افزایش نرخ تکثیر چغندرقند در شرایط این ویترو با استفاده از بیوراکتور تناوبی

Increasing of in vitro multiplication rate of sugar beet using periodical bioreactor

فرانک روزبه[1]، داریوش داودی[2] و محمود مصباح[1]

ف. روزبه، د. داودی و م. مصباح. ۱۳۸۳. افزایش نرخ تکثیر چغندرقند در شرایط این ویترو با استفاده از بیوراکتور تناوبی. **چغندرقند ۲۰(۲): ۱۱۳-۱۲۵**

چکیده

ریزازدیادی در سطح وسیع یا درحد تجاری علی‌رغم دارا بودن مزایای فراوان نسبت به روش‌های کلاسیک تکثیر با مشکلات متعددی ازجمله هزینه‌های بالای تولید همراه است. کاربرد بیوراکتورهای گیاهی در ریزازدیادی گیاهان می‌تواند این هزینه‌ها را کاهش داده و آنرا ازنظر اقتصادی توجیه پذیر نماید. بر این اساس، هدف از اجرای این تحقیق بررسی امکان استفاده از بیوراکتور در ریزازدیادی چغندرقند و بهینه سازی کشت بافت آن بود. ابتدا با استفاده از یک پمپ هواساز، زمان سنج، فیلترهای یکبار مصرف ۰/۲ میکرون و شلنگ‌های قابل اتوکلاو، بیوراکتور تناوبی ساده ساخته شد. گیاهچه‌های حاصل از کشت بذر در شرایط درون شیشه در بیوراکتور کشت گردیدند. محیط غذایی پایه MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۳ درصد ساکارز به صورت مایع برای تکثیر در بیوراکتور مورد استفاده قرار گرفت و تغذیه تناوبی ریزنمونه‌ها در هر ٦ ساعت به مدت ۱۰ دقیقه برقرار گردید. برای القاء ریشه‌زایی در بیوراکتور، محیط کشت پایه MS با ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA بدون دستکاری سیستم به کار برده شد. مقایسه نرخ تکثیر در مرحله پرآوری شاخه در بیوراکتور و ظروف ۱۰۰ میلی‌لیتری با چهار تکرار انجام گرفت. نتایج نشان داد که تکثیر در بیوراکتور از حیث تعداد شاخه، وزن‌تر، وزن خشک، وزن تک شاخه و نرخ تکثیر در مقایسه با ظروف ثابت ۱۰۰ میلی‌لیتری تفاوت معنی‌داری دارد اما درصد ریشه‌زایی در تیمار اعمال شده بسیار پایین بوده و نیاز به مطالعه بیشتر جهت القاء مطلوب ریشه‌زایی در بیوراکتور دارد.

واژه‌های کلیدی: بیوراکتور تناوبی، توجه اقتصادی، چغندرقند، روش‌های کلاسیک، ریزازدیادی

---

۱ - عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات چغندرقند- کرج.

۲ - عضو هیئت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی- کرج

مقدمه

چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) به طور طبیعی گیاهی دگرگرده افشان است اما امکان خودگشنی و ایجاد خودناسازگاری ژنتیکی برای تهیه و کاربرد اینبرد لاین‌ها در برنامه‌های اصلاحی آن وجود دارد. به نژادگران از این اینبردلاین‌ها برای تولید هیبریدها استفاده می‌کنند و کولتیوارهای هیبرید معمولاً از تلاقی بین یک والد نرعقیم و یک والد گرده‌افشان به دست می‌آیند. ژنوتیپ‌های انتخابی نرعقیم اغلب اوقات به روش تکثیر رویشی نگه‌داری می‌شوند و این کار با استفاده از قطعاتی از ریشه کامل یا قلمه‌های برگی انجام می‌شود (Meidema et al. 1980) اما نتایج حاصل از این روش همیشه رضایت‌بخش نیست و نرخ بسیار سریع‌تر تکثیر می‌تواند از طریق ریزازدیادی به دست آید(George 1996).

ریزازدیادی در سطح وسیع یا در حدتجاری علیرغم دارا بودن مزایای فراوان نسبت به روش‌های کلاسیک تکثیر، با مشکلات فنی متعددی همراه است. روش‌های رایج که براساس فعالیت آزمایشگاه‌های تحقیقاتی شکل گرفته‌اند شامل تعداد زیادی ظروف کشت کوچک، محیط کشت نیمه‌جامد یا جامد و تکثیر و دستکاری بافت گیاهی در شرایط استریل می‌باشد. بنابراین هزینه‌های تولید بالا بوده و موجب محدود شدن ریز ازدیادی تجاری گردیده است (داودی و روزبه ۱۳۷۸).

بخش اعظم هزینه‌های جاری تولید، بخصوص در کشورهای پیشرفته مربوط به دستمزد می‌باشد و بسیاری از آزمایشگاه‌ها مشغول تحقیق در این مورد 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 ریز ازدیادی و کاهش هزینه آن کمک کند(Vishnevetsky et al. 1997; Takayama and Akita 1994). مکانیزاسیون و اتوماسیون فرایند 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(Levin et al. 1988; Aitken-Christi 1991; Aitken-Christi et al. 1995; Vasile 1994). 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. استفاده از بیوراکتور در تکثیر گیاهان اولین بار در سال ۱۹۸۱ برای بگونیا گزارش شد (Takayama and Akita 1994). بعد از آن بهینه‌سازی تکثیر با این روش در گیاهان سیب‌زمینی و هویج نیز گزارش گردید

Akita and Takayama 1994; Jay et al.) 1994). در گیاه زینتی Nerine که تکثیر طبیعی آن کند است استفاده از بیوراکتور مناسب بوده و نتایج نشان داده‌اند که در محیط‌های یکسان میزان رشد در بیوراکتور ۶ تا ۸ برابر بیشتر از محیط کشت مایع ثابت می‌باشد(Vishnevetsky et al.1997). هم چنین طبق برخی گزارشات تا پنج هزار جنین هویج از هر میلی‌لیتر سوسپانسیون به دست آمده است. آکیتا و همکاران (۱۹۹۴) با استفاده از یک بیوراکتور پانصد لیتری تولید دویست هزار گیاهچه استویا را از یک ظرف گزارش کردند. گزارشاتی نیز در استفاده از بیوراکتور در کشت سلولی برای تولید جنین‌های غیرجنسی یا متابولیت‌های ثانویه وجود دارد (Takayama and Akita 1994; Ziv et al. 1994).

اگرچه استفاده از بیوراکتورها به طور عمده برای کشت‌های سوسپانسیون سلولی و تولید فرآورده‌های ثانویه بوده است، اما بهینه‌کردن بیوراکتورها برای جنین‌زایی غیرجنسی نیز در تعدادی از گیاهان مورد مطالعه قرار گرفته است (Nadel et al. 1990; Scragg 1990 and 1992; Hale et al, 1992; Archambault et al. 1994; Takayama and Akita 1998). امکان استفاده از بیوراکتور گیاهی برای تکثیر بهینه گیاهان میخک و آناناس (داودی و روزبه ۱۳۷۸) سیب زمینی (داودی و مجیدی ۱۳۸۰؛ مجیدی و داودی ۱۳۸۲) و هم چنین گیاه موز(فراهانی و همکاران، ۱۳۷۸) گزارش گردیده است. کشت درمحیط غذایی مایع با استفاده از یک سیستم غوطه‌ورسازی موقت با تعداد دفعات متفاوت غوطه ورسازی برای بهبود کیفیت گیاه و افزایش نرخ تکثیر موز، قهوه، هوآ (Hevea) و سیب‌زمینی (Alvard et al. 1993; Teisson and Alvard 1995; Etienne et al. 1997; ، داودی و مجیدی ۱۳۸۰؛ مجیدی و داودی ۱۳۸۲) و نیشکر (منتشر نشده) گزارش شده است.

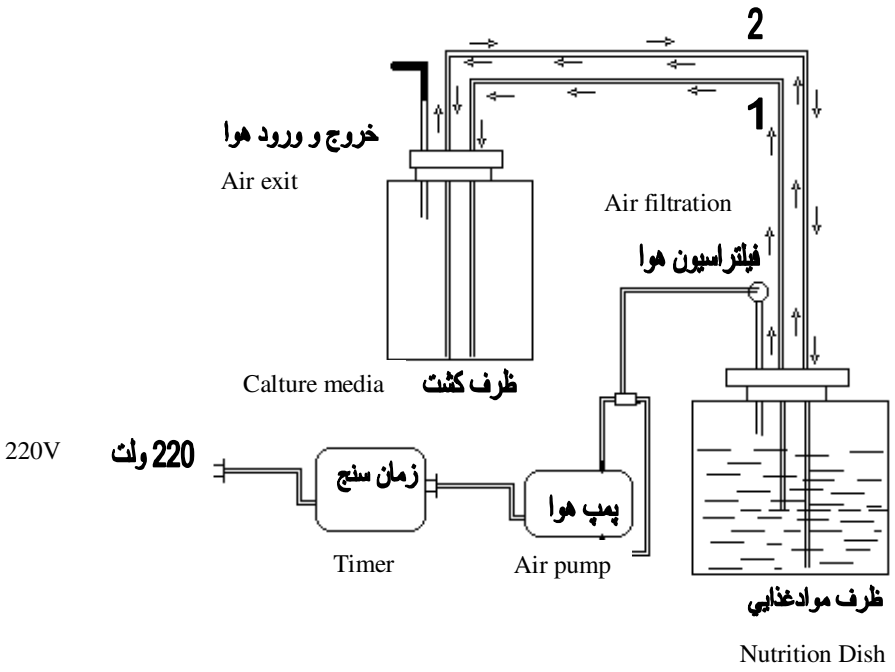
در حال حاضر از بیوراکتورها برای ریزازدیادی تجاری در کشورهای ایالات متحده، ژاپن، تایوان، کره، کوبا، کاستاریکا، هلند، اسپانیا، بلژیک و فرانسه استفاده می شود. گیاهان زینتی، پیازدار، آناناس، سیب‌زمینی و درختان جنگلی به این روش تکثیر می‌شوند و با استفاده از بیوراکتور توانسته‌اند قیمت واحد را برای گیاهان علفی از ۰/۱۷ دلار به ۰/۰۶ تا ۰/۰۷ دلار کاهش دهند (Ziv 2000). با توجه به مزایای کشت در بیوراکتور و استفاده از محیط غذایی مایع از یک طرف و در دستور کار قرار داشتن ریزازدیادی چغندرقند در برنامه‌های اصلاحی، این تحقیق جهت بررسی امکان تکثیر و کلن‌سازی چغندرقند در بیوراکتور انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذور چغندرقند رقم Dorothea پس از ضدعفونی سطحی روی محیط کشت پایه 1/2MS جامد شده با هشت گرم در لیتر آگار در ظروف استوانه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط غذایی کشت شده و در دمای ۲۵ درجه

سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی در حدود ۳۰۰۰ لوکس نوری قرار داده شدند. با توجه به آلودگی شدید بذور، ابتدا آنها را با مایع ظرفشویی شسته سپس به مدت یک دقیقه در الکل و ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد ضدعفونی سطحی شده و پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل و خشک کردن آنها، در شرایط استریل کشت گردیدند. گیاهچه های بیست روزه حاصل از جوانه زنی بذور برای کشت در بیوراکتور و مقایسه با ظروف ۱۰۰ میلی لیتری مورد استفاده قرار گرفتند.

شرح دستگاه بیوراکتور: بیوراکتورهای مورد استفاده در دو اندازه ۳ و ۶ لیتری انتخاب شدند, که در نحوه کارکرد، تغذیه و هوادهی مشابه بودند. برای برقراری سیستم بیوراکتور از پمپ هوای آکواریومی، زمان‌سنج با فواصل زمانی ۱۰ دقیقه، شیلنگ‌های سیلیکونی با قطر ۰/۵ و ۰/۸ سانتی‌متر قابل اتوکلاو کردن، میکروفیلترهای یک بار مصرف با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرون، ظرف موادغذایی و ظرف کشت به صورتی که در شکل ۱ آورده شده است, استفاده به عمل آمد.



شکل ۱ اجزاء بیوراکتور و گردش کار آن‌ها

Fig. 1 Diagram of bioreactor components and their relations

با روشن شدن پمپ توسط زمان‌سنج، موادغذائی به داخل ظرف کشت پمپ‌شده، تا زمان معینی در آنجا نگاه داشته‌شده و ضمن هوادهی در این مدت، با خاموش‌شدن پمپ توسط زمان‌سنج، موادغذائی به طور کامل به ظرف موادغذائی تخلیه می‌شود. پس از مشخص‌شدن موقعیت اجزاء، موادغذائی را در یک ظرف جداگانه و سیستم بیوراکتور را به صورت کامل در اتوکلاو استریل‌کرده و عمل تخلیه موادغذائی در ظـرف مربوطه و کشت تعداد ۱۵- ۱۰ عدد گیاهچه بذری (چهاربرگی) چغندرقند رقم Dorothea پس از قطع ریشه در ظرف 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 شش ساعت یک بار به مدت ۱۰ دقیقه برقرار گردید. برای بیوراکتورهای ۶ و ۳ لیتری، به ترتیب ۴ و ۲ لیتر محیط غذایی مورد استفاده قرار گرفت.

محیط‌های کشت: براساس آزمایشات اولیه‌ای که در مورد کشت گیاهچه‌های چغندرقند در بیوراکتور صورت گرفته بود محیط غذایی پایه MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۳٪ ساکارز به صورت مایع جهت تکثیر مورد استفاده قرار گرفت. کشت در ظروف ۱۰۰ میلی‌لیتری با محیط کشت پایه PGoB حاوی ۰/۵ میلی‌گرم BA، ۰/۲ میلی‌گرم NAA، و یک میلی‌گرم در لیتر GA_3 به صورت جامد با هشت گرم در لیتر آگار جهت مقایسه با سیستم بیوراکتور بکار گرفته شد. پس از ۴۰ روز فاکتورهای وزن‌تر، وزن خشک و تعداد گیاهچه‌های ظرف اندازه‌گیری گردید. نسبت تعداد گیاهچه در هر ظرف به جمعیت پایه همان ظرف معادل با نرخ تکثیر در نظر گرفته شد و تیمارها در چهار تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد مقایسه قرار گرفتند. آزمون T برای مقایسه دو سیستم بیوراکتور و ظروف ۱۰۰ میلی‌لیتری از حیث نرخ تکثیر مورد استفاده قرار گرفت. برای القاء ریشه‌زایی در بیوراکتور، محیط کشت معمول آزمایشگاه شامل محیط کشت پایه ½PGoB با سه میلی‌گرم در لیترNAA و محیط کشت پایه MS با سه میلی گرم در لیتر IBA بدون دستکاری سیستم بکار برده شد به این ترتیب که ظرف حاوی محیط کشت ریشه‌زایی در شرایط استریل جایگزین ظرف حاوی محیط کشت تکثیر گردید و پس از ۴۰ روز میزان ریشه‌زایی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

بذور کشت شده با روش ضدعفونی ذکر شده به خوبی در شرایط *in vitro* جوانه‌زنی کرده و با رشد مطلوب روی محیط غذایی در مرحله چهار برگی برای واکشت در بیوراکتور و ظروف ۱۰۰ میلی‌لیتری مورد استفاده قرار گرفتند. رشد گیاهچه‌های تلقیح شده در بیوراکتور بسیار سریع بود به طوری که پس از گذشت سه الی چهار روز مرحله انطباق با شرایط سپری شده و

رشد گیاهچه‌ها محسوس بود. رشد اندام‌هوایی در بیوراکتور به صورتی بود که پس از گذشت چهار هفته از تلقیح، در مقایسه با شاخه‌های واکشت شده در ظروف ۱۰۰ میلی‌لیتری بسیار بزرگ به نظر می‌رسیدند(شکل ۲). میانگین, انحراف معیار مربوطه و نتیجه آزمون t برای مقایسه میانگین تعداد شاخه در ظرف، وزن خشک و وزن تر شاخه‌ها، وزن تک شاخه ونرخ تکثیر در دو سیستم بیوراکتور و ظروف ۱۰۰ میلی‌لیتری در جداول ۱ و ۲ آورده شده است.

جدول ۱ تأثیر سیستم‌های مختلف کشت بر صفات مختلف مرحله تکثیر چغندرقند در شرایط این ویترو. هر خانه جدول شامل (انحراف معیار ± میانگین) می‌باشد

Table 1 The influence of different culture systems on various traits of sugar beet multiplication in *In vitro* condition. Each entry in the table gives the mean ± S.E.

		نرخ تکثیر Rate of multiplication	وزن تک شاخه (گرم) Weight of single shoot (gr)	وزن تر (گرم) Fresh weight (gr)	وزن خشک (گرم) Dry weight (gr)	تعداد شاخه Number of shoots
سیستم کشت Culture system	بیوراکتور Bioreactor	10.21 ± 6.13	4.817 ± 0.854	538 ± 284	37.8 ±18.1	113.3 ± 64.8
	ظروف ۱۰۰ میلی لیتری 100 ml jars	1.885 ± 0.536	0.271 ± 0.142	2.395 ± 0.698	0.1639 ± 0.0817	9.75 ± 2.63

جدول ۲ نتیجه آزمون t برای مقایسه میانگین صفات مختلف بین سیستم بیوراکتور و ظروف ۱۰۰ میلی لیتری

Table 2 Result of t-test for mean comparison of different traits in bioreactor system and 100 ml containers

	نرخ تکثیر Rate of multiplication	وزن تک شاخه (گرم) Weight of single shoot (gr)	وزن تر (گرم) Fresh weight (gr)	وزن خشک (گرم) Dry weight (gr)	تعداد شاخه Number of shoots
T	2.7^{*}	10.51^{**}	4.15^{**}	3.77^{**}	3.19^{*}
α	0.035	0.0000	0.006	0.0092	0.019

* و ** به ترتیب اختلاف در سطح پنج درصد و یک درصد احتمال معنی‌دار است.

*,** Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

شکل ۲ رشد و تکثیر شاخه‌ها در الف- بیوراکتور سه لیتری، ب- بیوراکتور شش لیتری و مقایسه آن با شاخه‌ها ی تکثیر شده در ظرف ۱۰۰ میلی‌لیتری، ج- یک گیاهچه حاصل از بیوراکتور و د- رشد و تکثیر شاخه‌ها در ظروف ۱۰۰ میلی لیتری

Fig. 2 Growth and multiplication of shoots in: A- 3 liters bioreactor, B- Shoot multiplication in 6 liters bioreactor compared with 100 mlit. Containter, C- A plantlet form bioreactor, D- growth and multiplication of shoots in 100mlit. containers

نتایج خلاصه شده در جدول ۲ بیان‌گر وجود اختلاف معنی‌دار بین سیستم بیوراکتور و ظروف ۱۰۰ میلی‌لیتری از حیث تمامی فاکتورهای مورد بررسی می‌باشد. علیرغم ریشه‌زایی برخی شاخه‌ها در بیوراکتور (شکل ۳)، نتایج حاصل از اعمال تیمار ریشه‌زایی در مقایسه با نتایج ریشه‌زایی در ظروف ۱۰۰ میلی‌لیتری و محیط کشت جامد بسیار پایین بود (زیر ۵ درصد) به طوری که تنها تعدادی از شاخه‌ها در یک تکرار از تکرارهای ریشه‌زایی در بیوراکتور ریشه‌دار شده بودند.

شکل ۳ ریشه‌زایی شاخه‌های چغندرقند در بیوراکتور
Fig. 3 Rooting of sugar beet shoots in bioreactor

به علت تماس اندام هوایی با مواد غذایی در زمان تغذیه در بیوراکتور، شاخه‌زایی مستقیم (Direct Organogenesis) روی دمبرگ برخی شاخه‌ها مشاهده گردید.

با توجه به سابقه تحقیق در مورد کاربرد بیوراکتور در رشد وتکثیر مواد گیاهی و همانگونه که قابل پیش‌بینی بود و نتایج این تحقیق نیز نشان داد، کاربرد سیستم بیوراکتوری می‌تواند برای سرعت بخشیدن به برنامه کلون‌سازی چغندرقند مفید واقع گردد. فاکتورهای تعداد شاخه تولید شده در یک ظرف کشت و نرخ تکثیر که جزء مهم‌ترین فاکتورهای مرحله تکثیر (Multiplication stage) می‌باشند و هم چنین فاکتورهای مرتبط با تولید بیوماس در سیستم بیوراکتور افزایش معنی‌داری در مقایسه با کشت در ظروف ۱۰۰ میلی‌لیتری در این تحقیق نشان داده‌اند اما با توجه به رشد زیاد اندام‌هوایی در بیوراکتور، نسبت بیوماس به تعداد شاخه که همان وزن تک شاخه می‌باشد بالا بوده و منجر به تولید گیاهان غیرمینیاتوری در شرایط این‌ویترو می‌گردد. مسئله تحریک رشد شاخ و برگ در بیوراکتور با تغذیه تناوبی یا ناپیوسته قبل از این نیز گزارش شده است (Ben-Yosef 1999). ایجاد گیاهان غیرمینیاتوری در مرحله تکثیر اگرچه موجب

سـازگاری سریع‌تر گیاهچه‌های به دست آمده پس از ریشه‌دهی می‌گردد اما درنهایت تعداد شاخه تولیدشده و نرخ تکثیر را کاهش می‌دهد. بنابراین جلوگیری از رشد زیاد شاخ و برگ و افزایش نرخ تکثیر می‌تواند به عنوان یکی از موارد بهینه‌سازی تکثیر در بیوراکتور، مدنظر قرار گیرد و با انجام آزمایش بررسی گردد. معمولاً روش کار استاندارد برای فرمنتورها به این صورت است که فعالیت‌های تحقیقات جدید و اعمال تیمارها با استفاده از ظروف کوچک انجام گرفته و سپس روش کار مطلوب در ظروف یا فرمنتورهای بزرگ به کار گرفته می‌شوند و در مورد بیوراکتورهای گیاهی نیز به نظر می‌رسد بایستی به همین ترتیب عمل شود چون نتایج حاصل از ظروف کشت کوچک با محیط کشت جامد و سیستم بسته قابل تعمیم برای بیوراکتور نمی‌باشد. نتایج آزمایشات اولیه برای تعیین محیط غذایی مطلوب برای مرحله تکثیر در بیوراکتور ظاهراً دال بر این بود که علیرغم مطلوب‌بودن محیط کشت پایه PGoB برای تکثیر در ظروف ثابت ۱۰۰ میلی لیتری، محیط کشت پایه MS بهتر می‌تواند نیازهای غذایی سیستم بیوراکتور را تأمین نماید. از طرف دیگر عدم قابلیت تعمیم نتایج حاصل از ظروف ثابت و محیط کشت جامد به سیستم بیوراکتور در مرحله ریشه‌زایی نیز مشاهده گردید. یعنی محیط کشت معمول ریشه‌زایی در آزمایشگاه کشت بافت چغندرقند با درصد قابل قبول ریشه‌زایی ویک تیمار محیط کشت دیگر (ذکر شده در مواد و روش‌ها) برای ریشه‌زایی در بیوراکتور به کار گرفته شد اما تنها در تیمار دوم تعداد محدودی از شاخه‌ها ریشه‌دار شدند. بنابراین نتیجه‌گیری کلی از این قسمت عبارت است از این که اگر هدف، تعیین شرایط فیزیکی و شیمیایی مطلوب تکثیر در سیستم بیوراکتوری می‌باشد باید تیمارهای آزمایشی در بیوراکتورهایی با مقیاس کوچک اعمال گردند به طوری که نتایج آزمایش قابل تعمیم به بیوراکتورهایی در مقیاس بزرگتر باشند.

وضعیت فیزیولوژیکی شاخه‌های تکثیرشده در بیوراکتور به علت شرایط متفاوت محیطی یعنی ترکیب گازهای داخل ظرف، رطوبت نسبی، نحوه تغذیه و توان اتوتروفی بالفعل نسبت به شاخه‌های تولیدشده در سیستم‌های ثابت و پیوسته، متفاوت بوده و بالطبع عکس‌العمل این شاخه‌ها نسبت به تیمارهای یکسان می‌تواند متفاوت باشد. به عنوان مثال تهویه هوا که در بیوراکتور انجام می‌شود یکی از عوامل ایجادکننده این تفاوت‌هاست (داودی و مجیدی ۱۳۸۰) و همین تفاوت‌هاست که موجب می‌شوند علیرغم شاخه‌زایی افزوده چغندرقند در بیوراکتور، نتایج حاصل از اعمال تیمارهای محیط کشت ریشه‌زایی معمول در آزمایشگاه کشت بافت چغندرقند برای ریشه‌زایی شاخه‌ها در بیوراکتور مطلوب نباشد.

اندام‌زایی مستقیم روی برخی دمبرگ‌ها که در بیوراکتور مشاهده گردید و به افزایش نرخ تکثیر کمک می‌کند، توسط سایر محققین نیز گزارش شده است

Hussey and Hepher 1978; Saunders 1982;) (Harms et al. 1983).

معنی‌دارشدن تفاوت‌های دو سیستم ذکرشده در حالی بوده است که از بیوراکتور در دو اندازه ۳ و ۶ لیتری استفاده به عمل آمده است یعنی حتی بالا بودن خطای آزمایشی نیز نتوانسته است تفاوت بین دو سیستم را به پوشاند و طبیعتاً در صورت استفاده از ظروف بیوراکتور هم اندازه که موجب کاهش خطای آزمایش می‌شود، تفاوت‌ها بیشتر آشکار خواهد شد.

تشکر و قدردانی

اینک از زحمات همکاران محترم خانم‌ها خدابخش، بیگدلی، قنبری، زهرابی و آقایان مهندس دبیراشرافی و رستمی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده References

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، جلد سوم، ۱۱۵۹-۱۱۵۵.

داودی د. و مجیدی ا.۱۳۸۰ الف. روش سریع و کارآ برای تولید انبوه ریزغده‌های سیب‌زمینی در بیوراکتور تناوبی. خلاصه مقالات هفتمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران؛ مؤسسه تحقیقات نهال و بذر؛ کرج.

داودی د. و مجیدی ا. ۱۳۸۰ ب. مقایسه بین کشت تهویه‌دار و بدون تهویه در ریزازدیادی سیب‌زمینی (رقم آگریا). خلاصه مقالات هفتمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران؛ مؤسسه تحقیقات نهال و بذر؛ کرج.

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، جلد سوم، ۱۱۲۰۰-۱۱۹۹.

مجیدی ا. و داودی د. ۱۳۸۲. تولید انبوه ریزغده‌های سیب‌زمینی با استفاده از سیستم بیوراکتور تناوبی. مجله علوم زراعی ایران، جلد پنجم، شماره ۴، ۳۰۲-۳۱۴.

Aitken-Christie J (1991) Automation. P. 363-388. In: P. C. Debergh and R. H. Zimmerman (eds.), Micropropagation: Technology and application. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands

Aitken-Christie J, Kozai T, Takayama S (1995) Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. In: J. Aitken-Christie, et al. (eds.), Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands pp. 1-18

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

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

Alvard D, Cote F, Teisson C (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Plant Cell, Tiss. and Organ Cult. 32:55-60

Archambault J, Williams RD, Lavoie L, Pepin M-F, Chavarie C (1994). Production of somatic embryos in a helical ribbon impeller bioreactor. Biotech. Bioengin. 44:930-943

Ben-Yosef B (1999) Temporary immersion. Plant-tc Monthly

Archive-January, http:\\planttc.coafes.umn.edu/listserv/1999/log9901 /msg00049.html.

Etienne H, Lartaud M, Michaux-Ferrirere N, Carron MP, Berthouly M, Teisson C (1997) Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg) using the temporary immersion technique. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 33:81-87

George EF (1996) Plant Propagation by Tissue Culture: Part 2 In Practice. 115-117; Exegetics Ltd

Hale SA, Young RE, Adelberg JW, Keese RJ, Camper ND (1992) Bioreactor development for continual-flow liquid plant tissue culture. Acta Hort. 319:107-112

Harms CT, Baktir I, Oertli JJ (1983) Clonal propagation in vitro of red beet (*Beta vulgaris* ssp.) by multiple adventitious shoot formation. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 2, 93-102

Hussey G, Hepher A (1978) In vitro clonal propagation of sugarbeet plants and polyploid formation. Ann. Rep. John Innes Inst.1978 p. 49

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

Levin R, Gaba V, Tal B, Hirsch S, Denola D, Vasil IK (1988) Automated plant tissue culture for mass propagation. Bio/Technology 6: 1035-1040

Meidema D, Groot PG, Zuidgeest JHM (1980) Vegetative propagation of *Beta vulgaris* by leaf cuttings. Euphytica 29: 425-432

Nadel BL, Altman A, Ziv M (1990) Regulation of large scale embryogenesis in celery. Acta Hort. 280: 75-82

Saunders JW (1982) Cytokinin affects on formation of high frequency habituated callus and adventitious buds in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). In Fujiwara (Ed.) 1982 pp. 153-154

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

Scragg AH (1992) Large-scale plant cell culture: methods, applications and products. Current Opinion Biotech. 3:105-109

Takayama S, Akita M (1994). The type of bioreactor used for shoots and embryos. Plant Cell, Tiss. and Organ Cult. 39: 147-157

Takayama S, Akita M (1998) Bioreactor techniques for large-scale culture of plant propagules. Adv. Hort Sci. 12:93-100

Teisson C, 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 Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands

Vasil IK (1994) Automation of plant propagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 39:105-108

Vishnevetsky J, Azizbekova N, Ziv M, Lilien-Kipnis H (1997) Development of the bulb and inflorescence in outdoor grown *Nerine sariensis.* Acta Hort. (ISHS) 430:147-154

Ziv M (2000) Bioreactor Technology for Plant Micropropagation. Horticultural Reviews; Volume 24; Edited by J. Lanick; John Wiley & Sons, Inc

Ziv M, Kahavy S, 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 Cult. 39: 109-117