

## Effect of proline nanocomposite coated with chitosan and moderate salinity stress on in vitro microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Agria

Roghayeh Ghasemi<sup>1</sup>, Alireza Motallebi-Azar<sup>2\*</sup> , Sima Panahirad<sup>3</sup>, Amin Jahanian<sup>4</sup>

1. MScGraduated student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
2. Associated Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
3. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
4. PhD Graduated student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

**Citation:** Ghasemi, R., Motallebi-Azar, A., Panahirad, S., Jahanian, A. (2024) Effect of proline nanocomposite coated with chitosan and moderate salinity stress on in vitro microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Agria. *Plant Productions*, 47(1), 117-130

### Abstract

#### Introduction

In recent years, the application of nanoparticles has been used successfully in plant tissue culture, which has a tremendous impact on the removal of microbial contamination of the explant through the use of these materials and also the positive role of these materials in callus formation, organogenesis, somatic embryogenesis, somaclonal variation and production of secondary metabolites. Proline is a proteogenic amino acid that accumulates as a useful solvent in plants under both stress and non-stress conditions. Recent discoveries indicate that proline plays an important role in plant growth and differentiation throughout the life cycle. Chitosan was found to enhance secondary metabolite production in cell suspensions and calli of various species applied in micropropagation, chitosan could improve plantlet quality in vitro, in consequence facilitating the subsequent acclimatization of plantlets to ex vitro conditions. The aim of this work was to investigate whether the in vitro application of nanocomposite and moderate salinity can improve microtuberization.

#### Materials and Methods

After the cultivation, the jars containing the explants were transferred to the growth chamber under absolute darkness and at a temperature of  $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ . The cultures were kept in these conditions for 4 months without sub culturing the samples for this purpose. MS medium containing 80 g of sucrose, containing proline at concentrations of 20 and 40 mg L<sup>-1</sup>, chitosan at a concentration of 240 mg L<sup>-1</sup>, proline 20 and chitosan 240 mg L<sup>-1</sup>, proline 40 and chitosan 240 mg L<sup>-1</sup>, 120 mg L<sup>-1</sup>, proline nanocomposite coated with chitosan 120 and 240 mg L<sup>-1</sup> and control

---

\* **Corresponding Author:** Alireza Motallebi-Azar  
**E-mail:** motallebiazar@gmail.com



treatment, as well as non-salinity treatments with the same compounds and concentrations mentioned for salinity were cultured. Factorial experiment was conducted base on a completely randomized design with three replications on single nude explants of mentioned cultivar.

### Results and Discussion

The results of this study show that moderate salinity has a significant effect on the first, second, third and last month of microtuberization. (in 1% level). The results of the comparison of mean microtuber yield showed that the highest yield was obtained when 240 mg of chitosan was treated with 20 mg / l of proline at moderate salinity with an average weight of 210 mg. Moreover, a concentration of 20 mg / l proline alone in moderate salinity was not sufficient to stimulate microtubers., but a concentration of 40 mg L<sup>-1</sup> proline in mild salinity was satisfactory. According to the results of this study, it can be suggested that the use of chitosan compounds with proline and the use proline nanocomposite coated with chitosan with moderate salinity can be used to produce suitable microtuberization in the in vitro conditions of potatoes. In order to prove our results with the results of previous researchers, the results of chitosan application experiment on the growth and yield of miniature showed that application of 500 mg L<sup>-1</sup> chitosan produced minituber weighing more than 1.5 g per seedling. Chitosan increased other traits including number of minituber per seedling, number of leaves per seedling and seedling length (Asghari-Zakaria et al., 2009). In the study of the effect of cobalt nanoparticles on the morphological characteristics of Santana cultivar in vitro, it was observed that the presence of cobalt nanoparticles caused the formation of microtubers faster, also the maximum size and function of microtubers from the combination of 2.5 mg. Cobalt nanoparticles with 80 g L<sup>-1</sup> sucrose were obtained (Hamza, 2019).

### Conclusions

In this experiment, proline nanocomposite coated with chitosan was successfully synthesized and according to the obtained results, it can be used in plant tissue culture and in vitro microtuberization. In the field of potato microtuberization, the use of nanocomposite showed a significant increase in the number of microtubers compared to the control, which showed a significant effect in the late stages of microtuberization. Also, the use of moderate salinity with treatment nanocomposite is effective for stimulating microtuberization, which increases microtubers yield. Based on the results of this experiment, a concentration of 120 mg L<sup>-1</sup> proline nanocomposite coated with chitosan is a more suitable concentration for potato microtuberization.

**Keywords:** Moderate salinity, Nano, Sucrose, Synthesis, Yield

## اثر نانو کامپوزیت پرولین پوشش دار شده با کیتوزان و تنش شوری ملایم بر ریزغده‌زایی درون شیشه ای سیب زمینی رقم آگریا

رقیه قاسمی<sup>۱</sup>، علیرضا مطلبی آذر<sup>۲\*</sup>، سیما پناهی راد<sup>۳</sup>، امین جهانیان<sup>۴</sup>

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد - گروه علوم باغبانی - دانشکده کشاورزی - دانشگاه تبریز، ایران
- ۲- دانشیار گروه علوم باغبانی - دانشکده کشاورزی - دانشگاه تبریز، ایران
- ۳- استادیار گروه علوم باغبانی - دانشکده کشاورزی - دانشگاه تبریز، ایران
- ۴- دانش آموخته دکتری - گروه علوم باغبانی - دانشکده کشاورزی - دانشگاه تبریز، ایران

### چکیده

در سال های اخیر، کاربرد نانوذرات به طور موفقیت آمیزی در کشت بافت گیاهی استفاده شده است که کاربرد این مواد تاثیر شگرفی در حذف آلودگی های میکروبی ریز نمونه ها دارد. همچنین این مواد نقش مثبتی در القای پینه زایی، اندام زایی، جنین زایی سوماتیکی، ایجاد تنوع سوماکلونال و تهییج متابولیت های ثانویه داشته است. با توجه به نقش مثبت ترکیبات نانو و نانوکامپوزیت در علوم مختلف، این آزمایش با هدف تاثیر مواد نانو در مطالعات کشت بافت و ریزغده‌زایی سیب زمینی انجام گرفت. کامپوزیت ها موادی هستند که از ۲ جزء یا بیشتر تشکیل شده اند که خواص برتری را نسبت به مواد پایه تشکیل دهنده آن دارا هستند. استفاده از روش کشت بافت برای تولید میکروتیوبر و مینی تیوبر برای ایجاد گیاهان یکنواخت و عاری از بیماری سیب زمینی در سال های اخیر مورد توجه قرار گرفته است و افزایش میزان تولید میکرو و مینی تیوبر در اولویت قرار گرفته است که در سال های اخیر با استفاده از علم نانو و کاربرد مواد نانوکامپوزیت تاثیر مثبتی در زمینه کشت بافت سیب زمینی انجام پذیرفته است. این آزمایش در سال ۱۴۰۰ بمدت ۴ ماه اجرا گردید. بدین منظور محیط کشت MS دارای ۸۰ گرم ساکارز حاوی پرولین در دو غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی گرم در لیتر، کیتوزان در غلظت ۲۴۰ میلی گرم در لیتر، پرولین ۲۰ میلی گرم و کیتوزان ۲۴۰ میلی گرم در لیتر، پرولین ۴۰ میلی گرم و کیتوزان ۲۴۰ میلی گرم در لیتر، نانوکامپوزیت پرولین-کیتوزان ۱۲۰ میلی گرم در لیتر، نانوکامپوزیت پرولین-کیتوزان ۲۴۰ میلی گرم در لیتر و تیمار شاهد به عنوان فاکتور اول آزمایش با ۸ سطح، همچنین فاکتور دوم آزمایش در دو سطح با (۵۰ میلی مولار کلرید سدیم) و بدون تنش شوری کشت شد. نتایج مقایسه میانگین عملکرد ریزغده نشان داد که بیشترین عملکرد ریزغده مربوط به تیمار ۲۴۰ میلی گرم کیتوزان همراه با ۲۰ میلی گرم در لیتر پرولین همراه با شوری ملایم با میانگین وزن ۲۱۰ میلی گرم بدست آمده است. علاوه بر این، غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر پرولین به تنهایی در

\* نویسنده مسئول: علیرضا مطلبی آذر

شوری ملایم جهت تحریک کنندگی ریزغده کافی نبود ولی غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر پرولین در شوری ملایم نتیجه رضایت بخشی داده است. با توجه به تحقیقات متعددی که در زمینه ریزغده زایی سیب زمینی انجام شده است و بررسی داده های مرتبط با عملکرد مشاهده می شود که نتایج داده های نانو کامپوزیت در مقایسه با سایر مواد مورد کاربرد در زمینه کشت بافت سیب زمینی مثبت ارزیابی شد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می توان پیشنهاد نمود که استفاده از ترکیبات کیتوزان به همراه پرولین و استفاده از مواد نانو کامپوزیت پرولین پوشش دار شده با کیتوزان همراه با شوری ملایم می تواند برای تولید ریزغده مناسب در شرایط درون شیشه ای سیب زمینی مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه های کلیدی:** ساکارز، سنتز، شوری ملایم، عملکرد، نانو

### مقدمه

غلظت های پایین ۱ میلی گرم در لیتر برای القاء ریزغده زایی سیب زمینی مناسب است (Ibrahim et al. 2018). مطالعه دیگر با کاربرد ۲/۵ میلی گرم در لیتر نانوذره کبالت در محیط کشت MS حاوی ۸۰ گرم ساکارز بعد از ۲ ماه بیشترین تعداد و وزن و بزرگترین ریزغده های سیب زمینی به دست آمد (Hamza, 2019).

پرولین به عنوان یک اسمولیت در گیاهان شناخته شده است و گیاهان را در مقابل تنش های مختلف محافظت می کند. گیاهان برای مقابله با تنش شوری نیاز به تعدیل اسمزی دارند. برای رسیدن به این منظور مولکول های قابل حل و سازگار در سلول سنتز می شوند که به عنوان اسمولیت و محافظ اسمزی عمل می کنند. این مولکول ها موجب پایین آوردن فشار اسمزی درون سلول شده و به جذب آب درون سلول کمک می نمایند (Yousry et al. 2015). در گیاه سیب زمینی افزایش میزان پرولین و قندهای محلول کل و همچنین کاهش میزان پتاسیم و وزن تر تحت تنش شوری گزارش شده است (Daneshmand 2014). نتایج آزمایشی نشان داد که در بررسی سه رقم سیب زمینی (آگریا، مارفونا و سانته) در شش سطح شوری صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ با افزایش غلظت نمک، میزان پرولین، کربوهیدرات های محلول کل، پروتئین محلول، وزن خشک و غلظت سدیم سلول ها افزایش و میزان وزن تر و غلظت پتاسیم آن ها کاهش یافت. همچنین واکنش سه رقم سیب زمینی به سطوح مختلف شوری متفاوت بود. رقم سانته بیشترین میزان تجمع پرولین، قندهای محلول کل، پروتئین محلول

در بسیاری از کشورها که آفات و بیماری های سیب زمینی مشکل جدی برای کشت و کار این محصول بوده است همچنین با کمبود مناطق رشدی ایزوله و عاری از ناقلین آفات و بیماری ها روبرو هستند در نتیجه برای تولید غده های بذری با کیفیت سیب زمینی از روش تولید میکروتیوبر (ریزغده) به عنوان جزء حیاتی تولید غده بذری استفاده می کنند. کشت بافت گیاهی به عنوان یک روش، امکان تکثیر کلونی انبوه گیاهان را فراهم می سازد و در تکثیر و نگهداری منابع ژنتیکی سیب زمینی نیز به کار گرفته شده است (Donnelly et al. 2003).

کامپوزیت ها موادی هستند که از ۲ جزء یا بیشتر تشکیل شده اند که خواص برتری را نسبت به مواد پایه تشکیل دهنده آن دارا هستند. محلول پاشی برگه فنیل آلانین پوشش دار شده با کیتوزان، اسیدیته قابل تیتراسیون<sup>۱</sup>، مواد جامد محلول کل (TSS)، اسید آسکوربیک، فلاونوئید و فنل کل، آنتوسانین و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL) را در میوه انگور افزایش داد و باعث بهبود کیفیت و افزایش پتانسیل آنتی اکسیدانی شد (Gohari et al. 2021). با کاربرد نانوذره نقره به شکل کریستالی در مقایسه با کاربرد یونی نقره به شکل تیوسولفات نقره (STS) صفات تعداد ریزغده و وزن ریزغده سیب زمینی رقم Desirée افزایش پیدا کرد. همچنین در این مطالعه مشخص شد که استفاده از

1- titratable acidity (TA)

در زمینه نانوکامپوزیت و کاربرد آن در مطالعه کشت بافت گیاهی و ریزغدهزایی سیب‌زمینی، این مطالعه با اهداف مختلفی مانند موفقیت در سنتز ترکیبات جدید نانوکامپوزیت پرولین پوشش‌دار شده با کیتوزان، مقایسه غلظت ترکیبات نانوکامپوزیت بر ریزغدهزایی درون شیشه‌های سیب‌زمینی در شرایط شوری ملایم برای بهبود شرایط ریزغدهزایی انجام گرفته است.

### مواد و روش‌ها

#### سنتز نانوکامپوزیت پرولین پوشش‌دار شده با کیتوزان

برای تهیه این نانوکامپوزیت، از یک پلیمریستی<sup>۱</sup> برای بارگیری<sup>۲</sup> روی پرولین استفاده شد. در این آزمایش، ۰/۱ گرم پودر نانوکامپوزیت با وزن مولکولی کم کیتوزان به ۲۵ میلی‌لیتر محلول اسید استیک ۱ درصد وزنی اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از همزن مغناطیسی هم‌زده شد تا محلول شفاف کیتوزان بدست آمد. ۰/۱ گرم پرولین در ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و به محلول کیتوزان اضافه و سپس به مدت ۱ ساعت با سرعت زیاد هم‌زده شد. در این آزمایش، سدیم تری پلی فسفات (TPP) به عنوان یک اتصال دهنده عرضی<sup>۳</sup> با نسبت ۲/۵ به ۱ نسبت به محتوای کیتوزان استفاده شد. در نهایت ۰/۰۴ گرم TPP در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و سپس به آرامی به محلول کیتوزان-پرولین اضافه شد. TPP در حالت اتصال عرضی با نانوذرات کیتوزان باعث انعقاد می‌شود و این مخلوط منعقد کننده به مدت یک شب هم زده شد و سپس چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد تا مواد از مایع رویی تمیز شود (Gohari et al., 2021a). اثبات اندازه ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی در دانشگاه شریف اثبات گردید (شکل ۲).

کل و پتاسیم را داشت (Amerian and Esna-Ashari 2017). با توجه به اینکه گیاهان سیب‌زمینی نسبت به شوری حساس هستند (Zhang et al. 2005) و این حساسیت در مراحل اولیه رشد بیشتر می‌باشد. در وضعیت شوری تجمع پرولین و مالون‌دی‌آلدهید (malondialdehyde) در گیاهان برنج و سیب‌زمینی گزارش شده است (Martinez et al. 1996; Zhang et al. 2005). در یک مطالعه برای بررسی میزان پرولین گیاهان درون‌شیشه‌ای سیب‌زمینی در شرایط شوری ۰/۵ درصد، ۵-آمینولولونیک اسید (ALA) میزان پرولین در تمامی تیمارهای ALA به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. با افزایش میزان شوری از ۲۰ تا ۶۰ میلی‌مولار در شرایط درون‌شیشه‌ای، به طور معنی‌داری غلظت پرولین و مالون‌دی‌آلدهید در ریزغده‌های دو رقم سیب‌زمینی افزایش پیدا کرد (Zhang et al. 2005).

الیستور کیتوزان به عنوان فراوان‌ترین آمینو پلی ساکاریدها در طبیعت، دارای خصوصیات از جمله سازگاری زیستی بالا، سمیت پایین، زیست تخریب پذیری و خواص ضد میکروبی است (Solgi and Taghizadeh 2017). در مطالعه‌ای که تاثیر کاربرد کیتوزان (۵، ۵۰، ۱۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت MS بر تولید مینی‌تیوبر سیب‌زمینی انجام گرفت، نشان داد که غلظت‌های ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از سفت شدن و جامد شدن محیط کشت جلوگیری کرد، ولی غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش وزن تر شاخساره شد و غلظت‌های پایین‌تر از این مقدار تاثیر معنی‌داری در وزن تر شاخساره نداشت. غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان محلول باعث سازگاری بهتر ریزغده‌ها و بهبود عملکرد مینی‌تیوبرها در گلخانه شد (Asghari-Zakaria et al. 2009). در مطالعه‌ای در گیاه گل‌رنج مشاهده شد که غلظت‌های پایین کیتوزان (۰/۰۵-۰/۴ درصد) باعث کاهش سطح پرولین شد ولی غلظت‌های بالاتر باعث افزایش میزان پرولین شد (Mahdavi et al. 2011). با توجه به تحقیقات ابتدایی

1- Deacetyliertes Chitin, Poly(D-glucosamin)

2- loading

3- cross-linker

## مواد گیاهی و شرایط کشت

در این آزمایش از ریز نمونه‌های درون شیشه‌ای عاری از ویروس سیب‌زمینی رقم آگریا موجود در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز که تحت شرایط تاریکی ۱۶ ساعت نوری و ۸ ساعت تاریکی قرار داشتند، استفاده گردید. این آزمایش در سال ۱۴۰۰ بمدت ۴ ماه اجرا گردید. شیشه‌های حاوی ریزنمونه‌ها درون اتاقک رشد با شرایط تاریکی مطلق و در دمای  $20 \pm$  ۱۸ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند در این پژوهش تیمارهای نانو کامپوزیت به عنوان فاکتور اول با ۸ سطح به صورت نانو کامپوزیت پرولین پوشش دار شده با کیتوزان (۱۲۰ و ۲۴۰ میلی گرم در لیتر)، پرولین (۲۰ و ۴۰ میلی گرم در لیتر)، کیتوزان (۲۴۰ میلی گرم در لیتر)، پرولین (۲۰ و ۴۰ میلی گرم در لیتر، فاکتور دوم با دو سطح به صورت تنش شوری ملایم (۵۰ میلی مولار) و بدون تنش بر ریزغده‌زایی در محیط کشت پایه MS با مقدار ۸۰ گرم ساکارز و ۸ گرم آگار برای جامد نمودن محیط کشت سیب‌زمینی مورد استفاده قرار گرفت. حجم مورد استفاده در هر شیشه ۴۰ میلی لیتر و تعداد ۱۶ تیمار با سه تکرار و در هر تکرار ۵ ریزنمونه در هر شیشه کشت گردید.

## داده برداری صفات

پس از یک‌ماه از تاریخ کشت ریز نمونه‌ها، یادداشت برداری صفات انجام گرفت. در مرحله ریزغده‌زایی صفات مورفولوژیکی زیر یادداشت برداری گردید: تعداد ریزغده ماه اول، دوم، سوم و ماه چهارم، تعداد استولون، طول استولون (میلی متر)، وزن ریزغده (میلی گرم)، عملکرد ریزغده (میلی گرم در هر تیمار آزمایش)، تعداد چشم و قطر ریزغده (میلی متر). برای اندازه‌گیری صفات از ترازوی حساس (شرکت اوهاس مدل DV215CD ساخت شرکت سوئیس با دقت ۰/۰۰۱ گرم)، برای اندازه‌گیری طول ریزغده و میانگره از خط کش و برای اندازه‌گیری قطر ریزغده از کولیس دیجیتال (MITUTOYO) ساخت کشور ژاپن استفاده شد.

## تجزیه آماری

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تیمار در ۳ تکرار که در هر تکرار (شیشه آزمایش) ۵ ریزنمونه کشت شد. فاکتور اول تیمارهای نانو کامپوزیت با هشت سطح و فاکتور دوم در دو سطح به صورت تنش شوری و بدون شوری بودند. تجزیه آماری به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. کلیه نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Office Excel رسم گردید.

## نتایج و بحث

### تعداد ریزغده

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر شوری ملایم روی ریزغده‌زایی ماه‌های اول، دوم، سوم و چهارم در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود، اما اثر متقابل شوری ملایم و تیمارهای نانو کامپوزیت معنی‌دار نبود (جدول ۱). با افزایش غلظت پرولین از ۲۰ میلی گرم در لیتر به ۴۰ میلی گرم در لیتر تعداد ریزغده‌ها بیش از ۱۰۰ درصد افزایش پیدا کرد و بیشترین تعداد ریزغده در ماه اول مربوط به تیمار کیتوزان ۲۴۰ میلی گرم در لیتر همراه با پرولین ۴۰ میلی گرم در لیتر بود و کمترین آن مربوط به تیمارهای کیتوزان ۲۴۰ میلی گرم در لیتر و پرولین ۲۰ میلی گرم در لیتر بود. همچنین مشاهده شد که تیمار نانو کامپوزیت پرولین پوشش دار شده در هر دو غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی گرم در لیتر نسبت به تیمارهای شاهد و کیتوزان ۲۴۰ میلی گرم در لیتر و پرولین ۲۰ میلی گرم در لیتر تعداد ریزغده‌های اولیه را افزایش داد (شکل ۱-A). همچنین مقایسه میانگین (جدول ۲) در صفت تعداد ریزغده‌زایی در شرایط شوری ملایم و بدون شوری نشان داد که شوری ملایم ۵۰ میلی مولار تعداد ریزغده‌ها را در ماه‌های اول، دوم، سوم و چهارم افزایش داده است، بنابراین چنین به نظر می‌رسد که شوری ملایم می‌تواند به عنوان محرک برای افزایش واکنش‌های درونی گیاه جهت تحریک ریزغده‌زایی مطرح باشد. در حالت کلی اثر تیمارهای ریزغده‌زایی در ماه دوم مشابه ماه اول

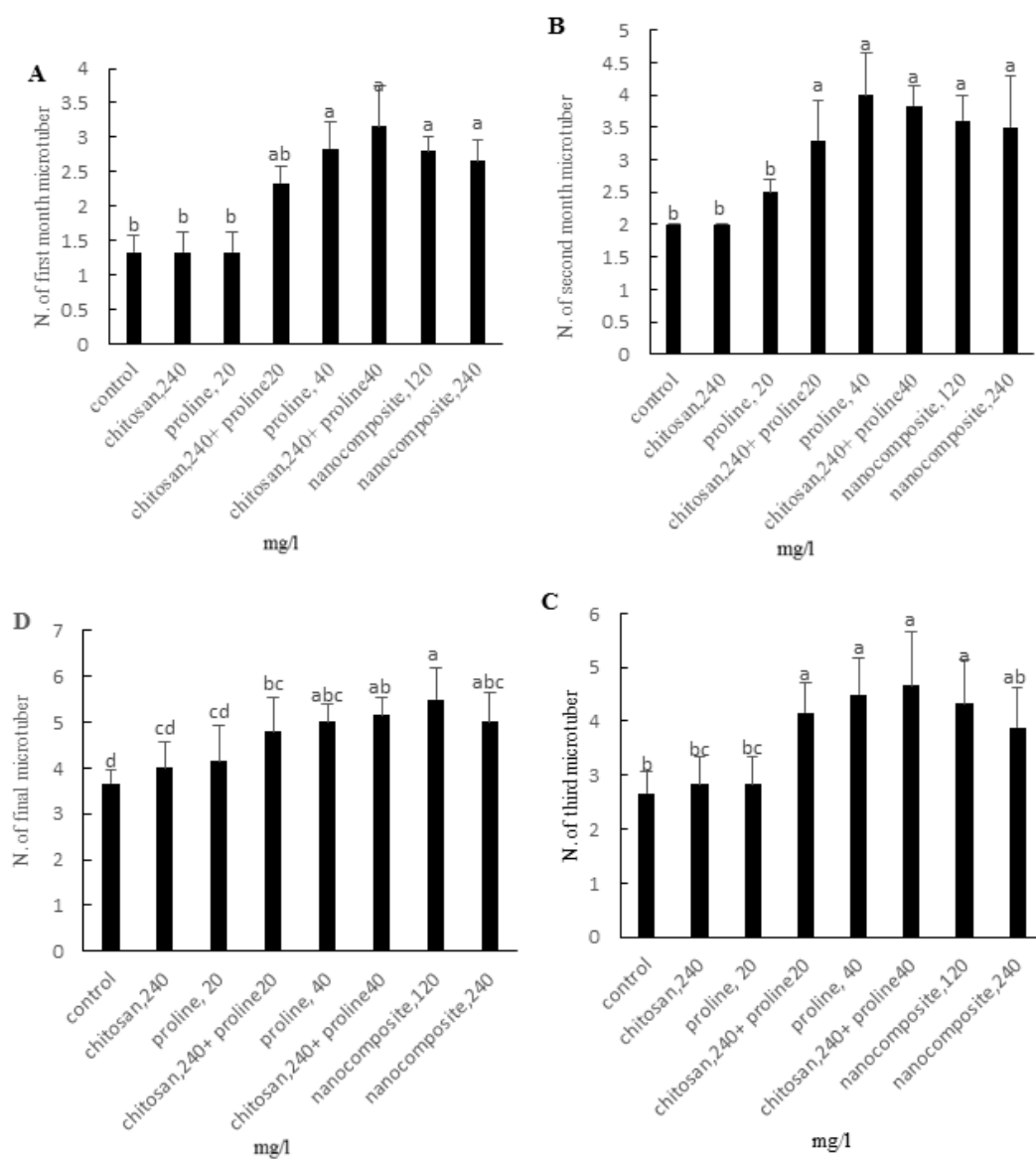
Topoonyanont 2015). به طور کلی چنین به نظر می‌رسد غلظت مناسب در ترکیبات و مدت زمان مورد استفاده در این تحقیق یکی از موارد تاثیرگذار در ریزغده‌زایی سیب‌زمینی می‌باشد، بطوریکه غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین نسبت به ۲۰ میلی‌گرم مناسب‌تر است و همچنین ترکیب نمودن پرولین با کیتوزان نسبت به کاربرد تنهایی این مواد برای ریزغده‌زایی سیب‌زمینی بهتر عمل کرد.

وزن ریزغده: در این آزمایش وزن ریزغده‌ها تقریباً بین ۲۴ تا ۵۸ میلی‌گرم متغیر بود و وزن ریزغده‌ها نیز به طور معنی‌داری تحت تاثیر شوری و تیمارهای نانوکامپوزیت بود اما اثر متقابل تیمارهای شوری و نانوکامپوزیت روی وزن ریزغده معنی‌دار نبود (جدول ۱). بیشترین وزن ریزغده در تیمار کیتوزان ۲۴۰ میلی‌گرم در لیتر همراه با پرولین ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۳). مهم‌ترین نتایج مربوط به صفت وزن ریزغده در جدول ۲ مشاهده می‌شود که وزن ریزغده در تیمار شوری ملایم نسبت به تیمار بدون شوری کاهش ۱۰۰ درصدی را نشان داد و این امر نشان می‌دهد که تیمارهای با شوری ملایم باعث تولید تعداد ریزغده‌های بیشتر با وزن کمتر می‌شود. در مطالعه صورت گرفته با استفاده از غلظت‌های مختلف تنش شوری (۲۵ تا ۱۵۰ میلی‌مولار) در دو رقم آگریا و مارفونا گیاه سیب‌زمینی، با افزایش شوری ریزغده‌زایی در هر دو رقم کاهش پیدا کرد و در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار ریزغده‌زایی متوقف شد. دلیل این کاهش تولید را کاهش پتانسیل اسمزی سلول‌های استولون و ریزغده در اثر شوری عنوان نمودند (Amerian and Esna-Ashari, 2011). تفاوت این آزمایش با تحقیقات محققین دیگر در این است که در سایر تحقیقات مرتبط با تنش شوری در شرایط درون شیشه‌ای سیب‌زمینی فقط به بررسی غلظت‌های شوری اکتفا نموده‌اند در حالی که در این آزمایش از تنش شوری ملایم و تیمارهای محافظت کننده در برابر تنش شوری برای اهداف تحریک ریزغده‌زایی استفاده شد.

بوده ولی تعداد ریزغده‌ها در ماه دوم نسبت به ماه اول حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد افزایش پیدا کرده بود (شکل B-1). تعداد ریزغده‌ها در ماه‌های سوم و چهارم با یک شیب ملایم افزایشی به تعداد ۴/۵ تا ۵ ریزغده رسید همچنین در ریزغده‌زایی ماه چهارم بیشترین تعداد مربوط به تیمار نانوکامپوزیت پرولین پوشش‌دار شده با کیتوزان در غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر بود که نشان داد که مواد نانوکامپوزیت در مراحل آخر ریزغده‌زایی تاثیر مثبت بیشتری بر تعداد ریزغده‌ها داشته است (شکل C-1 و D-1). تیمارهای نانوکامپوزیت در دو غلظت و تیمارهای پرولین به همراه کیتوزان در هر دو غلظت و پرولین در غلظت بالا تعداد بیشتری ریزغده نسبت به تیمارهای شاهد، کیتوزان و غلظت پایین پرولین (۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و کیتوزان به تنهایی، در هر چهار ماه آزمایش تولید نمودند.

شاید بتوان چنین گفت که با توجه به اینکه شوری باعث القای ریزغده‌زایی می‌شود ولی گیاه سیب‌زمینی به خصوص در مراحل اولیه رشد حساس به شرایط شوری می‌باشد لذا در مراحل اولیه رشد مواد کاهش دهنده اثرات شوری مانند پرولین و ترکیبات نانوکامپوزیت در محیط کشت باعث رشد اولیه می‌شود و در ادامه شوری محیط کشت باعث القای تولید پرولین در خود گیاه می‌شود که همراه با پرولین محیط کشت گیاه سیب‌زمینی را تا مراحل آخر ریزغده‌زایی در مقابل شوری محافظت می‌نماید. در تحقیقی تقریباً مشابه که با استفاده از ترکیبات نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم انجام گرفته است با کاربرد ۲ میلی‌گرم در لیتر از این ترکیب بیشترین تعداد ریزغده از هر گیاهچه بدست آمده است (Al-Jibouri et al., 2017). در آزمایشی تاثیر تنش‌های غیرزیستی ملایم روی میزان رشد ریزغده و ریزغده‌زایی سیب‌زمینی انجام شد، نشان داد که تنش‌های غیرزیستی به صورت ملایم شامل سرما (۴ درجه سلسیوس)، گرما (۳۰-۴۵ درجه سلسیوس) و شوری ملایم ریزغده‌زایی و رشد ریزغده را افزایش دادند و تطابق این نتایج با آزمایش ما می‌تواند به عنوان یک راهکار جدید برای افزایش ریزغده‌زایی مطرح گردد (Pumisutapon and

قاسمی و همکاران: اثر نانو کامپوزیت پرولین پوشش دار...



**Figure 1.** The average number of microtuber in treatment of chitosan, proline and nanocomposite coated proline (unit of concentrations mg / l) first month (A), second month (B), third month (C) and the number of (fourth) final microtuber (D).



Table 1- Analysis of variance microtuberization traits in two levels of salinity and treatments of proline, chitosan and nanocomposite coated proline

	df	Mean squares											
		N. of first month microtuber	N. of second month microtuber	third N. of month microtuber	N. of final microtuber	N. of stolon	Stolon length	Microtuber weighth	Microtuber yield	N. of eye	Microtuber sproute	Shoot on microtuber	Microtuber diameter
Salinity	1	13.01**	7.52**	4.6**	12.00**	2.08**	17.16**	0.015**	0.022**	0.020 <sup>ns</sup>	3.36 <sup>ns</sup>	0.062 <sup>ns</sup>	2.91**
Nanocomposite treatment	7	3.61**	3.99**	4.1*	2.47**	2.14*	2.56**	0.005*	0.009**	1.62*	1.75 <sup>ns</sup>	0.684 <sup>ns</sup>	3.8**9
Salinity× Nanocomposite	7	0.973 <sup>ns</sup>	0.91 <sup>ns</sup>	0.59 <sup>ns</sup>	0.571 <sup>ns</sup>	1.7 <sup>ns</sup>	0.71 <sup>ns</sup>	0.001 <sup>ns</sup>	0.006**	1.11 <sup>ns</sup>	0.49 <sup>ns</sup>	0.362 <sup>ns</sup>	1.31**
Experimental error	32	0.677	0.47	0.68	0.729	0.45	0.35	0.002	0.001	0.667	2.1	0.702	0.34
C. V %		36.1	22.85	22.2	19.1	55.9	43.89	24.7	28.74	45.13	35.9	42.2	20.82

ns, \*\* and \*: non-significant, significant at  $p \leq 0.01$  and  $p \leq 0.05$ , respectively

Table 2- Mean traits measured in two level salinity NaCl

NaCl	Mean squares						
	N. of first month microtuber	N. of second month microtube	N. of third month microtube	N. of final microtuber	N. of stolon	Stolon length (mm)	Microtuber weighth (mg)
Without salinity	1.71 <sup>b</sup>	2.71 <sup>b</sup>	3.41 <sup>b</sup>	4.16 <sup>b</sup>	1.04 <sup>b</sup>	7.29 <sup>b</sup>	40 <sup>a</sup>
With salinity (50 mM)	2.75 <sup>a</sup>	3.5 <sup>a</sup>	4.04 <sup>a</sup>	5.17 <sup>a</sup>	1.45 <sup>a</sup>	19.25 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>

Mean followed by the same letters in each column are not significantly different according to Duncans Multiple Range test (p 0.05)

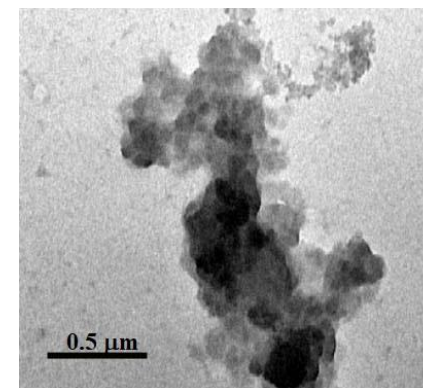
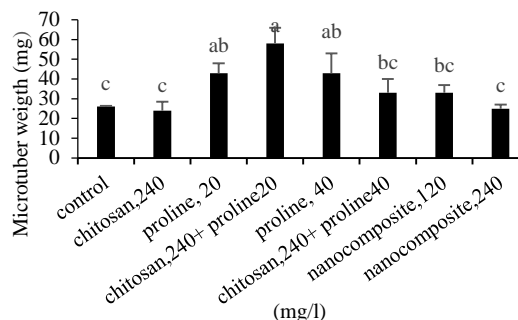


Figure 2- Confirmation of synthesis of nanocomposite proline coated with chitosan

به صورت نانو کامپوزیت همراه با تیمارهای شوری ملایم جهت تحریک کنندگی می‌تواند جهت افزایش عملکرد ریزغده در کشت درون شیشه‌ای سیب‌زمینی مناسب باشند. در جهت اثبات نتایج ما با نتایج محققان پیشین، نتایج آزمایش کاربرد کیتوزان بر رشد و عملکرد مینی تیور نشان داد که کاربرد ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان باعث تولید مینی تیورهای با وزن بیشتر از ۱/۵ گرم در هر گیاهچه شد که همچنین با کاربرد این غلظت از کیتوزان سایر صفات شامل تعداد مینی تیور در هر گیاهچه، تعداد برگ در هر گیاهچه و طول گیاهچه افزایش پیدا یافت (Asghari-Zakaria *et al.* 2009). با توجه به اینکه پرولین به عنوان رایج ترین اسمولیت در بسیاری از گیاهان به عنوان پاسخ به انواع تنش‌های محیطی در گیاهان تجمع می‌یابد و تجمع آن در سیتوپلاسم سلول موجب کاهش پتانسیل اسمزی شده و جذب آب در شرایط تنش را افزایش می‌دهد. پرولین در حفظ متابولیسم و سنتز پروتئین و در تعادل اسمزی داخل سلولی و محافظت آنزیم‌های سلولی و ساختار آن‌ها نقش دارد (Kishor *et al.* 2015; Yousry *et al.* 2015). در آزمایشی همبستگی مثبت و معنی‌داری در تنش دمایی در ارقام و کلون‌های امید بخش سیب‌زمینی درون شیشه‌ای بین میزان پرولین و آنزیم پراکسیداز به وجود آمد همچنین با افزایش میزان تنش اسمزی در محیط کشت از ۰/۵- مگاپاسکال تا ۱/۵- مگاپاسکال، پرولین با فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و محتوی پروتئین همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد داشت (Jafari *et al.* 2019). در مطالعه تاثیر نانوذره کبالت بر خصوصیات مورفولوژیکی سیب زمینی رقم سانتانا در شرایط درون شیشه‌ای مشاهده گردید که وجود نانوذره کبالت باعث شکل‌گیری سریع تر ریزغده‌ها گردید، همچنین بیشترین اندازه و عملکرد ریزغده‌ها از ترکیب ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر نانوذره کبالت همراه با ۸۰ گرم در لیتر ساکارز به دست آمد (Hamza, 2019). گزارش‌های پیشین نشان دادند که میزان کلروفیل a، کلروفیل b، پرولین، فعالیت آنزیم PAL و فعالیت آنزیم کاتالاز گیاه فلفل با کاربرد نانو کامپوزیت اکسید روی



**Figure 3. Effect of chitosan, proline and nanocomposite coated proline treatments on microtuber weight**

عملکرد ریزغده (میلی‌گرم در هر تیمار آزمایش): نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل شوری و تیمارهای نانو کامپوزیت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. با توجه به اینکه صفت عملکرد ریزغده یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای ارزیابی نتایج به دست آمده از تیمارهای آزمایش می‌باشد بنابراین با توجه به تجزیه و تحلیل مقایسات میانگین مربوط به عملکرد ریزغده در شکل ۴، بیشترین عملکرد ریزغده مربوط به تیمارهای کیتوزان ۲۴۰ همراه با پرولین ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم لیتر به ترتیب با میانگین وزن ۲۱۰ و ۱۸۲ میلی‌گرم، نانو کامپوزیت ۱۲۰ و ۲۴۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب با میانگین وزن ۲۰۹ و ۱۵۰ میلی‌گرم و پرولین ۴۰ میلی‌گرم در لیتر با ۱۵۳ میلی‌گرم در محیط کشت‌های با شوری ملایم به دست آمده است که این تیمارها با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. از دو غلظت استفاده شده برای تیمارهای نانو کامپوزیت غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر برای عملکرد ریزغده مناسب‌تر بود به طوری که در غلظت بالاتر مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری در شرایط شوری ملایم با شرایط بدون شوری مشاهده نشد. تفاوت معنی‌دار عملکرد ریزغده در کیتوزان ۲۴۰ همراه با پرولین ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر و نانو کامپوزیت پرولین پوشش‌دار با غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد که در این تیمارها عملکرد ریزغده در تیمارهای دارای شوری ملایم نسبت به تیمارهای بدون شوری افزایش عملکرد را نشان داده است، بنابراین کاربرد ترکیبات اسمولیت کننده پرولین و ترکیبات با خاصیت الیستوری کیتوزان و ترکیب این دو ماده

تعداد و طول استولون: کاربرد کیتوزان در قالب نانوکامپوزیت می‌تواند به عنوان یک الیستور با پتانسیل بالا در کشت بافت گیاهی مطرح شود لذا مشاهده شد که تیماری که فقط دارای ۴۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین داشت نسبت به تیمار کیتوزان ۲۴۰ همراه با ۴۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین از تعداد استولون‌های بیشتری برخوردار بود و تیمار کیتوزان ۲۴۰ میلی‌گرم در لیتر استولون تشکیل نداد و این امر نشان می‌دهد که کیتوزان به تنهایی استولون تولید نمی‌کند یا مانع تشکیل استولون می‌شود و استفاده از کیتوزان به شکل نانوکامپوزیت باعث کارایی بیشتر این ترکیب می‌شود (شکل ۷-A). مقایسه میانگین طول استولون نشان داد که تنها تفاوت معنی‌دار چشم‌گیر مربوط به تیمار نانوکامپوزیت پرولین پوشش‌دار شده ۲۴۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد که طول استولون نزدیک به ۲۵ میلی‌متر و بقیه تیمارها به جز تیمار کیتوزان ۲۴۰ میلی‌گرم در لیتر در حدود ۱۲ تا ۱۶ میلی‌متر طول دارند که تفاوت معنی‌داری با هم ندارند (شکل ۷-B). تیمار شوری ملایم نسبت به تیمار بدون شوری برای افزایش تعداد استولون معنی‌دار بود که این نتایج نشان داد که شوری ملایم نقش تحریک‌کنندگی خوبی در تشکیل تعداد استولون داشته است. همچنین میانگین طول استولون در محیط کشت‌های بدون شوری ۷/۲۹ میلی‌متر و در محیط کشت‌های دارای شوری ملایم ۱۹/۲۵ میلی‌متر بود که افزایش ۲/۵ برابری در طول استولون مشاهده گردید (جدول ۲).

پوشش‌دار شده با کیتوزان به مقدار قابل توجهی افزایش در مقایسه با شاهد داشتند (Asgari-Targhi *et al.* 2021). قطر ریزغده: مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف و شوری ملایم نشان داد که قطر ریزغده‌ها، از ترکیب تیمارها و شوری متاثر است و قطر ریزغده‌ها از ۲ الی ۶ میلی‌متر متغیر بود. با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش، بیشترین میزان قطر ریزغده مربوط به تیمار کیتوزان ۲۴۰ همراه با پرولین ۲۰ میلی‌گرم در لیتر است که با استفاده از شوری ملایم در محیط کشت این تیمار، قطر ریزغده به حدود نصف کاهش پیدا کرد (شکل ۵)، که این بیانگر کاهش قطر ریزغده‌ها در تمام تیمارها در شرایط شوری بود ضمن این‌که، به غیر از تیمار کیتوزان ۲۴۰ همراه با پرولین ۲۰ میلی‌گرم (شکل ۶) در بقیه تیمارها هیچ تفاوتی بین شرایط شوری و بدون شوری وجود نداشت. بر اساس نتایج محققان پیشین، در بررسی واکنش رقم‌ها و کلون‌های امیدبخش سیب‌زمینی به تنش اسمزی و دمایی در شرایط درون شیشه‌ای مشخص شد که در دمای ۳۵ درجه سلسیوس میزان تجمع پرولین بالاتر از دماهای ۱۵ و ۲۵ درجه سلسیوس بود و این بیانگر تحمل دمای بالا توسط گیاهچه‌ها در تیمار شاهد به جهت وجود پرولین بیشتر بود (Jafari *et al.* 2019). همچنین در یک مطالعه که با کاربرد دو نانوذره نیترا نقره و دی‌اکسید تیتانیوم در محیط کشت MS انجام گرفته بود مشاهده گردید که غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر نانوذره نیترا نقره باعث افزایش معنی‌دار وزن و قطر ریزغده شد که بیشترین وزن ریزغده و قطر آن به ترتیب ۳۷/۳۵ میلی‌گرم و ۶/۰۷ میلی‌متر به دست آمد (Al-Jibouri *et al.* 2017).



Figure 6. Above figure two week after explant culture. Below figures microtubers diameter in treatment of chitosan 240 with 20 mg/l proline in without salinity medium (right figure) and salinity (left figure)

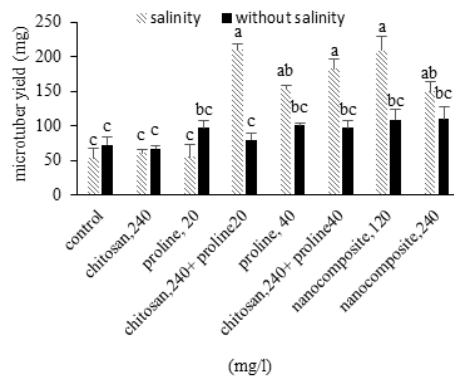


Figure 4. Mean yield of microtubers in treatments of chitosan, proline and nanocomposite coated proline and salinity

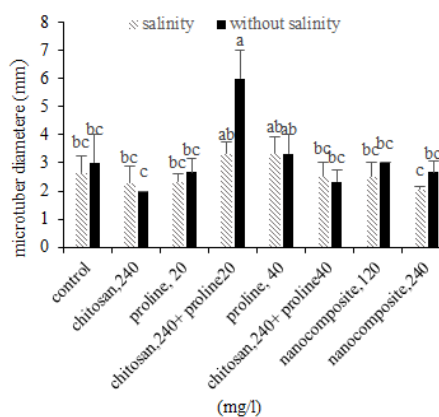


Figure 5. Mean diameter of microtubers in treatments of chitosan, proline and nanocomposite coated proline and salinity

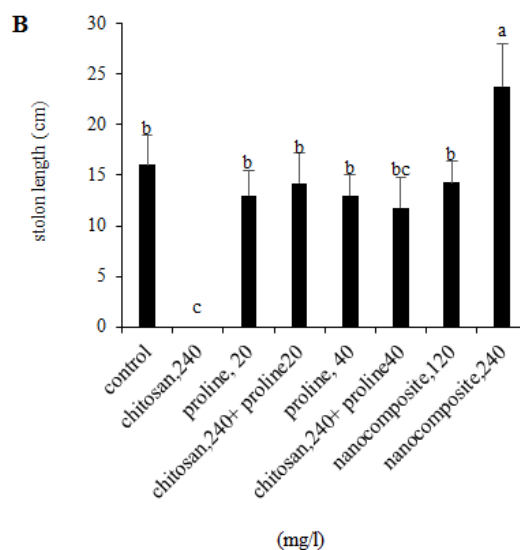
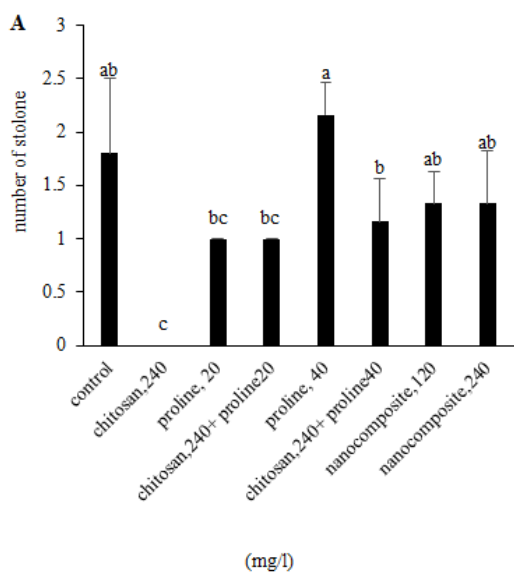


Figure 7- Mean stolon number (A) and stolon weight (B) in chitosan, proline and nanocomposite coated proline treatments

### نتیجه‌گیری

در زمینه ریزغده‌زایی سبب‌زمینی استفاده از ترکیب نانوکامپوزیت افزایش معنی‌داری در تعداد ریزغده‌ها نسبت به شاهد دیده شد که این افزایش در مراحل آخر ریزغده‌زایی به طور محسوس اثر خود را بروز داد. همچنین استفاده از شوری ملایم همراه با استفاده از ترکیبات تیماری برای تحریک ریزغده‌زایی موثر بود که استفاده از این مکانیسم باعث افزایش عملکرد ریزغده‌ها شد. بر اساس نتایج به دست آمده از این آزمایش، غلظت

۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانوکامپوزیت پرولین پوشش‌دار شده با کیتوزان برای ریزغده‌زایی سبب‌زمینی غلظت مناسب‌تری می‌باشد.

### سپاس‌گزاری

بدین وسیله از زحمات کارشناسان آزمایشگاه‌های گروه علوم باغبانی و مسئولین ساختمان تحصیلات تکمیلی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز کمال تشکر و قدردانی را داریم.

### References:

- Al-Jibouri, A. M. J., Abed, A. S., Hussin, Z. S., & Abdhusein, A. A. (2017). Effect of nanoparticles on in vitro microtuberization of potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Biotechnology Research Center*, 11(1), 57–61.
- Amerian, M., & Esna-Ashari, M. (2011). Effect of NaCl stress and sucrose on potato microtuberization. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 5(2), 96–98.
- Amerian, M., & Esna-Ashari, M. (2017). Effect of different levels of salinity on some -physiological and cells-growth -characteristics in three -potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars in vitro. *Plant Production Technology*, 9(1), 209–225. <https://doi.org/10.22084/ppt.2017.2214>
- Asgari-Targhi, G., Iranbakhsh, A., Ardebili, Z. O., & Tooski, A. H. (2021). Synthesis and characterization of chitosan encapsulated zinc oxide (ZnO) nanocomposite and its biological assessment in pepper (*Capsicum annuum*) as an elicitor for in vitro tissue culture applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, 170–182.
- Asghari-Zakaria, R., Maleki-Zanjani, B., & Sedghi, E. (2009). Effect of in vitro chitosan application on growth and minituber yield of *Solanum tuberosum* L. *Plant, Soil and Environment*, 55(6), 252–256. <https://doi.org/10.17221/1018-pse>
- Al-Jibouri, A.M.J., Abed, A.S., Hussin, Z.S. & Abdhusein, A. A. (2017). Effect of nanoparticles on in vitro microtuberization of potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.). *Journal Biotechnology Research Center*. 11:57–61
- Amerian, M. & Esna-Ashari, M. (2017). Effect of Different Levels of Salinity on some Physiological and Cells-growth Characteristics in Three Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivars In Vitro. *Plant proction Technology*. 9:209–225. <https://doi.org/10.22084/ppt.2017.2214>
- Amerian, M & Esna-Ashari. M. (2011). Effect of NaCl stress and sucrose on potato microtuberization. *Fruit, Veg Cereal Sci Biotechnol* 5:96–98
- Asgari-Targhi G, Iranbakhsh A, Ardebili ZO & Tooski AH (2021) Synthesis and characterization of chitosan encapsulated zinc oxide (ZnO) nanocomposite and its biological assessment in pepper (*Capsicum annuum*) as an elicitor for in vitro tissue culture applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189:170–182
- Asghari-Zakaria R, Maleki-Zanjani B & Sedghi E (2009) Effect of in vitro chitosan application on growth and minituber yield of *Solanum tuberosum* L. *Plant, Soil and Environment*, 55:252–256. <https://doi.org/10.17221/1018-pse>

- Daneshmand fatemeh (2014) The effect of ascorbic acid on reduction of oxidative stress caused by salinity in potato. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 27:417–426. <https://doi.org/2739>
- Donnelly DJ, Coleman WK & Coleman SE (2003) Potato microtuber production and performance: a review. *American Journal of Potato Research*, 80:103–115
- Gohari G, Zareei E & Kulak M, *et al* (2021) Improving the berry quality and antioxidant potential of flame seedless grapes by foliar application of chitosan–phenylalanine nanocomposites (CS–Phe NCs). *Nanomaterials*, 11:2287
- Hamza EM (2019) Improvement of Potato Micropropagation and Microtubers Formation as Affected by Nanoparticles. *Middle East Journal of Agriculture Research*, 08:525–532
- Ibrahim AS, Fahmy AH & Ahmed SS (2018) Silver Nanoparticles Promote Microtuberization in Potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Desirée. *Materials Science, Environmental Science, Biology, Agricultural and Food Sciences*, 4:14-29.
- Jafari F, Panahandeh J, Motallebi-azar AR & Torabie-Giglou M (2019) Response of potato's cultivars and promising clones to osmotic and temperature stress under in vitro conditions. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 50:633–648. <https://doi.org/10.22059/ijhs.2018.257388.1447>
- Kishor PBK, Hima Kumari P, Sunita MSL & Sreenivasulu N (2015) Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Frontiers in Plant Science*, 6:1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00544>
- Mahdavi B, Modarres Sanavy SAM & Aghaalikhani M, *et al* (2011) Chitosan improves osmotic potential tolerance in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seedlings. *Journal of Crop Improvement*, 25:728–741
- Martinez CA, Maestri M & Lani EG (1996) In vitro salt tolerance and proline accumulation in Andean potato (*Solanum* spp.) differing in frost resistance. *Plant Science*, 116:177–184
- Pumisutapon P & Topoonyanont N (2015) Moderate-abiotic stress increase in vitro tuberization and microtuber growth of potato. In: VI *International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants* 1155. pp 215–220
- Solgi M & Taghizadeh M (2017) The Effects of Silver Nitrate, Thymol, Green Silver Nanoparticles and Chitosan on Vase Life of Carnation Cut Flowers cv. White Liberty. *Plant Productions*, 40:1–12. <https://doi.org/10.22055/ppd.2017.13112> [ in persian]
- Yousry M, El-mesirry DS, Shama MA (2015) Effect of Proline on Resistance of Potato Crop (*Solanum tuberosum* L.) for the Negative Effects of Water Irrigation Salinity. *Current Science International*, 4:172–177
- Zhang Z, Mao B, Li H, *et al* (2005) Effect of salinity on physiological characteristics, yield and quality of microtubers in vitro in potato. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27:481–489