مجله علوم كشاورزي ايران
جلد ۳۷، شماره ۲، سال ۱۳۸۵ (۲۱۵-۲۰۵)

بررسي كشت درون شيشه اي دو رقم انگور ايراني و تعيين شرايط مناسب جهت كشت مريستم آنها

سپيده كلاته جاري[۱], علي عبادي[۲], ذبيح‌اله زماني[۳] و منصور اميدي[٤]
۱, ۲, ۳, ٤, دانشجوي سابق كارشناسي ارشد و دانشياران پرديس كشاورزي و منابع طبيعي دانشگاه تهران
تاريخ پذيرش مقاله ۸٤/۹/۲

خلاصه

دستيابي به روشهاي كشت درون شيشه‌اي جهت تكثير گياه مو، اولين قدم در بكارگيري تكنولوژي‌هاي زيستي براي اصلاح و عاري سازي اين گياه از عوامل بيماريزا مي‌باشد. در اين راستا تحقيقي در طي سالهاي ۸۲-۱۳۸۱ بر روي دو رقم انگور معروف ايراني بي‌دانه سفيد (بي‌دانه) و شاهرودي (دانه‌دار)، در آزمايشگاههاي گروه علوم باغباني دانشكده كشاورزي دانشگاه تهران انجام شد. به منظور استقرار درون شيشه‌اي ريزنمونه‌ها، آزمايشي شامل بررسي اثر زمان نمونه‌گيري طي فصل تابستان، نوع محيط كشت (**1/2MS, MS** و **WPM**) و نوع ريزنمونه بر روي صفاتي مانند تعداد و طول شاخساره، وضعيت برگ و اندازه كالوس انجام شد. نتايج نشان داد كه مناسبترين زمان نمونه‌گيري شهريور ماه، بهترين محيط كشت **MS** و مطلوبترين ريزنمونه‌ها قسمتهاي مياني و پاييني شاخساره در هر دو رقم مي باشند. در مرحله پرآوري، ابتدا اثر غلظتهاي مختلف هورمونهاي **BA** و **IBA** در محيط كشت **MS**، بر صفاتي چون تعداد، طول شاخساره و كيفيت آن بررسي شد. تيمار هورموني **BA** با غلظت يك ميلي گرم در ليتر در ارقام بيدانه سفيد و شاهرودي بهترين نتايج را در مرحله پرآوري نشان داد. در مرحله ريشه زايي، ريز قلمه‌ها در محيط كشت **MS** با نصف غلظت عناصر غذايي پرمصرف همراه با غلظت هاي مختلف هورمون **IBA** و شاهد بدون هورمون قرار گرفتند. تيمار ۰/۰۵ ميلي گرم در ليتر **IBA** و شاهد بهترين نتايج را بر درصد ريشه زايي، تعداد و طول ريشه در ريز قلمه‌ها در هر دو رقم ايجاد نمودند. مرحله سازگاري با انتقال گياهچه‌ها به گلخانه، استفاده از بستر كشت پيت و پرليت با نسبت ۱:۱ و تغذيه گياهچه‌ها با عناصر غذايي رقيق شده محيط كشت **MS** انجام شد. پس از يكماه، درصد موفقيت گياهچه‌هاي سازگار با شرايط محيطي در رقم بيدانه سفيد ۸۵% و رقم شاهرودي۸۰% بود. پس از تعيين بهترين شرايط كشت درون شيشه‌اي دو رقم انگور، كشت مريستم انتهايي در محيط كشت **MS** همراه با غلظتهاي مختلفي از **BA** و **IBA** انجام شد. مريستمها در تيمارهاي هورموني ۰/5 ميلي گرم در ليتر **BA** در رقم بيدانه سفيد و ۱ ميلي گرم در ليتر **BA**در رقم شاهرودي بخوبي رشد يافتند.

واژه‌هاي كليدي: كشت بافت، انگور، كشت مريستم.

مقدمه

توليد گياهان عاري از بيماريهاي ويروسي و شبه ويروسي كه موجب كاهش توليد و كيفيت محصول مي‌شوند در افزايش عملكرد و كيفيت محصولات مختلف بسيار مورد توجه است. با توجه به اينكه در حال حاضر در تاكستان‌ها هيچ روش شيميايي موثر براي كنترل بيماريهاي باكتريايي يا ويروسي وجود ندارد و اين گياه اغلب با روشهاي رويشي تكثير مي شود و بيماريهاي ويروسي نيز براحتي با روش تكثير رويشي به گياهان جديد

مكاتبه كننده: سپيده كلاته‌جاري
E-mail:kalatejari@yahoo.com

منتقل مي شوند، به نظر مي‌رسد تهيه گياهان مادري سالم از طريق كشت مريستم، مؤثرترين روش براي ازدياد اين گياه باشد (۸، ۱۰، ۲٤). با استفاده از اين روش مي توان از گياهان مادري آلوده به بيماريهاي ويروسي گياهان سالم توليد كرد، بنابراين براي ايجاد تاكستانهاي سالم و عاري از بيماريهاي ويروسي كه سبب كاهش كيفيت و كميت محصول مي شوند، اين روش ازدياد بسيار مناسب است (۱۳،۱۲، ۱۸). استفاده از كشت بافت به منظور حذف ويروس‌ها براي اولين بار در دهه ۱۹٦۰ انجام شد و اكنون به عنوان يك روش استاندارد در برنامه‌هاي سالم‌سازي گياهان مادري استفاده مي‌شود. اولين گام كاربرد كشت بافت براي توسعه كشت انگور، دستيابي به روشهايي با راندمان بالا براي تكثير يا باززايي گياه در شرايط درون شيشه‌اي است (۱۸، ۲۰).

در مورد كشت درون شيشه اي ارقام انگور ايراني گزارش چنداني در دسترس نمي باشد، لذا اين تحقيق با هدف تعيين شرايط بهينه براي كشت درون شيشه اي مو و در نهايت كشت مريستم آنها، روي دو رقم مهم از انگورهاي ايراني، ارقام بيدانه سفيد و شاهرودي، انجام شد. رقم بيدانه سفيد براي تازه خوري و تهيه كشمش مصرف مي شود و انگور شاهرودي عمدتا مصرف تازه خوري دارد. اين دو رقم انگور داراي سطح زير كشت و مصرف بالايي در ايران هستند اما آمار دقيقي در اين رابطه وجود ندارد.

مواد و روش‌ها

اين تحقيق طي سالهاي ۱۳۸۱ و ۱۳۸۲ بر روي تكثير درون شيشه اي دو رقم انگور ايراني بيدانه سفيد و شاهرودي انجام شد. ريزنمونه‌ها از گياهان بالغ در كلكسيون انگور مركز تحقيقات باغباني دانشكده كشاورزي دانشگاه تهران تهيه گرديد. مراحل مختلف تحقيق عبارت بودند از:

۱- مرحله استقرار ۲- مرحله پرآوري شاخساره ها ۳- مرحله ريشه زايي شاخساره ها ٤- مرحله سازگاري گياهچه ها ۵- مرحله كشت مريستم.

در مرحله استقرار، نمونه گيري از دو رقم انگور در تابستان سال ۸۱ در ٦ تاريخ مختلف شامل ۵ تير، ۲۵ تير، ۱۵ مرداد، ۵ شهريور، ۲۰ شهريور و ۳۰ شهريور ماه سال۸۱ در ساعات اوليه صبح از قسمتهاي بالايي شاخساره ها (قطر گره تا ۳ ميليمتر) و قسمتهاي پاييني آنها (قطر گره بيشتر از ۳ ميليمتر) انجام شد و ريز نمونه ها بعد از شستشو با آب و ضد عفوني سطحي با الكل اتيليک ۷۰% بمدت ۳۰ ثانيه و سپس كلريد جيوه ۰/۱% بمدت ۳ دقيقه و در نهايت ۳ مرتبه آبشويي با فواصل ۵، ۱۰ و ۱۵ دقيقه با آب مقطر استريل، به قطعات تک گره تقسيم شده و در نهايت در محيطهاي كشت الف: موراشيگ و اسكوگ[1] (MS)، ب: موراشيگ و اسكوگ با نصف غلظت عناصر پر مصرف و ج: محيط كشت حاوي نمكهاي پر مصرف WPM[2] همراه با عناصر كم مصرف و ويتامين هاي محيط كشت MS قرار گرفتند. در هر سه محيط كشت يک ميلي گرم در ليتر بنزيل آدنين[3] (BA) و ۰/۵ ميلي گرم در ليتر ايندول بوتيريک اسيد[4] (IBA)، ۳۰ گرم در ليتر ساكارز و ۷ گرم در ليتر آگار استفاده شد. پس از۳۰ روز از كشت صفات زير ارزيابي و يادداشت شدند: ميزان تشكيل پينه[5] در بن ريزنمونه ها بصورت نمره دهي از ۱ تا ۵، تعداد شاخساره توليد شده، طول شاخساره به سانتيمتر، وضعيت برگها از نظر رشد و سلامتي بصورت نمره دهي از يک (ضعيف) تا چهار (عالي). در اين مرحله، از آزمايش فاكتوريل در قالب طرح كاملا تصادفي با چهار فاكتور زمان كشت، محيط كشت، قطر گره و رقم استفاده شد.

در مرحله پرآوري، شاخساره هاي حاصل از مرحله استقرار در محيط كشت MS حاوي ۳۰ گرم در ليتر ساكارز، ٦/۵ گرم در ليتر آگار و BA با غلظت هاي ۰/۵، ۱ و ۲ ميلي گرم در ليتر بدون IBA يا همراه با ۰/۵ ميلي گرم در ليتر IBA استفاده شد. پس از۳۰ روز از كشت شاخساره ها صفات تعداد شاخساره در هر ريز نمونه و طول شاخساره به سانتي متر اندازه‌گيري و كيفيت شاخساره بصورت نمره دهي از يک (ضعيف) تا پنج (عالي) ارزيابي شدند.

1. Murashige & Skoog
2. Woody Plant Medium
3. Benzyladenine
4. Indole Butyric Acid
5. Callus

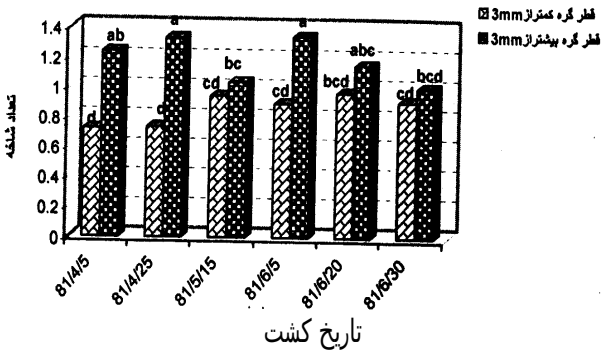
در مرحله ريشه زايي، شاخساره هاي حاصل از مرحله پرآوري در محيط کشت MS با نصف غلظت نمکهاي پرمصرف، ۲۰ گرم در ليتر ساکارز، ٦/٥ گرم در ليتر آگار و IBA با غلظتهاي ۰/۰٥ و ۰/٥ ميلي گرم در ليتر و شاهد بدون اکسين کشت شدند. پس از ۱۳ و ۲۸ روز از کشت در محيط ريشه زايي صفات تعداد شاخساره ريشه دار، تعداد و طول ريشه در هر شاخساره و تشکيل کالوس در بن شاخساره ها ارزيابي شدند.

در مرحله سازگاري گياهچه هاي ريشه دار به گلخانه منتقل شده و در گلدان هاي حاوي مخلوط پيت[1] و پرليت[2] به نسبت ۱:۱ قرار گرفتند و بر روي آنها درپوش پلاستيکي شفاف قرار داده شد. آبياري گلدانها در هفته اول با محلول يک دهم غلظت نمکهاي MS و سپس با محلول يک پنجم آن انجام گرفت. در پوش هاي شفاف به مرور برداشته و گياهان با شرايط محيط گلخانه سازگار شدند. پس از انجام آزمايشات مقدماتي جهت بهينه کردن شرايط کشت بافت اين دو رقم انگور، مريستم هاي انتهايي، که از قسمت گنبدي شکل و يک يا دو پريموردياي برگي تشکيل شده بودند، در زير بينوکولر جدا و در محيط کشت MS همراه با ۳۰ گرم در ليتر ساکارز ، ٦ گرم در ليتر آگار و غلظت هاي متفاوتي از IBA و BA قرار گرفتند. ترکيب هاي هورموني در رقم بيدانه سفيد ۰/۲٥ و ۰/٥ ميلي گرم در ليتر BA به تنهايي و ۰/۲٥ ميلي گرم در ليتر BA همراه با ۰/۱ ميلي گرم در ليتر IBA و در رقم شاهرودي ۰/٥ و ۱ ميلي گرم در ليتر BA به تنهايي و ۰/٥ ميلي گرم در ليتر BA همراه با ۰/۱ ميلي گرم در ليتر IBA بود. يکماه پس از کشت، وضعيت رشد مريستم ها بصورت تعداد مريستم هاي رشد يافته در هر تيمار و ميزان رشد مريستم ها بر اساس نمره دهي از يک تا چهار ارزيابي شدند که شماره چهار بيشترين رشد را شامل مي شد. ريز نمونه ها در همه مراحل آزمايش در اتاقک رشد با فتوپريود ١٦ ساعت روشنايي با استفاده از لامپ هاي فلورسنت سفيد با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس[3] و دماي ۲۸ درجه سانتيگراد در روز و ۲۲ درجه در شب قرار گرفتند. در آزمايشات مراحل پرآوري و ريشه زايي از طرح کاملا تصادفي استفاده شد. در کليه آزمايشها تعداد تکرارها حداقل ٥ تکرار و هر تکرار شامل ۳ ريزنمونه بود. مقايسه ميانگين ها با آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ٥% و ۱% با استفاده از نرم افزارهاي آماري SAS و MSTATC انجام شد. در مواردي که توزيع داده ها نرمال نبود از تبديل داده ها استفاده شد.

نتايج و بحث

مرحله استقرار

بيشترين تعداد شاخساره از گره هاي با قطر بيشتر از ۳ ميليمتر در تاريخهاي کشت ۲٥ تير و ٥ شهريور (بترتيب ۱/۳۳ و ۱/۳٤) و کمترين تعداد شاخساره از گره هاي با قطر کمتر از ۳ ميليمتر در تاريخهاي کشت ٥ و ۲٥ تيرماه بدست آمد (شکل ۱). همچنين بيشترين تعداد شاخساره در گره هاي با قطر بيشتر از ۳ ميليمتر در رقم بيدانه سفيد و محيط کشت MS بدست آمد (۱/٤) که با نتايج رقم بيدانه سفيد در محيط کشت WPM و قطر مشابه (۱/۳۳) و رقم شاهرودي در محيط کشت MS و همين قطر (۱/۳٤) اختلاف معني داري نداشت. کمترين تعداد شاخساره در رقم بيدانه سفيد و محيط کشت WPM و گره هاي با قطر کمتر از ۳ ميليمتر ايجاد شد (شکل۲).

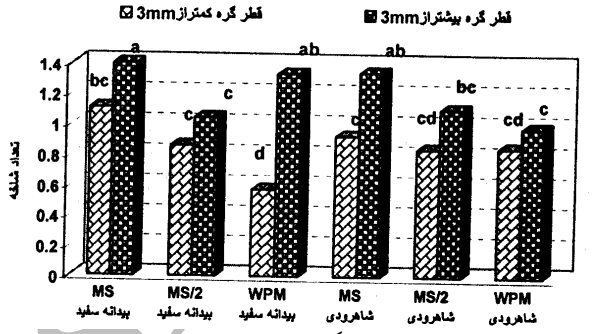


شکل ۱- اثر متقابل تاريخ کشت و قطر گره بر تعداد شاخه در مرحله استقرار

رقم شاهرودي شاخساره‌هاي بلندتري (۱/۷ سانتيمتر) نسبت به رقم بيدانه سفيد (۱/۳ سانتيمتر) توليد کرد. گره‌هاي با قطر بيشتر از ۳ ميليمتر در محيط کشت MS و در تاريخ ٥

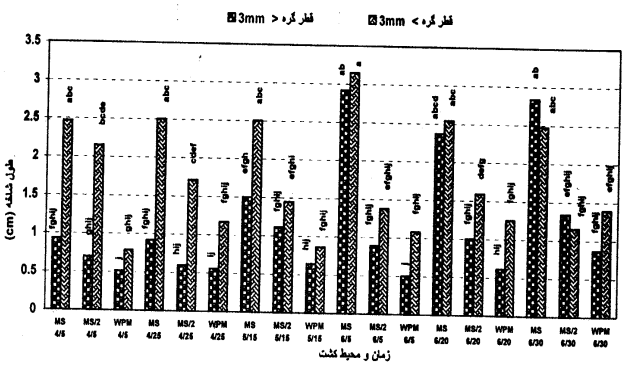
1. Peat
2. Perlite
3. Lux

شهريور بلندترين شاخساره ها را توليد كردند (۳/۱۵ سانتيمتر) و كوتاهترين شاخساره ها در گره هاي با قطر كمتر از ۳ ميليمتر و محيط كشت WPM و در كليه تاريخهاي كشت مشاهده شدند (شكل ۳).



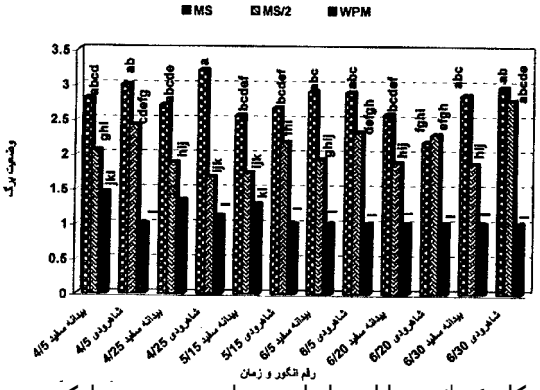
رقم انگور و محيط كشت

شكل ۲- اثر متقابل قطر گره و نوع محيط كشت در مرحله استقرار بر تعداد شاخه دو رقم انگور



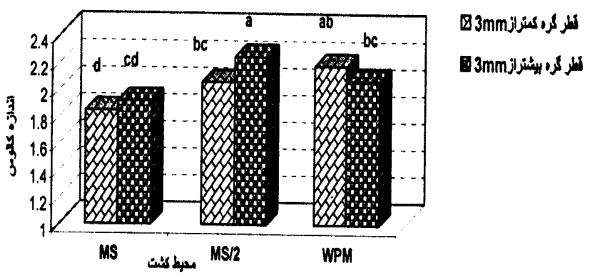
شكل ۳- اثر متقابل قطر ريزنمونه، زمانهاي مختلف و نوع محيط كشت در مرحله استقرار بر روي طول شاخه

قطر گره اثر معني داري را بر وضعيت برگهاي ريزنمونه ها نشان داد. در گره هاي با قطر بيشتر از ۳ ميليمتر، جوانه ها برگهاي مطلوبتري (ميانگين نمره ۲/٤) نسبت به گره هاي با قطر كمتر از ۳ ميليمتر (ميانگين نمره ۱/۱) توليد كردند. در رقم شاهرودي در تاريخ كشت ۲۵ تيرماه و محيط كشت MS، برگهايي با بهترين وضعيت (ميانگين نمره۳/۲۱) ايجاد شدند كه با نتايج حاصل از همين محيط كشت و هر دو رقم مورد آزمايش درتاريخهاي كشت ۵ تير و ۳۰ شهريور اختلاف معني داري نداشتند. نامطلوبترين وضعيت برگها در محيط كشت WPM در هر دو رقم بيدانه سفيد و شاهرودي و در بيشتر تاريخهاي كشت مشاهده شدند (شكل ٤).

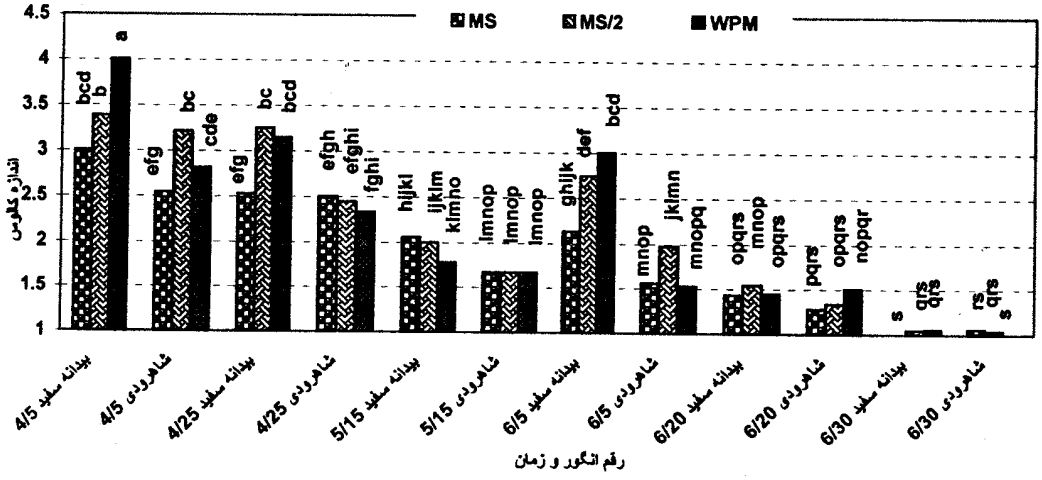


شكل ٤- اثر متقابل زمانهاي مختلف و نوع محيط كشت در مرحله استقرار بر روي وضعيت برگ دو رقم انگور

بيشترين ميزان كالوس بترتيب در محيطهاي كشت MS با نصف غلظت عناصر پرمصرف و گره هاي با قطر بيشتر از ۳ ميليمتر و نيز محيط كشت WPM و گره هاي با قطر كمتر از ۳ ميليمتر و كمترين ميزان آن در محيط كشت MS در هر دو قطر ريزنمونه مشاهده شد (شكل ۵). همچنين كمترين ميزان كالوس در تاريخ كشت ۳۰ شهريور در هر دو رقم و در هر سه محيط مورد بررسي تشكيل شد كه نشان دهنده تأثير قوي زمان بر ميزان تشكيل كالوس مي باشد (شكل ٦). بيشترين ميزان كالوس در محيط كشت WPM، رقم بيدانه سفيد و تاريخ كشت ۵ تيرماه تشكيل شد. باتوجه به اينكه هدف از مرحله استقرار، انگيزش رشد شاخساره هاي با كيفيت مطلوب در ريزنمونه ها مي باشد، تشكيل كالوس در اين مرحله بعنوان يك صفت نامطلوب تلقي مي شود. لذا ريز نمونه‌هايي كه اواخر فصل برداشت شده بودند براي كشت بافت مناسبتر بودند.



شكل ۵- اثر متقابل قطر گره و نوع محيط كشت در مرحله استقرار بر اندازه كالوس



شکل ٦- اثر متقابل زمانهاي مختلف گرفتن ريزنمونه و نوع محيط کشت در مرحله استقرار بر روي اندازه کالوس در دو رقم انگور

انتخاب محيط کشت مناسب براي استقرار ريزنمونه ها و انتخاب مخلوط نمکهاي پرمصرف و کم مصرف آن به نوع گياه مورد مطالعه بستگي دارد (۲۱). با توجه به نتايج اين آزمايش، مشاهده گرديد که ترکيب غذايي محيط کشت فاکتور مهمي در استقرار ريزنمونه ها در شرايط درون شيشه اي است زيرا محيط کشت بايد بتواند بخوبي جايگزين بافتها يا اندامهايي که گياه فاقد آن است (مثل ريشه و برگهاي بالغ در مرحله استقرار يا پرآوري) شود. آب و عناصر غذايي براي رشد و نمو گياه از محيط کشت تأمين مي شود. بنابراين وضعيت فيزيکي و شيميايي محيط کشت بايد به گونه اي باشد که به گياه اجازه جذب آب و يونها را بدهد. عناصر غذايي پايه در محيط کشت، برحسب هدف کشت بافت و گونه گياهي مورد استفاده ميتوانند متفاوت باشند (۱۹، ۲٤).

کاربرد محيط کشت MS به دليل اينکه بسياري از گياهان نسبت به آن عکس العمل مناسبي نشان مي دهند بسيار متداول است. در کشت بافت انگور نيز اين محيط کشت توسط محققان زيادي در مراحل مختلف کشت آن استفاده شده است (۵، ۱۰،۱٦). اين محيط کشت داراي غلظت بالايي از نمکها است (غلظت يوني ۹۳ ميلي مولار)، بنابراين مي‌تواند عناصر غذايي بيشتري در مقايسه با محيط کشت WPM (غلظت يوني ٤۱ ميلي مولار) و محيط کشت MS با نصف غلظت عناصر پرمصرف (غلظت يوني ٤۷ ميلي مولار) در اختيار ريزنمونه‌ها قرار دهد. با توجه به اينکه اختلاف محيط‌هاي کشت مورد استفاده در اين آزمايش فقط در غلظت عناصر پرمصرف بوده و پاسخ ريزنمونه ها در محيط کشت MS بهتر از دو محيط کشت ديگر بود، مي‌توان چنين استنباط نمود که انگور براي کشت درون شيشه‌اي به غلظت بالاتري از عناصر غذايي نيازمند است. علت رشد نامطلوب ريزنمونه ها در محيط کشت WPM پايين بودن نيتروژن اين محيط کشت نيز مي تواند باشد(۱).

نارايانا‌سوامي (۱۹۷۷) گزارش کرده است که بافتهاي گياهان که در زمان هاي مختلف فصل رشد برداشت مي شوند به دليل خصوصيات فيزيولوژيکي متفاوت، معمولا نسبت به کشت درون شيشه اي پاسخ يکساني نشان نمي دهند (۱۹). در اين آزمايش نيز ريزنمونه هايي که در اوايل شهريور ماه از تاکستان جمع آوري شدند بهترين نتيجه را براي استقرار در شرايط درون شيشه اي نشان دادند.

تورگروزا و همکاران (۲۰۰۱) گزارش دادند که درصد زنده ماندن ريزنمونه ها و پتانسيل توليد شاخساره در ريزنمونه‌هاي حاصل از جوانه هاي جانبي انگور نسبت به جوانه هاي انتهايي بيشتر است (۲٤). در تحقيقي ديگر نيز با توجه به تفاوت هاي فيزيولوژيکي و مورفولوژيکي جوانه ها، ريزنمونه هاي حاصل از قسمت مياني شاخساره‌هاي گياهان مادري (بين سومين تا دوازدهمين گره از سمت پائين شاخساره) براي کشت بافت مناسب ترتشخيص داده شدند(۱٤). در اين آزمايش نيز گره‌هاي

با قطر بيشتر از ۳ ميليمتر كه از قسمتهاي پاييني شاخساره برداشته شده بودند نسبت به گره‌هاي بالايي (قطر كمتر از ۳ ميلي متر) پاسخ بهتري به استقرار در شرايط درون شيشه اي نشان دادند كه نتايج مشابهي نيز توسط سودارسونو و گلدي (۱۹۹۱) در چند رقم انگور موسكادينه[1] گزارش شده است. اين امر احتمالاً به علت وضعيت فيزيولوژيكي خاص اين قسمت از شاخساره مي باشد. قسمتهاي انتهايي شاخساره در مو، در طول فصل رشد، بشدت در حال رشد و نمو مي باشد لذا ذخيره مواد غذايي دراين قسمت كم است، برگ كنار اين جوانه ها هنوز بالغ نشده است و جوانه كنار اين برگ نيز در حال خواب است. اين برگ بايد ابتدا كامل شود تا فرمان هورموني بيدار شدن را به جوانه بدهد. بنابراين تا وقتي كه برگ كناري جوان است، جوانه در حالت ركود است. همچنين فتوسنتز در برگهاي جوان پايين است به همين دليل جوانه ها نمي توانند قبل از تكامل برگها بميزان كافي تكامل يابند. اين وضعيت در قسمتهاي مياني و ابتدايي شاخساره كه داراي برگهاي تكامل يافته و بالغ مي باشند و جوانه ها نيز حالت ركود ندارند، نسبت به قسمتهاي انتهاي شاخساره متفاوت است.

1. Muscadine

مرحله پرآوري

در اين مرحله، شاخساره ها جهت پرآوري در محيط كشت MS، كه بهترين محيط براي استقرار هر دو رقم بيدانه سفيد و شاهرودي شناخته شد، قرار گرفتند. در هر دو رقم در بيشتر تيمارهاي هورموني تعداد شاخساره ها تفاوت معني داري نداشت (جدول ۱). در بين دو رقم مورد آزمايش، ميانگين طول شاخساره در رقم شاهرودي (۲/۳ سانتيمتر) بطور معني داري بيشتر از رقم بيدانه سفيد (۱/۸ سانتيمتر) بود.

تيمار هورموني ۰/۵ BA + ۰/۵ IBA بلندترين شاخساره ها را با ميانگين ۲/۸ cm توليد كرد كه با تيمار ۱ BA (۲/۲ cm) تفاوت معني داري نداشت ولي با ساير تيمارها تفاوت معني‌داري را نشان داد (جدول ۲) ولي اثر متقابل رقم و تيمار هورموني بر صفت طول شاخساره معني دار نشد.

جدول ۱- اثر تيمارهاي مختلف هورموني بر تعداد شاخساره و كيفيت ريزنمونه دو رقم انگور ايراني بيدانه سفيد و شاهرودي

رقم انگور	غلظتها ي مختلف هورمون (mg/L)		تعداد شاخساره	كيفيت ريزنمونه
	IBA	BA		
بيدانه سفيد	۰	۰/۵	۲/۱٦ ab	۱/۷۵ cd
	۰	۱	۲/٦۰a	۲/۰cd
	۰	۲	۱/٦۱bc	۱/۰۰e
	۰/۵	۰/۵	۲/۳۳ab	۳/۰۰b
	۰/۵	۱	۱/۸۱abc	۱/۵۱de
	۰/۵	۲	۱/۲۲c	۱/۷۷cd
شاهرودي	۰	۰/۵	۲/۰۲ ab	۲/۱۰cd
	۰	۱	۲/۲٦ab	۳/٤۰a
	۰	۲	۲/۲۵ab	۲/۳۳bc
	۰/۵	۰/۵	۱/۸٦ abc	۲/۹۳ab
	۰/۵	۱	۲/۳۰abc	۲/٦٦ab
	۰/۵	۲	۲/٤۸a	۲/۱۳cd

ميانگين هايي كه در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده اند، با يكديگر در سطح احتمال ۱% اختلاف معني داري دارند (بر اساس آزمون دانكن).

جدول ۲- اثر غلظتهاي مختلف هورمون بر طول شاخساره دو رقم انگور بيدانه سفيد و شاهرودي در مرحله پرآوري

غلظتهاي مختلف هورمون (mg/L)		طول شاخساره(cm)
IBA	BA	
۰	۰/۵	۲/۱٤b
۰	۱	۲/۲۷ab
۰	۲	۱/۷۹b
۰/۵	۰/۵	۲/۸۳a
۰/۵	۱	۲/۰۹b
۰/۵	۲	۱/۷۹b

ميانگين هايي که در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده اند، با يکديگر در سطح احتمال ۱% اختلاف معني داري دارند (بر اساس آزمون دانکن)

در اين آزمايش با افزايش غلظت سايتوکينين[1] طول شاخساره ها کاهش يافت. در تحقيقي مشابه که توسط جونا و وب[2] (۱۹۷۸) انجام شد، ريز نمونه هايي که در مرحله پرآوري در محيط کشت حاوي ۲ ميکرومولار BA قرار داشتند نسبت به محيط کشت حاوي ۱۰ ميکرومولار BA، شاخساره هاي بلندتري توليد کردند (۱۵). وجود رابطه معکوس بين طول شاخساره و غلظت سايتوکينين در پرآوري چند رقم انگور در تحقيقات متعددي مشاهده شده است (۷، ۱٦).

در تيمارهاي هورموني ۲ ميلي گرم در ليتر BA همراه يا بدون IBA در هر دو رقم بيدانه سفيد و شاهرودي، عارضه نامطلوب شيشه اي شدن[3] ريز نمونه ها مشاهده شد. اين ريزنمونه ها براي مراحل بعدي کشت بافت قابل استفاده نبوده و سريع از بين رفتند بنابراين غلظت هورموني ۲ ميلي گرم در ليتر BA براي پرآوري هر دو رقم نامطلوب بود. عارضه نامطلوب شيشه اي شدن در مراحل مختلف کشت بافت انگور در غلظت‌هاي بالاي سايتوکينين توسط محققان ديگر نيز گزارش شده است (۲، ۱٤). براي انجام پرآوري مطلوب و کاهش عارضه شيشه‌اي شدن، در ارقام انگور، کاهش غلظت BA (تا يك ميلي گرم در ليتر) در محيط کشت گزارش شده است و همچنين مشاهده شده است که BA در غلظتهاي پائين تر، اثر مثبت بيشتري روي کيفيت ريزنمونه‌هاي انگور دارد (۱۲، ۱٤). در اين آزمايش نيز در غلظتهاي پائين تر BA، شاخساره‌هاي مناسب تري نسبت به غلظتهاي بالاتر آن (۲ ميلي گرم در ليتر) توليد شدند.

مطلوبترين شاخساره ها در رقم شاهرودي در تيمار هورموني BA ۱ (با ميانگين ۳/٤) ايجاد شد که با تيمارهاي BA ۰/۵ + IBA ۰/۵ و BA ۱ + IBA ۰/۵ تفاوت معني داري نداشت. همچنين در رقم بيدانه سفيد مطلوب ترين شاخساره ها در تيمارهاي BA ۰/۵ + IBA ۰/۵ (با ميانگين ۳) و سپس BA ۱ بدون IBA (با ميانگين ۲) مشاهده شدند. نامناسبترين شاخساره ها در رقم بيدانه سفيد در غلظت هورموني BA ۲ بدون IBA (با ميانگين۱) مشاهده شدند (جدول ۱).

دراين آزمايش تيمار هاي هورموني IBA ۰/۵ + BA ۰/۵ و BA ۱ (ميلي گرم در ليتر) بهترين نتيجه را در پرآوري هر دو رقم ايجاد کردند ولي به دليل تشکيل کالوس در بن بعضي از شاخساره هاي ايجاد شده در تيمار هورموني IBA ۰/۵ + BA ۰/۵ و احتمال انگيزش شاخساره نابجا از روي کالوس، ترکيب هورموني فوق براي پرآوري شاخساره‌هاي مناسب نبود در حاليکه تيمار BA ۱ ضمن پرآوري مطلوب منجر به تشکيل کالوس نشد و براي پرآوري اين ارقام مناسب تر بود. ريزنمونه‌ها در هر دو رقم بيدانه سفيد و شاهرودي سه‌بار در محيط کشت MS حاوي ۱ ميلي‌گرم در ليتر BA واکشت شدند و تعداد شاخساره‌هاي توليد شده از هر تك شاخساره بعد از ۳ کشت، در رقم بيدانه سفيد ۱۵ شاخساره و در رقم شاهرودي ۹ شاخساره (طول بيشتر از 1cm) بود. محققان ديگري نيز تشکيل کالوس را در قسمت بن شاخساره هاي حاصل از پرآوري انگور در نتيجه کاربرد همزمان اکسين[4] و سايتوکينين، به دليل نقش اکسين در

1. Cytokinine
2. Jona & webb
3. Vitrification
4. Auxin

انگيزش كالوس ، گزارش دادند و تركيب اين دو هورمون را در پرآوري انگور به دليل ايجاد شاخساره هاي نابجا نامناسب دانستند (۱۹ ،۲۰ و ۲۵). البته اثر مثبت كاربرد اكسين همراه با سايتوكينين در پرآوري ارقام مختلف انگور نيز توسط تعدادي از محققان گزارش شده است. اثر مثبت كاربرد اين دو هورمون همراه با هم به علت تحريک تقسيم سلولي و تشكيل شاخساره هاي جديد از طريق كم كردن خاصيت غلبه انتهايي توسط سايتوكينين و بلند شدن طول شاخساره ها بعلت اثر اكسين بيان شده است (٦ ،۱۷ و ۲۱). در اين آزمايش نيز با كاربرد توام اين دو هورمون پرآوري مطلوبي بدست آمد ولي به دليل تشكيل كالوس در بن شاخساره ها از آن صرفنظر شد.

مرحله ريشه زايي

در ارزيابي ريشه زايي، ۲۸ روز بعداز قرار گرفتن ريزنمونه ها در محيط ريشه زايي، درصد شاخساره هاي ريشه دار در سه تيمار هورموني بدون اكسين (شاهد)، IBA ۰/۰۵ و IBA ۰/۵ (ميلي گرم در ليتر) در رقم بيدانه سفيد ۱۰۰% و در رقم شاهرودي بترتيب ۹۰%، ۹۰% و ۱۰۰% بود. شاخساره‌ها در رقم بيدانه سفيد زودتر ريشه زايي را آغاز كردند بطوريكه در روزهاي اوليه قرار گرفتن شاخساره‌ها در محيط ريشه‌زايي، در رقم بيدانه سفيد نسبت به رقم شاهرودي در هر سه تيمار مورد آزمايش، درصد بيشتري شاخساره ريشه‌دار مشاهده شد.

تعداد ريشه ها در هنگام ارزيابي ۲۸ روز بعد از قرار گرفتن در محيط ريشه زايي تفاوت معني داري را در تيمارهاي هورموني مورد آزمايش در سطح ۵% نشان داد، بطوريكه تيمار هورموني IBA ۰/۵ با ۳/٤ ريشه بيشترين تعداد ريشه را نسبت به شاهد (۲/۳) و تيمار IBA ۰/۰۵ (۲/۲) در هر ريزنمونه توليد كرد. طول ريشه ها در ارزيابي ۱۳ روز بعد از قرار گرفتن در محيط ريشه زايي ، در تيمار بدون اكسين و تيمار IBA ۰/۰۵ بترتيب با ۱/۱۰ و ۱/۲۸ سانتيمتر بطور معني داري بلندتر از تيمار IBA ۰/۵ (ميلي گرم در ليتر) با ميانگين ۰/٦۰ سانتيمتر بودند كه تفاوت در سطح ۱% معني دار بود. باتوجه به نتايج آزمايش، طول ريشه ها با افزايش زمان قرار گرفتن ريزقلمه ها در محيط كشت بتدريج افزايش يافت. رقم بيدانه سفيد ريشه‌هاي بلندتري نسبت به رقم شاهرودي ايجاد كرد ولي تعداد ريشه هاي دو رقم تفاوت معني داري نشان ندادند (جدول ۳).

جدول ۳- اثر رقم بر روي طول ريشه ۱۳ و ۲۸ روز بعد از قرار گرفتن شاخساره ها در محيط ريشه زايي

رقم انگور	طول ريشه (cm)	
	روز ۱۳	روز۲۸
بيدانه سفيد	۱/۲۹a	۸/۸٤a
شاهرودي	۰/۷۰b	٦/۰۳b

ميانگين هايي كه در هر ستون با حروف مختلف مشخص شده اند، در سطح احتمال ۱% اختلاف معني داري دارند (بر اساس آزمون دانكن).

بيست و هشت روز پس از قرار گرفتن ريزنمونه ها در محيط كشت ريشه زايي، تشكيل يا عدم تشكيل كالوس در قسمت بن ريزنمونه‌ها، در محلي كه ريشه‌ها از ساقه خارج مي‌شوند، ارزيابي شد. نتايج حاصل بصورت درصد ريشه‌هاي خارج شده از روي كالوس گزارش شد. در رقم شاهرودي در سه تيمار هورموني بدون اكسين، IBA ۰/۰۵ و IBA ۰/۵ (ميلي گرم در ليتر) درصد ريشه‌هاي خارج شده از روي كالوس بترتيب، ۲۵%، ٦۵% و ۸۰% ديده شد. در رقم بيدانه سفيد، درصد ريشه هاي مذكور بترتيب، ۱۵%، ٤۵% و ٦۰% مشاهده شد. كمترين درصد تشكيل كالوس در گياهچه ها در محيط كشت بدون اكسين مشاهده شد و همراه با افزايش غلظت اكسين درصد گياهچه‌هايي كه كالوس تشكيل دادند نيز افزايش يافت.

خصوصيات ژنتيكي و وضعيت فيزيولوژيكي گياه مادري و ريزنمونه حاصل در مرحله ريشه زايي فاكتورهاي مهمي هستند كه اثر متقابل با هورمونها و شرايط محيطي (نور و دما) ايجاد مي كنند(۱۳). همچنين اكسينها بطور معمول در طي مراحل مختلف تشكيل ريشه استفاده شده و مقدار ، نوع ، زمان و غلظت اكسين بر ريشه زايي مؤثراست (۳). در تحقيقي روي ريشه زايي چند رقم انگور ، تمام ريزشاخساره‌ها در ارقام انگور كبنه فرانک[1] وكبنه سووينون[2] به راحتي در محيط كشت فاقد

1. Cabernet franc
2. Carbernet Sauvignon

هورمون، ريشه دار شدند (مشابه رقم بيدانه سفيد در اين آزمايش). اما براي ريشه دار کردن ساير ارقام کاربرد اکسين ضروري بود (٤). در تحقيقي ديگر نيز که توسط جونا و وب انجام شد، ريشه آغازي شاخساره هاي انگور در محيط کشت فاقد تنظيم کننده رشد به کندي انجام شد (١٥).مهاترا و همکاران، در چند رقم انگور با حذف سايتوکينين و فسفات منو سديم[1] از محيط کشت و نيز با کاهش غلظت عناصر غذايي و ساکارز و افزودن ٠/١ ميلي گرم در ليتر IAA[2]، ٨٠% گياهچه هاي ريشه دار بدست آوردند (١٧). در اين آزمايش نيز غلظت عناصر غذايي و ساکارز در مرحله ريشه زايي نسبت به مراحل استقرار و پرآوري کاهش يافت که اين امر موجب انگيزش سريعتر ريشه ها در محيط کشت مي شود. در گزارشي دو تيمار هورموني NAA[3] و IBA (با غلظتهاي ٢/٥ و ٥ ميکرومولار) و محيط کشت فاقد اکسين با يکديگر مقايسه شده و مشاهده گرديد که درصد گياهان ريشه‌دار انگور بعد از دو هفته در محيط کشت بدون اکسين ٧٨% و در محيطهاي کشت داراي اکسين ١٠٠% بود (١٤). در تحقيق ديگري نيز نواک و جووا مشاهده کردند که در محيط کشت حاوي IBA يا NAA ، ٩٠% شاخساره هاي انگور ريشه دار شده و همچنين با کاربرد IBA ٠/٠١ (ميلي گرم در ليتر) ريشه زايي بدون تشکيل کالوس، انجام شد (٢٠). دراين آزمايش ١٠٠% ريشه‌زايي در اکثر تيمارها بعد از ٢٨ روز ايجاد شد. درصد ريشه زايي در محيط بدون اکسين و داراي اکسين در رقم بيدانه سفيد تفاوت معني داري نداشتند. در رقم شاهرودي تنها در بالاترين غلظت IBA، ١٠٠% شاخساره ها ريشه دار شدند و با کاهش غلظت IBA، ميزان تشکيل کالوس نيز کاهش يافت. البته نتايج آزمايش فوق با نتايج آزمايش محققان ديگري که در غلظت ٠/٥ و ١ ميلي گرم در ليتر IBA، شاخساره هاي ريشه دار بدون تشکيل کالوس بدست آوردند، مغايرت دارد (١٤). اين تفاوت احتمالا بدليل اختلاف ارقام از نظر توان ريشه زايي آنها مي باشد. در اين آزمايش تشکيل کالوس در غلظت ٠/٥ ميلي گرم در ليتر IBA مشاهده گرديد.

طبق برخي گزارشات، تشکيل کالوس در ريز قلمه هاي انگور در محيط کشت ريشه زايي حاوي غلظتهاي مختلف NAA تحريك شده است. همچنين غلظتهاي پائين‌تر IAA (٠/١ ميکرومولار) بهترين غلظت براي ريشه زايي شاخساره ها بدون تشکيل کالوس و مناسب براي انتقال گياهچه ها به شرايط خارج شيشه اي معرفي شده است(١٢، ١٧ و ٢٠). ريشه زايي بدون تشکيل کالوس در غلظتهاي پايينتر اکسين در گزارش‌هاي مذکور با نتايج اين آزمايش منطبق است.

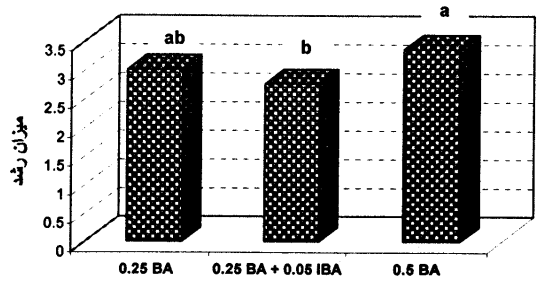
مرحله سازگاري

يکماه پس از قرار گرفتن در محيط کشت ريشه زايي، گياهچه‌هاي ريشه‌دار شده در شرايط درون شيشه اي براي سازگار شدن با شرايط برون شيشه‌اي، به گلدان و متعاقبا به محيط گلخانه منتقل شدند. يکماه پس از انتقال گياهچه ها به گلخانه و سازگار شدن آنها با شرايط محيطي خارج شيشه، درصد گياهاني که زنده مانده و بخوبي با شرايط محيط گلخانه سازگار شده بودند، تعيين شدند. در رقم بيدانه سفيد ٨٥% و در رقم شاهرودي ٨٠% گياهچه ها با شرايط محيط سازگار شده و رشد نرمال داشتند.

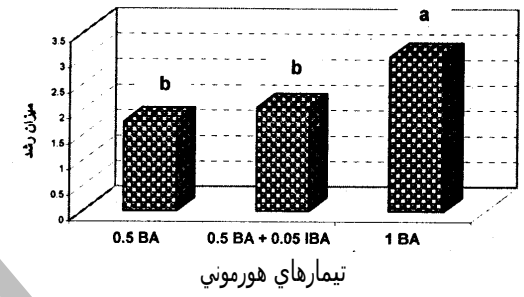
کشت مريستم

دربين تيمارهاي هورموني مختلف، تيمار هورموني ٠/٥ ميلي گرم در ليتر BA در رقم بيدانه سفيد و ١ ميلي گرم در ليتر BA در رقم شاهرودي بهترين تيمارها براي رشد مريستم‌ها بودند (شکل هاي ٧ و ٨). در تحقيقي روي کشت مريستمهاي چند رقم انگور در شرايط درون شيشه اي نيز مشاهده شد که رشد و تمايز مريستمهاي جدا شده انگور شديدا تحت کنترل هورموني است و سايتوکنين براي تکامل شاخساره هاي انگور در شرايط درون شيشه‌اي ضروري‌اند. همچنين مقادير ٢/٢٥ - ٠/٢٢ ميلي‌گرم در ليتر BA براي رشد مريستم ها توصيه شده است (٢٠) که با نتايج اين آزمايش منطبق است. در غلظتهاي بالاتر سايتوکينين مريستم هاي هر دو رقم بيدانه سفيد و شاهرودي رشد بهتري داشتند.

1. Monobasic sodium phosphate
2. Indoleacetic acid
3. Naphthaleneacetic acid



شكل ۷- اثر تيمارهاي مختلف هورموني بر ميزان رشد مريستم‌هاي رقم بيدانه



شكل ۸- اثر تيمارهاي مختلف هورموني بر ميزان رشد مريستم‌هاي رقم شاهرودي

براي كشت مريستم، در چهار رقم انگور پرلت[1]، ايتاليا[2]، روپستريس[3] و سالت كريك[4]، محيط كشت MS همراه با ۰/۵ ميلي‌گرم در ليتر BA توصيه شده است كه با نتايج اين آزمايش در رقم بيدانه سفيد منطبق است (۱۰). با استفاده از محيط كشت حاوي غلظتهاي مختلف هورمونهاي BA و NAA در چند رقم انگور مشاهده شد كه محيط حاوي ۲/۵ ميلي‌گرم در ليتر BA و بدون NAA بهترين رشد و تمايز را در مريستم ها ايجاد كرد (۱۱). در اين آزمايش نيز محيط كشت بدون اكسين و غلظت بالاتر سايتوكينين اثر بهتري بر رشد مريستمها در هر دو رقم داشت. با كشت مريستمهاي چند رقم انگور موسكادينه در محيط كشت MS و غلظتهاي مختلف از BA (۰/۵ ، ۱ و۲ ميلي گرم در ليتر)، بهترين تيمار براي زنده ماندن و رشد مريستمها تيمار هورموني ۲ ميلي‌گرم در ليتر معرفي شد (۹). در مجموع، طبق نتايج اين آزمايش مناسبترين محيط كشت براي هر دو رقم بيدانه سفيد و شاهرودي، محيط كشت MS بود. بهترين زمان تهيه ريزنمونه براي هر دو رقم شهريور ماه و همچنين بهترين تركيب هورموني براي پرآوري آنها BA ۱ (ميلي گرم در ليتر) بود.

1. Perletet
2. Italia
3. Rupestris
4. Salt creek

سپاسگزاري

بدينوسيله نويسندگان از سركار خانم مهندس مريم قاسمي كه در مراحل انجام اين تحقيق مساعدت نمودند و همچنين از آقاي دكتر محمدرضا فتاحي مقدم كه در آناليز آماري اين تحقيق كمک نمودند تشكر و قدرداني مي نمايند.

منابع مورد استفاده

REFERENCES

۱. شهرزاد، ش.، و امام، م. ۱۳۷۹.تكثير غيرجنسي پده (*Populus euphratica*) به روش كشت بافت. مجله تحقيقات ژنتيک و اصلاح گياهان مرتعي ايران (۲) ۱۱- ۳٦.

2. Al-Maarii, K. W. & A. S. Al–Ghamdi. 1995. *In vitro* propagation of grape *Vitis vinifera* cv. Banaty and Khalas .J. of Agri,. Sci. 3:169-183.
3. Bajaj,Y.B.S. (Ed). 1985. Biotechnology in Agriculture and Foresetry, Vol 1. Springer, Heidelberg
4. Barloss M. & K. G. M. Skene. 1978. *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera*) from fragmented shoot apices. Vitis 17: 335-340.
5. Botti, C., L. Gray & G. Reginato, 1993. The influence of culture date, genotype and type of shoot apices on *in vitro* proliferation of *Vitis vinifera* cvs. Thompson seedless, Ribier and Black Seedless. Vitis 32:125-126.
6. Chee, R. & R.M. Pool. 1982. The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultures *in vitro*. Scientia Horticulturae 16: 17-27.

7. Chee, R. & R. M. Pool. 1985. *In vitro* propagation of *Vitis*: The effects of organic substances on shoot multiplication. Vitis 24: 106-118.
8. Duran–Vila, N., J. Juarez & M. Arregui . 1988. Production of viroid – free grapevines by shoot tip culture. Am. J. Enol. Vitic. 39: 217-220.
9. El–Din, T.N., I.A. Rizk & M. Madkour. 1997. *In vitro* culture of muscadine grape (*Vitis rotundifolia)*. Bulletin of Faculty of Agriculture, University of Cario. 481: 129-142.
10. Gok, S. & F. Ergenoglu. 1997. Propagation of several grape varieties and rootstocks by meristem culture. Acta Hort. 441: 245-250.
11. Gomes, S., A.M. Pereira & O. Pinto–Carnide . 2003. Effect of culture medium on meristem differentiation and plant regeneration in *Vitis vinifera L.* 1st International symposium on Grapevine. Portugal. Abst. NO. 26.
12. Harris, R. E. & H. Stevenson. 1982. *In vitro* propagation of *Vitis*. Vitis 21: 22-32.
13. Hartmann, H.T., D.E. Kester, F.T. Davies & R.L. Geneve. 1997. Plant Propagation: Principles and Practices. 6th ed. Prentice Hall, Inc. USA. pp: 540-611.
14. Heloir, I., J.C. Fournioux, L. Oziol & R. Bessis. 1997.An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine (*Vitis vinifera* cv. pinot noir) using axillary bud cuttings. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 49: 223-225.
15. Jona, R. & K. J. Webb. 1978. Callus and axillary bud culture of *Vitis vinifera* "Sylvaner Riesling". Scientia Horticultrae 9: 55-60.
16. Lee, N. & H.Y. Wetzstein. 1990. *In vitro* propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115: 324-329.
17. Mhatre, M., C.K. Salunkhe & P.S. Rao. 2000. Micropropagation of *Vitis vinifera* L. : Towards an improved protocol. Sci. Hort. 84: 357-363.
18. Mullins, M.G., A. Bouquet. & L.E. Silliams. 1992. Biology of the Grapevine. 1st ed Cambridge University Press.
19. Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of plant from tissue cultures. In: Reinert J. (Ed). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Berlin Springer. pp:179-206.
20. Novak, F.J. & Z. Juvova. 1982. Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. Sci. Hort. 18: 231-240.
21. Pierik, R.L.M. 1997. In vitro Culture of Higher Plants. Kluwer Academic Publishers. Netherland.
22. Sudarsono, S. & R. Goldy. 1991. Growth regulator and axillary bud position effects on *in vitro* establishment of *Vitis rotundifolia*. Hort. Sci. 26: 304-307.
23. Taji, A.M. & R.R. Williams (Eds.).1996. Tissue Culture of Australian Plants. University of New England pp: 1-55.
24. Torregrosa, L., A. Bouquet & P.G. Goussard. 2001. *In vitro* Culture and Propagation of Grapevine. in: Roubleakis–Angelakis K.A. (Ed) Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine. Kluwer Academic Pub. Netherlands. pp. 281-326.