

Scientific Short Article

باززایی گیاه از جنین‌های رویشی حاصل از ریزنمونه پیچک در سه رقم ایرانی
انگور (*Vitis vinifera* L.)

Plant Rregeneration Via Somatic Embryo from Tendril Explant in Three Iranian
Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Cultivars

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

۱، ۲ و ۴- به ترتیب استاد، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد، گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع
طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳- مربی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۱۹

چکیده

عبادی، ع.، جمال محمود، ا.، میرمعصومی، م.، و امیدی، م. ۱۳۹۰. باززایی گیاه از جنین‌های رویشی حاصل از ریزنمونه پیچک در سه رقم ایرانی انگور
(*Vitis vinifera* L.) مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۷: ۲۸۱-۲۷۵.

باززایی، بهترین اندام برای این منظور است
(Martinelly and Gribaudo, 2009). تولید
جنین رویشی در انگور تحت تاثیر فاکتورهای
مختلف مانند ژنوتیپ (Olahe et al., 2009)،
محیط کشت (Perrin et al., 2001)، نوع و
غلظت‌های مختلف هورمونی
(Carimi et al., 2005)، نوع ریزنمونه
(Gambino et al., 2007) و زمان جمع‌آوری
ریزنمونه (Gribaudo et al., 2004)؛
(Vidal et al., 2009) قرار می‌گیرد. برای تولید
جنین رویشی در انگور در اغلب موارد از
ریزنمونه‌های تهیه شده از اندام‌های زایشی مانند

اصلاح سنتی انگور که شامل دورگ‌گیری و
تلاقی‌های کنترل شده است، به دلیل طولانی
بودن دوره نونهالی برای اصلاح این گیاه مناسب
نیست، بنابراین استفاده از روش‌های مهندسی
ژنتیک مانند انتقال ژن اهمیت ویژه‌ای دارد
(Scorza et al., 1995). برای انتقال ژن فراهم
کردن بافت مناسب که پذیرای ژن هدف باشد،
از ضروریات است. از آنجایی که بازدهی
تراریخته کردن سلول در کار انتقال ژن بسیار
پایین است، ارائه بافتی که قابلیت باززایی بالایی
داشته باشد حائز اهمیت است. جنین‌های
رویشی به دلیل بالا بودن پتانسیل

کشت در شرایط استریل قرار داده شدند. به منظور تولید کالوس جنین‌زا از محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) به همراه 2,4-D (در دوغلظت ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (در دوغلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز، ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین هیدرولایزیت و ۷ گرم در لیتر آگار استفاده شد. pH محیط‌های کشت روی ۵/۸ با استفاده از NaOH یک نرمال تنظیم شد. به منظور تمایز و تولید جنین رویشی کالوس‌ها تولید شده محیط کشت پایه MS به همراه ۰/۴ میکرومولار NAA و ۰/۴ میکرومولار BAP، محیط کشت بدون هورمون و محیط کشت به همراه ۴/۵ میکرومولار BAP و یک میکرومولار 2,4-D واگشت شدند. در مرحله تمایز یابی از اسید آمینه‌های گلوتامین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و فنیل آلانین به میزان ۱۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. کشت‌ها در تاریکی کامل و دمای 25 ± 1 در اتاق رشد نگهداری شدند. جنین‌ها در مرحله اژدری به منظور تولید گیاه، به محیط کشت MS به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP و در شرایط نور ۲۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزارهای SAS/9.1.3 و MSTATC انجام شد.

ده روز پس از کشت، ریزنمونه‌های پیچک کال‌زایی را شروع کردند. در طی چهار هفته اکثر ریزنمونه‌ها تولید کالوس کردند و

پرچم، تخمدان، گل کامل و جنین نابالغ استفاده شده است (Gambino et al., 2007؛ Xu et al., 2005؛ Mauro et al., 1986). از آنجایی که تهیه این نوع از ریزنمونه‌ها فقط در بعضی از مواقع سال امکان‌پذیر است، بررسی امکان تولید جنین رویشی در ژنوتیپ‌های مختلف انگور از ریزنمونه‌های رویشی که قادر به تولید گیاه باشد، اهمیت فراوان دارد. یکی از ریزنمونه‌های مورد استفاده برای تولید جنین رویشی در انگور پیچک است. برای اولین بار سالونخه و همکاران (Salunkhe et al., 1997) این ریزنمونه را برای تولید جنین رویشی در انگور معرفی کردند. این تحقیق به منظور بررسی پتانسیل ریزنمونه پیچک در تولید جنین رویشی و باززایی گیاه انگور و همچنین یافتن محیط کشت مناسب و غلظت‌های ایتیم تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در مراحل مختلف تولید جنین رویشی انجام شد.

ریزنمونه‌های پیچک از باغ انگور مرکز تحقیقات گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج در اردیبهشت ماه ۱۳۸۹ جمع‌آوری شدند. نمونه‌های پیچک با آب شسته و سپس در داخل الکل ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه قرار داده و بعد سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. نمونه‌ها با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه تیمار و پس از آن سه بار با آب مقطر استریل پیچک‌ها شسته شدند. بعد از ضدعفونی پیچک‌ها به قطعات پنج میلی‌متری بریده و به طور افقی روی محیط

به جنین‌های قلبی و طی یک ماه به جنین اژدری تبدیل شدند. در مرحله اژدری جنین‌ها به محیط جوانه‌زنی و تولید گیاه منتقل شدند. اختلاف مورفولوژیکی بین جنین‌های ارقام مختلف در مرحله تمایزیابی مشاهده نشد. داده‌برداری از درصد تولید جنین رویشی در این زمان انجام شد. تجزیه داده‌ها نشان داد که هر یک از ارقام در محیط کشت ویژه‌ای بیشترین درصد جنین رویشی تولید کرد، به طوری که رقم شاهرودی در محیط کشت MS به همراه ۴/۵ میکرومولار BAP و یک میکرومولار 2,4-D (۵/۲۵ درصد)، رقم بیدانه سفید در محیط کشت MS به همراه ۱۰/۴ میکرومولار NAA و ۰/۴ میکرومولار BAP و رقم یاقوتی در محیط کشت MS بدون هورمون بیشترین درصد تولید جنین رویشی داشتند (جدول ۱).

داده‌برداری از میزان تولید کالوس‌های جنین‌زا، در این زمان انجام شد. بیشترین درصد کالزایی مربوط به رقم بیدانه سفید بود (۸۵ درصد) و ارقام یاقوتی و شاهرودی به ترتیب ۸۲ و ۷۸ درصد کالزایی داشتند. نتایج نشان داد که فقط کالوس‌هایی که دارای رنگ سفید متمایل به زرد و بافتی دانه‌ای پس از انتقال به محیط تمایزیابی جنین رویشی ایجاد کردند. اکثر کالوس‌های جنین‌زا در تمامی ارقام در محیط کشت MS به همراه یک میلی‌گرم BAP و ۰/۱ میلی‌گرم 2,4-D به دست آمد.

سه هفته پس از کشت کالوس‌ها در محیط تمایزیابی جنین‌های رویشی نمایان شد. جنین‌های به وجود آمده مراحل تکوین مورفولوژیکی کروی، قلبی و اژدری شکل را طی کردند. جنین‌های کروی حدود دو هفته بعد

جدول ۱- تاثیر محیط کشت‌های مختلف بر تولید جنین رویشی از ریزنمونه پیچک در سه رقم انگور

Table 1. Effect of different media on production of somatic embryo from tendril explant in three grapevine cultivars

Cultivar	ارقام	Media کشت‌ها		
		MSa	MSb	MSc
Shahroudi	شاهرودی	4.75de	3.84e	5.25cde
Bidaneh Sefid	بیدانه سفید	10.41b	6.67cd	4.50de
Yaghouti	یاقوتی	7.50c	12.84a	2.75e

حروف متفاوت در کلیه ستون‌ها و سطرها نشان دهنده اختلاف معنی داری در سطح یک درصد است.

Different letters in all columns and rows indicate significant differences of the means at 1% probability level.

MSa: محیط کشت MS به همراه ۱۰/۴ میکرومولار NAA و ۰/۴ میکرومولار BAP؛ MSb: محیط کشت MS بدون هورمون،

MSc: محیط کشت MS به همراه ۴/۵ میکرومولار BAP و یک میکرومولار 2,4-D.

MSa: MS medium + 10.4 μM NAA and 0.4 μM BAP; MSb: MS medium without hormone; MSc: MS medium + 4.5 μM BAP and 1 μM 2,4-D

به محیط کشت جوانه‌زنی منتقل شدند. از محیط

زمانی که جنین‌ها به مرحله اژدری رسیدند،

برای جوانه زنی جنین ها و تولید گیاهچه استفاده درصد جوانه زنی نسبتاً بالایی داشتند. تعداد گیاهچه های حاصله نسبت به جنین های جوانه زده در همه ارقام پایین بود. در این مرحله تعدادی گیاهچه غیر طبیعی نیز وجود داشت. گیاهچه های غیر طبیعی در بعضی موارد از نظر توسعه ریشه و گاهی از نظر توسعه شاخساره دچار مشکل بودند و تا انتهای آزمایش نتوانستند گیاهچه کاملی را تولید کنند.

کشت MS به همراه یک میلی گرم در لیتر BAP شد. ۱۵ روز پس از کشت جنین ها، مرحله جوانه زنی و تولید گیاهچه شروع شد. طی مدت ۲۵ روز پس از جوانه زدن جنین ها، گیاهچه ها تولید شدند. بیشترین درصد جوانه زنی و تولید گیاه مربوط به ارقام یاقوتی و بیدانه سفید بود. بر روی گیاهچه های حاصل در بعضی موارد جنین رویشی ثانویه مشاهده شد. کمترین درصد جوانه زنی در رقم شاهرودی اتفاق افتاد (جدول ۲). همه ارقام مورد مطالعه

جدول ۲- جوانه زنی جنین های رویشی و باززایی گیاه در سه رقم انگور

Table 2. Germination of embryos and plant regeneration in three grapevine cultivars

Cultivar	ارقام	تعداد	تعداد	تعداد جنین های	تعداد جنین های	تعداد گیاهان
		ریزنمونه های کاشته شده	کالوس های تولید شده	کاشته شده	جوانه زده	تولید شده
		Number of cultured explants	Number of produced callus	Number of cultured embryos	Number of germinated embryos	Number of produced plants
Yaghouti	یاقوتی	720	612	320	252	152
Shahrودي	شاهرودی	720	562	158	121	78
Bidaneh Sefid	بیدانه سفید	720	590	275	226	117

کشت و ژنوتیپ اشاره کرد. در این تحقیق نیز تولید جنین رویشی تحت تاثیر این دو عامل قرار گرفت، به طوری که تولید جنین رویشی به این عوامل بستگی داشت و این یافته ها مطابق با نتایج پرین و همکاران (Perrin *et al.*, 2001) و اولاهه و همکاران (Olahe *et al.*, 2009) است. موثر بودن هورمون های 2,4-D و BAP برای تولید کالوس جنین زا در این تحقیق تایید شد که مطابق با سایر گزارش ها (Olahe *et al.*, 2009)؛

فراهم کردن کالوس جنین زا برای پرورش های مهندسی ژنتیک از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. در این تحقیق موثر بودن ریزنمونه پیچک جهت تولید کالوس جنین زا در انگور مشخص شد. گزارش حاضر اولین گزارش تولید کالوس جنین زا و جنین رویشی در ارقام یاقوتی، بیدانه سفید و شاهرودی از ریزنمونه پیچک است. از مهم ترین عوامل موثر در تولید جنین رویشی در انگور می توان به نوع محیط

تمایز جنین اثر مثبت داشت، که احتمالاً به دلیل کاهش جذب نیتروژن معدنی و استفاده کالوس از نیتروژن موجود در اسید آمینه‌ها است. تولید جنین‌های غیرطبیعی اکثراً در محیط کشت‌هایی مشاهده شد که تولید جنین رویشی ارقام در کمترین میزان خود بود که احتمالاً به دلیل شرایط نامناسب محیط کشت برای رقم خاص است و می‌تواند ناشی از واکنش متقابل شرایط فیزیولوژیکی رقم با محیط کشت باشد. در اکثر گزارش‌های مربوط به تولید جنین رویشی در انگور برای جوانه‌زنی جنین‌ها و تولید گیاهچه از تیمار سرمایی یا هورمون GA3 استفاده شده است (Das et al., 2002)، با این حال نتایج در مرحله تولید گیاهچه نشان داد که محیط کشت MS به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP و بدون تیمار سرمایی برای جوانه‌زنی و تولید گیاهچه مناسب است نشان‌دهنده این مطلب است که این تیمار از نظر اقتصادی نسبت به بقیه تیمارها مقرون به صرفه‌تر است. در نهایت این تحقیق پروتکل مناسبی را برای تولید جنین رویشی و باززایی ارقام انگور یاقوتی، بیدانه سفید و شاهرودی از ریزنمونه پیچک فراهم می‌کند و می‌توان از این پروتکل در تحقیقات تنوع سوماکلونال، مهندسی ژنتیک، حفاظت از ذخایر ژنتیکی و سایر موارد استفاده کرد.

Gambino et al., 2007) است. در مرحله تولید کالوس جنین‌زا، محیط کشت MS به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D برای تولید کالوس جنین‌زا از ریزنمونه پیچک در تمامی ارقام موثر بود، در مرحله تولید جنین رویشی در این محیط کشت بیشترین درصد تولید جنین رویشی در رقم شاهرودی به دست آمد، در حالی که در سایر ارقام کمترین درصدهای تولید جنین رویشی در این محیط کشت به دست آمد. این یافته مطابق با نتایج داس و همکاران (Das et al., 2002) بود. از سوی دیگر در این تحقیق قابلیت بالای تولید کالوس جنین‌زا و جنین رویشی از ریزنمونه پیچک در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید مشخص شد. گزارش حاضر دومین گزارش تولید جنین رویشی از ریزنمونه پیچک است. نتایج این تحقیق یافته‌های سالونخه و همکاران (Salunkhe et al., 1997) مبنی بر موثر بودن ریزنمونه پیچک جهت تولید جنین رویشی را تصدیق کرد. جنین‌های رویشی تولید شده دارای مراحل کروی، قلبی، اژدری و لپه‌ای بودند که این مراحل مطابق با سایر گزارش‌ها است. افزودن مکمل‌هایی مانند کازئین هیدرولایزت در مرحله تولید کالوس جنین‌زا و اسید آمینه‌های گلوتامین و فنیل آلانین در مرحله

واژه‌های کلیدی: انگور، جنین رویشی، هورمون، گیاهچه، ریزنمونه.

References

- 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.
- 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.
- Gambino, G., Ruffa, P., Vallania, R., and Gribaudo, I. 2007.** Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 79-83.
- Gribaudo, I., Gambino, G., and Vallania, R. 2004.** Somatic embryogenesis from grapevine anther: identification of the optimal developmental stage for collecting explants. *American Journal of Enol.* 55: 427-430.
- Martinelly, L., and Gribaudo, I. 2009.** *Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology.* Springer Verlag, Heidelberg. 481 pp.
- Mauro, M., 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.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Olahe, R., Aniko, Z., Andrezej, P., Sussane, H., Laszlo, F., and Kovacs, G. 2009.** Somatic embryogenesis in broad spectrum of grapevine genotypes. *Scientia Horticulturae* 120: 134-137.
- Perrin, M., Martin, D., Joly, D., Demangeat, G., This, P., and Masson, JE. 2001.** Medium-dependent response of grapevine somatic embryogenic cells. *Plant Science* 161: 107-116.
- 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: 65-70.
- Scorza, R., Cordts, J. M., Ramming, D. W., and Emershad, R. L. 1995.** Transformation of grape (*Vitis vinifera*) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 14: 589-592.
- Vidal, J. R., Rama, J., Taboada, L., Martin, C., Ibanez, M., Ssegura, 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, Tissue and Organ Culture* 96: 85-94.

Xu, X., Lu, J., Ren, Z., Wang, H., and Leong, S. 2005. Callus induction and somatic embryogenic seedless bunch grapes (*Vitis*) from immature ovule culture. *Proceedings of the Florid State Horticultural Society* 118: 260-262.

