نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و دوم، شماره چهارم، ۱۳۹٤
http://jopp.gau.ac.ir

بهینه‌سازی تولید پینه و ریزازدیادی در چهار رقم انگور (*Vitis vinifera* L.)

سمیه حاجی‌زاده سی‌سختی[۱]، *مسعود دهداری[۲]، اسد معصومی‌اصل[۳] و محمدعلی ابراهیمی[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام‌نور تهران شرق، [۲]دانشیار اصلاح نباتات، دانشگاه یاسوج، [۳]استادیاربیوتکنولوژی، دانشگاه یاسوج، [٤]استادیار بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام‌نور، تهران شرق

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۱۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/٦/۱۷

چکیده

سابقه و هدف: انگور هم به لحاظ سطح زیر کشت و هم ارزش تغذیه‌ای و اقتصادی از مهمترین محصولات باغی در دنیاست. ایران از نظر تولید انگور در رتبه هفتم دنیا جای دارد. از روش‌های تکثیر و اصلاح انگور استفاده از فن کشت بافت گیاهی است.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بهینه‌سازی کشت بافت گیاهی تولید پینه و بازایی از کالوس،این پژوهش در دو آزمایش در دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج به اجرا درآمد. در آزمایش اول از دو ریزنمونه‌ی مریستم میانی و برگ رقم‌های عسکری، سیاه، گوی و ریش‌بابا، ۵ سطح هورمون بنزیل آمینو پورین (BAP) و ۵ سطح هورمون نفتالین استیک اسید (NAA) (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) برای تولید پینه استفاده شد. دو ماه پس از کشت ریزنمونه‌ها و اعمال تیمارها صفاتی از قبیل طول، ارتفاع، حجم، وزن تر، وزن خشک و درصد رطوبت نسبی پینه اندازه گیری شدند. در آزمایش دوم از پینه‌های حاصل از مریستم میانی در محیط کشت حاوی ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA جهت ساقه‌زایی و ۰، ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر NAA برای ریشه‌زایی استفاده شد. صفات طول، وزن تر، درصد ساقه زایی و تعداد برگ در مرحله ساقه‌زایی و درصد ریشه‌زایی در آزمایش ریشه‌دهی بررسی شدند. هر دو آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. سپس تجزیه واریانس بر روی مشاهدات انجام شد و میانگین تیمارها با هم مقایسه و بهترین تیمارها معرفی شدند.

*مسئول مکاتبه: adehdari@yu.ac.ir

یافته‌ها: نتایج حاصل از تجزیه واریانس هر دو آزمایش نشان داد که اثرات اصلی و برهمکنش آنها برای کلیه‌ی ویژگی‌های اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود. به‌طورکلی در آزمایش اول بهترین تیمار هورمونی نسبت به شاهد برای صفات طول، ارتفاع، حجم، وزن تر، وزن خشک کالوس و درصد رطوبت نسبی، سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و مربوط به رقم ریش‌بابا و ریزنمونه‌ی مریستم میانی بود. نتایج آزمایش دوم نشان داد که میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA ترکیب مناسبی جهت ساقه‌زایی در ارقام عسکری و گویبود، این تیمار در رقم عسکری و رقم گوی به ترتیب باعث ۱۰۰ و ٦٧ درصد ساقه‌زایی شد.در حالی که در رقم سیاه سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۳۳ درصد و در رقم ریش‌بابا سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و NAA با ٦٧ درصد مناسب‌ترین ترکیب بودند. کلیه تیمارها واکنش بسیار مطلوبی نسبت به ریشه‌زایی داشتند به‌گونه‌ای که بین شاهد و سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد که جهت ریشه‌زایی استفاده شدند، تفاوتی وجود نداشت و صددرصد ریشه‌زایی در تمامی تیمارها حاصل شد.

نتیجه‌گیری: در مجموع با توجه به نتایج این پژوهش تولید پینه و باززایی در هر چهار رقم مورد مطالعه بهینه‌سازی گردید که می‌تواند در تولید و اصلاح انگور مورد استفاده واقع گردد.

واژه‌های کلیدی: انگور، پینه، کشت بافت گیاهی، ریزنمونه، ریزازدیادی

مقدمه

انگور[1] به تیره تاکسانان[2] تعلق دارد و به لحاظ سطح زیر کشت و ارزش اقتصادی یکی از محصولات مهم باغی به شمار می‌رود (۱۳). یکی از روش‌های ریزازدیادی ارقام مختلف انگور استفاده از کشت بافت گیاهی است. از پینه به‌عنوان ماده آزمایشی در برنامه‌های اصلاحی استفاده می‌گردد (۱). پینه از بخش‌های مختلف مانند قطعات برگ، ساقه، ریشه، دانه گرده و حتی پروتوپلاست می‌تواند به‌وجود بیاید. در طی تشکیل پینه در شرایط محیط کشت بافت گیاهی، تمایز و اختصاصی شدن سلول‌های مادری متوقف شده و سلول‌های ریزنمونه تمایززدایی می‌شوند. از تولید پینه و باززایی آن برای تکثیر کلونی، گزینش درون شیشه‌ای جهت افزایش تحمل نسبت به تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده (از طریق استفاده از تنوع موجود و یا تنوع سوماکلونی) و در مهندسی ژنتیک به منظور انتقال ژن مورد نظر از منبعی بیگانه به گیاه موردنظر استفاده می‌شود (۲). از بین محیط‌های مختلف کشت، کاربرد محیط کشت MS[3] به‌دلیل این‌که بسیاری از گیاهان نسبت به آن عکس‌العمل مناسبی نشان می‌دهند بسیار متداول است. در کشت بافت انگور نیز این محیط کشت توسط محققان زیادی در مراحل مختلف کشت آن استفاده شده است (۱۱). لازم به ذکر است که گونه‌های مختلف، ارقام و اندام‌های مختلف یک گیاه، به کشت بافت گیاهی واکنش یکسان نشان نمی‌دهند (۱۵).

در پژوهشی (۱۰) که جهت تولید پینه در انگور انجام شد، القاء پینه با ریزنمونه‌های مختلف در محیط کشت MS همراه با ۱، ۵ و ۱۰ میکرومول هورمون NAA[4] به‌کار برده شد. نمونه‌های کشت شده جهت تولید پینه به‌مدت ۲ هفته در تاریکی نگهداری شدند و سپس به محیطی با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. در این مطالعه تیمار ۵ میکرومول در ریزنمونه گره بالاترین درصد پینه‌زایی را (۸۰ درصد) داشت. ریزنمونه برگ چند ژنوتیپ انگور در محیط کشت نیچ و نیچ و با استفاده از تنظیم‌کننده‌های ۲،٤- دی‌کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D)[5] و تیدیازورون (TDZ)[6] جهت تولید پینه ارزیابی شد. نتایج حاکی از آن بود که این ریزنمونه در تولید پینه کارآمد است (۱۸). با توجه به اهمیت ایجاد تنوع در انگور به‌منظور بهره‌گیری در برنامه‌های اصلاحی و نظر به این‌که

1. *Vitis vinifera* L.
2. Vitaceae
3. Murashige and Skoog
4. Naphthaleneacetic acid
5. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
6. Thidiazuron

تاکنون مطالعه‌ای درخصوص القای کالوس و ریزازدیادی در ژنوتیپ‌های مهم موجود در استان کهگیلویه و بویراحمد گزارش نشده است، این مطالعه با به‌کارگیری دو ریزنمونه برگ و مریستم میانی ساقه و دو تنظیم کننده رشد NAA و BAP با هدف تولید پینه و ریزازدیادی در چهار رقم مختلف انگور شامل عسکری، سیاه، گوی و ریش‌بابا طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت دو آزمایش در آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج در بهار سال ۱۳۹۲ انجام گرفت. نمونه‌برداری از تاکستان منطقه دنا از چهار رقم عسکری، سیاه، گوی و ریش‌بابا صورت پذیرفت. شاخه‌های یکساله که فرم علفی داشتند انتخاب گردید و به طول ۳۰-۲۰ سانتی‌متر از پایه مادری جدا شدند و پس از اتمام نمونه‌برداری به آزمایشگاه انتقال یافتند. سپس هر نمونه سه مرتبه و هر بار به‌مدت ۱۵ دقیقه با آب جاری و مایع ظرفشویی شستشو شد. در مرحله بعد جداسازی برگ از شاخه‌ها انجام گرفت و ریزنمونه‌های اولیه آماده شدند. در آزمایش اول نمونه‌های برگ و مریستم میانی جهت کشت آماده شدند. محیط کشت مورد استفاده MS با ۰/۸ درصد آگار و ۳ درصد ساکارز بود. جهت تولید پینه از تنظیم کننده‌های رشد شامل سیتوکنین (BAP)[1] و اکسین (NAA) هر کدام در ۵ سطح ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد. ریزنمونه‌های اولیه به زیر دستگاه لامینارایر فلو جهت ضدعفونی نهایی و کشت منتقل شدند. نمونه‌ها ابتدا به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد و چند قطره توئین ۲۰ جهت حفظ آماس سلولی شستشو شد و سپس جهت حذف کلرید جیوه سه مرتبه و هربار به مدت ۵ دقیقه، آب دوبار تقطیر استریل استفاده گردید. پس از اتمام شستشو مجدداً نمونه‌ها جهت کشت در محیط MS برش داده شده و به‌صورت کاملاً استریل در شیشه‌های قابل اتوکلاو قرار داده شدند. پس ازکشت، ظروف به مدت ۳ هفته در تاریکی مطلق و سپس در ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی جهت القاء پینه نگهداری شدند. پس از دوماه صفاتی از قبیل طول، ارتفاع، حجم، وزن تر، وزن خشک و درصد رطوبت نسبی پینه اندازه گیری شدند. در آزمایش دوم پینه‌های تولید شده از آزمایش اول، به محیط کشت باززایی انتقال داده شدند. محیط باززایی نیز محیط کشت MS با سطوح ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA برای ساقه‌زایی و ۰، ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر NAA برای ریشه‌زایی بودند. صفات طول، وزن تر، درصد ساقه‌زایی و تعداد برگ در مرحله ساقه‌زایی و درصد

1. Benzylaminopurine

ریشه‌زایی در آزمایش ریشه‌دهی بررسی شدند. البته همچون آزمایش ریشه‌زایی، در این جا تنها درصد ساقه‌زایی مورد بررسی قرار گرفت. هر دو آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس مشاهدات و مقایسه میانگین‌ها به کمک نـرم‌افـزار SAS و رسـم نمودارها ازطریق پردازشگر Excel انجام شد. مقایسه میانگین اثرهای اصـلی بـه روش LSD و بـرای برهمکنش‌ها به روش LSmeans صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) آزمایش اول نشان داد که اثرهای اصلی شامل تنظیم‌کننده‌های NAA و BAP، ریزنمونه و رقم و تمامی برهمکنش‌ها برای کلیه صفات در سطح یک درصد معنی‌دار بود. به همین دلیل برهمکنش چهارگانه مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین برهمکنش رقم، ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های NAA و BAP (جدول ۲) نشان داد که دو ریزنمونه مریستم میانی و برگ در هر چهار رقم مورد آزمایش پینه‌زایی داشتند اما در مجموع ریزنمونه مریستم میانی برتر بود (شکل ۱). لازم به ذکر است به‌علت تعدد تیمارهای پینه‌زایی، تمامی مقایسات میانگین در جدول مقایسه میانگین نیامده است و تنها ۱۲ تیمار برتر که نتایج بهتری داشتند و ٤ تیمار که عملکرد ضعیف‌تری نسبت به بقیه داشتند در جدول مقایسه میانگین نمایش داده شدند.

سطوحی از تنظیم‌کننده‌های رشد که سبب بالاترین نرخ تولید پینه شدند در ارقام مختلف، متفاوت بودند که برخی از آن‌ها در جدول ۲ آورده شده‌اند. بیشترین طول پینه (۲/۸۵ سانتی‌متر) مربوط به ریزنمونه مریستم میانی رقم انگور سیاه در سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و سطوح ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و همین ریز نمونه با سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و سطوح ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA در رقم ریش بابا (۲/۸۵ سانتی‌متر) بود. بیشترین ارتفاع پینه (۲/۱ سانتی‌متر) مربوط به ریزنمونه مریستم میانی رقم عسکری با سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، بالاترین حجم (۷/۱۷ میلی‌لیتر) مربوط به ریزنمونه مریستم میانی رقم ریش بابا با سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، حداکثر وزن تر (۷/۱۵ گرم و ۷/۱ گرم) مربوط به ریزنمونه‌های مریستم میانی ارقام ریش‌بابا با سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و عسکری با سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، بیشترین میزان وزن خشک پینه (۰/۲۸۷ گرم) به رقم گوی و متعلق به ریزنمونه مریستم میانی با سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و حداکثر رطوبت نسبی پینه‌های تولیدی (۹۷/۰۹ درصد) به مریستم

میانی رقم ریش‌بابا با سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA تعلق داشت. بهترین سطح تنظیم‌کننده‌های رشد با توجه به بررسی صفات اندازه‌گیری شده جهت پینه‌زایی رقم عسکری ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA بود. در رقم گوی و سیاه نیز همین سطح بهترین پاسخ را داشت. اما در رقم ریش بابا ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA موفق‌تر بود. با توجه به نتایج، به‌طور کلی رقم ریش‌بابا در مقایسه با سایر ارقام در پینه‌زایی موفق‌تر بود. عوامل زیادی در تشکیل پینه و افزایش میزان آن مؤثرند، که نوع ریزنمونه، نوع محیط کشت، تنظیم‌کننده‌های رشد و عوامل محیطی از موارد بسیار مهم می‌باشند (۱۹).

جدول ۱- میانگین مربعات منابع تغییر برای صفات مورد ارزیابی در مرحله پینه‌زایی با استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP.

Table 1. Mean squares of source of variation for the measured traits in callus genesis experiment using NAA and BAP regulators.

میانگین مربعات (Mean squares)							
رطوبت کالوس Relative humidity	وزن خشک کالوس Dry weight of callus	وزن تر کالوس Fresh weight of callus	حجم کالوس Volume of callus	ارتفاع کالوس Height of callus	طول کالوس Length of callus	درجه آزادی Degrees of freedom	منابع تغییر Source of variation
65689**	0.287**	143.174**	135.218**	17.031**	36.785**	4	Benzyl amino purine(B)
45019**	0.175**	99.103**	93.913**	10.906**	22.991**	4	Naphthalene acetic acid(N)
7379**	0.558**	357.545**	346.377**	17.319**	41.071**	1	Explant(E)
12179**	0.037**	9.887**	7.956**	0.947**	1.627**	3	Cultivar(C)
3476**	0.010**	7.643**	7.420**	0.678**	1.292**	16	B*N
1396**	0.019**	16.097**	15.666**	0.489**	0.958**	4	E*B
5527**	0.016**	12.606**	11.587**	0.575**	1.778**	12	C*B
948**	0.019**	13.544**	12.935**	0.285**	1.005**	4	E*N
5354**	0.008**	4.104**	3.854**	0.587**	1.122**	12	C*N
421**	0.014**	13.382**	12.006**	0.332**	0.202**	3	C*E
836**	0.002**	1.734**	1.835**	0.151**	0.137**	16	E*N*B
2900**	0.005**	3.885**	3.735**	0.443**	0.826**	48	C*N*B
761**	0.004**	6.522**	6.223**	0.216**	0.233**	12	C*E*B
1425**	0.002**	1.289**	1.192**	0.098**	0.129**	12	C*E*N
700**	0.002**	1.413**	1.315**	0.150**	0.174**	48	C*E*N*B
15.394	0.00002	0.026	0.021	0.005	0.007	400	Total error
5.328	4.751	7.937	7.494	9.088	7.243		Coefficient of variation

** نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

** Significant at 1% probability level

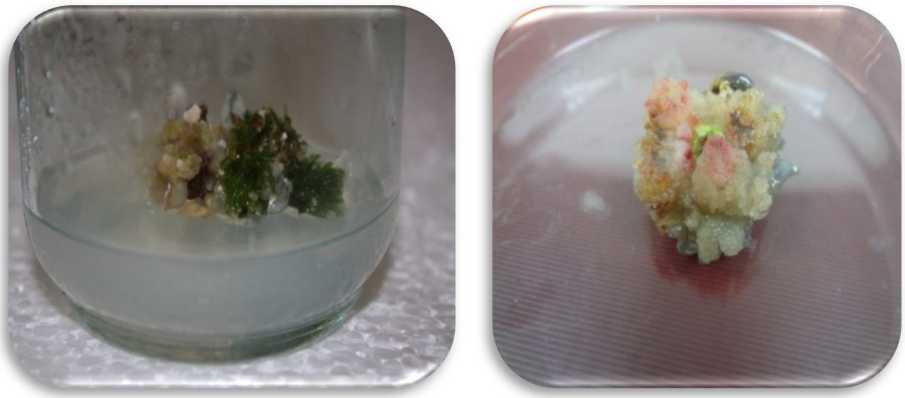
جدول ۲- مقایسه میانگین برهمکنش سه گانه رقم×BAP×NAA برای صفات اندازه‌گیری شده به روش Lsmeans.

Table 2. Mean caparison of BAP×NAA×cultivar interaction for the measured traits using Lsmeans method.

رطوبت نسبی کالوس Relative humidity (Percent)	وزن خشک کالوس Dry weight of callus(gr)	وزن تر کالوس Fresh weight of callus(gr)	حجم کالوس Volume of callus (mm^3)	ارتفاع کالوس Height of callus (cm)	طول کالوس Length of callus (cm)	Treatment (تیمار) Cultivar	Naphthalene acetic acid (mg/L)	Benzyl amino purine (mg/L)
$96.661a_1b_1$	$0.210g_1h_1i_1$	$6.310b_1c_1$	$6.175b_1c_1$	$1.800b_1c_1$	$2.850a_1$		1.5	0.5
$96.229b_1c_1$	$0.238d_1$	$6.320b_1c_1$	$6.275b_1$	$1.600e_1$-h_1	$2.850a_1$	Rish-baba	2	0.5
$97.090a_1$	$0.208g_1$-j_1	$7.150a_1$	$7.175a_1$	$1.775b_1c_1d_1$	$2.575c_1d_1$		0.5	1
$96.275b_1c_1$	$0.187o_1p_1q_1$	$4.792l_1$-o_1	$4.625k_1$-n_1	$1.750b_1c_1d_1$	$2.600b_1c_1d_1$		1	1.5
$96.007c_1$-i_1	$0.208g_1$-j_1	$5.210i_1j_1k_1$	$5.100g_1h_1i_1$	$1.750b_1c_1d_1$	$2.850a_1$	Siyah	1.5	1.5
$95.962c_1$-i_1	$0.221e_1$	$5.475f_1$-i_1	$5.550e_1f_1$	$1.650d_1$-g_1	$2.850a_1$		2	1.5
$95.244m_1$-s_1	$0.287a_1$	$6.035c_1d_1$	$5.900c_1d_1$	$1.450i_1$-l_1	$2.625b_1c_1$		2	1
$95.130o_1$-t_1	$0.287a_1$	$5.893d_1e_1$	$5.800d_1e_1$	$1.700c_1$-f_1	$2.750a_1b_1$	Gavi	2	1.5
$95.339k_1$-r_1	$0.247c_1$	$5.313h_1i_1j_1$	$5.250g_1h_1$	$1.650d_1$-g_1	$2.500c_1d_1e_1$		2	2
$95.989c_1$-i_1	$0.237d_1$	$5.916d_1e_1$	$5.750d_1e_1$	$1.700c_1$-f_1	$2.200g_1h_1i_1$		1.5	1.5
$96.029c_1$-h_1	$0.217e_1f_1g_1$	$5.470f_1$-i_1	$4.500l_1$-o_1	$1.700c_1$-f_1	$2.750a_1b_1$	Askari	2	1.5
$96.283b_1c_1$	$0.264b_1$	$7.105a_1$	$6.200b_1$	$2.100a_1$	$2.000k_1$-o_1		1	2
$92.673z_1a_2b_2$	$0.057i_2j_2$	$0.785f_2g_2h_2$	$0.750f_2g_2h_2$	$0.350f_2$	$0.500h_2$	Rish-baba	1	0
$91.611d_2e_2f_2$	$0.055j_2$	$0.665g_2h_2$	$0.650g_2h_2$	$0.500e_2$	$0.550h_2$	Askari	1.5	0
$90.530i_2j_2$	$0.081b_2$-e_2	$0.855d_2$-h_2	$0.750f_2g_2h_2$	$0.550d_2e_2$	$0.950d_2e_2f_2$	Gavi	0.5	0.5
$95.451h_1$-r_1	$0.146v_1$	$3.210v_1w_1$	$3.100w_1$	$1.400k_1$-n_1	$1.650u_1$-x_1	Siyah	1	0.5

در هر ستون میانگین‌هایی با حرف مشترک از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means with the same letterin each column are statistically not significant at the 5% probability level.



(a) (ب) (b)(الف)

شکل ۱- تولید پینه از ریزنمونه مریستم میانی در ارقام سیاه (الف) و عسکری (ب).

Figure 1. Callus induction from meristem explant in (a) Siah and (b) Askari cultivars.

از آنجا که میزان تولید پینه با توجه به نوع ریزنمونه تغییر می‌کند، لذا انتخاب یک ریزنمونه مناسب به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب، تأثیر چشمگیری بر تولید پینه و رشد آن دارد (١٤). قابل ذکر است ریزنمونه‌های جوان چون دارای واکوئل کوچک در سلول‌های خود هستند، فعالیت و توانایی زیادی در مقایسه با سلول‌های مسن در ایجاد پینه دارند (١٩). برای انتخاب ریزنمونه بایستی اندام‌های مریستمی نظیر نوک ساقه، جوانه جانبی، گل‌آذین، ساقه، برگ، دمبرگ و ریشه، بر سایر بافتها ترجیح داده شوند، چراکه این بافتها دارای خصوصیات ارزشمندی نظیر خصوصیات کلونی، قدرت بقاء کشت، سرعت رشد و خاصیت توتی‌پوتنسی در کشت‌های بافت گیاهی می‌باشند (٦).

در آزمایشی که به‌طور هم‌زمان از سه ریزنمونه برگ، مریستم میانی و سرشاخه جهت پینه‌زایی در انگور استفاده شد، نتایج در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داد که ریزنمونه‌های سرشاخه و مریستم میانی تولید پینه بیشتری در مقایسه با ریزنمونه برگ داشتند که مؤید این نکته است که نقاط مریستمی گیاه توانایی بیشتری در خصوص پینه‌زایی به علت قابلیت‌هایی که قبلاً اشاره شدند، دارند (٥).گوران و همکاران (٢٠١٣) در بررسی پینه‌زایی رقم فرخی انگور با استفاده از دو ریزنمونه‌ی برگ و پیچک بهترین درصد پینه‌زایی را در ریزنمونه پیچک مشاهده کردند (٨). ریزنمونه برگ در مطالعه‌ای دیگر در سه رقم مختلف انگور شامل Thompson، Sonaka و Tas-e-Ganesh مورد استفاده واقع شد و نتایج جهت تولید پینه رویان‌زا چشمگیر بوده است. به‌گونه‌ای که پس از ٤-٢ هفته علایم تولید پینه روی برگ‌های کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای مشاهده گردید (١٧). تولید پینه از ریزنمونه برگ توسط محققان زیادی و با ترکیبات گوناگون از تنظیم کننده‌های رشد مورد آزمایش قرار گرفت. آنچه مسلم است این نکته است که بهترین محیط کشت در این آزمایش‌ها محیط کشت MS بوده و تولید پینه نیز موفقیت‌آمیز بوده است (١٢ و ١٦). نتایج پژوهش دیگر نشان داد که ریزنمونه مریستم در مقایسه با ریزنمونه برگ پاسخ مناسب‌تری به محیط کشت‌پینه‌زایی دارد (٧). مریستم‌ها نواحی فعال سلولی هستند که با تمایز آن‌ها بافت‌های جدید در گیاه نیز تولید می‌شود. همچنین نواحی مریستمی عاری از هرگونه آلودگی هستند و گزینه‌ای مناسب جهت تولید گیاهان عاری از ویروس هستند.

استفاده به‌تنهایی از اکسین جهت تولید پینه مورد بررسی پژوهشگران قرار گرفته است. مثلاً در مطالعه‌ای که در انگور جهت تولید پینه و با کاربرد NAA به تنهایی در ریزنمونه‌های برگ، گره و سرشاخه انجام شد، تولید پینه با موفقیت همراه بوده است (١٠). نتایج آزمایش اول نشان داد که در مواردی که تنها یکی از دو تنظیم‌کننده اکسین و سیتوکنین در محیط کشت حضور داشتند نیز پینه از

ریزنمونه‌ها به‌خصوص در ریزنمونه مریستم میانی تولید شد. اما ترکیب هر دو تنظیم کننده با یکدیگر سبب تولید پینه‌هایی با صفات ظاهری مناسب‌تر گردید. چادهوری و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که برای هر سه ریزنمونه مختلف برگ، سر شاخه و مریستم میانی بیشترین درصد پینه‌زایی در ترکیب هم‌زمان دو تنظیم‌کننده رشد گیاهی BAP و NAA در محیط کشت MS و LS به‌دست آمد (۵). در گونه‌های مختلف گیاهی واکنش ژنوتیپ‌های داخل گونه‌ای به پینه‌زایی و ریزازدیادی متفاوت است (٦). در این پژوهش نیز ژنوتیپ‌های مورد استفاده واکنش خوبی به پینه‌زایی نشان دادند، هر چند همان‌گونه که ذکر شد ترکیب هورمونی مورد استفاده برای هر ژنوتیپ متفاوت بود.

در آزمایش دوم نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اثر ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد، رقم و برهمکنش آنها برای صفات طول ساقه (سانتی‌متر)، تعداد برگ، وزن تر ساقه (گرم) و درصد ساقه‌زایی در سطح یک درصد معنی‌دار بود. سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر از هریک از دو تنظیم کننده رشد BAP و NAA در رقم عسکری باعث ۱۰۰ درصد ساقه‌زایی شد (شکل ۲ د).

جدول ۳- میانگین مربعات منابع تغییر برای صفات مورد ارزیابی در مرحله ساقه‌زایی.

Table 1. Mean squares of source of variation for the measured traits in the shooting experiment.

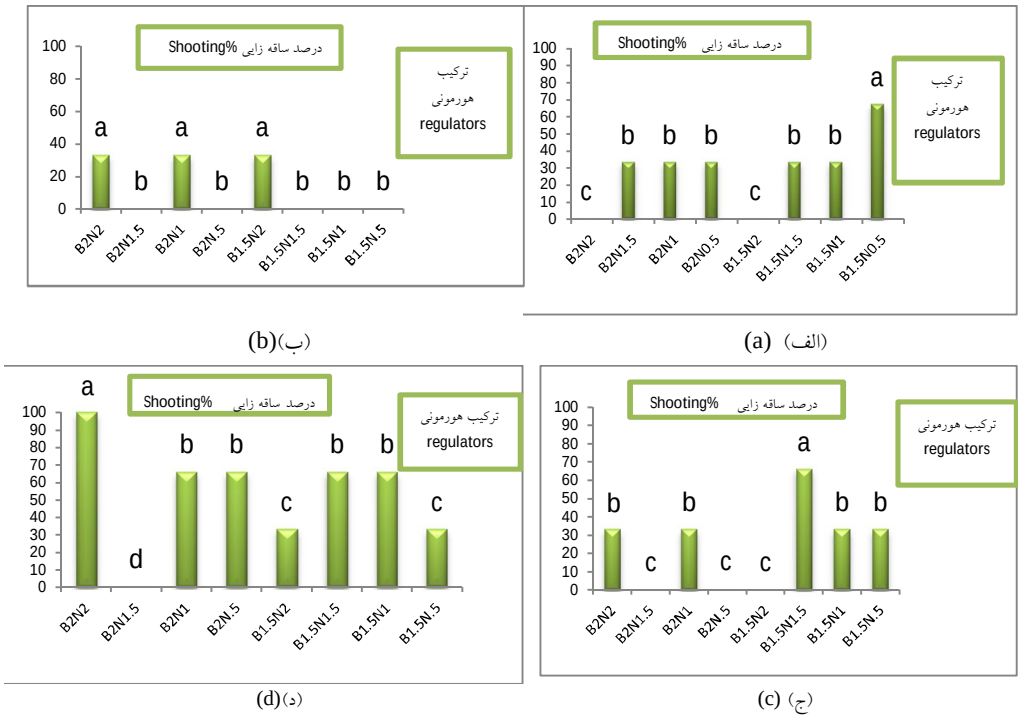
Mean squares				درجه آزادی	منابع تغییر
درصد ساقه‌زایی	وزن ساقه	تعداد برگ	طول ساقه		
Shoot percentage	Weight of stem (gr)	Number of leaves	Lengh of stem (cm)	Degrees of freedom	Source of variation
1201**	0.08**	23.49**	18.20**	7	Regulators combination(BN)
7394**	0.28**	54.51**	88.45**	3	Cultivare(C)
1527**	0.09**	24.88**	46.15**	21	BN×C
11.34	0.006	1.64	0.81	64	Total error
10.63	27.45	29.46	25.33		Coefficient of variation

** نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

** Significant at 1% probability level.

در رقم گوی (شکل ۲- الف) ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA باعث حداکثر ساقه‌زایی در این رقم شد (٦۷ درصد). در رقم سیاه (شکل ۲- ب) سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر از هریک از دو تنظیم کننده رشد BAP و NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA باعث حداکثر ساقه‌زایی در این رقم شد (۳۳ درصد). در رقم ریش‌بابا (شکل ۲- ج) ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA باعث حداکثر ساقه‌زایی شد (٦۷ درصد). نتایج

مربوط به ریشه‌زایی نیز نشان داد که بین شاهد و تیمارهای ریشه‌زایی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و در تمامی این تیمارها ریشه‌زایی ۱۰۰ درصد مشاهده شد (مشاهدات نشان داده نشده‌اند). در شکل ۳ برخی مراحل باززایی در ژنوتیپ‌های مورد استفاده نشان داده شده است.



شکل ۲- میزان ساقه‌زایی (درصد) در ارقام گوی (الف)، سیاه (ب)، ریش‌بابا (ج) و عسکری (د) در ترکیب هورمونی ۲ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP با ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA.

Figure 2. Shooting percentage in a) Gavi, b) Siah, c) Rish-baba and d) Askari cultivars treated by2 and 1.5 mg/L BAP and 0.5, 1, 1.5 and 2 mg/L NAA.

محیط کشتی که جهت آغاز بازززایی از پینه مورد استفاده قرار می‌گیرد امکان دارد شامل همان تنظیم‌کننده‌های رشد موجود در محیط القای پینه باشد. به‌نظر می‌رسد جهت باززایی از پینه‌های هر چهار رقم مورد مطالعه از آزمایش اول به هر دو تنظیم‌کننده مورد استفاده، نیاز باشد. اثر مثبت کاربرد اکسین و سیتوکنین در ایجاد گیاهچه در ارقام مختلف انگور توسط تعدادی از محققان گزارش شده است (۱۱). اثر مثبت کاربرد همزمان این دو هورمون به‌علت تحریک تقسیم سلولی و تولید

گیاهچه‌های جدید از طریق کاهش اثر غالبیت انتهایی و بلند شدن طول گیاهچه به‌علت اثر اکسین بیان شده است (٤). درصد باززایی و تولید گیاهچه از پینه در انگور و با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف نشان‌دهنده این واقعیت است که علاوه‌بر اثر تنظیم‌کننده‌های رشد در استفاده هم‌زمان آن‌ها جهت باززایی، نوع ریزنمونه نیز بر نرخ باززایی اثرگذار است. به‌طوری که در این آزمایش مریستم میانی در مقایسه با برگ و مریستم انتهایی از میزان باززایی بیشتری برخوردار بود.

(الف)(a) (ب)(b)

(ج) (c) (د) (d)

شکل ۳- تولید گیاهچه از پینه رقم عسکری (الف)، رشد کامل گیاهچه رقم ریش‌بابا (ب)، ریشه‌زایی در گیاهچه جوان رقم عسکری (ج)، گیاهچه کامل رقم گوی (د).

Figure 3. a) Shoot production from callus of Askari cultivar, b) Whole seedling of Rish-baba cultivar, c) Root production from Askari cultivar and d) Whole seedling of Gavi cultivar.

نکته قابل توجه اثر مثبت اکسین و سیتوکنین بر میزان باززایی است (۵). اما در مطالعه‌ای متفاوت راویندرا و همکاران (۲۰۱۰) از غلظت‌های مختلف TDZ به‌تنهایی جهت تولید گیاهچه استفاده کردند که موفقیت‌آمیز بود (۱۸).

خصوصیات ژنتیکی، وضعیت فیزیولوژیکی گیاه مادری و ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشد و شرایط نور و دما، عواملی مهم در مرحله ریشه‌زایی محسوب می‌شوند (۹). در تحقیقی که بر روی ریشه‌زایی چند رقم انگور انجام شد، تمامی گیاهچه‌ها در ارقام Cabernet frank و Cabernet sauvignon در محیط کشت فاقد هورمون ریشه دار شدند (۳). همچنین در رقم ایرانی بی‌دانه سفید نیز نتیجه مشابهی حاصل شد (۱۱). به‌طور معمول از تنظیم کننده اکسین در مراحل مختلف ریشه‌زایی استفاده می‌شود. در این آزمایش نیز علاوه بر شاهد، چهار سطح از تنظیم‌کننده NAA استفاده شد. در هر چهار رقم مورد آزمایش و در تمامی تکرارهای مربوط به تیمارهای مورد استفاده، صد در صد ریشه‌زایی مشاهده شد (شکل۳- د) و از آن‌جا که تنها صفت مورد بررسی در آزمایش مربوط به ریشه‌زایی درصد ریشه‌دهی بود، لذا تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف مورد آزمایش مشاهده نشد.

در مجموع نتایج حاصل از این آزمایش حاکی از واکنش خوب ژنوتیپ‌های انگور به تولید پینه و ریزازدیادی بود. نظربه اینکه برخی برنامه‌های اصلاحی مثل تحمل به انواع تنش‌ها در شرایط کشت بافت گیاهی امکان‌پذیر است، از این نتایج می‌توان در برنامه‌ریزی اصلاحی بهره جست.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نگارندگان مقاله از جناب آقای دکتر بیژن کاووسی عضو محترم هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کهگیلویه و بویراحمد به‌دلیل مساعدت در تهیه ژنوتیپ‌ها نهایت تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آورند.

منابع

1. AghazadehAghdam, L., and Kalantarzadeh, A. 2011. Effect of hormones on callus induction on three cultivar grapes. National Conference on Modern Agricultural Sciences and Technologies (MAST). 19-21 September.Zanjan, Iran. (In Persian)
2. Arzani, A., and Mirojagh, S.S. 1999. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction in vitro salt stress. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 58: 67-72.

3. Barloss, M., and Skene, K.G.M. 1978. *In vitro* propagation of grapevine from fragmented shoot apices. Vitis. 17: 335-340.
4. Chee, R., and Pool, R.M. 1982.The effect of growth substances of photopriod on the development of shoot apices of *Vitis viniferain vitro*. Hort. Sci. 16: 17-27.
5. Chowdhury, M.M.H., Ashrafuzzaman, M., Begum, S.N., Islam, M.M., and Dahr, P. 2012. Regeneration of plantlets from grape (*Vitis vinifera* L.) through different explants.Int. J. Sustain. Crop Prod. 7(2): 12-18.
6. Farsi, M., and Zol-Ali, J. 2003. Principle of plant biotechnology. Mashhad Univ. Press. 495p. (In Persian)
7. Forutan, A., and Vadidar, R. 2006. Plant tissue culture. Sepehr publisher. 293p.
8. Guran, A., Mozafari, A., and Ghaderi, N. 2013.Study of somatic embryogenesis in Farokhi grape cultivar. First electronic national new topics in horticulture sciences conference.19-20 Nov. Jahrom University, Iran.
9. Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T., and Geneve, R.L. 1997. Plant propagation: Principle and practices. Prentice Hall. Inc USA. Pp: 540-611.
10. Jaskani, M.J., Abbas, H., Sultana, R., Khan, M.M., Qasim, M., and Khan, I.A. 2008. Effect of growth hormones on micro propagation of *Vitis vinifera* L. CV. Perlette. Pak. J. Bot. 40(1): 105-109.
11. KalatehJari, S., Ebadi, A., Zamani, Z., and Omidi, M. 2006. Evaluation of *in vitro* culture of two Iranian grape cultivars and determine the appropriate conditions for culture their meristem. Agri. Sci. 37(2): 208-215.
12. KarimiAlivijeh, M., Ebadi, A., and Omidi, M. 2010. Study of somatic embryogenesis by using leaf explants in two grape cultivars. Iranian Hort. Sci. 41. 4: 319-326. (In Persian).
13. Kavusi, B., Eshghi, E., and Rahemi, M. 2008. Appointment measure of requirement of chilling in grape (*Vitis vinifera* Askari). Hort. Sci. Tech. Iran. 9(3): 153-162. (In Persian)
14. Khawar, K.M., Sarıhan, E., Sevimay, C., Parmaksız, S., Uranbey, I., Ipek, S., Kaya, A., Sancak, M.D. and Ozcan, C. 2005. Adventitious shoot regeneration and micro propagation of *Planta golanceolata* L. Period Bio. 107: 113-116.
15. Khayatzadeh, M., NabatiAhmadi. D., RajabiMemari, H., and Abdollahi, M.R. 2011. Optimization of call genesis of two spinach cltivars utilizing three different explants. Bio. Agri. 10(2): 1-6.
16. Lopez-perez, A.J., Carreno, J., Martonez, A., and Dabauza, M. 2005. High emberyogenic ability and plant regeneration of table grapevine induced by activated charcoal. Vitis, 44: 79-85.
17. Malabadi, R.B., Vijaykumar, S., Nataraja, K., and Mulgund, G.S. 2010. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in grapes. Bot. Res. Int. 3(2): 48-55.

18. Ravindra, B. Malabodi, S., Vijaykumar, K., Nataraja, and Mulgund, G.S. 2010. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in grapes. Bot. Res. Int. 3(2): 48-55.
19. Rezaiyan, Sh., Lahuti, M., and MahmudzadehAkherat, H. 2010. Study of effect concentration levels 2, 4-D and lighting conditions in callus production in *Trigonella foenum*. Bio. Sci. Zanjan Azad University. 3(3): 107-114. (In Persian)
20. Seyed Tabatabayi, B.A., and Omidi, M. 2009. Tissue and plant cell culture. Tehran Univ. Press, 368p. (In Persian)