علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۴۵، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۳ (ص ۳۵۲-۳۴۵)

تولید جنین سوماتیکی و باززایی گیاه با استفاده از ریزنمونهٔ تخمدان در ارقام انگور یاقوتی، بی‌دانهٔ سفید، شاهرودی و فلیم سیدلس

امیر جمال محمود[۱]، علی عبادی[۲*]، مسعود میرمعصومی[۳] و منصور امیدی[۴]
۱، ۲، ۳ و ۴. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد، مربی و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۱۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۱/۳۰)

چکیده

به‌منظور تولید کالوس جنین‌زا در چهار رقم انگور شامل یاقوتی، بی‌دانهٔ سفید، شاهرودی و فلیم سیدلس، ریزنمونه‌های تخمدان در دو مرحلهٔ III و V جمع‌آوری و در محیط کشت MS با غلظت‌های متفاوت 2,4-D و BAP کشت شدند. برای تمایزیابی جنین از محیط کشت MS با غلظت‌های مختلف IAA و BAP استفاده شد. نتایج نشان داد که جمع‌آوری ریزنمونه‌های تخمدان در مرحلهٔ V بالاترین درصد تولید جنین سوماتیکی را در همهٔ ارقام ایجاد می‌کند. محیط کشت MS به همراه ۴/۵ میکرومولار 2,4-D و ۱/۱ میکرومولار BAP در تولید کالوس جنین‌زا و همچنین محیط کشت MS به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در مرحلهٔ تمایز جنین بهتر از بقیهٔ تیمارهای هورمونی بودند. بیشترین تولید جنین سوماتیکی در ارقام یاقوتی و بی‌دانهٔ سفید در زمان دوم جمع‌آوری (v) و کمترین درصد تولید جنین سوماتیکی در ارقام شاهرودی و فلیم سیدلس در زمان اول جمع‌آوری (III) ریزنمونه به دست آمد. به‌منظور تولید گیاهچه و باززایی گیاه، جنین‌های تولیدشده در مرحلهٔ اژدری به محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP منتقل شدند. در این محیط کشت بیشتر جنین‌ها جوانه زدند.

واژه‌های کلیدی: **انگور، باززایی، جنین‌زایی سوماتیکی، ریزنمونهٔ تخمدان.**

مقدمه

جنین‌زایی سوماتیکی فرایندی است که در آن سلول‌های سوماتیکی به جنینی که از لحاظ مورفولوژی مشابه با جنین حاصل از تلقیح است، تبدیل می‌شوند (Ammirato *et al*., 1983). جنین‌زایی سوماتیکی کاربردهای زیادی دارد که می‌توان به حفاظت از منابع ژنتیکی (Gary & Compton, 1993)، انتقال ژن برای بهبود کمّیت و کیفیت میوهٔ انگور (Scorza *et al*., 1995) و بررسی تنوع سوماکلونال (Greshoff & Doy, 1974) اشاره کرد. تولید جنین سوماتیکی تحت‌تأثیر فاکتورهای مختلف مانند ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، زمان جمع‌آوری ریزنمونه، محیط کشت و هورمون‌های به‌کاررفته قرار می‌گیرد. در انگور برای اولین‌بار از ریزنمونهٔ پرچم جنین سوماتیکی ایجاد شد (Srinivasan & Mullins, 1976). از آن زمان تا امروز ریزنمونه‌های مختلفی مانند برگ (Das *et al*., 2002)، تخمک (Srinivasan & Mullins, 1980)، دمبرگ (Martinelly *et al*., 1993)، پیچک (Salunkhe *et al*., 1997)، پرچم (Salunkhe *et al*., 1999; Perl *et al*., 1995 Mauro *et al*., 1986)، گره‌های ساقه (Maillot *et al*., 2006)، بافت پوشش بذر (Xu & Lu, 2009)، پروتوپلاست (Zhu *et al*., 1997) و تخمدان (Carimi *et al*., 2005; Gambino *et al*., 2007) برای تولید جنین سوماتیکی در انگور استفاده شده است که در آزمایش‌های مختلف

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

یکی از بهترین ریزنمونه‌ها، ریزنمونهٔ تخمدان بود. در بیشتر گزارش‌ها ریزنمونهٔ تخمدان با سایر ریزنمونه‌ها مقایسه شده و این ریزنمونه تولید جنین سوماتیکی بالاتری را داشته است (Gambino *et al*., 2007; Carimi *et al*., 2005; Lopez-perez *et al*., 2005).

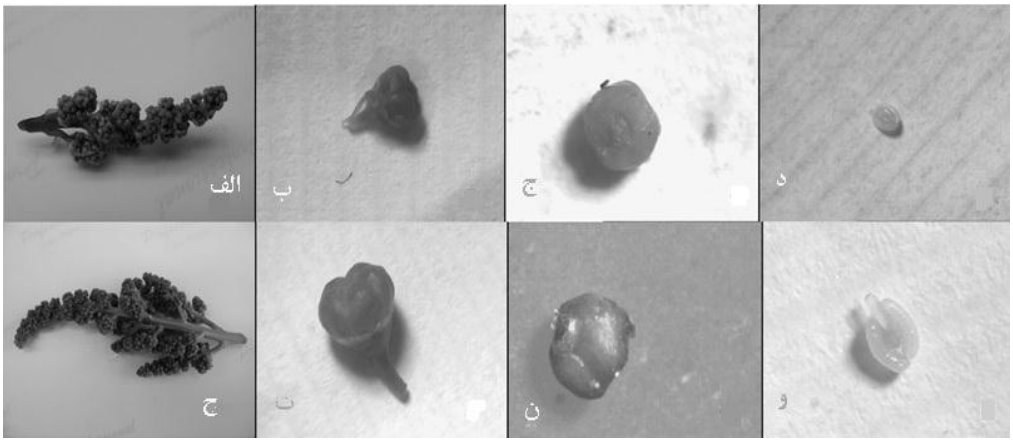
مطابق گزارش‌ها، زمان جمع‌آوری ریزنمونه برای تولید جنین سوماتیکی یکی از فاکتورهای تعیین‌کننده است. به‌طورکلی، فاکتور زمان جمع‌آوری ریزنمونه بیشتر در مورد ریزنمونه‌های زایشی مانند پرچم و تخمدان کاربرد دارد.

Gribaudo *et al*. (2004) مراحل مورفولوژیکی رشد گل‌آذین انگور را به شش مرحله تقسیم کردند که این مراحل مورفولوژیکی مطابق با مرحلهٔ میکروسپوری در پرچم است. در بیشتر گزارش‌ها از این مراحل برای تعیین زمان مناسب برای جمع‌آوری ریزنمونهٔ پرچم و تخمدان استفاده کرده‌اند. در مورد زمان جمع‌آوری ریزنمونهٔ تخمدان فقط یک گزارش (Vidal *et al*., 2009) وجود دارد که بیان کرده است که جمع‌آوری ریزنمونهٔ تخمدان در مراحل چهارم و پنجم مطابق پروتکل Gribaudo *et al*. (2004) سبب تولید درصد بالایی جنین سوماتیکی نسبت به مراحل دوم و سوم شده است. تنها استثنا رقم سلطانینا بوده است که مرحلهٔ دوم برای این رقم نتیجهٔ بهتری را ایجاد کرده است. از آنجا که عامل زمان جمع‌آوری تحت‌تأثیر ژنوتیپ قرار می‌گیرد به نظر می‌رسد که لازم است برای تولید بیشترین جنین سوماتیکی از این ریزنمونه زمان مناسب برای جمع‌آوری ریزنمونه در هر رقم مشخص شود. از دیگر عوامل مهم برای تولید جنین سوماتیکی نوع و نسبت هورمون‌های به‌کاررفته در محیط کشت است که به‌دلیل شرایط فیزیولوژیکی خاص هر رقم، غلظت ویژه‌ای از هورمون‌ها لازم است. بنابراین، ضروری است برای هر رقم سطح مناسب این عوامل تعیین شوند.

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر دو زمان مختلف جمع‌آوری ریزنمونهٔ تخمدان، نوع و غلظت‌های مختلف هورمون بر روند تولید کالوس جنین‌زا و همچنین تولید جنین سوماتیکی در ارقام انگور بی‌دانهٔ سفید، یاقوتی، شاهرودی و فلیم سیدلس انجام شد.

مواد و روش‌ها

گل‌آذین‌ها از مرکز تحقیقات گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج جمع‌آوری شدند. مطابق پروتکل Gribaudo *et al*. (2004) ریزنمونه‌ها در دو مرحلهٔ III و V از باغ تهیه شدند (شکل۱). از لحاظ زمانی مرحلهٔ III، حدود ۱۲ روز و مرحلهٔ V، هشت روز قبل از زمان بازشدن گل‌ها بود. پس از جمع‌آوری گل‌آذین‌ها، در کیسهٔ پلاستیکی قرار داده شده و به مدت سه الی پنج روز در یخچال (دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد) نگهداری شدند. سپس به‌تدریج نمونه‌ها از این دما خارج و کشت داده شدند.



شکل ۱. مورفولوژی خوشه، گل، تخمدان و پرچم در دو زمان مختلف جمع‌آوری ریزنمونه

الف) وضعیت خوشه در زمان اول جمع‌آوری ریزنمونه، ب) وضعیت گل در زمان اول جمع‌آوری، ج) وضعیت تخمدان در زمان اول جمع‌آوری، د) وضعیت پرچم در زمان اول جمع‌آوری، چ) مورفولوژی خوشه در زمان دوم جمع‌آوری ریزنمونه، ت) وضعیت گل در زمان دوم جمع‌آوری، ن) وضعیت تخمدان در زمان دوم جمع‌آوری، و) وضعیت پرچم در زمان دوم جمع‌آوری

برای ضدعفونی ابتدا گل‌آذین‌ها کاملاً شسته شدند، سپس به مدت ۶۰ ثانیه داخل الکل ۷۰ درصد قرار داده شدند. بعد از این کار، گل‌آذین‌ها سه بار با آب‌مقطر استریل شست‌وشو داده شده و سپس به محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه منتقل شدند. در نهایت سه بار با آب‌مقطر استریل شست‌وشو داده شدند.

جداسازی ریزنمونه‌های تخمدان در زیر استریو میکروسکوپ که توسط الکل و نور UV استریل شده بود و داخل هود کاملاً استریل قرار داشت، با دقت بالا به‌طوری‌که به ریزنمونه آسیبی نرسد انجام شد. این کار با حذف پوشش گل و پرچم‌ها و سپس جداسازی تخمدان از کلاله و خامه انجام شد (شکل۱). محیط کشت انتخابی برای القای کالوس محیط کشت MS بود. محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند و سپس داخل پتری‌های شیشه‌ای با قطر ۱۰ سانتی‌متر توزیع شدند. در مرحلهٔ تولید کالوس جنین‌زا فاکتورهای ژنوتیپ (چهار رقم یاقوتی، بی‌دانهٔ سفید، شاهرودی و فلیم سیدلس)، هورمون 2,4-D در دو غلظت ۴/۵ و ۹ میکرومولار و هورمون BAP در دو غلظت ۱/۱ و ۲/۲ میکرومولار ارزیابی شدند. در این مرحله ۱۶ تیمار مختلف با چهار تکرار روی ریزنمونه‌های تخمدان اعمال شد. در مرحلهٔ تمایز جنین سوماتیکی ۳ فاکتور ژنوتیپ در چهار سطح، هورمون BAP در سه غلظت صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و هورمون IAA در سه غلظت صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بررسی شد. این مرحله شامل ۳۶ تیمار مختلف با چهار تکرار بود.

برای القای کالوس از 2,4-D در دو غلظت ۴/۵ و ۹ میکرومولار و BAP در دو غلظت ۱/۱ و ۲/۲ میکرومولار استفاده شد. در داخل هر پتری‌دیش ۲۰ ریزنمونه کشت داده شد و هر پتری‌دیش به‌منزلهٔ یک تکرار در نظر گرفته شد. کالوس‌های به‌دست‌آمده پس از گذشت چهار هفته به محیط تمایزیابی جنین منتقل شدند. محیط کشت پایه MS برای تمایز جنین‌ها استفاده شد. برای تمایز جنین‌ها IAA در غلظت‌های صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر (بعد از اتوکلاو فیلتر شد و به محیط کشت تمایز جنین اضافه شد) و BAP در غلظت‌های صفر، ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر استفاده شدند. در هر پتری‌دیش ۲۰ عدد کالوس حاصل از ۲۰ ریزنمونه تخمدان کشت و هر پتری به‌منزلهٔ یک تکرار در نظر گرفته شد. جنین‌های تولیدشده پس از گذشت یک ماه به‌آرامی با پنس از کالوس‌ها جدا شدند و به محیط جوانه‌زنی و تولید گیاه که شامل محیط کشت MS به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بود، منتقل شدند. در مراحل تولید کالوس و تولید جنین، نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و تاریکی کامل قرار داده شدند. بااین‌حال جنین‌ها پس از جداشدن از بافت تولیدکننده در شرایط نور ۲ هزار لوکس و دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و داخل شیشهٔ مربایی در محیط کشت MS با یک میلی‌گرم در لیتر BAP قرار داده شدند. داده‌برداری از مرحلهٔ القای کالوس یک ماه بعد از کشت ریزنمونه و داده‌برداری از میزان کالوس‌های دارای جنین دو ماه بعد از انتقال به محیط جنین‌زایی انجام شد. داده‌برداری از گیاهان تولیدشده از جنین‌های رویشی شش هفته پس از انتقال به محیط کشت انجام شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایهٔ طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. هر واحد پتری‌دیش به‌منزلهٔ یک تکرار در نظر گرفته شد و به‌ازای هر تیمار ۸۰ ریزنمونه کشت داده شد. داده‌ها به‌صورت درصد محاسبه شدند. برای محاسبهٔ درصد تولید جنین سوماتیکی تعداد کالوس‌هایی که جنین سوماتیکی تولید کرده بودند بر تعداد کل کالوس‌های کشت‌شده تقسیم و حاصل در عدد ۱۰۰ ضرب شد. داده‌ها (درصد) قبل از آنالیز نرمال شدند و آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزارهای SAS 9.1.3 و MSTATC انجام شد.

نتایج و بحث

مرحلهٔ القای کالوس

هفت روز پس از کشت، ریزنمونه‌های تخمدان کالوس‌زایی را شروع کردند. منطقهٔ شروع تولید کالوس از قسمت اتصال تخمدان به نهنج بود. پس از یک ماه بیشتر ریزنمونه‌ها کالوس داشتند. در این مدت چهار نوع بافت به دست آمد: کالوس‌هایی با بافت فشرده که غیرجنین‌زا بودند، کالوس‌های نرم و آبکی که جنین‌زا نبودند، کالوس‌های ترد با ظاهری سفید و یا زردرنگ که در این نوع کالوس‌ها بعد از گذشت یک ماه جنین‌های ریز کروی به تعداد کم بر روی آن‌ها قابل مشاهده بود و در مرحلهٔ تمایز، جنین روی آن‌ها نمو کرد و بالاخره

ریزنمونه‌هایی که در مراحل اولیه سیاه‌رنگ شدند و در آن‌ها کالوسی تا انتهای این مرحله تولید نشد که احتمالاً دلیل آن از بین رفتن سلول‌ها بود.

اثر متقابل ژنوتیپ و زمان نمونه‌برداری بر تولید کالوس جنین‌زا در سطح پنج‌درصد معنادار بود. بیشترین تولید کالوس جنین‌زا در ارقام یاقوتی (۳۷ عدد) و بی‌دانهٔ سفید (۳۴ عدد) در زمان دوم جمع‌آوری و کمترین تولید کالوس جنین‌زا در رقم فلیم سیدلس (یک عدد) در زمان اول جمع‌آوری ریزنمونه به دست آمد. همچنین در تمام ارقام مطالعهٔ زمان دوم جمع‌آوری نسبت به زمان اول جمع‌آوری تولید کالوس جنین‌زای بالاتری را داشت.

اثر متقابل ژنوتیپ، زمان و هورمون‌های استفاده‌شده بر تولید کالوس جنین‌زا در سطح یک‌درصد معنادار شد. در تمام تیمارهای هورمونی تعریف‌شده در این آزمایش کالوس جنین‌زا ایجاد شد، اما در ارقام مطالعه‌شده دو تیمار از هورمون‌های به‌کاررفته بیشترین تولید کالوس جنین‌زا را نسبت به بقیهٔ تیمارها ایجاد کردند. تیمارهای هورمونی ۴/۵ میکرومولار 2,4-D و ۱/۱ میکرومولار BAP و همچنین ۹ میکرومولار 2,4-D و ۲/۲ میکرومولار BAP بالاترین تولید کالوس جنین‌زا را در همهٔ ارقام و در دو زمان جمع‌آوری ریزنمونه نشان دادند (جدول۱).

جدول ۱. تأثیر زمان جمع‌آوری ریزنمونهٔ تخمدان، غلظت‌های هورمونی مختلف و ژنوتیپ بر تعداد کالوس جنین‌زا در برخی ارقام انگور

ژنوتیپ و غلظت 2,4-D (میکرومولار)	زمان جمع‌آوری اول		زمان جمع‌آوری دوم	
	غلظت BAP (میکرومولار)		غلظت BAP (میکرومولار)	
	۲/۲	۱/۱	۲/۲	۱/۱
شاهرودی				
۴/۵	۱۰k	۲۷efg	۱۷j	۲۹e
۹	۱۸ij	۱۱k	۲۵g	۱۷j
بی‌دانهٔ سفید				
۴/۵	۱۶j	۳۴d	۲۰hi	۴۰b
۹	۲۷ef	۲۰hi	۳۳d	۲۵fg
یاقوتی				
۴/۵	۲۲h	۳۴bc	۲۹e	۴۲a
۹	۳۲d	۲۲h	۳۷c	۲۷ef
فلیم سیدلس				
۴/۵	۲no	۵zm	۴mn	۱۰k
۹	۳mn	۱o	۷l	۴mn

* هر تیمار شامل ۸۰ ریزنمونهٔ تخمدان بود و اعداد جدول نشان‌دهندهٔ تعداد کالوس جنین‌زا هستند.

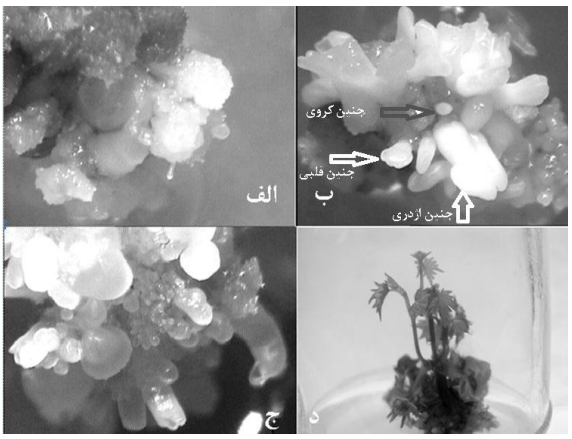
نتایج آزمایش در این مرحله نشان داد که تولید کالوس جنین‌زا در انگور به ژنوتیپ، زمان جمع‌آوری ریزنمونه و نسبت‌های هورمونی به‌کاررفته در محیط کشت بستگی دارد. در بین تیمارهای هورمونی، تیمار ۴/۵ میکرومولار 2,4-D و ۱/۱ میکرومولار BAP در همهٔ ارقام مطالعه‌شده بیشترین تعداد کالوس جنین‌زا را ایجاد کردند (جدول۱). بنابراین، تولید کالوس جنین‌زا در انگور به ژنوتیپ و زمان جمع‌آوری ریزنمونه بستگی داشت و به‌طورکل در همهٔ ارقام مطالعه‌شده زمان دوم جمع‌آوری نسبت به زمان اول کالوس‌های جنین‌زای بیشتری تولید کرد.

مرحلهٔ تمایز جنین

کالوس‌های ایجادشده به محیط تمایزیابی منتقل شدند و یک هفته پس از کشت، جنین‌ها بر روی آن‌ها مشاهده شدند. جنین‌های تولیدشده مراحل کروی، قلبی و اژدری شکل داشتند (شکل۲). جنین‌های کروی طی دو هفته به جنین قلبی و درنهایت با گذشت یک ماه به مرحلهٔ اژدری‌شکل رسیدند. جنین‌های اژدری برای تولید گیاه به محیط جوانه‌زنی منتقل شدند.

نتایج تجزیهٔ واریانس در این مرحله نشان داد که اثر متقابل زمان با ژنوتیپ بر درصد کالوس‌هایی که جنین

تولید کردند معنادار بود، به‌طوری‌که غیر از رقم فلیم سیدلس که تفاوت معناداری بین زمان‌های جمع‌آوری ریزنمونه نشان نداد، در بقیهٔ ارقام مطالعه‌شده زمان دوم جمع‌آوری نسبت به زمان اول درصد تولید جنین سوماتیکی بالاتری داشت. تعداد کالوس‌هایی که جنین سوماتیکی تولید کردند در رقم یاقوتی در زمان دوم جمع‌آوری ریزنمونه (۱۵ عدد) و کمترین درصد آن در رقم فلیم سیدلس در زمان اول جمع‌آوری (۱ عدد) به دست آمد. نتایج آزمایش در این مرحله نشان داد که ارقام یاقوتی و بی‌دانهٔ سفید قابلیت تولید جنین سوماتیکی بالاتری را نسبت به ارقام شاهرودی و فلیم سیدلس داشتند.



شکل ۲. الف) تولید کالوس جنین‌زا، ب) تولید جنین سوماتیکی (جنین کروی، قلبی و اژدری با پیکان نشان داده شده‌اند)، ج) تولید جنین‌های ثانویه، د) تولید گیاه حاصل از کشت جنین سوماتیکی

ارقام یاقوتی و بی‌دانهٔ سفید که بیشترین تولید کالوس جنین‌زا را داشتند، بیشترین تولید جنین سوماتیکی را نیز نشان دادند و ارقام شاهرودی و فلیم سیدلس که تولید کالوس جنین‌زای کمتری داشتند، جنین سوماتیکی کمتری را نیز تولید کردند.

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد که اثر متقابل ژنوتیپ و هورمون‌های به‌کاررفته در سطح ۱ درصد معنادار بود. از مجموع نه تیمار هورمونی به‌کاررفته شش تیمار منجر به تولید جنین سوماتیکی در همهٔ ارقام شدند (جدول۲).

نتایج آزمایش نشان داد که تیمارهای هورمونی به‌کاررفته برای تولید جنین سوماتیکی تحت‌تأثیر ژنوتیپ بودند، به‌طوری‌که بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی در رقم یاقوتی در تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد. در رقم بی‌دانهٔ سفید تیمار یک میلی‌گرم در لیتر BAP بدون کاربرد IAA بیشترین جنین سوماتیکی را نسبت به بقیهٔ تیمارها ایجاد کرد (۲۷درصد). در رقم شاهرودی در سه تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA + ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA و تیمار بدون هورمون بیشترین جنین سوماتیکی به دست آمد (جدول۲). در رقم فلیم سیدلس تفاوت معناداری در بین تیمارهای هورمونی که جنین تولید کردند، مشاهده نشد. در این رقم سه تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر IAA + ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP جنینی ایجاد نشد. بیشتر کالوس‌هایی که در تیمار سه میلی‌گرم در لیتر BAP قرار داشتند، حالت آبکی‌شدن را در انتهای آزمایش نشان دادند.

جدول ۲. درصد کالوس‌های دارای جنین سوماتیکی در ارقام انگور فلیم سیدلس، یاقوتی، شاهرودی و بی‌دانهٔ سفید در محیط کشت‌های مختلف

ارقام و IAA (میلی‌گرم در لیتر)	BAP (میلی‌گرم در لیتر)		
	۳	۱	۰
فلیم سیدلس			
۰	۰k	۲/۱۶j	۳j
۱	۲/۵j	۰k	۳/۴۱j
۲	۰k	۴/۲۵j	۳/۶j
شاهرودی			
۰	۰k	۷/۸۳i	۱۳/۶h
۱	۹/۳i	۰k	۹/۵i
۲	۰k	۱۳/۸۳h	۱۴h
بی‌دانهٔ سفید			
۰	۰k	۲۷/۱۶c	۲۰/۶۶ef
۱	۱۶/۶۷g	۰k	۱۴/۵h
۲	۰k	۲۴d	۲۲e
یاقوتی			
۰	۰k	۲۹/۸۳b	۲۴/۸۳d
۱	۲۱ef	۰k	۱۹/۹f
۲	۰k	۳۳/۶۷a	۲۷/۱۶c

* حروف متفاوت در کلیهٔ ستون‌ها و ردیف‌ها نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار بین تیمارها در سطح ۱درصد است. هر تیمار حاوی ۸۰ کالوس بود و داده‌ها به‌صورت درصد بیان شده‌اند.

مرحلهٔ جوانه‌زنی و تولید گیاه

موقعی که جنین‌ها به مرحلهٔ اژدری رسیدند، به محیط جوانه‌زنی و تولید گیاه که محیط کشت MS به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بود، منتقل شدند. نتایج نشان داد که بیشتر جنین‌های منتقل‌شده در مدت‌زمان دو هفته جوانه زدند و در مدت زمان یک ماه گیاه تولید کردند.

تعداد گیاهان تولیدشده نسبت به جنین‌های جوانه‌زده پایین بود که احتمالاً به این دلیل بود که بعضی از جنین‌ها ساختار طبیعی نداشتند. این جنین‌ها در بعضی مواقع از لحاظ تولید ساقه و گاهی از لحاظ تولید ریشه دچار مشکل بودند و نتوانستند گیاه کاملی را به وجود آورند. نتایج در این مرحله نشان داد که ارقام یاقوتی، و بی‌دانهٔ سفید بیشترین میزان جوانه‌زنی و تولید گیاه و رقم فلیم سیدلس کمترین میزان را نشان دادند. همچنین در رقم فلیم سیدلس بیشترین و در ارقام یاقوتی و بی‌دانهٔ سفید کمترین تولید گیاهچه‌های غیرطبیعی مشاهده شد (جدول۳).

جدول ۳. تعداد جنین‌های جوانه‌زده و تعداد گیاهچه‌های تولیدشدهٔ حاصل از کشت جنین‌های سوماتیکی ارقام انگور یاقوتی، بی‌دانهٔ سفید، شاهرودی و فلیم سیدلس

ارقام	تعداد جنین کشت‌شده	تعداد جنین‌های جوانه‌زده	درصد جنین‌های جوانه‌زده	تعداد گیاه تولیدشده	درصد گیاه تولیدشده
یاقوتی	۸۰۰	۷۲۰	۹۰	۵۸۰	۷۲/۵
بی‌دانهٔ سفید	۷۵۰	۶۲۰	۸۲	۴۸۰	۶۴
شاهرودی	۵۰۰	۳۵۰	۷۰	۲۲۰	۴۴
فلیم سیدلس	۲۵۰	۱۲۰	۴۸	۵۵	۲۲

* جنین‌ها در مرحلهٔ اژدری جدا و در محیط کشت جوانه‌زنی و تولید گیاهچه قرار داده شدند.

بحث

گزارش حاضر اولین گزارش تولید جنین سوماتیکی و باززایی گیاه با استفاده از ریزنمونهٔ تخمدان در ارقام انگور یاقوتی، بی‌دانهٔ سفید، شاهرودی و فلیم سیدلس است. Gribaudo *et al.* (2004) برای بالابردن بازدهی تولید جنین سوماتیکی از ریزنمونهٔ پرچم در انگور، شش مرحلهٔ رشدی را که در هر یک از این مراحل، گل‌آذین، گل و پرچم مورفولوژی خاص خود را داشتند، تعیین کردند. آن‌ها بیان کردند که بیشترین درصد جنین‌زایی در مراحل اول تا سوم در ارقام مطالعه‌شدهٔ آن‌ها به دست آمد. در نتایج Vidal *et al.* (2009) بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی در مراحل چهارم و پنجم جمع‌آوری ریزنمونهٔ تخمدان به دست آمد. نتایج آزمایش نشان داد که فاکتور زمان جمع‌آوری ریزنمونهٔ تخمدان یکی از عوامل مهم در موفقیت تولید کالوس جنین‌زا و جنین سوماتیکی و بالابردن بازدهی تولید جنین در انگور است. نتایج آزمایش این پژوهش نتایج آزمایش Vidal *et al.* (2009) را که بیان کردند جمع‌آوری ریزنمونهٔ تخمدان در مراحل رشدی چهارم و پنجم بیشترین تولید جنین سوماتیکی را ایجاد کرد، تأیید می‌کند. نتایج این پژوهش نشان داد که ریزنمونهٔ تخمدان قابلیت تولید جنین سوماتیکی به میزان بالا در بیشتر ارقام مطالعه‌شده (غیر از فلیم سیدلس) را داشت که مطابق با یافته‌های Lopez *et al.* (2005) و Gambino *et al.* (2007) که بیان کردند ریزنمونهٔ تخمدان توانایی تولید جنین سوماتیکی بیشتری را دارد، است.

یکی از فاکتورهای مهم در تولید جنین سوماتیکی نوع و غلظت هورمون‌های به‌کاررفته در محیط کشت است. در این پژوهش مؤثربودن هورمون‌های 2,4-D و BAP در تولید کالوس‌های جنین‌زا تأیید شد که مطابق یافته‌های Olahe *et al.* (2009) بود. همچنین نتایج نشان داد که تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA + ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در بیشتر ارقام مطالعه‌شده درصد تولید جنین سوماتیکی بیشتری را ایجاد کرد. این نسبت هورمونی احتمالاً یک نسبت هورمونی مناسب برای تولید جنین سوماتیکی از ریزنمونهٔ تخمدان در سایر ارقام انگور نیز است. از سوی دیگر مشخص شد که محیط کشت MS به‌منزلهٔ محیط کشت مناسب برای تولید جنین سوماتیکی در بیشتر ارقام انگور می‌تواند مد نظر قرار گیرد. برای تولید جنین ثانویه در انگور از محیط کشت‌های ویژه‌ای استفاده شده است (Das *et al.*, 2002)، اما در این پژوهش محیط کشت MS به

همراه دو میلی‌گرم در لیتر IAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP نه‌تنها سبب تولید جنین سوماتیکی اولیه شد، بلکه سبب تولید جنین‌های ثانویه نیز شد، به‌طوری‌که بعد از گذشت شش هفته جنین‌های ثانویه در این محیط کشت مشاهده شدند.

تولید جنین سوماتیکی در انگور تحت‌تأثیر عامل ژنوتیپ نیز قرار گرفت، به‌طوری‌که ارقام یاقوتی و بی‌دانهٔ سفید بیشترین درصد تولید جنین سوماتیکی و ارقام شاهرودی و فلیم سیدلس کمترین درصد تولید را داشتند. پاسخ‌های متفاوت ارقام انگور به تولید جنین سوماتیکی ممکن است مربوط به هورمون‌های متفاوت داخلی ریزنمونه‌ها در ارقام مطالعه‌شده باشد، به‌طوری‌که این هورمون‌ها با هورمون‌های به‌کاررفته در محیط کشت عکس‌العمل نشان می‌دهند و منجر به بروز پاسخ‌های متفاوت می‌شوند و یا اینکه ممکن است عامل ژنتیکی علت آن باشد. یافته‌های این پژوهش، با نتایج Olahe *et al.* (2009) که بیان کردند تولید جنین سوماتیکی در انگور به ژنوتیپ بستگی دارد، مطابقت دارد. تولید جنین سوماتیکی در این پژوهش نسبت به سایر گزارش‌های تولید جنین سوماتیکی از ریزنمونهٔ تخمدان (Gambino *et al.*, 2007; Lopez *et al.*, 2005) نسبتاً در زمان کمتری انجام شد، که احتمالاً به‌دلیل ژنوتیپ متفاوت و یا مناسب‌بودن شرایط کشت است. در برخی گزارش‌ها برای جوانه‌زدن جنین سوماتیکی و تولید گیاه در انگور از تیمارهای سرمایی و جیبرلین استفاده کرده‌اند (Das *et al.*, 2002; Lopez *et al.*, 2005)، اما در آزمایش ما محیط کشت MS به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP بدون سرمادهی جنین‌ها نشان داد که یک تیمار مناسب برای این منظور است.

این پروتکل احتمالاً می‌تواند برای تولید جنین سوماتیکی در سایر ارقام انگور برای تولید جنین سوماتیکی به کار رود. همچنین پروتکل حاضر می‌تواند برای اهداف مختلفی مانند تولید کالوس جنین‌زا به‌منظور اصلاح ارقام انگور به روش انتقال ژن، بررسی تنوع سوماکلونال، و... استفاده شود.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش تولید جنین سوماتیکی از ریزنمونهٔ تخمدان تحت‌تأثیر زمان جمع‌آوری ریزنمونه قرار گرفت. به‌طوری‌که جمع‌آوری ریزنمونهٔ تخمدان در زمان دوم جمع‌آوری نسبت به زمان اول در همهٔ ارقام جنین سوماتیکی بیشتری را ایجاد کرد. از سوی دیگر تیمار هورمونی ۴/۵ میکرومولار 2,4-D و ۱/۱ میکرومولار BAP بیشترین تولید کالوس جنین‌زا را در همهٔ ارقام مطالعه‌شده نشان داد. در مرحلهٔ تمایزیابی تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP در تمایز جنین‌ها بسیار مؤثر بود. از سوی دیگر مشخص شد که محیط کشت MS به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP برای جوانه‌زنی و تولید گیاه در انگور تیماری مناسب است.

REFERENCES

1. Ammirato, P. V. (1983). The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures: suspention culture techniques and hormone requirement. *Biotechnology*, 1, 68-74.
2. Carimi, F., Barizza, E. & Gardiman, M. (2005). Somatic embryogenesis from Stigma and styles of grapevine. *In Vitro Cellular and Developmental Biology of Plant*, 41, 249-252.
3. Das, D. K., Reddy, M. K., Upadhyaya, 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 Report*, 20, 999-1005.
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 and Organ Culture*, 90, 79-83.
5. Gary, D. J. & Compton, M. E. (1993). Grape somatic embryo dormancy and quiescence: Potential of dehydrated synthetic seeds for germplasm conservation. In: K. Redenbaugh, (Ed). *Synseeds, application of synthetic seeds to crop improvement*. (pp: 367-379), *CRC Press Inc, Boca Raton*.
6. Gresshoff, P. M. & Doy, CH. (1974). Derivation of haploid cell line from Vitis vinifera and the importance of the stage of miotic development of anther for haploid culture of this and other genera. *Plant physiology*, 73, 123-141.
7. Gribaubo, I., Gambino, G. & Vallania, R. (2004). Somatic embryogenesis from grapevine anther: identification of the optimal developmental stage for collceting explants. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 427-430.

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. Maillot, P., Kieffer, F. & Walter, B. (2006). Somatic embryogenesis from stem nodal sections of grapevine. *Vitis*, 45, 185-189.
10. Martinelly, L., Bragana, P., Poletti, V. & Scienza A. (1993). Somatic embryogenesis from leaf and petiole-derived callus of Vitis rupestris. *Plant Cell Report*, 12, 207-210.
11. Mauro, M. cl., Nef, C. & Fallot, J. (1986). Simulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from another culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. *Plant Cell Report*, 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, 1002-1030.
13. Olahe, R., Aniko, Z., Andrezej, P., Sussane, H., Laszlo. & kovacs, G. (2009). Somatic embryogenesis in broad spectrum of grapevine genotypes. *Scientia Horticulturae*, 120, 134-137.
14. Perl, A., Saad, S., Sahar, N. & Holland, D. (1995). Establishment of long-term embryogenic cultures of seedless Vitis vinifera cultivars–a synergistic effect of auxins and the role of abscisic acid. *Plant Science*, 104, 193-200.
15. Salunkhe, C. K., Rao, P. S. & Mhatre, M. (1997). Induction of somatic embryogenesis and plantlets in tendrils of Vitis vinifera L. *Plant Cell Report*, 17, 65-7.
16. 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.
17. Scorza, R., Cordts, J. M., Ramming, D. W. & Emershad, R. L. (1995). Transformation of grape (Vitis vinifera) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Re*port, 14, 589-592.
18. Srinivasan, C. & Mullins, M. G. (1980). High frequency somatic embryo production from unfertilized ovules of grapes. *Scientia Horticalturae*, 13, 235-250.
19. Vidal, J. R., Rama, J,. Taboada, L., Martin, C., M. Ibanez., Ssegura, A. & Gonzales- Benito, E. (2009). Improved somatic embryogenesis of grapevine (*vitis vinifera*) with a focus on induction parameters and efficient plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96, 85-94.
20. Xu, X. & Lu, J. (2009). Somatic embryogenesis from seed integuments of seedless grape cultivars. *Acta Horticulturae*, 827, 515-520.
21. Zhu, YM., Hoshino, Y., Nakano, M., Takahashi, E. & Mii, M. (1997). High efficient system of plant regeneration from protoplasts of grapevine (*Vitis vinifera* L.) through somatic embryogenesis by using embryogenic callus culture and activated charcoal. *Plant Science*, 123, 151-157.