DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4

اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر القا و رشد کالوس در چهار رقم انگور با هدف استحصال رسوراترول

زهرا وصال طلب و منصور غلامی*

ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۸

چکیده

بافت کالوس گیاهی قابلیت‌های متنوعی دارد از آن جمله می‌توان به کاربرد آن در تهیه کشت‌های تعلیق سلولی بمنظور تولید متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات مفید طبیعی اشاره نمود. بمنظور القای کالوس در ریزنمونه های چهار رقم انگور رجبی سفید شیراز، بی‌دانه قرمز، شاهانی و مکر قوچان از دو گروه ترکیب هورمونی الف) ۲،۴- دی کلروفنوکسی استیک اسید (در سه سطح) بهمراه بنزیل آدنین و ب) نفتالین استیک اسید (در سه سطح) و بهمراه کینتین استفاده شد. در اغلب ریزنمونه ها بیشترین درصد القا در سطح سه نفتالین استیک اسید مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با سطح دو نشان نداد. در بخش القاء و پرآوری پاسخ ریزنمونه ها به سطوح مختلف تنظیم کننده های رشد گیاهی متفاوت و وابسته به رقم بود. غلظت ۰/۷ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و ۰/۲ میلی گرم در لیتر کینتین بمنظور استحصال کشت تعلیق سلولی انتخاب شد که با چندین واکشت با کیفیت مطلوب حاصل گردید. پس از یافتن غلظت و ترکیب مناسب هورمون در محیط کشت، هدف از این مطالعه بررسی تفاوت در توانایی تولید رسوراترول سلول های ارقام مختلف انگور در شرایط کشت تعلیق سلولی می‌باشد. بررسی محتوای رسوراترول سلول کشت های تعلیق سلولی نشان داد بیشترین محتوای ترنس رسوراترول مربوط به کشت تعلیق سلولی رقم رجبی سفید شیراز بود. از مهمترین دلایل تفاوت در محتوای رسوراترول در کشت سلولی انگور، تفاوت در ذخیره ژنتیکی ارقام معرفی شده است.

واژه های کلیدی: انگور، رسوراترول، کشت تعلیق سلولی، تنظیم کننده های رشد گیاهی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۳۸۲۳۲۰۹۲ ، پست الکترونیکی: mgholami@basu.ac.ir

مقدمه

متابولیت‌های ثانویه گیاهی در ابتدا به عنوان مواد غیرضروری گیاهی تلقی می‌شدند زیرا هنوز ضرورت این ترکیبات در زنده مانی گیاهان تولید کننده مشخص نشده بود. در حال حاضر نقش حیاتی این ترکیبات در سازوکار دفاعی و بقای گیاهان درشرایط تنش پذیرفته شده است (۲۵و ۲۸). علی‌رغم پیشرفت‌های فراوان در ساخت ترکیبات در شیمی، صنعت داروسازی هنوز برای تعداد زیادی از متابولیت‌های ثانویه منتج به داروها، وابسته به منابع بیولوژیکی می‌باشد (۱۳، ۴۷ و ۵۰). بیوتکنولوژی، فرصتی را بمنظور بهره برداری از سلول، بافت یا اندام از طریق رشد آنها در محیط درون شیشه‌ای فراهم می آورد. بنابراین کشت سلول گیاهی می‌تواند به عنوان یک منبع جایگزین گیاه کامل برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش عمل کند. راهکارهای زیست فناورانه نظیر کشت بافت گیاهان دارویی، روش مناسبی برای تولید ترکیبات دارای ویژگی‌های درمانی می‌باشد. کشت بافت گیاهی در حال حاضر توجه جهانی را به دلیل توانایی سلول‌ها در ساخت ترکیبات ویژه نظیر متابولیت‌های ثانویه مفید به

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4

عنوان ترکیبات دارویی و غذایی به خود جذب کرده است (۴۴، ۴۸و ۲۰) که به دلیل داشتن مزیت‌هایی مانند مستقل بودن از تغییرات جغرافیایی، عوامل محیطی و سرعت بالای رشد مورد استقبال پژوهشگران و همچنین صنایع دارویی قرار گرفته است (۳۰).

بافت کالوس گیاهی قابلیت‌های متنوعی دارد که از آن جمله می‌توان به کاربرد آن در تهیه کشت‌های تعلیق سلولی بمنظور تولید متابولیت های ثانویه و یا ترکیبات مفید اشاره نمود (۳۳و ۴۴). سیتوکینین‌ها نظیر بنزیل آدنین (Benzyl Adenine) یا کینتین (Kinetin) در ترکیب با اکسین‌ها، نظیر ۲و۴- دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) یا نفتالین استیک اسید (Naphthalene acetic acid) در غلظت‌های کم اغلب در گونه های گیاهی القای کالوس را پیش می‌برند (۱۷و۳۵). نسبت این دو گروه از تنظیم کننده‌ها به یکدیگر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است زیرا اکسین‌ها و سیتو کینین‌ها می توانند سطوح یکدیگر را تنظیم کنند (۵۴ و۱۰).

کشت کالوس محدودیت‌هایی نظیر عدم یکنواختی تولید سلول، عدم رشد یکنواخت تک تک سلول‌ها و عدم دسترسی یکنواخت به اکسیژن و مواد غذایی دارد و به همین دلیل در مقایسه با کشت تعلیق سلولی از قابلیت کمتری برخوردار است (۲۴). برای جداسازی سلول‌های کالوس و تشکیل کشت تعلیق سلولی می‌توان آنزیم پکتیناز به محیط کشت افزود. برای افزایش شکنندگی و تردی کالوس و ایجاد یک کشت تعلیق سلولی خوب از نسبت بالای اکسین به سیتوکینین در محیط کشت استفاده می‌شود (۷).

انگور (*Vitis vinifera*) یکی از مهمترین محصولات خانواده *Vitaceae* است. متابولیت‌های ثانویه با ساختار فنلی از اجزای مهم انگور در تعیین رنگ، طعم و ترکیبات اصلی فرآورده های حاصل از میوه انگور می‌باشند (۴۹). گروهی از متابولیت‌های ثانویه با ارزش انگور می‌توان به استیلبن‌ها (Stilbenes) اشاره کرد. استیلبن‌ها گروه کوچکی از ترکیبات شیمیایی با ساختار ۱و۲- دی فنیل اتیلن (1,2-diphenylethylene) هستند که از مسیر فنیل پروپانوئید (Phenypropanoid pathway) مشتق می‌شوند. اغلب استیلبن‌ها فعالیت فیتوالکسینی دارند و مشتقات واحدهای مونومری آن ترانس رسوراترول (t-R ۳،۵،۴-تری هیدروکسی استیلبن) می‌باشد. اگرچه ساختارهای دیگری نیز در سایر خانواده های گیاهی شناسایی شده‌است (۱۴). شکل‌گیری استیلبن‌ها بخشی از مکانیسم عمومی دفاع گیاهی می‌باشد و نقش مؤثری در فعالیت‌های ضد میکروبی و ضد قارچی ایفا می‌کند (۲۷و ۴۲). در حقیقت ترنس رسوراترول در بافت‌های مختلف بوته انگور، حبه و کشت‌های سلولی آنها و نیز در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی تولید می‌شود (۱۶). فواید سودمند ترنس رسوراترول روی سیستم عصبی (۴۰)، سیستم قلبی عروقی (۱۵) فعالیت‌های ضد سرطانی و بازدارندگی تومورزایی (۴۱)، ضد پیری (۱۹)، ضد آلزایمری (۱۲) و ضد پلاکتی (۲۶) گزارش شده است.

مطالعات زیادی روی استفاده از تکنیک‌های مختلف درون شیشه‌ای برای ارقام *V. vinifera* صورت گرفته است (۱۸، ۴۵ و ۳۴). در بررسی صورت گرفته روی ارقام انگور، از ترکیب محیط بهینه در بخش جامد فاقد آگار برای کشت تعلیق سلولی همان رقم استفاده شده است (۴، ۵۳و ۴۶). باتوجه به ارزش درمانی و تغذیه‌ای مواد فنلی انگور بویژه رسوراترول و میزان تولید محدود این ترکیبات در شرایط طبیعی در گیاه تلاش برای دست یابی به روش‌های مناسب جهت افزایش تولید این ترکیبات در آزمایشگاه مورد توجه می‌باشد. ازاین رو داشتن سلول‌های پر رشد انگور در مرحله اول و استحصال استیلبن‌هایی نظیر رسوراترول در مراحل بعد از اهمیت بسزایی برخوردار است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات غلظت و ترکیبات هورمونی روی القا و پرآوری کالوس چهار رقم انگور با هدف داشتن سلول‌های با رشد قوی در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشد.

مواد و روشها

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4

تهیه ریزنمونه: این پژوهش در آزمایشگاه‌های گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا انجام گرفته است. ارقام انگور مورد استفاده در این پژوهش رجبی سفید شیراز، بیدانه قرمز، مکر قوچان و ریش بابا سیاه از مرکز تحقیقات باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه شد. برای تهیه بافت کالوس از یک سوم میانی شاخه های جوان استفاده شد. قطعات ساقه ابتدا با آب شهری و چند قطره توین شستشو (دو قطره در یک لیتر آب) و در ادامه به مدت ۲ دقیقه با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شد. پس از این در محلول هیپوکلریت سدیم با غلظت ۲/۵ درصد حجمی به حجمی به مدت ۸ دقیقه غوطه ور شد. در پایان سه نوبت در آب مقطر استریل در بازه زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه شستشو شد. ساقه ها پس از تقسیم به قطعات یک سانتی متری در محیط کشت جامد قرار گرفتند.

القای کالوس: محیط کشت مورد استفاده حاوی درشت مغذی‌های محیط B_5، ریزمغذی‌های محیط MS، ویتامین های مورل (۳۷)، ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کازئین هیدرولیزات، ۲ درصد وزنی به حجمی ساکارز و و ۰/۷۵ درصد وزنی به حجمی آگار با pH ۵/۷ بود. تیمارهای هورمونی در مرحله القاء در شش سطح مطابق جدول ۱ به محیط کشت اضافه شد. ریزنمونه های کشت شده در شرایط دمایی ۲۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور حدود ۱۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. پس از گذشت چهار هفته درصد القای کالوس و کیفیت کالوس ارزیابی شد. کیفیت ظاهری کالوس‌ها براساس زمان ظهور کالوس و قطر آن در پایان هفته چهار مطابق روش متکووسکی (۲۰۰۴) (۳۶) در چهار گروه امتیازدهی شدند: ۱)کالوس‌های با القا و رشد ضعیف، ۲) کالوس‌های با القا متوسط و رشد ضعیف، ۳) کالوس‌های با القا خوب و رشد متوسط و ۴) کالوس‌های با القای خوب و رشد قوی. برای این منظور، اندازه گیری‌ها در چهار تکرار و در دو نوبت (تاریخ) برداشت ریزنمونه در شهریور و اردیبهشت تکرار شد.

جدول ۱- ترکیب هورمونی بترتیب استفاده شده در محیط کشت القای کالوس

شماره	ترکیب هورمونی
۱	۰/۳ میلی گرم در لیتر آلفا-نفتالین استیک اسید و ۰/۲ میلی گرم در لیتر کینتین
۲	۰/۵ میلی گرم در لیتر آلفا-نفتالین استیک اسید و ۰/۲ میلی گرم در لیتر کینتین
۳	۰/۷ میلی گرم در لیتر آلفا-نفتالین استیک اسید و ۰/۲ میلی گرم در لیتر کینتین
۴	۰/۱ میلی گرم در لیتر ۲و۴-D و ۰/۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین
۵	۰/۳ میلی گرم در لیتر ۲و۴-D و ۰/۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین
۶	۰/۵ میلی گرم در لیتر ۲و۴-D و ۰/۱ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین

پرآوری کالوس و استحصال کشت تعلیق سلولی: بمنظور پرآوری کالوس‌های حاصل از چهار رقم انگور از مقایسه ترکیب نفتالین استیک اسید در سه سطح (۰/۳:سطح یک، ۰/۵: سطح دو و ۰/۷ میلی گرم در لیتر: سطح سه) و کینتین در دو سطح (۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم در لیتر) در سه تکرار استفاده گردید. وزن تر کالوس‌ها ارزیابی شد. آزمایش در دو نوبت تکرار شد. در بخش القاء بافت کالوس متنوع شامل آبکی کم رشد، آبکی پررشد، دانه دانه ترد با رشد کم تا متوسط، دانه دانه ترد با رشد زیاد و بلوری با رشد زیاد مشاهده شد. از بین چند گروه فوق، بافت کالوس دانه دانه، ترد و با رشد زیاد به دلیل حفظ سرعت رشد بالا طی واکشت‌های متوالی و نیز توانایی

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4

پخش مناسب در محیط مایع، در ادامه آزمایش‌ها مورد استفاده قرارگرفت. از سوی دیگر، به دلیل عملکرد بهتر ترکیب نفتالین استیک اسید و کینتین، داده های مربوط به گروه ترکیب هورمونی ۲و۴- D به دلیل مغایرت ویژگی‌های فیزیکی کالوس (داشتن بافت بلوری، یکپارچه و سخت) با استحصال کشت تعلیق سلولی در ادامه حذف گردید. کشت تعلیق سلولی مطلوب که از سلول‌های منفرد تشکیل شده بود با انتقال یک گرم کالوس به ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت پیش‌تر، اشاره شده دارای ترکیب هورمونی موفق در مرحله پرآوری و فاقد آگار و از طریق چندین نسل گزینش و واکشت‌های متوالی در محیط کشت منتخب در مرحله پرآوری حاصل شد. در این مرحله از شیکر اوربیتالی با سرعت ۱۲۰rpm استفاده شد.

استخراج ترکیبات فنلی، فلاونوییدی و رسوراترول: به این منظور از کشت ۷ روزه کالوس چهار رقم انگور استفاده شد. بلافاصله پس از برداشت کالوس در ازت مایع منجمد شد و تا زمان استخراج در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله استخراج به ۳۰۰ میلی گرم از سلول منجمد ۱/۵ میلی لیتر از محلول استخراج شامل ۹۹درصد متانول و ۱درصد اسید هیدروکلریک اضافه شد. نمونه حاصل ۲۰ ثانیه ورتکس شد و در تاریکی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. بمنظور جداسازی سلول‌ها، نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ (هرولب) شدند. در نهایت محلول رویی پس از عبور از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر برای سنجش فنل، فلاونویید و رسوراترول استفاده شد.

سنجش فنل کل بر اساس روش فولین سیوکالتئو (۵۲) بااستفاده از گالیک اسید به عنوان یک استاندارد بر حسب میلی گرم بر ۱۰۰ گرم وزن ترتعیین شد. جذب نمونه ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV1280، شیماتزو، ساخت کشور ژاپن) انجام شد. میزان فلاونویید کل نیز با استفاده از روش ایکسو و همکاران (۲۰۱۵) (۵۲) براساس میزان جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر سنجیده شد و برحسب میکروگرم روتین در هر گرم وزن تر تعیین شد.

برای سنجش ترانس رسوراترول از دستگاه HPLC (High performance liquid chromatography) کنوئر مدل اسمارت لاین ساخت کشور آلمان، ستون ۱۸C به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر استفاده شد. آشکارساز از نوع فرابنفش بود که در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و طول موج ۳۰۶ نانومتر تنظیم گردید. حجم تزریق هر نمونه به دستگاه ۲۰ میکرولیتر و سرعت جریان فاز متحرک ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه بود. استاندارد ترانس رسوراترول از شرکت سیگما تهیه شد.

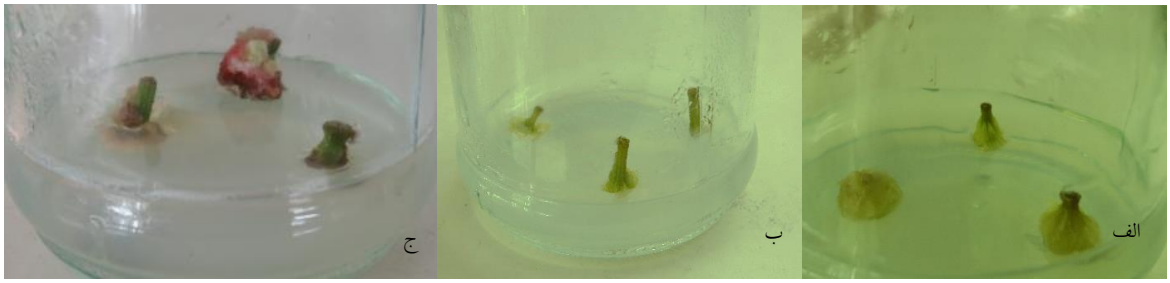
تجزیه واریانس داده ها براساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در بخش بهینه سازی تنظیم کننده رشد در محیط کشت و کاملاً تصادفی در بخش مقایسه محتوای فنل، فلاونویید و رسوراترول سلول های حاصل از چهار رقم انگور با استفاده از نرم افزار SAS 9.4 انجام گرفت.

نتایج

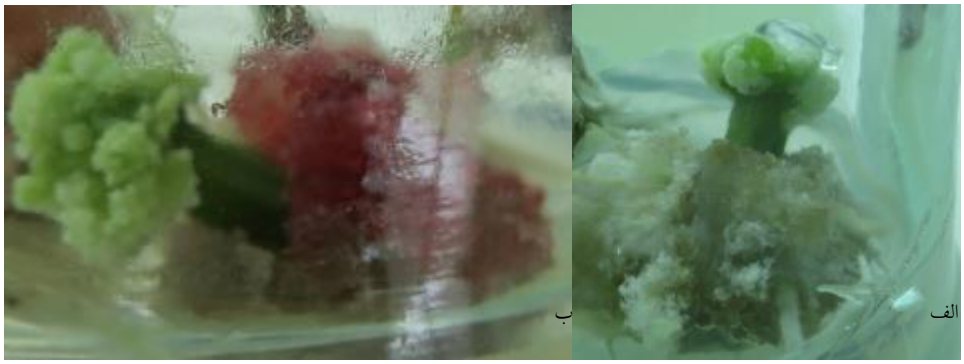
القای کالوس: پس از ۸ الی ۱۴ روز ریزنمونه ها در محیط حاوی ۲،۴- D کمی متورم شدند وآرام آرام تغییر رنگ داده، از سبز به زرد متمایل شدند (شکل۱). ریزنمونه ها در محیط حاوی نفتالین استیک در محل تماس با محیط کشت ابتدا متورم شده و سپس توده های سفید رنگ در ارقام سفید (رجبی سفید شیراز و مکر قوچان) و سفید وقرمز رنگ در ارقام قرمز (ریش بابای سیاه و بی‌دانه قرمز) مشاهده شدند (شکل۱). بخشی از ساقه که در خارج از محیط حاوی نفتالین استیک اسید قرارگرفته بود، پس از چهارهفته تغییر ساختار نشان نداد. در تعداد کمی از نمونه ها رشد کالوس در هر دو سمت ریزنمونه مشاهده شد (شکل۲). تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثرات ساده هورمون، رقم و فصل، اثرات متقابل دوگانه هورمون و رقم،

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4

رقم و فصل و نیز اثرات متقابل سه گانه آنها بر درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود (جدول۲). با افزایش غلظت اکسین در بیشتر موارد افزایش درصد القای کالوس مشاهده شد که به رقم انگور نیز وابسته بود. بطور کلی توانایی القای کالوس رقم رجبی سفید شیراز بیش از سایر ارقام در شرایط مشابه بود. بین رقم بی‌دانه قرمز و ریش بابای سیاه تفاوت معنی داری نبود (شکل۳). عموماً القای کالوس در نوبت دوم برداشت ریزنمونه (اردیبهشت)، بهتر از نوبت اول (شهریور) روی داد. رقم مکر قوچان علی رغم استفاده از ریزنمونه با شرایط ظاهری مشابه در نوبت اول (شهریور) نسبت به نوبت دوم (اردیبهشت) القای کالوس ضعیفی نشان داد (شکل۴). بررسی اثرات متقابل سه گانه نشان داد، افزایش غلظت هورمون اکسین در محیط کشت در اغلب ارقام با افزایش درصد القای کالوس همراه است. در استفاده از هورمون ۲،۴- D در نوبت اول رقم بیدانه قرمز استثنائاً با افزایش غلظت این هورمون درصد القای کالوس کاهش یافت. در رقم مکر قوچان نیز در نوبت اول و دوم افزایش این هورمون با افزایش درصد القا همراه نبود (جدول۳). بیشترین درصد القا (۱۰۰درصد) در ارقام رجبی سفید شیراز و ریش بابای سیاه در تیمار ۰/۷ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و ۰/۲ میلی گرم در لیتر کینتین در دو نوبت برداشت ریزنمونه اردیبهشت و شهریور حاصل شد. رقم بی‌دانه قرمز در نوبت اردیبهشت در تیمار فوق بالاترین درصد القا (۹۸،۷۵) را نشان داد. رقم مکر قوچان نیز بیشترین درصد عملکرد (۹۳،۷۵) خود را در همین تیمار هورمونی در نوبت اردیبهشت نشان داد.



شکل۱- القای کالوس در مراحل اولیه در محیط کشت حاوی الف) ۲،۴- D و بنزیل آدنین، ب) نفتالین استیک اسید و کینتین در ارقام سفید رنگ و ج) نفتالین استیک اسید و کینتین در ارقام قرمز رنگ در بازه زمانی ۱۶ روزه



شکل ۲- رشد کالوس در هر دو سمت ریزنمونه در برخی از نمونه ها در محیط کشت حاوی نفتالین استیک اسید و کینتین در الف)رقم رجبی سفید شیراز و ب)رقم ریش بابای سیاه

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر فصل، رقم و ترکیب تنظیم کننده های رشد بر درصد القا و کیفیت کالوس رقم‌های انگور در زمان ۲۸ روز پس از کشت.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد القای کالوس	کیفیت کالوس
فصل	۱	۲۰۲۱۳,۰۲**	۲۸,۲۱**
رقم	۳	۱۷۰۴۲,۵۳**	۲۱,۵۱**
ترکیب هورمونی	۵	۴۱۲۷,۳۹**	۹,۰۶**
فصل * رقم	۳	۱۱۵۸۰,۰۳**	۱۵,۱۵**
فصل * ترکیب هورمونی	۵	۸۴,۸۹ ns	۰,۱۲۸ns
رقم * ترکیب هورمونی	۱۵	۳۹۰,۶۵**	۱۰,۷**
فصل * رقم * ترکیب هورمونی	۱۵	۲۳۷,۳۲**	۰,۵۵**
خطا	۱۴۴	۱۰۷,۵۵	۰,۱۴
ضریب تغییر (درصد)	-	۱۳,۹۹	۱۳,۷۷

** و ns بترتیب اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد و عدم اختلاف معنی دار.

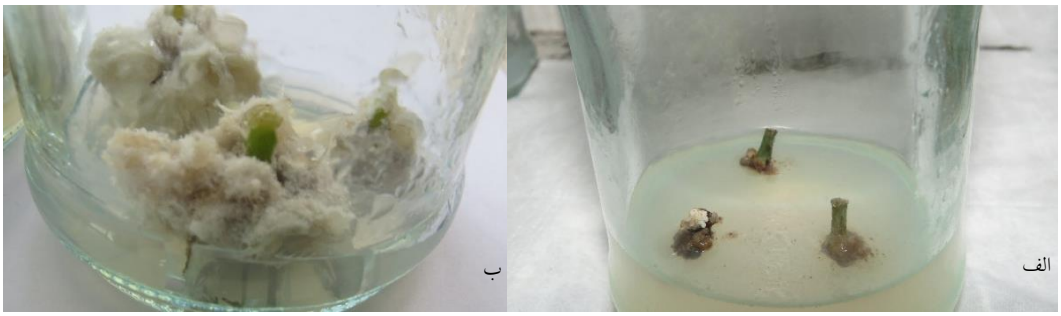
مشاهدات کالوس های القا شده حاکی از آن شد که در ارقام مختلف هورمون D -۲،۴ تأثیر مثبتی بر میزان القای کالوس داشته است. به طوری که کالوس های ایجاد شده در محیط حاوی این هورمون، دارای بافت محکم و سخت‌تری بودند، اما با افزایش غلظت افزایش میزان کالوس بویژه در رقم بی دانه قرمز و مکر قوچان مشاهده نشد و از میزان استحکام کالوس‌ها کاسته شد (شکل۵). القای کالوس در محیط حاوی D -۲،۴ با ظاهری متفاوت و تورم بیشتر در طول ساقه در مقایسه با محیط حاوی نفتالین استیک اسید مشاهده شد (شکل۵). کالوس حاصل در محیط D -۲،۴ دارای بافت محکم و سخت بود اما با افزایش غلظت این هورمون بافت کالوس و حتی ریزنمونه در برخی موارد نرم شد.

کیفیت ظاهری کالوس‌های القاء شده در این بخش براساس قدرت القای کالوس در ریزنمونه ها و رشد آن (۳۶)، ارزیابی و رتبه دهی شد. بررسی عوامل فصل، رقم و ترکیب هورمونی در غلظت های مختلف در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد.

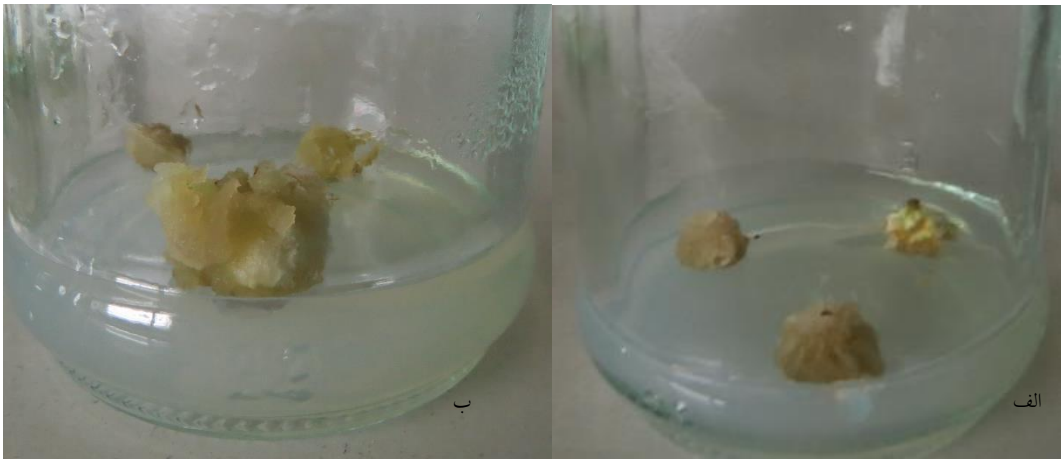
شکل ۳- القای کالوس در رقم رجبی سفید شیراز (الف، ب و پ)، رقم بی‌دانه قرمز (ت و ج) و رقم ریش بابای سیاه (چ و ی) پس از گذشت چهار هفته

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4

اثرات متقابل دوگانه رقم و فصل و نیز رقم و ترکیب هورمونی در غلظت های مختلف در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد. اثرات متقابل سه گانه رقم، تیمار و فصل نیز معنی دار بود (جدول۲ و نمودار۱). بطور کلی بایستی این نکته را در نظر داشت که کیفیت کالوس تابعی از درصد عملکرد می باشد. افزایش غلظت هورمون نفتالین استیک اسید، افزایش کیفیت را در پی داشت اگرچه افزایش این هورمون از سطح دو به سطح سه عموماً اختلاف معنی داری نشان نداد. افزایش غلظت هورمون D -۲،۴ ازسطح دو به سه در برخی موارد با کاهش کیفیت همراه بود که القای کالوس در ریزنمونه اردیبهشت در رقم بیدانه قرمز و ریش بابای سیاه و نیز ریزنمونه برداشت شهریور رقم رجبی سفید شیراز و ریش بابای سیاه از آن جمله می‌باشد.



شکل ۴- تفاوت القای کالوس در نوبت الف) اردیبهشت ماه نسبت به ب) شهریور ماه در رقم مکر قوچان پس از گذشت ۴ هفته



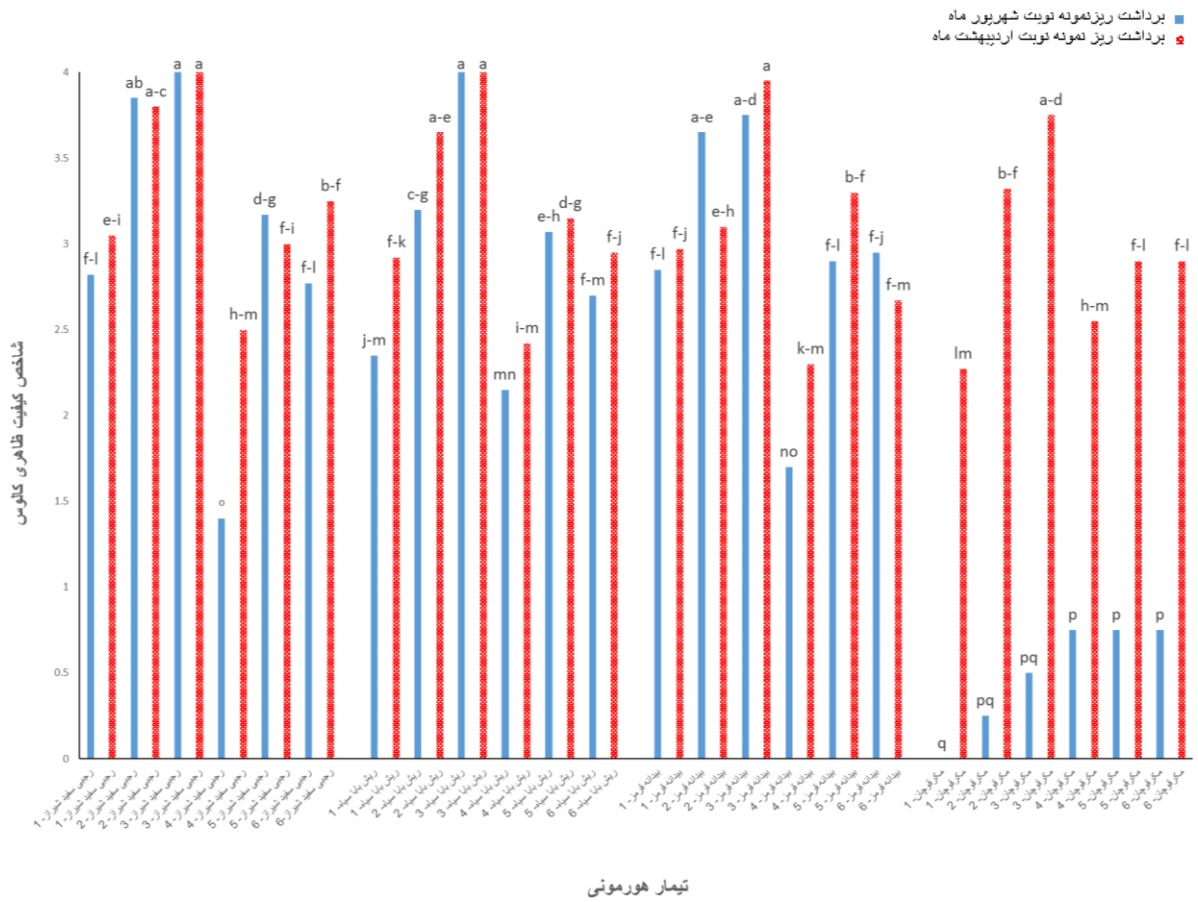
شکل ۵- القای کالوس در رقم بی دانه قرمز (الف) و مکر قوچان (ب) در محیط محتوی ۲و۴-D پس از گذشت چهار هفته

جدول ۳- اثرات متقابل سه گانه رقم، فصل و ترکیب هورمونی بر القای کالوس پس از گذشت چهار هفته

زمان برداشت ریزنمونه	رقم	بنزیل آدنین ۰،۱ میلی گرم در لیتر + ۲و۴-D (میلی گرم در لیتر)			کینتین ۰،۲ میلی گرم در لیتر + نفتالین استیک اسید (میلی گرم در لیتر)		
		۰،۱	۰،۲	۰،۳	۰،۳	۰،۵	۰،۷
نوبت شهریور	ریش بابا سیاه	$I\text{-}L_{۶۳،۷۵}$	$D\text{-}I_{۷۶،۲۵}$	$B\text{-}I_{۷۸،۷۵}$	$I\text{-}L_{۶۱،۲۵}$	$A\text{-}D_{۹۳،۷۵}$	$A_{۱۰۰}$
	رجبی سفید شیراز	$KL_{۵۳،۷۵}$	$B\text{-}I_{۷۸،۷۵}$	$A\text{-}C_{۹۵}$	$C\text{-}I_{۷۷،۵}$	$AB_{۹۶،۲۵}$	$A_{۱۰۰}$
	بیدانه قرمز	$L_{۵۱،۲۵}$	$A\text{-}E_{۹۱،۲۵}$	$A\text{-}F_{۸۸،۷۵}$	$G\text{-}K_{۷۰}$	$A\text{-}G_{۸۷،۵}$	$A\text{-}D_{۹۳،۷۵}$
	مکرقوچان	$M_{۱۸،۷۵}$	$M_{۱۸،۷۵}$	$M_{۱۸،۷}$	$N_{۰}$	$NM_{۶،۲۵}$	$NM_{۱۲،۵}$
نوبت اردیبهشت	ریش بابا سیاه	$H\text{-}K_{۶۸،۷۵}$	$A\text{-}H_{۸۲،۵}$	$A\text{-}E_{۹۱،۲۵}$	$F\text{-}J_{۷۱،۲۵}$	$A\text{-}D_{۹۳،۷۵}$	$A_{۱۰۰}$
	رجبی سفید شیراز	$F\text{-}J_{۷۱،۲۵}$	$A\text{-}D_{۹۳،۷۵}$	$A\text{-}C_{۹۵}$	$A\text{-}H_{۸۳،۷۵}$	$A\text{-}D_{۹۳،۷۵}$	$A_{۱۰۰}$
	بیدانه قرمز	$E\text{-}J_{۷۳،۷۵}$	$A\text{-}C_{۹۵}$	$A_{۹۷،۵}$	$H\text{-}L_{۶۶،۲۵}$	$F\text{-}J_{۷۱،۲۵}$	$A_{۹۸،۷۵}$
	مکر قوچان	$F\text{-}J_{۷۲،۵}$	$A\text{-}H_{۸۲،۵}$	$A\text{-}H_{۸۲،۵}$	$J\text{-}L_{۵۸،۷۵}$	$A\text{-}G_{۸۷،۵}$	$A\text{-}D_{۹۳،۷۵}$

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی داری را با هم در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4



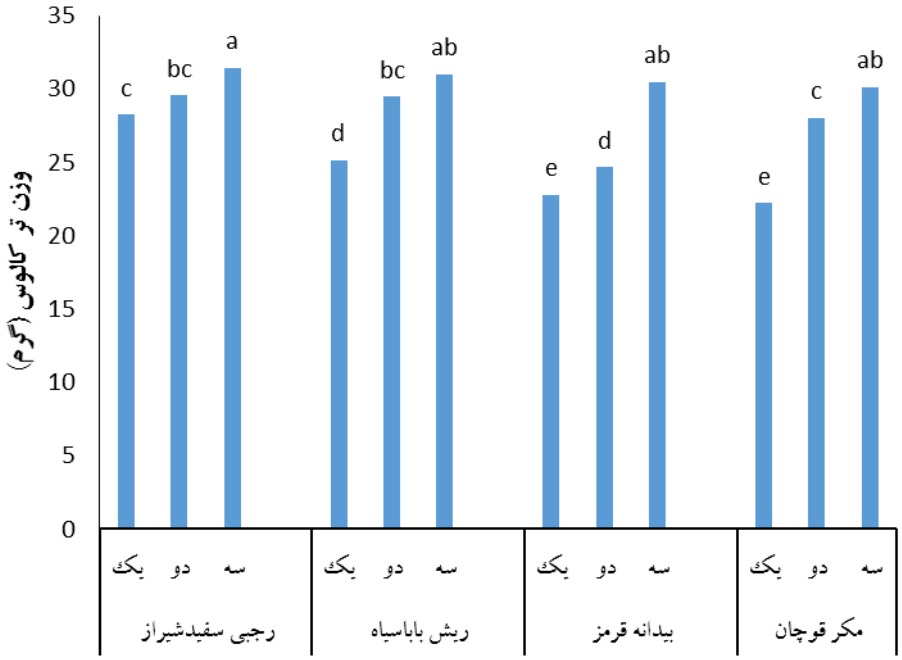
نمودار ۱- مقایسه کیفیت کالوس القا شده در چهار رقم انگور طی دو نوبت برداشت ریزنمونه. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی داری را با هم در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

پرآوری کالوس و استحصال کشت تعلیق سلولی: پس از گذشت یک ماه از کشت ریزنمونه ، نمونه های با رشد ضعیف و کالوس‌های آبکی حذف و کالوس‌های دارای بافت ترد و رشد قوی برای مرحله پرآوری کشت شدند (شکل۶). در بخش پرآوری نیز همانطور که قبلاً اشاره شد کالوس حاصل از ترکیب هورمونی نفتالین استیک اسید و کینتین از رشد بیشتر و بافت ترد، شکری و دانه دار برخوردار بود و در مرحله بعد نیز در شرایط کشت مایع، سلول‌ها به راحتی از یکدیگر تفکیک شدند. این در حالی است که کالوس حاصل از ترکیب هورمونی ۲،۴ D- و بنزیل آدنین رشد کمتر و بافت محکم، سخت، یکپارچه و فشرده ای داشت و این ویژگی در واکشت های بعدی نیز مشاهده شد. هدف از پرآوری کالوس در این مطالعه در نهایت استحصال کشت تعلیق سلولی و برداشت متابولیت های ثانویه رسوراترول می باشد. ویژگی‌های فیزیکی کالوس حاصل از ترکیب هورمونی ۲،۴ D- و بنزیل آدنین به دلیل بافت محکم و فشرده مغایر با هدف این بررسی بوده و به همین دلیل از بررسی و ارایه داده های حاصل ازین بخش صرف نظر شد. دراین بخش با افزایش غلظت هورمون نفتالین استیک اسید وزن‌تر کالوس افزایش نشان داد و بین ارقام مختلف پاسخ به سطوح مختلف هورمون نفتالین استیک اسید متفاوت بود (جدول۴). اما در بالاترین غلظت این هورمون تفاوت معنی داری میان ارقام مشاهده نشد (شکل۷). از آنجایی که ملاک انتخاب بافت کالوس در هر واکشت پررشدی و تردی بافت کالوس بود با افزایش تعداد واکشت ها میزان تولید آنتوسیانین در کالوس های

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4

انتخابی کمتر و پراکنده شد. افزایش کینتین در پایان دوره تفاوت معنی داری در افزایش وزن تر نداشت. اگرچه آغاز رشد محسوس در برخی تیمارهای ۰/۴ میلی گرم در لیتر کینتین در ترکیب با غلظت های نفتالین استیک اسید زودتر از تیمار ۰/۲ میلی گرم در لیتر همین هورمون مشاهده شد اما در اندازه گیری وزن تر در پایان دوره تفاوت معنی داری نشان نداد. اثرات متقابل میان رقم و ترکیبات هورمون نفتالین استیک اسید معنی دار شد (نمودار۲).

شکل ۶- اولین واکشت کالوس های حاصل از رقم ریش بابای سیاه، رجبی سفید شیراز، مکرقوچان و بی دانه قرمز (بترتیب از راست به چپ)



نمودار ۲- اثرات متقابل رقم و ترکیب هورمونی نفتالین استیک اسید در سه سطح. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی داری را با هم در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

شکل ۷- پرآوری کالوس رقم ریش بابای سیاه، مکر قوچان، بی دانه قرمز و رجبی سفید شیراز (بترتیب از راست به چپ) در محیط نفتالین استیک اسید ۰،۷ میلی گرم در لیتر و کینتین ۰،۲ میلی گرم در لیتر پس از گذشت ۴ هفته

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4

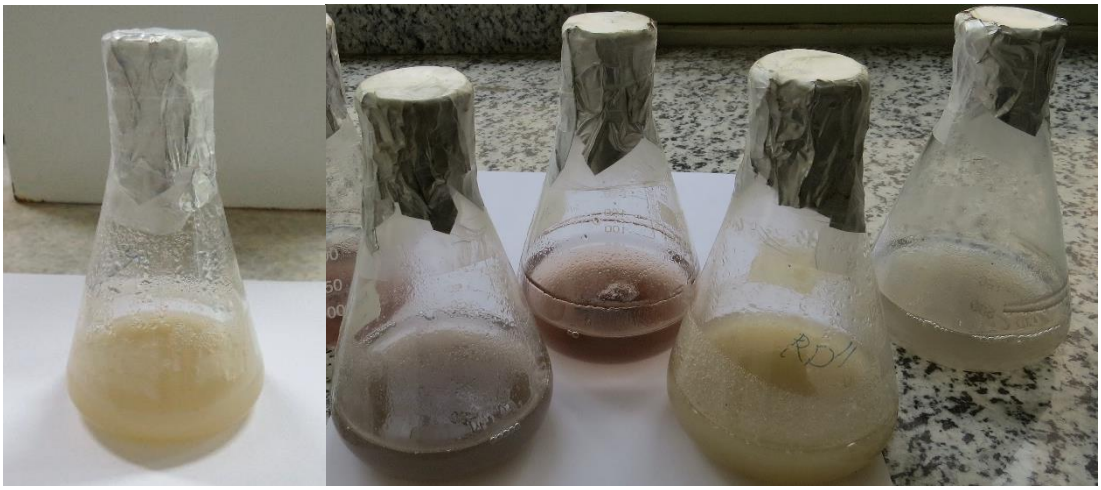
جدول ۴-تجزیه واریانس پرآوری کالوس رقم های انگور تازه خوری

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات وزن تر کالوس
رقم	۱	۵۱,۹۷**
غلظت اکسین	۳	۲۲۹,۳۱**
غلظت سیتوکینین	۵	۲,۹۷ns
رقم*سطوح غلظت اکسین	۳	۱۳,۳۵**
رقم*غلظت سیتوکینین	۵	۰,۱۲۴ns
غلظت اکسین* غلظت سیتوکینین	۱۵	۲,۲۷ns
رقم * غلظت اکسین* غلظت سیتوکینین	۱۵	۰,۰۳ns
خطا	۱۴۴	۲,۱۷
ضریب تغییر(درصد)	-	۵,۳۰

**اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد

کشت تعلیق سلولی با انتقال قطعاتی از کالوس به محیط کشت مایع محتوی نفتالین استیک اسید (۰/۷ میلی گرم در لیتر) و کینتین (۰/۲ میلی گرم در لیتر) بوجود آمد. سلول های کالوس در نتیجه چرخش مداوم شیکر به تدریج از یکدیگر جدا شدند و بدون نیاز به استفاده از آنزیم پکتیناز پس از چند نوبت واکشت به فاصله دوهفته طی چند ماه، کشت تعلیق سلولی مطلوب با همگنی و هم شکلی بالای سلول های منفرد حاصل شد.

استخراج ترکیبات فنلی، فلاونوییدی و رسوراترول: پس از گذشت ۶ ماه از استقرار کشت تعلیق سلولی چهار رقم، برداشت سلول ها بمنظور ارزیابی محتوای فنل، فلاونویید و رسوراترول صورت گرفت (شکل۸). ارزیابی مقایسه میانگین‌های هر سه صفت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. سلول‌ها در کشت تعلیق سلولی رقم بی‌دانه قرمز محتوای فنل و فلاونویید بیشتری در مقایسه با سایر ارقام نشان دادند (نمودار ۳).



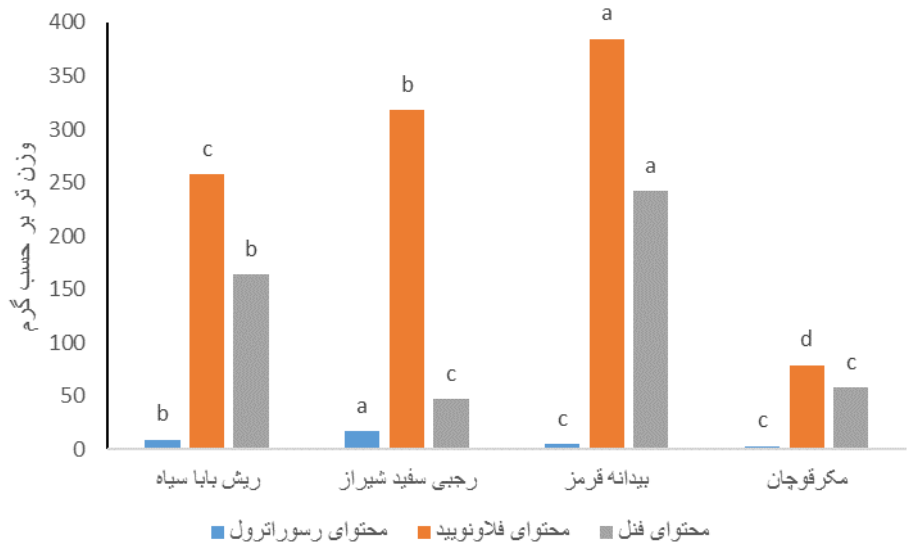
شکل ۸- انتقال قطعات کالوس جامد به محیط مایع پس از دو هفته (سمت راست)، کشت سوسپانسیون سلولی رقم رجبی سفید شیراز پس از چندین واکشت (سمت چپ)

غلظت ترنس رسوراترول در سطح ارقام مختلف تفاوت معنی داری نشان دادند. بیشترین غلظت ترنس رسوراترول مربوط به کشت تعلیق سلولی رقم رجبی سفید شیراز شناسایی شد. در رتبه بعد با اختلاف نسبتاً زیاد رقم ریش بابای سیاه قرارگرفت. میان دو رقم مکر قوچان و بی‌دانه قرمز اختلاف معنی داری مشاهده نشد (نمودار۳).

بحث و نتیجه گیری

تعداد زیادی از گیاهان چوبی رفتار مشابهی در خصوص القای کالوس در بافت‌های دارای فعالیت مریستمی از خود نشان می‌دهند. پاسخ متفاوت ریزنمونه ها در محیط کشت به تفاوت وضعیت فیزیولوژیکی و نیز تفاوت محتوای داخلی هورمون آن ها بستگی دارد (۲۳). القای کالوس بطورگسترده‌ای در ارقام منتخب انگور گزارش شده است، اما تاکنون مقایسه‌ای از ارقام مورد بررسی در این پژوهش گزارشی ارایه نشده است.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4



نمودار ۳- مقایسه محتوای رسوراترول بر حسب میکروگرم در گرم وزن تر، فنل بر حسب میلی گرم اسید گالیک در گرم وزن تر، فلاونویید بر حسب میکروگرم روتین در گرم وزن تر سلول های ارقام مختلف در شرایط کشت تعلیق سلولی. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی داری را با هم در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

القاء و پرآوری کالوس نخستین مرحله از مراحل کشت بافت با هدف استحصال کشت تعلیق سلولی می‌باشد (۳۸). اکسین و سیتوکینین بعنوان تنظیم کننده های رشد گیاهی، فاکتورهای کلیدی برای کنترل تقسیم سلولی در شرایط کشت بافت هستند (۱و ۹). استفاده از D -۲،۴ و نفتالین استیک اسید (بعنوان منبع اکسین) وکینتین و بنزیل آدنین (بعنوان منبع سیتوکینین) بمنظور تولید کالوس در کشت بافت گیاهان زیادی گزارش شده است (۱، ۲، ۹، ۱۱، ۳۱ و۴۳). یافته های این پژوهش در اغلب تیمارها با نتایج ونلیو و همکاران (۲۰۱۰) (۵۱) که اذعان داشتند با افزایش غلظت D -۲،۴ و نیز نفتالین استیک اسید در حضور بنزیل آدنین درصد القای کالوس در ریزنمونه های مختلف انگور رقم مرلوت افزایش می‌یابد مطابقت داشت. به نظر می‌رسد محتوای داخلی اکسین و سیتوکینین ریزنمونه های ارقام مختلف عامل تفاوت نتایج القای کالوس در آن‌ها باشد. در حقیقت، میزان بهینه تنظیم کننده های خارجی به ژنوتیپ و مقدار هورمون داخلی گیاه بستگی دارد (۸).

باتوجه به القای ضعیف کالوس در تیمارهای مختلف هورمونی در ریزنمونه های نوبت برداشت شهریور رقم مکر قوچان به نظر می رسد بلوغ زودتر در این رقم می‌تواند یکی از دلایل تجمع ترکیباتی نظیر فنل ها و در نتیجه پاسخ ضعیف‌تر به تولید کالوس در شرایط درون شیشه باشد. ونلیو و همکاران (۲۰۱۰) (۵۱) نیز غلظت بالای ترکیبات پلی فنلی در ریزنمونه های مختلف انگور را از دلایل القای ضعیف کالوس در ریزنمونه معرفی کردند. اینطور بنظر می‌رسد شاخه های رشد سال جاری علی رغم داشتن قطر و شرایط ظاهری مشابه از بلوغ بیشتر و تجمع ترکیبات فنلی بیشتری در شهریورماه برخوردار بودند و به همین دلیل میانگین درصد القای کالوس کمتری نسبت به اردیبهشت ماه داشتند (جدول ۳).

ترکیبات محیط کشت در کالوس زایی تأثیر بسزایی دارند. این اثر زمانی مشهود است که تنظیم کننده های رشد به محیط کشت اضافه می‌گردند (۲۲). در پژوهش حاضر از اکسین و سیتوکینین بمنظور القای کالوس استفاده گردید. اکسین و سیتوکنین به عنوان تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، فاکتورهای کلیدی برای کنترل تقسیم سلولی در شرایط کشت بافت می‌باشند. دراین پژوهش افزایش غلظت اکسین از سطح دو به سه در بیشتر گروه ها از اختلاف کمتری

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4

نسبت به سطح یک به دو در القای کالوس برخوردار بود. این مطلب مبین کاهش اثر بخشی افزایش غلظت اکسین در سطوح بالاتر می‌باشد.

نتایج این آزمایش نشان داد تفاوت در ترکیب نوع هورمون اکسین و سیتوکینین تفاوت در نوع و درصد القای کالوس را در پی دارد. در ارقام مختلف پیش از این نیز تفاوت در انواع کالوس القاء شده بدلیل تفاوت در محیط کشت محتوی منبع اکسینی ۲،۴- D و یا نفتالین استیک اسید گزارش شده بود (۱۱).

در رقم بی‌دانه قرمز افزایش ۲،۴- D از سطح ۲ به ۳ کاهش درصد القا نشان داد. غلظت‌های زیاد ۲،۴- D ممکن است برای بیان ژن های درگیر در تقسیم سلولی و تمایززدایی بافت مهارکننده باشد (۳۳). پیش‌تر بررسی القای کالوس در گیاه خربزه تلخ (*Momordica charantia*) نیز بر هم کنش ۲،۴- D و بنزیل آدنین در سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر نشان داد که با افزایش مقادیر ۲،۴- D از ۰/۲۵ به ۰/۵ میلی گرم در لیتر درصد القای کالوس افزایش نیافت و غلظت بالاتر هورمون تقریباً نقش بازدارنده داشت (۲). به نظر می‌رسد اکسین‌های صنعتی نظیر ۲و۴- دی در غلظت‌های بالا ویژگی گیاه کشی از خود نشان می‌دهند و به همین دلیل از تشکیل کالوس جلوگیری می‌کنند (۱۱).

ونلیو و همکاران (۲۰۱۰) (۵۱) گزارش کردند رقم و غلظت و نوع هورمون اکسین بر درصد القای کالوس موثر بود. دراین گزارش پایه انگور Zhi168 و Beta با کمترین غلظت بکار رفته هورمون ۲،۴- D (۰/۱ میلی گرم در لیتر)در ترکیب با بنزیل آدنین بیشترین درصد القای کالوس (۱۰۰درصد) را داشتند. در حالیکه در انگور شرابی رقم Merlot و انگور تازه خوری Jingxu بیشترین درصد القاء در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر ۲،۴- D و یا ۴ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک در ترکیب با بنزیل آدنین حاصل شد. در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است که غلظت بهینه تنظیم کننده‌های رشد برای القای کالوس به عوامل متعددی از جمله ژنوتیپ گیاه اصلی و ویژگی‌های رقم مورد استفاده بستگی دارد (۵،۳ و ۸).

گزارش شده است رقم، غلظت و نوع هورمون اکسین بر کیفیت کالوس حاصل نیز موثر می‌باشد. در مطالعه ای که بر القای کالوس در پایه انگور Zhi168 و Beta انجام شد نتایج نشان داد کمترین غلظت بکار رفته هورمون ۲،۴- D (۰/۱ میلی گرم در لیتر) در ترکیب با بنزیل آدنین بهترین کیفیت کالوس زایی را در پی داشت و با افزایش غلظت ۲،۴- D کیفیت کالوس القاء شده کاهش نشان داد (۵۱). در این آزمایش نیز افزایش غلظت هورمون نفتالین استیک اسید، افزایش کیفیت را در پی داشت در حالی که افزایش غلظت هورمون ۲،۴- D ازسطح دو به سه در برخی موارد با کاهش کیفیت همراه بود.

سالاری پور و همکاران (۱۳۹۴) (۶) گزارش کردند شکل سلول های توتون در محیط کشت بسته به نوع ترکیب هورمون اکسین بکار رفته تفاوت نشان داد به نحوی که در محیط حاوی نفتالین استیک اسید کشیده و در محیط حاوی ۲،۴- D، کروی بودند. در حالی که شکل سلول‌های کالوس انگور در پژوهش حاضر در محیط حاوی نفتالین استیک اسید کروی بود و در محیط حاوی ۲،۴- D سلول-های کشیده و کروی مشاهده شد. به نظر می‌رسد نوع هورمون اکسین تا حدودی در شکل ظاهری سلول ها و نحوه قرارگیری آن ها در کنار یکدیگر موثر است و پاسخ سلول‌های کالوس بسته به نوع گیاه متفاوت است. اساساً تنها منبع دسترسی کالوس‌ها به هورمون، همان نسبت‌های هورمونی موجود در محیط کشت است (۳۹). هریک از هورمون‌های اکسین و سیتوکینین می تواند سطح دیگری را تنظیم کند. القای آنزیم سیتوکینین اکسیداز توسط اکسین اثبات شده است (۲۹ و ۵۴). به نظر می‌رسد سطح کینتین در این آزمایش در بخش پرآوری، توسط سطوح نفتالین استیک اسید در بازه زمانی چهار هفته تنظیم شده است.

همانطور که انتظار می رود پتانسیل ژنتیکی ارقام مختلف انگور توانایی متفاوتی در تولید این ترکیب استیلبنوییدی در

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4

شرایط یکسان محیطی دارند. دراین آزمایش نیز ارقام مختلف، در شرایط کشت تعلیق سلولی مقادیر متفاوتی از رسوراترول تولید کردند. پیش از این نیز، مطالعات روی سطوح ژرم پلاسم *Vitis* نشان داد که محتوای رسوراترول به ژنوتیپ وابسته است (۳۲ و ۵۱). اثنی عشری و محمودی پور (۲۰۱۰) (۲۱) نیز با بررسی کشت تعلیق سلولی حاصل از ریزنمونه برگ و میوه دو رقم انگور ایرانی، به تفاوت پتانسیل ارقام در تولید رسوراترول تاکید کردند.

یافتن نسبت و ترکیب مناسب تنظیم کننده های رشد گروه اکسینی و سیتوکینین بمنظور القاء، پرآوری و استحصال کشت تعلیق سلولی اهمیت بسزایی دارد. استفاده از ترکیب ۰,۷ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و ۰,۲ گرم در لیتر کینتین توانست بیشترین وزن تر کالوس در هرچهار رقم انگور را تولید کند. با استفاده از همین ترکیب در کشت تعلیق سلولی نیز رشد و کیفیت مطلوبی حاصل شد. معرفی ارقام مختلف انگور با توانایی بیشتر در تولید رسوراترول و نیز استفاده از توانایی افزایش رشد وتولید متابولیت‌های ثانویه در کشت تعلیق سلولی در کنار هم، می‌تواند گامی مؤثر در تولید تجاری این ترکیب ارزشمند در آینده باشد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا برای حمایت‌های مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می کنیم.

منابع

۱. احمدی، ا.، کاووسی، م.، سلطانلو، ح.، صالحی جوزانی، غ.، و ستاریان، ع.، ۱۳۹۸. بررسی کالزایی و باززایی در گونه جنگلی آزاد (*Zelkova carpinifolia*) در شرایط کشت درون شیشه¬ای، مجله پژوهش های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، ۳۲ (۱)، صفحات ۱-۹.

۲. اصغرزاده، ر.، مرادی، ح.، نعمتزاده، ق.، و قنبری، ع.، ۱۳۹۵. بررسی اثر تنظیم کننده های رشد بر کالوس‌زائی گیاه داروئی *Momordica charantia*، فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۱۵ (۳)، صفحات ۴۶-۵۶.

۳. آقازاده اقدم، ل.، حسینی، ب.، زارع مهرجردی، م.، و دولتی بانه، ح.، ۱۳۹۰. تأثیر ترکیبات هورمونی مختلف و ژنوتیپ روی القای کالوس در ارقام انگور، هفتمین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، تهران https://civilica.com/doc/37594.

۴. اندی، ع.، ۱۳۹۵. بیوسنتز برخی مواد فنلی در کشت سوسپانسیون سلولی انگور تحت تأثیر نور و متیل جازمونات، رساله دکتری فیزیولوژی و اصلاح درختان میوه، گروه علوم باغبانی، دانشگاه بوعلی سینا، ۱۱۷صفحه.

۵. رستمی، ر.، و ارشادی، ا.، ۱۳۹۸. بهینه سازی باززایی گیاهان حاصل از جنین زایی سوماتیکی در شش رقم انگور، علوم باغبانی ایران، ۵۰(۴)، صفحات ۹۳۵-۹۴۵.

۶. سالاری پور، س.، کریم زاده، ق.، معینی، ا.، و ترکش اصفهانی، س.، ۱۳۹۴. تولید سوسپانسیون سلولی از ارقام توتون شرقی (*Nicotiana tabacum*) بمنظور تولید لاین سلولی، فناوری زیستی در کشاورزی، ۴ (۲)، صفحات ۱-۱۱.

۷. طغیانی، م.، احسان پور، ع.، شریعتی، م.، و امام زاده، ر.، ۱۳۹۵. مطالعه تغییرات میزان هورمون‌های اکسین و سیتوکینین و تغییرات سوماکلونال در گیاهان (*Nicotiana rustica* L.) باززایی شده و کالوس توتون، مجله پژوهش‌های گیاهی، ۲۹ (۲)، صفحات ۱-۹.

۸. گولان، ع.، مظفری، ع.، قادری، ن.، و مریوانی، ف.، ۱۳۹۳. القای کالوس از ریزنمونه های برگ و پیچک سه رقم انگوردر شرایط درون شیشه‌ای، سومین کنگره ملی کشاورزی ارگانیک و مرسوم، ایران اردبیل، صفحات ۱-۴.

۹. وطندوست، ش.، و زبرجدی، ع.، ۱۳۹۹. بررسی اثر نوع ریز نمونه و سطوح مختلف تنظیم کننده های رشد بر کالزایی و باززایی در گیاه دارویی بابونه (*Matricaria aurea* L)، مجله پژوهش های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، ۳۳ (۱)، صفحات ۱-۱۴.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4

10. Abdul Rahman, N.N., Rosli, R., Kadzimin, S., and Hakiman, M., 2019. Effects of auxin and cytokinin on callus induction in *Catharanthus roseus* (L.) G., Don. Fundamental and Applied Agriculture, 4(3), PP: 928–932.

11. Andre, S.B., Mongomake, K., Modeste, K.K., Edmond, K., Tchoa, K., Hilaire, T., and Justin, Y., 2015. The effect of plant growth regulators and carbohydrates on callus induction and proliferation from leaf explant of *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenaceae). International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 8 (2), PP: 118-127.

12. Anekonda, T.S., 2006. Resveratrol- a boon for treating Alzeimer's disease? Brain Research Reviews, 52, PP: 316-326.

13. Arnason, J.T., 1995. Phytochemistry of medicinal plants. Springer Science, Business Media, New York, Chapter two Pezzuto, J.M., Natural Product Cancer Chemoprotective Agents, PP: 19-45.

14. Belchi-Navarro, S., Almagro, L., Lijavetzky, D., Bru, R., and Pedreno, M.A., 2012. Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using Cyclodextrins and methyjasmonate, Plant Cell Report, 31, PP: 81-89.

15. Bradamante, S., Barenghi, L., and Villa, A., 2004. Cardiovascular protective effects of resveratrol, Cardiovascular Drug Reviews, 22, PP: 169-168.

16. Bru, R., Selles, S., Casado-Vela, J., Belchi-Navarro, S., and Pedreno, M.A., 2006. Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, PP: 65-71.

17. Chai, B.L., and Mariam, B.S., 1998. Application of biotechnology in turf grass genetic improvement, Crop Science, 38, PP: 1320-133.

18. Chee, R., and Pool, R.M., 1982. The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultured *in vitro*, Science Horticulture,16, PP: 17-27.

19. Dela Lastra, C.A., and Villegas, I., 2005. Resveratrol as an anti inflammatory and anti aging agent: mechanisms and clinical implications, Molecular Nutrition and Food Research, 49, PP: 405-430.

20. Ebrahimi, M., and Mokhtari, A., 2017. Engineering of Secondary Metabolites in Tissue and Cell Culture of Medicinal Plants: An Alternative to Produce Beneficial Compounds Using Bioreactor Technologies, Springer International Publishing, PP: 137-167.

21. Esna-Ashari, M., and Mahmoudi Pour, A., 2010. Ultraviolet irradiation enhances resveratrol production in organs and cell suspension cultures of two Iranian grapes (*Vitis vinifera* L.) cultivars, Food, (4), PP: 23-26.

22. George, E.F., Hall, M.A., and Klerk, G.J.D., 2008. Plant propagation by tissue culture, 3rd Edition, Springer, 504 p.

23. Guerra, M., and Handro, W., 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration in different organs of palm. Journal of Plant Research, 111, PP: 65-71.

24. Hakkim, F.L., Kalyani, S., Essa, M., Giriga, S., song, H., 2011. Production of rosmarinic acid in *Ocimum sanctum* (L.) cell suspension cultures by the influence of growth regulators. International Journal of Biological and Medical Research, 4(2), PP: 1158-1161.

25. Hartmann, T., 2007. From waste products to ecochemicals, fifty years research of plant secondary metabolism, Phytochemistry, 68, PP: 2831-2846.

26. Huang, Y.L., Tsai, W.J., Shen, C.C., and Chen, C.C., 2005. Resveratrol derivatives from the roots of *Vitis thunbergii*, Journal of Natural Products, 68, PP: 217-220.

27. Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., and Adran, M., 2002. Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, Phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. Journal of Agricultural and food chemistry, 50, PP: 2731-2741.

28. Juric, S., Stracenski, K., Krol-Kilinska, Z., Zutic, I., Uher, S. F., Dermic, E., Topolovec-Pintaric, S., and Vincekovic, M., 2020. The enhancement of plant secondary metabolites content in *Lactuca sativa* L., by encapsulated bioactive agents. Scientific Reports, 10:3737-3749. https://doi.org/10.1038/s41598-020-60690-3

29. Kaminek, M., Motyka, V., and Vankova, R., 1997. Regulation of cytokinin content in plant cells, Physiologia Plantarum, 101(4), PP: 689-700.

30. Kartal, M., Konuklugil, B., Indrayanto, G., and Alfermann, A.W., 2004. Comparison of different extraction methods for the determination of podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin in *Linum* species, Pharmaco Biomed, 35, PP: 441-447.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4

31. Khorrami Raad, M., Bohluli Zanjani, S., Ramezani Sayyad, A., Maghsudi, M., and Kaviani, B., 2012. Effect of cultivar, type and age of explants, light conditions and plant growth regulators on callus formation of anthurium, americaneurasian, American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 12 (6), PP: 706-712.

32. Li, X. D., Wu, B. H., Wang, L. J., and Li, S. H., 2006. Extrable amounts of trans-resveratrol in seed and berry skin in *Vitis* evaluated at germplasm level, Journal of agricultural and food chemistry 54 (23), PP: 8804-8811.

33. Mahmood, I., Razzaq, A., Khan, Z., Hafez, I.A., and Kaleem, S., 2012. Evaluation of tissue culture responses of promising Wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and development of efficient regeneration system, Pakistan Journal of Botany, 44, PP: 277-284.

34. Martinez-Markuez, A., Morante-Carriel, J., Ramirez-Strada, K., Cusido, R., Selles-Marchart, S., Palazon, J., Pedreno, M., Bru-Martinez, R., 2015. A reliable protocol for The stable transformation of non-embryogenic cell cultures of grapevine (*Vitis vinifera*) and Taxus x media. J Biol Methods, 2(2), PP:1-8.

35. Mastuti, R., Munawarti, A., and Firdiana, E. R., 2017. The combination effect of auxin and cytokinin on in vitro callus formation of Physalis angulata L., A medicinal plant. 8th International Conference on Global Resource Conservation. AIP Conference Proceedings, 040007-1–040007-6, https://doi.org/10.1063/1.5012721

36. Matkowski, A., 2004. In vitro isoflavonoid production in callus from different organs of *Pueraria lobate* (Wild.) Ohvi, Journal of Plant Physiology, 161(3), PP: 343-346.

37. Morel, G., 1970. Le probleme de la transformation tumorale chez les vegetaux. Physiology vegetables, 8, PP: 189-191.

38. Ngara, R., Rees, J., and Ndimba, B.K., 2008. Establishment of Sorghum cell suspension culture system for proteomics studies. Africa Journal Biotechnology, 7, PP: 744-749.

39. Nordstrom, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Astot, C., Dolezal, K., and Sandberg, G., 2004. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,101 (21), PP: 8039-8044.

40. Okawara, M., Katsuki, H., Kurimoto, E., Shibata H., Kume, T., and Akike, A., 2007. Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults, Biochemistry Pharmacology, 73, PP: 550-560.

41. Pervaiz, S., 2003. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology, Faseb Journal, 17, PP: 1975-1985.

42. Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., and Richter, H., 2004. Effects of resveratrol and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development, Vitis, 43,PP: 145-148.

43. Sharafi, A., Hashemi Sohi, H., and Jourabchi, E., 2008. Improvement on the situation of regeneration of medicinal plant *Artemisia annua* L., Journal of Environmental Research, 21,PP: 565-573.

44. Sheeba, E., Palanivel, S., and Parvathi, S., 2013. Effect of plant growth regulators on callus induction in *Physalis Minima* Linn. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology, 9(2), PP: 4847-4851.

45. Singh, S.K., Sharma, H.C., Singh, S.P., and Sharma, R.R., 2000. Propagation of grape through repetitive micro-cutting technique, Indian Horticulture, 3, PP: 14-15.

46. Tassoni, A., Fornale, S., Feranceschetti, M., Musiani, F., Michael, A., Perry, B., and Bagni, N., 2005. Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures, New Phytologist 166, PP: 895-905.

47. Valli, M., Pivatto, M., Danuello, A., Castro-Gamboa, I., Helena, D., Silva, S., Cavalheiro, A. J., Araujo, A.R., Furlan, M., Lopes, M.N., Vanderlan, and Bolzani, S., 2012. Tropical biodiversity: Has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry, *Quim, Nova*, 35(11), PP: 2278-2287.

48. Vanisree, M., Lee, C.H.Y., Lo, S.H., Nalawade, S.M., Lin, C.Y., and Tsay, S., 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures Review, Botanical Bulletin of Academia Sinica, 45, PP:1-22.

49. Waffo Teguo, P., Krisa, S., Pawlus, A.D., Richard, T., Monti, J.P., and Merillon, J.M., 2013. Grapevine stilbenoids: Bioavailability and neuroprotection handbook of natural products: Phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes, Merillon, J.M., and Ramawat, K.G., Berlin, Springer Berlin Heidelberg, PP: 2275-2309.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.1.10.4

50. Weber, T., and Kim, H. U., 2016. The secondary metabolite bioinformatics portal, Computational tools to facilitate synthetic biology of secondary metabolite production, Synthetic and Systems Biotechnology, (1), PP: 69-79.

51. Wen Liu, C. H., Liu, C. H., Yang, L., Wang, S. H., and Li, L., 2010. Effect of grape genotype and tissue type on callus growth and production of resveratrols and their piceids after UV-C irradiation, Food Chemistry, 122, PP: 475-481.

52. Xu, A., Zhan, J.C., and Huang, W.D., 2015. Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv, Cabernet Sauvignon, Plant Cell Tissue Organ Culture, 122(1), PP: 197-211.

53. Zamboni, A., Vrhovsek, U., Kassemeyer, H., Mattivi, F., and Velasco, R., 2006. Elicitor induced resveratrol production in cell cultures of different grape genotypes. Vitis, 45(2), PP: 63-68.

54. Zhang, R., Zhang, X., Wang, J., Letham, D., McKinney, S., and Higgins, T., 1995. The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an ipt gene. Planta, 196(1), PP: 84-94.

The effect of plant growth regulators on induction and callus growth in four grape cultivars with the aim of resveratrol extraction

Vesaltalab Z. and Gholami M.

Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

Abstract

Plant callus tissue has a variety of capabilities, including its use in the preparation of cell suspension cultures to produce secondary metabolites and beneficial natural compounds. In order to induce callus in four varieties explants of Rajabi Sefid Shiraz, Bidaneh Ghermez, Shahani and Makr Quchan from two hormonal compound groups of A) 2,4-D (in three levels) with BA and B) NAA (in three levels) with Kinetin were used. In most explants, the highest percentage of induction was observed at the third level of naphthalene acetic acid, which did not show a significant difference with the second level. The response of explants to different levels of plant growth regulators was different and dependent on cultivars, in induction and proliferation. Concentrations of 0.7 mg / l NAA and 0.2 mg / l Kinetin were selected to obtain cell suspension cultures, which good quality was obtained by several subcultures. After finding the appropriate concentration and composition of the hormone in the culture medium, the aim of this study was investigation of the diversity of Resveratrol cell production ability in different grape varieties under cell suspension culture. Measurements of the Trans-Resveratrol content of cell suspension cultures showed that the highest Trans-Resveratrol content was related to the cell suspension culture of Rajabi Sefid Shiraz. Differences in the genetic information of cultivars have been introduced as one of the most important reasons for differences in resveratrol content in grapes.

Key words: Grape, Resveratrol, Cell suspension culture, Plant growth regulators