مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیستم، شماره اول، ۱۳۹۲
http://jopp.gau.ac.ir

تاثیر غلظت‌های مختلف ساکاروز، کازئین هیدرولایزات و اسیدآمینه‌های مختلف بر جنین‌زایی سوماتیکی در برخی از ارقام انگور (*Vitis vinifera* L.)

***امیر جمال‌محمود[۱]، علی عبادی[۲]، منصور امیدی[۳] و مسعود میرمعصومی[۴]**

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی تهران، [۲]دانشیار گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران،
[۳]استاد گروه علوم زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران، [۴]مربی پردیس علوم دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۰۴

چکیده

ریزنمونه‌های برگ انگور ارقام شاهرودی، بیدانه سفید و یاقوتی جهت تولید کالوس در محیط کشت MS به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D کشت شدند. کالوس‌های به‌دست آمده به‌منظور تمایزیابی در محیط کشت MS بدون هورمون که دارای غلظت‌های مختلف ساکاروز، کازئین هیدرولایزات و اسیدآمینه‌های گلوتامین، فنیل آلانین و آرژنین بود، کشت شدند. ارقام یاقوتی و بیدانه سفید در محیط کشت دارای ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولایزات و رقم شاهرودی در محیط کشت دارای ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولایزات بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی را داشتند. از سوی دیگر در تمامی ارقام مورد مطالعه بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی در محیط کشت دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل آلانین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آرژنین بودند. همچنین ساکاروز در غلظت ۴۵ گرم در لیتر باعث تولید بیشترین درصد جنین سوماتیکی در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید شد. در حالی‌که در مورد رقم شاهرودی، در غلظت ۶۰ گرم در لیتر باعث تولید بیشترین درصد جنین سوماتیکی شد.

واژه‌های کلیدی: انگور، جنین‌زایی سوماتیکی، محیط کشت، ساکاروز، اسید آمینه

* مسئول مکاتبه: jamalmahmood.amir@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

انگور یکی از مهمترین محصولات باغبانی است که در مناطق وسیعی از جهان کشت می‌شود. به‌منظور افزایش کمیت و کیفیت این میوه و ایجاد مقاومت نسبت به آفات و امراض و شرایط نامساعد محیطی لزوم اجرای برنامه‌های اصلاح انگور اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. یکی از روش‌های اصلاح، مهندسی ژنتیک می‌باشد که به‌دلایل کوتاهی زمان انجام این کار و جابه‌جا نشدن بیشتر ژن‌ها دارای اهمیت فراوانی می‌باشد. برای انجام مهندسی ژنتیک نیاز به بافت خاص پذیرای ژن می‌باشد و در این ارتباط بهترین بافت کالوس جنین‌زا می‌باشد (اسکورزا و همکاران، ۱۹۹۵). از جنین‌های سوماتیکی نه تنها در انتقال ژن، بلکه در پژوهش‌ها جهت بررسی تنوع سوماکلونال (گرشوف و دوی، ۱۹۷۴)، ویروس‌زدایی ارقام (گامبینو و همکاران، ۲۰۰۶)، تشخیص ارقام جهش‌یافته (فرانک و همکاران، ۲۰۰۲) و مطالعه نحوه تمایزیابی در گیاهان (فرانسیسکو و همکاران، ۲۰۰۶) استفاده شده است. تولید جنین سوماتیکی تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند ژنوتیپ (اولاهه و همکاران، ۲۰۰۹)، محیط کشت، نوع و غلظت هورمون‌ها (داس و همکاران، ۲۰۰۲)، زمان جمع‌آوری ریزنمونه (ویدال و همکاران، ۲۰۰۹؛ گریبایدو و همکاران، ۲۰۰۴) و نوع ریزنمونه قرار دارد. به‌طور کلی ریزنمونه‌های مورد استفاده در انگور را می‌توان به دو دسته ریزنمونه‌های مورد استفاده از اندام‌های زایشی مانند تخمدان (کریمی و همکاران، ۲۰۰۵؛ گامبینو و همکاران، ۲۰۰۷؛ لوپز و همکاران، ۲۰۰۵)، پرچم (مارو و همکاران، ۱۹۸۶)، گل کامل (گامبینو و همکاران، ۲۰۰۷) و تخمک (مولینز و سری ناواسان، ۱۹۸۰) و ریزنمونه‌های رویشی مانند برگ (داس و همکاران، ۲۰۰۲)، دمبرگ (مارتینلی و همکاران، ۱۹۹۳)، پیچک (سالونخه و همکاران، ۱۹۹۷) و گره‌های ساقه‌ای (مایلوت و همکاران، ۲۰۰۶) تقسیم‌بندی نمود. ریزنمونه پرچم بیشترین کاربرد را برای تولید جنین سوماتیکی در انگور داشته است. عیب ریزنمونه‌های زایشی محدود بودن زمان جمع‌آوری آن‌ها می‌باشد، به‌طوری‌که فقط در برخی از مواقع سال می‌توان از آن استفاده کرد. از مزایای ریزنمونه‌های رویشی می‌توان در دسترس بودن این نوع از ریزنمونه‌ها در طی فصل رویش و از معایب آن می‌توان به پایین بودن بازدهی تولید جنین سوماتیکی از این ریزنمونه‌ها اشاره نمود. در بین ریزنمونه‌های رویشی ریزنمونه برگ بیشترین کاربرد را در تولید جنین سوماتیکی در انگور داشته است. برای بالا بردن بازدهی تولید جنین سوماتیکی در انگور، راهبردهای ویژه‌ای در نظر گرفته شده است. مشخص شده است که با جذب یون‌های نیترات و آمونیوم موجود در محیط کشت، تغییراتی در pH محیط کشت ایجاد می‌شود (نایدز، ۱۹۹۴). بنابراین

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده از سایر منابع نیتروژنی مانند کازئین هیدرولایزات و اسیدآمینه‌ها برای بالا بردن بازدهی جنین سوماتیکی در گیاهان موردنظر بوده است. با این حال پاسخ به این ترکیبات جهت بالا بردن تولید جنین سوماتیکی بسته به نوع گیاه و ژنوتیپ متفاوت می‌باشد. به‌طوری‌که در پژوهشی با افزودن کازئین هیدرولایزات به‌میزان ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر به‌میزان چشم‌گیری موجب بالا رفتن تولید کالوس جنین‌زا در انگور رقم کابرنت ساوینون شد (مارو و همکاران، ۱۹۸۶). همچنین در این پژوهش با افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل آلانین و ۱ میلی‌گرم در لیتر آدنین به‌میزان زیادی افزایش در تولید جنین سوماتیکی مشاهده شد. در گزارشی بیان شد که استفاده از آرژنین به‌میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به‌میزان زیادی موجب افزایش تولید جنین سوماتیکی در نیشکر شد (نیوس و همکاران، ۲۰۰۸). در آزمایشی دیگر که اثر L- گلوتامین بر روی تولید جنین سوماتیکی در گواوا مورد بررسی قرار گرفت، بیان گردید که استفاده از این ماده به‌میزان ۰/۶۸ میلی‌مولار باعث افزایش تولید جنین سوماتیکی در این گیاه شد (مانوج و همکاران، ۲۰۰۹). همچنین در گزارش دیگر عنوان شده است که بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی در گیاه فی‌جوآ در محیط کشت دارای ۴ میلی‌مولار آرژنین به‌دست آمد (لیریو و همکاران، ۲۰۰۱). در کاج افزودن مخلوطی از ۱۷ نوع از اسیدآمینه‌های مختلف به غلظت ۱۰ میلی‌مولار باعث تولید حداکثری جنین سوماتیکی شد (راویندرا و همکاران، ۲۰۰۵). گزارش دیگر نشان می‌دهد که افزودن اسیدآمینه‌های مختلف در مرحله تمایزیابی در ارزن باعث کاهش تولید جنین سوماتیکی شد (اپان و جرج، ۱۹۹۰). به‌نظر می‌رسد در محیط کشت توازن بین منابع مختلف نیتروژن یکی از عوامل مهم القای جنین سوماتیکی می‌باشد (اوزاوا و همکاران، ۱۹۹۶). نیتروژن موجود در اسیدآمینه‌ها در طی متابولیسم و سنتز پروتئین در مقایسه با منبع نیتروژن غیرآلی سریع‌تر وارد اسکلت کربنی می‌شود (لی، ۱۹۹۳).

از سوی دیگر یکی از ترکیبات مهم در محیط کشت ساکاروز می‌باشد. نقش ساکاروز در محیط کشت را به‌عنوان تامین‌کننده منبع کربنی و همچنین تنظیم‌کننده فشار اسمزی بیان نموده‌اند. همچنین ساکاروز در غلظت کم برای اندام‌زایی و در غلظت زیاد به‌منظور تولید جنین سوماتیکی می‌تواند مناسب باشد (ادوین و همکاران، ۲۰۰۸). به‌طوری‌که در آزمایشی بیان شد که غلظت ۳۵۰ میلی مولار ساکاروز برای تولید جنین سوماتیکی در گیاه آفتابگردان مطلوب می‌باشد (جینین و همکاران، ۱۹۹۵). برای تولید جنین سوماتیکی در انگور از غلظت‌های مختلف ساکاروز ۶۰، ۳۰ و ۲۰ گرم در لیتر استفاده شده است. اما از نظر بررسی این عامل بر روی تولید جنین سوماتیکی تا به حال در این گیاه آزمایشی

Archive of SID

www.SID.ir

انجام نشده است. هدف از این پژوهش بررسی اثرات کازئین هیدرولایزات، ساکاروز و اسیدآمینه‌های متفاوت در غلظت‌های مختلف، بر روی فرایند تولید جنین سوماتیکی و همچنین بالا بردن بازدهی تولید جنین سوماتیکی از ریزنمونه برگ در ارقام انگور شاهرودی، یاقوتی و بیدانه سفید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های برگ از مرکز تحقیقات گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج جمع آوری شدند. از سه برگ جوان انتهای هر شاخه استفاده گردید. برگ‌ها به‌منظور ضدعفونی ابتدا به‌طور کامل شسته شدند، سپس در محلول اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه قرار گرفتند. بعد از تیمار با الکل، برگ‌ها سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند. به‌منظور ضدعفونی سطحی، ریزنمونه‌ها در داخل محلول هیپوکلریت‌سدیم ۱/۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. در نهایت نمونه‌ها سه بار با آب‌مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. پس از استریل‌کردن، برگ‌ها به قطعات تقریبا ۱ سانتی‌متری بریده شدند و در داخل پتری دیش کشت گردید. به‌منظور انگیزش کالوس از محیط کشت MS به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP (داس و همکاران، ۲۰۰۲) و جهت تمایز جنین از محیط کشت MS بدون هورمون استفاده شد. یک ماه پس از کشت ریزنمونه‌ها، کالوس‌ها به محیط تمایزیابی منتقل شدند. به‌منظور بررسی تأثیر کازئین هیدرولایزات بر روی جنین‌زایی سوماتیکی در انگور در آزمایش اول از کازئین هیدرولایزات در سه غلظت ۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. به‌منظور بررسی تأثیر اسیدآمینه‌ها در آزمایش دوم، اسیدآمینه گلوتامین در سه غلظت ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، اسیدآمینه فنیل آلانین در سه غلظت ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر و اسیدآمینه آرژنین در سه غلظت ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. همچنین در آزمایش سوم از ساکاروز در غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰ گرم در لیتر استفاده شد. در تمام محیط کشت‌های مورد استفاده ۷ گرم در لیتر آگار اضافه گردید. pH تمام محیط‌های کشت مورد استفاده قبل از افزودن آگار با استفاده از NaOH یک نرمال روی ۵/۸ تنظیم شد. همچنین تمام محیط کشت‌ها، در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه استریل شدند. ساکاروز قبل از اتوکلاو به محیط‌های کشت افزوده شد. از سوی دیگر اسیدآمینه‌ها بعد از اتوکلاو و زمانی که دمای محیط کشت به ۵۵ درجه سانتی‌گراد رسید، فیلتر شده و به محیط کشت اضافه گردیدند. برای انگیزش کالوس جنین‌زا و تمایز جنین سوماتیکی نمونه‌ها در اتاق رشد گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و

Archive of SID

www.SID.ir

منابع‌طبیعی در شرایط کاملا تاریک و دمای ۱±۲۵ قرار داده شدند. برای جوانه‌زنی جنین‌ها از محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP استفاده شد. این پژوهش به‌صورت طرح کاملا تصادفی فاکتوریل انجام شد. در محیط تمایزیابی به ازای هر تیمار ۴۵ کالوس کشت داده شد و داده‌ها به‌صورت درصد بیان شد. درصد تولید جنین سوماتیکی دو ماه بعد از کشت کالوس‌ها زمانی‌که جنین‌ها در مرحله کروی بودند محاسبه شد. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزارهای SAS/9:1.3 و MSTATC انجام شد.

نتایج

مرحله القای کالوس: ۱۰ روز پس ازکشت، ریزنمونه‌های برگ کالوس‌زایی را شروع کردند. ناحیه حاشیه ریزنمونه برگ، منطقه شروع تولید کالوس بود. پس از یک ماه بیشتر ریزنمونه‌ها کالوس تولید نمودند. از نظر درصد کالوس‌زایی تفاوت معنی‌داری بین ارقام مشاهده شد، به‌طوری‌که رقم بیدانه سفید بیشترین درصد کالوس‌زایی (۷۵ درصد) و رقم شاهرودی کمترین درصد کالوس‌زایی (۶۵ درصد) را ایجاد کردند. رقم یاقوتی نیز ۷۰ درصد کالوس‌زایی داشت. در این پژوهش فقط کالوس‌های گرانوله سفید و یا زرد رنگ که به کالوس تیره رنگی متصل بودند (کالوس جنین‌زا)، در مرحله تمایز جنین سوماتیکی ایجاد کردند (شکل- الف ۱). هیچ نوع تفاوت مرفولوژیکی در بین کالوس‌های ایجاد شده از ارقام کشت داده شده مشاهده نشد. کالوس‌های آبکی و نرم و همچنین کالوس‌هایی که بافت خیلی فشرده‌ای داشتند، جنین سوماتیکی در مرحله بعد تولید نکردند.

مرحله تمایز جنین: دو ماه پس از کشت کالوس‌ها در محیط تمایزیابی، جنین‌ها مشاهده شدند. جنین‌های ایجاد شده دارای مراحل مورفولوژیکی کروی، قلبی و اژدری شکل بودند (شکل۱- ب). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل رقم و غلظت‌های مختلف کازئین هیدرولایزات روی جنین سوماتیکی معنی‌دار بودند (جدول ۱).

کمترین درصد تولید جنین سوماتیکی در ارقام مورد مطالعه در محیط کشت فاقد کازئین هیدرولایزات به‌دست آمد. ارقام یاقوتی و بیدانه سفید با افزایش غلظت کازئین هیدرولایزات افزایش در تولید جنین سوماتیکی را نشان دادند، به‌طوری‌که بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی در ارقام بیدانه سفید (۱۴/۲۵ درصد) و یاقوتی (۱۶/۵ درصد) در محیط کشت دارای ۵۰۰ میلی‌گرم کازئین هیدرولایزات به‌دست آمد. با این حال رقم شاهرودی کاهش در تولید جنین سوماتیکی در غلظت ۵۰۰

Archive of SID

www.SID.ir

میلی‌گرم کازئین هیدرولایزات را نشان داد، به‌طوری‌که برای این رقم بیشترین درصد تولید جنین در محیط کشت همراه با ۲۵۰ میلی‌گرم کازئین هیدرولایزات به‌دست آمد (۱۲/۲۵ درصد) (جدول ۱).

جدول ۱- تاثیر متقابل رقم و غلظت‌های مختلف کازئین هیدرولایزات بر درصد تولید جنین سوماتیکی در انگور.

ارقام	غلظت کازئین هیدرولایزات (میلی‌گرم در لیتر)		
	صفر	۲۵۰	۵۰۰
یاقوتی	۴/۲۵^{e}	۱۰/۷۵^{c}	۱۶/۵۰^{a}
شاهرودی	۲/۵۰^{e}	۱۲/۲۵^{bc}	۷/۰۰^{d}
بیدانه سفید	۳/۷۵^{e}	۷/۵۰^{d}	۱۴/۲۵^{b}

* حروف متفاوت در کلیه ستون‌ها و ردیف‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۱ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد. زمانی که بیشتر جنین‌ها در مرحله کروی بودند درصد تولید جنین سوماتیکی محاسبه گردید.

در مرحله تمایز جنین سوماتیکی همچنین از اسیدآمینه‌های متنوع در غلظت‌های مختلف استفاده شد. بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی در رقم یاقوتی و در محیط کشت دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل آلانین، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آرژنین و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و کمترین درصد تولید جنین سوماتیکی در رقم شاهرودی و در محیط کشت فاقد اسیدآمینه به‌دست آمد (جدول ۲). همچنین نتایج در این مرحله نشان داد که اثر متقابل اسیدهای آمینه با ارقام بر درصد تولید جنین سوماتیکی معنی‌دار می‌باشد. از سوی دیگر با افزایش غلظت اسیدآمینه L- گلوتامین (محیط کشت فاقد سایر اسیدآمینه‌ها) افزایش در تولید جنین سوماتیکی در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید مشاهده شد. اما در رقم شاهرودی، تولید جنین سوماتیکی با افزایش غلظت از ۵۰ به ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر این اسیدآمینه کاهش یافت. در رقم شاهرودی با افزایش غلظت اسیدآمینه فنیل آلانین درصد تولید جنین سوماتیکی کاهش یافت. از سوی دیگر تولید جنین سوماتیکی با افزایش غلظت آرژنین از ۵۰ به ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در تمام ارقام مورد مطالعه کاهش یافت. در شرایطی که غلظت اسیدآمینه گلوتامین ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بود، با افزایش غلظت فنیل آلانین از ۱۰ به ۲۰ میلی‌گرم در لیتر درصد تولید جنین سوماتیکی افزایش یافت، اما زمانی‌که غلظت گلوتامین ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود، با افزایش غلظت فنیل آلانین کاهش در تولید جنین سوماتیکی در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید مشاهده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- تاثیر اسیدآمینه‌های گلوتامین، فنیل آلانین و آرژنین روی درصد تولید جنین سوماتیکی در ارقام مختلف انگور.

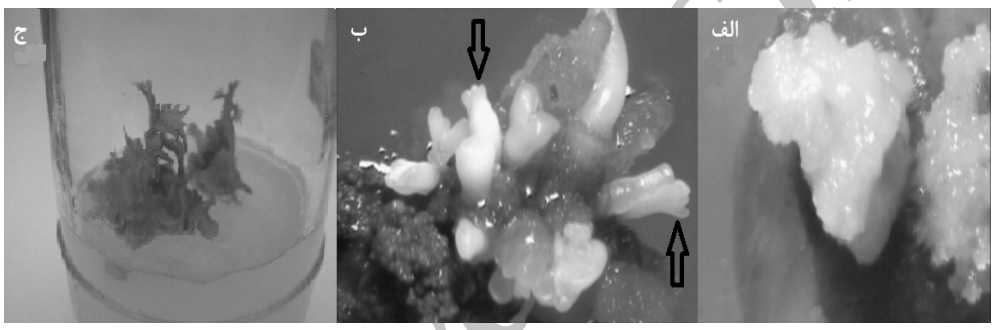
غلظت گلوتامین (میلی‌گرم در لیتر)	غلظت فنیل آلانین (میلی‌گرم در لیتر)			غلظت آرژنین (میلی‌گرم درلیتر)
	صفر	۱۰	۲۰	
	یاقوتی			
صفر	۳/۰۰^{k}	۴/۰۰^{k}	۳/۶۷^{k}	صفر
۵۰	۵/۰۰^{jk}	۷/۳۴^{hij}	۸/۳۴^{fgh}	صفر
۱۰۰	۷/۰۰^{hij}	۹/۰۰^{efgh}	۷/۳۴^{hij}	صفر
صفر	۸g^{hi}	۱۱/۰۰^{def}	۹/۰۰^{efgh}	۵۰
۵۰	۱۱/۶۷^{de}	۱۹/۰۰^{b}	۱۵/۰۰^{c}	۵۰
۱۰۰	۱۳/۰۰^{cd}	۲۳/۰۰^{a}	۲۰/۶۷^{ab}	۵۰
صفر	۵/۳۴^{ijk}	۷/۰۰^{hij}	۸/۰۰^{ghi}	۱۰۰
۵۰	۱۰/۳۴^{defg}	۱۱/۰۰^{def}	۸/۰۰^{ghi}	۱۰۰
۱۰۰	۷/۰۰^{hij}	۹/۳۴^{efgh}	۱۰/۶۷^{defg}	۱۰۰
	بیدانه سفید			
صفر	۳/۳۴^{n}	۳/۶۷^{mn}	۴/۳۴^{lmn}	صفر
۵۰	۵/۰۰^{klmn}	۶/۶۷^{hijklm}	۷/۶۷^{ghijk}	صفر
۱۰۰	۶/۳۴^{ijklm}	۹/۰۰^{fghi}	۷/۶۷^{ghijk}	صفر
صفر	۸/۰۰^{fghij}	۹/۰۰^{fghi}	۹/۳۴^{fgh}	۵۰
۵۰	۱۰/۰۰^{fg}	۱۶/۶۷^{ab}	۱۲/۶۷^{cde}	۵۰
۱۰۰	۱۳/۰۰^{cd}	۱۸^{a}	۱۶/۳۴^{ab}	۵۰
صفر	۴/۰۰^{lmn}	۵/۰۰^{klmn}	۵/۰۰^{klmn}	۱۰۰
۵۰	۱۰/۶۷^{def}	۹/۰۰^{fghı}	۶/۰۰^{jklmn}	۱۰۰
۱۰۰	۷/۶۷^{ghıjk}	۱۰/۳۴^{efg}	۱۴/۶۷^{bc}	۱۰۰
	شاهرودی			
صفر	۲/۳۳^{k}	۴/۳۴^{hijk}	۳/۰۰^{jk}	صفر
۵۰	۵/۰۰^{jhijk}	۵/۳۴^{fghij}	۷/۰۰^{defgh}	صفر
۱۰۰	۴/۶۷^{hijk}	۵/۳۴^{fghij}	۵/۳۴^{fghij}	صفر
صفر	۶/۳۴^{efghı}	۹/۳۴^{cd}	۸/۰۰^{def}	۵۰
۵۰	۶/۶۷^{defghı}	۱۳/۰۰^{ab}	۱۱/۰۰^{bc}	۵۰
۱۰۰	۹/۰۰^{cde}	۱۴/۰۰^{a}	۱۱/۳۴^{bc}	۵۰
صفر	۴/۰۰^{ijk}	۶/۰۰^{fghi}	۵/۰۰^{ghijk}	۱۰۰
۵۰	۸/۰۰^{def}	۷/۶۷^{defg}	۵/۰۰^{ghijk}	۱۰۰
۱۰۰	۶/۰۰^{fghi}	۹/۰۰^{cde}	۹/۳۴^{cd}	۱۰۰

* حروف متفاوت در کلیه ستون‌ها و ردیف‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۱ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد. زمانی‌که بیشتر جنین‌ها در مرحله کروی بودند درصد تولید جنین سوماتیکی محاسبه گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

وجود اسیدآمینه‌ها در محیط کشت‌ها باعث افزایش درصد تولید جنین سوماتیکی شد، به‌طوری‌که بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی در همه ارقام مورد مطالعه در محیط کشت دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل آلانین، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آرژنین و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و کمترین درصد تولید جنین سوماتیکی برای تمام ارقام در محیط کشت فاقد اسیدآمینه به‌دست آمد (جدول ۲). تولید جنین سوماتیکی در این آزمایش تحت تأثیر ژنوتیپ قرار گرفت، به‌طوری‌که رقم یاقوتی بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی (۹/۶۹ درصد) و رقم شاهرودی کمترین درصد تولید جنین سوماتیکی را ایجاد کردند (۸/۸۵ درصد). رقم بیدانه سفید نیز ۸/۸۵ درصد تولید جنین سوماتیکی داشت.



شکل ۱- کالوس جنین‌زای تولید شده در محیط کشت MS بدون هورمون (الف)، جنین سوماتیکی حاصل از کشت ریزنمونه برگ رقم یاقوتی در محیط کشت تمایزیابی دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل آلانین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آرژنین که با پیکان نشان داده شده است (ب) و گیاهچه‌های انگور به‌دست آمده از رشد جنین‌های سوماتیکی (ج) می‌باشد.

در این پژوهش غلظت‌های مختلف ساکاروز نیز مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش غلظت ساکاروز از ۳۰ به ۴۵ گرم در لیتر، افزایش در تولید جنین سوماتیکی در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید مشاهده شد. با این حال در غلظت ۶۰ گرم در لیتر کاهش در تولید جنین سوماتیکی در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید ایجاد کرد. ولی رقم شاهرودی با افزایش غلظت ساکاروز به ۶۰ گرم در لیتر افزایش در تولید جنین سوماتیکی مشاهده شد، به‌طوری‌که رقم شاهرودی در غلظت ۶۰ گرم در لیتر بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی را ایجاد کرد. در این آزمایش رقم یاقوتی در غلظت ۴۵ گرم در لیتر

Archive of SID

www.SID.ir

بیشترین درصد جنین سوماتیکی را ایجاد کرد (۱۱ درصد). در غلظت ۲۰ گرم در لیتر فقط رقم یاقوتی جنین سوماتیکی ایجاد کند و در بقیه ارقام جنین سوماتیکی تولید نشد (جدول ۳).

جدول ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف ساکاروز بر روی درصد تولید جنین سوماتیکی در برخی ارقام انگور.

ارقام	غلظت‌های ساکاروز (گرم در لیتر)			
	۲۰	۳۰	۴۵	۶۰
یاقوتی	۱/۶۷^{ef}	۴/۰۰^{bcd}	۱۱/۰۰^{a}	۴/۶۷^{bc}
بیدانه سفید	۰^{f}	۲/۶۷^{cde}	۵/۶۷^{b}	۳/۳۴^{cde}
شاهرودی	۰^{f}	۲/۰۰^{de}	۴/۰۰^{bcd}	۴/۶۷^{bc}

*حروف متفاوت در کلیه ستون‌ها و ردیف‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۱درصد می‌باشد. زمانی که بیشتر جنین‌ها در مرحله کروی بودند درصد تولید جنین سوماتیکی محاسبه گردید.

اکثر جنین‌های سوماتیکی در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP گیاهچه تولید نمودند (شکل ۳- ج).

بحث

در این پژوهش جنین سوماتیکی از ریزنمونه برگ در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش اثر مثبت افزودن کازئین هیدرولایزات به محیط کشت جهت تمایز جنین سوماتیکی در انگور مشخص شد، به‌طوری‌که با افزودن کازئین هیدرولایزات به محیط کشت، افزایش در تولید جنین سوماتیکی مشاهده شد که مطابق با یافته‌های مارو و همکاران (۱۹۸۶) می‌باشد. پاسخ به غلظت‌های مختلف کازئین هیدرولایزات جهت تولید جنین سوماتیکی در این پژوهش به ارقام بستگی داشت، به‌طوری‌که رقم شاهرودی در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر و ارقام یاقوتی و بیدانه سفید در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تولید جنین سوماتیکی را داشتند. در پژوهش‌هایی که در مورد گیاه نیشکر، فی‌جوآ و گوآوآ انجام شده بود (لیریو و همکاران، ۲۰۰۱؛ مانوج و همکاران، ۲۰۰۹ و نیوس و همکاران، ۲۰۰۸)، اثر مثبت افزودن اسیدآمینه به محیط کشت مشخص شده بود. در این پژوهش نیز با افزودن اسیدآمینه‌ها به محیط کشت افزایش در تولید جنین سوماتیکی مشاهده شد، به‌طوری‌که در محیط کشت دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل آلانین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و

Archive of SID

www.SID.ir

۵۰ میلی‌گرم در لیتر آرژنین بیشترین درصد جنین سوماتیکی تولید شد، در حالی‌که در محیط بدون اسیدآمینه کمترین جنین سوماتیکی در همه ارقام مورد مطالعه به‌دست آمد. نتایج این پژوهش بر خلاف نتایج اپان و جرج (۱۹۹۰) می‌باشد که بیان نمودند استفاده از اسیدآمینه‌ها تولید جنین سوماتیکی در گیاه ارزن را کاهش می‌دهد. توازن نیتروژن معدنی و آلی در محیط کشت یک عامل مهم در القای جنین سوماتیکی می‌باشد (اوزاوا و همکاران، ۱۹۹۶). نیتروژن موجود در اسیدآمینه‌ها در طی متابولیسم و سنتز پروتئین در مقایسه با منبع نیتروژن غیرآلی سریع‌تر وارد اسکلت کربنی می‌شود (لی، ۱۹۹۳). بنابراین اثر مثبت افزودن اسیدآمینه بر روی تولید جنین سوماتیکی احتمالا به‌دلیل کاهش استفاده از منابع نیتروژن غیرآلی موجود در محیط کشت، و استفاده کالوس از اسیدآمینه‌ها می‌باشد. همچنین در این پژوهش با افزایش غلظت اسیدآمینه آرژنین به ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، کاهش در تولید جنین سوماتیکی نسبت به غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ایجاد نمود. نقش ساکاروز در محیط کشت بیشتر به‌عنوان تامین‌کننده منابع کربنی موردنیاز برای رشد در شرایطی که فتوسنتز انجام نمی‌شود، می‌باشد و همچنین به‌عنوان ماده‌ای که باعث افزایش فشار اسمزی می‌شود، بیان شده است. در بیشتر پژوهش‌های مربوط به تولید جنین سوماتیکی در انگور از غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز استفاده شده است، در این پژوهش مشخص شد که ارقام یاقوتی و بیدانه سفید در غلظت ۴۵ گرم در لیتر ساکاروز جنین سوماتیکی بیشتری را تولید کردند، در حالی‌که رقم شاهرودی در غلظت ۶۰ گرم در لیتر بیشترین جنین سوماتیکی را ایجاد کرد. این تفاوت ممکن است در نتیجه متفاوت بودن شرایط فیزیولوژیکی رقم شاهرودی با دیگر ارقام باشد. نتایج این پژوهش نظریه ادوین و همکاران، (۲۰۰۸) را که افزایش غلظت ساکاروز تولید جنین سوماتیکی را افزایش می‌دهد، تایید می‌کند. همچنین در غلظت ۲۰ گرم در لیتر ساکاروز در ارقام مورد مطالعه حالت آبکی شدن کالوس اتفاق افتاد که احتمالا به‌دلیل کاهش فشار اسمزی محیط کشت و جذب آب زیاد توسط کالوس باشد، به‌طوری‌که در ارقام بیدانه سفید و شاهرودی جنینی در این غلظت ساکاروز مشاهده نشد و فقط رقم یاقوتی با درصد بسیار کم جنین تولید کرد، که احتمالا به‌دلیل قابلیت بالای این رقم برای تولید جنین سوماتیکی می‌باشد. در نهایت این پژوهش پروتکل مؤثری را برای افزایش بازدهی تولید جنین سوماتیکی از ریزنمونه برگ در ارقام بیدانه سفید، یاقوتی و شاهرودی بیان می‌کند، که می‌تواند جهت اهداف انتقال ژن، بررسی تنوع سوماکلونال و سایر موارد استفاده شود. با این‌حال بررسی‌های بیشتر در مورد امکان تولید جنین

Archive of SID

www.SID.ir

سوماتیکی در سایر ارقام انگور، همچنین بررسی اثر افزودن سایر ترکیبات به محیط کشت، به‌منظور بالا بردن بازدهی از این ریزنمونه می‌تواند راندمان کار را افزایش دهد.

منابع

1.Carimi, F., Barizza, E., and Gardiman, M. 2005. Somatic embryogenesis from stigma and styles of grapevine. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 41: 249–252.

2.Das, D.K., Reddy, M.K., Upadhyaya, C., and Sopory, S.K. 2002. An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). Plant Cell Rep. 20: 999-1005.

3.Eapen, S., and George, L. 1990. Influence of phytohormones, carbohaydrates, aminoacids, growth supplements and antibiotic on somatic embryogenesis and plant differentiation in finger millet. Plant Cell. Tissue. Organ Cult. 22: 87-93.

4.Edwin, F.G., Michael, A.H., and Geert, J.D. 2008. Plant propagation by tissue culture. Springer, London, 504p.

5.Francisco, R., Rafael, R.H., and Victor, M. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tissue Organ Cult. 86: 285-301.

6.Franks, T., Botta, R.M., and Thomas, R. 2002. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. Theo Appl Genet. 104: 397-404.

7.Gambino, G., Bondaz, J., and Gribaudo, I. 2006. Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlet of grapevine. Eur J Plant Pathol. 114: 397-404.

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

9.Gresshoff, P.M., and Doy, C.H. 1974. Derivation of haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of miotic development of anther for haploid culture of this and other genera. ZPflanzenphysiol. 73: 123-141.

10.Gribaubo, I., Gambino, G., and Vallania, R. 2004. Somatic embryogenesis from grapevine anther: identification of the optimal developmental stage for collecting explants. Am. J. Enol. Vitic. 55: 427-430.

11.Jeannin, G., Bronner, R., and Hahne, G. 1995. Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annus* L.) cultivated in vitro: role of suger. Plant Cell Rep. 15, 200- 204.

12.Lea, P.J., 1993. Nitrogen metabolism. In: Lea., P.J, Leegood RC (eds). Plant biochemistry and molecular biology. Wiley, New York, Pp: 155-180.

13.Lirio, L., Dal, V., and Miguel, P.G. 2001. The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue. Organ Cult. 64: 19-25.

Archive of SID

www.SID.ir

14. Lopez-perez, A.J., Carreno, J., Martinez, A., and Dabauza, M. 2005. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. Vitis. 44: 79-85.
15. Maillot, P., Kieffer, F., and Walter, B. 2006. Somatic embryogenesis from stem nodal sections of grapevine. Vitis. 45: 185-189.
16. Manoj, K., Jaiswal, V.S., and Jaiswal, U. 2009. Effect of selected amino acids and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). Sci Hort. 121: 233-236.
17. Martinelly, L., Bragana, P., Poletti, V., and Scienza, A. 1993. Somatic embryogenesis from leaf and petiole-derived callus of *Vitis rupestris*. Plant Cell Rep. 12: 207-210.
18. Mauro, M. cl., Nef, C., and Fallot, J. 1986. Simulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. Plant Cell Rep. 5: 377-380.
19. Mullins, M.G., and Srinivasan, C. 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv Cabernet Sauvignon) by apomoxis in vitro. J Exp Bot. 27: 1002-1030.
20. Nidez, R.P., 1994. Growth of embryogenic sweet orange callus on media varing in the ratio of nitrate to ammonium nitrogen. Plant Cell Tissue Organ Cult. 39: 1-5.
21. Nieves, N., Sagarra, F., Gonzalez, R., Lezcano, Y., Cid, M., Blanco, M.A., and Castillo, R. 2008. Effect of exogenous arginine on sugarcane (*Saccharum* sp.) somatic embryogenesis, free polyamines and the contents of the soluble proteins and proline. Plant Cell Tiss Organ Cult. 95: 313-320.
22. Olahe, R., Aniko, Z., Andrezej, P., Sussane, H., Laszlo, G., and kovacs, G. 2009. Somatic embryogenesis in broad spectrum of grapevine genotypes. Sci Hort. 120: 134-137.
23. Ozawa, K., Ling, D.H., and Komamine, A. 1996. High-frequency somatic embryogenesis from small suspension-cultured cluster of cells of an interspecific hibryd of Oryza. Plant Cell Tissue Organ Cult. 64: 157-159.
24. Ravindra, B.M., and Johannes, V. 2005. Role of antioxidants and amino acids on somatic embryogenesis of *Pinus patula*. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 41: 181-186.
25. Salunkhe, C.K., Rao, P.S., and Mhatre M. 1997. Induction of somatic embryogenesis and plantlets in tendrils of *Vitis vinifera* L. Plant Cell Rep. 17: 65-7.
26. Scorza, R., Cordts, J.M., Ramming, D.W., and Emershad, R.L. 1995. ransformation of grape (*Vitis vinifera*) zygotic-derived somatic embryos and regenerationof transgenic plants. Plant Cell Rep. 14: 589-592.
27. Vidal, J.R., Rama, J., Taboada, L., Martin, C., Ibanez. M., Segura, A., and Gonzales- Benito, E. 2009. Improved somatic embryogenesis of grapevine (*vitis vinifera*) with a focus on induction parameters and efficient plant regeneration. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 96: 85-94.

Archive of SID

www.SID.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Plant Production, Vol. 20 (1), 2013
http://jopp.gau.ac.ir

Effect of different concentrations of sucrose, casein hydrolysate and amino acids on somatic embryogenesis in some grapevine (*Vitis vinifera*) cultivars

***A.J. Mahmood[1], A. Ebadi[2], M. Omidi[3] and M. Masoodi[4]**
[1]Ms.c Student, Dept. of Horticultural, University of Tehran, [2]Assosiate Prof., Dept. of Horticultural University of Tehran, [3]Prof. Dept. of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, [4]Instructor, Science of Prdis, University of Tehran

Abstract

Leaf explants of grapevine cultivars Shahroodi, Bidaneh Sefid and Yaghouti were cultured in MS medium supplemented with 1mg/l BAP and 0.1mg/l 2,4-D for callus induction. To differentiate somatic embryo, achieved callus were cultured on MS medium contained various concentrations of sucrose, casein hydrolysate and supplemented with glutamine, phenyl alanine and arginine amino acids. Yaghouti and Bidaneh Sefid cultivars produced the highest percentage of somatic embryos in medium containing 250mg/l casein hydrolysate and Shahroodi in medium contained 500mg/l casein hydrolysate. On the other hand, in all studied cultivars the highest percentage of somatic embryos was obtained in medium contained 10mg/l phenyl alanine, 100mg/l glutamine and 50mg/l arginine. Although, Yaghouti and Bidaneh Sefid cultivars were produced the highest percentage of somatic embryos in medium contained 45g/l sucrose, Shahroodi cultivar produced the highest percentage of somatic embryos in medium contained 60g/l sucrose.

Keywords: Grapevine; Somatic embryogenesis; Medium; Sucrose; Amino acids

*Corresponding Author; Email: jamalmahmood.amir@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir