Journal of Vegetables Sciences, Autumn & Winter 2023, Vol 6, No 12(2), Pages 73-84

doi: 10.22034/iuvs.2022.562669.1236 Article Type: Research Online ISSN: 2676-4822

The Role of Thermal Stress on *In Vitro* Potato Microtuber Induction

Naser Askari[1*], Reza Ghahremani[2], Afarideh Raisi[3], Mohammad Sadat Hosseini[1], Bahareh Parsa Motlagh[4]

1- Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran.
2- M.Sc. Graduate, Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran.
3- M.Sc. Student, Department of Agronomy and Plant breeding, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran.
4- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant breeding, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran.

[*]**Corresponding author:** na.askari@yahoo.com

(**Received:** 26 September 2022 **Revised:** 10 November 2022 **Accepted:** 30 November 2022)

Extended Abstract

1. Introduction: Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the main crops for food security in the world. This plant has a cultivated area of more than 16 million hectares and a production of 360 million tons per year. This plant is propagated sexually (true potato seeds (TPS)), and asexually (tuber formation), but for commercial purposes mainly seed tubers are used. Mini tubers are used to prevent diseases and pests and increase product yield. Recently, microtuber is widely used as starting material for the propagation of potato due to its privileges including germplasm conservation, high storage potency, unseasonal production, decontaminated propagation, easier acclimatization and handling, rapid and economical multiplication procedure, and maximum yield productivity. Several factors affect potato microtuber growth, which can be mentioned as light quality, sucrose, genotype, plant growth regulators, explant type, gelling agent, and nutrition. The positive efficacy of controlled stressful conditions on enhancement efficiency of in vitro geophyte production was reported. According to crucial effect of temperature on tuberization, the purpose of this research is to investigate the role of thermal stresses (heat and cold) on microtuber induction under in vitro circumstances.

2. Materials and Methods: A single node of a greenhouse-grown stem was used as an explant for this experiment. We used 'Sante' cultivar as a model plant in this experiment. This research has three phase including explant preparation, plantlet multiplication and temperature stress pretreatments to induce microtuberization. Explants were disinfected with sodium hypochlorite 1% with 1 ml Tween® for 20 min. For multiplication phase, explants were cultured in MS medium contained 30 gr/l sucrose and 7 gr/l agar. Also, plantlets were cultured in MS medium with 80 gr/l sucrose for microtuberization phase. Explants were placed at several cold conditions (1, and 4 ºC) in three duration (4, 8, 12 h) and also hot circumstances (25, 40, 45, and 50 ºC) with different duration (0.5, 1, 2 h) in contrast to control treatment (25 ºC). The explants were placed under long photoperiod (16:8 hours) with fluorescent light (PAR = 750 s-1 m-2). Following 60 days, explant fresh and dry weight, explant diameter, microtuber diameter, microtuber fresh and dry weight, biomass, microtuber fresh weight per glass, microtuber number per glass, tuberization degree, and tuberization percentage were recorded.

3. Results and Discussion: The results illustrated that explant fresh weight and explant diameter increased in response to heat stress compared to control treatment. Based on our results, the highest explant fresh (58.4 gr) and dry weight (33.3 gr) was observed in 50 ºC (0.5 h) and 4 ºC (12 h), respectively. Furthermore, explant grown under 45 ºC for 2 hours had the greatest explant diameter (1.46 mm) in contrast to the rest. The most tuber diameter was observed in explants placed under 4 ºC for 8 h with 3.6 mm. Explants treated with 4 ºC for 8 h had the uppermost fresh weight and dry weight of microtuber with 45.3 gr and 9.5 gr, respectively. In biomass trait, the lowest amount was related to the control treatment, which indicates the significant effect of stress on improving biomass. Among the stress treatments, explant 1 °C for 12 h had the greatest effect in increasing biomass. In microtuber fresh weight per glass, 1 °C for 8 h treatment had the maximum effect with 160 gr. Also, hot treatment had a positive effect on tuberization degree. The most tuberization degree (4) was fond in explants treated with 50 for 2 h. Furthermore, in cold conditions, explants showed the highest number of microtuber induction. Also, the explants under 4 °C for 4 hours significantly increased the number of microtuber compared to the rest. According to results, cold treatment was more effective than heat stress in the tuberization percentage. The explants grown under 4 °C for 8 hours had the most tuberization percentage with 100%.

4. Conclusion: In general, stressors has a key role on microtuberization of potato compared to control condition. Among stress treatments, cold stresses have the most efficacy on in vitro microtuberization (number and fresh weight and dry weight of microtuber) and biomass of potato. In contrast, high temperature ameliorated tuberization degree, tuber diameter and also prevented microtuber growth. Altogether, 4°C for 8 hours as the best treatment can be recommend for industrial purpose.

Keywords: Abiotic stress, Cold, Heat, *In vitro* growth, Micro-tuber, Micropropagation.

Citation: Askari, N., Ghahramani, R., Reisi, A., Sadat-Hosseini, M. & Parsa Motlagh, B. (2023). The role of thermal stress on in vitro potato micromicrotuber induction. *Journal of Vegetables Sciences*, 6(2), 73-84. doi: 10.22034/iuvs.2022.562669.1236.

Copyrights:
Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted to Journal of Vegetables Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/ by/4.0).

دوفصلنامه علمی علوم سبزی‌ها، سال ۶، دوره ۱۲، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱، صفحات ۸۴-۷۳

شاپا الکترونیکی: ۴۸۲۲-۲۶۷۶ نوع مقاله: پژوهشی doi: 10.22034/iuvs.2022.562669.1236

نقش تنش دمایی در القای درون شیشه‌ای ریز غده سیب‌زمینی

ناصر عسکری[1*]، رضا قهرمانی[2]، آفریده رئیسی[3]، محمد سادات‌حسینی[1]، بهاره پارسامطلق[4]

۱- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.

۴ - استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.

[*]نویسنده مسئول: na.askari@yahoo.com

(**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۱/۰۴/۰۴ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۱/۰۸/۱۹ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۹/۰۹)

چکیده

سیب‌زمینی به عنوان یکی از محصولات استراتژیک در امنیت غذایی محسوب می‌شود. مرسوم‌ترین راه تکثیر و کشت این گیاه به صورت غیرجنسی و یا استفاده از بذور غده‌ای (غده‌چه‌ها و ریزغده‌ها) می‌باشد. تقاضا برای استفاده از ریزغده‌ها به دلیل عملکرد بالا و مزیت‌های تکثیر به شدت رو به افزایش است. این پژوهش با هدف بررسی اثر تنش دمایی در القای ریزغده‌زایی و ویژگی‌های مرتبط با آن انجام پذیرفت. به همین منظور از تیمارهای مختلف گرمایی (۴۰، ۴۵ و ۵۰ درجه سانتیگراد) در سه بازه زمانی (۰/۵، ۱ و ۲ ساعت) و همچنین تیمار سرمایی (۱ و ۴ درجه سانتیگراد) در سه دوره زمانی (۴، ۸ و ۱۲ ساعت) در مقایسه با تیمار شاهد (۲۵ درجه سانتیگراد) به‌عنوان پیش تیمار ریزغده زایی استفاده گردید و سپس شاخص‌هایی همچون قطر و وزن تر و خشک ریزنمونه، قطر غده، وزن تر و خشک غده، درصد زیست توده، تعداد غده، درجه و درصد غده‌زایی اندازه‌گیری شد. صرف‌نظر از دوره‌های زمانی، تنش گرمایی تأثیر معنی‌داری بر رشد ریزنمونه در طول دوره ریزغده‌زایی داشت و موجب افزایش وزن تر ریزنمونه، قطر ریزنمونه و همچنین افزایش درجه غده‌زایی شد، درحالیکه سرما تأثیر بیشتری بر فرایند ریزغده‌زایی داشت و موجب افزایش وزن خشک غده‌ها و تعداد غده‌های تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای شد. نتایج این پژوهش نشان داد، قرار دادن ریزنمونه‌های گره سیب‌زمینی در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۸ ساعت موجب افزایش معنی‌دار تعداد غده‌های القاء شده و همچنین وزن تر و خشک غده‌ها می‌شود.

واژه‌های کلیدی: القای درون‌شیشه‌ای، ریزغده، ریزازدیادی، سرما، گرما.

استناد: عسکری، ن.، قهرمانی، ر.، رییسی، آ.، سادات‌حسینی، م. و پارسامطلق، ب. (۱۴۰۱). نقش تنش دمایی در رشد درون شیشه‌ای ریز غده سیب زمینی. *علوم سبزی ها*، ۶ (۲)، ۸۴-۷۳.

حق چاپ:

حق چاپ برای نویسنده (گان) این مقاله محفوظ است. بر اساس قوانین انتشارات با دسترسی آزاد، تمام مطالعات چاپ شده در این مجله به‌صورت آزاد در وب سایت مجله برای عموم بدون پرداخت هزینه قابل‌دسترس است.

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) با سطح زیر کشت بیش از ۱۶ میلیون هکتار و تولید نزدیک به ۳۶۰ میلیون تن، یکی از مهم‌ترین گیاهان جهت تأمین امنیت غذایی جهانی است (FAO_STAT, 2020). تقاضا برای این گیاه غده‌ای به‌دلیل ارزش غذایی بالا، تولید مقرون به‌صرفه، کاربردهای فراوان و تولید نشاسته به شدت رو به افزایش است (Plantenga *et al*., 2019; Gong *et al*., 2021; Asghari *et al*., 2022).

با اینکه این گیاه به دو روش جنسی (بذر حقیقی) و غیر جنسی (غده) تکثیر می شود، اما برای جلوگیری از تنوع حاصل از دگرگشنی و تولید محصول یکنواخت، باکیفیت و با ویژگی‌های مشابه والد تجاری استفاده از روش غیر جنسی (غده) رایج است (Plantenga *et al*., 2019; Abedini *et al*., 2020). با وجود اینکه روش اصلی تکثیر و پرورش سیب‌زمینی استفاده از غده‌های سیب‌زمینی است اما به‌دلیل بروز آفات و بیماری‌های مرتبط، موجب کاهش عملکرد محصول می‌گردد. استفاده از غده‌چه‌های (mini-tuber) گیاهان عاری از ویروس کشت بافتی یک رویکرد مناسب جهت مقابله با موانع است، اما به دلیل راندمان پایین در تکثیر و موانع مرتبط با سازگاری، این رویه نیز نیازمند بازبینی است (Yagiz *et al*., 2020). میکروتیوبرها (micro-tuber) ریزغده‌های درون شیشه‌ای با اندازه میانگین ۱/۵-۰/۵ سانتیمتر (Rahman *et al*., 2015) با وزن ۲۷۳ میلی‌گرم هستند (Salem & Hassanein, 2017) که به‌دلیل مزایای بسیار زیاد از جمله مدیریت ژرم‌پلاسم گیاهی، کاهش فضای ذخیره بذور، افزایش قابلیت نگهداری طولانی مدت، تولید گیاهچه‌های عاری از بیماری، حمل و نقل و بسته بندی راحت، سازگاری بالا، تکثیر سریع و مقرون به صرفه و عملکرد بالای محصول می‌تواند به‌عنوان روشی جایگزین در کشت سیب‌زمینی مورد توجه قرار گیرد (Unchendu *et al*., 2016; Teng *et al*., 2019; Herrera-Isidron *et al*., 2021).

عوامل مختلفی در القای غده در شرایط کشت بافتی تأثیرگذارند که می‌توان به غلظت ساکارز (Herrera-Isidron *et al*., 2021)، تنظیم کننده‌های رشد (Sauer *et al*., 2013; Salem & Hassanein, 2017)، نوع ریزنمونه (Yagiz *et al*., 2020)، منابع نوری (Rahman *et al*., 2021)، عامل ژله‌ای کننده (Arregui *et al*., 2003)، ژنوتیپ (Mohamed *et al*., 2018) و عناصر غذایی (Rahman *et al*., 2015) اشاره کرد. همچنین، دمای اتاقک رشد تأثیر بسزایی در غده‌زایی سیب‌زمینی در شرایط درون شیشه‌ای دارد، بطوری‌که در اتاقک رشد، کاهش دما موجب بهبود ریزغده‌زایی ریزنمونه شد (Uranbey *et al*., 2004).

القای تنش دمایی در شرایط درون شیشه‌ای می‌تواند موجب افزایش راندمان تولید گیاهچه شود (Askari *et al*., 2016; Abdelsalam *et al*., 2021). همچنین طبق تحقیقات محدود قبلی در زمینه القای غده در سیب‌زمینی، اعمال تنش‌های شوری (Herrera-Isidron *et al*., 2021)، گرمایی (Singh *et al*., 2020)، سرمایی (Li *et al*., 2013) و بی‌هوازی (Pumisutapon & Topoonyanont, 2015) موجب بهبود ریزغده‌زایی شده است. هدف از انجام پژوهش حاضر از یک سو بررسی نقش پیش تیمارهای دمایی (گرما و سرما) در القای غده در شرایط درون شیشه ای و از سوی دیگر، معرفی تیمار دمایی مؤثر جهت افزایش تولید ریزغده جهت تکثیر تجاری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از رقم تجاری سانته (Sante) جهت القای ریز غده سیب‌زمینی استفاده گردید. این تحقیق شامل سه مرحله تهیه ریزنمونه، شاخه‌زایی و پیش تیمارهای تنش دمایی جهت القای ریزغده‌زایی می‌باشد. ریزنمونه‌های مورد استفاده در محیط کشت بافتی از تک گره‌های ساقه‌های سیب‌زمینی رشد کرده در گلخانه بودند. گره‌های جوانه جدا شده از ساقه با استفاده از هیپوکلریت سدیم با غلظت ۱ درصد حاوی یک میلی‌لیتر توئین (Tween® 20) و آب مقطر

استریل، به مدت ۲۰ دقیقه و سپس سه بار آبشویی با آب مقطر استریل ضد عفونی گردید (Pundir *et al.*, 2021). ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز با ۷ گرم بر لیتر آگار کشت شدند. پس از شش هفته، شاخساره‌های رشد کرده به محیط کشت MS دارای ۸۰ گرم در لیتر ساکارز (Herrera-Isidron *et al.*, 2021) به همراه یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین یه همراه ۷ گرم در لیتر آگار منتقل شد. شیشه‌ها جهت تیمارهای گرمایی (۴۰، ۴۵ و ۵۰ درجه سانتیگراد) در سه زمان (۰/۵، ۱ و ۲ ساعت) به آون منتقل شدند و از سوی دیگر برای تیمارهای سرمایی (۱ و ۴ درجه سانتیگراد) در سه زمان (۴، ۸ و ۱۲ ساعت) در مقایسه با تیمار شاهد (۲۵ درجه سانتیگراد) در انکوباتور قرار گرفتند (Pumisutapon & Topoonyanont, 2015). سپس، ریزنمونه‌ها به مدت ۶۰ روز در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتیگراد با نور مهتابی سفید ($PAR = 750\ s^{-1}\ m^{-2}$) با شرایط دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از ۶۰ روز (شکل ۱)، شاخص‌های رشدی ریزنمونه (قطر و وزن تر و خشک ریزنمونه) و غده (قطر غده، وزن تر و خشک غده، درصد زیست توده (بیوماس)، تعداد غده، درجه غده‌زایی و درصد غده‌زایی) اندازه‌گیری شد.

قطر ریزغده‌های هر ۵ ریزنمونه موجود در هر تکرار به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد. محاسبه درصد زیست‌توده بصورت نسبتی از وزن خشک و تر ریزغده با استفاده از فرمول ({وزن تر ریزغده/وزن خشک ریزغده} ×۱۰۰) انجام پذیرفت. برای اندازه‌گیری درجه ریزغده‌زایی، ریزغده‌های القاء شده درجه‌بندی شد. بر اساس این روش (Veramendi *et al.*, 2000)، ریزغده‌ها به ۵ درجه تقسیم شدند. ۰: فاقد هرگونه غده و استولون. ۱: تشکیل استولون توسعه یافته. ۲: تشکیل ریزغده روی ساقه. ۳: تشکیل ریزغده بر روی استولون. ۴: تشکیل ریزغده چسبیده به ریزنمونه. علاوه بر این، درصد غده‌زایی بر اساس فرمول ({تعداد کل ریزنمونه/تعداد ریزنمونه‌های دارای ریزغده} ×۱۰۰) محاسبه شد. در این پژوهش از طرح پایه کاملاً تصادفی (Complete Randomized Design) با سه تکرار استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SAS (Version 9.0) انجام شد. میانگین داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین، نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل (Microsoft Excel software, version 2013) تهیه گردید.

نتایج

بررسی داده‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که پیش تیمار گرمایی ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۰/۵ ساعت موجب افزایش وزن تر ریزنمونه گردید. همچنین، اعمال تنش سرمایی نقش مهمی در بهبود وزن خشک ریزنمونه نسبت به تیمار گرمایی داشت. اعمال پیش تیمار ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت موجب افزایش ۳۲۶ درصدی وزن خشک ریزنمونه نسبت به تیمار شاهد (۲۵ درجه سانتیگراد) گردید (جدول ۱).

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش (جدول ۱)، تیمار گرمایی در قطور شدن ریزنمونه‌های (تک‌گره ساقه) مورد مطالعه مؤثر بود بطوری‌که قطر ریزنمونه‌هایی که در معرض تنش گرمایی ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند با ۱/۴۶ میلی‌متر بیشتر از سایر تیمارها بود. قطر غده با اعمال تیمارهای گرمایی به شدت کاهش یافت، اما استفاده از پیش تیمار تنش سرمایی موجب افزایش قطر غده شد به نحوی‌که بیش‌ترین قطر غده در تیمار سرمایی ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۸ ساعت مشاهده گردید (جدول ۱).

شکل ۱- القای درون شیشه ای ریزغده سیب‌زمینی (ریز غده‌های القاء شده تحت دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۸ ساعت).

Figure 1- *In vitro* microtuber induction of potato (Induced microtubers under 4 ºC for 8 h).

جدول ۱- مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای مختلف دمایی و دوره زمانی بر وزن تر و خشک ریزنمونه، قطر ریزنمونه و قطر غده سیب‌زمینی

Table 1- The effect of different temperature treatments and duration on explant fresh and dry weight, explant diameter and tuber diameter of potato.

دما (سانتیگراد) Temperature (ºC)	زمان (ساعت) Duration (h)	وزن تر ریزنمونه (گرم) Explant fresh weight (gr)	وزن خشک ریزنمونه (گرم) Explant dry weight (gr)	قطر ریزنمونه (میلی‌متر) Explant diameter (mm)	قطر ریزغده (میلی‌متر) Tuber diameter (mm)
25	**-**	42.02^{abc}	7.82^{bc}	1.06^{def}	3.32^{ab}
40	**0.5**	29.62^{cd}	5.23^{cde}	0.94^{ef}	2.61^{e}
	1	28.31^{cd}	5.03^{cde}	0.95^{def}	2.42^{e}
	2	44.22^{abc}	7.31^{bc}	0.94^{ef}	2.64^{e}
45	**0.5**	30.42^{cd}	5.05^{cde}	1.19^{bc}	2.52^{e}
	1	38.51^{bcd}	6.72^{bcd}	0.97^{def}	2.74^{de}
	2	53.12^{ab}	9.74^{b}	1.46^{a}	3.13^{bcd}
50	**0.5**	58.41^{a}	8.41^{b}	0.97^{def}	2.41^{e}
	1	37.52^{bcd}	7.13^{bc}	1.26^{b}	2.51^{e}
	2	22.12^{d}	3.52^{e}	0.98^{def}	1.92^{f}
1	**4**	36.91^{bc}	7.26^{bc}	1.14^{bcd}	2.62^{e}
	8	42.52^{abc}	7.63^{bcd}	0.91^{fg}	3.22^{ab}
	12	30.41^{cd}	3.81^{de}	0.85^{g}	2.81^{de}
4	**4**	28.23^{cd}	4.82^{cde}	0.87^{g}	2.83^{de}
	8	41.34^{bc}	6.72^{bc}	1.11^{bcde}	3.68^{a}
	12	43.41^{abc}	33.31^{a}	1.15^{bcd}	3.21^{ab}

بر اساس آزمون دانکن، در هر ستون حروف غیر همسان به‌معنی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بین تیمارهای مورد استفاده است.
No similar letters in each column mean a significant difference between the treatments according to Duncan's test at the 5% probability.

بر اساس نتایج جدول ۲، تیمار سرما نسبت به گرما سبب افزایش معنی‌دار شاخص وزن تر و خشک غده شد. با بررسی تیمارهای مورد مطالعه پیش تیمارهای سرمایی ۱و ۴ درجه سانتیگراد در مدت زمان ۸ ساعت

بیشترین وزن تر غده را داشتند. علاوه بر این، اعمال پیش تیمار ۴ درجه سانتیگراد ۸ ساعته موجب افزایش ۶۴ درصدی وزن خشک غده نسبت به تیمار شاهد شد. داده‌های درصد زیست توده نشان داد القای تنش سرمایی ۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت موجب افزایش معنی‌دار (۲۱/۵ درصد) نسبت به تیمار شاهد (۱۶/۵ درصد) شد. افزون بر این، کاربرد تیمار سرمایی ۸ ساعته تحت دمای ۴ درجه سانتیگراد نقش مؤثری در بهبود وزن تر غده (۱۶۰/۰۵ گرم) نسبت به غده‌های حاصل از تیمار شاهد (۱۴۰/۰۸ گرم) داشت (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای مختلف دمایی و دوره زمانی بر وزن تر و خشک غده، درصد زیست توده و وزن تر غده در شیشه سیب‌زمینی

Table 2- The effect of different temperature treatments and duration on microtuber fresh and dry weight, biomass percent and microtuber fresh weight per glass of potato.

دما (سانتیگراد) Temperature (°C)	زمان (ساعت) Duration (h)	وزن تر غده (گرم) Microtuber fresh weight (gr)	وزن خشک غده (گرم) Microtuber dry weight (gr)	زیست توده (درصد) Biomass (%)	وزن تر غده در شیشه (گرم) Microtuber fresh weight per glass (gr)
25	**-**	35.53^{bc}	5.82^{cd}	16.52^{cde}	140.08^{b}
40	**0.5**	22.23^{def}	4.44^{f}	19.84^{ab}	71.06^{f}
	1	1.81^{h}	0.32^{i}	18.92^{bcd}	42.32^{i}
	2	24.12^{de}	5.06^{de}	21.13^{ab}	59.06^{g}
45	**0.5**	21.43^{def}	3.82^{fg}	17.81^{cd}	43.75^{i}
	1	23.22^{def}	4.34^{f}	18.54^{bcd}	51.31^{h}
	2	35.52^{bc}	6.82^{bc}	19.18^{abc}	106.04^{cd}
50	**0.5**	15.92^{fg}	2.92^{g}	18.31^{bcd}	33.51^{j}
	1	18.61^{ef}	3.15^{g}	17.82^{cd}	39.23^{ij}
	2	10.03^{g}	1.56^{h}	14.92^{e}	10.03^{k}
1	**4**	28.07^{cd}	5.62^{de}	19.91^{ab}	75.05^{f}
	8	45.81^{a}	7.61^{b}	17.12^{cde}	91.15^{e}
	12	26.12^{de}	5.64^{de}	21.54^{a}	51.63^{h}
4	**4**	23.63^{def}	4.55^{ef}	19.04^{abc}	103.07^{d}
	8	45.31^{a}	9.53^{a}	20.91^{ab}	160.05^{a}
	12	36.07^{b}	7.57^{b}	20.95^{ab}	131.82^{c}

بر اساس آزمون دانکن، در هر ستون حروف غیر همسان به‌معنی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بین تیمارهای مورد استفاده است.
No similar letters in each column mean a significant difference between the treatments according to Duncan's test at the 5% probability.

نتایج آزمایش حاضر نشان داد، قرار گرفتن ریزنمونه‌های کشت شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت تعداد ریزغده‌های درون شیشه‌ای را به میزان ۲۵ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داد (جدول ۳). همچنین، تأثیر تیمار گرمایی در شاخص درجه غده‌زایی بیشتر از سرما بود. بنابراین، استفاده از پیش تیمار ۵۰ درجه سانتیگراد موجب افزایش معنی‌دار درجه غده‌زایی نسبت به شاهد می‌شود. علاوه بر این، در بین تیمارهای مورد استفاده سرمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۸ ساعت بیشترین درصد ریزغده‌زایی (۱۰۰ درصد) را داشت (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای مختلف دمایی و دوره زمانی بر تعداد غده در شیشه، درجه ریزغده‌زایی و درصد ریزغده‌زایی در شیشه سیب‌زمینی

Table 3- The effect of different temperature treatments and duration on microtuber number per glass, tuberization degree and tuberization percentage of potato.

دما (سانتیگراد) Temperature (°C)	زمان (ساعت) Duration (h)	تعداد ریزغده در شیشه Microtuber number per glass	درجه ریزغده زایی Tuberization degree	درصد ریزغده‌زایی (٪) Tuberization percentage (%)
25	**-**	4.03^{b}	2.13^{gh}	80.01^{bc}
40	**0.5**	3.51^{bc}	3.21^{c}	85.07^{b}
	1	2.61^{cd}	2.85^{de}	40.02^{g}
	2	2.64^{cd}	2.97^{cd}	40.09^{g}
45	**0.5**	2.06^{de}	2.54^{ef}	40.05^{g}
	1	2.23^{d}	2.53^{ef}	45.23^{fg}
	2	3.07^{bc}	2.06^{h}	15.31^{h}
50	**0.5**	2.03^{de}	2.57^{ef}	20.09^{h}
	1	2.24^{d}	3.19^{c}	45.02^{fg}
	2	1.09^{e}	4.00^{a}	15.32^{h}
1	**4**	2.82^{cd}	2.62^{ef}	70.08^{cd}
	8	2.73^{cd}	3.56^{b}	55.04^{ef}
	12	2.25^{d}	2.35^{fg}	55.45^{ef}
4	**4**	5.36^{a}	2.03^{h}	65.13^{de}
	8	4.03^{b}	3.07^{cd}	100.00^{a}
	12	4.09^{b}	2.16^{gh}	80.98^{bc}

بر اساس آزمون دانکن، در هر ستون حروف غیر همسان به‌معنی وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بین تیمارهای مورد استفاده است.
No similar letters in each column mean a significant difference between the treatments according to Duncan's test at the 5% probability.

بحث

مطالعات پیشین نشان می‌دهد که با القای تنش گرمایی و سرمایی خفیف و در زمان‌های کوتاه میزان اسمولیت‌ها به میزان قابل توجهی افزایش پیدا می‌کند و نتیجه این پاسخ ایجاد یک تعادل آبی در بافت‌های مختلف گیاه و نزدیک شدن به شرایط عادی (شاهد) است (Machado & Paulsen, 2001; Naz *et al.*, 2018; Jan *et al.*, 2018). در پژوهش حاضر، تنش گرمایی و سرمایی موجب افزایش وزن تر ریزنمونه شد که نشان‌دهنده نقش کلیدی اسمولیت‌ها در بهبود روابط آبی ریز نمونه‌های سیب‌زمینی است.

قطر ریزنمونه به‌عنوان یک شاخص رشدی در شرایط درون شیشه‌ای مطرح است. تنش گرمایی موجب افزایش قطر ریزنمونه گره سیب‌زمینی گردید. القای تنش گرمایی از یک سوء نقش مهمی در افزایش سنتز پکتین در دیواره سلولی دارد و از سوی دیگر، بروز تنش گرمایی می‌تواند تأثیر بسزایی در افزایش تجمع یون کلسیم در بافت‌های گیاهی داشته که به نوبه خود موجب افزایش قطر ریزنمونه می‌شود (Wu *et al.*, 2018). علاوه بر این، همزمان با اعمال این تنش و افزایش بافت پارانشیمی و کوتیکولی ناشی از آن، منجر به افزایش قابل ملاحظه در قطر بافت‌های گیاهی می‌گردد (Salem-Fnayou *et al.*, 2011). در پژوهش حاضر، استفاده از پیش تیمار ۴۵ درجه سانتیگراد به‌مدت ۲ ساعت موجب القای بیش‌ترین رشد ریزنمونه نسبت به سایر پیش تیمارها شد. همچنین، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای دمایی ۴۰ (۲ ساعت)، ۵۰ (۰/۵ ساعت) و ۱ (۸ ساعت) درجه سانتیگراد با تیمار شاهد مشاهده نگردید که با نتایج

مطالعات پیشین در گیاه سیب‌زمینی مطابقت دارد (Pumisutapon & Topoonyanont, 2015).

نتایج آزمایشات پیشین حاکی از افزایش بیان ژن‌های مرتبط با ریزغده‌زایی سیب‌زمینی در مواجه با دمای بالای محیط رشد است (Singh *et al*., 2015). با این وجود، اعمال تنش سرمایی و به دنبال آن افزایش جذب مواد غذایی و بالا رفتن تجمع قندهای محلول و نشاسته از یک سوء و کاهش تنفس از سوی دیگر موجب افزایش تعداد غده‌های تولید شده سیب‌زمینی می‌شود (Hastilestari *et al*., 2018). در پژوهش حاضر، با وجود اینکه بیشترین میزان درجه ریزغده‌زایی را در تنش‌های گرمایی شدید (۵۰ درجه سانتیگراد) شاهد بودیم اما، تعداد غده‌های تولید شده در تنش سرمایی بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۳).

افزایش قابل ملاحظه (۳۲۶ درصدی) وزن خشک ریزنمونه (۴ درجه به‌مدت ۱۲ ساعت) و همچنین افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک غده‌های حاصل از گره سیب‌زمینی در تیمار سرمایی ۱ و ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۸ ساعت نسبت به تیمار شاهد (۲۵ درجه سانتیگراد) را می‌توان به افزایش نسبت اکسیژن جذب شده (Malone *et al*., 2006)، سنتز پروتئین‌های اسمولیتی (Li *et al*., 2021)، سنتز اکسین و تأثیر آن بر القای غده و ایجاد یک منبع (Sink) تغذیه‌ای قوی برای غده‌های القاء شده (Kolachevskaya *et al*., 2019)، تجمع آبسیزیک اسید در مواجه اولیه با تنش سرمایی (Chen *et al*., 1983) و تجمع رادیکال‌های آزاد و فعال (López-Delgado *et al*., 2012) نسبت داد. در تحقیقی که بر روی ارقام مختلف سیب‌زمینی انجام شد دمای پایین نسبت به دماهای بالاتر سبب افزایش معنی‌دار در تعداد و اندازه ریزغده‌ها شد (Otroshy *et al*., 2009). همچنین، در این پژوهش دمای بالا موجب کاهش معنی‌دار وزن خشک ریزنمونه و همچنین وزن تر و خشک ریزغده گردید. خسارت تنش گرمایی طولانی مدت شامل ممانعت از سنتز پروتئین محلول برگ و افزایش سیالیت ساختارهای سلولی و از بین رفتن غشاء می‌شود. این خسارت منجر به ممانعت از تولید مواد فتوسنتزی و در نهایت باعث کاهش رشد می‌گردد (Kahraman & Copur., 2010) که با نتایج حاصل از این پژوهش هم‌خوانی دارد. از سوی دیگر، تحت شرایط تنش گرمایی تنفس بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته و گیاه برای کاهش اثرات گرما سازوکارهای جانبی بکار می‌گیرد و مقدار زیادی از انرژی را صرف مقابله با تنش گرمایی می‌نماید. این عمل باعث کاهش کارایی در تأمین عناصر غذایی مورد نیاز برای توسعه سلولی و در نتیجه موجب کاهش رشد و همچنین کاهش وزن تر و خشک می‌گردد (Gupta *et al*., 2013).

بررسی درصد زیست توده در ریزغده‌های القاء شده نشان داد اعمال پیش تیمارهای دمایی (سرما و گرما) موجب افزایش معنی‌دار بیوماس در مقایسه با شاهد گردید. همچنین، بین تیمارهای گرمایی (۴۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد) و سرمایی (۱ و ۴ درجه سانتیگراد) تفاوت معنی‌داری یافت نگردید. بطورکلی، القای شرایط تنشی با افزایش تجمع پرولین موجب بهبود زیست توده تولیدی در سیب‌زمینی می‌گردد (Schafleitner *et al*., 2007). همچنین، Gautam و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که با القای یک تنش گرمایی وزن زیست توده در سیب‌زمینی بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد.

در پژوهش حاضر نقش منفی دماهای بالا در مقایسه با دمای اتاق (شاهد) و دماهای پایین در قطر ریزغده به‌عنوان یک شاخص رشدی غده‌ای مشاهده گردید، بطوری‌که بیش‌ترین قطر ریزغده در تیمارهای سرمایی (۱و ۴ درجه سانتیگراد) و تیمار شاهد و کمترین آن در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد یافت شد. همچنین، در یافته‌های پیشین به وضوح به تأثیر منفی دماهای بالا در سنتز کربوهیدرات‌ها و کاهش رشد غده‌های سیب‌زمینی القاء شده به‌وضوح اشاره شده است (Krauss & Marschner, 1984; Rykaczewska, 2013; Chen & Setter, 2021).

نتیجه گیری کلی

در مجموع، اعمال تنش‌های مختلف دمایی تأثیر مثبتی در بهبود برخی از شاخص‌های مرتبط با ریزغده‌زایی در سیب‌زمینی نسبت به روش‌های معمول (شاهد) داشت. نتایج این پژوهش نشان داد در طول اعمال تنش گرمایی ریزنمونه‌ها قطورتر از سایر تیمارها و حتی در مقایسه با تیمار شاهد بود. علاوه بر این، گرما نقش حیاتی در القای اولیه غده در سیب‌زمینی با بیشترین درجه ریزغده‌زایی داشت. درحالی‌که سرما نقش سازنده‌تری در درصد ریزغده‌زایی و تعداد ریزغده‌های تولیدی سیب‌زمینی داشت. از سوی دیگر، ریزنمونه‌های قرار گرفته در معرض تیمارهای سرمایی وزن خشک بهتری داشته و در نهایت وزن تر و خشک غده‌های تولید شده نیز بیشتر از سایر تیمارها بود. نتایج این پژوهش نشان داد که القای ریزغده در شرایط درون شیشه‌ای به شدت به دمای پایین وابسته است. بطورکلی، استفاده از پیش تیمارهای سرمایی می‌تواند به‌عنوان یک راهکار کارآمد در افزایش عملکرد تولید ریزغده‌های تجاری سیب‌زمینی در صنعت کشت‌بافت گیاهی معرفی گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از گروه باغبانی دانشگاه جیرفت جهت حمایت‌ها کمال تشکر را دارد.

References

- Abdelsalam, N. R., Grad, W. E., Ghura, N. S., Khalid, A. E., Ghareeb, R. Y., Desoky, E. S. M. & Ali, E. F. (2021). Callus induction and regeneration in sugarcane under drought stress. *Saudi journal of biological sciences*, 28(12), 7432-7442.
- Abedini, M., Mottalebi Azar, A., Zaare Nahandi, F. & Gohari, G. (2020). Application of Pectin- tagged Nano Silver and Triacontanol on In Vitro Microruberization of *Solanum tuberosum* L. cv. Agria. *Journal of Vegetables Sciences*, 7(1), 57-70. (In Persian).
- Arregui, L. M., Veramendi, J. & Mingo-Castel, A. M. (2003). Effect of gelling agents on in vitro tuberization of six potato cultivars. *American journal of potato research*, 80(2), 141-144.
- Asghari, M., Kalantar, M., Hassanpanah, D. & Dehghani Zahedani, M. (2022). Genetic varieties of the obtained hybrids from the Potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber intersections in the spring using the factor and cluster analysis. *Journal of Vegetables Sciences*, 10(2), 163-179. (In Persian).
- Askari, N., Visser, R. G. & Klerk, G. J. D. (2016). Advantageous effects of mild abiotic stresses in lily cultured in vitro. *Propag. Ornam. Plants*, 16, 130-136.
- Chen, C. T. & Setter, T. L. (2021). Role of tuber developmental processes in response of potato to high temperature and elevated CO2. *Plants*, 10(5), 871.
- Chen, H. H., Li, P. H. & Brenner, M. L. (1983). Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. *Plant physiology*, 71(2), 362-365.
- Fao stat. 2022. Available online: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC (accessed on 8 June 2022).
- Gautam, S., Gracia, N. S. Teale, K.M. Mandadi, K. Silva, J. A. & Vales, M. I. (2021). Development of an in vitro Microtuberization and Temporary Immersion Bioreactor System to Evaluate Heat Stress Tolerance in Potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Sci*, 12, 1-11.
- Gong, H. L., Dusengemungu, L., Igiraneza, C. & Rukundo, P. (2021). Molecular regulation of potato microtuber dormancy and sprouting: a mini-review. *Plant Biotechnology Reports*, 15(4), 417-434.
- Gupta, N. K., Agarwal, S., Agarwal, V. P., Nathawat, N. S., Gupta, S. & Singh, G. (2013) Effect of short -term heat

stress on growth, physiology and antioxidative defence system in wheat seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 1837 -1842

- Gur, A., Demirel, U., Ozden, M., Kahraman, A. & Copur, O. (2010) Diurnal gradual heat stress affects antioxidant enzymes, proline accumulation and some physiological components in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 9, 1008 -1015.
- Hastilestari, B. R., Lorenz, J., Reid, S., Hofmann, J., Pscheidt, D., Sonnewald, U. & Sonnewald, S. (2018). Deciphering source and sink responses of potato plants (*Solanum tuberosum* L.) to elevated temperatures. *Plant, cell & environment*, 41(11), 2600-2616.
- Herrera-Isidron, L., Valencia-Lozano, E., Rosiles-Loeza, P. Y., Robles-Hernández, M. G., Napsuciale-Heredia, A. & Cabrera-Ponce, J. L. (2021). Gene expression analysis of microtubers of potato *Solanum tuberosum* L. induced in cytokinin containing medium and osmotic stress. *Plants*, 10(5), 876.
- Jan, N., Majeed, U., Andrabi, K. I. & John, R. (2018). Cold stress modulates osmolytes and antioxidant system in Calendula officinalis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(4), 1-16.
- Kolachevskaya, O. O., Lomin, S. N., Arkhipov, D. V. & Romanov, G. A. (2019). Auxins in potato: molecular aspects and emerging roles in microtuber formation and stress resistance. *Plant cell reports*, 38(6), 681-698.
- Krauss, A. & Marschner, H. (1984). Growth rate and carbohydrate metabolism of potato tubers exposed to high temperatures. *Potato Research*, 27(3), 297-303.
- Li, H., Luo, W., Ji, R., Xu, Y., Xu, G., Qiu, S. & Tang, H. (2021). A comparative proteomic study of cold responses in potato leaves. *Heliyon*, 7(2), e06002.
- Li, M., Song, B., Zhang, Q., Liu, X., Lin, Y., Ou, Y. & Liu, J. (2013). A synthetic tuber-specific and cold-induced promoter is applicable in controlling potato cold-induced sweetening. *Plant physiology and biochemistry*, 67, 41-47.
- López-Delgado, H. A., Sánchez-Rojo, S., Mora-Herrera, M. E. & Martínez-Gutierrez, R. (2012). Micro-tuberization as a long term effect of hydrogen peroxide on potato plants. *American Journal of Potato Research*, 89(3), 240-244.
- Machado, S. & Paulsen, G. M. (2001). Combined effects of drought and high temperature on water relations of wheat and sorghum. *Plant and Soil*, 233(2), 179-187.
- Malone, J. G., Mittova, V., Ratcliffe, R. G. & Kruger, N. J. (2006). The response of carbohydrate metabolism in potato tubers to low temperature. *Plant and Cell Physiology*, 47(9), 1309-1322.
- Mohamed, F., Omar, G., El-Hamed, A. & El-Safty, B. (2018). Influence of plant density and genotype on potato minituber production from microshoots and microtubers. Catrina: *The International Journal of Environmental Sciences*, 17(1), 77-84.
- Naz, N., Durrani, F., Shah, Z., Khan, N. A. & Ullah, I. (2018). Influence of heat stress on growth and physiological activities of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Phyton*, 87, 225.
- Otroshy, M., Nazarian, F. & Struik, P. C. (2009). Effects of temperature fluctuation during in vitro phase on in vitro microtuber production in different cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant cell, tissue and organ culture (PCTOC*), 98(2), 213-218.
- Plantenga, F. D., Bergonzi, S., Abelenda, J. A., Bachem, C. W., Visser, R. G., Heuvelink, E. & Marcelis, L. F. (2019). The tuberization signal StSP6A represses flower bud development in potato. *Journal of Experimental Botany*, 70(3), 937-948.
- Pumisutapon, P. & Topoonyanont, N. (2015). Moderate-abiotic stress increase in vitro tuberization and microtuber

growth of potato. *VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants*, 1155, 215-220.
- Pundir, R. K., Pathak, A., Upadhyaya, D. C., Muthusamy, A. & Upadhyaya, C. P. (2021). Red and Blue Light-Emitting Diodes Significantly Improve Tuberization of Potato (L.). *Journal of Horticultural Research*, 29(1), 95-108.
- Rahman, M. H., Azad, M. O. K., Islam, M. J., Rana, M. S., Li, K. H. & Lim, Y. S. (2021). Production of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Seed Tuber under Artificial LED Light Irradiation in Plant Factory. *Plants*, 10(2), 297.
- Rahman, M. Z., Islam, S. S., Chowdhury, A. N. & Subramaniam, S. (2015). Efficient microtuber production of potato in modified nutrient spray bioreactor system. *Scientia horticulturae*, 192, 369-374.
- Rykaczewska, K. (2013). The impact of high temperature during growing season on potato cultivars with different response to environmental stresses. *American journal of plant sciences*, 2013.
- Salem, J. & Hassanein, A. M. (2017). In vitro propagation, microtuberization, and molecular characterization of three potato cultivars. *Biologia Plantarum*, 61(3), 427-437.
- Salem-Fnayou, A. B., Bouamama, B., Ghorbel, A. & Mliki, A. (2011). Investigations on the leaf anatomy and ultrastructure of grapevine (*Vitis vinifera*) under heat stress. *Microscopy Research and Technique*, 74(8), 756-762.
- Sauer, M., Robert, S. & Kleine-Vehn, J. (2013). Auxin: simply complicated. *Journal of experimental botany*, 64(9), 2565-2577.
- Schafleitner, R., Gaudin, A., Gutierrez Rosales, R. O., Alvarado Aliaga, C. A. & Bonierbale, M. (2007). Proline accumulation and real time PCR expression analysis of genes encoding enzymes of proline metabolism in relation to drought tolerance in Andean potato. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(1), 19-26.
- Singh, A., Siddappa, S., Bhardwaj, V., Singh, B., Kumar, D. & Singh, B. P. (2015). Expression profiling of potato cultivars with contrasting tuberization at elevated temperature using microarray analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 97, 108-116.
- Singh, B., Kukreja, S. & Goutam, U. (2020). Impact of heat stress on potato (*Solanum tuberosum* L.): Present scenario and future opportunities. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 95(4), 407-424.
- Teng, Y., Zhang, Y., Guo, J. T., Gao, Y. L. & Li, K. H. (2019). Acid pretreatment improves microtuberization of potato plantlets. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(1), 36-43.
- Uchendu, E. E., Shukla, M., Saxena, P. K. & Keller, J. E. (2016). Cryopreservation of potato microtubers: the critical roles of sucrose and desiccation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124(3), 649-656.
- Uranbey, S. E. R. K. A. N., Parmaksız, İ., Sancak, C. E. N. G. İ. Z., Çöçü, S. & Özcan, S. E. B. A. H. A. T. T. İ. N. (2004). Temperature and gelling agent effects on in vitro microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 18(2), 89-94.
- Van Dam, J., Kooman, P. L. & Struik, P. C. (1996). Effects of temperature and photoperiod on early growth and final number of tubers in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Res*. 39, 51-62.
- Veramendi, J., Sota, V., Fernandez-San Millan, A., Villafranca, M. J., Martin-Closas, L., Pelacho, A. M. & Mingo-Castel, A. M. (2000). An in vitro tuberization bioassay to assess maturity class of new potato clones. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(6), 733-738.

- Wu, H. C., Bulgakov, V. P. & Jinn, T. L. (2018). Pectin methylesterases: cell wall remodeling proteins are required for plant response to heat stress. *Frontiers in plant science*, 9, 1612.
- Yagiz, A. K., Yavuz, C., Tarim, C., Demirel, U. & Caliskan, M. E. (2020). Effects of growth regulators, media and explant types on microtuberization of potato. *American Journal of Potato Research*, 97(5), 523-530.