکان دهید.

بقیه آب مقطر استریل را به‌تدریج به استوک اضافه کرده و حجم محلول را به ۱۰۰ سی‌سی برسانید.

محلول استوک را در یخچال نگهداری کنید.

دقت شود که استوک IAA [1] و KIN باید در ظروف تیره و در یخچال نگهداری شود، زیرا این ترکیبات به نور حساس بوده و تجزیه خواهند شد.

۶-۵ طریقه ساخت محیط کشتMS:

بعد از تهیه استوک‌های مورداشاره باید آن‌ها را به نسبت مشخص با آب مقطر، ساکاروز، میواینوزیتول و آگار مخلوط نموده تا محیط جامد به دست آید.

• تهیه ۱ لیتر محیط کشت MS با استفاده از استوک‌های ساخته‌شده

۱- ابتدا ظرفی حاوی ۵۰۰ سی‌سی آب مقطر را بر روی دستگاه همزن مغناطیسی قرار داده و مگنت را به‌منظور هم زدن محلول در داخل آن قرار دهید.

۲- میزان ۱۰۰ سی‌سی از استوک مواد ماکرو را با استفاده از مزور ۱۰۰ سی‌سی به آن اضافه کنید.

۳- میزان ۱۰ سی‌سی از استوک مواد میکرو را به آن اضافه کنید.

میزان ۵ سی‌سی از استوک آهن را با استفاده از میکرو پیپت ۵ سی‌سی به آن اضافه نمایید.

۵- هر یک از ویتامین‌ها را به میزان ۱ سی‌سی به آن اضافه نمایید.

۶- میزان ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر میواینوزیتول وزن نموده و به محلول اضافه نمایید.

۷ – مقدار ۳۰ گرم ساکاروز وزن نموده و به محلول اضافه نمایید.

۸- حجم محلول را با استفاده از مزور ۱۰۰۰ سی‌سی به حجم یک لیتر برسانید.

۹- با استفاده از pH متر، pH آن را در حد ۵/۸ تنظیم نمایید.

۱۰- pH متر را از محلول خارج کرده و سپس آگار را به میزان لازم (برحسب نوع آگار) به محیط اضافه نمایید.

۱۱- این محیط را به‌نحوی‌که آگار آن به یک نسبت توزیع شود در ظروف کشت مناسب بریزید و اتوکلاو کنید. به دلیل اضافه کردن آگار رنگ محیط تغییر می‌کند.

منابع

ابراهیمی م.، مختاری آ.، مرادی ک. و خان احمدی م. برنامه خودکفایی تولید غده بذری عاری از ویروس ارقام مختلف سیب‌زمینی. ٤٢-٩٤ ک، ١٣٩٤
احتشامی م.، میارنعیمی م. و مزینی م. بیماری‌های مهم سیب‌زمینی. سازمان جهاد کشاورزی استان تهران. ١٣٨٧
احمدی ک.، قلی زاده ح.، عبادزاده ح.، حاتمی ف.، فضلی ب.، کاظمیان آ.، رفیعی م. و حسین پور ر. آمارنامه کشاورزی سال زراعی ٩٤-١٣٩٣: محصولات زراعی (جلد ١). وزارت کشاورزی، معاونت برنامه و بودجه، اداره کل آمار و اطلاعات. ١٣٩٥
نیکان جعفر. مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی شته زاد و مدیریت آن‌ها در مزارع تولید بذر سیب‌زمینی. موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی. ١٣٩٥

Abbas, M. F., Aziz-ud-Din, G. A., Qadir, A., & Ahmed, R. (2013). Major potato viruses in potato crop of pakistan: A brief review. Int. J. Biol. Biotech, 10(3), 435-440.
Al-Saikhan, M., Howard, L., & Miller Jr, J. (1995). Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (Solanum tuberosum, L.). Journal of Food Science, 60(2), 341-343.
Beukema, H., & van der Zaag, D. E. (1990). Introduction to potato production: Pudoc Wageningen.
Demagante, A., & Vander Zaag, P. (1988). The response of potato (Solanum spp.) to photoperiod and light intensity under high temperatures. Potato Research, 31(1), 73-83.
Ewing, E. (1981). Heat stress and the tuberization stimulus. American Potato Journal, 58(1), 31.
Gopal, J., Minocha, J., & Dhaliwal, H.(1998). Microtuberization in potato (Solanum tuberosum L.). Plant Cell Reports, 17(10), 794-798.
Harris, P. M. (2012). The potato crop: the scientific basis for improvement: Springer Science & Business Media.
Horton, D. E. (1987). Potatoes: Production, marketing, and programs for developing countries: International Potato Center.
Khurana, S. P., Minhas, J., & Pandey, S. (2003). The Potato: production and utilization in sub-tropics.
Li, P. (2012). Potato physiology: Elsevier.
Lommen, W. J. M. (1995). Basic studies on the production and performance of potato minitubers. Lommen,
McDonagh, P. (2012). Native, modified and clean label starches in foods and beverages. In Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings (pp. 162-174): Elsevier.
Pushkarnath. (1976). Potato in Sub-tropics: Orient Longman.
ROWE, R. E. (1993). Potato health management. Retrieved from
Salaman, R. N., Burton, W. G., & Hawkes, J. The history and social influence of the potato: Cambridge University Press.
Shekhawat, G., Paul, S., Khurana, S., Pandey, K., & Chandla, V. (1994). Potato: present & future (Proceeding of the National Symposium held at Modipuram during 1–3, March, 1993). Central potato Res. Inst., Shimla–171001, HP, India, 247.
Struik, P. C., & Wiersema, S. G. (1999) Seed potato technology: Wageningen Academic Pub.
Tadesse, M. (2000). Manipulating the physiological quality of in vitro plantlets and transplants of potato. The Netherlands: Wageningen University.
Talburt, W. F., & Smith, O. (1967). Potato processing. Westport, Conn., USA.
United Nations, N. Y., Ny. Department of Economic, & Affairs, S. (2002). World population ageing, 1950-2050: United Nations Publications.
Went, F. W. (1957). The experimental control of plant growth. The experimental control of plant growth., 17.
Wiersema, S. G. (1984). The production and utilization of seed tubers derived fromm true potato seed. Retrieved from