

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

چکیده

استقرار اولیه مریستم‌ها یکی از مراحل مهم در جریان کشت درون شیشه ای به منظور تولید 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 محدود در زمینه کشت مریستم ارقام انگور در 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 اسکوک 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 به صورت 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 اندازه اولیه ریز نمونه 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

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 ($\leq 0.2, 0.3, 0.5$ 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 obtain 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 ایران 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 بادبزی برگ انگور (GLV^۱) و پیچیدگی برگ انگور (GLRV^۲) می‌باشند که هر ساله خسارات شدیدی را به تاکستان‌های نواحی مختلف انگور خیز 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 زیاده‌تر گیاهان تولید شده از مریستم انتهایی احتمالاً به

منظور تولید گیاهان عاری از ویروس مورد استفاده قرار گرفتند. در آزمایش اول به منظور بررسی تاثیر اندازه اولیه مریستم در استقرار ریز نمونه‌ها در محیط کشت، نوک شاخساره‌ها با طول ۱/۵ - ۱ سانتی‌متر جدا و برگ‌های اطراف حذف شدند. نمونه‌گیری در اوایل صبح انجام گرفت. ضد عفونی نمونه‌ها در ابتدا با استفاده از آب و مایع ظرفشویی به مدت ۱۵ دقیقه و سپس با استفاده از الکل اتیلیک ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت و پس از آن نمونه‌ها با آب مقطر استریل آبخوبی شدند. بلافاصله نمونه‌ها توسط محلول کلرور جیوه ۱٪، حاوی ۰/۱٪ محلول Tween۲۰ به مدت ۳ دقیقه تیمار شدند و در پایان ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل ۳ دفعه و با فواصل زمانی ۵، ۱۰، ۱۵ دقیقه آبکشی شدند. مریستم‌های رقم بیدانه سفید در سه اندازه ۰/۵ میلی‌متر، ۰/۳ میلی‌متر و ۰/۲ میلی‌متر 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 واسکوگ (۱۹۶۲) به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۶/۵ گرم در لیتر آگار و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بود. PH تمام محیط‌های کشت با استفاده از هیدروکسید سدیم و اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال در حد ۵/۷-۵/۸ تنظیم شد (۳۰). محیط‌های کشت قبل از استفاده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر اتوکلاو شدند. پس از کشت مریستم‌ها، هر یک از ظروف پتری دیش با استفاده از پارافیلیم پوشانده شده و در اتاقکهای رشد با میانگین دمای روز ۲۸ درجه سانتی‌گراد و میانگین دمای شب ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. فتوپریود در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تنظیم شده بود. منبع نور مورد استفاده، لامپهای فلورسنت با نور سفید و شدت نور ۴۰ میکرو اینشتن ($0.04 \mu E \cdot m^{-2} \cdot sec^{-1}$) بر متر مربع در ثانیه در داخل اتاقک رشد بود. ارزیابی داده‌ها پس از یک ماه و با توجه به فاکتورهایی از قبیل طول گیاهچه‌های حاصل از رشد مریستم‌ها بر حسب سانتی‌متر و تعداد مریستم‌های رشد یافته در محیط استقرار انجام گرفت.

آزمایش دوم با هدف بررسی اثر نوع محیط کشت و تعیین بهترین زمان زمان نمونه‌گیری جهت استقرار مریستم‌های نوک شاخساره دو رقم انگور مذکور و با سه فاکتور زمان نمونه‌گیری در سه سطح (اواخر خرداد، اواخر تیر، اواخر مرداد)، نوع ترکیب محیط کشت در شش سطح و رقم در دو سطح و با سه تکرار به صورت آزمایش فاکتوریل خردشده در زمان در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام گرفت. با توجه به نتایج حاصل از آزمایش اول، مریستم‌ها به همراه ۲-۱ برگ اولیه به اندازه ۰/۵-۰/۳ میلی‌متر جدا شدند و هر پنج مریستم در داخل یک پتری دیش حاوی ۴۰-۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت محتوی غلظتهای مختلف BA (۱/۵، ۰/۱، ۰) میلی‌گرم در لیتر به تنهایی و با همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA مستقر شدند. در مجموع تعداد ۱۵ مریستم برای هر تیمار کشت داده شدند و ارزیابی مریستم‌ها یک ماه پس از کشت در محیط استقرار صورت گرفت. صفات مورد ارزیابی شامل تعداد گیاهک‌های قابل استفاده برای انتقال به محیط پرآوری در هر تیمار، وضعیت رشد مریستم‌ها بر اساس نمره دهی از یک تا پنج و طول گیاهک‌های حاصل از رشد مریستم‌ها بر حسب سانتی‌متر بودند. تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزارهای آماری SAS و MSTATC و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه ای دانکن صورت گرفت.

واسطه یکنواختی بیشتر در ماهیت دیپلویدی سلولهای انتهایی است (۲۶). اگر چه تحقیقات بسیاری به منظور ریز ازدیادی گونه‌ها و ارقام مختلف انگور با استفاده از شیوه‌های مختلف کشت بافت صورت گرفته، اما تحقیقات در خصوص کشت مریستم حاصل از جوانه‌های انتهایی شاخساره به ویژه در ارقام گونه وینیفرا تا حدودی محدود است (۵). معمولاً چهار مرحله جهت ازدیاد درون شیشه‌ای گیاهان مدنظر واقع می‌شود که شامل استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت، ایجاد اولین شاخساره‌ها و پرآوری، تکثیر انبوه شاخساره‌ها از طریق بازکشت‌های متوالی و در نهایت ریشه زایی گیاهچه‌های تولید شده و سازگار کردن آنها با شرایط بیرون و انتقال به محیط گلخانه می‌باشد (۸). با این حال استقرار اولیه ریز نمونه‌ها یکی از مراحل مهم در جریان کشت درون شیشه‌ای است. موفقیت در بهینه سازی محیط کشت در مرحله استقرار و به دست آوردن حتی یک گیاهچه کافی است که بتوان همین گیاهچه سالم را با سایر روش‌های متداول کشت بافت به راحتی ازدیاد کرد (۳). در واقع، موفقیت در استقرار مریستم‌ها، تضمینی برای ادامه کار جهت پرآوری مطلوب می‌باشد. این مرحله از کشت درون شیشه‌ای، اغلب به دلیل آلودگی و تولید و ترشح ترکیبات فنولی توسط ریزنمونه مشکل است. با این حال در این مرحله باید تعداد مناسبی ریزنمونه زنده مانده و روی محیط کشت رشد کنند (۲). استقرار مطلوب مریستم‌ها در محیط کشت تحت تاثیر فاکتورهای مختلفی از جمله ژنوتیپ (۱۵، ۳۲)، وضعیت مناسب گیاه مادری قبل از کشت در شرایط درون شیشه‌ای (۳۵)، ترکیب محیط کشت (۱۵، ۳۲)، زمان نمونه‌گیری (۱۸) و اندازه مناسب ریزنمونه اولیه (۲۳) می‌باشد. عموماً تعداد گیاهچه‌های حاصله عاری از ویروس، نسبت عکس با اندازه ریز نمونه دارد. با این حال در مواردی جدا کردن 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 کشت تحت کنترل هورمونی است و حضور هورمون جهت استقرار ریزنمونه‌ها و رشد مطلوب بعدی آنها ضروری است (۲۸). ترکیبات هورمونی مختلف چون سائیتوکینین‌ها به تنهایی یا همراه با اکسین با غلظت‌های مختلف جهت استقرار مریستم مورد استفاده قرار گرفته اند (۵، ۱۰، ۱۵، ۱۶، ۱۸، ۱۹، ۲۸، ۳۲). انواع محیط‌های کشت چون محیط کامل MS (۱۰، ۱۱، ۱۵، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۴، ۲۸، ۳۱)، یا رقیق شده آن با غلظت نصف نمکهای ماکرو (۹) و WPM اصلاح شده (۳۳) در ریز ازدیادی مو استفاده شده است.

با این توصیف، متداول ترین محیط کشت محیط MS بوده است (۱۲). با توجه به اهمیت موضوع و گزارشات معدود در زمینه کشت مریستم ارقام انگور در 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 نمونه‌گیری در استقرار مریستم‌های این دو رقم مهم تجاری انگور انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نوک شاخساره حاصل از پایه‌های مادری ارقام انگور بیدانه سفید و شاهرودی، واقع در کلکسیون انگور گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، به عنوان مواد آزمایشی برای کشت مریستم این ارقام به

نتایج و بحث

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 ۱/۱BA+۰/۱BA تولید گردید (جدول شماره ۴). محیط کشت ۵/۰ 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 ۱/۱BA+۰/۱BA و ۵/۰ BA+۰/۱BA اگرچه اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند اما به علت اینکه گیاهک‌های طویل تری در محیط کشت ۱/۱BA+۰/۱BA ایجاد گردید، این محیط به عنوان محیط بهینه جهت استقرار مریستم‌های رقم شاهرودی انتخاب گردید (جدول شماره ۴). نمونه‌گیری در اواخر خرداد ماه و استقرار مریستم‌ها در محیط کشت ۵/۰ 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

نتایج تجزیه واریانس آزمایش اول اختلاف معنی‌داری بین اندازه اولیه ریزنمونه مریستم و تعداد مریستم‌های رشد یافته در سطح ۱٪ نشان داد، اما اختلاف معنی‌داری بین این عامل و طول گیاهک‌های حاصل وجود نداشت (جدول شماره ۱). بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، تمام مریستم‌های با ابعاد اولیه ۵/۰ میلی‌متر به خوبی در محیط کشت استقرار یافتند که با مریستم‌های با ابعاد اولیه ۳/۰ میلی‌متر تفاوت معنی‌داری نداشت اما در صورت استفاده از اندازه‌های کوچکتر، تنها کمتر از نیمی از 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 تقریباً 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. کشت ریزنمونه‌های 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

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

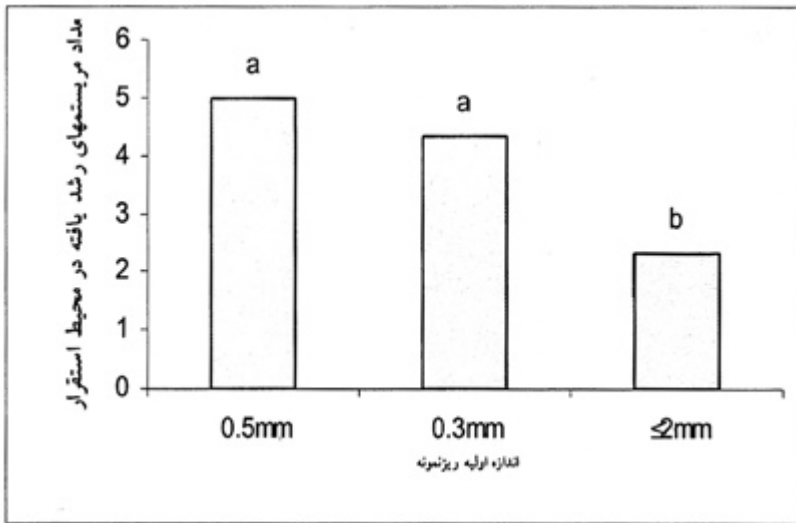
میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییرات S.O.V
تعداد مریستم‌های رشد یافته در محیط استقرار	طول گیاهک‌های حاصل از رشد مریستم‌ها در محیط استقرار (cm)		
۵/۷۷۷**	۰/۰۰۰۴ NS	۲	نوع محیط کشت
۰/۲۲۲	۰/۰۰۴۲	۶	خطای آزمایشی
		۸	کل

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

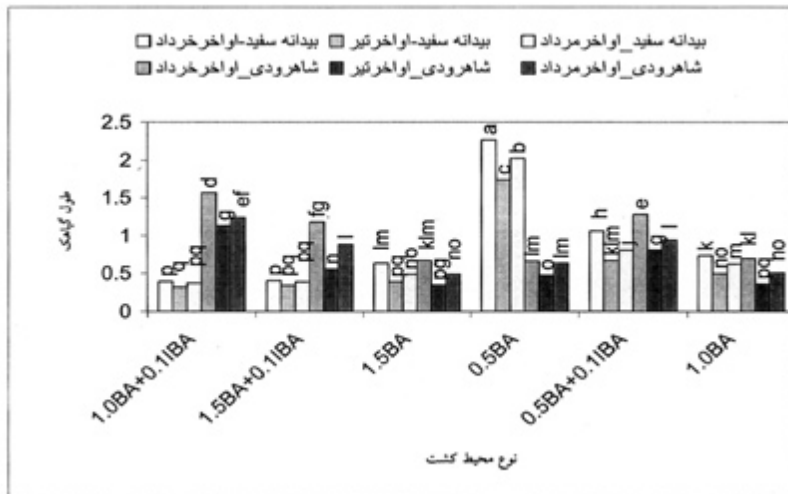
هوای منطقه 2 ± 32 درجه سانتی‌گراد بود بطوریکه انتخاب نمونه از باغ جهت کشت مریستم به دشواری انجام پذیرفت. همچنین بدلیل دمای بالا، نمونه‌ها چندان شاداب نبودند و وضعیت مناسبی نداشتند. نتایج حاکی از این بود که در تمامی محیط‌های کشت، طویل‌ترین گیاهک‌ها در زمان نمونه‌گیری اواخر خرداد ماه و کوتاه‌ترین نمونه‌ها هنگامی ایجاد شدند که نمونه‌گیری در اواخر تیرماه انجام گرفت که با نتایج Kabeli و همکاران (۱۸) که بهترین نتایج را در اوایل جولای در استقرار مریستم‌های رقم انگور کلایریت 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

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).

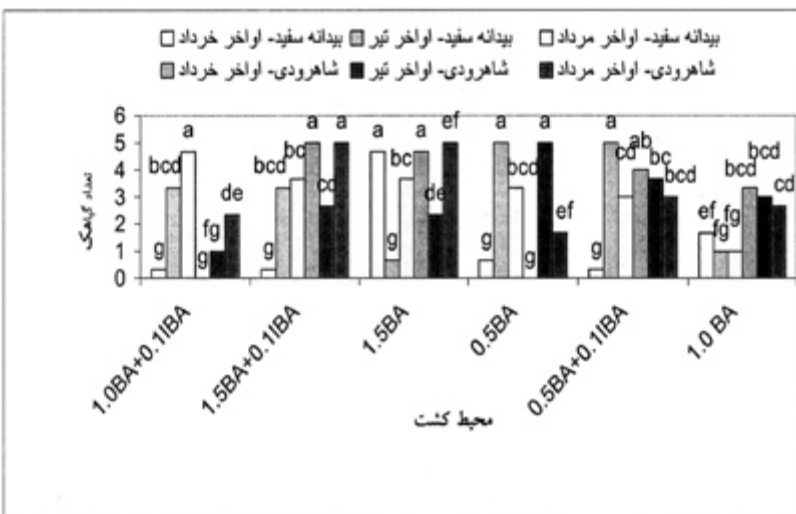
نتایج تجزیه واریانس آزمایش دوم، اختلاف معنی‌داری را بین اثر نوع محیط کشت و زمان نمونه‌گیری در سطح ۱٪ بر طول گیاهک‌های حاصل از مریستم‌ها پس از یک ماه نشان دادند، اما دو رقم انگور از نظر طول گیاهک‌های حاصل از رشد مریستم‌ها اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول شماره ۲). هر دو رقم از نظر تعداد گیاهک‌های قابل انتقال به مرحله پرآوری اختلاف معنی‌داری 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



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



نمودار شماره ۲- اثر متقابل محیط کشت، زمان نمونه‌گیری و رقم انگور، بر طول گیاهک‌های حاصل از رشد مریستم



نمودار شماره ۳- اثر متقابل محیط کشت، زمان نمونه‌گیری و رقم انگور، بر تعداد گیاهک‌های قابل انتقال به مرحله پرآوری

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

میانگین مربعات							درجه آزادی	منابع تغییرات S.O.V
تعداد مریستم‌های با رشد عالی ($x \geq 2$) cm	تعداد مریستم‌های با رشد خوب ($1/5 \leq x < 2$) cm	تعداد مریستم‌های با رشد متوسط ($1 \leq x < 2/5$) cm	تعداد مریستم‌های با رشد کم ($0/5 \leq x < 1$) cm	تعداد مریستم‌های رشد نکرده ($0/3 \leq x < 0/5$) cm	تعداد گیاهک قابل انتقال به مرحله پرآوری	طول گیاهک‌ها (cm)		
۰/۹۳۸**	۰/۵۵۶**	۱/۰۶۶**	۱/۵۵۲**	۱/۹۹۱**	۱۵/۴۹۸**	۱/۵۸۶**	۵	محیط کشت
۰/۷۸۱**	۰/۰۰۳ ^{ns}	۲/۶۱۱**	۱/۲۲۵**	۳/۰**	۱۵/۵۶۴**	۰/۰۰۵ ^{ns}	۱	رقم انگور
۰/۰۶۱**	۰/۱۶۲**	۰/۶۰۸**	۰/۳۱۴**	۲/۳۲۵**	۲۲/۹۵۲**	۰/۹۶۳**	۲	زمان نمونه گیری
۱/۰۱۶**	۰/۹۹۷**	۰/۷۱۲**	۱/۸۰۲**	۲/۷۰۲**	۲۸/۹۶۴**	۲/۸۸۷**	۵	محیط کشت × رقم انگور
۰/۰۳۴**	۰/۱۴۹**	۰/۳۰۳**	۰/۷۷۲**	۰/۳۷۶**	۰/۸۵۳**	۰/۰۱**	۱۰	محیط کشت × زمان نمونه گیری
۰/۰۱۵ ^{ns}	۰/۴۷۳**	۰/۰۷۸ ^{ns}	۰/۳۷۵**	۰/۲۲۸**	۰/۶۷۵ ^{ns}	۰/۰۴۴**	۲	رقم انگور × زمان نمونه گیری
۰/۰۴۳**	۰/۰۸۷**	۰/۱۷۴**	۰/۲۷**	۰/۱۱۲**	۰/۸۴۲**	۰/۰۳۶**	۱۰	محیط کشت × رقم انگور × زمان نمونه گیری
۰/۰۰۵	۰/۰۳	۰/۰۲۹	۰/۰۲۸	۰/۰۲۱	۰/۲۷۷	۰/۰۰۱	۷۲	خطای آزمایشی
							۱۰۷	کل
۹/۳۸	۱۹/۸۹	۱۷/۴۸	۱۰/۷۳	۱۱/۵۸	۱۸/۹۱	۴/۸۱		%.C.V

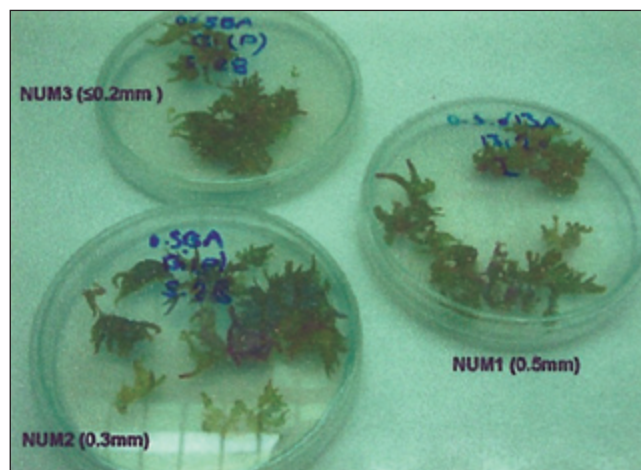
×× نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها به ترتیب در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ و ^{ns} بیانگر عدم معنی دار بودن اختلاف بین آنها می‌باشد.

جدول شماره ۳- مقایسه میانگین اثرات ساده نوع رقم بر طول 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

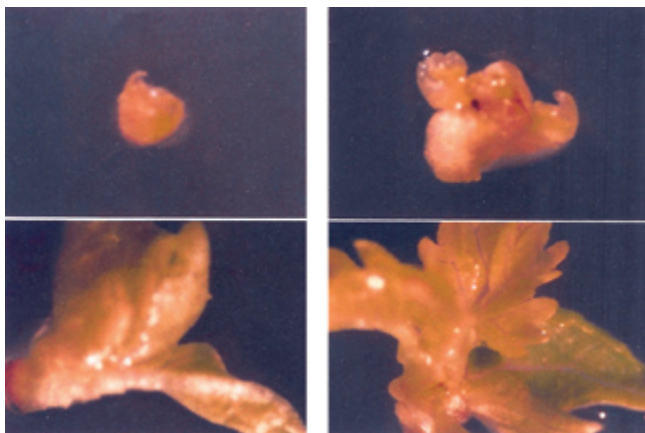
و روپستریس مشابهت داشت. بهترین نتایج در رقم بیدانه سفید در زمان نمونه‌گیری اواخر خرداد و در محیط کشت BA ۰/۵ به دست آمد و در رقم شاهرودی بهترین نتایج در محیط کشت IBA ۰/۱ BA+ ۱ و مجدداً در زمان اواخر خرداد ماه به دست آمد. غلظت‌های بالای اکسین می‌توانند مانع ریختزایی شوند و سایتوکینین‌ها نیز باعث تسریع 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 تأثیر 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 ریز نمونه 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 در دسترس 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 تأثیر می‌گذارند (۴). بهترین نتایج وقتی قابل دستیابی است که ریز نمونه‌ها در حالت رشد فعال گرفته شوند (۴). نمونه‌های جمع‌آوری شده

تولید کرد (جدول شماره ۴). در بررسی اثر متقابل نوع محیط کشت و زمان نمونه‌گیری 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 معنی‌داری در زمانهای اواخر خرداد و اواخر مرداد نشان ندادند (جدول شماره ۵). طویل‌ترین گیاهک‌ها در



شکل شماره ۱- تأثیر اندازه اولیه مریستم در استقرار ریزنمونه

رقم بیدانه سفید، در محیط BA ۰/۵ و در زمان نمونه‌گیری 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 معنی‌داری داشت (نمودار شماره ۲). تعداد گیاهک‌های قابل انتقال به مرحله پرآوری نیز تحت تأثیر 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 نتایج 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 Ergenoglu و Gok (۱۵) در ارقام ایتالیایی، پرلت



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

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

تعداد گیاهک ها ی قابل انتقال به مرحله پرآوری	میانگین طول گیاهک ها	نوع ترکیب هورمونی - رقم
۵ a	۲ a	0.5 BA - بیدانه سفید
۲/۵۵ cde	۰/۵۸ e	0.5 BA - شاهرودی
۲/۵۵ b	۰/۸۴ d	0.5 BA + 0.1 IBA - بیدانه سفید
۴/۵۵ a	۱ c	0.5 BA + 0.1 IBA - شاهرودی
۰/۲۲ f	۰/۳۶ g	1.0 BA + 0.1 IBA - بیدانه سفید
۴/۷۷ a	۱/۳۱ b	1.0 BA + 0.1 IBA - شاهرودی
۰/۳۳ f	۰/۳۷ g	1.5 BA + 0.1 IBA - بیدانه سفید
۳ bc	۰/۸۷ d	1.5 BA + 0.1 IBA - شاهرودی
۲/۶۶ cd	۰/۶۱ e	1.0 BA - بیدانه سفید
۲/۲۲ de	۰/۵۲ f	1.0 BA - شاهرودی
۲/۶۶ cd	۰/۵ f	1.5 BA - بیدانه سفید
۱/۸۸ e	۰/۵ f	1.5 BA - شاهرودی

- 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 شیشه‌ای، 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; Improvements in apex culture in vitis species. *Acta Horticulturae*. 227: 485-488.
8. Chee, R. and R. M. Pool. 1985; In vitro propagation of vitis:

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 معنی‌دار بودن 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-butyric acid

منابع مورد استفاده

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

جدول شماره ۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع محیط کشت و زمان نمونه‌گیری بر طول گیاهک‌های حاصل از رشد مرستم‌ها و تعداد گیاهک‌های قابل انتقال به مرحله پرآوری با استفاده از روش دانکن

تعداد گیاهک‌ها ی قابل انتقال به مرحله پرآوری	میانگین طول گیاهک‌ها	نوع ترکیب هورمونی - زمان
۴/۳۳a	۱/۴۶a	0.5 BA - اواخر خرداد
۳ b	۱/۱d	0.5 BA - اواخر تیر
۴ a	۱/۳۲ b	0.5 BA - اواخر مرداد
۴/۸۳ a	۱/۱۷ c	0.5 BA + 0.1 IBA - اواخر خرداد
۳ b	۰/۷۳ h	0.5 BA + 0.1 IBA - اواخر تیر
۴/۳۳ a	۰/۸۷ f	0.5 BA + 0.1 IBA - اواخر مرداد
۲/۶۶ bc	۰/۹۸ e	1.0BA + 0.1 IBA - اواخر خرداد
۲/۳۳ bc	۰/۷۲ h	1.0BA + 0.1 IBA - اواخر تیر
۲/۵ bc	۰/۸ q	1.0 BA + 0.1 IBA - اواخر مرداد
۲/۳۳ bc	۰/۷۹ g	1.5 BA + 0.1 IBA - اواخر خرداد
۰/۸۳ e	۰/۴۴ kl	1.5 BA + 0.1 IBA - اواخر تیر
۱/۸۳ cd	۰/۶۳ i	1.5 BA + 0.1 IBA - اواخر مرداد
۳/۱۶ b	۰/۷۱ h	1.0BA - اواخر خرداد
۱/۳۳ de	۰/۴۲ l	1.0BA - اواخر تیر
۲/۸۳ b	۰/۵۶g	1.0 BA - اواخر مرداد
۳/۱۶ b	۰/۶۵ i	1.5 BA - اواخر خرداد
۰/۸۳ e	۰/۳۶ m	1.5 BA - اواخر تیر
۲/۸۳ b	۰/۴۸ k	1.5 BA - اواخر مرداد

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 establishment 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 culture of grapevine (*Vitis vinifera* L.). Acta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Comenianae Physiologia Plantarum (24):31-44.

11. Compton, M. and D. Gray. 1995; Micropropagation of southern

home hybrid 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

- 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. Umamoto. 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 tobacco 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. Mkrtyumyan. and R. Butenko. 1988. Clonal micropropagation of grape. *Biologiya-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. Tubular inclusion bodies in plants infected with viruses of the Nepo. *J Gen Virol* 7: 159-160.

