مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۳، شماره ۱، ۱۳۹۱ (۱۱-۱)

تولید پینه رویان‌زا در چهار رقم انگور (*Vitis vinifera* L.) با استفاده از کشت بساک و گل کامل

مریم کریمی علویجه[1*]، علی عبادی[2] و منصور امیدی[3]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادان پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۲۲ - تاریخ تصویب ۸۹/۱/۲۹)

چکیده

با توجه به اهمیت اقتصادی انگور به عنوان یکی از محصولات مهم باغی کشور، اصلاح این میوه در جهت بهبود صفات نامطلوب مد نظر قرار گرفته است. امروزه استفاده از روشهای مولکولی برای اصلاح گیاهان اهمیت خاصی پیدا کرده است. لازمه انجام برنامه های انتقال ژن وجود امکانات و بافتهای مناسب گیاهی می باشد که به عنوان مثال می توان به پینه رویان زا اشاره نمود. در این پژوهش انگیزش پینه رویان‌زا با کشت ریز نمونه‌های بساک و گل کامل چهار رقم انگور بیدانه قرمز، فلیم سیدلس، شاهرودی و پرلت مورد بررسی قرار گرفت. این ریز نمونه ها حدود ۱۲-۱۰ روز قبل از باز شدن گلها از باغ جمع آوری شده و در دو محیط کشتPIV و Harst کشت شدند. نتایج نشان داد که ریزنمونه گل کامل در رقم فلیم سیدلس در محیط کشت PIV توانایی بیشتری در تولید پینه داشت. بعد از مرحله انگیزش، پینه‌ها به منظور رویان‌زایی به محیط کشت GS1CA منتقل شدند. در این محیط رقم شاهرودی نسبت به سه رقم دیگر در تولید پینه‌های رویان‌زا موفق‌تر عمل کرد و فقط ریزنمونه بساک توانایی تولید پینه‌های رویان‌زا را داشت.

واژه های کلیدی: **انتقال ژن، محیط کشت، ریز نمونه**

مقدمه

انگور (**Vitis vinifera** L.) یکی از مهمترین محصولات باغی جهان است. ارقام تجاری انگور علاوه بر داشتن صفات مطلوب، دارای نقاط ضعفی مانند حساسیت به آفات و بیماری‌ها هستند. بنابراین اصلاح این ارقام برای کسب صفاتی مانند مقاومت به بیماری‌ها و آفات و بالا بردن کیفیت و کمیت محصول ضروری است. اصلاح ژنتیکی انگور با استفاده از روش‌های کلاسیک به علت فاز نونهالی طولانی، پلی پلوئیدی و هتروزیگوتی بالا دارای محدودیت است (Gary & Benton, 1991 ، Nakano et al., 1997). بنابراین تکنولوژی‌های جدید از جمله بیوتکنولوژی گیاهی و انتقال ژنهای مطلوب می‌تواند ابزاری مفید برای اصلاح انگور باشند (Kuksova et al., 1997). با این حال، وجود بافت مناسب (رویان‌های رویشی) که توانایی پذیرش ژن‌های مورد نظر را داشته و در مراحل بعد بتواند به گیاه کامل تبدیل شود، لازمه تولید گیاهان تراریخت است. رویان‌زایی رویشی نه تنها در فرآیند انتقال ژن کاربرد دارد، بلکه به دلیل ایجاد تنوع سوماکلونال[1] در برنامه‌های اصلاحی نیز مورد استفاده

1. Somaclonal variation

* نویسنده مسئول: مریم کریمی علویجه تلفن: ۰۹۱۳۳۱۴۳۸۹۴ E-mail: m_karimi_a61@yahoo.com

قرار می‌گیرد. رویان‌های رویشی همچنین برای حفظ ژرم پلاسم گیاهی نمونه‌های مطلوبی هستند (Gary & Benton, 1991).

رویان رویشی به طور مستقیم از ریزنمونه یا بطور غیرمستقیم از بافت پینه ایجاد می شود. تلاش برای تولید رویان‌های رویشی در انگور از اوخر دهه ۱۹۷۰ آغاز شد و موفقیت در تولید رویان‌های رویشی برای اولین بار در انگور رقم کابرنت ساوینون حاصل شد(Mullins & Srinivasan, 1976).

موفقیت در تولید رویان‌های رویشی تحت تاثیر عوامل مختلف از جمله ژنوتیپ (Perrin et al., 2004; Perrin et al., 2001) و نوع ریزنمونه است. تولید رویان‌های رویشی با استفاده از ریزنمونه های مختلف و در ژنوتیپ‌های متفاوتی از انگور، گزارش شده است . (Bouquet et al., 1982; Mauro et al., 1986; Stamp & Meredith, 1988; Martinelli et al., 2001). ریز نمونه بساک نسبت به ریزنمونه های دیگر، رویان‌زایی رویشی بیشتری را در ارقام نشان میدهد. تولید رویان-های رویشی با استفاده از ریزنمونه های برگ، دمبرگ و ساقه (Stamp & Meredith, 1988; Krul & Worley, 1977)، پیچک، تخمدان و بساک (Gribaudo et al., 2004; Perl et al., 1996; Stamp & Meredith, 1988) و ریزنمونه های نابالغ کلاله و خامه (Carimi et al., 2005) گزارش شده است. تولید رویان‌های رویشی با کشت گل کامل در پایه مو شماره 110R و رقم Chardonnay با موفقیت انجام شد (Gribaudo et al., 2004). مرحله نمونه گیری از گلهای انگور نیز بر موفقیت رویان‌زایی رویشی موثر است.

پژوهشگران بهترین زمان نمونه گیری را بر اساس تعداد روزهای قبل از گلدهی، طول و رنگ بساک و مرحله میکروسپوری آن دانسته اند (Gribaudo et al., 2004). مطالعات دیگری برای بررسی و تشخیص رابطه بین مرحله مناسب در میوز و شکل ظاهری بوسیله Cersosimo (1987) انجام شد. وی بر اساس مشاهدات خود اظهار نمود که بساک انگور در مرحله تولید تترادها شفاف و به رنگ سبز با سایه زرد است. همچنین در این مرحله بین گلبرگ ها خط باریکی بوجود می آید و طول بساک ۰/۲ تا ۰/۳ میلیمتر و در برخی ارقام تا ۱ میلیمتر نیز می‌رسد. از نظر زمانی ۱۵-۱۰ روز قبل از باز شدن گل ها، زمان مناسبی برای نمونه‌گیری است (Gary & Perrin et Mortensen, 1986; Nakano et al., 1997 al., 2004;). از دیگر عوامل موثر در موفقیت رویان‌زایی رویشی، محیط کشت مناسب است. اثر شکل فیزیکی محیط (مایع یا جامد) روی رویان زایی انگور مطالعه شده است. با مقایسه رویان‌زایی دو همگروه(کلون) از رقم Chardonnay با شماره‌های 01Ch و 02Ch در دو محیط جامد و مایع ، مناسب تر بودن محیط کشت جامد برای رویان‌زایی این دو همگروه نشان داده شد (Jayasankar et al., 2003). کاربرد برخی مواد در محیط کشت نیز رویان‌زایی در انگور را تحت تاثیر قرار می دهد. زغال فعال رویان‌زایی ارقام Crimson Seedless و Don Marriano را افزایش داد (Lopez et al., 2005).

میزان آمونیوم موجود در محیط کشت نیز بر رویان-زایی موثر است. کشت بساک ارقام 110R, Chardonnay, Riesling, Merlot, Pinot noir و Cabernet Sauvignon در محیط کشت MPM2 که حاوی ۹ میلی مولار آمونیوم بود، نسبت به محیط MPM که در آن ۱۶/۵ میلی مولار آمونیوم وجود داشت، رویان‌زایی بیشتری نشان داد (Perrin et al., 2001). از سوی دیگر، بررسی اثر ساکارز به میزان ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰و ۱۸۰میلی‌گرم در لیتر بر رویان‌زایی رقم تامسون سیدلس نشان داد که بیشترین میزان رویان‌زایی در محیط کشت حاوی ۶۰ میلی‌گرم ساکارز حاصل می شود (Michael et al., 1993).

این پژوهش به منظور بررسی تولید پینه رویان‌زا توسط ریز نمونه‌های بساک و گل کامل چهار رقم انگور(بیدانه قرمز، فلیم سیدلس، شاهرودی و پرلت) در دو محیط کشت Harst و PIV انجام شد.

مواد و روش‌ها

بازدید مرتب از گل آذین ارقام انگور مورد آزمایش و نمونه‌گیری از آن ها برای بررسی وضعیت گل ها و بساک‌ها در فروردین و اردیبهشت سال ۱۳۸۶ انجام شد. خوشه‌های گل حدود ۱۲-۱۰ روز قبل از شکوفایی برداشت شدند. خوشه گل در این زمان دارای گل‌های نسبتا فشرده بود و بساک ها در زمان نمونه‌گیری رنگ

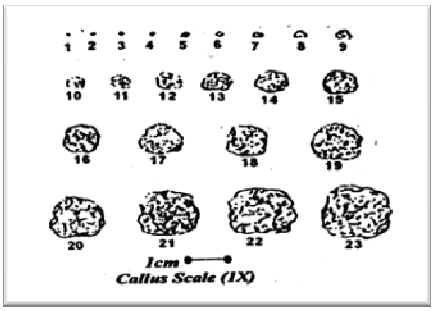
شفاف و تقریبا سبز داشته (شکل ۱) و بسته به رقم حدود ۲-۱ میلیمتر طول داشتند. گل آذین‌ها در آزمایشگاه به قطعات کوچکتر تقسیم و با آب و مایع ظرفشویی شستشو شدند. در مرحله بعد گل آذین‌ها برای اعمال تیمار سرما داخل ظروف در بسته قرار داده شده ودر دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند.

شکل ۱- نمایی از گل آذین (راست) و بساک ها (چپ) در زمان نمونه گیری

ضد عفونی نهایی و کشت ریزنمونه‌ها در داخل هود استریل انجام شد. برای ضد عفونی نمونه‌ها از تیمار هیپوکلریت کلسیم به میزان ۷٪ همراه با ۳ قطره توین ۲۰ (به ازاء هر لیتر محلول هیپوکلریت کلسیم) به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. سپس نمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند. به منظور کشت ریزنمونه-های بساک، گل ها زیر بینوکولر با استفاده از پنس و سوزن باز شده و بساک‌ها همراه با میله پرچم از کاسه گل جدا گردیدند، در مرحله بعد از سمت سطح شکمی بر روی همان محیط‌های کشت انگیزش پینه (NN PIV macro, Ms micro, B5 vitamin, Fe/EDTA, 2,4-D, BAP) و Harst (NN macro, Ms micro, B5 vitamin, Fe/EDTA, 2,4-D, TDZ) قرار گرفتند. ریز نمونه‌های گل کامل نیز، بعد از جدا سازی از گل آذین روی محیط کشت انگیزش پینه (PIV) قرار گرفتند. کشت ریز نمونه‌ها بسته به زمان مناسب نمونه گیری در ارقام مختلف، از تاریخ ۸۷/۲/۱۵ تا ۸۷/۲/۳۰ در چهار تکرار (هر تکرار یک پتری دیش به قطر ۹ سانتیمتر و هر پتری دیش شامل ۲۰ ریزنمونه) انجام شد.

برای انگیزش تشکیل پینه، پتری‌های حاوی محیط کشت و ریز نمونه‌های کشت شده، در شرایط تاریکی کامل و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از دو هفته کالوس ها روی ریزنمونه‌های گل کامل ظاهر شدند ولی در این زمان ریزنمونه‌های بساک پینه تولید نکردند. ریزنمونه‌های بساک۷ هفته پس از کشت تولید پینه نمودند. داده برداری از میزان رشد پینه‌ها بر اساس مقیاس هوکرونی برز(شکل ۲)، برای اولین بار در تاریخ ۸۷/۴/۱۰ و بعد از آن در تاریخ ۸۷/۵/۲۲ از ریزنمونه‌های کشت شده در محیط های کشت PIV و Harst انجام شد. پس از سه ماه پینه های ایجاد شده روی ریزنمونه-های گل کامل و بساک برای رویان‌زایی به محیط (NN macro, Ms micro, B5 vitamin, Fe/EDTA, NOA, GS1CA BAP, IAA) منتقل شدند.

شرایط نگهداری در این مرحله نیز تاریکی و دمای ۲۵ درجه بود. پینه‌ها هر چهار هفته یکبار روی این محیط واکشت شدند. داده برداری از ویژگی کیفی بافت پینه‌ها پس از دو ماه در محیط GS1CA انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه قرار گرفتند. برای تجزیه داده‌های کیفی از نرم افزار SPSS استفاده شد و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار EXCEL انجام شد.



شکل۲- الگوی مورد استفاده جهت اندازه گیری پینه (هوکرونی برز، ۲۰۰۱)

نتایج و بحث

بطور کلی ریزنمونه‌های گل کامل زودتر از بساک شروع به تولید پینه نمودند. برخی از ریز نمونه‌های گل کامل متورم شده و حدود دو هفته بعد از کشت پینه ایجاد نمودند. در کشت ریزنمونه‌های بساک، تولید پینه به مدت زمان بیشتری نیاز داشت و مشاهده پینه بر روی بساک-ها ۷-۶ هفته طول کشید.

Meredith & Stamp (1988) تولید پینه از ریزنمونه‌های بساک را بعد از گذشت ۴۰ روز گزارش کردند. رنگ بساک‌ها بعد از قرارگیری در

محیط کشت از سبز شفاف به رنگ قهوه ای روشن تغییر پیدا کرد.

مشاهدات انجام شده نیز تغییر رنگ بساک‌ها را در محیط کشت بعد از دو هفته تایید نمود. در کشت ریزنمونه‌های بساک وجود میله بساک برای تولید پینه لازم است، ریزنمونه‌های بساکی که طی جداسازی صدمات زیادی دیده بودند، بعد از مدتی سیاه شده و توانایی تولید پینه را از دست دادند (Salunkhe et al., 1999).

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اندازه پینه‌ها در محیط کشت های PIV و Harst در تاریخ۸۷/۴/۱۰ و ۸۷/۵/۲۲ نشان داد که عوامل ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، محیط کشت و زمان یادداشت برداری بر اندازه پینه‌ها اثر معنی دار داشتند (جدول۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ، محیط کشت، ریز نمونه و زمان یادداشت برداری بر میزان رشد پینه های تولید شده

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
زما ن	۱	۴۱۰/۴۸ **
ژنوتیپ×زمان	۳	۵/۶۲**
محیط کشت× زمان	۱	۲۱/۰۱**
ریزنمونه×زمان	۱	۳۶/۹۴**
ژنوتیپ×محیط کشت×زمان	۳	۲/۷۹ *
ژنوتیپ×ریزنمونه×زمان	۳	۸/۳۸**
محیط کشت×ریزنمونه×زمان	۱	۰/۱۵۸ ns
ژنوتیپ×محیط کشت×ریزنمونه×زمان	۳	۰/۶۳۶ ns
خطای(a)	۶	۱/۳۲
ژنوتیپ	۳	۷۶/۲۱**
محیط کشت	۱	۲۸۱/۴۲**
ژنوتیپ×محیط کشت	۳	۱۳/۶۹**
ریزنمونه	۱	۲۰۸۷/۳۳**
ژنوتیپ×ریزنمونه	۳	۱۰۲/۲۰**
محیط کشت×ریزنمونه	۱	۷۰/۳۶**
ژنوتیپ×محیط کشت×ریزنمونه	۳	۲/۳۸*
خطا	۸۵	/۹۸۶

**: معنی دار در سطح ۱٪، *: معنی دار در سطح ۵٪ و ns: معنی دار نیست.

ریزنمونه‌های گل کامل در مقایسه با بساک، پینه‌هایی با اندازه بزرگتر ایجاد نمودند(جدول ۲). احتمالا علت رشد بیشتر پینه‌های تولید شده از ریز نمونه‌های گل کامل، بزرگتر بودن ریزنمونه و همچنین وارد آمدن آسیب کمتر به آن طی جداسازی گل ها از گل آذین است. از علل دیگر رشد بیشتر پینه‌های فوق‌الذکر، شروع زودتر پینه‌زایی در ریزنمونه‌های گل کامل و همچنین داشتن بافت همراه که شرایط تامین مواد غذایی برای رشد بیشتر را تامین می‌نمود، می باشد. بررسی‌های Gambino et al.(2007) سه ماه بعد از کشت ریزنمونه‌های گل کامل، بساک و تخمدان در محیط PIV، نشان داد که ۹۲٪ از گل ها، ۷۰٪ از تخمدان‌ها و ۲۲٪ از بساک‌ها قادر به تولید پینه در این محیط بودند.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات ریز نمونه، محیط کشت، زمان یادداشت برداری و رقم بر اندازه پینه های تولید شده

تیمار		اندازه پینه(مقیاس هوکرونی برز)
ریز نمونه	گل کامل	۱۰/۰۷ a
	بساک	۱/۵۷ b
محیط کشت	PIV	۷/۲۶ a
	Harst	۴/۲۰ b
زمان یادداشت برداری	۸۷/۴/۱۰	۳/۸۳ b
	۸۷/۵/۲۲	۷/۵۸ a
رقم	شاهرودی	۵/۲۴c
	بیدانه قرمز	۳/۴۵d
	فلیم سیدلس	۷/۶۳a
	پرلت	۶/۴۳b

*: حروف غیر مشابه در کنار اعداد نشانگر معنی دار بودن و حروف مشابه نشانگر غیر معنی دار بودن اختلاف در می باشد.

ریزنمونه‌های کشت شده در محیط PIV رشد بهتری نسبت به کشت آنها در محیط Harst داشتند (جدول ۲) Gribaudo et al. (2004) و Gambino et al. (2007) محیط کشت PIV را برای انگیزش پینه رویان زا در ارقام انگور 110R, Brachetto, Muller Thurgau, Grignolinoو Chardonnay مورد استفاده قرار دادند. بررسی تاثیر نوع محیط کشت بر انگیزش پینه در بساک رقم Gewurztraminer نشان داد که محیط‌های (Nitsch & Nitsch, 1969) NN ، (Torregrosa, 1998) C2 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 پینه‌های رویان‌زا موثر بودند.

محیط NN کمترین میزان پینه‌های رویان‌زا و محیط B حداکثر آن را تولید کرد. محیط پایه و اصلی محیط کشت B، عناصر ماکرو و میکرو محیط کشت MS است، بنابراین محیط‌های کشت با پایه MS، برای انگیزش پینه مناسب تر هستند (Perrin et al.,2004). مقایسه محیط در مطالعات Iocoo et al.(2001) رقم Semilon نسبت به ارقام Shiraz، Chardonnay و Cabernet sauvignon در انگیزش پینه عملکرد بهتری داشت. تولید پینه‌های رویان زا در رقم Grenache نسبت به ارقام Cardinal و Cabernet Sauvignon بیشتر بود(Stemp & Meredith, 1988).

اندازه پینه‌های تولید شده در زمان‌های مختلف با

یکدیگر اختلاف داشت که نشان می دهد با گذشت زمان، تقسیمات سلولی و رشد پینه ادامه داشته است (جدول ۲).با بررسی اثر متقابل محیط کشت و رقم مشخص شد که رقم فلیم سیدلس در محیط کشت PIV و بعد از آن رقم شاهرودی و پرلت در همین محیط کشت بزرگترین پینه‌ها را ایجاد کردند. در محیط کشت Harst نیز بزرگترین پینه‌ها از رقم فلیم سیدلس بدست آمد. رقم پرلت در رتبه دوم و بعد از آن ارقام شاهرودی و بیدانه قرمز در رتبه سوم از نظر اندازه پینه‌های تولیدی در محیط کشت PIV قرار گرفتند (جدول ۳).

جدول ۳-مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم با محیط کشت، رقم با ریز نمونه و رقم با زمان یادداشت برداری بر اندازه پینه‌های تولید شده (مقیاس هوکرونی برز)

رقم × محیط کشت		رقم× ریز نمونه		رقم × زمان یادداشت برداری	
شاهرودی× PIV	۷/۷۲b	شاهرودی× گل کامل	۷/۲۷c	زمان (۸۷/۴/۱۰)× شاهرودی	۲/۸۰e
شاهرودی× Harst	۲/۷۵c	شاهرودی× بساک	۳/۲۰d	زمان (۸۷/۵/۲۲)× شاهرودی	۷/۶۷b
فلیم سیدلس× PIV	۸/۹۰a	شاهرودی× گل کامل	۱۳/۴۱a	زمان (۸۷/۴/۱۰) ×فلیم سیدلس	۶/۰۴c
فلیم سیدلس× Harst	۶/۴۳c	شاهرودی× بساک	۱/۴۶e	زمان (۸۷/۵/۲۲) × فلیم سیدلس	۹/۳۲a
پرلت× PIV	۷/۶۴b	شاهرودی× گل کامل	۱۲/۰۸b	زمان (۸۷/۴/۱۰) × پرلت	۴/۵۴d
پرلت× Harst	۵/۱۳d	شاهرودی× بساک	۱/۳۳e	زمان (۸۷/۵/۲۲) × پرلت	۸/۲۰b
بیدانه قرمز× PIV	۴/۵۵d	شاهرودی× گل کامل	۷/۰۸c	زمان (۸۷/۴/۱۰) × بیدانه قرمز	۱/۷۱f
بیدانه قرمز× Harst	۲/۴۲e	شاهرودی× بساک	۰/۵f	زمان (۸۷/۵/۲۲) × بیدانه قرمز	۵/۰۷d

*حروف غیر مشابه در کنار اعداد نشانگر معنی دار بودن اختلاف در هر ستون می باشد.

به طور کلی با بررسی اثر متقابل ریزنمونه و رقم مشخص شد که در تمامی ارقام، کشت گل کامل نسبت به کشت بساک پینه‌هایی با اندازه بزرگتر ایجاد کرد. ریزنمونه گل کامل رقم فلیم سیدلس بزرگترین و بساک رقم بیدانه قرمز کوچکترین پینه را ایجاد کرد. در مقایسه ارقامی که از ریزنمونه بساک آنها برای انگیزش پینه استفاده شد، رقم شاهرودی بزرگترین پینه را تولید کرد و بعد از آن ارقام فلیم سیدلس، بیدانه قرمز و پرلت قرار داشتند (جدول ۳). در پژوهشی اندازه پینه حاصل از ریزنمونه‌های گل کامل ارقام 110R، Grignolino و Chardonnay با اندازه پینه حاصل از ریز نمونه بساک برابر بود، در حالیکه در ارقام Thurgau Muller و g.l. Brachetto مهمترین عامل برای تحریک ریزنمونه‌ها به سمت تولید رویان سطوح تنظیم کننده های رشد بکار رفته در محیط‌های کشت می باشند. سطوح تنظیم کننده رشد در کنار میزان درونی هورمون ها می تواند رویان‌زایی را تحریک و یا از آن جلوگیری نماید. با توجه به تفاوت‌های موجود در ارقام به نظر می رسد هر رقم دارای سطوح هورمونی داخلی خاص خود می باشد و زمانی‌که در یک محیط کشت در کنار هورمون ویژه ای قرار می گیرد، عکس العمل خاص نشان داده که می‌تواند منجر به موفقیت یا عدم موفقیت در تولید پینه‌های رویان‌زا گردد. در ارقام مورد آزمایش محیط کشت PIV از لحاظ فراهم کردن سطوح هورمونی برای ریز نمونه‌های کشت شده بهتر عمل نمود.

اثر زمان یادداشت برداری طی دو مرحله داده برداری از پینه‌ها نشان داد که رقم فلیم سیدلس بیشترین و رقم بیدانه قرمز کمترین میزان رشد پینه را در زمان های یادداشت برداری داشتند (جدول ۳).اثر متقابل نوع ریز نمونه در محیط کشت (Harst و PIV) نشان داد که ریز نمونه‌ها در محیط کشت PIV نسبت

به محیط Harst تولید پینه‌های بزرگتری نمودند. گل های کامل در محیط کشت PIV پینه‌هایی بزرگتر و در محیط Harst پینه کوچکتری تولید کردند. ریز نمونه های بساک نیز چنین وضعیتی را از نظر میزان رشد در محیط کشت‌های مورد بررسی نشان دادند (جدول ۴).

جدول ۴-مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط کشت با نوع ریز نمونه، محیط کشت با زمان یادداشت برداری و زمان یادداشت برداری با نوع ریزنمونه بر اندازه پینه ها (مقیاس هوکرونی بر ز)

محیط کشت	نوع ریز نمونه		محیط کشت	زمان یادداشت برداری		نوع ریزنمونه	زمان یادداشت برداری	
PIV	گل کامل	a۱۱/۷۲	PIV	زمان (۸۷/۴/۱۰)	c۴/۹۶	گل کامل	زمان (۸۷/۴/۱۰)	b۷/۷۱
PIV	بساک	c ۲/۳۴	PIV	زمان (۸۷/۵/۲۲)	a۹/۶۴	بساک	زمان (۸۷/۴/۱۰)	d۰/۳۱
Harst	گل کامل	b۸/۱۸	Harst	زمان (۸۷/۴/۱۰)	d۲/۶۵	گل کامل	زمان (۸۷/۵/۲۲)	a۱۲/۲۷
Harst	بساک	d۰/۸۳	Harst	زمان (۸۷/۵/۲۲)	b۵/۶۴	بساک	زمان (۸۷/۵/۲۲)	c۲/۸۸

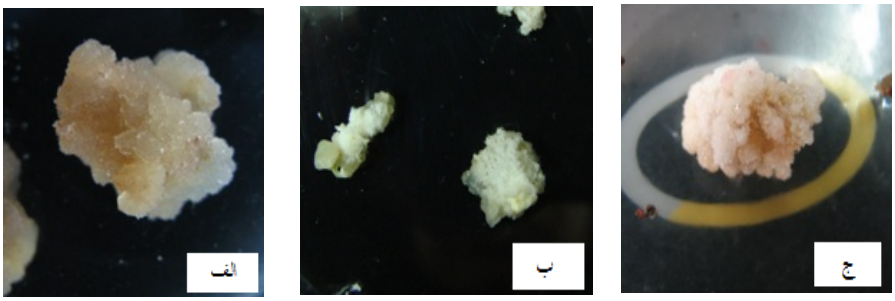
*: حروف غیر مشابه در کنار اعداد نشانگر معنی دار بودن و اختلاف در هر ستون می باشد

محیط کشت PIV در اولین و دومین زمان ارزیابی پینه‌ها، محیط مناسبی برای انگیزش پینه‌های با اندازه بزرگتر بود (جدول ۴). Iocoo et al. (2001) نیز محیط PIV را برای پینه‌زایی در ارقام Shiraz، Cabernet Sauvignon و Semillon مناسب دانستند.

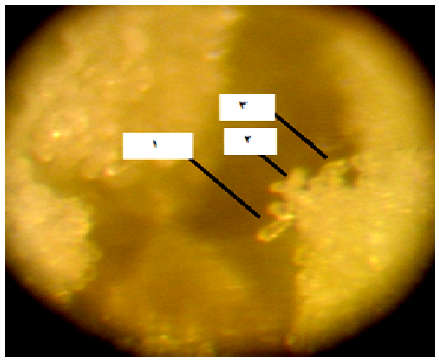
ریزنمونه گل کامل از نظر تولید پینه‌های بزرگتر نسبت به بساک طی دو زمان ارزیابی انجام شده، پاسخ بهتری داشت (جدول ۴). پس از انتقال پینه‌های رشد یافته در محیط‌های Harst و PIV به محیط GS1CA، ارزیابی بافت پینه‌های ایجاد شده از ریزنمونه‌های گل کامل و بساک در هر چهار رقم بر اساس کیفیت بافت پینه پس از شش هفته صورت گرفت. در این خصوص سه نوع بافت پینه [بافت آبکی، ریز رشته ای (Fibrial) و بافت فشرده] تشخیص داده شد که هر یک ویژگی خاصی داشتند. پینه‌های با بافت آبکی(شکل ۳- الف)، پینه‌هایی بودند که توانایی رویان‌زایی نداشتند. این پینه‌ها با وارد کردن ضربه به وسیله پنس یا اسکالپل از هم پاشیده می شدند. پینه‌های با بافت پودری (شکل ۳- ب) دارای ساختارهایی با رنگ سفید بودند که به صورت توده‌های تو خالی دیده می شدند. بافت‌های فشرده (شکل ۳- ج)، بافت‌هایی بودند که با وارد کردن ضربه از هم نمی‌پاشیدند و دارای رنگ شیری بودند. این بافت-ها در برخی از قسمت‌ها تولید ساختارهای کروی شکل کردند که در مراحل بعد توانایی تکامل به سمت تولید ساختارهای قلبی و اژدری شکل را داشتند (شکل ۴). محیط‌های Harst و PIV محیط‌های انگیزش پینه بوده و در این دو محیط پینه‌ها از نظر بافت تفاوت چندانی نشان ندادند، لیکن بعد از انتقال آنها به محیط تمایزیابی GS1CA، تغییرات در بافت پینه‌ها ایجاد شد. تغییرات ایجاد شده در برخی از پینه‌ها آغاز تمایزیابی به سمت رویان‌زایی بود. Lopez et al. (2005) پینه‌های ایجاد شده از ریزنمونه‌های کشت شده را به دو گروه (دارای بافت گلوله‌ای سفید یا زرد کمرنگ و دیگری کاملا نرم و به رنگ قهوه‌ای روشن) تقسیم کردند.

آزمون کای اسکوئر در تجزیه این داده‌ها در سطح یک در صد معنی‌دار شد ($\chi2$ =۹۸/۱۵۵; p=۰/۰۱). این نتیجه بیانگر آن است که رقم مورد استفاده در نوع بافت پینه تولید شده موثر بوده است. بر این اساس رقم پرلت با ۴۳/۳ ٪ بیشترین بافت آبکی را تولید کرد و در رقم بیدانه قرمز بیشترین بافت ریز رشته ای (۳۷/۵ ٪)

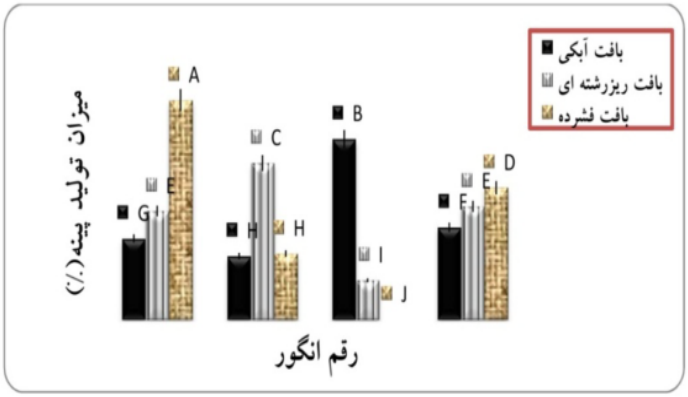
مشاهده شد. بیشترین بافت فشرده که رویان‌زایی را در مراحل بعد تضمین نمود به میزان۵۲/۶ ٪ در رقم شاهرودی مشاهده شد و رقم پرلت تولید پینه رویان‌زا نکرد. (شکل۵)پینه‌های با بافت فشرده که از ریزنمونه - در برخی دیگر از مطالعات، تولید پینه به میزان ۳۰/۴ ٪ در رقم Superior Seedless و تولید پینه رویان‌زا در رقم Cabernet Sauvignon به میزان ۴۳/۶ ٪ گزارش شده است (Perl et al., 1996, Mauro et al., 1986). در های بساک تولید شده بودند، دارای ویژگی رویان‌زایی بودند. برخی محققین (Lopez et al., 2005) نیز بیشترین تولید پینه‌رویـــــان‌زا را به میـــزان ۵۲/۵ ٪ از ریزنمونه‌های بساک در رقم Sugraone گزارش نمودند. مطالعه دیگر با نتایجی مشابه، تولید پینه رویان‌زا از ریز نمونه بساک معادل ۵۱/۳٪ در پایه V. riparia گزارش شده است (Bouquet et al., 1982).



شکل ۳- پینه با بافت آبکی(الف)، پینه با بافت پودری(ب) و پینه با بافت فشرده(ج)

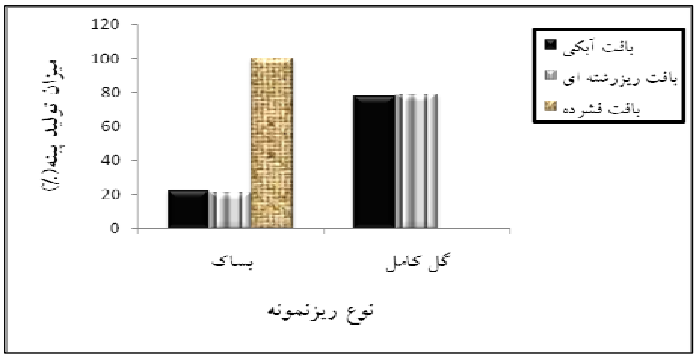


شکل ۴- جنین‌های سوماتیکی در مراحل کروی (۱)، قلبی (۲) و اژدری(۳)



شکل ۵- اثر رقم بر میزان تولید سه نوع پینه با بافت متفاوت از ریزنمونه بساک و گل کامل

ریزنمونه بر نوع بافت پینه تولید شده در آزمون کای اسکوئر در سطح یک درصد معنی‌دار شد (χ^2 =۱۰۳/۸۹; p=۰/۰۱). همانطور که در شکل ۶ نشان داده شده است، ریزنمونه بساک از نظر تولید پینه‌هایی با بافت فشرده بسیار موفق عمل کرد و تمام پینه‌های ایجاد شده از این ریزنمونه در سه رقم انگور شاهرودی، بیدانه قرمز و فلیم سیدلس دارای توانایی رویان‌زایی بودند. با این حال پینه‌های حاصل از کشت گل کامل ارقام Chardonnay، Muller Thurgau، Grignolino و 110R پتانسیل تولید رویان را داشتند ولی رقم Brachetto. g. l. قادر به تولید پینه‌های رویان‌زا از گل کامل نبود(Gambino et al., 2007). پینه‌های رویان زا در این پژوهش فقط از کشت بساک‌ها حاصل شدند. احتمالا قرارگیری مستقیم بساک روی سطح محیط کشت در تولید بهتر پینه‌هایی رویانی نقش دارد. ریزنمونه‌های گل کامل به راحتی و بدون ایجاد صدمه به بافت کشت می شوند، ولی وجود بافت‌های همراه امکان بهره مندی قسمت‌هایی از بافت را که توانایی تولید پینه‌های رویانی دارند را محدود می کند. در ارقام دیگر شاید ساختار گل به نحوی باشد که این محدودیت را ایجاد نکند و گلبرگ‌ها مانع رسیدن مواد به اندام مطلوب برای تولید رویان نشوند. به نظر می‌رسد تاثیر محیط کشت، شرایط محیطی و برخی عوامل دیگر بر تولید پینهٔ رویان زا از ریزنمونه گل کامل انگور مهم بوده و نیاز به بررسی های بیشتری دارد.



شکل ۶- تاثیر نوع ریز نمونه بر میزان تولید سه نوع پینه با بافت متفاوت در ریز نمونه های گل کامل و بساک

نتیجه گیری کلی

به طور کلی تولید پینه‌های رویان زا در انگور تحت تاثیر مستقیم رقم، محیط کشت مورد استفاده و نوع ریزنمونه قرار داشته و هر رقم در شرایط ویژه ای توانایی جنین زایی را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از بررسی حاضر مشخص نمود که پینه‌های حاصل از ریزنمونه بساک دارای مشخصات مربوط به بافت رویانی بودند، ولیکن پینه‌هایی که از ریزنمونه‌های گل کامل ایجاد شدند فاقد خصوصیات بافت‌های رویانی بودند. پینه‌های رویان‌زا دارای رشد کمتر، بافت فشرده تر و رنگ سفید مایل به زرد بوده و شکل گلوله‌ای داشتند. برای تولید پینه های رویان زا از گل کامل انگور نیاز به بررسی های دقیق تر و بیشتری می باشد. محیط کشت PIV نسبت به محیط کشت Harst برای تولید پینه در ارقام مورد آزمایش مناسب تر تشخیص داده شد. تفاوت ارقام نیز در این تحقیق بسیار جالب توجه بود، بطوریکه رقم پرلت در هر دو ریزنمونه قادر به تولید پینه‌های رویان زا نبود، در حالیکه رقم شاهرودی بیشترین میزان پینه‌های رویان زا را تولید کرد. با توجه به اهمیت رقم پرلت به عنوان یک رقم بیدانه تازه خوری با حبه‌های متوسط و عطر ملایم رقم موسکات، بررسی بیشتر برای تولید پینه‌های رویان‌زا در این رقم ضرورت دارد.

REFERENCES

1. Bouquet, A., Piganeau, B. & Lamaison, A. M. (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 Vitis. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 295, 569-574.
2. Carimi, F., Barizza, E. & Gardiman, M. (2005). Somatic embryogenesis from stigma and styles of grapevine. *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant*, 41, 249–252.
3. Cersosimo, A. 1987. Coltura in vitro di anther in Vitis sp. secondo contributo. *AGER s.c. AGriculture and Research ,* 75/76, 61-64.
4. Gambino, G., Ruffa, P., Vallania, R. & Gribaudo, I. (2007). Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis spp*.). *Plant Cell Tissue & Organ Culture,* 90, 79-83.
5. Gary, D.J. & Mortensen, J.A. (1986). Initiation and maintence of long term somatic embryogenesis from anther and ovaries of *Vitis longii* "Microsperma". *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 9, 73-80.
6. Gary, D., & Benton, C. (1991). In vitro micropropagation and plant establishment of muscadine grape. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 27, 7-14.
7. Gray, D. J., & Meredith, C. P. (1992). Grape. In: Hammerschlag. F. A., Litz, R. E. (eds). *Biotechnology of perennial fruit crops. CAB International, Wallingford, UK. pp*, 229–262.
8. Gribaudo, I., Gambino, G. & Vallania, R. (2004). Somatic embryogenesis from grapevine anther: identification of the optimal developmental stage for collecting explants. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 427-430.
9. Iocoo, P. & Frank, T. (2001). Gentic transformation of major wine grape cultivar of *Vitis vinifera* L. Transgenic Research, 10, 105-112.
10. Jayasankar, S., Bhaskar, R. & Gary, D. J. (2003). Comparative anatomy and morphology of *Vitis vinifera* (Vitaceae) somatic embryos from solid and liquid- culture-derived proembryogenic masses. *American Journal of Botany*, 90, 973–979.
11. Krul, W.R. & Worley, J.F. (1977). Formation of adventitious embryos in callus cultures of Seyval a French hybrid grape. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 102, 360-363.
12. Kuksova, V. B., Piven, N. M. & Gleba, Y.Yu. (1997). Somaclonal variation and *in vitro* induced mutagenesis in grapevine. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 49, 17–27.
13. Lopez-perez, A. J., Carreno, Martinez, J. 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.
14. Maillot, P., Kieffer, F. & Walter, B. (2006). Somatic embryogenesis from stem nodel section of grapevine. *Vitis*, 45, 185-189.
15. Martinelli, L., Bragagna, P., Poletti,V. & Scienza, A. (1993). Somatic embryogenesis from leaf- and petiole-derived callus of *Vitis rupestris*, *Plant Cell Reprot*, 12, 207–210.
16. 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.
17. Mauro, M. cl., Nef, C. & 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.
18. Michael, E., Campton, B. & Gary, D. J. (1993). Sucrose, Abscisic acid and methylglyoxal bis-(Guanylydrazone) affect grape somatic embryogenesis. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society (SAUS)*, 106, 124-128.
19. Mullins, M.G. & Srinivasan, C. (1976). Somatic embryos and planlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet-Savignon) by apomixes in vitro. *Journal of Experimental Botany*, 27, 1022-1030.
20. Nakano, M., Hoshino,Y. & Mii, M. (1994). Regeneration of transgenic plants of grapevine (*Vitis vinifera* L.) via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of embryogenic calli. *Journal of Experimental Botany*, 45, 649–656.
21. Nakano, M., Sakakibara, T. Watanabe, Y. & Mii, M. (1997). Establishment of embryogenesis cultures in several cultivars of *Vitis vinifera* and V. *labrusca*. *Vitis*, 36, 141-145.
22. Nitsch, J. P. & Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains, *Science*, 163, 85–87.
23. Perl, A., Gollop, A., Lipsky, A., Holland., Sahar, D. N., Or, E. & Elyasi, R. (1996). Regeneration and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 2, 188-193.

24. 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.
25. 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.
26. Salunkhe, C. K., Rao, P. S. & Mhatre, M. (1999). Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in anther callus of *Vitis latifolia* L. *Plant Cell Report*, 18, 670-673.
27. Stemp, J. A. & Meredith, C. P. (1988). Somatic embryogensis from leaves and anthers of grapevine. *Scientia Horticulturae*, 35, 235-250.
28. Torregrosa, L. (1998). A simple and efficient method to obtain stable embryogenic cultures from anthers of *Vitis vinifera* L., *Vitis*, 2, 91–92.