

بررسی اثر پیش تیمار پوتریسین و سایکوسل بر میزان موفقیت تکنیک نجات جنین در تلاقی های دای آلل ارقام بی دانه انگور فلیم سیدلس، پرلت و یاقوتی

مصطفی عالی فرا^۱، علی عبادی^{۲*} و محمدرضا فتاحی مقدم^۳

۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۱۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۳/۲۱)

چکیده

انگورهای بی دانه به طور گسترده در سراسر جهان کشت می شوند. استفاده از تکنیک نجات جنین در برنامه های به نژادی انگورهای بی دانه، توانسته است بر مشکلات حاصل از روش های به نژادی سنتی غلبه کند. از آنجاکه کارایی این تکنیک در سطح مطلوب نیست بنابراین، تلاش های زیادی در جهات مختلف به منظور ارتقا و بهبود این تکنیک توسط پژوهشگران انجام گرفته است. این پژوهش به صورت دو آزمایش جداگانه انجام گرفت و در هر دو آزمایش از سه رقم یاقوتی، فلیم سیدلس و پرلت به منزله والدین مادری و پدری استفاده شد. خوشه ها در زمان دو هفته قبل از شکوفایی با غلظت های مختلف سایکوسل و پوتریسین محلول پاشی شدند. تخمک ها ۴۵ روز پس از گرده افشانی از حبه ها خارج و در محیط کشت NN تکمیل شده با ۳ درصد ساکارز، ۰/۲ درصد زغال فعال و ۰/۶ درصد آگار کشت شدند. پس از گذشت ۱۰ هفته، جنین ها از تخمک ها خارج و به محیط کشت MS تکمیل شده با ۲/۵ درصد ساکارز، ۰/۲ درصد زغال فعال و ۰/۷ درصد آگار منتقل شدند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که نوع ژنوتیپ والد مادری و پدری و نیز استفاده از پیش تیمار پوتریسین و سایکوسل تأثیر مثبت و معناداری بر درصد تکامل آندوسپرم، رشد و جوانه زنی جنین ها و درصد گیاهچه های تولیدی داشت. استفاده از رقم پرلت به منزله والد مادری و رقم یاقوتی به منزله والد پدری و پیش تیمارهای سایکوسل و پوتریسین به ترتیب با غلظت ۱۰۰ و ۳۰ میلی گرم در لیتر سبب افزایش درصد صفات مورد بررسی شد.

واژه های کلیدی: آندوسپرم و جنین، تخمک، محیط کشت.

مقدمه

به دلیل ویژگی های خاص میوه و تولید محصول زیاد از ارقام مهم در برنامه های به نژادی محسوب می شوند. همچنین رقم یاقوتی یکی از ارقام مهم و بی دانه ایرانی است که علاوه بر داشتن خصوصیات کیفی مطلوب، جزء ارقام بسیار زودرس به حساب می آید. در برنامه های به نژادی انگور، دستیابی به ارقام بی دانه جدید با کمیت و کیفیت بالا و همچنین داشتن حبه های درشت از اهداف مهم به منظور پاسخ گویی به

انگورهای بی دانه به طور گسترده برای مصارف تازه خوری و تهیه کشمش در آسیا، اروپا و آمریکا کشت می شوند (Tang et al., 2009). امروزه مصرف کنندگان انگور برای مصارف تازه خوری و کشمش، انگورهای بی دانه را ترجیح می دهند (Tian et al., 2008). ارقام فلیم سیدلس (Flame seedless) و پرلت (Perlette) از ارقام مهم و تجاری انگورهای رومی می هستند که

پژوهشگران مختلف ترکیبات ضد جیبرلینی مختلفی را به منظور افزایش تشکیل حبه در واریته‌های بذردار و بی‌بذر انگور و نیز تحریک توسعه بذر در انگوره‌های استنواسپرموکارپ به کار برده‌اند (Pool *et al.*, 1982; Ledbetter & Shonnard, 1991; Bordelon *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 2009).

سایکوسل با نام شیمیایی کلرمکوات کلراید یکی از مشتقات کولین است که از واکنش تری متیل-آمین و یک آلفاتیک هالید به نام ۱ و ۲-کلرواتان، تولید می‌شود (Emam *et al.*, 1996). سایکوسل ترکیبی ضد جیبرلین است که از چرخه ترانس-ژرانیل پیروفسفات در مسیر مولونیک اسید جلوگیری می‌کند و از این طریق منجر به کاهش میزان پیش‌ماده کورن برای سنتز اسید جیبرلیک می‌شود و در نهایت موجبات کاهش میزان تولید جیبرلین در گیاه را فراهم می‌کند (De *et al.*, 1982; Davis & Curry, 1991).

پلی‌آمین‌ها^۱ فاکتورهای کلیدی در دوره ریخت‌زایی در انگور هستند. پوتریسین^۲ یکی از انواع پلی‌آمین‌های آلفاتیک است که هم در پروکاریوت‌ها و هم در پروکاریوت‌ها وجود دارد و برای تقسیم سلولی ضروری است و در فرایندهای نموی در گیاهان مانند رشد، اندام‌زایی و تمایز نقش دارد. Faurr *et al.* (1991) گزارش دادند که فراهم‌شدن نسبت مناسب پوتریسین به اسپرمیدین شاخص خوبی برای ادامه مراحل تکامل جنین‌های جنسی و بدنی است و ناتوانی جنین‌های انگور برای تولید گیاهان نرمال ممکن است به دلیل ناکافی بودن پلی‌آمین‌های درونی باشد. در این رابطه Colin *et al.* (1998) گزارش دادند که کاربرد خارجی پوتریسین روی خوشه‌های انگور، بلوغ آن را به تأخیر انداخت، در حالی که کاربرد بازدارنده‌های سنتز پلی‌آمین‌ها بلوغ خوشه‌ها را شتاب بخشید. کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد روی خوشه‌های انگور قبل از شکوفایی آن‌ها تأثیرات سودمندی روی توسعه و رشد تخمک‌ها و تعداد جنین‌های نجات‌یافته در ارقام بررسی شده داشت (Aguero *et al.*, 1995; Ponce *et al.*, 2002; Bharathy *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2009).

نیاز روزافزون بازار به انگوره‌های بی‌دانه است (Emershad & Ramming, 1984, 1989; Spiegel-roy *et al.*, 2005; Ebadi *et al.*, 2000).

بی‌دانگی در انگور (ارقام فلیم‌سیدلس، پرلت، یاقوتی) به دلیل پدیده استنواسپرموکاری ایجاد می‌شود که در این حالت گرده‌افشانی و لقاح به‌طور طبیعی انجام می‌گیرد اما جنین پس از مدتی سقط می‌شود (Bharathy *et al.*, 2005). انجام کارهای به‌نژادی برای ایجاد ارقام جدید بی‌دانه از دیرباز مورد توجه به‌نژادگران قرار داشته است اما در روش‌های معمول به‌نژادی به دلیل سقط جنین، به‌نژادگران به اجبار رقم بی‌دانه را به‌منزله والد پدری استفاده می‌کنند که این امر سبب تولید درصد پایینی از نتاج بی‌دانه می‌شود (Ramming *et al.*, 1990; Loomis & Weinberger, 1979). به‌نژادگران به منظور افزایش تعداد نتاج بی‌دانه و امکان‌پذیر ساختن تلاقی‌هایی که در حالت طبیعی نتاجی از آن‌ها به دست نمی‌آید از تکنیک نجات جنین استفاده می‌کنند. علت ایجاد پدیده استنواسپرموکاری هنوز به‌طور دقیق مشخص نیست؛ اما کاهش سطح هورمون‌ها (سیتوکینین‌ها)، مواد غذایی و نیز به هم خوردن تعادل هورمونی (افزایش میزان جیبرلین) در طول رشد بذور ارقام استنواسپرموکارپ می‌تواند از علل این امر باشد (Aguero *et al.*, 2000; Bharathy *et al.*, 2005).

از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌توان به‌منزله ابزاری مفید، در برنامه‌های به‌نژادی انگور استفاده کرد (Bordelon *et al.*, 1994). تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی یکی از فاکتورهای مهم و مؤثر در موفقیت تکنیک نجات جنین هستند و به‌طور گسترده‌ای توسط پژوهشگران برای نجات جنین استفاده می‌شوند (Emershad & Ramming, 1984; Spiegel-roy *et al.*, 1985; Aguero *et al.*, 1995; Ponce *et al.*, 2002a; Bharathy *et al.*, 2005). در بیشتر پژوهش‌های انجام‌شده، به منظور افزایش تعداد جنین‌های بزرگ‌تر و در پی آن افزایش تعداد بیشتر گیاهان بازیابی‌شده، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به محیط‌های کشت اضافه شده است (Emershad & Ramming, 1984; Spiegel-Roy *et al.*, 1985; Ponce *et al.*, 2002b).

1. Polyamine
2. Putrescine

آب‌مقطر دوبار استریل شست‌وشو داده شدند. حبه‌های ضدعفونی شده در شرایط استریل زیر لامینار فلو برش داده شدند و آن دسته از تخمک‌هایی که اندازه آن‌ها ۴ میلی‌متر یا بیشتر بود، از حبه‌ها جدا شدند و در پتری-دیش‌هایی به ابعاد ۱۵×۱۰ میلی‌متر در محیط کشت قرار گرفتند. محیط کشت استفاده‌شده محیط کشت NN (Nitsch & Nitsch, 1969) تکمیل‌شده با ۲ درصد ساکارز، ۰/۳ درصد زغال فعال و ۰/۶ درصد آگار بود. پتری دیش‌ها در اتاقک رشد تحت شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۵۰ میکرومول بر ثانیه بر مترمربع و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت ۱۰ هفته از کشت، در زیر استریو میکروسکوپ تخمک‌ها را شکافته و جنین‌هایی که داخل کیسه جنینی در سمت سفید قرار داشتند، خارج شدند. جنین‌های خارج‌شده اشکال کروی، قلبی و اژدری و بعضی مواقع چندین جنین داشتند (شکل ۱- الف و ب). همچنین پس از خارج کردن جنین، میزان آندوسپرم تخمک‌ها به سه صورت تخمک با آندوسپرم کامل، نیمه و عاری از آندوسپرم ثبت شد. جنین‌ها از آندوسپرم و تخمک جدا و به محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) با ۲ درصد ساکارز، ۰/۲ درصد زغال فعال و ۰/۷ آگار منتقل و تحت همان شرایط قبلی در اتاق رشد قرار داده شدند (شکل ۱- ج). بعد از گذشت دو هفته از کشت، جنین‌ها شروع به جوانه‌زدن کردند و طی دو هفته بعدی، برگ‌های اولیه که فاقد کلروفیل بودند و نیز ریشه‌های اولیه ظاهر شدند (شکل ۱- د). شش هفته پس از کشت جنین، رنگ برگ‌ها به سبزی گرایید و گیاهان به رشد ادامه دادند و به گیاهچه (دارای ۴ تا ۸ برگ) تبدیل شدند (شکل ۱- م). پس از گذشت ۱۲ هفته از زمان کشت و انجام مراحل سازگاری (شکل ۱- ی)، گیاهان توسعه‌یافته به خاک منتقل شدند.

این پژوهش به صورت دو آزمایش جدا از هم انجام گرفت و هر دو آزمایش در قالب طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی انجام شدند. آزمایش اول شامل سه فاکتور والد مادری با سه سطح (فلیم‌سیدلس، پرلت و یاقوتی)، والد پدری با سه سطح (فلیم‌سیدلس، پرلت و یاقوتی) و پیش‌تیمار پوتریسین با سه سطح (۰، ۲۰ و ۳۰

از آنجاکه بی‌دانگی در انگور توسط عوامل ژنتیکی کنترل می‌شود، در نتیجه یکی از عوامل بسیار مهم و تأثیرگذار در میزان موفقیت در فرایند نجات جنین انگورهای استنواسپرموکارپ نوع ژنوتیپ والدین مادری، پدری و حتی سطح پلوئیدی آن‌هاست (Emershad & Ramming, 1989; Goldy et al., 1987; Gribaudo et al., 1993; Yang et al., 2006; Bharathy et al., 2005; Gary et al., 1987; Ponce et al., 2002b).

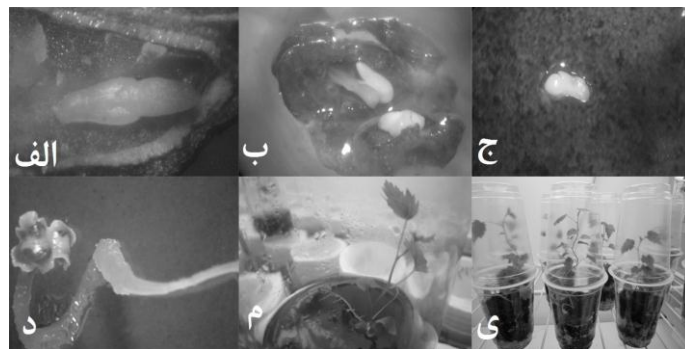
هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر والدین مادری، پدری و غلظت‌های مختلف پوتریسین و سایکوسل بر میزان تکامل آندوسپرم تخمک‌ها، میزان رشد و نمو جنین‌ها (جنین‌های کروی، قلبی، اژدری و چندجنینی)، درصد جوانه‌زنی جنین‌ها و درصد گیاهچه‌های تولیدی حاصل از تلاقی دای‌آل بین ارقام خارجی فلیم‌سیدلس و پرلت و رقم ایرانی یاقوتی بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش روی انگورهای بی‌دانه فلیم‌سیدلس، پرلت و یاقوتی، در کلکسیون انگور ایستگاه تحقیقاتی و آزمایشگاه‌های گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ انجام شد. در اواخر اردیبهشت‌ماه چند گل‌آذین به‌طور تصادفی روی بوته‌های انگور در ارقام یادشده انتخاب شد. در زمان ۱۴ روز قبل از شکوفایی گل‌ها، خوشه‌ها با محلول‌های سایکوسل (غلظت ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و پوتریسین (غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر) محلول‌پاشی شدند. پس از اینکه اولین گل‌ها در هر خوشه باز شدند، به‌منظور همسن‌سازی آن‌ها، گل‌های بازشده و غنچه‌های ریز نوک خوشه‌ها حذف و باقی‌مانده گل‌ها اخته شدند. بعد از گذشت ۲۴ و ۷۲ ساعت، گل‌های اخته‌شده با گرده مورد نظر گرده‌افشانی شدند. پس از گذشت ۴۵ روز از گرده‌افشانی، تعدادی حبه از خوشه‌ها برداشت شدند. ابتدا حبه‌ها با مایع دستشویی شست‌وشو شدند و به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و در ادامه دوباره با آب‌مقطر شست‌وشو داده شدند و در مرحله بعد به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد قرار گرفتند و در نهایت سه مرتبه با

تیمار و در هر تیمار ۳ پتری دیش به‌منزله تکرار در نظر گرفته شد و در هر پتری دیش ۱۵ تخمک کشت شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها براساس رویه GLM نرم‌افزار SAS (Ver9.2) انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد.

میلی‌گرم در لیتر) بود. آزمایش دوم نیز شامل سه فاکتور والد مادری با سه سطح (فلیم‌سیدلس، پرلت و یاقوتی)، والد پدری با سه سطح (فلیم‌سیدلس، پرلت و یاقوتی) و پیش‌تیمار سایکوسل با سه سطح (۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بود. هر آزمایش شامل ۲۷



شکل ۱. الف) جنین اژدری؛ ب) پدیده چندجنینی؛ ج) جنین کشت‌شده در محیط کشت MS؛ د) جنین جوانه‌زده با برگ و ریشه اولیه؛ ه) گیاهچه رشدیافته شش هفته پس از جوانه‌زنی جنین؛ و) گیاهان رشدیافته طی مراحل سازگاری

معناداری بر درصد رشد جنین‌ها (جنین‌های کروی، قلبی، اژدری و جنین‌های چندگانه)، درصد جنین‌های اژدری، درصد جنین‌های جوانه‌زده و درصد گیاهچه‌های تولیدشده داشت.

نتایج و بحث

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول‌های ۱ و ۲) بیانگر آن بود که والد مادری، والد پدری، پیش‌تیمار پوتریسین و پیش‌تیمار سایکوسل تأثیر

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر والد مادری، والد پدری، پیش‌تیمار پوتریسین بر درصد جنین‌های رشدیافته، درصد جنین‌های اژدری، درصد جوانه‌زنی جنین‌ها و درصد گیاهچه‌های تولیدشده

منابع تغییر	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات		
		جنین‌های رشدیافته	جنین‌های اژدری	جنین‌های جوانه‌زده
والد مادری	۲	۵۴۱/۸۷**	۶۰۳/۱۱**	۱۲۹۱/۷۷**
والد پدری	۲	۳۴۵/۵۲**	۷۲۲/۵۶**	۸۶/۱۸**
پوتریسین	۲	۷۵۹/۶۶**	۴۰۶/۴۷**	۱۰۶۳/۹۰**
والد مادری × پوتریسین	۴	۷۵/۲۰	۵۲/۷۲	۱۱۵/۷۶**
والد مادری × والد پدری	۴	۶۲۴/۱۵**	۱۳۴۱/۵۶**	۲۳۹/۲۶**
والد پدری × پوتریسین	۴	۱۱/۰۹	۶۲/۵۷	۶۹/۷۰**
والد مادری × والد پدری × پوتریسین	۸	۱۲۵/۴۲*	۹۱/۳۴**	۱۷۰/۹۳**
خطا	۵۲	۲۷/۶۰	۳۰/۳۲	۱۵/۵۵
ضریب تغییرات	-	۱۳/۵۴	۱۸/۹۰	۱۰/۷۴

** معنادار در سطح ۱ درصد * معنادار در سطح ۵ درصد.

تولیدشده در رقم پرلت نسبت به دو رقم دیگر معنادار بود. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که استفاده از والد مادری پرلت اثر سودمندتری بر روی صفات یادشده که نسبت به ارقام فلیم‌سیدلس و یاقوتی داشت (شکل‌های ۲

در آزمایش اول و دوم پس از برش تخمک‌ها مشخص شد تخمک‌هایی که والد مادری آن‌ها پرلت بود، جنین‌های اژدری و رشدیافته‌تر بیشتری نسبت به دو والد دیگر داشتند. همچنین میزان جوانه‌زنی جنین‌ها و گیاهچه‌های

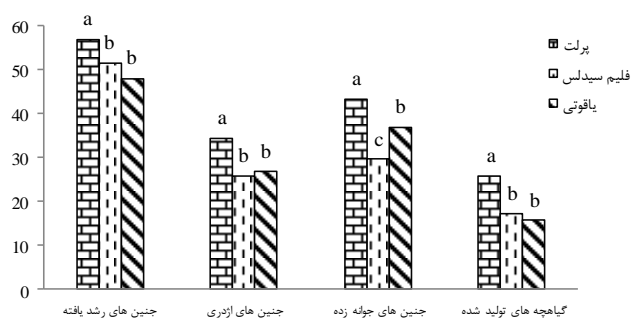
موفقیت در تکنیک نجات جنین قبلاً توسط Burger & Goussard (1996) و Liu *et al.* (2003) گزارش شده بود. نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش نتایجی را که پیش‌تر توسط دیگر پژوهشگران (Spiegel-Roy *et al.*, 1985; Ramming *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1990; Gribaudo *et al.*, 1993; Valdez *et al.*, 2005) گزارش شده بود را تأیید می‌کند.

و ۳). از آنجاکه بی‌دانگی در انگور توسط عوامل ژنتیکی کنترل می‌شود، پس میزان موفقیت در این تکنیک می‌تواند به‌شدت تحت‌تأثیر ژنوتیپ قرار گیرد. در این راستا اگر جداسازی تخمک در بین والدین مادری در یک زمان صورت گیرد، آن والدی که جنین خود را دیرتر سقط کند و یا حداقل زمان سقط جنین آن والد بعد از تاریخ جداسازی تخمک باشد برتری دارد. اثر ژنوتیپ بر میزان

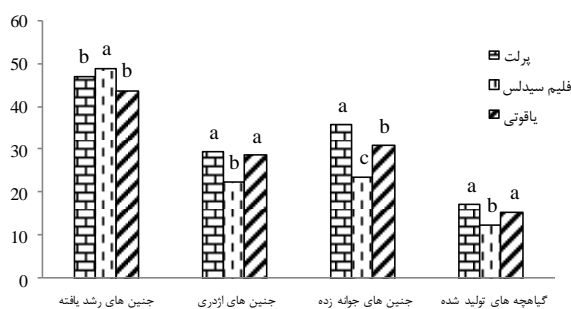
جدول ۲. تجزیه واریانس اثر والد مادری، والد پدری، پیش‌تیمار سایکوسل بر درصد جنین‌های رشدیافته، درصد جنین‌های اژدری، درصد جوانه‌زنی جنین‌ها و درصد گیاهچه‌های تولیدشده

میانگین مربعات				درجه آزادی (df)	منابع تغییر
درصد گیاهچه‌های تولیدشده	جنین‌های جوانه‌زده	جنین‌های اژدری	جنین‌های رشدیافته		
۱۵۲/۰۶**	۹۹۹/۳۲**	۳۳۳/۱۱**	۱۸۴/۸۷**	۲	والد مادری
۶۱/۴۶*	۱۴/۸۳	۵۴۳/۹۷**	۸/۸۳	۲	والد پدری
۳۴۹/۷۵**	۱۹۲/۵۴**	۴۴۸/۳۶**	۴۷۷/۳۲**	۲	سایکوسل
۲۴/۴۱	۹۵/۴۶**	۲۲۵/۲۱**	۲۶۳/۹۵**	۴	والد مادری × سایکوسل
۱۳۱/۴۷**	۲۶۳/۴۱**	۸۷۱/۴۱**	۸۵۱/۲۷**	۴	والد مادری × والد پدری
۱۲/۸۹	۶۱/۷۶**	۳۸/۳۹	۱۰۵/۰۷*	۴	والد پدری × سایکوسل
۳۷/۱۷	۸۹/۳۰**	۱۲۵/۲۴**	۸۱/۲۸	۸	والد مادری × والد پدری × سایکوسل
۲۰/۷۴	۱۹/۴۹	۳۸/۹۸	۴۴/۹۸	۵۲	خطا
۳۰/۵۸	۱۴/۷۸	۲۳/۳۴	۱۴/۵۰	-	ضریب تغییرات

** معنادار در سطح ۱ درصد * معنادار در سطح ۵ درصد.



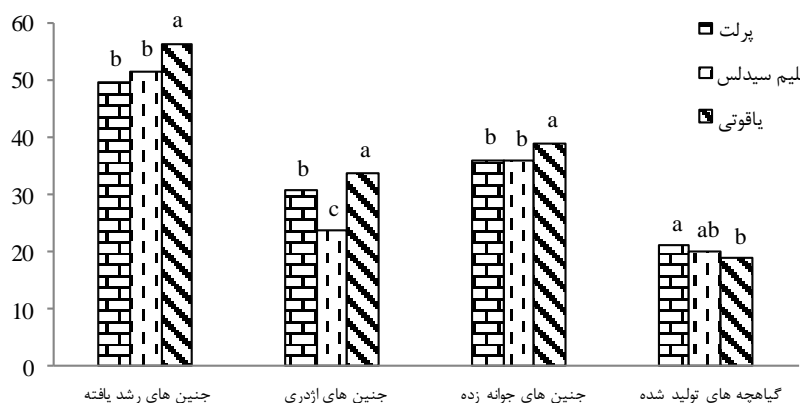
شکل ۲. اثر والد مادری بر درصد جنین‌های رشدیافته، درصد جنین‌های اژدری، درصد جنین‌های جوانه‌زده و درصد گیاهچه‌های تولیدشده با کاربرد پوتریسیسین دو هفته قبل از شکوفایی



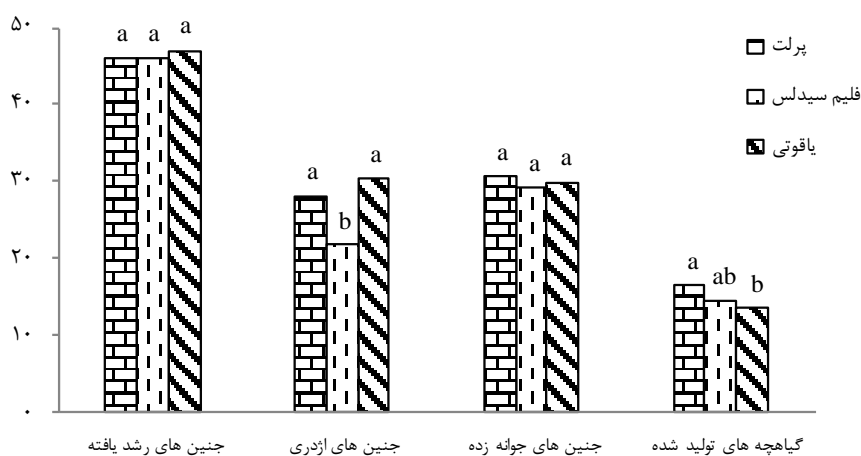
شکل ۳. اثر والد مادری بر درصد جنین‌های رشدیافته، درصد جنین‌های اژدری، درصد جنین‌های جوانه‌زده و درصد گیاهچه‌های تولیدشده با کاربرد سایکوسل دو هفته قبل از شکوفایی

است (Gray *et al.*, 1990; Bharathy *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2008). در بررسی ما مشخص شد که والد پدری یا قوتی نسبت به دو والد دیگر تأثیرات سودمندتر و معناداری داشت. اما در بررسی میزان زنده‌مانی گیاهچه‌های تولیدشده مشخص شد هنگامی که رقم پرلت به‌منزله والد گرده‌دهنده استفاده شد، تعداد گیاهچه‌های حاصل از آن نسبت به دو والد دیگر بیشتر و قوی‌تر بودند که این یافته نیز توسط آزمون دانکن تأیید شد (شکل‌های ۴ و ۵). نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش، مؤثر بودن والد پدری در موفقیت تکنیک نجات جنین را که پیش‌تر توسط دیگر پژوهشگران به دست آمده بود، تأیید کرد.

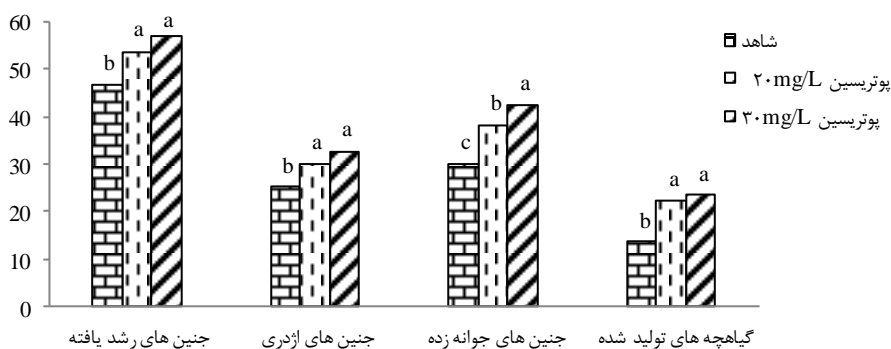
گرده ارقام مختلف انگور سرعت جوانه‌زنی و قدرت تولید لوله‌گرده متفاوتی دارند. به نظر می‌رسد والد پدری که گرده آن سرعت جوانه‌زنی بیشتری داشته باشد و بتواند لوله‌گرده قوی‌تری تولید کند، می‌تواند در نهایت لقاح مناسبی انجام دهد و نیز بر اثر لقاح مضاعف در برخی ترکیب‌ها جنین‌های قوی‌تری تولید می‌شود که دلیل آن ساختار ژنتیکی جنین است که این امر در برخی ترکیب‌ها (تلاقی‌ها) موجب افزایش قدرت و توانایی زنده‌ماندن جنین می‌شود و در ادامه تولید گیاهچه قوی‌تر را به همراه دارد. تا کنون گزارش‌های مختلفی مبنی بر تأثیر نوع والد پدری بر میزان رشد و توسعه جنین‌ها، درصد جوانه‌زنی جنین‌ها و زنده‌مانی گیاهچه‌های حاصله شده



شکل ۴. اثر والد پدری بر درصد جنین‌های رشد‌یافته، درصد جنین‌های ازدری، درصد جنین‌های جوانه‌زده و درصد گیاهچه‌های تولیدشده با کاربرد پوتریسین دو هفته قبل از شکوفایی



شکل ۵. اثر والد پدری بر درصد جنین‌های رشد‌یافته، درصد جنین‌های ازدری، درصد جنین‌های جوانه‌زده و درصد گیاهچه‌های تولیدشده با کاربرد سایکوسل دو هفته قبل از شکوفایی



شکل ۶. اثر پیش تیمار پوتریسین بر درصد جنین های رشد یافته، درصد جنین های اژدری، درصد جنین های جوانه زده و درصد گیاهچه های تولید شده با کاربرد پوتریسین دو هفته قبل از شکوفایی

غلظت ۳۰ میلی گرم در لیتر به وجود آمد. همچنین در این آزمایش مشاهده شد خوشه هایی که با پوتریسین تیمار شده بودند نسبت به خوشه های شاهد دیرتر شکوفا شدند و این در حالی بود که اندازه گل های این خوشه ها به مراتب بزرگتر از گل هایی بود که تیمار نشده بودند.

بررسی میزان آندوسپرم تخمک ها نشان داد خوشه های تیمار شده با پوتریسین در مقایسه با شاهد تخمک هایی با بیشترین درصد آندوسپرم را داشتند (جدول ۳).

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) مشخص کرد که استفاده از پیش تیمار پوتریسین اثر معناداری بر صفات بررسی شده داشت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین ها نشان داد که استفاده از پوتریسین با غلظت ۳۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر توانست درصد جنین های رشد یافته، جنین های اژدری، میزان جوانه زنی جنین ها و تعداد گیاهچه های تولید شده را در هر سه رقم (پرلت، یاقوتی و فلیم سیدلس) نسبت به شاهد به طور معناداری افزایش دهد (شکل ۶). بیشترین میزان افزایش در صفات بررسی شده توسط پوتریسین با

جدول ۳. بررسی درصد آندوسپرم درون کیسه جنینی در خوشه های تیمار شده با پوتریسین بر حسب درصد

شاهد			پوتریسین (۲۰ میلی گرم بر لیتر)			پوتریسین (۳۰ میلی گرم بر لیتر)		
-E	1/2E	+E	-E	1/2E	+E	-E	1/2E	+E
۴۸/۴۲	۱۶/۴۱	۳۵/۱۷	۳۳/۴۱	۲۰/۳۵	۴۶/۲۴	۳۰/۲۵	۲۵/۱۷	۴۴/۵۸

+E : آندوسپرم کامل؛ 1/2E: آندوسپرم نیمه و -E : بدون آندوسپرم

غلظت ۳۰ میلی گرم در لیتر به دست آمد. همچنین در خوشه های تیمار شده با پوتریسین پدیده چندجنینی مشاهده شد که این یافته، گزارش Ponce et al. (2002) را تأیید کرد.

در بررسی انواع اشکال جنین ها (کروی، قلبی، اژدری و چندجنینی) مشخص شد که بیشترین درصد جنین ها به صورت اژدری بودند (جدول ۴). بیشترین تعداد جنین ها از خوشه های تیمار شده با پوتریسین با

جدول ۴. مقایسه درصد و نوع جنین های به دست آمده از انگورهای تیمار شده توسط پوتریسین با شاهد

والد مادری و پیش تیمار	تعداد کل جنین ها	کروی شکل		قلبی شکل		اژدری شکل		چندجنینی	
		تعداد	(%)	تعداد	(%)	تعداد	(%)	تعداد	(%)
شاهد	۱۷۴	۱۵	۸/۶۳	۶۹	۳۹/۶۵	۹۰	۵۱/۷۲	۰	۰
پوتریسین (۲۰ میلی گرم در لیتر)	۲۱۹	۸	۳/۶۵	۸۲	۳۷/۴۴	۱۲۸	۵۸/۴۴	۱	۰/۴۵
پوتریسین (۳۰ میلی گرم در لیتر)	۲۲۲	۸	۳/۶۰	۸۵	۳۸/۲۸	۱۲۶	۵۶/۷۶	۳	۱/۳۵

همین این راستا نقش مثبت پلی‌آمین‌ها در بلوغ جنین‌های زایگوتی در صنوبر نروژی گزارش شده است (Santanen *et al.*, 2000)؛ ۴. از آنجا که پوتریسین در ساختمان خود دو گروه آمونیومی دارد پس ممکن است ازت موجود در این گروه‌ها بعد از تجزیه در مسیر فرایندهای متابولیسمی آزاد شده و به‌منزله منبع نیتروژنی در دسترس جنین قرار گرفته و در این راستا منجر به تحریک رشد جنین‌ها شده باشد. نتایج حاصل از این پژوهش یافته‌های Ponce *et al.* (2002) و Tang *et al.* (2009) را تأیید کرد.

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) مشخص کرد که استفاده از پیش‌تیمار سایکوسل اثر معناداری بر صفات بررسی شده داشت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که استفاده از سایکوسل با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش معنادار درصد جنین‌های رشدیافته، جنین‌های اژدری، درصد جوانه‌زنی جنین‌ها و تعداد گیاهچه‌های تولیدشده در هر سه رقم پرلت، یاقوتی و فلیم‌سیدلس نسبت به شاهد شد. همچنین استفاده از سایکوسل با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش معنادار درصد جنین‌های اژدری و گیاهچه‌های تولیدی شد. استفاده از غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر از سایکوسل درصد جوانه‌زنی جنین‌ها را نسبت به شاهد افزایش داد اما این افزایش از نظر آزمون دانکن معنادار نبود (شکل ۷).

پلی‌آمین‌ها به‌منزله فاکتورهای کلیدی در دوره مورفوریکتازی در انگور هستند. فراهم‌شدن نسبت مناسب پوتریسین به اسپرمیدین شاخص خوبی برای ادامه مراحل تکامل جنین‌های جنسی و بدنی است و احتمالاً ناتوانی جنین‌های انگور برای تولید گیاهان نرمال ممکن است به‌دلیل کافی نبودن پلی‌آمین‌های درونی باشد (Faure *et al.*, 1991). پژوهش‌ها مشخص کرده است که وجود مقادیر بالایی از پلی‌آمین‌ها برای جوانه‌زنی نرمال دانه‌گرده و رشد لوله‌گرده ضروری است (Song *et al.*, 2001; Wolukau *et al.*, 2004).

Ponce *et al.* (2002) و Tang *et al.* (2009) گزارش دادند که محلول‌پاشی خوشه‌های انگور در زمان دو هفته قبل از شکوفایی با پوتریسین سبب افزایش رشد و جوانه‌زنی جنین‌ها نسبت به شاهد شد. با توجه به پژوهش‌های انجام‌شده در این زمینه به نظر می‌رسد که استفاده از پوتریسین از چند طریق توانسته است صفات بررسی شده را افزایش دهد: ۱. بهبود لقاح از طریق فراهم‌کردن شرایط مناسب برای جوانه‌زنی نرمال دانه‌گرده و رشد لوله‌گرده؛ ۲. ادامه رشد و تکامل جنین‌های زایگوتیک از طریق فراهم‌شدن نسبت مناسب پوتریسین به اسپرمیدین؛ ۳. ناتوانی جنین‌های انگور برای تولید گیاهان نرمال احتمالاً به‌دلیل ناکافی بودن پلی‌آمین‌های درونی است، بنابراین کاربرد پوتریسین احتمالاً این کمبود را جبران و سبب افزایش رشد و نمو جنین‌ها شده است. در



شکل ۷. اثر پیش‌تیمار سایکوسل بر تعداد جنین‌های رشدیافته، تعداد جنین‌های اژدری، تعداد جنین‌های جوانه‌زده و تعداد گیاهچه‌های تولیدشده در آزمایش کاربرد سایکوسل دو هفته قبل از شکوفایی

بررسی میزان آندوسپرم تخمک‌ها نشان داد خوشه‌های تیمار شده با سایکوسل در مقایسه با شاهد تخمک‌هایی با بیشترین درصد آندوسپرم داشتند (جدول ۵). بیشترین درصد آندوسپرم در تخمک‌ها، متعلق به خوشه‌های تیمار شده توسط سایکوسل با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود (جدول ۵).

جدول ۵. بررسی میزان آندوسپرم درون کیسه جنینی در خوشه‌های تیمار شده با سایکوسل بر حسب درصد

شاهد			سایکوسل (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)			سایکوسل (۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)		
-E	½E	+E	-E	½E	+E	-E	½E	+E
۴۸/۴۲	۱۶/۴۱	۳۵/۱۷	۲۹/۴۱	۲۱/۲۰	۴۹/۳۹	۳۱/۴۶	۱۷/۱۷	۵۱/۳۷

+E: آندوسپرم کامل؛ ½E: آندوسپرم نیمه و -E: بدون آندوسپرم

در بررسی انواع اشکال جنین‌ها (کروی، قلبی، اژدری و چندجنینی) مشخص شد که بیشترین درصد جنین‌های اژدری متعلق به خوشه‌های تیمار شده با سایکوسل به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و کمترین تعداد جنین‌های به‌دست‌آمده و جنین‌های اژدری متعلق به تیمار شاهد بود (جدول ۶).

جدول ۶. مقایسه درصد و نوع جنین‌های به‌دست‌آمده از انگوره‌های تیمار شده توسط سایکوسل با شاهد

والد مادری و پیش‌تیمار	تعداد کل جنین‌ها	کروی شکل		قلبی شکل		اژدری شکل		چندجنینی	
		تعداد	(%)	تعداد	(%)	تعداد	(%)	تعداد	(%)
شاهد	۱۷۴	۱۵	۸/۶۳	۶۹	۳۹/۶۵	۹۰	۵۱/۷۲	۰	۰
سایکوسل (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)	۲۱۰	۸	۳/۸۰	۶۴	۳۰/۴۷	۱۳۴	۶۳/۸۰	۴	۱/۹
سایکوسل (۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر)	۱۸۱	۴	۲/۲۰	۵۹	۳۲/۵۹	۱۱۳	۶۲/۴۳	۵	۲/۷۶

کندکننده‌های رشد از طریق تغییر در مواد فتوسنتزی و هدایت آن‌ها به سمت مقصد سبب افزایش عملکرد می‌شوند (Khandewal et al., 2002). به‌طور کلی، استفاده از کندکننده‌های رشد سبب افزایش میزان کلروفیل در گیاهان می‌شود (Dole et al., 2005; Rossini et al., 2005). از سوی دیگر تیمار سایکوسل سبب افزایش ضخامت دیواره سلولی، تغلیظ شیره سلولی، افزایش تعداد دسته‌جات آوندی و قطر ساقه می‌شود (shekoofa et al., 2008b; Zhou et al., 1999). گزارش کردند کاربرد جیبرلین در زمان گلدهی انگوره‌های دانه‌دار سبب جلوگیری از لقاح شد. با توجه به بررسی‌های انجام شده در این زمینه و همچنین نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش به نظر می‌رسد که استفاده از سایکوسل از چند طریق توانسته است رشد، نمو و جوانه‌زنی جنین‌ها را افزایش دهد: ۱. بهم‌خوردن تعادل هورمون‌ها و افزایش میزان جیبرلین در زمان گلدهی و شکوفایی در ارقام استنواسپرموکارپ موجب سقط زود هنگام جنین می‌شود (Bharathy et al., 2005);

(Aguero et al., 2000) بنابراین، احتمالاً استفاده از سایکوسل که آثار ضد جیبرلینی دارد، توانسته است اثر منفی جیبرلین را خنثی و سبب افزایش اندازه و توسعه بذور و جلوگیری از سقط زود هنگام جنین شود؛ ۲. ساختار گل در انگور به گونه‌ای است که تخمدان‌ها در زمان شکوفایی به‌سهولت در معرض نور قرار می‌گیرند و می‌توانند فتوسنتز کنند بنابراین، به نظر می‌رسد استفاده از سایکوسل سبب افزایش میزان کلروفیل در تخمدان‌ها می‌شود که این امر افزایش محصولات حاصل از فتوسنتز را به دنبال داشته است که در نتیجه آن شرایط تغذیه‌ای جنین بهبود یافته و به‌طور مستقیم روند رشد و نمو جنین و آندوسپرم به‌طور مثبت تحت تأثیر قرار گرفته است؛ ۳. استفاده از سایکوسل سبب تغییر در مسیر حرکت مواد فتوسنتزی و هدایت آن‌ها به سمت مقصد و نیز افزایش تعداد دسته‌جات آوندی می‌شود که این امر سبب افزایش میزان شیره پرورده در خوشه‌ها و در نزدیکی جنین‌ها می‌شود و در نتیجه می‌تواند وضعیت تغذیه‌ای جنین و آندوسپرم را بهبود بخشد؛ ۴. از آنجاکه سایکوسل در

بوده و آزمون دانکن نشان داد که این تفاوت‌ها معنادار بوده است (شکل ۱۰). نتایج همچنین نشان داد که آثار متقابل معناداری بین والد پدری و پوتریسین وجود دارد که نشان می‌دهد، استفاده از والد پدری یاقوتی و پیش‌تیمار پوتریسین سبب افزایش درصد جوانه‌زنی این تیمار نسبت به سایر تیمارها شده بود. بیشترین درصد جنین‌های جوانه‌زده مربوط به استفاده از رقم یاقوتی به‌منزله والد مادری و پیش‌تیمار پوتریسین با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر می‌شد. بیشترین میزان گیاهچه‌های تولیدشده متعلق به زمانی بود که رقم پرلت توسط پوتریسین با غلظت ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر پیش‌تیمار شد (شکل ۱۱). در بررسی آثار متقابل سه‌گانه بین والد مادری، والد پدری و پیش‌تیمار پوتریسین، تیماری که در آن والد مادری فلیم‌سیدلس و والد پدری یاقوتی و پیش‌تیمار پوتریسین با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد بیشترین میزان در هر چهار صفت بررسی شده داشت.

در آزمایش ب، بررسی آثار متقابل بین والد مادری با پیش‌تیمار سایکوسل نشان داد زمانی که والد مادری یاقوتی و پیش‌تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل اعمال شد، درصد جنین‌های رشدیافته و جوانه‌زنی جنین‌ها نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود و براساس آزمون دانکن این تفاوت‌ها معنادار بود. اما در رقم فلیم‌سیدلس استفاده از سایکوسل با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش در درصد جنین‌های اژدری، جنین‌های رشدیافته و جنین‌های جوانه‌زده شد. بیشترین درصد به جنین‌های اژدری در ارقام فلیم‌سیدلس و پرلت هنگامی که از پیش‌تیمار سایکوسل با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شده بود، تعلق داشت (شکل ۱۲).

در آزمایش ب در بررسی اثر متقابل بین والد‌های پدری و پیش‌تیمار سایکوسل مشخص شد که والد‌های پدری پرلت و یاقوتی همراه با تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل بیشترین درصد گیاهچه‌های رشدیافته بودند و هر سه والد با پیش‌تیمار سایکوسل با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین درصد جوانه‌زنی جنین‌ها نسبت به سایر تیمارها را داشتند. رقم پرلت و فلیم با پیش‌تیمار سایکوسل با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در

ساختمان خود یک گروه آمونومی دارد پس ممکن است ازت موجود در گروه آمونومی بعد از تجزیه در مسیر فرایندهای متابولیسمی آزاد شده و به‌منزله منبع نیتروژنی در دسترس گیاه قرار گیرد و منجر به تحریک رشد و شاخص‌های وابسته به آن شود (Ma & Smith, 1992) و در نتیجه می‌تواند به‌صورت مستقیم و یا غیرمستقیم بر رشد و نمو جنین و آندوسپرم تأثیر گذارد.

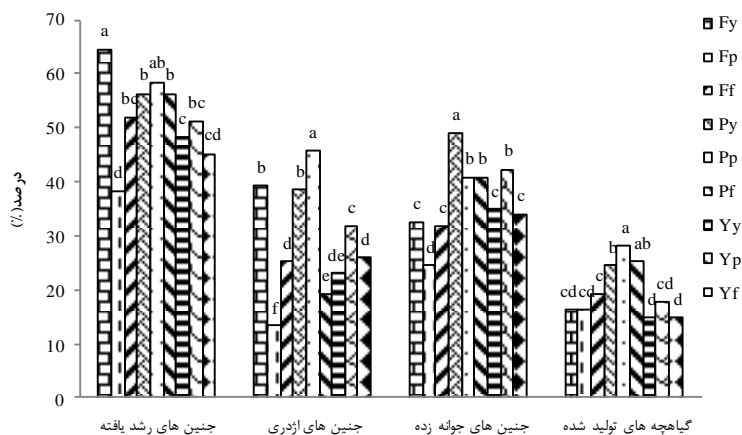
Bordelon & Moore (1994) گزارش دادند که استفاده از سایکوسل با غلظت ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب افزایش تعداد بذور بزرگ‌تر در رقم Venus Seedless شد. Tang *et al.* (2009) با محلول‌پاشی خوشه‌های ارقام تامپسون سیدلس^۱، کریمسون سیدلس^۲ و سنتنیال سیدلس^۳ توسط غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از سایکوسل نتیجه گرفتند که استفاده از سایکوسل با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش میزان رشد و نمو جنین‌ها شد اما درصد گیاهچه‌های تولیدی حاصل از این دو تیمار فرقی با یکدیگر نداشتند. نتایج این آزمایش یافته‌های Tang *et al.* (2009) را تأیید کرد.

در بررسی آثار متقابل والد مادری با پدری در هر دو آزمایش مشخص شد زمانی که رقم فلیم‌سیدلس با رقم یاقوتی و رقم پرلت با پرلت گرده‌افشانی شدند، بیشترین درصد جنین‌های رشدیافته را تولید کردند. بیشترین میزان جنین‌های اژدری متعلق به زمانی بود که رقم پرلت با گرده رقم یاقوتی و گرده پرلت گرده‌افشانی شده بودند. همچنین بیشترین درصد جوانه‌زنی زمانی رخ داد که رقم پرلت با گرده یاقوتی و رقم یاقوتی با گرده پرلت، گرده‌افشانی شده بودند. بیشترین درصد گیاهچه‌های تولیدشده متعلق به زمانی بود که رقم پرلت خود گرده‌افشانی شده بود (شکل‌های ۸ و ۹).

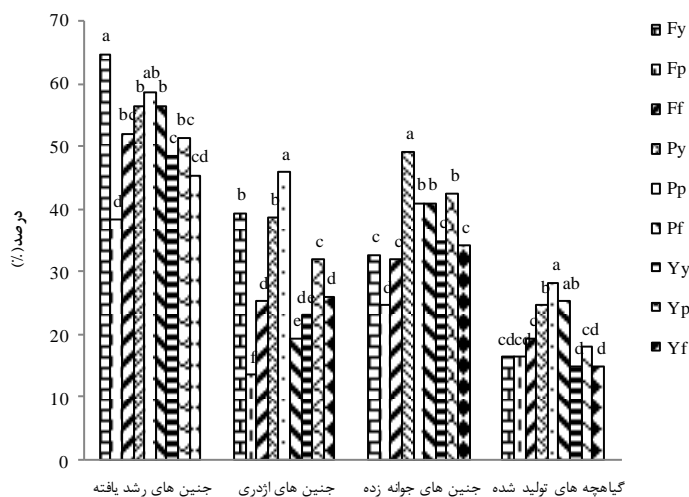
در آزمایش الف بررسی آثار متقابل بین والد مادری با پیش‌تیمار پوتریسین نشان داد زمانی که والد مادری پرلت و پیش‌تیمار پوتریسین با غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر اعمال شد، درصد جوانه‌زنی جنین‌ها و گیاهچه‌های تولیدشده نسبت به سایر تیمارها بیشتر

1. Thompson Seedless
2. Crimson Seedless
3. Centennial Seedless

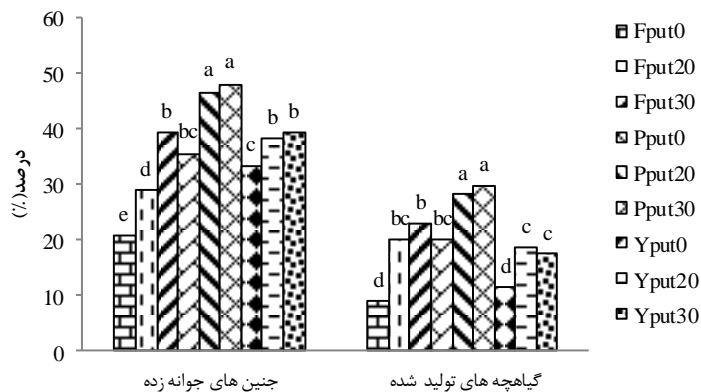
لیتر برتری نسبت به شاهد داشتند. اما والد پدری یاقوتی همراه با تیمار سایکوسل با غلظت ۴۰۰ میلی گرم در لیتر سبب کاهش درصد جوانه زنی و کاهش درصد جنین‌های رشد یافته شدند (شکل ۱۳).



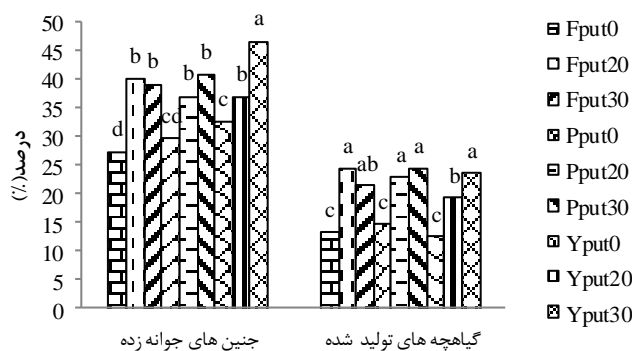
شکل ۸. اثر متقابل والد مادری و پدری بر درصد جنین‌های رشد یافته، درصد جنین‌های اژدری، درصد جنین‌های جوانه زده و درصد گیاهچه‌های تولید شده با کاربرد پوتریسین دو هفته قبل از شکوفایی



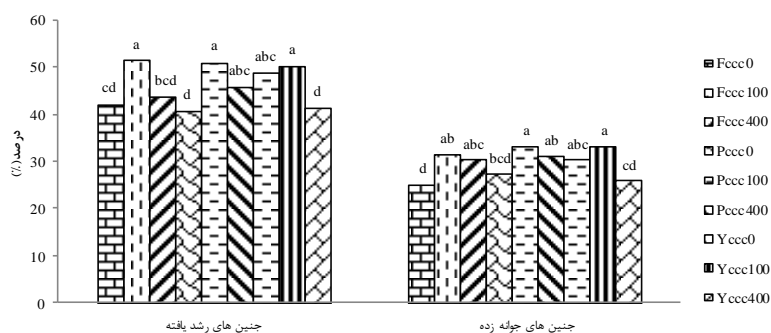
شکل ۹. اثر متقابل والد مادری و والد بر درصد جنین‌های رشد یافته، درصد جنین‌های اژدری، درصد جنین‌های جوانه زده و درصد گیاهچه‌های تولید شده با کاربرد سایکوسل دو هفته قبل از شکوفایی



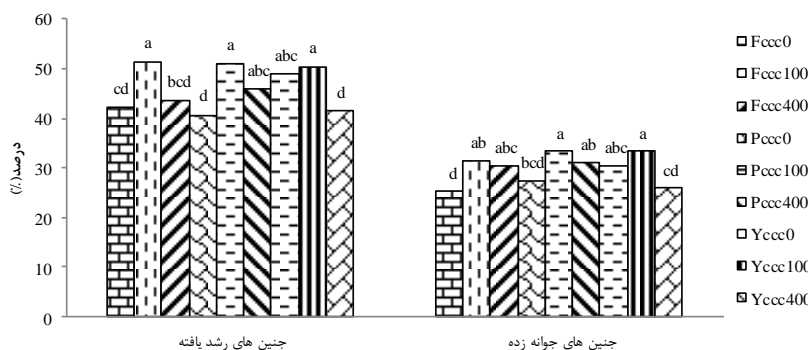
شکل ۱۰. اثر متقابل والد مادری و پیش تیمار پوتریسین بر درصد جوانه زنی جنین‌ها و درصد گیاهچه‌های تولید شده



شکل ۱۱. اثر متقابل والد پدری و پیش تیمار پوتریسین بر درصد جوانه‌زنی جنین‌ها و درصد گیاهچه‌های تولیدشده



شکل ۱۲. اثر متقابل والد مادری و پیش تیمار سایکوسل بر درصد جنین‌های رشد یافته، درصد جنین‌های اژدری، درصد جنین‌های جوانه‌زده



شکل ۱۳. اثر متقابل والد پدری و سایکوسل بر درصد جنین‌های رشد یافته و درصد جوانه‌زنی جنین‌ها

حروف F, P, Y متعلق به والدین مادری فلیم‌سیدلس، پرلت و یاقوتی است. حروف p, y متعلق به والدین پدری فلیم‌سیدلس، پرلت و یاقوتی است. ccc پیش تیمار سایکوسل با غلظت‌های ۰، ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر. Put: پیش تیمار پوتریسین با غلظت‌های ۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر. هر صفت در هر نمودار به‌طور جداگانه مقایسه شده است.

استفاده از پیش تیمار پوتریسین و سایکوسل به ترتیب با غلظت ۳۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از نابودی آندوسپرم در بذور جلوگیری کرد و سبب بهبود تغذیه جنین شد که به نوبه خود موجب افزایش رشد جنین و جوانه‌زنی بهتر جنین‌ها و در نهایت افزایش تعداد گیاهچه‌های تولیدی شد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد استفاده از رقم پرلت به‌منزله والد مادری و رقم یاقوتی به‌منزله والد پدری در برنامه به‌نژادی انگورهای بی‌دانه از طریق تکنیک نجات جنین می‌تواند بیشترین درصد جوانه‌زنی جنین‌ها و گیاهچه‌های تولیدی را به همراه داشته باشد.

REFERENCES

1. Aguero, C., Riquelme, C. & Tizio, R. (1995). Embryo rescue from seedless grapevine (*V. vinifera* L.) treat with growth retardant. *Vitis*, 34(1), 66-73.
2. Aguero, C., Riquelme, C. & Tizio, R. (2000). Effect of gibberellic acid and uniconazol on embryo abortion in the stenospermocarpic grape cultivars Emperatriz and Perlon. *Plant Growth Regulation*, 30(1), 9-16.
3. Bharathy, P. V., Karibasappa, Sand, V. & Patil, SG. (2005). In Ovule rescue of hybrid embryos in Flame Seedless grapes Influence of pre-bloom sprays of benzyladenine. *Scientia Horticulturae*, 106, 353-356.
4. Bordelon, B.P. & Moore, J.N. (1994). Promoting stenospermic grape seed trace development and germination with plant growth regulators. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*, 119, 719-726.
5. Burger, P. & Goussard, PG. (1996). In vitro culture of ovules embryo from Seedless Grape (*Vitis Vinifera* L.). *Hortscience*, 108(3), 434-438.
6. Colin, L., Geny, L. & Broquedis, M. (1998). Effect of polyamines on the ripening of *Vitis vinifera* L. berries. In Resumes VII symposium International sur La Genetique et I Amelioration de la Vigne, 5(3), 6-10.
7. Davis, T.D. & Curry, E.A. (1991). Chemical regulation of vegetative growth. *Critical Review in Plant Sciences*, 10, 151-188.
8. De, R., Giri, G., Saran, G., Singh, R.K. & Chaturvedi, G.S. (1982). Modification of water balance of dry land wheat through the use of chlormequat chloride. *Journal of Agricultural Science*, 98(3), 593-597.
9. Dole, J. M. & Wilkins, HF. (2005). Floriculture: Principles and Species. Prentice Hall, USA.
10. Ebadi, A., Atashkar, D & Dehghani, Y. (2000). Mechanism of seedlessness in five Iranian seedless cvs of grapevine (*V. vinifera* L.). Proceeding of 6th Int. Symp. of grapevine physiology and biotechnology. Create Heraklion, Greece.
11. Emam, Y., Tafazoli, T. & Karimi, H.R. (1996). Growth and development of winter wheat (cultivar Ghods) as affected by chlormequat chloride (CCC). *Iranian Journal of Agriculture Science*, 27(3), 23-31.
12. Emershad, RL & Ramming, DW. (1984). In ovulo embryo culture of *Vitis vinifera* L. cv. Tompson Seedless. *American Journal of Botany*, 71(6), 873-877.
13. Emershad, RL., Ramming, DW. & Serpe, MD. (1989). In Ovule embryo development and plant formation from stenospermic genotypes of *Vitis vinifera*. *American Journal of Botany*, 76(3), 379-402.
14. Faure, O., Mengoli, M., Nougard, A. & Bagni, N. (1991). Polyamine pattern and biosynthesis in zygotic and somatic embryo stages of *Vitis vinifera*. *Journal of Plant Physiology*, 138, 545-549.
15. Gray, DJ., Fisher, LC. & JA, Mortensen. (1987). Comparison of methodologies for in Ovule embryo rescue of seedless grapes. *Hortscience*, 22(6), 1334-1335.
16. Goldy, RG. & Amborn, U. (1987). In Vitro culture ability of ovules from 20 seedless grape clones. *Hortscience*, 22(5), 952.
17. Gribaudo, I., R, Zanetti., R, Botta., R. & Vallania, M. (1993). In Ovule embryo culture of stenospermocarpic grapes. *Vitis*, 32, 9-14.
18. Khandewal, K.S., Gupta, NK. & Sahu, MP. (2002). Effect of plant growth regulators on growth, yield and essential oil production of henna (*Lawsonia inermis* L.). *Journal of Horticultural Science a Biotechnology*, 77(1), 67-72.
19. Ledbetter, CA. & Shonnard, CB. (1991). Berry and seed characteristics associated with stenospermy in vinifera grapes. *Journal of Horticulture Science*, 66 (2), 247- 252.
20. Liu, SM., Sykes, R. & Clingeffer, R. (2003). Improved in ovule embryo culture for stenospermocarpic grapes. *Australian. Journal Agriculture Resource*, 54, 869-876.
21. Loomis, N.H. & Weinberger, J.H. (1979). Inheritance studies of seedlessness in grapes. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*, 104 (2), 181-184.
22. Ma, B.L. & Smith, D.L. (1992). Chlormequat & ethephon timing and grain production of spring barley. *Agronomy Journal*, 84(6), 934-939.
23. Murashige, T. & Skoog, G. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497.
24. Nitsch, J.P. & Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163, 85-87.
25. Okamoto, G. & Miura, K. (2005). Effect of pre-bloom GA application on pollen tube growth in cv. Delaware grape pistils. *Vitis*, 44(4), 157-159.
26. Ponce, M. & Tizio, R. (2002). Brief Note Improved in vitro embryo development of stenospermic grape by putrescine. *Biocell*, 26(2), 263-266.

27. Pool, RM. (1982). Effect of mepiquat chloride on the growth and yield of 'Concord' grapevines. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*, 107, 376-380.
28. Ramming, D.W., Emershad, P., Spiegel-Roy, P., Sahar, N. & Baron, I. (1990). Embryo culture of early ripening seeded grape (*Vitis vinifera* L.) genotypes. *Hortscience*, 25(3), 339-342.
29. Rossini, AC., Rodrigues, T., Leits, IC & Barbosa, JC. (2005). Growth retardants on development and ornamental quality of potted 'Liliput' *Zinnia elegans*. *Scientia Agricola*, 62, 337- 345.
30. Santanen, A. & Simola, LK. (2000). Changes in polyamine metabolism during somatic embryogenesis in *Picea abies*. *Journal of Plant Physiology*, 140,475-480.
31. Shekoofa, A. & Emam, Y. (2008b). Effects of nitrogen fertilization and plant growth regulators (PGRs) on yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Shiraz. *Journal of Agriculture Sciences & Technology*, 10, 101-108.
32. Song, I., Nada, K. & Tachibana, S. (2001). The early increase of s-adenosylmethionine decarboxylase activity is essential for the normal germination and tube growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) pollen. *Plant Science*, 161, 507-515.
33. Spiegel-Roy, P., Sahar, N., Baron, J. & Lavi, V. (1985). In vitro culture and plant formation from grape cultivars with abortive ovules and seeds. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*, 110(1), 109-112.
34. Tang, D., Wang, Y., Cai, J. & Zhao, R. (2009). Effects of exogenous application of plant growth regulators on the development of ovule and subsequent embryo rescue of stenospermic grape. *Scientia Horticulturae*, 120, 51-57.
35. Tian, L. Wang, Y., Niu, L. & Tang, D. (2008). Breeding of disease-resistant seedless grapes using Chinese wild *Vitis* spp. I. *In vitro* embryo rescue and plant development. *Scientia Horticulturae*, 117, 136-141.
36. Valdez, JG. (2005). Immature embryo rescue of grapevine (*Vitis vinifera* L) after an extended period of seed trace culture. *Vitis*, 44(1), 17-23.
37. Wolukau, J. N. (2004). The effect of temperature, polyamines and polyamine synthesis inhibitor on in vitro pollen germination and pollen tube growth of *Prunus mume*. *Scientia Horticulturae*, 99, 289-299.
38. Yang, D., Shengli, W., Yang, X. & Cao, Z. (2006). In vitro embryo rescue culture of F1 progenies from crosses between diploid and tetraploid grape varieties. *Plant Growth Regulation*, 51(1), 63-71.
39. Zhang Zhang, L., Meng, X.F. & Zhang, L.S. (1990). The effect of plant growth regulators on in ovule embryo culture. *Acta Agriculture Universitatis Pekinensis*, 16, 277-282.
40. Zhou, W., Leul, M. & Zhou, WJ. (1999). Uniconazole-induced tolerance of rape plants to heat stress in relation to changes in hormonal levels, enzyme activities and lipid peroxidation. *Plant Growth Regulator*, 27, 99-104.