بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته کشاورزی، گرایش اصلاح نباتات

عنوان پایان نامه:

بهینه‌سازی باززایی مستقیم در پنج رقم سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.)

استاد راهنما:
دکتر محمد ربیعی

استاد مشاور:
دکتر محمود خدامباشی

پژوهشگر:
بتول رحیمیان فرادنبه

اسفند ماه ۱۳۹۲

دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

پایان‌نامه خانم بتول رحیمیان فرادنبه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته کشاورزی گرایش اصلاح نباتات با عنوان: بهینه‌سازی باززایی مستقیم در پنج رقم سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) در تاریخ ۱۳۹۲/۱۲/۲۰ با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با نمره ۱۹/۸ مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. استاد راهنمای پایان‌نامه

دکتر محمد ربیعی (استادیار) .....

۲. استاد مشاور پایان‌نامه

دکتر محمود خدامباشی (استاد) .....

۳. استادان داور پایان‌نامه

دکتر فریبا رفیعی (استادیار) .....

دکتر غلامرضا ربیعی (استادیار) .....

دکتر سیّد حسن طباطبایی

معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی

دانشکده کشاورزی

کلیه حقوق مادی مرتبط بر نتایج مطالعات، ابتکارات

و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه

متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تشکر و قدردانی

خدایا امان بده تا همواره در حال حرکت باشم و از شوق کشف ناگفته‌ها باز نمانم. فرصت بده تا همیشه تشنه بمانم و باز عطش، مرا بی تاب طلب علم کند. با حمد و سپاس به درگاه حضرت دوست که دیباچه‌ای دیگر از ایام را به روی ما گشود تا بار دیگر از خوان گسترده نعمتش بهره‌مند گردیم و شکر و سپاس از منّت بی انتهایش که به من توفیق انجام این پایان نامه را عطا کرد. از این رو بر خود وظیفه می دانم مراتب قدردانی و سپاس خود را نثار کسانی کنم که در این مسیر پر فراز و نشیب لحظه‌ای از راهنمایی، پشتیبانی و تشویق من دریغ نکردند.

از زحمات استاد فاضل و بزرگوارم آقای دکتر محمد ربیعی که با اخلاق حسنه و سعه صدرشان با من در انجام این پژوهش کمال همکاری را مبذول داشتند و با رویی گشاده و اخلاقی درخور تحسین در تمام مراحل عملی و علمی این کار با کمال تواضع مراگام به گام همراهی و مساعدت کردند، کمال قدردانی را دارم.

همچنین از راهنمایی‌های دلسوزانه استاد گرامی، آقای دکتر محمود خدامباشی که مشاوره این پایان نامه را بر عهده داشتند تشکر می نمایم.

از خانواده عزیزم که استقامت در تلاش را به من آموختند و در تمام این سال ها با فراهم کردن آرامش فکری و آسایش روحی، بسیاری دشواری ها را بر من آسان نمودند، با تمام وجود قدردانم.

در پایان از سایر اساتید محترم گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی و کلیه دوستان عزیزم که هرکدام به نحوی در این راه یاری گرم بودند به ویژه سرکار خانم سپیده محمدی و تهمینه شگفت که در تمام این مدت حضورشان مایه دلگرمیم بود قدردانی نموده و موفقیتشان را در تمام لحظات زندگی آرزو می کنم.

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

دو فرشته مهر و دوستی و مقدس ترین واژه های کتاب آفرینش،

که وجودشان بهانه زندگیم است و عطر یاس دعاهایشان اعتبار زیستنم.

خواهران و برادر عزیزم

یاران پر محبّت روزهای زندگیم،

که با قلبی مملو از مهر و محبّت در طول زندگی همواره مشوق من بوده اند.

و همه آنانی که به من آموختند.

چکیده

این تحقیق به منظور بهینه‌سازی باززایی مستقیم ارقام مختلف سیب‌زمینی شامل آریندا، اگریا، سانته، مارادونا و مارفونا به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. آزمایش ضدعفونی نشان داد غلظت ۱ درصد هیپوکلریت سدیم در مدت زمان ۵ و ۱۰ دقیقه به ترتیب بهترین نتیجه را در استریل کردن ریزنمونه برگ و میانگره ارقام مختلف سیب‌زمینی به همراه دارد. در آزمایش باززایی، هورمون BAP در غلظت‌های ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر و هورمون Kin در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با هم استفاده شدند. ارزیابی نتایج به دست آمده در محیط *In vitro* بر روی صفات سرعت باززایی، نوع باززایی و طول اندام باززایی شده نشان داد هورمون BAP بیشترین تاثیر را بر باززایی ارقام مختلف سیب‌زمینی دارد و هورمون Kin تاثیر کمتری بر صفات اندازه‌گیری شده در این آزمایش نشان داد. غلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP بیشترین تاثیر را در تولید ساقه و ریشه دارد و در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر این هورمون بییشترین میزان جنین تولید شد. طول ساقه‌ها و ریشه‌های تولید شده نیز در غلظت‌های پایین BAP بیشتر بود و با افزایش غلظت کاهش می‌یافت امّا سطوح غلظتی BAP در طول جنین تاثیری نداشت. هر چند در غلظت‌های ۰/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون Kin بیشترین میزان ساقه‌زایی و بلندترین ساقه‌ها به دست آمد، امّا این هورمون در میزان ریشه‌زایی و جنین‌زایی و طول ریشه‌ها و جنین‌های به دست آمده تاثیری نداشت. ارقام مورد مطالعه در اکثر صفات اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌داری نشان دادند که در این میان رقم مارفونا در تمامی صفات اندازه‌گیری شده پاسخ بهتری به شرایط *In vitro* نشان داد. با استفاده از تجزیه کلاستر ارقام و صفات دارای شرایط مشابه در این آزمایش در گروه‌های یکسان قرار گرفتند.

کلمات کلیدی: باززایی مستقیم، سیب‌زمینی، BAP، Kin.

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

فصل اول: مقدمه ۶

فصل دوم: بررسی منابع ۱۲

۲-۱ اصول کشت بافت ۱۲

۲-۲ تکنیک‌های کشت بافت ۱۳

۲-۳ باززایی ۱۴

۲-۳-۱ توانایی (Competence) و قابلیت (Determination) ۱۶

۲-۴ فاکتورهای موثر بر باززایی ۱۶

۲-۴-۱ مواد گیاهی ۱۷

۲-۴-۱-۱ تاثیر ژنوتیپ ۱۷

۲-۴-۱-۲ مرحله فیزیولوژیکی گیاه بخشنده ۱۸

۲-۴-۱-۳ منبع ریزنمونه ۱۹

۲-۴-۱-۴ اندازه ریزنمونه ۲۰

۲-۴-۱-۵ موقعیت ریزنمونه در گیاه بخشنده ۲۰

۲-۴-۲ تنظیم کننده‌های رشد ۲۰

۲-۴-۳ محیط کشت ۲۴

۲-۴-۴ شرایط کشت ۲۴

۲-۴-۵ رقابت ریزنمونه‌ها ۲۵

۲-۵ باززایی *In vitro* در سیب‌زمینی ۲۵

فصل سوم: مواد و روش‌ها ۲۹

۳-۱ مواد ۲۹

۳-۲ روش‌ها ۲۹

۳-۲-۱ تهیه گیاهچه‌های استریل ۲۹

۳-۲-۲ ترکیب و نحوه تهیه محیط کشت ۳۰

۳-۲-۳ استوک هورمون‌ها ۳۲

۳-۲-۳-۱ روش تهیه استوک هورمون BAP و Kin ۳۲

۳-۲-۴ ضدعفونی کردن ۳۲

۳-۲-۴-۱ ضدعفونی وسایل ۳۳

۳-۲-۴-۲ ضدعفونی محیط کشت ۳۳

۳-۲-۴-۳ ضدعفونی سطحی مواد گیاهی ۳۳

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

۳-۲-۵ آزمایش ضدعفونی ۳۴
۳-۲-۶ آزمایش باززایی ۳۴
۳-۲-۷ اندازه‌گیری صفات ۳۴
۳-۲-۸ تجزیه و تحلیل آماری ۳۵
فصل چهارم: نتایج و بحث ۳۶
۴-۱ ضدعفونی ۳۶
۴-۲ باززایی مستقیم ۴۵
۴-۲-۱ سرعت باززایی ۴۵
۴-۲-۲ نوع اندام باززایی شده ۴۶
۴-۲-۳ اندازه اندام باززایی شده ۴۹
۴-۳ تجزیه کلاستر ارقام و صفات مورد بررسی ۶۰
۴-۳-۱ تجزیه کلاستر ارقام ۶۰
۴-۳-۲ تجزیه کلاستر صفات ۶۰
۴-۴ تجزیه کلاستر هورمون‌ها ۶۰
۴-۴-۱ تجزیه کلاستر برای غلظت‌های مختلف هورمون BAP ۶۱
۴-۴-۲ تجزیه کلاستر برای غلظت‌های مختلف هورمون Kin ۶۱
نتیجه‌گیری کلی ۶۸
پیشنهادات ۶۹
منابع ۷۰

فهرست جدول‌ها

عنوان **شماره صفحه**

جدول ۱-۱ مقدار مواد موجود در ۱۰۰ گرم سیب‌زمینی ۷
جدول ۳ـ۱ مشخصات ارقام سیب‌زمینی مورد استفاده در این آزمایش ۳۰
جدول ۳ـ۲ ترکیب محیط کشت پایه MS ۳۱
جدول ۴-۱ جدول تجزیه واریانس ضدعفونی ریزنمونه‌ها در ۵ دقیقه ۳۸
جدول ۴-۲ جدول تجزیه واریانس ضدعفونی ریزنمونه‌ها در ۱۰ دقیقه ۳۸
جدول ۴-۳ تجزیه واریانس صفات مرتبط با باززایی از میانگره ۵ رقم سیب‌زمینی در شرایط کشت *In vitro* ۵۳
جدول ۴-۴ مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در ارقام مختلف ۵۴
جدول ۴-۵ مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در غلظت‌های مختلف هورمون BAP ۵۵
جدول ۴-۶ مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در غلظت‌های مختلف هورمون Kin ۵۶

فهرست شکل‌ها

عنوان **شماره صفحه**

شکل ۴-۱ مقایسه میزان آلودگی ریزنمونه‌ها در ۵ دقیقه ۳۹

شکل ۴-۲ مقایسه میزان از بین رفتن ریزنمونه‌ها در ۵ دقیقه ۳۹

شکل ۴-۳ مقایسه میزان آلودگی ریزنمونه‌ها در ۱۰ دقیقه ۴۰

شکل ۴-۴ مقایسه میزان از بین رفتن ریزنمونه‌ها در ۱۰ دقیقه ۴۰

شکل ۴-۵ مقایسه میزان آلودگی ارقام مختلف در ۵ دقیقه ۴۱

شکل ۴-۶ مقایسه میزان از بین رفتن ارقام مختلف در ۵ دقیقه ۴۱

شکل ۴-۷ مقایسه میزان آلودگی ارقام مختلف در ۱۰ دقیقه ۴۲

شکل ۴-۸ مقایسه میزان از بین رفتن ارقام مختلف در ۱۰ دقیقه ۴۲

شکل ۴-۹ مقایسه تاثیر سطوح مختلف هیپوکلریت سدیم بر میزان آلودگی و از بین رفتن ریزنمونه‌های ضدعفونی شده در ۵ دقیقه ۴۳

شکل ۴-۱۰ مقایسه تاثیر سطوح مختلف هیپوکلریت سدیم بر میزان آلودگی و از بین رفتن ریزنمونه‌های ضدعفونی شده در ۱۰ دقیقه ۴۳

شکل ۴-۱۱ مقایسه تاثیر سطوح مختلف هیپوکلریت سدیم بر میزان آلودگی و از بین رفتن ریزنمونه‌های ضدعفونی شده در ۵ دقیقه و ۱۰ دقیقه ۴۴

شکل ۴-۱۲ اثر متقابل سطوح مختلف هورمون BAP و رقم بر سرعت باززایی ۵۷

شکل ۴-۱۳ اثر متقابل سطوح مختلف هورمون BAP و رقم بر ساقه‌زایی ۵۸

شکل ۴-۱۴ اثر متقابل سطوح مختلف هورمون BAP و رقم بر طول جنین ۵۹

شکل ۴-۱۵ تجزیه کلاستر ارقام مورد بررسی ۶۲

شکل ۴-۱۶ تجزیه کلاستر صفات مورد بررسی ۶۲

شکل ۴-۱۷ تجزیه کلاستر برای غلظت‌های مختلف هورمون BAP ۶۳

شکل ۴-۱۸ تجزیه کلاستر برای غلظت‌های مختلف هورمون Kin ۶۳

شکل ۴-۱۹ ریزنمونه کشت شده سالم ۶۴

شکل ۴-۲۰ آلودگی قارچی در ریزنمونه‌ها ۶۴

شکل ۴-۲۱ آلودگی باکتریایی در ریزنمونه‌ها ۶۵

فهرست شکل‌ها

عنوان **شماره صفحه**

شکل ۴-۲۲ جنین‌زایی در ریزنمونه میانگره ۶۵

شکل ۴-۲۳ ریشه‌زایی در ریزنمونه میانگره ۶۶

شکل ۴-۲۴ ساقه‌زایی در ریزنمونه میانگره ۶۷

فصل اول

مقدمه

سیب‌زمینی زراعی *Solanum tuberosum* L. گیاهی آتوتتراپلوئید با ۴۸ کروموزوم، از اعضای خانواده Solanaceae و متعلق به جنس بسیار بزرگی است که ۱۶۰ گونه غده‌زا را شامل می‌شود که از این میان هشت گونه زراعی و مابقی وحشی هستند (ترکش اصفهانی، ۱۳۸۴). این گیاه یکی از مهمترین منابع دولپه‌ای در تغذیه انسان است (پیمان و همکاران، ۱۳۸۳) که از نظر اهمیت غذایی در جهان، مقام چهارم را بعد از گندم، برنج و ذرت دارد و از نظر عملکرد تولید هیچ محصولی قادر به رقابت با این محصول نمی‌باشد (بلندی و همکاران، ۱۳۸۹). همچنین به سبب دارا بودن اسیدهای آمینه مهم در پروتئین خود و ویتامین‌ها و مواد معدنی در حد مطلوب، پس از تخم‌مرغ، سیب‌زمینی دومین منبع غذایی ساده در جهان می‌باشد (مظفری، ۱۳۷۹). غده‌های سیب‌زمینی نسبت به محصولات دانه‌ایی دارای عملکرد بسیار بالایی در هکتار هستند (بورتون، ۱۹۶۹) و در صنایع غذایی و فرآوری محصولات، تولید الکل و غذای حیوانات استفاده می‌شوند (اترشی، ۲۰۰۶).

سیب‌زمینی یکی از مهمترین منابع غذایی گیاهی برای بشر به شمار می‌رود و با توجه به روند روبه رشد جمعیت جهان به خصوص در کشورهای در حال توسعه و توسعه نیافته و مشکل شرایط نامطلوب تغذیه در بسیاری از این کشورها، این گیاه در تغذیه مردم این مناطق نقش بسیار مهمی یافته است (ترکش اصفهانی، ۱۳۸۴). بنابراین به عنوان یک محصول غذایی مهم در برنامه توسعه اقتصادی سازمان ملل در این هزاره برای فراهم کردن امنیت غذایی و از بین بردن فقر نقش اساسی دارد. در این برنامه سیب‌زمینی تنها تامین کننده غذا نیست بلکه به عنوان یک محصول اقتصادی مهم تامین کننده شغل و درآمد نیز است. در تایید این نقش‌های مهم سازمان ملل سال ۲۰۰۸ را سال جهانی سیب‌زمینی نامید (برادشاو و بونیربال، ۲۰۱۰).

اگرچه سیب‌زمینی تنها حاوی ۲ درصد پروتئین براساس وزن تازه می‌باشد ولی ارزش آن تا ۱۰ درصد در وزن خشک افزایش می‌یابد که با بیشتر غلات از جمله برنج و گندم برابر است. سیب‌زمینی یک منبع غنی از لیزین است امّا دارای غلظت کمی از آمینواسیدهای سولفور است، زیرا این نوع از آمینواسیدها ارزش غذایی آن را کاهش می‌دهند (فریدمن، ۱۹۹۶). نسبت پروتئین به کربوهیدرات در سیب‌زمینی از بسیاری از غلات و ریشه‌ها و غده‌های دیگر بالاتر است و کیفیت پروتئین آن نیز در مقایسه با سایر محصولات گیاهی بسیار بالاتر است. ارزش بیولوژیکی پروتئین سیب‌زمینی از محصولاتی نظیر سویا، ذرت، گندم و لوبیا بالاتر است و از آنجا که درصد پروتئین‌های مشابه با پروتئین‌های شیر در گیاه سیب‌زمینی زیاد است می‌تواند یک جایگزین مناسب برای شیر در افرادی که معده آنها قابلیت هضم شیر را از دست داده است، به شمار رود (ترکش اصفهانی، ۱۳۸۴).

همچنین سیب‌زمینی حاوی مقدار زیادی ویتامین C، B6 و B1، اسید فولیک، پتاسیم معدنی، فسفر، کلسیم، منیزیم و ریزمغذی‌هایی چون آهن و روی است. پتاسیم یک ماده معدنی بسیار فراوان در این گیاه است. غلظت آهن و روی در سیب‌زمینی در مقایسه با ریزمغذی‌ها در غلات و لگوم کمتر است. سیب‌زمینی یک رژیم غذایی پر فیبر است مخصوصاً هنگامی که با پوست خورده می‌شود و همچنین غنی از آنتی اکسیدان‌هایی شامل پلی‌فنل، ویتامین C، کاروتنوئیدها و ویتامین E است (استوری، ۲۰۰۷). هر ۱۰۰ گرم از سیب‌زمینی حاوی مقدار مشخصی از مواد زیر است (احمد، ۲۰۱۰):

جدول ۱-۱ مقدار مواد موجود در ۱۰۰ گرم سیب‌زمینی

انرژی	۹۷ کیلوکالری	فسفر	۲۵ میلی‌گرم
آب	۷۵ گرم	کلسیم	۵ میلی‌گرم
کربوهیدرات	۲۲ گرم	آهن	۰/۳۵ میلی‌گرم
پروتئین	۲ گرم	منیزیوم	۰/۳۵ میلی‌گرم
چربی	۰/۱ گرم	ویتامین B1 (تیامین)	۱۳ میلی‌گرم
فیبر	۱/۵ گرم	ویتامین C	۵ میلی‌گرم
سدیم	۳۹۱ میلی‌گرم	ویتامین B2 (ریبوفلاویون)	۰/۱ میلی‌گرم
پتاسیم	۵۰ میلی‌گرم	نیاسین	۰/۰۲ میلی‌گرم

غده سیب‌زمینی یک ساقه متورم شده زیرزمینی است که در طی فصل‌ها به عنوان یک اندام ذخیره‌ای دارای خواب، تکامل یافته و زنده می‌ماند. انرژی ذخیره‌ایی در این گیاه همیشه به صورت نشاسته است، از این رو به عنوان یک منبع انرژی کربوهیدراتی در رژیم غذایی صدها میلیون انسان و حتی به عنوان حامی زندگی بشر در فضا مطرح شده است (ویلیر، ۲۰۰۹).

سیب‌زمینی گیاهی است که رویشگاه اولیه آن کوه‌های آند می‌باشد که از کلمبیا تا شمال شیلی ادامه دارد و در کشورهای پرو و بولیوی، امروزه حتی ارقام وحشی آن نیز یافت می‌شود (رستگار، ۱۳۸۴). اولین نشانه کشت سیب‌زمینی، در کانادا مربوط به سال ۱۶۲۳ میلادی می‌باشد (مجیدی هروان، ۱۳۸۲). سیب‌زمینی قبل از کشف آمریکا در جای دیگر مورد کاشت قرار نگرفته و کاشفین اسپانیایی آمریکا، اولین اروپاییانی بودند که به این گیاه برخورد نموده‌اند و در اواخر قرن شانزدهم آن را به اروپا بردند (رستگار، ۱۳۸۴) ولی این گیاه تا مدت‌ها نتوانست به عنوان یک محصول غذایی مهم جایی برای خود باز کند. علت این امر احتمالاً مشکلات ناشی از عدم سازگاری به طول روزهای بلند بوده است (مجیدی هروان، ۱۳۸۲).

تا قرن هفدهم هنوز ارزش خوراکی سیب‌زمینی بر کسی روشن نبود. نخستین بار در اواسط قرن هفدهم در ایرلند به عنوان یک گیاه زراعی کاشته شد (رستگار، ۱۳۸۴) و در طول قرن هجدهم به تدریج به اصلی‌ترین منبع غذایی مردم ایرلند تبدیل شد به طوری که وابستگی شدید تغذیه‌ای مردم ایرلند به این گیاه و شیوع بیماری بادزدگی سیب‌زمینی (Late blight) و عدم موفقیت در تولید این محصول در طی سال‌های ۱۸۴۵ تا ۱۸۴۷، منجر به بروز قحطی و گرسنگی شدید و مرگ بیش از یک میلیون نفر در این کشور شد (ترکش اصفهانی، ۱۳۸۴). در اواسط قرن نوزدهم کاشت سیب‌زمینی در آلمان آغاز شد و سپس به سایر نقاط دنیا راه یافت (رستگار، ۱۳۸۴).

سابقه ورود سیب‌زمینی به کشور ایران به سال‌های ۱۸۱۰-۱۸۰۰ میلادی باز می‌گردد. در دوره فتحعلی شاه فردی به نام مالکوم (John Malcolm) در ماموریت سیاسی از طرف دولت هند شرقی، سیب‌زمینی را برای اولین بار به ایران آورد که سال‌ها بنام آلوی مالکوم نامیده می‌شد و بعدها به سیب زیرزمینی و سپس به سیب‌زمینی معروف شد و هم اکنون نیز در بعضی از مناطق کشور (مانند کازرون) به آلو معروف است. بعد از آن اطلاعاتی در ارتباط با چگونگی ورود، انتقال و گسترش آن در سطح کشور در دست نیست (مجیدی هروان، ۱۳۸۲). اما شواهد موجود از جمله تاریخچه طولانی استفاده از ارقام محلی مانند پشندی و استانبولی، موید قدمت بسیار زیاد کشت این ارقام در کوه‌های شمالی ایران است (ترکش اصفهانی، ۱۳۸۴). از سال‌های ۱۳۴۰ توسعه کشت سیب‌زمینی در مناطق مختلف کشور شروع شده و در دهه ۵۰ در اغلب استان‌ها و مناطق، تولید آن توسعه یافته است و به عنوان سومین محصول مهم بعد از گندم و برنج در تامین نشاسته (پخته یا فرآوری شده) مورد نیاز در تغذیه مردم قرار دارد (مجیدی هروان، ۱۳۸۲).

کشت و کار سیب‌زمینی تقریباً در اکثر کشورهای جهان متداول بوده و متجاوز از ۲۲ میلیون هکتار سطح زیر کشت این محصول با میزان تولیدی بالغ بر ۲۸۷ میلیون تن می‌باشد و با تولید متوسط ۲/۲ تن ماده خشک در هکتار از اقلام مهم محصولات غذایی جهان به شمار می‌رود. در سال ۲۰۱۱ سیب‌زمینی به عنوان پنجمین محصول مهم غذایی بعد از نیشکر، ذرت، برنج و گندم با ۳۷۳ میلیون تن وزن غده‌های تازه از زمین‌های زراعی تولید شده است. که نیمی از سیب‌زمینی تولید شده در هند و چین بود؛ در واقع چین (۸۸ میلیون تن) اکنون اولین تولید کننده سیب‌زمینی در دنیاست، هند (۴۲ میلیون تن) دومین، روسیه (۳۲

میلیون تن) سومین، اوکراین (۲۴ میلیون تن) چهارمین و ایالات متحده آمریکا (۱۹ میلیون تن) پنجمین تولید کنندگان هستند (فائو، ۲۰۱۳). امروزه در بیشتر مناطق نیمه گرم و معتدل جهان کشت سیب‌زمینی رایج است که قسمت اعظم آن در آسیاست (رستگار، ۱۳۸۴). سیب‌زمینی در ۱۴۹ کشور دنیا در عرض جغرافیایی ۶۵ درجه شمالی تا ۵۰ درجه جنوبی و تا ارتفاع ۴۰۰۰ متر از سطح دریا رشد می‌کند (هیجمنز، ۲۰۰۱). سیب‌زمینی می‌تواند در هر جایی که نه خیلی گرم (با میانگین درجه حرارت روزانه کمتر از ۲۱ درجه سانتی‌گراد) و نه خیلی سرد (بالای ۵ درجه سانتی‌گراد) و میزان آب کافی از باران یا آبیاری در دسترس باشد، رشد کند (گووین‌داکریشان و هاورکورت، ۲۰۰۶).

در ایران نیز کشت و کار سیب‌زمینی از دو قرن پیش مرسوم گردیده و به تدریج توسعه یافته است، به طوری که در اوایل دهه ۱۳۴۰ سطح زیر کشت این محصول ۲۳۰۰۰ هکتار بوده است ولی در طول دهه‌های اخیر سیب‌زمینی جایگاه ویژه‌ای در الگوی تغذیه مردم کشور پیدا نموده و موجب توسعه سطح زیر کشت محصول شده است. در بین کشورهای خاورمیانه، ایران یکی از تولید کنندگان عمده سیب‌زمینی است (مجیدی هروان، ۱۳۸۲).

در سال زراعی ۹۰- ۱۳۸۹، از حدود ۱۲ میلیون هکتار سطح برداشت محصولات زراعی، ۵۵۸ هزار هکتار معادل ۴/۶ درصد از آن به گروه سبزیجات اختصاص داشته است. همچنین میزان تولید گروه سبزیجات ۱۷/۱ میلیون تن، معادل ۲۲/۱ درصد از کل میزان تولید محصولات زراعی در این سال بوده است. در این میان محصول سیب‌زمینی با سهم ۳۳/۳ درصد از سطح برداشت و ۳۲/۷ درصد از کل میزان تولید در گروه سبزیجات رتبه نخست را به خود اختصاص داده است. در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹ سطح برداشت سیب‌زمینی کشور حدود ۱۸۶ هزار هکتار برآورد شده که ۹۹/۸ درصد آن سهم اراضی با کشت آبی و ۰/۲ درصد هم سطح برداشت اراضی با کشت دیم بوده است. میزان تولید نیز حدود ۵/۶ میلیون تن برآورد شده که ۹۹/۹ درصد آن سهم اراضی با کشت آبی است. عملکرد سیب‌زمینی در اراضی با کشت آبی کشور ۳۰۰۶۷/۲ کیلوگرم در هکتار و در اراضی با کشت دیم ۹۸۵۸/۸ کیلوگرم در هکتار بوده است. (مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات وزارت جهادکشاورزی، ۱۳۹۲).

طبق آمار فائو در سال ۲۰۱۱، ۴۸۲۲۱۴۰ میلیون تن سیب‌زمینی در ایران تولید شد و از نظر سطح زیر کشت، در رده دوازدهم جهانی قرار گرفته بود (فائو، ۲۰۱۳).

سیب‌زمینی یک محصول با رشد رویشی است که اغلب غذا بدون آن کامل نیست (احمد و همکاران، ۲۰۱۲). بیولوژی تولید مثلی سیب‌زمینی برای ایجاد و نگهداری تنوع ایده‌آل است. سیب‌زمینی‌ها شبیه گونه‌های اجدادی وحشی خود توسط روش‌های جنسی و غیرجنسی (از طریق غده) تکثیر می‌شوند (اسکراه و همکاران، ۲۰۰۸). تکثیر رویشی سیب‌زمینی روش سنتی مورد استفاده کشاورزان است. در این روش تکثیر دو مشکل مهم وجود دارد: اول قرارگیری سیب‌زمینی در معرض انواع بیماری‌های باکتریایی، ویروسی و قارچی و دوم میزان پایین تکثیر (لوبن‌استین و همکاران، ۲۰۰۱). تولید مثل جنسی از طریق نوترکیبی باعث افزایش فراوانی تنوع ایجاد شده در ژن‌های مختلف که توسط جهش به وجود آمده‌اند، می‌شود و از این رو سیب‌زمینی‌ها هتروزیگوتی بالایی دارند که در اثر خویش‌آمیزی ضعف ناشی از اینبریدینگ نشان می‌دهند. گیاهچه‌های منحصر به فردی از نظر ژنتیکی که از بذور حقیقی تولید می‌شوند غده‌هایی تولید می‌کنند که می‌توانند به عنوان غدد بذری رشد کنند و بنابراین از طریق تولید مثل غیرجنسی (رویشی) می‌توان

کلونی‌های مجزایی را تولید و نگهداری کرد. بیشتر ارقام سیب‌زمینی از طریق غده‌های بذری تکثیر می‌شوند و از نظر ژنتیکی یکنواخت هستند (مجیدی هروان، ۱۳۸۲).

از زمان کشف قوانین وراثت توسط مندل تاکنون اصول اصلاح نباتات به طریق علمی در اکثر گیاهان پایه‌ریزی شده و پیشرفت‌های سریعی در بهبود صفات گیاهان حاصل گردیده است و با این حال عملیات اصلاحی به دلیل ساختار خاص ژنتیکی سیب‌زمینی در این گیاه به کندی پیش رفته است زیرا الگوی توارثی آن پیچیده بوده و تحقیقات سیتوژنتیکی به دلیل کوچک و زیاد بودن کروموزوم‌ها به دشواری صورت می‌گیرد. در سال ۱۹۳۰ متخصصین ژنتیک متوجه شدند که سیب‌زمینی یک گیاه تتراپلوئید (2n=4x=48) بوده و توارث تترازومیکی از خود نشان می‌دهد. اصلاح سیب‌زمینی در آمریکا و اروپای شمالی تا اوایل قرن بیستم بدون توجه به شناخت ماهیت ژنتیکی به صورت غیر علمی انجام گرفته و در دو دهه اول قرن بیستم، ارقام زراعی و وحشی از آمریکای مرکزی و جنوبی جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی جمع‌آوری شده است که محققین روسی از جمله پیشگامان این فعالیت‌ها بوده‌اند (مجیدی هروان، ۱۳۸۲). با توجه به افزایش نیاز به سیب‌زمینی، راندمان تولید آن به اصلاح مناسب آن بستگی خواهد داشت (کوریا و همکاران، ۲۰۰۹).

اگرچه تولید رقم‌های اصلاح شده گیاهان از طریق روش‌های مرسوم اصلاح نباتات با موفقیت‌هایی همراه بوده است، ولی این روش‌ها بسیار زمان‌بر می‌باشد و تولید یک رقم جدید حدود ۶ تا ۱۰ سال زمان نیاز دارد، بنابراین به دلیل محدودیت‌های روش‌های به‌نژادی سنتی، استفاده از فنون زیست فناوری از جمله کشت بافت و سلول‌های گیاهی می‌تواند راهکاری در جهت سرعت بخشیدن به جنبه‌های به‌نژادی باشد. افزون بر این کشت بافت و سلول گیاهی، مقدمه‌ای برای انتقال ژن و مهندسی ژنتیک محسوب می‌گردد (محمدی بازرگانی و همکاران، ۱۳۸۳؛ هیوسی، ۱۹۷۸).

تکنیک کشت بافت به عنوان یک روش جدید و مورد قبول جهانی برای اصلاح کمیت و کیفیت تکثیر رویشی گیاه سیب‌زمینی توسعه و گسترش یافته است. این تکنیک به عنوان ابزاری قدرتمند در اصلاح نباتات توسعه یافته است و توجه بسیاری از علوم جهانی را به دست آورده است. باززایی از طریق تکنیک کشت بافت یک جزء ضروری و مهم در تحقیقات بیوتکنولوژیکی است و برای دستکاری‌های ژنتیکی در گیاهان مورد نیاز است. توتی‌پتانسی یک سلول یا بافت اتفاقات جدیدی را در برنامه‌های اصلاحی گیاهان ایجاد می‌کند که امکان دستکاری‌های ژنی و انتخاب صفات مطلوب را تسهیل می‌کند. تکنیک کشت بافت نسبت به روش‌های تکثیر سنتی چندین برتری دارد. کاربرد تکنیک‌های *In vitro* احتمال غلبه بر مشکل خود ناسازگاری موجود بین گونه‌های دور را فراهم کرده (پروین، ۲۰۱۱) و برای اصلاح ارقام موجود کاربرد دارد، همچنین سرعت معرفی واریته‌ها و ارقام جدید را در مقایسه با روش‌های سنتی اصلاح نباتات تسریع می‌بخشد (خادیگه، ۲۰۰۹).

اگرچه سیب‌زمینی یک غذای سالم است اما اصلاح ویژگی‌های مواد غذایی و سلامتی آن ارزش بررسی کردن را دارد. امروزه بهبود سلامتی مردم فقیر توسط اصلاح مواد غذایی پرمصرف که غنی از مواد ریز مغذی (biofortification) هستند، مورد توجه است (بیورگوس و همکاران، ۲۰۰۷). غده سیب‌زمینی منبعی غنی از انواع کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و ویتامین‌ها می‌باشد. به دلیل اهمیت تغذیه‌ای زیاد و تولید آسان، سیب‌زمینی یکی از اولین کاندیداهای مهم برای اصلاح از طریق زادآوری و بیوتکنولوژی بوده است. روش‌های قدیمی برای اصلاح ارقام سیب‌زمینی مبتنی بر کشت و تلاقی ارقام سازگار، با عملکرد بالا و خصوصیات مطلوب آنها استوار

بوده است. مشکلاتی نظیر عقیمی و تتراپلوئیدی به همراه سطوح بالای هتروزیگوسی، به میزان زیادی کارآیی روش‌های قدیمی برای اصلاح ارقام سیب‌زمینی را کاهش می‌دهد. بنابراین، یک راه کار جایگزین برای اصلاح ارقام مهم سیب‌زمینی استفاده از تکنیک‌های درون شیشه‌ای شامل دورگ‌گیری سوماتیکی، جهش‌زایی و مهندسی ژنتیک می‌باشد (کومار و همکاران، ۱۹۹۵).

سیب‌زمینی یکی از گیاهانی است که در سال‌های نیمه دوم قرن بیستم بیشترین بررسی‌های روش‌های کشت بافت، اندام، سلول و پروتوپلاسم سلول‌های گیاهی را به خود اختصاص داده است. این گیاه در سایر زمینه‌های تحقیقاتی نیز مانند بررسی‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، بیماری‌ها و... مورد توجه بوده است که دلایل عمده توجه به آن را می‌توان در رشد سریع، روش‌های اصلاح کلونی، تکثیر غیرجنسی، عکس‌العمل مناسب برای کشت و رشد در محیط‌های غذایی، ریشه‌زایی سریع و مناسب، سازگاری وسیع، اهمیت آن در تغذیه انسان و اهمیت اقتصادی این گیاه دانست. به همین جهت کشت بافت سیب‌زمینی در زمینه‌های تولید بذر، تولید محصول، حذف عوامل بیماری‌زا، اصلاح ارقام، انتقال ژن و نگهداری منابع ژنتیکی در طول سالیان گذشته مورد استفاده قرار گرفته است. کشت بافت به عنوان یک روش، امکان تکثیر کلونی انبوه گیاهان را فراهم می‌سازد و در تکثیر و نگهداری منابع ژنتیکی سیب‌زمینی و سایر گیاهان غده‌ای در شرایط کنترل شده بکار گرفته شده است. در مرکز تحقیقات بین‌المللی سیب‌زمینی (CIP) حدود ۵۰۰۰ کلون با این روش نگهداری می‌شود که در برنامه‌های اصلاحی، تکثیر و ریزازدیادی مورد استفاده قرار می‌گیرند. (مجیدی هروان، ۱۳۸۲).

هدف از تحقیق پیش رو بررسی تاثیر هورمون‌های BAP (6-benzyl amino purine) و Kin (Kinetin) به صورت جداگانه و در ترکیب با هم در باززایی مستقیم (شاخه‌زایی، جنین‌زایی و ریشه‌زایی) ارقام مختلف سیب‌زمینی مورد کشت و کار در ایران، با استفاده از ریزنمونه‌های برگ و میانگره است. به طور قطع بهینه‌سازی شرایط باززایی و به خصوص جنین‌زایی سوماتیکی به طور مستقیم به کمک هورمون‌های فوق در سیب‌زمینی باعث سرعت بخشدن به فعالیت‌های بیوتکنولوژیکی و اصلاحی ذکر شده در این گیاه می‌گردد.

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱ اصول کشت بافت

تمام سلول‌های یک موجود دارای اطلاعات ژنتیکی یکسانی می‌باشند و تفاوت بین آنها در نحوه بیان برخی ژن‌ها در هر کدام از آنها است. بنابراین هر سلول تمام اطلاعات ژنتیکی یک موجود کامل را دارا می‌باشد و در صورت قرار گرفتن در شرایط خاص از قابلیت تولید یک موجود کامل برخوردار است. بر این اساس به صورت نظری می‌توان با کشت سلول یا هر کدام از اندام‌های گیاهی در شرایط مصنوعی آنها را وادار به تکثیر نمود. بر همین اساس شخصی به نام شوان (۱۸۳۸)، برای اولین بار نظریه‌ای ارائه کرد. طبق نظریه وی، اگر هر کدام از سلول‌های زنده موجود پرسلولی را در شرایط مطلوب قرار دهیم، سلول‌ها توانایی این را دارند که به صورت مستقل به یک موجود کامل تبدیل شوند. بنابراین نظریه توتی‌پتانسی (Totipotency) در سلول‌های گیاهی شکل گرفت. طبق این نظریه هر یک از سلول‌های زنده مستقل هستند و می‌توانند گیاه کامل را ایجاد کنند. این تئوری پایه و اساس کشت بافت را بنا نهاد (شریفی، ۱۳۸۹). کشت بافت بنا به تعریف استریت (۱۹۷۷) عبارت است از هر نوع کشت چند سلولی که بر روی محیط کشت رشد و نمو کرده و با یکدیگر ارتباط پروتوپلاسمی دارند.

اولین کوشش در کشت بافت گیاهی توسط گیاهشناسی آلمانی به نام هابرلنت (۱۹۰۲) صورت گرفت. اگرچه وی در کار خود ناموفق بود، ولی با تلاش‌های او تکنیک کشت بافت گیاهی به صورت جدی شکل گرفت (شریفی، ۱۳۸۹). به دلیل تاخیر در کشف هورمون‌های گیاهی، کشت بافت گیاهی پس از کشت بافت حیوانی و انسانی شروع شد (باقری، ۱۳۸۸).