**مقاله علمی پژوهشی**
مجله دوفصل نامه
**مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی**
**ISSN 2588-5073** چاپی
**ISSN 2588-5081** الکترونیکی
**دوره ۱۱، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۱**
**صفحه ۱۴۰-۱۳۱**

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1401.11.1.12.9

**DOR:20.1001.1.25885073.1401.11.1.12.9**

**Genetic Engineering and Biosafety Journal**
**Volume 11, Number 1**
**2022**

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

# بررسی اثر تیمارهای مختلف القاکننده رشد کند در شرایط درون شیشه‌ای به منظور حفاظت میان مدت ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی بانک ژن گیاهی ملی ایران

# Investigation of different slow-growth inducing treatments for *in vitro* conservation of potato genotypes from national plant-gene bank of Iran

رویا بهاری[۱]، نازنین امیربختیار[۲]، معصومه عمادپور[۱*]
**Roya Bahari[1], Nazanin Amirbakhtiar[2], Masoumeh Emadpour[1*]**

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

1. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University (TMU), Tehran, Iran
2. Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

*Corresponding Author, Email: m.emadpour@modares.ac.ir
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۵/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۳)

## چکیده

**حفظ ژرم‌پلاسم سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) با توجه به نقش این گیاه در تامین امنیت غذایی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. با توجه به هتروزیگوسیتی بالای سیب‌زمینی و تفرق شدید در نتاج حاصل از تولیدمثل جنسی، ضروری است که از تکثیر غیرجنسی برای حفظ ریخته ارثی ژنوتیپ‌های منتخب استفاده شود. گرچه کشت درون‌شیشه‌ای، روشی کارآمد برای نگهداری منابع ژنتیکی سیب‌زمینی است ولی تحت شرایط بهینه نگهداری، به دلیل رشد سریع گیاهان، واکشت‌های متعدد نیاز است. از آنجا که این امر منجربه افزایش هزینه‌ها و افزایش احتمال وقوع تنوع سوماکلونال می‌شود، بنابراین ایجاد شرایط رشد حداقل در گیاهان تحت نگهداری در شرایط درون‌شیشه‌ای ضروری به نظر می‌رسد. در پژوهش حاضر به منظور یافتن بهترین تیمار موثر بر کاهش سرعت رشد ریزنمونه‌ها با حداقل اثر منفی بر آنها، اثر دو نوع آگار شامل آگار-آگار و آگار شیرینی‌پزی، اثر دو عامل اسموتیک سوربیتول و مانیتول در دمای ۶ درجه سانتی‌گراد بر سه ژنوتیپ سیب‌زمینی مورد بررسی قرار گرفت. ریزنمونه‌ها به مدت ۹ ماه بدون واکشت تحت تیمارهای رشدکند نگهداری شده و صفات طول اندام هوایی، تعداد جوانه بالقوه و وضعیت گیاهچه‌ها ثبت شد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که در هر سه ژنوتیپ تحت بررسی، تیمار سوربیتول (در ترکیب با آگار-آگار یا آگار شیرینی‌پزی) در دمای ۶ درجه به دلیل داشتن طول گیاهچه کمتر و وضعیت گیاهچه مطلوب و همچنین داشتن تعداد جوانه کافی جهت واکشت، تیمار برتر جهت نگهداری میان‌مدت ژرم‌پلاسم سیب‌زمینی است.**

**واژه‌های کلیدی**

سیب‌زمینی،
کشت درون‌شیشه‌ای،
حفظ ژرم‌پلاسم،
عوامل اسموتیک،
رشد کند

[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.12.9 ]

**Genetic Engineering and Biosafety Journal**
**Volume 11, Number 1, 2022**

## Abstract

Conservation of potato germplasm (*Solanum tuberosum* L.) is of great importance due to its role in providing food security. Considering high heterozygosis of potato and severe segregation in the progeny obtained from sexual reproduction, it is necessary to use asexual propagation to maintain selected genotypes. Although *in vitro* culture is an efficient method for maintaining potato genotypes, rapid growth of plants under optimum growth conditions, makes multiple subcultures necessary to be done. The later leads to increased costs and an increase in the probability of somaclonal variation. Therefore, it seems to be necessary to induce slow growth in plants maintained under *in vitro* conditions. In the current research the aim was to find out the best *in vitro* treatment for reducing the growth of potato shoots with the least negative effect on them. To approach the aim, two types of agar (including agar-agar and confectionery agar) and two osmotic agents (including sorbitol and mannitol) were evaluated on three potato genotypes in 6℃. The traits of shoot length, number of possible buds and microplant condition were recorded after 9 months. The results of data analysis showed that in all the three investigated genotypes, sorbitol osmotic agent (in combination with agar-agar or confectionery agar) at the temperature of 6 ℃ was the best treatment for medium-term storage of potato germplasm. It was mainly due to having the least shoot length, good microplant condition and also having enough buds for subsequent subcultures.

**Key words:** Potato, *in vitro* culture, germplasm conservation, osmotic agents, slow growth

## مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) مهم‌ترین محصول غده‌ای در جهان و منبع کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها وموادمعدنی است و در صنعت نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Khoury *et al.* 2014; Kraak 1992). در سیب‌زمینی زراعی که تتراپلوئید و به شدت هتروزیگوت است، تکثیر جنسی و تولید بذر به تفرق شدید در نتاج منجر می‌شود، بنابراین نیاز است که کولتیوارها یا لاین‌های والدی الیت به طریق غیرجنسی حفظ شوند. نگهداری ژرم‌پلاسم سیب‌زمینی به طریق غیرجنسی در مزرعه علاوه بر اینکه فضا و نیروی کار زیادی می‌طلبد، گیاه را در معرض شرایط نامساعد محیطی، آفات و بیماری‌ها قرار می‌دهد. بنابراین، ترجیح بانک‌های ژن، حفظ و نگه‌داری کلون‌ها یا لاین‌های والدی الیت در شرایط درون شیشه‌ای است (Gopal *et al.* 2002).

امروزه، کشت درون‌شیشه‌ای به عنوان یک روش کارآمد جهت تکثیر و حفاظت از منابع ژنتیکی گونه‌های گیاهی با تکثیر رویشی است (Arbeloa *et al.* 2015). در شرایط درون شیشه‌ای، گیاه در محیطی عاری از عوامل تهدیدکننده مانند آفات و عوامل بیماریزا، شرایط آب و هوایی و سیل و خشکسالی رشد می‌کند. همچنین این تکنیک اجازه می‌دهد تا تعداد زیادی نمونه در محیط کوچک حفظ شوند که به کاهش هزینه‌های نگهداری و فضای مورد نیاز کمک می‌کند (Barrueto Cid 2001) با این حال، مدیریت گیاهان آزمایشگاهی به دلیل ضرورت انتقال دوره‌ای گیاهان به ظروف جدید و محیط تازه طی فرایند واکشت همزمان با کاهش سطح مواد مغذی وکاهش فضای مورد نیاز برای رشد، نیروی کار زیادی را طلب می‌کند (Engelmann 1991).

یکی از راه‌های نگهداری مواد گیاهی در شرایط کشت درون شیشه‌ای، روش رشد آهسته یا حداقل رشد است که در آن سوخت و ساز گیاه کاهش یافته و بدین ترتیب فاصله بین واکشت‌ها افزایش می‌یابد. به‌علاوه، کاهش تعداد واکشت‌ها سبب کاهش احتمال ایجاد تنوع سوماکلونال و افزایش ثبات ژنتیکی می‌شود (Peredo *et al.* 2006). ایجاد رشد کند در گیاهان درون‌شیشه‌ای به منظور افزایش فواصل واکشت توسط عوامل فیزیکی و شیمیایی قابل انجام است که به طرز موفقیت‌آمیزی جهت نگهداری تعداد



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.12.9 ]

زیادی از گیاهان تاکنون به‌کار رفته است (Keller *et al.* 2006; Rao 2004; Uyoh *et al.* 2003).

از میان عوامل مهم فیزیکی موثر در سرعت رشد می‌توان به دما، نور (فتوپریود و شدت نور) و اندازه ظروف مختلف کشت اشاره کرد. بر اساس مطالعات انجام شده، استفاده از دمای پایین برای ایجاد رشد کند در گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای موفقیت‌آمیز بوده است و موفقیت در این روش به گونه گیاهی، ریزنمونه اولیه، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و عوامل اسموتیک به کار رفته بستگی دارد (Cha-um and Kirdmanee 2007). عوامل شیمیایی موثر در ایجاد رشد حداقل، شامل غلظت اجزای محیط کشت، تاخیراندازهای رشد گیاهی و ترکیبات اسموتیک هستند. کاهش غلظت اجزای محیط کشت به نصف یا یک چهارم غلظت سبب کاهش جذب مواد مغذی و کندی رشد در گیاه سوسن می‌شود (Bonnier and Tuyl 1997). تاخیراندازهای رشد گیاهی شامل ABA (Abscisic acid) و گروه Anti-GA (Anti-gibberellic acid) نیزبه عنوان بازدانده‌های رشد گیاهی به کار رفته‌اند. به‌علاوه، ایجاد محدودیت در آب در دسترس یا ایجاد شرایط خشکی با استفاده از عوامل اسموتیک، روش دیگری برای کاهش سرعت رشد در گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای است. چندین عامل اسموتیک شامل مانیتول، سوربیتول و پلی‌اتیلن گلایکول به منظور ایجاد رشد کند در گیاهان مختلف به کار رفته‌اند (Cha-um and Kirdmanee 2007).

مونز و همکاران (۲۰۱۹) به منظور نگهداری ژرم‌پلاسم سیب‌زمینی در شرایط رشد کند در کشت درون‌شیشه‌ای، اثر محیط کشت MS همراه با سوربیتول یا مانیتول با غلظت‌های ۲۰، ٤٠ و ٦٠ گرم بر لیتر و اسید جیبرلیک ۰/۲ گرم بر لیتر را با ردیابی میزان طویل شدن شاخساره و درصد مرگ و میر، نسبت برگ‌های پیر و انواع ناهنجاری‌ها به صورت هفتگی بررسی کردند. بر اساس نتایج این محققین، تیمار سوربیتول به میزان ۲۰ گرم بر لیتر سبب کاهش سرعت رشد بدون ایجاد مرگ و میر و یا ناهنجاری ظاهری شد. گرچه غلظت‌های ٤٠ و ٦٠ گرم بر لیتر سوربیتول یا مانیتول سبب کاهش بیشتر در رشد گیاهان شد، اما این کاهش در رشد با افزایش مرگ و میر گیاهان همراه بوده و بنابراین برای نگهداری سیب‌زمینی در شرایط رشد کند توصیه نشدند (Muñoz *et al.* 2019).

در بررسی انجام شده بر روی اثر تنظیم کننده‌های اسمزی در نگهداری ژرم‌پلاسم جینسنگ برزیلی (*Pfaffia glomerata*)، سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) و کاساوا (*Manihot esculenta*) در شرایط درون‌شیشه‌ای برای کاهش سرعت رشد گیاه و طولانی کردن دوره کشت، مشخص گردید که سوربیتول در غلظت‌های ۲۰ و ٤٠ گرم بر لیتر رشد شاخساره را به تأخیر می‌اندازد و می‌تواند تیمار مناسبی برای ایجاد رشد کند در سیب زمینی و جینسنگ برزیلی در شرایط کشت درون شیشه‌ای باشد. برای حفظ ژرم‌پلاسم‌های کاساوا، مانیتول در غلظت ۲۰ گرم در لیتر به عنوان یک تنظیم‌کننده اسمزی مناسب بود (Luz *et al.* 2013).

در بررسی انجام شده توسط وتورازی و همکارن (۲۰۱۷)، اثر ٤ غلظت نمکی در محیط MS (۰، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ درصد)، چهار غلظت ساکارز (۰، ۱، ۲ و ۳ درصد) و دو سطح دمایی (۲۷±۲°C و ۲±۱۸°C) در ایجاد رشد کند در ۳۰ نمونه ژنتیکی سیب‌زمینی شیرین مورد آزمایش قرار گرفت. بهترین نتیجه با غلظت کامل (۱۰۰ درصد) مواد معدنی MS، ساکارز ۲ درصد، دمای ۲۷±۲°C و واکشت هر ۱۸۰ روز یکبار حاصل شد (Vettorazzi *et al.* 2017).

دیواکاران و همکاران (۲۰۰٦) توانستند با استفاده از محیط کشت MS و به کار بردن ۱۵ گرم در لیتر ساکارز و مانیتول، گیاهچه‌های وانیل را در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یکسال بدون نیاز به واکشت حفظ نمایند (Divakaran *et al.* 2006).

ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی موجود در کلکسیون درون‌شیشه‌ای بانک ژن گیاهی ملی ایران تحت شرایط نگهداری فعلی، به طور متوسط هر ٦ تا ۸ هفته یکبار واکشت می‌شوند که علاوه بر افزایش احتمال ایجاد تنوع سوماکلونال و افزایش هزینه‌های مربوط به تهیه محیط کشت جدید، نیروی کار زیادی نیز می‌طلبد. تحقیق حاضر برای اولین بار به منظور تعیین بهترین تیمار موثر بر کاهش رشد ریزنمونه‌ها با حداقل اثر منفی بر آن‌ها بر روی سه ژنوتیپ سیب‌زمینی تحت نگهداری در بانک ژن گیاهی ملی ایران انجام شد. همچنین، اثر آگار شیرینی‌پزی در نگهداری ژرم‌پلاسم سیب‌زمینی با



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.12.9 ]

توجه به بهای پایین‌تر آن در مقایسه با آگار-آگار و به منظور صرفه‌جویی در هزینه‌های نگهداری، برای نخستین بار بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق از گیاهچه‌های ٦-٨ هفته‌ای سه ژنوتیپ سیب‌زمینی که تحت نگهداری در کلکسیون درون‌شیشه‌ای بانک ژن گیاهی ملی ایران هستند، به عنوان ریزنمونه تهیه شد. از این گیاهچه‌ها، که در محیط MS کامل همراه با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و حاوی ۷ گرم در لیتر آگار-آگار رشد کرده‌اند، ریزنمونه‌های تک گره‌ای از اندام هوایی جدا شده و به محیط کشت مورد آزمایش موجود در لوله‌های آزمایش (ارتفاع ۲۰۰ mm و قطر ۲۰ mm) منتقل شدند. از درپوش پنبه‌ای جهت بستن لوله‌های حاوی محیط کشت استفاده شد (Lentini *et al.* 1988; McClelland and Smith 1990).

آزمایش به صورت فاکتوریل با چهار فاکتور در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد که هر تکرار شامل یک ریزنمونه بود. فاکتورهای آزمایشی عبارت بودند از ژنوتیپ (فاکتور اول) در سه سطح شامل دو کلون پیشرفته ایرانی ۳۳٦/۰۲ و ۰۰۱۸۲ و رقم هلندی آگریا، نوع آگار (فاکتور دوم) در دو سطح شامل آگار-آگار و آگار شیرنی‌پزی هر کدام به میزان ۷ گرم در لیتر، عامل اسموتیک (فاکتور سوم) در دو سطح شامل ترکیب ساکارز به میزان ۲۰ گرم در لیتر و سوربیتول به میزان ٤۰ گرم در لیتر و نیز ترکیب ساکارز به میزان ٤۰ گرم در لیتر و مانیتول به میزان ۲۰ گرم در لیتر و دمای محیط (فاکتور چهارم) در دو سطح ٦ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد. نمونه ها به مدت ۹ ماه در شدت نور $۲۰\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ و فتوپریود ۸:۱٦ (روشنایی:تاریکی) نگهداری شدند. در ماه نهم، صفات طول اندام هوایی و تعداد جوانه بالقوه اندازه‌گیری شد. از آنجا که در گیاه سیب‌زمینی امکان رشد یک جوانه از کنار هر برگ وجود دارد، تعداد برگ‌ها، به‌عنوان شاخصی از تعداد جوانه‌های بالقوه شمارش شد. علاوه براین، وضعیت ظاهری گیاهچه‌ها به صورت مرده (۰)، خیلی ضعیف (۱)، ضعیف (۲)، متوسط (۳)، خوب (٤) و خیلی خوب (۵) امتیازدهی شد (Gopal *et al.* 2002). در نهایت، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای صفات کمی و محاسبه آماره نما (Mode) برای صفات ظاهری با استفاده از نرم‌افزار R انجام گرفت.

## نتایج و بحث

در مطالعه حاضر، علاوه بر بررسی کارایی رشد کند ایجاد شده با استفاده از تنش اسمزی القاءشده توسط سوربیتول یا مانیتول برای حفاظت درون شیشه‌ای سیب‌زمینی در دو دمای ۲۲ و ٦ درجه سانتی‌گراد، بررسی امکان استفاده از آگار شیرینی‌پزی به جای آگار-آگار جهت نگهداری ژرم‌پلاسم سیب‌زمینی در شرایط درون شیشه‌ای نیز مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت ۵ ماه از آزمایش، در نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد تحت تیمارهای مختلف در هر سه ژنوتیپ تحت بررسی، محیط کشت به شدت آب از دست داده و رو به اتمام بوده و بیشتر نمونه‌ها در حال خشک و نکروزه شدن بودند (شکل ۱). این نمونه‌ها قابلیت نگهداری تا ۹ ماه را نداشتند. با این وجود، در صورتی که از ظروف نگهداری بزرگ‌تر و مقدار بیشتری محیط کشت استفاده شود این امکان وجود دارد که این نمونه‌ها را به‌توان مدت طولانی‌تری در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد (Westcott 1981a; Westcott 1981b). بنابراین در پژوهش حاضر، نمونه‌های تحت نگهداری در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد از آزمایش حذف شده و آزمایش با نمونه‌های تحت نگهداری در دمای ٦ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت.

برای دو صفت طول اندام هوایی و تعداد جوانه بالقوه، ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro مورد بررسی گرفت. با توجه به انحراف از توزیع نرمال، لگاریتم طبیعی داده‌های اصلی گرفته شده و پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌های حاصله، تجزیه واریانس انجام شد. نتایج تجزیه واریانس برای صفت طول اندام هوایی نشان داد که تفاوت بسیار معنی‌داری (در سطح یک درصد) بین ژنوتیپ‌های مختلف در پاسخ به تیمارهای مورد بررسی وجود داشت. همچنین اثر نوع عامل اسموتیک بر صفت طول اندام هوایی بسیار معنی‌دار (در سطح یک درصد) بود. در حالی که اثر نوع آگار، اثرهای متقابل دوگانه "ژنوتیپ و نوع آگار"، "ژنوتیپ و نوع عامل اسموتیک"، "نوع آگار و نوع عامل اسموتیک" و اثر متقابل سه



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.12.9 ]

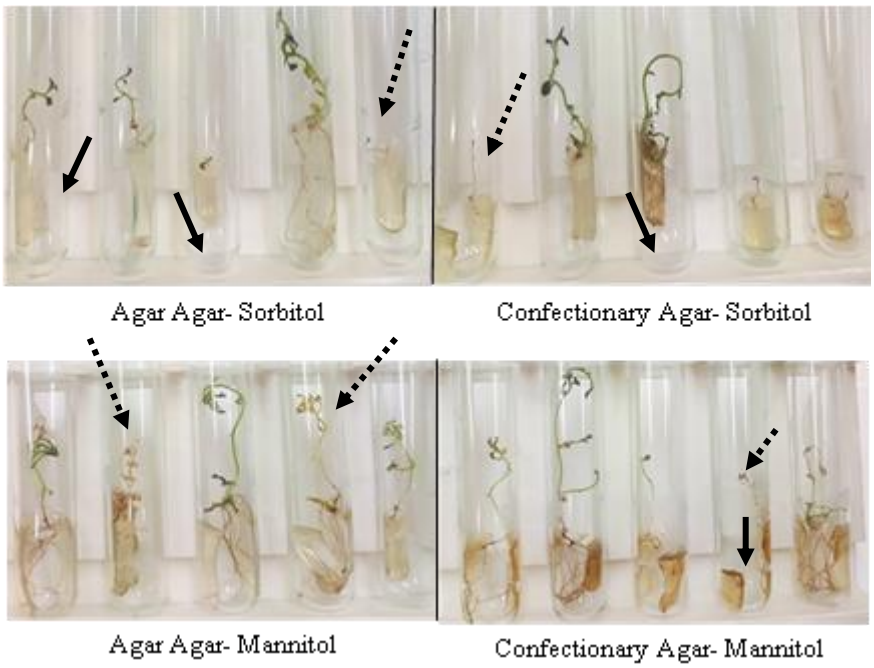
گانه "ژنوتیپ، نوع آگار و نوع عامل اسموتیک" معنی‌دار نبودند (جدول ۱). مقایسه میانگین صفت طول اندام هوایی برای سه ژنوتیپ تحت بررسی نشان داد که بیشترین طول اندام هوایی با ٤٨/٦ میلی‌متر مربوط به ژنوتیپ اگریا بوده و بین دو ژنوتیپ ۰۰۱۸۲ و ۳۳٦/۰۲ به ترتیب با طول اندام هوایی ۱۹/۷ و ۱۸/٦ میلی‌متر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در ارتباط با تیمار نوع عامل اسموتیک نیز، کمترین طول اندام هوایی برای عامل اسموتیک سوربیتول با ١٤/٢ میلی‌متر مشاهده شد.

نتایج تجزیه واریانس برای صفت تعداد جوانه بالقوه نشان داد که اثر ژنوتیپ و نوع عامل اسموتیک بر این صفت بسیار معنی‌دار (در سطح یک درصد) بود، در حالی‌که اثر نوع آگار، اثرهای متقابل دوگانه "ژنوتیپ و نوع آگار"، "ژنوتیپ و نوع عامل اسموتیک"، "نوع آگار و نوع عامل اسموتیک" بر این صفت معنی‌دار نبود. اثرهای متقابل سه‌گانه سه عامل مورد بررسی نیز بر صفت تعداد جوانه بالقوه در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

از آنجا که تاثیر نوع آگار بر هر دو صفت طول اندام هوایی و تعداد جوانه بالقوه، غیرمعنی‌دار بوده و با در نظر گرفتن قیمت بسیار پایین‌تر آگار شیرینی‌پزی در مقایسه با آگار-آگار، استفاده از آگار شیرینی‌پزی به جای آگار-آگار به منظور نگهداری ژرم‌پلاسم سیب‌زمینی پیشنهاد می‌شود.

به منظور تعیین بهترین تیمار جهت ایجاد رشد کند در ژنوتیپ‌های تحت بررسی، مقایسه میانگین اثرهای متقابل نوع آگار و نوع عامل اسموتیک برای هر ژنوتیپ برای صفات طول اندام هوایی و تعداد جوانه بالقوه با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰,۰۵ به صورت جداگانه انجام شد. همچنین، برای بررسی صفت وضعیت گیاهچه ها، از آماره نما (Mode)استفاده شد (شکل‌های ۲، ۳ و ٤).

در ژنوتیپ ۰۰۱۸۲، دو ترکیب تیماری آگار-آگار - سوربیتول و آگار شیرینی‌پزی - سوربیتول دارای کمترین طول اندام هوایی بودند و تفاوت معنی‌داری با دو ترکیب تیماری آگار شیرینی‌پزی - مانیتول و آگار-آگار - مانیتول داشتند.




**شکل ۱**- وضعیت ریزگیاه‌های ژنوتیپ اگریا در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در چهار ترکیب تیماری تحت بررسی، پس از گذشت ۵ ماه از شروع آزمایش. در تمامی تیمارهای تحت بررسی، محیط به شدت آب از دست داده و رو به اتمام (با پیکان نشان داده شده است) بود. همچنین در بیشتر نمونه‌ها خشکی و نکروزه شدن (با علامت نقطه چین مشخص شده اند) مشهود بود.

**Fig 1.** The five month old microplant appearance of Agria genotype at 22 ℃ subjected to four treatments. In all the treatments, the medium was severely dehydrated and running out (indicated by filled arrow). Furthermore, at this temperature, many of the microplants showed dryness and necrosis (indicated by dotted arrow)



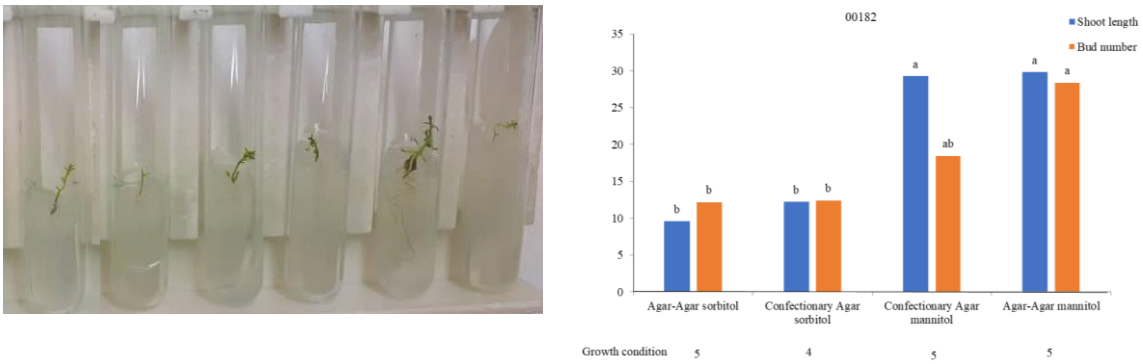
[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.12.9 ]

**جدول ۱**- تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ، نوع آگار و ترکیبات اسموتیک بر طول اندام هوایی و تعداد جوانه سیب‌زمینی در شرایط درون‌شیشه‌ای

**Table 1.** Analysis of variance (ANOVA) of the effects of genotype, agar type and osmotic agents on shoot length and bud number of potato under *in vitro* conditions

| | Bud number | | Shoot length | |
|---|---|---|---|---|
| **Source of Variation** | **Degrees of Freedom** | **Mean Squares** | **Degrees of Freedom** | **Mean Squares** |
| **Genotype** | 2 | $3.086^{**}$ | 2 | $3.802^{**}$ |
| **Agar type** | 1 | $0.718^{ns}$ | 1 | $0.017^{ns}$ |
| **Osmotic agent** | 1 | $2.538^{**}$ | 1 | $13.488^{**}$ |
| **Genotype*Agar type** | 2 | $0.297^{ns}$ | 2 | $0.246^{ns}$ |
| **Genotype*Osmotic agent** | 2 | $0.582^{ns}$ | 2 | $0.726^{ns}$ |
| **Agar type*Osmotic agent** | 1 | $0.128^{ns}$ | 1 | $0.347^{ns}$ |
| **Genotype*Agar type*Osmotic agent** | 2 | $1.190^{*}$ | 2 | $0.267^{ns}$ |
| **Error** | 46 | 0.333 | 44 | 0.249 |
| **Coefficient of Variation** | 18.3 | | 16.5 | |

**(b)** **(a)**




**شکل ۲- (a)** مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارها برای صفت طول اندام هوایی و تعداد جوانه بالقوه در ژنوتیپ ۰۰۱۸۲ و نمایش آماره نما برای صفت وضعیت گیاهچه. آگار_آگار – سوربیتول: آگار_آگار در ترکیب با تیمار ساکارز (۲۰ g/lit) و سوربیتول ( ٤٠ g/lit)، آگار شیرینی‌پزی – سوربیتول: آگار شیرینی‌پزی در ترکیب با تیمار ساکارز (۲۰ g/lit) و سوربیتول (٤٠ g/lit)، آگار شیرینی‌پزی–مانیتول: آگار شیرینی‌پزی در ترکیب با تیمار ساکارز (٤٠ g/lit)، و مانیتول (۲۰ g/lit)، آگار_آگار – مانیتول: آگار_آگار در ترکیب با تیمار ساکارز (٤٠ g/lit)، و مانیتول (۲۰ g/lit). **(b)** وضعیت گیاهچه‌های ۰۰۱۸۲ پس از گذشت ۹ ماه از نگهداری در تیمار سوربیتول در ترکیب با آگار–آگار (پنج نمونه سمت راست) و یا آگار شیرینی‌پزی (نمونه آخر در سمت چپ) در دمای ٦ درجه.

**Fig 2. (a)** The means of treatment interactions on traits of shoot length and number of possible buds in genotype 00182 and the mode score of microplant condition in each treatment. Agar_agar- sorbitol: agar-agar in combination with sucrose (20 $g.L^{-1}$) and sorbitol (40 $g.L^{-1}$); confectionary agar- sorbitol: confectionary agar in combination with sucrose (20 $g.L^{-1}$) and sorbitol (40 $g.L^{-1}$); confectionary agar-mannitol: confectionary agar in combination with sucrose (40 $g.L^{-1}$) and mannitol (20 $g.L^{-1}$); agar_agar-mannitol: agar-agar in combination with sucrose (40 $g.L^{-1}$) and mannitol (20 $g.L^{-1}$); **(b)** Microplant condition in genotype 00182 after 9 months of preservation in sorbitol treatment in combination with agar-agar (five samples in the right) or confectionary agar (the last sample in the left) in 6 ℃.

بیشترین طول اندام هوایی با ۲۹/۸ میلی‌متر متعلق به ترکیب تیماری آگار-آگار–مانیتول و کمترین طول اندام هوایی با ۹/٦ میلی‌متر متعلق به ترکیب تیماری آگار-آگار – سوربیتول بود. از نظر صفت تعداد جوانه بالقوه، بیشترین تعداد با ۲۸/٤ عدد جوانه متعلق به ترکیب تیماری آگار-آگار – مانیتول و کمترین تعداد جوانه بالقوه با ۱۲/۲ عدد متعلق به ترکیب تیماری آگار-آگار – سوربیتول بود.



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.12.9 ]

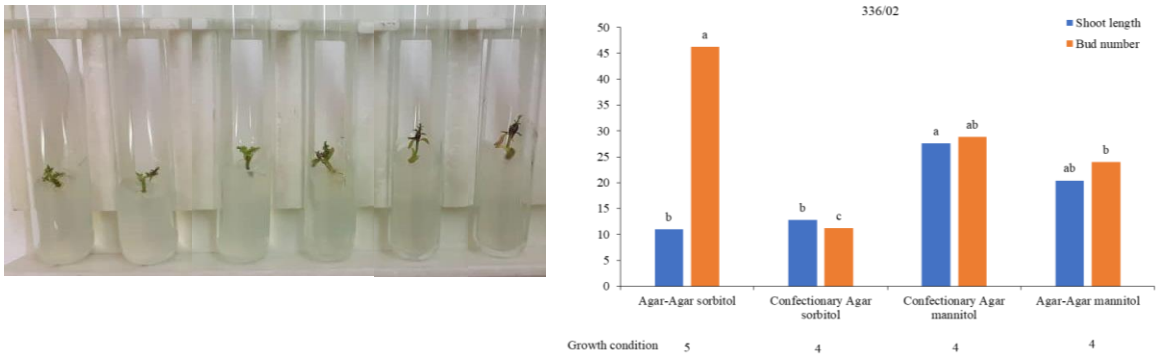
مقایسه میانگین چهار ترکیب تیماری مورد بررسی از نظر صفت تعداد جوانه بالقوه نشان داد که بین سه ترکیب تیماری آگار_آگار – سوربیتول، آگار شیرینی‌پزی – سوربیتول و آگار شیرینی‌پزی – مانیتول تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین، بررسی آماره نما برای صفت وضعیت گیاهچه‌ها در ژنوتیپ ۰۰۱۸۲ نشان داد که به‌جز ترکیب تیماری آگار شیرینی‌پزی – سوربیتول، سایر ترکیبات تیماری از وضعیت گیاهچه خیلی خوب (دارای اسکور ۵) برخوردار بودند (شکل ۳). با در نظر گرفتن نتایج سه صفت مورد بررسی برای ژنوتیپ ۰۰۱۸۲، ترکیب تیماری آگار_آگار – سوربیتول به دلیل داشتن طول گیاهچه کمتر و وضعیت گیاهچه خیلی خوب به عنوان ترکیب تیماری برتر برای نگهداری میان‌مدت ژنوتیپ مذکور معرفی می‌شود. لازم به ذکر است که ترکیب تیماری مذکور با وجود دارا بودن تعداد جوانه بالقوه کمتر و با تفاوت آماری معنی‌دار با ترکیب تیماری آگار_آگار – مانیتول، از تعداد جوانه کافی (۱۲/۲ عدد) برای واکشت برخوردار است.

در ژنوتیپ ۳۳۶/۰۲، کمترین طول اندام هوایی در ترکیب تیماری آگار_آگار – سوربیتول (۱۱ میلی‌متر) و بیشترین طول اندام هوایی در ترکیب تیماری آگار شیرینی‌پزی – مانیتول (۲۷/۶ میلی‌متر) مشاهده شد. بین سه ترکیب تیماری آگار_آگار – سوربیتول، آگار شیرینی‌پزی – سوربیتول و آگار_آگار – مانیتول تفاوت معنی‌داری برای صفت طول اندام هوایی مشاهده نشد ولی بین ترکیب تیماری آگار شیرینی‌پزی – مانیتول و ترکیبات تیماری حاوی سوربیتول، تفاوت آماری معنی‌دار مشاهد شد. برای صفت تعداد جوانه بالقوه، بیشترین تعداد متعلق به ترکیب تیماری آگار_آگار – سوربیتول با ٤٦/٢٥ عدد جوانه و کمترین تعداد با ۱۱/۲ عدد جوانه متعلق به ترکیب تیماری آگار شیرینی‌پزی – سوربیتول بود. بین ترکیبات تیماری حاوی مانیتول از نظر صفت تعداد جوانه بالقوه، تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد. بررسی آماره نما برای صفت وضعیت گیاهچه‌ها نشان داد که به‌جز ترکیب تیماری آگار_آگار – سوربیتول که در وضعیت خیلی خوب (دارای رتبه ۵) بودند، باقی ترکیبات تیماری در وضعیت خوب (دارای رتبه ٤) بودند. بر اساس نتایج حاصله برای سه صفت تحت بررسی، ترکیب تیماری آگار–آگار – سوربیتول به علت داشتن طول اندام هوایی کوتاه‌تر و وضعیت گیاهچه مطلوب‌تر و همچنین دارا بودن بیشترین تعداد جوانه بالقوه در مقایسه با سایر ترکیبات تیماری، به عنوان ترکیب تیماری برتر برای نگهداری میان‌مدت ژنوتیپ ۳۳٦/۰۲ معرفی می‌شود (شکل ۳).

در ژنوتیپ اگریا، مقایسه میانگین اثرهای متقابل نوع آگار و نوع تیمار اسموتیک برای صفت طول اندام هوایی نشان داد که دو ترکیب تیماری آگار-آگار – سوربیتول و آگار شیرینی‌پزی – سوربیتول دارای طول اندام هوایی کمتر بوده و تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد با دو ترکیب تیماری آگار شیرینی‌پزی – مانیتول و آگار-آگار – مانیتول داشتند. گرچه بین دو ترکیب تیماری آگار-آگار – سوربیتول و آگار شیرینی‌پزی – سوربیتول تفاوت معنی‌داری برای صفت طول اندام هوایی وجود نداشت ولی تیمار آگار-آگار – سوربیتول با ۱۸/٤ میلی‌متر دارای طول اندام هوایی کمتری بود. همچنین مقایسه میانگین اثرهای متقابل نوع آگار و نوع تیمار اسموتیک برای صفت تعداد جوانه بالقوه نشان داد که بیشترین تعداد جوانه با ٦۰ عدد متعلق به ترکیب تیماری آگار_آگار – مانیتول و کمترین تعداد جوانه بالقوه با ۲۸/۲ عدد متعلق به ترکیب تیماری آگار شیرینی‌پزی – سوربیتول بود ولی بین چهار ترکیب تیماری مورد بررسی از نظر تعداد جوانه، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. همچنین بررسی آماره نما برای صفت وضعیت گیاهچه برای ژنوتیپ مذکور نشان داد که به‌جز ترکیب تیماری آگار_آگار – مانیتول که دارای وضعیت گیاهچه خوب (دارای رتبه ٤) بود، سایر ترکیبات تیماری از وضعیت گیاهچه خیلی‌خوب (دارای رتبه ۵) برخوردار بودند (شکل ٤). با در نظر گرفتن نتایج سه صفت تحت بررسی برای ژنوتیپ اگریا، به علت طول گیاهچه کوتاه‌تر دو ترکیب تیماری آگار-آگار – سوربیتول و آگار شیرینی‌پزی – سوربیتول و عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین ترکیبات تیماری مورد بررسی از نظر صفت تعداد جوانه و وضعیت گیاهچه مطلوب در تیمارهای سوربیتول، دو ترکیب تیماری آگار_آگار – سوربیتول و آگار شیرینی‌پزی – سوربیتول به عنوان تیمارهای برتر برای نگهداری میان‌مدت (۹ ماهه) ژنوتیپ اگریا معرفی می‌شوند.

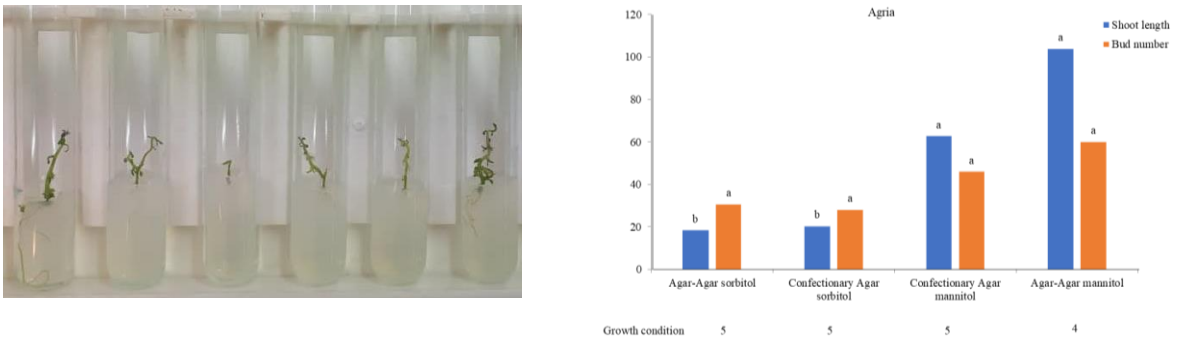


[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.12.9 ]




**شکل ۳- (راست)** مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارها برای صفت طول اندام هوایی و تعداد جوانه بالقوه در ژنوتیپ ۳۳٦/۰۲ و نمایش آماره نما برای صفت وضعیت گیاهچه. آگار_آگار – سوربیتول: آگار_آگار در ترکیب با تیمار ساکارز (۲۰ g/lit) و سوربیتول ( ٤٠ g/lit)، آگار شیرینی‌پزی – سوربیتول: آگار شیرینی‌پزی در ترکیب با تیمار ساکارز (۲۰ g/lit) و سوربیتول ( ٤٠ g/lit)، آگار شیرینی‌پزی – مانیتول: آگار شیرینی‌پزی در ترکیب با تیمار ساکارز (٤٠ g/lit)، و مانیتول (۲۰ g/lit) ، آگار_آگار – مانیتول: آگار_آگار در ترکیب با تیمار ساکارز (٤٠ g/lit)، و مانیتول (۲۰ g/lit). (چپ) وضعیت گیاهچه‌های ۳۳٦/۰۲ پس از گذشت ۹ ماه از نگهداری در تیمار سوربیتول در ترکیب با آگار–آگار (چهار نمونه سمت چپ) و یا آگار شیرینی‌پزی (دو نمونه سمت راست) در دمای ٦ درجه. توجه کنید که نقاط قهوه‌ای رنگ و متورم که روی ساقه مشاهده می‌شود، مربوط به میکروتیوبرهای تشکیل شده هستند.

**Fig 3. (Right)** The means of treatment interactions on traits of shoot length and number of possible buds in genotype 336/02 and the mode score of microplant condition in each treatment. Agar_agar- sorbitol: agar-agar in combination with sucrose (20 $g.L^{-1}$) and sorbitol (40 $g.L^{-1}$); confectionary agar- sorbitol: confectionary agar in combination with sucrose (20 $g.L^{-1}$) and sorbitol (40 $g.L^{-1}$); confectionary agar-mannitol: confectionary agar in combination with sucrose (40 $g.L^{-1}$) and mannitol (20 $g.L^{-1}$); agar_agar-mannitol: agar-agar in combination with sucrose (40 $g.L^{-1}$) and mannitol (20 $g.L^{-1}$); **(Left)** Microplant condition in genotype 336/02 after 9 months of preservation in sorbitol treatment in combination with agar-agar (four samples in the left) or confectionary agar (two samples in the right) in 6 ℃. Note the brawn and swallowed parts observed on the shoots are microtubers.




**شکل ٤–(راست)** مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارها برای صفت طول اندام هوایی و تعداد جوانه بالقوه در ژنوتیپ اگریا و نمایش آماره مد برای صفت وضعیت گیاهچه. آگار_آگار – سوربیتول: آگار_آگار در ترکیب با تیمار ساکارز (۲۰ g/lit) و سوربیتول ( ٤٠ g/lit)، آگار شیرینی‌پزی – سوربیتول: آگار شیرینی‌پزی در ترکیب با تیمار ساکارز (۲۰ g/lit) و سوربیتول ( ٤٠ g/lit)، آگار شیرینی‌پزی – مانیتول: آگار شیرینی‌پزی در ترکیب با تیمار ساکارز (٤٠ g/lit)، و مانیتول (۲۰ g/lit) ، آگار_آگار – مانیتول: آگار_آگار در ترکیب با تیمار ساکارز (٤٠ g/lit)، و مانیتول (۲۰ g/lit). **(چپ)** وضعیت گیاهچه‌های اگریا پس از گذشت ۹ ماه از نگهداری در تیمار سوربیتول در ترکیب با آگار–آگار (چهار نمونه سمت چپ) و یا آگار شیرینی‌پزی (دو نمونه سمت راست) در دمای ٦ درجه.

**Fig 4. (Right)** The means of treatment interactions on traits of shoot length and number of possible buds in genotype agria and the mode score of microplant condition in each treatment. Agar_agar- sorbitol: agar-agar in combination with sucrose (20 $g.L^{-1}$) and sorbitol (40 $g.L^{-1}$); confectionary agar- sorbitol: confectionary agar in combination with sucrose (20 $g.L^{-1}$) and sorbitol (40 $g.L^{-1}$); confectionary agar-mannitol: confectionary agar in combination with sucrose (40 $g.L^{-1}$) and mannitol (20 $g.L^{-1}$); agar_agar-mannitol: agar-agar in combination with sucrose (40 $g.L^{-1}$) and mannitol (20 $g.L^{-1}$); **(Left)** Microplant condition in genotype agria after 9 months of preservation in sorbitol treatment in combination with agar-agar (four samples in the left) or confectionary agar (two samples in the right) in 6 ℃.



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.12.9 ]

در مجموع، نتایج این مطالعه حاکی از برتری تیمار سوربیتول به ویژه در ترکیب با آگار_آگار در ایجاد رشد کند در ژنوتیپ‌های تحت بررسی به همراه حفظ وضعیت مطلوب گیاهچه‌ها و داشتن تعداد کافی جوانه برای واکشت بود. در مطالعات پیشین نیز برتری تیمار سوربیتول در ایجاد رشد کند در ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی در شرایط درون شیشه‌ای گزارش شده است. پیش از این، در یک بررسی، اثر مانیتول، سوربیتول و daminozide در ایجاد رشد کند در پنج واریته محلی سیب‌زمینی تحت نگهداری در بانک ژن Suceava رومانی مورد مطالعه قرار گرفت. آنها نمونه‌ها را در دمای ٦-١٢ درجه و به مدت ٧ و ١٢ ماه نگهداری و مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه مذکور، محیط حاوی ٤٠ گرم در لیتر سوربیتول و ٢٠ گرم در لیتر ساکارز به عنوان بهترین محیط برای حفاظت درون شیشه‌ای واریته‌های محلی سیب‌زمینی مورد بررسی معرفی شد (Ciobanu and Constantinovici 2012). در پژوهش دیگری نیز، اثر سطوح مختلف سوربیتول و مانیتول در ایجاد رشد کند در سه ژنوتیپ سیب‌زمینی مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های کشت شده در محیط‌های رشد کند در دمای ٧ درجه و به مدت ١٨ ماه نگهداری شدند. آنها تیمار ٤٠ گرم در لیتر سوربیتول همراه با ٢٠ گرم در لیتر ساکارز را به علت دارا بودن حداکثر درصد زنده‌مانی ریزگیاه‌ها و دارا بودن وضعیت خوب برای ریزگیاهان به منظور تهیه جوانه‌های مناسب برای واکشت به عنوان تیمار برتر شناسایی کردند ( Gopal and Sukh Chauhan 2010).

مونز و همکاران (٢٠١٩)، اثر محیط‌های کشت دارای سطوح مختلف سوربیتول و مانیتول را در ایجاد رشد کند در ٣ نمونه ژنتیکی سیب‌زمینی بومی شیلی تحت نگهداری در بانک ژن INIA در دمای ٢٠ درجه به مدت ٨ ماه بررسی کردند. آنها تیمار ٢٠ گرم در لیتر سوربیتول را به علت کاهش معنی‌دار سرعت رشد ریزگیاهان، عدم ایجاد مرگ و میر و ناهنجاری به عنوان تیمار مطلوب برای نگهداری میان‌مدت ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی تحت بررسی معرفی کردند. در واقع الکل قندی سوربیتول با کاهش سوخت و ساز گیاه به ایجاد رشد کند در گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای کمک می‌کند.

در مجموع، نتایج حاصل از پژوهش حاضر، حاکی از برتری تیمار سوربیتول در دمای ٦ درجه جهت نگهداری میان‌مدت سه ژنوتیپ سیب‌زمینی بررسی شده در شرایط درون‌شیشه‌ای است. تیمار مذکور می‌تواند به مدت یک سال بدون نیاز به واکشت جهت نگهداری ژرم‌پلاسم سیب‌زمینی در شرایط درون شیشه‌ای مورد استفاده قرار گیرد. همچنین بر اساس نتایج تحقیق حاضر و با توجه به بهای پایین آگار شیرینی‌پزی، استفاده از این نوع آگار برای نگهداری ژرم‌پلاسم سیب‌زمینی نیز پیشنهاد می‌گردد.

## سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از پروژه تحقیقاتی مصوب مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر به شماره **۹۹۰۵۳۵-۰۴۱-۰۳-۰۳-۲** می‌باشد. کلیه مراحل این پروژه در مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر انجام شده است که بدینوسیله مورد تشکر و قدردانی قرار می‌گیرند.

## منابع

**Arbeloa A, Marín J, Andreu P, García E, Lorente P. 2015.** *In vitro* conservation of fruit trees by slow growth storage. In: VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, Italy, Sanremo, 1155.

**Barrueto Cid L. 2001.** A propagação *in vitro* de plantas. Biotecnologia Ciência e Desenvo vimento, Brasília, ano 3:16-21.

**Bonnier F. J. M., & Van Tuyl J. M. 1997.** Long term t in vitro storage of lily: effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. Plant cell, Tissue and organ culture, 49(2): 81-87.



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.12.9 ]

**Cha-um S, & Kirdmanee C. 2007.** Minimal growth *in vitro* culture for preservation of plant species. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology 1:13-25.

**Ciobanu IB, & Constantinovici D. 2012.** The effect of sorbitol and conservation period, on the in vitro evolution of *Solanum tuberosum* L. plantlets. Cercetări Agronomice în Moldova 3(151):79-86.

**Divakaran M, Babu, KN, & Peter K. 2006.** Conservation of Vanilla species, *in vitro*. Scientia horticulturae 110(2):175-180.

**Engelmann F. 1991.** *In vitro* conservation of tropical plant germplasm—a review. Euphytica *57*3:227-243.

**Gopal J, Chamail A, & Sarkar D. 2002.** Slow-growth *in vitro* conservation of potato germplasm at normal propagation temperature. Potato Research 45(2):203-213.

**Gopal J, & Sukh Chauhan N. 2010.** Slow growth *in vitro* conservation of potato germplasm at low temperature. Potato Research 53(3):1409-1410.

**Keller EJ, Senula A, Leunufna S, & Grübe M. 2006.** Slow growth storage and cryopreservation—tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. International Journal of Refrigeration 29(3):411-417.

**Khoury CK, Bjorkman AD, Dempewolf H, Ramirez-Villegas J, Guarino L, Jarvis A, Rieseberg LH, & Struik PC. 2014.** Increasing homogeneity in global food supplies and the implications for food security. Proceedings of the national Academy of Sciences 111(11):4001-4006.

**Kraak A. 1992.** Industrial applications of potato starch products. Industrial Crops and Products 1(2-4):107-112.

**Lentini Z, Mussell H, Mutschler M, & Earle E. 1988.** Ethylene generation and reversal of ethylene effects during development *in vitro* of rapid-cycling *Brassica campestris* L. Plant Science 54(1):75-81.

**Luz T, Cardoso L, Alves R, & Matsumoto K. 2013.** Effect of osmotic regulators on *in vitro* conservation of Brazilian ginseng, potato and cassava germplasms. In: VIII International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding, Portugal, Coimbra, 1083.

**McClelland M, & Smith M. 1990.** Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. HortScience 25(7):797-800.

**Muñoz M, Díaz O, Reinún W, Winkler A, & Quevedo R. 2019.** Slow growth *in vitro* culture for conservation of Chilotanum potato germplasm. Chilean journal of agricultural research 79(1):26-35.

**Peredo EL, Revilla MÁ, & Arroyo-García R. 2006.** Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organogenic calli. Journal of plant physiology, 163(10):1071-1079.

**Rao NK. 2004.** Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology, 3(2):136-145.

**Uyoh E, Nkang A, & Eneobong E. 2003.** Biotechnology, genetic conservation and sustainable use of bioresources. African Journal of Biotechnology *2*12:704-709.

**Vettorazzi RG, Carvalho VS, Sudré CP, & Rodrigues R. 2017.** Developing an *in vitro* optimized protocol to sweet potato landraces conservation. Acta Scientiarum. Agronomy 39:359-367.

**Westcott R. 1981a.** Tissue culture storage of potato germplasm. 1. Minimal growth storage. Potato Research 243:331-342.

**Westcott R. 1981b.** Tissue culture storage of potato germplasm. 2. Use of growth retardants. Potato Research 24(3):343-352.

[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-01 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.1.12.9 ]