Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

The Effect of Graphene Oxide and Putrescine on In Vitro Microtuberization of Potato (*Solanum tuberosum*) cv. Agria at Nitrogen (NH_4NO_3) Deficiency Stress

Masoumeh Abbaspour khajeh
MSc Student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, university of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail address: mabbaspour11@gmail.com

Alireza Motallebiazar
*Corresponding author. Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, university of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail address: motallebiazar@gmail.com

Jabber Panahandeh
Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, university of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail address: panahandeh@tabrizu.ac.ir

Alireza Tarinejad
Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. E-mail address: tarinejad@yahoo.com

Amin Jahanian
Ph.D. Student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, university of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail address: amin.jahanian68@gmail.com

Amir Kahnamoi
MSc Student, Department of Biothechnology, Faculty of Agriculture, university of Tabriz, Tabriz, Iran. E-mail address: kahnamoii@gmail.com

Abstract

Objective

Due to the fact that the use of nanomaterial technology has expanded in recent years in tissue culture studies, the present study is based on the use of graphene nanomaterials and has been studied its derivatives such as graphene oxide and graphene oxide with putrescine in different levels of Ammonium nitrate was studied for increase microtuberization efficiency . This study was performed with aim of to induce suitable environmental conditions for microtuberization and stimulate anatomical and biochemical changes for in vitro conditions on potato microtuberization of Agria cultivar. According to previous studies, the general purpose of using these compounds is to increase the osmotic potential, as well as the possibility of increasing the amount of starch grains in cells by using these nanomaterial.

Materials and methods

Nitrogen content of control medium included control (complete nitrogen of MS medium), 50 and 25 percent of nitrogen of MS medium. Graphene treatments were used as control (without

graphene oxide), 25 and 50 mg / l graphene oxide (alone) and 25 and 50 mg / l graphene oxide with putrescine. In this experiment, the number of microtuber in the first, second and final month microtuber, as well as the number of microtuber sproute, number of eyes, average microtuber weight, diameter of microtubers and microtubers yield were evaluated.

Results

The results showed that the most positive response to microtuberization was obtained in treatments with 25 percent nitrogen and graphene oxide with putrecsine treatments. It was also observed that the reduction of 25 percent of the culture medium nitrogen and the addition of graphene oxide with putrescine increased the final microtuberization, while the microtuberization in the control treatment (without nitrogen reduction and without graphene oxide) showed the lowest percentage. On the other hand, the results showed that 25 percent nitrogen and 50 mg / l graphene oxide with putrescine had the highest average microtuber weight (39 mg) compared to the lowest average microtuber weight (graphene oxide with putrescine without nitrogen reduction treatment) that Showed 240 percent increase in microtuber weight. In general, the use of graphene oxide with putrescine and 25 percent nitrogen could have positive effects on the microtuberization.

Conclusions

The general results showed that reducing the amount of nitrogen in the culture medium increases the amount of microtuberization and its effective the use of graphene and graphene oxide with putrescine in microtuberization. The results of this experiment showed that the culture medium containing 25% nitrogen and graphene oxide with putrescine were the most suitable treatments for this experiment.

Keywords: graphene oxide, microtuber yield, number of microtuber, putrescine

Paper Type: Research Paper.

Citation: Abbaspour khajeh M, Motallebiazar AR, Panahandeh J, Tarinejad AR, Jahanian A, Kahnamoi A (2023) The Effect of Graphene Oxide and Putrescine on In Vitro Microtuberization of Potato (*Solanum tuberosum*) cv. Agria at Nitrogen (NH_4NO_3) Deficiency Stress. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (3), 77-96.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (3), 77-96. DOI: 10.22103/jab.2023.19279.1394

Received: May 05, 2023. Received in revised form: June 27, 2023.

Accepted: June 28, 2023. Published online: September 30, 2023.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

تأثیر گرافن اکسید و گرافن اکسید پوتریسین‌دار بر ریز غده‌زایی درون شیشه‌ای سیب زمینی رقم آگریا تحت تنش کمبود ازت (NH_4NO_3)

معصومه عباسپور خواجه

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: mabbaspour11@gmail.com

علیرضا مطلبی آذر

*نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: motallebiazar@gmail.com

جابر پناهنده

دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: panahandeh@tabrizu.ac.ir

علیرضا تاری‌نژاد

دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. رایانامه: tarinejad@yahoo.com

امین جهانیان

دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: amin.jahanian68@gmail.com

امیر کهنمویی

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: kahnamoii@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۴/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۷

چکیده

هدف: با توجه به اینکه استفاده از فناوری نانو مواد در سال‌های اخیر در مطالعات کشت بافت گسترش پیدا کرده است لذا مطالعه حاضر بر اساس استفاده از نانو مواد گرافنی و مشتقات آن که در این پژوهش گرافن اکسید و گرافن اکسید پوترسین‌دار در سطوح مختلف کمبود نیترات آمونیوم جهت افزایش کارایی ریزغده‌زایی سیب‌زمینی مورد مطالعه قرار گرفت. این پژوهش با هدف القاء شرایط محیطی مناسب برای ریزغده‌زایی و تحریک تغییرات آناتومیکی و بیو شیمیایی در شرایط درون شیشه‌ای بر ریزغده‌زایی سیب‌زمینی رقم آگریا انجام گرفت. اهداف کلی استفاده از این ترکیبات با توجه به مطالعات پیشین، افزایش پتانسیل اسمزی و همچنین امکان افزایش میزان دانه‌های نشاسته در سلول‌ها با استفاده از این نانومواد دانست.

مواد و روش‌ها: میزان ازت محیط کشت شامل شاهد (ازت کامل محیط کشت MS) ، ۵۰ و ۲۵ درصد ازت محیط کشت MS بود. تیمارهای گرافن به‌صورت شاهد (بدون گرافن اکسید)، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر گرافن اکسید (به‌تنهایی) و ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر گرافن اکسید پوترسین‌دار استفاده گردید. در این آزمایش صفات تعداد ریزغده‌زایی ماه اول و دوم و تعداد ریزغده‌زایی نهایی، همچنین تعداد غده جوانه زده، تعداد چشم، متوسط وزن ریزغده، قطر غده و عملکرد ریزغده مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که بیشترین پاسخ مثبت به ریزغده‌زایی در تیمارهای با ۲۵ درصد ازت محیط کشت و تیمارهای گرافن اکسید پوتر سین‌دار به دست آمد. همچنین مشاهده شد که کاهش ازت به‌میزان ۲۵ در صد محیط کشت و افزودن گرافن اکسید پوترسین‌دار باعث افزایش میزان ریزغده‌زایی نهایی شد در حالی که ریزغده‌زایی در تیمار شاهد (بدون کاهش ازت و فاقد گرافن اکسید) کمترین درصد را نشان داد. از طرف دیگر، نتایج نشان داد که تیمار ۲۵ درصد ازت محیط کشت همراه با ۵۰ میلی‌گرم در لیتر گرافن اکسید پوتر سین‌دار بیشترین متوسط وزن ریزغده با وزن ۳۹ میلی‌گرم را دارا بود که نسبت به کمترین متوسط وزن ریزغده (تیمار گرافن اکسید پوترسین‌دار بدون کاهش ازت محیط کشت) ۲۴۰ درصد افزایش را نشان داد. به‌طور کلی در این آزمایش استفاده از گرافن اکسید پوتر سین‌دار و ۲۵ در صد ازت محیط کشت توانست اثراتی مثبت در ریزغده‌زایی سیب‌زمینی در شرایط درون شیشه‌ای ایجاد کند.

نتیجه‌گیری: نتایج کلی نشان داد که کاهش میزان ازت محیط کشت باعث افزایش میزان ریزغده‌زایی می‌شود و استفاده از گرافن و گرافن اکسید پوترسین‌دار در ریزغده‌زایی موثر است. نتایج این آزمایش نشان داد که محیط کشت حاوی ۲۵ درصد ازت و گرافن اکسید پوترسین‌دار مناسب‌ترین تیمارهای این آزمایش بودند.

کلیدواژه‌ها: پوترسین، تعداد ریزغده، عملکرد ریز غده، گرافن اکسید

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: عباسپور خواجه معصومه، مطلبی آذر علیرضا، پناهنده جابر، تاری‌نژاد علیرضا، جهانیان امین، کهنمویی امیر (۱۴۰۲) تأثیر گرافن اکسید و گرافن اکسید پوتریسین‌دار بر ریز غده‌زایی درون شیشه‌ای سیب زمینی رقم آگریا تحت تنش کمبود ازت (NH_4NO_3). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۳)، ۷۷-۹۶.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L) گیاهی علفی و چند ساله از تیره (Solanaceae) و یک محصول تجاری مهم در سطح جهان است. تقاضا برای استفاده از غده‌های عاری از ویروس سیب‌زمینی به جهت افزایش عملکرد مزرعه ای افزایش چشم‌گیری پیدا کرده است لذا با توجه به این تقاضا، تحقیقات در زمینه ریزغده‌زایی درون شیشه‌ای در سطح وسیع‌تری در حال انجام است. ریزغده‌های سیب‌زمینی تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای دارای مزایای زیادی از جمله تولید غده‌های بذری با کیفیت بالا، قابلیت نگهداری طولانی‌تر، کار کردن آسان، غده‌های یکنواخت و بدون هرگونه عارضه فیزیولوژیکی است (Dhital and Lim, 2012). عوامل موثر بر ریزغده‌زایی و تشکیل آن در شرایط درون شیشه‌ای شامل ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، فتوپریود، دما، نوع منبع کربن، تنظیم‌کننده‌های رشد، ترکیبات آنتی‌جیبرلین، نوع و غلظت ازت و حتی سن فیزیولوژیکی غده مادری و دیگر ترکیبات محیط کشت می‌باشد (Donnelly et al. 2003). میزان ازت کل و منبع آن در محیط کشت روی تعداد، اندازه و نمو ریزغده‌ها، تأثیر بسزایی می‌گذارد (Zakaria et al. 2007, Mohapatra and Batra, 2017). اثر منبع ازت روی ریزغده‌زایی واریته‌های مختلف سیب‌زمینی در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی طی روزهای بلند نشان داد که محتوای ازت کمتر و کاهش میزان تبدیل نیترات به آمونیوم برای نمو یافتن غده هایی با اندازه بزرگتر (بزرگتر از ۶ میلی متر) مناسب است (Dobránszky and Magyar-Tábori, 2004). در سال‌های اخیر، نانوتکنولوژی به عنوان حوزه علمی چند رشته‌ای مجموعه‌ای از ابزارها و تکنیک‌های برگرفته از مهندسی، فیزیک، شیمی و زیست شناسی را به کار می‌گیرد (Mohammadabadi et al. 2009; Heidarpour et al. 2011; Mohammadabadi and Mozafari 2018). پیشرفت‌های علم نانو و فناوری نانو، ساخت و شناسایی حامل‌های زیست فعال زیر میکرونی را به صورت معمول امکان‌پذیر کرده است. تحویل مواد فعال زیستی به نقاط هدف در داخل بدن و رفتار آزادسازی آنها مستقیماً تحت تأثیر اندازه ذرات است (Mortazavi et al. 2005; Zarrabi et al. 2020). در مقایسه با حامل‌های اندازه میکرومتر، نانوحامل‌ها مساحت سطح بیشتری را فراهم می‌کنند و پتانسیل افزایش حلالیت، افزایش فراهمی زیستی، بهبود رهاسازی کنترل‌شده و امکان هدف‌گیری دقیق مواد محبوس‌شده را به میزان بیشتری دارند (Heidarpour et al. 2011; Mohammadabadi and Mozafari 2019). در حال حاضر علم نانومواد به‌طور گسترده در صنعت پزشکی، انرژی، الکترونیک و کشت بافت گیاهی (Gogos et al. 2012; Park et al. 2019; Hu et al. 2014) استفاده می‌شود. گرافن و مشتقات آن از زمان کشف آن در سال ۲۰۰۴ علاقه‌مندان زیادی را به‌خود جذب کرده است. گرافن اکسید[1] (GO) به عنوان یکی از مشتقات گرافن دارای ساختار لایه‌ای دو بعدی منحصر به‌فردی است که به اندازه یک اتم ضخامت دارد. اخیراً GO به‌دلیل کم هزینه بودن، دسترسی آسان و توانایی گسترده در تبدیل شدن به گرافن، طرفداران زیادی پیدا کرده است (Cheng et al. 2016). گرافن اکسید به‌دلیل ماهیت طبیعی پایداری و سازگاری زیستی خوب همچنین حلالیت در شرایط فیزیولوژیکی و سمیت کم در بسیاری از مطالعات

[1] Graphene oxide (GO)

زیستی به‌طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. در مقایسه با سایر موادکربنی مانند فولرین[1] و نانولوله‌های کربنی، مواد گرافنی اثرات سمی بسیار کمی از خود نشان داده‌اند و تقریبا می‌توان گفت که برای سلامت بشر بی‌خطر هستند. گرافن اکسید و مشتقات آن به‌دلیل خاصیت ضد میکروبی زیاد و مقدار زیاد در طبیعت و خاصیت شیمیایی و فیزیکی منحصر به فرد آن شناخته شده است (Geim and Novoselov, 2010; Khodakovskaya et al. 2009; Kim et al. 2017). طی یک پژوهش تاثیر غلظت‌های مختلف گرافن اکسید بر مکانیسم‌های جوانه‌زنی گیاه باقلا (*Vicia faba* L.) مورد بررسی قرارگرفت. گرافن اکسید در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با کاهش پارامترهای رشدی و فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده H_2O_2، آسکوربات پرواکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، افزایش سطح الکترولیت، افزایش اکسیداسیون لیپید و پروتئین اثرات منفی بر رشد گیاه باقلا داشت ولی غلظت‌های ۴۰۰ و۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش معنی‌داری در شاخص‌های رشدی گیاه باقلا نشان داد (Anjum et al. 2014). در مطالعاتی که اخیرا انجام گرفته است، تاثیر گرافن اکسید در ۴ غلظت (۰، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر ریشه‌زایی و رشد ریشه سیب، رقم گالا، در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر بر طول ریشه‌های نابجا و محتوای رطوبتی و تعداد ریشه‌های جانبی اثر بازدارندگی داشت ولی غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بر تعداد ریشه‌های نابجا و میزان ریشه‌دهی نسبت به تیمار شاهد (بدون گرافن اکسید) افزایش معنی‌داری نشان داد. همچنین تیمارهای گرافن اکسید فعالیت آنزیم‌های مرتبط با تنش اکسیداتیو مانند کاتالاز، پروکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز را افزایش داد (Li et al. 2018). در آزمایشی دیگر نشان داده شد که گرافن اکسید در غلظت‌های ۲۰ ، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش رشد ساقه و ریشه دانهال‌های گیاه گوجه فرنگی شد همچنین گرافن اکسید رشد ریشه و ساقه در گیاهان بالغ را نیز افزایش داد. در این تحقیق سطح رونویسی ژن‌های درگیر در تشکیل ریشه‌های مویین و مقدار هورمون اکسین نیز در این گیاهان افزایش پیدا کرد. در انتهای آزمایش نشان دادند که گرافن اکسید تعداد گل ها و میوه ها را افزایش داد که مربوط به افزایش سطح اکسین بود (Guo et al. 2021). در مطالعه‌ای که در گیاه هندوانه با استفاده از ترکیب گرافن اکسید انجام گرفت نتایج جالبی مشاهد شد که میانگین قند میوه‌ها در گیاهان تیمار شده با گرافن اکسید نسبت به گیاهان شاهد افزایش پیدا کرد به طوری که عدد بریکس میوه گیاهان تیمارشده با گرافن اکسید ۱۱/۷۳ بود که در این عدد ۱۰/۱۶ برای گیاهان تیمار نشده بود که پیشنهاد نمودند که با استفاده از نانو گرافن اکسید در میزان رشد و کیفیت میوه‌ها نتایج مثبتی را در پی داشت (Tlili et al. 2011). در یک مطالعه ارتباط بین گرافن اکسید با میزان جذب عنصر کادمیوم و جوانه‌زنی و رشد دانهال برنج نشان داد که گرافن اکسید باعث جذب سریع‌تر کادمیوم در محیط غذایی شد و همچنین اثرات بازدارندگی عنصر کادمیوم در جوانه‌زنی و رشد دانهال برنج با کاربرد گرافن اکسید کاهش پیدا کرد (Yin et al. 2018).

یک گروه از ترکیبات پلی‌کاتیونی آلیفاتیک که در همه سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی حضور دارند، پلی‌آمین‌ها هستند. معمول ترین این ترکیبات شامل دی‌آمین پوتریسین (put)، تری‌آمین اسپرمیدین (spd) و تتراآمین اسپرمین (spm) می باشد (Gill

[1] fullerene

andTuteja 2010; Kakkar and Sawhney, 2002c Smith, 1985). اسمیت در سال ۱۹۸۵ پیشنهاد کرد که پلی‌آمین‌ها می‌توانند به عنوان پیامبرهای ثانویه برای هورمون‌های رشد گیاهی در داخل سلول عمل کنند (Smith, 1985). این ترکیبات در pH های فیزیولوژی به‌صورت کاتیون هستند که این طبیعت پلی‌کاتیونی آنها از خواص مهم در فعالیت‌های فیزیولوژیکی محسوب می‌شود، به‌طوریکه پلی‌آمین‌ها در گیاهان اغلب در ترکیب با مولکول‌های آنیونی همچون اسیدهای نوکلئیک، پروتئین، فسفولیپیدها و پلی‌ساکاریدها هستند (Tang et al. 2003). بر اساس تحقیقاتی که توسط (Mader, 1995) صورت گرفت، در محیط کشت دارای پلی‌آمین‌ها (پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین) ۱۰۰ درصد ریزغده‌زایی پس از ۴۰ روز حاصل شد اما در همین زمان در تیمار شاهد هیچ ریزغده‌ای مشاهده نشد. همچنین در محیط کشت دارای جاسمونیک اسید و پلی‌آمین‌ها، ریزغده‌زایی در گیاه سیب‌زمینی افزایش یافت (J C Mader and Hanke, 1997). پلی‌آمین‌ها تشکیل ریزغده در گیاه یام (*Dioscorea alata L.*) را افزایش می‌دهند. کاربرد پوتریسین به‌میزان ۱۰ میکرومولار به همراه ۳ درصد ساکارز، ریزغده‌زایی کامل را در روز چهاردهم در یام به‌همراه داشت (Ovono et al. 2010). در پژوهشی Liu et al. (2009) مشاهده کردند که نانو مواد بر پایه کربن (نانوتیوب کربن[1]) ، به راحتی از دیواره سلولی و غشای سلولی نفوذ کرده و همچنین در تحقیق دیگر مشاهده شد که انتقال نانوتیوب کربن تک جداره به داخل کلروپلاست افزایش پیدا کرد که این عمل باعث افزایش فعالیت فتوسنتزی و انتقال الکترون شد (Giraldo et al. 2014). با توجه به اینکه استفاده از فناوری نانو مواد در سال های اخیر در مطالعات کشاورزی و در برخی تحقیقات در زمینه کشت بافت مورد استفاده قرار گرفته و تمرکز بیشتر مطالعات در جنبه‌های سمیت این مواد روی گیاهان صورت پذیرفته است این ایده را در ما ایجاد نمود که ارتباط بین نانومواد با شرایط تغذیه‌ای به ویژه ازت و میزان جذب در شرایط درون شیشه‌ای در ریزغده‌ها چگونه خواهد بود و همچنین با استفاده از این ترکیبات نانو افزایش در میزان جذب آب در سلول‌ها شده و همچنین افزایش نشاسته در ریزغده‌ها نیز باعث افزایش ریزغده‌زایی خواهد شد. از دیگر جنبه استفاده از نانو گرافن اکسید شاید بتوان به جذب و انتقال درون سلولی و عبور آسان از دیواره سلولی به عنوان یک استراتژی مهم در کاربرد ترکیبات نانومواد عنوان نمود. لذا مطالعه حاضر بر اساس استفاده از نانو مواد گرافنی و مشتقات آن که در این پژوهش گرافن اکسید و گرافن اکسید پوترسین‌دار در سطوح مختلف کمبود نیترات آمونیوم محیط کشت برای بررسی ریزغده‌زایی درون شیشه‌ای سیب زمینی رقم آگریا انجام پذیرفته است تا بتوانیم پاسخ‌های مناسبی برای کاربرد نانومواد در شرایط کشت بافت داشته باشیم.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز واقع در محل ساختمان تحصیلات تکمیلی دانشکده کشاورزی انجام شد. در این آزمایش از ریز نمونه‌های درون شیشه‌ای عاری از ویروس

[1] carbon nanotubes (CNTs)

سیب‌زمینی رقم آگریا موجود در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی که تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت نوری و ۸ ساعت تاریکی قرار داشتند، استفاده گردید.

شرایط کشت ریز نمونه: جهت انجام کشت، قلمه‌های تک گره از جوانه‌های جانبی گیاه درون شیشه‌ای تهیه شد. این قلمه‌ها با طول تقریبی یک سانتی‌متر و با رعایت قطبیت به محیط کشت ریزغده‌زایی استریل شده حاوی تیمارهای مورد نظر انتقال یافتند. پس از اتمام فرآیند کشت، شیشه‌های حاوی ریزنمونه‌ها به‌درون دستگاه ژرمیناتور با شرایط تاریکی مطلق و در دمای ۱۸ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند. کشت‌ها به‌مدت ۴ ماه در این شرایط نگهداری شدند و هر دو هفته یک بار از آنها یادداشت برداری صورت گرفت.

تهیه محلول پایه نانو مواد گرافن اکسید: برای همگن ساختن و حل کردن نانو مواد گرافن اکسید در این آزمایش از دستگاه اولتراسونیک هموژنایزر[1] استفاده گردید. برای تهیه محیط کشت سه سطح تنش کمبود ازت به‌عنوان فاکتور اول (ازت کامل (۱/۶۵ گرم بر لیتر) محیط کشت MS، ۵۰ و ۲۵ درصد ازت محیط کشت MS) در ترکیب با پنج سطح تیمار نانوماده گرافن فاکتور دوم (شاهد، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر گرافن اکسید و ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیترگرافن اکسید پوتریسین‌دار) استفاده شد. در تمامی محیط‌های کشت از ۸ گرم در لیتر آگار و ۸۰ گرم در لیتر ساکارز استفاده گردید.

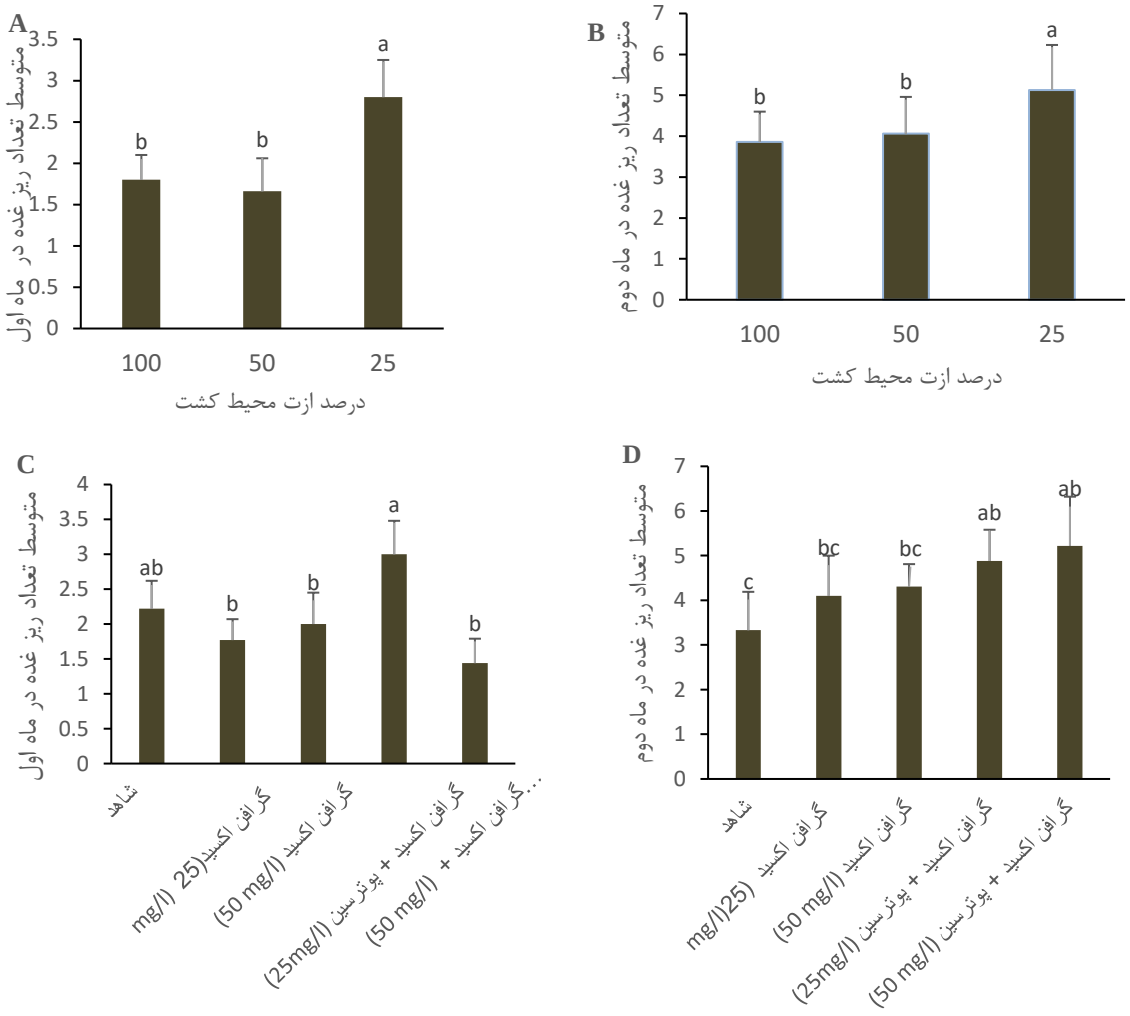
اندازه گیری صفات و تجزیه آماری: پس از گذشت سه ماه از تاثیرگذاری این مواد، ریزغده‌زایی و سایر صفات مرتبط مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش صفات تعداد ریزغده‌زایی ماه اول و دوم و تعداد ریزغده‌زایی نهایی، همچنین تعداد غده جوانه‌زده، تعداد چشم، متوسط وزن ریزغده، قطر ریزغده و عملکرد ریزغده مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق به‌صورت آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور که فاکتور اول شامل سه سطح ازت محیط کشت و فاکتور دوم تیمارهای گرافنی شامل پنج تیمار آزمایشی که در مجموع با ۱۵ تیمار و سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد که در هر تکرار ۵ ریز نمونه کشت شده بودند انجام گرفت. تجزیه‌های آماری به وسیله نرم افزار نسخه SPSS ۲۱ و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. کلیه شکل‌های این آزمایش با استفاده از نرم افزار Microsoft Office Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

متوسط تعداد ریز غده زایی ماه های اول و دوم: بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) داده‌ها، اثر ازت محیط کشت و تیمارهای گرافن اکسید بر تعداد ریزغده در ماه‌های اول و دوم در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند با این حال اثر برهمکنش ازت محیط کشت با تیمار گرافن اکسید در متوسط تعداد ریزغده‌زایی در ماه‌های اول و دوم معنی‌دار نبودند. در تیمارهای

[1] Ultrasonic Homogenizer

اعمال شده در این آزمایش، با کاهش ازت محیط کشت به‌میزان ۲۵ درصد محیط کشت MS تعداد ریزغده‌زایی در ماههای اول و دوم افزایش یافت (شکل B-۱و A-۱). محتوای نیتروژن کمتر و کاهش میزان تبدیل ازت به آمونیوم برای افزایش ریزغده‌زایی و تولید غده‌هایی با اندازه بزرگتر (بزرگتر از ۶ میلی متر) مناسب است (Dobránszky and Magyar-Tábori, 2004). همچنین اعمال تیمار گرافن اکسید همراه با پوترسین با غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر در ماه اول تعداد ریز غده را افزایش داد و در ماه دوم غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش تعداد ریز غده گردید (شکل D-۱و C-۱)



شکل ۱. متوسط تعداد ریزغده تحت تاثیر ازت در ماه اول (A) و ماه دوم (B) و تحت تاثیر تیمارهای گرافن اکسید در ماه اول(C) و ماه دوم (D). (بارها نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند و اعداد مشخص شده در هر تیمار متوسط پنج ریز نمونه در سه تکرار می‌باشند)

Figure 1. The average number of microtuber in treatment of nitrogen in first month (A) and second month (B) and in treatment of graphene oxide in first month (C) and second month (D) (Bars indicate standard deviation and the numbers specified in each treatment are an average of five explant in three replications)

جدول ۱. تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در فاکتور تیمار گرافن اکسید و کمبود ازت

Table 1. Analysis of variance (ANOVA) of measured traits in factor graphene oxide treatment and nitrogen deficiency

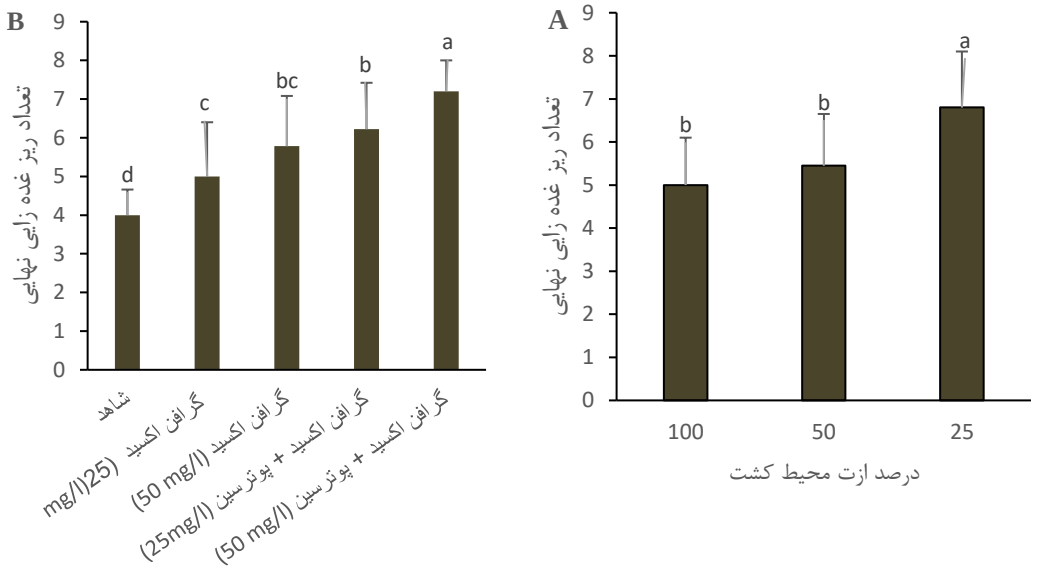
		میانگین مربعات (MS)									
منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	تعداد ریز غده در ماه اول N. of first month microtuber	تعداد ریز غده در ماه دوم N. of second month microtuber	تعداد ریز غده نهایی N. of final microtuber	تعداد استولون stolon N. of	متوسط وزن ریز غده Microtuber weigth average	تعداد چشم N. of eyes	تعداد ریز غده جوانه زده Microtuber sproute	طول جوانه رشد کرده روی ریز غده Length of sproute on microtuber	قطر ریز غده Microtuber diameter	عملکرد ریز غده Microtuber yield
ازت محیط کشت Nitrogen medium	2	5.75**	6.95**	13.11**	1.82ns	8.3ns	135.8ns	1.014*	4.52ns	2.49ns	0.004ns
گرافن اکسید Graphen oxide	4	3.07*	4.96**	5.63**	2.21ns	9.5ns	2.67*	0.987*	1.95ns	1.06ns	0.006*
ازت × گرافن اکسید Nitrogen × graphen oxide	8	1.14ns	1.48ns	1.03ns	0.90ns	40.8**	1.7ns	0.38ns	1.26ns	3.81*	0.007**
اشتباه آزمایشی Experimental error	30	0.95	1.02	0.77	1.35	5.37	0.72	0.402	1.802	1.32	0.002
درصد CV CV percent		24.7	23.1	15.4	33.2		22.2	15.5	14.8	23.7	

ns ، * ، ** به ترتیب بیانگر عدم معنی دار و معنی دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد

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

تعداد ریز غده نهایی: بر اساس نتایج تجزیه واریانس جدول، اثر ازت محیط کشت و تیمارهای گرافن اکسید بر تعداد ریزغده نهایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شدند ولی اثر بر همکنش این دو فاکتور معنی‌دار نبود (جدول ۱). مقایسات

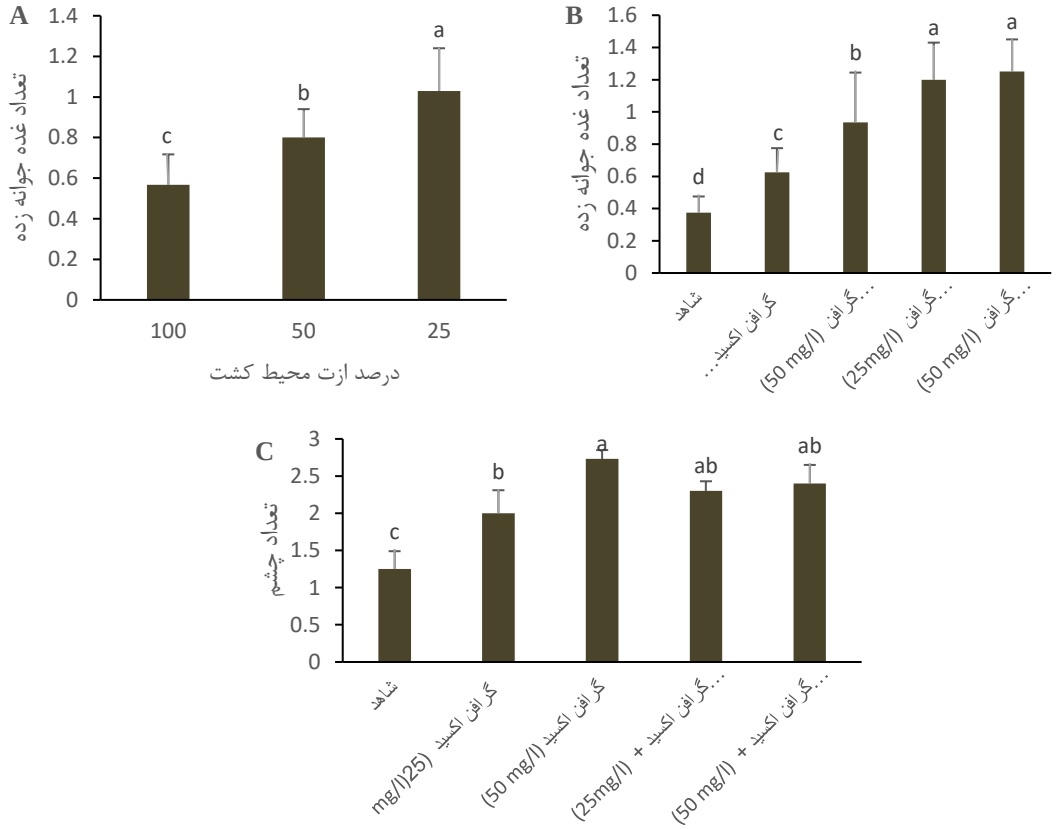
میانگین‌ها نشان داد که کاهش ازت به میزان ۲۵ درصد محیط کشت و افزودن گرافن اکسید پوترسین‌دار باعث افزایش میزان ریزغده‌زایی نهایی شد در حالی که ریزغده‌زایی در تیمار شاهد (بدون کاهش ازت و فاقد گرافن اکسید) کمترین درصد را نشان داد (شکل B-۲و A-۲). با توجه به اینکه میزان نیتروژن کل و منبع آن در محیط کشت روی نمو ریزغده‌ها، تأثیر بسزایی دارد لذا نتایج این آزمایش نشان داد که کاهش میزان نیتروژن تا میزان ۲۵ درصد محیط کشت MS و استفاده از گرافن اکسید پوترسین‌دار در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر می‌تواند تعداد ریزغده‌زایی نهایی را تا ۴۰ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش دهد. به نظر می رسد در رابطه با ریزغده‌زایی و مصرف نیتروژن نوعی رابطه منفی وجود دارد که نتایج محققان پیشین نیز بیان داشته‌اند که کاهش میزان ازت محیط کشت تا ۵۰ درصد باعث افزایش میزان ریزغده‌زایی رقم آگریا شد (Iranbakhsh et al. 2011). با توجه به موضوعات مشابه‌ای که در زمینه نانومواد کربن‌دار انجام گرفته است و با کاربرد نانوتیوب کربن منفذهای واقد در دیواره سلولی القاء شده و باعث افزایش جذب آب به درون سلول شده است که درنهایت باعث افزایش جوانه‌زنی بذر شده است (Vithanage et al. 2017)، لذا می‌توان چنین استنباط نمود که با کابرد نانو مواد گرافن اکسید پتانسیل اسمزی محیط کشت تا حد مناسبی برای جذب آب افزایش پیدا می‌کند و با ترکیب نمودن پوترسین به گرافن اکسید شاید بتوان گفت که به تعادل کاتیون- آنیون کمک نموده است و به‌علت دارا بودن ویژگی پلی‌کاتیونی در pH فیزیولوژیکی توانسته است که با پروتئین‌ها، فسفولیپیدها و ساختارهای دیواره سلولی واکنش دهد و با این مکانیسم سبب پایداری این ملکول‌ها شود.



شکل ۲. متوسط تعداد ریزغده نهایی تحت تاثیر ازت محیط کشت (A) و تیمارهای گرافن اکسید (B) (بارها نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند و اعداد مشخص شده در هر تیمار متوسط پنج ریز نمونه در سه تکرار می‌باشند)

Figure 2. The average number of final microtuber in treatment of medium nitrogen (A) and graphene oxide treatment (B) (Bars indicate standard deviation and the numbers specified in each treatment are an average of five explant in three replications)

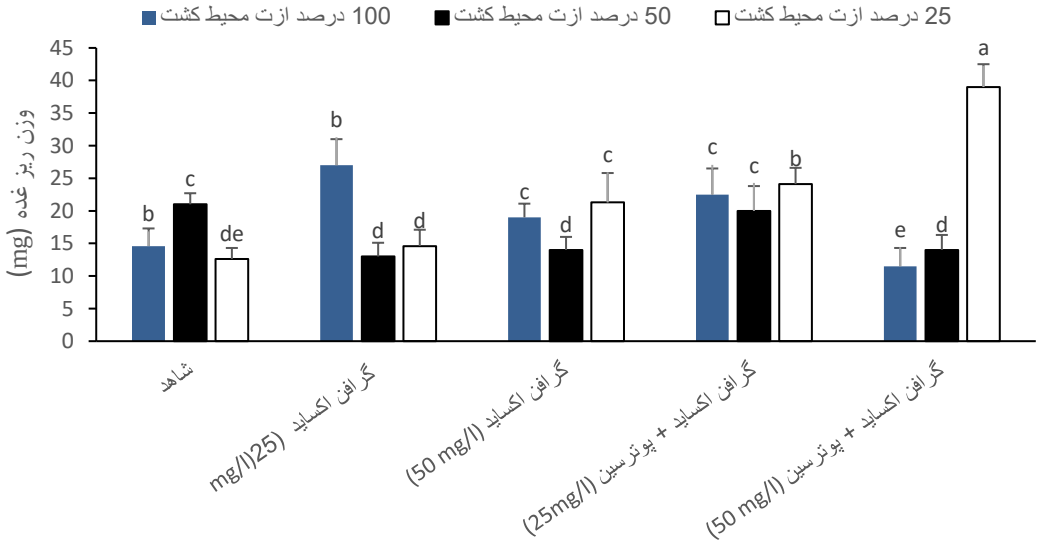
تعداد غده جوانه زده و تعداد چشم: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها مشخص کرد که تعداد غده جوانه‌زده و تعدا چشم تحت تاثیر تیمار گرافن اکسید قرار گرفتند. این در حالی است که اثر برهمکنش کاهش ازت محیط کشت و تیمار گرافن اکسید معنی دار نشد (جدول ۱). تعداد غده جوانه زده به کاهش ازت و تیمار گرافن وابسته بود، به‌طوری که بیشترین غده جوانه زده تولیدی در محیط کشت‌های حاوی ۲۵ درصد ازت محیط کشت و گرافن اکسید پوترسین‌دار بودند و اختلاف معنی‌داری در هر سه تیمار ازت محیط کشت مشاهده شد ولی در تیمارهای گرافن اکسید در هر دو غلظت ۵۲ و ۵۰ میلی‌گرم با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل B–۳و A–۳). مقایسه میانگین تعداد چشم‌های ریزغده‌ها نشان داد که کاربرد گرافن اکسید در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تعدا چشم را در ریزغده‌ها ایجاد کرد و نسبت به تیمار شاهد ۵۰ درصد تعداد چشم‌ها را افزایش داد همچنین کاهش میزان ازت محیط کشت تاثیر معنی‌داری بر تعداد چشم ریزغده‌ها نداشت (شکل C–۳).



شکل ۳. تعداد غده جوانه زده تحت تاثیر ازت محیط کشت (A) و تیمارهای گرافن اکسید (B)- تعداد چشم تحت تاثیر تیمارهای گرافن اکسید (C) (بارها نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند و اعداد مشخص شده در هر تیمار متوسط پنج ریز نمونه در سه تکرار می‌باشند)

Figure 3. The number of microtuber sproute in treatment of medium nitrogen (A) and treatments of graphene oxide (B) - The number of eyes in treatments of graphene oxide (Bars indicate standard deviation and the numbers specified in each treatment are an average of five explant in three replications)

متوسط وزن ریزغده: نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس نشان داد که اثر برهمکنش ازت محیط کشت و تیمار گرافن اکسید بر متوسط وزن ریزغده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود ولی اثرات ساده این دو فاکتور در این صفت ریزغده‌زایی معنی‌دار نشد (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمار ۲۵ درصد ازت محیط کشت همرا ه با گرافن اکسید پوترسین‌دار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر با وزن ۳۹ میلی‌گرم بیشترین متوسط وزن ریزغده را داشت که نسبت به کمترین متوسط وزن ریزغده (تیمار گرافن اکسید پوترسین‌دار بدون کاهش ازت محیط کشت) ۲۴۰ درصد افزایش را نشان داد (شکل ۴). با توجه به این مطالب حد قابل توجهی از غلظت ازت برای ایجاد ساقه و برگ و دست یابی به فتوسنتز ضروری می‌باشد و ایجاد تعادل با ریزغده‌زایی یک امر حیاتی در کشت بافت سیب‌زمینی می‌باشد. این مطالب بیانگر این است که کاهش میزان ازت محیط کشت ریزغده‌زایی سیب‌زمینی می‌تواند باعث افزایش متوسط وزن ریزغده شود که این امر درصورت استفاده همزمان با نانو گرافن اکسید پوترسین‌دار می‌تواند افزایش چشم‌گیری در وزن ریزغده‌ها ایجاد کند. در مطالعات پیشین با کاهش محتوای نیترات آمونیوم محیط کشت به ۵۰ درصد با کاهش مقدار برگ و میزان فتوسنتز، وزن تر ریزغده‌ها افزایش پیدا کرد (Seog, 2000).

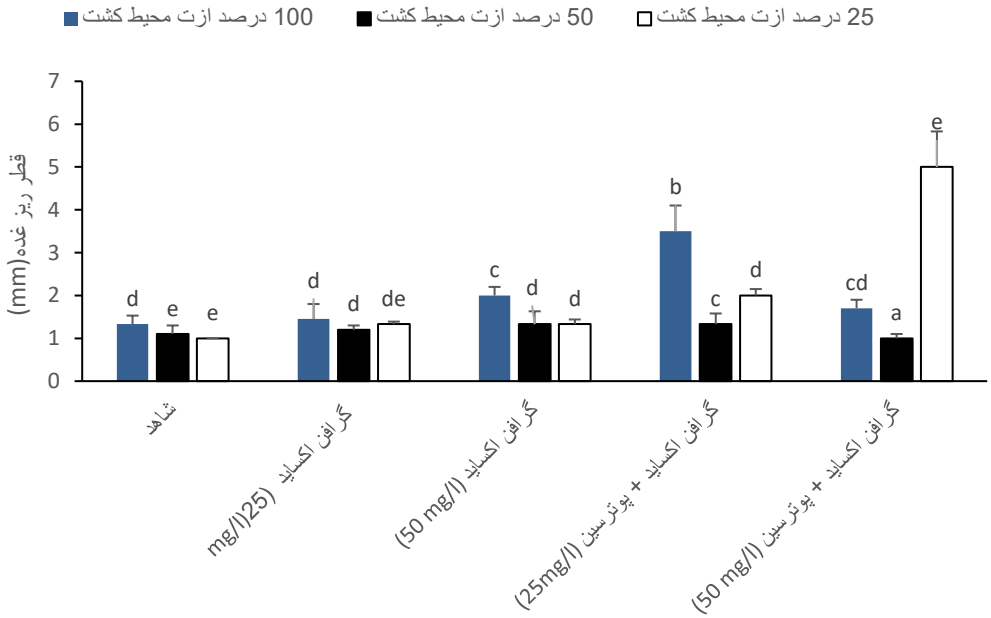


شکل ٤. متوسط وزن ریزغده در ترکیبات تیماری ازت محیط کشت و تیمارهای گرافن اکسید (بارها نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند و اعداد مشخص شده در هر تیمار متوسط پنج ریز نمونه در سه تکرار می‌باشند)

Figure 4. The average microtuber weight in treatments of medium nitrogen and graphene oxide (Bars indicate standard deviation and the numbers specified in each treatment are an average of five explant in three replications)

قطر ریزغده: قطر ریزغده‌های تولید شده به طور معنی‌داری از برهمکنش کاهش ازت محیط کشت با تیمار گرافن تحت تاثیر قرار گرفت ولی اثر کمبود ازت محیط کشت و تیمارهای گرافن اکسید در مورد این صفت معنی‌دار نبودند (جدول ۱). در بررسی مقایسات میانگین مشخص شد که بیشترین قطر غده (۵ میلی متر) مربوط به تیمار ۲۵ درصد

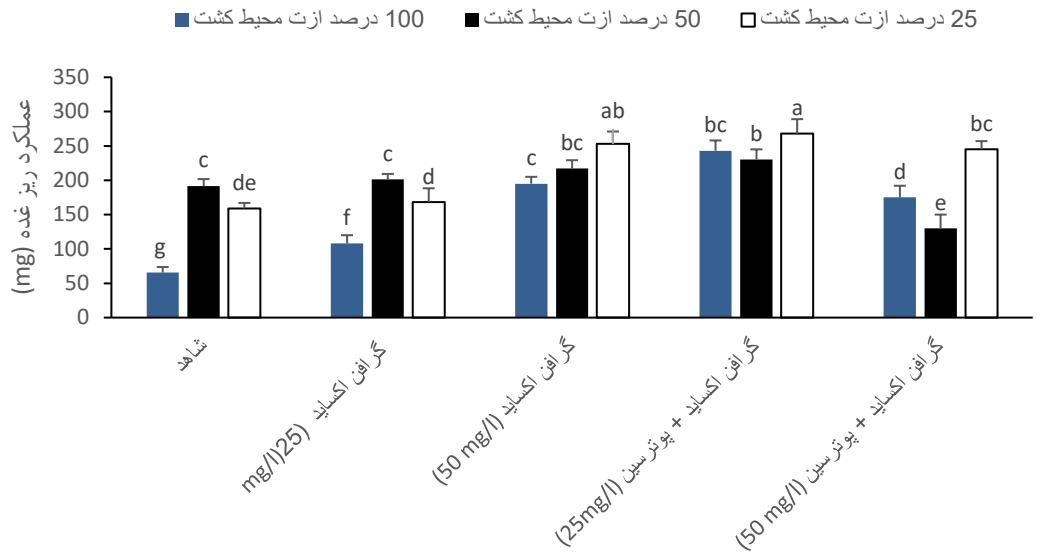
ازت محیط کشت به همراه گرافن اکسید پوترسین‌دار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بود که صفت متوسط وزن ریزغده نیز در این تیمار بیشترین مقدار را دارا بود (شکل ۵). در تیمارهای گرافن اکسید حاوی ازت ۵۰ درصد تفاوت معنی‌دار قوی وجود نداشت ولی در تیمارهای گرافن اکسید همراه با پوترسین بدون کاهش ازت محیط تفاوت نسبتا خوبی در تیمار ۲۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد و قطر غده ۳/۵ میلی‌متری به‌دست آمد. نتایج گزارش Iranbakhsh et al. (2011) نیز در تیمار کاهش ازت محیط به ۵۰ درصد نیز میانگین اندازه غده‌ها را در طول ۴/۵ ماه ۶/۱ تا ۷ میلی‌متر ارائه نموده که می تواند سبب دلیل منطقی گزارش آزمایش ما گردد. شاید بتوان چنین بیان نمود که با توجه به خاصیت آبدوستی مواد گرافنی و همچنین حالت چسبندگی و پیوستگی بالای نانومواد گرافن به سطوح سلولی، امکان تحریک بیشتر کانال‌های انتقال آب را در سطح سلول‌ها فراهم می‌کند و در نتیجه باعث افزایش پتانسیل اسمزی و آفزایش جذب آب در سلول‌ها می‌شود و افزایش حجم سلول‌ها را در پی خواهد داشت.



شکل ۵. متوسط قطر ریز غده در ازت محیط کشت و ترکیبات تیماری گرافن اکسید (بارها نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند و اعداد مشخص شده در هر تیمار متوسط پنج ریز نمونه در سه تکرار می‌باشند)

Figure 5. The average microtuber diameter in medium nitrogen and treatments of graphene oxide (Bars indicate standard deviation and the numbers specified in each treatment are an average of five explant in three replications)

عملکرد ریز غده: عملکرد ریزغده به عنوان یک صفت شاخص آزمایش در پتانسیل تولید ریزغده مطرح می‌باشد. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که اثر بر همکنش کاهش ازت محیط کشت با تیمار گرافن اکسید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین عملکرد ریزغده مربوط به تیمار۲۵ درصد ازت محیط کشت همراه با ۲۵ میلی‌گرم در لیتر گرافن اکسید پوترسین‌دار بود که عملکرد ریز غده در حدود ۲۷۰ میلی‌گرم بود که نسبت به تیمار شاهد ۵ برابر افزایش عملکرد را نشان داد (شکل ۷). با افزایش میزان گرافن اکسید پوترسین‌دار به ۵۰ میلی‌گرم عملکرد ریزغده کاهش پیدا کرد (شکل ۶). در تیمارهای بدون کاهش ازت با افزایش غلظت گرافن اکسید از ۲۵ به ۵۰ میلی‌گرم در لیتر میزان عملکرد ریزغده ۸۰ درصد افزایش پیدا کرد و در مقایسه تیمارهای بدون کاهش ازت، تیمار گرافن اکسید پوترسین‌دار ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار گرافن اکسید بدون پوترسین ۱۲۵ درصد افزایش عملکرد را نشان داد. از آنجایی که اثرات ازت بر ریزغده‌زایی هم‌سو با مورفولوژی کلی است و با توجه به تحقیقات پیشین که عنوان شده است افزایش میزان ازت در گیاهان باعث ارتفاع بیشتر و فاصله طولانی‌تر میان‌گره‌ها، زیاد شده وزن خشک برگ و ساقه، کاهش نسبت برگ به ساقه، افزایش وزن خشک ریشه می‌شود که در کنار این موارد در سیب‌زمینی ازت زیاد باعث افزایش تقسیم ماده خشک به شاخساره نسبت به ریزغده‌ها می‌شود (Muleta and Aga, 2019; Zahia et al. 2020). و با توجه به نتایج پیشین که استفاده از غلظت یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP (Khorsandi et al. 2020)، و استفاده از کاهش ازت محیط کشت (Iranbakhsh et al. 2011) برای ریزغده‌زایی سیب‌زمینی مثبت ارزیابی شده است لذا چنین استنباد می‌شود که با کاربرد تیمارهای گرافن اکسید بیوسنتز هورمون‌های اکسین ریز غده‌ها فعال شده است و این عوامل باعث شده است که ریزغده‌زایی در تیمارهای گرافن اکسید و گرافن اکسید پوترسین‌دار و شرایط کاهش ازت محیط کشت افزایش پیدا کند. در آزمایشی نقش تغذیه‌ای نانوذرات سیلیسیم بر ویژگی‌های فیزیولوژیک و تولید مینی‌تیوبر سیب‌زمینی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که اثر سطوح غلظت سیلیسیم تنها در صفات تعداد و عملکرد ریزغده در بوته معنی‌دار بود همچنین در کاربرد ذرات نانو و میکرو سیلیکات سدیم افزایش معنی‌داری در عملکرد سیب‌زمینی مشاهده نمودند (Saadatian and Kafi, 2015). در مطالعه‌ای که در گیاه هندوانه با استفاده از ترکیب گرافن اکسید انجام گرفت نتایج جالبی مشاهد شد که میانگین قند میوه‌ها در گیاهان تیمار شده با گرافن اکسید نسبت به گیاهان شاهد افزایش پیدا کرد به طوری که عدد بریکس میوه گیاهان تیمارشده با گرافن اکسید ۱۱/۷۳ بود که در این عدد ۱۰/۱۶ برای گیاهان تیمار نشده بود که پیشنهاد نمودند که با استفاده از نانو گرافن اکسید در میزان رشد و کیفیت میوه‌ها نتایج مثبتی را در پی داشت (Tlili et al. 2011).



شکل ٦. متوسط عملکرد ریز غده در ازت محیط کشت و ترکیبات تیماری گرافن اکسید (بارها نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشند و اعداد مشخص شده در هر تیمار متوسط پنج ریز نمونه در سه تکرار می‌باشند)

Figure 6. The average microtuber yield in medium nitrogen and treatments of graphene oxide (Bars indicate standard deviation and the numbers specified in each treatment are an average of five explant in three replications)

شکل ۷. ریز غده تولید شده در تیمار ۲۵ میلی‌گرم در لیترگرافن اکسید پوترسین دار در شرایط کاهش ۲۵ درصد ازت محیط کشت (سمت چپ) و تیمار گرافن اکسید ۲۵ میلی‌گرم در لیتر بدون تغییر ازت محیط کشت (سمت راست)

Figure 7. microtuber produced in 25 mg / l graphene oxide with putrescine treatment in 25 percent nitrogen reduction (left photo) and 25 mg / l graphene oxide treatment without nitrogen change (right photo)

نتیجه‌گیری: از نتایج به دست آمده این طور استنباط می‌شود که کاهش میزان ازت محیط کشت باعث افزایش میزان ریزغده‌زایی می‌شود و استفاده از گرافن و گرافن اکسید پوترسین‌دار در ریزغده‌زایی موثر است. نتایج این آزمایش نشان داد که محیط کشت حاوی ۲۵ درصد ازت و گرافن اکسید پوترسین‌دار مناسب‌ترین تیمارهای این آزمایش بودند.

سپاسگزاری: از معاونت پژوهشی و کارشناسان آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشگاه تبریز برای اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود. از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری میشود.

References

Anjum NA, Singh N, Singh MKet al. (2014) Single-bilayer graphene oxide sheet impacts and underlying potential mechanism assessment in germinating faba bean (*Vicia faba* L.). Sci Total Environ 472, 834–841.

Cheng F, Liu YF, Lu GY et al. (2016) Graphene oxide modulates root growth of *Brassica napus* L. and regulates ABA and IAA concentration. J Plant Physiol 193, 57–63.

Dobránszky J, Magyar-Tábori K (2004) Effects of tuberization conditions on the microtuber yield and on the proportion of microtuber tissues. Int Hortic Sci 10(4), 91–96.

Geim AK, Novoselov KS (2010) The rise of graphene. Nanosci Nanotechnol: a collection of reviews from nature journals (pp. 11–19). World Scientific.

Gill SS, Tuteja N (2010) Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. Plant Signal Behave 5(1), 26-33.

Giraldo JP, Landry MP, Faltermeier SM et al. (2014) Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing. Nat Mate 13(4), 400-408.

Gogos A, Knauer K, Bucheli TD (2012) Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. J Agric Food Chem 60(39), 9781-9792.

Guo X, Zhao J, Wang R et al. (2021) Effects of graphene oxide on tomato growth in different stages. Plant Physiol Biochem 162, 447–455.

Heidarpour F, Mohammadabadi MR, ISM Zaidul et al. (2011) Use of prebiotics in oral delivery of bioactive compounds: a nanotechnology perspective. Pharmazie 66 (5), 319-324.

Hu X, Lu K, Mu L, Kang J, Zhou Q (2014) Interactions between graphene oxide and plant cells: Regulation of cell morphology, uptake, organelle damage, oxidative effects and metabolic disorders. Carbon 80, 665-676.

Iranbakhsh A, Ebadi M, Zare Z (2011) Effects of nitrogen and potasium on in vitro microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L. var *Agria*). Aust J Basic Appl Sci 5(12), 442–448.

Kakkar RK, Sawhney VK (2002) Polyamine research in plants - A changing perspective. Physiol. Plant 116(3), 281–292.

Khodakovskaya M, Dervishi E, Mahmood M et al. (2009) Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. ACS Nano 3(10), 3221–3227.

Khorsandi S, Motallebi azar A, Zaare nahandi F, Hatami A, Mokhtarzadeh S (2020) Effect of

Different Concentrations of BAP and Putrescine on Potato Microtuberization (cv. Agria). J Indian Inst Sci 10(2), 723–731.

Kim DH, Gopal J, Sivanesan I (2017) Nanomaterials in plant tissue culture: The disclosed and undisclosed. RSC Advances 7(58), 36492–36505.

Li F, Sun C, Li X et al. (2018) The effect of graphene oxide on adventitious root formation and growth in apple. Plant Physiol Biochem 129, 122–129.

Liu Q, Chen B, Wang Q et al. (2009) Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. Nano Lett 9(3), 1007-1010.

Mader JC, Hanke DE (1997) Polyamine sparing may be involved in the prolongation of cell division due to inhibition of phenylpropanoid synthesis in cytokinin-starved soybean cells. J Plant Growth Regul 16(2), 89–93.

Mader JC. (1995). Polyamines in Solanum tuberosum in vitro: free and conjugated polyamines in hormone-induced tuberization. J Plant Physiol 146(1–2), 115–120.

Mohammadabadi MR, El-Tamimy M, Gianello R, Mozafari MR (2009) Supramolecular assemblies of zwitterionic nanoliposome-polynucleotide complexes as gene transfer vectors: Nanolipoplex formulation and in vitro characterisation J Liposome Res 19 (2), 105-115.

Mohammadabadi MR, Mozafari MR (2018) Enhanced efficacy and bioavailability of thymoquinone using nanoliposomal dosage form. J Drug Deliv Sci Technol 47 (1), 445-453.

Mohammadabadi MR, Mozafari MR (2019) Development of nanoliposome-encapsulated thymoquinone: evaluation of loading efficiency and particle characterization. J Biopharm 11 (4), 39-46

Mohapatra PP, Batra VK (2017) Tissue Culture of Potato (*Solanum tuberosum* L.): A Review. Int J Curr Microbiol 6(4), 489–495.

Mortazavi SM, Mohammadabadi MR, Mozafari MR (2005) Applications and in vivo behaviour of lipid vesicles. Nanoliposomes from Fundamentals to Recent Developments. Trafford Publishing, England. 67-76.

Muleta HD, Aga MC (2019) Role of nitrogen on potato production: a review. J Plant Sci 7(2), 36-42.

Ovono PO, Kevers C, Dommes J (2010) Tuber formation and development of Dioscorea cayenensis–Dioscorea rotundata complex in vitro effect of polyamines. In Vitro Cell Dev Biol 46(1), 81–88.

Park S, Kim T, Gwon Y et al. (2019) Graphene-layered eggshell membrane as a flexible and functional scaffold for enhanced proliferation and differentiation of stem cells. Acs Appl. Bio Mater 2(10), 4242-4248.

Saadatian B, kafi M (2015) Study of nutritional role of silicon nano-particles on physiological characteristics of minituber potato production. J Plant Prod Res Vol. 22 (1) 173-189.

Seog K (2000) Investigation of a two process for potato (*Solanum tuberosum* L .) microtuber production.PhD theses, University of Canterbury. Botany.

Smith TA (1985) Polyamines. Annu Rev Plant Physiol 36(1), 117–143.

Tang GX, Zhou WJ, Li HZ et al. (2003) Medium, explant and genotype factors influencing shoot regeneration in oilseed Brassica spp. J Agron Crop Sci 189(5), 351-358.

Tlili I, Hdider C, Lenucci MS et al. (2011) Bio active compounds and antioxidant activities of different watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld) cultivars as affected by fruit sampling area J Food Compos Anal 24(3), 307-314.

Vithanage M, Seneviratne M, Ahmad M, Sarkar B, Ok YS (2017) Contrasting effects of engineered carbon nanotubes on plants: a review. Environ Geochem. Health 39(6), 1421-1439.

Yin L, Wang Z, Wang S, Xu W, Bao H (2018) Effects of graphene oxide and/or Cd2+ on seed germination, seedling growth, and uptake to Cd2+ in solution culture. Water Air Soil Pollut 229(5), 1-12.

Zahia K, Malika RK, Sara, et al. (2020) Interactive effect of genotype and medium on microtuberization of potatoes (L.) grown. Acta Nat Sci 7(1), 8-25.

Zakaria M, Hossain MM, Mian MK et al. (2007) Effect of nitrogen and potassium on in vitro tuberization of potato. Plant Tissue Cult Biotechnol 17(1), 79-85.

Zarrabi A, Alipoor Amro Abadi M, Khorasani S, et al. (2020) Nanoliposomes and Tocosomes as Multifunctional Nanocarriers for the Encapsulation of Nutraceutical and Dietary Molecules. Molecules 25 (3), e638.