Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 50, No 4, Winter 2020 (935-945)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.263376.1495

علوم باغبانی ایران
دورۀ ۵۰، شمارۀ ۴، زمستان ۱۳۹۸ (ص ۹۴۵-۹۳۵)

بهینه‌سازی باززایی گیاهان حاصل از جنین‌زایی سوماتیکی در شش رقم انگور (*Vitis vinifera* L.)

راضیه رستمی[۱] و احمد ارشادی[۲*]
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۱۸)

چکیده

هدف از این پژوهش افزایش راندمان باززایی در برخی رقم‌های انگور تجاری بود. به این منظور از کالوس جنین‌زای حاصل از بساک نابالغ شش رقم انگور شامل بیدانه سفید، بیدانه قرمز، فخری، عسکری، یاقوتی و تامسون سیدلس استفاده شد. کالوس جنین‌زا در محیط کشت MS بدون هورمون کشت شد و بالاترین تعداد جنین سوماتیکی در رقم بیدانه سفید مشاهده شد. سپس جنین‌های سوماتیکی در محیط کشت MS تحت دو ترکیب هورمونی ۰/۵ میکرومولار بنزیل آمینو پورین (BAP) و ۰/۱ میکرومولار نفتالین استیک اسید (NAA) + ۲/۵ میکرومولار بنزیل آمینو پورین (BAP) برای جوانه‌زنی قرار گرفتند. در طول جوانه‌زنی در هر دو محیط کشت، گیاهان با رشد غیرطبیعی رأس شاخه و ریشه مشاهده شدند؛ همچنین در محیط کشت حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP گیاهان با ریشه طویل و رأس شاخه غیرطبیعی مشاهده شد. درصد جنین‌های طبیعی در دو محیط جوانه‌زنی وابسته به نوع رقم بود، به طوری که درصد جوانه‌زنی طبیعی در رقم عسکری تفاوت معنی‌داری در دو محیط کشت نداشت، ولی در سایر رقم‌ها این درصد در محیط کشت حاوی ۰/۵ میکرومولار BAP بالاتر بود. بعد از چهار هفته گیاهان به دو محیط کشت باززایی MS و WPM که هر دو حاوی ۰/۵ میکرومولار BAP بودند، انتقال یافتند. درصد باززایی روی محیط WPM (۷٦/۸۷ درصد) نسبت به محیط MS (۵۹/۲۷ درصد) بالاتر بود. در بین رقم‌های مورد بررسی، بالاترین درصد باززایی در رقم‌های عسکری (۹٤/٤ درصد)، بیدانه سفید (۸۳/۸۵ درصد) و تامسون سیدلس (۸۰/٦٦ درصد) به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: بساک، جوانه‌زنی، کالوس جنین‌زا، گیاهان نرمال، محیط WPM.

Optimizing plant regeneration through somatic embryogenesis in six grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars

Raziyeh Rostami[1] and Ahmad Ershadi[2*]
1, 2. Ph.D. Candidate and Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran
(Received: Aug. 6, 2018 - Accepted: Nov. 9, 2018)

ABSTRACT

The purpose of the study was to improve plant regeneration efficiency in some commercial grapevine cultivars. To achieve this goal, embryogenic callus from immature anthers of six grapevine cultivars: ‘Bidaneh Sefid’, ‘Bidaneh Ghermez’, ‘Fakhri’, ‘Askari’, ‘Yaghuti’ and ‘Thompson Seedless’ were used. Embryogenic calli were cultured in plant growth regulator-free MS medium and the highest number of somatic embryos was observed in Bidaneh Sefid cultivar. Then, somatic embryos were transferred to two germination media: 1. MS medium containing 0.5 µM BAP and 2. MS medium containing 0.1 µM NAA plus 2.5 µM BAP. Plants with abnormal shoot and root apex were observed during germination; embryos with long root and abnormal shoot apex were also observed on medium containing 0.1 µM NAA plus 2.5 µM BA. There was no significant difference between the percentages of normal germination in ‘Askari’ on both media; however, higher normal germination was found on medium containing 0.5 µM BAP in other cultivars. After four weeks, plants were transferred to the MS and WPM media, both were supplemented with 0.5 µM BAP. Plants were transferred to regeneration media after four weeks. The regeneration percentage on WPM medium (76.87%) was higher than on MS medium (59.27%). Maximum percentage of regeneration was obtained from Askari (94.40%), Bidaneh Sefid (83.85%), Thomson Seedless (80.66%) and Bidaneh Ghermez (76%) on WPM.

Keywords: Anther**,** embryogenic callus, germination, normal plants, WPM medium.

* Corresponding author E-mail: Ershadi@basu.ac.ir

مقدمه

اصلی‌ترین روش باززایی در انگور، استفاده از کالوس جنین‌زای حاصل از سلول‌های سوماتیکی است. جنین‌زایی سوماتیکی به‌عنوان یک روش باززایی کارآمد برای انتقال ژن و یک سیستم مدل درون شیشه‌ای عالی برای بررسی مکانیسم‌های تنظیم‌کننده بیان ژن‌های مربوط به توسعه جنینی است (Bharathy & Agrawal, 2008). جنین سوماتیکی علاوه بر مهندسی ژنتیک، دارای کاربردهای دیگری ازجمله ویروس‌زدایی (Gambino *et al*., 2006)، جداسازی موتانت‌های درون شیشه‌ای (Franks *et al*., 2002)، ذخیره‌سازی ژرم پلاست (Wang *et al*., 2002) و تولید بذر مصنوعی (Das *et al*., 2006) است. اگرچه از بافت‌های مختلف برای تولید کالوس جنین‌زا استفاده شده است (Gambino *et al*., 2007; Jamal Mahmouh *et al*., 2015; Maillot *et al*., 2006)، اما متداول‌ترین بافت مورد استفاده بساک است (Vidal *et al*., 2009; Perrin *et al*., 2004).

موفقیت در جنین‌زایی سوماتیکی بسیار وابسته به ژنوتیپ است (Maillot *et al*., 2006; Perrin *et al*., 2004)، ولی در کنار ژنوتیپ، نوع ریزنمونه (Gambino *et al*., 2007)، مرحله توسعه ریزنمونه (Gribaudo *et al*., 2004; Jamal Mahmoud *et al*., 2015)، نوع محیط کشت (Perrin *et al*., 2001) و تنظیم‌کننده‌های رشد (Ebadi *et al*., 2012b) بر جنین‌زایی سوماتیکی تأثیرگذار هستند. به‌عنوان یک تکنیک، جنین‌زایی سوماتیکی در انگور هنوز چندان متداول نشده است و اغلب دارای مشکلاتی از جمله راندمان پایین القای کالوس جنین‌زا، توانایی جنین‌زایی پایین و در نهایت درصد پایین جوانه‌زنی و تبدیل به گیاه است (Bharathy & Agrawal, 2008). با وجود پژوهش‌های زیاد روی جنین‌زایی سوماتیکی در انگور، جوانه‌زنی جنین سوماتیکی و تولید گیاه از آن که مراحل مهمی در فرایندهای باززایی هستند، به ندرت مورد بررسی قرار گرفته است (Ji *et al*., 2017). نرخ تبدیل گیاهان که شامل فرآیندهای باززایی گیاه از جنین سوماتیکی از جمله توسعه ریشه‌های اولیه، تشکیل لپه، شکل‌گیری و سبز شدن هیپوکوتیل و شکل‌گیری انتهای شاخساره با یک یا دو سرآغازه برگی از جنین‌های سوماتیکی می‌باشد، هنوز پایین است (Perrin *et al*., 2001). این موضوع به ویژه هنگامی‌که کالوس جنین‌زا برای انتقال ژن استفاده می‌شود، دارای اهمیت بیشتری است چرا که کارآمدی تولید گیاه تراریخت به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. بنابراین معرفی روش کارآمد که منجر به شکل‌گیری گیاهان طبیعی از نمونه‌های جنین می‌شود، همچنین بهبود روش‌های موجود اهمیت زیادی دارد. مطالعات اخیر نشان داده که مشخص کردن ترکیبات محیط کشت که با نیازهای سلولی در هر مرحله توسعه منطبق شده است، موجب افزایش کارآمدی جنین‌زایی، کاهش گیاهان غیرطبیعی و افزایش باززایی گیاهان می‌شود (Perrin *et al*., 2004).

متداول‌ترین محیط‌های کشت مورد استفاده برای جنین‌زایی سوماتیکی در انگور شامل MS (Murashige & Skoog, 1962) و NN (Nitsch & Nitsch, 1969) بوده (Perrin *et al*., 2004; Xu *et al*., 2014) و محیط کشت WPM (Lloyd & McCown, 1980) کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. برای مراحل جوانه‌زنی و باززایی گیاه در انگور از محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشد (Ji *et al*., 2017) و یا حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد از جمله BAP، BA و NAA استفاده شده‌است (Dai *et al*., 2015; Motoike *et al*., 2001)، که البته واکنش رقم‌ها بسیار متفاوت بوده و بررسی محیط کشت مناسب برای هر رقم به‌منظور بهینه‌سازی باززایی و افزایش راندمان باززایی گیاهان ضروری است (López-Pérez *et al*., 2005).

هدف از این پژوهش بهبود روش باززایی گیاه با افزایش درصد گیاهان طبیعی در شش رقم انگور بیدانه سفید، بیدانه قرمز، عسکری، یاقوتی، تامسون سیدلس و فخری بود. به این منظور از هورمون‌های مختلف در محیط جوانه‌زنی و همچنین دو محیط کشت WPM و MS به‌منظور افزایش باززایی گیاه و کاهش گیاهان غیرطبیعی استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی محیط کشت و القای کالوس جنین‌زا

این پژوهش در گروه علوم باغبانی دانشگاه بوعلی سینا طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۴ و روی شش رقم انگور

بیدانه سفید، بیدانه قرمز، فخری، عسکری، یاقوتی و تامسون سیدلس انجام شد. برای القای کالوس جنین‌زا از بساک‌های نابالغ استفاده شد و ریزنمونه‌ها از بوته‌های انگور پنج ساله از ایستگاه تحقیقات انگور ملایر در هر دو سال ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ در اردیبهشت تهیه شد. خوشه‌های گل تقریباً ۱۴-۱۰ روز قبل از گلدهی هنگامی که رنگ آن‌ها سبز مایل به زرد بود، طبق روش توصیف شده توسط Gribaudo *et al.* (2004) در مراحل III تا IV انتخاب و بعد از جمع‌آوری به مدت ۵ تا ۷ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سپس خوشه‌های گل ابتدا با آب و چند قطره مایع ظرف‌شویی شسته شده و به مدت ۴۵ دقیقه در آب جاری قرار گرفتند. در مرحله بعد نمونه‌ها به مدت دو دقیقه در الکل ۷۰ درصد و پس از آن به مدت ده دقیقه در هیپوکلرید سدیم (۱/۵ درصد کلر فعال) حاوی چند قطره مایع ظرف‌شویی ضدعفونی شده و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل شست‌وشو شدند.

برای القای کالوس جنین‌زا، بساک‌های نابالغ در محیط کشت MS حاوی ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار و غلظت‌های مناسب 2,4-D و BAP که برای هر رقم طی یک پیش‌آزمایش تعیین‌شده بود، کشت شدند. رقم‌های عسکری و فخری در محیط کشت حاوی ۱۰ میکرومولار 2,4-D و ۱ میکرومولار BAP، رقم‌های بیدانه سفید، بیدانه قرمز و تامسون سیدلس در محیط حاوی ۲/۵ میکرومولار 2,4-D و ۴ میکرومولار BAP و رقم یاقوتی در محیط حاوی ۲/۵ میکرو مولار 2,4-D و ۴ میکرومولار BAP کشت شدند. هر پتری دیش حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت بود و تعداد ۳۰ بساک در هر پتری دیش کشت شد. هر چهار هفته یک‌بار پس از حذف کالوس‌های غیر جنین‌زا، کالوس‌های جنین‌زا واکشت شده و بعد از گذشت شش ماه به محیط کشت تمایز انتقال یافتند.

پی‌اچ تمامی محیط‌های کشت مورد استفاده در این آزمایش با استفاده از سدیم هیدروکسید یک نرمال و قبل از افزودن آگار روی ۵/۸ تنظیم شد و محیط‌های کشت به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو (۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر) شدند. دور پتری‌ها و شیشه‌ها با پارافیلم پوشانده و در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. در مراحل القای کالوس جنین‌زا و بلوغ جنین، پتری‌دیش‌ها در تاریکی مطلق و در مراحل جوانه‌زنی و باززایی گیاه، شیشه‌ها در ۱۶ ساعت روشنایی (۴۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه) و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد نگه‌داری شدند.

بلوغ جنین

کالوس‌های جنین‌زا و جنین‌های سوماتیکی در مرحله کروی در محیط کشت مناسب برای بلوغ جنین واکشت شدند. در این مرحله از محیط کشت MS بدون هورمون به همراه ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار، ۰/۰۵ درصد کازئین هیدرولیزات و ۰/۲۵ درصد زغال فعال استفاده گردید. تعداد جنین‌های سوماتیکی بعد از دو بار واکشت کالوس‌ها در این محیط کشت شمارش شد.

جوانه‌زنی جنین، باززایی گیاهان و سازگاری

برای به‌دست‌آوردن بهترین محیط کشت جوانه‌زنی، جنین‌های سوماتیکی در مرحله اولیه تشکیل لپه‌ها از کالوس جدا و به محیط کشت جوانه‌زنی منتقل شدند. جوانه‌زنی در محیط کشت MS با دو ترکیب هورمونی مختلف: ۱-۰/۵ میکرومولار BAP و ۲-۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP انجام شد. گیاهان جوانه‌زده با ریشه اولیه، لپه و هیپوکوتیل سبزرنگ و آغازنده برگی در نوک شاخه‌ها، به محیط‌های کشت باززایی MS و WPM حاوی ۰/۵ میکرومولار BAP منتقل شدند. جنین‌های سوماتیکی در شیشه‌های ۲۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت شدند. تمامی محیط‌های کشت جوانه‌زنی و باززایی گیاه حاوی ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار و ۰/۲۵ درصد زغال فعال بود.

بعد از توسعه ریشه‌ها و مشاهده حداقل ۴ تا ۶ برگ حقیقی، گیاهان تولید شده از شیشه‌ها خارج و در گلدان‌های پلاستیکی حاوی کوکوپیت و پرلایت (به نسبت ۱:۱) استریل شده کشت شدند. گلدان‌ها ابتدا در شرایط رطوبت نسبی ۹۵ درصد و نور مصنوعی به

مدت ۴ هفته نگه‌داری گردید. پس از آن به‌تدریج سازگار شده و در نهایت پس از دو ماه به گلدان‌های حاوی ترکیب خاک زراعی، ماسه و کود دامی پوسیده به نسبت ۱:۱:۱ منتقل و در گلخانه نگه‌داری شدند.

تجزیه آماری

در مرحله بلوغ، آزمایش به‌صورت کاملاً تصادفی با سه تکرار و هر تکرار حاوی دو پتری‌دیش انجام و در انتها کالوس‌های جنین‌زا به قطعات با وزن ۰/۱ گرم تقسیم شده و تعداد جنین‌های بالغ در هر قطعه شمارش شد. در مرحله جوانه‌زنی، آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۶×۲ انجام شد که فاکتور اول شامل شش رقم و فاکتور دوم دو ترکیب هورمونی مختلف (۱-۰/۵ میکرومولار BAP و ۲-۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP)، با سه تکرار و هر تکرار شامل دو شیشه مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله باززایی گیاه نیز آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۶×۲ بود که فاکتور اول شامل شش رقم و فاکتور دوم دو محیط کشت MS و WPM، با سه تکرار و هر تکرار شامل دو شیشه بود. نتایج مراحل جوانه‌زنی و باززایی به‌صورت درصد بیان شد. آزمون نرمالیتی بر روی تمامی داده‌ها صورت گرفت و پس از آن تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 با کمک رویه GLM و مقایسه میانگین‌ها با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

بلوغ جنین

بعد از گذشت شش ماه از کشت بساک نابالغ، نمونه‌های فاقد رشد و کالوس‌های غیر جنین‌زا حذف و کالوس جنین‌زا در محیط تمایز کشت شد. طی چهار هفته کشت در محیط تمایز، جنین‌های سوماتیکی در مراحل مختلف کروی، قلبی، اژدری و مراحل اولیه تشکیل لپه مشاهده شده (شکل A-۲) و سپس به محیط کشت جوانه‌زنی انتقال یافتند. تعداد جنین‌های سوماتیکی در مراحل اولیه تشکیل لپه در ۰/۱ گرم کالوس جنین‌زای کشت شده در محیط تمایز در شش رقم مورد بررسی، اندازه‌گیری شد. رقم‌ها از نظر تعداد جنین سوماتیکی تولید شده در مرحله تشکیل لپه با هم نفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد داشتند. تعداد جنین‌های تمایز یافته در رقم‌های مختلف بسیار متفاوت بود، به طوری‌که بیشترین تعداد جنین در مرحله بلوغ در رقم بیدانه سفید (۱۹۲) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با تامسون سیدلس (۱۷۰) و بیدانه قرمز (۱۵۹) نداشت. کمترین تعداد جنین سوماتیکی در رقم فخری (۹۴/۳۳) مشاهده شد که البته تفاوت معنی‌داری با رقم‌های یاقوتی (۹۶) و عسکری (۱۰۸) نداشت (جدول ۱). یکی از عوامل اصلی مؤثر در توانایی جنین‌زایی سوماتیکی ژنوتیپ است (Olah *et al*., 2009). در پژوهشی که توسط Ebadi *et al*. (2012a) صورت گرفت، بالاترین میزان تمایز جنین‌های حاصل از کشت پرچم در رقم بیدانه سفید مشاهده شد. در پژوهش حاضر تعداد جنین‌های تولید شده بسیار وابسته به نوع ژنوتیپ بود، برای مثال تعداد جنین‌های تولیدشده در رقم بیدانه سفید تقریباً دو برابر رقم فخری بود (جدول۱). چندین گزارش مبنی بر استفاده از محیط‌های کشت مختلف برای تمایز جنین وجود دارد، اما در اغلب گزارش‌ها محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد استفاده شده است (Morgana *et al*., 2004; Zhou *et al*., 2014).

جدول ۱. تعداد جنین‌های سوماتیکی در مرحله تشکیل لپه از ۰/۱ گرم کالوس جنین زا روی محیط بلوغ جنین در شش رقم انگور تجاری

Table 1. The number of somatic embryos at cotyledonary stage obtained from 0.1 g embryogenic callus cultured on embryo maturation medium in six commercial grape cultivars

Cultivar	Number of somatic embryos at cotyledonary stage
Bidaneh Sefid	192a
Bidaneh Ghermez	159.33a
Fakhri	94.33b
Askari	108b
Yaghuti	96.67b
Thompson Seedless	170.33a

میانگین‌هایی دارای حروف مشابه فاقد تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

Means followed by similar letters are not statistically different (P<0.05) according to Duncan's multiple range test.

استفاده از محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد، تمایز و بلوغ جنین‌های طبیعی که به‌خوبی توسعه یافته‌اند را تسهیل می‌کند (Prado *et al*., 2010). محیط کشت MS بدون هورمون، نه تنها یک محیط کشت

مناسب برای تمایز جنین سوماتیکی است، بلکه می‌توان برای تولید جنین ثانوی نیز از آن استفاده نمود (Ebadi *et al.*, 2012b). مرحله بلوغ جنین‌ها به علت اثر آن‌ها روی جوانه‌زنی و باززایی، یک مرحله محدودکننده برای استفاده از جنین سوماتیکی می‌باشد و از اهمیت بالایی برخوردار است، که در نهایت موجب افزایش راندمان تولید گیاه طبیعی می‌گردد (Motoike *et al.*, 2001).

جوانه‌زنی

جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی با توسعه لپه‌ها و ریشه‌های اولیه، شکل‌گیری کلروفیل و به دنبال آن طویل شدن هیپوکوتیل و تشکیل یک یا دو آغازنده برگی تشخیص داده می‌شود (Merkle & Wiecko, 1990). جوانه‌زنی طی ۴-۳ هفته پس از واکشت جنین‌های سوماتیکی روی محیط کشت MS به همراه ۰/۵ میکرومولار BAP و یا MS به‌همراه ۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP و تحت شرایط نور رخ داد. در طی پژوهش حاضر گیاهان غیرطبیعی در طی جوانه‌زنی مشاهده شد (شکل A-۱).

به‌طورکلی جوانه‌زنی غیرنرمال با عدم توسعه ریشه و عدم رشد نرمال اندام هوایی مشخص شد که عدم رشد اندام هوایی شامل: ۱- عدم تشکیل لپه، ۲- تشکیل یک یا بیشتر از دولپه و ۳- تشکیل برگ‌های بد شکل بود که توسعه بعدی این گیاهان را با اشکال مواجه کرد. همچنین در این پژوهش گیاهانی با رشد ریشه طویل و رشد غیرنرمال رأس شاخه در زمان استفاده از ۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BA مشاهده شد (شکل B-۱). پس از یک ماه از کشت در محیط جوانه‌زنی، درصد جنین‌های نرمال و جنین‌های غیرنرمال شامل: ۱- رشد غیرنرمال رأس شاخه و ریشه و ۲- دارای ریشه طویل و رشد غیرنرمال رأس شاخه بررسی شد.

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر محیط کشت، رقم و اثر متقابل آن‌ها بر درصد جنین‌های طبیعی، جنین‌های غیرطبیعی و درصد باززایی در شش رقم انگور تجاری[۱]

Table 2. Analysis of variance for the effect of medium culture, cultivar and interaction between medium culture and cultivar on percentage of normal embryos, percentage of abnormal embryos and percentage of regeneration in six commercial grape cultivars[1]

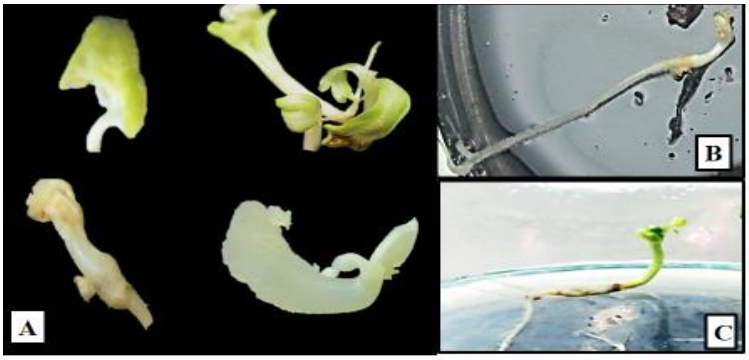
Variation Source	df	Mean square				
		Normal embryos	Total abnormal Embryos	Embryos with abnormal root and shoot apex	Embryos with long root and abnormal shoot apex	Regeneration
Medium	1	5080.6**	5080.60**	224.75*	3149.45**	2887.31**
Cultivar	5	2273.75**	2273.75**	1271.54**	250.74**	944.48**
Medium × Cultivar	5	176.82*	176.82*	220.45**	250.74**	31.672ns
Error	22	54.27	54.27	50.51	6.33	30.69
Coefficient of Variation (%)	-	14.32	15.17	18.14	26.90	8.13

۱. درصد جنین‌های غیرطبیعی از ۱۰۰ منهای درصد جنین‌های طبیعی به‌دست آمده است و لذا منابع تغییرات برای هر دو صفت دارای میانگین مربعات مشابه هستند.

*، ** و ns: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار.

1. Since percentage of total abnormal embryos = 100- percentage of normal embryos, so that mean squares were identical for variation sources of both traits.

*, **, ns: Significant at 5% and 1% of probability levels, and non-significant, respectively.



شکل ۱. (A) جوانه‌زنی غیرطبیعی (B) گیاهان با ریشه‌های طویل و رأس شاخه غیرطبیعی، (C) گیاه غیرطبیعی به‌دست‌آمده یک ماه پس از کشت در محیط کشت باززایی در شش رقم انگور تجاری.

Figure 1. (A) Abnormal germination, (B) plant with long roots and abnormal shoot apex, (C) abnormal plant obtained one month after cultivation in regeneration medium in six commercial grape cultivars.

اثر تنظیم‌کننده‌های رشد، رقم و همچنین اثر متقابل آن‌ها بر درصد جنین‌های طبیعی، جنین‌های با ریشه و رأس شاخه غیرطبیعی و جنین‌های با ریشه طویل و رأس شاخه غیرطبیعی در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). به‌طورکلی درصد جوانه‌زنی طبیعی در محیط کشت حاوی ۰/۵ میکرومولار BAP (۶۳/۳۲ درصد) بیش از محیط حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP (۳۹/۸۴ درصد) بود، ولی واکنش رقم‌ها به این دو محیط کشت با هم تفاوت داشت. در هر دو محیط کشت بالاترین درصد جوانه‌زنی مربوط به رقم عسکری بود که نوع محیط تأثیر معنی‌داری بر درصد گیاهان طبیعی در این رقم نداشت. بالاترین درصد جوانه‌زنی طبیعی پس از رقم عسکری مربوط به رقم‌های بیدانه سفید و تامسون سیدلس بود که البته هر دو رقم در محیط کشت حاوی ۰/۵ میکرومولار BAP درصد جوانه‌زنی طبیعی بالاتری داشته و در محیط کشت حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP دچار کاهش در درصد جوانه‌زنی شدند. در پژوهشی که توسط Dhekney *et al.* (2009) انجام شد درصد جوانه‌زنی در محیط کشت حاوی ۱ میکرومولار BAP بسیار وابسته به رقم بود و درصد جوانه‌زنی در رقم تامسون سیدلس ۷۳/۳ درصد مشاهده شد که در مقایسه با این پژوهش تقریباً مشابه درصد جوانه‌زنی طبیعی رقم تامسون سیدلس در محیط کشت ۰/۵ میکرومولار BAP (۷۲ درصد) بود. همچنین در پژوهش صورت گرفته توسط Zhou *et al.* (2014) روی رقم تامسون سیدلس، در محیط کشت با ۰/۲ میکرومولار BAP تقریباً ۳۵ درصد جوانه‌زنی غیرطبیعی مشاهد شد.

رقم‌های بیدانه قرمز و فخری در دو محیط کشت مورد بررسی، تفاوت معنی‌داری از نظر درصد گیاهان طبیعی با یکدیگر نداشتند، البته کاهش درصد جوانه‌زنی طبیعی در محیط کشت حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP نسبت به ۰/۵ میکرومولار BAP برای رقم بیدانه قرمز ۶۵ درصد و رقم فخری ۳۶ درصد بود. رقم یاقوتی در هر دو محیط کشت دارای کمترین درصد جوانه‌زنی طبیعی بود که البته در محیط کشت حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP تفاوت معنی‌داری با رقم‌های فخری و بیدانه قرمز نداشت (جدول ۳).

درصد جوانه‌زنی گیاهان غیرطبیعی در محیط کشت حاوی ۰/۵ میکرومولار BAP بسیار کمتر بود. گیاهان با رشد غیرطبیعی ریشه و رأس شاخه در هر دو محیط کشت مورد آزمایش مشاهده شد، ولی گیاهان با ریشه طویل و رشد غیرطبیعی رأس شاخه فقط در محیط کشت حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP مشاهده شد. به جز رقم‌های بیدانه قرمز و یاقوتی، درصد گیاهان با رشد غیرطبیعی ریشه و اندام هوایی بالاتر از گیاهان با ریشه طویل بود (جدول ۳).

برای بهبود جوانه‌زنی و افزایش گیاهان طبیعی، آزمایش‌های مختلفی انجام شده است. Perl *et al.* (1995) مشاهده کردند بعد از انتقال گیاهان به محیط کشت حاوی NAA، گیاهان غیرطبیعی به گیاهان طبیعی تبدیل شدند و علت این پدیده را بهبود سیستم ریشه و تولید سیتوکینین درونی که در نهایت منجر به تشکیل شاخه‌های با ساختار طبیعی شد، دانستند. در مقابل نتایج ما نشان داد کاربرد NAA حتی در سطوح پایین به همراه BAP موجب تولید ریشه‌های طویل شد، اما توسعه شاخه‌ها موفق نبود (جدول ۳).

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر ویژگی‌های جنین شش رقم انگور تجاری در محیط کشت جوانه‌زنی

Table 3. Mean comparison effect of growth regulators on embryo traits of six commercial grape cultivars in germination medium

Cultivars	Normal embryos (%)		Total abnormal embryos (%)		Embryos with abnormal root and shoot apex (%)		Embryos with long root and abnormal shoot apex (%)	
	0.1 µM NAA + 2.5 µM BA	0.5 µM BAP	0.1 µM NAA + 2.5 µM BA	0.5 µM BAP	0.1 µM NAA + 2.5 µM BA	0.5 µM BAP	0.1 µM NAA + 2.5 µM BA	0.5 µM BAP
Bidaneh Sefid	44.90^{d}	76.41^{ab}	55.10^{c}	23.59^{ef}	39.81^{cd}	23.59^{ef}	14.95^{c}	0^{e}
Bidaneh Ghermez	20.55^{f}	58.66^{c}	79.44^{a}	41.33^{d}	47.44^{bc}	41.33^{c}	32.00^{b}	0^{e}
Fakhri	30.34^{ef}	47.37^{cd}	69.65^{ab}	52.62^{cd}	55.33^{ab}	52.62^{abc}	14.32^{c}	0^{e}
Askari	78.43^{ab}	85.96^{a}	21.56^{ef}	14.04^{f}	16.53^{ef}	14.04^{f}	5.03^{d}	0^{e}
Yaghuti	17.98^{f}	39.52^{de}	82.01^{a}	60.48^{bc}	44.86^{bc}	60.48^{a}	37.15^{a}	0^{e}
Thompson Seedless	45.15^{d}	72.00^{b}	54.85^{c}	28.00^{e}	46.07^{bc}	28.00^{de}	8.78^{d}	0^{e}
Average	39.56B	63.32A	60.43A	36.67B	41.67A	36.67B	18.70A	0B

در هر صفت میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

For each traits, means followed by similar letters are not statistically different (P<0.05) according to Duncan's multiple range test.

Motoike *et al.* (2001) گزارش کردند که بسیاری از جنین‌های سوماتیکی دو رقم 'Niagara' و 'Fredonia' در محیط کشت دارای ۰/۴ میکرومولار BAP و ۰/۵ میکرومولار NAA تولید ریشه طبیعی نمودند، اما موفق به تولید گیاهان طبیعی نشدند. همچنین Faure *et al.* (1996) بیان داشتند که در برخی از جنین‌های جوانه زده عدم رشد مریستم در انتهای شاخه مشاهده شد. ویژگی‌های رقم، هورمون‌های داخلی، تنظیم‌کننده‌های رشد مورداستفاده و اثر متقابل آن‌ها ممکن است موجب توسعه گیاهان غیرطبیعی در محیط کشت جوانه‌زنی گردد (Jiménez & Bangerth, 2000).

بالاترین درصد گیاهان غیرطبیعی در رقم یاقوتی (۸۲ درصد) و در محیط کشت حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP مشاهده شد که ۴۶ درصد آن گیاهان با ریشه و رأس شاخه غیرطبیعی و ۳۷ درصد آن دارای ریشه طویل و رأس شاخه غیرطبیعی بودند. کمترین درصد جوانه‌زنی غیرطبیعی مربوط به رقم عسکری (۱۴ درصد) و در محیط کشت حاوی ۰/۵ میکرومولار BAP بود. رقم‌های بیدانه قرمز، فخری و عسکری درصد رشد غیرطبیعی رأس ریشه و شاخه در دو محیط کشت مورد استفاده تفاوت چندانی نداشتند. درصد رشد غیرطبیعی در رقم‌های تامسون سیدلس و بیدانه سفید در محیط کشت حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP نسبت به محیط کشت ۰/۵ میکرومولار BAP تقریباً ۴۰ درصد افزایش داشت. برخلاف این دو رقم، در رقم یاقوتی درصد این گیاهان در محیط کشت دارای ۰/۵ میکرومولار BAP، ۲۵ درصد بالاتر بود. بالاترین درصد گیاهان با ریشه طویل و رشد غیرطبیعی رأس شاخه در رقم‌های یاقوتی (۳۷ درصد) و بیدانه قرمز (۳۲ درصد) مشاهده شد که تقریباً دو برابر بیدانه سفید (۱۴ درصد) و چهار برابر رقم عسکری (۸/۷۸ درصد) بود. محیط کشت حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP بیشتر موجب افزایش درصد گیاهان با رأس ساقه غیرطبیعی شد که البته رقم‌ها واکنش‌های مختلفی داشتند. در رقم‌های تامسون سیدلس و یاقوتی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان با ریشه و رأس ساقه غیرطبیعی و گیاهان با ریشه طویل و رشد غیرطبیعی رأس شاخه وجود نداشت، ولی در رقم یاقوتی درصد گیاهان دارای ریشه طویل و رأس شاخه غیرطبیعی ۴ برابر بیشتر بود (جدول ۳). کارآمدی جوانه‌زنی یک فاکتور بسیار مهم است، چرا که منجر به باززایی موفق گیاهان می‌شود (Ji *et al.*, 2017).

در این پژوهش همه رقم‌ها در محیط کشت حاوی ۰/۵ میکرومولار BAP در مقایسه با محیط کشت حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP نتایج بهتری را نشان دادند. تحقیقات نقش تنظیم‌کننده‌های رشد را در توسعه جنین سوماتیکی تأیید می‌کنند (Dai *et al.*, 2015).

عدم رشد و نمو صحیح رأس شاخه در جنین‌های بالغ انگور موجب شکست در جوانه‌زنی و در نهایت کاهش باززایی می‌شود (Motoike *et al.*, 2001). نرخ بالای تبدیل جنین‌های سوماتیکی به گیاه، اغلب به ساختار رأس شاخساره وابسته است و جنین‌های با رشد غیرطبیعی در رأس ساقه توانایی توسعه به گیاهان طبیعی را ندارند (López-Pérez *et al.*, 2006).

باززایی گیاهان

بعد از چهار هفته گیاهان طبیعی و غیرطبیعی به محیط‌های کشت WPM و MS که هر دو حاوی ۰/۵ میکرومولار BAP بودند، منتقل شدند. برای یافتن بهترین محیط کشت باززایی، درصد گیاهان دارای حداقل ۴ تا ۶ برگ حقیقی بعد از چهار هفته بررسی گردید (شکل B-۲). اثر رقم و نوع محیط بر درصد باززایی در سطح یک درصد معنی‌دار شد، ولی اثر متقابل آن‌ها غیر معنی‌دار بود (جدول ۲). درصد باززایی گیاهان با توجه به رقم و محیط متفاوت بود و در مقایسه دو محیط کشت، به طورکلی درصد باززایی بالاتری در محیط کشت WPM (۷۶/۸۷) نسبت به محیط کشت MS (۵۹/۲۷) مشاهده گردید. در مقایسه رقم‌ها بالاترین درصد باززایی در رقم عسکری (۸۵/۲۶ درصد) و کمترین درصد باززایی در رقم فخری (۵۱/۳۳) مشاهده شد (جدول ۴). بعد از رقم عسکری بالاترین درصد باززایی مربوط به بیدانه سفید (۷۶/۰۳) بود (جدول ۴).

بالاترین درصد باززایی در محیط کشت WPM در رقم‌های عسکری (۹۴/۴ درصد)، بیدانه سفید (۸۳/۸۵ درصد) و تامسون سیدلس (۸۰/۶۶ درصد) مشاهده شد. در محیط کشت MS نیز رقم عسکری بالاترین درصد (۷۶/۱۱ درصد) تولید گیاه را داشت. کمترین درصد باززایی در رقم‌های یاقوتی (۴۷ درصد) و فخری (۴۶ درصد) و در محیط کشت MS مشاهده شد. اگرچه همه رقم‌ها در محیط کشت WPM درصد باززایی بیشتری نسبت به محیط کشت MS داشتند، ولی این افزایش برای همه رقم‌ها یکسان نبود و در رقم بیدانه قرمز به ۳۱ درصد رسید. افزایش باززایی گیاه در محیط کشت WPM نسبت به محیط کشت MS در رقم‌های بیدانه سفید ۱۹ درصد، عسکری ۱۸ درصد، یاقوتی ۲۹ درصد، فخری ۱۸ درصد و تامسون سیدلس ۲۱ درصد بود (جدول ۴). هر دو محیط کشت MS و WPM حاوی ۰/۵ میکرومولار هورمون BAP بودند، اما رقم‌ها پاسخ بهتری را در محیط کشت WPM نشان دادند؛ بنابراین تفاوت بین ترکیبات این دو محیط کشت منجر به توسعه بهتر رقم‌های مورد آزمایش در محیط کشت WPM گردید.

تفاوت قابل توجه بین محیط‌های کشت MS و WPM در منبع نیتروژن آن‌ها است. محتوای نیتروژن در محیط کشت MS بیشتر از محیط کشت WPM بود و از نیترات پتاسیم و نیترات آمونیوم تأمین می‌شود، درحالی‌که در محیط کشت WPM محتوای نیتروژن فقط از آمونیوم نیترات تأمین می‌شود (Lu, 2005).

منابع نیتروژن به شکل احیا شده به‌منظور توسعه پاسخ جنین‌زایی در انگور دارای اهمیت بالایی هستند. آمونیوم برای حفظ حیات سلولی و بهبود توسعه جنین‌زایی سوماتیکی و تبدیل بعدی گیاه ضروری است (Perrin *et al*., 2001).

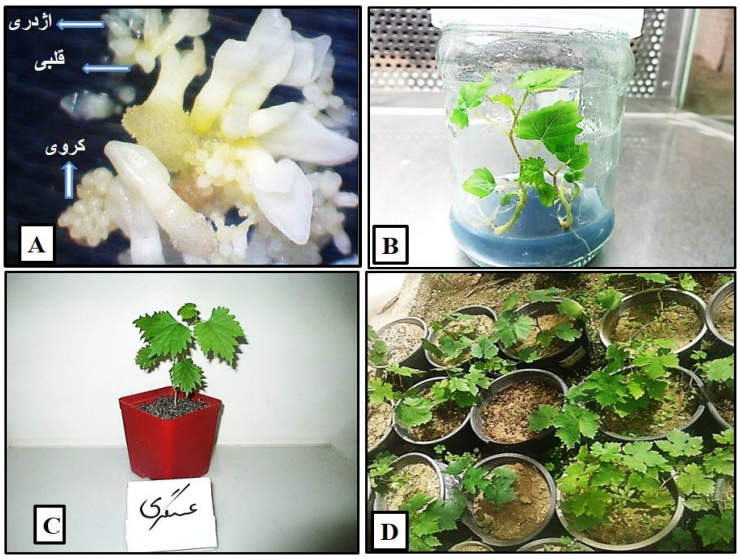
جدول ۴. مقایسه میانگین اثر محیط کشت بر درصد باززایی گیاهان در شش رقم انگور تجاری

Table 4. Mean comparison effect of culture medium on plant regeneration percentage in six commercial grape cultivars

Cultivars	Regeneration medium		Average
	MS	WPM	
Bidaneh Sefid	68.22^{cd}	83.85^{b}	76.03^{b}
Bidaneh Ghermez	54.66^{fgh}	79.33^{b}	67^{c}
Askari	76.11^{bc}	94.40^{a}	85.26^{a}
Fakhri	46^{h}	56.66^{efg}	51.33^{d}
Yaghuti	47^{h}	66.33^{cde}	56.66^{d}
Thompson Seedless	63.66^{def}	80.66^{b}	72.16^{bc}
Average	59.27^{b}	76.87^{a}	-

در هر صفت میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

For each traits, means followed by similar letters are not statistically different (P<0.05) according to Duncan's multiple range test.



شکل ۲. (A) جنین سوماتیکی در مراحل مختلف توسعه، (B) گیاهان طبیعی به دست آمده یک ماه بعد از کشت در محیط کشت باززایی، (C) گیاه طبیعی تشکیل شده در گلدان‌های حاوی کوکوپیت و پرلایت، (D) گیاهان کشت‌شده در خاک پس از انتقال به گلخانه

Figure 2. (A) Somatic embryos at different stages of development, (B) normal plant obtained after 1 month of culture in regeneration medium, (C) regenerated plant in pot containing cocopeat and perlite, (D) plants cultivated in the soil after transferring to the greenhouse

در این پژوهش استفاده از محیط کشت WPM حتی موجب بهبود توسعه و رشد در گیاهان غیرطبیعی شد. تعداد زیادی از گیاهان غیرطبیعی بعد از انتقال به محیط کشت WPM تولید شاخساره کردند و به گیاهان طبیعی تبدیل شدند. محیط کشت WPM برای کشت بافت گیاهان چوبی طراحی شده است (Lloyd & McCown, 1980). در واقع با در نظر گرفتن این نتایج، محیط کشت WPM در مقایسه با محیط کشت MS محیط بهتری برای رشد رأس شاخه بود. نرخ بالای باززایی گیاه اغلب به یک ساختار و عملکرد خوب انتهای شاخه وابسته است (López-Pérez *et al.*, 2006). جنین‌های غیرطبیعی که قادر نیستند به گیاه تبدیل شوند دور انداخته می‌شود و این موجب اتلاف زمان، هزینه و انرژی می‌شود، بنابراین بهبود پروتکل باززایی علاوه برافزایش راندمان موجب صرفه‌جویی در این موارد می‌گردد (Ji *et al.*, 2017).

به‌کارگیری محیط کشت WPM تغذیه‌شده با یک میکرومولار BAP برای رسیدن به اهداف چهارگانه حفظ کشت جنین، بلوغ جنین، جوانه‌زنی جنین و توسعه گیاهان در رقم تامسون سیدلس بسیار کارآمد گزارش شده است (Bharathy & Agrawal, 2008). در پژوهش صورت گرفته توسط Ji *et al.* (2017) استفاده از محیط‌های کشت MS و WPM در مقایسه با محیط کشت NN موجب افزایش درصد جوانه‌زنی در رقم تامسون سیدلس گردید.

برخی از گیاهان در انتهای این مرحله نتوانستند به گیاه کامل تبدیل شوند (شکل C-۱). گیاهانی که ساختار شاخه و ریشه در آن‌ها به‌خوبی توسعه یافته بود به گلدان‌های حاوی کوکوپیت و پرلیت منتقل شدند (شکل C-۲) و بعد از یک ماه سازگاری گیاهان در خاک کشت و در گلخانه نگه‌داری شدند (شکل D-۲).

نتیجه‌گیری کلی

در کشت بافت راندمان بالای باززایی بسیار مهم است. به طورکلی باززایی از جنین سوماتیکی در انگور معمولاً ضعیف بوده که این موضوع علاوه بر القای کالوس جنین‌زا، با درصد جنین‌زایی و باززایی پایین مرتبط است. از بین شش رقم مورد بررسی بهترین درصد تمایز، جوانه‌زنی و باززایی در رقم‌های عسکری، بیدانه سفید و تامسون سیدلس مشاهده شد. در هر دو محیط کشت جوانه‌زنی شامل محیط کشت حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP و محیط کشت حاوی ۰/۵ میکرومولار BAP، گیاهان با رشد غیرطبیعی ریشه و رأس شاخه مشاهده شد. علاوه بر آن در محیط کشت حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP گیاهان با ریشه طویل و رشد غیرطبیعی رأس شاخه مشاهده شد. درصد تولید گیاهان طبیعی و غیرطبیعی در دو محیط کشت بسیار متنوع و وابسته به رقم بود، اما به طورکلی محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میکرومولار BAP در تمامی رقم‌ها موجب بهبود جوانه‌زنی در مقایسه با محیط کشت حاوی ۰/۱ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار BAP گردید. از بین دو محیط کشت باززایی مورد بررسی محیط کشت WPM نسبت به محیط کشت MS موجب افزایش باززایی گیاهان در کلیه رقم‌های مورد ارزیابی شد. این اولین گزارش استفاده از محیط کشت WPM در باززایی گیاهان حاصل از کالوس جنین‌زا است.

REFERENCES

1. Bharathy, P. & Agrawal, D. (2008). High frequency occurrence of single cotyledonary embryo morphotype and repetitive somatic embryogenesis in '*Thompson Seedless*' crossed with seven grapevine male parents. *Vitis*, 47,169-174.
2. Dai, L., Zhou, Q., Li, R., Du, Y., He, J., Wang, D., Cheng, S., Zhang, J. & Wang, Y. (2015). Establishment of a picloram-induced somatic embryogenesis system in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay and genetic transformation of a stilbene synthase gene from wild-growing *Vitis* species. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 121, 397-412.
3. Das, D. K., Nirala, N. K., Reddy, M. K., Sopory, S. K. & Upadhyaya, K. C. (2006). Encapsulated somatic embryos of grape (*Vitis vinifera* L.): an efficient way for storage and propagation of pathogen-free plant material. *Vitis*, 45,179-184.
4. Dhekney, S. A., Li, Z. T., Compton, M. E. & Gray, D. J. (2009). Optimizing initiation and maintenance of *Vitis* embryogenic cultures. *HortScience*, 44(5), 1400-1406.

5. Ebadi, A., Jamal Mahmod, A., Mirmasomi, M. & Omidi, M. (2012a). Somatic embryogenesis and plant regeneration from anhter culture in some grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Horticultural Science and Technology*, 12 (2), 241-252. (in Farsi)
6. Ebadi, A., Jamal Mahmod, A., Mirmasomi, M. & Omidi, M. (2012b). Grapevine regeneration (*Vitis vinifera* L.) through somatic embryogenesis from whole flowers as explant. *Journal of Horticultural Science*, 25 (4), 417-424. (in Farsi)
7. Faure, O., Aarrouf, J. & Nougaréde, A. (1996). Ontogenesis, differentiation and precocious germination in anther-derived somatic embryos of grapevine (*Vitis vinifera* L.): proembryogenesis. *Annals of Botany*, 78, 23-28.
8. Franks, T., Botta, R. & Thomas, M. (2002). Chimerism in grape: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 192-199.
9. Gambino, G., Bondaz, J. & Gribaudo, I. (2006). Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 114, 397-404.
10. Gambino, G., Ruffa, P., Vallania, R. & Gribaudo, I. (2007). Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 90, 79-83.
11. Gribaudo, I., Gambino, G. & Vallania, R. (2004). Somatic embryogenesis from grapevine anthers: the optimal developmental stage for collecting explants. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 427-430.
12. Jamal Mahmod, A., Ebadi, A., Mirmasomi, M. & Omidi, M. (2015). Somatic embryogenesis and plant regeneration with from ovaries in Yaghoti, White seedless, Shahrodi and Flame seedless grapevine cultivars. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 45(4), 345- 352. (in Farsi)
13. Ji, W., Luo, Y., Guo, R., Li, X., Zhou, Q., Ma, X. & Wang, Y. (2017). Abnormal somatic embryo reduction and recycling in grapevine regeneration. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(4), 912-918.
14. Jiménez, V. M. & Bangerth, F. (2000). Relationship between endogenous hormone levels of grapevine callus cultures and their morphogenetic behaviour. *Vitis*, 39, 151-157.
15. Kikkert, J. R., Striem, M. J., Vidal, J. R., Wallace, P. G., Barnard, J. & Reisch, B. I. (2005). Long term study of somatic embryogenesis from anthers and ovaries of 12 grapevine (*Vitis* sp.) genotypes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, 41, 232-239.
16. Lloyd, G. & McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. In: Combined Proceedings of *International Plant Propagators' Society*, 20-22 Dec., Ohio, USA, pp. 421-427.
17. López-Pérez, A. J., Carreño, J., Martínez-Cutillas, A. & Dabauza, M. (2005). High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. *Vitis*, 44 (2), 79-85.
18. López-Pérez A., Carreóo, J. & Dabauza M. (2006). Somatic embryo germination and plant regeneration of three grapevine cvs: Effect of IAA, GA. *Vitis*, 45, 141-143.
19. Lu, M. (2005). Micropropagation of *Vitis thunbergii Sieb.* et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shoot tip culture. *Scientia Horticulturae*, 107, 64-69.
20. Maillot, P., Kieffer, F. & Walter, B. (2006). Somatic embryogenesis from stem nodal sections of grapevine. *Vitis*, 45 (4), 185-189.
21. Merkle, S. A. & Wiecko, A. T. (1990). Somatic embryogenesis in three magnolia species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115, 858-860.
22. Morgana, C., Di Lorenzo, R. & Carimi, F. (2004). Somatic embryogenesis of *Vitis vinifera* L. (cv. Sugraone) from stigma and style culture. *Vitis*, 43(4), 169-173.
23. Motoike, S. Y., Skirvin, R. M., Norton, M. A. & Otterbacher, A. G. (2001). Somatic embryogenesis and long term maintenance of embryogenic lines from fox grapes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66, 121-131.
24. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
25. Nitsch, J. P. & Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163, 85-87.
26. Olah, R., Anik, Z., Andrzej, P., Howard, S. & Kovacs, L. G. (2009). Somatic embryogenesis in a broad spectrum of grape genotypes. *Scientia Horticulturae*, 120, 134-137.
27. 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.
28. Perrin, M., Gertz, C. & Masson, J. E. (2004). High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19 grapevine genotypes grown worldwide. *Plant Science*, 167, 1343-1349.
29. Perrin, M., Martin, D., Joly, D., Demangeat, G., This, P. & Masson, J. E. (2001). Medium-dependent response on grapevine somatic embryogenic cells. *Plant Science*, 161, 107-116.

30. Prado, M. J., Grueiro, M. P., González, M. V., Testillano, P. S., Dominguez, C., López, M. & Rey, M. (2010). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from anthers and ovaries of six autochthonous grapevine cultivars from Galicia (Spain). *Scientia Horticulturae*, 125, 342-352.
31. Sezgin, M. & Dumanoğlu, H. (2014). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledons of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, 50, 58-68.
32. Vidal, J. R., Rama, J., Taboada, L., Martin, C., Ibañez, M., Segura, A. & González-Benito, M. E. (2009). Improved somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera*) with focus on induction parameters and efficient plant regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 96, 85-94.
33. Wang, Q., Gafny, R., Sahar, N., Sela, I., Mawassi, M., Tanne, E. & Perl, A. (2002). Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. *Plant Science*, 162(4), 551-558.
34. Xu, Z-Sh., Yu, Z-Y., Zhang, M., Zhang, Z. & Tao, J-M. (2014). Plant regeneration via somatic embryogenesis from solid and suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. 'Manicure Finger'. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*, 50, 249-256.
35. Zhou, Q., Dai, L., Cheng, S., He, J., Wang, Dan., Zhang, J. & Wang, Y. (2014). A circulatory system useful both for long-term somatic embryogenesis and genetic transformation in *Vitis vinifera* L. cv. Thompson Seedless. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 118, 157-168.