به‌زراعی کشاورزی
دوره ۱۷ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۴
صفحه‌های ۱۳۸-۱۳۱

تأثیر برخی از اسیدهای آمینه بر افزایش ریزغده‌زایی سیب‌زمینی رقم 'آگریا'

یلدا قاضی وکیلی[۱]، علی‌رضا مطلبی‌آذر[۲]، فریبرز زارع نهندی[۳]* و ناصر مهنا[۴]

۱. کارشناس ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۴. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۳/۲۳

چکیده

با توجه به اهمیت تولید و تکثیر گیاهان عاری از ویروس در سیب‌زمینی تاکنون تعدادی از عوامل دخیل در تکثیر سیب‌زمینی (تولید گیاهچه‌ها و ریزغده‌های درون‌شیشه‌ای عاری از ویروس) بررسی شده است. مطابق نتایج دیگر تحقیقات، افزودن مخلوطی از اسیدهای آمینه، تأثیر مهمی در کشت بافت گیاهان دارد و رشد را در بسیاری از موارد افزایش می‌دهد. این آزمایش به‌منظور بررسی اثر چهار اسیدآمینهٔ گلوتامین، آرژنین، آسپاراژین، سیستئین و ترکیب دوتایی آنها بر ریزغده‌زایی سیب‌زمینی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. جوانه‌های جانبی حاصل از شاخساره‌های درون‌شیشه‌ای به‌عنوان ریزنمونه و تحت شرایط استریل روی محیط کشت MS کشت شدند. کشت‌ها در تاریکی مداوم و دمای ۲±۱۷ درجهٔ سانتی گراد در ژرمیناتور نگهداری شدند. طی ماه اول کشت، سرعت ریزغده‌زایی و پس از اتمام دو ماه صفاتی نظیر درصد ریزغده‌زایی، ریزغده‌های فاقد دورهٔ خواب ومتوسط وزن ریزغده اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌ها نشان داد که همهٔ صفات مورد بررسی به جز ریزغدهٔ فاقد دورهٔ خواب تحت تأثیر چهار اسیدآمینهٔ مذکور معنادار بودند. در پژوهش حاضر، اسیدآمینهٔ آسپاراژین در ترکیب با اسیدآمینهٔ آرژنین تأثیر مثبتی در بهبود اکثر صفات مهم از جمله متوسط وزن ریزغده و سرعت ریزغده‌زایی داشت.

کلیدواژه‌ها: آرژنین، آسپاراژین، دورهٔ خواب، سرعت ریزغده‌زایی، وزن ریزغده.

* نویسنده مسئول Email: fzaare@gmail.com

۱. مقدمه

سیب‌زمینی[1] یکی از مهم‌ترین گیاهان تیرهٔ Solanaceae است. ازآنجا که ازدیاد سیب‌زمینی توسط اندام‌های غیرجنسی (غده‌ها و ریزغده‌ها) صورت می‌گیرد، دسترسی به گیاهان و غده‌های سالم و مناسب حائز اهمیت است. با توجه به حساسیت سیب‌زمینی به ویروس‌ها، تولید گیاهان عاری از ویروس از طریق کشت درون‌شیشه‌ای و تکثیر آنها، به کاهش هزینه‌ها و افزایش عملکرد منجر می‌شود [۴]. یکی از روش‌های مؤثر کاهش بیماری‌ها، تولید ریزغده‌های عاری از امراض با روش‌های مختلف کشت بافت است. این ریزغده‌های عاری از بیماری را می‌توان در تمام طول سال و در هر حجمی تولید کرد [۱۴]. تولید ریزغده، صنعت تولید بذر سیب‌زمینی را متحول کرده است. تولید ریزغده در شرایط درون‌شیشه‌ای اولین بار به‌عنوان ابزار تجربی برای حل مشکلات پاتولوژیکی در سیب‌زمینی [۹]، توسط کشت گره‌های منفرد با جوانه‌های جانبی برای تولید غدهٔ بذری عاری از ویروس صورت گرفت [۱۱]. عامل‌های مؤثر بر ریزغده‌زایی در شرایط درون‌شیشه‌ای شامل ژنوتیپ [۱]، نوع ریزنمونه [۱۸]، فتوپریود [۱۶]، دما [۲]، نوع منبع کربن [۹]، تنظیم‌کننده‌های رشد [۲۰] و ترکیبات محیط کشت [۲۴] است.

بهینه‌سازی برخی از ترکیبات محیط کشت به‌خصوص اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها در گیاهانی نظیر کاج که پاسخ ضعیفی به کشت بافت دارند، می‌تواند سبب بهبود شرایط ریزازدیادی شود [۸]. به‌نظر می‌رسد افزودن اسیدهای آمینه تأثیر زیادی در کشت بافت گیاهان دارد، اما محیط‌های کشت مورد استفاده به‌ندرت با اسیدهای آمینه تکمیل شده‌اند [۳]. اسیدهای آمینه با اهداف مختلفی استفاده می‌شوند. برای مثال، برای جنین‌زایی سوماتیکی از اسیدهای آمینهٔ آلانین و پرولین در یونجه [۲۲] و نیز گلیسین، آسپاراژین، پرولین و سرین در ذرت [۶] استفاده شده است. به‌منظور افزایش باززایی به‌عنوان منبع نیتروژن آلی در کشت‌های درون‌شیشه‌ای از سیستئین در برنج [۱۲]، گلوتامین در آناناس [۱۳] و آسپاراژین در سورگوم [۲۱] بهره گرفته شده است. تیمار با اسیدآمینه، به سطح بالایی از جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی شاخساره نسبت به محیط‌های کشت عاری از اسیدآمینه منجر شده است و افزودن مخلوطی از اسیدهای آمینه به محیط کشت رشد را در بسیاری از موارد افزایش داده است [۳]. در گیاه نیشکر، اسیدهای آمینهٔ گلوتامین، آرژنین، آسپاراژین، سیستئین و گلیسین تأثیر بسزایی در تحریک باززایی از کالوس غیرجنین‌زا داشتند [۳]. محققان در آزمایشی دیگر به نتایجی مبنی بر سودمند بودن اسیدآمینهٔ گلوتامین برای جنین‌زایی و رشد کالوس جنین‌زا در خرما رسیدند [۸].

نیتروژن در محیط کشت به‌صورت آلی و معدنی استفاده می‌شود. تمام موجودات زنده به نیتروژن به‌عنوان عنصری ضروری نیازمندند که اکثر آنها در اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدها وجود دارند. نیتروژن آلی در رشد و تمایز سلول‌های گیاهی تأثیر دارد [۳]. در همهٔ محیط‌های کشت، غلظت نیتروژن معدنی بیشتر از سایر عناصر بیشتر است که مؤید اهمیت این عنصر در رشد سلولی و ریخت‌زایی درون‌شیشه‌ای است. از طرف دیگر، استفاده از منبع نیتروژن آلی که اغلب از طریق اسیدهای آمینه تأمین می‌شود، می‌تواند در بهبود رشد سلول، کالوس، جنین‌زایی سوماتیکی و شاخه‌زایی تأثیر داشته باشد. ازآنجا که اکثر نیتروژن معدنی تأمین‌شده در محیط کشت توسط بافت‌های گیاهی به اسیدهای آمینه و سپس به پروتئین تبدیل می‌شوند، ممکن است تنها منبع خارجی نیتروژن گیاهان کشت‌شده در محیط کشت اسیدهای آمینه باشد [۱۰]. با توجه به در دست نبودن اطلاعات جامع در مورد تأثیر

1. Solanum tuberosum L.

اسیدهای آمینهٔ گلوتامین، آرژنین، آسپاراژین و سیستئین در ریزغده‌زایی سیب‌زمینی و اهمیت این ترکیبات در ریزازدیادی بسیاری از گیاهان، این مطالعه انجام گرفت.

هدف پژوهش حاضر، ارزیابی تأثیر این اسیدهای آمینهٔ گلوتامین، آرژنین، آسپاراژین و سیستئین و ترکیبی از آنها در سرعت و کمیت ریزغده‌زایی به‌منظور بهینه‌سازی محیط کشت ریزغده‌زایی است.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. پرآوری شاخساره در شرایط درون‌شیشه‌ای

تحقیق حاضر در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی گروه علوم باغبانی دانشگاه تبریز در سال ۱۳۹۱ به اجرا درآمد. پنج ریزنمونه به طول تقریبی ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر، که هر کدام دارای یک تک‌جوانه بودند، در داخل ارلن‌های ۲۵۰سی‌سی محتوی ۳۰ میلی‌متر محیط کشت MS که به آن ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار اضافه شده بود، کشت شدند. کشت‌ها در دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد تحت فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

۲.۲. ریزغده‌زایی درون شیشه‌ای

جوانه‌های جانبی از ساقهٔ گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای که حدود چهار هفته سن داشتند، جدا شدند و پنج ریزنمونه در داخل شیشه‌هایی که محتوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS با ترکیبات مختلف اسیدهای آمینه بودند، قرار گرفتند. اسیدهای آمینهٔ بررسی‌شده در این تحقیق گلوتامین (Gln)، آرژنین (Arg)، آسپاراژین (Asn) و سیستئین (Cys) و ترکیبی از آنها Gln+Cys, Gln+Arg, Gln+Asn, Arg+Asn, (Cys+Arg, Cys+Asn,) بود که به مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌همراه شاهد (بدون اسید آمینه) ارزیابی شدند. ۸۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار قبل از استریل کردن به هر یک از محیط کشت‌ها اضافه شد. کشت‌ها تحت شرایط تاریکی و دمای ۲±۱۷ درجهٔ سانتی‌گراد در اتاق رشد قرار گرفتند. پس از ۳۰ روز، داده‌های سرعت ریزغده‌زایی و پس از اتمام دو ماه صفاتی نظیر ریزغده‌های فاقد دورهٔ خواب، متوسط وزن ریزغده و درصد ریزغده‌زایی اندازه‌گیری شد. در مورد اخیر (درصد ریزغده‌زایی) تعداد ریزغدهٔ تولیدی در هر واحد آزمایش به تعداد کل ریزنمونه‌های به‌دست‌آمده تقسیم و در عدد ۱۰۰ ضرب شد و نتیجه به‌صورت درصد ریزغده‌زایی بیان شد.

آزمایش بر پایهٔ طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. اطلاعات به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخهٔ ۲۰) آنالیز شد. مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

۳. نتایج و بحث

آغازش ریزغده در تیمارهای مختلف متفاوت بود، به این‌صورت که در اکثر ریزنمونه‌ها در هفتهٔ اول کشت، تورم جوانه که نشان‌دهندهٔ القای ریزغده بود، مشاهده و شروع تشکیل ریزغده در هفتهٔ اول پس از کشت دیده شد. در محیط‌های کشت حاوی اسیدهای آمینه Arg-Asn، Gln-Asn، Asn و Cys-Asn تمام ریزنمونه‌ها ریزغده تولید کردند. از طرف دیگر، حداقل تشکیل ریزغده در محیط کشت فاقد اسیدآمینه به‌دست آمد. در هفتهٔ سوم پس از کشت در تمام محیط‌های کشت ۱۰۰ درصد القای ریزغده ملاحظه شد. بعد از یک ماه، محیط‌های کشت حاوی اسیدهای آمینه Arg-Asn، Gln-Asn، Asn و Cys-Asn ریزغدهٔ بیشتری از دیگر تیمارها داشتند. در بسیاری از تیمارها ریزغده‌ها از جوانهٔ جانبی ریزنمونه‌های کشت‌شده به‌صورت مستقیم حاصل شد و این امر در حالی است که

در برخی از ریزنمونه‌ها جوانهٔ جانبی رشد کرد و شاخساره تولید شد. روی همین شاخساره‌ها ریزغده‌هایی به‌طور انتهایی و جانبی تشکیل شدند.

تعدادی از ریزغده‌های تولیدشده در حضور تیمارهای مختلف اسیدهای آمینه فاقد دورهٔ خواب بودند و چشم‌هایشان شروع به رشد و تولید شاخسارهٔ فرعی کردند. وزن ریزغده‌ها در این پژوهش بین ۷ تا ۲۸۷ میلی‌گرم بود. شایان ذکر است که در محیط‌های کشتی که جوانهٔ جانبی قادر به رشد و تولید شاخساره‌های جدید نبود، وزن ریزغده‌ها بیشتر بود، درحالی که در محیط‌های کشتی که ریزغدهٔ کمی تشکیل شده بود، تعداد شاخساره‌ها زیاد بود.

سرعت ریزغده‌زایی نیز در این آزمایش بدین صورت بود که در هر ظرف شروع ریزغده‌زایی از یک ریزنمونه به ریزنمونهٔ دیگر متفاوت بود، به‌طوری که در برخی از ریزنمونه‌ها سه تا شش روز بعد از کشت، ریزغده‌زایی مشاهده شد؛ اما در تعداد اندکی از ریزنمونه‌ها پس از هشت تا هفده روز شروع شد.

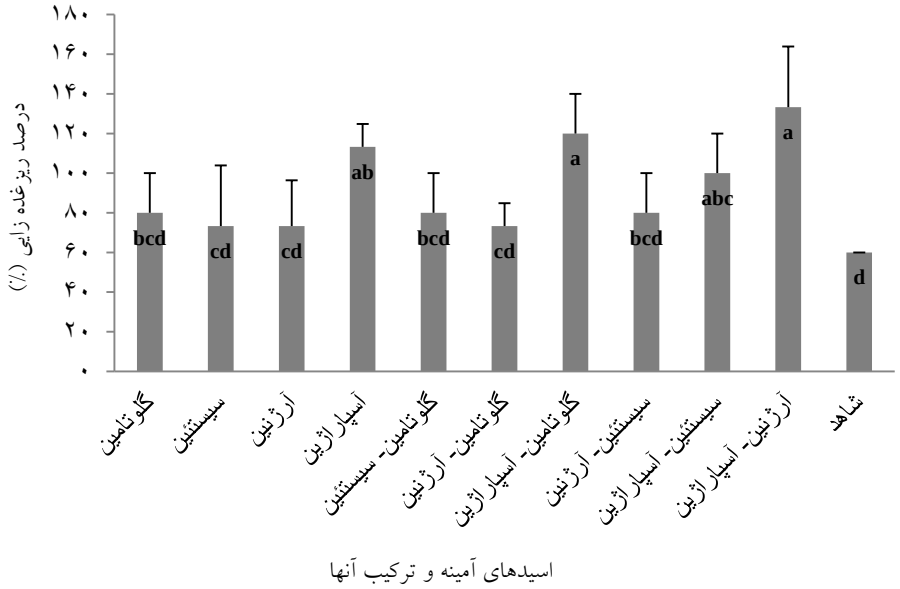
نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تیمارهای مختلف اسیدهای آمینه بر درصد ریزغده‌زایی در سطح احتمال ۱ درصد معنادار بود (جدول ۱). در محیط کشت فاقد اسیدآمینه، درصد ریزغده‌زایی خیلی کم بود و کمترین حد ریزغده‌زایی مشاهده شد، درحالی که بیشترین درصد ریزغده‌زایی در محیط‌های کشت حاوی Asn، Gln-Asn، Arg-Asn و Cys-Asn مشاهده شد و بقیهٔ تیمارهای حاوی اسیدآمینه تأثیراتی مشابه با تیمار شاهد داشتند و بنابراین در درصد ریزغده‌زایی تأثیرگذار نیستند (شکل ۱).

با توجه به نتایج موجود، افزودن اسیدهای آمینه به محیط‌های کشت، تأثیر بسزایی در افزایش درصد ریزغده‌زایی داشته است. از این بین، مناسب‌ترین اسیدهای آمینه برای افزایش این صفت مطلوب Asn، Gln-Asn، Arg-Asn و Cys-Asn تعیین شدند. در تحقیقی دیگر بر روی گیاه سیب‌زمینی نشان داده شد با افزودن مخلوطی از اسیدهای آمینهٔ اسید آسپارتیک، اسید گلوتامیک، لیزین و پرولین به محیط کشت کیفیت غده‌ها می‌تواند تحت تأثیر قرار گیرد [۲۲]. اسید آسپارتیک، اسید گلوتامیک، لیزین و پرولین در غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت القای تأثیر چندانی در تولید غده نداشت و فقط در پرولین افزایش دیده شد؛ اما در این پژوهش بر خلاف آزمایش بالا نشان داده شد که آسپاراژین به‌تنهایی و در ترکیب با آرژنین، گلوتامین و سیستئین تأثیر بسزایی در افزایش درصد ریزغده‌زایی داشت.

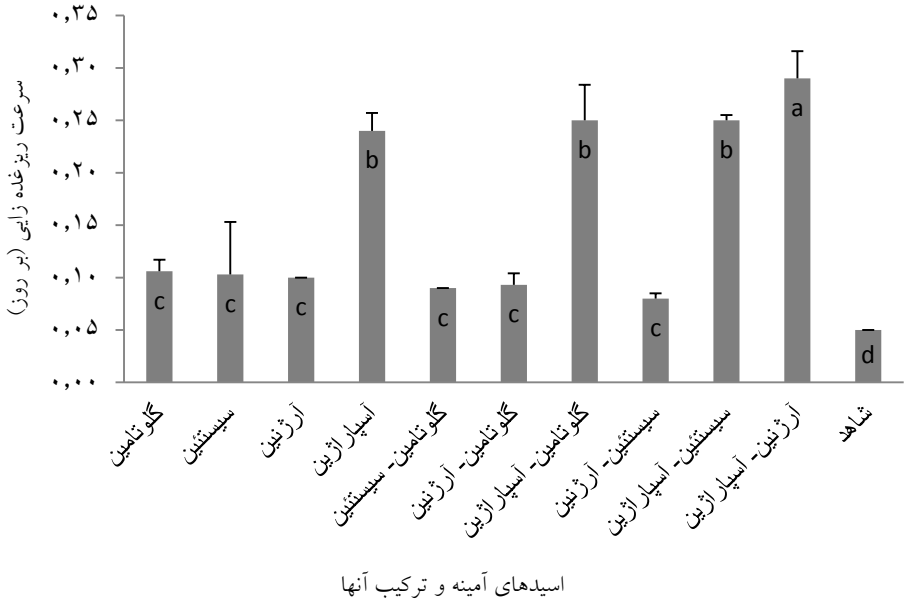
جدول ۱. تجزیهٔ واریانس صفات اندازه‌گیری‌شده در تیمارهای اسیدهای آمینه

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات صفات			
		ریزغده فاقد دورمانسی	سرعت ریزغده‌زایی	ریزغده‌زایی (٪)	متوسط وزن ریزغده
تیمارهای اسیدآمینه	۱۰	۱۱۸/۷۸^{ns}	۰/۰۲۳**	۱۶۳۶/۳۶۴**	۰/۰۰۱**
اشتباه آزمایشی	۲۲	۱۴۵/۴۵	۰/۰۰۱	۴۲۴/۲۴۲	۰/۰۰۱

*، **: به‌ترتیب معناداری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد، ns : عدم معناداری.



شکل ۱. درصد ریزغده‌زایی در تیمارهای مختلف اسیدآمینه (مقدار هر اسیدآمینه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر است)

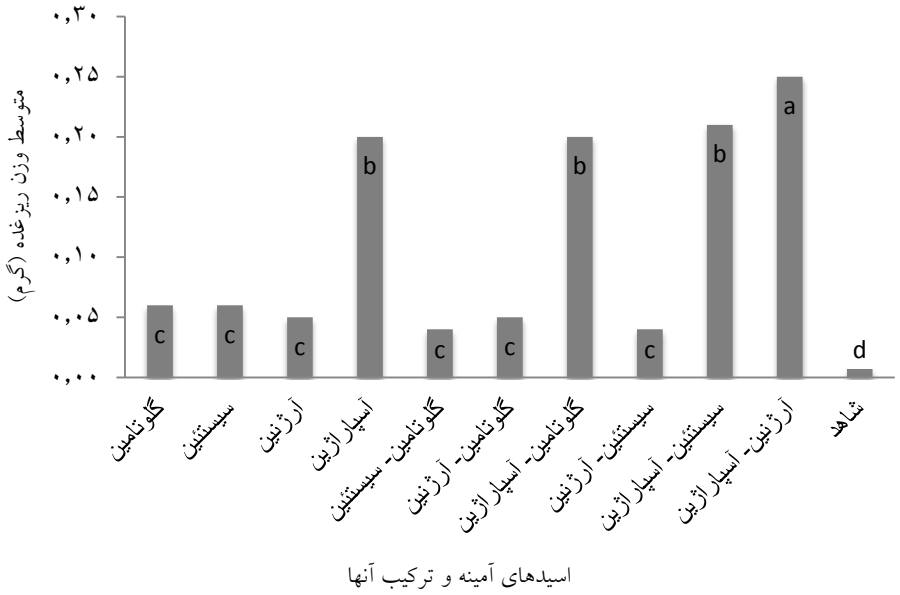


شکل ۲. سرعت ریزغده‌زایی در تیمارهای مختلف اسیدآمینه (مقدار هر اسیدآمینه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر است)

سرعت ریزغده زایی عبارت از سرعت تولید ریزغده در واحد زمان است که هرچه بیشتر باشد، تولید ریزغده سریع تر انجام می گیرد. در این پژوهش مشاهده شد که سرعت ریزغده‌زایی به‌طور معناداری از اثر اسیدهای آمینه متأثر شد ($P<0/01$). حداکثر سرعت ریزغده زایی مربوط به محیط کشت حاوی Arg-Asn بود، درحالی که حداقل سرعت ریزغده‌زایی در محیط کشت فاقد اسیدآمینه مشاهده شد. تیمارهای آسپاراژین، گلوتامین-آسپاراژین و

سیستئین-آسپاراژین بعد از تیمار آرژنین-آسپاراژین بیشترین سرعت ریزغده زایی را به خود اختصاص دادند، اگرچه اختلاف معناداری بین سه تیمار ذکرشده دیده نشد (شکل ۲). وجود ساکارز نیز در محیط کشت سبب شروع زودتر ریزغده‌زایی از جوانه‌های جانبی می‌شود و درنتیجه در غلظت‌های زیاد به‌عنوان سیگنال برای ریزغده‌زایی ضروری است [۱۷ ، ۵]. با توجه به نتایج پژوهش حاضر، مطلوب‌ترین اسیدآمینه برای افزایش سرعت ریزغده‌زایی Arg-Asn مشخص شد. این امر در حالی است که در صفات بررسی‌شدهٔ قبلی نظیر درصد ریزغده‌زایی، آسپاراژین به‌تنهایی و در ترکیب با دیگر اسیدهای آمینه تأثیر مثبتی داشت، اما در این صفت ملاحظه شد که آسپاراژین فقط در ترکیب با آرژنین تأثیرگذار بود؛ البته آرژنین به‌تنهایی تأثیر چندانی در افزایش سرعت ریزغده‌زایی نداشت.

وزن ریزغده‌ها به‌طور تقریبی بین ۷ تا ۲۸۷ میلی‌گرم متغیر بود. وزن ریزغده‌ها نیز به‌طور معناداری تحت تأثیر تیمارهای مختلف اسیدهای آمینه بود ($P<0/01$). حداکثر وزن ریزغده ها متعلق به محیط کشت دارای اسیدهای آمینه Arg-Asn بود، درحالی که این صفت در محیط کشت فاقد اسیدآمینه (شاهد) به کمترین مقدار خود کاهش یافت (شکل ۳). براساس نتایج به‌دست‌آمده، در حضور ترکیبی از دو اسیدآمینهٔ آرژنین و آسپاراژین، وزن ریزغده ها نسبت به سایر محیط‌های کشت حاوی اسیدآمینه خیلی زیاد بود، درحالی که تیمار شاهد نسبت به دیگر محیط‌های کشت دارای اسیدآمینه، کمترین وزن ریزغده را به خود اختصاص داد. ریزغده های با وزن کم، گیاهچه هایی با تعداد غده کم تولید می کند. بنابراین وزن ریزغده یکی از شاخص های مهم در تولید ریزغده‌های درون‌شیشه‌ای است [۷]. غلظت زیاد ساکارز نیز تولید وزن تر و مقدار مادهٔ خشک را بهبود می‌بخشد [۱۱]. در این صفت نظیر صفت سرعت ریزغده‌زایی، آسپاراژین به‌تنهایی تأثیرگذاری کمتری داشت و در ترکیب با آرژنین تأثیر مثبتی را از خود نشان داد.



شکل ۳. متوسط وزن ریزغده در تیمارهای مختلف اسیدآمینه (مقدار هر اسیدآمینه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر است)

رشد جوانه‌ها و نبود دورهٔ خواب در آنها به شرایط فیزیولوژیکی، به‌خصوص بازدارنده‌های رشد جوانه‌ها وابسته است [۱۴]. دورهٔ خواب نامشخص در ریزغده های سیب‌زمینی سبب کاهش سودمندی آن‌ها به‌عنوان بذر گواهی شده است [۱۹]. در این پژوهش، در تعدادی از ریزغده های تولیدی در محیط‌های کشت بررسی شده، جوانهٔ موجود بر روی ریزغده، شروع به رشد کرد و این امر نشان داد که این ریزغده‌ها فاقد دورهٔ خواب بودند.

تجزیه‌وتحلیل داده‌های مربوط به دورهٔ خواب ریزغده ها نشان داد که تأثیر نوع و ترکیب اسیدهای آمینه بر دورهٔ خواب ریزغده‌ها معنادار نبودند (جدول ۱). ازاین‌رو تیمارهای مختلف اسیدهای آمینه و گروه شاهد، دورهٔ خواب یکسانی نسبت به هم و نسبت به شاهد ایجاد کردند. همان‌طور که ذکر شد عامل دورهٔ خواب هورمون ABA است وغیرمعنادار بودن صفت تولید ریزغدهٔ فاقد دورهٔ خواب نشان‌دهندهٔ این است که اسیدهای آمینه تأثیری بر دورهٔ خواب نداشتند. عوامل متعددی از قبیل ژنوتیپ، اندازهٔ ریزغده، مدت زمان قرار گرفتن ریزغده ها در محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد، بلوغ جوانه و سطح داخلی ABA بر خواب ریزغده‌ها اثر می‌گذارند [۱۵].

۴. نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه محیط کشت MS نوعی محیط کشت غنی به‌منظور ریزغده‌زایی است و تا کنون تحقیقی دربارهٔ گیاهان به‌ویژه سیب‌زمینی با تغییر اسیدهای آمینه صورت نگرفته، می‌توان گفت در همهٔ صفات ریزغده‌زایی، استفاده از اسیدهای آمینه (به خصوص آسپاراژین به تنهایی و در ترکیب با دیگر اسیدهای آمینه) تأثیر معناداری دارد و این امر نشان می‌دهد که برای ریزغده‌زایی استفاده از اسیدهای آمینه بسیار مفید است. به‌کارگیری اسیدهای آمینه در محیط کشت نشان داد که اسیدآمینهٔ آسپاراژین در کنار اسیدآمینهٔ آرژنین بر سرعت ریزغده‌زایی و وزن ریزغده‌های تشکیل‌شده تأثیر مثبت داشت. در این آزمایش تیمارهای مختلف اسیدهای آمینه و شاهد، دورهٔ خواب یکسانی نسبت به‌هم و نسبت به تیمار شاهد ایجاد کردند. غیرمعنادار بودن صفت تولید ریزغدهٔ فاقد دورهٔ خواب نشان می دهد که اسیدهای آمینه تأثیری در دورهٔ خواب نداشتند.

منابع

1. Ahloowalia BS (1999) Minitubers for seed potato production. Farm and Food. 4: 4-6.
2. Akita M and Takayama S (1994) Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. Plant Cell Tissue Organ Culture. 36: 177-182.
3. Asad S, Arshad M and Zafar Y (2009) Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcan. African Journal of Biotechnology. 8(7): 1214-1218.
4. Bajaj YPS (1987) Biotechnology in agriculture and forestry. Potato. Published by Springer-Verlag. 3: 608.
5. Baroja-Fernandez E, Aguirreolea J, Martinkova H, Hanus J and Strand M (2002) Aromatic cytokinins in micropropagated potato plants. Plant Physiological Biochemical. 40: 217-224.
6. Claparols I, Santosa MA and Torne MJ (1993) Influence of some exogenous amino acids on the production of maize embryogenic callus and on endogenous amino acid content. Plant Cell TissueOrgan Culture. 34: 1-11.
7. Donnelly DJ, Coleman WK and Coleman SE (2003) Potato micro tuber production and performance. American Journal of Potato Research. 19: 122-135.
8. El-shiaty OH, El-sharabasy SF and Abd-Kareim AH (2004) Effect of some amino acids and biotin on callus and proliferation of date palm sewy cultivar. Arab Journal of Biotechnology. 7(2): 265-272.

9. Garner N and Blake J (1989) The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. Annual Scientific Reports. 63: 663-674.

10. George EF, Hall MA and De Klert G (2008) Plant propagation by tissue culture. 3th Ed. Published by Springer. 72 P.

11. Gopal J, Chamail A and Sarkar D (2004) *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: Effect of genotype, abscisic acid and sucrose. Arab Journal of Biotechnology. 8: 205-215.

12. Grewel D, Gill R and Gosal S (2006) Role of cysteine in enhancing androgenesis and regeneration of indica rice (*Oryza sativa* L.). Plant Growth Reports. 49: 43-47.

13. Hamasaki RM, Purgatto E and Mercier H (2005) Glutamine enhances competence for organogenesis in pine apple leaves cultivated *in vitro* Braz. Journal Plant Physiology. 17(4): 383-389.

14. Hannapel DJ (2007) Signaling the Induction of Tuber Formation. In: Vreugdenhil D (Ed.), Potato Biology and Biotechnology. Elsevier B.V. PP. 242-243.

15. Hemberg T (1985) Potato rest. *In:* Potato Physiology. American Journal of Potato Research. 354-388.

16. Hussey G and Stacey NJ (1984) Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). American Potato Journal. 53: 565-578.

17. Hussain I, Chaudhry Z, Muhammad A, Asghar R, Naqvi SMS and Rashid H (2006) Effect of chlorocholine chloride, sucrose and BAP on *in vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Cardinal). Pakestan Journal Botanic. 38(2): 275-282.

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

19. Leclerc Y and Donnelly DJ (1995) Microtuber Dormancy in three potato cultivars. American Potato. 2: 215-223.

20. Ortiz-Montiel G and Lozoya-Saldafia H (1987) Potato minitubers: Technology validation in Mexico. American Potato. 64: 535-544.

21. Rao AM, Sree KP and Kishor PBK (1995) Enhanced plant regeneration in grain and sweet sorghum by asparagine, praline and cefotaxime. Plant Cell Reports. 15: 72-75.

22. Skokut TA, Manchester J and Schaefer J (1985) Regeneration in alalfa tissue culture. Plant Physiology. 79: 579-583.

23. Sladky Z (1990) *In vitro* induction of axillary potato microtubers and improvement of their quality. Biologia Plantarum. 32: 181-188.

Wang P and Hu C (1985) *In vitro* mass tuberization and virus free seed potato production in Taiwan. American Potato. 59: 33-37.