نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰ ، ص. ۴۲۴-۴۱۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 25, No. 4, Winter 2012, P. 417-424
ISSN: 2008 - 4730

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

علی عبادی[1*]- امیرجمال محمود[2]- مسعود میرمعصومی[3]- منصور امیدی[4]

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 جنین زا و جنین سوماتیکی در دو زمان مختلف جمع آوری شدند. برای تولید کالوس جنین زا 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 بدون هورمون، محیط کشت MS به همراه ۲میلی گرم IBA و ۰/۲ میلی گرم BAP، محیط کشت MS به همراه پنج میکرومولار 2,4-D و یک میکرومولارBAP 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 جنین زا و جنین سوماتیکی بیشتری در همه ارقام مورد مطالعه ایجاد کردند. پاسخ گیاهان به محیط کشت برای تولید کالوس جنین زا تحت تاثیر رقم قرار گرفت، بطوریکه ارقام بیدانه سفید، یاقوتی و فلیم سیدلس بیشترین درصد تولید کالوس جنین زا 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 جنین زا را ایجاد کردند. پاسخ گیاهان به محیط کشت در مرحله تمایز یابی به ژنوتیپ بستگی داشت، بطوریکه هر رقم در محیط کشت ویژه ای 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 جنین زا، جنین سوماتیکی، گیاهچه

مقدمه

جنین زایی سوماتیکی فرایندی است که در آن سلول‌های رویشی به جنین شبیه با جنین زایگوتی توسعه پیدا می کنند. 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 سوماتیکی در انگور که قادر به جوانه زنی و تولید گیاه بود توسط مالینز و سیرینواسان (۱۴) گزارش شد. مهترین مزیت جنین زایی 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 ۱۷)، نوع ریز نمونه و زمان جمع آوری آن (۶ و ۲۱)، محیط کشت (۱۶) قرار می گیرد. هر چند که گزارش هایی 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

۱و۲- 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

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 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 جنین زایی 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 چهار 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 کالوس هایی با بافت فشرده توانایی تولید کالوس جنین زا 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 روش ها

گل آذین‌های ارقام انگور شاهرودی، بیدانه سفید، یاقوتی، عسکری و فلیم سیدلس که از مهترین 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 کاملا فشرده و گلبرگها به 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 نمونه ها، ابتدا گل آذین‌ها کاملا شستشو و سپس در داخل الکل ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه قرار داده شدند. بعد از تیمار با الکل نمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل مورد شستشو و پس از انتقال به محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه نهایتا سه بار دیگر با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. ریز نمونه های گل کامل در زیر هود لامینار کاملا 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 کاملا 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 کالوس های بدست آمده به محیط تمایز جنین منتقل شدند. جهت تمایز جنین از محیط کشت های 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 BAPو محیط کشت MS به همراه ۲میلی 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 جنین زا تولید شده نسبت به تعداد کل ریزنمونه‌های کشت داده شده)، و در مورد میزان جنین زایی سوماتیکی (تعداد کالوسی که جنین زایی کردند نسبت به تعداد کل کالوس ها) دو ماه بعد از انتقال به محیط جنین زایی 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.

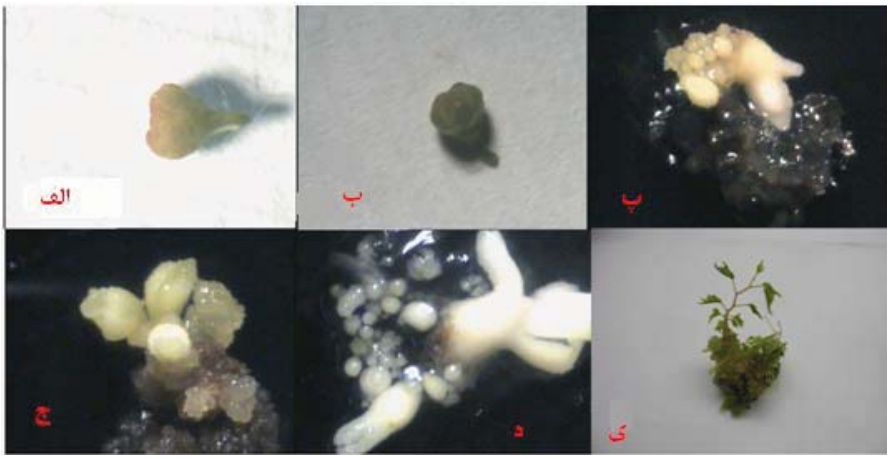
نتایج

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 (جدول۲).



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 ازکشت در محیط تمایزیابی، د: جنین‌های ثانویه تولید شده، ی: گیاهچه‌های انگور حاصل

جدول۱–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.

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 ۱۰میکرومولار 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 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).

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

ارقام و غلظت BAP (میکرومولار)	2,4-D (میکرومولار)	
	(میکرومولار) ۵	(میکرومولار) ۱۰
یاقوتی		
میکرومولار۱	a۱۸	c۷/۹۵
میکرومولار۲	cd۷/۴۱	b۱۲/۰۸
بیدانه سفید		
میکرومولار۱	b۱۲/۰۰	de۶/۲۵
میکرومولار۲	ghi۳/۳۴	de۸/۲۵
فلیم سیدلس		
میکرومولار۱	hij۲/۵۰	jk۱/۱۶
میکرومولار۲	k۰/۵۴	ijk۱/۹۱
شاهرودی		
میکرومولار۱	ef۵/۴۱	hij۲/۵۰
میکرومولار۲	c۷/۹۱	f۴/۱۶
عسکری		
میکرومولار۱	hijk۲/۱۶	jk۱/۳۳
میکرومولار۲	k۰/۶۷	gh۳/۶۷

*-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.

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

نتایج در این مرحله نشان داد که تولید جنین سـوماتیکی بـه نـوع رقم، محیط کشت و زمـان جمـع آوری ریزنمونـه بـستگی داشـت. در مرحله تمایز یابی پنج نوع محیط کـشت مختلـف مقایـسه گردیـد. در تمام محیط کشت‌ها جنین سوماتیکی ایجاد شد، بـا ایـن حـال میـزان تولید جنین سوماتیکی به ژنوتیپ و زمان نمونه برداری بستگی داشت. تولید جنین سوماتیکی در محیط کشت MS به همراه ۰/۵ میلی گـرم IBA در ارقام یاقوتی و بیدانه سفید نسبتا بیشتر بود، بطوریکه در رقم یاقوتی بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی(۱۰/۸۳ درصـد) در ایـن محیط کشت مشاهده شد. ارقام بیدانه سفید، شاهرودی و عسکری بـه ترتیب ۶/۳۳، ۳/۶۶ و ۲/۵ درصد در این محـیط کـشت تولیـد جنـین داشتند. در این محیط کشت در رقم فلیم سـیدلس جنـین سـوماتیکی تولید نشد. همچنین تولیـد جنـین سـوماتیکی در تمـامی ارقـام مـورد مطالعه (به غیر از رقم فلیم سیدلس) از کالوس‌هـای منـشاء گرفتـه از ریز نمونه هایی که در زمان اول جمع آوری شده بودند، در مقایسه بـا زمان دوم بیشتر بود. رقم بیدانه سفید در محیط کشت MS به همـراه ۲ میلی گرم IBA و ۰/۲ میلـی گـرم BAP بیـشترین درصـد تولیـد 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 تولیـد جنـین سوماتیکی داشتند. رقم فلـیم سـیدلس در ایـن محـیط کـشت جنـین سوماتیکی تولید نکرد. در محیط کشت MS بدون هورمون بیـشترین جنین سوماتیکی در رقم شاهرودی ایجاد شد (۸/۵ درصد).

ارقام یاقوتی، بیدانه سفید و عـسکری در ایـن محـیط کـشت بـه ترتیـب ۴/۸۴، ۳/۶۷ و ۲ درصـد تولیـد جنـین سـوماتیکی داشـتند. همچنین در این محیط کشت در رقم فلیم سیدلس جنین ایجاد نـشد. از سوی دیگر در محیط کشت MS به همراه ۵ میکرومـولار 2,4-D و ۱ میکرومـولار BAP بیـشترین تولیـد جنـین سـوماتیکی در ارقـام یاقوتی و بیدانه سفید بدست آمد. رقم فلیم سیدلس فقط در این محیط کشت جنین سوماتیکی (۱/۱۶ درصد) تولید کرد، هر چند کـه در ایـن محیط کشت کمتـرین درصـد تولیـد جنـین نـسبت بـه سـایر محـیط کشت‌ها در دیگر ارقام بدست آمد. رقم عسکری در محیط کشت MS به همراه دو میلی گرم BAP بیـشترین درصـد جنـین سـوماتیکی را تولید کرد، در حالیکه ارقام یاقوتی، بیدانه سـفید و شـاهرودی در ایـن محـیط کـشت بـه ترتیـب ۳/۵، ۲/۱۶ و ۱/۱۶ درصـد تولیـد جنـین سوماتیکی داشتند. کمترین درصـد تولیـد جنـین سـوماتیکی در ارقـام یاقوتی، شاهرودی و بیدانه سفید در محیط کشت MS به همراه پـنج میکرومولار 2,4-D و یک میکرومولار BAP و محـیط کـشت MS به همراه دو میلی گرم BAP بدست آمد. در این محیط کـشت تولیـد جنین سوماتیکی در رقم فلیم سیدلس مشاهده نشد. همچنین اثر زمان جمع آوری ریزنمونه بر روی تولیـد جنـین سـوماتیکی در سـطح یـک درصد معنی دار شد. بطوریکـه زمـان اول جمـع آوری ریزنمونـه گـل کامل در تمامی ارقام مورد مطالعه و در تمامی محیط کشت‌ها بهتـر از زمان دوم جمع آوری ریزنمونه گل کامل بود و بیشترین درصـد تولیـد جنین سوماتیکی را نسبت به زمان دوم ایجاد کرد. ارقام فلیم سـیدلس و عسکری در زمان دوم جمع آوری ریزنمونه جنین سـوماتیکی تولیـد نکردند (جدول ۴).

تولید جنین ثانویه

جنین‌هـای جـدا شـده از کـالوس در محـیط کـشت MS بـدون هورمون کشت و پس از یک ماه تولید جنین‌های ثانویه نمودند. تعـداد جنین ثانویه تولید شده برای هر رقم متغیر بود. رقم یـاقوتی بیـشترین تولید جنین ثانویه و رقم فلیم سیدلس کمترین تولیـد جنـین ثانویـه را داشت. میانگین تولید جنین ثانویه در رقم یاقوتی بـه ازای هـر جنـین ۵۰، در رقم بیدانه سفید ۴۰، در رقم شاهرودی ۳۰، در رقـم عـسکری ۱۵ و در رقم فلیم سیدلس ۱۰ بود (شکل۱-د).

جدول ٤- تاثیر زمان جمع آوری ریزنمونه گل کامل و نوع محیط کشت بر درصد تولید جنین سوماتیکی در پنج رقم انگور

	MS_a		MS_b		MS_c		MS_d		MS_e	
ارقام	T_1	T_2	T_1	T_2	T_1	T_2	T_1	T_2	T_1	T_2
یاقوتی	a۱۴/۶۷	bc۷	b۶/۳۴	cde۳/۳۴	b۸/۶۷	de۴	a ۵	b۲	b۵	c۲
بیدانه سفید	b۸/۰۰	d۴/۶۷	bcd۵/۰۰	ef۳/۴۲	a۱۱	cd۵	a۴/۰۰	b۱/۳۳	c۳/۰۰	cd۱/۳۴
فلیم سیدلس	f۰/۰	f۰/۰	f۰/۰	f۰/۰	f۰/۰	f۰/۰	b۲/۳۳	c۰/۰	d۰/۰	d۰/۰
شاهرودی	cd۵/۰۰	e۲/۳۴	a۱۱/۶۷	bc۵/۳۴	c۶/۳۴	e۲/۳۴	b۲	c۰/۰	c۲/۳۳	d۰/۰
عسکری	cd۴/۵۰	f۰/۰	def۳/۰۰	f۰/۰	de۳/۰۰	f۰/۰	b۲/۳۳	c۰/۰	a۸/۰۰	d۰/۰

*-MSa: محیط کشت MS به همراه ۰/۵ میلی گرم IBA، MSb: محیط کشت MS بدون هورمون، MSc: محیط کشت MS به همراه دو میلی گرم IBA و ۰/۲ میلی گرم BAP، MSd: محیط کشت MS به همراه ۵ میکرو مولار 2,4-D و ۱ میکرومولار BAP، MSe: محیط کشت MS به همراه دو میلی گرم در لیتر BAP. T_1 زمان اول جمع آوری و T_2 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

ارقام یاقوتی، بیدانه سفید وشاهرودی در محیط کشت MS به همراه یک میلی گرم 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 میلی گرم BAP همراه با سرمادهی جنین ها، 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 جنین هایی که تیمار سرمایی بر روی آنها اعمال نشده بود به مراتب کمتر از جنین هایی 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 معنی داری بین ارقام مورد مطالعه (به استثناء بیدانه سفید) مشاهده نشد.

بحث

نتایج آزمایشات نشان داد که جمع آوری ریزنمونه گل کامل در زمان اول بیشترین درصد تولید کالوس جنین زا و جنین سوماتیکی را در ارقام مورد مطالعه ایجاد کرد که مطابق با یافته‌های گریبایدو و همکاران (۷) که بیان نمودند جمع آوری ریز نمونه پرچم در مراحل اولیه یک تا سه بیشترین جنین سوماتیکی را در ارقام گونه وینیفرا ایجاد کرد، می باشد. از سوی دیگر با یافته‌های ویدال و همکاران (۲۲) که بیان نمودند جمع آوری ریزنمونه تخمدان در مراحل چهارم و پنجم بیشترین جنین سوماتیکی را در ارقام مورد مطالعه آنها ایجاد کرد، متضاد است. که احتمالا بدلیل متفاوت بودن نوع ریزنمونه است. میزان جنین سوماتیکی تولید شده در این تحقیق با مقادیر گزارش شده توسط گامبینو و همکاران (۴) که از ریزنمونه گل کامل برای تولید جنین سوماتیکی استفاده کرده اند، تقریبا مشابه است. در این تحقیق تولید جنین سوماتیکی طی دو ماه اتفاق افتاد، در حالیکه در تحقیق گامبینو و همکاران (۴) سه ماه طول کشید که احتمالا 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 جنین زا و جنین سوماتیکی به ژنوتیپ بستگی دارد، که این یافته مطابق با یافته‌های اولاهه و همکاران (۱۵) می باشد. همچنین این تحقیق گزارش گامبینو و همکاران (۴) مبنی بر موثر بودن ریزنمونه گل کامل برای تولید کالوس جنین زا و جنین سوماتیکی را تصدیق کرد.

جدول۵- تاثیر محیط کشت و تیمار خوسرمایی بر روی درصد جوانه زنی و تولید گیاه در پنج رقم انگور (*V. vinifera*)

ژنوتیپ و محیط کشت	سرمادهی شده	بدون سرمادهی
یاقوتی		
MS	cd۳۲/۳۳	a۶۰/۶۶
NN	gh۱۶	c۳۳/۶۷
بیدانه سفید		
MS	de۲۶/۶۷	a۵۵/۶۷
NN	h۱۵/۳۴	efg۲۲/۳۴
شاهرودی		
MS	c۳۴	a۵۸/۶۷
NN	fgh۱۷	c۳۴/۶۷
فلیم سیدلس		
MS	b۴۵/۶۷	c۳۴/۳۴
NN	c۳۷/۰۰	ef۲۳/۰۰
عسکری		
MS	b۴۸/۰۰	c۳۴/۰۰
NN	c۳۷/۰۰	de۲۵/۶۷

*-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.

احتمال تراریخت شدن سلول‌های جنین در کار انتقال ژن بسیار پایین می باشد، 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 (تقریبا 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 می باشد، بلکه می توان 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، می باشد. احتمالا 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 می باشد، چرا که در تحقیق گامبینو 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 احتمالا بدلیل به هم خوردن نسبت هورمون‌های درونی جنین‌ها طی سرمادهی باشد. در این تحقیق 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 می کند که می توان 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.

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- Gribaubo I., Gambino G., and Vallania R. 2004. Somatic embryogenesis from grapevine anther: identification of the optimal developmental stage for collceting 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 miotic 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.