

باززایی گیاه انگور (*Vitis vinifera* L.) از طریق جنین زایی رویشی با استفاده از ریز نمونه گل کامل

علی عبادی^{۱*} - امیر جمال محمود^۲ - مسعود میرمعصومی^۳ - منصور امیدی^۴

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۵

چکیده

ریزنمونه‌های گل کامل ارقام یاقوتی، شاهرودی، فلیم سیدلس، بیدانه سفید و عسکری به منظور تولید کالوس جنین‌زا و جنین سوماتیکی در دو زمان مختلف جمع آوری شدند. برای تولید کالوس جنین‌زا از محیط کشت MS به همراه ۵ و ۱۰ میکرومولار 2,4-D و یک و دو میکرومولار BAP استفاده شد. جهت تمایز جنین از محیط کشت MS به همراه نیم میلی گرم IBA، محیط کشت MS به همراه ۲ میلی گرم IBA و ۰/۲ میلی گرم BAP، محیط کشت MS به همراه پنج میکرومولار 2,4-D و یک میکرومولار BAP و محیط کشت MS به همراه ۲ میلی گرم در لیتر BAP استفاده شد. در مرحله جوانه زنی از دو محیط کشت MS و NN و تیمار سرمایی ۴ درجه سانتی گراد بمدت دو هفته استفاده شد. نتایج نشان داد که ریز نمونه‌های گل کامل جمع آوری شده در زمان اول، کالوس جنین‌زا و جنین سوماتیکی بیشتری در همه ارقام مورد مطالعه ایجاد کردند. پاسخ گیاهان به محیط کشت برای تولید کالوس جنین‌زا تحت تاثیر رقم قرار گرفت، بطوریکه ارقام بیدانه سفید، یاقوتی و فلیم سیدلس بیشترین درصد تولید کالوس جنین‌زا را در محیط کشت MS به همراه پنج میکرومولار 2,4-D و یک میکرومولار BAP تولید کردند، در حالیکه رقم شاهرودی در محیط کشت MS به همراه پنج میکرومولار 2,4-D و دو میکرومولار BAP و رقم عسکری در محیط کشت MS به همراه ۱۰ میکرومولار 2,4-D و دو میکرومولار BAP بیشترین کالوس جنین‌زا را ایجاد کردند. پاسخ گیاهان به محیط کشت در مرحله تمایز یابی به ژنوتیپ بستگی داشت، بطوریکه هر رقم در محیط کشت ویژه‌ای بیشترین درصد جنین سوماتیکی تولید کرد. در مرحله جوانه زنی و تولید گیاهچه ارقام بیدانه سفید، یاقوتی و شاهرودی در محیط کشت MS به همراه یک میکرومولار BAP و بدون سرمادهی جنین‌ها و ارقام عسکری و فلیم سیدلس در محیط کشت MS به همراه یک میکرومولار BAP و با سرمادهی جنین‌ها بیشترین جوانه زنی و تولید گیاهچه را داشتند.

واژه‌های کلیدی: انگور، کالوس جنین‌زا، جنین سوماتیکی، گیاهچه

مقدمه

سوماتیکی در انگور که قادر به جوانه زنی و تولید گیاه بود توسط مالینز و سیرینواسان (۱۴) گزارش شد. بهترین مزیت جنین‌زایی سوماتیکی در انگور استفاده از این بافت بمنظور تولید گیاهان تراریخت مقاوم به عوامل نامساعد محیطی و بیولوژیکی می‌باشد (۱۹). هر چند که از این فرایند در موارد تشخیص ارقام موتانت (۲)، ویروس زدایی ارقام حساس انگور (۳)، بررسی تنوع سوماکلونال (۷) و برای حفاظت از ذخایر ژنتیکی (۵ و ۹) استفاده شده است. تولید جنین سوماتیکی در انگور تحت تاثیر عوامل مختلف مانند ژنوتیپ (۱۵) و نوع ریز نمونه و زمان جمع آوری آن (۶ و ۲۱)، محیط کشت (۱۶) قرار می‌گیرد. هر چند که گزارش‌هایی وجود دارد که ریز نمونه تخمدان نسبت به پرچم بازدهی بیشتری را نشان داده است (۱، ۴ و ۱۰)، با این حال از ریز نمونه پرچم بیشترین استفاده به منظور تولید جنین سوماتیکی شده است (۴، ۱۲، ۱۵، ۱۷ و ۱۸). از معایب این ریز

جنین‌زایی سوماتیکی فرایندی است که در آن سلول‌های رویشی به جنین شبیه با جنین‌زایی‌گوتی توسعه پیدا می‌کنند. تولید جنین سوماتیکی برای اولین بار از کشت سوسپانسیون سلولی گیاه هویج گزارش شد (۱۸). از آن زمان تا کنون تولید جنین سوماتیکی در طیف وسیعی از گیاهان گزارش شده است. در انگور برای اولین بار از کشت ریز نمونه پرچم جنین سوماتیکی تولید شد (۷). اولین تولید جنین

۱-۲- دانشیار و دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و

منابع طبیعی (کرج)، دانشگاه تهران

(*)- نویسنده مسئول: (Email: aebadi@ut.ac.ir)

۳- مربی پردیس علوم دانشگاه تهران

۴- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی (کرج)،

دانشگاه تهران

رنگ سبز تیره و در مرحله سه از فشردگی گلها کاسته شده و گلبرگها رنگ سبز شفاف داشتند. بعد از جمع آوری، ریز نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد بمدت ۲ روز قرار داده شدند. به منظور استریل کردن نمونه‌ها، ابتدا گل آذین‌ها کاملاً شستشو و سپس در داخل الک ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه قرار داده شدند. بعد از تیمار با الک نمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل مورد شستشو و پس از انتقال به محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه نهایتاً سه بار دیگر با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. ریز نمونه‌های گل کامل در زیر هود لامینار کاملاً استریل جدا و کشت گردیدند. در هر سه مرحله این تحقیق (تولید کالوس، تمایز جنین سوماتیکی و جوانه زنی و باززایی گیاه) آزمایش‌ها بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار بر روی هر تیمار انجام شد. به منظور القاء کالوس از محیط کشت MS به همراه 2,4-D در دو غلظت ۵ و ۱۰ میکرومولار و BAP در دو غلظت ۱ و ۲ میکرومولار، ۳۰ گرم ساکاروز، ۰/۲۵ درصد زغال فعال و ۲/۵ گرم فیتاژل استفاده شد. پس از گذشت یک ماه کالوس‌های بدست آمده به محیط تمایز جنین منتقل شدند. جهت تمایز جنین از محیط کشت‌های MS به همراه نیم میلی گرم IBA، محیط کشت MS بدون هورمون، محیط کشت MS به همراه ۲ میلی گرم IBA و ۰/۲ میلی گرم BAP، محیط کشت MS به همراه پنج میکرومولار 2,4-D و یک میکرومولار BAP و محیط کشت MS به همراه ۲ میلی گرم در لیتر BAP استفاده شد. در این مرحله در تمامی محیط کشت‌های مورد استفاده زغال فعال به میزان ۰/۲۵ درصد اضافه شد. در مرحله جوانه زنی، جنین‌ها در دو نوع محیط کشت MS به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP و محیط کشت NN بدون هورمون کشت گردیدند. pH تمامی محیط کشت‌های مورد استفاده قبل از افزودن فیتاژل به روی ۵/۸ تنظیم شد. همچنین تمامی محیط کشت‌های مورد استفاده در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. به منظور بررسی تاثیر تیمار سرمایی بر جوانه زنی و تولید گیاه بعضی از جنین‌ها در محیط کشت‌های مربوطه به مدت دو هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. جهت تولید کالوس و جنین، نمونه‌ها در شرایط دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و شرایط تاریکی و برای تولید گیاه از جنین، جنین‌ها در شرایط نور ۲۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. داده برداری از مرحله القاء کالوس یک ماه بعد از کشت ریزنمونه (تعداد کالوس‌های جنین‌ها) تولید شده نسبت به تعداد کل ریزنمونه‌های کشت داده شده، و در مورد میزان جنین‌زایی سوماتیکی (تعداد کالوسی که جنین‌زایی کردند نسبت به تعداد کل کالوس‌ها) دو ماه بعد از انتقال به محیط جنین‌زایی و بالاخره داده برداری از گیاهان تولید شده از جنین رویشی شش هفته پس از انتقال به محیط کشت انجام شد. آنالیز داده‌ها توسط نرم افزارهای SAS/9.1.3 و MSTATC انجام شد.

نمونه‌ها مشکل جداسازی ریز نمونه در زیر بینوکولار و آسیب پذیری بالا در هنگام جداسازی بوده است. ریز نمونه جدیدی که جهت تولید جنین سوماتیکی معرفی شده است، ریز نمونه گل کامل می باشد که جداسازی این ریز نمونه کار آسانی بوده و نیاز به بینوکولار ندارد. همچنین مشخص شده است که این ریز نمونه در ارقام 110R و Muller Thurgau بهتر از ریز نمونه پرچم عمل می‌نماید (۴). زمان جمع آوری ریز نمونه یکی از عوامل مهم جهت جنین‌زایی سوماتیکی از ریز نمونه‌های پرچم و تخمدان بیان شده است (۶ و ۲۱). گریباید و همکاران (۷) شش مرحله مورفولوژیکی در رشد اندام‌های زایشی انگور را تعیین کردند که این مراحل مطابق با مراحل میکروسپوری در پرچم بود. وضعیت میکروسپرانژی در این شش مرحله به این صورت است: در مرحله اول جمع آوری ریزنمونه پرچم سولهای مادر گرده در فاز پیش میوزی اولیه، در مرحله دوم سلول‌های مادر گرده در فاز پیش میوزی تاخیری، در مرحله سوم سلول‌های گرده دیواره کالوزی دارند، در مرحله چهارم تتراد تشکیل شده است، در مرحله پنجم دیواره سلولی اولیه دانه گرده تشکیل شده است و در مرحله ششم دانه گرده آماده انتشار می باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که جمع آوری ریز نمونه پرچم در مراحل اولیه دوم و سوم باعث تولید بیشترین درصد جنین سوماتیکی شد. ویدال و همکاران (۲۲) از این مراحل رشدی برای تعیین بهترین زمان جمع آوری ریز نمونه تخمدان استفاده کردند و مشخص شد که جمع آوری ریز نمونه تخمدان در مراحل چهارم و پنجم بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی را در ارقام مورد بررسی (به غیر از رقم سلطانا) ایجاد کرد، و همچنین مشخص شد که عامل زمان جمع آوری تحت تاثیر ژنوتیپ بود. کریمی و همکاران (۱) کالوس‌های ایجاد شده از کشت ریزنمونه‌های پرچم و گل کامل انگور را در سه گروه آبکی، پودری و فشرده طبقه بندی کرده و بیان نمودند که فقط کالوس‌هایی با بافت فشرده توانایی تولید کالوس جنین‌ها را داشتند.

این تحقیق با هدف بررسی محیط کشت‌های مختلف و زمان‌های متفاوت جمع آوری ریزنمونه بر تولید جنین سوماتیکی و باززایی گیاه از ریزنمونه گل کامل در انگور ارقام شاهرودی، بیدانه سفید، یاقوتی، عسکری و فلیم سیدلس انجام شده است.

مواد و روش‌ها

گل آذین‌های ارقام انگور شاهرودی، بیدانه سفید، یاقوتی، عسکری و فلیم سیدلس که از بهترین ارقام تجاری انگور در ایران می‌باشند، از مرکز تحقیقات گروه باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج در اردیبهشت ماه ۱۳۸۹ در زمان اول (حدود ۲۰ روز قبل از باز شدن گل) و در زمان دوم (حدود ۱۲ روز قبل از باز شدن گل) جمع آوری شدند. در مرحله یک خوشه‌ها کاملاً فشرده و گلبرگ‌ها به

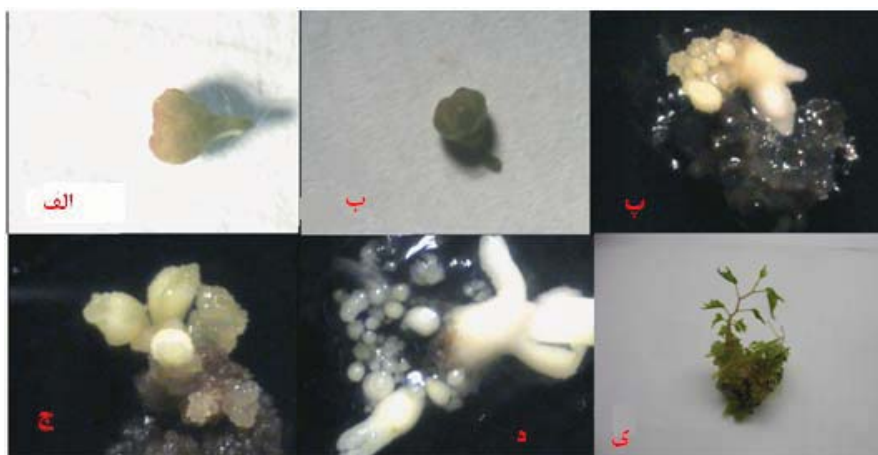
نتایج

مرحله القاء کالوس جنین زا

هفت روز پس از کشت ریزنمونه ها، کالوس زایی شروع شد. منطقه اتصال گل به دمگل ناحیه شروع تولید کالوس بود. اکثر ریزنمونه‌ها یک ماه پس از کشت تولید کالوس کردند. تفکیک کالوس های جنین زا و غیر جنین زا بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی کالوس انجام شد، بطوریکه در این آزمایش تنها کالوس‌های سفید و یا زرد رنگ که به کالوس قهوه ای تیره متصل بودند و دارای بافت دانه ای بودند (کالوس جنین زا)، در مرحله تمایز یابی جنین سوماتیکی تولید کردند (شکل ۱-پ) و تولید جنین سوماتیکی از کالوس های تیره با بافت آبکی یا کالوس های سفید با بافت بسیار فشرده (کالوس غیر جنین زا) مشاهده نشد.

در تمامی رقم‌های مورد مطالعه کالوس جنین زا ایجاد شد، اما درصد تولید این نوع کالوس به رقم، نوع محیط کشت و زمان جمع آوری ریزنمونه بستگی داشت. بیشترین درصد کالوس جنین زا در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید و کمترین درصد تولید کالوس جنین زا در ارقام عسکری و فلیم سیدلس مشاهده شد (جدول ۱).

نتایج تجزیه واریانس در این مرحله نشان داد که تولید کالوس جنین زا در انگور وابسته به ژنوتیپ می‌باشد. ارقام یاقوتی با ۱۱/۴۸ درصد و فلیم سیدلس با ۱/۵۳ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین درصد تولید کالوس جنین زا را داشتند. درصد تولید کالوس جنین زا در ارقام بیدانه سفید ۷/۴۴ درصد، شاهرودی ۵ درصد و عسکری ۱/۹۵ بود (جدول ۱). همچنین اثر زمان جمع آوری ریزنمونه گل کامل بر درصد تولید کالوس جنین زا در سطح یک درصد معنی دار شد. در همه ارقام زمان اول جمع آوری ریزنمونه گل کامل بیشترین درصد تولید کالوس جنین زا را ایجاد کرد. بیشترین درصد تولید کالوس جنین زا در رقم یاقوتی و در زمان اول جمع آوری (۱۴/۹۳ درصد) بدست آمد. همچنین ارقام بیدانه سفید و شاهرودی در زمان اول جمع آوری ریزنمونه به ترتیب ۹/۷ و ۷ درصد تولید کالوس جنین زا داشتند. کاهش در تولید کالوس جنین زا در زمان دوم جمع آوری ریزنمونه در همه ارقام مشاهده شد، بطوریکه در زمان دوم جمع آوری ریزنمونه فقط ارقام یاقوتی، بیدانه سفید و شاهرودی تولید کالوس جنین زا داشتند (جدول ۲).



شکل-۱- الف: ریزنمونه گل کامل در زمان اول جمع آوری ب: ریزنمونه گل کامل در زمان دوم جمع آوری پ: کالوس جنین زا و جنین‌های کروی تولید شده یک ماه پس از کشت ریزنمونه، ج: جنین سوماتیکی تولید شده دو ماه پس از کشت در محیط تمایزیابی، د: جنین‌های ثانویه تولید شده، ی: گیاهچه‌های انگور حاصل

جدول ۱-درصد تولید کالوس های جنین زا در پنج رقم مختلف انگور

ارقام	تعداد نمونه کاشته شده	تعداد نمونه دارای کالوس	درصد تولید کالوس جنین زا
یاقوتی	۳۰۵	۲۹۵	a۱۱/۴۸
بیدانه سفید	۳۰۹	۳۰۴	b۷/۴۴
عسکری	۳۰۸	۲۸۵	d۱/۹۵
شاهرودی	۳۰۰	۲۹۴	c۵/۰۰
فلیم سیدلس	۳۲۵	۳۱۲	e۱/۵۳

*-حروف متفاوت در ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۱درصد می باشد.

جدول ۲- اثر متقابل زمان جمع آوری ریزنمونه و ژنوتیپ بر درصد تولید کالوس جنین زا از ریزنمونه گل کامل در پنج رقم انگور

ارقام	زمان اول	زمان دوم
یاقوتی	۱۴/۹۳ a	۸/۰۴۱ c
بیدانه سفید	۹/۷۰ b	۵/۱۸ d
شاهرودی	۷/۰۰ c	۳/۰۰ e
عسکری	۳/۹۱ de	۰/۰ f
فلیم سیدلس	۳/۰۶ e	۰/۰ f

*-حروف متفاوت در کلیه ستون‌ها و ردیف‌ها نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح یک درصد می باشد.

در رقم شاهرودی ایجاد شد (جدول ۳).

تمایز جنین سوماتیکی

جنین‌های سوماتیکی ۲۰ روز پس از کشت در محیط تمایز یابی ظاهر شدند. جنین‌های تولید شده دارای سه مرحله مورفولوژیکی کروی، قلبی و اژدری شکل بودند (شکل ۱ج). ارقام یاقوتی و بیدانه سفید بیشترین و رقم فلیم سیدلس کمترین درصد تولید جنین سوماتیکی را ایجاد کردند (جدول ۴).

چهار نوع محیط کشت در مرحله تولید کالوس جنین زا مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۳). نتایج در این مرحله نشان داد که تولید کالوس جنین زا در محیط کشت‌های مختلف وابسته به ژنوتیپ می‌باشد، بطوریکه محیط کشت MS به همراه ۵ میکرومولار 2,4-D و ۱ میکرومولار BAP باعث تولید بیشترین درصد تولید کالوس جنین‌زا در ارقام یاقوتی، بیدانه سفید و فلیم سیدلس شد. در حالیکه رقم عسکری بیشترین درصد تولید کالوس جنین زا را در محیط کشت MS به همراه ۱۰ میکرومولار 2,4-D و ۲ میکرومولار BAP ایجاد کرد. از سوی دیگر در محیط کشت MS به همراه ۵ میکرومولار 2,4-D و ۲ میکرومولار BAP بیشترین درصد تولید کالوس جنین زا

جدول ۳- تاثیر تیمارهای هورمونی بکار رفته بر درصد تولید کالوس جنین زا

2,4-D (میکرومولار)		ارقام و غلظت BAP (میکرومولار)
۱۰ (میکرومولار)	۵ (میکرومولار)	
یاقوتی		
c۷/۹۵	a۱۸	میکرومولار ۱
b۱۲/۰۸	cd۷/۴۱	میکرومولار ۲
بیدانه سفید		
de۶/۲۵	b۱۲/۰۰	میکرومولار ۱
de۸/۲۵	ghi۳/۳۴	میکرومولار ۲
فلیم سیدلس		
jk۱/۱۶	hij۲/۵۰	میکرومولار ۱
ijk۱/۹۱	k۰/۵۴	میکرومولار ۲
شاهرودی		
hij۲/۵۰	ef۵/۴۱	میکرومولار ۱
f۴/۱۶	c۷/۹۱	میکرومولار ۲
عسکری		
jk۱/۳۳	hijk۲/۱۶	میکرومولار ۱
gh۳/۶۷	k۰/۶۷	میکرومولار ۲

*-حروف متفاوت در کلیه ستون‌ها و ردیف‌ها نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح یک درصد می باشد.

یاقوتی و بیدانه سفید بدست آمد. رقم فلیم سیدلس فقط در این محیط کشت جنین سوماتیکی (۱/۱۶ درصد) تولید کرد، هر چند که در این محیط کشت کمترین درصد تولید جنین نسبت به سایر محیط کشت‌ها در دیگر ارقام بدست آمد. رقم عسکری در محیط کشت MS به همراه دو میلی گرم BAP بیشترین درصد جنین سوماتیکی را تولید کرد، در حالیکه ارقام یاقوتی، بیدانه سفید و شاهرودی در این محیط کشت به ترتیب ۳/۵، ۲/۱۶ و ۱/۱۶ درصد تولید جنین سوماتیکی داشتند. کمترین درصد تولید جنین سوماتیکی در ارقام یاقوتی، شاهرودی و بیدانه سفید در محیط کشت MS به همراه پنج میکرومولار 2,4-D و یک میکرومولار BAP و محیط کشت MS به همراه دو میلی گرم BAP بدست آمد. در این محیط کشت تولید جنین سوماتیکی در رقم فلیم سیدلس مشاهده نشد. همچنین اثر زمان جمع آوری ریزنمونه بر روی تولید جنین سوماتیکی در سطح یک درصد معنی دار شد. بطوریکه زمان اول جمع آوری ریزنمونه گل کامل در تمامی ارقام مورد مطالعه و در تمامی محیط کشت‌ها بهتر از زمان دوم جمع آوری ریزنمونه گل کامل بود و بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی را نسبت به زمان دوم ایجاد کرد. ارقام فلیم سیدلس و عسکری در زمان دوم جمع آوری ریزنمونه جنین سوماتیکی تولید نکردند (جدول ۴).

تولید جنین ثانویه

جنین‌های جدا شده از کالوس در محیط کشت MS بدون هورمون کشت و پس از یک ماه تولید جنین‌های ثانویه نمودند. تعداد جنین ثانویه تولید شده برای هر رقم متغیر بود. رقم یاقوتی بیشترین تولید جنین ثانویه و رقم فلیم سیدلس کمترین تولید جنین ثانویه را داشت. میانگین تولید جنین ثانویه در رقم یاقوتی به ازای هر جنین ۵۰، در رقم بیدانه سفید ۴۰، در رقم شاهرودی ۳۰، در رقم عسکری ۱۵ و در رقم فلیم سیدلس ۱۰ بود (شکل ۱-د).

چهار هفته پس از کشت در برخی از کالوس‌هایی که در محیط کشت MS به همراه ۵ میکرومولار 2,4-D و ۱ میکرومولار BAP قرار داشتند، جنین‌های کروی مشاهده شد (شکل پ ۱).

نتایج در این مرحله نشان داد که تولید جنین سوماتیکی به نوع رقم، محیط کشت و زمان جمع آوری ریزنمونه بستگی داشت. در مرحله تمایز یابی پنج نوع محیط کشت مختلف مقایسه گردید. در تمام محیط کشت‌ها جنین سوماتیکی ایجاد شد، با این حال میزان تولید جنین سوماتیکی به ژنوتیپ و زمان نمونه برداری بستگی داشت. تولید جنین سوماتیکی در محیط کشت MS به همراه ۰/۵ میلی گرم IBA در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید نسبتاً بیشتر بود، بطوریکه در رقم یاقوتی بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی (۱۰/۸۳ درصد) در این محیط کشت مشاهده شد. ارقام بیدانه سفید، شاهرودی و عسکری به ترتیب ۶/۳۳، ۳/۶۶ و ۲/۵ درصد در این محیط کشت تولید جنین داشتند. در این محیط کشت در رقم فلیم سیدلس جنین سوماتیکی تولید نشد. همچنین تولید جنین سوماتیکی در تمامی ارقام مورد مطالعه (به غیر از رقم فلیم سیدلس) از کالوس‌های منشاء گرفته از ریزنمونه‌هایی که در زمان اول جمع آوری شده بودند، در مقایسه با زمان دوم بیشتر بود. رقم بیدانه سفید در محیط کشت MS به همراه ۲ میلی گرم IBA و ۰/۲ میلی گرم BAP بیشترین درصد تولید سوماتیکی را تولید کرد (۸ درصد). ارقام یاقوتی، شاهرودی و عسکری در این محیط کشت به ترتیب ۶/۳۴، ۴/۳۴ و ۱/۵ درصد تولید جنین سوماتیکی داشتند. رقم فلیم سیدلس در این محیط کشت جنین سوماتیکی تولید نکرد. در محیط کشت MS بدون هورمون بیشترین جنین سوماتیکی در رقم شاهرودی ایجاد شد (۸/۵ درصد).

ارقام یاقوتی، بیدانه سفید و عسکری در این محیط کشت به ترتیب ۴/۸۴، ۳/۶۷ و ۲ درصد تولید جنین سوماتیکی داشتند. همچنین در این محیط کشت در رقم فلیم سیدلس جنین ایجاد نشد. از سوی دیگر در محیط کشت MS به همراه ۵ میکرومولار 2,4-D و ۱ میکرومولار BAP بیشترین تولید جنین سوماتیکی در ارقام

جدول ۴- تاثیر زمان جمع آوری ریزنمونه گل کامل و نوع محیط کشت بر درصد تولید جنین سوماتیکی در پنج رقم انگور

MS _e		MS _d		MS _c		MS _b		MS _a		ارقام
T ₂	T ₁	T ₂	T ₁	T ₂	T ₁	T ₂	T ₁	T ₂	T ₁	
c۲	b۵	b۲	a ۵	de۴	b۸/۶۷	cde۳/۳۴	b۶/۳۴	bc۷	a۱۴/۶۷	یاقوتی
cd۱/۳۴	c۳/۰۰	b۱/۳۳	a۴/۰۰	cd۵	a۱۱	ef۴/۴۲	bcd۵/۰۰	d۴/۶۷	b۸/۰۰	بیدانه سفید
d۰/۰	d۰/۰	c۰/۰	b۲/۳۳	f۰/۰	f۰/۰	f۰/۰	f۰/۰	f۰/۰	f۰/۰	فلیم سیدلس
d۰/۰	c۲/۳۳	c۰/۰	b۲	e۲/۳۴	c۶/۳۴	bc۵/۳۴	a۱۱/۶۷	e۲/۳۴	cd۵/۰۰	شاهرودی
d۰/۰	a۸/۰۰	c۰/۰	b۲/۳۳	f۰/۰	de۳/۰۰	f۰/۰	def۴/۰۰	f۰/۰	cd۴/۵۰	عسکری

*MSa: محیط کشت MS به همراه ۰/۵ میلی گرم IBA، MSb: محیط کشت MS بدون هورمون، MS_c: محیط کشت MS به همراه دو میلی گرم IBA و ۰/۲ میلی گرم BAP، MS_d: محیط کشت MS به همراه ۵ میکرومولار 2,4-D و ۱ میکرومولار BAP، MS_e: محیط کشت MS به همراه دو میلی گرم در لیتر BAP، T₁ زمان اول جمع آوری و T₂ زمان دوم جمع آوری ریزنمونه گل کامل می‌باشد. حروف متفاوت در کلیه ستون‌ها و ردیف‌ها نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۱درصد می باشد.

جوانه زنی جنین‌ها و تولید گیاهچه

بحث

نتایج آزمایشات نشان داد که جمع آوری ریزنمونه گل کامل در زمان اول بیشترین درصد تولید کالوس جنین‌ها و جنین‌سوماتیکی را در ارقام مورد مطالعه ایجاد کرد که مطابق با یافته‌های گریبایدو و همکاران (۷) که بیان نمودند جمع آوری ریزنمونه پرچم در مراحل اولیه یک تا سه بیشترین جنین‌سوماتیکی را در ارقام گونه وینیفرا ایجاد کرد، می‌باشد. از سوی دیگر با یافته‌های ویدال و همکاران (۲۲) که بیان نمودند جمع آوری ریزنمونه تخمدان در مراحل چهارم و پنجم بیشترین جنین‌سوماتیکی را در ارقام مورد مطالعه آنها ایجاد کرد، متضاد است. که احتمالاً بدلیل متفاوت بودن نوع ریزنمونه است. میزان جنین‌سوماتیکی تولید شده در این تحقیق با مقادیر گزارش شده توسط گامبینو و همکاران (۴) که از ریزنمونه گل کامل برای تولید جنین‌سوماتیکی استفاده کرده‌اند، تقریباً مشابه است. در این تحقیق تولید جنین‌سوماتیکی طی دو ماه اتفاق افتاد، در حالیکه در تحقیق گامبینو و همکاران (۴) سه ماه طول کشید که احتمالاً می‌تواند به شرایط مناسب کشت در این تحقیق و نوع ژنوتیپ مرتبط باشد. از سوی دیگر در این تحقیق مشخص شد که پاسخ به انواع محیط کشت جهت تولید کالوس جنین‌ها و جنین‌سوماتیکی به ژنوتیپ بستگی دارد، که این یافته مطابق با یافته‌های اولاهه و همکاران (۱۵) می‌باشد. همچنین این تحقیق گزارش گامبینو و همکاران (۴) مبنی بر موثر بودن ریزنمونه گل کامل برای تولید کالوس جنین‌ها و جنین‌سوماتیکی را تصدیق کرد.

ارقام یاقوتی، بیدانه سفید و شاهرودی در محیط کشت MS به همراه یک میلی‌گرم BAP و بدون سرمادهی بیشترین جوانه زنی و تولید گیاهچه را داشتند. در حالیکه ارقام فلیم سیدلس و عسکری در محیط کشت MS به همراه یک میلی‌گرم BAP همراه با سرمادهی جنین‌ها، بیشترین تعداد جنین‌های جوانه زده و تولید گیاهچه را داشتند (جدول ۵). برای جوانه زنی جنین و تولید گیاهچه محیط کشت NN به همراه سرمادهی جنین برای ارقام عسکری و فلیم سیدلس موثرتر از سایر ارقام بود. جنین‌های سایر ارقام هر چند در این محیط کشت جوانه زدند، اما پس از مدتی تولید گیاهچه غیر نرمال کردند، بطوریکه مشکلاتی از لحاظ توسعه ریشه و شاخساره داشتند و رشد این گیاهچه‌ها پس از مدتی متوقف شد. بعضی از جنین‌های ارقام یاقوتی، بیدانه سفید و شاهرودی که تیمار سرمایی بر روی آنها اعمال شده بود، زمانی که به شرایط استاندارد منتقل شدند، شروع به تولید کالوس (برگشت از حالت جنینی) کردند. تولید کالوس در جنین‌هایی که تیمار سرمایی بر روی آنها اعمال نشده بود به مراتب کمتر از جنین‌هایی بود که تیمار سرمایی بر روی آنها اعمال شده بود. تولید کالوس توسط جنین در ارقام عسکری و فلیم سیدلس به میزان خیلی کم مشاهده شد. از لحاظ درصد جوانه زنی و تولید گیاه تفاوت معنی‌داری بین ارقام مورد مطالعه (به استثناء بیدانه سفید) مشاهده نشد.

جدول ۵- تاثیر محیط کشت و تیمار خوسرمایی بر روی درصد جوانه زنی و تولید گیاه در پنج رقم انگور (*V. vinifera*)

بدون سرمادهی	سرمادهی شده	ژنوتیپ و محیط کشت
		یاقوتی
a60/66	cd32/33	MS
c33/67	gh16	NN
		بیدانه سفید
a55/67	de26/67	MS
efg22/34	h15/34	NN
		شاهرودی
a58/67	c34	MS
c34/67	fgh17	NN
		فلیم سیدلس
c34/34	b45/67	MS
ef23/00	c27/00	NN
		عسکری
c34/00	b48/00	MS
de25/67	c27/00	NN

*-حروف متفاوت در کلیه ستون‌ها و ردیف‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱ درصد می‌باشد.

مشخص شد که ارقام یاقوتی، شاهرودی و بیدانه سفید در محیط کشت MS به همراه ۱ میلی گرم BAP بدون تیمار سرمایی و ارقام فلیم سیدلس و عسکری در همین محیط کشت ولی با تیمار سرمایی بیشترین تعداد گیاهچه را تولید کردند. این تفاوت در پاسخ به تیمار سرمایی در ارقام مختلف ممکن است مربوط به شرایط فیزیولوژیکی متفاوت هر رقم باشد. از سوی دیگر در محیط کشت NN بدون هورمون جنین‌های ارقام یاقوتی، شاهرودی و بیدانه سفید تولید گیاهچه‌های غیر طبیعی کردند، که رشد این گیاهچه‌ها در مراحل بعدی متوقف شد. این حالت در ارقام فلیم سیدلس و عسکری در این محیط کشت به مراتب کمتر مشاهده شد. همچنین در این تحقیق موثر بودن محیط کشت MS به همراه یک میلی گرم BAP جهت جوانه زنی و تولید گیاهچه در انگور مشخص شد. در نهایت این تحقیق دستورالعمل مناسبی را برای تولید جنین سوماتیکی و باززایی گیاه از ریزنمونه گل کامل در ارقام شاهرودی، بیدانه سفید، یاقوتی، عسکری و فلیم سیدلس بیان می‌کند که می‌توان از این دستورالعمل برای اهداف انتقال ژن، بررسی تنوع سوماکلونال و سایر اهداف استفاده کرد، با این حال برای بالا بردن بازدهی تولید جنین سوماتیکی و بررسی امکان تولید جنین سوماتیکی از این ریزنمونه در سایر ارقام انگور نیاز به تحقیقات بیشتری است.

احتمال تراریخت شدن سلول‌های جنین در کار انتقال ژن بسیار پایین می‌باشد، تولید جنین ثانویه به منظور بالا بردن بازدهی کار انتقال ژن از ضروریات است. تعداد جنین سوماتیکی تولید شده به ازای هر کالوس در این ریزنمونه کم بود (تقریباً به ازای هر کالوس شش جنین)، به منظور بر طرف کردن این مشکل دستورالعملی برای تولید جنین ثانویه از جنین‌های اولیه در این تحقیق ابداع شد. نتایج نشان داد که محیط کشت MS بدون هورمون نه تنها یک محیط کشت مناسب برای تمایز جنین سوماتیکی می‌باشد، بلکه می‌توان برای تولید جنین ثانویه نیز از آن استفاده نمود. در آزمایش حاضر تولید جنین‌های ثانویه بدون تولید کالوس بدست آمد، که بر خلاف گزارش مارتینلی و همکاران (۱۲) که بیان نمودند که یک ماه بعد از کشت جنین، به مقدار خیلی زیادی کالوس ایجاد شد، می‌باشد. احتمالاً به این خاطر است که محیط کشت تولید جنین‌های ثانویه در این آزمایش فاقد هورمون بود. همچنین این اولین گزارش تولید گیاهچه از جنین‌های بدست آمده از ریزنمونه گل کامل می‌باشد، چرا که در تحقیق گامینو و همکاران (۴) تولید گیاه گزارش نشد. جنین‌های ارقام یاقوتی، شاهرودی و بیدانه سفید بعد از تیمار سرمایی هنگامی که به شرایط استاندارد منتقل شدند، برگشت از حالت جنینی (تولید کالوس) نشان دادند، که احتمالاً بدلیل به هم خوردن نسبت هورمون‌های درونی جنین‌ها طی سرمادهی باشد. در این تحقیق

منابع

- ۱- کریمی م. (استاد راهنما: علی عبادی، استاد مشاور: منصور امیدی)، ۱۳۸۷، بررسی روش‌های تولید کالوس جنین زا در انگور. ۷۸ صفحه.
- 2- 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.
- 3- Franks T., Botta R.M., and Thomas R. 2002. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.* 104:397-404.
- 4- Gambino G., Bondaz J., and Gribaudo I. 2006. Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlet of grapevine. *Eur. J. Plant Pathol.* 114:397-404.
- 5- 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 Cult.* 90: 79-83.
- 6- Gary D.J., and Compton M.E. 1993. Grape somatic embryo dormancy and quiescence: Potential of dehydrated synthetic seeds for germplasm conservation. In: Redenbaugh K(ed) *Synseeds, Application of Synthetic Seeds to Crop Improvement.* CRC Press Inc, Boca Raton, pp 367-379.
- 7- Gribaudo I., Gambino G., and Vallania R. 2004. Somatic embryogenesis from grapevine anther: identification of the optimal developmental stage for collecting explants. *Am. J. Enol. Vitic.* 55: 427-430.
- 8- Gresshoff P.M., and Doy C.H. 1974. Derivation of haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of mitotic development of anther for haploid culture of this and other genera. *ZPflanzenphysiol* 73:123-141.
- 9- Kikker J.R., Striem M.J., Vidal J.R., Wallace P., Barnard G., and Reisch B.I. 2005. Long-term study of somatic embryogenesis from anthers and ovaries of 12 grapevine (*Vitis sp*) genotypes In vitro. *Cell Dev Biol-Plant* 41: 232-239.
- 10- Kuksova V.B., Piven N.M., and Gleba Yu. 1997. Somaclonal variation and in vitro induced mutagenesis in grapevine. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 49:17-27.
- 11- Lopez-perez A., Carreno J., Martinez J.A., and Dabauza M. 2005. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. *Vitis* 44: 79-85.
- 12- Martinelli L., Candioli E., Costa D., Poletti V., and Rascio N. 2001. Morphogenic competence of *Vitis rupestris* S.

- secondary somatic embryos with a long culture history. *Plant Cell Rep.* 20:279-284.
- 13- Mauro M., Nef C.L., and Fallot J. 1986. Simulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. *Plant Cell Report* 5: 377-380.
 - 14- Mullins M.G., and Srinivasan C. 1976 Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv *Cabernet Sauvignon*) by apomoxis in vitro. *J Exp. Bot.* 27:1002-1030.
 - 15- Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15:473-497.
 - 16- Olahe R., Zok A., Andrezej P., Sussane H., Laszlo G., and Kovacs G. 2008. Somatic embryogenesis in broad spectrum of grapevine genotypes. *Scientia horticulture.* 120:134-137.
 - 17- Perrin M., Martin D., Joly D., Demangeat G., This P., and Masson J.E. 2001. Medium-dependent response of grapevine somatic embryogenic cells. *Plant Sci.* 161: 107-116.
 - 18- Perrin M., Gertz C., and Masson J.E. 2004. High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19-grapevine genotypes grown world wide. *Plant Sci.* 167: 1343-1349.
 - 19- Salunkhe C.K., Rao P.S., and Mhatre M. 1999. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in anther callus of *Vitis latifolia* L. *Plant Cell Rep.* 18:670-673.
 - 20- 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.
 - 21- Steward F.C. 1958. Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. *Am. J. Bot.* 45: 709-713.
 - 22- Vidal J.R., Rama J., Taboada L., Martin C., Ibanez M., Segura A., and Gonzales- Benito E. 2009. Improved somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera*) with a focus on induction parameters and efficient plant regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 96:85-94.