بررسی جنین زایی سوماتیکی توسط ریزنمونه برگ در دو رقم انگور بیدانه قرمز و فلیم سیدلس

مریم کریمی (۱)، علی عبادی (۲) و منصور امیدی (۳)
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران، ۲و ۳- دانشیار دانشگاه تهران

چکیده

تولید جنین های سوماتیکی با استفاده از اندام های رویشی به علت فراهم بودن ریز نمونه در طول سال بسار حائز اهمیت می باشد. در این آزمایش از دو رقم بیدانه قرمز و فلیم سیدلس ریز نمونه های برگی گرفته شد. ریز نمونه ها برای تولید کالوس در محیط کشت MS حاوی دو هورمون BAP، 2,4-D و کازئین هیدرولیزات کشت شدند. از دو هورمون IAA و BAP برای تولید جنین های سوماتیکی استفاده گردید. محیط کشت MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر IAA و ۵ میلی گرم در لیتر BAP بیشترین تولید جنین را داشتند. رقم فلیم سیدلس نیز در تولید جنین های سوماتیکی نسبت به رقم بیدانه قرمز بهتر عمل کرد.

مقدمه

انجام برنامه های انتقال ژن روشی جدید برای تولید ارقام جدید با داشتن خصوصیات مطلوب می باشد.در انگور نیز برنامه های انتقال ژن برای کسب خصوصیاتی مانند مقاومت به بیماریها و آفات مد نظر قرار گرفته است. لازمه عملی شدن برنامه های انتقال ژن داشتن بافت هایی می باشد که توانایی پذیرش ژن ها را داشته و در مراحل بعد به گیاهانی کامل تبدیل شوند. جنین های سوماتیکی از جمله بافتهایی می باشند که چنین خصوصیتی را دارند. در انگور برای اولین بار جنین های سوماتیکی با استفاده از کشت تخمدان نارس رقم کابرنت ساوینون(مالینز[3] و سری ناواسان[4] ۱۹۷۶) ممکن گردید. تولید جنین های سوماتیکی از کشت ریز نمونه برگ در ارقام Thompson Seedless و Chardonnay نیز گزارش شده است(۵).

مواد و روش‌ها

برگ های جوان رشد یافته در انتهای شاخساره های سال جاری بوته های انگور ارقام بیدانه قرمز و فلیم سیدلس در بهار ۸۶ جمع آوری شد. اندازه برگ ها حدود ۵-۲ سانتیمتر بوده و فاقد علائم بیماری یا آفت بودند. محلول ۰/۸ ٪ هیپوکلریت سدیم به همراه چند قطره توین ۲۰ به مدت ۱۰ دقیقه برای ضد عفونی برگ ها استفاده شد. از محلول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی بیوتیک جنتامایسین به مدت ۳۰ ثانیه برای کنترل آلودگی های باکتریایی استفاده شد. ریز نمونه های برگ در محیط MS با تیمار هورمونی 2,4-D با غلظت ٤/٥ میکرومولار و BAP با غلظت ۱/۱ میکرومولار، ۱ گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات، ۲۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۷ گرم در لیتر آگار با pH= ۵/۸ کشت شدند. در ریز نمونه های برگی علائم متورم شدن بافت بعد از ۱۰ روز قابل مشاهده بود و در هفته سوم کالوس ها بر روی سطح ریز نمونه ها مشاهده شدند. برای تحریک جنین زایی، این کالوس ها به محیط MS با هورمون های IAA به میزان ۱،۲ و ۳/۵ میلی گرم در لیتر و BAP به میزان۲، ۵ و۱۰ میلی گرم در لیتر منتقل شدند. شرایط نگهداری برای کالوس ها در این محیط تاریکی مطلق و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد برای مدت یک

[3] Mullins
[4] serinivasan

ماه اول و سپس در ماه دوم دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شدت نور $\mu E/M^2/S$ ۱۲-۱۰ بود. در این نوع کالوس ها، در طی دو هفته بعد از انتقال به شرایط نوری ذکر شده، جنین ها در مرحله اول شکل گیری مشاهده شدند. طی دو هفته بعدی شدت نور به $\mu E/M^2/S$ ٤٥ رسانده شد و به مرور زمان جنین های قلبی بر سطح کالوس قابل مشاهده گردیدند.

نتایج و بحث

در محیط پایه MS به همراه هورمون 2,4-D با غلظت ٤/٥ میکرومولار و هورمون BAP با غلظت ۱/۱ میکرومولار، در ریز نمونه های برگی علائم متورم شدن بافت بعد از ۱۰ روز قابل مشاهده بود. مقایسه توانایی دو رقم با یگدیگر برای تولید جنین نشان داد که رقم فلیم سیدلس نسبت به رقم بیدانه قرمز برای تولید جنین در تیمار های هورمونی اعمال شده موفق تر عمل کرده است. رقم بیدانه قرمز ۳۱/٤٪ توانایی تولید جنین را داشت، در حالیکه رقم فلیم سیدلس٦٨/٦٪ در تولید جنین موفق بود. داس و همکاران در سال ۲۰۰۲ با بررسی جنین زایی چهار رقم انگور در محیط MS با تیمار هورمونی۱ میلی گرم در لیتر IAA و ۱ میلی گرم در لیتر BAP بیشترین جنین زایی را در رقم پوسا سیدلس مشاهده کردند. محیط کشت MS با ۲ میلی گرم در لیتر IAA و ۵ میلی گرم در لیتر BAP بیشترین جنین زایی در سطح کالوس ها را نشان داد.

منابع

1. Bouquet, A. & B. Lamaison. 1982. Influence du genotype sur la production de cals, d embryoides et de plantes entieres par culture d anther In vitro dans le genre vitro dans le genre Vitis. CR Acad Sci. 295:569-574.
2. Carimi, F., E. Barizza. & M. Gardiman. 2005. Somatic embryogenesis frome Stigma and styles of grapevine. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 41:249–252.
3. Colova-Tsolova, V. & L. Jiang. 2001. Genetically Engineered Grape for Seedless and Stress Tolerance. ASEV52 nd Annual meeting, Sandieg California: 1-1.
4. Das, D.K., M.K. Reddy, K.C. Upadhyaya, & S. K. Sopory. 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.
5. Jayasankar,S., R. Bhaskar, & D. J. Gary. 2003. Comparative antomy and morphology of Vitis vinifera(Vitaceae) somatic embryos frome solid and liquid culture-derived proembryogenic masses. American Journal of Botany 90(7): 973–979.
6. Mullins, M. G., C. Srinivasan. 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet-sauvignon) by apomixes in vitro. J. Exp. Bot. 27: 1022-1030.

Investigation on Somatic Embryogenesis In Two Grapevine Cultivars (Red Sultanina, Flame Seedless) by Leaf Explant

Abstract
Production of somatic embryos by using of vegetative explants is very important due to the availability of these explants during the year. In present study the leaf explants were obtained from two cv. Red Sultanina and Flame Seedless. In order to calli inducing, the explants were cultured on MS medium containing two BAP and 2,4-D hormones and Cazein hydrolyzate.