مقاله پژوهشی

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نوع محیط کشت پایه بر تکثیر درون شیشه‌ای ارقام انگور بی‌دانه سوپریور و کریمسون

کیان حضرتی[۱]، مهرآنا کوهی‌دهکردی[۲]* و محمدرضا نقوی[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۶/۲۴- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۸)

چکیده

تکثیر رقم‌های وارداتی انگور بصورت سنتی با دو مشکل انتقال آفات و بیماری و مدت زمان طولانی تکثیر مواجه است. لذا در تحقیق حاضر از کشت بافت به منظور معرفی محیط بهینه تکثیر ارقام بی‌دانه سوپریور و کریمسون استفاده شد. چهار نوع محیط کشت پایه جهت باززایی شامل محیط‌های CP، WPM، DKW و DKW تغییر یافته هر کدام حاوی دو تیمار هورمونی، مورد آزمون قرار گرفتند. گیاهان باززا شده با بنیه مناسب به محیط کشت CP با ۲۵ تیمار هورمونی متفاوت جهت بررسی ریشه‌زایی انتقال یافتند. آزمون‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. مناسب‌ترین محیط پرآوری برای رقم کریمسون، محیط WPM با ترکیب هورمونی mgL^{-1} ۱ BA و mgL^{-1} ۰/۱ NAA و برای ریشه‌زایی محیط CP با ترکیب هورمونی mgL^{-1} ۰/۷۵ IBA و mgL^{-1} ۱ NAA بود. مناسب‌ترین محیط پایه پرآوری برای رقم سوپریور، محیط DKW با ترکیب هورمونی mgL^{-1} ۱ BA و mgL^{-1} ۰/۱ NAA و برای ریشه‌زایی محیط پایه CP تکمیل شده با mgL^{-1} ۰/۲۵ NAA بود. نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر می‌تواند در تکثیر و توسعه کشت ارقام انگور بی‌دانه سوپریور و کریمسون مفید باشد.

کلمات کلیدی: پرآوری، تاکسانان، ریزنمونه

۱- دانش آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران

۲- دانشیار، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران

۳- استاد، گروه اصلاح نباتات، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* پست الکترونیک: m.koohi@gmail.com

مقدمه

انگور با نام علمی *Vitis vinifera* L. از تیره تاکسانان به لحاظ سطح زیرکشت و ارزش اقتصادی از محصولات مهم باغی به شمار می‌رود. رقم‌های بی‌دانه کریمسون (Crimson Seedless) و سوپریور (Superior Seedless) انگور از ارقام تجاری جهان به شمار می‌روند که در آمریکا اصلاح شده‌اند و در بازار صادرات انگور جایگاه خوبی دارند (کمرون[1]، ۲۰۰۱). اغلب ارقام تازه‌خوری مناسب صادرات، بی‌دانه و دارای حبه‌های درشت هستند که دو رقم مذکور این خصوصیات مهم را دارند. همچنین افزایش اندازه حبه‌ها از طریق مصرف جیبرلین در این دو رقم امکان‌پذیر است (دوکوزلیان و پیکوک[2]، ۲۰۰۰؛ ابوزهرا[3]، ۲۰۱۳). هر دو رقم از استحکام حبه بالایی برخوردار بوده که این امر منجر به افزایش عمرانبارداری در آنها شده است (ال‌سید[4]، ۲۰۱۳).

کشت بافت گیاهی، جایگزین مناسبی برای روش‌های معمول تکثیر گیاهان می‌باشد و ارقام تجاری انگور را می‌توان با استفاده از روش کشت بافت در مقیاس بالا و صرف زمان کمتر تکثیر کرد (علیزاده[5] و همکاران، ۲۰۱۰). ارقام انگور به راحتی با استفاده از کشت بافت قابل تکثیر می‌باشند و انگور از اولین گیاهانی است که در شرایط درون شیشه‌ای تکثیر شده است (تورگروسا[6] و همکاران، ۲۰۰۱؛ گامبینو[7] و همکاران، ۲۰۰۷). کشت درون شیشه‌ای انگور برای اولین بار با استفاده از گره‌های حاوی جوانه فعال انجام گرفت و از آن زمان به بعد روش‌های مختلف کشت درون شیشه‌ای برای تکثیر انگور توسعه یافته است (اسکیادا[8] و همکاران، ۲۰۱۰) که می‌توان به کشت قطعات نوک شاخساره (گری و بنتون[9]، ۱۹۹۱)، کشت جوانه جانبی، تک گره و تکثیر از طریق رویان‌زایی سوماتیکی (مارتینلی[10] و همکاران، ۲۰۰۱) اشاره نمود. مطالعات اخیر محققان نشان داده است در تکثیر درون شیشه‌ای انگور درجه موفقیت در کلیه مراحل کشت کاملا به ژنوتیپ وابسته است. با توجه به این مطالب بهینه‌سازی کشت بافت در کلیه ارقام ضروری به نظر می‌رسد (اسمرا[11] و همکاران، ۲۰۱۰؛ افتخاری[12] و همکاران، ۲۰۱۲). نتایج تحقیق فایک[13] و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد غلظت سیتوکینین و اندازه ریزنمونه در کشت بافت انگور رقم Flame seedless موثر بوده است و بیشتر مریستم‌هایی که در محیط WPM (Woody Plant Medium) حاوی BAP و IBA بودند طی ۲ هفته جوانه زده و تمایز شاخساره در آن‌ها اتفاق افتاده است. در تحقیق دیگری به منظور بررسی کشت درون شیشه‌ای دو رقم انگور ایرانی و تعیین شرایط مناسب جهت کشت مریستم آنها، کشت مریستم انتهایی در محیط کشت MS همراه با غلظت‌های مختلفی از تنظیم کننده‌های رشد BA و IBA انجام شد. بر اساس نتایج بدست آمده گزارش شد مریستم‌ها در تیمارهای هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA در رقم بیدانه سفید و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در رقم شاهرودی رشد مطلوبی داشتند (کلاته‌جاری و همکاران، ۱۳۸۵).

در پژوهش دیگری که به منظور بهینه‌سازی تولید پینه و ریزازدیادی در چند رقم انگور انجام شد، محیط کشت محتوی میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA ترکیب مناسبی جهت ساقه‌زایی ارقام عسکری و گوی بود که به ترتیب باعث ۱۰۰ و ۶۷ درصد ساقه‌زایی شد در حالی که در رقم ریش‌بابا سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و NAA با ۶۷ درصد مناسبترین ترکیب بود (حاجی‌زاده‌سی‌سختی و همکاران، ۱۳۹۴). نتایج مطالعه انجام شده بر ریزازدیادی انگور Muscat Alexandria، نشان داد محیط کشت MS محتوی ۳ میلی‌گرم در لیترBAP+ ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA مناسبترین محیط برای ریزازدیادی این رقم می‌باشد (ابیدو[14] و همکاران، ۲۰۱۳). برخلاف مطالعات انجام شده روی کشت بافت ارقام انگور، مطالعات محدودی به منظور باززایی و ریشه‌زایی دو رقم انگور سوپریور و کریمسون انجام شده است، لذا این پژوهش با هدف تعیین مناسب‌ترین محیط کشت و ترکیبات هورمونی بهینه برای تکثیر دو رقم انگور بی‌دانه سوپریور و کریمسون در محیط درون شیشه‌ای انجام شد.

مواد و روش‌ها

1. Cameron
2. Dokoozlian and Peacock
3. Abu-Zahra
4. El-Sayed
5. Alizadeh
6. Torregrosa
7. Gambino
8. Skiada
9. Gary and Benton
10. Martinelli
11. Smerea
12. Eftekhari
13. Fayek
14. Abido

تیمارهای مورد استفاده در مرحله باززایی

از سرشاخه‌های جوان گیاهان انگور رقم‌های کریمسون بی‌دانه و سوپریور بی‌دانه (موجود در باغ تحقیقاتی دانشگاه تهران) که حالت نیمه‌خشبی داشتند در اواسط اردیبهشت ماه ۱۳۹۷ قلمه تهیه شد. قلمه‌ها به آزمایشگاه کشت بافت مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی منتقل شدند. ریزنمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با آب مقطر حاوی یک قطره توین روی شیکر قرار گرفتند، سپس به مدت ۱ ساعت زیر آب جاری شستشو شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها در زیر هود لامینار به مدت ۴۵ ثانیه با اتانول ۷۰ درصد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد حاوی ۳-۲ قطره توین ۲۰ استریل شدند. در نهایت نمونه‌ها با آب مقطر استریل سه مرتبه و به ترتیب به مدت سه، پنج و هفت دقیقه شستشو داده شدند. قطعات تک‌گره پس از خشک شدن با کاغذ صافی استریل بر روی محیط کشت استقرار (MS + 0.5 mgL^{-1} BA)، در اتاقک رشد با دمای ۲۳±۲ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۸۰۰۰ –۶۰۰۰ لوکس و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی به مدت ۳۰-۳۵ روز قرار گرفتند. برای باززا شدن گیاهان، شاخساره‌های رشد کرده در مرحله استقرار به جوانه‌های تک گره یک تا دو سانتی‌متری بدون برگ تقسیم و به عنوان ریزنمونه به محیط‌های مورد نظر منتقل شدند.

در تحقیق حاضر، بر اساس بررسی منابع انجام شده و به منظور بهینه‌سازی محیط باززایی، آزمایش اولیه‌ای با استفاده از سطوح مختلف NAA (صفر، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و BA (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت CP (چی و پول[1]، ۱۹۸۵)، انجام شد (نتایج ارائه نشده است). بر اساس نتایج بدست آمده از این آزمایش، دو تیمار هورمونی شامل 0.1 mgL^{-1} NAA + 1 mgL^{-1} BA و 0.5 mgL^{-1} NAA + 0.05 mgL^{-1} BA انتخاب شدند و کارایی این دو تیمار منتخب در چهار نوع محیط کشت باززایی شامل محیط‌های کشت CP، WPM (لیود و مک‌کان[2]، ۱۹۸۱)، DKW[3] (درایور و کونیوکی[4]، ۱۹۸۴؛ مک‌گراناهان و همکاران[5]، ۱۹۸۷) و DKW تغییر یافته (MDKW[6]) بررسی شد. به هر ظرف کشت، تعداد چهار ریزنمونه منتقل شد و هر یک از این ظروف به منزله یک تکرار قلمداد شد. ظرف‌های مربوط به باززایی به اتاقک رشد با دمای ۲۳±۲ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۸۰۰۰ –۶۰۰۰ لوکس و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند (نیلا [7] و همکاران، ۲۰۱۷). بررسی فاز باززایی به صورت آزمایش فاکتوریل بر اساس طرح کاملا تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. صفات مورد ارزیابی در این مرحله، ۳۰ روز بعد از قرار گرفتن تک‌گره‌ها در محیط باززایی اندازه‌گیری شدند که شامل درصد ساقه‌زایی (درصد جوانه‌های باززا شده در هر ظرف کشت)، تعداد نوساقه (میانگین تعداد ساقه‌های ایجاد شده روی جوانه‌های باززا شده در هر ظرف کشت) و طول نوساقه (میانگین طول ساقه ایجاد شده روی جوانه‌های باززا شده در هر ظرف کشت) بود. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شدند.

تیمارهای مورد استفاده در مرحله ریشه‌زایی

گیاهان باززا شده با بنیه مناسب و قوی با ارتفاع دو سانتی‌متر به بالا انتخاب و به محیط کشت CP با ۲۵ تیمار هورمونی متفاوت انتقال یافتند. تیمارهای مورد استفاده برای ریشه‌زایی شامل دو نوع هورمون IBA و NAA هر کدام در پنج سطح صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و یک میلی‌گرم در لیتر بود. محیط‌های کشت با سطوح هورمونی مورد نظر جهت ریشه‌دار کردن گیاهچه‌ها تهیه و در ظرف‌ها توزیع شدند، پس از ۴۸ ساعت نگهداری محیط‌های کشت در دمای اتاق و اطمینان از عدم آلودگی آنها، شاخساره‌ها برای ریشه‌زایی به محیط کشت‌ها منتقل شدند. در هر ظرف کشت، چهار عدد شاخساره قرار داده شد. هر یک از این ظروف به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که ظروف مربوط به ریشه‌زایی به اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۸۰۰۰–۶۰۰۰ لوکس و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند (نیلا و همکاران، ۲۰۱۷). بررسی فاز ریشه‌زایی به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. در فاز ریشه‌زایی صفاتی از قبیل درصد ریشه‌زایی (درصد شاخساره‌های ریشه‌دار شده در هر ظرف کشت)، تعداد ریشه‌های ایجاد شده (میانگین تعداد ریشه ایجاد شده بر روی شاخساره‌ها در هر ظرف کشت) و طول

1. Chee and Pool (CP)
2. Lloyd and McCown
3. Driver and Kuniyaki Walnut (DKW)
4. Driver and Kuniyuki
5. McGranahan
6. Modified Driver and Kuniyaki Walnut (MDKW)
7. Naila

ریشه‌های ایجاد شده (میانگین طول ریشه‌های ایجاد شده در شاخساره‌های در هر ظرف کشت) مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شدند.

سازگاری

به منظور سازگاری گیاهچه‌ها ابتدا گیاهان ریشه‌دار شده از آگار خارج و پس از شستشوی کامل با آب ولرم در گلدان‌های کوچکی که با ترکیبی از پرلیت و پیت‌ماس با نسبت ۱:۱ پر شده بود، مستقر شدند. گلدان‌ها با آب معمولی با فشار ۷۰ بار مه‌پاشی شدند. برای حفظ حداکثر رطوبت، روی گلدان‌ها با سرپوش پلاستیکی پوشانده شد و گیاهان به گلخانه سازگاری با دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۱۲۰۰۰-۱۰۰۰۰ لوکس نوری و رطوبت ۹۰ درصد منتقل شدند (لوپزپرز[1] و همکاران، ۲۰۰۵).

نتایج و بحث

پرآوری رقم کریمسون

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، اثرات تیمار هورمونی، محیط کشت و اثر متقابل تیمار هورمونی و محیط کشت در رقم کریمسون بر صفات درصد ساقه‌زایی، تعداد نوساقه و طول نوساقه حاصل از کشت سرشاخه معنی‌دار بود. مقایسه میانگین اثر محیط کشت بر درصد ساقه‌زایی، تعداد نوساقه‌ها و طول نوساقه رقم کریمسون نشان داد محیط کشت WPM همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بهترین اثر را در درصد ساقه‌زایی (شکل ۱، الف- شکل ۵، الف)، محیط کشت DKW همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بهترین اثر را بر روی تعداد نوساقه (شکل ۱، ب) و محیط کشت MDKW همراه با ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA بهترین اثر را در طول نوساقه داشت (شکل ۱، ج).

جدول۱- تأثیر ترکیب هورمونی و محیط کشت بر درصد ساقه‌زایی، تعداد نوساقه و طول نوساقه در کشت سرشاخه رقم کریمسون

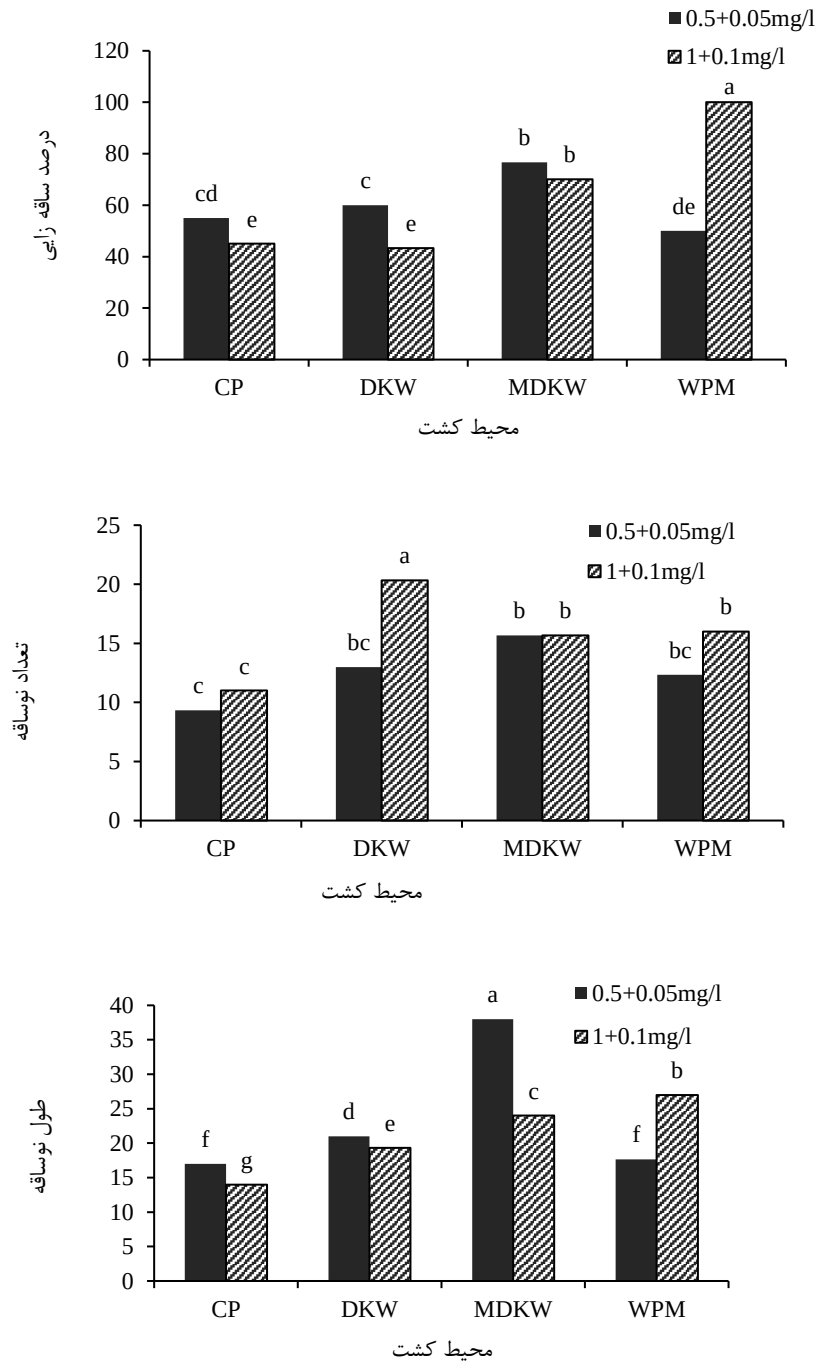
منابع تغییر		میانگین مربعات		
	درجه آزادی	درصد ساقه زایی	تعداد نوساقه	طول نوساقه
محیط کشت	۳	۱۰۹۴/۰۴۴**	۴۹/۰۰**	۲۵۲/۹۴**
هورمون	۱	۱۰۴/۱۶*	۳۲/۶۶*	۳۲/۶۶**
محیط کشت × هورمون	۳	۱۲۰۹/۳۷**	۲۴/۱۱**	۱۳۶/۶۶**
اشتباه آزمایشی	۱۶	۱۷/۷۰	۳/۹۵	۰/۷۰
ضریب تغییرات		۶/۷۳	۱۴/۰۴	۳/۷۸

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد

به منظور ریزازدیادی انگور، محیط‌های کشت مختلف حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد متفاوتی از جمله BA، NAA و BAP مورد استفاده قرار گرفته است (دای[2] و همکاران، ۲۰۱۵). نتایج بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد واکنش ارقام مختلف به محیط‌های کشت، بسیار متفاوت بوده است از اینرو شناسایی محیط کشت بهینه برای هر رقم به منظور بهینه نمودن شرایط ریزازدیادی ضروری به نظر می‌رسد (لوپزپرز و همکاران، ۲۰۰۶). به عنوان نمونه در تحقیق انجام شده توسط جی[3] و همکاران (۲۰۱۷) استفاده از محیط کشت WPM در مقایسه با محیط NN منجر به افزایش درصد ساقه‌زایی در رقم تامسون سیدلس شده است.

بر اساس نتایج مطالعات انجام شده، نوع و غلظت سیتوکینین متناسب با نوع رقم انگور مورد بررسی تفاوت نشان می‌دهد. به عنوان نمونه در مطالعات انجام شده روی انگور رقم (*V. rotundifolia*) گزارش شد که تنظیم‌کننده رشد TDZ نسبت به BAP تأثیر بیشتری دارد (سودارسونو و گلدی[4]، ۱۹۸۸). علاوه بر این، متره[5] و همکاران (۲۰۰۰) گزارش نمودند برای تکثیر رقم انگور *V.vinifera*، BAP مناسبترین سیتوکینین بود. بر اساس نتایج مطالعات انجام شده، ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف و غلظت آنها به دلیل تأثیر آنها بر تقسیم سلول و گسترش آن، به طور قابل توجهی بر طول شاخساره تأثیر می‌گذارد (اعظمی[6]، ۲۰۱۰؛

1. López-Pérez
2. Dai
3. Ji
4. Sudarsono and Goldy
5. Mhatre
6. Aazami



شکل ۱- تأثیر محیط کشت و ترکیب هورمونی بر a) درصد ساقه‌زایی، b) تعداد نوساقه و c) طول نوساقه‌های پرآوری شده رقم کریمسون. میانگین‌های دارای حروف مشابه، فاقد تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

خان[1] و همکاران ۲۰۰۵).

پرآوری رقم سوپریور

بر اساس نتایج تجزیه واریانس تأثیر ترکیب هورمونی، محیط کشت و اثر متقابل ترکیب هورمونی و محیط کشت در رقم سوپریور بر روی صفات درصد ساقه‌زایی و طول نوساقه حاصل از کشت سرشاخه معنی‌دار بود. همچنین اثر محیط کشت و اثر متقابل ترکیب هورمونی و محیط کشت اثر معنی‌داری بر تعداد نوساقه نشان داد (جدول ۲).

1. Khan

جدول ۲- تأثیر ترکیب هورمون و محیط کشت بر درصد ساقه زایی، تعداد نوساقه و طول نوساقه حاصل از کشت سرشاخه رقم سوپریور

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد ساقه زایی	تعداد نوساقه	طول ساقه
محیط کشت	۳	۱۰۰۱/۰۴**	۶۲/۱۱**	۳۱۵/۱۶**
هورمون	۱	۱۲۷۶/۰۴**	۰/۶۶n.s	۴۲/۶۶**
محیط کشت * هورمون	۳	۱۲۰۹/۳۷**	۲۴/۱۱**	۵۵/۸۸**
اشتباه آزمایشی	۱۶	۲۲/۹۱	۰/۹۱	۰/۶۶
ضریب تغییرات		۶/۹۸	۷/۰۹	۳/۵۸

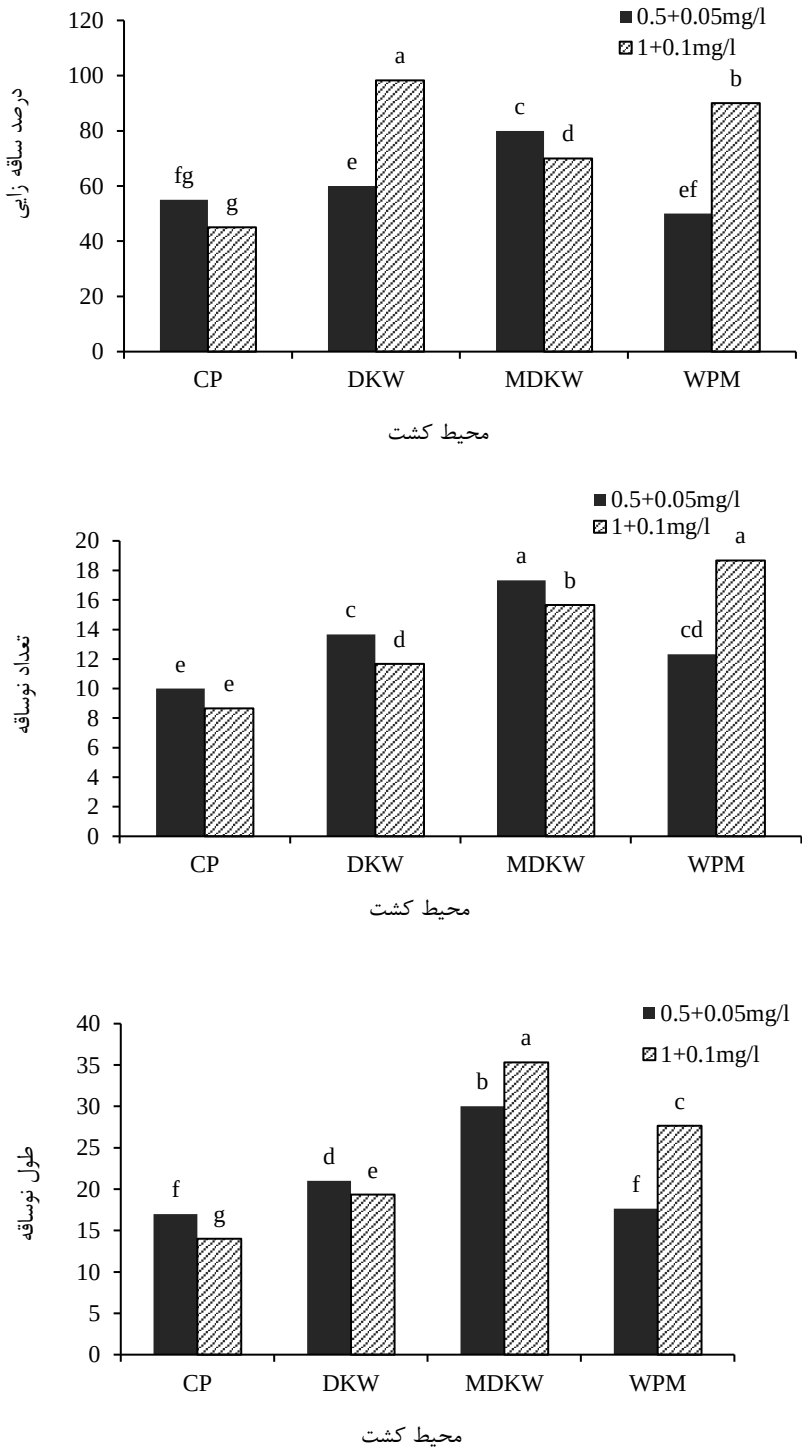
ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱درصد

مقایسه میانگین اثر محیط کشت بر درصد ساقه‌زایی، تعداد نوساقه‌های پرآوری شده و طول نوساقه رقم سوپریور نشان داد که محیط کشت DKW حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بهترین اثر را در درصد ساقه‌زایی (شکل ۲، الف و شکل ۵، ج)، محیط کشت WPM همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و همچنین محیط کشت MDKW با ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هر دو هورمون BA و NAA بهترین اثر را در تعداد نوساقه (شکل ۲، ب) و محیط کشت MDKW همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بهترین اثر را بر روی صفت طول نوساقه‌های پرآوری شده (شکل ۲، ج) داشته است.

نتایج تحقیق رستمی و ارشادی (۱۳۹۸) به منظور بهینه سازی باززایی گیاهان حاصل از جنین‌زایی سوماتیکی در شش رقم انگور نشان داد، درصد باززایی بیشتری در محیط کشت WPM نسبت به محیط MS حاصل شده است. هرچند میزان این افزایش برای همه ارقام یکسان نبود. با توجه به اینکه در هر دو محیط غلظت نیم میکرومولار از تنظیم‌کننده رشد BAP استفاده شده بود، پاسخ متفاوت ارقام به دو محیط را به دلیل تفاوت موجود در ترکیب محیط‌های کشت با تأکید بر منبع نیتروژن گزارش نمودند. محتوی نیتروژن در محیط کشت WPM از آمونیوم نیترات تأمین می‌شود (لو[1]، ۲۰۰۵). آمونیوم به منظور حفظ حیات سلولی، بهبود جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی گیاه ضروری گزارش شده است (پرین[2] و همکاران، ۲۰۰۱).

در تحقیق حاضر کاربرد سیتوکینین (BA) با مقدار کم اکسین (NAA)، منجر به تشکیل حداکثری شاخساره گردید. نتایج تحقیقات پیشین نیز حاکی از آن است که سیتوکینین‌ها بویژه اگر توأم با اکسین در محیط کشت به کار، روند باعث تحریک تقسیم سلولی می‌شوند (جرج[3] و همکاران، ۲۰۰۸؛ چادهری [4] و همکاران، ۲۰۱۲). سیتوکینین‌ها در غلظت‌های بالا (۱ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) باعث تشکیل شاخساره جدید از طریق کم کردن خاصیت غلبه انتهایی می‌شوند، علاوه بر این که در مرحله پرآوری شاخساره برای تشکیل میزان مناسبی از جوانه‌ها علاوه بر سیتوکینین‌ها استفاده از اکسین نیز ضروری است (ماتره و همکاران، ۲۰۰۰؛ چادهری و همکاران، ۲۰۱۲) که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. در نتایج چند تحقیق که به صورت مجزا انجام شده است، بهترین تیمار هورمونی برای پرآوری چند رقم انگور، تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA معرفی شده است (تورگروسا[5] و همکاران، ۲۰۰۱؛ بوکوئت[6] و همکاران، ۲۰۰۶). این تیمار رشد جوانه‌های جانبی را تحریک نموده و پرآوری مناسبی را در ریزنمونه‌ها در پی داشته است. نتایج تحقیق ایبانز[7] و همکاران (۲۰۰۳) نیز حاکی از آن بود که از بین سه نوع سیتوکینین بنزیل‌آدنین، ۲- ایزوپنتینیل آدنین و تیدیازورون، بنزیل‌آدنین پاسخ‌های مورفوژنیک بهتری را ایجاد نموده است که نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیقات ذکر شده قبلی مطابقت نشان می‌دهد. محیط کشت WPM محیط مناسبی برای ساقه زایی گزارش شده است (لوپزپرز و همکاران، ۲۰۰۶)، این موضوع در تحقیق رستمی و ارشادی (۱۳۹۸) مورد تأیید قرار گرفته است به این دلیل که کاربرد محیط کشت WPM منجر به بهبود رشد در گیاهان غیرطبیعی حاصل از جنین زایی سوماتیکی در تحقیق مذکور شد به طوری که این گیاهان پس از انتقال به محیط WPM، تولید شاخساره

1. Lu
2. Perrin
3. George
4. Chowdhury
5. Torregrosa
6. Bouquet
7. Ibanez



شکل ۲- تأثیر محیط کشت بر الف) درصد ساقه‌زایی، ب) تعداد نوساقه و ج) طول نوساقه‌های پرآوری شده رقم سوپریور. میانگین‌های دارای حروف مشابه فاقد تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

نمودند و به گیاه طبیعی تبدیل شدند.

ریشه‌زایی رقم کریمسون

نتایج مقایسه میانگین ترکیبات هورمونی بر درصد ریشه‌زایی ریزنمونه باززا شده رقم کریمسون نشان داد در تیمار ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA (شکل ۳، الف) و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA، بیشترین درصد ریشه‌زایی وجود دارد (شکل ۳، الف). در میان ترکیبات هورمونی مورد استفاده در این بخش تیمار هورمونی ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون

IBA همراه با ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA بهترین اثر را بر روی تعداد ریشه (شکل ۳، ب) و تیمار حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA بدون IBA، بهترین اثر را در طول ریشه‌ها (شکل ۳، ج) داشته است.

در تحقیق نوروزی و همکاران (۱۳۹۷)، هورمون IBA هورمون مناسبی جهت ریشه‌زایی و افزایش طول ریشه در رقم بی‌دانه انگور گزارش شد. در تحقیق دیگری نیز ریشه زایی انگور Alexandria در محیط کشت با غلظت‌های مختلف IBA و NAA مورد بررسی قرار گرفت و بیشترین میزان ریشه‌زایی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد. نتایج بدست آمده در تحقیق بارتو و نوکاراجو[1] (۲۰۰۷) نیز نشان داد محیط کشت محتوی دو تنظیم‌کننده رشد IBA و NAA بالاترین میزان ریشه‌زایی (۹۵ درصد) در رقم پرلت انگور را به دنبال داشته است. در مطالعات انجام شده توسط آبیدو و همکاران (۲۰۱۳) نیز بالاترین درصد ریشه زایی و طول ریشه در محیط MS محتوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۰/۵میلی‌گرم در لیتر IAA گزارش شد.

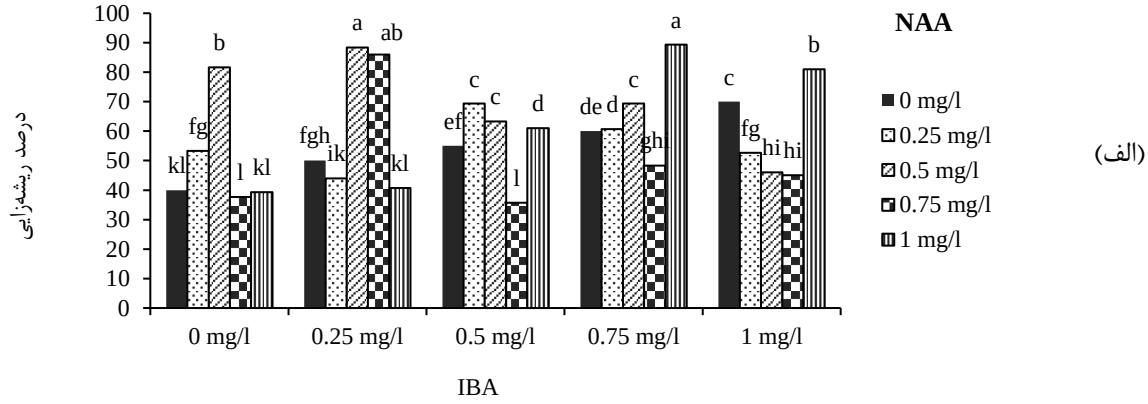
ریشه‌زایی رقم سوپریور

بیشترین درصد ریشه‌زایی از ریزنمونه باززا شده حاصل از رقم سوپریور (۱۰۰٪ سرشاخه‌ها) در تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA بدون حضور IBA (شکل ۴، الف- شکل ۵، د)، بیشترین تعداد ریشه در ریزنمونه‌های کشت شده در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA (شکل ۴، ب) و بیشترین طول ریشه در تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۱میلی‌گرم در لیتر IBA (شکل ۴، ج) مشاهده شد. خصوصیات ژنتیکی، وضعیت فیزیولوژیکی گیاه مادری و ریزنمونه حاصل در مرحله ریشه‌زایی به عنوان فاکتورهای مهمی گزارش شدند که می‌توانند اثر متقابل با هورمون‌ها و شرایط محیطی (نور کم، دمای مناسب) ایجاد نمایند (بارزالی[2] و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین گزارش شده است اکسین‌ها به طور معمول طی مراحل مختلف تشکیل ریشه (ریشه‌انگیزی، ریشه آغازی و طویل شدن ریشه) مورد استفاده قرار گرفته‌اند و مقدار، نوع، زمان و غلظت اکسین بر ریشه‌زایی موثر بوده است. در تحقیق حاضر نیز نتایج مطلوب به منظور تولید شاخساره جدید، طول شاخه و تعداد نوساقه و همچنین ریشه‌زایی در دو رقم سوپریور و کریمسون در محیط‌های پایه و ترکیب هورمونی متفاوتی از هم مشاهده شد. بر اساس نتایج تحقیقات پیشین افزودن NAA یا IBA به محیط ریشه‌زایی منجر به ریشه‌دار شدن ۹۰٪ شاخساره‌ها شده است (آنیس و احمد[3]، ۲۰۱۶) که با نتایج تحقیق حاضر مشابهت دارد. در تحقیق مظفری[4] و همکاران (۲۰۱۶) با افزایش غلظت IBA، ریشه‌های ضخیم تری به دست آمد. با این‌حال تعداد ریشه در رقم خوشناو با افزایش غلظت IBA کاهش یافت که علت این موضوع به احتمال اکسین داخلی بالاتر در این رقم نسبت به ارقام دیگر گزارش شد و بر اساس نتایج این تحقیق، غلظت کم تا متوسط IBA برای ریشه‌زدن شاخه انگور در شرایط آزمایشگاهی پیشنهاد شد.

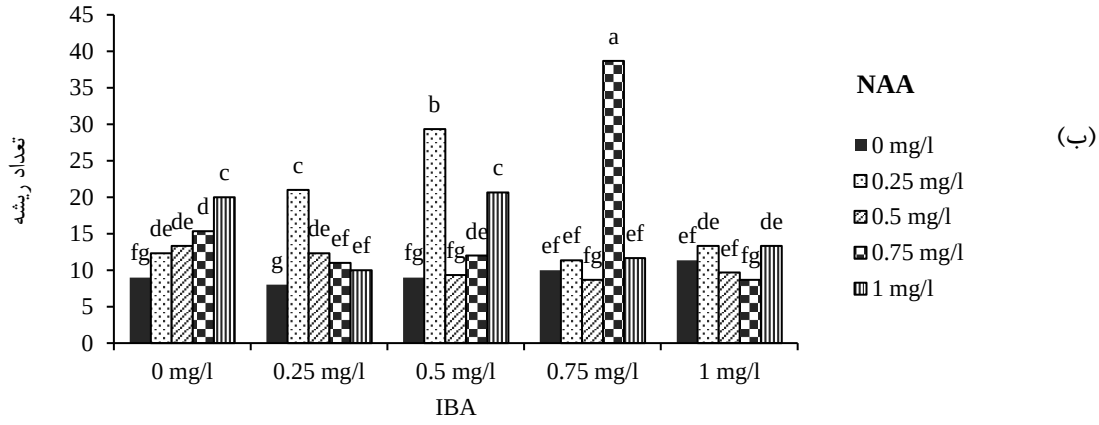
نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر به منظور پرآوری رقم کریمسون انگور، محیط WPM با ترکیب هورمونی mgL^{-1} ۱ BA و mgL^{-1} ۰/۱ NAA و برای ریشه‌زایی در این رقم محیط CP با ترکیب هورمونی mgL^{-1} ۰/۷۵ IBA و mgL^{-1} ۱ NAA بهترین محیط گزارش می‌شود. در رقم سوپریور نیز بهترین پرآوری در محیط DKW با ترکیب هورمونی mgL^{-1} ۱ BA و mgL^{-1} ۰/۱ NAA و بهترین ریشه‌زایی نیز در محیط پایه CP همراه با mgL^{-1} ۰/۲۵ NAA بدست آمد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد دو رقم سوپریور و کریمسون پاسخ‌های متفاوتی به محیط‌های کشت مختلف نشان دادند. در این آزمایش، نوع محیط کشت اثر معنی‌داری بر روی هر یک از صفات مورد بررسی داشت. با توجه به اینکه دو رقم مورد بررسی در این پژوهش دارای زمینه‌های ژنتیکی متفاوتی می‌باشند، می‌توان بیان کرد که وجود زمینه ژنتیکی متفاوت می‌تواند سبب بروز پاسخ‌های متفاوت در محیط‌های کشت متفاوت شود. نتایج بسیاری از پژوهش‌های انجام شده حاکی از آن بود که گونه‌های مختلف، ارقام و اندام‌های مختلف یک گیاه به کشت بافت گیاهی واکنش یکسانی نشان نمی‌دهند که نتایج حاصل از این تحقیق نیز تأییدی بر این مطلب می‌باشد. نتایج حاصل از پژوهش حاضر می‌تواند به منظور ریزازدیادی و توسعه کشت ارقام تجاری سوپریور و کریمسون انگور مورد استفاده قرار گیرد.

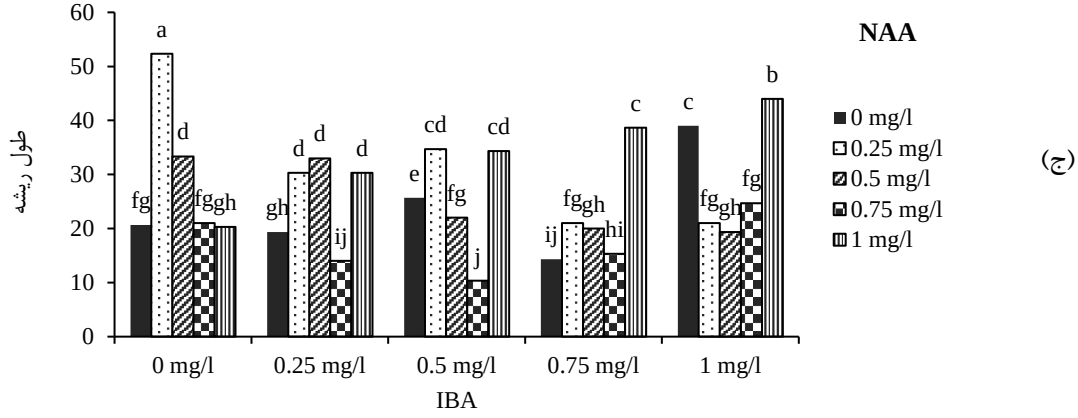
1. Barreto and Nookaraju
2. Barzali
3. Anis and Ahmad
4. Mozafari



(الف)

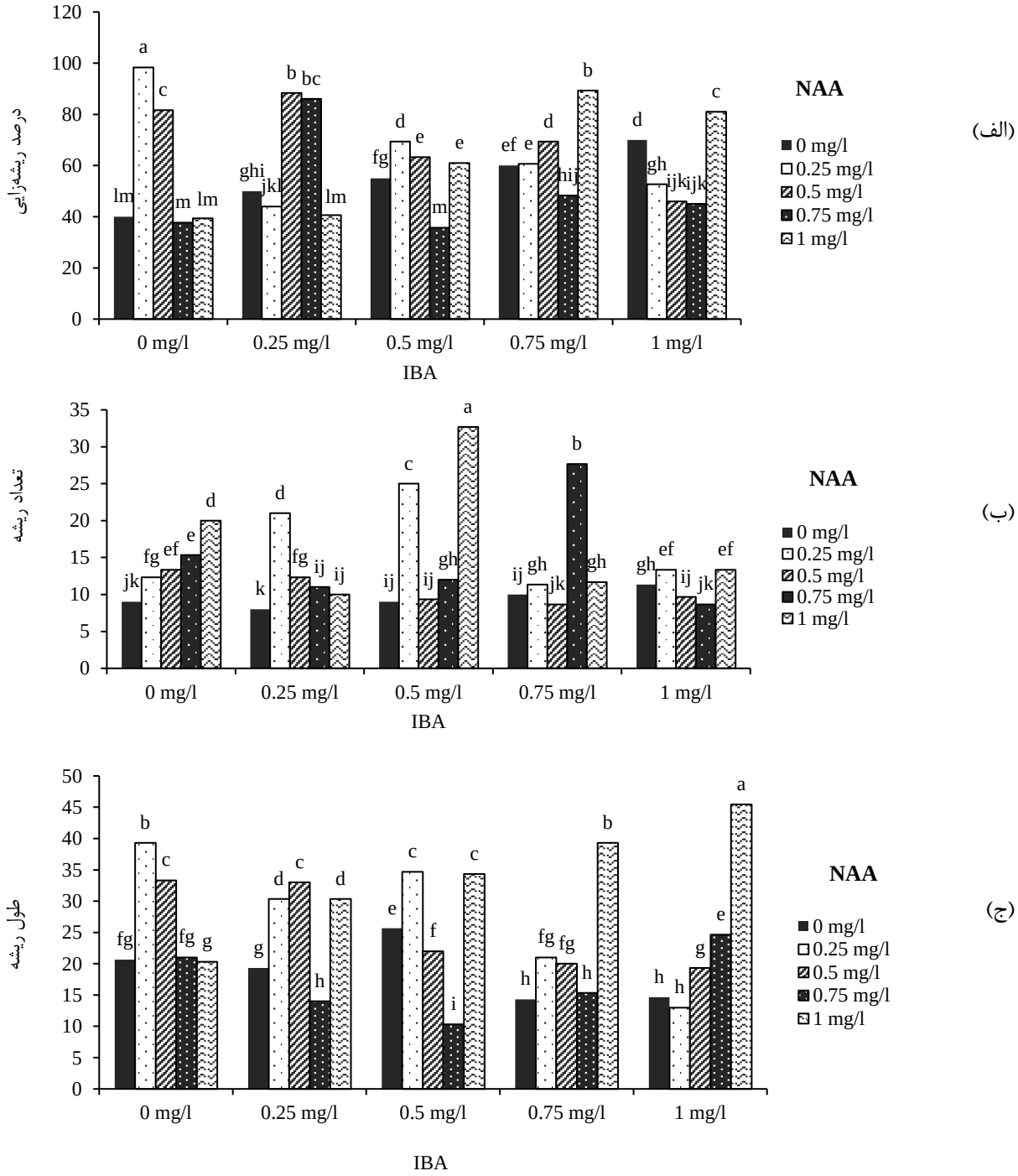


(ب)



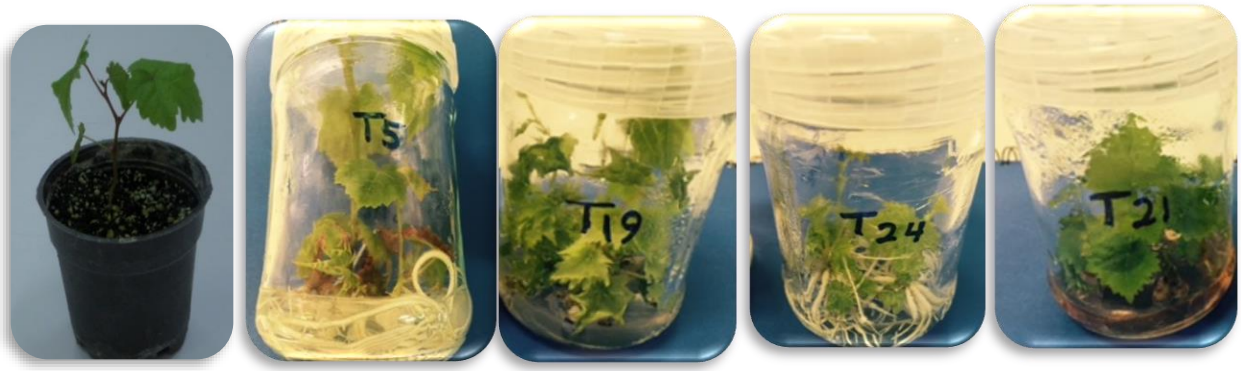
(ج)

شکل ۳- تأثیر ترکیبات هورمونی بر الف) درصد ریشه‌زایی، ب) تعداد ریشه و ج) طول ریشه رقم کریمسون. میانگین‌های دارای حروف مشابه فاقد تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.



شکل ۴- اثر ترکیبات هورمونی بر الف) درصد ریشه‌زایی، ب) تعداد ریشه و ج) طول ریشه رقم سوپریور. میانگین‌های دارای حروف مشابه فاقد تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

الف ب ج د و



شکل ۵- الف) رقم کریمسون پرآوی شده، ب) ریشه‌دار شدن گیاهچه‌های کریمسون در محیط ریشه‌زایی CP (0.75 IBA+ 1 mg.l^{-1} NAA)، ج) رقم سوپریور پرآوری شده، د) ریشه‌دار شدن گیاهچه‌های سوپریور در محیط ریشه‌زایی CP (0.25 mg.l^{-1} NAA+0.0 mg.l^{-1} IBA)، و) رقم سوپریور در مرحله سازگاری.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان مقاله از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران بواسطه حمایت مالی تشکر می‌نمایند. همچنین از جناب آقای دکتر عبادی به خاطر در اختیار قراردادن ریزنمونه‌های ارقام مورد استفاده، قدردانی می‌شود.

منابع

حاجی‌زاده سی‌سختی، س.، دهداری، م.، معصومی‌اصل، ا. و ابراهیمی، م. ۱۳۹۴. بهینه‌سازی تولید پینه و ریزازدیادی در چهار رقم انگور (*Vitis vinifera* L.). مجله پژوهش‌های تولید گیاهی، (۴)۲۲: ۳۵-۴۸.

رستمی، ر. و ارشاد، ا. ۱۳۹۸. بهینه‌سازی باززایی گیاهان حاصل از جنین‌زایی سوماتیکی در شش رقم انگور (*Vitis vinifera* L.). علوم باغبانی ایران، ۵۰(۴): ۹۳۵-۹۴۵

کلاته‌جاری، س.، عبادی، ع.، زمانی، ذ. و امیدی، م. ۱۳۸۵. بررسی کشت درون شیشه‌ای دو رقم انگور ایرانی و تعیین شرایط مناسب جهت کشت مریستم آنها. مجله علوم کشاورزی ایران، (۲)۳۷: ۲۰۵-۲۱۵.

Aazami, M.A. 2010. Effect of some growth regulators on "*in vitro*" culture of two *Vitis vinifera* L. cultivars. Romanian Biotechnological Letters, 15(3): 5229-5232.

Abido, M.A.M., Hassanen, A.S.A. and Rayan, G.A. 2013. *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) Muscat of Alexandria cv. for conservation of endangerment. Middle East Journal of Scince Research, 13: 328–337.

Abu-Zahra, T.R., 2013. Effect of plant hormones application methods on fruit quality of 'Superior Seedless' grape. Bioscience Biotechnology Research Asia, 10(2): 527-531.

Alizadeh, M., Singh, S. and Patel, V. 2010. 'Comparative performance of *in vitro* multiplication in four grape (*Vitis* spp.) rootstock genotypes'. International Journal of Plant Production, 4(1): 41-50.

Anis, M. and Ahmad, N. 2016. Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement. Singapore, Springer.

Barreto, M.S. and Nookaraju, A. 2007. Effect of auxin types on *in vitro* and *ex vitro* rooting and acclimatization of grapevine as influenced by substrates. Indian Journal of Horticulture, 64(1): 5-11.

Barzali, P., Mofidabadi, W.Y., Bozorgi, R. and Zangi, M.R. 2011. The using of gibberellic acid hormone on cotton mature embryo resulted by crossing between wild and commercial species on artificial medium. African Journal of Biotechnology, 10(46): 9322-9327.

Bouquet, A., Torregrosa, L., Iocco, P. and Thomas, M.R (Ed). 2006. Grapevine (*Vitis vinifera* L.). Agrobacterium Protocols. Humana Press, 273-285.

Cameron, I. 2001. Crimson seedless promise WA table grape boon. Journal of the Department of Agriculture, Western Australia, 42(1): 24-29.

Chee, R. and Pool, R.M. 1985. *In vitro* propagation of *Vitis*: the effects of organic substances on shoot multiplication. Vitis, 24: 106-118.

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. International Journal of Sustainable Crop Production, 7(2): 12-18.

Dai, L., Zhou, Q., Li, R., Du, Y., He, J., Wang, D., Cheng, S., Zhang, J. and Wang, Y. 2015. Establishment of a picloram-induced somatic embryogenesis system in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay and genetic transformation of a stilbene synthase gene from wild-growing *Vitis* species. Plant Cell Tissue Organ Culture, 121: 397-412.

Dokoozlian, N.K. and Peacock, W.L. 2001. Gibberellic acid applied at bloom reduces fruit set and improves size of' Crimson Seedless' table grapes. Horticultural Science, 36(4): 706-709.

Driver, j.A. and Kuniyuki, A.H. 1984: *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. Horticultural Science, 19: 507–709.

Eftekhari, M., Alizadeh, M., Mashayekhi, K. and Asghari, H.R. 2012. *In vitro* propagation of four Iranian grape varieties: Influence of genotype and pretreatment with *arbuscular mycorrhiza*. Vitis, 51(4): 175-182.

El-Sayed, M.E.A. 2013. Improving fruit quality and marketing of "Crimson Seedless" grape using some preharvest treatments. Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants, 5: 218-226.

Fayek, M.A., Amina H.J. and Abdel-Baset A. 2009. Meristem tip culture for *in vitro* eradication of grapevine leaf roll-associated virus-1 (GLRaV-1) and grapevine fan leaf virus (GFLV) from infected flame seedless grapevine plantlets. Iniciación a la Investigación, 4: 1-11.

Gambino, G., Ruffa, P., Vallania, R. and Gribaudo, I. 2007. Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 90(1): 79-83.

George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. 2008. The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. In Plant propagation by tissue culture. Springer, Dordrecht. D. (1984). Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd. pp. 65-113.

Gray, D. and Benton, C. 1991. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine Grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). Plant Cell Tissue Organ Culture, 27: 7-14

Ibanez, A., Valero, M. and Morte, A. 2003. Influence of cytokine's and subculturing on proliferation capacity of single-axillary-bud micro cuttings of *Vitis vinifera* L. cv. Napoléon, Annals de Biological, 25: 81-90.

Ji, W., Luo, Y., Guo, R., Li, X., Zhou, Q., Ma, X. and Wang, Y. 2017. Abnormal somatic embryo reduction and recycling in grapevine regeneration. Journal of Plant Growth Regulation, 36(4): 912-918.

Khan, N., Ahmed, M., Hafiz, I., Abbas, N., Ejaz, S. and Anjum, M. 2015. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for *in vitro* shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. OENO One, 49(1): 37-45.

Lloyd, G. and McCown, B. 1981. Commercially feasible micro-propagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. International Plant Propagators Society, 30: 421–427.

López-Pérez, A., Carreóo, J. and Dabauza, M. 2006. Somatic embryo germination and plant regeneration of three grapevine vs: Effect of IAA, GA. Vitis, 45: 141-143.

López-Pérez, A.J., Carreño, J., Martinez-Cutillas, A. and Dabauza, M. 2005. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. Vitis, 44(2): 79-85.

Lu, M. 2005. Micropropagation of *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through high frequency shoot tip culture. Scientia Horticulturae, 107: 64-69.

Martinelli, L.U.C.I.A., Candioli, E.R.I.C.A., Costa, D., Poletti, V. and Rascio, N. 2001. Morphogenic competence of *Vitis rupestris* S. secondary somatic embryos with a long culture history. Plant Cell Reports, 20(4): 279-284.

McGranahan, G.H., Driver, J.A. and Tulecke, W. 1987. Tissue culture of Juglans. Cell and tissue culture in forestry. Springer, Dordrecht: 261-271.

Mhatre, M., Salunkhe, C.K. and Rao, P.S. 2000. Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards an improved protocol. Scientia Horticulture, 84(3-4): 357-363.

Mhatre, M., Salunkhe, C.K. and Rao, P.S. 2000. Micropropagation of *Vitis vinifera* L.: towards an improved protocol. Scientia Horticulture, 84: 357-363.

Mozafari, A.A., Ghoraishi, O., Ghaderi, N. and Javadi, T. 2016. Micropropagation of grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) on different basal media supplemented with benzyl adenine. Agriculturae Conspectus Scientificus, 81(3): 123-129.

Naila, A., Afrasiab, H. and Anwar, S. 2017. Micropropagation and Acclimatization of European Varieties of Grapes (*Vitis Vinifera* L). International Journal of Advances in Biology, 4: 01-11.

Perrin, M., Martin, D., Joly, D., Demangeat, G., This, P. and Masson, J.E. 2001. Medium dependent response on grapevine somatic embryo genic cells. Plant Science, 161: 107-116.

Skiada, F.G., Grigoriadou, K. and Eleftheriou, E.P. 2010. Micropropagation of *Vitis vinifera* L. cv.'Malagouzia'and 'Xinomavro'. Central European Journal of Biology, 5(6): 839-852.

Smerea, S., Andronic, L., Grigorov, T. and Bujoreanu, V. 2010. *In vitro* regenerative genotypic specificity of meristems from virus infected grapevine cultivars. Romanian Biotechnology Letter, 15: 9-25.

Sudarsono, P.D. and Goldy, R.G. 1988. Effect of some growth regulators on *in vitro* culture of three *Vitis rotundifolia* cultivars. Horticultural Science, 23: 757. (Abstract).

Torregrosa, L., Bouquet, A. and Goussard, P.G. 2001. *In vitro* culture and propagation of grapevine. Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine. Springer, Dordrecht, 281-326.