مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۷ ، شماره ۲، سال ۱۳۹۰

مقاله کوتاه علمی

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]، امیرجمال 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 دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۱۹ **تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۱۲**

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.

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 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

نویسنده مسئول: aebadi@ut.ac.ir تلفن: ۰۹۱۲۵۶۷۷۵۲۱

Archive of SID
www.SID.ir

پرچم، تخمدان، گل کامل و جنین نابالغ استفاده شده است (Gambino *et al.*, 2007؛ Mauro *et al.*, 1986؛ Xu *et al.*, 2005). 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 اپتیمم 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 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 هیدرولایزت و۷ 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 واکشت شدند. در مرحله تمایز یابی از اسیدآمینه‌های گلوتامین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و فنیل آلانین به میزان ۱۰ میلی گرم در لیتر استفاده شد. کشت‌ها در تاریکی کامل و دمای ۱±۲۵ 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

Archive of SID

www.SID.ir

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 دوهفته بعد 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).

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 محیط 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 ستون ها 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

زمانی که جنین‌ها به مرحله اژدری رسیدند، به محیط کشت جوانه‌زنی منتقل شدند. از محیط

Archive of SID

www.SID.ir

کشت MS به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP شد. ۱۵ روز پس از کشت جنین‌ها، مرحله جوانه‌زنی و تولید گیاهچه شروع شد. طی مدت ۲۵ روز پس از جوانه‌زدن جنین‌ها، گیاهچه‌ها تولید شدند. بیشترین درصد جوانه‌زنی و تولید گیاه مربوط به ارقام یاقوتی و بیدانه سفید بود. بر روی گیاهچه‌های حاصل در بعضی موارد جنین رویشی ثانویه مشاهده شد. کمترین درصد جوانه‌زنی در رقم شاهرودی اتفاق افتاد (جدول ۲). همه ارقام مورد مطالعه برای جوانه‌زنی جنین‌ها و تولید گیاهچه استفاده درصد جوانه‌زنی نسبتاً بالایی داشتند. تعداد گیاهچه‌های حاصله نسبت به جنین‌های جوانه زده در همه ارقام پایین بود. دراین مرحله تعدادی گیاهچه غیر طبیعی نیز وجود داشت. گیاهچه‌های 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.

جدول ۲- جوانه‌زنی جنین‌های رویشی و باززایی گیاه در سه رقم انگور

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

Cultivar	ارقام	تعداد ریزنمونه‌های کاشته شده Number of cultured explants	تعداد کالوس‌های تولید شده Number of produced callus	تعداد جنین‌های کاشته شده Number of cultured embryos	تعداد جنین‌های جوانه‌زده Number of germinated embryos	تعداد گیاهان تولید شده Number of produced plants
Yaghouti	یاقوتی	720	612	320	252	152
Shahroudi	شاهرودی	720	562	158	121	78
Bidaneh Sefid	بیدانه سفید	720	590	275	226	117

فراهم کردن کالوس جنین‌زا برای پروسه‌های مهندسی ژنتیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. در این تحقیق موثر بودن ریزنمونه پیچک جهت تولید کالوس جنین‌زا در انگور مشخص شد. گزارش حاضر اولین گزارش تولید کالوس جنین‌زا و جنین رویشی در ارقام یاقوتی، بیدانه سفید و شاهرودی از ریزنمونه پیچک است. از مهم‌ترین عوامل موثر در تولید جنین رویشی در انگور می‌توان به نوع محیط 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 یافته‌ها مطابق با نتایج پرین وهمکاران (Perrin *et al.*, 2001) و اولاهه و همکاران (Olahe *et al.*, 2009) است. موثر بودن هورمون‌های 2,4-D و BAP برای تولید کالوس جنین‌زا در این تحقیق تایید شد که مطابق با سایر گزارش‌ها (Olahe *et al.*, 2009؛

Archive of SID

www.SID.ir

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، درحالی 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 اسیدآمینه‌های گلوتامین و فنیل آلانین در مرحله تمایز جنین اثر مثبت داشت، که احتمالاً به دلیل کاهش جذب نیتروژن معدنی و استفاده کالوس از نیتروژن موجود در اسیدآمینه‌ها 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 را فراهم می‌کند و می‌توان از این پروتکل در تحقیقات تنوع سوماکلونال، مهندسی ژنتیک، حفاظت از ذخایر ژنتیکی و سایر موارد استفاده کرد.

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

Archive of SID
www.SID.ir

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 collceting explants. American Journal of Enol. 55: 427-430.

Martinelly, L., and Gribaudo, I. 2009. Grapeving 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*

Archive of SID

www.SID.ir

vinifera) with a focus on induction parameters and efficient plant regeneration. Plant 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) form immature ovule culture. Proceedings of the Florid State Horticultural Society 118: 260-262.

Archive of SID

www.SID.ir