القای کالوس در ریشه انگور(*Vitis vinifera*L.) در شرایط درون شیشه‌ای

علی گوران[1*]، محمد جیرانی[1]، سید محمد حسین حیات الغیبی[1]، علی اکبر مظفری[2]
۱ - دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی علوم باغبانی دانشگاه کردستان، سنندج
۲ - استادیار گروه مهندسی علوم باغبانی دانشگاه کردستان، سنندج
*Email: kinggouran@gmail.com

چکیده

با هدف بررسی توانایی ریزنمونه ریشه و تعیین ترکیب تنظیم کننده رشد مناسب، ریشه‌های رقم فرخی انگور (*Vitis vinifera* L.) مورد آزمایش قرار گرفت. در این راستا با استفاده از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ(MS)، تنظیم کننده‌های رشد، نفتالین استیک اسید(NAA)، تو، فور دی کلروفنوکسی استیک اسید(2,4-D)، ایندول بوتریک اسید(IBA)، بنزیل آمینوپیورین(BAP)، بنزیل آدنین(BA) بر روی ریزنمونه ریشه مورد آزمایش قرار گرفتند. تیمارهای 2 ppm NAA + 2 ppm BAP + 1 ppm IBA و 1 ppm NAA + 2 ppm BAP + 1 ppm IBA مناسب‌ترین ترکیبات برای کالوس‌زایی از ریشه بودند. نتایج، نشان دهنده توانایی خوب ریزنمونه ریشه برای تولید کالوس و همچنین تاثیر مثبت تنظیم کننده رشد NAA برای القای کالوس است.

کلمات کلیدی: ریشه، انگور، کالوس، فرخی، *Vitis vinifera* L.

مقدمه

انگور از اصلی‌ترین محصولات باغی و از مهم‌ترین محصولات اقتصادی کشاورزی در جهان است. کشت بافت یکی از بهترین راهکارها برای اصلاح و بهبود ویژگی‌های منحصر به فرد این گیاه است. القای کالوس اولین مرحله تکنیکی در بسیاری از روش‌های کشت بافت گیاهی محسوب می‌شود(Scagliusi *et al.*, 2002; Naor *et al.*, 2011).تاکنون از اندام‌های مختلف به عنوان ریزنمونه برای القای کالوس استفاده شده است(Maillot *et al.*, 2006; Gambino *et al.*, 2007; Cutanda *et al.*, 2008; Martinelli and Gribaudo, 2009; Malabadi *et al.*, 2010)و در این میان اندام ریشه به دلیل بالا بودن آلودگی درونی آن کمتر مورد توجه قرار گرفته است. اگر چه القای کالوس در آن به سختی صورت می‌گیرد، اما ریشه تنها ریزنمونه‌ای است که در تمامی طول سال در دسترس است و به دلیل دارا بودن مریستم اختصاصی و وجود سلول‌های بنیادی در آن از پتانسیل بسیار بالایی برای استفاده در فرایند کشت بافت و مهندسی ژنتیک برخوردار است. با هدف بررسی و تعیین ترکیب تنظیم کننده‌های رشد مناسب و مورد نیاز برای القای کالوس در ریزنمونه ریشه این تحقیق صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی و کشت بافت گروه مهندسی علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۲ انجام گرفت. در این آزمایش از تنظیم کننده‌های رشد، نفتالین استیک اسید(NAA)، تو، فور دی کلروفنوکسی استیک اسید(2,4-D)، ایندول بوتریک اسید(IBA)، بنزیل آمینوپورین(BAP)، بنزیل آدنین(BA) استفاده شد. ریزنمونه‌های ریشه حاصل از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای رقم فرخی انگور(*Vitis vinifera* L.) مورد استفاده قرار گرفت. ریزنمونه‌ها در پتری‌دیش‌های ده سانتیمتری یک‌بار مصرف حاوی محیط کشت MS دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز و همراه با تیمارهای تنظیم کننده رشد شامل : تیمارهای (T1) فاقد تنظیم کننده رشد به عنوان شاهد،(T2) 1 ppm 2,4-D + 0.5 ppm BAP + 1 ppm IBA، (T3) 2 ppm 2,4-D + 0.5 ppm BAP + 1 ppm IBA، (T4) 1 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP + 1 ppm IBA، (T5) 2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP + 1 ppm IBA، (T6) 1 ppm NAA + 1 ppm BAP + 1 ppm IBA، (T7) 1 ppm NAA + 2 ppm BAP + 1 ppm IBA، (T8) 2 ppm NAA + 1 ppm BAP + 1 ppm IBA، (T9) 2 ppm NAA + 2 ppm BAP + 1 ppm IBA، (T10) 1 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP + 1 ppm IBA، (T11) 1ppm 2,4-D + 2ppm BA، (T12) 1.5ppm 2,4-D + 1ppm BA، (T13) 1ppm NAA + 0.2ppm BA، (T14) 1ppm NAA + 1ppm 2,4-D، (T15) 2ppm NAA + 2ppm BA + 2ppm 2,4-D کشت شدند. ریزنمونه‌ها به مدت یک ماه در شرایط تاریکی و سپس یک ماه در شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت

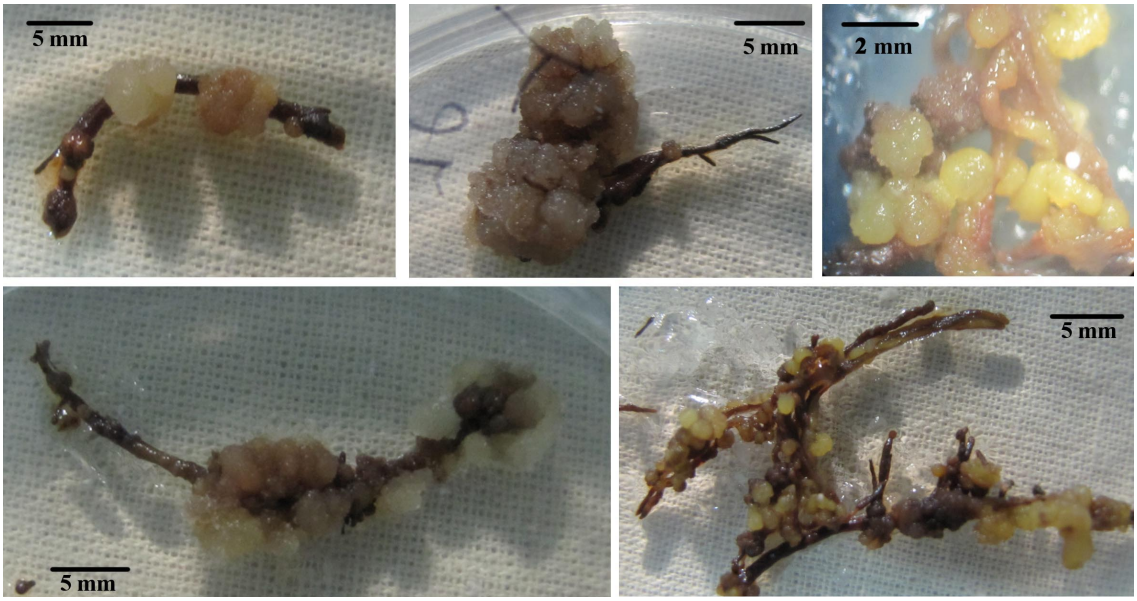
تاریکی و در دمای ۲±۲۵ سانتیگراد و رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد در اتاقک رشد نگهداری شدند. در پایان درصد کالوس‌زایی و وزن تر کالوس‌های تولید شده اندازه گیری شدند. داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SAS v.8.3 مورد تجزیه آماری قرار گرفت. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2007 ترسیم گردید.

نتایج و بحث

القای کالوس در ریزنمونه‌های حاصل از ریشه‌های درون شیشه‌ای رقم فرخی در تیمارهای مختلف تفاوت‌های معنی‌داری($p<0.01$) داشتند. نتایج نشان داد که بهترین نتیجه از تیمار T9 با ۱۰۰ درصد کالوس‌دهی بدست آمد(جدول ۱). همچنین میانگین بیشترین وزن کالوس نیز در تیمار T9 مشاهده گردید(جدول ۱). تیمارهای T7، T6 و T8 نیز به ترتیب بهترین نتایج در القای کالوس در ریزنمونه ریشه داشتند. سایر تیمارها یا به طور کلی نتوانستند کالوس تولید نمایند و یا القای کالوس بسیار ناچیزی داشتند(جدول ۱).

جدول ۱- نتایج درصد کالوس‌زایی و میانگین وزن تر کالوس ریزنمونه ریشه رقم فرخی در تیمارهای مختلف تنظیم کننده رشد($p<0.01$)

تیمار	درصد کالوس‌زایی (٪)	میانگین وزن تر کالوس و ریزنمونه در هر تیمار (گرم)
(T1) Control	0.0 ± 0 d	0.1± 0.00 d
(T2) 1 ppm 2,4-D + 0.5 ppm BAP + 1 ppm IBA	0.0 ± 0 d	0.1± 0.00 d
(T3) 2 ppm 2,4-D + 0.5 ppm BAP + 1 ppm IBA	6.0 ± 0.8 d	0.213±0.05 cd
(T4) 1 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP + 1 ppm IBA	0.0 ± 0 d	0.1± 0.00 d
(T5) 2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP + 1 ppm IBA	0.0 ± 0 d	0.1± 0.00 d
(T6) 1 ppm NAA + 1 ppm BAP + 1 ppm IBA	51.2 ± 8 cb	0.651±0.16 cb
(T7) 1 ppm NAA + 2 ppm BAP + 1 ppm IBA	67.3 ± 17 b	0.825±0.37 b
(T8) 2 ppm NAA + 1 ppm BAP + 1 ppm IBA	28.3 ± 5 cd	0.343±0.04 cbd
(T9) 2 ppm NAA + 2 ppm BAP + 1 ppm IBA	100 ± 13 a	1.513±0.27 a
(T10) 1 ppm 2,4-D	0.0 ± 0 d	0.1± 0.00 d
(T11) 1 ppm 2,4-D + 2 ppm BA	0.0 ± 0 d	0.1± 0.00d
(T12) 1.5 ppm 2,4-D + 1 ppm BA	0.0 ± 0 d	0.1± 0.00d
(T13) 1 ppm NAA + 0.2 ppm BA	1.8 ± 0.7 d	0.118±0.00 d
(T14) 1 ppm NAA + 1 ppm 2,4-D	0.0 ± 0 d	0.1± 0.00 d
(T15) 2 ppm NAA + 2 ppm BA + 2 ppm 2,4-D	0.0 ± 0 d	0.1± 0.00 d



تصویر۱ - کالوس تولید شده از ریزنمونه ریشه رقم فرخی

نتایج نشان داد که NAA نسبت به 2,4-D از توانایی بیشتری برای القای کالوس در ریزنمونه ریشه برخوردار بوده است. کاربرد تنظیم کننده‌های رشد خارجی با فعال سازی بیان ژن، سبب افزایش تقسیم سلولی و تمایزیابی می‌شود و غلظت و ترکیب تنظیم کننده‌های

رشد، تعیین کننده پاسخ ریزنمونه کشت شده با نشان دادن واکنش‌های مورفولوژیک است(Gaj, 2004). 2,4-D از تنظیم کننده‌های رشد بسیار مناسب برای القای کالوس شناخته می‌شود(Salunkhe *et al.*, 1997; Fehér *et al.*, 2002; Scagliusi *et al.*, 2002; Gaj, 2004; Mujib and Samaj, 2006; Martinelli and Gribaudo, 2009) و برای القای کالوس انگور، از بین تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D، BA و NAA با غلظت‌های مختلف، بهترین نتیجه از 2,4-D حاصل شده است(Robacker, 1993) با این حال می‌توان گفت که ریزنمونه ریشه همخوانی بیشتری با NAA نشان داده است. اثر متقابل BAP و یا BA با NAA نشان دهنده تعادل هورمونی مناسب‌تر برای القای کالوس است. وجود IBA با دارا بودن نقشی مکمل باعث افزایش کیفیت کالوس‌ها می‌شود. گیاهان به بیش از یک نوع اکسین نیاز دارند و IBA با هم‌سویی با IAA طبیعی گیاه سبب افزایش کارایی و تکمیل بیان ژن‌ها و تغییرات متابولیکی می‌گردد(Simon and Petraˇsek, 2011). القای کالوس از ریشه در این تحقیق، طی مدت دو هفته اتفاق افتاد. این نشان دهنده تاثیر سریع استفاده هم زمان از چند تنظیم کننده‌های رشد با غلظت‌های متعادل در محیط کشت می‌باشد. بافت تمامی کالوس‌های تولید شده محکم و به رنگ های زرد و قهوه‌ای بود(تصویر ۱). کالوس‌های با این ویژگی‌ها اغلب مناسب برای استفاده در تکنیک‌های کشت بافت به خصوص جنین‌زایی سوماتیکی هستند(Martinelli and Gribaudo, 2009). در هیچ کدام از تیمارهایی که موجب کالوس‌زایی شدند بافت کالوس‌ها برفکی، پفکی و شیشه‌ای نبودند.کیفیت بالای کالوس‌های تولید شده را می‌توان به وجود مریستم اختصاصی، بافت جوان و دینامیک ریشه و وجود هم زمان چند اکسین در محیط کشت نسبت داد.

ریشه توانایی خوبی برای تولید کالوس‌های با کیفیت دارد. تنظیم کننده رشد NAA قابلیت القای کالوس را در سطح بالایی دارد. همچنین استفاده از چند اکسین در محیط کشت سبب بهبود پاسخویی ریزنمونه ریشه به تیمار می‌شود.

منابع

Cutanda, M.C., Bouquet, A., Chatelet, P., Lopez, G., Botella, O., Montero, F., Torregrosa, L., 2008. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis vinifera* cultivars 'Macabeo'and 'Tempranillo'. Vitis 47, 159-162.

Fehér, A., Pasternak, T., Otvos, K ,.Miskolczi, P., Dudits, D., 2002. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. Section Botany 57.

Gaj, M.D., 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Plant Growth Regulation 43, 27-47.

Gambino, G., Ruffa, P., Vallania, R., Gribaudo, I., 2007. Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 90, 79-83.

Maillot, P., Kieffer, F., Walter, B., 2006. Somatic embryogenesis from stem nodal sections of grapevine. Vitis Geilweilerhof 45, 185.

Malabadi, R.B., Vijaykumar, S., Nataraja , K., Mulgund, G.S., 2010. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in grapes(*Vitis vinifera* L.). Botany Research International 3, 48-55.

Martinelli, L., Gribaudo, I., 2009. Strategies for effective somatic embryogenesis in grapevine: an appraisal. Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology, 461-493.

Mujib, A., Samaj, J., 2006. Plant Cell Monographs: Somatic Embryogenesis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 355 p

Naor, V., Ziv, M., Zahavi, T., 2011. The effect of the orientation of stem segments of grapevine (*Vitis vinifera*) cv. Chardonnay on callus development *in vitro* .Plant Cell, Tissue and Organ Culture 106, 353-358.

Robacker, C., 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from muscadine grape leaf explants. HortScience 28, 53-55.

Salunkhe, C., Rao, P., Mhatre, M., 1997. Induction of somatic embryogenesis and plantlets in tendrils of *Vitis vinifera* L. Plant Cell Reports 17, 65-67.

Scagliusi, S.M., Vega, J., Kuniyuki, H., 2002. Cytopathology of callus cells infected with grapevine leafroll-associated virus 3. Fitopatologia Brasileira 27, 384-388.

Simon, S., Petraˇsek, J., 2011. Why plants need more than one type of auxin. Plant Science 180, 454–460.