بررسی اثر مقادیر گوناگون نیترات آمونیوم و نیترات پتاسیم بر تغییرات سلولی ـ تکوینی ریزغده‌های گیاه سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) رقم اگریا در شرایط درون شیشه‌ای

زهرا زارع[۱]، علیرضا ایران‌بخش[۲]، مصطفی عبادی[۳]

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار
۳. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان

چکیده

ریزغده‌های سیب‌زمینی حاصل از کشت بافت جایگزین مناسبی برای غده‌های بذری است. هدف از این پژوهش بررسی اثر غلظت‌های مختلف NH_4NO_3, KNO_3 در محیط‌های کشت در شیشه بر تغییرات سلولی تکوینی ریز غده‌های حاصل از کشت بافت این گیاه در شرایط مذکور می‌باشد. در این پژوهش از محیط‌های کشت ازمایشگاهی جامدومایع به منظور تهیه گیاهچه استریل والقای ریزغده زایی استفاده شد. در محیط‌های القاء ریزغده‌زایی غلظت‌هر یک از ترکیبات NH_4NO_3, KNO_3، ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ برابر حد تعیین شده در محیط کشت در نظر گرفته شد. ریزغده‌زایی رقم آگریا درتناوب نوری صورت پذیرفت. تاریکی دائمی اثر بازدارنده بر ریزغده‌زایی دارد. به منظور بررسی‌های تکوینی و تشریحی ریز غده‌ها در پایان مدت القا، ابعاد آنها در محور طولی و عرضی و پس از مقطع‌گیری میکروسکپی از آنها، تغییرات تعداد سلول‌ها و تغییرات ابعاد سلول هاومحتوای نشاسته بر مبنای سلول‌های بافت پارانشیم پوست و مغز سنجیده شد. بر همین مبنا با نتایج آماری معنی دارمشخص شد در غلظت‌های مختلف NH_4NO_3 بیشترین تعداد ردیف‌های سلولی متعلق به غلظت نیم تا برابر استانداردمحیط کشت بود. و از نظر تعداد دانه‌های نشاسته غلظت برابر استانداردتا ۱/۵برابر آن بیشترین مقدار را نشان دادند. غلظت‌های مختلف این ترکیب بر تغییر ابعاد سلول‌ها اختلافات معنی دار ی نشان ندادند. در گروه KNO_3، با نتایج آماری معنی دار غلظت ۱/۵ برابر استاندارد بیشترین تعداد ردیف‌های سلولی، ابعاد سلول و همچنین بیشترین محتوی نشاسته را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: درون شیشه، ریزغده‌زایی، سیب‌زمینی، کشت بافت، نیترات آمونیوم، نیترات پتاسیم

مقدمه

از آن‌جا که گیاه سیب‌زمینی نقش مهمی در تغذیه مردم جهان و سبدغذایی خانواده ایرانی دارد. در این مطالعه مورد توجه قرار گرفته است. این گیاه به دو روش جنسی (تولید بذر حقیقی) و غیرجنسی یا رویشی تکثیر می‌شود. استفاده از روش جنسی و تولید بذر حقیقی اغلب در مطالعات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاح نژاد سیب‌زمینی متداول است، اما تولید تجاری عمدتاً از طریق تکثیررویشی است. روش‌های سنتی در تکثیراین گیاه بسیاری از بیماری‌ها را از نسلی به نسل دیگر انتقال می‌دهد و با افت شدید محصول روبروست و از طرفی انبارداری و نگاهداری غده‌های بذری با هزینه بالا و مشکلاتی مواجه است. از این رو در سراسر دنیا توجه ویژه‌ای به تولید ریزغده‌ها در شیشه متمرکز شده است.

*e.mail: zzare2006@yahoo.com

ریزغده‌ها، غده‌های بسیار کوچک هستند که در شرایط القای غده‌دهی در شیشه از گیاهچه‌های عاری از ویروس تولید می‌شوند. ریزغده‌های تولید شده قابل کشت در گلدان و نهایتاً در مزرعه هستند و از این طریق می‌توان به گیاه‌هانی با غده مطلوب دست یافت. ریزغده‌های تولید شده ابتدا در حالت خواب هستند و از این رو قبل از کاشت در مزرعه و یا گلخانه باید آنها را به مدت ۳ تا ٤ ماه در دمای ٦-٥ درجه نگهداری نمود.

امروزه این محصول در جهان از نظر اهمیت غذایی مقام چهارم را بعد از گندم، برنج و ذرت دارد. از نظر محتوی مواد، شامل ماکرومولکول‌های اصلی چون پروتئین، چربی و کربوهیدرات است و علاوه بر آن دارای موادی مثل آب، فیبر، عناصر معدنی مثل کلسیم، فسفر، آهن، سدیم، پتاسیم و گروهی از ویتامین‌ها مثل بتاکاروتن، تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین و اسید آسکوربیک است.

سیب‌زمینی تقریبا در تمام استان‌های ایران از مناطق بیابانی تا مناطق مرطوب کرانه دریای خزر کشت می‌شود. گیاه سیب‌زمینی دارای ارقام زراعی زیادی است.

رقم اگریا رقمی متوسط تا دیرس و از تلاقی بین ارقام کوآرتا و سملو در سال ۱۹۸۵ در کشور آلمان به بوجود آمده است و رشد ساقه‌ها بصورت ایستا می‌باشد. رنگ گل آن سفید، میوه حاصل از آن بدون دانه است و عملکرد آن بسته به شرایط محیطی بسیار متغیر است. اندازه غده‌ها متغیر است غده‌های آن تخم‌مرغی شکل، رنگ پوست زرد وبخش گوشتی زرد تیره است. عمق چشم‌های غده‌ها نیز کم دارای دوره خواب بلند تا بسیار بلند هستند. وزن خشک غده‌های آن بسته به شرایط محیطی رشد، متغیر است. میزان نشاسته و قندهای احیایی در آن پایین است و از این رو در صنایع تبدیلی بسیار مناسب است.

امروزه در دنیا البته و در ایران تحقیقات زیادی بر روند ریزغده‌زایی و بهبود کیفیت آن صورت گرفته است (Kawakami, 2004; Seabrook et al. 2004; Gopal, 1997; Wang, 1982؛ عبادی و همکاران، ۱۳۸۰، احمدیان و همکاران، ۱۳۷٤ و ارجمندی، ۱۳۷٦) از جمله محققینی هستند که بر روند ریزغده‌زایی سیب‌زمینی تحقیقات موثری انجام داده‌اند. در این تحقیق سعی بر این است که به بررسی بافت‌شناسی و سلولی تکوینی ریز غده‌های حاصل از کشت در شیشه‌ای پرداخته شود. تاکنون تحقیقات اندکی در زمینه بافت‌شناختی ریزغده‌ها انجام شد است. Cutter, 1978; Xu, 1998; Liu, 2002 تحقیقاتی در این زمینه انجام داده‌اند.

عبادی (۱۳۸۰)، با طراحی بیوراکتورهای پیوسته و نیمه‌پیوسته به تولید آزمایشگاهی ریز غده‌ها پرداختند. همچنین روند تکوینی و سلولی ریزغده‌ها را از دید میکروسکوپ‌نوری و الکترونی مورد بررسی قرار دادند.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال ۸۵-۱۳۸٤ در مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انجام شد. رقم مورد بررسی رقم اگریا (*Agria*) بود که از موسسه اصلاح بذر کرج تهیه گردید. این رقم در کشت خاک از ارقام دیررس می‌باشد. مراحل کار در سه مرحله، الف) تهیه گیاهچه استریل، ب) شاخه زایی و ج) القای ریزغده در شیشه انجام شد. نمونه گیاهی مورد استفاده در کشت بافت، جوانه‌های چشم‌های غده‌های سیب‌زمینی بذری تهیه شده و همچنین تک گره‌های ساقه‌های گیاه سیب‌زمینی که از کاشت غده‌های سیب‌زمینی بذری در گلدان پس از یک ماه بدست آمده بودند. این نمونه‌های گیاهی پس از استریل شدن با هیپوکلریت سدیم ۲ ٪ والکل ۷۰٪ در محیط کشت جامد MS، به اضافه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA، ۰/۵ میلی‌گرم GA3 و مقدار ۳۰ گرم بر لیترساکاروز در شرایط ۱٦ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی استریل کشت داده شدند. پس از ٦ هفته گیاهچه‌های استریل قابل استفاده برای مراحل بعدی بدست آمدند. در مرحله بعدی شاخه‌های این گیاهچه‌های استریل در محیط کشت مایع MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/٤ میلی‌گرم بر لیتر GA3 و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، به منظور شاخه‌زایی واکشت شدند، به طوری که هر قسمت ساقه برای واکشت شامل ۳-۲ گره در ارلن‌های محتوی کشت مایع و بر روی شیکر (GFL) با تعداد ۱۰۰ دور در دقیقه در شرایط ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. پس از چهار هفته گیاهچه‌هایی با شاخه‌های فراوان ایجاد شد که این شاخه‌ها نمونه‌های کشت بافتی مورد نیاز برای القای ریزغده بودند.

در ادامه، محیط‌های کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ٦٠ گرم در لیتر ساکاروز به منظور شرایط بهینه ریز غده‌زایی ساخته شد. سپس در شرایط استریل و استفاده از دستگاه لامینار ایرفلو گیاهچه‌های پر شاخه مرحله قبلی را از محیط مایع MS خارج و محیط‌های MS مایع فوق را به عنوان گروه شاهد به آنها افزودیم و در شرایط فتوپریود ۸ ساعت نور ١٦ ساعت تاریکی و دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتیگراد بر روی شیکر به مدت ۲ ماه و تعداد ۱۰۰ دور دقیقه قرار داده، زمان و کیفیت ریزغده‌دهی آنها را سنجیدیم. سپس تیمارهای مختلف شیمیایی را بنابرغلظت‌های مختلف هر یک از ترکیبات NH_4NO_3, KNO_3 محیط MS به صورت (۲MS، ۳/۲MS، ۱MS، ۱/۲MS و ۰) ساخته و بر ارلن‌های محتوی شاخه‌های تکثیر شده اثر دادیم و نتایج مختلف متفاوتی را بدست آوریم

در ادامه به منظور بررسی تغییرات تکوینی و تشریحی ریزغده‌ها در پایان مدت القا، ابعاد ریز غده‌ها در محور طولی و محور عرضی تغیرات تعداد سلول‌ها و تغییرات ابعاد سلول‌های سنجیده شد.

برای این منظور ابعاد ریزغده‌ها با خط‌کش و ابعاد سلول‌های آنها با گراتیکول و میکروسکوپ نوری (NIKON) مدل فوتو آلفا بر روی مقاطع تهیه شده با میکروتوم (Laica) و برش‌های دستی بر روی هر تیمار مورد مطالعه قرار گرفت.

به منظور بررسی‌های آماری از طرح کاملا تصادفی (CRD) (Complete Randomized Design) که مخصوص طرح‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای است، استفاده گردید. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار MSTATC و SPSS صورت پذیرفت.

نتایج

نتایج بررسی‌های کشت بافت و مطالعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی

هدف از این تحقیق بررسی روند ریزغده زایی گیاه سیب زمینی رقم اگریا (*Solanum tuberosum* L. var. agria) در محیط‌های کشت در شیشه درغلظت‌های مختلف NH_4NO_3, KNO_3 از عناصر پر مصرف محیط MS از دیدگاه سلولی تکوینی می‌باشد.

در آغاز از غده‌های بذری سالم (عاری از ویروس) سیبزمینی تهیه شده، جوانه‌های چشم ها، جدا شدند و به منظور تهیه گیاهچه‌های استریل، به محیط‌های کشت MS جامد حاوی ۰/۱ mgl^{-1}NNA + ۰/۵mgl^{-1}GA3 + ساکارز gl^{-1} ۳۰ + آگار ۸٪ انتقال داده شد. بعد از گذشت حدود ۸ ـ ٦ هفته از رشد جوانه‌های جدا کشت، شاخه‌های باریک با چندین گره بوجود آمد (شکل ۱).

روش دیگر تهیه گیاهچه‌های استریل که در این تجربه نیز مورد استفاده قرار گرفت، کاشت غده‌های بذری سیب‌زمینی در گلدان‌هایی که خاک آن‌ها استریل شده بود و نهایتاً ازگیاه سیب‌زمینی حاصل در این گلدان، تک گره‌هایی ازقسمت‌های ساقه‌های هوایی به صورت جدا کشت در محیط‌های جامد MS حاوی ۰/۱ mgl^{-1}NNA + ۰/۵mgl^{-1}GA3 + ساکارز gl^{-1} ۳۰ + آگار ۸٪، انتقال داده شدند، پس ازحدود ٦ـ ٤ هفته از رشد جدا کشت‌های تک گرهی، گیاهچه‌های استریل شامل شاخه‌هایی با چندین گره بوجود آمد (شکل۲).

این گیاهچه‌های پایه، جهت تکثیر و بررسی مراحل بعدی استفاده شد. به منظور تکثیر شاخه‌های گیاه، شاخه‌های چند گره‌ای گیاهچه‌ها به قطعات ۳ـ۲ گره‌ای، تقسیم و در محیط‌های مایع MS حاوی ۰/۵mgl^{-1}BAP، ۰/٤mgl^{-1}GA3 + ساکارز gl^{-1} ۳۰ برروی شیکر با تعداد ۹۰ الی ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت یک ماه قرار داده شد (شکل ۳).

درمرحله بعد شاخه‌های تکثیر یافته برای القای ریز غده زایی در محیط مایع MS حاوی ۲mgl^{-1}BAP، ساکارز gl^{-1} ٦٠، به عنوان محیط‌های القایی بر روی شیکر با تعداد ۹۰ الی ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت دو ماه انتقال داده شد.

بر همین مبنا اثرات نور و تاریکی بر این روند بررسی و با توجه به نتایج بهتر اثرات تناوب نور و تاریکی (۸ ساعت نور ١٦ ساعت تاریکی)، این عامل نوری به عنوان شرایط نوری مناسب برای القای ریزغده‌زایی انتخاب شد. با برقراری تمامی شرایط فوق، محیط‌های القایی ریزغده‌زایی با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و۲ برابر هر یک از ترکیبات NH_4NO_3, KNO_3 ساخته و اثرات هریک از آن‌ها به طور جداگانه بررسی شد (شکل ٤ و ٥).

تغییرات تکوینی ریزغده‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف برخی عناصر پرمصرف

در این قسمت به ارائه نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف برروند ریزغده‌زایی و ریزغده‌های تشکیل یافته می‌پردازیم. هدف از انجام این بخش از پژوهش بررسی‌های سلولی-تکوینی ریزغده‌های حاصل از هر تیمار است و اینکه آیا عناصر پرمصرف می‌توانند بر تغییر برخی ساختار بافت‌ها، اثری داشته باشند یا خیر؟ و درصورت ایجاد تغییر، این تمایز چگونه است؟ از آنجا که عمده بافت غده سیب‌زمینی متشکل از بافت پارانشیم‌های پوست و مغز است، بنابراین سلول‌های این دو بافت از نظر تغییرات تکوینی مورد پژوهش قرار گرفتند. ویژگی‌هایی از سلول‌ها که برای این‌گونه بررسی‌های تمایزی انتخاب شدند عبارت بودند از: اندازه ابعاد سلول‌های پارانشیم پوست و مغز، تعداد ردیف‌های سلولی بافت پارانشیم پوست و مغز و تعداد دانه‌های نشاسته در سلول‌های پارانشیم پوست ومغز.

پس از انجام ریزغده‌زایی از هر تیمار غده‌ها جدا شدند ابعاد آنها اندازه‌گیری شد و از هر تیمار بزرگترین غده‌ها که نشان‌دهنده‌ی پایان تمایزات هریک بود، برای انجام بررسی‌های تکوینی انتخاب شد، نتایج هریک از گروه‌های تیماری در ادامه آمده است.

نتایج اثر غلظت‌های مختلف NH_4NO_3 بر تکوین ریزغده‌ها

پس از برش‌گیری از ریزغده‌های تشکیل شده در غلظت‌های مختلف ۰، $\frac{1}{2}$، ۱، $\frac{3}{2}$ و۲ برابرغلظت استاندارد NH_4NO_3 هر یک از نظر ابعاد سلول‌های پارانشیم پوست و مغز و تعداد در ردیف‌های سلولی هریک آنالیز شدند و تعداد دانه‌های نشاسته هریک شمارش شدند. نتایج آماری حاصل نشان داد که غلظت‌های مختلف NH_4NO_3 بر تعداد ردیف‌های سلولی پارانشیم پوست و مغز اثر معنی‌داری داشته است، بطوریکه درغلظت‌های برابر استاندارد از NH_4NO_3 (1MS) و $\frac{1}{2}$ آن بیشترین تعداد ردیف‌های سلولی را داشته‌ایم و در غلظت‌های کمتر و بیشتر از آن بر تعداد ردیف‌های سلولی کاهش خواهیم داشت (شکل۸). همچنین نتایج آماری نشان داد که غلظت‌های مختلف NH_4NO_3 طول و عرض سلول‌های پارانشیم پوست و مغز اثر معنی‌داری به جای نگذاشته است

شکل ظاهری ریزغده‌ها در این گروه‌ها از گرد تا تخم‌مرغی و رنگهای مایل به تیره دیده شد میانگین ابعاد غده‌ها در تیمارها به تر تیب ۰، $\frac{1}{2}$، ۱، $\frac{3}{2}$ و ۲ بر حسب میلی‌متر (۵/۲ و ۵/۸)، (٦/١ و ٧)، (٦ و ٧/٥)، (٤/٥ و ٥/٢) و (٥/٥ و ٥/٩) بودند نتایج حاصل از شمارش دانه‌های نشاسته نشان داد که در غلظت‌های ۱/۵ و ۱ برابر مقدار استاندارد بیشترین مقدار نشاسته وجود دارد و در غلظت‌های کمتر و بیشتر از این حد اثر کاهشی بر تعداد دانه‌های نشاسته دیده می‌شود (شکل ٦، ٧ و ٩).

نتایج اثر غلظت‌های مختلف KNO_3 بر تکوین ریزغده‌ها

ریزغده‌هایی که در مرحله قبل از محیط‌های القایی ریزغده در غلظت‌های مختلف KNO_3 به دست آمدند. برای بررسی‌های میکروسکوپی، آماده و برش‌گیری شدند، در برش‌های میکروسکوپی، پارانشیم‌های مغزی و پوست از نظر تعداد ردیف‌های سلولی، ابعاد سلول‌ها و محتوای دانه‌های نشاسته، آنالیز شدند و نتایج آنالیزها در شکل‌های ۱۱و۱۲و۱۳و۱٤ آمده است. بررسی آماری نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف KNO_3 بر تعداد ردیف‌های سلولی پارانشیم‌های مغزی و پوست اثرات معنی‌داری دارد و در غلظت ۱/۵ برابر غلظت KNO_3 از مقدار استاندارد بیشترین تعداد لایه‌های سلولی مشهود است (شکل۵) و در غلظت‌های کمتر از آن شبیه ردیف‌های سلولی شاهد است. در بررسی اثر غلظت‌های مختلف KNO_3 بر ابعاد سلول‌های پارانشیم مغزی و پوست شاهد تأثیر معنی‌دار غلظت‌ها بر اندازه ی سلول‌ها بودیم، به طوریکه در غلظت KNO_3، در حد۲ برابر مقدار استاندارد، کاهش ابعاد سلولی را در هر دو مورد پارانشیم پوست و مغز شاهد بودیم. در بررسی محتوای نشاسته برش‌های میکروسکوپی هر غلظت شاهد افزایش تعداد دانه‌های نشاسته در غلظت ۱/۵ برابر مقدار KNO_3 از حد استاندارد بودیم. ویژگی‌های ظاهری ریزغده‌ها در این گروه تیماری نیز از گرد تا کمی کشیده و تخم مرغی با رنگ‌های زرد تا تیره بودند که بیشتر به نوع رقم آن‌ها

بستگی داشت میانگین ابعاد ریزغده‌ها در این تیمارها به ترتیب مقدار غلظت ۰، $\frac{1}{2}$ ، ۱، $\frac{3}{2}$و ۲ به ترتیب برحسب میلی‌متر (۸ / ۵، ۷/۳)، (۹،٦ /۷)، (٦/۵ و ۷/۵)، (٦/۵ و ۸/۵) و (٦ و٦/۵) موجود بودند. نتیجه این که در این گروه در غلظت ۱/۵ برابر استاندارد از KNO_3 بهترین غلظت از نظر ویژگی‌های تکوینی ریزغده‌هاست، چرا که بزرگترین و پرمحتواترین ریزغده را از نظر دانه‌های نشاسته خواهیم داشت که این مسأله با میانگین ابعاد ریزغده‌ها مطابقت دارد (شکل۱۰).

نتایج کلی مطالعات بافت‌شناسی

۱ ـ در مطالعات بافت شناختی ـ تکوینی ریزغده ها، تغییرات غلظت‌های مختلف KNO_3, NH_4NO_3 بر ویژگی‌های سلولی ـ بافتی ریزغده‌ها تأثیرات معنی‌داری می‌گذارد.

۲ـ در غلظت‌های مختلف عناصر پر مصرف مقدار ۱/۵ برابر KNO_3 بیشترین تعداد ردیف‌های سلولی و همچنین بیشترین مقدار محتوای نشاسته را دارد.

۳ـ KNO_3, NH_4NO_3 در غلظت‌های شاهد (MS ۱) و تا نصف مقدار آن نتایج، بهینه در مقایسه با دیگر غلظت‌ها، از نظر ردیف‌های سلولی، ابعاد سلولی و محتوای نشاسته‌ای نشان دادند.

٤ ـ تغییرات غلظت‌های مختلف عناصر بر شکل ظاهری ریزغده‌ها تأثیر ویژه ای ندارد و شکل ریزغده‌ها بیشتر تابع رقم انتخابی آنهاست.

بحث

در این تحقیق گیاه سیب‌زمینی رقم اگریا از دیدگاه بررسی مقاطع میکروسکپی نوری از ریز غده‌های بدست آمده از تیمارهای غلظت‌های مختلف KNO_3, NH_4NO_3 به منظور بررسی روند سلولی تکوینی غده‌های هر تیمار مورد بررسی قرار گرفت.

دیدگاه‌های کلی در تکوین ریزغده‌ها

تشکیل غده‌های سیب‌زمینی از دونظر مورد توجه است: یکی نمو ریخت شناختی غده‌ها و دیگری تغییرات بیوشیمیایی که منجر به تشکیل و ذخیره نشاسته می‌شود. تغییرات بیوشیمیایی طی سال‌های گذشته مورد مطالعه زیادی قرار گرفته است، اما تغییرات ریخت شناسی تاکنون کمتر مورد مطالعه بوده است.

تکوین و ساختار غده سیب زمینی توسط پژوهشگران مختلف از جمله Cutter, 1978; Xu, 1998 مورد بررسی قرار گرفته است.

یافته‌های بیوشیمیایی طی فرایند غده زایی نشان داده است که ساخت نشاسته قبل از حجیم شدن ریزغده‌ها آغاز می‌گردد. مطالعه حجیم شدن سلول‌ها و تقسیمات میتوزی سلول‌ها، کلیدی برای روشن شدن چگونگی تبدیل رشد طولی استولون به رشد شعاعی است. اولین علائم ریزغده‌زایی که تا حد زیادی هم زمان در مریستم‌های القاء شده دیده می‌شود، حجیم شدن سلول‌های پارانشیم پوستی در اثر توسعه واکوئل‌های آنها می‌باشد.

تقسیم سلولی و حجیم شدن سلول ها، هر دو در نمو غده‌ها دخالت دارند (شکل۱۵). روشن نیست که آیا توسعه اولیه استولون نتیجه تقسیم سلولی است یا حجیم شدن سلول ها. شماری از پژوهشگران، گزارش کرده اند که قبل از افزایش ابعاد سلول ها، فعالیت میتوزی رخ می‌دهد. سایر مشاهدات نشانگر آن است که توسعه شعاعی اولیه ناشی از افزایش قطر سلول‌ها است.

عبادی (۱۳۸۰) طی مطالعه سلول‌های اپیدرمی در برش‌های طولی نشان دادند که درفاصله میانگره‌های در حال حجیم شدن در ردیف سلول‌های اپیدرمی بافت پریدرمی به سرعت تمایز می‌یابد. فلوژن با منشأ اپیدرمی فعالیت خود را به صورت تقسیمات پری کلینال نا متقارن آغاز می‌کند که منجر به تشکیل دو ردیف سلولی می‌گردد. لایه خارجی ازسلول‌های کوچک و لایه داخلی از سلول‌های بزرگتر تشکیل شده‌اند. سلول‌های لایه خارجی ضمن حجیم شدن به فعالیت تکثیر خود ادامه می‌دهد و سلول‌های ردیف خارجی تر را می‌سازد. دیواره‌های سلولی در این بافت به سرعت به چوب پنبه آغشته می‌شوند و می‌میرند. پارانشیم پسین بسیار محدودی از فعالیت فلوژن شکل می‌گیرد. مجموعه فلم، فلوژن و فلودرم آرایش منظم، ردیفی و شعاعی دارند. پریدرم به صورت پوششی محافظ از تبخیر آب بافت‌های

درونی جلوگیری می‌کند. در بخش‌های مسن بافت‌های پریدرمی عدسک‌ها شکل می‌گیرد.

میزان فعالیت فلوژن، تعیین کننده ضخامت فلم است و بستگی به رقم سیب زمینی و شرایط محیطی دارد ظاهراً بافت فلودرمی (پوست پسین) از فلوژن نمو می‌یابد (Lyshede, 1977). این دیدگاه در تضاد با نتایج پژوهش عبادی (۱۳۸۰) است که می‌تواند خود نتیجه تفاوت‌های ژنوتیپی رقم‌ها یا تفاوت در شرایط کشت در شیشه و موجود زنده باشد.

روند افزایش تعداد سلول‌ها در محور طولی و عرضی ریزغده‌ها مشابه با تغییرات ابعاد ریزغده هاست. نتایج بدست آمده در این پژوهش نیز از نظر هم راستا بودن ابعاد ریزغده‌ها با افزایش تعداد ردیف‌های سلولی پارانشیم‌های پوست و مغز و همچنین با ابعاد سلول‌ها، با مطالعات عبادی (۱۳۸۰) همخوانی دارد.

پژوهش‌ها در این زمینه که افزایش اندازه سلول‌ها همگام با افزایش اندازه غده‌ها می‌باشد، از سوی Reeve et al. (1973) نیز مورد تأیید قرار گرفته و نشانگر اهمیت زیاد حجیم شدن سلول‌ها در رشد غده‌ها می‌باشد.

نقش عناصر پرمصرف در تکوین و تغییرات ریزغده‌ها

هرچند تاکنون به مسأله نقش عناصر پر مصرف در ریزغده‌زایی گیاه سیب‌زمینی درشیشه پرداخته نشده است و نتایج و بررسی پژوهشگران در این زمینه در دسترس نیست، شاید با دلایل مشابه و نقش عناصر در روند تقسیمات سلولی و رشد بتوان به بحث و بررسی این نتایج دست یافت.

نقش ازت

در مورد نتایج نقش ازت در مطالعات بافت‌شناختی ریزغده‌ها به این نتیجه رسیدیم که با وجود اینکه ازت در غلظت‌های بالای استاندارد (۱/۵ برابر) در تعداد ریز غده‌ها افزایش معنی داری می‌گذارد یعنی به عبارتی ریزغده‌زایی را تحریک می‌کند، اما غلظت مقدار ازت در مقادیر بیشتر از حد استاندارد آن از نظر ویژگی‌های بافت شناختی ریزغده‌های حاصل سبب کاهش در تعداد ردیف‌های سلولی و ابعاد و محتوای نشاسته‌ای آن‌ها دارد که با ابعاد ریزغده‌ها مطابقت دارد. از آنجا که نقش ازت در بافت‌ها بستگی زیادی با فعالیت فتوسنتزی گیاه دارد، تغذیه ازتی را به شرایطی وابسته می‌کند، زیرا از طریق گلوسیدهای محلول حاصل از فتوسنتز، اسیدهای ستونی ساخته می‌شوند که داخل شدن ازت در اسیدهای آمینه را ممکن می‌سازد واز سمیت ان میکاهد. با این حال، کافی نبودن قندها در تغذیه آمونیاکی نسبت به نیتریک نتایج بسیار نامطلوبی به بار می‌آورد در نتیجه زیادی یون‌های NH_4^+ دریاخته‌ها نسبت به یون‌های NO_3^- سمیت خیلی بیشتری تولید می‌کند و موجب ایجاد اختلالاتی در تراوایی آن‌ها می‌شود که هنوز به خوبی مشخص نشده‌اند. بدین سان مشاهدات کشاورزی در مورد رابطه بین فتوسنتز و تغذیه آمونیاکی چنین بیان می‌شود: وقتی فتوسنتز ضعیف است، سمیت یون‌های NH_4^+ به مراتب مشخص است.

شاید بتوان از این مسئله در مورد ریزغده‌زایی در شیشه الهام گرفت، از آنجا که بافت ریزغده یک بافت مصرفی و غیرفتوسنتزی است. به علت کمبود اسیدهای ستونی در نتیجه تجمع ازت، اثرهای سمیت و کاهش رشد تقسیمات سلولی وابعاد سلول‌ها را به دنبال داشته باشد. چرا که در غلظت برابر استاندارد MS (۱MS) و حتی کمتر از آن، رشد بهبود می‌یابد.

نقش پتاسیم

در بررسی‌های بافت شناختی ریز غده‌ها به این نتیجه رسیدیم که پتاسیم در غلظت ۱/۵ برابر حالت استاندارد اثر مطلوبی بر رشد سلول‌ها و تقسیمات آن و تجمع دانه‌های نشاسته می‌گذارد. در بررسی این نتایج بهتر است به نقش پتاسیم در سلول‌ها بپردازیم. مطالعات مختلف پژوهشگران نشان می‌دهد که پتاسیم به صورت یون k^+ باقی می‌ماند و تحرک بسیار بالایی دارد (Westermann, 2005). این عنصر به مقدار بالا در گیاه سیب زمینی (invivo) یافت می‌شود به طوریکه مقدار آن نسبت به سایر یون‌ها خصوصاً Ca خیلی بیشتر است.

بیشتر مواد معدنی که در فلوئم در حال حرکت هستند سرانجام در غده‌ها ذخیره خواهند شد وی همچنین بیان دارد محدوده ی کافی از عناصر معدنی

تا حد تشکیل و رشد غده‌ها نیاز است و مقادیر بیشتر از آن در طی بلوغ غده‌ها مؤثر است (Westermann, 2005).

پتاسیم در مایعات درون یاخته‌ای، بخصوص در واکوئل، محلول است و در آنجا غالباً باغلظتی ده‌ها برابر غلظت محیط جمع می‌شود. فراوانی و تحرکش آن را به صورت مهمترین کاتیونی در می‌آورد که باعث ایجاد فشار اسمزی و در نتیجه واکوئلی است.

در پژوهش انجام شده با رشد پارانشیم مغزی از نظر ابعاد، در غلظت بالای پتاسیم مواجه بودیم که با توسعه واکوئلی در سلول‌های پارانشیم مغز که همسو با بالاترین ابعاد سلول‌ها در قیاس با سلول‌های پارانشیم پوست است، قابل توجیه است.

پتاسیم در سنتز پروتئین‌ها از اسیدهای آمینه دخالت می‌کند چنانکه هنگام کمبود پتاسیم، تجمع اسیدهای آمینه مشاهده می‌شود (آنزیمی که آمینو اسیدها را بر روی tRNA منتقل می‌کند به پتاسیم نیاز دارد) و در نتیجه پروتئین‌ها در رشد و افزایش حجم سلول و همچنین تقسیم آن دخالت دارند. نقش دیگر پتاسیم در سلول‌ها، دخالت در سنتز پلی‌اوزیدها، ازاوزها است، چنانکه در کمبود پتاسیم تجمع اوزها مشاهده می‌شود. این مسئله نیز در این تحقیق با تجمع دانه‌های نشاسته که مربوط به ساخته شدن نشاسته است، با افزایش میزان پتاسیم مطابقت دارد و بالاخره پتاسیم در فعال کردن بعضی کینازها و در نتیجه در مصرف فسفات‌ها و انتقال انرژی دخالت می‌کند.

منابع

احمدیان، ش. عبدمیشانی، س. زرغامی، ر. (۱۳۷۴) تولید ریزغده‌های عاری از ویروس سیب‌زمینی از طریق کشت بافت. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

ارجمندی قهستانی، ا. زرغامی، ا. (۱۳۷۶) بررسی امکان غده‌زایی در دو رقم دراگا و اگریای سیب‌زمینی با استفاده از روش کشت مریستم انتهایی در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی. دانشگاه ابوعلی سینای همدان.

ضرغامی، ر. بلندی، ا. (۱۳۸۳) تکثیر گیاهچه‌های سالم از طریق کشت بافت در سیب‌زمینی. سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. موسسه تحقیقات و آموزش کشاورزی. صفحه ۱۵ تا ۳۰.

عبادی، م. (۱۳۸۰) بررسی روند تکوینی ـ سلولی گیاه سیب‌زمینی *Solanum tuberosum* در کشت بافت، سلول و بیوراکتورهای نیمه پیوسته و پیوسته. رساله دکتری. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات.

Cutter, E. G (1978) Structure and development of the potato plant. 70 – 152. Chapman & Hall

Dobranszki, J. Iabori, KM. Ferenczy, A. (1999) Light and genotype effects on invitro tuberization on potato plantlets. Potato Research. 42: 3- 4, 483–488.

Gopal, J. Minocha, J.L., (1997) Effectiveness of Selection at Microtuber crop level in Potato. plant breeding. 115: 293 - 295.

IslamKawakami, J. Hasegawa, T. Jituyama, Y. (2004) Growth and yield of Potato Plants grown from microtubers in fields. American Jouranal of Potato Research. 80: 6, 371-378.

Liu, Jun. Song, Botato. Et al. (2002) Total RNA variation during microtuber induction of potato (*Solanum tuberosum*. L).

Lyshede O. B. (1977) Studies on the periderm and epidermis of the potato tuber solanum tuberosum L.cv. <bintje>, PP68-74 "yearbook of the royal veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark.

Reeve, R.M, et al. (1973) parenchyma cell growth in Potato tubers. I. Different tuber regions. American potato Journal. 50, 49-57**.**

Seabrook, J.E.A. Douglass, L.K. Arnold, DA. (2004) Effect of leaves on microtubers produced from potato single-node cuttings invitro. American Journal of Potato Research. 81: 1, 1-5.

Wang, P.J, C.Y. Hu. (1982) In vitro mass tuberization and virus-free seed-potato production in Taiwan.Am. Potato J. 59: 33-37.

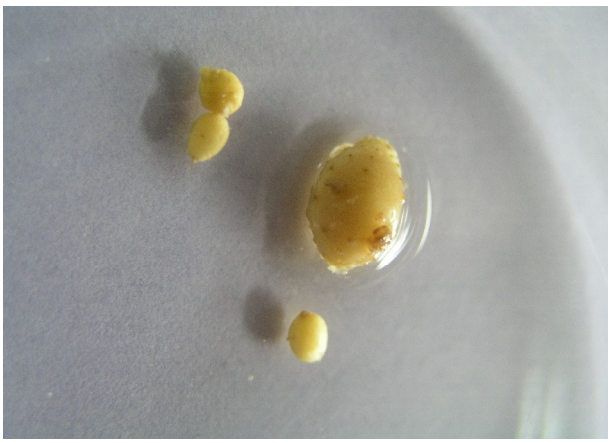
Westermann, DT. (2005) Nutritional Requirements of potato. American Journal Potato Research. Online.

Xu, X., et al. (1998) Cell division and cell enlargement during poyato tuber formation. Journal of Experimental botany. 573-582; 24.

شکل۱. کشت جوانه‌های غده بذری شش هفته پس از کشت

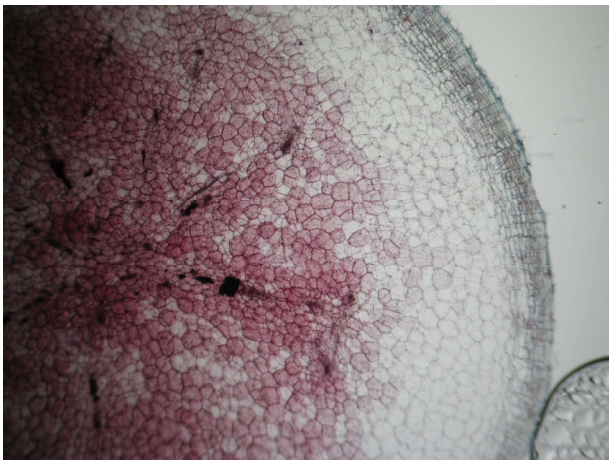
شکل۲. کشت تک گره‌های ساقه‌های هوایی دو هفته پس از کشت

شکل ۳. شاخه‌زایی از قطعات ساقه‌ای ۲-۳ گره‌ای از گیاهچه‌های استریل

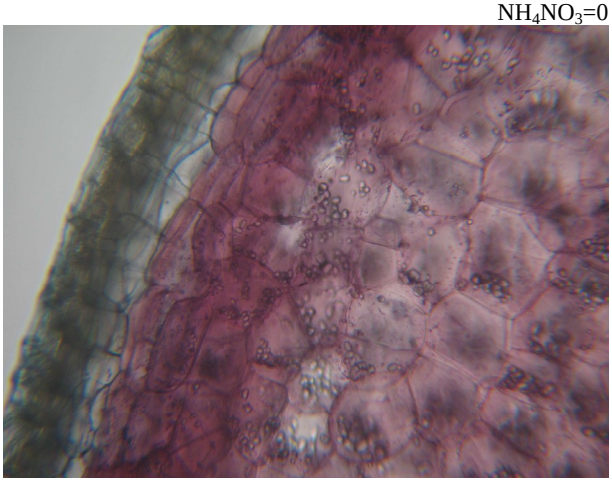


شکل٤. ریز غده‌زایی در تیمار NH_4NO_3

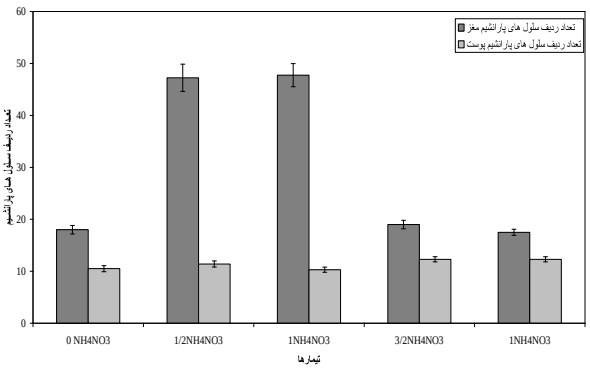
شکل ۵. ریز غده‌زایی در تیمار $KN0_3$=3/2



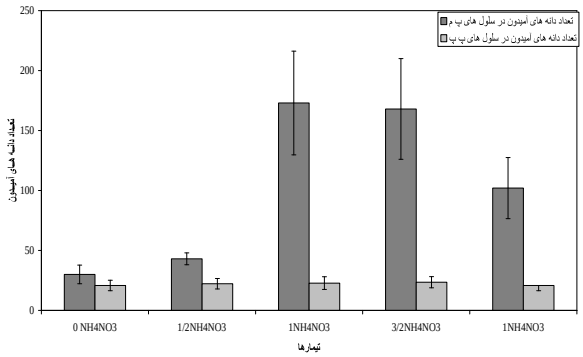
شکل ٦. کاهش تعداد دانه‌های نشاسته در تیماری با غلظت NH_4NO_3=0



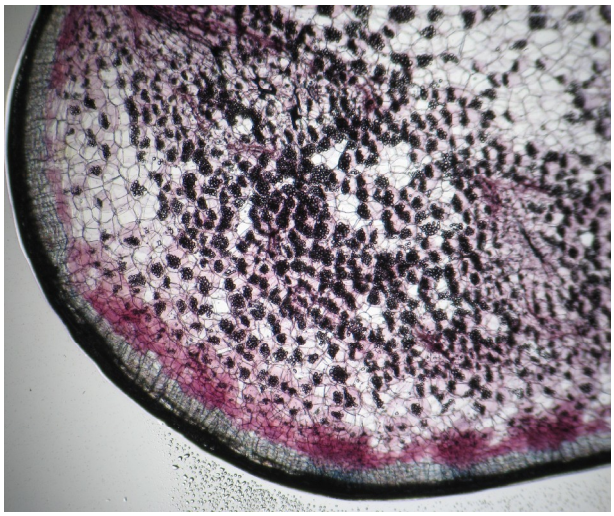
شکل ۷. کاهش در ردیف‌های سلولی در تیماری با غلظت NH_4NO_3=2



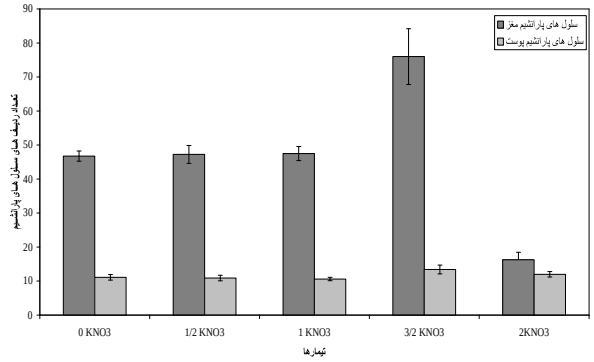
شکل ۸. اثرات غلظت‌های مختلف NH_4NO_3 بر تعداد ردیف‌های سلول‌های پارانشیم پوست و مغز



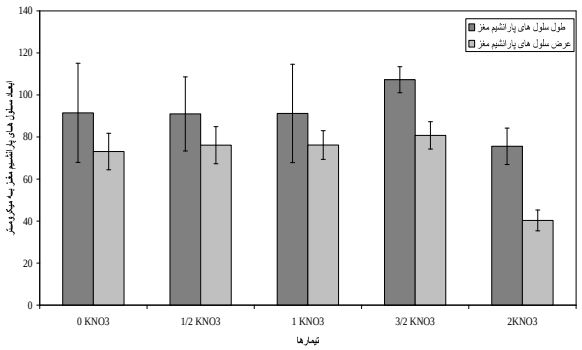
شکل۹. اثرات غلظت‌های مختلف NH_4NO_3 بر تعداد دانه‌های نشاسته درپارانشیم مغز



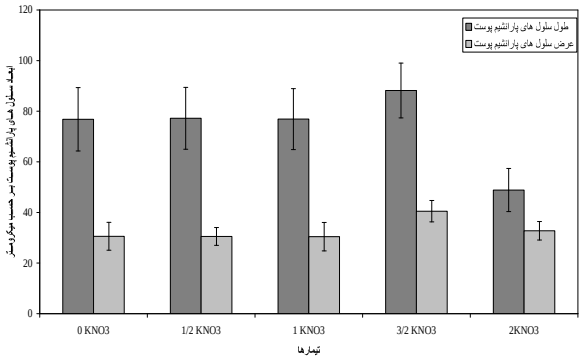
شکل ۱۰. افزایش ردیف‌های سلولی و میزان دانه‌های نشاسته در تیمار KNO_3=3/2



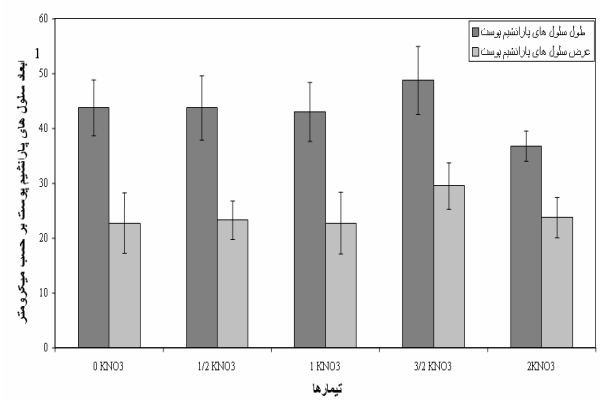
شکل۱۱. اثرات غلظت‌های مختلف KNO_3 بر تعداد ردیف‌های سلول‌های پارانشیم پوست و مغز



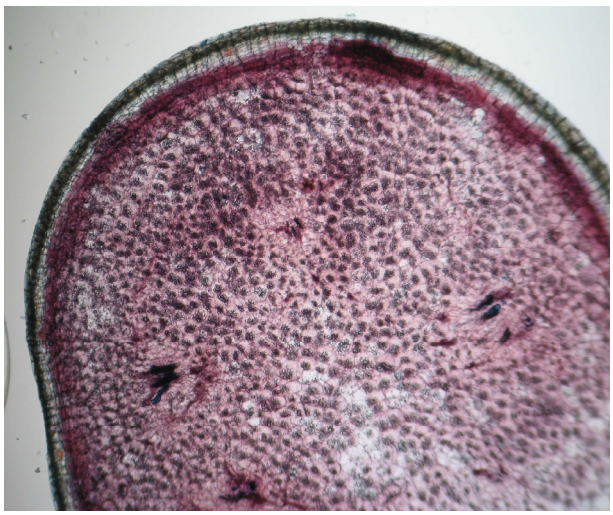
شکل۱۲. اثرات غلظت‌های مختلف KNO_3 بر ابعاد سلول‌های پارانشیم مغز



شکل۱۳. اثرات غلظت‌های مختلف KNO_3 بر ابعاد سلول‌های پارانشیم پوست



شکل۱٤. اثرات غلظت‌های مختلف KNO_3 بر تعداد دانه‌های نشاسته در پارانشیم مغز و پوست



شکل ۱۵. در برش عرضی ریز غده‌ها بخش‌های عمده پارانشیم مغز و پوست هستند.

The effects of different concentrations of NH_4NO_3 and KNO_3 on developmental-cellular variation of microtubers in *Solanum tuberosum* L. var agria *In vitro* conditions.

Zare, Z.[1], Iranbakhsh, A.[2], Ebadi, M.[3]

1. Department of biology Islamic Azad University----------, Iran
2. Department of biology Islamic Azad University-Garmsar branch, Garmsar, Iran
3. Department of biology Islamic Azad University-Damghan branch, Damghan, Iran

Abstract:

The potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important agricultural plants in the world. Today, potato is the fourth most important food crop in the world after wheat, rice and corn. It is propagated predominantly by asexual method (tubers and minitubers). However, propagation by true seed is primarily used for breeding purposes (enhancement of breeding populations) and genetic studies. The traditional methods for asexual propagation of the plant face important problems including contamination of tubers and plants and decreased crops. Therefore, the seed tubers can be replaced by micrutubers produced by tissue culture. In this study solid and culture media used for produce of sterile plantlets and microtuberization. The aim of this study is search about effect of different concentrations of NH_4NO_3 and KNO_3 in media culture Invitro in histological/ cellular variations of the microtubers. The concentrations of 0, 1/2, 1, 3/2 and 2 times more than standard concentrations of the above mentioned compounds in MS medium were used in separate induction media. The results showed that the alternating light and darkness is more suitable for the variety Agria and the samples kept in absolute darkness demonstrated no microtuberization in this study. Sections for light microscopy were prepared from microtubers in each sample after their dimensions were measured and morphological studies carried out. The aim was to study the histological aspects of samples. The number of cell rows, the dimensions of the cells and the starch content of the parenchymal tissues of microtuber's pulp and the cortex were analyzed. The results again showed significant variations in histological features of the microtubers developed in media containing different concentrations of macronutrients. In this study, KNO_3 with concentrations of 1.5 times more than standard concentration in MS medium yielded maximum number of cell rows and maximum starch granules content which were proportional to the average dimensions of microtubers. NH_4NO_3, with concentrations of 1/2 to 1 time more than standard concentrations in MS medium yielded a better differentiation of parenchymal tissues than other concentrations.

Key words: In vitro, KNO_3, Microtuberization, NH_4NO_3, Solanum tuberosum, Tissue culture