Investigating the Effect of Different Concentrations of Murashige and Skoog (MS) Medium and Sucrose on the Production of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Microtubers *In Vitro*

Fahimeh Yarmohammadi[1], Alireza Motallebi-Azar[2], Samaneh Kazemiani[2], Mina Amani[2*]

1. Bastam Agricultural Jihad Center, Semnan Province, Shahrood County, Iran.
2. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
Corresponding author email: Mina76amani@yahoo.com

Introduction

Considering the sensitivity of potatoes to viruses, the production of virus-free plants through in vitro cultivation and their propagation leads to a reduction in costs and an increase in yield. One of the effective methods of reducing plant diseases and producing disease-free microtubers is the use of in-vitro production methods. Considering the role and importance of macro elements and micro elements in the growth of microtubers, it is possible to change the composition of MS culture medium by changing the concentration of salts of macro elements and micro elements without disturbing the balance of elements. This experiment aims to investigate the effect of different concentrations of macro elements (2 Mac, Mac, ½ Mac) and micro elements (2 Mic, Mic, ½ Mic) of MS culture medium in combination with two concentrations of sucrose (80 and 160 g/liter) was performed on in vitro micronodulation of Agria potato.

Materials and Methods

This experiment to investigate the effect of different concentrations of macro elements (2 Mac, Mac, ½ Mac) and micro elements (2Mic, Mic, ½ Mic) of MS culture medium in combination with two concentrations of sucrose (80 and 160 (g/liter) on in vitro microtuberation of Agria potato was carried out as a factorial experiment in the form of a completely randomized design with 3 replications in the plant tissue culture laboratory of the Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz. Lateral buds obtained from in-vitro shoots were used as explants and were cultured under sterile conditions on different culture mediums for the purpose of microtuberation, and the cultures were kept in continuous darkness and at a temperature of 18±2°C were kept in the growth room. During one month, Microtuber initiation rate and after two months, microtuber formation characteristics were measured.

Results and Discussion

The results of the analysis of variance showed that the effect of the concentration of micro elements and the interaction effects of micro elements with different concentrations of sucrose and macro elements were significant only in the case of two traits, the percentage and the speed of microtuber initiation, while all microtuber traits productivity was significantly affected by the interaction of micro elements and macro elements. In all culture mediums with 8% sucrose, the initiation percentage of microtubers was 100% and the initiation rate was also maximum. However, the highest percentage of microtuber formation, weight, length, diameter and number of buds on microtuber was obtained in 2Mac culture

medium with 16% sucrose. The results showed that the microtuber that had more weight and size had a higher percentage of dormancy and the buds on the microtuber were not able to germinate and produce microtuber during the stages of microtuber formation.

Conclusion

In all traits related to microtubers, except for percentage and speed of microtubers initiation, the effects of micro elements, macro elements and sucrose elements were not significant, and this shows that the three investigated factors cannot independently improve microtubers formation is effective in Agria variety. In all traits of micronodulation, the interaction effect of low consumption elements with other two factors was not significant and this shows that the concentration of low consumption elements in Agria variety is not critical for micronodulation. In all culture mediums with 8 % sucrose, the initiation percentage of microtubers was 100 % and the initiation speed was also the maximum, but when double the concentration of macro elements and 16 % sucrose were used, the initiation percentage and the initiation speed of micro-glands in Agria variety showed a significant decrease. The percentage of microtuber formation, weight, length, diameter and number of buds on the microtuber in Agria cultivar were significantly affected by the mutual effect of the concentration of macro elements and sucrose, and the 2 Mac culture medium has 16% sucrose in the first priority and the ½ culture medium Mac with 8 % sucrose in the second priority was better than the other treatments in terms of the investigated traits. In this research, it was found that the produced microglands with greater weight and size had a higher percentage of dormancy and during the stages of microglandogenesis, the buds on the microtubers were not able to germinate and produce microtubers.

Keywords: Agria variety, Macro elements, Micro elements, Microtuber formation, Tissue culture.

بررسی اثر غلظت‌های مختلف محیط‌کشت موراشیک و اسکوگ (MS) و ساکارز در تولید ریزغده سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) در شرایط درون شیشه‌ای

فهیمه یارمحمدی[1]، علیرضا مطلبی‌آذر[2]، سمانه کاظمیانی[2]، مینا امانی[2*]

۱. مرکز جهاد کشاورزی بسطام، استان سمنان، شهرستان شاهرود، ایران.

۲. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

ایمیل نویسنده مسئول: Mina76amani@yahoo.com

چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی افزایش سرعت ریزغده‌زایی و بهبود صفات ریزغده‌زایی، تعیین بهترین غلظت ساکارز (۸۰ و ۱۶۰ گرم در لیتر)، نمک‌های عناصر پرمصرف (2 Mac, Mac, ½ Mac) و کم‌مصرف (2Mic, Mic, ½ Mic) و غلظت‌های مختلف محیط کشت MS برای بهبود سرعت و کمیت ریزغده‌زایی در سیب‌زمینی رقم آگریا اجرا شد. از جوانه‌های جانبی حاصل از شاخساره‌های درون شیشه‌ای به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد و تحت شرایط استریل روی محیط‌های کشت مختلف به‌منظور ریزغده‌زایی کشت شدند و کشت‌ها در تاریکی مداوم و دمای ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد در اتاق رشد نگهداری شدند. در طی ۱ ماه سرعت آغازش ریزغده و پس از گذشت ۲ ماه صفات ریزغده‌زایی اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت عناصر کم‌مصرف و اثرات متقابل عناصر کم‌مصرف با غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف فقط در مورد ۲ صفت درصد و سرعت آغازش ریزغده معنی‌دار بوده، درحالی‌که تمامی صفات ریزغده‌زایی از اثر متقابل عناصر کم‌مصرف و پرمصرف به‌طور معنی‌داری متأثر شدند. در تمامی محیط‌های کشت دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز، درصد آغازش ریزغده‌ها صد درصد و سرعت آغازش نیز حداکثر بود. با این حال بالاترین درصد تشکیل ریزغده، وزن، طول، قطر و تعداد جوانه بر روی ریزغده، در محیط‌کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز به‌دست آمد. نتایج نشان داد که ریزغده‌هایی که وزن و اندازه بیشتری داشتند، از درصد دورمانسی بیشتری برخوردار بودند و جوانه‌های روی ریزغده‌ها طی مراحل ریزغده‌زایی، قادر به جوانه‌زنی و تولید ریزغده نبودند. در همه محیط‌های کشت استفاده شده همراه با ۸۰ گرم در لیتر ساکارز، درصد آغازش ریزغده‌ها ۱۰۰ درصد و سرعت آغازش غده بیشتر بود، ولی زمانی‌که از دوبرابر غلظت عناصر پرمصرف و ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز استفاده شد، درصد آغازش و سرعت آغازش ریزغده کاهش یافت. در این تحقیق مشخص شد که ریزغده‌های تولیدی با وزن و اندازه بیشتر، از درصد دورمانسی بیشتری برخوردار بودند و طی مراحل ریزغده‌زایی، جوانه‌های روی ریزغده‌ها قادر به جوانه‌زنی و تولید ریزغده نبودند.

واژگان کلیدی: رقم آگریا، عناصر کم‌مصرف، عناصر پرمصرف، ریزغده‌زایی، کشت‌بافت.

مقدمه

باتوجه به افزایش روزافزون جمعیت جهان در سال‌های اخیر نیاز به مواد غذایی اهمیت زیادی پیدا کرده است. یکی از راه‌های افزایش مواد غذایی، افزایش تولیدات کشاورزی است. سیب‌زمینی با نام علمی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از گیاهان تیره Solanaceae به‌دلیل کشت و کار آسان به‌عنوان اولین سبزی رایج در جهان کشت می‌شود (Abelenda *et al.*, 2019). میزان استفاده از سیب‌زمینی به‌عنوان غذا در جهان ۳۰ الی ۷۲ درصد می‌باشد (Shahriyar

(*et al.*, 2015)، اولاً به‌عنوان یک منبع کربوهیدرات و ثانیاً به‌عنوان سبزی استفاده می‌شود؛ بنابراین سیب‌زمینی از مهم‌ترین سبزیجات در جهان به‌شمار می‌آید. از آنجا که ازدیاد سیب‌زمینی توسط اندام‌های غیرجنسی (غده‌ها) صورت می‌گیرد، دسترسی به گیاهان و غده‌های سالم و مناسب حائز اهمیت است (Salem and Hassanein, 2017). باتوجه‌به حساسیت سیب‌زمینی به ویروس‌ها، تولید گیاهان عاری از ویروس از طریق کشت درون شیشه‌ای و تکثیر آن‌ها، به کاهش هزینه‌ها و افزایش عملکرد منجر می‌شود (Hannapel, 2007; Igbal *et al.*, 2016). تولید ریزغده در شرایط درون شیشه‌ای اولین بار توسط کشت گره‌های منفرد با جوانه‌های جانبی برای تولید غده بذری عاری از ویروس در سیب‌زمینی صورت گرفت (Haque *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2014). این ریزغده‌های عاری از بیماری را می‌توان در تمام طول سال و در هر حجمی تولید کرد (Hannapel, 2007).

عامل‌های مؤثر بر ریزغده‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای شامل ژنوتیپ (Ahloowalia, 1999)، نوع ریزنمونه (Khuri and Moorby, 1996)، فتوپریود (Hussey and Stacey, 1984)، دما (Akita and Takayama, 1994)، نوع منبع کربن (Garner and Blake, 1989)، تنظیم‌کننده‌های رشد (Ortiz-Montiel and Lozoya-Saldafia, 1987) و ترکیبات محیط‌کشت است. از نظر گیاهشناسی، غده سیب‌زمینی ساقه تغییرشکل یافته است. جوانه‌های جانبی در شرایط درون‌شیشه‌ای به محرک‌های خارجی به‌منظور توسعه شاخساره یا ریزغده‌زایی پاسخ می‌دهند (Afrasiab and Iqbal, 2012). تأمین محیط‌کشت مناسب برای ادامه رشد ریزغده‌ها ضروری است و به‌نظر می‌آید مؤثرترین راه برای رسیدن به ریزغده‌های بزرگتر باشد (Khalafalla *et al.*, 2010). امروزه در دنیا و در کشور ما تحقیقات زیادی در ارتباط با ریزازدیادی گیاهانی با ارزش اقتصادی صورت گرفته است (Joshi and Mature, 2015) که در این میان پژوهش‌هایی نیز بر روند ریزغده‌زایی سیب‌زمینی جهت بهبود کیفیت آن صورت گرفته است (Motallebi-Azar *et al.*, 2011; 2013; Khalil *et al.*, 2017; Ashrafzadeh and Leung, 2015; Ebadi and Iranbakhsh, 2011; Snnowald and Snnowald, 2015). در تمامی مطالعات از محیط کشت پایه MS استفاده شده است و تغییری در ترکیبات اصلی این محیط کشت (عناصر پر مصرف و کم‌مصرف) انجام نشده است و با توجه به نقش و اهمیت عناصر پرمصرف و کم‌مصرف در رشد ریزغده‌ها، می‌توان با تغییر غلظت نمک‌های عناصر پرمصرف و کم‌مصرف، بدون برهم‌زدن تعادل عناصر، در ترکیب محیط‌کشت MS تغییراتی را ایجاد نمود و اثر آن‌ها را روی ریزغده‌زایی بررسی کرد (Yu *et al.*, 2000). در شرایط درون‌شیشه‌ای اضافه کردن ساکارز در سطوح بالا به محیط کشت الزامی است تا ریزغده‌زایی صورت بگیرد (Simko, 1994). یو و همکاران (Yu *et al.*, 2000) ساکارز را به عنوان منبع کربنی معرفی کردند که برای رشد ریزغده‌ها تقدم بیشتری نسبت به فراورده‌های حاصل از هیدرولیز آن دارد و مقدار ساکارز در دسترس را از عوامل اصلی در تولید ریزغده‌ها دانستند (George, 1993; Karhu, 1997). ساکارز دارای دو نوع نقش در توسعه ریزغده‌ها می‌باشد. نقش اول آن به عنوان منبع کربن است که به آسانی توسط گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای جذب و به نشاسته تبدیل می‌شود. نقش دوم آن در رشد و نمو ریزغده است (Yu *et al.*, 2000). هیدرولیز ساکارز منجر به تولید مقادیر برابر گلوکز و فروکتوز می‌شود. در محیط‌کشت، غلظت گلوکز همیشه کمتر از غلظت فروکتوز است، زیرا سلول‌های سیب‌زمینی تمایل بیشتری برای جذب گلوکز از فروکتوز دارند (Yu *et al.*, 2000). برای رسیدن به اندازه معمول ریزغده، نگهداری غلظت ساکارز در سطح مناسب در طول رشد و نمو ریزغده ضروری است (Yu *et al.*, 2000).

برای انجام یک آزمایش موفق و یا تولید و تکثیر گیاه از طریق کشت بافت و ایجاد اندام‌های هوایی نابجا در ریزنمونه-های کشت شده، ترکیبات محیط کشت نقش اساسی و سرنوشت‌ساز دارد. محیط کشت غذایی عامل مهم در کشت بافت

و سلول به شمار می‌رود، آنچه که طراحی محیط کشت را به طور خاصی مشکل می‌کند، اثرات متقابل بسیار پیچیده مواد شیمیایی مختلف در یک محیط کشت غذایی مشخص می‌باشد. به عنوان مثال کاربرد بعضی از قندها در محیط کشت سبب کمبود بر می‌شود (George, 1993; Karhu, 1997). همچنین محیط‌های کشت از نظر پتانسیل اسمزی متفاوت می‌باشند. پتانسیل اسمزی محیط‌های کشت مختلف به وسیله مواد قابل حل اندازه‌گیری می‌شود که ساکارز و عناصر پرمصرف بیشترین تأثیر را در پتانسیل اسمزی محیط کشت دارند (George, 1993). این تحقیق به منظور افزایش سرعت ریزغده‌زایی و بهبود صفات ریزغده‌زایی، تعیین بهترین غلظت ساکارز، نمک‌های عناصر پرمصرف و کم‌مصرف و غلظت‌های مختلف محیط کشت MS برای بهبود سرعت و کمیت ریزغده‌زایی در رقم آگریا اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش، در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شده است. در این بررسی از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای عاری از ویروس سیب‌زمینی رقم آگریای موجود در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه علوم باغبانی دانشگاه تبریز استفاده شد. برای تهیه محیط‌کشت اقدام به تهیه محلول‌های پایه از نمک‌های معدنی و ویتامین‌ها گردید. مواد لازم و مقادیر آن‌ها برای تهیه ۱ لیتر از محیط‌کشت ½ MS، MS، 2MS در جدول ۱ آورده شده است. برای تهیه محیط‌کشت، مواد لازم به‌صورت هفت محلول ذخیره (استوک) شامل نمک‌های عناصر پرمصرف، نمک‌های عناصر کم‌مصرف، KI و $CaCl_2$، نمک آهن، نمک مس و مولیبدن و ویتامین‌ها تهیه و در یخچال نگهداری گردید. برای تهیه محیط‌کشت، مقدار لازم از محلول‌های ذخیره برداشته و همراه با ترکیب عناصر پرمصرف و کم‌مصرف موردنیاز (که به‌صورت ذخیره تهیه شده بود)، به محیط‌کشت اضافه شد. حجم محلول به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و بسته به نوع تیمار ساکارز محیط‌کشت، ۸۰ یا ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز به محیط‌کشت اضافه شد. بعد از افزودن مقدار ۰/۱ گرم بر لیتر میواینوزیتول، pH محلول با استفاده از NaOH یا HCl یک نرمال روی ۵/۸ تنظیم گردید. برای جلوگیری از تغییر در pH محیط‌کشت در مدت زمان رشد ریزنمونه‌ها از MES[1] به مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. برای تهیه محیط جامد ۸ گرم آگار به محیط اضافه شد. پس از حل شدن کامل آگار، در داخل هر ظرف شیشه‌ای، ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت با استفاده از استوانه مدرج ریخته شد و محیط‌های کشت اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتسمفر به مدت ۲۰ دقیقه شدند. پس از ضدعفونی، محیط‌های کشت تا زمان کشت در شرایط تاریکی نگهداری شدند.

جدول ۱- مواد لازم و مقادیر آن‌ها برای تهیه یک لیتر محیط‌کشت

Table 1- Necessary materials and their amounts for preparing one liter of culture medium

محلول ذخیره (استوک) Stock solution	مواد لازم برای محیط‌کشت Necessary materials for culture medium	مقادیر اصلی برای تهیه محیط‌کشت 2MS The main values for the preparation of 2MS culture medium (g/liter)	مقادیر اصلی برای تهیه محیط‌کشت MS Main values for preparation of MS culture medium (g/liter)	مقادیر اصلی برای تهیه محیط‌کشت ½ MS The main values for the preparation of culture medium ½ MS (g/liter)
نمک‌های عناصر ماکرو (Macro elements)	NH_4NO_3	3.3	1.65	0.825
	KNO_3	3.8	1.9	0.95
	$MgSO_4.7H_2O$	0.74	0.37	0.185
	KH_2PO4	0.34	0.17	0.085
	$MnSO_4.4H2O$	0.046	0.023	0.0115

[1] [2-(N-morpholino) ethane sulphonic acid]

نمک‌های عناصر میکرو (Micro elements)	$ZnSO_4.7H_2O$	0.0172	0.0086	0.0043
	H_3BO_3	0.0124	0.0062	0.0031
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.0005	0.00025	0.000125
	$CuSO_4.5H_2O$	0.00005	0.000025	0.0000125
	$CoCl_2.6H_2O$	0.00005	0.000025	0.0000125
کلسیم (Calcium)	$CaCl_2.2H_2O$	0.88	0.44	0.22
ید (Iodine)	KI	0.00166	0.00083	0.000415
ویتامین (Vitamin)	Nicotinic Acid	0.0005	0.0005	0.0005
	Thiamin.HCl	0.0005	0.0005	0.0005
	Pyridoxine.HCl	0.0001	0.0001	0.0001
	Glycine	0.002	0.002	0.002
آهن (Iron)	FeSO4. 7H2O	0.0556	0.0278	0.0139
	Na2 EDTA.2H2O	0.0672	0.0336	0.0168

محیط کشت ریزغده‌زایی

برای بررسی ریزغده‌زایی از محیط‌های کشت ½ Mac، Mac و 2 Mac، ½ Mic، Mic، 2 Mic همراه با ۲ غلظت ۸۰ و ۱۶۰ گرم ساکارز در لیتر، جمعاً ۱۸ ترکیب استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۲- غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف و کم‌مصرف در تیمارهای مورد بررسی

Table 2- Different concentrations of Macro and Micro elements in the investigated treatments

	½ Mic	Mic	2 Mic
½ Mac	½ Mac × ½ Mac	½ Mac × Mic	½ Mac × 2 Mic
Mac	Mac × ½ Mic	Mac × Mic (control)	Mac × 2 Mic
2 Mac	2 Mac × ½ Mic	2 Mac × Mic	2 Mac × 2 Mic

کشت ریزنمونه‌ها

برای کشت ابتدا گیاهچه‌ها از داخل شیشه کشت در زیر هود لامینار خارج شده و سپس روی کاغذ صافی استریل شده قرار گرفتند. با استفاده از اسکالپل در زیر هود، قلمه‌های تک گره از وسط شاخساره به طول تقریبی ۱ سانتی‌متر تهیه شد. در مرحله بعد ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت، شامل غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف، کم‌مصرف و ساکارز به‌طور عمودی با رعایت قطبیت قرار داده شدند و در شرایط تاریکی کامل با دمای ۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو ماه نگهداری شدند.

اندازه‌گیری صفات

زمان آغازش ریزغده (مشاهده تورم جوانه جانبی به اندازه ۲ میلی‌متر)، هر هفته به‌مدت ۱ ماه یادداشت‌برداری گردید. بعد از تشکیل ریزغده و رشد کافی، ۲ ماه بعد از کشت، اندازه‌گیری‌های درصد آغازش و تشکیل ریزغده، قطر، طول، وزن، تعداد جوانه رشدیافته روی ریزغده و دورمانسی ریزغده‌ها (تعداد ریزغده دارای جوانه رشدیافته در هر واحد آزمایشی بر تعداد کل ریزغده)، به‌عنوان شاخصی از تولید ریزغده ثبت شد. درصد تشکیل ریزغده (قطر بیش از ۵ میلی‌متر) با شمارش تعداد ریزنمونه‌هایی که ریزغده تولید کرده بودند، نسبت به تعداد کل ریزنمونه‌ها برآورد گردید. برای تعیین درصد آغازش ریزغده با قطر حدودا ۲ میلی‌متر نیز به همین ترتیب عمل شد. قطر و طول ریزغده‌ها به‌وسیله خط‌کش و وزن ریزغده با ترازوی حساس (۰/۰۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد.

سرعت آغازش ریزغده

$$\text{سرعت آغازش} = \frac{(n_1 \times t_1) + \cdots + (n_n \times t_n)}{t_n}$$

n، تعداد ریزغده آغازش شده و t، روز. برای اندازه‌گیری سرعت آغازش ریزغده هر ۶ روز یکبار تعداد ریزغده آغازش شده شمارش شد.

استفاده از ریزغده به‌عنوان واحد تکثیر

گلدان‌های دارای پیت، ورمی‌کولایت و پرلایت به نسبت ۱:۱:۱ در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. سپس سیستم میست در اتاق کشت راه‌اندازی شد. ریزغده‌ها از محل میانگره در زیر هود لامینار بریده شده و به گلدان‌ها انتقال داده شدند و سپس آبیاری و به زیر سیستم میست با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردیدند و به مدت ۱ ماه در این شرایط نگهداری شدند. پس از چهار الی شش روز گیاهچه‌ها سبز شدند. در طول نگهداری در شرایط آزمایشگاه، هفته‌ای دو مرتبه محلول غذایی ۱۰ برابر رقیق‌شده MS به‌منظور رشد بهتر گیاهچه‌ها، به گیاهان داده شد.

علاوه بر این، جهت تهیه مجدد ریز نمونه جهت کشت (در صورت نیاز)، ریزغده‌ها پس از برداشت، به محیط‌کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد منتقل شده و در اتاق رشد در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد (فوتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) قرار گرفتند. پس از ۶ الی ۷ روز ریزغده‌ها جوانه زده و برای تهیه گیاهچه‌های درون شیشه‌ای قابل استفاده بودند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

این تحقیق به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و در هر تکرار ۴ نمونه اجرا شد. بررسی فرضیات تجزیه واریانس برای تمامی صفات مورد اندازه‌گیری نشان داد که فرضیات تجزیه واریانس (به‌خصوص همگنی واریانس و عدم ارتباط بین واریانس و میانگین) برای تمامی صفات برقرار بوده و نیازی به تبدیل داده و یا هر روش دیگری که باعث برقراری فرضیات تجزیه واریانس شود نبوده و بنابراین تجزیه واریانس داده‌ها و همبستگی خطی بین صفات با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver.21 انجام شد. مقایسات میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام و نمودارها با نرم‌افزار Excel ترسیم شد. در این نمودارها مقدار عددی بار روی هر ستون نشان‌دهنده انحراف استاندارد میانگین تیمار موردنظر می‌باشد.

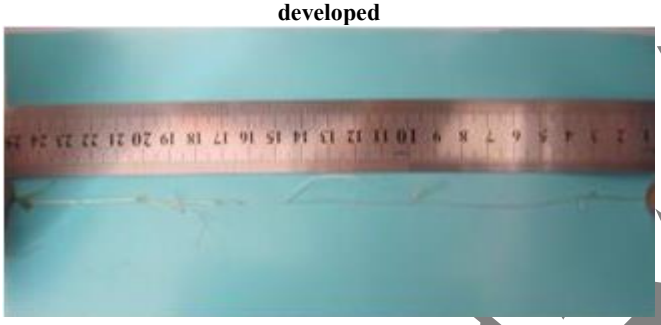
نتایج و بحث

فرایند آغازش و ریزغده‌زایی

نخستین آغازش ریزغده، ۴ روز پس از کشت جوانه جانبی، در محیط‌کشت MS با نصف عناصر پرمصرف دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد (داده‌ها نشان داده نشده است). البته در برخی از ریزنمونه‌ها، ریزغده‌های آغازش‌یافته، رشدنکرده (اندازه کمتر از ۲ میلی‌متر) و بنابراین جوانه‌های جانبی شروع به رشد کرده (شکل ۱-الف) و در چنین نمونه‌هایی، ریزغده‌ای تشکیل نشد. بعد از ۲ ماه، طول شاخه‌های رشدیافته از محل گره بین ۱ الی ۲۵ سانتی‌متر بود (شکل ۲) که در برخی ریزنمونه‌ها، شاخه‌های رشدیافته، تولید شاخه جانبی کردند (شکل ۳). در اکثر تیمارها، ریزغده‌های آغازش شده، رشد کرده و طی ۲ ماه اندازه آن‌ها از ۲ الی ۹ میلی‌متر متغیر بود (شکل ۱-ب). کشت تعدادی از ریزغده‌های تولیدی روی محیط‌کشت MS بدون هورمون نشان داد که جوانه‌های موجود روی ریزغده‌ها پس از ۵ الی ۷ روز شروع به رشد کرده و پس از ۱ ماه گیاهان درون شیشه‌ای مطلوب را تولید کردند (شکل ۴). برخی از ریزنمونه‌ها هیچ ریشه‌ای تولید نکردند، ولی اکثر ریزنمونه‌ها دارای ۱ الی ۱۶ عدد ریشه بودند که طول آن‌ها بین ۰/۵ الی ۲۰ سانتی‌متر متغیر بود (شکل ۵).

شکل ۱- پاسخ جوانه جانبی به تیمارهای ریزغده‌زایی الف. عدم رشد ریزغده آغازش‌یافته ب. ریزغده رشدیافته

Fig. 1- Lateral bud response to micronodulation treatments a. lack of microgland development b. Microgland developed



شکل ۲- رشد شاخساره از محل گره به طول ۲۵ سانتی‌متر

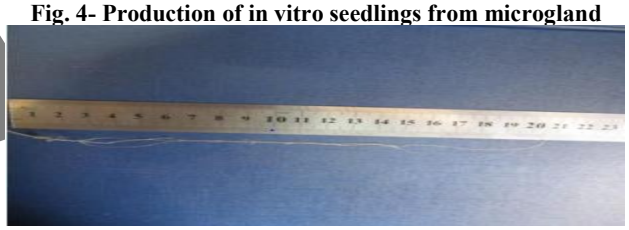
Fig. 2- 25 cm long shoot growth from the node location

شکل ۳- رشد شاخساره‌ها از محل گره

Fig. 3- The growth of shoots from the location of the node

شکل ٤- تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای از ریزغده

Fig. 4- Production of in vitro seedlings from microgland



شکل ٥- ریشه‌های رشدیافته از ریزنمونه به طول ۱ الی ۲۰ سانتی‌متر

Fig. 5- The roots grown from the explant with a length of 1 to 20 cm

درصد آغازش ریزغده

آغازش ریزغده در محیط‌کشت MS (تغییرنیافته) و در تغییریافته‌های آن (۸ محیط‌کشت) مشاهده شد، اما زمان آغازش و درصد آغازش وابسته به نوع محیط‌کشت و غلظت ساکارز بود. نخستین آغازش ریزغده ۴ الی ۵ روز پس از کشت

جوانه‌های جانبی در محیط‌کشت MS با نصف عناصر پرمصرف به‌همراه ۸۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد و به‌طور متوسط در سایر محیط‌های کشت ۱۴ الی ۱۶ روز پس از کشت، آغازش ریزغده شروع شد. غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف در سطح احتمال ۵ درصد تأثیر معنی‌داری روی درصد آغازش ریزغده داشتند، اما اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف از نظر درصد آغازش ریزغده مشاهده شد. اثر متقابل Mac × Suc بر روی درصد آغازش ریزغده معنی‌دار بود، درحالی‌که سایر اثرات متقابل (Mac × Mic × Suc, Mic × Suc, Mac × Mic) بر درصد آغازش ریزغده تأثیر معنی‌داری نداشتند (جدول ۳). در این آزمایش در محیط‌های کشت دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز و با افزایش غلظت عناصر پرمصرف، درصد آغازش ریزغده تغییر نکرد و آغازش ریزغده در این تیمارها، ۱۰۰ درصد بود، ولی هنگامی که از ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز استفاده گردید با افزایش غلظت عناصر پرمصرف، کاهش معنی‌داری در درصد آغازش ریزغده‌ها مشاهده شد. حداقل درصد آغازش ریزغده، در محیط‌کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده گردید. فشار اسمزی در غلظت ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز برای ریزغده‌زایی مناسب بوده و امکان جذب مواد غذایی توسط سلول‌های گیاهی و آغازش ریزغده وجود دارد. احتمالاً افزایش غلظت عناصر پرمصرف و ساکارز، فشار اسمزی را بالاتر از حد بهینه برده و این امر نتیجه معکوس در پی داشته است. همچنین ممکن است کاهش غلظت عناصر، باعث رقیق شدن محیط‌کشت و جذب راحت‌تر آب و مواد غذایی توسط گیاه گردد. به‌نظر می‌رسد که افزایش فشار اسمزی در حد بهینه، سبب تحریک و افزایش رشد و نمو شده و پس از رسیدن به یک حد بهینه رشد و شکل‌گیری اندام، بر اثر توقف جذب آب متوقف می‌شود. از طرف دیگر با کاهش غلظت عناصر پرمصرف به Mac ½ در هر ۲ غلظت ساکارز، آغازش ریزغده‌ها ۱۰۰ درصد بود؛ بنابراین می‌توان گفت که غلظت ۸۰ گرم در لیتر ساکارز و Mac ½ از نظر درصد آغازش ریزغده و جنبه اقتصادی مناسب‌تر از سایر تیمارها می‌باشد. در محیط‌کشت Mac ½، آغازش غده در *Gloriosa rothschildiana* بالاتر از محیط‌کشت Mac بود (Kozak, 2003). گزارشات قبلی نیز بر این امر تأکید دارد که بایستی برای ریزغده‌زایی غلظت‌های ساکارز را مورد بررسی قرار داد (Seabrook *et al.*, 2004; Hussain *et al.*, 2006). کارلسون و همکاران (Carlson *et al.*, 2004) گزارش کردند که بهترین محیط‌کشت برای القاء ریزغده، محیط‌کشت MS همراه با ۸۰ گرم در لیتر ساکارز می‌باشد. غلظت ۸۰ گرم در لیتر ساکارز درمقایسه با غلظت ۴ و ۱۲ گرم در لیتر ساکارز سبب افزایش در آغازش ریزغده‌ها گردید (Garner and Blake, 1989).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر عوامل موردبررسی بر صفات موردمطالعه

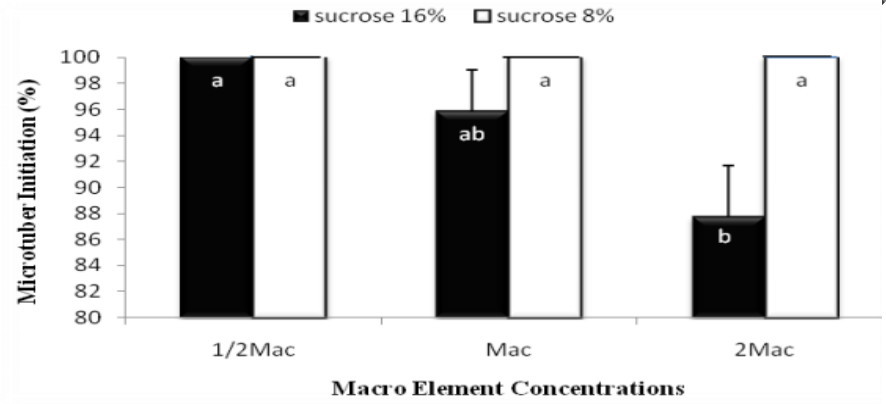
Table 3- Variance analysis of the effect of the studied factors on the studied traits

		میانگین مربعات (Mean square)								
منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (D.F)	آغازش ریزغده Microtuber initiation (%)	تشکیل ریزغده Microtuber formation (%)	سرعت آغازش ریزغده Microtuber initiation rate per day	طول ریزغده Microtuber length	قطر ریزغده Microtuber diameter	وزن ریزغده Microtuber Weight	تعداد جوانه روی ریزغده Number of buds on per microtuber	تعداد شاخه Number of shoot	دورمانسی Dormancy
Mac	2	158.14*	517.32^{ns}	1.47^{ns}	1.36^{ns}	1.32^{ns}	0.05^{ns}	1.47^{ns}	0.08ns	818.36^{ns}
Mic	2	58.75^{ns}	669.84^{ns}	0.80^{ns}	0.57^{ns}	1.70^{ns}	94.72^{ns}	2.95^{ns}	0.06^{ns}	228.89^{ns}
Suc	1	371.90*	9.84^{ns}	4.4*	6.40^{ns}	2.04^{ns}	65.06^{ns}	5.33^{ns}	0.32^{ns}	1143.95^{ns}
Mac × Mic	4	19.39^{ns}	325.83^{ns}	0.38^{ns}	1.88^{ns}	0.67^{ns}	156.62^{ns}	0.95^{ns}	0.04^{ns}	510.42^{ns}
Mac × Suc	2	158.14*	3581.99*	0.04*	9*	13.24*	1622.88^{ns}	15.83*	0.66*	606.97^{ns}
Mic × Suc	2	58.75^{ns}	193.13^{ns}	0.54^{ns}	3.85^{ns}	1.63^{ns}	358.66^{ns}	0.60^{ns}	0.05^{ns}	95.07^{ns}
Mac × Mic × Suc	4	19.39^{ns}	402.41^{ns}	0.38^{ns}	1.47^{ns}	0.23^{ns}	209.2^{ns}	1.65^{ns}	0.02^{ns}	1209.61^{ns}
Error	33	62.96	1217.50	0.71	2.55	1.94	353.26	2.32	0.14	1002.21

^{ns}، ** و * به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

^{ns}, ** and *: non-significant, significant at $p\leq0.01$ and $p\leq0.05$, respectively

آغازش ریزغده در غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف از ۹۵/۰۸ تا ۹۸/۱۱ درصد متغیر بود و از نظر آماری تفاوتی بین غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف وجود نداشت (شکل ۶). بنابراین برای آغازش ریزغده از جوانه جانبی، نیاز به مقادیر کمتر عناصر کم‌مصرف (½ Mac) می‌باشد. این امر نشان داد که برای آغازش ریزغده‌ها، مقدار عناصر کم‌مصرف بحرانی نبوده و آغازش ریزغده وابسته به عناصر کم‌مصرف نمی‌باشد. احتمال می‌رود که حتی در مقادیر پایین‌تر عناصر کم‌مصرف نیز آغازش ریزغده مشاهده شود. همچنین مقادیر عناصر کم‌مصرف روی فشار اسمزی محلول بی‌تأثیر بوده و چون آغازش ریزغده عمدتاً وابسته به فشار اسمزی است، بنابراین با دوبرابر کردن مقادیر عناصر Mic، فشار اسمزی در حد ناچیز افزایش پیدا کرده که همراه با تأمین بهتر مواد غذایی لازم برای سلول‌های تحریک شده، باعث مقداری افزایش در درصد آغازش ریزغده شده است. قندها و عناصر پرمصرف، بیشترین تأثیر را در پتانسیل اسمزی کل محیط‌کشت دارند (George, 1993).



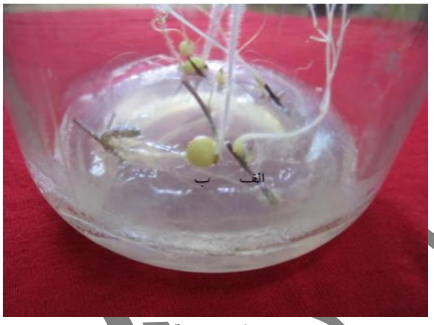
شکل ٦- میانگین درصد آغازش ریزغده در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف

Fig. 6- Average percentage of initiation of microtuber in different concentrations of sucrose and macro elements

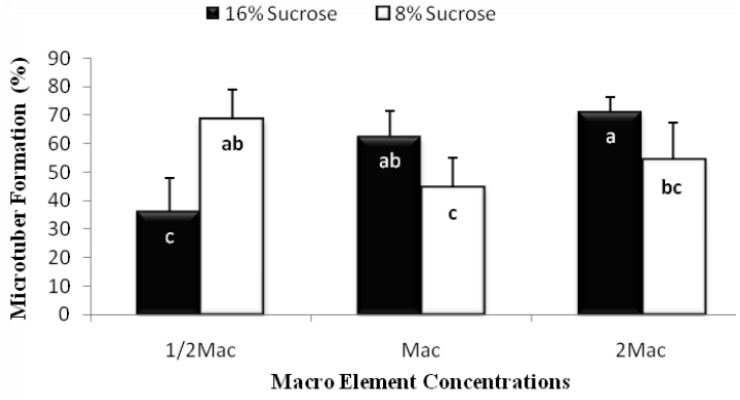
درصد تشکیل ریزغده

در اکثر تیمارها و ریزنمونه‌ها، پس از آغازش ریزغده‌ها در محل گره، ریزغده‌ها در طی دو ماه تشکیل شدند (شکل ۷-ب). با این حال در تیمارهایی که به‌دلیل شرایط نامناسب، ریزغده‌های آغازش یافته رشد نکرده بودند، جوانه‌های جانبی شروع به رشد کرده و ریزغده‌ای در محل گره تولید نشد (شکل ۷-الف). در محیط‌کشت MS (شاهد)، میانگین تشکیل ریزغده برابر ۲۳/۳۵ درصد و در محیط‌های‌کشت MS تغییریافته ۲۷/۳۳ درصد بود (شکل ۸). اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف، عناصر کم‌مصرف و ساکارز از نظر درصد تشکیل ریزغده وجود نداشت. با این حال درصد تشکیل ریزغده به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر اثر متقابل Mac × Suc قرار گرفت، درحالی‌که سایر اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه معنی‌دار نبودند (جدول ۳). حداقل درصد تشکیل ریزغده در غلظت ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز، در محیط-کشت Mac ½ حاصل شد و با افزایش غلظت عناصر پرمصرف، درصد تشکیل ریزغده نیز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. به‌طوری‌که درصد تشکیل ریزغده در Mac ½، ۳۶ درصد و در 2Mac، ۷۱ درصد بود. بنابراین در محیط‌کشت حاوی ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز اضافه‌کردن عناصر پرمصرف باعث افزایش معنی‌داری در تشکیل ریزغده شد. حداقل درصد تشکیل ریزغده در محیط‌کشت MS (شاهد) دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز نسبت به Mac ½ از درصد تشکیل ریزغده کمتری برخوردار بود؛ لذا می‌توان چنین نتیجه گرفت که در رقم آگریا محیط‌کشت MS تغییریافته (1/2 Mac) دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز، باعث بهبود تشکیل ریزغده می‌شود. از طرف دیگر محیط‌کشت Mac 2 دارای ۱۶۰ گرم در لیتر از درصد

تشکیل ریزغده بالایی برخوردار بود. با این حال برای کاهش هزینه‌ها، محیط‌کشت Mac ½ دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز نسبت به سایر تیمارها ترجیح داده می‌شود. به‌کار بردن غلظت ۶ الی ۱۰ گرم در لیتر ساکارز سبب تشکیل ریزغده گردید (Bhojwani and Razdan, 1996). آلتیندال و کارادوگان (Altindal and Karadogan, 2011) نشان دادند که نوع منبع کربن و غلظت به‌کار رفته برای هر رقم متفاوت می‌باشد. به‌طوری‌که محیط‌کشت پایه MS دارای ۶ گرم در لیتر ساکارز در رقم آگریا و ۴ درصد مالتوز در رقم جاستین، بهترین محیط‌های کشت برای ریزغده‌زایی بودند. در غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف، درصد تشکیل ریزغده از ۴۹ تا ۶۰ درصد متغیر بود و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف مشاهده نشد. بنابراین استفاده از غلظت‌های بالا یا پایین عناصر کم‌مصرف بر تشکیل بهینه ریزغده اثری نداشته و می‌توان از غلظت پایین عناصر کم‌مصرف استفاده نمود.



شکل ۷- فرایند ریزغده‌زایی پس از دو ماه: الف- عدم رشد ریزغده آغازش یافته و تبدیل شدن به شاخه ب- ریزغده رشد یافته
Figure 7- The process of micrituber formation after two months: A- The lack of microtuber developed and becoming into a branch B- Microtuber developed

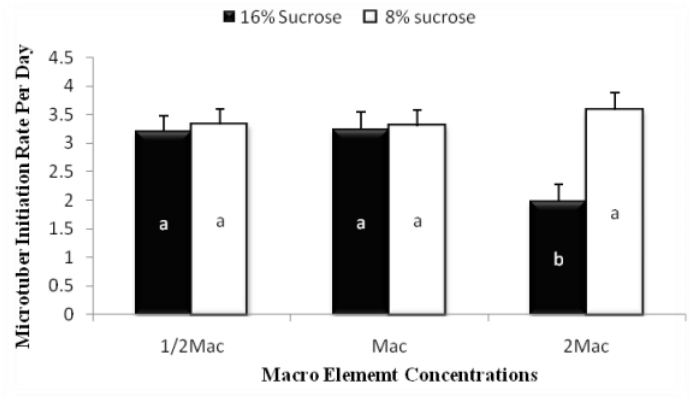


شکل ۸- میانگین درصد تشکیل ریزغده در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف
Figure 8- The average percentage of microtuber formation in different concentrations of sucrose and macro elements

سرعت آغازش ریزغده

در هر محیط‌کشت شروع ریزغده‌زایی از یک ریزنمونه به ریزنمونه دیگر متفاوت بود. همچنین اختلاف زمانی بین شروع ریزغده‌زایی در ریزنمونه‌های کشت شده در یک محیط‌کشت وجود داشت. به‌طوری‌که در برخی از ریزنمونه‌ها چهار الی پنج روز بعد از کشت، آغازش ریزغده مشاهده شد و در تعداد دیگری از ریزنمونه‌ها پس از ۱۴ الی ۱۶ روز آغازش ریزغده شروع شد. اختلاف معنی‌داری بین ۲ غلظت ساکارز از نظر سرعت آغازش ریزغده وجود داشت، درحالی‌که سرعت آغازش ریزغده تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف و پرمصرف قرار نگرفت. از بین اثرات متقابل، فقط اثر

متقابل Mac × Suc تأثیر معنی‌داری روی سرعت آغازش ریزغده داشت. این نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف و کم‌مصرف نتوانست به‌طور معنی‌داری سرعت آغازش ریزغده‌ها را تغییر دهد. با این حال زمانی‌که غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف را به‌همراه درصدهای مختلف ساکارز درنظر بگیریم سرعت آغازش ریزغده‌ها از اثر توأم این دو فاکتور به‌طور معنی‌داری متأثر شدند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که کمترین سرعت آغازش ریزغده مربوط به محیط‌کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز بود. سایر تیمارها از سرعت آغازش ریزغده مناسب و حداکثری برخوردار بودند. این امر احتمالا به این خاطر می‌باشد که در محیط‌کشت 2 Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز، فشار اسمزی بالا، باعث تأخیر در آغازش ریزغده‌ها شده که نهایتاً پس از ۱ ماه، درصد آغازش ریزغده در این تیمار نسبت به سایر تیمارها کمتر بود. این درحالی است که فشار اسمزی بالا در بهبود تشکیل ریزغده‌ها مؤثر می‌باشد (شکل ۹). لذا محیط‌کشت 2 Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز برای تشکیل ریزغده تیمار مناسبی است. هرچند که از سرعت آغازش پایین‌تری برخوردار باشد. ساکارز یکی از محرک‌های بحرانی برای تشکیل ریزغده است و به‌عنوان یک منبع رطوبت بذر و منبع انرژی و نیز در غلظت‌های بالاتر به‌عنوان سیگنالی برای تشکیل ریزغده ضروری است (Hussain *et al.*, 2006). یو و همکاران (Yu *et al.*, 2000) گزارش کردند که سرعت رشد ریزغده‌ها در غلظت ۸۰ گرم در لیتر ساکارز خیلی بالاتر از زمانی بود که از ۴ گرم در لیتر ساکارز در محیط‌کشت استفاده شد. سرعت آغازش ریزغده در غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف از ۲/۸۷۷ تا ۳/۲۹۵ متغیر بود. با این حال از نظر آماری تفاوتی بین غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف وجود نداشت. چون سرعت آغازش ریزغده عمدتاً وابسته به فشار اسمزی است و عناصر کم-مصرف نقش بارزی در فشار اسمزی ندارند، بنابراین با دوبرابر کردن مقادیر Mic مواد غذایی بیشتری تأمین خواهد شد و باعث مقداری افزایش در سرعت آغازش ریزغده شده است.



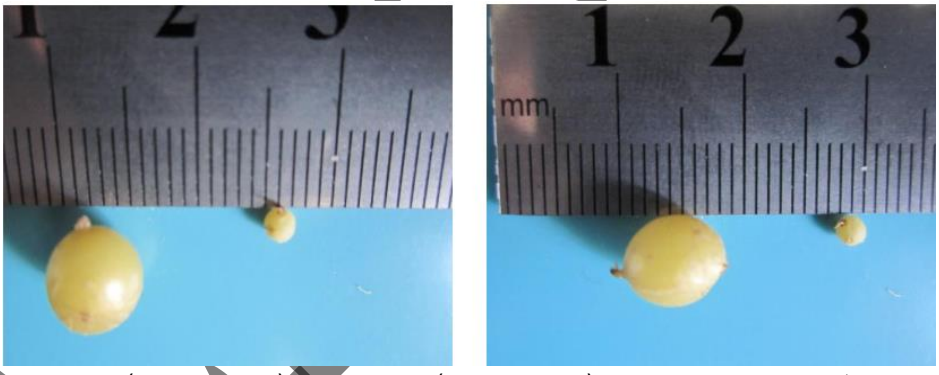
شکل ۹- میانگین سرعت آغازش ریزغده در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف

Fig. 9- The average microtuber initiation rate per day in different concentrations of sucrose and macro elements

طول ریزغده

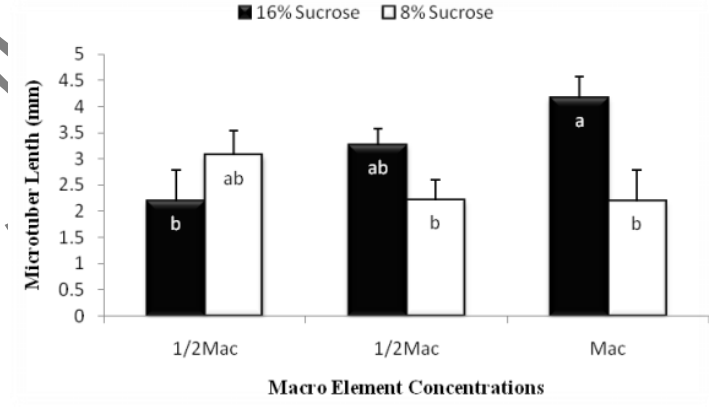
در تیمارهای مورد بررسی، طول ریزغده از ۲ الی ۹ میلی‌متر متغیر بود (شکل ۱۰- الف). طول ریزغده تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف، عناصر کم‌مصرف و ساکارز قرار نگرفت. به‌غیر از اثرمتقابل Mac × Suc سایر اثرات متقابل بر روی طول ریزغده تأثیر معنی‌داری نداشتند. طویل‌ترین ریزغده با میانگین ۴/۲ میلی‌متر در محیط‌کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده شد، ولی اختلاف معنی‌داری با محیط‌کشت تغییرنیافته‌ی Mac تکمیل شده با ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز نداشت، تغییر غلظت عناصر پرمصرف به Mac ½، سبب کاهش طول ریزغده (به کمترین مقدار، ۲/۱ میلی‌متر)، در بین تیمارهای به‌کار رفته شد. در غلظت ۸۰ گرم در لیتر ساکارز، طول ریزغده با کاهش غلظت عناصر

پرمصرف، از 2 Mac به Mac ثابت مانده و سپس در Mac ½ افزایش نشان داد، ولی این افزایش معنی‌دار نبود (شکل ۱۱). با توجه به نقش عناصر پرمصرف می‌توان چنین استنباط کرد که یونی مانند یون کلسیم که در محیط‌کشت به‌صورت نمک کلرید کلسیم وجود دارد، علاوه بر نقش‌های متعددی مانند حضور در ساختمان و پروتئین‌های غشاء سلولی و تیغه میانی دیواره سلولی و ساخت سلولز، فعال‌کننده تعدادی از آنزیم‌های مسئول تقسیم سلولی و طویل شدن سلول می‌باشد (Shacklock *et al.*, 1992; Jones, 1998; Mengel and Kirby, 1987). نیتروژن نیز برای ساختن اسیدآمینه تریپتوفان (ماده اولیه برای ساخت اکسین) لازم می‌باشد (George, 1993)، با کاهش غلظت این عناصر در محیط‌کشت، سنتز اکسین که یکی از وظایف آن طویل شدن و توسعه سلولی می‌باشد کاهش می‌یابد. درنتیجه رشد سلول‌ها با کاهش غلظت عناصر پرمصرف کاهش می‌یابد و سبب کاهش طول ریزغده می‌شود و با توجه به اینکه ریزغده یک اندام ذخیره‌ای برای نشاسته می‌باشد، به مقادیر ساکارز بالاتری نیاز دارد. بنابراین با افزایش غلظت ساکارز می‌توان انتظار داشت که ریزغده‌های بزرگتری تولید شود. طول ریزغده در غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف از ۱/۷ تا ۲/۳ میلی‌متر متغیر بود. با این حال ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف مشاهده نشد و می‌توان چنین استنباط کرد که طول ریزغده مستقل از اثرات عناصر کم‌مصرف بوده و وابستگی زیادی به غلظت‌های ساکارز و عناصر پرمصرف دارد. در کل درصورت بهینه بودن سایر عوامل مؤثر در ریزغده‌زایی، غلظت‌های بالای ساکارز می‌تواند در تولید و رشد ریزغده‌های بزرگتر مفید باشد (Yu *et al.*, 2000; Shibli *et al.*, 2001).



شکل ۱۰- الف. طول ریزغده (۲ الی ۹ میلی‌متر) ب. قطر ریزغده (۲ الی ۸ میلی‌متر)

Fig. 10- a. Microtuber length (2 to 9 mm) b. The diameter of the microtuber (2 to 8 mm)

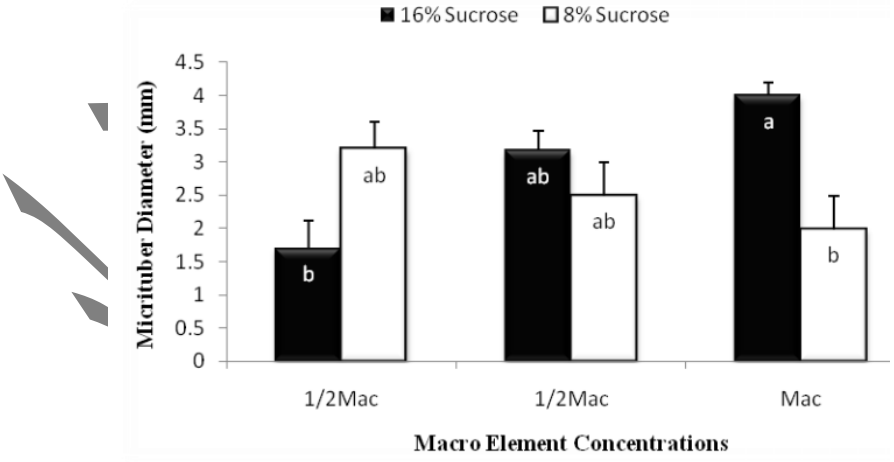


شکل ۱۱- میانگین طول ریزغده در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف

Fig. 11- The average microtuber length in different concentrations of sucrose and macro elements

قطر ریزغده

قطر ریزغده تحت تأثیر اثرات فاکتورهای مورد مطالعه قرار نگرفت، ولی اثرمتقابل دوگانه Mac × Suc تأثیر معنی‌داری روی قطر ریزغده داشت. قطر ریزغده از ۱/۷ الی ۴ میلی‌متر متغیر می‌باشد و این امر نشان داد که در محیط‌های کشت مورد استفاده، قطر ریزغده مناسبی به‌دست آمده است. با این‌حال قطورترین ریزغده‌ها در محیط‌کشت 2 Mac که با ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز تکمیل شده بود به‌دست آمد. این درحالی است که قطر ریزغده‌ها در محیط‌کشت MS (شاهد) در هر ۲ غلظت ساکارز و نیز در محیط‌کشت Mac ½ تکمیل شده با ۸۰ گرم در لیتر ساکارز بیشتر بود. در دو محیط‌کشت (محیط‌کشت 2Mac همراه با ۸۰ گرم در لیتر ساکارز و نیز محیط‌کشت Mac ½ به‌همراه ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز)، قطر ریزغده‌ها کم‌تر بود (شکل ۱۲). ریزغده‌ها یک منبع با ارزش برای نگهداری ژرم‌پلاسم سیب‌زمینی می‌باشند. درتحقیقی که بر روی ۶ ژنوتیپ مختلف سیب‌زمینی انجام شد مشخص شد که فقط ریزغده‌هایی با قطر بیش از ۵ میلی‌متر توانستند بعد از ۳ سال انبارداری بقای خود را حفظ نمایند. از طرفی دیگر روند تولید ریزغده وابسته به غلظت ساکارز بود. به‌طوری‌که در محیط‌های کشت دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز با افزایش غلظت عناصر پرمصرف، افزایش در قطر ریزغده‌ها مشاهده شده و برعکس زمانی‌که محیط‌کشت دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز بود کاهش در غلظت عناصر پرمصرف باعث افزایش قطر ریزغده‌ها گردید. قطر ریزغده‌ها در غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف از ۲/۴۷ تا ۳/۱۱ میلی‌متر متغیر بود و با کاهش غلظت عناصر کم‌مصرف، افزایش ناچیزی در قطر ریزغده‌ها مشاهده شد، ولی اختلاف معنی‌داری بین Mic ½، Mic و 2Mic وجود نداشت و می‌توان از غلظت پایین عناصر کم‌مصرف استفاده نمود. در میان سه غلظت مختلف ساکارز (۰، ۶ و ۸ گرم در لیتر) بزرگترین ریزغده‌ی تولیدی (۴/۳ میلی‌متر) در محیط‌کشت ۶ گرم در لیتر ساکارز همراه با ۱۲ گرم در لیتر BAP مشاهده گردید (Imani *et al.*, 2010).



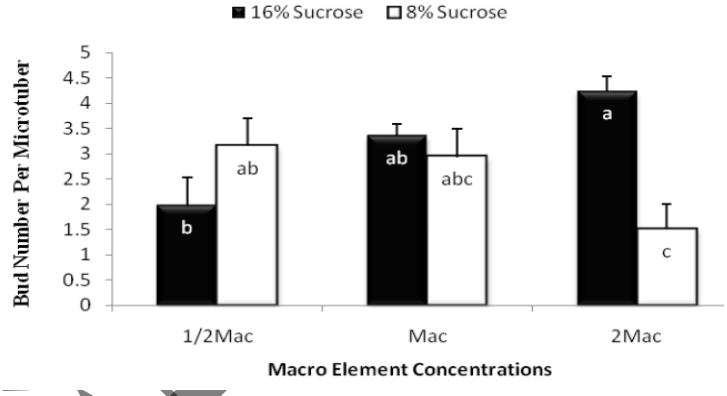
شکل ۱۲- میانگین قطر ریزغده در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف

Figure 12- The average microtuber diameter in different concentrations of sucrose and macro elements

تعداد جوانه بر روی ریزغده

سیب‌زمینی از محصولاتی می‌باشد که توسط اندام رویشی تکثیر می‌گردد و با توجه به اینکه ریزغده یک اندام برای تکثیر می‌باشد با افزایش تعداد جوانه بر روی ریزغده، محصول بیشتری تولید خواهد شد. با اعمال تیمارهای مختلف، تعداد جوانه روی ریزغده‌ها بین ۱ الی ۹ جوانه متغیر بود. تعداد جوانه بر روی ریزغده، از غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف، پرمصرف و ساکارز متأثر نگردید. از طرف دیگر تعداد جوانه تحت تأثیر اثرمتقابل Mac × Suc قرار گرفت و سایر اثرات

متقابل بر تعداد جوانه تأثیر معنی‌دار نداشتند. تعداد جوانه بر روی ریزغده به غلظت‌های عناصر پرمصرف و ساکارز وابسته بود. به‌طوری‌که بالاترین تعداد جوانه (۴/۲۳۱) بر روی هر ریزغده زمانی به‌دست آمد که ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز قرار گرفتند. درصورتی‌که در محیط‌کشت 2Mac دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز کمترین تعداد جوانه (۱/۵۰۹) مشاهده گردید. در محیط‌کشت Mac متوسط تعداد ریزغده در ۱۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز بیشتر از ۸۰ گرم در لیتر ساکارز بود، ولی اختلاف معنی‌داری بین دو غلظت ۸۰ و ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده نگردید (شکل ۱۳). در محیط‌کشت ½ Mac متوسط تعداد جوانه بر روی ریزغده در ۸۰ گرم در لیتر ساکارز بالاتر از ۱۶۰ گرم در لیتر بود، ولی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. این نتایج نشان داد که محیط‌کشت تغییریافته 2Mac دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز و ½ Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز، تحت این شرایط قادر به تولید ریزغده‌هایی با تعداد جوانه بیشتر از دو عدد نبودند. از آنجایی‌که افزایش تعداد جوانه روی ریزغده، منجربه افزایش عملکرد ریزغده در محصول می‌شود، بنابراین استفاده از تیمارهایی با غلظت بالاتر ساکارز و عناصر پرمصرف مناسب‌تر می‌باشد. در غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف، تعداد جوانه بر روی ریزغده از ۲/۴ تا ۳/۲ عدد متغیر بود، ولی از نظر آماری تفاوتی بین غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف مشاهده نگردید. بنابراین استفاده از غلظت‌های بالا یا پایین عناصر کم‌مصرف بر تشکیل تعداد جوانه اثری نداشته و می‌توان از غلظت پایین عناصر کم‌مصرف استفاده نمود.



شکل ۱۳- میانگین تعداد جوانه بر روی هر ریزغده در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف

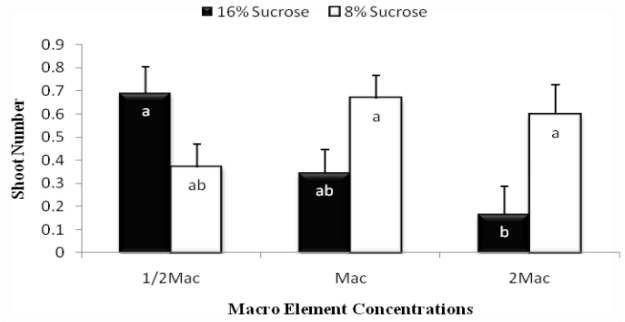
Figure 13- The average number of buds on per microtuber in different concentrations of sucrose and macro elements

دورمانسی

در تعدادی از ریزغده‌های تولیدی در محیط‌های کشت مورد بررسی، جوانه‌های موجود بر روی ریزغده، شروع به رشد کردند و این امر نشان داد که این ریزغده‌ها فاقد دورمانسی بودند. رشد جوانه به‌دلیل نداشتن دوره خواب در ریزغده‌های تولیدی اتفاق می‌افتاد. عدم وجود دوره خواب، عامل محدودکننده در استفاده از ریزغده‌ها به‌عنوان بذر گواهی شده می‌باشد که برای کوتاه کردن کارهای کشت بافت عدم وجود دورمانسی مفید است (Leclerc and Donnelly, 1995). عوامل متعددی از قبیل ژنوتیپ، اندازه ریزغده، مدت زمان قرار گرفتن ریزغده‌ها در محیط‌کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد، بلوغ جوانه و سطح داخلی ABA بر خواب ریزغده‌ها اثر می‌گذارند (Hemberg, 1985). تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به درصد دورمانسی ریزغده‌ها نشان داد که اثرات ساده و متقابل فاکتورهای مورد مطالعه بر روی درصد دورمانسی ریزغده‌ها معنی‌دار نبودند. لذا غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف، عناصر کم‌مصرف و ساکارز، دورمانسی یکسانی را ایجاد کردند و به‌طور متوسط ۷۳/۶۵ درصد ریزغده‌ها، دارای دورمانسی بودند.

تعداد شاخه رشدیافته از محل گره

شاخساره‌های رشدیافته، دارای طولی بین ۱ الی ۲۵ سانتی‌متر بودند که گاهی روی شاخساره اصلی شاخساره‌های جانبی نیز تشکیل شد. تعداد شاخه رشدیافته از محل گره تحت تأثیر اثرمتقابل ساکارز و عناصر پرمصرف قرار گرفت. کمترین تعداد شاخساره در محیط‌کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز به‌دست آمد و با توجه به اینکه در این محیط‌کشت، میزان غده تشکیل شده حداکثر بوده، طبیعی است که تعداد شاخه حداقل باشد (شکل ۱۴). گزارشات نشان داد که سطوح کم ساکارز (۳ گرم در لیتر) در محیط‌کشت ریزغده‌زایی، شاخساره‌های طبیعی را تولید می‌کنند و هیچ ریزغده‌ای تشکیل نشد. بنابراین سطوح کم ساکارز مسئول رشد رویشی شاخساره در سیب‌زمینی هستند (Hussain *et al.*, 2006; Khuri and Moorby, 1995). پژوهش‌های فوجینو و همکاران (Fujino *et al.*, 1995) نشان دادند که افزایش ساکارز از ۳ به ۸ گرم در لیتر، سبب توقف طویل شدن شاخه‌ها و متورم شدن ناحیه زیر هر یک از شاخه‌ها می‌شود. تتسومورا و همکاران (Tetsumura *et al.*, 2008) گزارش کردند که کاهش در غلظت محیط‌کشت MS سبب افزایش تشکیل ریشه و شاخه در *Vaccinium corymbosum* گردید.



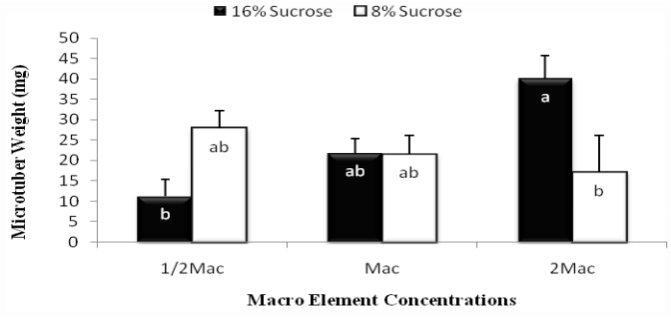
شکل ١٤- میانگین تعداد شاخه در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف

Fig. 14- The average number of shoot in different concentrations of sucrose and macro elements

وزن ریزغده‌ها

وزن ریزغده‌ها، به‌عنوان یک عامل اصلی در تولید غده محسوب می‌شود، به‌طوری‌که ریزغده‌هایی با وزن کم، گیاهچه-هایی با تعداد غده کمی، تولید خواهند کرد (Donnelly *et al.*, 2003). بنابراین بهینه‌سازی شرایط تولید ریزغده می‌تواند بر عملکرد مزرعه‌ای سیب‌زمینی تأثیرگذار باشد (Dwiati and Anggorowati, 2011). در این آزمایش وزن ریزغده‌ها بین ۷ تا ۱۰۳ میلی‌گرم متغیر بود که نشان‌دهنده بالا بودن وزن ریزغده‌های تولیدی از وزن تعریفی برای ریزغده‌ها می‌باشد. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف، پرمصرف و ساکارز تأثیر معنی‌داری بر وزن ریزغده نداشتند. این امر نشان می‌دهد که وزن ریزغده‌ها از اثرات انفرادی فاکتورهای مورد مطالعه متأثر نشد. با این حال اثرمتقابل Mac × Suc بر روی وزن ریزغده معنی‌دار بود، این درحالی است که سایر اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه بر وزن ریزغده معنی‌دار نبودند. وزن ریزغده در محیط‌کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز، تقریباً دو برابر محیط‌کشت MS (شاهد) دارای ۸۰ یا ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز بود که این امر نشان‌دهنده بهبود عوامل تغذیه‌ای با دو برابر کردن غلظت عناصر پرمصرف می‌باشد. از طرف دیگر با کاهش غلظت عناصر پرمصرف نسبت به محیط‌کشت MS (شاهد)، کاهش در وزن ریزغده‌ها در محیط‌کشت دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز مشاهده گردید که نشان‌دهنده برهم-خوردن تعادل بین مواد معدنی و غلظت منبع کربن می‌باشد (شکل ۱۵). برهم‌خوردن تعادل مواد معدنی و منبع کربن در تیمار دیگری نیز مشاهده گردید. به‌طوری‌که در محیط‌کشت تغییریافته 2Mac، دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز، وزن

ریزغده دو برابر محیط‌کشت 2Mac، دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز بود. بنابراین غلظت‌های بالای ساکارز در ریزغده‌زایی و افزایش وزن ریزغده‌ها مؤثر می‌باشد. اثر غلظت محیط کشت پایه روی جنین‌زایی سوماتیکی در مارچوبه بررسی شد و نتایج نشان داد که غلظت‌های محیط‌کشت پایه، روی رشد شاخساره‌ها تأثیر معنی‌داری داشت، علاوه بر این، وزن تر شاخساره‌ها در تیمار 2MS دوبرابر MS بود (Mamiya and Sakmoto, 1999). بررسی روند تغییرات وزن ریزغده‌ها نشان داد که وزن ریزغده‌ها در محیط‌های‌کشت دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز با افزایش غلظت عناصر پرمصرف افزایش نشان داد. این درحالی است که در محیط‌های کشت دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز، کاهش معنی‌داری در وزن ریزغده‌ها با افزایش غلظت عناصر پرمصرف مشاهده شد. به‌عبارت دیگر، زمانی‌که غلظت عناصر پرمصرف افزایش می‌یابد، برای به‌دست آوردن ریزغده‌های با وزن بالا، بایستی غلظت ساکارز افزایش یابد تا علاوه بر تأمین مواد معدنی، انرژی لازم برای تجمع مواد نشاسته‌ای در ریزغده‌ها نیز فراهم شود. علت پایین بودن وزن ریزغده‌ها در ۸۰ گرم در لیتر ساکارز یا در غلظت‌های پایین‌تر از ۸۰ گرم در لیتر، این می‌تواند باشد که در محیط‌کشت، ساکارز به‌راحتی به گلوکز و فروکتوز تجزیه شده و طی ۳۰ روز پس از کشت قسمت اعظمی از ساکارز جذب و مورد استفاده قرار می‌گیرد. لذا برای مرحله رشد و بزرگ شدن ریزغده‌ها، منبع کربن ناچیزی باقی خواهد ماند، ولی با افزایش غلظت ساکارز، می‌توان انتظار داشت که منبع کربن کافی برای بزرگ شدن ریزغده وجود داشته باشد. وزن ریزغده از ۲۰/۵ میلی‌گرم تا ۲۴/۷۲ میلی‌گرم در غلظت‌های مختلف عناصر کم‌مصرف، متغیر بود، ولی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. به‌طوری‌که در رابطه با عناصر کم‌مصرف، اختلاف معنی‌داری بین محیط‌کشت MS و تغییر یافته‌ها وجود نداشته و به‌نظر می‌رسد غلظت Mic ½ می‌تواند نیازهای رشد سلول‌های ریزغده را فراهم سازد، پس می‌توان از محیط‌کشت MS یا تغییریافته آن استفاده نمود، ولی باتوجه به هزینه‌ها، محیط‌کشت دارای Mic ½ توصیه می‌شود.



شکل ۱۵- میانگین وزن ریزغده در غلظت‌های مختلف ساکارز و عناصر پرمصرف

Fig. 15- The average weight of the microtuber in different concentrations of sucrose and macro elements

ضریب همبستگی بین وزن ریزغده با صفات مورد اندازه‌گیری نشان داد که وزن ریزغده با تعداد شاخساره‌های تولیدی از جوانه جانبی رابطه منفی و معنی‌داری داشت. به‌عبارت دیگر در محیط‌های کشتی که جوانه جانبی قادر به رشد و تولید شاخساره‌های جدید نبود، وزن ریزغده‌ها بالاتر بود. این امر نشان می‌دهد که هر ترکیب از عناصر پرمصرف و کم‌مصرف و نیز غلظت ساکارز و یا هر عامل دیگری که بتواند از رشد طولی شاخساره تولیدی از جوانه جانبی جلوگیری کند، می‌تواند باعث تشکیل ریزغده و نهایتاً منجربه تولید ریزغده‌های با وزن بالا گردد. از طرف دیگر، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین وزن ریزغده با طول، قطر، درصد تشکیل ریزغده و تعداد جوانه بر روی ریزغده وجود داشته و در ریزنمونه‌ها و محیط‌های کشتی که طول، قطر، وزن ریزغده‌ها و تعداد جوانه روی ریزغده‌ها بالا بود، ریزغده‌های با وزن بالا تولید شد.

این امر نشان می‌دهد که عوامل مشترکی روی این صفات تأثیرگذار می‌باشند. لذا در انتخاب محیط‌کشت مناسب، بایستی بالا بودن این صفات مدنظر باشد (داده‌ها نشان داده نشده است).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه محیط کشت 2Mac دارای ۱۶۰ گرم در لیتر ساکارز در اولویت اول و محیط کشت Mac ½ دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز در اولویت دوم به علت تولید ریزغده‌های با وزن بالا و تعداد بیشتر جوانه بر روی ریزغده به عنوان تیمار برتر پیشنهاد می‌شود. ریزغده‌های تولیدی با وزن و اندازه بیشتر، از درصد دورمانسی بیشتری برخوردار بودند و طی مراحل ریزغده‌زایی، جوانه‌های روی ریزغده‌ها قادر به جوانه‌زنی و تولید ریزغده نبودند. همچنین با توجه به تأثیر مواد آلی بر فرایندهای ریخت‌زایی، پیشنهاد می‌شود که اثر نوع و غلظت ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و افزودنی‌های آلی روی فرایند ریزغده‌زایی بررسی شود.

منابع

Abelenda, J. A., Bergonzi, S., Oortwijn, M., Sonnewald, S., Du, M., Visser, R. G., & Bachem, C. W. (2019). Source-sink regulation is mediated by interaction of an FT homolog with a SWEET protein in potato. *Current Biology*, 29, 1178-1186.

Afrasiab, H., & Iqbal, J. (2012). Biochemical and molecular characterization of somaclonal variants and induced mutants of potato. *Pakistan Journal of Botany*, 44, 1503-1508.

Ahloowalia, B. S. (1999). Minitubers for seed potato production. *Farm and Food*, 4, pp.4-6.

Akita, M., & Takayama, S. (1994). Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 36, 177-182.

Altindal, D., & Karadogan. (2011). The effect of carbon sources on *in vitro* microtubrization of potato (S*olanum tuberosum* L.). *Turkish Journal of Field Crops*, 15, 7-11.

Ashrafzadeh, S., & Leung, D.W.M. (2015). Microtuber formation in potato callus. *ScienceAsia*, 41, 1-4.

Bhojwani, S.S., & Razdan, M.K. (1996). Plant tissue culture: theory and practice, a revise edition Elsevier.

Carlson, C., Groza, H.I., & Jiang, J. (2004). Induction of *In Vitro* minimum potato plant growth and microtuberization. *American Journal of Potato Research*, 81, 50-58.

Donnelly, D.J., Coleman, W.K., & Coleman, S.E. (2003). Potato microtuber production and performance: a review. *American Journal of Potato Research*, 80, 103-115.

Dwiati, M., & Anggorowati, S. (2011). Induction of *in vitro* culture of potato microtuber by using alar and dark photoperiod application. *Agrivita, Journal of Agricultural Science*, 33, 47-52.

Ebadi, M., & Iranbakhsh, A. (2011). The induction and growth of potato (*Solanum tuberosum* L) microtubers (sante cultivar) in response to the different concentrations of 6-benzylaminopurine and sucrose. *African Journal of Biotechnology*, 10, 10626-10635.

Fujino, K., Koda, Y., & Kikuta, Y. (1995). Reorientation of cortical microtubules in the sub-apical region during tuberization in single-node stem segments of potato in culture. *Plant and cell physiology*, 36, 891-895.

Garner, N., & Blake, J. (1989). The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. *Annal. Botany*, 63, 663-674.

George, E.F. (1993). Plant propagation by tissue culture. part1. The technology Exegetics England. Potato. Phd Thesis, Punjab Agricultural University Ludhiana India.

Hannapel, D.J. (2007). Signaling the Induction of Tuber Formation. In: Vreugdenhil D (Ed.), Potato Biology and Biotechnology. *Elsevier B.V*, 242-243.

Haque, A.V., Samad, M.A., & Shapla, T.L. (2009). In vitro callus initiation and regeneration of potato. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 34, 449-456.

Hemberg, T. (1985). Potato rest. *In:* Potato Physiology. P.H. Li (Ed). Academic Press Inc, Orlando, Fla. U.S.A. 354-388.

Hussain, I., Chaudhry, Z., Muhammad, A., Asghar, R., Naqvi, S.M.S., & Rashid, H. (2006). Effect of chlorocholine chloride, sucrose and BAP on *in vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Cardinal). *Pakestan Journal of Botany*, 38, 275-282.

Hussey, G., & Stacey, N.J. (1984). Factors affecting the formation of in vitro tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *American Potato Journal*, 53, 565-578.

Imani, A.A., Qhrmanzadeh, R., Azimi, J., & Janpoor, J. (2010). The effect of various of 6-benzylaminopurine (BAP) and sucrose on *in vitro* potato (*solanum tuberosum* L.) microtuber induction. *American-Eurasian Journal Agriculture and Environ. Science*, 8, 457-459.

Iqbal, A.A., Rizwan, A., Mukhtar, Z., Mansoor, S., Mehmood, Z., & Asad, S. (2016). Establishment of an efficient and reproducible regeneration system for potato cultivars grown in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 48, 285-290.

Jones, J.B. (1998). Plant Nutrition Manual. *CRC Press, Boca Raton, Florida, USA*. P.149.

Joshi, A., & Mature, N. (2015). Micropropagation and conservation of endanger medicinal plant – *Leptadenia rticulata* (Retz.) wight and Arn. trought nodal explant. *International Journal of Current Advanced Research*, 4, 382-385.

Karhu, S.T. (1997). Sugar use in relation to shoot induction by sorbitol and cytokinin in apple. *Journal American Society Horticulture Science*, 122, 476–480.

Khalafalla, M.M., Abd Elaleem, K.G., Rasheid, S., & Modawi, R.S. (2010). Callus formation and organogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar almera. *Journal of Phytology*, 2, 40–46.

Khalil, M.M., Abd El Aal, A.M.H., & Samy, M.M. (2017). Studies on microtuberization of five potato genotypes. *Egyptian Journal of Horticulture*, 44, 91-97.

Khuri, S., & Moorby, J. (1995). Investigations into the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro*. *Annal of Botany*, 75, 295-303.

Kozak, D. (2003). Effect of medium components on *in vitro* tuberization of *Gloriosa rothschhildiana* óbrien. *Acta Horticultur*, 624, 515-520.

Kumar, V., Rashmi, D., & Banerjee, M. (2014). Callus induction and plant regeneration in *Solanum tuberosum* L. cultivars (Kufri Chipsona 3 and MP-97/644) via leaf explants. International Research *Journal of Biological Sciences*, 3, 66-72.

Leclerc, Y., & and Donnelly, D. J. (1995). Microtuber Dormancy in three potato cultivars. *American Potato Jornal*, 2, 215-223.

Mamiya, K., & Sakamoto, Y. (1999). Effect of sugar concentration and strengthof basal medium on conversion of somstic embryos in *Asparagus Officinalis* L. *Scientia Horticulture*, 84, 15-26.

Mengel, K., & Kirby, E.A. (1987). Principles of plantnutrition. International patash institute. *Worblaufen Bern, Switzerland*, 687-695.

Motallebi-Azar, A., Kazemiani, S., & Yarmohamadi, F. (2013). Effect of sugar/osmotica levels on in vitro microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Russian Agricultural Sciences*, 39, 112-116.

Motallebi-Azar, A., Kazemiani, S., Kiumarsie, F., & Mohaddes, N. (2011). Shoot proliferation from node explants of potato (*Solanum tuberosum* cv. Agria). II. effect of different concentrations of NH4NO3, hydrolyzed casein and BAP. *Romanian Biotechnological Letters*, 16, 6181-6186.

Ortiz-Montiel, G., & Lozoya-Saldafia, H. (1987). Potato minitubers: Technology validation in Mexico. *American Potato*, 64, 535-544.

Salem, J., & Hassanein, A.M. (2017). In vitro propagation, microtuberization, and molecular characterization of three potato cultivars. *Biologia Plantarum*, 61, p. 427-437.

Seabrook, J.E.A., Douglass, L.K., & Arnold, D.A. (2004). Effect of leaves on microtubers produced from potato single-node cutting *in vitro*. *American Journal of Potato Research*, 81, 1-5.

Shacklock, P.S., Read, N.D., & Trewavas A.J. (1992). Cytosolic free calcium mediates redlight induced photomorphogenesis. *Nature*, 358, 753-755.

Shahriyar, S., Akram, S., Khan, K., Miya, F., & Sarkar, A.R. (2015). In vitro plant regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) at the rate of different hormonal concentration. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 1, 297-303.

Shibli, R.A., Abu-Ein, A.M., & Ajlouni, M.M. (2001). *In vitro* and *in vivo* multiplication of virus free "Spunta" potato. *Pakistan Journal. Botanica*, 33, 35-41.

Simko, I. (1994). Sucrose application causes hormonal changes associated with potato tuber induction. *Journal Growth Regulator*, 13, 73-77.

Sonnewald, S., & Sonnewald, U. (2014). Regulation of potato tuber sprouting. *Planta*, 239, 27-38.

Tetsumura, T., Matsumoto, Y., & Sato, M. (2008). Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Science Horticulture*, 119, 72-84.

Yu, W.C., Joyce, P.J., Cameron, D.C., & McCown, B.H. (2000). Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. *Plant Cell Reports*, 19, 407-413.