مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۳، شماره ۳، ۱۳۹۱ (۲۷۴-۲۶۷)

مقایسه کاربرد بنزیل آدنین و سایکوسل بر جوانه زنی جنین در انگورهای استنوسپرموکارپ به روش نجات جنین

ابراهیم پوراحمدی [۱*]، علی عبادی [۲] ، منصور امیدی [۳] و علیرضا رحیمی [۴]
۱، ۲، ۳، ۴،دانشجوی کارشناسی ارشد ،استادان و کارشناس پردیس کشاورز ی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۲ - تاریخ تصویب: ۸۹/۷/۱۱)

چکیده

امروزه مصرف کنندگان انگورهای بیدانه را به منظور مصرف به صورت تازه خوری و تهیه کشمش ترجیح می دهند. به این منظور یکی از اهداف مهم در اصلاح انگورهای تازه خوری تولید ارقام بیدانه جدید می باشد. یکی از روش های اصلاح ارقام بیدانه جدید استفاده از تکنیک نجات جنین است. در این پژوهش، تاثیر محلول پاشی گل ها قبل از شکوفایی با مواد تنظیم کننده رشد بنزیل آدنین (۵۰ پی پی ام) و سایکوسل (۲۰۰ پی پی ام) در ارقام فلیم سیدلس، پرلت و عسکری در شرایط باغ انجام گرفت. ۵۰ روز بعد از گرده افشانی تخمک ها از حبه ها خارج شده و در محیط نیچ و نیچ کشت گردیدند. پس از گذشت ۱۰ هفته از زمان کشت تخمک ها، جنین های آنها خارج گردید و در محیط نیچ و نیچ کشت شدند. سپس جنین های بازیابی شده و جوانه زده ارزیابی شدند. نتایج به دست آمده نشان داد که تیمارهای سایکوسل و بنزیل آدنین به ترتیب با ۳۲/۹۴٪ و ۳۲/۰۵٪ بر میزان جنین های بازیابی شده و با ۲۶/۷۶٪ و ۲۷/۰۵٪ بر میزان جنین های جوانه زده در مقایسه با شاهد اثر مثبت و معنی داری داشتند. مقایسه میانگین ها نشان داد که تاثیر تیمارهای سایکوسل و بنزیل آدنین بر تعداد جنین های بازیابی شده و جوانه زده در هر سه رقم یکسان بود، با این حال اختلاف آن ها با شاهد کاملا معنی دار بود.

واژه های کلیدی: **بنزیل آدنین،سایکوسل،جنین بازیابی شده،جنین جوانه زده**

مقدمه

امروزه مصرف کنندگان انگور در سراسر جهان انگورهای بیدانه با حبه های درشت را جهت مصارف تازه خوری ترجیح می دهند. بیدانگی در انگور به دو صورت پارتنوکارپی و استنوسپرموکارپی دیده می شود. بیدانگی پارتنوکارپی در انگور به صورت محدود دیده می شود و بیدانگی در انگور بیشتر به صورت استنوسپرموکارپی گزارش شده است (Stout, 1936). در بیدانگی استنوسپرموکارپی، گرده افشانی و لقاح صورت می گیرد ولی جنین در مراحل اولیه چند سلولی تا کروی شدن به همراه اندوسپرم تخریب شده و سقط می شود (Liu et al., 2003; Stout, 1936). در اصلاح سنتی انگور به منظور دستیابی به ارقام بیدانه جدید از ارقام بیدانه انگور فقط به عنوان والد پدری استفاده می شود. در این تلاقی فقط ۱۵-۱۰ درصد از نتاج حاصل بیدانه خواهند بود و اگر تلاقی بین ارقام بیدانه صورت گیرد حدود ۸۵ درصد از نتاج بیدانه خواهند بود ولی این روش در طبیعت امکان پذیر نیست (Emershad & Raming, 1984;

* نویسنده مسئول: ابراهیم پوراحمدی تلفن: ۰۹۱۹۳۵۲۱۰۴۱ E-mail: ORTAHMADI@yahoo.com

(Spiegel-Roy et al., 1985; Ponce & Tizio, 2002).
تکنیک نجات جنین این امکان را فراهم می کند که تلاقی بین ارقام بیدانه با بیدانه صورت گیرد و با جداسازی و کشت تخمک ها به صورت درون شیشه ای از سقط جنین جلوگیری شود و ضمن باز یابی، زمینه رشد جنین را در درون تخمک فراهم می نماید(Cain et al., 1983; Spiegel-Roy et al., 1985; Ebadi et al., 2004). عوامل متعددی در بازیابی، جوانه زنی و تعداد گیاهچه های حاصل از تلاقی ارقام بیدانه با بیدانه به کمک تکنیک نجات جنین دخالت دارند که از جمله آنها نوع محیط کشت، نژادگان مورد استفاده در تلاقی، زمان جداسازی تخمک از حبه و نیز زمان جداسازی جنین از تخمک را می توان نام برد (Emershad & Raming, 1989; Ebadi et al., 2004; Kebeli & Boz, 2003).
یکی دیگر از عوامل موثر در میزان جوانه زنی جنین ها استفاده از تنظیم کننده‌های رشد می‌باشد. برخی از پژوهشگران گزارش نمودند که استفاده از بازدارنده‌های رشد مانند آنیکونازول و سایکوسل به صورت اسپری بر روی گل آذین و شاخه حامل آن در زمان قبل از باز شدن گل باعث بهبود در میزان جوانه زنی جنین در محیط کشت می‌شود (Ponce & Tizio, 1998; Tang et al., 2010).

بعضی از تنظیم کننده های رشد نیز باعث بهبود میزان جوانه زنی جنین‌های کشت شده در انگور می-شود. برخی از پژوهشگران گزارش نمودند، مصرف خارجی بنزیل آدنین BA به صورت محلول پاشی روی گل آذین و شاخه حامل آن قبل از گلدهی باعث بهبود تعداد جنین‌های بازیابی شده و تعداد جنین‌های جوانه زده می‌شود(Bharathy et al., 2005).

برخی از محققین گزارش نمودند، مصرف BA به صورت محلول پاشی قبل از گلدهی میزان جنین های بازیابی شده و تعداد جنین‌های جوانه زده را نسبت به شاهد، بهبود می بخشد(Tang et al., 2010) .

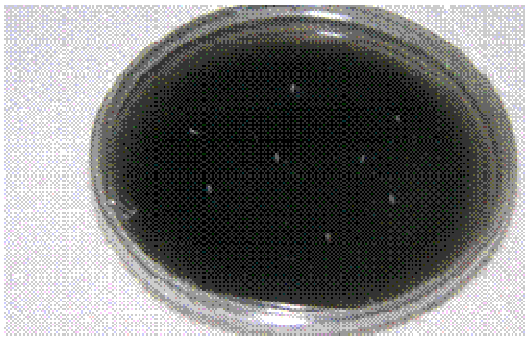
هدف از این پژوهش مقایسهٔ اثر دو تنظیم کنندهٔ رشد (بنزیل آدنین و سایکوسل) به صورت محلول پاشی روی گل آذین و شاخهٔ حامل آن در زمان قبل از گل دهی بر میزان بازیابی جنین و جوانه زنی جنین در ارقام انگور عسکری، فلیم سیدلس و پرلت بود.

مواد و روش‌ها

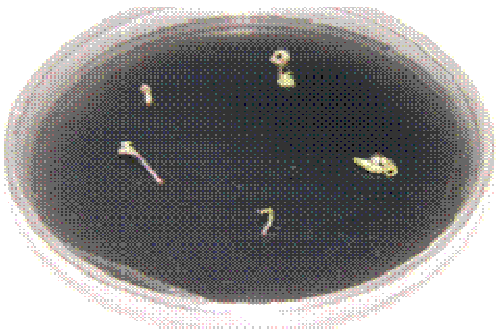
سه رقم از انگورهای بیدانه شامل ارقام عسکری، فلیم سیدلس و پرلت به عنوان والد مادری و رقم یاقوتی به عنوان والد پدری انتخاب شدند. ۱۳ روز قبل از باز شدن گل ها، زمانی که طول گل آذین حدود ۱۰ cm بود، گل آذین و شاخهٔ حامل آن ها با محلول ۵۰ پی پی ام بنزیل آدنین و محلول ۲۰۰ پی پی ام سایکوسل در روی بوته ها جداگانه محلول پاشی شدند. بار دیگر پنج روز قبل از باز شدن گل ها زمانی که طول گل آذین حدود ۱۴ cm بود به همراه شاخه حامل با محلول ۵۰ پی پی ام بنزیل آدنین محلول پاشی شدند. با مشاهدهٔ اولین گل های باز شده بر روی گل آذین، گل های باز شده به همراه گلهای کوچک انتهای گل آذین قطع شدند تا گل های باقی مانده بر روی گل آذین که هم سن هستند، باقی بمانند. غنچه ها با پنس اخته شده و داخل کیسه های مخصوص قرار داده شدند. عمل گرده افشانی در دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از اخته کردن با دانهٔ گرده رقم یاقوتی که ۱۰ روز قبل از گرده افشانی با روش شیر دوشی جمع آوری و در داخل دسیکاتور در دمای چهار درجه سانتی گراد ذخیره شده بود، انجام شد. گل آذین ها به مدت یک هفته در داخل کیسه های مخصوص قرار داده شدند. بعد از تشکیل حبه، خوشه ها از کیسه ها خارج شدند. ۵۰ روز بعد از گرده افشانی، از حبه ها نمونه گیری انجام شد و به آزمایشگاه منتقل شدند. حبه ها چند بار با آب معمولی به همراه چند قطره مایع دستشویی شستشو شده، به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰٪ حجمی ضدعفونی و سپس حبه ها سه مرتبه با آب مقطر دو بار استریل شده شستشو داده شدند. حبه ها در شرایط استریل با اسکالپل برش داده شده و با پنس تخمک ها از حبه ها جدا گردیدند و سپس۲۰ عدد تخمک در هر پتری در محیط کشت نیچ و نیچ (NN) در شش تکرار کشت شدند. این محیط دارای ۱۰ میکرولیتر ایندول استیک اسید (IAA)، یک میکرومول اسید جیبرلیک (GA_3) و یک میکرومول بنزیل آدنین (BA)، به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، دو گرم در لیتر ذغال فعال و هشت گرم در لیتر آگار بود. پتری های کشت شده در اتاقک رشد تحت شرایط ۱±۲۵ درجه سانتی گراد، فتوپریود ۱۶

ساعت روشنایی با شدت نور $50\mu M.\ s^{-1}.m^{2}$ قرار داده شدند.

بعد از گذشت ۱۰ هفته از زمان کشت، تخمک ها را در شرایط کاملاً استریل برش داده و جنین آنها پس از جداسازی بار دیگر روی محیط نیچ و نیچ کشت شدند. با گذشت حدود ۱۰ روز از زمان کاشت، جنین ها شروع به جوانه زنی نمودند. بعد از جوانه زنی، جنین های جوانه زده به محیط کشت MS با نصف غلظت نمک های آن که دارای یک میکرومول بنزل آدنین بود انتقال داده شدند. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار صورت گرفت و بعد از ارزیابی جنین های بازیابی شده(شکل ۱) و جنین های جوانه زده (شکل ۲)، تجزیه داده ها با نرم افزار SAS صورت گرفت.



شکل ۱- جنین های بازیابی شده در رقم پرلت تحت تیمار BA



شکل ۲- جنین های جوانه زده در رقم پرلت تحت تیمار BA

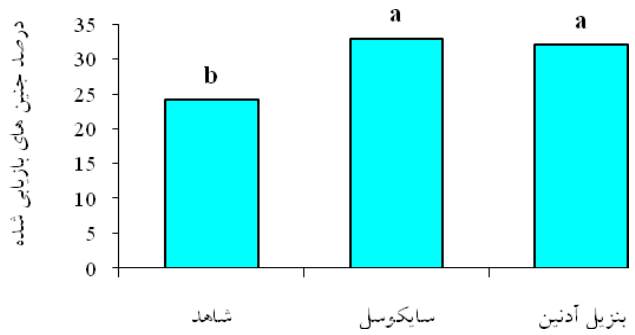
نتایج و بحث

اندازه تخمک ها از زمان کاشت تا زمان برش زدن و خارج نمودن جنین در حال بزرگ شدن بود. در زمان برش تخمک ها، گاهی تخمک های برش خورده توخالی بودند و در مواردی دیگر جنین و اندوسپرم قهوه ای و تجزیه شده بودند و فقط در تعدادی از آن ها جنین سفید و براق با اشکال کروی و اژدری مشاهده شد (شکل ۳).

شکل ۳- جنین خارج شده از تخمک

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد که درصد جنین های بازیابی شده تحت تأثیر پیش تیمار گل ها با مواد تنظیم کننده رشد و اثرات متقابل پیش تیمار و والد مادری می باشد.

تاثیر پیش تیمارهای سایکوسل و بنزیل آدنین بر میزان جنین های بازیابی شده در سطح ۱٪ معنی دار بود. مقایسه میانگین ها نشان داد که بین دو تیمار سایکوسل ۳۲/۹۴٪ و بنزیل آدنین ۳۲/۰۵٪ از نظر تاثیر بر میزان جنین بازیابی شده اختلاف معنی داری وجود نداشت ولی هر دو تیمار نسبت به شاهد ۲۴/۱۶٪از نظر درصد جنین های بازیابی شده اختلاف معنی داری نشان دادند (شکل۴)



شکل ۴- تاثیر پیش تیمار گل آذین با مواد تنظیم کننده رشد بر درصد جنین های بازیابی شده

برخی از پژوهشگران گزارش نمودند از نظر فیزیولوژی یکی از فرضیات مطرح در مورد علل سقط جنین در انگورهای بیدانه عدم تعادل هورمونهای مؤثر رشد از جمله اکسین و اسیدجیبرلیک در شکل گیری میوه و دانه است (Cain et al., 1983).

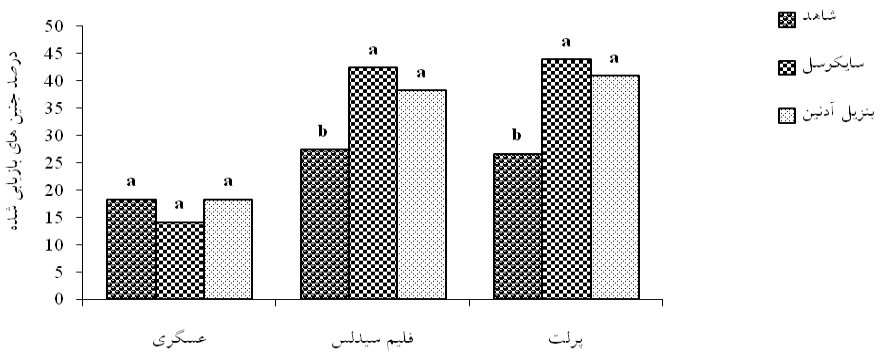
برخی از محققین گزارش نمودند که در ابتدای تشکیل حبه میزان اسید جیبرلیک بسیار بالاست اما سه هفته بعد از تشکیل حبه ها میزان اسید جیبرلیک تا حد صفر کاهش می یابد. آنها گزارش نمودند که سطح اسید جیبرلین در رقم بیدانه توکی[1] سه روز بعد از باز شدن گل ها بالاتر از رقم دانه دار توکی می باشد (Iwahori et al., 1968).برخی گزارشات حاکی از آن است که استفاده از بازدارنده های رشد باعث بهبود جوانه زنی در انگورهای بیدانه میشود (Ledbetter & Shonard, 1991)بنابراین طبق نظر آنها استفاده از بازدارنده های رشد از جمله سایکوسل میزان فعالیت تحریک کننده های رشد از جمله اکسین و اسیدجیبرلیک را کاهش داده و زمینه برای بهبود فعالیت جنین در درون تخمک فراهم می گردد.

محققین با مطالعه سیتولوژیکی و جنین در برخی از ارقام بیدانه گزارش نمودند فعالیت سایتوکنین تا چهار هفته بعد از باز شدن گل ها دیده می شود و در هفته ششم ناپدید می شود. آنها همچنین گزارش نمودند، محلول پاشی BA در ارقام بیدانه انگور کمبود سایتوکنین را در حبه ها جبران و باعث بهبود تشکیل بذر در حبه ها می شود(Pandey, 1982). برخی از پژوهشگران گزارش نمودند،استفاده از بنزیل آدنین بعنوان یک سایتوکنین در بهبود وضعیت رشد جنین در انگورهای بیدانه به خاطر نقش های متعددی است که این تنظیم کننده به عهده دارد، که از جمله این نقش ها می توان شرکت در فرآیند تقسیم سلولی، به تعویق انداختن پیری و تقویت سیستم منبع و مخزن بین برگ و میوه را نام برد(Atkins & Emery, 1985). نتایج حاصل از مقایسهٔ دو تیمار سایکوسل و بنزیل آدنین در این آزمایش با نتایج حاصل از برخی از مطالعات گذشته مطابقت داشت (Tang et al., 2010).

اثر متقابل پیش تیمار و والد مادری بر میزان جنین های بازیابی شده در سطح ۱٪ معنی دار بود. تیمارهای بنزیل آدنین و سایکوسل در مقایسه با شاهد در میزان

1. Tokay

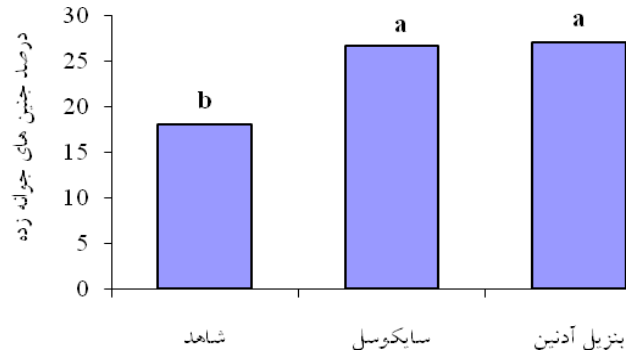
بازیابی جنین در والد مادری عسکری اختلاف معنی داری نشان ندادند (شکل ۵).



شکل ۵- تاثیر پیش تیمار گل آذین در والد مادری بر درصد جنین های باز یابی شده

این در حالی بود که در والد مادری فلیم سیدلس تیمار سایکوسل ۴۲/۵۰٪ و تیمار بنزیل آدنین۳۸/۳۳٪ نسبت به شاهد ۲۶/۶۶٪ جنین های بازیابی شده بیشتری داشتند. همچنین در والد مادری پرلت تیمارهای سایکوسل ۳۸/۳۳٪ و بنزیل آدنین۴۴/۰۰٪ از نظر تاثیر بر بازیابی جنین اختلاف معنی داری را با یکدیگر نشان ندادند ولی نسبت به شاهد۲۷/۵۰٪ اختلاف معنی داری داشتند. این یافته ها با نتایج برخی از پژوهش انجام شده مطابقت دارد (Tang et al., 2010). پس از گذشت هشت تا ده روز از کاشت جنین های خارج شده از تخمک ها برروی محیط کشت نیچ و نیچ، جوانه زنی آنها شروع شد. زمانی یک جنین جوانه زده محاسبه می شد که دو برگ لپه ای آن ها کاملاً نمایان می شد.

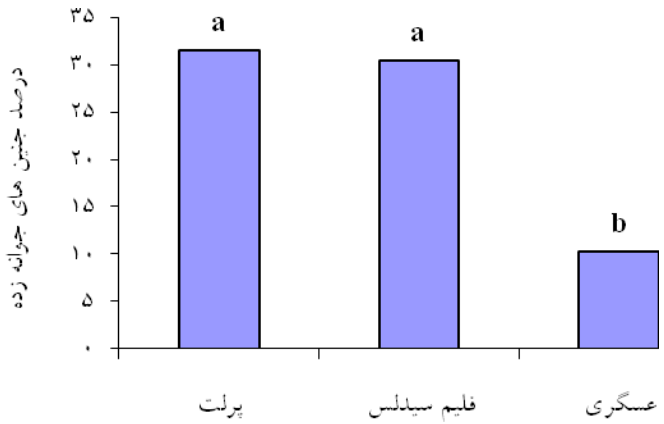
نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد که درصد جنین های جوانه زده تحت تأثیر پیش تیمار گل ها با مواد تنظیم کننده رشد، والد مادری و اثرات متقابل والد مادری و پیش تیمار قرار گرفته بود. تیمارهای سایکوسل ۲۶/۷۶٪ و بنزیل آدنین ۲۷/۰۵٪ با هم اختلاف معنی دار نداشتند ولی نسبت به شاهد ۱۸/۰۵٪ اختلاف معنی داری نشان دادند (شکل۶).



شکل ۶- مقایسه اثر پیش تیمار با مواد تنظیم کننده رشد بر درصد جنین های جوانه زده

نتایج بدست آمده در این تحقیق با مطالعات قبلی برخی از پژوهشگران مطابقت دارد(Tang et al., 2010). این پژوهشگران با مقایسهٔ چهار تنظیم کنندهٔ رشد شامل سایکوسل، بنزیل آدنین، پوتریسین و اتفن دریافتند بنزیل آدنین و سایکوسل در مقایسه با دو ترکیب دیگر در میزان جوانه زنی جنین ها تاثیر بیشتری داشته اند. اثر والد مادری بر درصد جنین های جوانه زده در سطح ۱٪ معنی دار بود. بررسی میانگین ها نشان

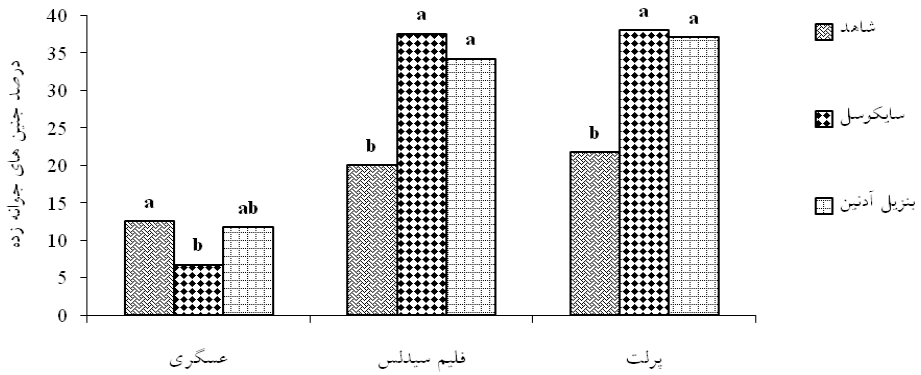
می دهد که والدهای مادری پرلت ۳۱/۵۶ و فلیم سیدلس ۳۰/۵۵٪ اختلاف معنی داری نداشتند ولی نسبت به والد عسکری ۱۰/۲۷٪ درصد بیشتری از جنین های جوانه زده را داشتند (شکل ۷).



شکل ۷- مقایسه اثر والد های مادری بر درصد جنین های جوانه زده

به نظر می رسد چون بیدانگی در انگور توسط عوامل ژنتیکی کنترل می شود، پس میزان موفقیت جنین های جوانه زده می تواند تحت تأثیر نژادگان گیاه باشد. نتایج به دست آمده در این آزمایش با برخی از مطالعات قبلی در این زمینه مطابقت دارد. آنها گزارش نمودند، در بین پنج رقم از انگورهای بیدانه، رقم فلیم سیدلس بالاترین میزان جوانه زنی را داشت (Ebadi et al., 2004).

اثر متقابل پیش تیمار گل ها با مواد تنظیم کننده رشد و والد مادری معنی دار بود. بررسی میانگین ها نشان داد که در رقم عسکری تیمار بنزیل آدنین نسبت به شاهد تاثیر چندانی در افزایش میزان جوانه زنی جنین نداشت ولی نسبت به سایکوسل در میزان جوانه زنی برتر بود (شکل ۸).



شکل ۸- اثر متقابل تیمارها و والدهای مادری بر درصد جنین های جوانه زده

این در حالی است که جوانه زنی جنین ها در رقم فلیم سیدلس تحت تاثیر معنی دار تیمار سایکوسل ۳۷/۵۰٪ و تیمار BA ۳۴/۱۶٪ بود و هر دو تیمار ذکر شده نسبت به شاهد ۲۰/۲۰٪ برتری معنی داری را

نشان دادند. همین وضعیت در رقم پرلت نیز مشاهده شد بطوری که در این رقم میزان جوانه زنی جنین در تیمار سایکوسل ۳۸/۰۰٪ بود که با تیمار بنزیل آدنین ۳۷/۰۵٪ اختلاف معنی داری نداشت ولی هر دو نسبت به شاهد ۲۱/۶۶٪ اختلاف معنی داری را نشان دادند.

در این ارتباط برخی از پژوهشگران با اعمال تیمارهای بنزیل آدنین و سایکوسل در رقم سنتنیال سیدلس[1] گزارش نمودند که بین این دو تیمار از نظر تاثیر بر میزان جوانه زنی گیاهچه های بدست آمده اختلاف معنی داری وجود نداشت (Tang et al., 2010).

برخی از محققین با اعمال تیمار بنزیل آدنین بر چند رقم از انگورهای استنواسپرموکارپ گزارش نمودند که تیمار بنزیل آدنین فقط بر جنین های جوانه زدهٔ حاصل از تلاقی بین ارقام فلیم سیدلس و کنکورد تاثیر معنی داری نداشت ولی در سایر تلاقی ها اثر این تیمار معنی دار بود (Bharathy et al., 2005).

نتیجه گیری کلی

پیش تیمار گل ها با بنزیل آدنین و سایکوسل در میزان جوانه زنی ارقام مورد مطالعه اثرات مثبت نشان داد، به طوری که بنزیل آدنین با ۲۷/۰۵ درصد و سایکوسل با ۲۶/۷۶ درصد نسبت به شاهد با ۱۸/۰۵ درصد در میزان جوانه زنی برتری نشان دادند.همچنین میزان موفقیت ارقام مختلف انگورهای بیدانه در تکنیک نجات جنین متاثر از زمینه ژنتیکی آنها است و با هم متفاوت می باشد؛ به طوری که میزان موفقیت در رقم پرلت ۳۱/۶۶ درصد، در رقم فلیم سیدلس ۳۰/۵۵ درصد و در رقم عسکری ۱۰/۲۷ درصد بود.

1. Centenniall Seedless

REFERENCES

1. Atkins, C. A. & Emery, R. J. (1998). Cis and Trans isomers of cytokinins in seed development of Lupin. Abstract No. 585. *Plant Biology Electronic Abstract Center*.
2. Bharathy, P. V., Karibasappa, G. S. & Patil, S. G. (2005). In ovulo rescue of hybrid embryos in Flame Seedless grapes Influence of pre-bloom sprays of benzyladenine. *Scientia Horticulturae*, 106, 353-356.
3. Cain, D. W., Emershad, R. L. & Tarailo, R. E. (1983). In ovulo embryo culture and seedling development of seeded and seedless grape. *Vitis*, 22, 9-14.
4. Clore, W. J. (1965). Responses of Delware grapes to gibberllin. *The American Society for Horticultural Science*, 87, 259 – 263.
5. Ebadi, A., Sarikhani, H., Zamani, Z. & Babalar, M. (2004). Effect of male parent and application of Boric acid on embryo rescue in some seedless grapevine (*Vitits vinifera*) cultivars. Acta Horticulturae, 640, 255-260.
6. Emershad, R. L. & Ramming, D.W. (1984). In ovulo embryo culture of Thompson Seedless grapes. *American Journal of Botany*, 71(6), 873-877.
7. Emershad , R. L., Ramming, D. W. & Serpe, M. D. 1989. In ovulo embryo development and plant formation from stenospermic genotypes of Vitis venifera. *American Journal of Botany*. 76(3): 379-402.
8. Iwahori, S., Weaver, R. J. & Pool, R. M. (1968). Gibberellin – like activity in berries of seeded and seedless ،Tokay, grapes. *Plant Physiology*, 43, 333 – 337.
9. Kebeli, N & Boz , Y. (2003). Studies on the Applying of Embryo Culture in Breeding New Hybrids by Crossing Seedless Grape Cultivars. *Acta Horticulturae*, 625, 279–281.
10. Ledbetter, C. A. & Shonnard, C. B. (1991). Berry and seed characteristics associated with stenospermy in vinifera grapes. *Journal of Horticulture Science*, 66 (2), 247- 252.
11. Liu, S.M., Sykes, R. & Clingeleffer, R. 2003. Improved in ovulo embryo culture for stenospermocarpic grapes. *Australian Journal of Exprimental Agriculture*, 54, 869-876.
12. Pandey, S. N. (1982). *The Grape in India. Indian Council of Agricultural Research*. New Dehli. India. P. 42.
13. Ponce, M. & Tizio, R. (2002). Brief Note Improved in vitro embryo development of stenospermic grape by putrescine. *Biocell*, 26(2), 263–266.
14. Spiegel-Roy, P., Sahar, N., Baron, J. & Lavi, V. (1985). In vitro culture and plant formation from grape cultivars with abortive ovules and seeds. *The American Society for Horticultural Science*, 110(1), 109-112.
15. Stout, A. B.(1936). Breeding for hardy seedless grapes. *The American Society for Horticultural Science*, 34, 416-420.

16. Tang, D., Wang,Y., Cai, J. & Zhao, R. (2010). Effects of exogenous application of plant growth regulators on the development of ovule and subsequent embryo rescue of stenospermic grape. *Scientia Horticulturae*, 120(1), 51-57