

بررسی زمان و نحوه سقط جنین در چند رقم انگوری 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) رنگ آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. 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.

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

واژه های کلیدی: انگورهای بی دانه، سقط جنین، محیط کشت.

مقدمه

دلیل سقط جنین در مراحل اولیه تکامل تا دهه های اخیر امکان پذیر نبود ولیکن با تکامل تکنیک های نجات جنین این کار اولین بار در سال ۱۹۸۳ صورت گرفت (Cain *et al.*, 1983). با استفاده از این تکنیک می توان جنین های 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 آن ها نتاج به دست آورد. موفقیت این روش در دستیابی به ارقام بی دانه جدید به طور متوسط ۸۵ درصد می باشد که بسیار قابل توجه است (Emershad and Ramming, 1984; Cain *et al.*, 1983; Spiegel-Roy *et al.*, 1985). برای پیاده کردن این روش در اصلاح ارقام ایرانی انگور نیاز به اطلاعات اساسی از نحوه بی دانه شدن ارقام موجود یعنی ارقام بی دانه سفید، بی دانه قرمز، عسکری، یاقوتی و کشمش سبز می باشد، زیرا بی دانگی در انگور تحت تأثیر دو پدیده متفاوت یعنی پارتنوکاری (تشکیل میوه بی دانه بدون انجام عمل باروری) و استنوسپرموکاری (تشکیل میوه بی دانه در اثر باروری) می باشد و استفاده از تکنیک نجات جنین تنها در صورتی امکان پذیر است که اولاً بی دانگی به دلیل پدیده استنوسپرموکاری باشد و ثانیاً از چگونگی و زمان سقط جنین آن ها

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 (Clingeffer, 1998). صنعت انگورهای رومیزی عمدتاً بر انگورهای بی دانه متکی بوده و به غیر از رقم انتخابی سلطانی (بی دانه سفید) بقیه ارقام مهم همگی جزو ارقام بی دانه اصلاح شده می باشند. اصلاح انگورهای موجود به منظور دستیابی به ارقام جدید انگور بی دانه با اهدافی از قبیل درشتی حبه ها، کیفیت بهتر رنگ و طعم و مقاومت به شرایط نامساعد محیطی صورت می گیرد (Clingeffer, 1998; Clingeffer, 1995). موفقیت اصلاح انگورهای تازه خوری برای دستیابی به ارقام جدید بی دانه با کمک روش های کلاسیک اصلاح که از طریق دورگ گیری بین والد پدری بی دانه با والد مادری دانه دار صورت می گیرد، ۱۵ - ۱۰ درصد می باشد (Singh and Brar, 1992; Lavee and Nir, 1985; Spiegel-Roy and Weinberger, 1979; Cain *et al.*, 1983; Loomis and *et al.*, 1985). تلافی ارقام بی دانه با یکدیگر به

برای نفوذ بهتر محلول تثبیت کننده به درون بافت های مختلف، نمونه ها به مدت ۲ ساعت تحت شرایط خلاء قرار گرفتند. تخمک ها و شبه بذرها از گل و حبه بیرون آورده شده و سپس ابعاد آن ها با بینوکولر مجهز به عدسی مدرج اندازه گیری شد. سپس نمونه ها ابتدا در سری الک های اتانول، پروپانول و بوتانول، در هر کدام به مدت ۲ ساعت جهت آبگیری قرار گرفتند. در مرحله بعد نمونه ها به مدت ۲ ساعت در ترکیبی از بوتانول و GMA (۹۳ میلی لیتر ۲- هیدروکسی اتیل متاکریلات، ۷ میلی لیتر پلی اتیلن گلایکول ۴۰۰ و ۶/۰ گرم بنزیل پروکساید) جهت نفوذ GMA به درون بافت های تخمک قرار داده شدند. سپس نمونه ها به مدت 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 کپسول ها به مدت ۲ روز در داخل آون با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و پس از سخت شدن با استفاده از میکروتوم برش هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. برش های تهیه شده به کمک اسید پرئودیک، معرف شیف و تولوئیدین بلو رنگ آمیزی شدند (Feder and O'Brien, 1968). نمونه های رنگ آمیزی شده توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به تعداد زیاد نمونه ها و نیاز به زمان قابل توجه برای برش تک تک تخمک ها و شبه بذرها و همچنین با توجه به شباهت دو رقم بی دانه سفید و بی دانه قرمز، در برخی زمان های نمونه برداری، تنها یکی از این

اطلاعات کافی در دست باشد تا بتوان قبل از شروع تخریب در بافت های تخمک حاوی سلول تخم و یا بیش از جنین نسبت به خارج کردن آن از درون حبه و کشت آن در محیط های 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 آن ها به خصوص در تحقیقات به نژادی انجام گرفت.

مواد و روش ها

این تحقیق در سال ۱۳۷۷ در مرکز تحقیقات و آزمایشگاه های گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران انجام شد. در ابتدا از هر کدام از ارقام بی دانه سفید بی دانه قرمز، عسکری، یاقوتی و کشمش سبز، سه بوته یکنواخت و همسن (۲۰ ساله) انتخاب شد. در روی هر بوته، سه خوشه در قسمت های مختلف آن قبل از شکوفائی گل ها انتخاب و علامت گذاری شدند. برای همسن نمودن گل ها، خوشه ها به طور روزانه مورد بازدید قرار می گرفتند. در اولین روز شکوفائی، کلیه گل های باز شده حذف گردیدند. در روز دوم کلیه گل های باز شده حفظ و همه گل های باز نشده حذف گردیدند و به این ترتیب تنها گل هایی مورد نمونه برداری های بعدی قرار گرفتند که در روز دوم شکوفائی گل آذین، باز شده بودند. سپس در زمان های ۲، ۲۱، ۳۵ و ۴۵ روز پس از شکوفائی از خوشه های شماره ۲، ۳ و ۴ در هر خوشه نمونه برداری از گل و حبه انجام شد. نمونه ها در محلول FPA 50 (اتانول ۵۰ درصد، فرمالین و پروپیونیک اسید به نسبت ۵:۵:۹۰) تثبیت شدند.

۲/۳۳ درصد کل شبه بذرها را تشکیل می‌دادند، همه آن‌ها دارای کیسه جنینی کامل بوده و استعداد باروری داشتند. با این حال تنها ۱/۲۵ درصد آن‌ها بارور شده (شکل ۶) و بقیه ۳/۸ موفق به باروری نشده بودند. شبه بذره‌های بارور شده رقم یاقوتی در زمان ۲ روز پس از شکوفایی دارای اندوسپرم ۳ - ۱ هسته‌ای (۵/۱۲٪) و یا ۶ - ۴ هسته‌ای (۶/۱۲٪) بودند. درصد قابل توجهی از شبه بذره‌های کوچکتر (۱ - ۴/۰ 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 - ۴/۰ میلی متر قرار داشتند. تعداد شبه بذره‌های بدون کیسه جنینی و یا دارای کیسه جنینی ناقص در این رقم بیش از رقم بی دانه قرمز بوده و تنها ۸/۴۱ درصد شبه بذرها دارای کیسه جنینی کامل بودند که از این میزان تنها ۵/۸ درصد بارور شده و اندوسپرم آن‌ها تا مرحله ۳ - ۱ هسته‌ای پیش رفته بود.

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

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 کشمش سبز در زمان ۲ روز پس از شکوفایی 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 - ۴/۰ میلی متر بودند. از تعداد کل شبه بذر مورد بررسی در این رقم ۶/۸۰ درصد آن‌ها دارای کیسه جنینی کامل بوده و استعداد باروری داشتند، با این حال تنها ۳/۶۱ درصد آن‌ها بارور شده (شکل ۱) و بقیه بارور نشده بودند (شکل ۲). سایر شبه بذرها (۹/۱۲٪) 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 بذره‌های بارور شده مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج به دست آمده نشان داد که ۷/۳۸ درصد شبه بذرها دارای اندوسپرم حاوی ۳ - ۱ هسته آزاد (شکل ۵) و ۶/۲۲ درصد دیگر دارای اندوسپرم ۶ - ۴ هسته‌ای آزاد بودند. در همین زمان شبه بذره‌های رقم یاقوتی از نظر طولی رشد بیشتری داشته و در گروه ۱ - ۴/۰ میلی متر و ۲ - ۱ میلی متر قرار گرفتند. شبه بذره‌های بزرگتر (۲ - ۱ میلی متر) که



شکل ۱ - برش طولی شبه بندر 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



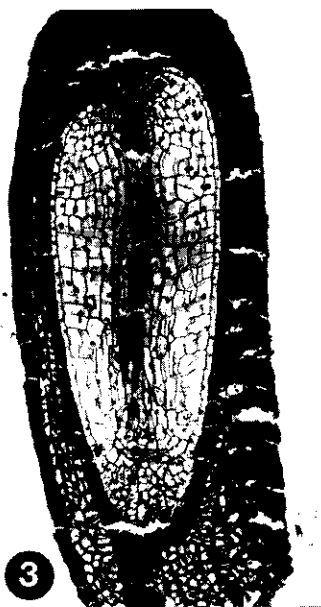
شکل ۲ - برش طولی تخمک بارور نشده رقم بی دانه قرمز دو روز پس از شکوفایی گل

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

flower opening

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

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



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

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) 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 ۶ - ۴ میلی‌متر قرار گرفتند. البته در این زمان نیز تعدادی از شبه بذرها همچنان کوچک مانده بودند. در ارقام مورد بررسی درصد قابل توجهی از شبه بذرها با طول ۲ - ۴ میلی‌متر بدون کیسه جنینی بوده و بافت خورش در آن‌ها در حال تخریب بود (شکل ۶). 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

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 بذرها باقی مانده در درون حبه توان تولید حبه‌های نسبتاً درشت را داشتند که از نظر مطالعات اصلاحی حائز اهمیت بود. این نتایج با نتایج لدبتر و رامینگ (Ledbetter and Ramming, 1989) و 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) 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 ۶ - ۴ هسته اندوسپرمی که نشان دهنده تقسیمات بیشتر هسته اندوسپرم می‌باشد، تنها در تعداد کمی از شبه بذرها ارقام بی دانه قرمز، یاقوتی و کشمشی سبز مشاهده شد. رقم یاقوتی در این مرحله از نظر تعداد شبه بذرها دارای ۶-۴

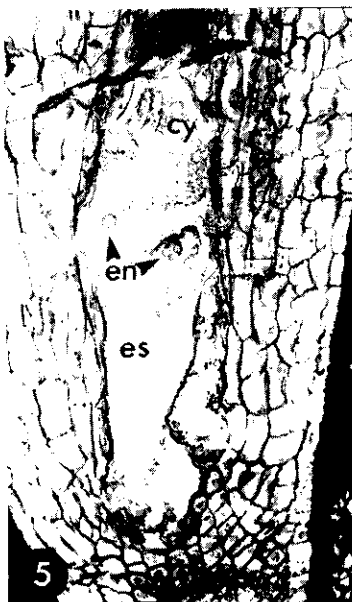
جدول ۱ - وضعیت درونی شبه بذرهاى چهار رقم انگور بى دانه ۲ روز پس از شکوفایى گل‌ها*

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

| Cultivars | رقم | طول شبه بذر | شبه بذر شبه بذر | شبه بذر بدون کیمه جنینی | شبه بذر با کیمه جنینی ناقص | شبه بذر با کیمه جنینی کامل | شبه بذر سالم بارور نشده | شبه بذر سالم بارور شده | شبه بذر | |
|----------------|--------------|--------------------------|--------------------|--------------------------------------|--|--|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| | | | | | | | | | دارای اندوسپرم | دارای اندوسپرم of |
| | | Length of seed traces | Seed sac | Seed traces without embryo sac | Seed traces with abnormal embryo sac | Seed traces with normal embryo sac | Unfertilized normal seed traces | Fertilized normal seed traces | with endosperm of 1-3 هسته | with endosperm of 4-6 nuclei |
| | | (mm) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) |
| Red seedless | بی دانه قرمز | 0.4-1 | 100 | 12.9 | 6.5 | 80.6 | 19.3 | 61.3 | 38.7 | 22.6 |
| | | 1-2 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 0/4-1 | 66.6 | 20.8 | 16.6 | 29.2 | 8.4 | 20.4 | 8.3 | 12.5 |
| Yaghoobi | یاغوبی | 1-2 | 33.4 | - | - | 33.4 | 8.3 | 25.1 | 12.5 | 12.6 |
| | | 0.4-1 | 100.0 | 27.7 | 30.5 | 41.8 | 33.3 | 8.5 | 8.5 | - |
| Askary | عسکری | 1-2 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 0.4-1 | 85.7 | 11.4 | 5.8 | 68.5 | 17.1 | 51.4 | 28.6 | 22.8 |
| Green Kashmiri | گنمشى سبز | 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 می باشد.



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)



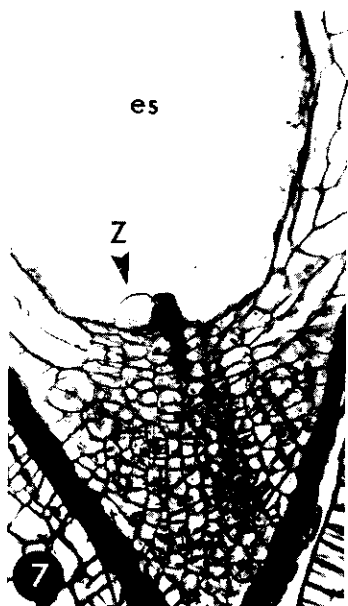
شکل ۶ - برش طولی تخمک بارور نشده رقم عسکری ۲۱ روز پس از شکوفایی گل

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, degenerated nucellus (n) and integuments (in) can be realized



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 degenerating zygote can be realized

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 کشمش 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 بذرها 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 دیر هنگام جنین باعث افزایش اندازه شبه بذرها شده است. شبه بذرها در رقم عسکری وضعیتی بین دو رقم بی دانه قرمز و

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 بذرها درشت‌تر در هر سه رقم بی دانه قرمز، عسکری و کشمش 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 کشمش 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 مهم 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

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 می آورد 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) و ننگ و همکاران (Wang et al., 1993)، آگورو و همکاران (Agucro et al., 1995) و پامرو 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 بذرها رقم بی دانه سفید و ۳۳/۳ درصد از شبه بذرها رقم عسکری دارای پیش جنین زنده بودند و در رقم بی دانه سفید همراه پیش جنین‌های زنده اثری از اندوسپرم دیده نمی شد (شکل ۱۲) و اندوسپرم آن‌ها قبلاً از بین رفته بود. در رقم عسکری از مجموع ۳۳/۳ درصد شبه بذرها 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 نمی شد (شکل ۱۳) و تنها کیسه‌های جنینی خالی و دارای زایگوت مرده مشاهده می شدند. بنابراین در این مرحله در بیشتر شبه بذرها مورد بررسی

کشمشی سبز داشتند، به نحوی که تعداد بیشتری از شبه بذرها به خصوص شبه بذرها 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 می شود بنابراین بزرگتر بودن اندازه حبه در ارقام کشمشی سبز و عسکری می تواند 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 بذرها در کوچک (۲ - ۴/۰ میلی متر) دارای بافت خورش فاسد شده بوده و شبه بذرها 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 دللی 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 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

جدول ۳ - وضعیت درونی شبه بذرهای سه رقم انگوری دانه 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 | شبه بذر | Seed traces | with degenerated traces | Seed traces with no embryo sac | having no endosperm | with celluarised endosperm | Seed traces with degenerated zygote | Seed traces with normal embryo | شبه بذر دارای | شبه بذر دارای | شبه بذر دارای | شبه بذر دارای |
|--------------------------------|--------|-------------|---------|-------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------|----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | | | | | | | | | | کیمه جنینی | اندوسپرم | سلولی شده | زاینده |
| Yaghooti | بانونی | 0.4-2 | 33.3 | 33.3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 2-4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 4-6 | 66.7 | - | - | 58.3 | 8.4 | 66.7 | - | - | - | - | - | - |
| | | 0.4-2 | 13.8 | 13.8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| White seedless بی دانه سفید | | 2-4 | 80.5 | - | 72.2 | 8.3 | - | 8.3 | - | - | - | - | - | - |
| | | 4-6 | 5.7 | - | - | - | 5.7 | - | - | - | - | - | - | 5.7 |
| | | 0.4-2 | 41.7 | 41.7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 2-4 | 4.2 | - | - | - | - | - | 4.2 | - | - | - | - | - |
| Green Keshmeshi کنمشی سبز | | 4-6 | - | - | - | - | - | - | 41.6 | - | - | - | - | - |
| | | 0.4-2 | 41.7 | 41.7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 2-4 | 4.2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 4-6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 6-8 | - | - | - | - | - | - | 12.5 | - | - | - | - | 12.5 | |

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

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

جدول ۴ - وضعیت درونی شبه بذرهایی سه رقم انگور سی دانه ۴۵ روز پس از شکوفایی گل‌ها*

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

| Cultivar | رغم | طول شبه بذر | شبه بذر Seed traces | شبه بذر با بافت خوردن تخریب شده Seed traces with degenerated nucellus | شبه بذر بدون کیمه جنینی Seed traces with no embryo sac | شبه بذر دارای کیمه جنینی بدون اندوسپرم Seed traces having no endosperm | شبه بذر دارای اندوسپرم خسته‌ای در حال فساد Seed trace free nuclear endosperm | شبه بذر دارای اندوسپرم سلولی شده Seed traces celluarised with degenerated zygote | شبه بذر دارای زایگوت برده Seed traces with normal pro-embryo | شبه بذر دارای پیش جنین زنده Seed traces |
|--------------------------------|-------|----------------|------------------------|---|--|---|---|--|---|--|
| | | | | | | | | | | |
| White seedless بی دانه 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 بی دانه 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 مسکری | 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.

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



شکل ۹ - برش طولی شبه بذر رقم کشمش‌سبز 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 seedlecs 35 days after flower opening

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

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



شکل ۱۱ - برش طولی شبه بذر رقم کشمش‌سبز 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



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 seedless 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

(۱۲/۵٪) همچنان در این مرحله دارای پیش جنین زنده بودند. رقم عسکری نیز وضعیتی مشابه رقم کشمش 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

زایگوت، پیش جنین و اندوسپرم از بین رفته بودند و تنها در تعداد کمی از شبه بذرها ارقام بی دانه سفید و عسکری پیش جنین زنده قابل مشاهده بود. با توجه 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 بذرها رقم بی دانه سفید (۵/۷٪) و کشمش سبز

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.

افزایش می‌یابد. با توجه 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

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.
- Clingeffer, P.R. 1996. Overseas varieties and breeding programs-A summary from a table grape perspective. 4th Australian Table Grape Industry Technical Conference. October. Robinvale, Victoria. pp 47-52.
- Clingeffer, P.R. 1998. Breeding table grape and raisin varieties. Proceedings 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.

- 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 grapes. 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 seedless grape. Journal of Japanese Society for Horticultural Sciences 62: 1-7.