علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۵، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۳ (ص ۲۵۵-۲۴۵)

بررسی اثر نوع و حالت محیط کشت و زمان جداسازی تخمک و جنین بر میزان موفقیت تکنیک نجات جنین انگور «فلیم سیدلس»

علی عبادی[1*]، مصطفی عالی‌فر[2]، محمدرضا فتاحی[3] و اصغر استاجی[4]
۱، ۲، ۳ و ۴. استاد، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۲۷ - تاریخ تصویب: ۹۱/۱/۲۳)

چکیده

انگور رقم فلیم سیدلس یکی از ارقام مهم و تجاری انگورهای رومیزی است که به‌دلیل خصوصیات میوه و تولید محصول زیاد در برنامه‌های اصلاحی استفاده می‌شود. اصلاح‌کنندگان به‌منظور به‌نژادی انگورهای بی‌دانه و با توجه به اهمیت در نظر گرفتن ارقام بی‌دانه به‌منزلهٔ والد مادری برای افزایش تولید نتاج بی‌دانه در یک چرخهٔ به‌نژادی از روش نجات جنین استفاده می‌کنند. در این پژوهش تأثیر محیط‌های کشت امرشاد و رامینگ (ER) و نیچ و نیچ (NN) در حالت‌های جامد و دبل فاز در سه زمان جداسازی تخمک از حبه (۳۵، ۴۵ و ۵۵ روز پس از گرده‌افشانی) و دو زمان جداسازی جنین از تخمک (هشت و ده هفته پس ازکشت تخمک‌ها) بر میزان تکامل جنین‌های خارج‌شده از تخمک (جنین‌های کروی، قلبی، اژدری و جنین‌های چندگانه)، جوانه‌زنی جنین‌ها و گیاهچه‌های تولیدی از آن‌ها در انگور رقم فلیم سیدلس بررسی شد. نتایج نشان داد که جداسازی تخمک‌ها از حبه در زمان ۵۵ روز پس از گرده‌افشانی و کشت آن‌ها در محیط کشت NN با حالت دبل فاز همراه با خارج‌کردن جنین از تخمک در زمان ۱۰ هفته تأثیر مثبت و معناداری بر صفات بررسی‌شده داشت.

واژه‌های کلیدی: **انگور فلیم سیدلس، بکرباری کاذب، کشت تخمک.**

مقدمه

انگورهای بی‌دانه به‌طور گسترده برای مصارف تازه‌خوری و تهیهٔ کشمش در آسیا، اروپا و آمریکا کشت می‌شوند (Tang *et al*., 2009). امروزه مصرف‌کنندگان انگور برای مصارف تازه‌خوری و کشمشی، انگورهای بی‌دانه را ترجیح می‌دهند (Tian *et al*., 2008). رقم فلیم سیدلس یکی از ارقام مهم و تجاری انگورهای تازه‌خوری است که به‌دلیل ویژگی‌های خاص میوه و تولید محصول زیاد از ارقام مهم در برنامه‌های به‌نژادی محسوب می‌شود. بی‌دانگی در انگور رقم فلیم سیدلس به‌دلیل پدیدهٔ بکرباری کاذب 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 به‌نژادی به‌دلیل سقط جنین، به‌نژادگران به‌اجبار رقم بی‌دانه را به‌منزلهٔ والد پدری استفاده می‌کنند که این امر سبب تولید درصد پایینی از نتاج بی‌دانه می‌شود (Weinberger & Loomis, 1979; Ramming *et al*., 1990). به‌نژادگران به‌منظور افزایش تعداد نتاج بی‌دانه و امکان‌پذیر ساختن تلاقی‌هایی که در حالت طبیعی نتاجی از آن‌ها به دست نمی‌آید از روش نجات جنین استفاده می‌کنند.

تاکنون پژوهشگران انواع محیط‌های کشت مانند محیط ER، WPM (Kebeli *et al*., 2003)، SH، C

تلفن: ۰۹۱۲۵۶۷۷۵۲۱ E-mail: aebadi@ut.ac.ir

(Emershad & Ramming, 1984)، BD (Liu *et al*., 2003)، NN، MS و B5 (Yang *et al*., 2006) با حالات متفاوت جامد (Spiegel-Roy *et al*., 1985 Ponce *et al*., 2002; Valdez *et al*., 2006)، مایع (Emershad *et al*., 1989) و دبل فاز (Meng *et al*., 1984; Emershad *et al*., 1994; Burger & Trautmann; 2000 Tian *et al*., 2008) را برای بهبودتکنیک نجات جنین استفاده کرده‌اند و نتایج متفاوتی را با توجه به ارقام استفاده‌شده به دست آورده‌اند. پژوهش‌هایی که تا کنون به‌منظور شناسایی محیط‌های کشت مناسب برای کشت تخمک‌های انگور انجام گرفته است، مشخص کرده محیط‌های کشت NN و ER از سایر محیط‌های کشت مقایسه‌شده (WPM، MS، BD و B5) سودمندترند (Kebeli *et al*., 2003: Yang *et al*., 2006; Tian *et al*., 2008). در بررسی‌های انجام‌شده روی حالات محیط کشت مشخص شده است که استفاده از حالت مایع (بدون آگار) برای برخی ارقام مناسب‌تر است (Meng *et al*., 1994) و در پژوهشی دیگر تفاوتی بین استفاده از حالت جامد و مایع گزارش نشد (Gray *et al*., 1987). شناخت زمان مناسب برای جداسازی تخمک از حبه در مرحلهٔ قبل از سقط جنین بسیار حائز اهمیت است. این زمان در ارقام مختلف متفاوت است و جنین نسبت به رقم از مرحلهٔ چندسلولی تا مرحلهٔ پیشرفته‌تر مانند مرحلهٔ کروی یا اژدری شکل در زمان‌های مختلف تکامل پیدا می‌کند و بعد از آن دچار تخریب می‌شود و از بین می‌رود (Emershad & Ramming, 1984). در پژوهش‌های مختلفی که روی ارقام مختلف انجام گرفته است، نسبت به نوع رقم زمان‌های مختلفی از ۲۱ روز تا ۷۰ روز برای جداسازی تخمک از حبه ذکر شده است که با توجه به متفاوت‌بودن ارقام و زمان‌های مختلف سقط جنین در بذور آن‌ها و همچنین با توجه به شرایط رشد و نمو بوته‌ها در مناطق مختلف، این نتایج قابل قبول و منطقی به نظر می‌رسد (Spiegel-Roy *et al*., 1985; Emershad *et al*., 1989; Ledbetter *et al*., 1989; Gary *et al*., 1990; Kebeli *et al*., 2003). زمان مناسب جداسازی جنین از تخمک نیز از دیگر عوامل مؤثر بر موفقیت تکنیک نجات جنین است که این فاکتور هم در ارقام و شرایط مختلف متفاوت است و حدود هشت تا دوازده هفته ذکر شده است (Zhao & Guo, 2004; Bharathy *et al*., 2005; Tian *et al*., 2008).

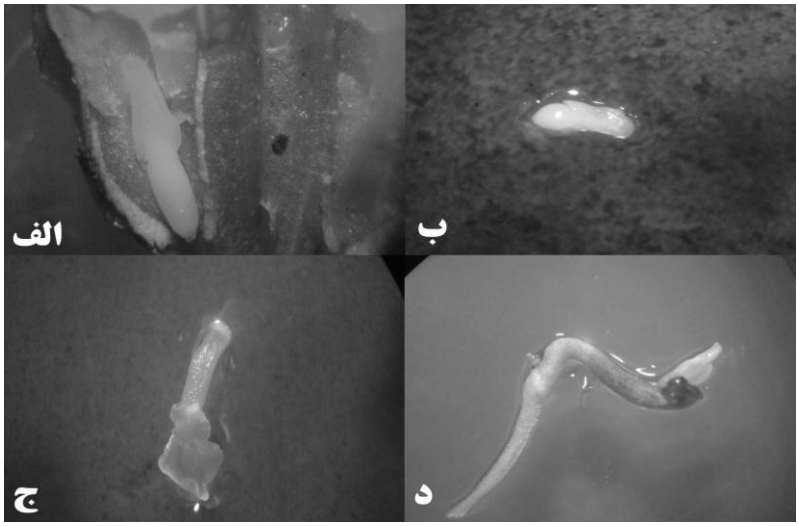
هدف از این مطالعه بررسی تأثیر محیط‌های کشت، وضعیت جامد یا دبل فاز بودن محیط کشت، زمان جداسازی تخمک از حبه و زمان جداسازی جنین از تخمک بر میزان رشد و نمو جنین‌ها، درصد جوانه‌زنی جنین‌ها و درصد گیاهچه‌های تولیدی در انگور رقم تجاری فلیم سیدلس بود.

مواد و روش‌ها

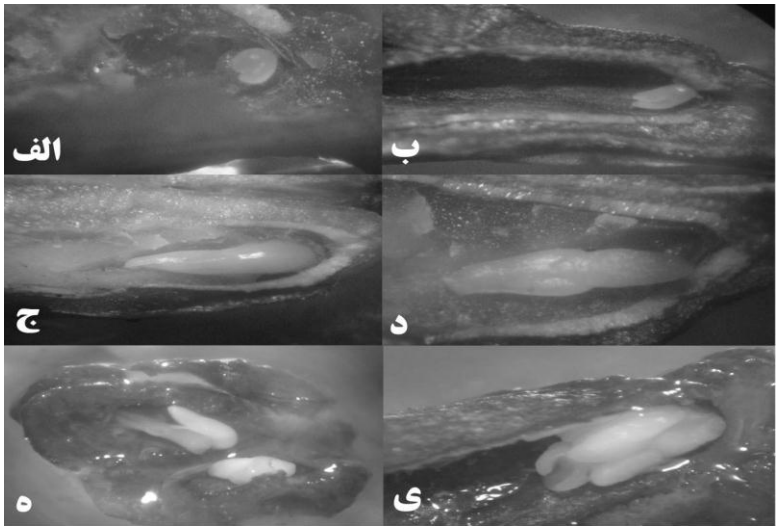
این پژوهش در کلکسیون تحقیقاتی انگور و آزمایشگاه‌های گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در سال ۱۳۸۹ انجام شد. در اواخر اردیبهشت‌ماه چند گل‌آذین به‌طور تصادفی روی بوته‌های انگور رقم فلیم سیدلس انتخاب شد. پس از اینکه اولین گل‌ها در هر خوشه باز شدند، به‌منظور هم‌سن‌سازی آن‌ها، گل‌های بازشده و غنچه‌های ریز نوک خوشه حذف شدند و سپس در سه زمان مختلف ۳۵، ۴۵ و ۵۵ روز پس از گرده‌افشانی از خوشه‌ها تعدادی حبه برداشت شد. ابتدا حبه‌ها با مایع دستشویی (به مقدار یک میلی‌لیتر در لیتر) شست‌وشو شدند و به‌مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و سپس دوباره با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند و در مرحلهٔ بعد به‌مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد قرار گرفتند و در نهایت سه مرتبه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. حبه‌های ضدعفونی شده در شرایط استریل زیر لامینار فلو برش داده شد و آن دسته از تخمک‌هایی که اندازهٔ آن‌ها چهار میلی‌متر یا بیشتر بود، از حبه‌ها جدا شدند و در پتری‌دیش‌هایی به ابعاد ۱۵×۱۰۰ میلی‌متر در محیط کشت قرار گرفتند. محیط‌های کشت استفاده‌شده شامل محیط کشت NN (Nitsch & Nitsch, 1969) تکمیل‌شده با ۲ درصد ساکارز، ۰/۲درصد زغال فعال و ۰/۷درصد آگار و محیط کشت ER (Emershad & Ramming, 1994) تکمیل‌شده با ۳ درصد ساکارز، ۰/۲درصد زغال فعال و ۰/۷درصد آگار بود. هر دو محیط کشت به دو صورت جامد و دبل فاز تهیه و در پتری‌دیش‌ها توزیع شدند. برای تهیهٔ محیط کشت با فاز جامد حدود ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی آگار در پتری‌دیش‌ها توزیع شد و به‌منظور تهیهٔ محیط کشت به‌صورت دبل فاز حدود ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی آگار در پتری‌دیش‌ها ریخته شد و

بعد از سردشدن آن، ۱۰ میلی‌لیتر از همان محیط کشت به‌صورت مایع (بدون آگار) به آن افزوده شد (Tian *et al.*, 2008). پتری‌دیش‌ها در اتاقک رشد تحت فتوپریود شانزده ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی با شدت نور ۵۰ میکرومول بر ثانیه بر مترمربع و دمای ۱±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت هشت و ده هفته از کشت، در زیر استریومیکروسکوپ تخمک‌ها را شکافته و جنین‌هایی که داخل کیسهٔ جنینی در سمت سفت قرار داشتند، خارج شدند (شکل۱.الف).

جنین‌های خارج‌شده اشکال کروی، قلبی و اژدری داشتند (شکل۲) در بعضی مواقع پس از شکافتن تخمک‌ها حالت چندجنینی مشاهده شد که این جنین‌ها از سلول‌های بدنی (سوماتیک) یا سلول‌های گامتوفیت به وجود آمده بودند و تعداد آن‌ها یک در نظر گرفته شد (شکل ۲) همچنین پس از خارج‌کردن جنین، میزان آندوسپرم تخمک‌ها به سه صورت تخمک با آندوسپرم کامل، نیمه و عاری از آندوسپرم ثبت شد. جنین‌ها از آندوسپرم و تخمک جدا شده و به محیط کشت MS (Murashing & Skoog, 1962) تکمیل‌شده با ۲ درصد ساکارز، ۰/۲ درصد زغال فعال و ۰/۷ درصد آگار منتقل و تحت همان شرایط قبلی در اتاق رشد قرار داده شدند (شکل ۱.ب).

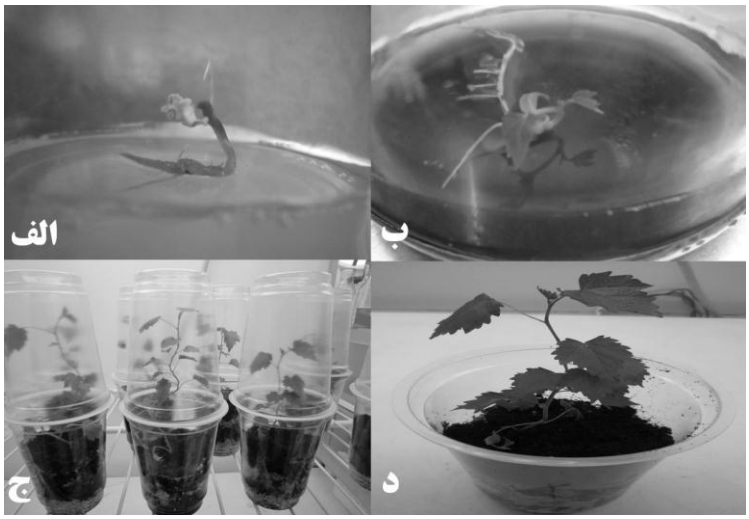


شکل ۱. جنین اژدری درون تخمک برش داده‌شده (الف)، کشت جنین خارج شده از تخمک در محیط کشت دبل فاز (ب)، جنین در حال جوانه‌زدن دو هفته بعد ازکشت (ج)، جنین جوانه‌زده با برگ و ریشهٔ اولیه (د)



شکل ۲. مراحل مختلف رشد جنین: مرحلهٔ قلبی (الف)، شروع مرحلهٔ اژدری (ب)، اواسط مرحلهٔ اژدری (ج)، جنین اژدری کامل (د)، تخمک با چند جنین (ه و ی)

بعد از گذشت دو هفته از کشت، جنین‌ها شروع به جوانه‌زدن کردند (شکل۱.ج) و طی دو هفتهٔ بعدی، برگ‌های اولیه که فاقد کلروفیل بودند و نیز ریشه‌های اولیه ظاهر شدند (شکل‌های ۱.د و ۳.الف). شش هفته پس از کشت جنین‌ها، رنگ برگ‌ها به سبزی گرایید و گیاهان به رشد ادامه دادند و به گیاهچه (دارای چهار تا هشت برگ) تبدیل شدند (شکل۳.ب). پس از گذشت دوازده هفته از زمان کشت و انجام مراحل سازگاری (شکل۳.ج)، گیاهان توسعه‌یافته به خاک منتقل شدند (شکل۳.د).



شکل۳. جنین جوانه‌زده با دو برگ اولیه (فاقد کلروفیل) دو هفته پس از جوانه‌زنی (الف)، گیاهچهٔ رشدیافته شش هفته پس از جوانه‌زنی جنین (ب)، گیاهان رشدیافته طی مراحل سازگاری (ج)، گیاه سازگارشده دوازده هفته پس از جوانه‌زنی جنین (د)

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت که شامل چهار فاکتور نوع محیط کشت با دو سطح (NN و ER)، حالت محیط کشت با دو سطح (جامد و دبل فاز)، زمان جداسازی تخمک با سه سطح (۳۵، ۴۵ و ۵۵ روز پس از گرده‌افشانی) و زمان جداسازی جنین با دو سطح (هشت و ده هفته پس از کشت تخمک) بود. این آزمایش شامل ۲۴ تیمار و در هر تیمار چهار پتری‌دیش به‌منزلهٔ تکرار در نظر گرفته شد و در هر پتری‌دیش ۱۵ تخمک کشت شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس رویه GLM نرم‌افزار SAS (Ver9.2) انجام گرفت و میانگین‌ها به‌کمک آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

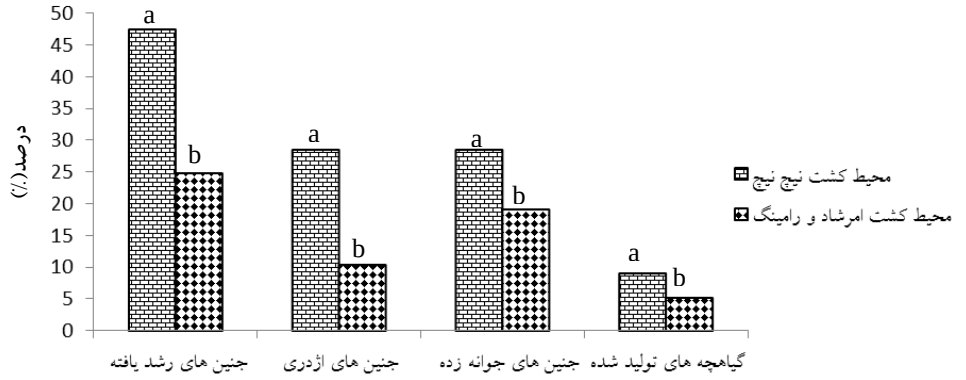
نتایج به‌دست‌آمده از تجزیهٔ واریانس داده‌ها (جدول ۱) بیانگر آن بود که نوع محیط کشت تأثیر معناداری بر میزان رشد جنین‌ها (جنین‌های کروی، قلبی، اژدری و جنین‌های‌چندگانه)، تعداد جنین‌های اژدری، میزان جنین‌های جوانه‌زده و تعداد گیاهچه‌های تولیدشده داشت. نتایجی که از مقایسهٔ میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح ۵ درصد به دست آمد، مشخص کرد که محیط کشت NN نسبت به محیط کشت ER تأثیر بهتری بر صفات اندازه‌گیری شده داشت (شکل۴). همچنین از نظر مراحل توسعهٔ جنین، بیشترین تعداد جنین‌ها مربوط به مراحل اژدری و کروی شکل و کمترین آن مربوط به مرحلهٔ قلبی‌شکل بود. این نتایج بیانگر افزایش میزان جنین‌های رشدیافته و نیز جنین‌های اژدری‌شکل در محیط کشت NN نسبت به محیط کشت ER بود (جدول۲).

پس از برش‌دادن تخمک‌ها مشخص شد که آن دسته از جنین‌هایی که تخمک‌های آن‌ها در محیط کشت دبل فاز قرار داده شده بودند به مرحلهٔ اژدری شکل نزدیک‌تر بودند و رشد بیشتری داشتند، در صورتی که جنین‌های حاصل از کشت تخمک در محیط کشت جامد اندازهٔ کوچک‌تر داشتند و در مراحل ابتدایی‌تر تکامل (قبل از مرحلهٔ اژدری شکل) قرار گرفته بودند. نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها نشان داد که محیط‌های کشت با حالت دبل فاز اثر سودمندتری بر روی صفات یادشده نسبت به محیط کشت با فاز جامد داشت (شکل۵).

جدول ۱. تجزیهٔ واریانس اثر محیط کشت، فاز محیط کشت، زمان جداسازی تخمک و زمان جداسازی جنین بر درصد جنین‌های رشدیافته، جنین‌های اژدری، جوانه‌زنی جنین‌ها و گیاهچه‌های تولیدشده

منابع تغییر	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات			
		الف	ب	ج	د
نوع محیط کشت	۱	۱۲۲۸۲ /۴۹**	۷۷۵۹/۸۸**	۲۰۷۸/۲۷**	۳۳۷/۴۲**
فاز محیط کشت	۱	۱۹۴۶/۳۶**	۵۸۰/۹۷**	۳۳۴۴/۴۷**	۱۶۷/۱۶**
زمان جداسازی تخمک	۲	۳۴۷۸/۳۱**	۱۳۰۶/۶۸**	۱۷۵۵/۷۸**	۱۸۹/۳۴**
زمان جداسازی جنین	۱	۴۷/۶۵**	۳۶۷/۶۱**	۱۳۳/۸۳**	۵۵/۹۹*
محیط کشت × فاز محیط کشت	۱	۳۳۸/۰۴**	۳۱۶/۸۶**	۳۷/۴۸	۵۶/۰۸*
محیط کشت × زمان جداسازی تخمک	۲	۱۳۹/۳۳**	۳۲۶/۳۱**	۳۱۱/۵۲**	۲۹/۲۲
محیط کشت × زمان جداسازی جنین	۱	۱/۴۰	۴۱/۹۷	۱۱/۵۵	۱۱/۵۵
فاز محیط کشت × زمان جداسازی تخمک	۲	۹۵/۱۰	۶۶۹/۱۵**	۲۵۸/۶۳**	۲۸/۲۸
فاز محیط کشت × زمان جداسازی جنین	۱	۰/۰۳	۶۱/۱۰	۰/۴۶	۴/۱۶
زمان جداسازی تخمک × زمان جداسازی جنین	۲	۶/۲۹	۱۵/۳۴	۳/۲۴	۰/۰۰۴
محیط کشت × فاز محیط کشت × زمان جداسازی تخمک	۲	۳۵/۷۶	۴۷۵/۹۹**	۷۹/۲۰**	۳/۲۵
محیط کشت × فاز محیط کشت × زمان جداسازی جنین	۱	۴۰/۲۳	۵۳/۰۳	۴/۱۷	۰/۴۶
محیط کشت × زمان جداسازی تخمک × زمان جداسازی جنین	۲	۱۸/۷۱	۳۰/۰۹*	۳/۲۴	۰/۴۶
فاز محیط کشت ×زمان جداسازی تخمک × زمان جداسازی جنین	۲	۶/۸۴	۲۳۶/۵۲*	۶/۰۳	۱/۳۹
محیط کشت×فاز محیط کشت×زمان جداسازی تخمک× زمان جداسازی	۲	۱۳/۸۰	۵۴/۳۸	۴/۱۷	۰/۴۶
خطا	۷۲	۲۰/۱۶	۳۲/۰۸	۱۳/۷۳	۱۰/۱۷
ضریب تغییرات (CV)	–	۱۲/۴۱	۲۹/۱۳	۱۷/۰۱	۳۵/۸۰

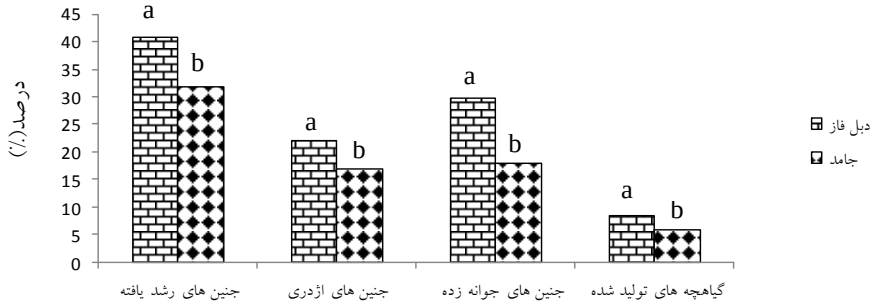
** معنادار در سطح ۱ درصد، * معنادار در سطح ۵ درصد الف: درصد جنین‌های رشدیافته (کروی، قلبی و اژدری) ب: درصد جنین‌های اژدری ج: درصد جوانه‌زنی جنین‌ها د: درصد گیاهچه‌های تولیدشده.



شکل ۴. تأثیر نوع محیط کشت بر درصد جنین‌های رشدیافته، جنین‌های اژدری، جنین‌های جوانه‌زده و گیاهچه‌های تولیدشده در انگور رقم فیلم سیدلس. در شکل فوق هر یک از صفات جدا از یکدیگر و به‌صورت مستقل مقایسهٔ میانگین شده‌اند.

جدول ۲. تعداد و نوع جنین در محیط‌های کشت NN و ER

	تعداد کل محیط کشت جنین‌ها	کروی شکل		قلبی شکل		اژدری شکل		چندجنینی	
		تعداد	(٪)	تعداد	(٪)	تعداد	(٪)	تعداد	(٪)
NN	۳۳۸	۸۳	۲۵/۳۰	۴۳	۱۳/۱۰	۲۰۵	۶۰/۶۵	۳	۰/۹۵
ER	۱۸۱	۷۰	۳۸/۶۷	۳۴	۱۸/۸۷	۷۵	۴۱/۴۳	۲	۱/۰۳

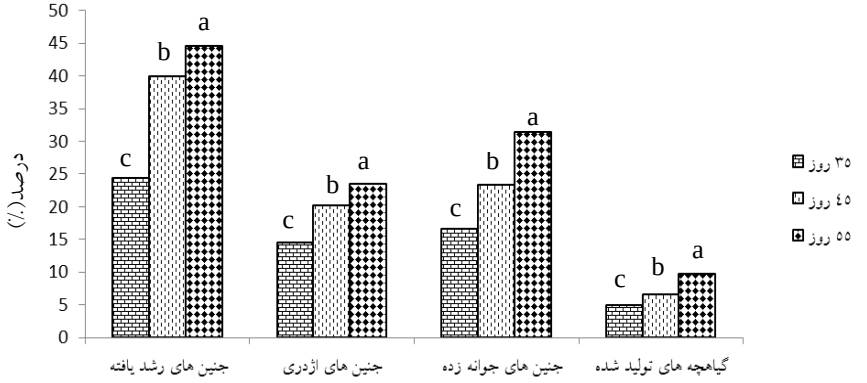


شکل ۵. تأثیر حالت محیط کشت بر درصد جنین‌های رشدیافته، جنین‌های اژدری، جنین‌های جوانه‌زده و گیاهچه‌های تولیدشده در انگور رقم فیلم سیدلس. در شکل فوق هر یک از صفات جدا از یکدیگر و به‌صورت مستقل مقایسهٔ میانگین شده‌اند.

زمان‌های جداسازی تخمک نیز روی چهار صفت بررسی‌شده تأثیر معناداری داشت. نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها نشان داد که در بین زمان‌های جداسازی تخمک از حبه (۳۵، ۴۵ و ۵۵ روز بعد از گرده‌افشانی) زمان جداسازی ۵۵ روز نسبت به دو زمان دیگر تأثیر بیشتری بر صفات بررسی‌شده داشت (شکل۶). همچنین بررسی میزان آندوسپرم در سه زمان یادشده نشان داد که هرچقدر جداسازی تخمک دیرتر انجام گیرد، میزان آندوسپرم درون تخمک نیز کمتر می‌شود (جدول۳).

زمان جداسازی جنین از تخمک نیز تأثیر معناداری بر درصد جنین‌های رشدیافته، درصد تشکیل جنین‌های اژدری، درصد جوانه‌زنی جنین‌ها و گیاهچه‌های تولیدی داشت. نتایج حاصل از مقایسهٔ میانگین‌ها نشان داد که در بین زمان‌های جداسازی جنین از تخمک، زمان جداسازی ۱۰ هفته نسبت به زمان جداسازی ۸ هفته تأثیر مثبت معنادار و بهتری داشت (شکل۷).

بررسی اثرات متقابل نشان داد که استفاده از محیط کشت NN با حالت دبل فاز با جداسازی تخمک در زمان ۵۵ روز و نیز جداسازی جنین در زمان ۱۰ هفته بیشترین درصد جنین‌های رشد یافته، جنین‌های اژدری، بالاترین درصد جوانه‌زنی جنین و بیشترین تعداد گیاهچه‌های تولیدی را داشت (شکل‌های ۵ تا ۸).

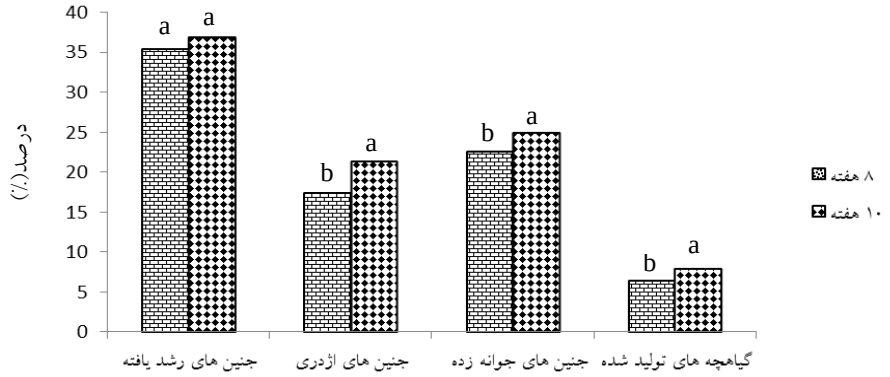


شکل ۶. تأثیر زمان جداسازی تخمک از حبه بر درصد جنین‌های رشدیافته، جنین‌های اژدری، جنین‌های جوانه‌زده و گیاهچه‌های تولیدشده در انگور رقم فیلم سیدلس. در شکل فوق هر یک از صفات جدا از یکدیگر و به‌صورت مستقل مقایسهٔ میانگین شده‌اند.

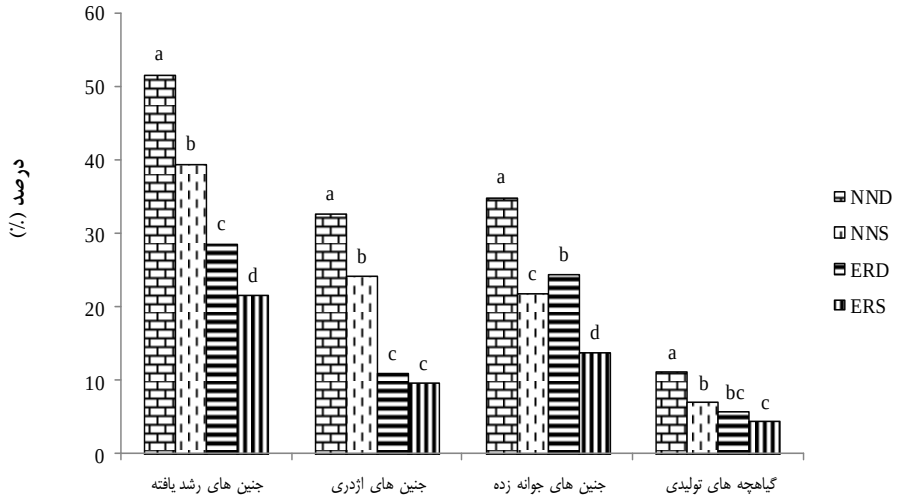
جدول ۳. بررسی میزان آندوسپرم درون کیسه جنینی در تخمک‌های جدا شده در زمان‌های ۳۵، ۴۵ و ۵۵ روز پس از باز شدن گل‌ها

۳۵روز			۴۵ روز			۵۵ روز		
+E	½E	-E	+E	½E	-E	+E	½E	-E
۳۴/۵۸	۲۴/۱۶	۴۱/۲۵	۳۴/۱۶	۱۵/۴۱	۵۰/۴۱	۱۸/۰۸	۱۷/۵	۶۵/۴۱

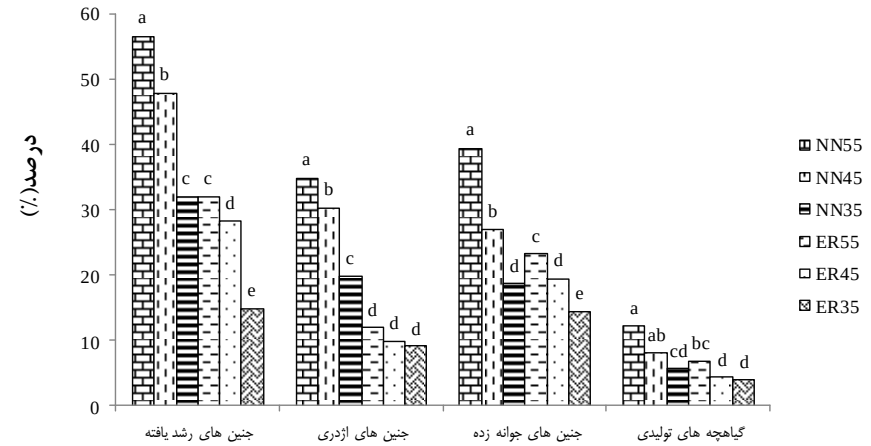
+E: آندوسپرم کامل، ½E: آندوسپرم نیمه، -E : بدون آندوسپرم. * اعداد جدول بر حسب درصد هستند.



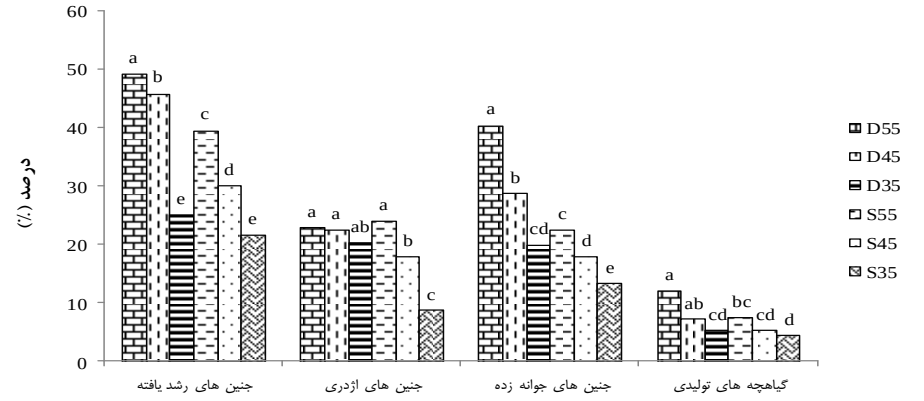
شکل ۷. تأثیر زمان جداسازی جنین از تخمک بر درصد جنین‌های رشدیافته، جنین‌های اژدری، جنین‌های جوانه‌زده و گیاهچه‌های تولیدشده در انگور رقم فیلم سیدلس. در شکل فوق هر یک از صفات جدا از یکدیگر و به‌صورت مستقل مقایسهٔ میانگین شده‌اند.



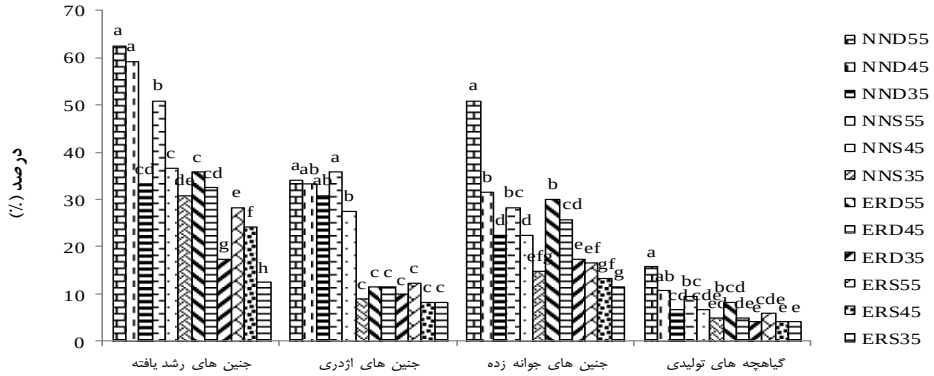
شکل ۸. اثر متقابل بین ترکیب محیط کشت و فاز محیط کشت بر صفات بررسی‌شده



شکل ۹. اثر متقابل بین ترکیب محیط کشت و زمان جداسازی تخمک بر صفات بررسی‌شده



شکل ۱۰. اثر متقابل بین فاز محیط کشت فاز محیط کشت و زمان جداسازی تخمک بر صفات بررسی‌شده



شکل ۱۱. اثر متقابل بین ترکیب محیط کشت، فاز محیط کشت و زمان جداسازی تخمک بر صفات بررسی‌شده

(ER): محیط کشت امرشاد رامینگ، (NN): محیط کشت نیچ و همکاران، (S): محیط کشت با حالت جامد، (D): محیط کشت با حالت دبل فاز.

میانگین‌هایی که در هر ستون حروف مشابه دارند از نظر آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد معناداری نیستند.

در نمودارهای فوق هر یک از صفات، جدا از یکدیگر و به‌صورت مستقل مقایسهٔ میانگین شده‌اند.

بحث

والد پدری می‌تواند آثار مثبت و منفی بر میزان جوانه‌زنی جنین‌ها بگذارد (Bharathy *et al.*, 2005) از آنجا که والد مادری نسبت به والد پدری تأثیر بیشتری بر روی جوانه‌زنی جنین دارد (Yang *et al.*, 2006) بنابراین، در این پژوهش از تلاقی رقم فلیم سیدلس با ارقام دیگر به‌منظور جلوگیری از پیچیده‌شدن روابط و تحت‌تأثیر قرارگرفتن دیگر فاکتورهای بررسی‌شده، صرف‌نظر شد.

ترکیب محیط کشت نقش اساسی و بسیار مهمی در نجات جنین انگورهای بی‌دانه در شرایط آزمایشگاهی دارد (Yang *et al.*, 2006). محیط‌های کشت ER، NN و MS بیشترین موفقیت را در میان محیط‌های کشت استفاده‌شده برای نجات جنین انگورهای بی‌دانه حاصل کرده‌اند. در بررسی‌هایی که برای شناخت بهترین محیط کشت برای کشت تخمک انجام شد، Yang *et al.* (2006) با مقایسهٔ محیط‌های کشت B5، MS و NN، Liu *et al.* (2003) با مقایسهٔ محیط‌های کشت BD، ER و NN و همچنین Tang *et al.* (2008) با مقایسهٔ محیط‌های کشت B5 و NN دریافتند که محیط کشت NN نسبت به محیط‌های کشت دیگر تأثیر بهتری بر جوانه‌زنی جنین و رشد گیاهچه‌ها دارد. Guo *et al.* (2004) گزارش کردند که جنین‌های کشت‌شده رقم ونوس سیدلس[1] و جنین‌های حاصل از تلاقی بیچون[2]× امرالد سیدلس در محیط کشت ER و NN نسبت به جنین‌های کشت‌شده در محیط کشت MS جوانه‌زنی بهتری داشتند. در نهایت Cheng *et al.* (2007) با آزمایش دو محیط کشت NN و ER در مورد ارقام روبی سیدلس و امرالد سیدلس گزارش کردند که تخمک‌های کشت‌شده در محیط کشت NN نسبت به محیط کشت ER جوانه‌زنی بالاتری داشتند این در حالی است که

1. Venus Seedless
2. Beichun

برخلاف نتایج Liu *et al.* (2003) و Cheng *et al.* (2007) گزارش Tian *et al.* (2008) مبنی بر این بود که جنین تخمک‌های کشت‌شده در محیط کشت ER نسبت به محیط کشت NN میزان جوانه‌زنی بالاتری داشتند.در بررسی ما محیط کشت NN نسبت به ER تأثیرات سودمندتری روی رشد و رسیدن جنین‌ها به مرحلهٔ اژدری و نیز جوانه‌زدن آن‌ها داشت که موافق نظر Liu *et al.* (2003) و Cheng *et al.* (2007) است. این تفاوت در نتایج ممکن است به‌دلیل تفاوت در ژنوتیپ‌های استفاده‌شده و واکنش این ژنوتیپ‌ها به نوع ترکیبات و غلظت‌های متفاوت مواد به‌کاررفته در محیط‌های کشت استفاده‌شده در این پژوهش‌ها باشد.

محیط‌های کشت با حالات مایع و جامد توسط پژوهشگران مختلف برای کشت تخمک‌های انگور بارها استفاده شده‌اند. Meng *et al.* (1994) در پژوهشی تخمک‌های حاصل از گرده‌افشانی باز در ارقام تامپسون سیدلس[1] و برانکس سیدلس[2] را در محیط‌های مختلف کشت و نتیجه گرفتند که محیط کشت مایع برای برخی ارقام بهتر است و نمو جنین در آن بهتر صورت می‌گیرد. در محیط کشت مایع در مورد ارقام مورد نظر، جنین‌های بزرگ‌تری تولید شد و بدشکلی نیز وجود نداشت. بااین‌حال پژوهشگران دیگر محیط کشت جامد را نسبت به محیط کشت مایع ترجیح داده‌اند. Gray *et al.* (1987) با مقایسهٔ کشت تخمک‌های حاصل از تلاقی ارقام اورلاندو سیدلس[3] و آرکانساس[4] در محیط کشت‌هایی با حالت جامد و مایع دریافتند که توسعه و رشد جنین‌ها هیچ تفاوت معناداری در دو حالت جامد و مایع نداشت. Burger & Trautman (2000) با مقایسهٔ حالت نیمه‌جامد (چهار گرم آگار در لیتر) و جامد در ارقام فلیم سیدلس، اکلیپس سیدلس[5]، سانردسیدلس[6] و NVB88-80 و نیز Tian *et al.* (2008) با مقایسهٔ حالت‌های جامد، مایع و دبل فاز در ارقام امرالد سیدلس[7]، فلیم سیدلس، تامپسون سیدلس، دلایت[8]، روبی سیدلس[9]، موناکا[10] و بلاش سیدلس[11] دریافتند که استفاده از محیط کشت با حالت دبل فاز به‌طور معناداری تکامل و جوانه‌زنی جنین را نسبت به محیط‌های کشت با حالات جامد و مایع افزایش داد. نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد محیط کشت دبل فاز میزان توسعه و رشد جنین را افزایش می‌دهد، به‌طوری‌که در این محیط کشت، جنین‌های بیشتری به مرحلهٔ اژدری رسیدند و این امر به‌نوبهٔ خود سبب بهبود در جوانه‌زنی جنین‌ها شد. به نظر می رسد استفاده از حالت دبل فاز توانسته بود ویژگی‌های مفید هر یک از حالت جامد و مایع را به‌صورت یکجا برای تخمک و جنین فراهم کند و سبب بهبود جذب مواد غذایی توسط تخمک در طول دورهٔ کشت شود. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش تأییدکنندهٔ نتایج Burger & Trautman (2000) و Tian *et al.* (2008) است.

شناخت بهترین زمان جهت جداسازی تخمک از حبه، قبل از سقط و از بین رفتن جنین بسیار مهم است و دانستن آن سبب می‌شود که جنین اجازه یابد بیشترین رشد خود را قبل از سقط‌شدن روی پایهٔ مادری انجام دهد. زمان جداسازی تخمک از حبه در ارقام مختلف متفاوت است. Gray *et al.* (1990) با کاشت تخمک‌های ارقام اورلاندو سیدلس، هیمراد[12] و مارس[13] در زمان‌های ۱۰ تا ۷۰ روز، زمان‌های ۴۰ تا ۶۰ روز بعد از گرده‌افشانی را برای جداسازی تخمک مناسب دانستند، همچنین Kebeli *et al.* (2003) با مقایسهٔ دو زمان ۴۲ و ۵۲ روز در رقم باریس[14]، زمان ۵۲ روز را برای جداسازی و کشت تخمک مناسب دانستند. Ebadi *et al.* (2000) در مورد ارقام ایرانی گزارش کردند که پس از گذشت ۲۱ روز از گرده‌افشانی در رقم ایرانی بی‌دانهٔ قرمز، جنین یا آندوسپرم زنده و فعال وجود نداشت، درحالی‌که در ارقام ایرانی عسکری، کشمشی سبز و یاقوتی سقط جنین در زمان‌های دیرتر رخ داده بود. در پژوهش‌های مختلفی در زمینهٔ زمان جداسازی تخمک از حبه در رقم فلیم سیدلس، پژوهشگران در زمان‌های متفاوتی اقدام به جداسازی تخمک از حبه کرده‌اند که Bharathy *et al.* (2005) در زمان ۴۰ روز و Tian *et al.* (2008) در زمان ۴۹ روز اقدام به جداسازی کرده‌اند. Spiegel-Roy *et al.*

1. Thompson Seedless
2. Bronx Seedless
3. Orlando Seedless
4. Arkansas
5. Eclipse Seedless
6. Sunred Seedless
7. Emerald Seedless
8. Delight
9. Ruby Seedless
10. Monukka
11. Blush Seedless
12. Himord
13. Mars
14. Baris

(1985) با مقایسهٔ دو زمان جداسازی ۲۸ و ۴۹ روز بعد از گرده‌افشانی بر روی رقم فلیم سیدلس نتیجه گرفتند که بیشترین تعداد جوانه‌زنی جنین با جداسازی تخمک از حبه در زمان ۴۹ روز پس از شکوفایی گل‌ها میسر شد. Liu Xiao-ning *et al.* (2005) زمان مناسب جداسازی تخمک از حبه را در رقم فلیم سیدلس ۳۷ روز گزارش کردند و در بررسی‌هایشان این زمان را براساس اینکه آندوسپرم در رقم فلیم سیدلس در زمان ۳۰ روز از بین می‌رود و جنین به‌دلیل از بین رفتن آندوسپرم و تغذیه‌نشدن با مواد مغذی آندوسپرم سقط می‌شود، مناسب دانستند. Gray *et al.* (1990) گزارش کردند که جنین‌های جداشده با یا بدون آندوسپرم به رشد خود ادامه دادند و زنده ماندند. مشاهدات ما نیز این گزارش‌ها را تأیید کرد و این مطلب مشخص می‌کند که از بین رفتن و فقدان آندوسپرم به‌طور قطع نمی‌تواند رشد جنین را در شرایط درون‌شیشه‌ای تحت‌تأثیر قرار دهد و آن را متوقف کند و سبب سقط و از بین رفتن جنین شود. همان‌طور که در جدول ۳ آمده است، بیشترین درصد تخمک‌های بدون آندوسپرم (۶۵/۴۱ درصد) در زمان جداسازی ۵۵ روز مشاهده شدند، بااین‌حال بیشترین موفقیت در نجات جنین و تکامل بعدی آن متعلق به همین زمان بود. Aguero *et al.* (2000) گزارش کردند که به‌دلیل از بین رفتن تعادل بین هورمون‌ها سقط جنین رخ می‌دهد و در همین راستا Bharathy *et al.* (2005) با اسپری بنزیل آدنین روی حبه‌های انگور رقم فلیم سیدلس و تبدیل حبه به یک سینک قوی، میزان جنین‌های بازیابی‌شده و جنین‌های جوانه‌زده را در تخمک‌های جداشده پس از ۴۰ روز را ۶ تا ۱۹ برابر (به‌دلیل تفاوت در ارقام پدری) نسبت به شاهد افزایش دادند و این امر خود دلیلی بر این مطلب است که احتمالاً از بین رفتن آندوسپرم از مرحلهٔ خاص تکاملی به بعد سبب اختلال در تغذیهٔ جنین و سقط آن نمی‌شود. در بررسی ما زمان ۵۵ روز مناسب‌ترین زمان برای جداسازی تخمک از حبه نسبت به دو زمان ۳۵ و ۴۵ روز در رقم فلیم سیدلس بود که این زمان به زمان ۴۹ روز Spiegel-Roy *et al.* (1985) نزدیک و با زمان جداسازی تخمک از حبه در ۳۷ روز که Liu *et al.* (2005) گزارش کردند فاصلهٔ زیادی داشت. این تفاوت احتمالاً به‌دلیل استفاده ما از تخمک‌هایی به اندازهٔ چهار میلی‌متر یا بیشتر در زمان جداسازی تخمک از حبه‌هاست، زیرا در پژوهشی مشخص شد که تخمک‌هایی به اندازه چهار میلی‌متر یا بیشتر نسبت به تخمک‌های کوچک‌تر داری جنین‌های رشدیافته‌تر و درصد جوانه‌زنی بسیار بالاتری داشتند (Tang *et al.* 2009). به نظر ما تفاوت در منطقهٔ کشت، شرایط آب و هوایی و حتی وضعیت تغذیه‌ای درخت می‌تواند متفاوت‌بودن زمان مناسب جداسازی تخمک را در پژوهش‌های مذکور را توجیه کند.

دورهٔ کشت تخمک در شرایط آزمایشگاهی به‌منزلهٔ یک عامل مهم در افزایش بازده تولید گیاه توسط تکنیک نجات جنین محسوب می‌شود. یک دورهٔ کشت هشت تا دوازده‌هفته‌ای برای کشت تخمک توسط بیشتر اصلاح‌کنندگان انگور توصیه شده است (Spiegel-Roy *et al.*, 1985; Gray *et al.*, 1987; Bouquet & Davis *et al.*, 1990; Zang *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2003) و طولانی‌تر شدن آن ممکن است توانایی بازیابی جنین را کاهش دهد. در این پژوهش مشاهده شد که دورهٔ کشت ۱۰ هفته‌ای تخمک نسبت به دورهٔ کشت هشت هفته‌ای در انگور رقم فلیم سیدلس تأثیر بهتری بر جوانه‌زنی جنین و میزان تولید گیاهچه داشت، که این نتایج با گزارش Tian *et al.* (2008) مطابقت دارد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش به نظر ما بهترین شرایط برای نجات جنین انگور رقم فلیم سیدلس در برنامه‌های به‌نژادی می‌تواند جداسازی تخمک‌ها از حبه در زمان ۵۵ روز، جداسازی جنین از تخمک در زمان ۱۰ هفته و کشت تخمک در محیط کشت NN با حالت دبل فاز معرفی می‌شود.

REFERENCES

1. 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.
2. Bharathy, P. V., Karibasappa, G. S. & Patil, S. G. (2005). In ovule rescue of hybrid embryos in Flame Seedless grapes Influence of pre-bloom sprays of benzyladenine. *Scientia Horticulturae*, 106, 353-356.
3. Bouquet, A. & Davis, H. P. (1990). *In vitro* ovule and embryo culture for breeding seedless table grapes (*Vitis vinifera* L.). CAB Abstracts. AN, 901612160.

4. Burger, P. & Trautmann, I.A. (2000). Manipulations of ovules to improve in vitrodevelopment of *Vitis vinifera* L. embryos. *Acta Horticulturae*, 528, 613–619.
5. Cheng Lin-lin.,Wang Yue-jin., Shi Yan., Zhang Jian-xia.,Tang Dong-mei & Zhang Zong-qin. (2007). Study on factors affecting embryo rescue of seedless grape. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 27 (7), 1317-1322. (In Chinese).
6. Ebadi, A., Atashkar, D. & Dehghani, Y. (2000). Mechanism of seedlessness in five Iranian seedless cvs of grapevine (*V. vinifera* L.). Proceeding of *6th international symposium of grapevine physiology and biotechnology. Create Heraklion*, Greece.Abstract.
7. Emershad, R. L. & Ramming, D.W. (1984). In ovule embryo culture of *Vitis vinifera* L. cv. Thompson Seedless. *The American Journal of Botany*, 71(6), 873-877.
8. Emershad, R.L., Ramming, D.W. & Serpe, M.D. (1989). In ovule embryo development and plant formation from stenospermic genotypes of *Vitis vinifera.The American Journal of Botany*, 76(3), 379-402.
9. Gray, D. J., Fisher, L. C. & Mortensen, J. A. (1987). Comparison of methodologies for in ovule embryo rescue of seedless grapes. *Hortscince*, 22(6), 1334-1335.
10. Gray, D. J., Mortensen, J. A., Benton, C. M., Durham, R. E. & Moore, G. A. (1990). Ovule culture to obtain progeny from hybrid seedless bunch grapes. *Journal* of the *American Society* for *Horticultural Science*, 115(6), 1019-1024.
11. Guo, Y.S., Gao, X.Y., Zhao, Y.H. & Guo, X.W. (2004). Preliminary report on the embryo rescue technique in Venus Seedless grape. *Sino-overseas Grapevine Wine*, 3, 6-8.
12. Kebeli, N. & Boz, Y. (2003). Studies on the Applying of embryo culture in breeding new hybrids by crossing seedless grape cultivars. *Acta Horticulturae*, 279–281.
13. Ledbetter, C.A. & Ramming, D.W. (1989). Seedlessness in grapes. *Horticultural Reviews*, 11, 159–184.
14. Liu, S. M., Sykes, R. & Clingeleffer, R. (2003). Improved in ovule embryo culture for stenospermocarpic grapes. *Australian Journal* of *Agricultural Research*, 54, 869-876.
15. Liu Xiao-ning., Wang Yue-jin., Zhang Jian-xia. & Jiang Shu-ping. (2005). Development and abortion of the ovules,endosperms and embryos of Flame Seedless grape. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 10, 1947-1953.
16. 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.
17. Meng, X. F., Zhang, L., Zhang, L. S. & Wang, S. Z. (1994). Study on ovule development of seedless grapes and its early culture *in vitro*, III. Effect of culture methods on embryo development *in vitro*. CAB Abstract. AN, 941610505.
18. Murashige, T. & Skoog, G. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Journal* of *Plant Physiology*, 15, 473–497.
19. Nitsch, J.P. & Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163, 85–87.
20. Ponce, M. & Tizio, R. (2002). Brief Note. Improved in vitro embryo development of stenospermic grape by putrescine. *Biocell*, 26(2), 263–266.
21. Ramming, D. W. (1990). The use of embryo culture in fruit breeding. *Hortscince*, 25(4), 393-398.
22. 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.
23. Tang, D., Wang, Y., Cai, J. & Zhao, R. (2006). Study on embryo rescue technique for seedless grape breeding. *Journal of Fruit Science*, 23, 87-99.
24. Tang, D., Wang, Y., Cai, J. & Zhao, R. (2008). 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.
25. Tian, L. (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.
26. Tsolova, V. (1990). Obtaining plants from crosses of seedless grapevinevarieties by means of *in vitro* embryo culture. *Vitis*, 29, 1-4.
27. Valdez, J. G. (2005). Immature embryo rescue of grapevine (*Vitis vinifera* L) after an extended period of seed trace culture. *Vitis*, 44(1), 17–23.
28. 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, 63-71.
29. Zhang, L., Meng, X.F. & Zhang, L.S. (1990). A study on ovule development of seedless grapes and its early culture *in vitro* I. The effect of plant growth regulators on in ovulo embryo culture. *Acta Agriculture Universitatis Pekinensis*, 3, 277–282.
30. Zhao, S. J. & Guo, Z. (2004). Advances in research of breeding seedless triploid grapes. *Journal of Fruit Science*, 21, 360-364.