بررسی فاکتورهای موثر در القای کالوس انگور

فاطمه کبیری[۱]، احمد معینی[۲]*، امین باقی‌زاده[۳] و زهرا موحدی[۴]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۱- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۸)

چکیده

انگور یکی از محصول‌های باغی مهم و مورد توجه جهان است که در کشورهای زیادی کشت می‌شود. تولید کالوس در انگور می‌تواند با اهدافی از جمله ریزازدیادی از طریق رویان‌زایی، تولید متابولیت‌های ثانویه و انتقال ژن انجام شود. با توجه به این کاربردها، در این تحقیق آزمایش‌های مستقلی برای بهینه سازی کالوس‌زایی انگور انجام شده است. ابتدا، اثرات نوع محیط کشت (MS، WPM و B_5)، غلظت Kin در سه سطح (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و غلظت NAA در چهار سطح (۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. همچنین در آزمایشات دیگر اثرات هریک از نمک‌های عناصر پرمصرف (KH_2PO_4، $MgSO_4.7H_2O$، $CaCl_2.2H_2O$، KNO_3 و NH_4NO_3) با غلظت‌های ۱/۲۵، ۱/۵ و ۲ برابر غلظت آن در محیط کشت پایه MS) و نیز بررسی اثرات نوع و غلظت منبع هیدرات کربن (شکر معمولی، ساکارز و شکر قهوه‌ای در سه غلظت مختلف ۲۰، ۳۰ و ۴۰ گرم در لیتر) به صورت آزمایشات جداگانه و در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شدند. نتایج تاثیر محیط‌های کشت مختلف با غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نشان داد که تیمار T_7 (محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin)، در مقایسه با سایر تیمارها، دارای بیشترین متوسط وزن تر کالوس (۱۲/۳۱ گرم) بود. همچنین با افزایش ۱/۲۵ و ۱/۵ برابر در غلظت نمک‌های $MgSO_4.7H_2O$ و NH_4NO_3 و نیز افزایش ۱/۵ و ۲ برابر در غلظت $CaCl_2.2H_2O$ در محیط کشت پایه MS، بیشترین متوسط وزن تر کالوس بدست آمد. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، استفاده از ۳۰ گرم در لیتر شکر قهوه‌ای به عنوان منبع هیدرات کربن، بیشترین تاثیر را بر وزن کالوس داشت.

کلمات کلیدی: شرایط درون شیشه‌ای، عناصر ماکرو، کالوس

۱- کارشناس ارشد گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۳- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، مرکز بین المللی علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، کرمان
۴- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر
* پست الکترونیک: moieni_a@modares.ac.ir

مقدمه

انگور (*Vitis vinifera*)، جزء زیرجنس *Euvitis* می‌باشد و تخمین زده شده که این گونه دارای بیش از ۱۰۰۰۰ رقم می‌باشد. این گیاه بومی آسیای مرکزی است که حدود هفت تا هشت هزار سال پیش اهلی شده و از این منطقه به سایر نقاط دنیا گسترش یافته است (آلولدت[1]، ۱۹۹۷). تولید جهانی انگور سالانه به ۷۵ میلیون تن می‌رسد. ایران به دلیل شرایط آب و هوایی و اقلیمی یکی از کشورهای مهم تولیدکننده انگور در دنیا است، به طوری که طبق گزارش سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد، کشور ایران با تولید ۲۲۷۵۸۳۰ تن انگور در رتبه هشتم جهان و از نظر میزان صادرات کشمش در رتبه سوم جهان قرار دارد (فائو[2]، ۲۰۱۶).

تکثیر انگور بیشتر به وسیله روش‌های سنتی از جمله قلمه، خوابانیدن و پیوند صورت می‌گیرد. یکی از روش‌های ریزازدیادی ارقام مختلف انگور استفاده از کشت بافت گیاهی است. اولین گزارش درباره کشت درون‌شیشه‌ای انگور توسط مورل[3] (۱۹۴۴) صورت گرفت. از کالوس به عنوان ماده آزمایشی در برنامه‌های اصلاحی استفاده می‌گردد. کالوس از بخش‌های مختلف مانند قطعات برگ، ساقه، ریشه، دانه گرده و حتی پروتوپلاست می‌تواند به وجود بیاید. در طی تشکیل کالوس در شرایط محیط کشت بافت گیاهی، تمایز و اختصاصی شدن سلول‌های مادری متوقف شده و سلول‌های ریزنمونه تمایززدایی می‌شوند. از تولید کالوس و باززایی آن برای تکثیر کلونی، گزینش درون شیشه‌ای جهت افزایش تحمل نسبت به تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده (از طریق استفاده از تنوع موجود و یا تنوع سوماکلونی) و در مهندسی ژنتیک به منظور انتقال ژن مورد نظر از منبعی بیگانه به گیاه مورد نظر استفاده می‌شود (ارزانی و میراجاق[4]، ۱۹۹۹). از بین محیط‌های مختلف کشت، کاربرد محیط کشت MS به دلیل این که بسیاری از گیاهان نسبت به آن عکس‌العمل مناسبی نشان می‌دهند بسیار متداول است. در کشت بافت انگور نیز این محیط کشت توسط محققان زیادی در مراحل مختلف کشت آن استفاده شده است (کلاته جاری[5] و همکاران، ۲۰۰۶). لازم به ذکر است که گونه‌های مختلف، ارقام و اندام‌های مختلف یک گیاه، به کشت بافت گیاهی واکنش یکسان نشان نمی‌دهند (خیاطزاده[6] و همکاران، ۲۰۱۱).

امروزه در بسیاری از گونه‌های گیاهی می‌توان کالوس را در شرایط درون شیشه‌ای نیز تولید کرد و بر حسب گونه گیاهی، کالوس می‌تواند از انواع مختلف بافت‌ها با بکارگیری محیط کشت مناسب تولید شود (نیلی[7]، ۱۹۷۹؛ ایکه‌اوچی[8] و همکاران، ۲۰۱۳).

عوامل مختلفی کشت کالوس را تحت تأثیر قرار می‌دهند که می‌توان آنها را به دو دسته طبقه‌بندی کرد، فاکتورهای فیزیکی (کیفیت و کمیت نور، دما و...) و شیمیایی (نمک‌های عناصر پرمصرف و کم‌مصرف، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و منبع هیدرات کربن). عناصر پرمصرف در محیط‌های کشت با غلظت بیشتر از ۰/۵ mM استفاده می‌شوند. تغییر روی غلظت این نمک‌ها اثرات مختلفی روی ریزنمونه ایجاد می‌کند. تمام عناصر پرمصرف به استثنای پتاسیم، نقش ساختمانی یا متابولیکی بر عهده دارند. نیتروژن و گوگرد در ساختمان اسیدهای آمینه و فسفر در ساختمان اسیدهای نوکلئیک شرکت دارند. کلسیم و منیزیم به عنوان کوفاکتور آنزیمی و پتاسیم در سیستم‌های تعادل یونی سلول نقش ایفاء می‌کنند. نیتروژن یکی از عناصر ضروری گیاه بوده که نقش مهمی در رشد و نمو گیاه دارد. ازت بیشتر از سایر عناصر پرمصرف، مورد نیاز است و به صورت یون‌های نیترات یا آمونیوم استفاده می‌شوند و نسبت $NH4^+$ به $NO3^-$، در بسیاری از موارد در تعیین نوع باززایی اهمیت دارد (تاجی و ویلیامز[9]، ۱۹۹۶). با توجه به مطالب مذکور، نوع محیط کشت، نمک‌های عناصر پرمصرف، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و منبع هیدرات کربن نقش کلیدی در رشد و نمو گیاه دارند و به همین علت در مواردی تغییر در نوع و غلظت آنها می‌تواند منجر به بهینه سازی پاسخ گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای شود. لذا در این پژوهش اثرات نوع محیط کشت (MS، WPM و B_5) و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی Kin و NAA و نیز اثرات غلظت هر یک از نمک‌های پرمصرف ($2H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$, KH_2PO_4, NH_4NO_3, KNO_3, $CaCl_2$ با غلظت‌های ۱/۲۵،

1. Alleweldt
2. FAO: Food and Agriculture Organization
3. Morel
4. Arzani and Mirojagh
5. KalatehJari
6. Khayatzadeh
7. Neely
8. Ikeuchi
9. Taji and Williams

۱/۵ و ۲ برابر غلظت آن در محیط کشت پایه MS) و همچنین اثرات نوع و غلظت منبع هیدرات کربن (شکر معمولی، ساکارز و شکر قهوه‌ای در سه غلظت مختلف ۲۰، ۳۰ و ۴۰ گرم در لیتر) در قالب چند آزمایش روی القا و تولید کالوس انگور بررسی شده است.

مواد وروش‌ها

در این تحقیق از انگور وارداتی از کشور شیلی (رقم Red globe)، به رنگ قرمز و با حبه‌های گرد بسیار درشت، استفاده شد. لازم به ذکر است که به دلیل وارداتی بودن میوه‌های این انگور با هدف مصرف تازه‌خوری، فقط خوشه آن در ایران در دسترس بود، لذا در این تحقیق از قطعات خوشه انگور کاملاً رسیده، جهت بررسی کالوس‌زایی استفاده شد. پس از جدا کردن حبه‌ها، خوشه‌ها به مدت ۲ دقیقه در زیر شیر آب جاری قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها در شرایط استریل لامینار ایرفلو ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و سپس بعد از ۳ دقیقه آبشویی با آب مقطر استریل، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت‌سدیم ۳ درصد قرار گرفتند و نهایتاً مواد گیاهی سه مرتبه (هر مرتبه به مدت ۳ دقیقه) با آب مقطر استریل شسته شدند. بعد از ضدعفونی، نمونه‌ها در شرایط کاملاً استریل به قطعات یک سانتی‌متری تقسیم و سپس ریزنمونه‌ها، برای القای کالوس‌زایی در محیط کشت WPM حاوی Kin ۴ mgl^{-1} و در شرایط لوله آزمایش کشت شدند (به منظور رفع مشکل ترشحات فنلی، از mgl^{-1} ۱۵۰ از هر یک از سه ماده اسید سیتریک، اسید آسکوربیک و پلی‌وینیل‌پیرولیدون در محیط کشت استفاده شد). کشت‌ها سپس به اتاق رشد کنترل شده با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ثابت ۲۵°C و شدت نور حدود ۴۰۰۰ لوکس منتقل شدند. پس از القا کالوس، از کالوس‌های تولید شده جهت انجام آزمایش‌های بهینه‌سازی کالوس‌زایی استفاده شد و برای این منظور آزمایش‌های ذیل انجام شدند.

آزمایش اول: در این آزمایش اثرات محیط کشت پایه و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی کینتین و نفتالین استیک اسید روی القا و رشد کالوس انگور بررسی شده است. این آزمایش به صورت فاکتوریل شامل سه فاکتور و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (هر تکرار شامل یک ظرف شیشه‌ای (۸cm ×۵/۵) حاوی ۷۵ ml محیط کشت و ۱ گرم کالوس بود) انجام شد. محیط کشت با سه سطح (MS، WPM و B_5)، فاکتور اول را تشکیل می‌داد. غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی Kin در سه سطح (mgl^{-1} ۳ و ۲ ،۱) و غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی NAA در چهار سطح (mgl^{-1} ۱ و ۰/۵، ۰/۱، ۰) به ترتیب فاکتورهای دوم و سوم را تشکیل می‌دادند.

آزمایشات ۲ الی ۶: در این آزمایش‌ها، تأثیر غلظت نمک‌های پرمصرف به صورت ۵ آزمایش مستقل و با استفاده از محیط کشت پایه MS حاوی NAA mgl^{-1} ۰/۵ و Kin mgl^{-1} ۲ بررسی شد و در هر آزمایش اثر یکی از نمک‌های NH_4NO_3, KNO_3, $CaCl_2$.$2H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$, KH_2PO_4, با ضریب ۱/۲۵، ۱/۵ و ۲ برابر غلظت در محیط کشت MS مورد مطالعه قرار گرفت.

آزمایش هفتم: این آزمایش اثر سه نوع منبع هیدرات کربن (شکر معمولی، ساکارز و شکر قهوه‌ای) با سه غلظت مختلف (gl^{-1} ۲۰، ۳۰ و ۴۰) در محیط کشت MS حاوی NAA mgl^{-1} ۰/۵ و Kin mgl^{-1} ۲ بررسی شد.

آزمایش‌های ۲ الی ۷ به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (هر تکرار شامل یک ظرف شیشه‌ای (۸cm ×۵/۵) حاوی ml ۷۵ محیط کشت و یک گرم کالوس) انجام شدند. بعد از کشت، ظروف کشت شده به اتاق رشد کنترل شده با دمای ۲۵°C و شرایط ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی (۴۰۰۰ با شدت لوکس) منتقل شدند. بعد از۸ هفته، بررسی تیمارها و یادداشت برداری از صفت وزن تر کالوس انجام شد و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver.16 آنالیز شدند.

نتایج و بحث

آزمایش اول

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین تیمارهای تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مختلف در صفت وزن تر کالوس در محیط کشت پایه MS در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۲). مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که تیمار T_7 (محیط کشت MS حاوی NAA mgl^{-1} ۰/۵ و Kin mgl^{-1} ۲) در مقایسه با سایر تیمارها بیشترین متوسط وزن کالوس (۱۲/۳۱ گرم) (شکل ۱) را داشت.

آزمایش‌های۲ الی ۶

بر اساس نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس، اثر غلظت

جدول ۱– بررسی اثر نوع و غلظت منبع هیدرات کربن روی رشد و القای کالوس‌های حاصل از کشت ریزنمونه خوشه انگور

نوع منبع هیدرات کربن	غلظت ($g\ l^{-1}$)		تیمار
شکر خوراکی	۲۰		T_1
شکر خوراکی	۳۰	(شاهد)	T_2
شکر خوراکی	۴۰		T_3
شکر قهوه ای(تصفیه نشده)	۲۰		T_4
شکر قهوه ای(تصفیه نشده)	۳۰		T_5
شکر قهوه ای(تصفیه نشده)	۴۰		T_6
ساکارز(Merck)	۲۰		T_7
ساکارز(Merck)	۳۰		T8
ساکارز(Merck)	۴۰		T_9

جدول ۲- تجزیه واریانس بررسی اثرات محیط کشت و ترکیب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر القای کالوس در انگور

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS) صفات
نوع محیط کشت (A)	۲	۱۹,۹۳**
غلظت Kin (B)	۲	۲۳/۵۹۴**
غلظت NAA (C)	۳	۹/۰۲۱**
A × B	۴	۳۷/۲۲**
A × C	۶	۱۲/۸۲**
B × C	۶	۶/۵۴**
A × B × C	۱۲	۸/۱۸**
خطای آزمایشی	۷۲	۱/۷۴

**معنی دار در سطح ۱٪

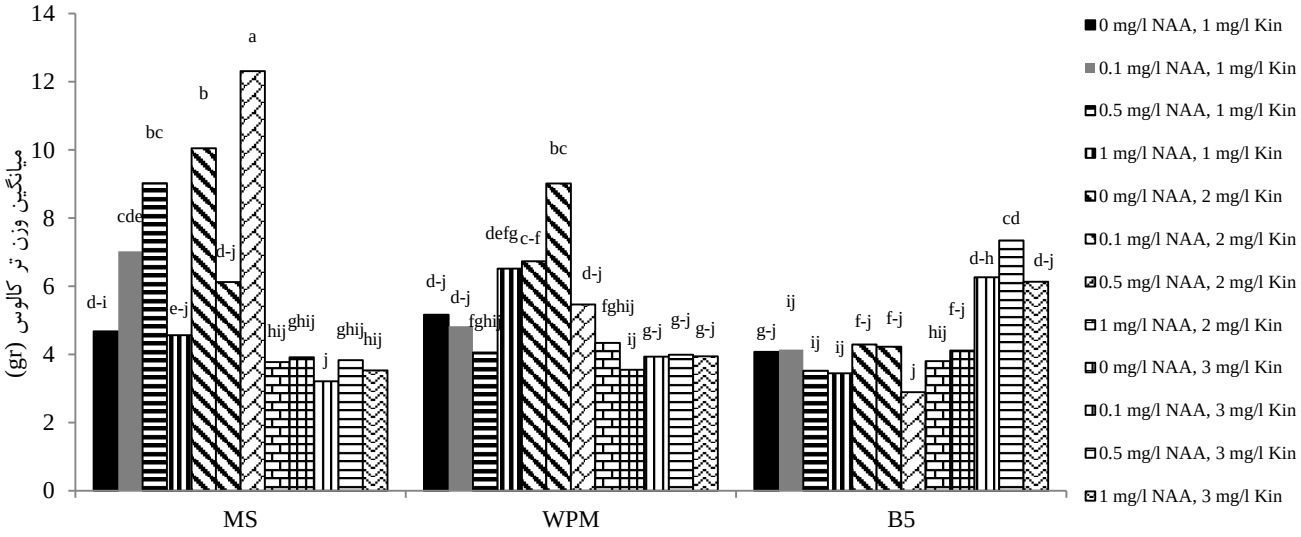
NH_4NO_3 بر وزن تر کالوس در هر تیمار در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که افزایش غلظت NH_4NO_3 به میزان ۱/۲۵ و ۱/۵ برابر غلظت در محیط کشت پایه MS بیشترین متوسط وزن تر کالوس (۸/۷ و ۷/۵ گرم، به ترتیب) را داشت (شکل ۲).

همچنین طبق نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس، اثر غلظت KNO_3 برای صفت وزن تر کالوس در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود و نتایج مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که افزایش غلظت نمک KNO_3 به میزان ۱/۲۵، ۱/۵ و ۲ برابر غلظت در محیط کشت پایه MS نسبت به شاهد بیشترین متوسط وزن تر کالوس (۷/۹، ۷/۵ و ۶/۹ گرم) را داشته است (شکل ۳). حذف کامل KNO_3 می‌توانند درصد کالوس‌زایی را کاهش دهند (کیربی[1] و همکاران، ۱۹۸۷). در بعضی موارد، افزایش غلظت KNO_3 در محیط کشت، می‌تواند القای کالوس را افزایش دهد (حق و ظفر[2]، ۲۰۰۴).

بطورکلی نیتروژن یکی از عناصر ضروری گیاه بوده که نقش مهمی در رشد و نمو گیاه دارد. در محیط‌های کشت گیاهی، نیتروژن معدنی معمولاً در دو شکل تأمین می‌شود: شامل فرم اکسید شده مانند آنیون نیترات و فرم احیاء شده مانند کاتیون آمونیوم (کیربی و همکاران، ۱۹۸۷). به نظر می‌رسد که در اکثر کشت‌ها، زمانی که از هر دو شکل ازت معدنی استفاده شود، بهترین رشد القاء می‌شود.

نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس اثر غلظت $MgSO_4.7H_2O$ روی صفت وزن تر کالوس در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود و نتایج مقایسه میانگین تیمارها (شکل ۴) نشان داد که با افزایش ۱/۲۵ و ۱/۵ برابر غلظت $MgSO_4.7H_2O$ در محیط کشت پایه MS، بیشترین وزن کالوس (۹/۳ و ۸/۹ گرم، به ترتیب) بدست آمده است. در گزارشات نتایج نشان داد که منیزیم یک عنصر مهم برای فرآیند جنین‌زایی سوماتیکی است (سانتوس[3] و همکاران،

1. Kirby
2. Haq and Zafar
3. Santos



شکل۱- مقایسه میانگین تیمارهای محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای صفت وزن تر کالوس در انگور.

میانگین های با حروف مشترک تفاوت معنی داری از لحاظ آماری در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.

۲۰۰۵) برای مثال در مطالعه‌ای افزایش غلظت منیزیم به محیط کشت میزان جنین‌زایی را در گیاه کاکائو افزایش داده است (مینیاکا[1] و همکاران، ۲۰۰۸). همچنین در تحقیق دیگری نتایج نشان داد که افزایش منیزیم به محیط کشت پایه، رشد و کیفیت گیاه را در تمشک قرمز (*Rubus idaeus*) افزایش داده است (پوتونگ و رید[2]، ۲۰۱۴). منیزیم به عنوان یک ماده معدنی پرمصرف برای گیاهان به عنوان اتم مرکزی در مولکول کلروفیل جهت تجمع زیرواحدهای ریبوزومی برای سنتز پروتئین مورد نیاز است و نیز به عنوان کوفاکتور ضروری برای بسیاری از واکنش‌های آنزیمی عمل می‌کند. همچنین منیزیم ممکن است که در تعادل کاتیون–آنیون سلول‌ها نقش داشته باشد (ادوین و همکاران[3]، ۲۰۰۸).

در بررسی اثر غلظت $CaCl_2.2H_2O$، نتایج تجزیه واریانس نشان داد که غلظت این نمک اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد روی وزن تر کالوس داشته است. نتایج مقایسه میانگین تیمارها نشان داد (شکل ۵)، که با افزایش ۱/۵ و ۱/۷۵ برابر غلظت $CaCl_2.2H_2O$ در محیط کشت پایه MS، بیشترین متوسط وزن تر کالوس (۲/۸۶ گرم) حاصل شده است.

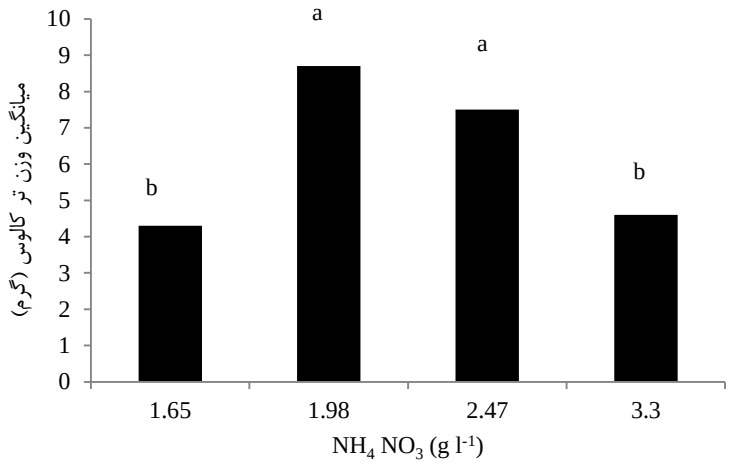
کلسیم نیز جزء عناصر پرمصرف گیاهان است و یک تعدیل‌کننده مهم عمل آنزیم است و برای سنتز و تثبیت دیواره سلولی مورد نیاز است. در محیط‌های کشت بافت گیاهی، کلسیم در غلظت ۱ تا ۳ میلی‌مول به صورت نمک کلراید یا نیترات استفاده می‌شود (واترر[4]، ۲۰۰۵). تغییر غلظت این نمک می‌تواند باعث بهبود رشد شود همچنانکه در تحقیقی کالوس‌زایی سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) با استفاده از غلظت ۳-۶ میلی مولار $CaCl_2.2H_2O$ حداکثر کالوس‌زایی بدست آمده است (اولامین[5] و همکاران، ۲۰۱۳). نتایج تجزیه واریانس بررسی اثر غلظت KH_2PO_4 نشان داد که این تغییر غلظت این نمک تأثیر معنی‌داری روی صفت مقدار کالوس نداشته است. لذا مقایسه میانگین بررسی اثر تیمارهای غلظت این نمک نشان داده نشده است.

آزمایش هفتم

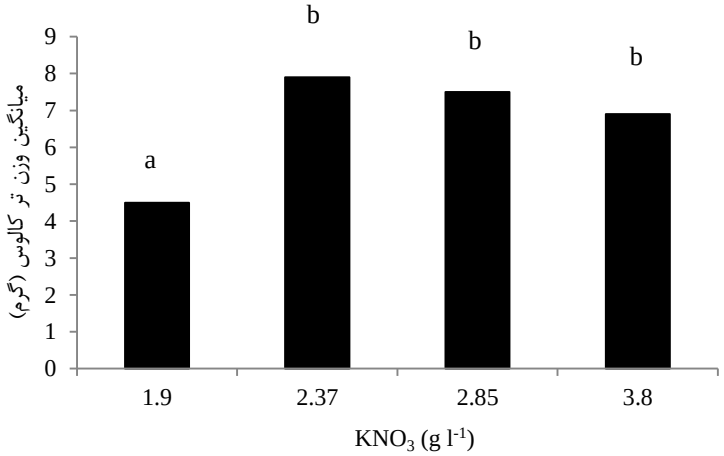
نتایج تجزیه واریانس بررسی اثر نوع و غلظت منبع هیدرات کربن محیط کشت روی کالوس‌زایی انگور نشان داد که بین تیمارها در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری وجود داشته و تیمار T_5 (شکر قهوه‌ای به مقدار $30 gl^{-1}$) با متوسط وزن تر ۹/۸۱ گرم بیشترین تأثیر را روی کالوس‌زایی داشته است و پس از آن تیمارهای T_2 ، T_4 و T_6 به ترتیب با متوسط وزن تر ۸/۱۸، ۸/۱۳ و ۸/۱۶ گرم قرار گرفته‌اند (شکل ۶).

در شرایط درون شیشه‌ای، شرایط مناسب برای فتوسنتز مهیا نیست و یا اصولاً به علت کمبود نور، فتوسنتز انجام نمی‌شود. بافت‌های سبز در این شرایط به قدر کافی اتوتروف نیستند و به همین علت منبع هیدرات کربن جزء بسیار مهم

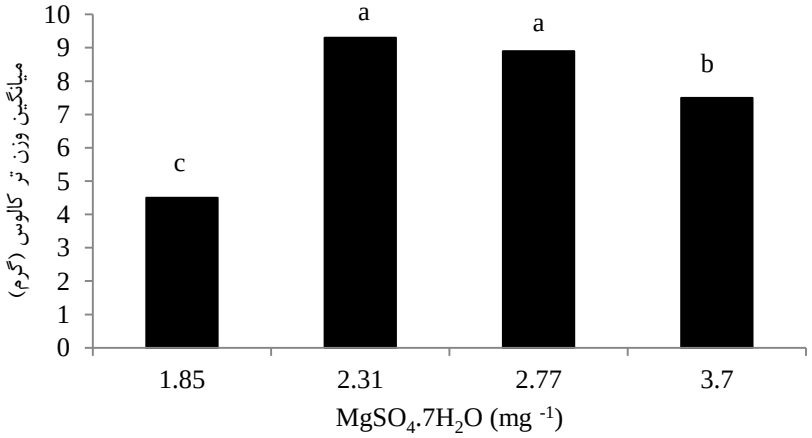
1. Minyaka
2. Poothong and Reed
3. Edwin
4. Waterer
5. Ulamin



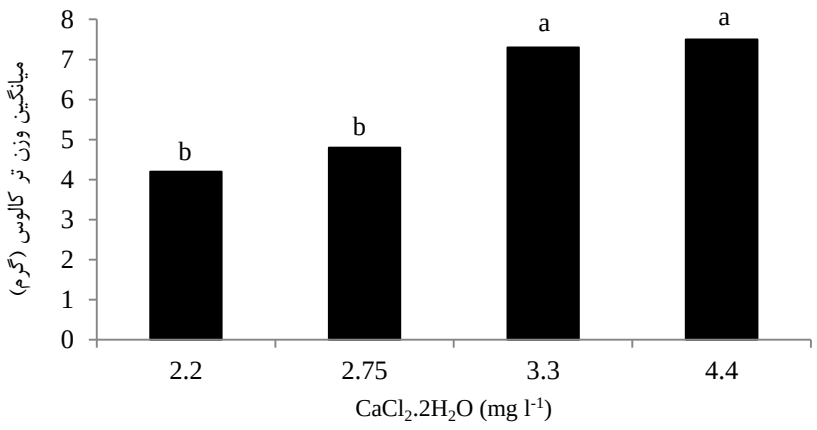
شکل ۲- مقایسه میانگین تیمارهای افزایش غلظت NH_4NO_3 برای صفت وزن تر کالوس در انگور. میانگین های با حروف مشترک تفاوت معنی داری از لحاظ آماری در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.



شکل ۳-مقایسه میانگین تیمارهای افزایش غلظت KNO_3 برای صفت وزن تر کالوس در انگور. میانگین های با حروف مشترک تفاوت معنی داری از لحاظ آماری در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.



شکل ۴- مقایسه میانگین تیمارهای افزایش غلظت $MgSO_4.7H_2O$ برای صفت وزن کالوس در انگور. میانگین های با حروف مشترک تفاوت معنی داری از لحاظ آماری در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.



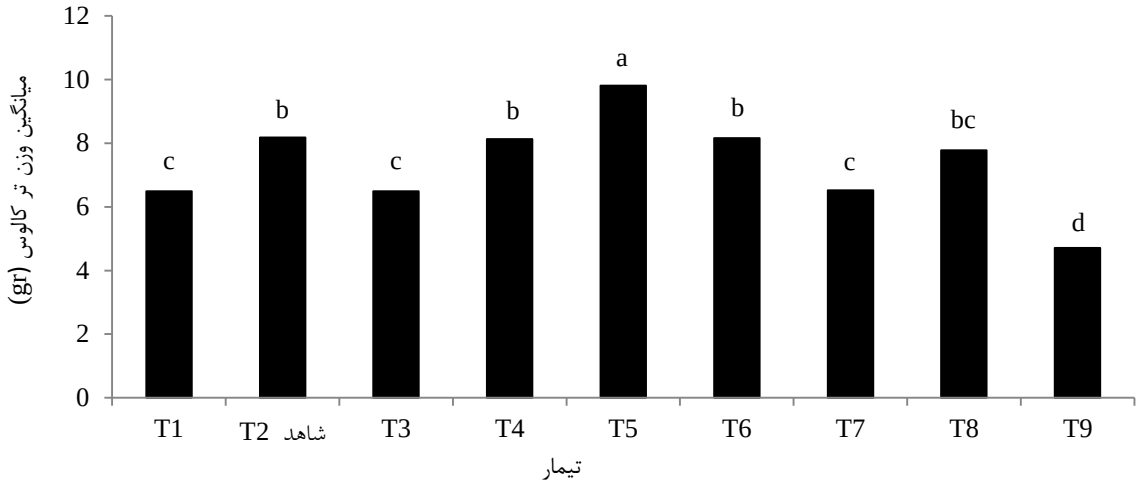
شکل ۵- مقایسه میانگین تیمارهای افزایش غلظت $CaCl_2.2H_2O$ برای صفت وزن کالوس در انگور. میانگین های با حروف مشترک تفاوت معنی داری از لحاظ آماری در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.

در هر نوع کشت محسوب می‌شود (نوواک[1] و همکاران، ۲۰۰۴). همچنین منبع هیدرات کربن به عنوان یک عامل تأثیرگذار روی فشار اسمزی محیط کشت، روی جذب مواد غذایی توسط ریزنمونه از محیط کشت موثر هستند. تأثیر منبع هیدرات کربن و غلظت آن در محیط کشت، روی القا کالوس در بسیاری از گیاهان از قبیل برنج (*Oryza sativa* L.) (شهنوج و باری[2]، ۲۰۰۴) و زیتون (*Olea europaea*) (گراسیا[3] و همکاران، ۲۰۰۲) به اثبات رسیده است. به طور معمول از ساکارز یا گلوکز با غلظت ۵-۲٪ در کشت بافت استفاده می‌شود. سایر کربوهیدرات‌ها مثل فروکتوز، نشاسته، مالتوزو شکر معمولی و نیز شکر قهوه‌ای به عنوان منبع هیدرات کربن در کشت بافت گیاهی نیز استفاده می‌شوند. شکر قهوه‌ای، شکر نیمه تخلیص شده می‌باشد که هنوز بخشی از ناخالصی‌های ملاس را دارد در حالیکه در شکر معمولی (تصفیه شده) و ساکارز آزمایشگاهی این ناخالصی‌ها حذف شده‌اند. بر اساس نتایج این آزمایش، وجود عناصر و ناخالصی‌ها در شکر قهوه‌ای اثر مثبتی روی رشد کالوس انگور داشته است. در تحقیقات کشت بافت، درصد بالایی از هزینه‌ها به منبع هیدرات کربن اختصاص دارد. جایگزینی ساکارز با شکر قهوه‌ای علاوه بر بهبود رشد، در کاهش هزینه‌ها نیز تأثیر بسزایی داشته است که این موضوع در ریزازدیادی گیاهانی مانند سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) (دمو[4] و همکاران، ۲۰۰۸)، توت فرنگی (*Fragaria nanassa*) (کائور[5] و همکاران، ۲۰۰۵) و موز (*Musa paradisiacal*) (داناالاکشیمی و استفان[6]، ۲۰۱۴) تأیید شده است.

نتیجه‌گیری کلی

بطورکلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزایش غلظت هرکدام از نمک‌های پرمصرف (در غلظت‌های مورد مطالعه) به تنهایی در محیط کشت باعث افزایش معنی‌دار وزن کالوس شده‌اند. همچنین با توجه به اثر مثبت شکر قهوه‌ای در افزایش وزن تر کالوس و نیز با توجه به اینکه از نظر اقتصادی این نوع شکر در مقایسه با ساکارز و شکر خوراکی هزینه‌های مرحله تخلیص نیاز ندارد، استفاده از آن در محیط کشت بسیار مقرون به صرفه تر است. همچنین با توجه به موفقیت کالوس‌زایی در رقم انگور، توصیه می‌شود که تحقیقاتی روی استفاده‌های کاربردی از این کالوس‌ها انجام شود، بالاخص در خصوص امکان رویان‌زایی سوماتیکی، که در اینصورت می‌توان از رویان‌های حاصله برای تکثیر انبوه این گیاه استفاده نمود. همچنین با توجه به اهمیت آنتوسیانین‌ها در صنایع دارویی و غذایی، می‌توان نسبت به انجام تحقیقات تکمیلی در جهت شناسایی آنتوسیانین‌های تولید شده در کالوس انگور و نیز بررسی یکسری عوامل مختلف موثر روی تولید بیشتر آنها اقدام نمود. علاوه بر این امکان‌پذیر بودن تولید کالوس‌های مذکور فرصت مناسبی برای انجام تحقیقات آتی در خصوص انتقال ژن و تولید گیاهان تراریخت از طریق ارگانوژنز و رویان‌زایی

1. Nowak
2. Shahnewaj and Bari
3. Gracia
4. Demo
5. Kaure
6. Dhanalakshmi and Stephan



شکل ۶- مقایسه میانگین تیمارهای اثر نوع و غلظت هیدرات کربن برای صفت وزن تر کالوس در انگو. میانگین های با حروف مشترک تفاوت معنی داری از لحاظ آماری در سطح احتمال ۱ درصد ندارند.

سوماتیکی در رقم مذکور را فراهم می‌کند.

منابع

Alleweldt, G. 1997. Genetics of grapevine breeding. Program Botany, 58: 441-454.

Arzani, A. and Mirojagh, S.S. 1999. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction *in vitro* salt stress. Plant cell Tissue Organ Culture, 58: 67-72.

Demo, P., Kuria, P., Nyende, A.B. and Kahangi, E.M. 2008. Table sugar as an alternative low cost medium component for *in vitro* micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). African Journal of Biotechnology, 7(15): 2578-2584.

Dhanalakshmi, S. and Stephan, R. 2014. Low cost media options for the production of banana (*Musa paradisiacal* L.) through plant tissue culture. Journal of Academia and Industrial Research, 2(9): 509 -512.

FAO. 2016. Table and dried grapes, FAO-OIV Focus 2016 Report. ISBN 978-92-5-109708-3.

George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. 2008. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In *Plant propagation by tissue culture* (pp. 115-173). Springer, Dordrecht.

Gracia, J.L., Troncoso, J., Sarmiento, R. and Troncoso, A. 2002. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. Plant Cell Tissue Organ Culture, 69: 95-100.

Haq, I.U. and Zafar, Y. 2004. Effect of nitrate on embryo induction efficiency in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). African Journal of Biotechnology, 3(6): 319-323.

Ikeuchi, M., Sungimoto, K. and Lwase, A. 2013. Plant Callus: Mechanisms of induction and repression. Plant Cell, 25(9): 3159–3173.

KalatehJari, S., Ebadi, A., Zamani, Z. and Omidi, M. 2006. Evaluation of *in vitro* culture of two Iranian grape cultivars and determine the appropriate conditions for culture their meristem. Agricultural Science, 37(2): 208-215.

Kaur, R., Gautam, H. and Sharma, D.R. 2005. A low cost strategy for micropropagation of strawberry (*Fragaria nanassa*) cv. Chandler. Proc. of the VII Int. Symp. On temperate zone fruits in the tropics and subtropics. Acta Horticulturae, 695: 129-133.

Khayatzadeh, M., NabatiAhmadi. D., RajabiMemari, H. and Abdollahi, M.R. 2011. Optimization of call genesis of two spinach cltivars utilizing three different explants. Biology and Agriculture, 10(2): 1-6.

Kirby, E.G., Leustek, T. and Lee, M.S. 1987. Nitrogen nutrition. In: Bonga, J.M. and D.J. Durzan, (eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol. 1. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster. 237 p.

Minyaka, E., Niemenak, N., Sangare, A. and Omokolo, D.N. 2008. Effect of $MgSO_4$ and K_2SO_4 on somatic embryo differentiation in *Theobroma cacao* L. Plant cell Tissue Organ Culture, 94: 149-160.

Morel, G. 1944. Le development de Mildiou sur des tissus de vigne cultives *in vitro*. Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de IAcademie des Sciences, 218: 50-52.

Neely, D. 1979. Tree wounds and wound closure. Journal Arboriculture, 5: 135–140.

Nowak, B.K., Miczynski, K. and Hudy, L. 2004. Sugar uptake and utilization during adventitious bud differentiation on in vitro leaf explant of Wegierkazwykla plum (*Prunus domestica*). Plant cell Tissue Organ Culture, 76: 255-260.

Poothong, S. and Reed, B.M. 2014. Modeling the effects of mineral nutrition for improving growth and development of micropropagated red raspberries. Scientia Horticulturae, 165: 132-141.

Santos, O.M., Romano, E., Yotoko, C.S.K., Tinoco, P.M.L., Dias, A.B.B. and Araga˜o, L.F.J. 2005. Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. Plant Science, 168: 723–729.

Shahnewaj, S. and Bari, M.A. 2004. Effect of concentration of sucrose on the frequency of callus induction and plant regeneration in another culture of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Tissue Culture, 14(1): 37-43.

Taji, A. and Williams, R. 1996. Tissue culture of australian plants. Armidale, NSW: University of England.

Ulamin, N., Sanga, G., Ara, N., Shah, S.H. and Farhatullah. 2013. Effect of various concentrations of calcium chloride on callus growth and potassium nutrition of calli cultures of potato (*Solanum tuberosum*), Pakistan Journal of Botany, 45: 209- 214.

Waterer, D. 2005. Calcium nutrition of potatoes, problems and potential solutions. Manitoba Agriculture, pp. 1-3.