Archive of SID

"نهال و بذر"
جلد ۱۷، شماره ۲، شهریور ۱۳۸۰

بررسی زمان و نحوه سقط جنین در چند رقم انگور بی دانه به منظور نجات جنین آن‌ها*

Time and Mechanism of Embryo Abortion in some Seedless Grapevine Cultivars to Rescue their Embryo

علی عبادی، داریوش آتشکار و یحیی دهقانی

دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۷۹/۸/۲۳

چکیده

عبادی، ع.، آتشکار، د. و دهقانی، ی. ۱۳۸۰. بررسی زمان و نحوه سقط جنین در انگور بی دانه به منظور نجات جنین آن‌ها. نهال و بذر ۱۷: ۲۰۲-۱۸۳.

در سال ۱۳۷۷ نمونه‌های گل و حبه انگور در تاریخ‌های ۲، ۲۱، ۳۵ و ۴۵ روز پس از باز شدن گل از بوته‌های بیست ساله ارقام بی دانه سفید، بی دانه قرمز، عسکری، یاقوتی و کشمشی سبز در ایستگاه تحقیقاتی باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران جمع آوری گردید. نمونه‌ها ابتدا در محلول FPA50 تثبیت شده و سپس مراحل آب‌گیری، خواباندن در رزین و نهایتاً تهیه برش از نمونه‌ها با دستگاه اولترامیکروتوم با ضخامت پنج میکرون انجام شد. نمونه‌ها به روش (Periodic Acid Schiff's reagent= PAS) رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرارگرفتند. نتایج نشان داد که در تمامی ارقام مورد بررسی باروری در بیش از ۵۰ درصد تخمک‌ها صورت گرفته و سلول تخم و اندوسپرم هسته‌ای در آن‌ها تشکیل می‌شود. با این حال در برخی ارقام مانند بی دانه قرمز اصولاً سلول تخم قبل از تقسیمات اولیه و قبل از سه هفتگی دچار انحطاط شده و از بین می‌رود در حالی که در ارقام بی دانه سفید و یاقوتی درصد کمی از سلول‌های تخم با انجام چندین نوبت تقسیم سلولی به پیش جنین چند سلولی تبدیل می‌شوند. درصد کمی از پیش جنین‌ها در رقم یاقوتی تا پنج هفتگی و در رقم بی دانه سفید حتی تا بیش از شش هفتگی زنده بودند و پس از آن دچار انحطاط شدند. در ارقامی مانند عسکری و کشمشی سبز درصد بیشتری از سلول‌های تخم تشکیل جنین چندین سلولی داده و تا ۴۵

* قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده دوم که به گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران ارائه شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

روز پس از شکوفایی زنده بودند. با توجه به نتایج به دست آمده نجات جنین در رقم بی‌دانه قرمز قبل از سه هفتگی و در ارقام یاقوتی قبل از پنج هفتگی و در ارقام بی دانه سفید، عسکری وکشمشی سبز حدود شش هفتگی باید انجام شود تا بتوان از کشت جنین‌های در حال تکامل در محیط کشت مصنوعی گیاه به دست آورد.

واژه‌های کلیدی: انگورهای بی دانه، سقط جنین، محیط کشت.

مقدمه

انگور یکی از محصولات باغبانی در تجارت بین المللی است، به طوریکه در سال ۱۹۹۵ تولید جهانی انگورهای رومیزی ۷/۴ میلیون تن و کشمش یک میلیون تن بوده است (Clingeleffer, 1998). صنعت انگورهای رومیزی عمدتاً بر انگورهای بی دانه متکی بوده و به غیر از رقم انتخابی سلطانی (بی دانه سفید) بقیه ارقام مهّم همگی جزو ارقام بی دانه اصلاح شده می‌باشند. اصلاح انگورهای موجود به منظور دستیابی به ارقام جدید انگور بی دانه با اهدافی از قبیل درشتی حبه‌ها، کیفیت بهتر رنگ و طعم و مقاومت به شرایط نامساعد محیطی صورت می‌گیرد (Clingeleffer, 1998; 1995). موفقیت اصلاح انگورهای تازه خوری برای دست‌یابی به ارقام جدید بی دانه با کمک روش‌های کلاسیک اصلاح که از طریق دورگ‌گیری بین والد پدری بی دانه با والد مادری دانه‌دار صورت می‌گیرد، ۱۵ - ۱۰ درصد می‌باشد (*et al.*, 1985; Singh and Brar, 1992 Lavee and Nir, 1985; Spiegel-Roy Weinberger, 1979; Cain *et al.*, 1983; Loomis and) که نشان دهنده پایین بودن کارآیی این روش می‌باشد. تلاقی ارقام بی دانه با یکدیگر به دلیل سقط جنین در مراحل اولیه تکامل تا دهه‌های اخیر امکان‌پذیر نبود ولیکن با تکامل تکنیک‌های نجات جنین این کار اولین بار در سال ۱۹۸۳ صورت گرفت (Cain *et al.*, 1983). با استفاده از این تکنیک می‌توان جنین‌های تازه تشکیل شده در تلاقی ارقام بی دانه را قبل از سقط از درون حبه بیرون آورده و در محیط کشت مصنوعی پرورش داد و از آن‌ها نتاج به دست آورد. موفقیت این روش در دستیابی به ارقام بی دانه جدید به طور متوسط ۸۵ درصد می‌باشد که بسیار قابل توجّه است (*et al.*, 1983; Spiegel-Roy *et al.*, 1985; Emershad and Ramming, 1984; Cain). برای پیاده کردن این روش در اصلاح ارقام ایرانی انگور نیاز به اطلاعات اساسی از نحوه بی‌دانه شدن ارقام موجود یعنی ارقام بی دانه سفید، بی دانه قرمز، عسکری، یاقوتی و کشمشی سبز می‌باشد، زیرا بی دانگی در انگور تحت تأثیر دو پدیده متفاوت یعنی پارتنوکارپی (تشکیل میوه بی دانه بدون انجام عمل باروری) و استنوسپرموکارپی (تشکیل میوه بی‌دانه در اثر باروری) می‌باشد و استفاده از تکنیک نجات جنین تنها در صورتی امکان‌پذیر است که اولاً بی دانگی به دلیل پدیده استنوسپرموکارپی باشد و ثانیاً از چگونگی و زمان سقط جنین آن‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

اطلاعات کافی در دست باشد تا بتوان قبل از شروع تخریب در بافت‌های تخمک حاوی سلول تخم و یا بیش از جنین نسبت به خارج کردن آن از درون حبه و کشت آن در محیط‌های مصنوعی اقدام نمود. بر این اساس این تحقیق با هدف تعیین زمان و چگونگی انجام سقط جنین در انگورهای بی دانه ایرانی به منظور نجات جنین آن‌ها به خصوص در تحقیقات به نژادی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال ۱۳۷۷ در مرکز تحقیقات و آزمایشگاه‌های گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران انجام شد. در ابتدا از هر کدام از ارقام بی دانه سفید بی دانه قرمز، عسکری، یاقوتی و کشمشی سبز، سه بوته یکنواخت و همسن (۲۰ ساله) انتخاب شد. در روی هر بوته، سه خوشه در قسمت‌های مختلف آن قبل از شکوفائی گل‌ها انتخاب و علامت گذاری شدند. برای همسن نمودن گل‌ها، خوشه‌ها به طور روزانه مورد بازدید قرار می‌گرفتند. در اولین روز شکوفائی، کلیه گل‌های باز شده حذف گردیدند. در روز دوم کلیه گل‌های باز شده حفظ و همه گل‌های باز نشده حذف گردیدند و به این ترتیب تنها گل‌هایی مورد نمونه‌برداری‌های بعدی قرار گرفتند که در روز دوّم شکوفایی گل آذین، باز شده بودند. سپس در زمان‌های ۲، ۲۱، ۳۵ و ۴۵ روز پس از شکوفائی از خوشه‌چه‌های شماره ۲، ۳ و ۴ در هر خوشه نمونه‌برداری از گل و حبه انجام شد. نمونه‌ها در محلول FPA 50 (اتانول ۵۰ درصد، فرمالین و پروپیونیک اسید به نسبت: ۵: ۵: ۹۰) تثبیت شدند. برای نفوذ بهتر محلول تثبیت کننده به درون بافت‌های مختلف، نمونه‌ها به مدّت ۲ ساعت تحت شرایط خلاء قرار گرفتند. تخمک‌ها و شبه بذرها از گل و حبه بیرون آورده شده و سپس ابعاد آن‌ها با بینوکولر مجهز به عدسی مدرج اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها ابتدا در سری الکل‌های اتانول، پروپانول و بوتانول، در هرکدام به مدّت ۲ ساعت جهت آبگیری قرار گرفتند. در مرحله بعد نمونه‌ها به مدّت ۲ ساعت در ترکیبی از بوتانول و GMA (۹۳ میلی لیتر ۲ـ هیدروکسی اتیل متاکریلات، ۷ میلی لیتر پلی اتیلن گلایکول ۴۰۰ و ۰/۶ گرم بنزیل پروکساید) جهت نفوذ GMA به درون بافت‌های تخمک قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدّت ۴۸ ساعت در درون GMA خالص قرار گرفتند و در نهایت هر تخمک درون یک کپسول ژلاتینی سیتولوژی قرار گرفته و بر روی آن GMA ریخته شد، به طوری که کل کپسول حاوی تخمک پر از GMA گردید. تمامی کپسول‌ها به مدّت ۲ روز در داخل آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از سخت شدن با استفاده از مایکروتوم برش هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. برش‌های تهیه شده به کمک اسید پریودیک، معرف شیف و تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شدند (Feder and O'Brien, 1968). نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. با توجّه به تعداد زیاد نمونه‌ها و نیاز به زمان قابل توجّه برای برش تک‌تک تخمک‌ها و شبه بذرها و همچنین با توجّه به شباهت دو رقم بی دانه سفید و بی دانه قرمز، در برخی زمان‌های نمونه برداری، تنها یکی از این

www.SID.ir

Archive of SID

۲ رقم مورد بررسی قرار گرفت و در مورد سایر ارقام زمانی که در تاریخ خاصی از بین رفتن تخمک و اجزاء درون آن مشاهده می‌شد، در تاریخ‌های بعدی بررسی روی آن رقم خاص صورت نمی‌گرفت.

نتایج

نتایج بررسی باروری شبه بذرها در ارقام بی دانه قرمز، یاقوتی، عسکری و کشمشی سبز در زمان ۲ روز پس از شکوفائی گل‌ها در جدول ۱ نمایش داده شده است. در رقم بی دانه قرمز در تاریخ ۲ روز پس از شکوفایی تمامی شبه بذرها کوچک و دارای طولی برابر ۱ - ۰/۴ میلی متر بودند. از تعداد کل شبه بذر مورد بررسی در این رقم ۸۰/۶ درصد آن‌ها دارای کیسه جنینی کامل بوده و استعداد باروری داشتند، با این حال تنها ۶۱/۳ درصد آن‌ها بارور شده (شکل ۱) و بقیه بارور نشده بودند (شکل ۲). سایر شبه بذرها (۱۲/۹٪) اساساً بدون کیسه جنینی بودند (شکل ۳) و یا این که کیسه جنینی آن‌ها به طور کامل تکامل نیافته بود (شکل ۴).

تکامل اندوسپرم در شبه بذرهای بارور شده مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج به دست آمده نشان داد که ۳۸/۷ درصد شبه بذرها دارای اندوسپرم حاوی ۳ - ۱ هسته آزاد (شکل ۵) و ۲۲/۶ درصد دیگر دارای اندوسپرم ۶ - ۴ هسته‌ای آزاد بودند. در همین زمان شبه بذرهای رقم یاقوتی از نظر طولی رشد بیشتری داشته و در ۲ گروه ۱ - ۰/۴ میلی متر و ۲ - ۱ میلی متر قرار گرفتند. شبه بذرهای بزرگتر (۲ - ۱ میلی متر) که ۳۳/۴ درصد کل شبه بذرها را تشکیل می‌دادند، همه آن‌ها دارای کیسه جنینی کامل بوده و استعداد باروری داشتند. با این حال تنها ۲۵/۱ درصد آن‌ها بارور شده (شکل ۶) و بقیه ۸/۳ موفق به باروری نشده بودند. شبه بذرهای بارور شده رقم یاقوتی در زمان ۲ روز پس از شکوفایی دارای اندوسپرم ۳ - ۱ هسته‌ای (۱۲/۵٪) و یا ۶ - ۴ هسته‌ای (۱۲/۶٪) بودند. درصد قابل توجهی از شبه بذرهای کوچکتر (۱ - ۰/۴ میلی متر) یا فاقد کیسه جنینی بودند و یا این که در آن‌ها کیسه جنینی به طور کامل تکامل نیافته بود، با این حال تعداد دیگری دارای کیسه جنینی کامل بوده و پس از باروری، هسته‌های اندوسپرمی آزاد در درون اندوسپرم آن‌ها مشاهده می‌شد.

در رقم عسکری شبه بذرها مشابه رقم بی دانه قرمز همگی کوچک بوده و در گروه ۱ - ۰/۴ میلی‌متر قرار داشتند. تعداد شبه بذرهای بدون کیسه جنینی و یا دارای کیسه جنینی ناقص در این رقم بیش از رقم بی دانه قرمز بوده و تنها ۴۱/۸ درصد شبه بذرها دارای کیسه جنینی کامل بودند که از این میزان تنها ۸/۵ درصد بارور شده و اندوسپرم آن‌ها تا مرحله ۳ - ۱ هسته‌ای پیش رفته بود.

در رقم کشمشی سبز نیز درصد قابل توجهی از شبه بذرها (۸۶/۵ %) در هر گروه طولی دارای کیسه جنینی کامل بوده و تعداد زیادی از آن‌ها بارور شده بودند و اندوسپرم آن‌ها طی این مدّت عمدتاً در مرحله ۳ - ۱ هسته‌ای و در موارد کمتری در مرحله ۶ - ۴ هسته‌ای بود. مطالعات آناتومیکی در تاریخ دو روز پس از شکوفائی گل‌ها نشان داد که در کلیه ارقام مورد مطالعه تعداد

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱ - برش طولی شبه بذر بارور شده رقم بی دانه قرمز دو روز پس از شکوفایی گل

Fig. 1. Longitudinal section of fertilized seed trace of cv. Red seedless 2 days after flower opening

در این شکل زایگوت (Z) و هسته‌های اندوسپرم آزاد (en) و بافت خورش (n) دیده می‌شوند

In this figure zygote (Z), Free nuclear endosperm (en) and nucellus can be realized

شکل ۲ - برش طولی تخمک بارور نشده رقم بی دانه قرمز دو روز پس از شکوفایی گل

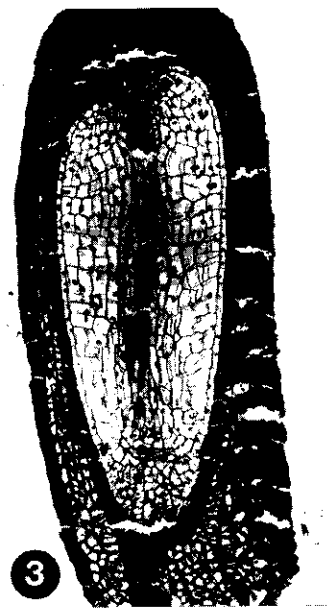
Fig. 2. Longitudinal section of unfertilized ovule of cv. Red seedless 2 days after flower opening

در این شکل کیسه جنینی خالی و سلول‌های قرینه (Sy) قابل تشخیص هستند

In this figure empty embryo sac and synergists (Sy) can be realized

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳ - برش طولی تخمک رقم بی دانه قرمز دو روز پس از شکوفایی گل
Fig. 3. Longitudinal section of ovule of cv. Red seedless 2 days after flower opening

در این شکل اثری از کیسه جنینی دیده نمی‌شود و بافت خورش (n) به تدریج از قسمت مرکز تخریب شده است
In this figure there is no sign of embryo sac and nucellus has been degenerated from the center

شکل ۴ - برش طولی تخمک رقم بی دانه قرمز دو روز پس از شکوفایی گل
Fig. 4. Longitudinal section of ovule of cv. Red seedless 2 days after flower opening

در این شکل کیسه جنینی کوچک و تکامل نیافته (es) بود و با تعداد محدود هسته (nu) قابل تشخیص هستند
In this figure undeveloped small embryo sac (es) with few nuclei can be realized

www.SID.ir

Archive of SID

قابل توجهی از شبه بذرها بدون کیسه جنینی و یا دارای کیسه جنینی ناقص پائین بود. البته در مورد رقم عسکری این وضعیت کمی متفاوت بوده به طوریکه بیش از نیمی از شبه بذرها (۵۸/۲٪) فاقد کیسه جنینی و یا دارای کیسه جنینی ناقص بودند، با این حال شبه بذرهای باقی مانده در درون حبه توان تولید حبه‌های نسبتاً درشت را داشتند که از نظر مطالعات اصلاحی حائز اهمیّت بود. این نتایج با نتایج لدبتر و رامینگ (Ledbetter and Ramming, 1989) ونگ و هوریوچی (Wang and Horiuchi, 1993) و همچنین ونگ و همکاران (Wang *et al.*, 1993) مطابقت دارد. باروری در تمامی ارقام در تاریخ دو روز پس از شکوفائی گل‌ها مشاهده شد. این یافته‌ها بیانگر آن است که ارقام بی دانه ایرانی از تیپ انگورهای استنوسپرموکارپ می‌باشند و از این نظر وضعیتی مشابه با اکثر ارقام بی دانه در سایر کشورها دارند. نتایج این تحقیق با نتایج پرات و اینست (Pratt and Einset, 1961) باریت (Barrit, 1970) و کاسمیر و استات (Kassemeyer and Staudt, 1983) هماهنگی دارد. در این مرحله در اکثر ارقام مورد مطالعه درصد قابل توجهی از شبه بذرها دارای اندوسپرم ۳ - ۱ هسته‌ای بودند. با این حال در رقم عسکری تنها درصد کمی از شبه بذرها دارای چنین وضعیتی بودند. وجود ٦ - ۴ هسته اندوسپرمی که نشان دهنده تقسیمات بیشتر هسته اندوسپرم می‌باشد، تنها در تعداد کمی از شبه بذرهای ارقام بی‌دانه قرمز، یاقوتی و کشمشی سبز مشاهده شد. رقم یاقوتی در این مرحله از نظر تعداد شبه بذرها دارای ٦ - ۴ هسته و ۳ - ۱ هسته وضعیت متعادلی داشت. کند بودن آهنگ تقسیم هسته اندوسپرمی می‌تواند دلیلی بر سقط جنین باشد. این وضعیت توسط ونگ و هوریوچی (Wang and Horiuchi, 1990) در مورد رقم هیمرود گزارش شده است. تقسیم زایگوت در هیچکدام از نمونه‌های بارور شده ارقام مورد بررسی در این تاریخ مشاهده نشد. این یافته نیز با نتایج سایر محققین از جمله باریت (Barrit, 1970)، عبادی و همکاران (Ebadi *et al.*, 1996) و کاسمیر و استات (Kassemeyer and Staudt, 1983) هماهنگی دارد، چراکه در سایر ارقام بررسی شده نیز اولین تقسیم زایگوت ۴ - ۳ هفته پس از باز شدن گل‌ها گزارش شده است که همزمان با تشکیل دیواره سلولی در درون اندوسپرم هسته‌ای می‌باشد.

بررسی وضعیت درون شبه بذرها در تاریخ ۲۱ روز پس از باز شدن گل‌ها در جدول ۲ نمایش داده شده است. در این زمان تعدادی از شبه بذرها رشد کرده و در محدوده بالاتری از نظر طول ۴ - ۲ و یا ٦ - ۴ میلی متر) قرارگرفتند. البته در این زمان نیز تعدادی از شبه بذرها همچنان کوچک مانده بودند. در ارقام مورد بررسی درصد قابل توجهی از شبه بذرهای با طول ۲ - ۴/۰ میلی متر بدون کیسه جنینی بوده و بافت خورش در آن‌ها در حال تخریب بود (شکل ٦). در ارقام عسکری و کشمشی تعداد کمی از شبه بذرها دارای کیسه جنینی بودند، با این حال در درون کیسه جنینی اثری از هسته‌های اندوسپرم نبود (شکل ۷) و یا اینکه هسته‌ها عمدتاً در مرحله تجزیه بودند و این در حالی بود که در رقم بی دانه قرمز در این مرحله

www.SID.ir

www.SID.ir

جدول ۱ - وضعیت درونی شبه بذرهای چهار رقم انگور بی‌دانه ۲ روز پس از شکوفایی گل‌ها*

Table 1. Internal situation of seed traces in four seedless grapevince cultivars 2 days after flower opening

Cultivars	رقم	طول شبه بذر Lenght of seed traces sac (mm)	شبه بذر Seed traces sac (%)	شبه بذر بدون کیسه جنینی Seed traces without embryo sac (%)	شبه بذر باکیسه جنینی ناقص Seed traces with abnormal embryo sac (%)	شبه بذر باکیسه جنینی کامل Seed traces with normal embryo sac (%)	شبه بذر سالم بارور نشده Unfertilized normal seed traces (%)	شبه بذر سالم بارور شده Fertilized normal seed traces (%)	شبه بذر دارای اندوسپرم Seed traces with endosperm of ۳-۱ هسته 1-3 nuclei (%)	۶-۴ هسته 4-6 nuclei (%)
Red seedless	بی‌دانه قرمز	0.4-1	100	12.9	6.5	80.6	19.3	61.3	38.7	22.6
		1-2	-	-	-	-	-	-	-	-
Yaghooti	یاقوتی	0/4-1	66.6	20.8	16.6	29.2	8.4	20.4	8.3	12.5
		1-2	33.4	-	-	33.4	8.3	25.1	12.5	12.6
Askary	عسکری	0.4-1	100.0	27.7	30.5	41.8	33.3	8.5	8.5	
		1-2	-	-	-	-	-	-	-	-
Green Kashmeshi	کشمشی سبز	0.4-1	85.7	11.4	5.8	68.5	17.1	51.4	28.6	22.8
		1-2	14.3	-	5.8	8.5	5.7	2.8	2.8	-

* 36 seed traces of each of three cultivars were studied.

* تعداد کل شبه بذر بررسی شده در مورد هر کدام از چهار رقم ۳۶ عدد شبه بذر می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲ - وضعیت درونی شبه بذرهای سه رقم انگور بی‌دانه ۲۱ روز پس از شکوفایی گل‌ها*

Table 2. Internal situation of seed traces in three seedless grapevine cultivars 21 days after flower opening*

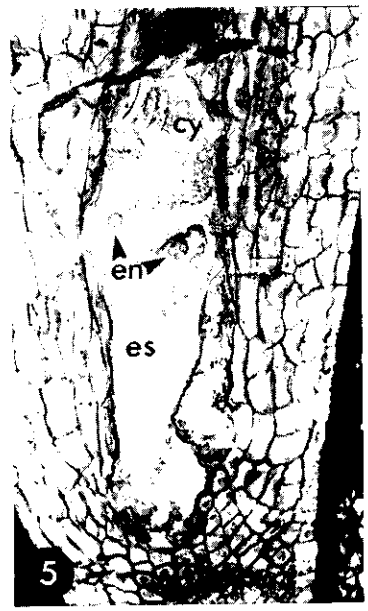
Cultivar	رقم	طول شبه بذر Lenght of seed traces (mm)	شبه بذر Seed traces (%)	شبه بذر بدون کیسه جنینی Seed traces with no embryo sac (%)	شبه بذر با بافت خورش Seed traces with degenerated nucellus (%)	شبه بذر دارای جنینی بدون اندوسپرم Seed traces with embryo sac, having no endosperm (%)	شبه بذر دارای کیسه با اندوسپرم Seed traceas with embryo sac: اندوسپرم در حال تجزیه Degeneration endosperm (%)	شبه بذر دارای کیسه با اندوسپرم Seed traceas with embryo sac: اندوسپرم آزاد در حال سلولی شدن Free nuclear forming cell wall(%)	شبه بذر دارای کیسه جنینی حاوی زایگوت Seed traces with embryo sac, containing zygote: مرده Dead (%)	شبه بذر دارای کیسه جنینی حاوی زایگوت Seed traces with embryo sac, containing zygote: درحال تجزیه Degenerating (%)	شبه بذر دارای کیسه جنینی حاوی زایگوت Seed traces with embryo sac, containing zygote: زنده Alive (%)
Red seedless	بی‌دانه قرمز	0.4-2	47.2	-	16.7	30.5	-	-	19.4	8.3	2.8
		2-4	52.8	-	-	47.2	-	5.6	27.7	2.9	22.2
Askary	عسکری	0.4-2	50.0	-	30-5	5.5	5.6	8.4	8.3	-	11.2
		2-4	50.0	-	-	8.3	5.5	36.2	27.8	8.3	13.9
Green Kashmeshi	کشمشی سبز	0.4-2	27.7	-	19.4	-	8.3	-	2.7	5.6	-
		2-4	47.2	13.8	-	17.2	16.2	-	17.1	6.2	10.1
		4-6	25.1	2.7	-	10.2	-	12.2	-	8.5	13.9

* 36 seed traces of each of three cultivars were studied.

* تعداد کل نمونه بذر بررسی شده در مورد هرکدام از چهار رقم ۳۶ عدد شبه بذر می‌باشد.

Archive of SID

Archive of SID



شکل ۵ - برش طولی شبه بذر بارور شده رقم یاقوتی دو روز پس از شکوفایی گل

Fig .5. Longitudinal section of fertilized seed trace of cv. Yaghooti 2 days after flower opening

در این شکل هسته‌های آزاد اندوسپرم (en) در کنار بافت سیتوپلاسم (cy) در داخل کیسه جنینی (es) دیده می‌شود

In this figure, free nuclear endosperm (en) with accompanying cytoplasm (cy) can be realized inside embryo sac(es)

شکل ٦ - برش طولی تخمک بارور نشده رقم عسکری ۲۱ روز پس از شکوفایی گل

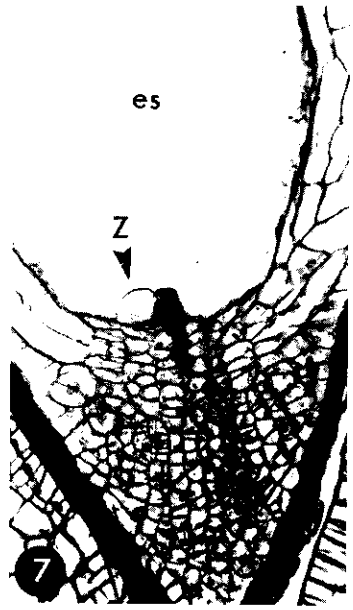
Fig. 6. Longitudinal section of unfertilized ovule of cv Askary 21 days after flower opening

در این شکل بافت تخریب شده خورش (n) و پوشش‌های تخمک (in) دیده می‌شود

In this figure, degnerated nucellus (n) and integuments (in) can be realized

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷ - برش طولی شبه بذر رقم عسکری ۲۱ روز پس از شکوفایی گل

Fig. 7. Longitudinal section of seed traces cv Askary 21 days after flower opening

در این شکل کیسه جنینی خالی (es) دیده و سلول زایگوت (Z) زنده دیده می‌شود

In this figure, empty embryo sac (es) and alive zygote can be realized

شکل ۸ - برش طولی شبه بذر بی دانه قرمز ۲۱ روز پس از شکوفایی گل

Fig. 8. Longitudinal section of seed traces cv. Red seedless 21 days after flower opening

در این شکل کیسه جنینی خالی (es) دیده و زایگوت (Z) در حال تخریب دیده می‌شود

In this figure, empty embryo sac (es) and a degnerating zygote can be realized

www.SID.ir

Archive of SID

شبه بذر دارای اندوسپرم فعال و یا در حال تجزیه دیده نشد. تقسیم زایگوت در این مرحله در هیچ کدام از ارقام مورد بررسی مشاهده نشد و در اکثر نمونه‌ها یا زایگوت قبلاً از بین رفته بود و یا در حال تخریب بود (شکل ۸). شبه بذرهای درشت‌تر در هر سه رقم بی دانه قرمز، عسکری و کشمشی سبز وضعیت بهتری از نظر تکامل داشتند، به طوریکه تعداد بیشتری از آن‌ها دارای کیسه جنینی و اندوسپرم و زایگوت فعال بودند.

در رقم بی دانه قرمز ۵/۶ درصد، در رقم عسکری ۳۶/۲ درصد و در رقم کشمشی ۱۲/۲ درصد از شبه بذرها دارای اندوسپرم در حال سلولی شدن بودند و تعداد زایگوت زنده آن‌ها نیز به مراتب بالاتر بود (شکل ۹).

زمان سه هفته پس از باز شدن گل‌ها مرحله‌ای مهّم در رشد بذرها می‌باشد زیرا در این مرحله اندوسپرم هسته‌ای شروع به تشکیل دیواره سلولی نموده و سلول‌های اندوسپرمی به وجود می‌آیند. پرات و اینست (Pratt and Einset, 1961) و عبادی و همکاران (Ebadi *et al.*, 1995, 1996) در ارقام دانه دار هم زمان با سلولی شدن اندوسپرم زایگوت نیز شروع به تقسیم می‌نماید.

تقسیمات زایگوت و اندوسپرم وابسته به یکدیگر هستند و اندوسپرم به عنوان منبع تغذیه‌ای و هورمونی برای زایگوت و پیش جنین به حساب می‌آیند. هرگونه اختلال در رشد و نمو اندوسپرم موجب فراهم آمدن مقدمات سقط زایگوت و یا پیش جنین به حساب می‌آید. بر اساس نظرات باریت (Barrit, 1970)، لدبتر و رامینگ (Ledbetter and Raming, 1989)، ونگ و هوریوچی (Wang and Horiuchi, 1993) و عبادی و همکاران (Ebadi *et al.*, 1995) عامل اختلال ممکن است خود جنین باشد که در اثر ناتوانی‌های ژنتیکی و یا فیزیولوژیکی قادر به تقسیم نبوده و به این ترتیب از ادامه تکامل اندوسپرم که همان سلولی شدن باشد، جلوگیری می‌کند. مشاهدات انجام شده در مورد ارقام مورد بررسی نیز مؤید این فرضیه است. در این مرحله کیسه جنینی خالی و فاقد اندوسپرم بود. در این نمونه‌ها زایگوت در حال تجزیه بود و یا اینکه قبلاً از بین رفته بود. با این حال در تعدادی دیگر از شبه بذرها که زایگوت آن‌ها هنوز زنده بود ولیکن تقسیم نشده بودند، کیسه جنینی حاوی هسته‌های اندوسپرمی در حال تجزیه و در تعداد کمی از آن‌ها حتی اندوسپرم در مرحله شروع سلولی شدن مشاهده شد. این نتایج با یافته‌های ونگ و همکاران (Wang *et al.*, 1993) تطابق و هماهنگی کامل دارد. در رقم کشمشی سبز وضعیت در این مرحله متفاوت بود، به طوریکه تعدادی از شبه بذرها طولی بیش از ۴ میلی متر داشتند. در تعدادی از این شبه بذرها اندوسپرم در حال سلولی شدن بوده و زایگوت نیز هنوز زنده بود، با این حال در شبه بذرهای کوچک همین رقم سلولی شدن اندوسپرم مشاهده نشد و بیشتر زایگوت‌ها در حال تجزیه بوده و یا قبلاً از بین رفته بودند. بنابراین بر اساس نظریات لدبتر و رامینگ (Ledbetter and Raming, 1989) می‌توان نتیجه گرفت که در این رقم سقط دیرهنگام جنین باعث افزایش اندازه شبه بذرها شده است. شبه بذرهای رقم عسکری وضعیتی بین دو رقم بی دانه قرمز و

www.SID.ir

Archive of SID

کشمشی سبز داشتند، به نحوی که تعداد بیشتری از شبه بذرها به خصوص شبه بذرهای بزرگتر دارای اندوسپرم در حال سلولی شدن و زایگوت زنده نیز بودند. سقط دیر هنگام شبه بذرها علاوه بر افزایش اندازه شبه بذر موجب افزایش اندازه حبه نیز می‌شود بنابراین بزرگتر بودن اندازه حبه در ارقام کشمشی سبز و عسکری می‌تواند به همین دلیل باشد.

نتایج بررسی وضعیت تکامل شبه بذرها در تاریخ ۳۵ روز پس از باز شدن گل‌ها در جدول ۳ به نمایش گذاشته شده است. در این تاریخ طول شبه بذرها در رقم یاقوتی و بی دانه سفید حداکثر به ۶-۴ میلی متر و در رقم کشمشی سبز حداکثر به ۸-۶ میلی متر رسیده بود. تمامی شبه بذرهای کوچک (۲ - ۴/۰ میلی متر) دارای بافت خورش فاسد شده بوده و شبه بذرهای بزرگتر (۶-۴ و ۸-۶ میلی متر) عمدتاً دارای کیسه جنینی بدون اندوسپرم بودند، ولیکن در تعداد محدودی از آن‌ها حتی اندوسپرم سلولی نیز مشاهده گردید (۸/۴ %).

بزرگ بودن شبه بذرها در این تاریخ دلیلی بر زنده بودن زایگوت نبود و بیشتر زایگوت‌ها قبلاً از بین رفته بودند. در این مرحله وضعیت در رقم بی دانه سفید تقریباً مشابه رقم یاقوتی بود و تنها درصد کمی از شبه بذرها (۵/۷ %) که همگی در محدوده ۶-۴ میلی متر بودند، دارای اندوسپرم سلولی و پیش جنین زنده بودند و پیش جنین چندین سلولی در منطقه سفت کاملاً مشهود بود. در رقم کشمشی سبز نیز وضعیت کماکان مشابه دو رقم قبلی بود، با این تفاوت که به طور نسبی در تعداد بیشتری از شبه بذرها (۱۲/۵ %) که رشد بیشتری داشتند (۸ - ۶ میلی متر) تقسیم زایگوت و سلولی شدن اندوسپرم انجام شده (شکل ۱۱) و پیش جنین با تعدادی سلول قابل تشخیص بود. رشد پیش جنین تا مرحله چند سلولی این امکان را فراهم می‌آورد که در کارهای اصلاحی با انتقال آن‌ها به محیط کشت مصنوعی بتوان از آن‌ها گیاه به دست آورد. با این حال بر اساس گزارش‌های سینگ و برار (Singh and Brar, 1992) ونگ و همکاران (Wang *et al.*, 1993)، آگورو و همکاران (Agucro *et al.*, 1995) و پامر و همکاران (Pommer *et al.*, 1997) در صورتی که برای نجات آن‌ها اقدامی نشود، پس از مدتی به دلایل مشکلات تغذیه‌ای و هورمونی از بین خواهند رفت.

نتایج بررسی وضعیت درونی شبه بذرها در تاریخ ۴۵ روز پس از شکوفایی گل‌ها در جدول ۴ به نمایش گذاشته شده است. در این تاریخ تنها ۸/۳ درصد از شبه بذرهای رقم بی دانه سفید و ۳۳/۳ درصد از شبه بذرهای رقم عسکری دارای پیش جنین زنده بودند و در رقم بی دانه سفید همراه پیش جنین‌های زنده اثری از اندوسپرم دیده نمی‌شد (شکل ۱۲) و اندوسپرم آن‌ها قبلاً از بین رفته بود. در رقم عسکری از مجموع ۳۳/۳ درصد شبه بذرهای دارای پیش جنین، ۱۶/۶ درصد آن‌ها دارای اندوسپرم سلولی شده زنده بودند و این در حالی بود که در رقم بی دانه قرمز اثری از اندوسپرم و پیش جنین دیده نمی‌شد (شکل ۱۳) و تنها کیسه‌های جنینی خالی و دارای زایگوت مرده مشاهده می‌شدند. بنابراین در این مرحله در بیشتر شبه بذرهای مورد بررسی

www.SID.ir

www.SID.ir

جدول ۳ - وضعیت درونی شبه بذرهای سه رقم انگور بی‌دانه ۳۵ روز پس از شکوفایی گل‌ها*

Table 3. Internal situation of seed traces in three seedless grapevine cultivars 35 days after flower opening*

Cultivar	رقم	طول شبه بذر Lenght of seed traces (mm)	شبه بذر Seed traces (%)	شبه بذر با بافت خورش تخریب شده Seed traces with degenerated nucellus (%)	شبه بذر بدون کیسه جنینی Seed traces with no embryo sac (%)	شبه بذر دارای کیسه جنینی بدون اندوسپرم Seed traces with embryo sac, having no endosperm (%)	شبه بذر دارای اندوسپرم سلولی شده Seed traces with celluarised celluaarised endosperm (%)	شبه بذر دارای زایگوت مرده Seed traces with degenerated zygote (%)	شبه بذر دارای پیش جنین زنده Seed traces with normal embryo (%)
Yaghooti	یاقوتی	0.4-2	33.3	33.3	-	-	-	-	-
		2-4	-	-	-	-	-	-	-
		4-6	66.7	-	-	58.3	8.4	66.7	-
White seedless	بی‌دانه سفید	0.4-2	13.8	13.8	-	-	-	-	-
		2-4	80.5	-	72.2	8.3	-	8.3	-
		4-6	5.7	-	-	-	5.7	-	5.7
Green Keshmeshi	کشمشی سبز	0.4-2	41.7	41.7	-	-	-	-	-
		2-4	4.2	-	-	-	-	4.2	-
		4-6	-	-	-	-	-	41.6	-
		6-8	-	-	-	-	12.5	-	12.5

* 36 seed traces of each of three cultivars were studied.

* تعداد کل نمونه بذر بررسی شده در مورد هرکدام از چهار رقم ۳۶ عدد شبه بذر می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴ ـ وضعیت درونی شبه بذرهای سه رقم انگور بی‌دانه ۴۵ روز پس از شکوفایی گل‌ها*

Table 4. Internal situation of seed traces in three seedless grapevine cultivars 35 days after flower opening*

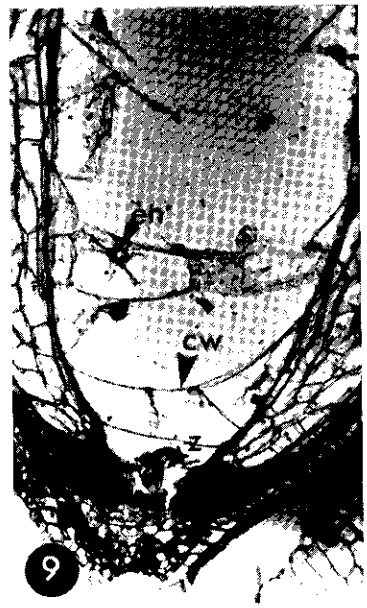
Cultivar	رقم	طول شبه بذر 6Lenght of seed traces (mm)	شبه بذر Seed traces (%)	شبه بذر با بافت خورش تخریب شده Seed traces with degenerated nucellus (%)	شبه بذر بدون کیسه جنینی Seed traces with no embryo sac (%)	شبه بذر دارای کیسه جنینی بدون اندوسپرم Seed traces with embryo sac, having no endosperm (%)	شبه بذر دارای اندوسپروم‌هسته‌ای درحال فساد Seed trace with degenerating free nuclear endosperm (%)	شبه بذر دارای اندوسپرم سلولی شده Seed traces with celluarised celluaarised endosperm (%)	شبه بذر دارای زایگوت مرده Seed traces with degenerated zygote (%)	شبه بذر دارای پیش جنین زنده Seed traces with normal pro-embryo (%)
White seedless	بی‌دانه سفید	0.4-2	25	25	-	-	-	-	-	-
		2-4	58.4	-	-	58.4	-	-	58.4	-
		4-6	16.6	-	-	16.6	-	-	8.3	8.3
Red seedless	بی‌دانه قرمز	0.4-2	58.3	58.3	-	-	-	-	-	
		2-4	33.3	-	16.7	16.6	-	-	16.6	-
		4-6	8.4	-	-	8.4	-	-	8.4	-
Askary	عسکری	0.4-2	50	50	-	-	-	-	-	-
		2-4	-	-	--		-	-	-	-
		4-6	16.7	-	-	-	16.7	-	8.3	8.3
		6-8	33.3	-	-	-	8.3	16.6	8.3	25.0

* 36 seed traces of each of three cultivars were studied.

* تعداد کل نمونه بذر بررسی شده در مورد هرکدام از چهار رقم ۳۶ عدد شبه بذر می‌باشد.

Archive of SID

Archive of SID



شکل ۹ - برش طولی شبه بذر رقم کشمشی سبز ۲۱ روز پس از شکوفایی گل

Fig. 9. Longitudinal section of seed traces of cv. Green Keshmeshi 21 days after flower opening

در این شکل زایگوت (Z)، شروع تشکیل دیواره سلولی (CW) در اندوسپرم و هسته‌های اندوسپرم (en) دیده می‌شوند

In this figure, recently formed cell wall(CW) in endosperm, endosperm nuclear (en) and Zygote (z) can be realized

شکل ۱۰ - برش طولی شبه بذر رقم بی‌دانه سفید ۳۵ روز پس از شکوفایی گل

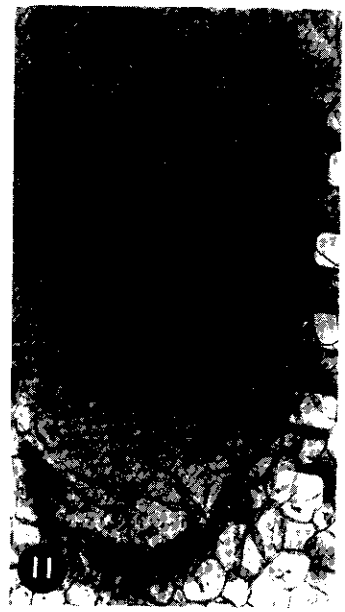
Fig. 10. Longitudinal section of seed traces of cv. White seedlees 35 days after flower opening

در این شکل پیش جنین (pe) در مرحله چند سلولی قابل تشخیص می‌باشد

In this figure, multi cellular pro-embryo (pe) can be realized

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱۱ - برش طولی شبه بذر رقم کشمشی سبز ۳۵ روز پس از شکوفایی

Fig. 11. Longitudinal section of seed traces of cv. Green Keshmeshi 35 days after flower opening

در این شکل اندوسپرم سلولی شده (ce) قابل تشخیص می‌باشد

In this figure, cellular endosperm (ce) can be realized

شکل ۱۲ - برش طولی شبه بذر رقم عسکری ۴۵ روز پی از شکوفایی گل

Fig. 12. Longitudinal section of seed traces of cv. Askary 45 days after flower opening

در این شکل پیش جنین چند سلولی (pe) بدون همراهی اندوسپرم قابل تشخیص می‌باشد

In this figure, multi-cellular pro-embryo (pe) without accompanying endosperm can be realized

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱۳ - برش طولی شبه بذر رقم بی دانه قرمز ۴۵ روز پس از شکوفایی گل

Fig. 13. Longitudinal section of seed traces of cv. Red seedlless 45 days after flower opening

در این شکل کیسه جنینی خالی (es) دیده می‌شود و اثری از پیش جنین و اندوسپرم نمی‌باشد

In this figure, embryo sac (es) is empty and there is no sign of pro-embryo and endosperm

زایگوت، پیش جنین و اندوسپرم از بین رفته بودند و تنها در تعداد کمی از شبه بذرهای ارقام بی دانه سفید و عسکری پیش جنین زنده قابل مشاهده بود.

با توجّه به نتایج به دست آمده مشخص می‌گردد که در کلیه ارقام مورد بررسی سقط زایگوت یا پیش جنین حدود سه هفته پس از باز شدن گل‌ها در تعداد قابل توجهی از شبه بذرها انجام می‌شود. در مرحله پنج هفته پس از باز شدن گل‌ها وضعیت بین ارقام متفاوت بود، به طوریکه در رقم بی دانه قرمز اثری از زایگوت و یا پیش جنین زنده دیده نمی‌شد ولیکن تعداد کمی از شبه بذرهای رقم بی دانه سفید (۵/۷ %) و کشمشی سبز (۱۲/۵ %) همچنان در این مرحله دارای پیش جنین زنده بودند. رقم عسکری نیز وضعیتی مشابه رقم کشمشی سبز داشت، به طوریکه حتی تا مرحله ۴۵ روز پس از باز شدن گل‌ها در تعدادی از شبه بذرها (۳۳/۳ %) پیش جنین زنده قابل تشخیص بود. بنابراین برای استفاده از تکنیک نجات جنین در تلاقی‌هایی که والد مادری بی دانه باشد، می‌بایست دقت لازم به عمل آید تا پیش جنین‌ها پس از حداکثر رشد و تقسیم و قبل از شروع به تخریب از داخل بافت حبه بیرون آورده شده و به محیط کشت منتقل شوند، چراکه هر چه اندازه شبه بذر بزرگتر باشد امکان نجات جنین آن‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش می‌یابد. با توجّه به نتایج به دست آمده، زمان مناسب برای این کار در رقم بی دانه قرمز زودتر از سه هفته، در ارقام بی دانه سفید و یاقوتی بین سه الی پنج هفته و در ارقام عسکری و کشمشی سبز می‌تواند حتی تا حدود هفت هفته پس از شکوفایی گل‌ها تعیین گردد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی و دانشگاه تهران که بودجه این تحقیق را فراهم نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از آقای دکتر غلامحسین مصاحبی و سرکار خانم مهندس میناکوهی که امکان انجام این تحقیق را فراهم آوردند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

References

Aguer, C., Riquelme, C., and Tizio, R. 1995. Embryo rescue from seedless grapevines *(Vitis vinifera)* treated with growth retardants. Vitis 34: 73-76.

Barrit, D.J. 1970. Ovule development in seeded and seedless grapes. Vitis 9: 7-14.

Cain, D.W., Emershad, R.L., and Tarailo, R.E. 1983. In Ovulo embryo culture and seedling development of seeded and seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). Vitis 22: 9-14.

Clingeleffer, P.R. 1996. Overseas varieties and breeding programs-A summary from a table grape prespective. 4th Australian Table Grape Industry Technical Conference. October. Robinvale, Victoria. pp 47-52.

Clingeleffer, P.R. 1998. Breeding table grape and raisin varieties. Proccedings of the 2nd Japan-Australia International Workshop. Breeding and Biotechnology for Fruit trees, Tatura, Merbein, Adelaide, Australia. pp. 46-49.

Ebadi, A., May, P., Sedgley, M., and Coombe, B.G. 1995. Effect of low temperature near flowering time on ovule development and pollen tube growth in the grapevine (*Vitis vinifera* L.)., cvs. Chardonnay and Shiraz. Australian Journal of Grape and Wine Research 1: 11-19.

Ebadi, A., May, P., Sedgley, M., and Coombe, B.G. 1996. Seed development and abortion in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay. International Journal of Plant Science 157: 703-712.

Emershad, R.L., and Ramming, D.W. 1984. In Ovulo Embryo Culture of (*Vitis vinifera* cv. Thomson Seedless. American Journal of Botany 71: 873-877.

Feder, N., and O'Brien, T.P. 1968. Plant microtechnique: Some principles and new methods.

www.SID.ir

Archive of SID

American Journal of Botany 55: 123-142.

Kassemeyer, H.H., and Staudt, G. 1983. Growth and development of endosperm, embryo and ovules of *Vitis vinifera*. Vitis 22: 109-119.

Lavee, S., and Nir, Gi. 1985. Grape. pp. 167-191. In: Monselise, S.P. (ed.). Boca Raton, Florida CRC Handbook of Fruitset and Development. Crc Press.

Ledbetter, C.A., and Ramming, D.W. 1989. Seedlessness in grapes. Horticultural Reviews 11: 159-184.

Loomis, N.H., and Weinberger, J.H. 1979. Inheritance studies of seedlessness in grapes. Journal of American Society for Horticultural Sciences 104: 181-184.

Pommer, C.V., Ramming, D.W., and Emershad, R.L. 1995. Influence of grape genotype, ripening season, seed trace size and culture date in ovule embryo development and plant formation. Bragantia 54(2): 237-249.

Pratt, C., and Einset, J. 1961. Sterility due to pre-meiotic ovule abortion in small clustered and normal Concord graps. Journal of American Society for Horticultural Sciences 78: 230-238.

Singh, Z., and Brar, S.J.S. 1992. *In vitro* development of ovule in seedless and seeded cvs of grapes (*vitis vinifera*), a particular reference to in ovulo embryo culture. Vitis 31: 77-82.

Spiegel-Roy, P., Sahar, N., Baron, J., and Levi, U. 1985. *In vitro* culture and plant formation from grape cultivars with abortive ovules and seeds. Journal of American Society for Horticultural Sciences 110: 109-112.

Wang, J., and Horiuchi, S. 1990. A histological study on the seedlessness in "Himrod seedless" grapes. Journal of Japanes Society for Horticultural Sciences 59: 455-462.

Wang J., and Horiuchii, S. 1993. A morphological study seedlees fruit formation in the grape cv. "Wuheibai". Acta Horticulturae-Sinica 19: 1-6.

Wang, J., Horiuchi, S., and Matsui, H. 1993. A histological study of seedlessness in seddless grape. Journal of Japanese Society for Horticultural Sciences 62: 1-7.

آدرس نگارندگان:
علی عبادی و داریوش آتشکار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.
یحیی دهقانی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران.

www.SID.ir