مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

بررسی اثر غلظت‌های مختلف تیمارهای هورمونی بر کشت درون‌شیشه‌ای انگور بیدانه قرمز

احسان نوروزی[1]، لطفعلی ناصری*[2]، رقیه نجف‌زاده[3]

[1 و 2] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و دانشیار علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

[3] استادیار گروه گیاهان دارویی و معطر، مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه، میاندوآب، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۰۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۱

چکیده

انگور بیدانه قرمز یکی از ارقام مهم و با کیفیت انگور در ایران می‌باشد که در سال‌های اخیر توسط کشاورزان مورد استقبال زیادی قرار گرفته است. با توجه به اهمیت تکثیر انبوه این گیاه و تولید نهال‌های سالم و به ویژه عاری از سرطان مو، در پژوهش حاضر اثر غلظت‌های مختلف تیمارهای هورمونی بر پرآوری و ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای رقم بیدانه قرمز با هدف ارائه دستورالعملی مناسب جهت تکثیر درون‌شیشه‌ای آن مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف بنزیل‌آمینوپورین (BAP) (۰/۲۵، ۰/۵۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌استیک‌اسید (IAA) برای پرآوری نمونه‌ها و از ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA) و نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) در غلظت‌های ۰، ۰/۸ و ۱/۶ میلی‌گرم در لیتر برای ریشه‌زایی نمونه‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. نتایج نشان داد که هورمون‌های مورد استفاده اثر معنی‌داری روی خصوصیاتی از قبیل تعداد گره، طول میانگره، تعداد شاخساره، طول و قطر شاخساره، وزن تر و خشک شاخساره، تعداد و سطح برگ، شاخص کلروفیل، تعداد و طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه در ریزنمونه‌ها داشت. بین غلظت‌های مورد استفاده این هورمون‌ها نیز تفاوت وجود داشت. بر اساس نتایج، بیشترین پرآوری نمونه‌ها در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و بیشترین تأثیر بر میزان ریشه‌زایی در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آمد. طبق این نتایج می‌توان از تیمارهای هورمونی مشخص شده جهت افزایش پرآوری و ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای در رقم بیدانه قرمز انگور استفاده نمود.

کلمات کلیدی: *انگور، ریزازدیادی، تیمارهای هورمونی، پرآوری، ریشه‌زایی.*

***نویسنده مسئول**: لطفعلی ناصری **تلفن**: ۰۹۱۴۴۴۷۷۴۹۲ Email: l.naseri@urmia.ac.ir

مقدمه

انگور با نام علمی (*Vitis vinifera* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات باغی جهان است که به لحاظ سطح زیرکشت و ارزش اقتصادی بالا، مورد کشت و کار قرار می‌گیرد. ارزش این محصول به دلیل تولید فرآورده‌های متنوع، بسیار بالا بوده و از این لحاظ نقش بسیار مهمی را در اقتصاد کشورهای تولید کننده آن ایفاء می‌کند (Zohouri, 2006). طبق گزارشات سازمان خواربار جهانی، میزان تولید جهانی انگور در سال ۲۰۱۵ تقریباً ۷۵ میلیون تن بوده است که کشور ایران با تولید ۲ میلیون و ۲۵۱ هزار تن، در دنیا جایگاه مهمی داشته و در بین ده کشور برتر تولید کننده انگور، رتبه دهم را به خود اختصاص داده است (FAO, 2017). از طرف دیگر از لحاظ سطح زیرکشت و میزان تولید در بین سایر محصولات درختی در ایران، انگور در جایگاه اول قرار دارد. ارقام بسیاری از انگور در کشور مورد کشت و کار قرار می‌گیرند که در این میان، رقم بیدانه قرمز یکی از ارقام بسیار مهم به لحاظ تازه‌خوری و نیز تولید کشمش است که محصول تازه و کشمش تهیه شده از آن کیفیت مطلوبی دارد. از طرف دیگر، جزء ارقام بومی استان آذربایجان‌غربی می‌باشد که در سال‌های اخیر توسط کشاورزان مورد استقبال زیادی قرارگرفته و انتظار می‌رود در آینده نیز سهم مهمی از تاکستان‌های جدیدالاحداث را به خود اختصاص دهد (Jalili-Marandi, 2003).

منابع ژنتیکی در کنار آب و خاک یکی از سه نهاده پایه‌ای تولید می‌باشد. حفاظت و بهره‌برداری مؤثر از آن جهت افزایش و پایداری تولید اهمیت زیادی دارد (Bakhtiari *et al*., 2016). تاکنون از تکنیک درون‌شیشه‌ای برای باززایی یا تکثیر بسیاری از گونه‌های گیاهی استفاده شده است (Zinhari *et al*., 2016). روش مرسوم تولید انگور، استفاده از قلمه است که در نتیجه تکثیر با این روش در صورت آلوده بودن بوته‌های مادری، آلودگی به نهال‌های دختری منتقل خواهد شد. بیماری سرطان مو ناشی از باکتری آگروباکتریوم (*Agrobacterium vitis*) از جمله بیماری‌های بسیار شایع باغات انگور است که هیچ تضمینی برای صحت و سلامت نهال‌های تولیدی حاصل از روش سنتی وجود ندارد. در این میان، ریزازدیادی انگور یکی از راه‌حل‌های موجود برای تولید نهال‌های سالم و به ویژه عاری از سرطان مو می‌باشد (Ashcan, 2008). تهیه مواد گیاهی سالم به عنوان پایه‌های مادری جهت ازدیاد گیاه مادری، مؤثرترین روش می‌باشد که به این منظور شیوه‌هایی چون کشت مریستم و گرمادرمانی استفاده می‌شود (Alizadeh, 2004). چرا که گیاهان تولید شده از مریستم معمولاً خصوصیات ژنتیک گیاهان مادری را به خوبی حفظ می‌کنند. پایداری بالای گیاهان تولید شده از

مریستم‌ها احتمالاً به واسطه یکنواختی بیشتر در ماهیت دیپلوئیدی سلول‌های انتهایی است و رشد و تمایز مریستم در محیط کشت نیز، تحت کنترل هورمون است. بنابراین، حضور هورمون جهت استقرار ریزنمونه‌ها و رشد مطلوب بعدی آن‌ها ضروری می‌باشد. در کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان، تنظیم‌کننده‌های رشد مخصوصاً اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها خیلی بارز هستند. در واقع می‌توان گفت که کشت درون‌شیشه‌ای بدون وجود تنظیم کننده‌های رشد غیرممکن است (Bakhshi-Khanikei & Farshadfar, 2005).

در این رابطه، ترکیبات هورمونی مختلف چون سیتوکینین‌ها به تنهایی یا همراه با اکسین‌ها با غلظت‌های مختلف جهت استقرار مریستم مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Aazami, 2010). بدین منظور از محیط کشت کامل MS یا رقیق شده آن با غلظت نصف نمک‌های ماکرو و محیط کشت WPM اصلاح شده در ریزازدیادی انگور استفاده شده است. در پژوهشی Kalatehjari (2004) گزارش کرد که علت پاسخ‌دهی بهتر ریزنمونه‌های رقم شاهرودی و بیدانه سفید انگور به محیط کشت MS در مقایسه با محیط کشت WPM در غلظت‌های هورمونی یکسان، نسبت زیاد عناصرغذایی و نیتروژن محیط کشت MS می‌باشد. طبق نتایج Haddad و همکاران (۲۰۰۸) بیشترین طول شاخساره رقم بیدانه سلطانی، ۱۸ روز پس از کشت ریزنمونه‌ها در محیط MS دارای ۲/۲ میکرومولار در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم IBA بدست آمد. در پژوهشی Ibanez *et al.* (2003) تأثیر سیتوکینین و واکشت را بر پرآوری انگور رقم ناپلئون بررسی نمودند و گزارش کردند که از بین سه نوع سیتوکینین بنزیل‌آدنین، ۲- ایزوپنتینیل‌آدنین و تیدیازورون، بنزیل‌آدنین پاسخ‌های مورفوژنیک بهتری را باعث شد. بخصوص غلظت‌های ۶/۶۷ و ۸/۹ میکرومولار منجر به درصد جوانه‌زنی ۱۰۰ درصدی و ضریب تکثیر بالا شد. کشت ریز قلمه‌ها در محیط دیگر، سرعت جوانه‌زنی و به مقدار زیادی تولید شاخه‌ها و جوانه‌های محوری را به ازای هر ریزنمونه تا سومین واکشت افزایش داد. اما از آن به بعد گیاهچه‌ها بشدت شیشه‌ای شده و دچار زوال شدند. در دیگر مطالعات نیز به بررسی اثر غلظت‌های مختلف هورمون‌ها در کشت درون‌شیشه‌ای ارقام مختلف انگور پرداخته شده است (Abido *et al.*, 2013; Banilas & Korkas, 2007; Butiuc-Keul *et al.*, 2009; Kalatehjari, 2004; Mharte *et al.*, 2000; Wang, 2009; Yerbolova *et al.*, 2013).

با توجه به اهمیت تکثیر انبوه این گیاه و تولید نهال‌های سالم و به ویژه عاری از سرطان مو، در پژوهش حاضر اثر غلظت‌های مختلف تیمارهای هورمونی بر پرآوری و ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای رقم بیدانه قرمز با هدف ارائه دستورالعملی مناسب جهت تکثیر درون‌شیشه‌ای آن و تعیین غلظت مناسب این هورمون‌ها برای تولید گیاهان عاری از سرطان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

قلمه‌های خشبی انگور رقم بیدانه قرمز در اوایل فصل بهار ۱۳۹۱ از یک باغ مشخص و مطمئن در شهرستان ارومیه جمع‌آوری شدند و پس از غوطه‌وری در قارچ‌کش (محلول بنومیل ۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه)، انتهای آن‌ها به مدت ۱۰ الی ۱۵ ثانیه در ایندول‌بوتیریک‌اسید (۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) آغشته گردیده و در بستر پرلایت در شرایط طبیعی گلخانه گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه قرار داده شدند. پس از گذشت ۲۰ الی ۳۰ روز، ریشه‌زایی کافی در این قلمه‌ها صورت گرفت. سپس این قلمه‌ها به گلدان منتقل شده و در شرایط مناسب تغذیه‌ای و رطوبتی جهت دستیابی به رشد کافی جهت گرفتن ریزنمونه در آزمایش‌های بعدی برای کشت درون‌شیشه‌ای آن‌ها در آزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی قرار داده شدند. ریزنمونه‌های مورد استفاده جوانه جانبی بودند که در شهریور ماه از گیاه جدا شدند و در الکل اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، کلریدجیوه ۰/۱ درصد به مدت ۳ دقیقه و هیپوکلریت‌سدیم دارای کلر فعال ۵ درصد به مدت ۷ دقیقه ضدعفونی شدند (Salami, 2005).

جهت دستیابی به غلظت مناسب هورمون سیتوکینین BAP برای پرآوری، غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌استیک‌اسید (IAA) در محیط کشت پایه MS مورد آزمایش قرار گرفتند (Dezhmpour *et al*., 2007). صفات اندازه‌گیری شده شامل تعداد گره، طول میانگره، تعداد شاخساره، طول و قطر شاخساره، وزن تر و خشک شاخساره، تعداد برگ، سطح برگ و شاخص کلروفیل پس از گذشت ۳۰ روز از رشد ریزنمونه‌ها بود (Aazami, 2010). بدین منظور تعداد گره، تعداد شاخساره و برگ تشکیل شده شمارش و یاداشت گردید. طول میانگره، طول و قطر شاخساره نیز توسط کولیس دیجیتال بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شدند. سطح برگ توسط دستگاه سطح‌سنج (Area Meter, AM 200, England) اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر مربع بیان شد. شاخص کلروفیل نیز توسط دستگاه کلروفیل‌متر (Konica Minolta 502, Japan) بر حسب شاخص SPAD اندازه‌گیری شد. وزن تر شاخساره نیز با استفاده از ترازوی حساس و وزن خشک توده گیاهی نیز بعد از قرار گرفتن گیاهک‌ها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد آون به مدت ۴۸ ساعت توسط ترازوی حساس اندازه‌گیری شد. برای تعیین غلظت مناسب هورمونی جهت ریشه‌دار کردن گیاهک‌های حاصل از آزمایش قبلی، هورمون‌های اکسین IBA و NAA در ۳ سطح ۰، ۰/۸ و ۱/۶ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت پایه MS استفاده شد (Hamidullah *et al*., 2013). صفات بررسی شده نیز شامل تعداد ریشه (از طریق شمارش)، طول ریشه (با استفاده از کولیس دیجیتال)، وزن تر ریشه (با استفاده از ترازوی حساس) و وزن

خشک ریشه (بعد از خشک شدن در آون ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت با استفاده از ترازوی حساس) پس از طی چهار هفته از رشد گیاهک‌ها بود (Hamidullah *et al*., 2013). لازم به ذکر است که کلیه محیط‌های کشت آماده شده در فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۱ دقیقه در اتوکلاو استریل شدند. نمونه‌های کشت شده نیز، در اتاق رشد با شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۵۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه قرار گرفتند.

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۶ تکرار و هر تکرار شامل یک ظرف شیشه‌ای با دو ریزنمونه گیاهی انجام گرفت. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (Ver: 9.1) انجام گرفت. بدین منظور آزمون نرمال بودن داده‌ها به روش میانگین‌گیری در نرم‌افزار Excel 2010 انجام گرفت. برای مقایسه میانگین از آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT) در سطح احتمال ٪۵ استفاده شد. جهت رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel 2010 استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که هورمون‌های BAP، IBA و NAA اثر معنی‌داری روی خصوصیات مورد مطالعه در نمونه‌های حاصل از کشت درون شیشه‌ای انگور داشت ($P\leq0.01$) (جدول ۱ و ۲).

همچنین بین غلظت‌های مورد استفاده این هورمون‌ها نیز تفاوت وجود داشت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت BAP تعداد گره تشکیل شده در نمونه‌ها کاهش یافت، طوری که در تیمارهای دارای غلظت پایین BAP تعداد گره بیشتری به دست آمد. طبق این نتایج، بیشترین تعداد گره در غلظت ۰/۲۵ (۱۵/۶۶ گره) و پس از آن در غلظت‌های ۰/۵۰ و ۱ میلی‌گرم در لیتر (به ترتیب ۱۲/۸۳ و ۱۳/۵۰ گره) در مقایسه با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (۸/۶۶ گره) به دست آمد. بیشترین طول میانگره نیز در گیاهک‌های تولید شده از تیمارهای حاوی ۰/۲۵ و ۰/۵۰ میلی‌گرم در لیتر BAP (به ترتیب ۰/۵۷ و ۰/۵۰ میلی‌متر) به دست آمد (شکل ۱).

تعداد شاخساره‌های به دست آمده نیز در غلظت‌های مختلف BAP متفاوت بود، طوری که بیشترین تعداد شاخساره در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر (۳/۶۶ شاخساره) و کمترین آن در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (۲/۱۶ شاخساره) مشاهده شد.

همچنین طول و قطر شاخساره به وجود آمده نیز در غلظت‌های مختلف BAP متفاوت بود، طوری که بیشترین این مقادیر در غلظت‌های ۰/۲۵ (به ترتیب ۱۶/۲۷ و ۱/۷۰ میلی‌متر) و ۰/۵۰ (به ترتیب ۱۶/۲۳ و ۱/۷۲ میلی‌متر) میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد (شکل ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر پرآوری درون‌شیشه‌ای انگور رقم بیدانه قرمز

Table 1- Variance analysis of the effects of various concentrations of BAP hormone on *in vitro* proliferation in Red Seedless grape

		Mean square میانگین مربعات									
منبع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	تعداد شاخساره Shoots number	طول شاخساره Shoots length	شاخص کلروفیل Chlorophyll index	سطح برگ Leaf area	تعداد برگ Leaf number	تعداد گره Node number	وزن تر شاخساره Shoots fresh weight	وزن خشک شاخساره Shoots dry weight	طول میانگره Nodal length	قطر شاخساره Shoots diameter
تیمار Treatment	3	2.7**	28.07**	45.24**	3879.4**	51.44**	51.44**	0.025*	0.006*	1.44**	0.141**
تکرار Repeat	5	0.275ns	0.78ns	1.24ns	4490.3ns	0.566ns	0.566ns	0.569ns	0.006ns	0.001ns	0.051ns
اشتباه آزمایشی Error	15	0.341	0.983	1.051	3343.8	2.144	2.144	0.006	0.001	0.085	0.026
ضریب تغییرات (cv) Coefficient of variation	-	20.33	6.87	9.17	10.17	11.56	11.56	16.61	17.91	19.02	9.92

ns، *، **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطوح ۵ درصد و ۱ درصد.

ns, *, **: Not significant, significant at p≤0.05 and p≤0.01, respectivly

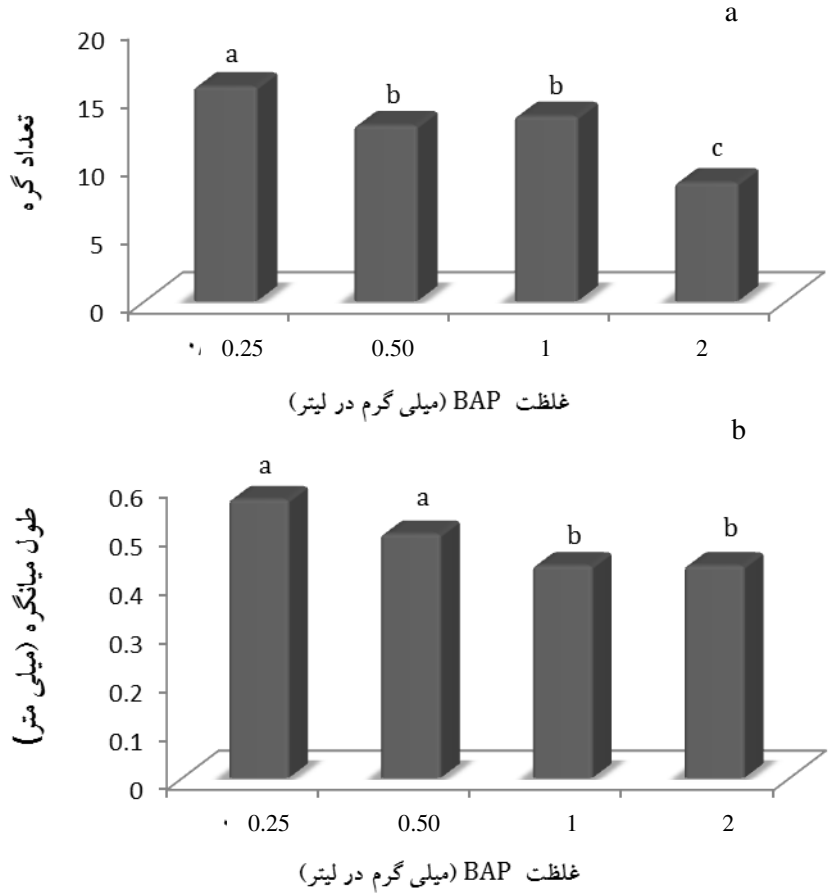
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر غلظت هورمون‌های مختلف بر ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای انگور رقم بیدانه قرمز

Table 2- Variance analysis of the effects of various hormones concentrations on rooting in Red Seedless grape

	Mean square	میانگین مربعات				
طول ریشه Root length	تعداد ریشه Root number	وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن تر ریشه Root fresh weight	درجه آزادی Degree of freedom	منبع تغییرات Source of variation	
2.18^{ns}	0.577^{ns}	0.009^{ns}	0.036^{ns}	5	تکرار Repeat	
61.43**	58.77**	0.007**	0.11*	1	نوع هورمون Type of hormone	
720.36**	263.11**	0.701**	3.17**	2	سطوح هورمون Level of hormone	
330.1**	67.11**	0.49**	2.27**	2	نوع هورمون × سطوح هورمون Type of hormone × Level of hormone	
1.11	1.49	0.005	0.016	25	اشتباه آزمایشی Error	
برش‌دهی اثرات متقابل: نوع هورمون × سطوح هورمونی LSMEANS Test: Type of hormone × Level of hormone						
624.09**	294.00**	0.606**	2.94**	2	IBA hormone	هورمون IBA
426.37**	36.22**	0.635**	2.50**	2	NAA hormone	هورمون NAA
5.19	12.37	14.37	11.74	-	ضریب تغییرات (cv) Coefficient of variation	

^{ns}، *، **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطوح ۵ درصد و ۱ درصد.

^{ns}, *, **: Not significant, significant at p≤0.05 and p≤0.01, respectivly

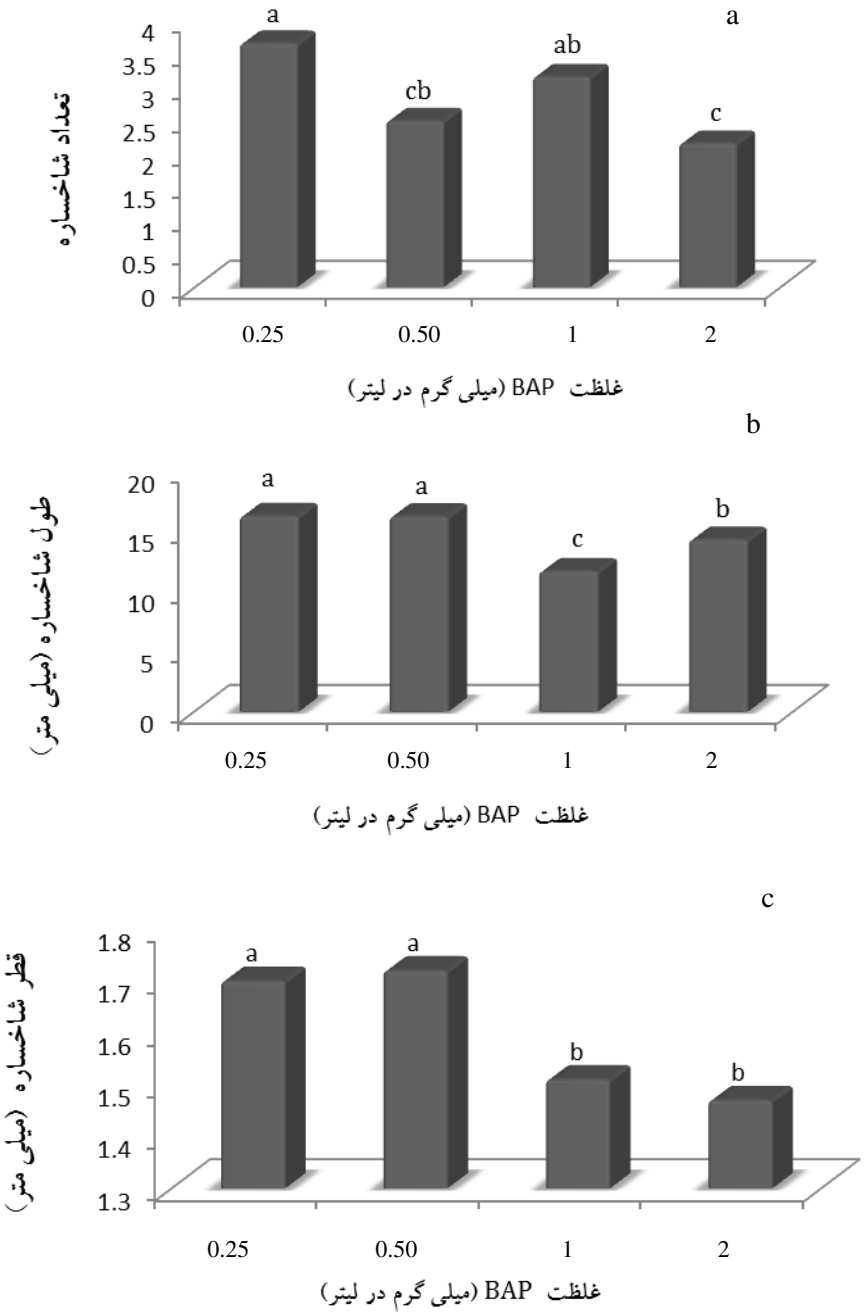


شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر تعداد گره (a) و طول میانگره (b) در ریزنمونه‌های انگور رقم بیدانه قرمز. † ستون‌های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ٪۵ دارند.

Figure 1- The effects of various concentrations of BAP hormone on node number (a) and nodal length (b) in Red Seedless grape explants. † Columns with different superscripts are significantly different at P≤0.05.

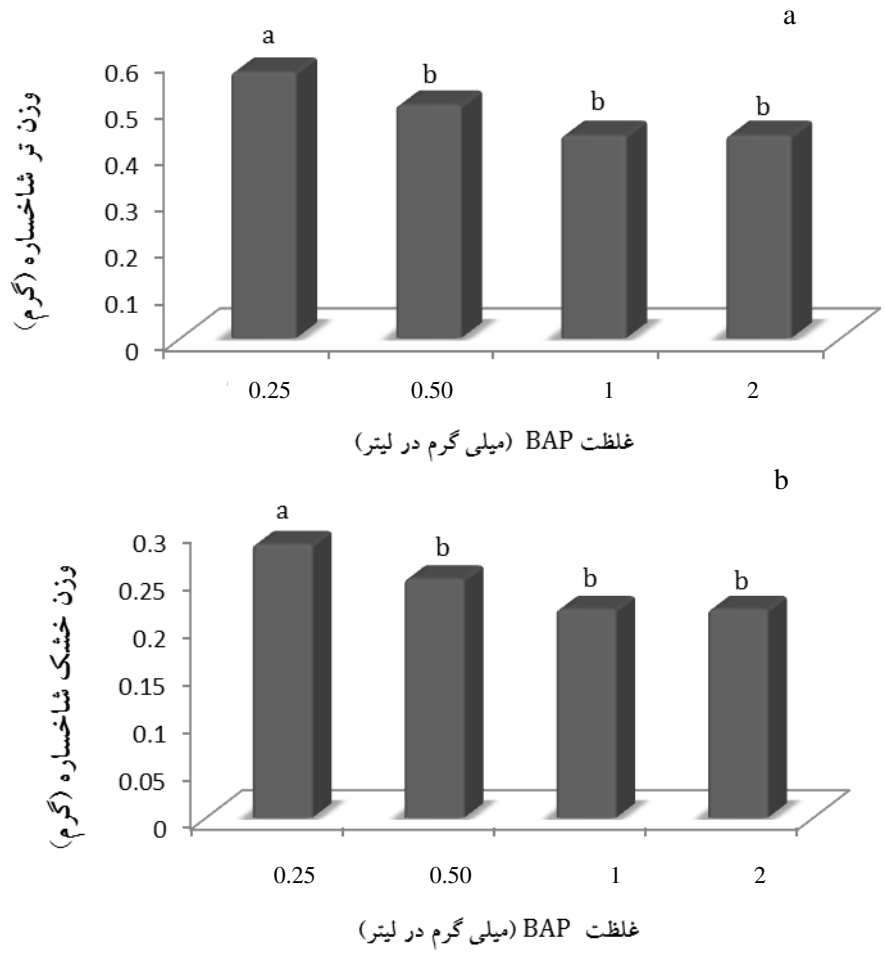
وزن تر و خشک شاخساره نیز در غلظت‌های مختلف BAP متفاوت بود، به طوری که بیشترین این مقادیر در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (به ترتیب ۰/۵۷ و ۰/۲۸ گرم) مشاهده شد. بین سایر غلظت‌ها نیز از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳).

چنانکه در شکل ۴ مشاهده می‌شود، بیش‌ترین تعداد برگ نیز در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (۳۸/۸۳ برگ) به دست آمد. همچنین بیشترین سطح برگ در غلظت‌های ۰/۲۵ (۲۰۵۲/۵۰ میلی‌مترمربع)، ۰/۵۰ (۱۸۳۲/۳۰ میلی‌مترمربع) و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP (۱۸۵۶/۷۰ میلی‌مترمربع) به دست آمد. همچنین بیشترین میزان کلروفیل در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP (۱۵/۲۳ SPAD) مشاهده شد. بین سایر غلظت‌ها از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.



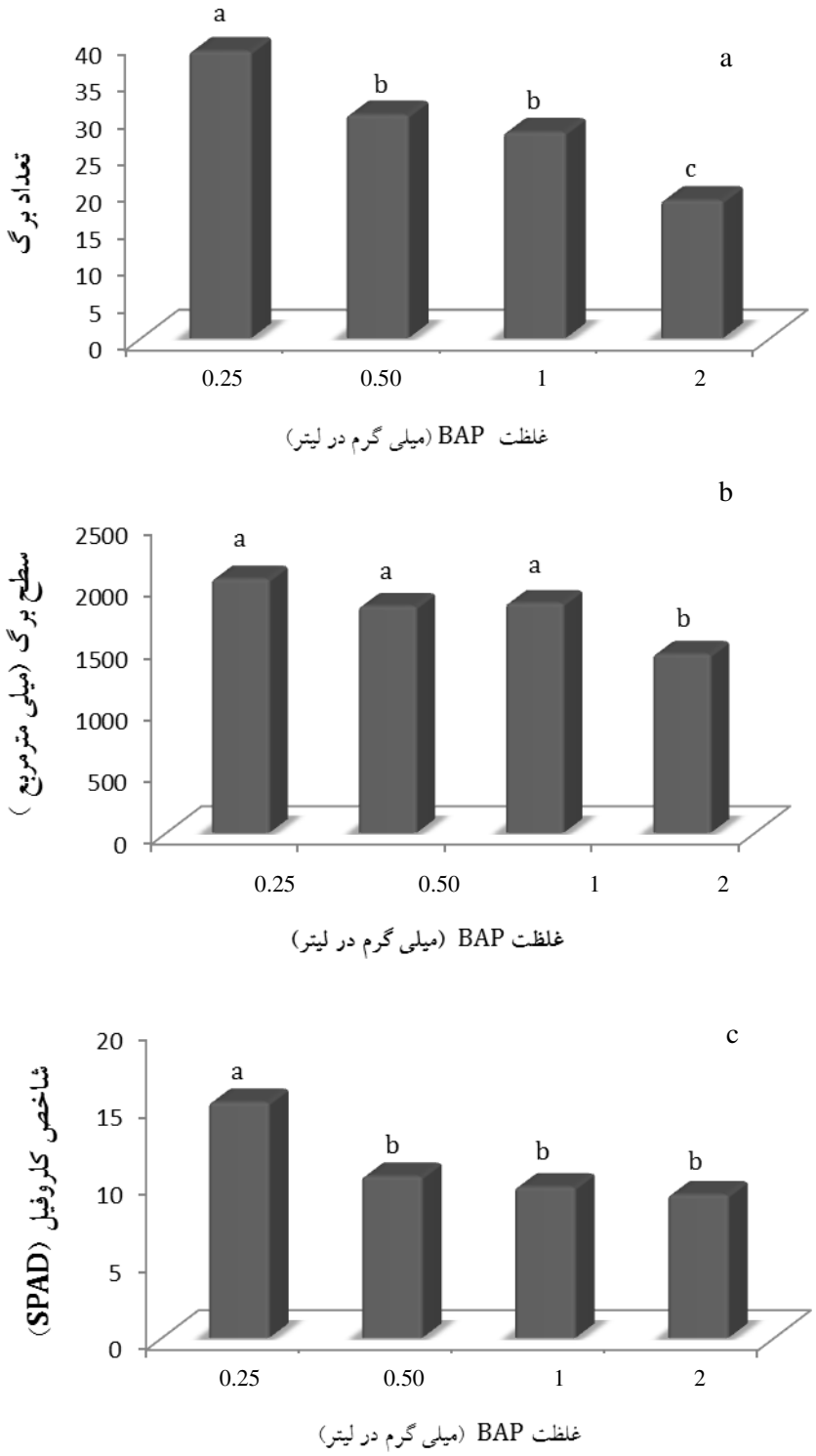
شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر تعداد (a)، طول (b) و قطر (c) شاخساره در ریزنمونه‌های انگور رقم بیدانه قرمز. † ستون‌های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ٪۵ دارند.

Figure 2- The effects of various concentrations of BAP hormone on shoots number (a), length (b) and diameter (c) in Red Seedless grape explants. † **Columns with different superscripts are significantly different at P≤0.05.**



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر وزن تر (a) و خشک (b) شاخساره در ریزنمونه‌های انگور رقم بیدانه قرمز. † ستون‌های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ دارند.

Figure 3- The effects of various concentrations of BAP hormone on shoots fresh (a) and dry weight in Red Seedless grape explants. † **Columns with different superscripts are significantly different at P≤0.05.**



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر تعداد برگ (a)، سطح برگ (b) و شاخص کلروفیل (c) در ریزنمونه‌های انگور رقم بیدانه قرمز. † ستون‌های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ٪۵ دارند.

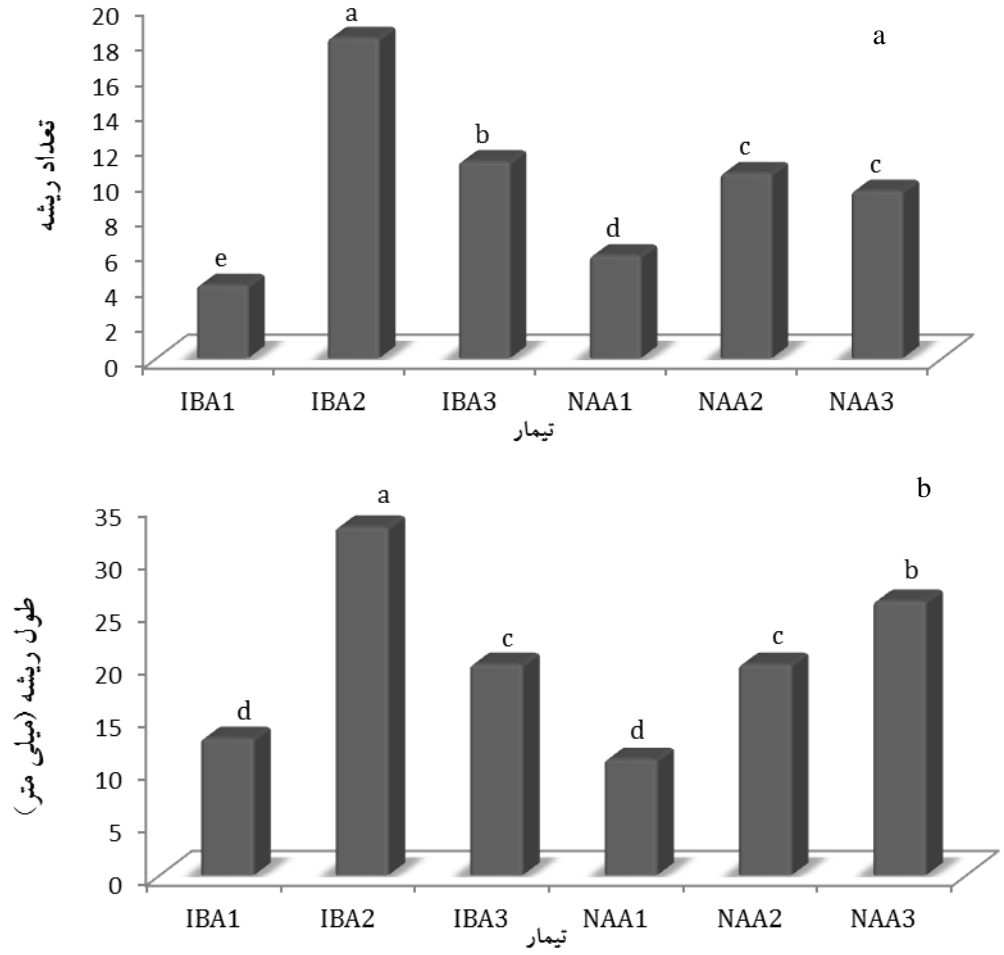
Figure 4. The effects of various concentrations of BAP hormone on leaf number (a), leaf area (b) and chlorophyll index (c) in Red Seedless grape explants. † **Columns with different superscripts are significantly different at P≤0.05.**

طبق این نتایج از بین چهار غلظت هورمون BAP مورد آزمایش، غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر بیشترین اثر را بر صفات مختلف اندازه‌گیری شده داشت. طوری که بیشترین تعداد گره، طول میانگره، تعداد شاخساره، طول و قطر شاخساره، وزن تر و خشک شاخساره، تعداد برگ، سطح برگ و شاخص کلروفیل در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد. اگرچه غلظت‌های ۰/۵۰ و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP نیز دارای بیشترین طول میانگره، طول و قطر شاخساره، تعداد برگ و سطح برگ بودند، اما غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به دلیل دارا بودن بیشترین صفات مورد مطالعه، غلظت مناسب و باصرفه‌ای جهت پرآوری ریزنمونه‌های انگور رقم بیدانه قرمز می‌باشد. آنچه که مسلم است غلظت‌های مختلف BAP تأثیر متفاوتی در رشد و نمو ریزنمونه خواهند داشت. هورمون BAP از جمله تنظیم‌کننده‌های محرک رشد و تکثیر شاخه با قدرت ماندگاری بالا می‌باشد (Bakhshi-Khanikei & Farshadfar, 2005).

مطالعات پیشین به خوبی نشان داده است که BAP مؤثرترین هورمون سیتوکینین برای تحریک توسعه شاخه در گونه‌ها و ارقام جنس *Vitis* است (Lazo *et al*., 2016). در پژوهشی Kalatehjari (2004) گزارش نمود که انگور رقم شاهرودی در حضور سیتوکینین به همراه اکسین بهترین نتایج پرآوری را داشت. در پژوهشی دیگر Zhang *et al*. (2011) در تحقیقی دیگر اعلام نمودند که سیتوکینین به همراه اکسین در ارقام انگور بهترین نتایج پرآوری را داشت است. این نتایج با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. با توجه به اینکه شیشه‌ای‌شدن یا ویتریفیکاسیون (Vitrification) یکی از مسایل نامطلوب و معمول در ریزافزایی است که گیاهچه‌های دارای این عارضه، ظاهر آبکی، شفاف و اغلب دارای ساقه و برگ‌های باد کرده می‌باشند. بنابراین، احتمال موفقیت در استفاده از این گیاهچه‌ها برای فرآیند تکثیر، کم است (Bakhshi-Khanikei & Farshadfar, 2005). به دلیل اینکه هورمون سیتوکنین باعث تقسیم سلولی، حفظ پروتئین‌ها و کلروفیل می‌شود، در نتیجه با کاربرد بهینه هورمون BAP می‌توان ریزنمونه‌های با کیفیت بالایی بدست آورد. به این دلیل تقسیم سلولی بیشتر باعث افزایش سطح برگ، طول و قطر شاخه شده است. اما افزایش غلظت BAP و تقسیم سلولی بیشتر، از رشد قطری شاخساره جلوگیری می‌کند. در این پژوهش پدیده شیشه‌ای شدن فقط در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد، به طوری که در تکثیر درون شیشه-ای انگور رقم Agiorgitiko نیز گزارش شده است که افزایش سطوح BAP میزان شیشه‌ای - شدن را به شدت افزایش داد (Banilas & Korkas, 2007) که با نتایج پژوهش ما همخوانی دارد. با این حال مطالعات پیشین نشان داده است

که غلظت‌های بالاتر BAP باعث شیشه‌ای‌شدن گیاهچه‌ها و تولید شاخه‌های کوتاه‌تر و دارای حالت جاروی می‌شود. به نظر می‌رسد که ارتباط مستقیم بین افزایش سطوح سیتوکینین و شیشه‌ای-شدن به علت تقسیمات سریع سلولی و جذب بیش از حد آب می‌باشد (Banilas & Kokas, 2007). در پژوهشی Esnaashari et al. (2007) اعلام کردند که با در نظر گرفتن نقش شناخته شده اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و جیبرلین‌ها در رشد و تقسیم سلولی و نتایج بی‌شمار کاربرد تیمارهای هورمونی که از طریق تأثیرگذاری بر غلظت هورمون‌های درونی نقش خود را ایفاء می‌کنند. می‌توان چنین اظهار نظر نمود که هر ژنوتیپ دارای مقادیر خاصی از هورمون‌های درونی بوده و غلظت تیمارهای به کار گرفته شده بیشترین تأثیر را در چگونگی عملکرد و واکنش هورمون-های درونی نسبت به آنها دارد. با توجه به اینکه، یکی از روش‌های حفظ تعادل متابولیسمی گیاهان در غلظت‌های بالا، ممانعت از عمل و یا حتی تجزیه هورمون می‌باشد، اثر قطعی برهمکنش اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها با سایر هورمون‌های درونی در مراحل پایانی رشد و نمو، همانند اسید آبسیزیک، اتیلن و جیبرلین‌ها به اثبات رسیده است. از این پژوهش نتیجه گرفته می‌شود که کاربرد ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BAP میزان قابل قبولی از پرآوری شاخه را همراه با حداقل میزان شیشه‌ای‌شدن ایجاد نموده است که این می‌تواند به دلیل تقسیم سلولی مناسب باشد که این خود نیز، باعث جذب آب، مواد کربوهیدراتی و معدنی به مقدار لازم می‌شود. در نتیجه، گیاهچه‌های حاصل شده از این طریق کیفیت بهتر، شکل ظاهری بهتر، توسعه سطح برگ و کلروفیل بهتری را در پی دارند. بنابراین، کاربرد سطوح پایین‌تر BAP (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) را می‌توان برای پرآوری شاخه انگور رقم بیدانه قرمز پیشنهاد کرد که با نتایج (Banilas & Korkas, 2007) در پژوهش بر ارقام دیگر انگور نیز مطابقت دارد.

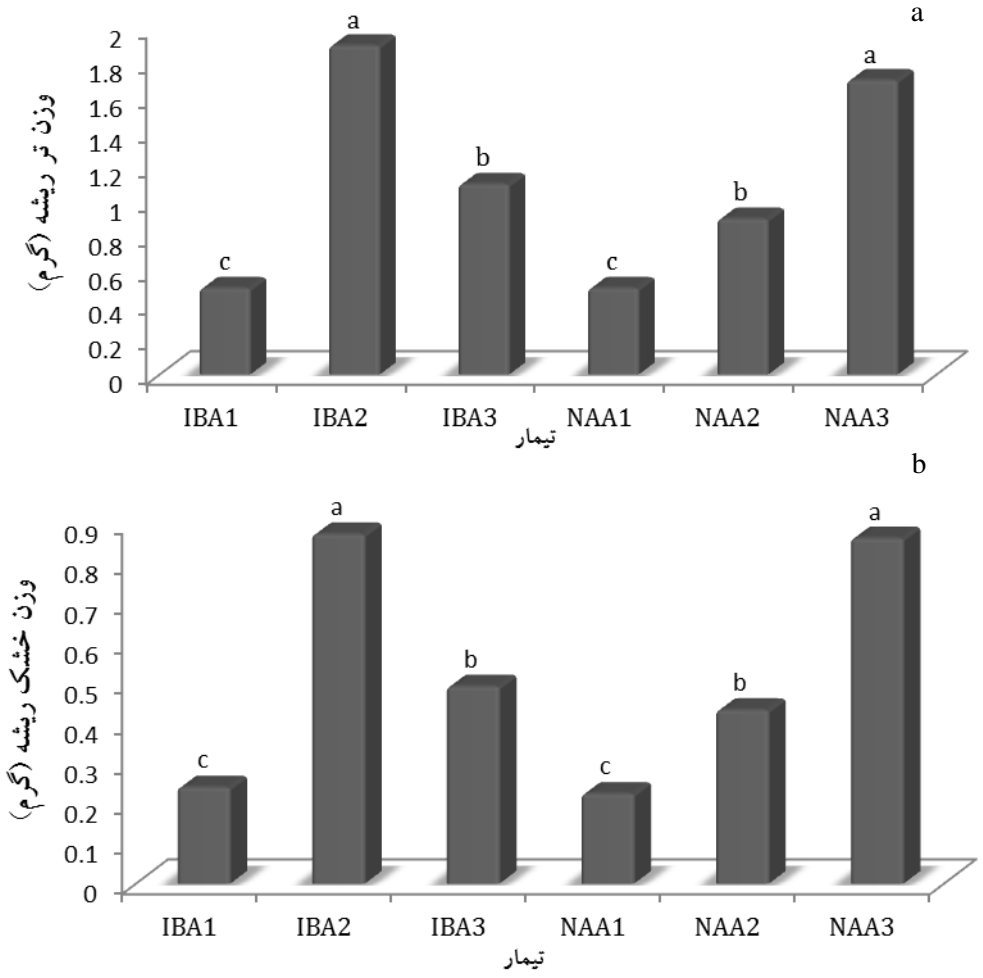
بر اساس نتایج به دست آمده، هورمون IBA از نظر تولید تعداد ریشه نسبت به هورمون NAA در وضعیت بهتری قرار داشت، طوری که بیشترین تعداد ریشه در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA (۱۸/۱۶ ریشه) به دست آمد. همچنین کمترین تعداد ریشه در تیمار شاهد IBA (۴/۱۶ ریشه) مشاهده شد. بین غلظت‌های ۰/۸ و ۱/۶ میلی‌گرم در لیتر NAA نیز از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. طول ریشه به دست آمده نیز در غلظت‌های مختلف IBA و NAA متفاوت بود، به طوری که بیشترین طول ریشه در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر IBA (۳۳ میلی‌متر) به دست آمد. کمترین طول ریشه نیز در تیمار شاهد این دو هورمون مشاهده شد (شکل ۵). مراحل کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های انگور رقم بیدانه قرمز در شکل ۷ آمده است.



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف هورمون IBA و NAA بر تعداد (a) و طول (b) ریشه در ریزنمونه‌های انگور رقم بیدانه قرمز. IBA1: شاهد، IBA2: ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر، IBA3: ۱/۶ میلی‌گرم در لیتر، NAA1: شاهد، NAA2: ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر و NAA3: ۱/۶ میلی‌گرم در لیتر، † ستون‌های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ٪۵ دارند.

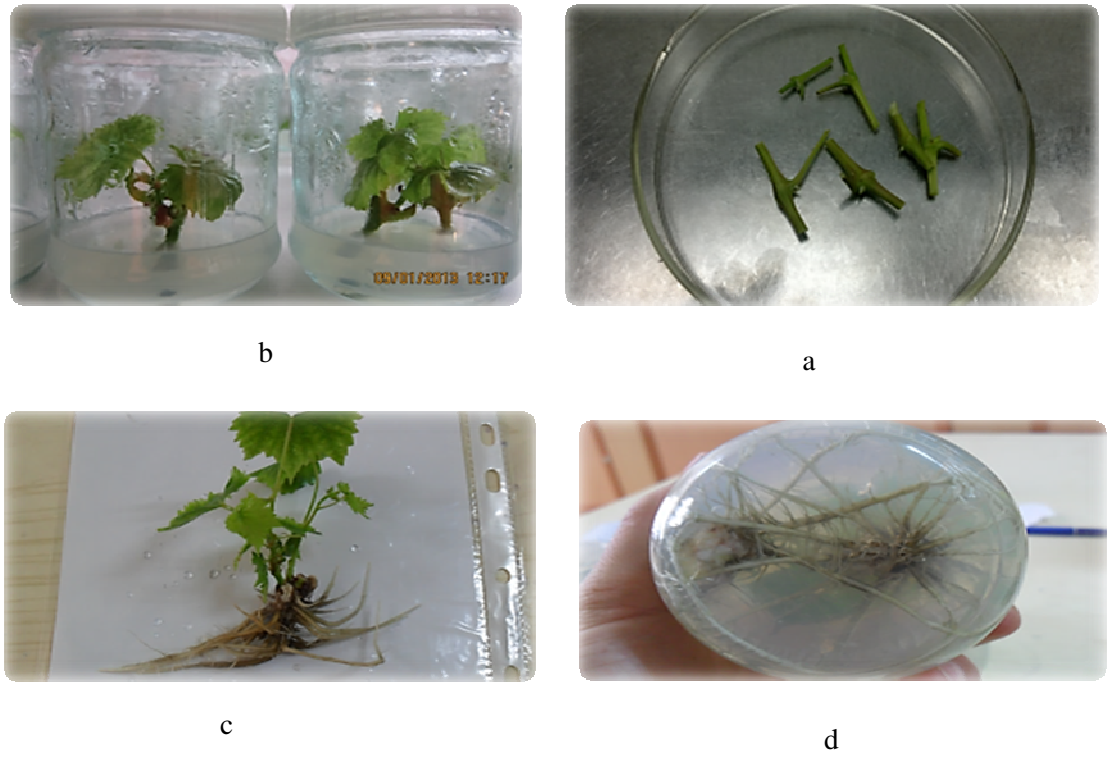
Figure 5- The effects of various concentrations of IBA and NAA hormones on root number. (a) and length (b) in Red Seedless grape explants. IBA1: control, IBA2: 0.8 mg L^{-1}, IBA3: 1.6 mg L^{1}, NAA1: control, NAA2: 0.8 mg L^{-1}, and NAA3: 1.6 mg L^{-1}, † Columns with different superscripts are significantly different at P≤0.05.

چنانکه در شکل ۶ مشاهده می‌شود، بیشترین وزن تر و خشک ریشه مربوط به دو غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر IBA (به ترتیب ۱/۹۰ و ۰/۸۷ گرم) و ۱/۶ میلی‌گرم در لیتر NAA (به ترتیب ۱/۷۰ و ۰/۸۶ گرم) بود. کمترین این صفات نیز در تیمار شاهد این دو هورمون مشاهده شد.



شکل ۶- اثر غلظت‌های مختلف هورمون IBA و NAA بر وزن تر (a) و خشک (b) ریشه در ریزنمونه‌های انگور رقم بیدانه قرمز. IBA1: شاهد، IBA2: ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر، IBA3: ۱/۶ میلی‌گرم در لیتر، NAA1: شاهد، NAA2: ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر و NAA3: ۱/۶ میلی‌گرم در لیتر، † ستون‌های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ دارند.

Figure 6- The effects of various concentrations of IBA and NAA hormones on root fresh (a) and dry (b) weight in Red Seedless grape explants, IBA1: control, IBA2: 0.8 mg L^{-1}, IBA3: † Columns with different superscripts are significantly different at P≤0.05.



شکل ۷- مراحل کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های انگور رقم بیدانه قرمز. a: ریزنمونه، b: پرآوری ریزنمونه‌ها، c: ریشه‌زایی و d: گیاه کامل.

Figure 7- The steps of in vitro culture of in Red Seedless grape explants a: Explant, b: Proliferation of explants, c: Rooting, d: Complete plant.

با توجه به اینکه در سال‌های اخیر اکثر توجه‌ها به سوی روش‌های ارزان و سریع در پروسه‌های ریزازدیادی معطوف شده است، ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای روش مناسبی جهت کاهش هزینه‌های ریزازدیادی و مدت زمان پروسه تولید است. از طرف دیگر، در هر سیستم ریزازدیادی انتقال از محیط درون‌شیشه‌ای به محیط گلدانی و سازگاری، یک فرایند مهم و اغلب محدودکننده می‌باشد. چندین عامل در بقاء ریزقلمه‌ها و موفقیت فرایند انتقال از یک مرحله با ویژگی هتروفیک به وضعیت کاملاً اتوتروف دخیل می‌باشند. اندازه ریزقلمه‌ها اغلب قدرت و توانایی آن‌ها را در تحمل استرس‌های دوره سازگاری تحت تأثیر قرار می‌دهد و رطوبت نسبی محیط کشت نیز، پسابیدگی گیاهچه‌ها را تا زمانی که ساختار کوتیکولی برگ‌ها به اندازه کافی توسعه یافته و ضخیم‌تر شوند، تحت تأثیر قرار می‌دهد. سلول‌های تمایزیافته نیاز به نوع و غلظت مناسبی از اکسین دارند تا بتوانند به علایم و سیگنال‌های ارگانوژنیک پاسخ دهند. در این میان، برگ‌ها یکی از منابع سازنده اکسین هستند و می توان گفت با افزایش سطح برگ، سنتز درونی اکسین افزایش می‌یابد که این به نوبه خود باعث افزایش تعداد و طول ریشه‌ها می‌شود. اکسین‌ها

در تحریک تقسیم سلولی، افزایش طول سلول‌ها، تحریک آغازیدن ریشه، تمایزیابی بافت‌های آوندی و افزایش حرکت مواد در آوندها نقش دارند. البته هورمون IBA نسبت به NAA در ریشه‌زایی مؤثر می‌باشد. همچنین وجود ریشه فرعی، جذب آب و مواد غذایی را افزایش داده و تنش‌های به وجود آمده در اثر آب از دست‌دهی گیاهان را در مرحله سازگاری کم می‌کند (Bakhshi-Khanikei & Farshadfar, 2005).

طبق این نتایج، از بین هورمون‌های اکسینی مورد استفاده هورمون IBA با غلظت ۰/۸ میلی-گرم در لیتر بیشترین اثر را بر صفات تعداد ریشه، طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه داشت. در بیشتر تحقیقات انجام گرفته در زمینه ریزازدیادی انگور، اغلب ریشه‌زایی به صورت درون‌شیشه‌ای آزمایش شده است (Jalili-Marandi, 2003; Mharte *et al*., 2000 Wang, 2009). در پژوهشی Abido *et al*. (2013) ریشه‌زایی انگور رقم Alexandria را در محیط کشت MS با غلظت‌های متفاوت IBA و NAA بررسی کردند و بیشترین میزان ریشه‌زایی را در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به دست آوردند. سایر محققان (Butiuc-Keul *et al*., 2009) نیز گزارش کردند که IBA بیشترین تأثیر را در ریشه‌زایی درون‌شیشه‌ای انگور رقم Perlette داشت. در سایر مطالعات نیز گزارش شده است که انگور رقم Agiorgitik بهترین نتایج ریشه‌زایی را در محیط کشت MS با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA داشت. همچنین ریشه‌هایی که در حضور NAA به خصوص در غلظت‌های بالا به وجود آمده بودند، متورم و شکننده بودند و برخلاف آن، ریشه‌هایی که در حضور IBA به وجود آمده بودند، وضعیت طبیعی‌تری داشتند (Banilas & Korkas, 2007). نتایج این مطالعات با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

انگور یک محصول استراتژی مهم باغبانی دنیا می‌باشد که به لحاظ سطح زیرکشت و ارزش اقتصادی بالا، بیشتر مورد کشت و کار قرار می‌گیرد. با توجه به این که امروزه روش‌های تکثیر انگور اکثراً سنتی بوده و از عواقب این روش تکثیر، می‌توان به انتقال آلودگی، عملکرد پایین، محدودیت‌های زمانی تکثیر و هزینه زیاد نام برد، بنابراین توسعه روش‌های کشت درون-شیشه‌ای این محصول مهم از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP جهت پرآوری و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر IBA جهت ریشه‌زایی رقم بیدانه قرمز انگور موفقیت‌آمیز بود.

منابع

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

Abido AS, Aly MM, Hassanen AS Rayan AG (2013). *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) Muscat of Alexandria cv. for conservation of endangerment. Middle-East Journal of Scientific Research 13: 328-337.

Alizadeh A (2004). Preliminary collection and identification of local cultivars of grapevine in West Azarbaijan province. Seed and Plant 20: 1-21.

Ashcan M (2008). Important disease of fruit trees in Iran. University Publication Center, Tehran, 384 p (In Persian).

Bakhshi-Khanikei GH, Farshadfar M (2005). Basic Principles of Biotechnology and Plant Culture. Payam Noor University (PNU), Tehran, 339 p (in Persian).

Bakhtiari F, Mozafari J, Abdollahi H (2016). A study on growth, propagation and rooting of Iranian native pears for developing *in vitro* conservation system. Journal of Agricultural Biotechnology 8: 17-34 (in Persian).

Banilas G, Korkas E (2007). Rapid micropropagation of grapevine cv. Agiorgitiko through lateral bud development. Journal of Science and Technology 42: 31-38.

Butiuc-Keul AL, Cotse A, Bcraaciunaa A, Halmagyl A, Deliu F, Iliescu M, Iuoras R (2009). *In vitro* clonal propagation of several grapevine cultivars. Acta Hortclturae (ISHS) 83: 151-156.

Dezhmpour J, Garigurian, V, Majidi E, Asgharzadeh N (2007). Sterilization, establishment and proliferation of some prunus interspesific hybrids for *in vitro* culture. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 8: 165-174 (In Persian).

Esnaashari M, Gholami M, Almasi P (2007). Grape Biology. In: Mycle JM (eds.). Bu-Ali Sina University. 244 p (in Persian).

Evers PW, Donkers J, Prat A, Vermeer E (1988). Micropropagation of forest trees through tissue culture, p. 98-102. In: J.M. Bonga and P. Aderkas (eds.), *In vitro* culture of trees. Centre for Agricultural Publishing and Documentation.

Food and Agriculture Organization (2017). Grapes production in 2015 mostly based on FAOSTAT. Available online 4 August, from http://www.faostat.fao.org.

Haddad R, Garousi G, Ghannadnia M (2008). Response of grape explants (cv. Bidaneh Soltani) to different culture media. JWSS - Journal of Water and Soil Science 12: 551-558 (In Persian).

Hamidullah I, Syanal MM, Upadhyay S, Ahuja P, Mir H (2013). *In vitro* plant regeneration of grape cv. 'Perlette' axillary bud and shoot tip explants. Indian Journal of Horticulture 70: 185- 189.

Ibanez, A, Valero M, 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.

Jalili-Marandi R (2003). Small fruits. Academic Center for Education Culture and Research of West Azarbaijan Urmia (In Persian).

Kalatehjari S (2004). Evaluation of responses of two grape cultivars 'White Seedless' and 'Shahroodi' on *in vitro* culture conditions. Iranian Journal of Agricultural Sciences 2: 205-215 (In Persian).

Lazo-Javalera MF, Troncoso-Rojas R, Tiznado-Hernández ME, Martínez-Tellez MA, Vargas-Arispuro I, Islas-Osuna MA, Rivera-Domínguez M (2016). Surface disinfection procedure and *in vitro* regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. Doi: 10.1186/s40064-016-2081-0.

Mharte M, Salunkhe CK, Rao PS (2000). Micropropagation of *Vitis vinifera* L.: towards an improved protocol. Scientia Horticulture 84: 357-363.

Salami A, Ebadi A, Zamani Z, Ghasemi M (2005). Improvement in apex culture in an Iranian grapevine (*Vitis vinifera* L. 'Bidaneh Sefid') through fragmented shoot apices. International Journal of Agriculture and Biology 3: 333-336.

Wang KYI (2009). *In vitro* culture of 'dog ridge' grapevine. MSc thesis. Texas A and M University. Texas, USA.

Yerbolova SL, Ryabushkina AN, Oleichenko NS, Oleichenko AG, Galiakparov NN (2013). The effect of growth regulators on *in vitro* culture of some *Vitis vinifera* L. Cultivars World Applied Sciences Journal 23: 76-80.

Zhang P, Zhi-Ying Y, Zong-Ming CH, Zhen Z, Jian-Min T (2011). *In vitro* explants regeneration of the grape 'Wink' (*Vitis vinifera* L. 'Wink'). Journal of Plant Breeding and Crop Science 3: 276-282.

Zinhari Z, Pourseyedi SH, Zolala J (2016). Callus induction and direct shoot regeneration in *Lepidium draba* L. explants. Journal of Agricultural Biotechnology 8: 31-52 (in Persian).

Zohouri M (2006). Grapevine guide. Agricultural Research and Education Organization, Tehran (in Persian).

Effects of various concentrations of hormonal treatments on *In vitro* culture of red seedless grape

Norouzi E.[1], Naseri L.[2*], Najafzadeh R.[3]

[1,2] M.Sc Graduate and Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Medicinal Plants, Higher Education Center Shahid Bakeri Miyandoab, Urmia University, Miyandoab, Iran.

Abstract

Red Seedless grape is one of the most important and qualitative Iranian grape varieties which has been welcomed by farmers recently. Given the importance of the mass propagation of this plant, producing healthy seedlings, and particularly free of grapevine crown gall disease or cancer, in the present study the effects of various hormonal concentrations treatments were studied on proliferation and rooting of red seedless grape, with the aim of giving a suitable instruction for in vitro culture of the plant. For this purpose, the MS medium containing various concentrations of benzyl amino purine (BAP) (0.25, 0.5, 1, and 2 mg L^{-1}) with 0.2 mg L^{-1} indole acetic acid (IAA) were used for proliferation and various concentrations of indole butyric acid (IBA) (0, 0.8, and 1.6 mg L^{-1}) were used for rooting of the samples in a completely randomized design. The results showed that the studied hormones had the significant effects on the characteristics such as node number, nodal length, shoots number, length, diameter, fresh and dry weight, leaf number, leaf area, chlorophyll index, root number, length, fresh and dry weight. There was also different between concentrations of the used hormones. According to the results the highest proliferation and rooting was achieved at 0.25 mg L^{-1} of BAP and 0.8 mg L^{-1} of IBA, respectively. According to the results, these hormonal treatments can be useful for proliferation and rooting of red seedless grape.

Keywords: *Grape, Micropropagation, Hormonal treatments, Proliferation, Rooting.*

[*] Corresponding Author: Naseri L. Tel: 09144477492 Email: l.naseri@urmia.ac.ir