# اثر کاربرد بیرونی پوترسین بر توسعه تخمک و نجات جنین در دو رقم انگور بکربار کاذب ایرانی(*Vitis vinifera* L.)

# Effect of Putrescine Application on the Development of Ovule and Subsequent Embryo Rescue of Two Iranian Stenospermic Grape (*Vitis vinifera* L.)

رسول جلیلی‌مرندی[۱*]، الهام معصومی[۲] و حامد دولتی‌بانه[۳]

تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۱۵

**چکیده**

ارقام بی‌دانه انگور به‌طور وسیع در ایران پرورش داده می‌شوند. سقط جنین در انگورهای بکربار کاذب محدودیت بزرگی در کارآیی اصلاح ارقام بیدانه ایجاد می‌کند، پژوهش حاضر جهت بررسی تأثیر کاربرد بیرونی پوترسین در شرایط مزرعه بر توسعه تخمک و نجات جنین در دو رقم انگور بکربار کاذب (عسکری و بی‌دانه‌سفید) طراحی و اجرا گردید. غلظت‌های پوترسین صفر، ۲، ۲۰ و ۳۰ میلی-گرم در لیتر بود. طول حبه و تخمک‌های رقم بی‌دانه سفید، ۲۰ روز و رقم عسکری ۴۰ روز بعد از باز شدن گل اندازه‌گیری شد و سپس تخمک‌های بیرون آورده شده از درون حبه‌ها بر روی محیط‌کشت نیچ و نیچ حاوی ۱ میکرومول جیبرلین، ۱ میکرومول نفتالین استیک اسید، ۲ گرم در لیتر زغال فعال، ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار کشت شدند. صفات مورد بررسی شامل طول حبه و تخمک، تخمک‌های قهوه‌ای شده، کالوس داده و جوانه‌زده بود. نتایج تحقیقات نشان داد که غلظت‌های مختلف محلول‌پاشی پوترسین بر طول حبه و تخمک، درصد تخمک‌های قهوه‌ای شده و جوانه‌زده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. همچنین درصد تخمک-های حاوی کالوس در غلظت‌های مختلف پوترسین در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. کاربرد ۳۰ میلی‌گرم در لیتر پوترسین به-طور معنی‌دار سبب افزایش طول حبه و تخمک، درصد تخمک‌های حاوی کالوس و جوانه‌زده و کاهش تخمک‌های قهوه‌ای شده گردید. جوانه‌زنی تخمک‌ها در غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر پوترسین در رقم انگور عسکری ۳۰/۰۱۸ درصد و در رقم انگور بی‌دانه سفید ۲۴/۴۱ درصد بود.

**واژه‌های کلیدی:** بی‌دانگی، پوترسین، کشت تخمک، سقط جنین، محیط‌کشت

۱. دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۳. استادیار پژوهشی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

*: نویسنده مسئول Email: rasuljalili@yahoo.com

**مقدمه**

انگور یکی از محصولات عمده باغی در ایران به‌شمار می‌آید. ایران در سال 2009 میلادی با سطح کشت ۲۸۶۰۰۰۰ هکتار، ششمین کشور و با تولید ۳ میلیون تن انگور، هفتمین کشور دنیا بود(FAO, 2009).

ارقام بی‌دانه انگور از لحاظ تازه‌خوری و تهیه کشمش مورد ترجیح اکثر مصرف‌کننده‌ها می‌باشد (*عبادی* و همکاران[1]، 2002؛ *تیان* و همکاران[2]،2008 ). بی‌دانگی در انگور ناشی از پارتنوکارپی (بکرباری) و استنوسپرموکارپی (بکرباری کاذب) می‌باشد (جلیلی‌مرندی[3]، 2010؛ *عبادی*، 2002؛ *تیان*، 2008) در ارقام بکربار کاذب علیرغم عمل گرده‌افشانی و تلقیح، جنین بعد از ۳ الی ۶ هفته از بین می‌رود (*عبادی*، 2002؛ *تیان*، 2008) در این نوع ارقام در ناحیه بیرونی تخمکپوش‌های دانه، سلول‌های ماکرواسکلریت که موجب سفت‌شدن دانه می‌شوند، تشکیل نگردیده و در اثر سقط جنین دانه رشد نمی‌کند (*جلیلی‌مرندی*، 2010). برخی پژوهشگران بکرباری کاذب را یک صفت قابل توارث گزارش نموده‌اند و عقیده بر این دارند که ژن‌های غالب و فاکتورهای متعدد دیگر صفت بکرباری کاذب را تحت تأثیر قرار می‌دهند (*لیدبتر و رامینگ*[4]، 1989). به‌نظر پژوهشگران یکی از علل بکرباری کاذب در ارقام انگور، تجزیه اندوسپرم و به‌دنبال آن توقف رشد جنین می‌باشد (*کلینگلرفر*[5]، 1998؛ *عبادی*[6]، 2001). علت اصلی این پدیده به‌طور دقیق مشخص نمی‌باشد. بر اساس اظهار برخی از پژوهشگران این پدیده می‌تواند ناشی از عدم تعادل هورمونی در بافت‌های والد مادری در طی مراحل اولیه رشد بذر باشد (*ترزا*[7] و همکاران، 2002).

اصلاح انگورهای تازه‌خوری به‌منظور دسترسی به ارقام بی دانه برتر که دارای صفات کمی و کیفی مطلوبی باشند اهمیت زیادی در بازاریابی آنها دارد. دسترسی به ارقامی با حبه درشت و بی‌دانه، یکنواختی در اندازه حبه، رنگ مطلوب و انبارمانی مناسب، گوشتی‌بودن حبه و عطر و طعم مطلوب اهمیت ویژه‌ای در اصلاح این ارقام دارد. کیفیت خوراکی ارتباط نزدیکی با میزان قند، اسید و نسبت آنها به یکدیگر و گوشتی‌بودن حبه دارد. بافت ترد حبه به‌طور کلی از دیدگاه مصرف‌کننده از اهمیت خاصی برخوردار است (*عبادی* و همکاران، 2002).

1. Ebadi *et al*.
2. Tian *et al*.
3. Jalili Marandi
4. Ledbetter and Ramming
5. Clinglerffer
6. Ebadi
7. Teresa *et al*.

تلاش برای افزایش بهره‌وری از تکنیک نجات جنین تا به حال موفقیت نسبی داشته است. استفاده از ترکیبات مختلف و غلظت هورمون‌ها، بررسی اثر سرما، اسیدجیبرلیک، استفاده از نور غنی‌شده از طول موج قرمز، به کارگیری محیط‌های مختلف کشت و تولید ارقام جدید انگور از جمله روش‌های مورد مطالعه در تکنیک نجات جنین می‌باشد.( عبادی، 2002؛ ترزا، 2002؛ *آگرو*[8]، 2000).

موفقیت اصلاح انگورهای تازه‌خوری برای دست‌یابی به ارقام جدید بی‌دانه با کمک روش‌های کلاسیک اصلاح که از طریق دورگ‌گیری بین والد پدری بی‌دانه و والد مادری دانه‌دار صورت می‌گیرد بین ۱۰ الی ۱۵ درصد می‌باشد(عبادی، 2002). امروزه تکنیک نجات جنین امکان تولید ارقام جدید بی‌دانه را فراهم نموده است و موفقیت این روش برای دستیابی به ارقام بی‌دانه جدید به‌طور متوسط ۸۵ درصد می‌باشد. (*عبادی*، 2001؛ *ترزا*، 2002؛ *کین*[9] و همکاران، 1993؛ *اسپیگل-روی*[10] و همکاران، 1985). بر اساس اظهار پژوهشگران یکی از علل سقط جنین در ارقام بکربار کاذب انگور ناشی از سطوح جیبرلین بیش از حد در مراحل اولیه توسعه بذر می‌باشد (آگرو، 2000) استفاده از ترکیبات ضدجیبرلین نظیر سایکوسل، اسیدآبسیسزیک، بنزیل‌آمینوپورین ، آنسی‌میدول[11] و اونی‌ونازول[12]، می‌تواند از سنتز جیبرلین و سقط جنین جلوگیری کند. *بوردلون و موور*[13] (1994).

پلی‌آمین‌ها نظیر پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین تنظیم کننده‌های مهم در مراحل رشد و توسعه گیاه به شمار می‌آیند. این ترکیبات در زنده ماندن سلول‌ها، تقسیم، باز ساخت و تمایز سلول‌ها نقش دارند(*شالر*[14]،2007؛ *تاکاهاشی و کاکهی*[15]، 2010). همچنین این ترکیبات در انتقال پیام‌ها و سنتز پروتئین‌ها دخیل می‌باشند. *توبیرسیو*[16] و همکاران، 1993).

پلی‌آمین‌ها در طی جنین‌زایی رویشی و تشکیل جنین‌های جنسی و رشد سریع آنها نقش کلیدی دارند (*نووکارجو*[17] و همکاران، 2008؛ *گالستون و ترنس*[18]، 1985) پلی‌آمین‌ها در مراحل مختلف تلقیح و تشکیل میوه گیاهان مختلف دخیل می‌باشند و کاربرد خارجی پلی‌آمین‌ها به‌ویژه پوترسین، موجب

8. Aguero *et al*.
9. Cain *et al*.
10. Spiegel-Roy *et al*.
11. Ancymidol
12. Uniconazole
13. Bordelon and Moore
14. Schaller
15. Takahashi and Kakehi
16. Tiburcio *et al*.
17. Nookaraju *et al*.
18. Galston and Terence

افزایش درصد گل‌های تلقیح یافته انگور می‌شود(*شالر*، 2007). احتمال داده می‌شود که کمبود غلظت پلی‌آمین‌های درونی سبب محدودیت رشد می‌شود و می‌توان گفت که پوترسین در توسعه تعداد زیادی از جنین‌ها و رشد آتی آنها یک ترکیب مناسب می‌باشد و پوترسین در تمایز سلول‌های بذرهای نابالغ انگور نقش دارد (*نرزا* و همکاران، 2002).

نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهند که اضافه‌کردن پوترسین به محیط‌کشت، یکی از دلایل توجیه‌پذیر، در افزایش جوانه‌زنی مستقیم جنین‌های ارقام بکربار کاذب است. زیرا یکی از عوامل محدودکننده رشد جنین، می‌تواند ناشی از کمبود پوترسین درونی جنین‌ها باشد (*پونکه*[1] و همکاران، 2002).

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی یکی از فاکتورهای مهم تأثیرگذار بر موفقیت نجات جنین و در بهبود کارآیی نجات جنین در ارقام بی‌دانه انگور است. (*اسپیگل-روی*، 1985؛ *امرشاد و رامنینگ*[2]، 1984) هدف از این بررسی کاربرد خارجی پوترسین و اثر ژنوتیپ در نجات جنین ارقام انگور عسکری و بی‌دانه سفید می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۸۹ در ایستگاه تحقیقاتی کهریز ارومیه و آزمایشگاه‌های کشت بافت گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه انجام شد. برای این منظور ابتدا از ارقام عسکری و بی‌دانه سفید در تاکستان‌های ایستگاه تحقیقاتی کهریز ارومیه سه بوته با قدرت رشد یکسان و هم سن (۱۲ ساله) انتخاب شد. برای هر تیمار ۵ خوشه در قسمت‌های مختلف با اندازه تقریباً یکسان انتخاب و اتیکت زده شد. ۱۴روز قبل از باز شدن گل‌ها، از پوترسین در غلظت‌های صفر، ۲، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر برای محلول‌پاشی بر روی دو رقم عسکری و بی‌دانه سفید استفاده شـــــد. در مرحله شکوفایی برای هم‌سن‌نمودن گل‌ها، خوشـــــه‌ها به‌طور روزانه مورد بازدید قرار می‌گرفتند. در اولین روز شکوفایی، کلیه گل-های باز شده حذف گردیدند. در روز دوم کلیه گل‌های باز شده حفظ و همه گل‌های باز نشده حذف گردید. (*عبادی*، 2001). حبه‌ها در رقم بی‌دانه سفید در زمان ۲۰ روز پس از گرده-افشانی و در رقم عسکری ۴۰ روز پس از گرده‌افشانی برداشت شدند (*عبادی*، 2002). بعد از استریل کردن حبه‌ها با محلول یک دوم درصد (حجمی به حجمی) هیپوکلریت سدیم تجارتی به همراه چند قطره مویان، به‌مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شده پس از سه بار آبکشی با اسکالپل برش و با پنس تخمک‌ها را جدا کرده و به محیط‌کشت نیچ و نیچ (N&N) به اضافه ۱ میکرومول GA3، ۱ میکرومول NAA، ۲ گرم در لیتر زغال فعال، ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار قرار داده شد و pH محیط‌کشت به ۰/۱± ۵/۶ تنظیم گردید و سپس به اتاقک رشد با دمای روز ۲±۲۷ و دمای شب ۲±۲۲ و در معرض نور سفید فلورسنت با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس انتقال داده شدند. مـــیانگین طول حبه‌ها و میانگین طول تخمک بر حسب میلی‌متر با کولیس اندازه‌گیری گردید و تعداد تخمک‌های قهوه‌ای شده، تخمک‌های حاوی کالوس و تخمک‌های جوانه-زده تا ۵ ماه پس از کشت در شرایط درون‌شیشه‌ای، بررسی و شمارش شدند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و در پنج تکرار انجام گرفت. هر واحد آزمایشی متشکل از ۴ پتری‌دیش، و هر پتری‌دیش حاوی ۱۰ تخمک بود.

با توجه به اینکه برخی از اعداد بر اساس درصد بیان شده و یا بعضی از صفات دارای رقم صفر بودند. بنابراین جهت برقراری توزیع نرمال، از دو نوع فرمول $\arcsin\sqrt{x+0.5}$ و $\sqrt{x+0.5}$ برای تبدیل دادها استفاده گردید. بعد از تبدیل داده‌ها و برقراری شرایط توزیع نرمال، تجزیه واریانس مرکب و مقایسات میانگین با استفاده از برنامه آماری MSTATC انجام گرفت. مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۱ درصد، انجام گرفت.

## نتایج

نتایج تجزیه واریانس اثر محلول پاشی پوترسین بر طول حبه و طول تخمک در جدول ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج این جدول اثر محلول‌پاشی پوترسین قبل از گلدهی بین اقام مورد آزمایش، غلظت‌های مختلف پوترسین و اثر متقابل آنها بر طول حبه‌ها و همچنین طول تخمک در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. با افزایش غلظت پوترسین طول حبه‌ها افزایش نشان داد و بیشترین طول حبه در غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر رقم انگور عسکری مشاهده گردید (شکل ۱). موجب افزایش وزن حبه و وزن تخمک‌ها، نسبت به حبه‌های تیمار نشده (شاهد) گردید (شکل ۱). طول تخمک در بین ارقام مورد آزمایش، غلظت‌های مختلف پوترسین و اثر متقابل آنها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. بیشترین طول تخمک نیز هماهنگ با طول حبه در غلظت

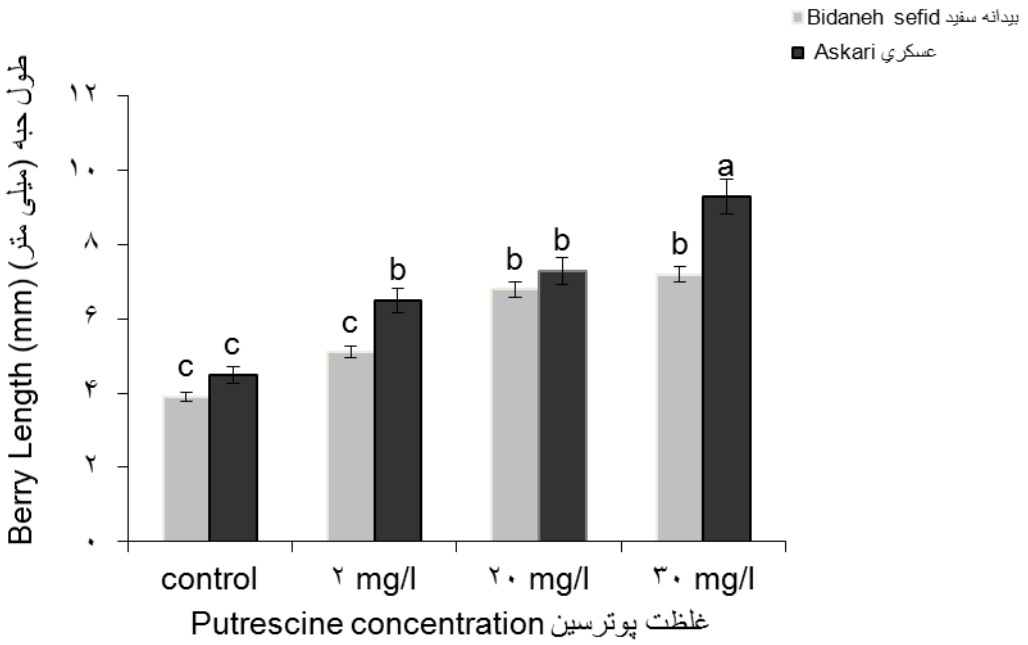
1. Ponce, *et al.*
2. Emershad and Rammin

۳۰ میلی‌گرم در لیتر پوترسین، در رقم انگور عسکری به‌دست آمد (شکل ۲).

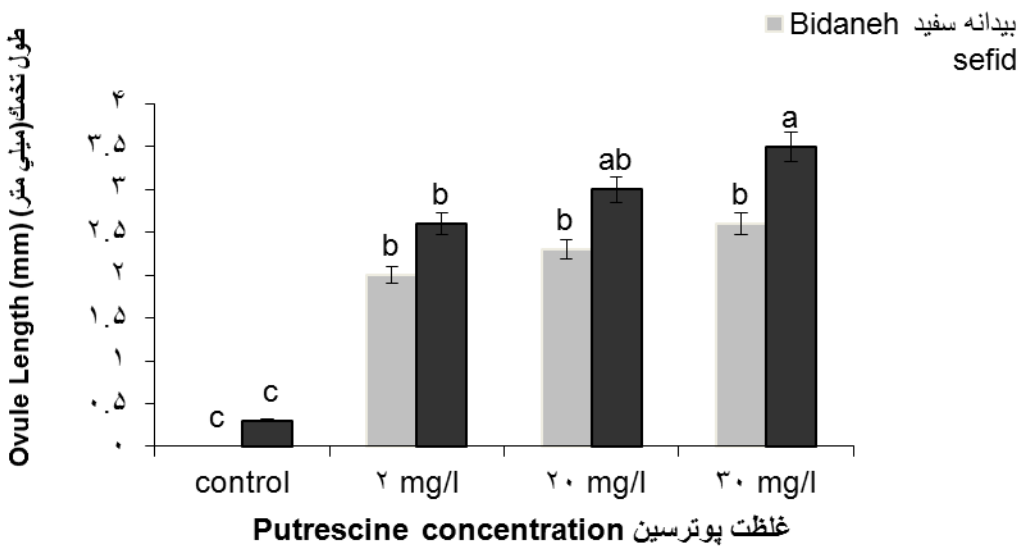
جدول ۱: تجزیه واریانس اثر پوترسین در طول حبه و طول تخمک‌ها در زمان برداشت در دو رقم انگور مورد آزمایش
Table 1: ANOVA of putrescine effect on berry and ovule length at harvest time of grape cultivars

| منابع تغییرات Source of variation | درجه آزادی df | میانگین مربعات Mean of Squares | |
|---|---|---|---|
| | | طول تخمک Ovule length | طول حبه Berry length |
| رقم Cultivar | 1 | 4.62520** | 15.985** |
| پوترسین putrescine | 3 | 20.0602** | 36.172** |
| پوترسین×رقم Cultivar× putrescine | 3 | 0.1785416** | 1.859** |
| اشتباه آزمایش Error | 40 | 0.025 | 0.028 |
| ضریب تغییرات(٪) CV(%) | | 7.72 | 2.66 |

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد **: Significant at $p$ <0.01




شکل ۱: اثر متقابل رقم و غلظت پوترسین بر طول حبه. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ می‌باشند
Fig 1: Interaction of cultivars and putrescine concentration on berry length. Bars with similar letters are not significantly different at 1% level




شکل ۲: اثر متقابل رقم و غلظت پوترسین بر طول تخمک. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ می‌باشند

Fig 2: Interaction of cultivars and putrescine concentration on ovule length. Bars with similar letters are not significantly different at 1% level

بعد از گذشت حدود ۲۰ روز از زمان کشت تخمک‌ها در محیط‌کشت نیچ و نیچ مشاهده شد که تعدادی از تخمک‌ها ابتدا قهوه‌ای و سپس کاملاً در مراحل بعدی سیاه شدند. نتایج این بررسی نشان داد که بین ارقام انگور مورد آزمایش و بین غلظت‌های مختلف پوترسین و اثر متقابل آنها از لحاظ قهوه‌ای شدن تخمک‌ها اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد وجود دارد (جدول ۲). بیشترین درصد تخمک‌های قهوه‌ای شده در هر دو رقم انگور مورد آزمایش در تیمار شاهد و کمترین درصد تخمک‌های قهوه‌ای شده در تیمارهای قبل از گلدهی با پوترسین و در غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده گردید (شکل ۳).

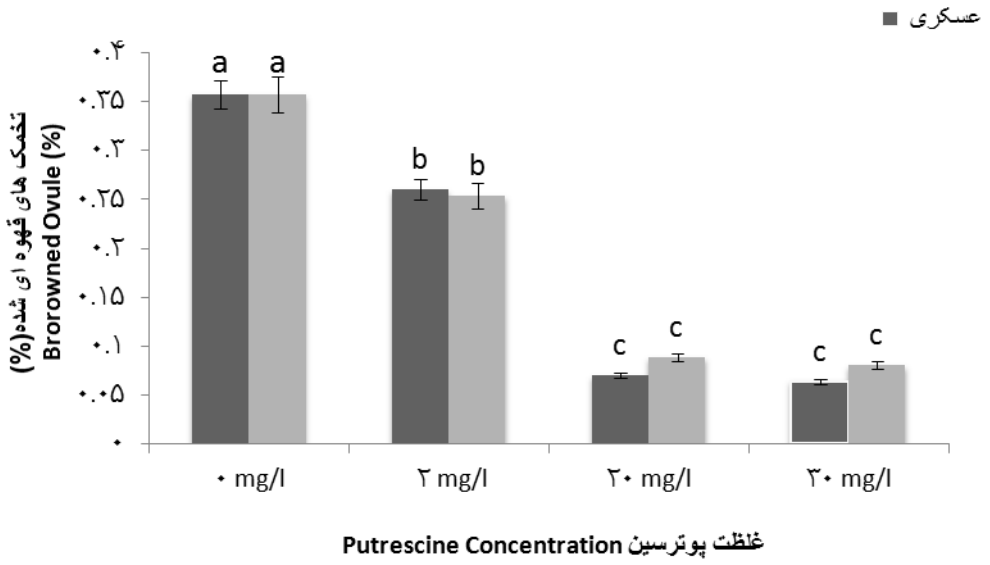
جدول ۲: تجزیه واریانس اثر پوترسین در تخمک‌های قهوه‌ای شده، حاوی کالوس و جوانه‌زده در دو رقم انگور مورد آزمایش

Table 2: ANOVA of putrescine effect on browned, with callus and germinate ovules of examined grape cultivars

| منابع تغییرات Source of orce Variation | درجه آزادی d.f | Sum of Squares مجموع مربعات | | |
|---|---|---|---|---|
| | | درصدتخمک‌های حاوی کالوس Ovules with Callus % | درصد تخمک‌های قهوه‌ای شده Browned Ovules % | درصد تخمک جوانه‌زده Germinated Ovules % |
| رقم Cultivar | 1 | 7.29 ns | 0.022 ** | 438.42** |
| غلظت پوترسین Putrescine Concentration. | 3 | 4954.22* | 0.18** | 937.85** |
| رقم × پوترسین Cultivar×Putrescine | 3 | 49.89ns | 0.02** | 71.89** |
| خطای آزمایش Error | 40 | 36.64 | 54.78 | 13.32 |
| CV | | 15.68 | 22.49 | 22.60 |

*،** و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ درصد،۱ درصد و غیرمعنی‌دار

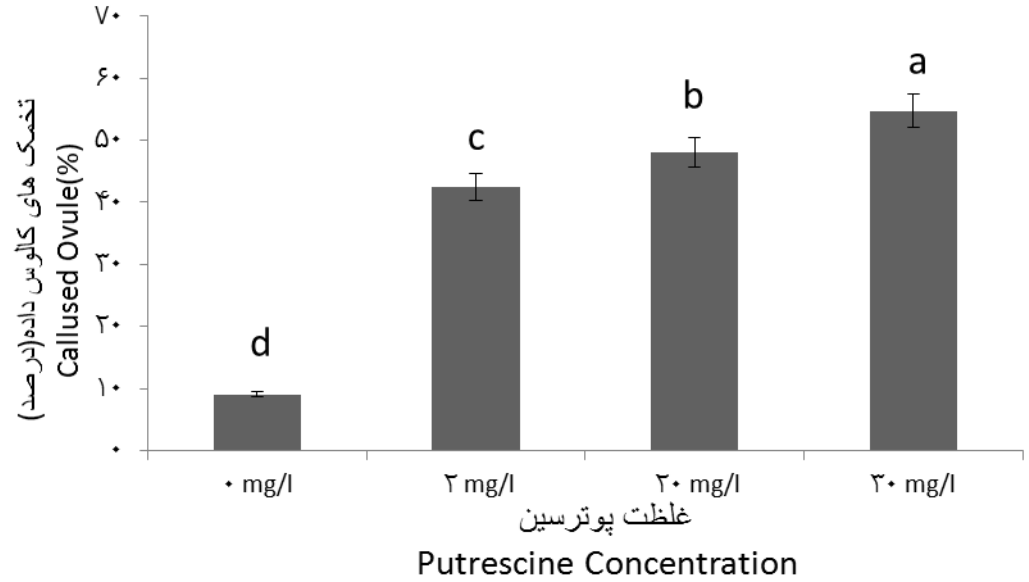
*,**and ns: Significant at p<0.001,0.005 and not significant, respectively




شکل ۳: اثر متقابل رقم و غلظت پوترسین بردر صد سیاه‌شدن تخمک‌ها. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ می‌باشند

Fig 3: Interaction of cultivars and putrescine concentration on browned ovules. Bars with similar letters are not significantly different at 1% level

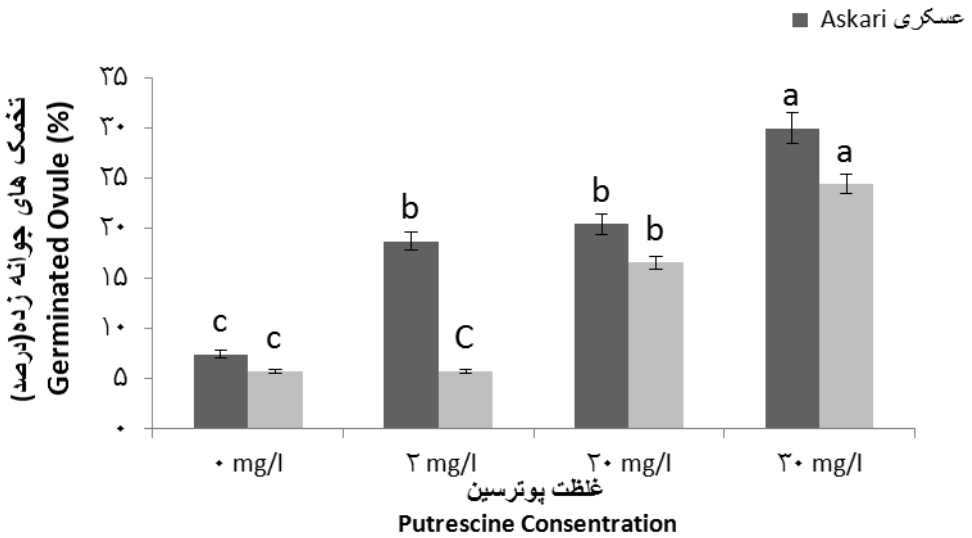
بر اساس نتایج به‌دست آمده درصد تخمک‌های کالوس داده در ارقام مورد آزمایش و اثر متقابل رقم انگور و پوترسین معنی‌دار نبود. اما غلظت‌های پوترسین بر درصد تخمک‌های کالوس داده در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). با افزایش غلظت پوترسین درصد تخمک‌های کالوس داده افزایش یافت به‌طوری‌که کمترین درصد تخمک‌های کالوس داده در تیمار شاهد و بیشترین درصد در تیمار ۳۰ میلی‌گرم در لیتر قبل از گلدهی توسط پوترسین مشاهده گردید (شکل۴).




شکل ۴: اثر غلظت پوترسین بر تخمک‌های کالوس داده. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند

Fig 4: Effect of putrescine concentration on callused ovules. Bars with similar letters are not significantly different at 5% level

بر اساس نتایج جدول ۲ درصد تخمک‌های جوانه‌زده در بین ارقام انگور مورد آزمایش و غلظت‌های مختلف پوترسین در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل رقم انگور و پوترسین در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. کمترین درصد تخمک‌های جوانه‌زده در شاهد و بیشترین درصد در تیمار پوترسین با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده گردید (شکل ۵). درصد جوانه‌زنی تخمک در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر، بین ارقام مورد آزمایش معنی‌دار بود و تخمک‌های جوانه‌زده در رقم انگور عسکری بیشتر از رقم انگور بی‌دانه سفید بود (شکل ۵). درصد جوانه‌زنی تخمک‌ها در غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر پوترسین در رقم انگور عسکری ۳۰/۰۱۸ درصد و در رقم انگور بی‌دانه سفید ۲۴/۴۱ درصد بود.




شکل ۵: اثر متقابل رقم انگور و غلظت پوترسین بر درصد تخمک‌های جوانه‌زده. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ می‌باشند

Fig 5: Interaction of grape cultivars and putrescine concentration on percentage of ovules germination. Bars with similar letters are not significantly different at 1% level

**بحث**

بر اساس نتایج پژوهش‌های به‌دست آمده پوترسین سبب افزایش اندازه حبه‌ها و در موازات آن موجب افزایش اندازه تخمک‌ها نیز می‌شود (*تانگ*[1]، 2009). افزایش اندازه تخمک در رشد و نمو و جوانه‌زنی تخمک‌ها و به‌عبارت دیگر در نجات جنین تاثیر بسزایی دارد( *تانگ*، 2009؛ *ترزا*، 2002). به‌طورکلی در تخمک‌هایی که طول آنها بیشتر از ۲ میلی‌متر است، شانس تشکیل جنین بیشتر می‌باشد(تانگ، 2009) و در نتایج حاصل از این تحقیق نیز موارد مشابه مشاهده گردید.

بر اساس اظهار پژوهشگران میزان قهوه‌ای شدن تخمک‌ها بر روی محیط‌کشت، به ارقام مختلف انگور، زمان جداسازی تخمک‌ها و اندازه تخمک‌ها بستگی دارد (*گری*[2]، 1992). میزان سیاه‌شدن تخمک‌ها در دو رقم مورد آزمایش نسبت به نتایج به‌دست آمده از طرف برخی محققان مطابقت دارد (*عبادی*، 2002).

قهوه‌ای شدن تخمک‌ها در محیط‌کشت و در نهایت نکروزه‌شدن جنین‌ها می‌تواند ناشی از سنتز ترکیبات سمی در اثر فعالیت تخمک‌ها باشد. بین قهوه‌ای شدن تخمک‌ها با تانن‌ها ارتباط مشخص وجود دارد و احتمالاً با گسترش تانن‌ها در محیط کشت حلقه‌هایی در اطراف تخمک‌ها به وجود می‌آید که سبب از بین رفتن تخمک‌ها می شود (*گری*، 1992). با توجه به اینکه زمان برداشت تخمک در این آزمایش در رقم بی‌دانه سفید ۲۰ روز بعد از شکوفایی و در رقم عسکری۴۰ روز بعد از شکوفایی بود، میزان قهوه‌ای شدن تخمک‌ها در این دو رقم نسبت به نتایج به‌دست آمده از طرف برخی محققان مطابقت دارد( *عبادی*، 2002). طبق اظهار پژوهشگران در اکثر ارقام بی‌دانه تخمک‌ها در شروع رنگ‌گیری شروع به انحطاط می‌کنند. در این زمان لکه‌های سیاه در دیواه تخمک‌ها ظاهر شده و از بین می‌روند و این نوع تخمک‌ها قادر به جوانه‌زنی بر

1. Tang *et al*.
2. Gray

روی محیط‌کشت را نمی‌باشند (*عبادی*، 2002؛ *تسولووا*[1]، 1990).

تولید کالوس در تخمک‌های کشت شده علاوه بر اینکه به ژنوتیپ ارقام انگور بستگی دارد در ضمن تنظیم‌کننده‌های رشد نیز در تشکیل کالوس مؤثر می‌باشند (*عبادی*، 2002؛ *خو*[2] و همکاران، 2005). همچنین بر اساس اظهار برخی پژوهشگران تشکیل کالوس به فعالیت‌های متابولیکی تخمک بستگی دارد و از تخمکپوش بیرونی منشاء می‌گیرد (*والدز*[3]، 2005).

ژنوتیپ‌های مختلف انگور بر درصد تخمک‌های جوانه‌زده انگورهای بکربار کاذب تاثیر بسزایی دارند و قدرت جوانه‌زنی تخمک‌های انگور رقم عسکری بیشتر از رقم انگور بی‌دانه سفید می‌باشد (*عبادی*، 2002). همچنین کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد در مرحله کشت تخمک‌ها و در مرحله پیش از تمام گل، زمان سقط جنین را به تعویق انداخته و میزان موفقیت در نجات جنین را افزایش می‌دهد (*ترزا*، 2002؛ *تانگ*، 2009؛ *باهاراتی*[4]، 2005). به‌نظر می‌رسد محلول‌پاشی قبل از گلدهی پوترسین موجب افزایش اندازه حبه و تخمک‌های داخل آن گردیده و در نتیجه موجب افزایش جوانه زنی تخمک‌های کشت شده در محیط‌کشت می‌شود (*تانگ*، 2009) همچنین گزارش‌هایی مبنی بر تاثیر افزایش جوانه‌زنی تخمک‌ها در محیط‌کشت حاوی پوترسین نیز، اعلام گردیده است.

بر اساس تحقیقات انجام شده مشاهده گردیده است که با افزایش غلظت پوترسین تعداد تخمک‌های جوانه‌زده و جنین-های نجات یافته افزایش می‌یابد. هچنین عکس‌العمل ارقام مختلف انگور به پوترسین و غلطت‌های مختلف آن متفاوت می باشد ( *تانگ*، 2009؛ *ترزا*، 2002) موارد ذکر شده با نتایج این آزمایش هماهنگی دارد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این تحقیق پوترسین با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش طول حبه و تخمک، کاهش سیاه‌شدن تخمک و درصد جوانه‌زنی در ارقام مورد آزمایش نسبت به شاهد گردید و با نتایج پژوهشگران مطابقت دارد. در عین حال می‌توان گفت که بررسی‌های بیشتری مورد نیاز است تا شناخت جامعی بر اساس مطالعه پیش تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد و غلظت‌های مختلف آنها در ارقام بکربار کاذب ارقام انگور در ایران به‌دست آید.

---

1. Tsolova
2. Xu *et al*.
3. Valdez
4. Bharathy *et al*.

## منابع


Aguero, C., Vigliocco, A. Abdala G. and Tizio, R. 2000. Effect of gibberellic acid and uniconazol on embryo abortion in the stenospermocarpic grape cultivars Emperatriz and Perlon**.** Plant Growth Regulation**,** 30: 9-16.

Aguero, C., Gregori, M. T., Ponce,M. T., Iandolino, A. and Tizio, R. 1996**.** Improved germination of stenospermic ovules by low temperatures. Biocell, 20: 123-126.

Bharathy, P. V., Karibasappa, G. S., Patil, S. G. and Agrawal, D. C. 2005. In ovule rescue of hybrid embryos in flame seedless grapes-Influence of pre-bloom sprays of benzyladenine. Scientia Horticulturae, 106: 353-356.

Bordelon, B. P. and Moore, J. N.1994. Promoting stenospermic grape seed trace development and germination with plant growth regulators. Journal of the American Society for Horticultural Science, 119: 719-726.

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.

Clinglerffer, P. R. 1998. Breeding table grape and raisin varieties. Breeding and biotechnology for fruit trees, Nifts. P. 46-49**.**

De-Klerk, G. J. and Hall, M. A. 2008. Plant propagation by tissue culture 3rd edition. volume 1. the background .Springer Publishers, 508 pp.

Ebadi, A., Atashkar, D. and Dehgani, Y. 2001. Time and mechanism of embryo abortion in some seedless grapevine cultivars to rscue their embryo. Seed and Plant Improvement Journal, 17: 183-202 (In Persian).

Ebadi, A., Sarikhani, H., Zamani,Z., and Babalar, M. 2002. Application of in ovule embryo culture technique in grapevine breeding program. Iranian Journal of Agricultural Science, 33: 129-135 (In Farsi).

Emershad, R. L. and Ramming, D. W. 1984. In ovule embryo development and plant formation from stenospermic genotypes of *Vitis vinifera*. American Journal of Botany, 76:397-402.

Food and Agricultural Organization of United Nations.2009. Economic and Social Department: The Statisticall Division.

Galston, W. A. and Terence, A. S. 1985. Polyamines in plants. Martinus Nijhoff/Dr. Junk W. Publishers, 225 pp.

Gray, D. J. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) cultivars. Amercan Journal of Botany, 79: 542-546.

Jalili-Marandi, R. 2010. Samll fruits. Jihad-e-Daneshgahi of Urmia University Publications. Urmia, Iran, 297 pp. (In Farsi).

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

Nookaraju, A., Barreto, M. S., and Agrawal, D. C. 2008. Cellular polyamines influence maturation and germination of somatic embryos from pro-embryonal masses of two grapevine cultivars. Vitis, 47: 31-34.

Ponce, M. T., Guinazu, M. E. and Tizio, R. 2002. Improved *in vitro* embryo development of stenospermic grape by putrescine. Biocell, 26: 263-266.

Schaller, K. 2007. Influence of nitrogen nutrition of grapevines on their polyamine metabolism in flowers and berries. Buletinul USAMV-CN, 64: 1-6.

Spiegel-Roy, P., Sahar, N., Baron, J. and Lavi, U. 1985. *In vitro* culture and plant formation from grape cultivar Rubi (Italia Red). Journal of the American Society for Horticultural Science, 110: 109-112.

Takahashi, T. and Kakehi, J. I. 2010. Polyamines: ubiquitous polycations with unique role in growth and stress responses. Annals of Botany, 105: 1-6.

Tang, D., Wang, Y., Cai, J. and Zhao, R. 2009. Effects of exogenous application of plant growth regulators on the development of ovule and subsequent embryo rescue of stenospermic grape (*Vitis vinifera* L.). Scientia Horticulturae, 120: 51-57.

Teresa, M., Monica, P., Guinazu, E. and Tizio, R. 2002. Improved *in vitro* embryo development of stenospermic grape by putrescine. Biocell, 26: 263-266.

Tian, L., Wang, Y., Niu, L., and Tang, D. 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.

Tiburcio, A. F., Campos, J. L., Figueras, X. and Besford, R T. 1993. Recent advances in the understanding of polyamines function during plant development. Plant Growth Regulation, 12: 331-340.

Tsolova, V. 1990. Obtaining plants from crosses of seedless grapevine varieties by means of *in vitro* embryo culture. Vitis, 29: 1-4.

Valdez, J. G. 2005. Immature embryo rescue of grapevine (*Vitis vinifera* L.) after an extended period of seed trace culture. Vitis, 44: 17-23.

Xu, X., Lu, J., Ren, Z., Wang, H. and Leong, S. 2005. Callus induction and somatic embryogenesis in muscadine and seedless bunch grapes (*Vitis*) from immature ovule culture. Florida State Horticultural Society, 118: 260-262.

# Effect of Putrescine Application on the Development of Ovule and Subsequent Embryo Rescue of Two Iranian Stenospermic Grape (*Vitis vinifera* L.)

Jalili-marandi[1*], R. Masomi [2], E. and Dolati-bane[3], H.

**Abstract**

Seedless grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) are widely grown in Iran. Abortion of zygotic embryos in stenospermocarpic grapes largely limits the efficiency of breeding of seedless cultivars. The present study was designed to investigate effects of exogenously applied putrescine to the grapevines in field condition on ovule development and subsequent embryo rescue of two stenospermocarpic grape cultivars (Askary and Bidaneh Sefid). Concentrations of putrescine were 0, 2, 20 and 30mg/l. Length of berries and ovules were measured in Bidaneh Sefid after 20 days and Askary after 40 days of flower opening then, dissected out of ovules from berries were cultured in Nitsch & Nitsch medium containing 1µM GA3, 1µM NAA, 2 g/l activated charcoal, 20 g/l sucrose and 8 g/l agar. Evaluated characteristics were length of berries and ovules, browned, with callus and germinated ovules. The results showed that different concentrations of putrescine sprays were significant on length of berry and ovule, percentage of browned and germinated ovules at 1% level. Also percentages of ovules with callus were significant in different concentrations of putrescine at 5 %. Application of putrescine at 30 mg/l significantly increased length of berry and ovule, percentage of ovules with callus, germinated ovules and decreased browned ovules. Ovules germination at 30 mg/l concentration of putrescine was 30.018% in Askary cultivar and 24.412% in Bidaneh Sefid.

**Keywords:** Seedlessness, Putrescine, Ovule culture, Embryo abortion, Culture medium

1. Associate professor, Former graduate student of Horticulture Urmia University, Urmia
2. MS in Biotechnology Urmia University, Urmia
3. Research Assistant Professor Urmia University, Urmia
*: Corresponding author Email: rasuljalili@yahoo.com