تکثیر درون شیشه‌ای کیوی از طریق جنین زایی رویشی

[۱] **نسرین محمودی قادی**

دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان *nasrinmahmodi12.yahoo.com*

[۲] **کامبیز مشایخی**

عضوهیات علمی دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی گرگان،kambizm@yahoo.com

[۳] **مهدی علیزاده**

عضوهیات علمی دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی گرگان guasnr@Gmail.com

[4] **بهنام کامکار**

behnamkamkar@yahoo.com

چکیده

ریزازدیادی به‌عنوان یکی از روش‌های کشت بافت برای ایجاد تعداد زیادی گیاه مشابه از یک گیاه مادری استفاده می‌شود. با توجه به اینکه بررسی روند جنین زایی رویشی برای گیاهان چوبی حائز اهمیت می باشد لذا این آزمایش جهت بررسی تکثیر درون شیشه ای کیوی از طریق جنین زایی رویشی با استفاده از ریز نمونه دمبرگ کیوی در دو محیط کشت موراشیگی واسکوگ (MS) و گمبورگ (B5) انجام گردید. ریزنمونه دمبرگ حاصل از کشت درون شیشه‌ای بذور کیوی در فضای استریل تهیه و به دو محیط کشت مایع مذکور با ۴ غلظت توفوردی (0, 2, 4, 6) میلی گرم در لیتر منتقل گردیدند. آزمایش درقالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار اجرا گردید و رفتار ریزنمونه بعد از ۴ هفته در محیط القاء و ۶ هفته در محیط ظهور مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی ها نشان داد که تنها جنین رویشی در محیط B5 و در غلظت ۴ میلی گرم در لیتر تولید شد. و در سایر تیمارها هیچ جنینی تولید نشد.

کلمات کلیدی: کیوی، کشت درون شیشه ای، محیط کشت، ریزنمونه

مقدمه

کشت بافت بر وجود خاصیت توانمندی در سلول‌های گیاهی استوار است. روش‌های مربوط به آن شامل کشت سلول یا قطعات جدا شده از بافت گیاهی در یک محیط کشت غذایی و تحت شرایط ضد عفونی شده است که درنهایت طی یک فرایند اندام‌زایی یا جنین‌زایی رویشی به تولید گیاهان کامل می‌انجامد (هادسون و کستر، ۲۰۰۲). کیوی‌فروت با نام علمی *Actinidia deliciosa* در مناطق معتدله گرم و نیمه‌گرمسیری رشد می‌کند و میوه آن از محصول مهم باغبانی محسوب می‌شود. این میوه بومی چین بوده و از دو طریق جنسی و رویشی قابل ازدیاد است ولی به‌منظور حفظ یکنواختی ژنتیکی رقم‌ها از روش‌های ازدیاد غیر جنسی مانند قلمه، پیوند و کشت بافت استفاده می‌شود (افشار و اسحاقی، ۱۳۷۸).

بیان مسأله

جنین‌زایی رویشی فرایندی است که طی آن سلول‌های رویشی تحت شرایط انگیزشی به سلول‌های جنین‌زا تبدیل شده ودرنتیجه یکسری تغییرات بیوشیمیایی ومرفولوژیکی به جنین رویشی تبدیل می‌شوند. این جنین‌ها شبیه جنین معمولی بذر هستند. و می‌توانند در شرایط درون‌شیشه‌ای باززا شده وگیاه کامل جدیدی را ایجاد کند (زیمرمن، ۱۹۹۳). این روش تکنیکی برای تولید سریع تعداد زیادی از گیاهان با ژنوتیپ مشخصی از یک گیاه مادری باارزش می‌باشد (جیمنز، ۲۰۰۱). جنین زایی رویشی در گیاهان با ریز نمونه های مختلف مشاهده شده است. با توجه به اینکه تحقیقات زیادی راجع به جنین زایی رویشی کیوی بعنوان یک گیاه چوبی صورت نگرفته است در این تحقیق سعی شد باززایی کیوی از طریق جنین زایی رویشی بررسی شود.

بررسی ادبیات موضوع

با هورمون‌های مختلف برای جنین‌زایی رویشی مورد بررسی ریزنمونه‌های لپه، جنین، برگ و ساقه حاصل از گیاهچه استریل پرتقال قرار گرفت، نتایج نشان داد که در ریزنمونه‌های لپه و جنین با استفاده از هورمون نفتالین استیک اسید جنین‌زایی مستقیم و با هورمون‌های دی‌کامبا و پیکلورام جنین‌زایی غیرمستقیم صورت گرفت در صورتی‌که با ریزنمونه‌های برگ و ساقه هیچ جنینی مشاهده نشد (کیونگ لینگ و همکاران، ۲۰۰۸). نتایج خسروی و همکاران (۱۳۸۶) بر جنین زایی سوسن نشان داد که بیشترین تعداد جنین رویشی در قسمت میانی پیاز با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر و کمترین تعداد جنین در قسمت انتهایی فلس با غلظت ۹ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد .

روش تحقیق

گندزدایی

برای انجام این تحقیق ابتدا بذور کیوی از میوه رسیده جدا شدند و به منظور گندزدایی سطحی، ابتدا در زیر هود در الکل اتیلیک 70 % به مدت ۴۵ ثانیه غوطه‌ور شدند و سپس از سفید کننده تجاری وایتکس محتوی ۵ %هیپوکلریت سدیم، در غلظت ۶۰% به مدت 20 دقیقه استفاده شد . در پایان مدت گندزدایی، ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل شده در 3 مرحله به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه آبکشی شدند. سپس بذور به ظروف کشت شامل محیط کشت MS ۱/۲ منتقل شدند.

تهیه ریز نمونه

محیط کشت‌های حاوی بذور در اتاقک رشد در دمای ۲±۲۵ قرار گرفتند و بعد از گذشت ۷ هفته ریزنمونه دمبرگ تهیه شد.

مراحل استقرار ریزنمونه‌ها

ریزنمونه‌های تهیه شده به دو محیط کشت مایع موراشیگی واسکوگ (MS) و گمبورگ (B5) با ۴ غلظت (۰، ۲، ۴، ۶) میلی گرم در لیتر منتقل شدند. ظروف حاوی ریزنمونه به دستگاه اکسیفیتون با سرعت ۱ تا ۲ دور در دقیقه و شرایط دمایی ۲±۲۷ و نور ۲۰۰۰ لوکس که توسط لامپ‌های فلورسنت سفید تامین می‌شد، منتقل شدند. رفتار ریزنمونه‌ها بعد از۴ هفته در محیط القاء و ۶ هفته در محیط ظهور مورد ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل داده ها

این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی درجهار تکرار انجام گردید. عمل تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SAS بر روی داده‌ها صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ % انجام گرفت

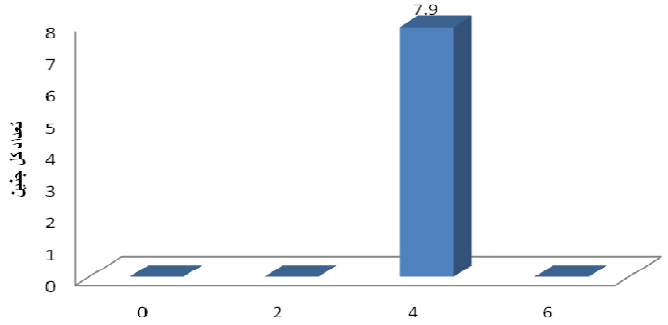
بحث و نتیجه گیری

بررسی جنین زایی برای ریزنمونه دمبرگ در دو محیط کشت (MS) و (B5) نشان داد که با توجه به مقایسه میانگین ها تعداد جنین تولید شده برای ریزنمومه دمبرگ در غلظت ۴ میلی گرم در لیتر ۷/۹ بود. و در سایر تیمارها هیچ جنینی تولید نشد. باتوجه به عدم تولید جنین در محیط MS در تجزیه واریانس در نظر گرفته نشد.

اکسین نقش مهمی در فرآیند جنین‌زایی رویشی ایفا می‌کند. مقادیر درون‌زای اکسین و نیز کاربرد خارجی آن، از جمله فاکتورهای تعیین‌کننده در طول فاز القاء و رئالیزاسیون هستند. البته واکنش تمام گیاهان به توفوردی یکسان نبوده و جهت القای جنین‌زایی رویشی در هرکدام از آن‌ها نیاز به افزودن غلظت‌های متفاوتی از توفوردی می‌باشد. شواهد زیادی وجود دارد مبنی بر این‌که حساسیت بافت‌ها می‌تواند در کسب شایستگی جنین‌زایی ریزنمونه‌های کشت بافت مهم باشد. برای مثال مقدار فیتوهورمون محیط کشت یک عامل اساسی تنظیم‌کننده رشد و تمایزیابی درون شیشه‌ای بافت گیاه است تنها به‌شرطی که مواد اولیه مادری بافت پاسخی مناسب به‌آن بدهد (بل و همکاران، ۱۹۹۳).

همچنین با توجه به تحقیقات احسان‌پور و امینی (۱۳۷۹) استفاده از ریزنمونه‌های مختلف و به‌ویژه ریزنمونه‌های دارای بافت مریستمی و جوان امکان رسیدن به کالوس جنین‌زا را به میزان چشم‌گیری افزایش می‌دهد

بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که پاسخ متفاوت ریزنمونه‌های مختلف یک گیاه به هورمون در محیط کشت، در نتیجه اختلافات در حالات ویژه درون‌سلولی ریزنمونه‌ها از قبیل بیان ژن و سطوح هورمون درون‌زای آن می‌باشد (ونگ وهمکاران، ۱۹۹۰).



شکل۱- تعداد جنین تولید شده در محیط B5

منابع

۱- احسان پور، ع. ا. و امینی، ف. ۱۳۸۲. کشت سلول و بافت گیاهی . انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان. ۱۸۱ص

۲- افشار محمدیان، م .و ر .اسحاقی تیموری .۱۳۷۸ . کشت، پرورش و ارزش غذایی کیوی .انتشارات منصور افشار محمدیان

۳- خسروی، س. وطن‌پور ازغندی، ع. حداد، ر. مجتهدی، ن. ۱۳۸۶. تکثیر درون شیشه‌ای یکی از ارقام تجاری سوسن (*Lilium longiflorum* var Ceb-Dazzle). با استفاده از روش جنین‌زایی رویشی مستقیم. نشریه تحقیقات نهال و بذر جلد: (۲)۲۳ ۱۵۹-۱۶۸.

4- Bell, L. M., Trigiano, R. N. and Conger, B. V. 1993. Relationship of abscisic acid to somatic embryogenesis in *Dactylis glomerata*. Environmental and Experimental Botany. 33:495-499.

5- Hudson, H.T., Kester, D.E.2002.Plant propagation . principles and practices .Upper Saddle River, N,J., Prentice Hall . 88 . P.

6- Jimenez, V. M., 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role endogenous hormones. Rev. Bars. Fisiol. Veg. 13(2):196-223.

7-Kiong Ling, A. P., Sok Wan, L. Hussein, S. Ibrahim, R. 2008. Induction of somatic embryos from different explants of *Citrus sinensis.* Journal of Plant Sciences. 3(1):18-32.

8- Merkle, S.A., Parrott, W.A. and Flin, B.S. 1995. Morphogenic aspect of somatic embryogenesis. In: Torp, T.A.(Ed). In vitro embryogenesis in plants. Klauwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.115-203.

9- Wang, L., Huang, B. He, M. and Hao, S. 1990. Somatic embryogenesis and hormonal regulator in tissue culture of *Freesia refracta*. Ann. Bot. 65: 271-276.

10- Zimmerman, J. L., 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. Plant Cell. 5:1411-1423.

Abstract

In vitro kiwifruit multiplication through somatic embryogenesis

N. Mahmoudi*, K. Mashayekhi ,M. Alizadeh and kamkar, B

Horticulture Department, University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran

Key words: kiwi, in vitro, medium culture, explants

Micropropagation is one of the method to produce many similar plants. Somatic embryogenesis in woody plant is important .In this study, *in vitro* culture kiwi through somatic embryogenesis with petiole explants

was investigated. Petiole were excised aseptically from *in vitro* raised seedling and inoculated on full strength MS and B5 media with four concentration (0, 2, 4, 6) mg/L 2,4-D. The experiment was laid out as complete randomized design with four replications. Explants responses were assessed 4 weeks after induction and 8 weeks after realization phase.Somatic embryogenesis occurred with petiole explants in B5 medium culture with 4 mg/l concentration.There was no embryo in another treatment.