مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۱، شماره ۴، ۱۳۸۹ (۳۲۶-۳۱۹)

بررسی جنین‌زایی سوماتیکی توسط ریزنمونه برگ در دو رقم انگور بیدانه قرمز و فلیم سیدلس (Red Sultanina, Flame Seedless)

مریم کریمی علویجه[۱]*، علی عبادی[۲] و منصور امیدی[۳]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادان پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۸/۱/۲۳ - تاریخ تصویب: ۸۸/۱۲/۲)

چکیده

تولید جنین‌های سوماتیکی در انگور بیشتر با کشت اندام‌های زایشی مانند بساک و تخمدان معمول است. با این حال استفاده از اندام‌هایی مانند برگ به عنوان ریزنمونه، به علت محدودیت زمانی جمع‌آوری اندام‌های زایشی در طی سال مورد توجه می‌باشد. در این آزمایش از دو رقم انگور بیدانه قرمز و فلیم سیدلس ریزنمونه برگ تهیه و در محیط پایه MS به همراه 2,4-D با غلظت ٤/٥ میکرومولار و BAP با غلظت ۱/۱ میکرومولار، ۱ گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات، ۲۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۷ گرم در لیتر آگار کشت گردید. کالوس‌های تولید شده بعد از دو ماه به محیط کشت مشابه دارای ۰/۵ میکرومولار NAA به جای 2,4-D منتقل شدند. این کالوس‌ها بعد از سه ماه از کشت ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS با تنظیم‌کننده‌های IAA به میزان ۱، ۲ و ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر و BAP به میزان ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر برای انگیزش جنین‌زایی زیرکشت شدند. نتایج نشان داد که رقم فلیم سیدلس در تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد IAA با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر و BAP با غلظت پنج میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان جنین‌زایی را داشت.

واژه‌های کلیدی: انگور، ریزنمونه برگ، محیط کشت MS، کالوس جنین‌زا.

مقدمه

انگور در حال حاضر از مهمترین محصولات میوه‌ای در دنیاست و رقم‌های بسیاری از آن در نقاط مختلف دنیا کشت می‌شوند. در بین گونه‌های مختلف انگور گونه وینیفرا مهمترین گونه در دنیاست و تمام رقم‌های انگور در ایران از این گونه است. با توجه به پتانسیل ایران چه از لحاظ اقلیمی و چه از لحاظ ژنتیکی، لزوم انجام پژوهش در زمینه‌های مختلف به زراعی و به‌نژادی مو برای دستیابی به عملکرد بالا همراه با کیفیت مطلوب ضروری است. اصلاح سنتی، رقم‌های گیاهی جدید با ویژگی‌های مفید تولید کرده است. با این حال، اصلاح سنتی بوته‌های انگور با توجه به دوره طولانی مورد نیاز تا شروع گلدهی به دهها سال زمان نیاز دارد. همچنین تفرق صفات زیادی در نتاج حاصل از دو رگ‌گیری ایجاد می‌شود. اصلاح سنتی در نهایت نمی‌تواند به بعضی از تغییرات مطلوب ویژه با حفظ سایر خصوصیات اساسی یک رقم تجاری منجر شود، چون تعداد زیادی از ژنها در هم آمیخته و بیان می‌شوند و یک گیاه می‌تواند در این فرآیند به کلی تغییر کند. امروزه می‌توان از روش‌های جدید برای جلوگیری از طولانی شدن برنامه‌های اصلاحی و حفظ خصوصیات ارقام تجاری استفاده کرد (Colova-Tsolova & Jiang, 2001; Hardie & Robinson, 2005). زیست‌فناوری[۱] گیاهی می‌تواند ویژگی‌های مفید را از هر گیاهی گرفته و جهت بهبود

1. Biotechnology

* نویسنده مسئول: مریم کریمی علویجه تلفن: ۰۹۱۳-۳۱۴۳۸۹۴ E-mail: m_karimi_a61@yahoo.com

صفات به گیاه مورد نظر انتقال دهد (Stemp & Meredith, 1987). در این روش از آنجا که معمولاً یک یا دو ژن منتقل می‌شود، ویژگی اصلی و ذاتی گیاه مقصد حفظ شده و تغییری نخواهد کرد. در انجام برنامه‌های انتقال ژن وجود بافت گیاهی که توانایی پذیرش ژن مورد نظر را داشته و در مرحله بعد بتواند به گیاه کامل تبدیل شود، ضروری است. برای ایجاد چنین بافتی می‌توان از روش جنین‌زایی سوماتیکی استفاده کرد. اصلاح ژنتیکی انگور با استفاده از تکنیک‌های مولکولی به دلیل میزان کم باززایی ریزنمونه‌ها در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای به تاخیر افتاده است. برای اولین بار جنین‌زایی سوماتیکی در انگور با استفاده از تخمدان نارس رقم کابرنت ساوینون توسط Mullins & Srinivasan (1976) گزارش شد. تولید جنین‌های سوماتیکی در انگور با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف بساک (Bouquet & Lamaison, 1982; Salunkhe et al., 1999; Stemp & Meredith, 1987)، تخمدان (Hardie & Robinson, 2005; Mullins & Srinivasan, 1976; Reustle et al., 1995)، کشت دمبرگ (Stemp & Meredith, 1987)، پیچک (Salunkhe et al., 1999) و کشت کلاله و خامه (Carimi et al., 2005) گزارش شده است. اندام‌هایی مانند برگ و دمبرگ به خاطر در دسترس بودن ریزنمونه‌های مناسب برای کشت در طول سال مورد توجه محققین هستند. Stemp & Meredith (1987) از ژنوتیپ‌های کاردینال[1]، ساوینون بلنک[2]، تامسون سیدلس[3] و وایت ریزلینگ[4] و در *Vitis rupestris* ارقام سنت جورج[5] و PI100692 و هیبرید Ganzin No.1 و گونه *Vitis longii* موفق به تولید جنین‌های سوماتیکی شدند. تولید جنین‌های سوماتیکی از کشت ریزنمونه برگ در ارقام تامسون سیدلس و شاردونه[6] نیز گزارش شده است (Jayasankar et al., 2003). Das et al. (2002) نیز تولید جنین‌های سوماتیکی را با کشت چهار رقم پوسا سیدلس، بیوتی سیدلس، پرلت و ناشیک مورد بررسی قرار دادند و موفق به تولید جنین‌های سوماتیکی از کشت ریزنمونه‌های برگی در این چهار رقم انگور شدند. در تمام مطالعات انجام شده به منظور جنین‌زایی از ریزنمونه‌های برگی، محیط کشت پایه مورد استفاده موراشیگ و اسکوگ[7] و نیچ و نیچ[8] بوده است (Das et al., 2002; Salunkhe et al., 1999). نوع تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در محیط کشت و غلظت این تنظیم‌کننده‌های رشد بر جنین‌زایی از سطح ریزنمونه‌ها مؤثرند. تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد BA، 2,4-D، NOA و IAA که غلظت‌های متفاوتی داشتند به منظور جنین‌زایی در تحقیقات فوق مد نظر قرار گرفتند. لذا با توجه به اهمیت تولید کالوس‌های جنین‌زا برای انجام آزمایش‌ها بعدی انتقال ژن این تحقیق در راستای بررسی اثر رقم (بیدانه قرمز و فلیم‌سیدلس) و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد (اکسین و بنزیل‌آدنین) مناسب جنین‌زایی با استفاده از ریزنمونه برگ در محیط کشت MS انجام شد.

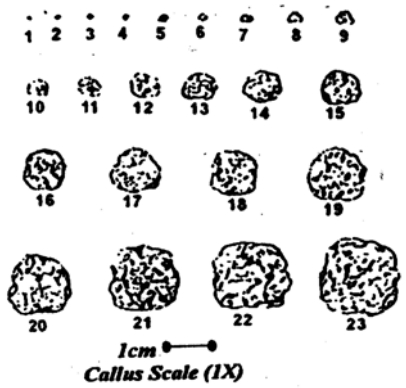
مواد و روش‌ها

به منظور انجام این پژوهش نمونه‌های مناسب برای کشت، از برگ‌های جوان انتهای شاخساره‌های سال جاری ارقام بیدانه قرمز و فلیم سیدلس جمع‌آوری شد. اندازه برگ‌ها حدود ۵-۲ سانتی‌متر بوده و فاقد علائم بیماری یا آفت بودند. ابتدا برگ‌ها به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفتند و بعد از آن برای ضدعفونی نهایی به لامینار انتقال یافتند. محلول ۰/۸٪ هیپوکلریت سدیم به همراه چند قطره توین ۲۰ به مدت ۱۰ دقیقه برای ضدعفونی برگ‌ها استفاده شد. سپس سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند. به منظور کنترل آلودگی‌های باکتریایی از محلول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به مدت ۳۰ ثانیه استفاده شد. سپس ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل برای بار دوم شسته شدند. ریزنمونه‌های برگی به قطعات یک سانتی‌متری تقسیم شدند و به منظور تحریک

1. Chardinal
2. Sauvignon Blanc
3. Thompson Seedless
4. White Riesling
5. St. George
6. Chardonnay
7. Murashig & Skoog (MS)
8. Nitsch & Nitsch (NN)

کالوس‌زایی بر روی رگبرگ‌های بافت برگ، چندین برش سطحی روی رگبرگ‌ها ایجاد گردید. ریزنمونه‌های برگ در محیط MS با تیمار تنظیم‌کننده‌های رشدی 2,4-D با غلظت ۴/۵ میکرومولار و BAP با غلظت ۱/۱ میکرومولار، ۱ گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات، ۲۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۷ گرم در لیتر آگار با pH=۵/۸، در چهار تکرار (هر تکرار یک پتری‌دیش به قطر ۹ سانتی‌متر و هر پتری دیش شامل ۶ ریزنمونه) انجام شد.

بعد از هشت هفته و انجام دو زیرکشت، کالوس‌ها را به قطعات نیم سانتی‌متری تقسیم کرده، سپس نیمی از کالوس‌ها به محیط کشت MS با تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد NAA با غلظت ۰/۵ میکرومولار و BAP با غلظت ۱/۱ میکرومولار، ۱ گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات، ۲۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۷ گرم در لیتر آگار با pH=۵/۸ منتقل شدند و باقیمانده کالوس‌ها در همان محیط قبلی زیر کشت شدند. طی این مدت کشت‌ها در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. اندازه گیری سطح کالوس، در هر دو محیط MS که تنها تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین آنها متفاوت بود، انجام شد. اندازه کالوس‌ها به روش استاندارد هوکرونی برز (شکل ۱) رتبه دهی شد.



شکل۱- الگوی مورد استفاده جهت اندازه‌گیری کالوس (مقیاس هوکرونی برز)

بعد از گذشت پنج هفته کالوس‌هایی که دارای رشد کمتر، رنگ سفید مایل به کرم و بافت گلوله‌ای بودند از بین کالوس‌های انتقال داده شده به محیط حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP انتخاب شده و برای تحریک بیشتر جنین‌زایی، این کالوس‌ها به محیط MS با تنظیم‌کننده‌های رشد IAA به میزان ۱، ۲ و ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر و BAP به میزان۲، ۵ و۱۰ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند. شرایط نگهداری برای کالوس‌ها در این محیط تاریکی مطلق و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت یک ماه اول و سپس در ماه دوم دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۱۰-۱۲$\mu E/M^2/S$ بود. بعد از مشاهده جنین‌ها در مرحله اول شکل‌گیری شدت نور را به ۴۵$\mu E/M^2/S$ افزایش داده و بعد از تکامل جنین‌ها، یادداشت برداری از تولید یا عدم تولید جنین در این مرحله انجام گردید.

طرح آماری مورد استفاده در این آزمایش، فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی بود و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه قرار گرفتند. برای آنالیز داده‌های کیفی از نرم‌افزار SPSS استفاده شد و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار EXCEL انجام شد.

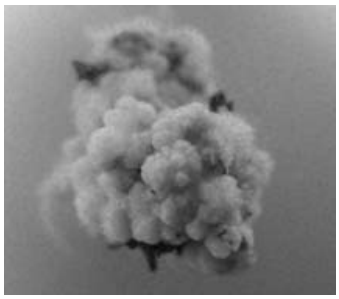
نتایج و بحث

در ریزنمونه‌های برگی علائم متورم شدن بافت بعد از ۱۰ روز قابل مشاهده بود و در هفته سوم کالوس‌ها بر روی سطح ریزنمونه‌ها مشاهده شدند.

کالوس‌ها بیشتر از محل زخم‌هایی که عمود بر رگبرگ‌های روی بافت پهنک ایجاد شده بودند، تشکیل شدند و به منظور کسب توانایی اولیه تولید جنین به محیط کشت MS با تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و BAP منتقل شدند (شکل۲). استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد NAA که اکسینی ضعیف‌تر است، به منظور کمک به جنین‌زایی کالوس‌ها صورت گرفت. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها برای ارزیابی اندازه کالوس‌ها در محیط کشت MS حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D با غلظت ۴/۵ میکرومولار و NAA با غلظت ۰/۵ میکرومولار نشان داد که ارقام فلیم سیدلس و بیدانه قرمز تفاوت معنی‌داری از نظر اندازه کالوس نداشتند و تنظیم‌کننده‌های رشد NAA میزان رشد کالوس‌ها را تا حدودی کاهش داد که خود در جنین‌زایی کالوس‌ها در مراحل بعد مؤثر است، ولیکن این اختلاف به حد معنی دار نرسید (جدول۱).

تأثیر ژنوتیپ با رشد بیشتر کالوس‌های رقم بیدانه قرمز (میانگین ۱۸/۰۶۲) نسبت به رقم فلیم سیدلس

(میانگین ۱۷/۶۹) مشخص بود ولی این تفاوت نیز به حد معنی‌دار شدن نرسید. کالوس‌های رقم بیدانه قرمز در محیط MS حاوی 2,4-D رشد بیشتری نشان دادند و کمترین رشد مربوط به کالوس‌های رقم فلیم سیدلس در محیط حاوی NAA بود. در تحقیقی مشابه انگیزش کالوس در محیطNN حاوی 2,4-D با غلظت ۲ میکرومولار و BAP با غلظت ۹ میکرومولار و در مرحله بعد جنین‌زایی کالوس‌ها در محیط NN حاوی NAA با غلظت ۱۰ میکرومولار با موفقیت انجام شد، ولیکن در این پژوهش نیز تفاوت معنی‌داری بین NAA و 2,4-D از نظر تأثیر بر جنین‌زایی مشاهده نشد (Salunkhe et al., 1999). در حالی که در آزمایش دیگر استفاده از IAA با غلظت ۱ میکرو مولار و BAP با غلظت ۶/۶ میکرومولار برای تحریک جنین‌زایی در انگور موفقیت‌آمیز بود (Popescu et al., 1995). ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی 2,4-D با غلظت ۹ میکرومولار و BAP با غلظت ۴/۴ میکرومولار برای انگیزش کالوس‌های جنینی از انگور موسکادین با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است (Robacker, 1993). Matsuta & Hirabayashi (1989) نشان دادند که محیط کشت NN حاوی NAA و IAA به جای محیط کشت NN حاوی IAA و 2,4-D برای جنینی‌زایی در ارقام *Vitis vinifera* L. مناسب نبود. در تمامی آزمایش‌های انجام شده حضور یک اکسین ضروری می‌باشد که نشان‌دهنده ضرورت وجود این گروه از تنظیم‌کننده‌های رشد می‌باشد. گروه اکسین علاوه بر تحریک تولید کالوس در مراحل اولیه تولید کالوس، می‌تواند در مراحل بعدی برای تحریک جنین‌زایی در غلظت‌های پایین‌تر تأثیرگذار باشد.



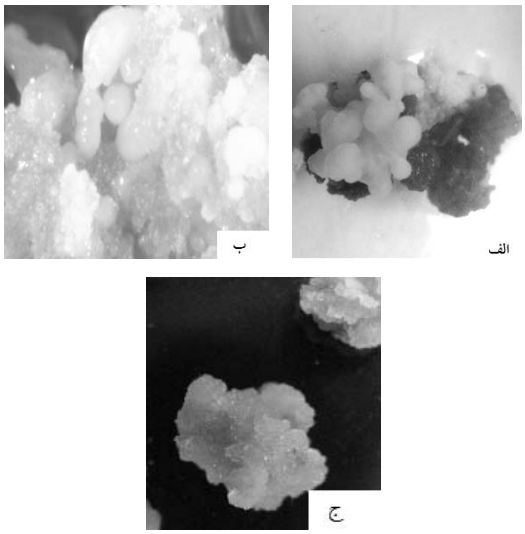
شکل ۲- انگیزش کالوس از ریزنمونه‌های برگی با بزرگنمایی ۱۲ برابر (مناسب برای انتقال به محیط جنین‌زایی)

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر دو تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و NAA در محیط MS و رقم بر اندازه کالوس تولید شده

منبع تغییرات	درجه آزادی	MS_e
ژنوتیپ	۱	۰/۵۶۳$^{n.s}$
هورمون	۱	۰/۰۵۲$^{n.s}$
ژنوتیپ×هورمون	۱	۰/۰۸۶$^{n.s}$
خطا	۱۲	۳/۰۰۶

n.s عدم معنی دار بودن را نشان می‌دهد.

در این آزمایش همچنین نمونه‌های برگی کشت شده دو رقم بیدانه قرمز و فلیم سیدلس از لحاظ تولید جنین‌های سوماتیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این ارزیابی، کالوس‌ها به دو گروه: کالوس‌های جنینی و کالوس‌هایی فاقد ساختار جنینی تقسیم شدند (شکل۳). در کالوس‌هایی که فاقد ساختار جنینی بودن بافت کاملاً نرم و آبکی بودن کالوس‌ها قابل مشاهده بود. این کالوس‌ها با ضربه‌های اسکالپر از هم پاشیده شده و تقسیمات سلولی بدون تمایزیابی به سمت تولید جنین ادامه یافت. در کالوس‌های دارای ساختار جنینی توده‌های فشرده سلولی با رنگ کرم و رشد کم، جنین‌های گلوله‌ای و بعد از آن جنین‌های قلبی شکل بر سطح کالوس مشاهده شد.



شکل ۳- کالوس‌های دارای ساختار جنینی در مراحل اولیه (الف- بزرگنمایی ۱۲ برابر)، جنین‌های سوماتیکی (ب- بزرگنمایی ۱۶ برابر)، کالوس‌های بدون ساختارجنینی (ج- بزرگنمایی ۱۲ برابر)

نتایج آزمون کای اسکوئر نشان داد که تیمار رقم انگور (بیدانه قرمز و فلیم سیدلس) در سطح یک درصد معنی‌دار بود (χ^2=۹/۳۹; p=۰/۰۱).

مقایسه توانایی دو رقم در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف IAA و BAP برای تولید جنین نشان داد که رقم فلیم سیدلس نسبت به رقم بیدانه قرمز برای تولید جنین در تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشدی اعمال شده موفق‌تر عمل کرده است (شکل ۴). رقم بیدانه قرمز ۳۱/۴٪ توانایی تولید جنین را داشت، در حالی که رقم فلیم سیدلس به میزان ۶۸/۶٪ در تولید جنین موفق بود.

Das et al. (2002) با بررسی جنین‌زایی چهار رقم انگور (پوسا سیدلس[1]، بیوتی سیدلس[2]، پرلت[3] و ناشیک[4]) ناشیک[4]) در محیط MS با تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین جنین‌زایی را در رقم پوسا سیدلس مشاهده کردند. در تحقیقی Passos et al. (1999)، اگرچه موفق به تولید کالوس بر سطح ریزنمونه‌های برگی برخی از ارقام انگور گردید، ولیکن کالوس‌های تولید شده، قادر به تولید جنین نبودند. کالوس‌های با بافت فشرده دارای خصوصیات کالوس‌های جنین‌زا بودند و با نتایج محققین دیگر (Lopez et al., 2005) که بیشترین تولید کالوس‌های جنین‌زا را به میزان ۵۲/۵٪ را در رقم سوگرائن[5] گزارش نمودند، شباهت داشت. در برخی دیگر

1. Pussa Seedless
2. Beuty Seedless
3. Perrlete
4. Nashik
5. Sugraone

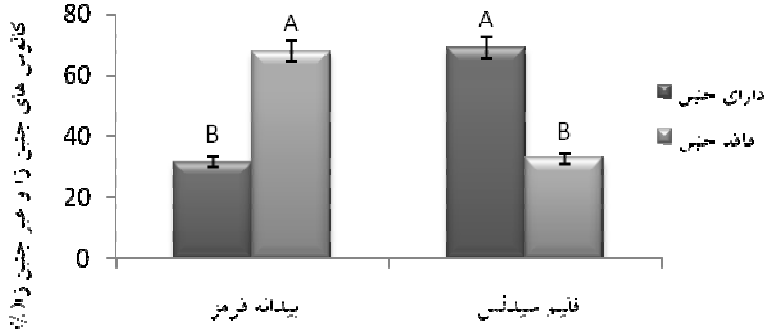
دیگر از کارهای تحقیقاتی تولید کالوس جنین‌زا را به میزان ۳۰/۴٪ در رقم سوپریور سیدلس[6] و در رقم کرنت ساوینون[7] را به میزان ۴۳/۶٪ گزارش نمودند (Perl et al., 1996; Mauro et al., 1986). در مطالعه دیگر با نتایجی مشابه تولید کالوس جنین‌زا از ریزنمونه بساک در پایه *V. riparia* را در حدود ۵۱/۳٪ گزارش شد (Bouquet & Lamaison, 1982).

تأثیر تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد بر جنین‌زایی نیز تجربه گردید. آزمون کای اسکوئر برای این تیمارها نیز در سطح یک درصد معنی‌دار شد(χ^2 =۲۸/۴۶; p=۰/۰۱). در بین تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد اعمال شده، بهترین محیط کشت، محیط کشت پنجم با ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود که در آن بیشترین جنین‌زایی در سطح کالوس‌ها مشاهده شد و بعد از آن به ترتیب محیط‌های هشتم، اول، دوم، سوم، نهم و بالاخره محیط کشت ششم قرار داشتند. محیط کشت چهارم با ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و محیط کشت هفتم با ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و۲ میلی‌گرم در لیتر BAP تولید جنین‌های سوماتیکی را تحریک نکردند.

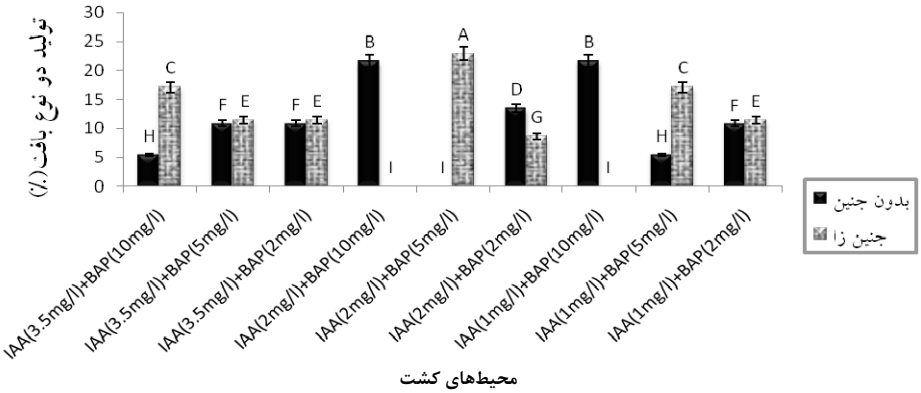
محیط کشت‌های هشتم و اول، دوم، سوم و نهم تفاوت معنی‌داری در تولید جنین‌های سوماتیکی نشان ندادند (شکل ۵).

مطالعات انجام شده بر جنین‌زایی ارقام انگور

6. Superior Seedless
7. Cabernet Sauvignon



شکل ۴- نمودار اثر رقم بر جنین‌زایی در دو رقم انگور



شکل ۵- نمودار اثر محیط کشت بر میزان تولید دو نوع بافت کالوس جنین‌زا و غیر جنین‌زا

سوگرائن و کریمسون سیدلس[1] نشان داد که توانایی جنین‌زایی کالوس‌ها و غلظت BA (۱/۳ میلی‌گرم در لیتر) رابطه مستقیم دارند (Lopez et al., 2005). در آزمایش دیگر محققان غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و 2,4-D را بر جنین‌زایی ریزنمونه‌های برگی در محیط MS بررسی کردند. نتایج نشان داد تنها محیطی که جنین‌زایی را در ریزنمونه‌های برگی کشت شده تحریک نمود، محیط MS با تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D به میزان ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و BAP به میزان یک میلی‌گرم در لیتر بود (Das et al., 2002). در پژوهش انجام شده نیز تأثیر غلظت‌های مختلف نیز برجنین‌زایی تأیید گردید. با بررسی نتایج حاصل از این آزمایش و مقایسه تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشدی به کار رفته مشخص شد که ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی به کار رفته در محیط کشت پنجم توانسته جنین‌زایی بیشتری را در ارقام بیدانه قرمز و فلیم سیدلس ایجاد کند. جنین‌زایی به وسیله تعامل دو تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و IAA تحریک می گردد. همچنین باید توجه داشت که هر رقم نیز دارای سطوح تنظیم‌کننده رشدی متفاوت با رقم دیگر بوده و تعامل سطوح تنظیم‌کننده‌های رشدی بکار رفته در محیط کشت و ریزنمونه رقم مورد آزمایش به طور مؤثری جنین‌زایی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در مطالعه‌ای که بر روی انگور رقم سیوال بلانک[2] انجام شد، تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد NOA با غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر و TDZ با غلظت ۰/۹ میلی‌گرم در لیتر در محیط NN بیشترین میزان تولید کالوس‌های جنین‌زا را موجب شد (Reustle et al., 1995). با تغییر نوع رقم انگور، نوع تنظیم‌کننده رشد و غلظت آن برای کسب بالاترین میزان جنین‌زایی تغییر می‌یابد. در بررسی تأثیر نوع محیط کشت بر انگیزش کالوس جنین‌زا در رقم گرزترایزر[3] نشان داده شد که محیط‌های NN، (Nitsch & Nitsch, 1969)، C2 (Torregrosa, 1998) و B (Martinelli et al., 2001) و همچنین محیط‌های B1 و B2 (Perrin et al., 2001) (مشتق شده از محیط‌های B و MPM)، روی انگیزش کالوس‌های جنین‌زا مؤثر بودند. محیط NN کمترین میزان تولید کالوس‌های جنین‌زا و محیط B حداکثر آن را تولید کرد. محیط کشت MS، محیط پایه B است، بنابراین محیط‌های کشت با پایه MS، برای انگیزش کالوس جنین‌زا مناسب هستند (Perrin et al., 2004). مقایسه محیط کشت‌های C1، HT وPIV برای انگیزش کالوس جنین‌زا در ارقام شیراز[4]، شیراز[4]، کبرنت ساوینون[5] و سمیلون[6] و شاردونه نشان داده است که محیط HT (محیط پایه NN+۱۰ میکرو مولار 2,4-D و ۵ میکرومولار TDZ) بیشترین میزان تولید کالوس جنین‌زا را داشت و پس از آن محیط PIV قرار گرفت (Iocoo & Frank, 2001).

1. Crimson Seedless
2. Seyval blanc
3. Gewurztraminer
4. Shiraz
5. Cabernet Sauvignon
6. Semillon

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج آزمایش انجام شده، رقم و نوع محیط کشت مورد استفاده بر جنین‌زایی کالوس‌های به دست آمده از کشت ریزنمونه برگ مؤثر بودند. کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد با غلظت‌های متفاوت در هر مرحله باعث تولید بافت‌های متفاوتی می‌شود. کاربرد اکسین‌هایی همچون 2,4-D برای انگیزش کالوس از ریزنمونه‌ها مناسب می‌باشد. تنظیم‌کننده‌های رشد مانند NAA اگرچه رشد کالوس‌ها را به طور معنی‌داری افزایش نداد، ولی کالوس‌های به دست آمده را به تولید و تمایز ساختارهای اولیه جنینی تحریک نمود که با فشرده شدن بافت برخی از نواحی کالوس قابل تشخیص بود و در مرحله بعد کاربرد نسبت مناسب دو تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و IAA تولید جنین در این نواحی را باعث شد. در غلظت‌های مناسب، بخصوص در ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شده در محیط کشت پنجم جنین‌ها با ساختار کروی و قلبی شکل در هفته سوم قابل مشاهده بودند (شکل۳). رقم فلیم سیدلس نسبت به رقم بیدانه قرمز در تولید جنین‌های سوماتیکی از سطح ریزنمونه‌ها، بهتر عمل نمود. اثر نوع رقم بر جنین‌زایی نیز به سطوح تنظیم‌کننده‌های رشدی درون بافتی مربوط است و موفقیت هر رقم در محیط مناسب با تیمار تنظیم‌کننده‌های رشدی به کار رفته در آن محیط وابسته است. نتایج این تحقیق نشان داد که ریزنمونه برگی می‌تواند در تولید کالوس‌هاس جنین‌زا موفق باشد. لذا با توجه به در دسترس بودن این اندام در طول سال لازم است تحقیقات بیشتری بر روی این نوع ریزنمونه نه تنها در ارقام بررسی شده بلکه در سایر ارقام مهم نیز انجام شود تا بتوان با بهینه نمودن شرایط کشت و نگهداری ریزنمونه‌های برگی به میزان کافی کالوس‌های جنین‌زا در ارقام مهم تجاری تولید نمود و زمینه برای شروع تحقیقات انتقال ژن فراهم گردد. همچنین لازم است تا تحقیقات انجام شده در جهت تولید گیاه از جنین‌های تولید شده، ادامه یابد.

REFERENCES

1. Bouquet, A. & Lamaison, B. (1982). Influence du genotype sur la production de cals, d embryoides et de plantes entieres par culture d anther *In vitro* dans le genre vitro dans le genre *Vitic*. *CR Acad Sci*, 295, 569-574. (In French).
2. Carimi, F., Barizza, E. & Gardiman, M. (2005). Somatic embryogenesis from Stigma and styles of grapevine. *In Vitro Cell*. *Development Biology Plant*, 41, 249–252.
3. Colova-Tsolova, V. & Jiang, L. (2001). *Genetically Engineered Grape for Seedless and Stess Tolerance*. (ASEV52nd Annual meeting), Sandieg California: 1-1
4. Das, D. K., Reddy, M. K., Upadhyaya, K. C. & Sopory, S. K. (2002). An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*, 20, 999-1005.
5. Hardie, J. & Robinson, S. (2005). *Gene techology*. Cooperative Research Centre for Viticulture (CRCV).
6. Iocoo, P. & Frank, T. (2001). Gentic transformation of major wine grape cultivar of *Vitis vinifera* L. *Transgenic Research*, 10, 105-112.
7. Jayasankar, S., Bhaskar, R. & Gary, D. J. (2003). Comparative anatomy and morphology of *Vitis vinifera* (Vitaceae) somatic embryos frome solid and liquid culture-derived proembryogenic masses. *American Journal of Botany*, 90(7), 973–979.
8. Lopez-perez, A. J., Carreno, J., Martinez, A. & Dabauza, M. (2005). High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. *Vitis*, 44, 79-85.
9. Martinelli, L., Gribaudo, I., Bertoldi, D., Cadioli, E. & Poletti, V. (2001). High efficiency somatic embryogenesis and plant germination in grapevine cultivar Chardonnay and Brachetto a grappolo lungo. *Vitis*, 40, 111-115.
10. Matsuta, N. & Hirabayashi, T. (1989). Embryogenic cell lines from somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*, 7, 684–687.
11. Mauro, C. I., Nef, C. & Fallot, J. (1986). Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet- Sauvignon. *Plant Cell Reports*, 5, 377-380.
12. Mullins, M. G. & Srinivasan, C. (1976). Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet-sauvignon) by apomixes *in vitro*: *Journal of Experimental Botany*, 27, 1022-1030.
13. Nitsch, J. P. & Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163, 85–87.
14. Passos, I. R. S., Appezzato-Da-Glora, B. & Vienera, M. L. C. (1999). Embryogenic responses of *Vitis*

spp.: Effect of genotype and polyvinylpyrrolidone. *Vitis*, 38, 47-50.
15. Perl, A., Gollop, A., Lipsky, A., Holland, D., Sahar, N., Or, E. & Elyasi, R. (1996). Regeneration and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 2, 188-193.
16. Perrin, M., Gertz, C. & Masson, J. E. (2004). High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19-grapevine genotype grown worldwide. *Plant Science*, 167, 1343-1349.
17. Perrin, M., Martin, D., Joly, D., Demangeat, G., This, P. & Masson, J. E. (2001). Medium-dependent response of grapevine somatic embryogenic cells. *Plant Science*, 161, 107-116.
18. Popescu, C. F., Gorenflot, R. & Raicu, P. (1995). Somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* L. *Annual Review of Cell and developmental biology*, 18, 15–20.
19. Reustle, G., Harst, M. & Alleweldt, G. (1995). Plant regeneration of grapevine (*Vitis* sp.) protoplast isolated from embryogenic tissue. *Plant Cell Reports*, 15, 238-241.
20. Robacker, C. (1993). Somatic embryogenesis and plant regeneration from muscadine grape leaf explants. *Horticulture Science*, 28, 53–55.
21. Salunkhe, C. K., Rao, P. S. & Mhatre, M. (1999). Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in anther callus of *Vitis latifolia* L. *Plant Cell Reports*, 18, 670-673.
22. Stemp, J. A. & Meredith, C. P. (1987). Somatic embryogensis from leave and anthers of grapevine. *Scientia Horticulturae*, 35, 235-250.
23. Torregrosa, L. (1998). A simple and efficient method to obtain stable embryogenic cultures from anthers of *Vitis vinifera* L.. *Vitis*, 2, 91–92.