پژوهش و سازندگی
در زراعت و باغبانی
شماره ۶۷، تابستان ۱۳۸۴

تاثیر زمان نمونه گیری، اندازه ریز نمونه و نوع محیط بر استقرار مریستم‌های دو رقم تجاری انگور

• **سیدعلی رضا سلامی**، دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
• **علی عبادی**، دانشیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
• **ذبیح‌الله زمانی**، دانشیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: اسفندماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: مهرماه ۱۳۸۴

Email: asalami@ut.ac.ir

Archive of SID

چکیده

استقرار اولیه مریستم‌ها یکی از مراحل مهم در جریان کشت درون شیشه ای به منظورتولید گیاهان عاری از ویروس است. موفقیت در بهینه سازی محیط کشت در مرحله استقرار، ادامه کشت برای پرآوری نمونه‌ها را تضمین می‌کند. استقرار مریستم‌ها در محیط کشت تحت تاثیر فاکتورهای مختلفی می‌باشد. با توجه به اهمیت ارقام ایرانی و گزارشات معدود در زمینه کشت مریستم ارقام انگوردر کشور، این بررسی در سال ۸۴-۱۳۸۳ با هدف تعیین محیط کشت بهینه جهت استقرار مریستم بر گرفته از جوانه‌های ارقام انگور بیدانه سفید و شاهرودی انجام گرفت. در آزمایش اول به منظور بررسی تاثیر اندازه اولیه مریستم در استقرار ریز نمونه‌ها، مریستم‌های رقم بیدانه سفید در سه اندازه ۰/۵ میلی متر، ۰/۳ میلی متر و ۰/۲≤ میلی متر جدا و در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA استقرار یافتند. آزمایش دوم با هدف بررسی اثر نوع محیط کشت و زمان نمونه‌گیری در استقرار مریستم‌های نوک شاخساره دو رقم انگور مذکور جهت مرتفع ساختن بخشی از مشکلات مربوط به تولید گیاهان عاری از ویروس با سه فاکتور زمان نمونه‌گیری، نوع ترکیب هورمونی محیط کشت و رقم انگور با سه تکرار به‌صورت آزمایش فاکتوریل خردشده در زمان در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام گرفت. صفات مورد ارزیابی شامل تعداد گیاهچه‌های قابل استفاده برای انتقال به محیط پرآوری، وضعیت رشد مریستم‌ها و طول گیاهچه‌های حاصل از رشد مریستم‌ها بودند. نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری بین انداره اولیه ریزنمونه مریستم بر تعداد مریستم‌های رشد یافته در محیط استقرار وجود دارد، اما اختلاف معنی داری بین اندازه اولیه ریز نمونه‌ها و طول گیاهچه‌های حاصل از رشد مریستم‌ها مشاهده نشد. بهترین نتایج در رقم بیدانه سفید در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA و در رقم شاهرودی در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA به علاوه یک میلی گرم در لیتر BA و در زمان اواخر خرداد ماه به دست آمد.(براساس نتایج بدست آمده) انتخاب محیط کشت مناسب و یا تهیه فرمولاسیون مطلوب آن و گزینش زمان مناسب نمونه‌گیری برای موفقیت در کشت مریستم ضروری است.

کلمات کلیدی: انگور، بیدانه سفید، شاهرودی، کشت مریستم، نوع محیط کشت

www.SID.ir

Pajouhesh & Sazandegi No 67 pp: 72-81

The effects of culture medium, date of culture and size of explants on meristem establishment of two commercial grapevine cultivars

By:A. Salami, A. Ebadi, Z. Zamani; Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj - Iran.

Meristem establishment is one of the important steps of in vitro propagation. A successful establishment of meristems, assures promising proliferation. Meristem establishment is influenced by many factors. Because of importance of Iranian cultivars and lack of enough reports on meristem culture, this study was conducted to choose the best combination of culture medium in meristem establishment of two Iranian cultivars Bidaneh Sefid and Shahroodi during 2003-2004. In the first trial, establishment of three sizes of Bidaneh Sefid cultivar meristems (≤0.2, 0.3, 0.5 mm) were investigated on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA. In second trial, the effects of medium combination and time of culture, were investigated.The trial was done according to complete random design with three factors and three replications and the data were recorded regarding to the number of plantlets capable for proliferation, growth rate of meristems and the length of plantlets obtained from meristems after one month. The results showed significant differences between the primary size of meristems and the number of meristems and establishment capacity but, there was no differences in length of plantlets. The best results were obtained as 0.5 BA medium for Bidaneh Sefid cultivar and 1.0BA+ 0.1IBA in Shahroodi cultivar both in the second half of June. So in order to have success in meristem culture, it is necessary to select proper hormonal combination to abtain the best formulation and the best time for culture.

Key words: Grapevine, Bidaneh Sefid, Shahroodi, Meristem Culture, Media culture

مقدمه

انگور (*Vitis vinifera* L.) یکی از محصولات مهم باغبانی است که هم به لحاظ سطح زیر کشت و هم ارزش اقتصادی بالا مورد کشت و کار واقع می‌شود (۱۴). ارزش این محصول به لحاظ تولید فرآورده‌های متنوع بسیار بالا است و از این لحاظ نقش بسیار مهمی را در اقتصاد کشورهای تولید کننده آن ایفا می‌کند. کشور ایران از نظر تولید انگور و صادرات کشمش در دنیا جایگاه مهمی داشته و به ترتیب در رتبه‌های هفتم و سوم قرار گرفته است. از طرف دیگر، از لحاظ سطح زیر کشت و میزان تولید، انگور در بین سایر محصولات درختی در ایران در جایگاه اول قرار دارد و ارقام بسیاری در کشور مورد کشت و کار واقع می‌شوند (۱۳). در این میان رقم بیدانه سفید یکی از ارقام ایرانی بسیار مهم به لحاظ تازه خوری و نیز تولید کشمش است که محصول تازه و کشمش تهیه شده از آن شباهت بسیار زیادی به رقم تامسون سیدلس داشته و به لحاظ کیفیت در دنیا شهرت دارد. رقم شاهرودی نیز از دیگر ارقام مهم ایرا نی است که قابلیت خوب تازه خوری و نگهداری آن برای مدت طولانی آنرا به عنوان رقم مطلوب انگور معرفی کرده است. با توجه به اینکه از نقطه نظر اقتصادی ، تولید وقتی توجیه پذیر خواهد بود که کمیت و کیفیت محصول مطلوب باشد لذا کلیه عوامل موثر بر این روند باید در جریان تولید مد نظر واقع شود. بیماریهای ویروسی یکی از این عوامل هستند که هر ساله باعث خسارت شدید در تاکستان‌ها شده و بر تولید و عمل آوری انگور تاثیر می‌گذارد. بیماری‌های ویروسی گاهی الگوی کشت را برای مدت‌های مدید در یک منطقه تغییر داده و بر بازار و صادرات محصول اثر می‌گذارند (۱). از جمله مهمترین این بیماری‌ها در ایران، بیماری‌های بادبزنی برگ انگور (GFLV[1]) و پیچیدگی برگ انگور(GLRV[2]) می‌باشند که هر ساله خسارات شدیدی را به تاکستان‌های نواحی مختلف انگورخیز کشور وارد می‌آورند. با توجه به اهمیت تولید انگور و خسارات ناشی از این بیماریها، لزوم اجرای یک مدیریت صحیح در تولید مواد گیاهی عاری از ویروس ضروری به نظر می‌رسد. اگر چه کوششهای بسیاری در خصوص کاربرد ترکیبات شیمیایی جهت حذف ویروسها صورت گرفته اما اغلب موفقیت آمیز نبوده است (۳۴) لذا تهیه مواد گیاهی سالم به عنوان پایه‌های مادری جهت ازدیاد گیاه مادری موثرترین روش می‌باشد که به این منظور از شیوه‌هایی چون کشت مریستم (۱۰، ۱۵، ۱۸، ۱۹) و گرمادرمانی استفاده می‌گردد (۲۱، ۲۲، ۲۹، ۳۲). کشت مریستم به عنوان شیوه‌ای از کشت درون شیشه‌ای یکی از متداول‌ترین و موثرترین شیوه‌های حذف عوامل بیماریزای ویروسی از گیاهان آلوده است(۳۵). شیوه‌های عاری سازی عوامل ویروسی توسط محققان بسیاری مورد بررسی قرار گرفته است (۱۷). با این حال استفاده از مریستم انتهایی شاخساره متداول‌ترین شیوه در عاری سازی عوامل ویروسی می‌باشد که در برنامه‌های عاری سازی مواد گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷، ۲۵، ۲۸). گیاهک‌های تولید شده از کشت مریستم معمولاً خصوصیات ژنتیکی گیاه مادری را به خوبی حفظ می‌کنند. پایداری زیادتر گیاهان تولید شده از مریستم انتهایی احتمالا به

Archive of SID

www.SID.ir

واسطه یکنواختی بیشتر در ماهیت دیپلوییدی سلولهای انتهایی است (۲۶). اگـر چه تحقیقات بسـیاری به منظور ریز ازدیادی گونه‌هـا و ارقام مختلف انگور با استفاده از شیوه‌های مختلف کشت بافت صورت گرفته، اما تحقیقات در خصوص کشـت مریستم حاصل از جوانه‌ها ی انتهایی شاخساره به ویژه در ارقـام گونه وینیفرا تا حدودی محدود اسـت (۵). معمـولاً چهار مرحله جهت ازدیاد درون شیشه‌ای گیاهان مد نظر واقع می‌شود که شامل استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشـت، ایجاد اولین شاخسـاره‌ها و پـرآوری، تکثیر انبوه شاخسـاره‌ها از طریق بازکشـت‌های متوالی و در نهایت ریشـه زایی گیاهچه‌های تولید شـده و سـازگارکردن آنها با شـرایط بیرون و انتقال به محیط گلخانه می‌باشـد (۸). با این حال اسـتقرار اولیه ریز نمونه‌ها یکی از مراحل مهم در جریان کشت درون شیشه‌ای است. موفقیت در بهینه سازی محیط کشـت در مرحله استقرار و به دست آوردن حتی یک گیاهچه کافی اسـت که بتوان همین گیاهچه سـالم را با سـایر روش‌های متداول کشت بافت به راحتی ازدیاد کرد (۳). در واقع، موفقیت در اسـتقرار مریسـتم‌ها، تضمینی برای ادامه کار جهت پرآوری مطلوب می‌باشد. این مرحله از کشت درون شیشـه ای، اغلب به دلیل آلودگی و تولید و ترشـح ترکیبات فنولی توسـط ریزنمونه مشکل است. با این حال در این مرحله باید تعداد مناسبی ریزنمونه زنده مانده و روی محیط کشـت رشـد کنند (۲). استقرار مطلوب مریستم‌ها در محیط کشت تحت تاثیر فاکتورهای مختلفی از جمله ژنوتیپ (۱۵، ۳۲)، وضعیت مناسـب گیاه مادری قبل از کشـت در شـرایط درون شیشـه ای (۳۵)، ترکیب محیط کشـت (۱۵، ۳۲)، زمان نمونه گیری(۱۸) و اندازه مناسـب ریزنمونه اولیه (۲۳) می‌باشـد. عموما تعداد گیاهچه‌های حاصله عاری از ویروس، نسبت عکس با اندازه ریز نمونه دارد. با این حال در مواردی جداکردن مریستم انتهایی در حد کوچک که عاری از ویروس بوده و قادر به تولید گیاهچه نیز باشد دشوار است (۳). رشد و تمایز مریستم‌ها در محیط کشـت تحت کنترل هورمونی است و حضور هورمون جهت استقرار ریزنمونه‌ها و رشد مطلوب بعدی آنها ضروری است (۲۸). ترکیبات هورمونی مختلـف چون سـایتوکینین‌ها به تنهایی یا همراه با اکسـین با غلظت‌های مختلف جهت اسـتقرار مریستم مورد اسـتفاده قرار گرفته اند (۵، ۱۰، ۱۵، ۱۶، ۱۸، ۱۹، ۲۸ ، ۳۲). انـواع محیط‌های کشـت چـون محیط کامل MS (۳۱،۲۸،۲۴،۲۰،۱۹،۱۸،۱۷،۱۵،۱۱،۱۰،۶) ، یـا رقیق شـده آن با غلظت نصـف نمکهای ماکرو (۹) و WPM اصلاح شـده(۳۳) در ریـز ازدیادی مو استفاده شده است.

بـا این توصیف، متداول ترین محیط کشـت محیط MS بوده اسـت (۱۲). با توجه به اهمیت موضوع و گزارشات معدود در زمینه کشت مریستم ارقام انگوردر کشور(۵) این بررسی در سال ۸۴-۱۳۸۳ با هدف رفع پاره ای از مشکلات مربوط به تولید گیاهان عاری از ویروس از طریق تعیین محیط کشت بهینه جهت استقرار مریستم‌های ارقام انگور بیدانه سفید و شاهرودی و همچنین بررسی اثر اندازه اولیه ریز نمونه و زمان نمونه گیری در استقرار مریستم‌های این دو رقم مهم تجاری انگور انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نوک شاخسـاره حاصل از پایه‌ها ی مـادری ارقام انگور بیدانه سـفید و شـاهرودی، واقع در کلکسـیون انگور گروه باغبانی دانشـکده کشاورزی دانشـگاه تهران، به عنوان مواد آزمایشی برای کشـت مریستم این ارقام به منظور تولید گیاهان عاری از ویروس مورد استفاده قرار گرفتند. در آزمایش اول به منظور بررسـی تاثیر اندازه اولیه مریستم در استقرار ریز نمونه‌ها در محیط کشـت، نوک شاخساره‌ها با طول ۱/۵- ۱ سانتی‌متر جدا و برگ‌های اطراف حذف شـدند. نمونـه گیری در اوایل صبح انجـام گرفت. ضدعفونی نمونه‌هـا در ابتدا با اسـتفاده از آب و مایع ظرفشـویی به مـدت ۱۵ دقیقه و سـپس با اسـتفاده از الکل اتیلیک ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیـه انجام گرفت و پس از آن نمونه‌ها با آب مقطر اسـتریل آبشویی شدند. بلافاصله نمونه‌ها توسـط محلول کلرور جیوه ۰/۱ ٪ حاوی ۰/۱ ٪ محلول Tween۲۰ به مدت ۳ دقیقه تیمار شـدند و در پایان ریزنمونه‌ها با آب مقطر اسـتریل ۳ دفعه و با فواصل زمانی ۵ ، ۱۰، ۱۵ دقیقه آبکشـی شدند. مریستم‌های رقم بیدانه سـفید در سـه اندازه ۰/۵ میلی متر، ۰/۳ میلی متر و ۰/۲ ≤ میلی متر در زیر لامینارفلو[۵] و با استفاده از استریو میکروسکوپ و توسط سرنگ به دقت جدا و هر ۵ مریستم در یک پتری دیش حاوی محیط کشت استقرار یافتند. محیط کشت حاوی نمکهای ماکرو، میکرو و ویتامین‌های محیط موراشیگ واسـکوگ (۱۹۶۲) به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۶/۵ گرم در لیترآگار و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA بود. PH تمام محیط‌های کشـت با استفاده از هیدروکسید سدیم و اسـید کلریدریک ۰/۱ نرمال در حد ۵/۸-۵/۷ تنظیم شـد(۳۰). محیط‌های کشـت قبل ازاسـتفاده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سـانتی گراد و فشـار ۱ اتمسـفر اتوکلاو شـدند. پس از کشت مریستم‌ها، هر یک از ظروف پتری دیش با استفاده از پارافیلم پوشانده شده و در اتاقکهای رشـد با میانگین دمای روز ۲۸ درجه سانتی گراد و میانگین دمای شـب ۲۴ درجه سـانتی گراد قرار داده شدند. فتوپریود در ۱۶ ساعت روشـنایی و ۸ سـاعت تاریکی تنظیم شـده بود. منبع نور مورد اسـتفاده، لامپهای فلورسـنت با نور سفید و شدت نور ۴۰ میکرو اینشتن (. $\mu E . m^{-2}$ sec-۱) بر متر مربع در ثانیه در داخل اتاقک رشـد بود. ارزیابی داده‌ها پس از یک ماه و با توجه به فاکتورهایی از قبیل طول گیاهچه‌های حاصل از رشد مریستم‌ها بر حسـب سانتی متر و تعداد مریستم‌های رشد یافته در محیط استقرار انجام گرفت.

آزمایش دوم با هدف بررسی اثر نوع محیط کشت و تعیین بهترین زمان زمان نمونه گیری جهت اسـتقرار مریستم‌های نوک شاخساره دو رقم انگور مذکور و با سـه فاکتور زمان نمونه گیری در سه سطح(اواخر خرداد، اواخر تیر، اواخر مرداد)، نوع ترکیب محیط کشـت در شـش سطح و رقم در دو سـطح و با سه تکرار به‌صورت آزمایش فاکتوریل خردشده در زمان در قالب طـرح پایه کاملا تصادفی انجـام گرفت. با توجه به نتایج حاصل از آزمایش اول، مریسـتم‌ها به همراه ۲- ۱ برگ اولیه به اندازه ۰/۵-۰/۳ میلی مترجدا شـدند و هر پنج مریسـتم در داخل یک پتری دیش حاوی ۴۰-۳۰ میلی لیتر محیط کشـت محتوی غلظتهای مختلـف BA (۱/۵، ۱، ۰/۱) میلی گرم در لیتر به تنهایی و یا همراه با ۰/۱ میلی گرم در لیترIBA مسـتقر شـدند. در مجموع تعداد ۱۵ مریسـتم برای هر تیمار کشـت داده شدند و ارزیابی مریسـتم‌ها یک ماه پس از کشت در محیط اسـتقرار صورت گرفت. صفات مورد ارزیابی شـامل تعداد گیاهک‌های قابل استفاده برای انتقال به محیط پرآوری در هر تیمار، وضعیت رشـد مریسـتم‌ها بر اساس نمره دهی از یک تا پنج و طول گیاهک‌های حاصل از رشـد مریسـتم‌ها بر حسب سانتی متر بودند. تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزارهای آماری SAS و MSTATC و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه ای دانکن صورت گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس آزمایش اول اختلاف معنی داری بین اندازه اولیه ریزنمونه مریستم و تعداد مریستم‌های رشد یافته در سطح ۱٪ نشان داد، اما اختلاف معنی داری بین این عامل و طول گیاهک‌های حاصل وجود نداشت (جدول شماره ۱). بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، تمام مریستم‌های با ابعاد اولیه ۰/۵ میلیمتر به خوبی در محیط کشت استقرار یافتند که با مریستم‌های با ابعاد اولیه ۰/۳ میلیمتر تفاوت معنی داری نداشت اما در صورت استفاده از اندازه‌های کوچکتر، تنها کمتر از نیمی‌از مریستم‌ها قادر به استقرار در محیط کشت شدند (نمودار شماره ۱). مریستم‌هایی که قادر به استقرار و زنده ماندن در محیط کشت شدند، تمایز یافته و گیاهک‌های حاصل از مریستم‌ها با اندازه متفاوت در نهایت اندازه‌ای تقریبا یکسان داشتند (شکل شماره ۱). مراحل مختلف تمایز یابی و رشد مریستم‌ها در طی یک ماه در شکل شماره ۲ آمده است. آنچه که مسلم است، اندازه اولیه ریزنمونه در استقرار آن تعیین کننده است. کشت‌ریز نمونه‌های کوچک دشوارتر است و ریزنمونه‌های بزرگتر احتمالاً به دلیل برخورداری از مواد غذایی و تنظیم کننده‌های رشد داخلی، برای کشت مناسب تر هستند (۲). این موضوع در خصوص کشت مریستم از حساسیت بیشتری برخوردار است چرا که جدا کردن مریستم انتهایی در اندازه کوچک که عاری از ویروس باشد و توانایی تولید یک گیاهک سالم را داشته باشد دشوار است (۳۶).

نتایج تجزیه واریانس آزمایش دوم، اختلاف معنی داری را بین اثر نوع محیط کشت و زمان نمونه گیری در سطح ۱٪ بر طول گیاهک‌های حاصل از مریستم‌ها پس از یک ماه نشان دادند، اما دو رقم انگور از نظر طول گیاهک‌های حاصل از رشد مریستم‌ها اختلاف معنی داری نداشتند (جدول شماره ۲). هر دو رقم از نظر تعداد گیاهک‌های قابل انتقال به مرحله پرآوری اختلاف معنی داری با هم نشان دادند و رقم شاهرودی تعداد گیاهک‌های بیشتری را تولید کرد اما گیاهک‌های حاصل در دو رقم از نظر طول تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (جدول شماره ۳). اثر متقابل محیط کشت و رقم، همچنین اثر متقابل محیط کشت و زمان نمونه‌گیری بر فاکتورهای مورد بررسی در سطح ۱٪ معنی دار بودند. در حالیکه اثر متقابل رقم و زمان نمونه‌گیری تنها بر طول گیاهک‌ها اثر معنی‌داری داشت و تفاوت معنی‌داری را بر تعداد گیاهک‌های قابل انتقال به مرحله پرآوری نشان نداد. اثرات متقابل سه جانبه هر یک از تیمارها نیز اثرات معنی‌داری بر کلیه صفات در سطح ۱٪ نشان داد (جدول شماره ۲). بلندترین شاخساره‌ها و بالاترین میانگین تعداد گیاهک در رقم بیدانه سفید در محیط ۵/۰ BA و در رقم شاهرودی در محیط ۱BA+۰/۱IBA تولید گردید (جدول شماره ۴). محیط کشت ۰/۵ BA به عنوان بهترین محیط جهت استقرار مریستم‌های رقم انگور بیدانه سفید انتخاب گردید که با نتایج کلاته جاری و همکاران (۵) مطابقت داشت. محیط کشتهای ۰/۵BA+۰/۱IBA و ۱BA+۰/۱IBA اگرچه اختلاف معنی داری با هم نداشتند اما به علت اینکه گیاهک‌های طویل تری در محیط کشت ۱BA+۰/۱IBA ایجاد گردید، این محیط به عنوان محیط بهینه جهت استقرار مریستم‌های رقم شاهرودی انتخاب گردید(جدول شماره ۴). نمونه گیری در اواخر خرداد ماه و استقرار مریستم‌ها در محیط کشت ۰/۵ BA ، طویل‌ترین گیاهک‌ها را تولید کرد. کوتاه‌ترین گیاهک‌ها در محیط کشت ۱/۵ BA و در زمان نمونه‌گیری اواخر تیرماه ایجاد گردیدند (جدول شماره ۵). در این زمان درجه حرارت هوای منطقه ۲ ± ۳۲ درجه سانتی گراد بود بطوریکه انتخاب نمونه از باغ جهت کشت مریستم به دشواری انجام پذیرفت. همچنین بدلیل دمای بالا، نمونه‌ها چندان شاداب نبودند و وضعیت مناسبی نداشتند. نتایج حاکی از این بود که در تمامی محیط‌های کشت، طویل‌ترین گیاهک‌ها در زمان نمونه‌گیری اواخر خرداد ماه و کوتاه‌ترین نمونه‌ها هنگامی ایجاد شدند که نمونه گیری در اواخر تیر ماه انجام گرفت که با نتایج Kabeli و همکاران (۱۸) که بهترین نتایج را در اوایل جولای در استقرار مریستم‌های رقم انگور کلاریت به دست آورده بودند مطابقت داشت. حضور IBA در محیط کشت به همراه BA، باعث اختلاف معنی‌داری در طول گیاهک‌های رقم شاهرودی در تمام تیمارها گردید اما در رقم بیدانه سفید، حضور IBA در محیط کشت گیاهک‌هایی کوتاه‌تر نسبت به محیط‌های حاوی BA تنها

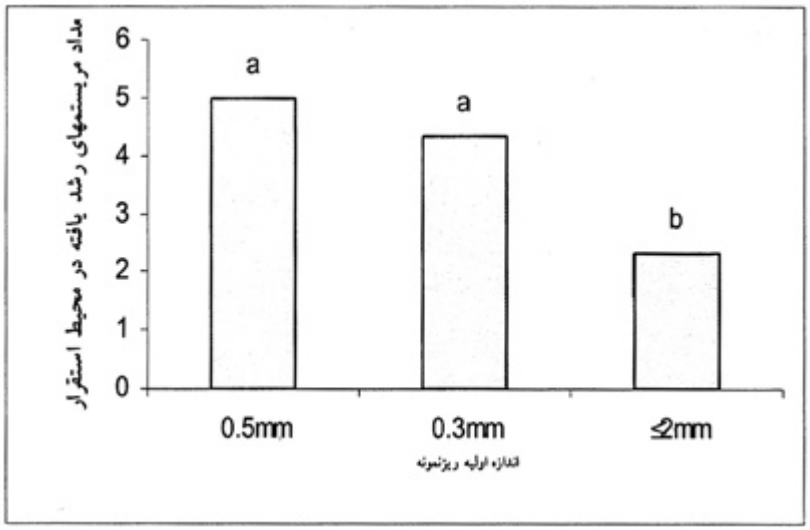
جدول شماره ۱- تجزیه واریانس اثر اندازه اولیه ریزنمونه در کشت مریستم، براستقرارمریستم‌های رقم انگور بیدانه سفید

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		طول گیاهک‌های حاصل از رشد مریستم‌ها در محیط استقرار (cm)	تعداد مریستم‌های رشد یافته در محیط استقرار
نوع محیط کشت	۲	۰/۰۰۰۴ ns	۵/۷۷۷ **
خطای آزمایشی	۶	۰/ ۰۰۴۲	۰/ ۲۲۲
کل	۸		

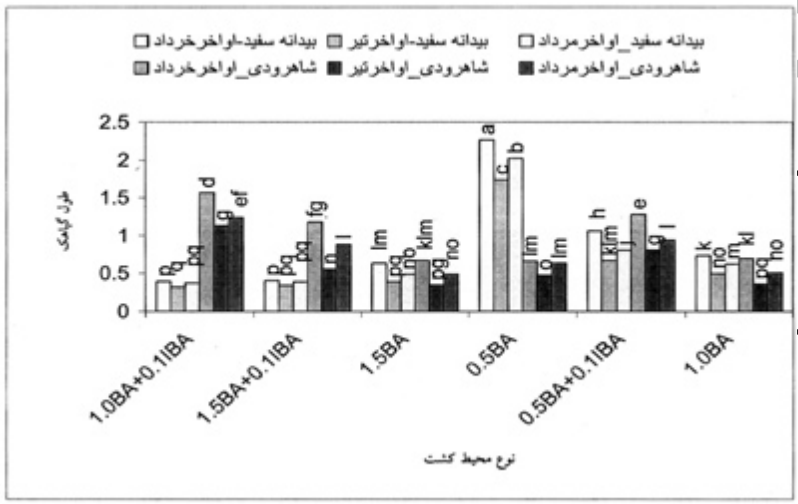
** نشان دهنده معنی دار بودن تیمارها در سطح احتمال ۱٪ و ns بیانگر عدم معنی‌دار بودن آنها می‌باشد.

Archive of SID

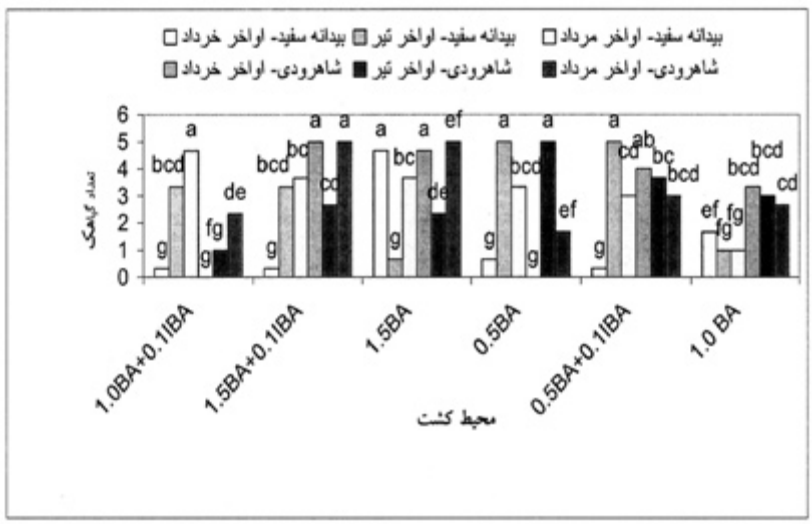
www.SID.ir



نمودار شماره ۱- اثر اندازه ریز نمونه بر تعداد مریستم‌های رشد یافته در محیط استقرار



نمودار شماره ۲- اثر متقابل محیط کشت، زمان نمونه گیری و رقم انگور، برطول گیاهک‌ها ی حاصل از رشد مریستم



نمودار شماره۳- اثر متقابل محیط کشت، زمان نمونه گیری و رقم انگور، برتعداد گیاهک‌ها ی قابل انتقال به مرحله پرآوری

www.SID.ir

جدول شماره ۲- تجزیه واریانس اثر نوع محیط کشت، رقم و زمان نمونه گیری در استقرار ریزنمونه‌های دو رقم انگور یک ماه پس از کشت

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		طول گیاهک‌ها (cm)	تعداد گیاهک قابل انتقال به مرحله پرآوری	تعداد مریستم‌های رشد نکرده (۰/۳≤ x<۰/۵) cm	تعداد مریستم‌های با رشد کم (۰/۵≤ x<۱) cm	تعداد مریستم‌های با رشد متوسط (۱≤ x<۲۱/۵) cm	تعداد مریستم‌های با رشد خوب (۱/۵≤ x<۲) cm	تعداد مریستم‌های با رشد عالی (x≥۲) cm
محیط کشت	۵	۱/۵۸۶**	۱۵/۴۹۸**	۱/۹۹۱**	۱/۵۵۲**	۱/۰۶۶**	۰/۵۵۶**	۰/۹۳۸**
رقم انگور	۱	۰/۰۰۵ ns	۱۵/۵۶۴**	۳/۰**	۱/۲۲۵**	۲/۶۱۱**	۰/۰۰۳ ns	۰/۷۸۱**
زمان نمونه گیری	۲	۰/۹۶۳××	۲۲/۹۵۳**	۲/۳۲۵**	۰/۳۱۴**	۰/۶۰۸**	۰/۱۶۳**	۰/۰۶۱**
محیط کشت × رقم انگور	۵	۲/۸۸۷**	۲۸/۹۶۴**	۲/۷۰۳**	۱/۸۰۲**	۰/۷۱۲**	۰/۹۹۷**	۱/۰۱۶**
محیط کشت× زمان نمونه گیری	۱۰	۰/۰۱**	۰/۸۵۳**	۰/۳۷۶**	۰/۷۷۲**	۰/۳۰۳**	۰/۱۴۹**	۰/۰۳۴**
رقم انگور× زمان نمونه گیری	۲	۰/۰۴۴**	۰/۶۷۵ ns	۰/۲۲۸**	۰/۳۷۵**	۰/۰۷۸ ns	۰/۴۷۳**	۰/۰۱۵ ns
محیط کشت × رقم انگور × زمان نمونه گیری	۱۰	۰/۰۳۶**	۰/۸۴۲**	۰/۱۱۲**	۰/۲۷**	۰/۱۷۴**	۰/۰۸۷**	۰/۰۴۳**
خطای آزمایشی	۷۲	۰/۰۰۱	۰/۲۷۷	۰/۰۲۱	۰/۰۲۸	۰/۰۲۹	۰/۰۳	۰/۰۰۵
کل	۱۰۷							
C.V ٪		۴/۸۱	۱۸/۹۱	۱۱/۵۸	۱۰/۷۳	۱۷/۴۸	۱۹/۸۹	۹/۳۸

×× نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها به ترتیب در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ و ns بیانگر عدم معنی دار بودن اختلاف بین آنها می‌باشد.

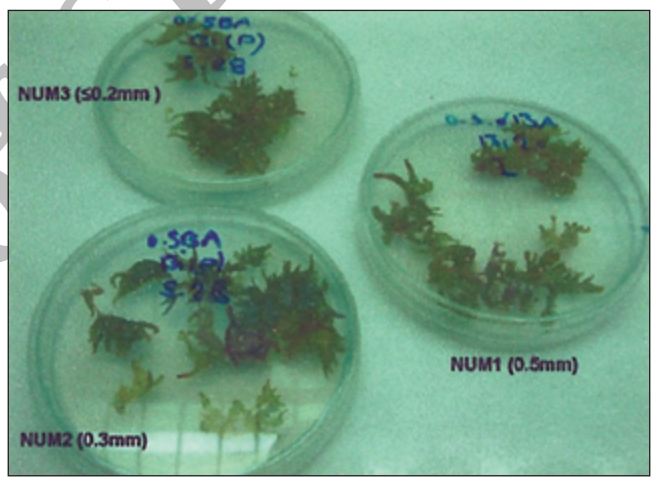
Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ۳- مقایسه میانگین اثرات ساده نوع رقم برطول گیاهک‌ها ی حاصل از رشد مریستمها و تعداد گیاهک‌ها ی قابل انتقال به مرحله پرآوری با استفاده از روش دانکن

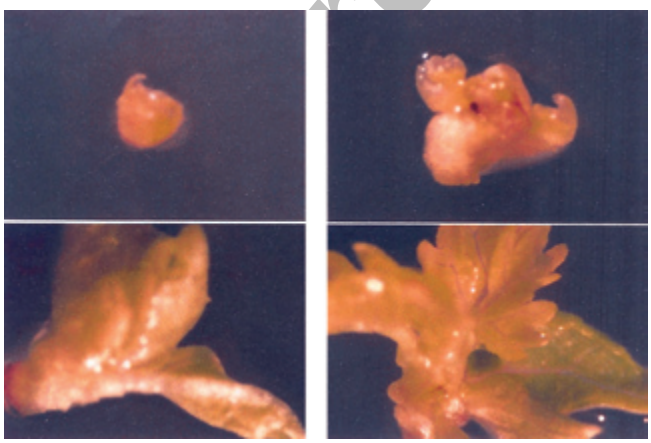
رقم انگور	میانگین طول گیاهک‌ها	تعداد گیاهک‌ها ی قابل انتقال به مرحله پرآوری
رقم شاهرودی	۰/ ۷۸۵a	۲/۴۰۷b
رقم بیدانه سفید	۰/ ۸ a	۳/۱۶۶ a

تولید کرد (جدول شماره ۴). در بررسی اثر متقابل نوع محیط کشت و زمان نمونه گیری بر تعداد گیاهک‌های قابل انتقال به مرحله پرآوری، کلیه محیطهای کشت به غیر از محیط کشت IBA ۰/۱ +BA ۱/۵ که کمترین تعداد گیاهک را تولید کرد اختلاف معنی داری در زمانهای اواخر خرداد و اواخر مرداد نشان ندادند (جدول شماره ۵). طویل ترین گیاهک‌ها در



شکل شماره ۱- تاثیر اندازه اولیه مریستم در استقرار ریزنمونه

رقم بیدانه سفید، در محیط BA ۰/۵ و در زمان نمونه گیری اواخر خرداد و در رقم شاهرودی در محیط IBA ۰/۱ +BA ۱ حاصل آمدند که با رقم بیدانه سفید در هر سه زمان اختلاف معنی داری داشت (نمودار شماره ۲). تعداد گیاهک‌های قابل انتقال به مرحله پرآوری نیز تحت تاثیر اثرات متقابل نوع رقم، نوع محیط کشت و زمان نمونه‌گیری قرار داشت (نمودار شماره ۳). این تفاوت‌ها شاید در نتیجه واکنش متفاوت ارقام به استقرار در محیط کشت باشد (۱۵، ۳۲). رقم بیدانه سفید بهترین نتایج را در مرحله استقرار در محیط حاوی سایتوکینین تنها نشان داد که با نتایج گامس و همکاران (۱۶)، Novak و Juvana (۲۸) در نتاج هیبرید انگور آمریکایی و اروپایی و کلاته جاری و همکاران (۵) در ارقام بیدانه سفید و شاهرودی که بهترین نتیجه در تمایز مریستم‌ها را در محیط‌های حاوی سایتوکینین بدون اکسین مشاهده کرده بودند مطابقت داشت. این در حالی بود که در رقم شاهرودی حضور سایتوکینین به همراه اکسین موجب پاسخ بهتر گردید که با نتایج Gok و Ergenoglu (۱۵) در ارقام ایتالیا، پرلت و روپستریس مشابهت داشت. بهترین نتایج در رقم بیدانه سفید در زمان نمونه گیری اواخر خرداد و در محیط کشت BA ۰/۵ به دست آمد و در رقم شاهرودی بهترین نتایج در محیط کشت IBA ۰/۱ +BA ۱ و مجدداً در زمان اواخر خرداد ماه به دست آمد. غلظت‌های بالای اکسین می‌توانند مانع ریخت‌زایی شوند و سایتوکینین‌ها نیز باعث تسریع تقسیم سلولی، تشکیل اندام هوایی و ریخت‌زایی می‌شوند (۲). فصول و ماه‌های مختلف سال نیز از جمله فاکتورهایی هستند که بر روی میزان آلودگی و پاسخ ریز نمونه به کشت تاثیر می‌گذارند. به عنوان مثال جوانه‌ها، اندام‌ها و یا مریستم‌های انتخاب شده در فصل بهار که در وضعیت آغازین رشد هستند از جوانه‌های در حال خواب و یا نمونه‌هایی که در شرایط آب و هوایی نامناسب انتخاب می‌شوند پاسخ دهی بهتری دارند. این موضوع در نتیجه شرایط فیزیولوژیک مطلوب‌تر در این زمان‌ها و رشد فعال بیشتر می‌باشد. همین‌طور که از فصل بهار به سمت تابستان و بعد از آن پیش می‌رویم، پاسخ ریزنمونه به استقرار در محیط کشت کاهش می‌یابد که با نتایج حاصل از این آزمایش مطابقت دارد. این موضوع در نتیجه کاهش میزان رشد فعال و همچنین تولید ترکیبات بازدارنده درونی گیاه است که با افزایش سن فیزیولوژیک، تولید و ترشح این ترکیبات افزایش می‌یابد(۲). تغییرات دمایی، شدت نور و دردسترس بودن آب، بر میزان کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و میزان مواد رشدی در گیاه مادری اثر دارند و از این رو بر واکنش ریز نمونه در محیط کشت تاثیر می‌گذارند(۴). بهترین نتایج وقتی قابل دستیابی است که ریز نمونه‌ها در حالت رشد فعال گرفته شوند(۴). نمونه‌های جمع آوری شده



شکل شماره ۲- رشد مریستم‌ها طی یک ماه در محیط استقرار

www.SID.ir

جدول شماره ۴ - مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع محیط کشت و رقم برطول گیاهچه‌ها ی حاصل از رشد مریستم‌ها و تعداد گیاهچه‌ها ی قابل انتقال به مرحله پرآوری با استفاده از روش دانکن

نوع ترکیب هورمونی - رقم	میانگین طول گیاهک ها	تعداد گیاهک ها ی قابل انتقال به مرحله پرآوری
0.5 BA- بیدانه سفید	۲ a	۵ a
0.5 BA- شاهرودی	۰/۵۸ e	۲/۵۵ cde
0.5 BA +0.1 IBA- بیدانه سفید	۰/۸٤ d	۳/۵۵ b
0.5 BA +0.1 IBA- شاهرودی	۱ c	٤/۵۵ a
1.0BA + 0.1 IBA- بیدانه سفید	۰/۳٦ g	۰/۲۲ f
1.0 BA + 0.1 IBA- شاهرودی	۱/۳۱b	٤/۷۷ a
1.5 BA + 0.1 IBA- بیدانه سفید	۰/۳۷ g	۰/۳۳ f
1.5 BA + 0.1 IBA- شاهرودی	۰/۸۷ d	۳ bc
1.0BA- بیدانه سفید	۰/٦۱ e	۲/٦٦ cd
1.0 BA- شاهرودی	۰/۵۲ f	۲/۲۲de
1.5 BA- بیدانه سفید	۰/۵ f	۲/٦٦ cd
1.5 BA- شاهرودی	۰/۵ f	۱/۸۸ e

در زمان‌های مختلف سال پاسخ یکسانی را نسبت به شرایط کشت درون شیشه‌ای نشان نمی‌دهند (۲۷) که با نتایج حاصل از این آزمایشات مبتنی بر معنی‌داربودن اختلاف زمانهای مختلف کشت در استقرار مریستم‌ها مطابقت دارد.

پاورقی‌ها

1-Grapevine Fanleaf Virus
2-Grapevine Leafroll Virus
3-Murashige and Skoog
4-Woody plant media
5- Laminar air flow
6-Benzylaminopurine
7- Indole-3-butryic acid

منابع مورد استفاده

۱ - اشکان، س، م. ۱۳۷۴؛ بیماریهای تاک. تهران، مرکز نشر دانشگاهی. ۲۳.

۲ - باقری، ه.، آزادی، پ. ۱۳۸۱؛ کشت بافت گیاهی، تکنیک‌ها و آزمایش‌ها. مشهد، انتشارات جهاد دانشگاهی. ۲۷، ۳۰، ۳۸.

۳ - جعفرپور، ب.، جعفرپور، ب. ۱۳۷۷؛ ویروس شناسی گیاهی کاربردی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۳۶۸-۳۷۰.

۴ - خوشخوی، م.، ۱۳۷۷؛ فنون کشت بافت گیاهی برای گیاهان باغبانی. انتشارات دانشگاه شیراز.

۵ - کلاته جاری، س.، ۱۳۸۲؛ بررسی واکنش دو رقم انگور بیدانه سفید و شاهرودی به شرایط کشت درون شیشه ای، پایان نامه کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.

6. Barlass, M. and G. M. Skene. 1978; In vitro propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. Vitis. 17: 335-340.

7. Bass, P., E. Clog and B. Walter. 1988; Improvments in apex culture in vitis species. Acta Horticulturae. 227: 485-488.

8. Chee, R. and R. M. Pool. 1985; In vitro propagation of vitis:

www.SID.ir

جدول شـماره۵- مقایسـه میانگین اثرات متقابل نوع محیط کشـت و زمان نمونه گیری برطول گیاهک‌های حاصل از رشـد مریسـتم‌ها و تعداد گیاهک‌های قابل انتقال به مرحله پرآوری با استفاده از روش دانکن

نوع ترکیب هورمونی - زمان	میانگین طول گیاهک ها	تعداد گیاهک ها ی قابل لنتقال به مرحله پرآوری
0.5 BA- اواخر خرداد	۱/٤٦a	٤/۳۳a
0.5 BA- اواخر تیر	۱/۱d	۳ b
0.5 BA- اواخر مرداد	۱/۳۲ b	٤ a
0.5 BA +0.1 IBA- اواخر خرداد	۱/۱۷ c	٤/۸۳ a
0.5 BA +0.1 IBA- اواخر تیر	۰/۷۳ h	۳ b
0.5 BA +0.1 IBA- اواخر مرداد	۰/۸۷ f	٤/۳۳ a
1.0BA + 0.1 IBA- اواخر خرداد	۰/۹۸ e	۲/٦٦ bc
1.0BA + 0.1 IBA- اواخر تیر	۰/۷۲ h	۲/۳۳ bc
1.0 BA + 0.1 IBA- اواخر مرداد	۰/۸ q	۲/٥ bc
1.5 BA + 0.1 IBA- اواخر خرداد	۰/۷۹ g	۲/۳۳ bc
1.5 BA + 0.1 IBA- اواخر تیر	۰/٤٤ kl	۰/۸۳ e
1.5 BA + 0.1 IBA- اواخر مرداد	۰/٦۳ i	۱/۸۳ cd
1.0BA- اواخر خرداد	۰/۷۱ h	۳/۱٦ b
1.0BA- اواخر تیر	۰/٤۲ l	۱/۳۳ de
1.0 BA- اواخر مرداد	۰/٥٦g	۲/۸۳ b
1.5 BA- اواخر خرداد	۰/٦٥ i	۳/۱٦ b
1.5 BA- اواخر تیر	۰/۳٦ m	۰/۸۳ e
1.5 BA- اواخر مرداد	۰/٤۸ k	۲/۸۳ b

The effects of organic substances on shoot multiplication. Vitis. 24: 106-118.

9. Choi, S., J. Oh., J. Kim., D. Pak., S. Lee, and D. Choi. 1992;Studies on the grape meristem culture in vitro. 1. Factors affecting culture stablishment and shoot proliferation of ‘ Kyoho’ and ‘ S. 9110 ’ varieties by meristem culture in vitro. Research reports of the rural development administration, Biotechnology 34(2): 1-9. CAB abstracts.

10. Cholvadova, B. 1989; Cultivating of meristem culyure of grapevine (*Vitis vinifera* L.). Acta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Comenianae Physiologia Plantrum (24):31-44.

11. Compton, M. and D. Gray. 1995; Micropropagation of southern home hybride grape.107th annual meeting of the Florida state Horticultural Society Orlando. Florida. Proceeding of the Florida state Horticultural Society. 1994. Pub. 1995. 107: 308-310. CAB abstracts.

12. De Fossard, R. A. 1976. Tissue Culture for Plant Propagators. University of New England.

13. FAO. 2003. http: //faostat.fao.org/faostat.

14.Galletta, G. J. and D. J. Himerlic, 1989; Small fruit crop Management. Prentice Hall. New Jersey.

15. Gok, S. and F. Ergenoglu. 1997; Propagation of several grape varieties and rootstocks by meristem culture. Acta Hort. 441: 245-250.

16. Gomes, S., A. M. Periera and O. Pinto-Carnide. 2003. Effects of

www.SID.ir

culture medium on meristem differentiation and plant regeneration in *Vitis vinifera*. International Symposium on Grapevine. Portugal.Abstracts Nr.26.

17. Harris, R. E. and J. H. Stevenson, 1982; in vitro propagation of vitis. Vitis. 21:22-32.

18. Kebeli, N., T. Ozen., and Y. Boz . 1995; Investigation on the suitable combinations auxin and sytokinin for in vitro propagation of (*Vitis vinifera* L.) cv. Clairette. Viticulture Research Institute.

19. Kebeli N., Y. Boz and Y. Z. Gursoy. 1995; The research on the propagation with meristem culture of elite vine material from clonal selection studies. Viticulture Research Institute.

20. Knapp E., V. Hanzer., D. Mendonca., A. da Camara Machado., H. Katinger., and M. Laimer de Camara Machado. 1998; Improved virus detection in rosaceous fruit trees in vitro. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 52: 3-6.

21. Leonhardt, W., Ch. Wawrosch., A. Auer., and B. Kopp. 1998; Monitoring of virus diseases in Austrian grapevine varieties and virus elimination using in vitro thermotherapy. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 52: 71-74.

22. Maekawa, A., Y. Umemoto. and H. Yamashita. 1995; Elimination of viruses by meristem culture.3. Elimination of grapevine fanleaf virus. Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japon.

23. Meyerson, M., C. Benton. and D. Gray. 1995; A coparison of shoot micropropagation among bunch and Muscadina grape species and cultivars. Proceeding of the Florida state. Horticultural Society. 1078: 311-312. CAB abstracts.

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

25. Mulins, M. G., A. Bouquet. and L. E. Williams. 1992; Biology of the grapevine. 1th ed. Cambridge University Press.

26. Murashige J. and F. Skoog. 1962; A revised medium for rapid growth and bioassays with tobbaco tissue culture. Physiologia Plantarum 15:473-497.

27. Narayanaswamy, S. 1997; 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.

28. Novak, F. J., and Z. Juvona. 1982; Clonal propagation of grapevine through in vitro axillary bud culture. Scientia Horticulture. 18: 231-240.

29. Postman, J. D., and A. Hadidi. 1995; Elimination of apple scar skin viroid from pears by in vitro thrmotherapy and apical meristem culture. Acta Horticulture. 386: 536-543.

30. Raymond, C., R. M. Pool. and D. Bucher. 1984. A method for large scale in vitro propagation of vitis. New York,s Food and Life Sciences Bulletin.

31. Sheherbakova E., M. Mkrtumyan. and R. Butenko. 1988. Clonal micropropagation of grape. Biologya-kal tiviruemykh-kletok-I-Bioteknologiyal: 149. CAB abstracts.

32. Szegedi E. 1995. A review of the use of thermotherapy in viticulture to eliminate pathogens and pests from propagating material. Pesticide Science 45: 282-286.

33. Thies, K., and C. Graves. 1992. Meristem micropropagation protocol for *Vitis rotundifolia* michx. HortScience 27(5): 449. CAB abstracts.

34. Tomlinson, J. A.1982. Chemotherapy of plant viruses and virus diseases. In: Pathogens, vectors and plant diseases (ed. Harris K. F. and Maramorosch K.). Academic Press.London.Pp: 23-44.

35. Torregrosa, L., A. Bouquet. and P. G. Goussard. 2001. In vitro culture and propagation of grapevine. In: Roubeleakis-Angelakis K.A.(ed). Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine. Kluwer Academic Pub. Netherlands. Pp:281-326.

36. Walkey, D. G. A. and Webb M. J. W. 1970. Tubulor inclusion bodies in plants infected with viruses of the Nepo. J Gen Virol 7: 159-160.

Archive of SID

www.SID.ir