مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

اثر فشار اسمزی بر ریزغده زایی درون شیشه ای در سیب زمینی رقم آگریا با کاربرد غلظت های مختلف ساکارز و پلی اتیلن گلایکول

علیرضا مطلبی آذر*[1]، سمانه کاظمیانی نجف آبادی[2]، نسرین اکبری[3]

[1] دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

[2] کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

[3] کارشناس ارشد گروه بهنژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۵/۱۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۱۱

چکیده

اثر پنج غلظت ساکارز و پلی اتیلن گلایکول هر کدام (۰/۰، ۰/۰۵، ۰/۱۱، ۰/۱۷ و ۰/۲۳ مول بر لیتر) بر آغازش، تشکیل و رشد ریزغده بررسی شد. گره های حاصل از شاخساره های درون شیشه ای در محیط کشت MS کشت شدند و در تاریکی مداوم و دمای ۱±۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی داری بین تیمارهای اعمال شده از نظرآغازش و تشکیل ریزغده، همچنین طول، قطر و وزن تر ریز غده ها وجود داشت و ساکارز در فرآیند ریزغده زایی (در کلیه صفات) برتر از پلی اتیلن گلایکول و استفاده از سطوح بالای ساکارز در تشکیل ریزغده در شرایط درون شیشه ای مفید بود. افزایش ساکارز، تعداد ریزغده را بدون اثر منفی روی وزن و اندازه آنها به طور موثری افزایش داد. پلی اتیلن گلایکول بکار برده شده در محیط کشت، منجر به کاهش فرآیند ریزغده زایی (در کلیه صفات) شد. محدودیت ریزغده زایی توسط غلظت های بالای پلی اتیلن گلایکول در نتیجه کاهش جذب آب و مواد غذایی توسط ریزنمونه های گره از محیط کشت بود. از طرف دیگر استفاده از غلظت های بالای پلی اتیلن گلایکول به طور معنی داری بر دورمانسی ریزغده ها به منظور مبادله ژرم پلاسم موثر بود. نتایج این پژوهش می‌تواند به درک بهترمکانیسمهای فیزیولوژیکی مربوط به ریزغده زایی کمک کرده و گامی جهت رسیدن سریع به اهداف اصلاحی باشد.

واژه های کلیدی: *ریزغده زایی، ساکارز، سیب زمینی، پلی اتیلن گلایکول.*

* نویسنده مسئول: علیرضا مطلبی آذر تلفن: ۰۹۱۴۴۰۱۹۶۳۷ Email: motallebiazar@gmail.com

مقدمه

سیب زمینی یکی از مهمترین گیاهان، به منظور دستورزی سلول و بافت گیاهی است (Struik and Wiersema, 1999). در زمینه کشت درون شیشه ای بسیاری از گیاهان مهم زراعی(Kahrizi *et al.*, 2010; Kalantarhormozi *et al.*, 2015) و باغی (Ghotbzadeh Kermani *et al.*, 2015) تحقیقاتی صورت گرفته است. با این حال در سیب زمینی تحقیقات گسترده ای صورت گرفته تا شرایط کشت برای این گیاه استراتژیک، بهینه شود. تولید ریزغده در شرایط درون شیشه ای اولین بار به عنوان ابزار تجربی برای حل مشکلات پاتولوژی در سیب زمینی (Coleman *et at.*, 2001)، توسط کشت گره های منفرد با جوانه های جانبی برای تولید بذر عاری از ویروس در سیب زمینی صورت گرفت (Gopal *et al.*, 1988; 2004). معمولاً در کشت درون شیشه ای، ساکارز با غلظت ۱ تا ۵ درصد استفاده می‌شود زیرا این قند بوسیله گیاه سنتز شده و به صورت طبیعی در گیاه منتقل می‌شود (George, 1993; Karhu, 1997). در پژوهشی مشخص شد که غلظت بهینه ساکارز برای ریزغده زایی ٦۰ تا ۸۰ گرم بر لیتر است (Dodds *et al.*1992). غلظت-های خیلی بالا یا خیلی کمتراز ۸۰ گرم بر لیتر ساکارز، منجر به ریزغده‌زایی کندتر و کمتر و تولید ریزغده‌های کوچکتر را موجب می‌شود. در برخی موارد، کل غلظت ساکارز به کار برده شده در محیط کشت یا بخشی از آن توسط منبع کربن دیگر جایگزین می شود (Ramarosandratana *et al.*, 2001; Rout *et al.*, 2000). جایگزینی منبع کربن محیط کشت توسط محلول های اسموتیک فعال، نشان داد که قند به کار برده شده در محیط کشت به عنوان منبع کربن و تنظیم کننده اسموتیک است در این مورد، بیشتر از محلول دو قند الکلی، مانیتول و سوربیتول، استفاده می‌شود (George, 1993). منابع کربن اسمزی شرکت کننده در محیط کشت، عموماً باعث افزایش القا و به دنبال آن یک کاهش در صفات مورد آزمون می‌شوند. کاهش در صفات مورد آزمون، توسط جزء اسمزی که به صورت افراطی در محیط کشت استفاده شده، یا توسط سمیت ناشی از غلظت های بالای کربوهیدرات ها صورت می گیرد. بنابراین، تیمار با منبع کربن با بهترین پاسخ ریخت زایی (ساکارز) در محیط کشت، به اضافه یک منبع فعال اسمزی (مانند مانیتول، سوربیتول و پلی اتیلن گلایکول) که منجر به کاهش پتانسیل اسمزی در محیط کشت شده، کاهش پاسخ به ریخت زایی را منجر می‌شود (De PaivaNeto, 2003). یک حد بحرانی پایین، برای هر دو نقش منبع کربن، تامین انرژی و هم پتانسیل اسمزی، برای جنین های نابالغ تشکیل شده از جنین های سوماتیکی در آفتابگردان وجود دارد (Jeannin *et al.*, 1995). نوع منبع کربن بر اندام زایی تاثیر چندانی نداشت. جنین زایی سوماتیکی در *Euonymus europaeus* L. توسط منبع کربن

و پتانسیل اسمزی محیط کشت کنترل می‌شود (Biahoua & Bonneau, 1999). اثرات سودمند کاربرد پلی اتیلن گلایکول در بلوغ جنین سوماتیکی *Pinus* گزارش شد (Ramarosandratana *et al.*, 2001). انتخاب منبع کربن بایستی بر اساس گونه های مورد مطالعه صورت بگیرد زیرا در برخی از موارد منبع کربن ممکن است جذب و متابولیزه شود. به عنوان مثال استفاده از سوربیتول در کشت بافت سیب (*Malus domestica Borkh*)، به عنوان یک حلال فعال اسموتیک، منجر به خسارت شد (De PaivaNeto, 2003).

این آزمایش به منظور تعیین نقش دوگانه ساکارز (نقش تغذیه‌ای و تولید کننده فشار اسمزی محیط کشت) بر ریزغده‌زای درون شیشه-ای سیب زمینی انجام شد. برای این منظور در این مطالعه اثر غلظت های مختلف ساکارز و پلی اتیلن گلایکول تحت شرایط استاندارد برریزغده زایی درون شیشه ای مورد بررسی قرار گرفت. بررسی اخیر همچنین تاثیر ساکارز را، به عنوان منبع تغذیه ای در درجه اول و منبع اسموتیکوم برای ریزغده زایی در ارتباط با منبع تنش زای پلی اتیلن گلایکول بیان می کند.

مواد و روش ها

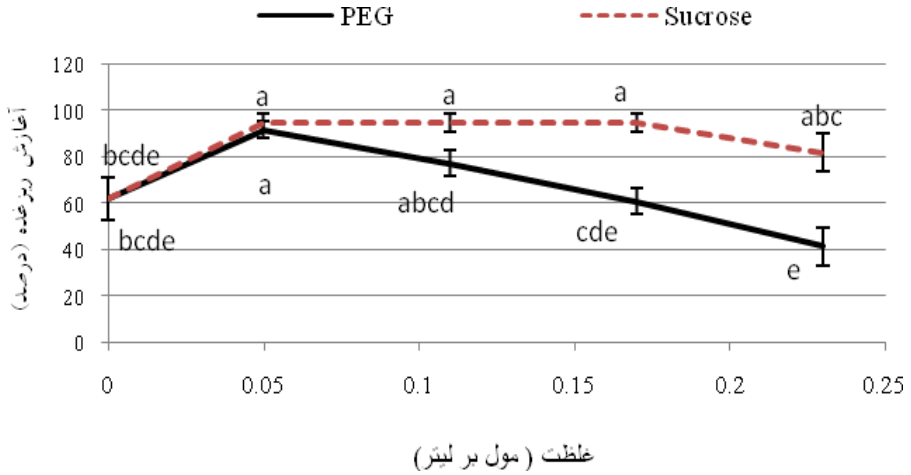
جوانه های جانبی از شاخساره های درون شیشه ای سیب زمینی رقم آگریا عاری از ویروس جدا و سپس به محیط های کشت MS شامل دو نوع منبع اسموتیکوم ساکاروز و پلی اتیلن گلایکول در ۵ غلظت انتقال داده شدند. ۵ تیمار شامل (۰/۰، ۰/۰۵، ۰/۱۱، ۰/۱۷ و ۰/۲۳ مول بر لیتر) ساکارز و پلی اتیلن گلایکول۶۰۰۰ مخلوط شده با ۸۰ گرم بر لیتر ساکارز بود. ۵ جوانه جانبی در هر پتری دیش کشت شد. پتری دیش ها با پارافیلم بسته و در تاریکی مداوم و در دمای ۱±۲۰ درجه سانتیگراد در اتاق رشد قرار گرفتند. پس از ۳۰ روز، داده ها برای تعداد ریزغده آغازش یافته در هر پتری دیش (متورم شدن سلول‌ها در محل گره، اندازه کم تر از ۳ میلیمتر)، تعداد ریزغده تشکیل شده (اندازه بزرگ تر از ۳ میلیمتر)، وزن تر ریزغده (میلی گرم)، طول و قطر (میلیمتر)، تعداد چشم روی ریزغده و چشم جوانه زده ثبت شد. آزمایش با دو تیمار ساکارز و با دو تیمار ساکارز و پلی اتیلن گلایکول۶۰۰۰ در ۵ غلظت به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار انجام شد. اطلاعات به دست آمده از این مطالعه با SPSS16 آنالیز شد. مقایسات میانگین ها با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی ۵ غلظت مختلف پلی اتیلن گلایکول و ساکارز روی درصد آغازش، درصد تشکیل ریزغده، طول، قطر ریزغده، وزن تر، تعداد چشم ریزغده و جوانه‌زنی چشم ها نشان داد که کلیه صفات در سطوح مختلف پلی اتیلن گلایکول نسبت به ساکارز در سطح پائین‌تر قرار داشت.

جدول تجزیه واریانس نشان داد که درصد آغازش ریزغده به طور معنی داری تحت تاثیر غلظت های مختلف ساکارز وپلی اتیلن گلایکول قرار گرفت (p<۰/۰۱). حداکثر درصد آغازش ریزغده زمانی مشاهده شد که محیط کشت MS حاوی غلظت های بالای ساکارز بود. درصد آغازش ریزغده با افزایش درصد ساکارز در محیط کشت (۰/۲۳ مول بر لیتر) با افزایش فشار اسمزی در محیط کشت حاوی ۰/۲۳ مول بر لیتر ساکارز، ریزغده زایی نسبت به دیگر غلظتها کندتر صورت گرفته ولی معنی دار نمی‌باشد.

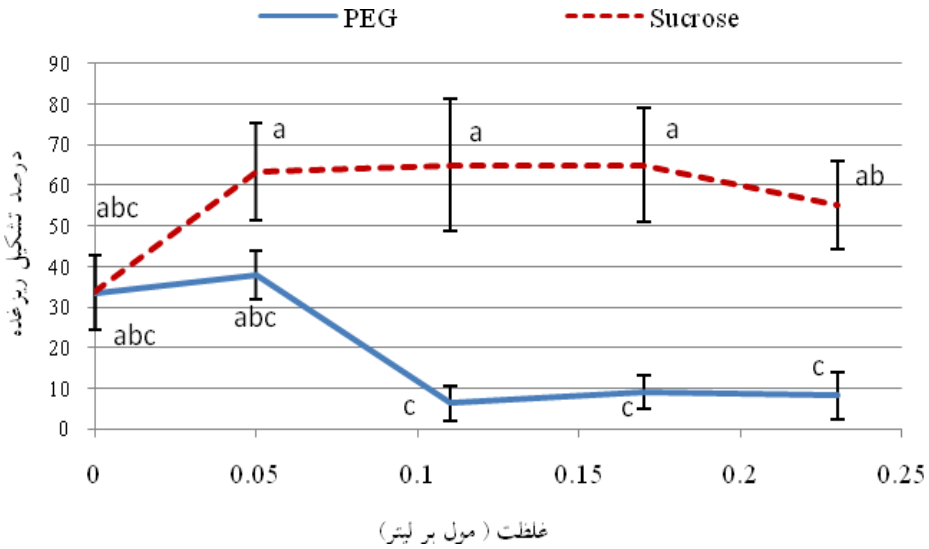
درصد آغازش ریزغده با اضافه کردن پلی اتیلن گلایکول از ۰/۰۵ تا ۰/۲۳ مول بر لیتر به طور معنی داری کاهش یافت، اما در غلظت صفر تا ۰/۰۵ فشار اسمزی در محیط کشت در حدی نبوده که در فرآیند آغازش ریز غده اثر گذار باشد یا به عبارت دیگر فشار اسمزی ایجادی در محدوده‌ای تحمل ریز غده بوده (شکل ۱).



شکل ۱- درصد آغازش ریزغده در غلظت های مختلف ساکارز و پلی اتیلن گلایکول.

Figure 1- Percentage of microtuber initiation in different concentrations of sucrose and PEG.

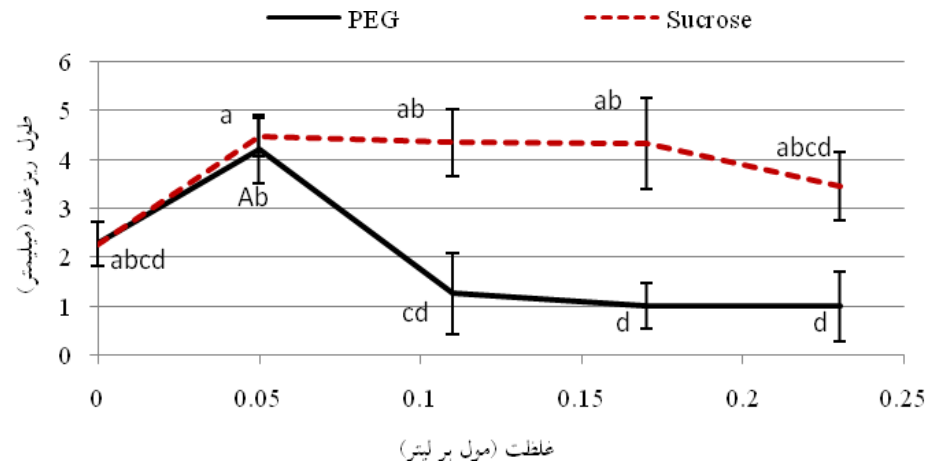
جدول تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی داری بین غلظت های مختلف ساکارز و پلی اتیلن گلایکول از نظر درصد تشکیل ریزغده وجود دارد (p<۰/۰۱) در محیط کشت حاوی غلظت های بالای ساکارز، درصد تشکیل ریزغده حداکثر بود. با افزایش غلظت پلی اتیلن گلایکول بالاتر از حد تحمل گیاه، درصد تشکیل ریزغده به طور معنی داری کاهش یافت. بنابراین کاربرد پلی اتیلن گلایکول در محیط کشت به منظور ریزغده زایی بایستی با احتیاط صورت بگیرد به طوری که مشاهده شد با وجود نزدیکی درصد آغازش ریزغده در غلظت ۰/۰۵ مول بر لیتر ساکارز و پلی اتیلن گلایکول ، درصد تشکیل ریزغده در این غلظت در تیمار ساکارز بالاتر از پلی اتیلن گلایکول بود (شکل ۲).



شکل۲- درصد تشکیل ریزغده در غلظت های مختلف ساکارز و پلی اتیلن گلایکول.

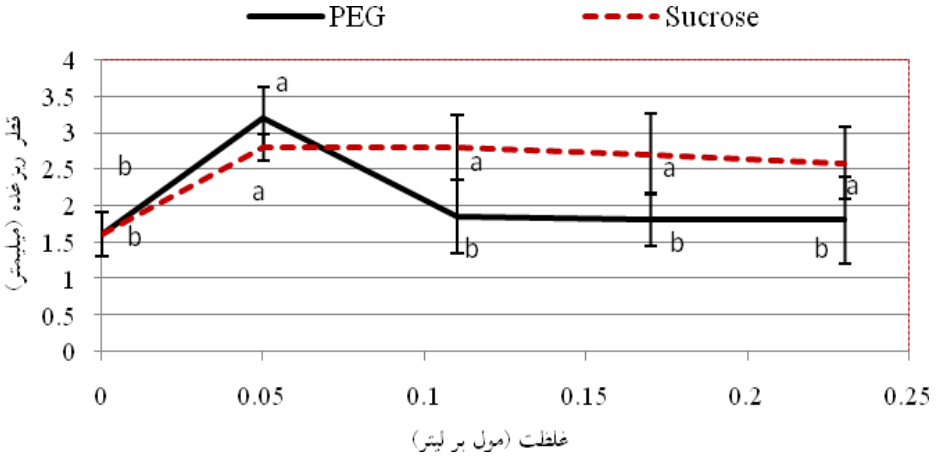
Figure 2- Percentage of microtuber formation in different concentrations of sucrose and PEG.

جدول تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی داری بین غلظت های مختلف ساکارز و پلی اتیلن گلایکول از نظر طول و قطر ریزغده وجود داشت ($p<۰/۰۱$). در محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلف ساکارز، حداکثر طول و قطر ریزغده زمانی تولید شد که ساکارز در غلظت های ۰/۰۵، ۰/۱۱ و ۰/۱۷ مول بر لیتر به محیط کشت اضافه شد. در سطوح بالاتر ساکارز (۰/۲۳ مول بر لیتر) اسمولاریته محیط کشت افزایش یافت و ریزنمونه ها تحت تنش قرار گرفتند در نتیجه این تنش، اندازه ریزغده به طور معنی داری کاهش یافت. طول و قطر ریزغده در غلظت ۰/۰۵ مول بر لیتر پلی اتیلن گلایکول افزایش نشان داد. با اضافه کردن مقادیر بیشتر پلی اتیلن گلایکول به محیط کشت (بالای ۰/۰۵ مول بر لیتر) طول و قطر ریزغده ها به طور معنی داری کاهش یافت. شایان ذکر است که اختلاف مشاهده شده در اندازه قطر بین پلی اتیلن گلایکول و ساکارز کمتر از اختلاف مشاهده شده در طول ریزغده‌ها بود(شکل ۳ و ٤).



شکل۳- میانگین طول ریزغده در غلظت های مختلف ساکارز و پلی اتیلن گلایکول.

Figure 3- Mean of microtuber length in different concentrations of sucrose and PEG.



شکل٤- میانگین قطر ریزغده در غلظت های مختلف ساکارز و پلی اتیلن گلایکول.

Figure 4- Mean of microtuber diameter in different concentrations of sucrose and PEG.

جدول تجزیه واریانس نشان داد که وزن تر ریزغده به طور معنی داری تحت تاثیر غلظت های مختلف ساکارز و پلی اتیلن گلایکول قرار گرفت ($p<۰/۰۵$). افزایش غلظت ساکارز در محیط کشت، وزن تر ریزغده ها را به طور غیر معنی داری افزایش داد. بنابراین افزایش درصد تشکیل ریزغده، اندازه و وزن ریزغده ها را نیز افزایش داد که این امر نشان داد با افزایش غلظت ساکارز، به طور موثر تولید ریزغده درون شیشه ای بدون اثرات جانبی منفی افزایش می یابد. وزن تر ریزغده با افزایش پلی اتیلن گلایکول در محیط کشت ریزغده زایی به طور معنی داری کاهش یافت (شکل ۵).

جدول تجزیه واریانس نشان داد که تعداد چشم و جوانه زنی چشم ها روی ریزغده به طور معنی داری تحت تاثیر غلظت های مختلف

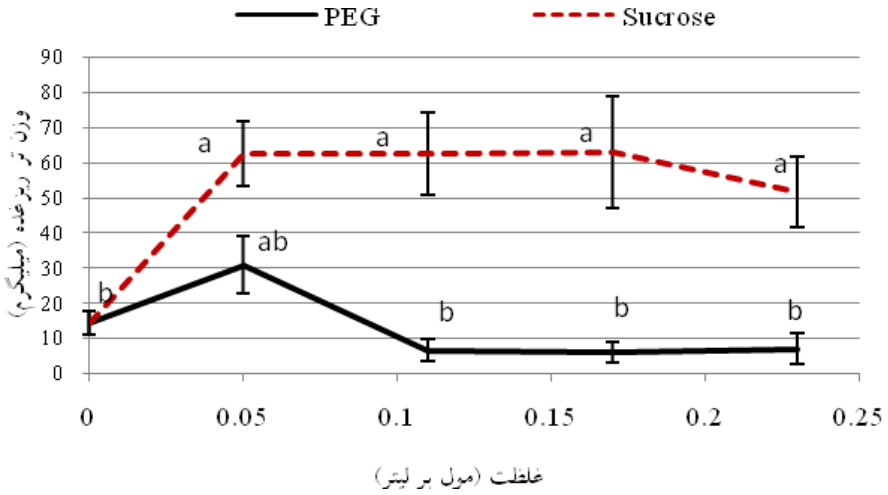
ساکارز وپلی اتیلن گلایکول قرار گرفت (p<۰/۰۱). محیط های کشت حاوی غلظت های بالای ساکارز، از تعداد چشم بیشتری روی ریزغده برخوردار بودند. از طرف دیگر، زمانی که غلظت پلی اتیلن گلایکول ۰/۰۵ مول بر لیتر بود، تعداد چشم افزایش یافت در حالی که با افزایش مقادیر بیشتر پلی اتیلن گلایکول به محیط کشت (بالای ۰/۰۵ مول بر لیتر) تعداد چشم به طور معنی داری کاهش یافت. از آنجایی که افزایش تعداد چشم منجر به افزایش عملکرد در مزرعه می گردد بنابراین به طور کلی تیمارهای ساکارز برتر از پلی اتیلن گلایکول بودند (شکل ٦).

جوانه زنی چشم ها، با کشت قطعات گره در غلظت های بالای ساکارز وپلی اتیلن گلایکول به طور معنی داری کاهش نشان داد. جوانه زنی چشم ها در غلظت ۰/۰۵ مول بر لیتر ساکارز افزایش نشان داد و با افزایش بیشتر ساکارز در محیط کشت غذایی (بالای ۰/۰۵ مول بر لیتر) جوانه زنی چشم ها به طور معنی داری کاهش یافت. با افزایش پلی اتیلن گلایکول در محیط کشت غذایی، جوانه زنی چشم ها به طور معنی داری کاهش یافت و این می‌تواند ناشی از اثر منفی پلی اتیلن گلایکول روی قدرت جذب آب و کاهش شدید پتانسیل آب و ایجاد پتانسیل منفی در محیط کشت غذایی باشد که منجر به القا تنش در محیط کشت شد (شکل ۷). با توجه به اینکه عدم جوانه زنی چشم ها و کاهش رشد آنها یک فاکتور بسیار مهم در انبارداری ریزغده ها می باشد زیرا ریزغده به عنوان منبع ژرم پلاسم، انبارداری و حمل و نقل آن بسیار حائز اهمیت می باشد، بنابراین افزایش فشار اسمزی و تنش اعمال شده توسط غلظت های بالای منابع اسموتیکوم و تغذیه در حفظ دورمانسی ریزغده‌ها موثر بود.

نتایج نشان داد که کلیه صفات مورد بررسی در سطوح مختلف پلی اتیلن گلایکول نسبت به ساکارز در سطح پائین‌تری بود، در واقع غلظت پلی اتیلن گلایکول، خاصیت سمی آن و عدم توان جذب آب و مواد غذایی، منجر به عدم تقسیم سلولی و رشد سلول ها در ناحیه گره شده و نتیجتاً ریزغده‌ای در محل گره تشکیل نشده یا با وجود آغازش ریزغده، تنش وارده به حدی بالا بوده که سلول ها قادر به تقسیمات طولی و عرضی نبوده و عدم تشکیل ریز غده منجر به شروع به رشد شاخساره گردید. البته شاخساره های رشد یافته از محل گره در مقایسه با تیمار ساکارز از توان رشدی کمتری برخوردار بودند که دلیل آن شاید تنش ایجاد شده باشد.

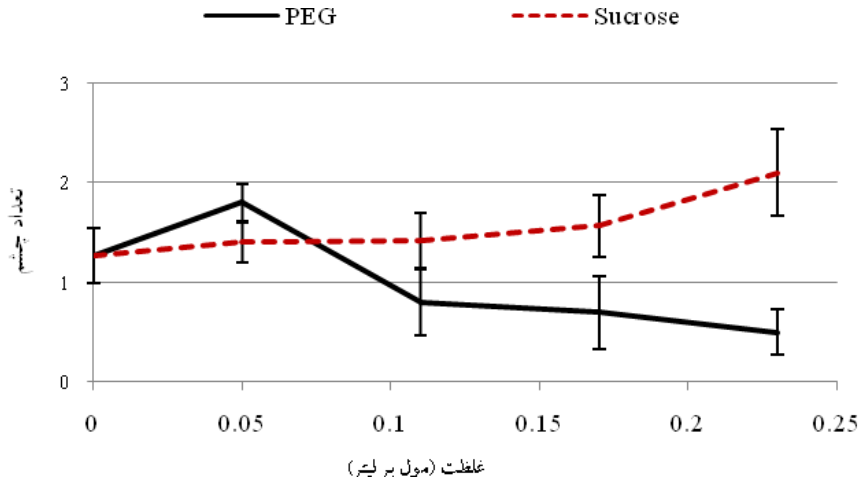
یافته‌های ما نشان داد که درصد آغازش ریزغده در هر دو نوع تیمار (ساکارز و پلی اتیلن گلایکول) در غلظت‌های بالا کاهش داشت.کاهش درصد آغازش ریزغده با افزایش درصد ساکارز در محیط کشت (۰/۲۳ مول بر لیتر) را می‌توان به دلیل افزایش فشار اسمزی در محیط کشت حاوی ۰/۲۳ مول بر لیتر ساکارز دانست، که منجر به ریزغده زایی کندتر گردید از آنجا که طبق منابع، نوع منبع کربن روی آغازش اندام تاثیر چندانی ندارد (Biahoua and Bonneau, 1999)، بنابراین

آغازش در کلیه تیمار ها مناسب بود. در اکثر گزارشات حداکثر ساکارز مورد استفاده برای ریزغده زایی ۸۰ یا ۹۰ گرم بر لیتر با بکارگیری هورمون‌ها بوده (Seabrook *et al.*, 2004; Hussain *et al.*, 2006; Khuri & Moorby, 1996) ما در این بررسی بدون استفاده از تنظیم کننده‌های رشدی موفق به تولید ریزغده در حد مطلوب شدیم.



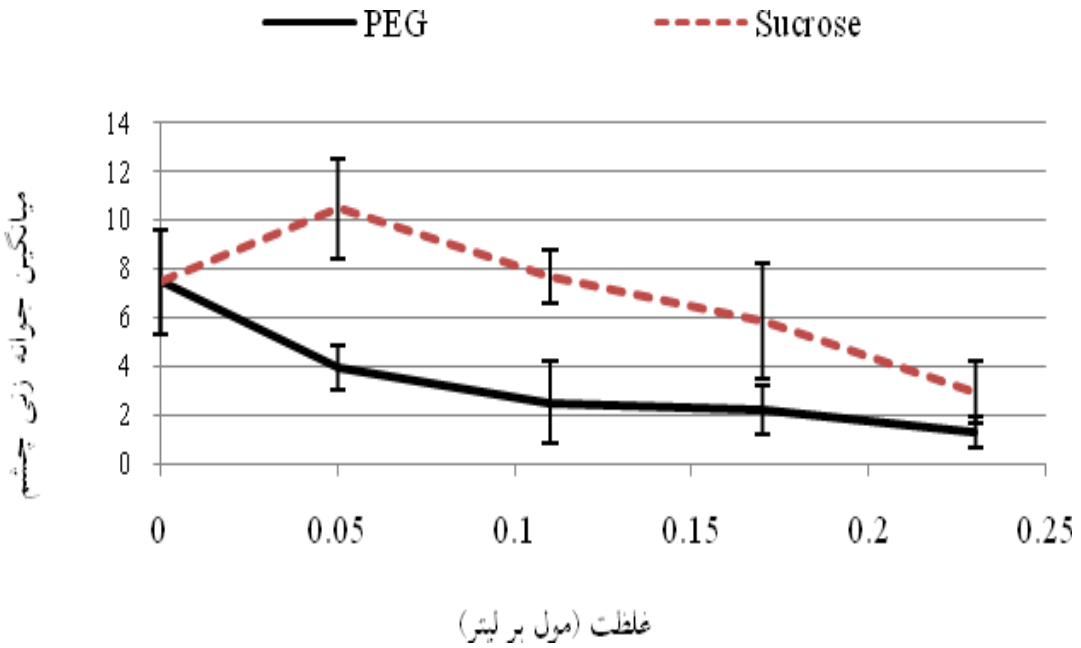
شکل۵- میانگین وزن تر ریزغده در غلظت های مختلف ساکارز و پلی اتیلن گلایکول.

Figure 5- Mean of microtuber fresh weight in different concentrations of sucrose and PEG.



شکل٦- میانگین تعداد چشم ریزغده در غلظت های مختلف ساکارز و پلی اتیلن گلایکول.

Figure 6- Mean of microtuber eye number in different concentrations of sucrose and PEG.



شکل۷- میانگین جوانه زنی چشم ریزغده در غلظت های مختلف ساکارز و پلی اتیلن گلایکول.

Figure 7- Mean of microtuber eye sprouting in different concentrations of sucrose and PEG

با توجه به عدم استفاده سلولهای گیاهی از پلی اتیلن گلایکول، فشار اسمزی ایجاد شده توسط پلی اتیلن گلایکول، در طی انجام آزمایش ثابت باقی خواهد ماند این در حالی است که ساکارز در طی انجام آزمایش بتدریج جذب سلولهای گیاهی شده و در طی این مدت بتدریج از فشار اسمزی حاصل از اضافه کردن ساکارز کاسته می‌شود. به طوری که با وجود مشاهده نزدیکی درصد آغازش ریزغده در غلظت ۰/۰۵ مول بر لیتر ساکارز و پلی اتیلن گلایکول، درصد تشکیل ریزغده در این غلظت در تیمار ساکارز بالاتر از پلی اتیلن گلایکول بود و این به روشنی بیان می‌کند هر چند درصد آغازش در ۰/۰۵ مول بر لیتر دو تیمار تقریباً به هم نزدیک بوده ولی فشار اسمزی حاصل از پلی اتیلن گلایکول و عدم توان جذب آب و مواد غذایی و در نهایت تنش حاصل از پلی اتیلن گلایکول روی فرآیندهای فیزیولوژیکی منتهی به رشد، اثر منفی اعمال کرده و از افزایش توان فتوسنتزی و ذخیره مواد در ریزغده‌های آغازش یافته کاسته و در نتیجه درصد تشکیل ریزغده شدیداً کاهش یافت. حضور غلظت های بالای پلی اتیلن گلایکول در محیط کشت منجر به کاهش فشار اسمزی و افزایش تنش شده که در نهایت تشکیل ریزغده را کاهش می دهد. محدودیت تشکیل ریزغده توسط غلظت های بالای منبع اسموتیکوم موجود در محیط کشت منجر به کاهش جذب آب و مواد مغذی از محیط کشت شد. بنابراین پلی اتیلن گلایکول بیشتر از ساکارز در غلظت های بالا در محدود کردن ریزغده زایی موثر بود. با توجه به اینکه تا

کنون گزارشی در مورد اضافه کردن پلی اتیلن گلایکول به محیط کشت ریزغده زایی وجود ندارد، این یافته ها می تواند برای محققین مفید واقع شود. مشخص شده است که با افزایش غلظت قند در محیط کشت، رشد و نمو زیاد می-شود و با رسیدن به یک حد بهینه، در غلظت های بالاتر از آن بتدریج کاسته می‌شود (Bagheri and Saffari, 2003). مفید بودن ساکارز در ریزغده زایی توسط سایر دانشمندان نیز گزارش شده است، این محققین نشان دادند که با جایگزین کردن ۸۰ گرم بر لیتر گلوکز و فروکتوز (معادل ۸۰ گرم بر لیتر ساکارز) ریزغده های کوچکی تولید شد که دلیل آن نامساعد بودن اسمولاریته محیط کشت بود (Yu *et al.*, 2000).

تفاوت های مشاهده شده بین ساکارز و پلی اتیلن گلایکول در اندازه ریزغده‌ها را می‌توان توسط عدم رشد توجیه کرد. با توجه به اینکه رشد در نتیجه تقسیم سلولی و افزایش اندازه سلولها حاصل می‌گردد با کمبود آب و مواد غذایی حاصل از تنش ناشی از افزایش فشار اسمزی محیط کشت، روند تقسیم سلولی کاهش می‌یابد ولی متوقف نمی‌شود اما سلولهای حاصل توان رشدی ندارند زیرا رشد سلول در نتیجه افزایش حجم آنها بوده که ناشی از جذب آب و مواد غذایی می باشد با وجود اینکه ساکارز به عنوان یک ماده اسموتیک در غلظت های بالا عمل می‌کند و توان جذب آب توسط گیاه را کاهش می‌دهد ولی به دلیل اینکه یک ماده غذایی مناسب و موثر در رشد گیاه است باعث افزایش فرآیندهای فیزیولوژی منتهی به رشد سلول گردیده و در نتیجه باعث ایجاد ریزغده می‌گردد ولی در تیمار پلی اتیلن گلایکول با وجود اینکه تقسیم سلولی در ریزغده‌ها صورت می‌گیرد ولی افزایش حجم و اندازه در آنها به دلیل عدم جذب آب و موادغذایی ایجاد نمی‌گردد. گزارشات نشان داد که هیدرولیز سریع ساکارز در طول رشد ریزغده منجر به افزایش اندازه ریزغده می شود (Yu *et al.*, 2000).

از آنجا که ریزغده تشکیل شده حاصل تقسیم متوالی سلولها و حجیم شدن آنهاست و با توجه به اینکه وزن‌تر ریزغده نیز معیاری از میزان رشد و توان فتوسنتزی و شرایط مناسب رشدی است، مقایسه وزن تر ریزغده تحت تیمار پلی اتیلن گلایکول و ساکارز نیز معیاری مناسب در بررسی میزان اثرگذاری پلی اتیلن گلایکول و ساکارز بر توان جذب آب و اعمال تنش حاصل از کاهش بیش از حد پتانسیل اسمزی بود. چنانچه مشاهده شد وزن تر ریزغده در تیمار پلی اتیلن گلایکول کمتر از ساکارز بود. اختلاف در وزن‌تر را می توان اینگونه توجیه کرد اولاً از آنجا که آب عامل اصلی جذب مواد توسط گیاه است هر عاملی که باعث کاهش پتانسیل آب گردد مانند عوامل اسمزی باعث می‌گردد که امکان جذب آب و مواد مغذی توسط گیاه کاهش و گاه به صفر برسد و این بر توان رشدی و فتوسنتزی گیاه اثر منفی خواهد داشت با توجه به افزایش میزان وزن تر در ساکارز نسبت به پلی اتیلن گلایکول می توان گفت که چون ساکارز ماده

غذایی به شمار می‌آید و پلی اتیلن گلایکول یک ماده غذایی بشمار نیامده و در ضمن خاصیت سمی نیز دارد در نتیجه در محیط کشت حاوی ساکارز نسبت به پلی اتیلن گلایکول وزن تر بیشتر بود. استفاده از سوربیتول در کشت بافت سیب به عنوان یک حلال فعال اسموتیک منجر به آسیب می شود (De PaivaNeto, 2003)، نتایج ما نشان داد که اگر چه پلی اتیلن گلایکول مانند سوربیتول به عنوان یک حلال اسموتیک می باشد، بکارگیری آن در کشت بافت سیب زمینی فقط منجر به کاهش در عملکرد ریزغده می شود. وزن ریزغده های Zantedeschia در محیط کشت دارای ١٦ و ٣٢ گرم بر لیتر مانیتول (معادل ٣٠ و ٦٠ گرم بر لیتر ساکارز) به ترتیب ۰/۵۱ و ۰/۵۵ بود و در ٤٨ گرم بر لیتر مانیتول (معادل۹۰ گرم بر لیتر ساکارز) ۰/۲۱ گرم بود (Kubo *et al.*, 2005).

نتایج این بررسی نشان داد که محیط های کشت حاوی غلظت های بالای ساکارز، از تعداد چشم بیشتری روی ریزغده برخوردار بودند. افزایش تعداد چشم روی ریزغده، منجر به افزایش عملکرد ریزغده در محصول می شود (Gopal *et al.*, 1997) زیرا از این طریق پتانسیل عملکرد افزایش می‌یابد، بنابراین تیمارهای ساکارز برتر از پلی اتیلن گلایکول می باشند. جوانه زنی چشم ها، با کشت قطعات گره در غلظت های بالای ساکارز و پلی اتیلن گلایکول به طور معنی داری کاهش نشان داد. با افزایش پلی اتیلن گلایکول در محیط کشت غذایی، جوانه زنی چشم ها به طور معنی داری کاهش یافت و این می‌تواند ناشی از اثر منفی پلی اتیلن گلایکول روی قدرت جذب آب و کاهش شدید پتانسیل آب و ایجاد پتانسیل منفی در محیط کشت غذایی باشد که منجر به القا تنش در محیط کشت شد. عدم رشد چشم در شرایط درون شیشه ای فاکتور مهمی می باشد زیرا اگر از ریزغده به عنوان منبع ژرم پلاسم یا برای حمل و نقل و نگهداری استفاده شود عدم رشد آن یک فاکتور مثبت است. پلی اتیلن گلایکول به عنوان یک منبع اسموتیکوم مانع رشد چشم گردید.

بررسی حاضر نشان داد که ریزغده زایی ارتباط نزدیکی با نسبت منبع تغذیه به فشار اسمزی دارد. افزایش منبع تغذیه اثرات منفی فشار اسمزی بر ریزغده زایی را کاهش داد. نتایج ما نشان داد که کاربرد خارجی ساکارز تولید ریزغده را بدون اثرات جانبی منفی افزایش داد. همچنین برای مبادلات ژرم پلاسم، ریزغده ها بایستی در محیط کشت حاوی غلظت های بالای ساکارز و با غلظت مناسب یک ماده اسموتیکوم تولید شوند. مطالعه حاضر شاید اولین بررسی اثرات ساکارز و پلی اتیلن گلایکول بر تولید ریزغده روی مهم ترین رقم تجاری- اقتصادی ایران، آگریا است.

منابع

Bagheri A, Saffari M (2003). *In vitro* culture of higher plants. Ferdowsi University Press (In Farsi).

Biahoua A, Bonneau L (1999). Control of *in vitro* somatic embryogenesis of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium. Plant Cell Reports 19: 185–190.

Coleman WK, Donnelly DJ, Coleman SE (2001). Potato microtubers as research tools: A Review. American Journal of Potato Research 78: 47-55.

De PaivaNeto V, Otoni WC (2003). Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? Scientia Horticulturae 2: 193-202.

Dodds JH, Silva-Rodriguez D, Tovar P (1992). Micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). In: Bajaj YSP (Eds). Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 19: high-tech and micropropagation ш. Springer, Berlin Heidelberg New York 91-106.

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

Ghotbzadeh Kermani S, Pourseyedi Sh, Mohamadi GhA, Moieni A, Baghizadeh A (2015). Regeneration of White top (Cardaria draba L.) using Tissue Culture. Journal of Agriculture Biotechnology 7: 133-154 (In Farsi).

Gopal J, Chamail A, Sarkar D (2004). *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: Effect of genotype, abscisic acid and sucrose. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. 40: 485-490.

Gopal J, Minocha JL, Dhaliwal HS (1998). Microuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Cell Reports 16: 794-798.

Gopal J, Minocha JL, Sidhu JS (1997). Comparative performance of potato crops raised from microtubers induced in dark versus microtubers induced in light. Potato Research 40: 407-412.

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

Jeannin G, Bronner R, Hahne G (1995). Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated *in vitro*: role of the sugar. Plant Cell Reports 15: 200–204.

Kahrizi D, Salmanian A, Zebarjadi AR (2010). Effect of cultivar and density of cultured cotyledons on shoot regeneration in rapeseed (Brassica napus L.). Journal of Agriculture Biotechnology 9: 1-6 (In Farsi).

Kalantarhormozi S, Siahpoosh MR, Rajabi Memari H, Hamdi H, Shomeili M, Hamoudi J (2015). Regeneration of two commercial sugarcane cultivars (CP48-103 and CP69-1062) from terminal leaves derived explants. Journal of Agriculture Biotechnology 7: 155-174 (In Farsi).

Karhu ST (1997). Sugar use in relation to shoot induction by sorbitol and cytokinin in apple. Journal of American Society of Horticultural Science 122: 476–480.

Khuri S,Moorby J (1996) Nodal segments or microtubers as explants for *in vitro* microtuber production of potato. Plant Cell Tissue and Organ Culture 45: 215-222.

Kubo T, Mori G, Oda M (2005). Factors affecting the formation and growth of microtubers in Zantedeschia plantlets. Journal of Japan Society of Horticultural Science 74: 47-50.

Ramarosandratana A, Harvengt L, Bouvet A, Galvayrac R, Paques M (2001). Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellanfum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant 37: 29-34.

Rout GR, Samantaray S, Das P (2000). *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. Biotechnology Advance 18: 91–120.

Seabrook JEA, Douglass LK, Arnold DA (2004). Effect of leaves on microtubers produced from potato single-node cutting *in vitro*. American Journal of Potato Research 81:1-5.

Struik PC, Wiersema SG (1999). Seed Potato Technology. Wageningen Press Wageningen Netherlands.

Yu WC, Joyce PJ, Cameron DC, McCown BH (2000). Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. Plant Cell Reports 19:407-413.

Effect of Osmotic Pressure on *In vitro* Microtuberization of Potato cv. Agria in Different Concentrations of Sucrose and PEG

Motallebi-Azar A.[1],* , Kazemiani Najafabadi S.[2], Akbari N.[3]

[1] Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran.
[2] MSc, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran.
[1] BSc, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran.

Abstract

In order to evaluate the effects of five concentrations of sucrose and PEG (0.0, 0.05, 0.11,0.17 and 0.23 mol.l^{-1}) on microtubers initiation, formation and growth, a factorial experiment based on completely randomized design with five replications was carried out. Nodes from*in vitro* potato shoots were cultured for microtuberization in MS medium and incubated in constant darkness in growth room at 20 ±1^{o}C. Analysis of variance revealed significant differences among treatments for initiation and formation of microtubers, as well as microtuber length, diameter and fresh weight. Sucrose was more effective than PEG on microtuberization process (all traits).Thus; it was show that application of high levels of sucrose was very useful in microtuberization. Increasing of sucrose concentrations efficiently improved *in vitro* microtubers number without negative side effects on fresh weight and size. PEG led to a decrease in microtuberization (all traits). High concentrations of PEG restricted microtuberization due to reduce water and nutrients uptake by node explants from medium. On the other hand the use of high concentrations of osmotic material was significantly effective on microtubers dormancy which is useful in germplasm exchange. Results of study like the one presented here, could be very useful in better understanding of physiological mechanisms involved in microtuberization process and useful in approaching breeding objectives as well.

Key words: *microtuberization, PEG, Sucrose, Solanum tuberosum*.

* Corresponding Author: Motallebi-Azar A. Tel: 09144019637 Email: motallebiazar@gmail.com