



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گنجان

مجله پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیستم، شماره اول، ۱۳۹۲

<http://jopp.gau.ac.ir>

تأثیر غلظت‌های مختلف ساکاروز، کازئین هیدرولایزات و اسید آمینه‌های مختلف بر

جنین‌زایی سوماتیکی در برخی از ارقام انگور (*Vitis vinifera* L.)

*امیر جمال محمود^۱، علی عبادی^۲، منصور امیدی^۳ و مسعود میرمعصومی^۴

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی تهران، ^۲دانشیار گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران،

^۳استاد گروه علوم زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران، ^۴مربی پردیس علوم دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۰۴

چکیده

ریزنمونه‌های برگ انگور ارقام شاهرودی، بیدانه سفید و یاقوتی جهت تولید کالوس در محیط کشت MS به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D کشت شدند. کالوس‌های به‌دست آمده به‌منظور تمایزیابی در محیط کشت MS بدون هورمون که دارای غلظت‌های مختلف ساکاروز، کازئین هیدرولایزات و اسید آمینه‌های گلوتامین، فنیل آلانین و آرژنین بود، کشت شدند. ارقام یاقوتی و بیدانه سفید در محیط کشت دارای ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولایزات و رقم شاهرودی در محیط کشت دارای ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولایزات بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی را داشتند. از سوی دیگر در تمامی ارقام مورد مطالعه بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی در محیط کشت دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل آلانین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آرژنین بودند. همچنین ساکاروز در غلظت ۴۵ گرم در لیتر باعث تولید بیشترین درصد جنین سوماتیکی در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید شد. در حالی‌که در مورد رقم شاهرودی، در غلظت ۶۰ گرم در لیتر باعث تولید بیشترین درصد جنین سوماتیکی شد.

واژه‌های کلیدی: انگور، جنین‌زایی سوماتیکی، محیط کشت، ساکاروز، اسید آمینه

* مسئول مکاتبه: jamalmahmood.amir@gmail.com

مقدمه

انگور یکی از مهمترین محصولات باغبانی است که در مناطق وسیعی از جهان کشت می‌شود. به منظور افزایش کمیت و کیفیت این میوه و ایجاد مقاومت نسبت به آفات و امراض و شرایط نامساعد محیطی لزوم اجرای برنامه‌های اصلاح انگور اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. یکی از روش‌های اصلاح، مهندسی ژنتیک می‌باشد که به دلایل کوتاهی زمان انجام این کار و جابه‌جا نشدن بیشتر ژن‌ها دارای اهمیت فراوانی می‌باشد. برای انجام مهندسی ژنتیک نیاز به بافت خاص پذیرای ژن می‌باشد و در این ارتباط بهترین بافت کالوس جنین‌زا می‌باشد (اسکورزا و همکاران، ۱۹۹۵). از جنین‌های سوماتیکی نه تنها در انتقال ژن، بلکه در پژوهش‌ها جهت بررسی تنوع سوماکلونال (گرشوف و دوی، ۱۹۷۴)، ویروس‌زدایی ارقام (گامبینو و همکاران، ۲۰۰۶)، تشخیص ارقام جهش‌یافته (فرانک و همکاران، ۲۰۰۲) و مطالعه نحوه تمایزیابی در گیاهان (فرانسیسکو و همکاران، ۲۰۰۶) استفاده شده است. تولید جنین سوماتیکی تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند ژنوتیپ (اولاهه و همکاران، ۲۰۰۹)، محیط کشت، نوع و غلظت هورمون‌ها (داس و همکاران، ۲۰۰۲)، زمان جمع‌آوری ریزنمونه (ویدال و همکاران، ۲۰۰۹؛ گریبایدو و همکاران، ۲۰۰۴) و نوع ریزنمونه قرار دارد. به‌طور کلی ریزنمونه‌های مورد استفاده در انگور را می‌توان به دو دسته ریزنمونه‌های مورد استفاده از اندام‌های زایشی مانند تخمدان (کریمی و همکاران، ۲۰۰۵؛ گامبینو و همکاران، ۲۰۰۷؛ لویز و همکاران، ۲۰۰۵)، پرچم (ماررو و همکاران، ۱۹۸۶)، گل کامل (گامبینو و همکاران، ۲۰۰۷) و تخمک (مولینز و سری ناواسان، ۱۹۸۰) و ریزنمونه‌های رویشی مانند برگ (داس و همکاران، ۲۰۰۲)، دم‌برگ (مارتینلی و همکاران، ۱۹۹۳)، پیچک (سالونجه و همکاران، ۱۹۹۷) و گره‌های ساقه‌ای (مایلوت و همکاران، ۲۰۰۶) تقسیم‌بندی نمود. ریزنمونه پرچم بیشترین کاربرد را برای تولید جنین سوماتیکی در انگور داشته است. عیب ریزنمونه‌های زایشی محدود بودن زمان جمع‌آوری آن‌ها می‌باشد، به‌طوری‌که فقط در برخی از مواقع سال می‌توان از آن استفاده کرد. از مزایای ریزنمونه‌های رویشی می‌توان در دسترس بودن این نوع از ریزنمونه‌ها در طی فصل رویش و از معایب آن می‌توان به پایین بودن بازدهی تولید جنین سوماتیکی از این ریزنمونه‌ها اشاره نمود. در بین ریزنمونه‌های رویشی ریزنمونه برگ بیشترین کاربرد را در تولید جنین سوماتیکی در انگور داشته است. برای بالا بردن بازدهی تولید جنین سوماتیکی در انگور، راهبردهای ویژه‌ای در نظر گرفته شده است. مشخص شده است که با جذب یون‌های نیترات و آمونیوم موجود در محیط کشت، تغییراتی در pH محیط کشت ایجاد می‌شود (نایدز، ۱۹۹۴). بنابراین

استفاده از سایر منابع نیتروژنی مانند کازئین هیدرولایزات و اسیدآمینها برای بالا بردن بازدهی جنین سوماتیکی در گیاهان موردنظر بوده است. با این حال پاسخ به این ترکیبات جهت بالا بردن تولید جنین سوماتیکی بسته به نوع گیاه و ژنوتیپ متفاوت می‌باشد. به طوری که در پژوهشی با افزودن کازئین هیدرولایزات به میزان ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر به میزان چشم‌گیری موجب بالا رفتن تولید کالوس جنین‌زا در انگور رقم کابرننت ساوینون شد (مارو و همکاران، ۱۹۸۶). همچنین در این پژوهش با افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل آلانین و ۱ میلی‌گرم در لیتر آدنین به میزان زیادی افزایش در تولید جنین سوماتیکی مشاهده شد. در گزارشی بیان شد که استفاده از آرژنین به میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به میزان زیادی موجب افزایش تولید جنین سوماتیکی در نیشکر شد (نیوس و همکاران، ۲۰۰۸). در آزمایشی دیگر که اثر L-گلوتامین بر روی تولید جنین سوماتیکی در گواوا مورد بررسی قرار گرفت، بیان گردید که استفاده از این ماده به میزان ۰/۶۸ میلی‌مولار باعث افزایش تولید جنین سوماتیکی در این گیاه شد (مانوج و همکاران، ۲۰۰۹). همچنین در گزارش دیگر عنوان شده است که بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی در گیاه فی‌جوا در محیط کشت دارای ۴ میلی‌مولار آرژنین به دست آمد (لیریو و همکاران، ۲۰۰۱). در کاج افزودن مخلوطی از ۱۷ نوع از اسیدآمین‌های مختلف به غلظت ۱۰ میلی‌مولار باعث تولید حداکثری جنین سوماتیکی شد (راویندرا و همکاران، ۲۰۰۵). گزارش دیگر نشان می‌دهد که افزودن اسیدآمین‌های مختلف در مرحله تمایزبایی در ارزن باعث کاهش تولید جنین سوماتیکی شد (اپان و جرج، ۱۹۹۰). به نظر می‌رسد در محیط کشت توازن بین منابع مختلف نیتروژن یکی از عوامل مهم القای جنین سوماتیکی می‌باشد (اوزاوا و همکاران، ۱۹۹۶). نیتروژن موجود در اسیدآمین‌ها در طی متابولیسم و سنتز پروتئین در مقایسه با منبع نیتروژن غیرآلی سریع‌تر وارد اسکلت کربنی می‌شود (لی، ۱۹۹۳).

از سوی دیگر یکی از ترکیبات مهم در محیط کشت ساکاروز می‌باشد. نقش ساکاروز در محیط کشت را به عنوان تامین‌کننده منبع کربنی و همچنین تنظیم‌کننده فشار اسمزی بیان نموده‌اند. همچنین ساکاروز در غلظت کم برای اندام‌زایی و در غلظت زیاد به منظور تولید جنین سوماتیکی می‌تواند مناسب باشد (ادوین و همکاران، ۲۰۰۸). به طوری که در آزمایشی بیان شد که غلظت ۳۵۰ میلی‌مولار ساکاروز برای تولید جنین سوماتیکی در گیاه آفتابگردان مطلوب می‌باشد (جنین و همکاران، ۱۹۹۵). برای تولید جنین سوماتیکی در انگور از غلظت‌های مختلف ساکاروز ۶۰، ۳۰ و ۲۰ گرم در لیتر استفاده شده است. اما از نظر بررسی این عامل بر روی تولید جنین سوماتیکی تا به حال در این گیاه آزمایشی

انجام نشده است. هدف از این پژوهش بررسی اثرات کازئین هیدرولایزات، ساکاروز و اسیدآمینه‌های متفاوت در غلظت‌های مختلف، بر روی فرایند تولید جنین سوماتیکی و همچنین بالا بردن بازدهی تولید جنین سوماتیکی از ریزنمونه برگ در ارقام انگور شاهرودی، یاقوتی و بیدانه سفید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های برگ از مرکز تحقیقات گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج جمع آوری شدند. از سه برگ جوان انتهای هر شاخه استفاده گردید. برگ‌ها به منظور ضدعفونی ابتدا به‌طور کامل شسته شدند، سپس در محلول اتانول ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه قرار گرفتند. بعد از تیمار با الکل، برگ‌ها سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند. به منظور ضدعفونی سطحی، ریزنمونه‌ها در داخل محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. در نهایت نمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل شست‌و‌شو داده شدند. پس از استریل کردن، برگ‌ها به قطعات تقریباً ۱ سانتی‌متری بریده شدند و در داخل پتری دیش کشت گردید. به منظور انگیزش کالوس از محیط کشت MS به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP (داس و همکاران، ۲۰۰۲) و جهت تمایز جنین از محیط کشت MS بدون هورمون استفاده شد. یک ماه پس از کشت ریزنمونه‌ها، کالوس‌ها به محیط تمایزیابی منتقل شدند. به منظور بررسی تأثیر کازئین هیدرولایزات بر روی جنین‌زایی سوماتیکی در انگور در آزمایش اول از کازئین هیدرولایزات در سه غلظت ۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. به منظور بررسی تأثیر اسیدآمینه‌ها در آزمایش دوم، اسیدآمینه گلوتامین در سه غلظت ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، اسیدآمینه فنیل آلانین در سه غلظت ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر و اسیدآمینه آرژنین در سه غلظت ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. همچنین در آزمایش سوم از ساکاروز در غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰ گرم در لیتر استفاده شد. در تمام محیط کشت‌های مورد استفاده ۷ گرم در لیتر آگار اضافه گردید. pH تمام محیط‌های کشت مورد استفاده قبل از افزودن آگار با استفاده از NaOH یک نرمال روی ۵/۸ تنظیم شد. همچنین تمام محیط کشت‌ها، در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استریل شدند. ساکاروز قبل از اتوکلاو به محیط‌های کشت افزوده شد. از سوی دیگر اسیدآمینه‌ها بعد از اتوکلاو و زمانی که دمای محیط کشت به ۵۵ درجه سانتی‌گراد رسید، فیلتر شده و به محیط کشت اضافه گردیدند. برای انگیزش کالوس جنین‌زا و تمایز جنین سوماتیکی نمونه‌ها در اتاق رشد گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و

منابع طبیعی در شرایط کاملا تاریک و دمای 25 ± 1 قرار داده شدند. برای جوانه‌زنی جنین‌ها از محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP استفاده شد. این پژوهش به صورت طرح کاملا تصادفی فاکتوریل انجام شد. در محیط تمایزبایی به ازای هر تیمار ۴۵ کالوس کشت داده شد و داده‌ها به صورت درصد بیان شد. درصد تولید جنین سوماتیکی دو ماه بعد از کشت کالوس‌ها زمانی که جنین‌ها در مرحله کروی بودند محاسبه شد. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزارهای SAS/9:1.3 و MSTATC انجام شد.

نتایج

مرحله القای کالوس: ۱۰ روز پس از کشت، ریزنمونه‌های برگ کالوس‌زایی را شروع کردند. ناحیه حاشیه ریزنمونه برگ، منطقه شروع تولید کالوس بود. پس از یک ماه بیشتر ریزنمونه‌ها کالوس تولید نمودند. از نظر درصد کالوس‌زایی تفاوت معنی‌داری بین ارقام مشاهده شد، به طوری که رقم بیدانه سفید بیشترین درصد کالوس‌زایی (۷۵ درصد) و رقم شاهرودی کمترین درصد کالوس‌زایی (۶۵ درصد) را ایجاد کردند. رقم یاقوتی نیز ۷۰ درصد کالوس‌زایی داشت. در این پژوهش فقط کالوس‌های گرانوله سفید و یا زرد رنگ که به کالوس تیره رنگی متصل بودند (کالوس جنین‌زا)، در مرحله تمایز جنین سوماتیکی ایجاد کردند (شکل - الف ۱). هیچ نوع تفاوت مورفولوژیکی در بین کالوس‌های ایجاد شده از ارقام کشت داده شده مشاهده نشد. کالوس‌های آبکی و نرم و همچنین کالوس‌هایی که بافت خیلی فشرده‌ای داشتند، جنین سوماتیکی در مرحله بعد تولید نکردند.

مرحله تمایز جنین: دو ماه پس از کشت کالوس‌ها در محیط تمایزبایی، جنین‌ها مشاهده شدند. جنین‌های ایجاد شده دارای مراحل مورفولوژیکی کروی، قلبی و اژدری شکل بودند (شکل ۱- ب). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل رقم و غلظت‌های مختلف کازئین هیدرولایزات روی جنین سوماتیکی معنی‌دار بودند (جدول ۱).

کمترین درصد تولید جنین سوماتیکی در ارقام مورد مطالعه در محیط کشت فاقد کازئین هیدرولایزات به دست آمد. ارقام یاقوتی و بیدانه سفید با افزایش غلظت کازئین هیدرولایزات افزایش در تولید جنین سوماتیکی را نشان دادند، به طوری که بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی در ارقام بیدانه سفید (۱۴/۲۵ درصد) و یاقوتی (۱۶/۵ درصد) در محیط کشت دارای ۵۰۰ میلی‌گرم کازئین هیدرولایزات به دست آمد. با این حال رقم شاهرودی کاهش در تولید جنین سوماتیکی در غلظت ۵۰۰

میلی گرم کازئین هیدرولایزات را نشان داد، به طوری که برای این رقم بیشترین درصد تولید جنین در محیط کشت همراه با ۲۵۰ میلی گرم کازئین هیدرولایزات به دست آمد (۱۲/۲۵ درصد) (جدول ۱).

جدول ۱- تاثیر متقابل رقم و غلظت های مختلف کازئین هیدرولایزات بر درصد تولید جنین سوماتیکی در انگور.

ارقام	غلظت کازئین هیدرولایزات (میلی گرم در لیتر)		
	صفر	۲۵۰	۵۰۰
یاقوتی	۴/۲۵ ^c	۱۰/۷۵ ^c	۱۶/۵۰ ^a
شاهرودی	۲/۵۰ ^c	۱۲/۲۵ ^{b,c}	۷/۰۰ ^d
بیدانه سفید	۳/۷۵ ^e	۷/۵۰ ^d	۱۴/۲۵ ^b

* حروف متفاوت در کلیه ستون ها و ردیف ها نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح ۱ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن می باشد. زمانی که بیشتر جنین ها در مرحله کروی بودند درصد تولید جنین سوماتیکی محاسبه گردید.

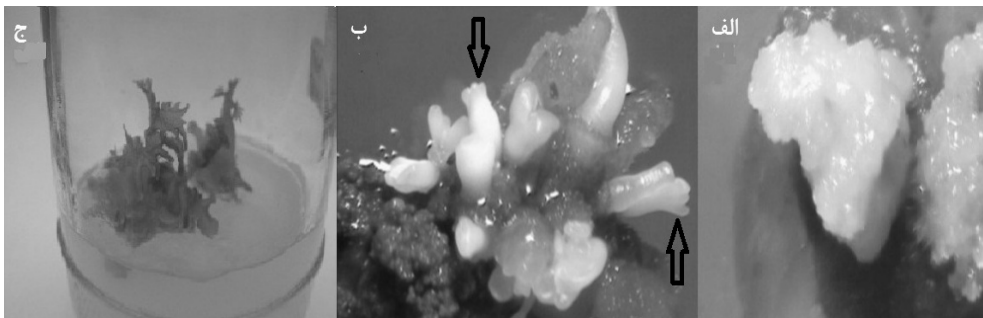
در مرحله تمایز جنین سوماتیکی همچنین از اسید آمینه های متنوع در غلظت های مختلف استفاده شد. بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی در رقم یاقوتی و در محیط کشت دارای ۱۰ میلی گرم در لیتر فنیل آلانین، ۵۰ میلی گرم در لیتر آرژنین و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر گلوتامین و کمترین درصد تولید جنین سوماتیکی در رقم شاهرودی و در محیط کشت فاقد اسید آمینه به دست آمد (جدول ۲). همچنین نتایج در این مرحله نشان داد که اثر متقابل اسید های آمینه با ارقام بر درصد تولید جنین سوماتیکی معنی دار می باشد. از سوی دیگر با افزایش غلظت اسید آمینه I- گلوتامین (محیط کشت فاقد سایر اسید آمینه ها) افزایش در تولید جنین سوماتیکی در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید مشاهده شد. اما در رقم شاهرودی، تولید جنین سوماتیکی با افزایش غلظت از ۵۰ به ۱۰۰ میلی گرم در لیتر این اسید آمینه کاهش یافت. در رقم شاهرودی با افزایش غلظت اسید آمینه فنیل آلانین درصد تولید جنین سوماتیکی کاهش یافت. از سوی دیگر تولید جنین سوماتیکی با افزایش غلظت آرژنین از ۵۰ به ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در تمام ارقام مورد مطالعه کاهش یافت. در شرایطی که غلظت اسید آمینه گلوتامین ۵۰ میلی گرم در لیتر بود، با افزایش غلظت فنیل آلانین از ۱۰ به ۲۰ میلی گرم در لیتر درصد تولید جنین سوماتیکی افزایش یافت، اما زمانی که غلظت گلوتامین ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بود، با افزایش غلظت فنیل آلانین کاهش در تولید جنین سوماتیکی در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید مشاهده شد.

جدول ۲- تاثیر اسیدآمین‌های گلوتامین، فنیل آلانین و آرژینین روی درصد تولید جنین سوماتیکی در ارقام مختلف انگور.

غلظت آرژینین (میلی گرم در لیتر)	غلظت فنیل آلانین (میلی گرم در لیتر)			غلظت گلوتامین (میلی گرم در لیتر)
	۲۰	۱۰	صفر	
یاقوتی				
صفر	۳/۶۷ ^k	۴/۰۰ ^k	۳/۰۰ ^k	صفر
صفر	۸/۳۴ ^{efgh}	۷/۳۴ ^{hij}	۵/۰۰ ^{jk}	۵۰
صفر	۷/۳۴ ^{hij}	۹/۰۰ ^{efgh}	۷/۰۰ ^{hij}	۱۰۰
۵۰	۹/۰۰ ^{efgh}	۱۱/۰۰ ^{def}	۸ ^{ghi}	صفر
۵۰	۱۵/۰۰ ^c	۱۹/۰۰ ^b	۱۱/۶۷ ^{de}	۵۰
۵۰	۲۰/۶۷ ^{ab}	۲۳/۰۰ ^a	۱۳/۰۰ ^{cd}	۱۰۰
۱۰۰	۸/۰۰ ^{ghi}	۷/۰۰ ^{hij}	۵/۳۴ ^{ijk}	صفر
۱۰۰	۸/۰۰ ^{ghi}	۱۱/۰۰ ^{def}	۱۰/۳۴ ^{defg}	۵۰
۱۰۰	۱۰/۶۷ ^{defg}	۹/۳۴ ^{efgh}	۷/۰۰ ^{hij}	۱۰۰
بیدانه سفید				
صفر	۴/۳۴ ^{lmn}	۳/۶۷ ^{mn}	۳/۳۴ ⁿ	صفر
صفر	۷/۶۷ ^{ghijk}	۶/۶۷ ^{hijklm}	۵/۰۰ ^{klmn}	۵۰
صفر	۷/۶۷ ^{ghijk}	۹/۰۰ ^{fghi}	۶/۳۴ ^{ijklm}	۱۰۰
۵۰	۹/۳۴ ^{fgh}	۹/۰۰ ^{fghi}	۸/۰۰ ^{fghij}	صفر
۵۰	۱۲/۶۷ ^{cde}	۱۶/۶۷ ^{ab}	۱۰/۰۰ ^{fg}	۵۰
۵۰	۱۶/۳۴ ^{ab}	۱۸ ^a	۱۳/۰۰ ^{cd}	۱۰۰
۱۰۰	۵/۰۰ ^{klmn}	۵/۰۰ ^{klmn}	۴/۰۰ ^{lmn}	صفر
۱۰۰	۶/۰۰ ^{ijklmn}	۹/۰۰ ^{fghi}	۱۰/۶۷ ^{def}	۵۰
۱۰۰	۱۴/۶۷ ^{bc}	۱۰/۳۴ ^{efg}	۷/۶۷ ^{ghijk}	۱۰۰
شاهرودی				
صفر	۳/۰۰ ^{jk}	۴/۳۴ ^{hijk}	۲/۳۳ ^k	صفر
صفر	۷/۰۰ ^{defgh}	۵/۳۴ ^{fghij}	۵/۰۰ ^{hijk}	۵۰
صفر	۵/۳۴ ^{fghij}	۵/۳۴ ^{fghij}	۴/۶۷ ^{hijk}	۱۰۰
۵۰	۸/۰۰ ^{def}	۹/۳۴ ^{cd}	۶/۳۴ ^{efgh}	صفر
۵۰	۱۱/۰۰ ^{bc}	۱۳/۰۰ ^{ab}	۶/۶۷ ^{defgh}	۵۰
۵۰	۱۱/۳۴ ^{bc}	۱۴/۰۰ ^a	۹/۰۰ ^{cde}	۱۰۰
۱۰۰	۵/۰۰ ^{ghijk}	۶/۰۰ ^{fghi}	۴/۰۰ ^{ijk}	صفر
۱۰۰	۵/۰۰ ^{ghijk}	۷/۶۷ ^{defg}	۸/۰۰ ^{def}	۵۰
۱۰۰	۹/۳۴ ^{cd}	۹/۰۰ ^{cde}	۶/۰۰ ^{fghi}	۱۰۰

* حروف متفاوت در کلیه ستون‌ها و ردیف‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۱ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد. زمانی که بیشتر جنین‌ها در مرحله کروی بودند درصد تولید جنین سوماتیکی محاسبه گردید.

وجود اسیدآمینها در محیط کشت‌ها باعث افزایش درصد تولید جنین سوماتیکی شد، به طوری که بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی در همه ارقام مورد مطالعه در محیط کشت دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل آلانین، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آرژنین و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و کمترین درصد تولید جنین سوماتیکی برای تمام ارقام در محیط کشت فاقد اسیدآمین به دست آمد (جدول ۲). تولید جنین سوماتیکی در این آزمایش تحت تأثیر ژنوتیپ قرار گرفت، به طوری که رقم یاقوتی بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی (۹/۶۹ درصد) و رقم شاهرودی کمترین درصد تولید جنین سوماتیکی را ایجاد کردند (۸/۸۵ درصد). رقم بیدانه سفید نیز ۸/۸۵ درصد تولید جنین سوماتیکی داشت.



شکل ۱- کالوس جنین‌زای تولید شده در محیط کشت MS بدون هورمون (الف)، جنین سوماتیکی حاصل از کشت ریزنمونه برگ رقم یاقوتی در محیط کشت تمایزیابی دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل آلانین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آرژنین که با پیکان نشان داده شده است (ب) و گیاهچه‌های انگور به دست آمده از رشد جنین‌های سوماتیکی (ج) می‌باشد.

در این پژوهش غلظت‌های مختلف ساکاروز نیز مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش غلظت ساکاروز از ۳۰ به ۴۵ گرم در لیتر، افزایش در تولید جنین سوماتیکی در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید مشاهده شد. با این حال در غلظت ۶۰ گرم در لیتر کاهش در تولید جنین سوماتیکی در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید ایجاد کرد. ولی رقم شاهرودی با افزایش غلظت ساکاروز به ۶۰ گرم در لیتر افزایش در تولید جنین سوماتیکی مشاهده شد، به طوری که رقم شاهرودی در غلظت ۶۰ گرم در لیتر بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی را ایجاد کرد. در این آزمایش رقم یاقوتی در غلظت ۴۵ گرم در لیتر

بیشترین درصد جنین سوماتیکی را ایجاد کرد (۱۱ درصد). در غلظت ۲۰ گرم در لیتر فقط رقم یاقوتی جنین سوماتیکی ایجاد کند و در بقیه ارقام جنین سوماتیکی تولید نشد (جدول ۳).

جدول ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف ساکاروز بر روی درصد تولید جنین سوماتیکی در برخی ارقام انگور.

ارقام	غلظت‌های ساکاروز (گرم در لیتر)		
	۶۰	۴۵	۳۰
یاقوتی	۴/۶۷ ^{bc}	۱۱/۰۰ ^a	۴/۰۰ ^{bcd}
بیدانه سفید	۳/۳۴ ^{cde}	۵/۶۷ ^b	۲/۶۷ ^{cde}
شاهرودی	۴/۶۷ ^{bc}	۴/۰۰ ^{bcd}	۲/۰۰ ^{de}

*حروف متفاوت در کلیه ستون‌ها و ردیف‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ادرصد می‌باشد. زمانی که بیشتر جنین‌ها در مرحله کروی بودند درصد تولید جنین سوماتیکی محاسبه گردید.

اکثر جنین‌های سوماتیکی در محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP گیاهچه تولید نمودند (شکل ۳-ج).

بحث

در این پژوهش جنین سوماتیکی از ریزنمونه برگ در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش اثر مثبت افزودن کازئین هیدرولایزات به محیط کشت جهت تمایز جنین سوماتیکی در انگور مشخص شد، به طوری که با افزودن کازئین هیدرولایزات به محیط کشت، افزایش در تولید جنین سوماتیکی مشاهده شد که مطابق با یافته‌های مارو و همکاران (۱۹۸۶) می‌باشد. پاسخ به غلظت‌های مختلف کازئین هیدرولایزات جهت تولید جنین سوماتیکی در این پژوهش به ارقام بستگی داشت، به طوری که رقم شاهرودی در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر و ارقام یاقوتی و بیدانه سفید در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تولید جنین سوماتیکی را داشتند. در پژوهش‌هایی که در مورد گیاه نیشکر، فی‌جوآ و گوآوا انجام شده بود (لیریو و همکاران، ۲۰۰۱؛ مانوج و همکاران، ۲۰۰۹ و نیوس و همکاران، ۲۰۰۸)، اثر مثبت افزودن اسیدآمین به محیط کشت مشخص شده بود. در این پژوهش نیز با افزودن اسیدآمین‌ها به محیط کشت افزایش در تولید جنین سوماتیکی مشاهده شد، به طوری که در محیط کشت دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل آلانین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و

۵۰ میلی گرم در لیتر آرژنین بیشترین درصد جنین سوماتیکی تولید شد، در حالی که در محیط بدون اسیدآمین کمترین جنین سوماتیکی در همه ارقام مورد مطالعه به دست آمد. نتایج این پژوهش بر خلاف نتایج اپان و جرج (۱۹۹۰) می باشد که بیان نمودند استفاده از اسیدآمینها تولید جنین سوماتیکی در گیاه ارزن را کاهش می دهد. توازن نیتروژن معدنی و آلی در محیط کشت یک عامل مهم در القای جنین سوماتیکی می باشد (اوزاوا و همکاران، ۱۹۹۶). نیتروژن موجود در اسیدآمینها در طی متابولیسم و سنتز پروتئین در مقایسه با منبع نیتروژن غیرآلی سریع تر وارد اسکلت کربنی می شود (لی، ۱۹۹۳). بنابراین اثر مثبت افزودن اسیدآمین بر روی تولید جنین سوماتیکی احتمالاً به دلیل کاهش استفاده از منابع نیتروژن غیرآلی موجود در محیط کشت، و استفاده کالوس از اسیدآمینها می باشد. همچنین در این پژوهش با افزایش غلظت اسیدآمین آرژنین به ۱۰۰ میلی گرم در لیتر، کاهش در تولید جنین سوماتیکی نسبت به غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر ایجاد نمود. نقش ساکاروز در محیط کشت بیشتر به عنوان تامین کننده منابع کربنی مورد نیاز برای رشد در شرایطی که فتوسنتز انجام نمی شود، می باشد و همچنین به عنوان ماده ای که باعث افزایش فشار اسمزی می شود، بیان شده است. در بیشتر پژوهش های مربوط به تولید جنین سوماتیکی در انگور از غلظت ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز استفاده شده است، در این پژوهش مشخص شد که ارقام یاقوتی و بیدانه سفید در غلظت ۴۵ گرم در لیتر ساکاروز جنین سوماتیکی بیشتری را تولید کردند، در حالی که رقم شاهرودی در غلظت ۶۰ گرم در لیتر بیشترین جنین سوماتیکی را ایجاد کرد. این تفاوت ممکن است در نتیجه متفاوت بودن شرایط فیزیولوژیکی رقم شاهرودی با دیگر ارقام باشد. نتایج این پژوهش نظریه ادوین و همکاران، (۲۰۰۸) را که افزایش غلظت ساکاروز تولید جنین سوماتیکی را افزایش می دهد، تایید می کند. همچنین در غلظت ۲۰ گرم در لیتر ساکاروز در ارقام مورد مطالعه حالت آبکی شدن کالوس اتفاق افتاد که احتمالاً به دلیل کاهش فشار اسمزی محیط کشت و جذب آب زیاد توسط کالوس باشد، به طوری که در ارقام بیدانه سفید و شاهرودی جنینی در این غلظت ساکاروز مشاهده نشد و فقط رقم یاقوتی با درصد بسیار کم جنین تولید کرد، که احتمالاً به دلیل قابلیت بالای این رقم برای تولید جنین سوماتیکی می باشد. در نهایت این پژوهش پروتکل مؤثری را برای افزایش بازدهی تولید جنین سوماتیکی از ریزنمونه برگ در ارقام بیدانه سفید، یاقوتی و شاهرودی بیان می کند، که می تواند جهت اهداف انتقال ژن، بررسی تنوع سوماکلونال و سایر موارد استفاده شود. با این حال بررسی های بیشتر در مورد امکان تولید جنین

سوماتیکی در سایر ارقام انگور، همچنین بررسی اثر افزودن سایر ترکیبات به محیط کشت، به منظور بالا بردن بازدهی از این ریزنمونه می‌تواند راندمان کار را افزایش دهد.

منابع

1. Carimi, F., Barizza, E., and Gardiman, M. 2005. Somatic embryogenesis from stigma and styles of grapevine. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 41: 249–252.
2. Das, D.K., Reddy, M.K., Upadhyaya, C., and Sopory, S.K. 2002. An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Rep.* 20: 999-1005.
3. Eapen, S., and George, L. 1990. Influence of phytohormones, carbohydrates, aminoacids, growth supplements and antibiotic on somatic embryogenesis and plant differentiation in finger millet. *Plant Cell. Tissue. Organ Cult.* 22: 87-93.
4. Edwin, F.G., Michael, A.H., and Geert, J.D. 2008. *Plant propagation by tissue culture.* Springer, London, 504p.
5. Francisco, R., Rafael, R.H., and Victor, M. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 86: 285-301.
6. Franks, T., Botta, R.M., and Thomas, R. 2002. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theo Appl Genet.* 104: 397-404.
7. Gambino, G., Bondaz, J., and Gribaudo, I. 2006. Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlet of grapevine. *Eur J Plant Pathol.* 114: 397-404.
8. Gambino, G., Ruffa, P., Vallania, R., and Gribaudo, I. 2007. Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis spp.*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 90: 79-83.
9. Gresshoff, P.M., and Doy, C.H. 1974. Derivation of haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of mitotic development of anther for haploid culture of this and other genera. *ZPflanzenphysiol.* 73: 123-141.
10. Gribaudo, I., Gambino, G., and Vallania, R. 2004. Somatic embryogenesis from grapevine anther: identification of the optimal developmental stage for collecting explants. *Am. J. Enol. Vitic.* 55: 427-430.
11. Jeannin, G., Bronner, R., and Hahne, G. 1995. Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated in vitro: role of suger. *Plant Cell Rep.* 15, 200- 204.
12. Lea, P.J., 1993. Nitrogen metabolism. In: Lea., P.J, Leegood RC (eds). *Plant biochemistry and molecular biology.* Wiley, New York, Pp: 155-180.
13. Lirio, L., Dal, V., and Miguel, P.G. 2001. The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue. Organ Cult.* 64: 19-25.

14. Lopez-perez, A.J., Carreno, J., Martinez, A., and Dabauza, M. 2005. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. *Vitis*. 44: 79-85.
15. Maillot, P., Kieffer, F., and Walter, B. 2006. Somatic embryogenesis from stem nodal sections of grapevine. *Vitis*. 45: 185-189.
16. Manoj, K., Jaiswal, V.S., and Jaiswal, U. 2009. Effect of selected amino acids and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). *Sci Hort*. 121: 233-236.
17. Martinelly, L., Bragana, P., Poletti, V., and Scienza, A. 1993. Somatic embryogenesis from leaf and petiole-derived callus of *Vitis rupestris*. *Plant Cell Rep*. 12: 207-210.
18. Mauro, M. cl., Nef, C., and Fallot, J. 1986. Simulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. *Plant Cell Rep*. 5: 377-380.
19. Mullins, M.G., and Srinivasan, C. 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv Cabernet Sauvignon) by apomixis in vitro. *J Exp Bot*. 27: 1002-1030.
20. Nidez, R.P., 1994. Growth of embryogenic sweet orange callus on media varying in the ratio of nitrate to ammonium nitrogen. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 39: 1-5.
21. Nieves, N., Sagarra, F., Gonzalez, R., Lezcano, Y., Cid, M., Blanco, M.A., and Castillo, R. 2008. Effect of exogenous arginine on sugarcane (*Saccharum* sp.) somatic embryogenesis, free polyamines and the contents of the soluble proteins and proline. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 95: 313-320.
22. Olahe, R., Aniko, Z., Andrezej, P., Sussane, H., Laszlo, G., and kovacs, G. 2009. Somatic embryogenesis in broad spectrum of grapevine genotypes. *Sci Hort*. 120: 134-137.
23. Ozawa, K., Ling, D.H., and Komamine, A. 1996. High-frequency somatic embryogenesis from small suspension-cultured cluster of cells of an interspecific hibryd of *Oryza*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 64: 157-159.
24. Ravindra, B.M., and Johannes, V. 2005. Role of antioxidants and amino acids on somatic embryogenesis of *Pinus patula*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 41: 181-186.
25. Salunkhe, C.K., Rao, P.S., and Mhatre M. 1997. Induction of somatic embryogenesis and plantlets in tendrils of *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Rep*. 17: 65-7.
26. Scorza, R., Cordts, J.M., Ramming, D.W., and Emershad, R.L. 1995. ransformation of grape (*Vitis vinifera*) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep*. 14: 589-592.
27. Vidal, J.R., Rama, J., Taboada, L., Martin, C., Ibanez. M., Segura, A., and Gonzales- Benito, E. 2009. Improved somatic embryogenesis of grapevine (*vitis vinifera*) with a focus on induction parameters and efficient plant regeneration. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*. 96: 85-94.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Plant Production, Vol. 20 (1), 2013
<http://jopp.gau.ac.ir>

Effect of different concentrations of sucrose, casein hydrolysate and amino acids on somatic embryogenesis in some grapevine (*Vitis vinifera*) cultivars

***A.J. Mahmood¹, A. Ebadi², M. Omid³ and M. Masoodi⁴**

¹Ms.c Student, Dept. of Horticultural, University of Tehran, ²Associate Prof., Dept. of Horticultural University of Tehran, ³Prof. Dept. of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, ⁴Instructor, Science of Prdis, University of Tehran

Abstract

Leaf explants of grapevine cultivars Shahroodi, Bidaneh Sefid and Yaghouti were cultured in MS medium supplemented with 1mg/l BAP and 0.1mg/l 2,4-D for callus induction. To differentiate somatic embryo, achieved callus were cultured on MS medium contained various concentrations of sucrose, casein hydrolysate and supplemented with glutamine, phenyl alanine and arginine amino acids. Yaghouti and Bidaneh Sefid cultivars produced the highest percentage of somatic embryos in medium containing 250mg/l casein hydrolysate and Shahroodi in medium contained 500mg/l casein hydrolysate. On the other hand, in all studied cultivars the highest percentage of somatic embryos was obtained in medium contained 10mg/l phenyl alanine, 100mg/l glutamine and 50mg/l arginine. Although, Yaghouti and Bidaneh Sefid cultivars were produced the highest percentage of somatic embryos in medium contained 45g/l sucrose, Shahroodi cultivar produced the highest percentage of somatic embryos in medium contained 60g/l sucrose.

Keywords: Grapevine; Somatic embryogenesis; Medium; Sucrose; Amino acids

*Corresponding Author; Email: jamalmahmood.amir@gmail.com

