زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره نهم، پاییز ۱۳۹۰، صفحه ۲۷-۳۸
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۵/۰۹
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۲/۲۱
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۴/۲۳
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۷/۲۷

وابستگی زنده‌مانی جداکشت‌های مریستم شاخه با جنبه‌های ریخت‌شناختی آن در انگور (*Vitis vinifera*)

غلامرضا گوهری [۱]، سمیه فریدی نیچران [۲]، سمیه نقی‌لو [۳]، علیرضا مطلبی‌آذر [۱] و محمدرضا دادپور [۱*]
[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[۲] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
[۳] گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

کشت مریستم شاخه، یکی از روش‌های کارآمد برای زدودن بیماری‌های ویروسی از گیاهان آلوده به شمار می‌آید. شناسایی بخش مریستمی و جداسازی آن، نخستین گام برای بنیان‌گذاری کشت مریستم است. جدا کردن مریستم شاخه به تنهایی با داشتن اندازه‌ای بسیار کوچک و بی‌رنگ، به ویژه هنگامی که آغازنده‌های برگی و اندام‌های دیگر آن را همراهی نکنند، بسیار دشوار است. در این آزمایش، شناسایی مریستم شاخه در گیاه انگور که دارای الگوی نموی پیچیده و ساختاری بسیار ریز است، انجام گردید. در این روش، مریستم زنده با فلورسئین دی استات (FDA) ۰/۱ درصد به همراه فوشین اسید ۰/۰۵ درصد در آب، رنگ‌آمیزی شد. مریستم رنگ‌آمیزی شده، پس از ردیابی با استرومیکروسکوپ فلورسنس (پرتو ۵۱۰ نانومتر) و جداسازی، در محیط موراشیگ- اسکوگ (۱/۲) کشت شد. نتایج نشان داد که مریستم انگور از سه دوره نموی برخوردار ست که میزان اندام‌زایی در آنها یکسان نیست. مریستم جدا شده از دوره‌ای با اندام‌زایی بیشتر، میزان زنده‌مانی بیشتری را در بنیان‌گذاری جداکشت نشان داد. همچنین همراهی آغازنده برگی و آغازنده وامانده (آغازنده مشترک پیچک و گل‌آذین) با مریستم، شانس زنده‌مانی آن را به طور معنی‌داری افزایش داد. نتایج این آزمایش نشان دادند که بهترین جداکشت برای انجام کشت مریستم انگور، مریستم همراه با آغازنده برگی و آغازنده وامانده است که از جوانه‌های جا گرفته در گره پیچک‌دار پایینی به دست آمده باشد.

واژه‌های کلیدی: انگور، اندام‌زایی، زنده‌مانی، فلورسئین دی استات، کشت مریستم، مریستم شاخه

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: dadpour@tabrizu.ac.ir، شماره تماس: ۰۴۱۱۳۳۹۲۰۵۴

مقدمه

مریستم شاخه، بخش بسیار کوچک و تمایزنیافته‌ای از گیاه است که ساختاری ساده و عملکردی بسیار پیچیده دارد. مریستم رویشی شاخه، نه تنها سازوکارهای ویژه‌ای را برای پدید آوردن اندام‌های هوایی گیاه به کار می‌گیرد، بلکه سامان‌دهی سلول‌های بنیادی (stem cells) و مرزبندی آنها با اندام‌های آغازش یافته را در دستور کار نموی خود دارد (Aida and Tasaka, 2006). سلول‌های بنیادی در بخش میانی (central zone) مریستم شاخه، تقسیم بسیار کُندی دارند. حال آن که، آهنگ تقسیم سلول‌های بخش پیرامونی (peripheral zone) مریستم، بسیار تند است و نخستین گام‌های اندام‌زایی در این بخش برداشته می‌شوند (Lyndon, 1994). سلول‌هایی که اندام‌های هوایی برای آغازش (initiation) خود به آنها نیاز دارند، در این بخش ساخته می‌شوند. مریستم شاخه در دوره رشد رویشی گیاه، با این که کنترل روند اندام‌زایی و ریخت‌زایی را در اختیار دارد، سازوکارهای سازمان‌یافته‌ای را به کار می‌گیرد تا از افزایش اندازه خود جلوگیری نمایند (Bowman and Eshed, 2000). در دوره گل‌زایی گیاه نیز که گذار از رویشی بودن مریستم به زایشی شدن آن روی می‌دهد، پیدایش پستی و بلندی در رویه بیرونی آن که خود به پدیدار شدن گل‌آذین و یا پیرامون‌های گل می‌انجامد، گواهی بر گرایش به رفتار کوچک‌مانی در این بخش است (Kwiatkowska, 2004). مریستم، برای آن که بیش از اندازه بزرگ نشود، دو راه پیش رو دارد: آغازنده‌های گل را از خود جدا کند و یا خمیدگی‌ها و برآمدگی‌های رویه بیرونی را افزایش دهد، تا توانایی گنجایش سلول‌های بی‌شمار ساخته شده را داشته باشد (Dumais and Kwiatkowska, 2002).

در برخی از گیاهان مونوپودیال (رشد نامحدود)، مریستم شاخه این توانایی را دارد که رویشی بماند و با پدید آوردن بخش مریستمی دیگر، زمینه‌ساز آغازش اندام‌های زایشی گردد. شاید بتوان گفت که در بین گیاهان گوناگون، انگور از این دیدگاه، ویژگی‌های بسیار بارزی دارد (Gerrath and Posluszny, 2007). مریستم شاخه در این گیاه، همگام با پدید آوردن آغازنده برگی، بخش مریستمی گرد و غده مانندی را در روبروی آن می‌سازد که آنلاژ (anlage) یا آغازنده وامانده (uncommitted primordium) خوانده می‌شود (Gerrath, 1991)، زیرا این ساختار در تمایزیابی خود، رفتاری دوگانه دارد و پیدایش آن، سرآغازی بر پدیدار شدن پیچک و یا گل‌آذین است. بنابراین، دو اندام رویشی (پیچک) و زایشی (گل‌آذین) در انگور، خاستگاه یکسانی داشته و هر دو از آغازنده وامانده ساخته می‌شوند (Vasconcelos *et al.*, 2009). در دوره اندام‌زایی و ریخت‌زایی مریستم شاخه انگورهای اروپایی (*Vitis vinifera* L.)، آغازنده وامانده را نمی‌توان در همه گره‌ها دید و از هر سه گره، تنها دو گره دارای این بخش مریستمی است. بنابراین، در میان دو گره دارای پیچک، یک گره بدون پیچک جای می‌گیرد که کمتر گیاهی از این الگوی نموی پیروی می‌کند. از دیدگاه ریخت‌شناسی، مریستم به هنگام پدید آوردن هر یک از گره‌های سه‌گانه، پیدایی و اندازه یکسانی ندارد (Gerrath and Posluszny, 2007).

مریستم تنها بخشی از گیاه است که بیماری‌های ویروسی و باکتریایی، توانایی آلوده‌سازی و رخنه در آن را ندارند. پس اگر بتوان این بخش را بدون همراهی آغازنده‌های برگی جدا و کشت نمود، می‌توان به بیماری‌زدایی از گیاه امیدوار بود (Hosokawa, 2008). برای نخستین بار، کشت مریستم شاخه و اندام‌زایی آن در گیاه سیب‌زمینی گزارش شد (Sussex, 1952). در برخی از گیاهان تک لپه‌ای که شناسایی مریستم آسان است، کشت مریستم را روشی کارآمد برای به دست آوردن گیاهان بدون ویروس می‌دانند (Ramgareeb *et al*., 2009). کشت مریستم شاخه در گندمیان، گسترش بیشتری پیدا کرده و از آن برای دستیابی به گیاهان تراریخت استفاده می‌کنند. در پدید آوردن گیاهان تراریخت از کوچک بودن مریستم و توانایی بالای باززایی (regeneration) آن، بهره‌گیری می‌شود. چون، هر چه اندازه جداکشت کوچکتر باشد، کارآیی بافت در ورود ژن و دریافت آن افزایش خواهد یافت (Sticklen and Oraby, 2005). با این که روش‌های ریزافزونی در انگور، بهبود چشمگیری یافته است (Mhatrea *et al*., 2000)، بیشترین کاربرد کشت مریستم در این گیاه نیز، برای دست‌یابی به گیاهان تراریخت است (Dutt *et al*., 2007).

از آن جایی که کشت مریستم شاخه در زدودن آلودگی‌های ویروسی و باکتریایی، همچنین به دست آوردن گیاهان تراریخت کاربرد دارد، بهینه‌سازی روش‌های جداسازی آن می‌تواند نقش سازنده‌ای در این راستا داشته باشد. تا کنون روش کارآمدی برای شناسایی، جداسازی و برداشت مریستم تنها در انگور گزارش نشده است. بنابراین در این پژوهش، تلاش شد تا میزان کارآیی یک روش نوین میکروسکوپی برای بنیان‌گذاری کشت مریستم شاخه در انگور، روشن گردد.

مواد و روش‌ها

ریخت‌شناسی مریستم

پیش از انجام کشت مریستم، ریخت‌شناسی جوانه در فرآیند اندام‌زایی و پیدایش گره‌های پیچک‌دار و بدون پیچک بررسی شد. در این راستا، بیش از ۱۰۰ جوانه زمستان‌گذران از شاخه‌های یک‌ساله برداشت شدند و در FAA (فرمالین (۰/۵ میلی‌لیتر)- استیک اسید (۰/۵ میلی‌لیتر)- اتانول ۵۰ درصد (۹ میلی‌لیتر)) تثبیت گردیدند. پس از یک شبانه‌روز، نمونه‌ها با الکل ۵۰، ۷۰ و ۹۶ درصد آبگیری شدند. پس از آبگیری، فلس‌زدایی جوانه‌ها در درون الکل ۹۶ درصد و در زیر استرومیکروسکوپ Nikon با سامانه نوری بدون سایه انجام پذیرفت. پس از فلس‌زدایی، نمونه‌ها در درون نیگروزین ۰/۵ درصد (محلول در الکل) رنگ‌آمیزی شدند. تصویربرداری از نمونه‌ها بر پایه روش نوین میکروسکوپی نور بازتابشی (Epi-illumination light microscopy) انجام شد (Dadpour *et al*., 2008).

کشت مریستم

برای دستیابی به مریستم شاخه، جوانه‌های زمستان‌گذران انگور از شاخه‌های یک‌ساله برداشت شدند. زدودن فلس‌ها از هر جوانه به روشی که قبلاً ذکر شد، انجام پذیرفت. سپس نمونه‌ها در اتانول ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم ۱ درصد، به ترتیب ۵ و ۱۰ دقیقه سترون شدند. به دنبال سترون کردن نمونه‌ها، آب‌شویی

(۱۰ دقیقه) آنها با آب مقطر انجام گرفت. برای جلوگیری از چروکیدگی مریستم، آماده‌سازی و فلس‌زدایی جوانه در درون آب مقطر انجام شد. سرد بودن آب کمک نمود تا با کند شدن تنفس اندام‌ها، حباب کمتری آزاد شود و از این راه، فرآیند فلس‌زدایی آسان‌تر باشد. پس از کنار زدن برگ‌ها، کُرک‌ها و اندام‌های درونی که به نمایان شدن آغازنده‌های برگی، پیچک و یا گل‌آذین انجامید، نمونه رنگ‌آمیزی شد تا بتوان بخش مریستمی را از ساختارهای همراه جدا نمود. جداسازی مریستم در نمونه‌های رنگ‌آمیزی نشده، بسیار دشوار بود. برای رنگ‌آمیزی مریستم زنده، از فلوروکروم فلورسئین دی استات ۰/۱ درصد به همراه فوشین اسید ۰/۰۵ درصد در آب، استفاده شد. جداسازی مریستم در زیر هود لامینار و با استفاده از استرومیکروسکوپ فلورسنس (با تابش فرابنفش و پرتو برانگیخته ۵۱۰ نانومتر) انجام گرفت.

در این آزمایش، مریستم به همراه یک آغازنده برگی، مریستم به همراه یک آغازنده وامانده مریستم با یک آغازنده برگی و یک آغازنده وامانده، تیمارهای به کار رفته بودند. تیمارها پس از آماده‌سازی با روش‌هایی که ذکر شد، در محیط کشت موراشیگ-اسکوگ نیم غلظت (سترون شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه در اوتوکلاو)، کشت شدند. هر تیمار، دارای ۲۰ تکرار بود که هر تکرار، در شیشه‌ای کوچک و جداگانه جای گرفت تا آلودگی نمونه‌ها کاهش یابد.

تجزیه آماری

تجزیه واریانس داده‌ها در این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶/۰ و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

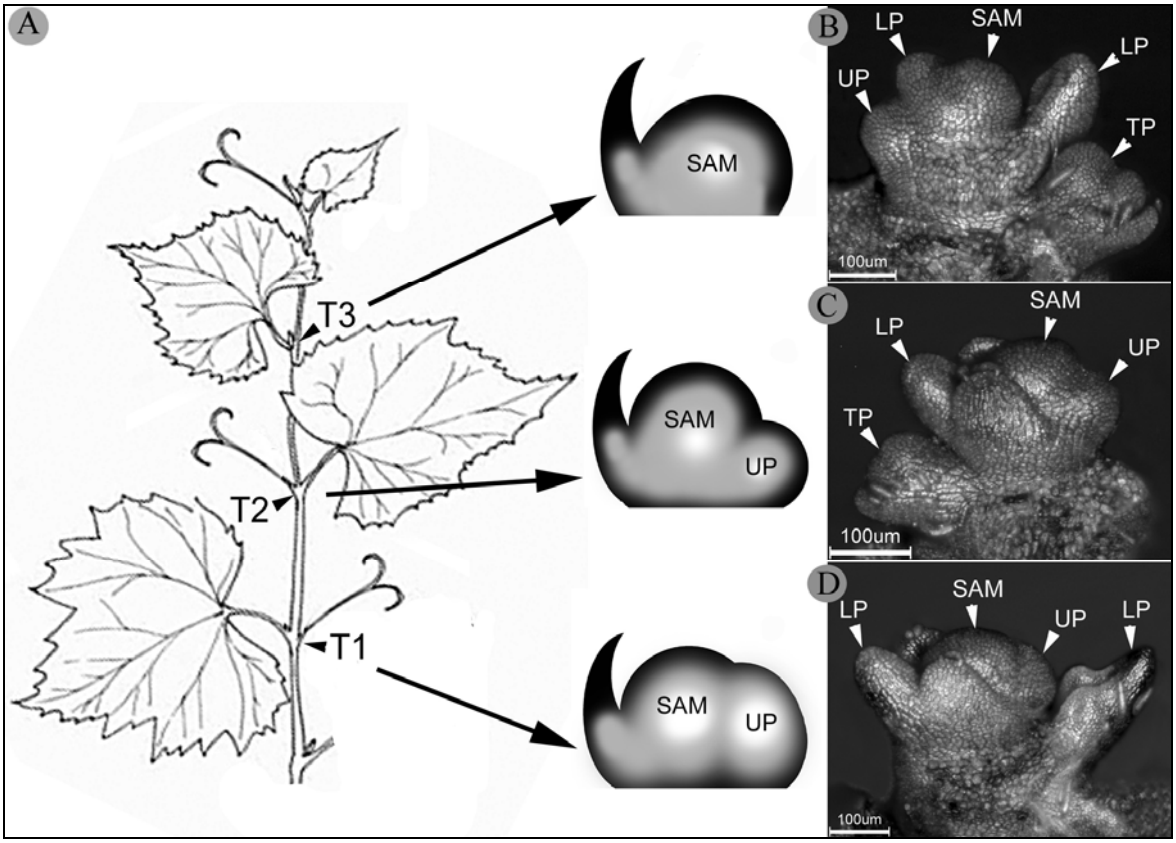
ریخت‌شناسی مریستم

مریستم انگور در هر دوره از اندام‌زایی خود، یک الگوی نموی (developmental pattern) را به نمایش گذاشت که در هر دوره آن، گره پیچک‌دار پایینی، گره پیچک‌دار بالایی و گره بدون پیچک ساخته می‌شد. چیدمان پشت سر هم این زیرساخت به پیدایش شاخه‌ای انجامید که در آن، میان دو گره دارای پیچک، یک گره بدون پیچک جای می‌گرفت. هنگامی که مریستم، گره پیچک‌دار پایینی را تشکیل می‌داد، آغازنده وامانده مانند یک توده سلول با برجستگی و افتادگی کمتر در بخش کناری مریستم نمایان شد. به هنگام پیدایش گره پیچک‌دار بالایی، آغازنده وامانده همچون اندامی گرد و برجسته با افتادگی بیشتر در بخش پیرامونی مریستم آغازش یافت. مریستم در پدید آوردن گره بدون پیچک، گرد و کوچک ماند و آغازنده وامانده در روبروی برگ پدیدار نشد (شکل ۱).

جداسازی و کشت مریستم

مریستم و اندام‌های کناری آن در رنگ‌آمیزی با فلورسئین دی استات به رنگ سبز درخشان درآمدند. سلول‌ها در مریستم رنگ‌آمیزی شده با دیواره‌های درخشان نمایان گردیدند که از آن در شناسایی قلمرو

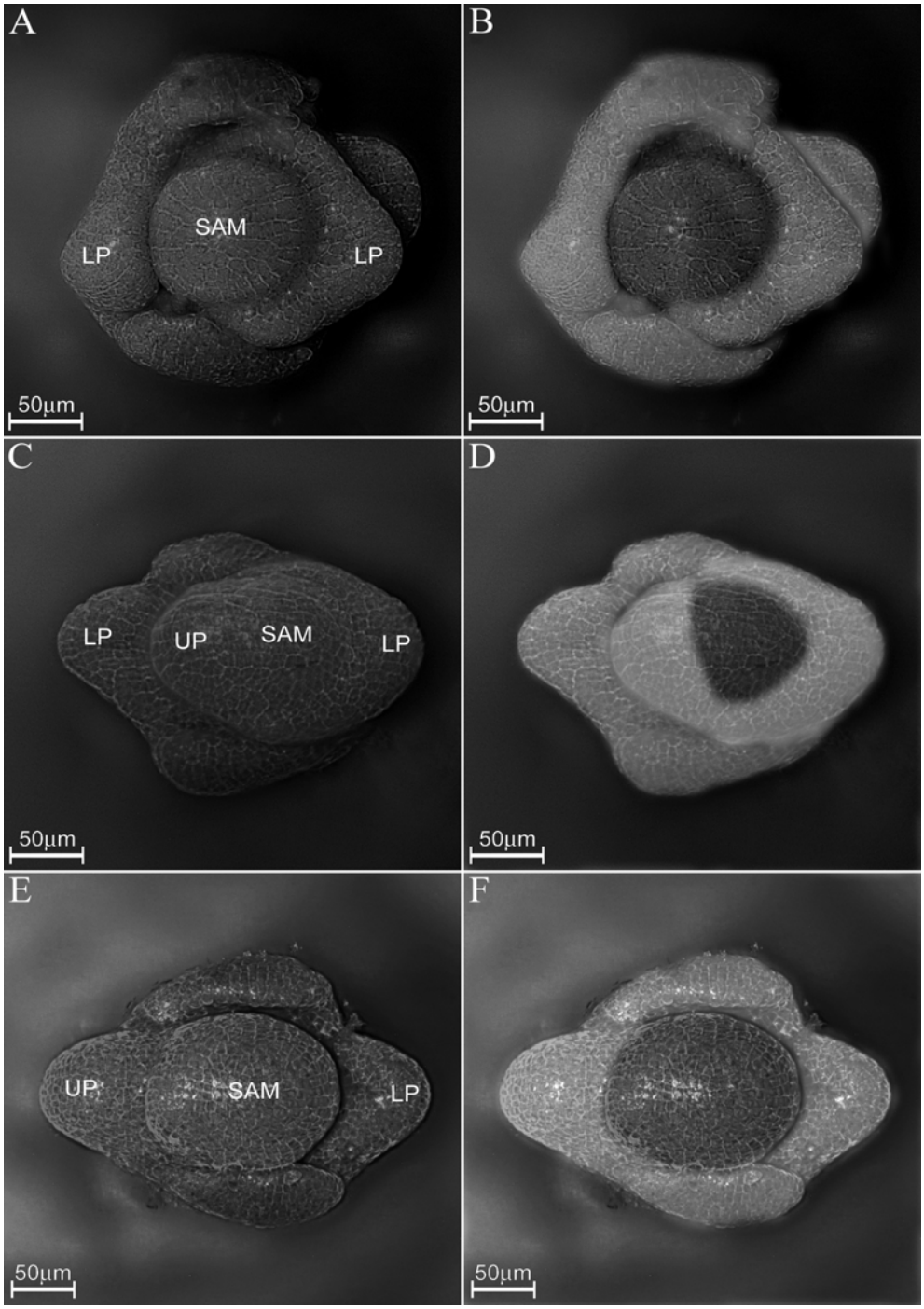
گسترش سلول‌های مریستمی استفاده شد. در کنار مریستم، آغازنده برگی، آغازنده وامانده، آغازنده گل‌آذین و یا پیچک در زیر میکروسکوپ مشخص بود (شکل‌های ۲ و ۳). بررسی‌های میکروسکوپی نشان دادند که در دوره سه‌گانه آغازش اندام‌های روبروی برگی (آغازه پیچک و گل‌آذین)، اندازه مریستم یکسان نمی‌ماند. جداسازی مریستم به هنگام آغازش گره پیچک‌دار پایینی بسیار دشوار بود. حال آنکه برداشت مریستمی که فرآیند پدید آوردن گره بدون پیچک را آغاز کرده بود، ساده‌تر انجام پذیرفت.



شکل ۱- چگونگی آغازش و جدا شدن آغازنده وامانده از مریستم شاخه

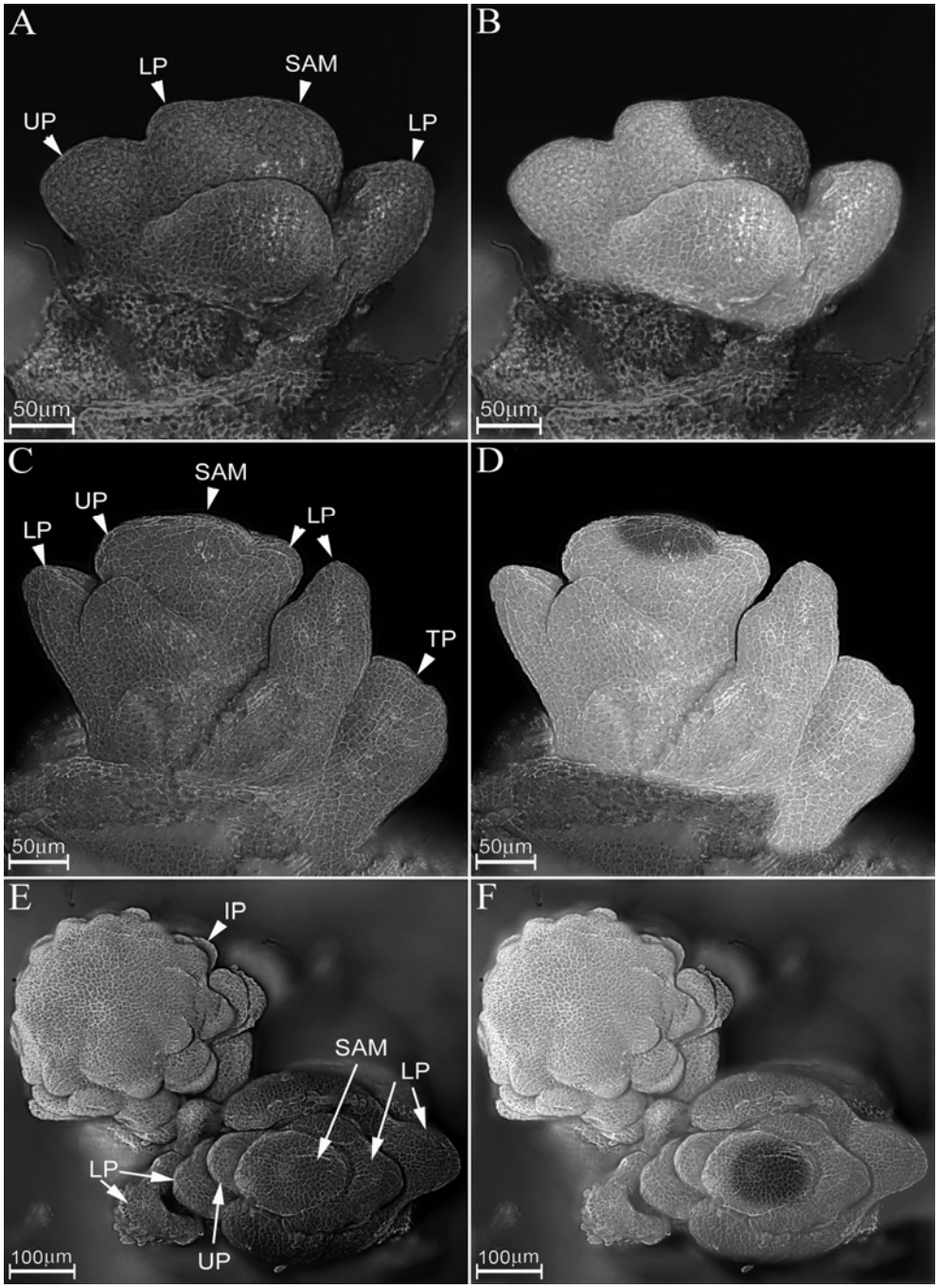
A- الگوی جای‌گیری پیچک بر روی شاخه سبز که در آن گره پیچک‌دار پایین (T1)، گره پیچک‌دار بالا (T2) و گره بدون پیچک (T3) پدید می‌آیند؛ B- مریستم به هنگام پدید آوردن گره بدون پیچک؛ C- مریستم به هنگام پدید آوردن گره پیچک‌دار بالا؛ D- مریستم به هنگام پدید آوردن گره پیچک‌دار پایین.

نمایه‌ها: آغازنده برگی (LP)، آغازنده وامانده (UP)، آغازنده پیچک (TP)، مریستم (SAM).



شکل ۲- ریخت‌شناسی مریستم انگور از نمای بالا

A- مریستم (SAM) بدون آغازنده وامانده و در میان دو آغازنده برگی (LP)؛ B- همان تصویر پیشین با نمایش مریستم به رنگ تیره؛ C- مریستم (SAM) با آغازنده وامانده (UP) بالایی و دو آغازنده برگی (LP)؛ D- همان تصویر پیشین با نمایش مریستم به رنگ تیره؛ E- مریستم (SAM) با آغازنده وامانده (UP) پایینی و یک آغازنده برگی (LP)؛ F- همان تصویر پیشین با نمایش مریستم به رنگ تیره.



شکل ۳- ریخت‌شناسی مریستم انگور

A- مریستم (SAM) با آغازنده وامانده (UP) پایینی و دو آغازنده برگی (LP) از نمای پهلو؛ B- همان تصویر پیشین با نمایش مریستم به رنگ تیره؛ C- مریستم (SAM) با آغازنده وامانده (UP) بالایی، سه آغازنده برگی (LP) و یک آغازنده پیچک (TP) در دید از پهلو؛ D- همان تصویر پیشین با نمایش مریستم به رنگ تیره؛ E- مریستم (SAM) با چندین آغازنده وامانده (UP) و آغازنده برگی (LP)، در کنار یک گل‌آذین (IP) از نمای بالا؛ F- همان تصویر پیشین با نمایش مریستم به رنگ تیره.

بر پایه داده‌های به دست آمده، مریستم‌های تنها که هیچ آغازنده‌ای آنها را همراهی نمی‌کرد، دو هفته پس از کشت، به طور معنی‌داری زنده‌مانی (viability) بسیار کمتری در برابر مریستم‌هایی داشتند که دارای آغازنده برگی و یا آغازنده وامانده بودند. هر چند، میزان زنده‌مانی مریستم‌های تنها که از دوره‌های نموی سه‌گانه برداشت شده بودند، یکسان بود و اختلاف معنی‌داری بین آنها (آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد) دیده نشد. زنده‌مانی مریستم‌های برداشت شده به هنگامی که گره پایین و یا گره بالای پیچک‌دار را پدید می‌آوردند، از دیدگاه آماری یکسان، و به طور معنی‌داری بیشتر از مریستم‌های جدا شده‌ای بود که اندام‌زایی آنها به پدیدار شدن گره بدون پیچک می‌انجامید (شکل ۴). بررسی داده‌های به دست آمده نشان داد که بیشترین میزان زنده‌مانی به تیمار مریستم به همراه یک آغازنده وامانده و یک آغازنده برگی مربوط است. از سوی دیگر، میانگین زنده‌مانی مریستم تنها، به طور معنی‌داری کمتر از میزان زنده‌مانی مریستم با یک آغازنده وامانده بود (شکل ۵). همچنین، میانگین زنده‌مانی مریستم برداشت شده از گره بدون پیچک، کمتر از گره پیچک‌دار بالایی و گره پیچک‌دار پایینی بود. زنده‌مانی مریستم‌های برداشت شده از گره پیچک‌دار بالایی و پایینی، تقریباً یکسان بود و اختلاف معنی‌داری بین آنها (آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد) دیده نشد (شکل ۶).

بحث

کشت مریستم شاخه، بر توانایی آغازیدن اندام‌های نوپدید و پیدایش گیاه درون شیشه‌ای استوار است (Sticklen and Oraby, 2005). هر چند، نخستین گام برای انجام کشت مریستم، برداشتی درست از اندازه و چگونگی جداسازی و جای‌گذاری آن در بستر کشت دارد. مریستم شاخه، تلاش می‌کند که از افزایش اندازه خود در دوره اندام‌زایی جلوگیری نماید. بنابراین در بیشتر گیاهان، نوسان چندانی در اندازه مریستم رویشی روی نمی‌دهد (Aida and Tasaka, 2006). انگور از دیدگاه رفتار وابسته به اندام‌زایی مریستم، گیاهی ویژه به شمار می‌آید، زیرا پیچک و گل‌آذین در این گیاه، از بخش مریستمی (آغازنده وامانده) جداگانه‌ای ساخته می‌شوند که روبروی برگ پدید می‌آید. پس مریستم شاخه انگور، برای کاهش هزینه‌ای که فرآیند اندام‌زایی بر اندازه آن وارد می‌کند، جداسازی آغازنده وامانده را در رفتار نموی خود گنجانده است.

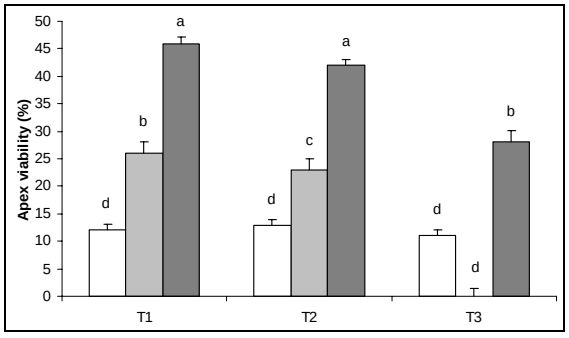
با این که فرآیند اندام‌زایی در انگور از دیدگاه نمو رویشی و زایشی بررسی شده است، وابستگی ریخت‌شناسی مریستم در دوره سه‌گانه آغازش آغازنده وامانده با کشت مریستم روشن نیست. بررسی ریخت‌شناسی مریستم انگور در این آزمایش نشان داد که که بسته به ویژگی‌های گرهی که ساخته می‌شود، ساختار بیرونی و اندازه مریستم نیز دگرگون می‌گردد.

برای نخستین بار، وابستگی دگرگونی‌های نموی مریستم با اندازه آن در گیاه گوجه‌فرنگی بررسی شد (Whaley, 1939). مطالعات نشان داد که در این گیاه، اندازه اندام آغازش یافته از مریستم، همبستگی نزدیکی

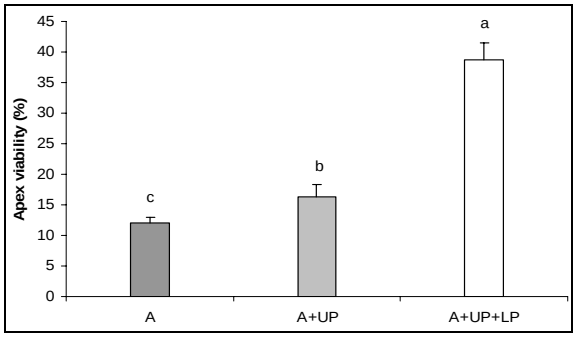
با اندازه و میزان نمو مریستم دارد. بنابراین، از مریستمی با اندازه کوچک، اندامی کوچک آغازش پیدا می‌کند و از مریستمی با اندازه بزرگتر، اندامی بزرگ پدید می‌آید. در این آزمایش، هیچ گونه وابستگی میان اندازه مریستم و زنده‌مانی آن در گیاه انگور به دست نیامد. هر چند مشخص شد که مریستم در دوره فرازگرایانه اندام‌زایی خود (که با آغازش آغازنده وامانده همراه است)، توانایی زنده‌مانی بیشتری در کشت درون‌شیشه‌ای پیدا می‌کند. در گیاه نیشکر چنین گزارش شد که افزایش شمار آغازنده‌های برگی به همراه مریستم جدا شده، زنده‌مانی مریستم در پیوند درون‌شیشه‌ای را افزایش می‌دهد (Ramgareeb *et al.*, 2009). با این حال، افزایش در شمار آغازنده‌های برگی را نمی‌توان با افزایش در اندازه مریستم، یکی دانست. در این پژوهش نیز مشخص شد که فراوانی مریستم‌های زنده هنگامی که همراه با آغازنده وامانده و یا برگ جدا و کشت گردیدند، بیشتر از مریستم‌های تنها بود.

کشت مریستم شاخه در گیاه *Alestroemeria* با اندازه‌های ۰/۷ و ۲ میلی‌متر، نشان داده است که مرگ‌ومیر جداکشت‌ها با کاهش اندازه آنها، افزایش می‌یابد. هر چند، میزان زدایش ویروس با کاهش اندازه مریستم، افزایش پیدا کرد (Chiari and Bridgen, 2002). در گیاه پنبه، زنده‌مانی مریستم وابستگی فراوانی به اندازه آن داشت. چنان که زنده‌مانی جداکشت‌های کوچکتر از ۰/۵ میلی‌متر، کاهش فراوانی پیدا نمود (Saeed *et al.*, 1997). داده‌های به دست آمده از این آزمایش نیز نشان داد که وابستگی نزدیکی میان اندازه و زنده‌مانی مریستم انگور، می‌توان یافت.

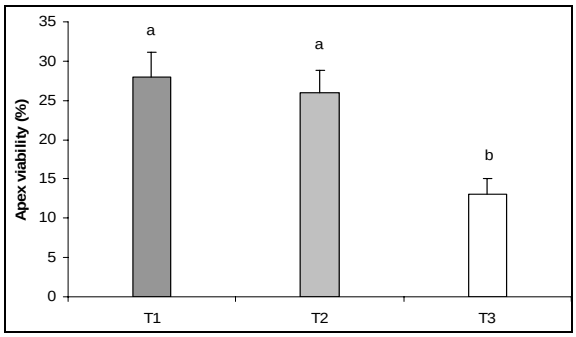
در گیاه ذرت، با جدا کردن و کشت مریستم‌های شاخه که اندازه‌ای نزدیک به ۰/۳ میلی‌متر داشتند و دارای دو آغازنده برگی بودند، ۳۰ درصد از آنها توانستند زنده بمانند و تا پدید آوردن گیاهچه رشد کنند (Irish and Nelson, 1988). در مرکبات نیز گزارش شده است که افزایش شمار آغازنده‌های برگی همراه مریستم، به کاهش کارآیی زدایش ویروس می‌انجامد و از سوی دیگر، کاهش اندازه مریستم در این دسته از گیاهان، کاهش زنده‌مانی جداکشت را در بر دارد. در مرکبات، مریستم به همراه یک تا دو آغازنده برگی، بهترین کارآیی در ویروس‌زدایی با زنده‌مانی جداکشت را در پی داشت (Navarro *et al.*, 1975). بر پایه داده‌های به دست آمده از این آزمایش، برداشت مریستم با یک آغازنده برگی و یک آغازنده وامانده، زنده‌مانی مریستم را نزدیک به سه برابر افزایش داد و به بیش از ۳۵ درصد رساند که با داده‌های به دست آمده در گیاه ذرت و مرکبات همخوانی دارد.



شکل ۴- میزان زنده‌مانی مریستم تنها (A)، مریستم با یک آغازنده وامانده (A+UP) و مریستم به همراه یک آغازنده وامانده و یک آغازنده برگی (A+UP+LP) که از گره‌های پیچک‌دار پایینی (T1)، پیچک‌دار بالایی (T2) و بدون پیچک (T3) برداشت شده بودند. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.



شکل ۵- میانگین زنده‌مانی مریستم تنها (A)، مریستم با یک آغازنده وامانده (A+UP) و مریستم به همراه یک آغازنده وامانده و یک آغازنده برگی (A+UP+LP). حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.



شکل ۶- میانگین زنده‌مانی مریستم برداشت شده از گره‌های پیچک‌دار پایینی (T1)، پیچک‌دار بالایی (T2) و بدون پیچک (T3). حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن است.

در گیاه *Acacia* گزارش شده است که مریستم برداشت شده از دانه‌رست‌های دو ساله، زنده‌مانی بیشتری از مریستم گیاهان پیرتر (۴، ۶ و ۸ ساله) دارند. از سوی دیگر نشان داده شد که ویژگی‌های نموی شاخه و گل‌زا بودن آن، در توانایی باززایی مریستم برداشت شده، نقش دارند (Beck *et al.*, 2000). در این آزمایش، نقش بارده بودن و نبودن شاخه در زنده‌مانی و باززایی مریستم به دست آمده از آن بررسی نشد، ولی مشخص گردید که کشت مریستم نمویافته‌تر به زنده‌مانی بیشتر آن می‌انجامد.

در گیاه داوودی، تلاش برای بنیان‌گذاری کشت مریستم تنها و بدون همراهی آغازنده های برگی ناکام مانده است. برای افزایش توانایی زنده‌مانی مریستم در این گیاه، با ابزار برش ویژه، جداکشت آن به دست آمد و بر روی ریشه از پیش‌آماده گیاهان دیگری همچون کلم جای گرفت. پس از رشد و اندام‌زایی مریستم پیوند شده، جداسازی و بازکشت آن انجام پذیرفت (Hosokawa *et al.*, 2004). در گیاه داوودی برای شناسایی مریستم از روش‌های رنگ‌آمیزی استفاده نشد. احتمالاً ساختار ساده مریستم این گیاه، شناسایی آن را آسان می‌سازد. هر چند برای کارآمدتر شدن برداشت مریستم بدون آغازنده برگی، استفاده از ابزار برش نقش بسیار سازنده‌ای داشت. در گیاه انگور، پیچیده بودن ساختار مریستم، جداسازی آن بدون رنگ‌آمیزی را بسیار دشوار می‌نماید. هر چند با انجام رنگ آمیزی، شناسایی مریستم در هر گام از نمو آن انجام‌پذیر شد. این آزمایش نشان داد که میزان زنده‌مانی و اندام‌زایی جداکشت مریستم انگور، بیشتر از گیاهان نرم‌بافتی چون داوودی است. از سوی دیگر، می‌توان مریستم واحد در این گیاه را که هیچ آغازنده برگی آن را همراهی نکند، (و نه ریشه از پیش آماده) کشت کرد.

در گیاه سورگوم، مریستم شاخه در دانه‌رُست ۳ روزه بسیار کوچکتر از مریستم در دانه‌رُست ۷ روزه بود. بنابراین، در این گیاه پیشنهاد گردید که از دانه‌رُست‌های ۷ روزه به بالا مریستم جدا شده و کشت گردد (Kishore *et al.*, 2006). یکسان نبودن اندازه مریستم بر پایه دوره رشد گیاه سورگوم، با یافته‌های ما در گیاه انگور، همخوانی دارد. زیرا در انگور نیز، اندازه مریستم شاخه از دوره نموی، پیروی می‌نماید. این دوره

نموی بازتابی از چگونگی رفتار مریستم در پیدایش آغازنده وامانده است.

جمع‌بندی

نتایج به دست آمده از این آزمایش نشان داد که میزان اندام‌زایی در مراحل مختلف نموی مریستم یکسان نیست و بیشترین زنده‌مانی جداکشت‌ها هنگامی به دست می‌آید که اندام‌زایی بالا باشد. همچنین، همراهی آغازنده برگی و آغازنده وامانده با مریستم، شانس زنده‌مانی آن را به طور معنی‌داری افزایش داد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد که برای انجام موفقیت‌آمیز کشت مریستم انگور، نه تنها به جایگاه بلکه به مرحله نموی مریستم نیز توجه شود.

منابع

Aida, M. and Tasaka, M. (2006) Genetic control of shoot organ boundaries. Current Opinion in Plant Biology 9: 72-77.

Beck, S. L., Dunlop, R. and Staden, J. (2000) Meristem culture of *Acacia mearnsii*. Plant Growth Regulation 32: 49-58.

Bowman, J. L. and Eshed, Y. (2000) Formation and maintenance of the shoot apical meristem. Trends in Plant Science 5: 110-115.

Chiari, A. and Bridgen, M. P. (2002) Meristem culture and virus eradication in *Alstroemeria*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68: 49-55.

Dadpour, M. R., Grigorian, V., Nazemieh, A. and Valizadeh, M. (2008) Application of epi-illumination light microscopy for study of apex in fruit trees. International Journal of Botany 4: 49-55.

Dumais, J. and Kwiatkowska, D. (2002) Analysis of surface growth in shoot apices. Plant Journal 31: 229-241.

Dutt, M., Li, Z. T., Dhekney, S. A. and Gray, D. J. (2007) Transgenic plants from shoot apical meristems of *Vitis vinifera* L. ‘‘Thompson Seedless’’ via *Agrobacterium* - mediated transformation. Plant Cell Reports 26: 2101-2110.

Gerrath, J. M. (1991) Developmental morphology and anatomy of grape flowers. In: Horticultural reviews. (ed. Janick, J.) 315-337. Avi Publication Pompany. Oxford.

Gerrath, J. M. and Posluszny, U. (2007) Shoot architecture in the vitaceae. Canadian Journal of Botany 85: 691-700.

Hosokawa, M. (2008) Leaf primordia-free shoot apical meristem culture: a new method for production of viroid-free Plants. Journal of Japanese Society for Horticultural Sciences 77: 341-349.

Hosokawa, M., Otake, A., Sugawara, Y., Hayashi, T. and Yazawa, S. (2004) Rescue of shoot apical meristems of *chrysanthemum* by culturing on root tips. Plant Cell Reports 22: 443-448.

Irish, E. E. and Nelson, T. M. (1988) Development of maize plants from cultured shoot apices. Planta 175: 9-12.

Kishore, N. S, Visarada, K. B. R. S., Lakshmi, Y. A., Pashupatinath, E., Rao, S. V. and Seetharama, N. (2006) *In vitro* culture methods in sorghum with shoot tip as the explant material. Plant Cell Reports 25: 174-182.

Kwiatkowska, D. (2004) Structural integration at the shoot apical meristem: models, measurements, and experiments. American Journal of Botany 91: 1277-1293.

Lyndon, R. F. (1994) Control of organogenesis at the shoot apex. New Phytologist 128: 1-18.

Mhatrea, M., Salunkheb, C. K. and Raoa, P. S. (2000) Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards an improved protocol. Scientia Horticulturae 84: 357-363.

Navarro, L., Roistacher, C. N. and Murashige, T. (1975) Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free Citrus. Journal of American Society for Horticultural Sciences 100: 471-479.

Ramgareeb, S., Snyman, S. J., Antwerpen, T. V. and Rutherford, R. S. (2009) Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum spp*. cultivar NCo376) using apical meristem culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture 100: 175-181.

Saeed, N. A., Zafar, Y. and Malik, K. A. (1997) A simple procedure of Gossypium meristem shoot tip culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51: 201-207.

Sticklen, M. and Oraby, H. F. (2005) Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 41: 187-200.

Sussex, I. M. (1952) Regeneration of the potato shoot apex. Nature 170: 224-225.

Vasconcelos, M. C., Greven, M., Winefield, C. S., Trought, M. C. T. and Raw, V. (2009) The flowering process of *Vitis vinifera*: a review. American Journal of Enology and Viticulture 60: 411-434.

Whaley, W. G. (1939) Developmental Changes in Apical Meristems. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) 25: 445-448.

Morphology of the shoot apical meristem and its effects on the explants viability in grapevine

Gholam Reza Gohari [1], Somayeh Faridi Nicharan [2], Somayeh Naghiloo [3]
Alireza Mottalebi Azar [1] and Mohammad Reza Dadpour [1]*

[1] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Urmieh, Urmieh, Iran
[3] Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Abstract

Shoot apical meristem (SAM) culture is known as an effective method for the production of virus free plants. Detection and then dissection of SAM are the first two steps in establishment of successful culture. Providing of leaf primordium-free meristem is a very difficult operation due to the small size and colorless appearance of the SAM. Amongst the commercial plants, grapevine demonstrates specific and complex developmental pattern at which the SAM plays a crucial role. In this research, the live meristems were stained using novel procedure and then they were stained by water solution of FDA (0.1%) and fuchsine acid (0.05%), simultaneously. The prepared meristems were then detected and excised under a fluorescence stereomicroscope (510 nm) and afterwards they were immediately cultured on the half strength MS medium. Microscopic studies were shown that the size of SAM in the grapevine was fluctuated in terms of its developmental course. The higher organogenesis ability of SAM, the more viability of the explants that were achieved during the meristem culture. On the other hand, viability of meristem containing leaf and uncommitted primordium was higher than that of organ-free meristem.

Key words: Grapevine, Organogenesis, Viability, FDA, Meristem culture, Shoot apical meristem

* Corresponding Author: dadpour@tabrizu.ac.ir