نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 29، شماره 3، پاییز 1394، ص. 450-443
شاپا: 4730 - 2008

Journal of Horticultural Science
Vol. 29, No. 3, Fall 2015, P. 443-450
ISSN: 2008 - 4730

بررسی قابلیت آندروژنز و کالوس‌زایی در چهار رقم گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill) به‌وسیله کشت بساک

رسول نجیب[1*] - محمد فارسی[2] - امین میرشمسی کاخکی[3] - سعیدرضا وصال[4]

تاریخ دریافت: 1393/03/25
تاریخ پذیرش: 1394/04/24

چکیده

به منظور بررسی پاسخ به آندروژنز و القاء کالوس از کشت بساک گوجه‌فرنگی، چهار رقم به نام‌های موبیل هلند، بیکر، U. S. Agriseed و خرم انتخاب شدند. جهت تعیین مرحله مناسب توسعه میکروسپور برای کشت بساک بررسی‌های سیتولوژیکی در اندازه‌های مختلف طولی 7/9-2 میلی‌متری جوانه‌های گل انجام شد. برمبنای مطالعات سیتولوژیکی در هر چهار رقم مورد آزمایش، جوانه‌های‌گل با اندازه طولی 4/9-4 میلی‌متر بدلیل داشتن بالاترین فراوانی میکروسپورهای مرحله میوز تا اواسط مرحله تک‌هسته‌ای، جهت کشت انتخاب شدند. جهت پیش‌تیمار از محلول کلشی‌سین 0/025 درصد در 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت استفاده شد. سپس بساک‌ها در محیط کشت MS حاوی 2 میلی‌گرم بر لیتر IAA و 1 میلی‌گرم بر لیتر 2ip کشت شدند. روند تغییرات در فراوانی القاء کالوس و ضخامت کالوس‌ها در طی هشت هفته ثبت شد. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر فراوانی نسبی القاء کالوس با هم اختلاف معنی‌داری دارند ($P < 0/0001$). دو رقم موبیل هلند و خرم پتانسیل نسبتا بالایی برای پاسخ به آندروژنز از طریق کشت بساک نشان دادند. به‌نظر می‌رسد با بهبود شرایط فیزیولوژیکی جهت رشد گیاه مادری و بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت در آزمایشات بعدی بتوان در زمینه تولید گیاهان هاپلویید در این دو رقم گوجه‌فرنگی به پیشرفت‌هایی دست پیدا کرد.

واژه‌های کلیدی: القاء کالوس، ژنوتیپ، هاپلویید

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill) یکی از مهمترین سبزیجات است که علاوه بر مصارف خوراکی به‌عنوان یک گیاه مدل برای مطالعات سیتولوژیکی و سیتوژنتیکی استفاده می‌شود (5). طبق آمار سازمان خواروبار و کشاورزی (فائو) (3) این محصول در بین سبزیجات از لحاظ میزان تولید و سطح زیرکشت مقام اول را به‌خود اختصاص داده است که نشان دهنده جایگاه ویژه این محصول در کشاورزی جهانی است (3).

برنامه‌های اصلاحی گوجه‌فرنگی اکثراً بر تولید و گزینش گیاهان هیبرید استوار است. برای تولید گیاهان هیبرید و بهره جستن از قدرت آن نیاز به تولید لاین‌های خالص با قدرت ترکیب‌پذیری بالا می‌باشد. ایجاد فن‌آوری‌های کارآمد جدید نظیر هاپلوئیدهای مضاعف‌شده[5] می‌تواند یک راه حل کارآمد و سریع برای تهیه لاین‌های خالص در گوجه‌فرنگی باشد. با این وجود میزان موفقیت در این روش پایین بوده و نیاز به بررسی‌های آزمایشگاهی وسیعی دارد (5).

یکی از روش‌های تولید گیاهان هاپلوئید آندروژنز[6] است که به صورت کشت بساک[7] یا کشت میکروسپور آزاد شده[8] انجام می‌گیرد (10). تولید گیاهان هاپلویید بوسیله آندروژنز در گوجه‌فرنگی علی‌رغم تلاش‌های فراوان به‌دلیل محدودیت ژنوتیپ‌های پاسخ‌دهنده به آندروژنز، پایین بودن سطح القاء کالوس، موفقیت کم در تعداد کالوس‌هایی که به مرحله باززایی می‌رسند و بالا بودن فراوانی گیاهچه‌هایی با سطوح پلوئیدی نامعین، تاکنون پیشرفت زیادی حاصل نشده است. شاید علت این امر سرسخت بودن این گیاه در پاسخ به آندروژنی بین اعضای خانواده سیب‌زمینی باشد، بطوریکه تاکنون تنها

1، 2 و 3- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، استاد و استادیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: najib.r.1367@gmail.com)
4- گروه پژوهشی بقولات، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

5- Doubled Haploid
6- Androgenesis
7- Anther culture
8- Microspore isolated culture

دو آزمایشگاه باززایی کامل را در نتیجه کشت بساک این گیاه گزارش کرده‌اند (6 و 9). از طرفی علی‌رغم اهمیت بالای اقتصادی این گیاه، دستورالعمل‌های واقعی و قابل اطمینان که توسط محققین در این زمینه ارائه شده باشد، بسیار محدود است؛ بطوریکه هنوز دستورالعمل مشخصی که حتی در یک ژنوتیپ قابل تکرار باشد و نتایج مشابهی ارائه نماید، شناسایی و تائید نشده است (5). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که در القاء آندروژنز پنج عامل ژنوتیپ، مرحله توسعه بساک، شرایط رشدی گیاه مادری، پیش‌تیمار و ترکیبات محیط کشت تاثیرگذار می‌باشند (10). در گوجه‌فرنگی ژنوتیپ و مرحله توسعه بساک نسبت به سایر عوامل دارای اهمیت بیشتری هستند (4). مرحله تکوینی بساک برای بدست آوردن کالوس هاپلوئید گوجه‌فرنگی، عامل حیاتی است. در کشت بساک گوجه‌فرنگی دو مرحله مختلف به عنوان مراحل مطلوب گزارش شده‌اند. طبق گزارش دوی و گرشوف (2)، بیشتر محققانی که شاخه تولید کردند، در مرحله میوز میکروسپورها، بهترین نتیجه را بدست آوردند. گائو و همکاران (4) اوخر مرحله میکروسپورهای تک‌هسته‌ای تا ابتدای دوهسته‌ای را مرحله مطلوب برای القاء کالوس و شاخه‌زایی معرفی نمودند (2 و 4).

ژنوتیپ یکی دیگر از مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار در پاسخ به آندروژنز در گوجه‌فرنگی است، بطوریکه دوی و همکاران (2) فقط در 3 رقم از 43 رقم مورد آزمایش موفق به تولید کالوس شدند و فقط در یک رقم از آنها اندام‌زایی مشاهده شد. زاگورسکا و همکاران (11) در بررسی 80 رقم، موفق به تولید کالوس در 53 رقم شدند. زاگورسکا و همکاران (12) در مطالعه‌ای دیگر از بین 100 واریته مورد آزمایش، در 22 واریته کالوس تولید کردند که اکثر کالوس‌ها میکس‌پلوئید بودند. بنابراین تولید هاپلوئید برای اهداف اصلاحی، نیاز به ژنوتیپ‌هایی دارد که پاسخ خوبی به کشت بساک می‌دهند. تاکنون القاء کالوس در بیش از 200 رقم گوجه‌فرنگی مورد مطالعه قرار گرفته است که در حدود 20 درصد از آنها کالوس ایجاد کرده و فقط تعداد معدودی قادر به اندام‌زایی بودند (13). به‌جز برای لاین‌های جهش یافته حامل ژن نرعقیمی $ms10^{35}$، در حال حاضر هیچ نوع اطلاعی در مورد چگونگی اثرات ژنوتیپ در تشکیل کالوس در این رقم‌های خاص وجود ندارد (1، 10 و 13). هدف از این تحقیق بررسی امکان القاء کالوس از بساک در چند ژنوتیپ گوجه‌فرنگی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کاشت و داشت گیاه مادری

بذور چهار رقم گوجه‌فرنگی با نام‌های موبیل هلند، بیکر، U. S. Agriseed و خرم جهت بررسی پاسخ به آندروژنز انتخاب شدند. کشت بذرها در فاصله سال‌های 1392-1391 در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد صورت پذیرفت. در طی دوره رشد، عملیات داشت، مطابق با نیاز گیاه به‌طور دقیق صورت پذیرفت و گیاهان در شرایط کنترل شده و تحت شرایط دمایی روزانه 3±25 درجه سانتی‌گراد و شبانه 3±22 درجه سانتی‌گراد و تحت نور طبیعی رشد کردند. در طی دوره رشد، چندین مرتبه از کودهای N:P:K با نسبت 20:20:20 همراه با آب آبیاری جهت تقویت گیاهان استفاده شد. جهت کنترل آفات و بیماری‌ها، عملیات پیشگیری لازم صورت پذیرفت. به‌علاوه جهت داشتن گیاهان جوان، به فاصله هر یک ماه عملیات کاشت تکرار گردید تا همیشه گل‌های جوان و تازه در دسترس باشند.

انتخاب مناسب‌ترین جوانه‌های گل

به منظور تعیین اندازه مناسب گل در ارتباط با مرحله مناسب توسعه میکروسپور، جوانه‌های گل در ساعات اولیه صبح جمع‌آوری و در داخل ظروف درب بسته حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. جوانه‌های با اندازه 2-7/9 میلی‌متری به 6 گروه به فاصله هر یک میلی‌متر تقسیم شده و به مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از جداسازی بساک‌ها، جهت رنگ‌آمیزی به مدت 15 دقیقه در محلول رنگی استوکارمن 4 درصد قرار گرفتند. پس از له کردن بساک‌ها، بررسی‌های لازم با میکروسکوپ نوری صورت پذیرفت و مورد مناسب براساس مشاهده میکروسپورهای در حال تقسیم میوز تا اواسط میکروسپورهای تک هسته‌ای انتخاب شد. در مطالعات سیتولوژیکی به‌صورت تصادفی حداقل 10-5 جوانه‌گل و از هر جوانه 5-3 بساک در هر گروه برای هر رقم مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت حداقل 100 میکروسپور به طور تصادفی در نقاط مختلف اسلایدهای تهیه شده شمارش گردید و فراوانی نسبی مراحل مختلف پیش‌میوزی، میوزی، تتراد، میکروسپورهای نابالغ (اوایل تا اواسط مرحله تک‌هسته‌ای) و دانه‌های گرده (اواخر تک‌هسته‌ای و مرحله دوهسته‌ای، وجود لوب‌های مشخص و متعدد) ثبت شد.

جداسازی و کشت بساک

براساس نتایج آزمایش اول، جوانه‌های گل با اندازه 4-4/9 میلی‌متر (دارای بساک‌هایی به طول حدود 4-3 میلی‌متر) در ساعات اولیه صبح جمع‌آوری و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت پیش‌تیمار از تنش دمای پایین 4 درجه سانتی‌گراد و محلول کلشی‌سین 0/025 درصد به مدت 48 ساعت استفاده شد. برای ضدعفونی سطحی، ابتدا جوانه‌های گل با آب مقطر شستشه شدند. سپس جوانه‌های گل با الکل 70 درصد به مدت پنج دقیقه و در ادامه با محلول هیپوکلریت سدیم 2/5 درصد و چند قطره مایع ظرفشویی به مدت 15 دقیقه ضدعفونی شده و پس از اعمال تیمارهای فوق جوانه‌های گل حداقل سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بساک‌ها پس از جداشدن جهت کشت در داخل

پتری‌دیش‌های 15×60 میلی‌متری دارای 10 میلی‌لیتر محیط کشت MS حاوی 2 میلی‌گرم بر لیتر IAA، 1 میلی‌گرم بر لیتر 2ip، 30 گرم بر لیتر ساکارز و 8 گرم بر لیتر آگار با pH برابر با 5/7 قرار گرفتند. حداقل 50 بساک برای هر رقم کشت شد. پتری‌دیش‌ها پس از کشت به اتاقک رشد انتقال یافته و چهار هفته در شرایط دمایی 25 درجه سانتی‌گراد و تاریکی قرار داده شدند. پس از چهار هفته پتری‌دیش‌ها به شرایط نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی با شدت نور 10000 لوکس انتقال یافتند.

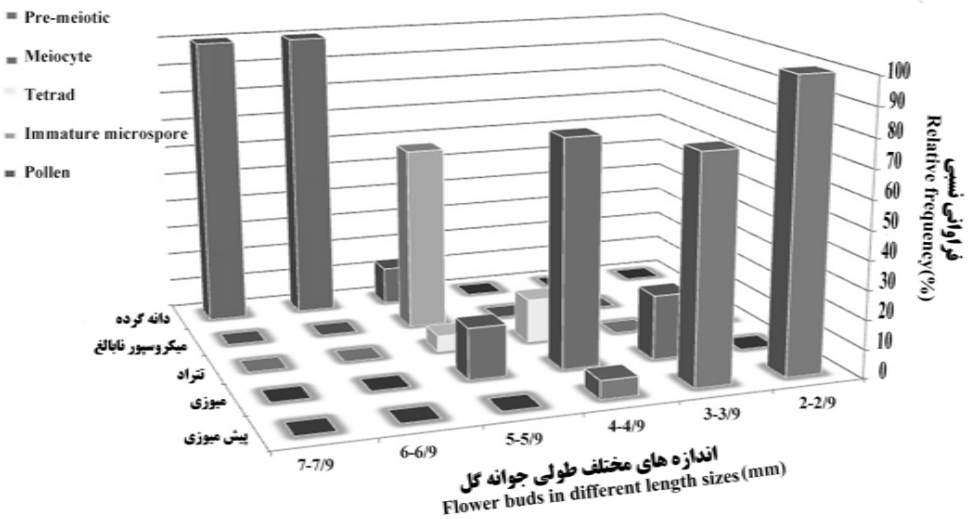
بررسی روند القاء کالوس در بساک‌های کشت شده

چند روز پس از کشت به فاصله هر یک هفته نمونه‌ها بطور مرتب در زیر لوپ جهت دنبال نمودن تغییرات و القاء کالوس مورد بررسی قرار گرفتند و فراوانی کالوس‌های القاء شده شمارش شد. تغییرات به‌طور منظم عکس‌برداری گردید. حدود هشت هفته پس از کشت به‌دلیل توقف رشد، ضخامت کالوس‌ها با استفاده از میکروسکوپ دوربین‌دار و نرم‌افزار Dino Capture 2.0 نسخه 1/4 اندازه‌گیری شد. مطالعات سیتولوژیکی در تمام موارد فوق با میکروسکوپ‌های تحقیقاتی المپیوس BX51 و عکسبرداری توسط دوربین‌های دیجیتالی DP70 انجام گرفت. جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین نسبت‌های مشاهده شده، از آزمون کای مربع استفاده شد. کلیه آنالیزها با استفاده از نرم‌افزار آماری JMP 8 صورت گرفت. رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

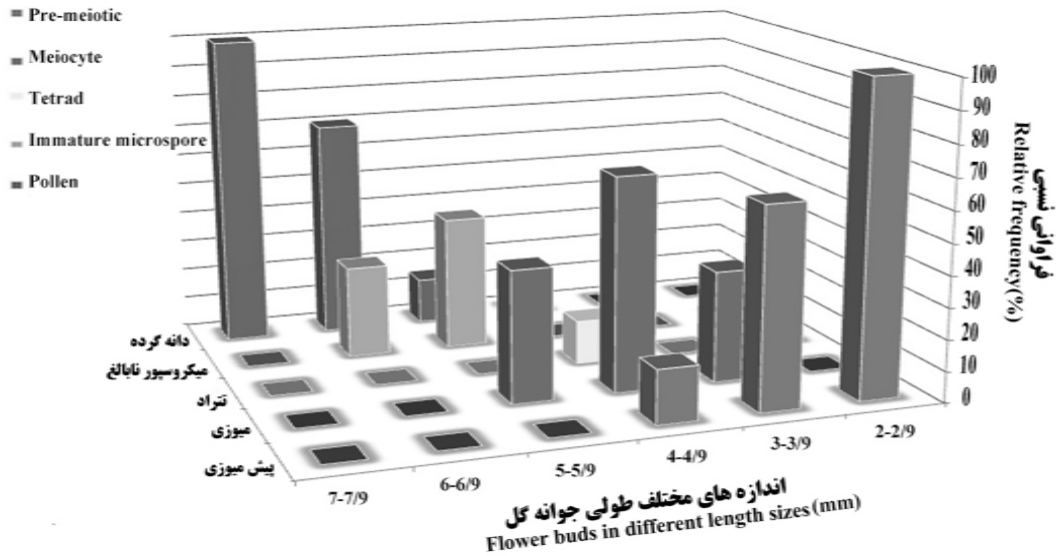
بررسی‌های سیتولوژیکی در جوانه‌های گل 3/9-2 میلی‌متری در ارقام موبیل هلند، بیکر و خرم نشان داد که درصد زیادی از سلول‌های مادر میکروسپور هنوز مرحله تقسیم میوزی خود را آغاز نکرده بودند. بیشترین فراوانی میکروسپورهای میوزی و مرحله انتهایی میوز (تتراد) در این ارقام در جوانه‌های گل 4/9-4 میلی‌متری مشاهده شد. این در حالی است که در رقم U. S. Agriseed جوانه‌های گل 4/9-3 میلی‌متری حاوی درصد زیادی از میکروسپورها بودند که در مرحله میوزی قرار داشتند. با افزایش طول جوانه گل از 5 میلی‌متر در هر چهار رقم مورد مطالعه در این آزمایش، فراوانی میکروسپورهای میوزی و اواسط مرحله تک‌هسته‌ای به شدت کاهش و از سوی دیگر، فراوانی میکروسپورهای اواخر تک‌هسته‌ای و دانه‌های گرده به شدت افزایش یافت. نمودارهای توزیع فراوانی نسبی میکروسپورها و دانه‌های گرده در اندازه‌های مختلف طولی جوانه گل، برای هر یک از چهار رقم مورد مطالعه در این تحقیق در شکل‌های 1 تا 4 آورده شده است.

مرحله زمانی برداشت بساک‌ها یکی از عوامل تعیین کننده میزان موفقیت در تولید جنین از کشت بساک می‌باشد. نتایج در بیشتر تحقیقات نشان می‌دهد که فاصله زمانی بین تقسیم میوز تا اواسط مرحله میکروسپورهای تک‌هسته‌ای برای پاسخ به آندروژنز در کشت بساک و میکروسپور گوجه‌فرنگی مناسب است (10 و 11). از آنجا که میکروسپورهای درون یک بساک در مراحل مختلفی از توسعه قرار دارند، لذا برای تعیین اندازه مناسب جوانه‌های گل، مشاهده مراحل ذکر شده و فراوانی نسبی این مراحل مورد توجه قرار می‌گیرد.



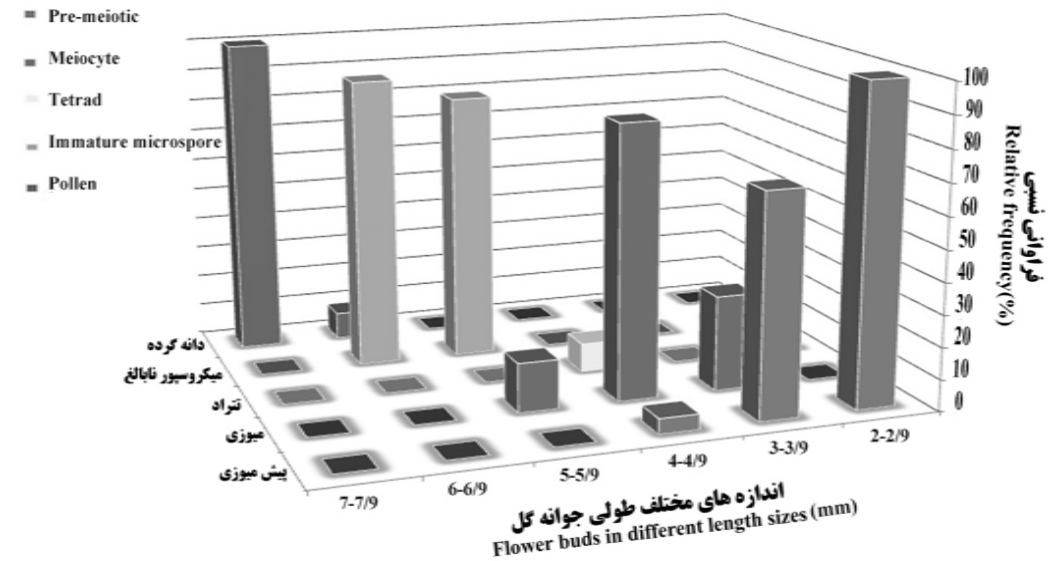
شکل 1- نمودار توزیع فراوانی مراحل توسعه میکروسپور و دانه گرده در اندازه‌های مختلف طولی جوانه گل در رقم موبیل هلند گوجه فرنگی

Figure 1- Frequency of microspore and pollen development of flower buds in different length sizes in the cultivars Mobil-Netherlands of tomato



شکل 2- نمودار توزیع فراوانی مراحل توسعه میکروسپور و دانه گرده در اندازه‌های مختلف طولی جوانه گل در رقم بیکر گوجه فرنگی

Figure 2- Frequency of microspore and pollen development of flower buds in different length sizes in the cultivars Baker of tomato

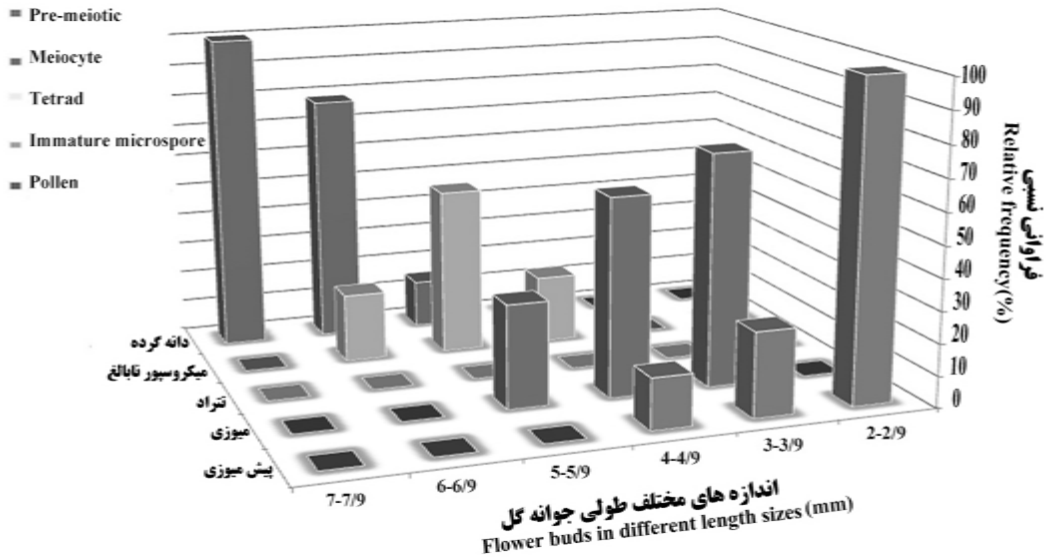


شکل 3- نمودار توزیع فراوانی مراحل توسعه میکروسپور و دانه گرده در اندازه‌های مختلف طولی جوانه گل در رقم خرم گوجه فرنگی

Figure 3- Frequency of microspore and pollen development of flower buds in different length sizes in the cultivars Khoram of tomato

براساس نتایج حاصل از این آزمایش در هر چهار رقم مورد مطالعه، جوانه‌های گل با اندازه طولی 4-4/9 میلی‌متری که دارای بساک‌هایی با طول تقریبی 4-3 میلی‌متر بودند، به‌دلیل داشتن بالاترین فراوانی نسبی میکروسپورهای میوزی و میکروسپورهای تک‌هسته‌ای، جهت کشت بساک می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. این نتایج با یافته‌های سیمارو و همکاران (9) مطابقت دارد. آن‌ها بیان کردند که در چهار رقم نربارور گوجه‌فرنگی مورد بررسی جوانه‌های گل کمتر از 4 میلی‌متر در مرحله پیش‌میوزی قرار دارند. جوانه‌های گل 5-4 میلی‌متر در مرحله میوزی، جوانه‌های گل 6-5 میلی‌متر در مرحله تتراد و اواخر میوز و جوانه‌های گل بیش از 6 میلی‌متر حاوی میکروسپورهای نابالغ و دانه‌های گرده هستند. اما در ارقام دارای ژن نرعقیمی، بیشترین فراوانی مرحله میوزی در جوانه‌های 3-2

میلی‌متری مشاهده شد.



شکل 4- نمودار توزیع فراوانی مراحل توسعه میکروسپور و دانه گرده در اندازه‌های مختلف طولی جوانه گل در رقم U. S. Agriseed گوجه فرنگی

Figure 4- Frequency of microspore and pollen development of flower buds in different length sizes in the cultivars U. S. Agriseed of tomato

دلیل اصلی این مطلب به‌خاطر کوچک‌تر بودن اندازه جوانه گل در ارقام حامل ژن نرعقیمی است. شریعت‌پناهی و همکاران (5) نیز جوانه‌های گل با طول 5-4 میلی‌متر را به دلیل داشتن بالاترین فراوانی میکروسپورهای میوزی مورد استفاده قرار دادند. اما نتایج تحقیقات سومرز و جارمیلو (6) نشان داد که بساک‌های کمتر از 3/5 میلی‌متر در مرحله میوز قرار دارند. این نوع بساک‌ها در برخی ارقام در جوانه‌های گل 5-3 میلی‌متری و در برخی دیگر در جوانه‌های گل 8–3/5 میلی‌متری قرار داشتند، که با نتایج حاصل از این آزمایش اختلاف دارند.

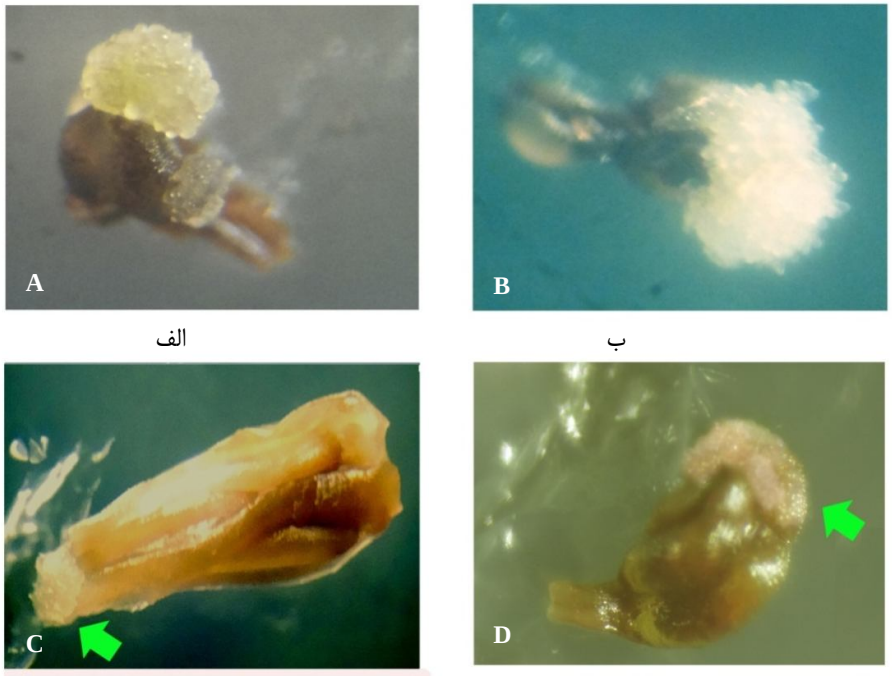
نتایج حاصل از بررسی تغییر شکل و القاء کالوس در این آزمایش نشان داد که در دو رقم بیکر و U. S. Agriseed هیچ‌گونه القاء کالوسی صورت نپذیرفت. در این ارقام با گذشت سه هفته پس از کشت، بساک‌ها به تدریج به رنگ زرد مایل به قهوه‌ای در آمدند و در هفته چهارم فراوانی بساک‌های قهوه‌ای شده افزایش یافت. پس از شش هفته از زمان کشت، همه بساک‌ها در این دو رقم قهوه‌ای شده و مردند، اما در رقم موبیل هلند و خرم در طی هفته دوم تا چهارم بساک‌ها متورم شده و در نهایت دیواره بساک پاره شد و کالوس‌ها مشاهده شدند (شکل5).

در هفته سوم به تدریج فراوانی بساک‌های تغییر شکل یافته افزایش یافت. از هفته چهارم پس از کشت، فراوانی القاء کالوس کاهش یافته و در نهایت از هفته پنجم و ششم به بعد هیچگونه تغییری در فراوانی القاء کالوس مشاهده نشد. در پایان هفته هشتم پس از کشت به‌دلیل عدم رشد، ضخامت تمام کالوس‌های القاء شده اندازه‌گیری شد. درصد فراوانی نسبی القاء کالوس و میانگین ضخامت کالوس‌های ایجاد شده پس از هشت هفته در جدول 1 آورده شده است.

به منظور بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در القاء کالوس بین چهار ژنوتیپ مورد مطالعه آزمون کای مربع صورت پذیرفت. نتایج حاصل از آزمون کای مربع در جدول 2 آمده است.

با توجه به سطح معنی‌داری ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر فراوانی نسبی القاء کالوس با هم اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < 0/0001$). این نتایج، یافته‌های حاصل از تحقیقات قبلی را نیز تایید می‌کند. سومرز و جارمیلو (7) با بررسی تحقیقات قبلی انجام شده نشان دادند که هرچند کارهای زیادی بر روی کشت بساک گوجه‌فرنگی انجام شده است ولی با این حال تعداد ژنوتیپ‌های بسیار کمی به القاء کالوس پاسخ می‌دهند.

در تحقیق حاضر تنها دو رقم از چهار رقم مورد مطالعه کالوس تولید کردند و هیچگونه اندام‌زایی مشاهده نشد. دوی و همکاران (9) نیز از 43 رقم مورد بررسی فقط در سه رقم موفق به تولید کالوس شدند و فقط یکی از این رقم‌ها اندام‌زایی نمود. چایلوها و تارجی (1)، شارپ و همکاران (6)، شامیانا و دائو (8) و دبرگ و نیج (9) نیز فقط توانستند کالوس القاء کنند و هیچ‌گونه اندام‌زایی مشاهده نشد.



شکل 5- نمونه‌ای از کالوس‌های القاء شده در گوجه‌فرنگی: ژنوتیپ موبیل‌هلند (الف و ب) و ژنوتیپ خرم (پ و ت)

Figure 5- An example of calluses induced in Tomato. A-B). Mobil-Netherlands genotype. C - D). Khoram genotype.

جدول 1- فراوانی نسبی کالوس‌های القاء شده در چهار ژنوتیپ گوجه‌فرنگی

Table 1- Frequency of calluses induced in four genotypes of tomato

ژنوتیپ Genotype	فراوانی نسبی القاء کالوس Frequency of callus induction (%)	میانگین ضخامت کالوس‌ها Mean callus diameter (mm)
Mobil-Netherlands	32	5.67
Baker	0	-
Khoram	18	3.81
U. S. Agriseed	0	-

جدول 2- جدول مقدار کای مربع برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در القاء کالوس بین چهار ژنوتیپ گوجه فرنگی

Table 2- Chi-square test for significant difference between four tomato genotypes in callus induction.

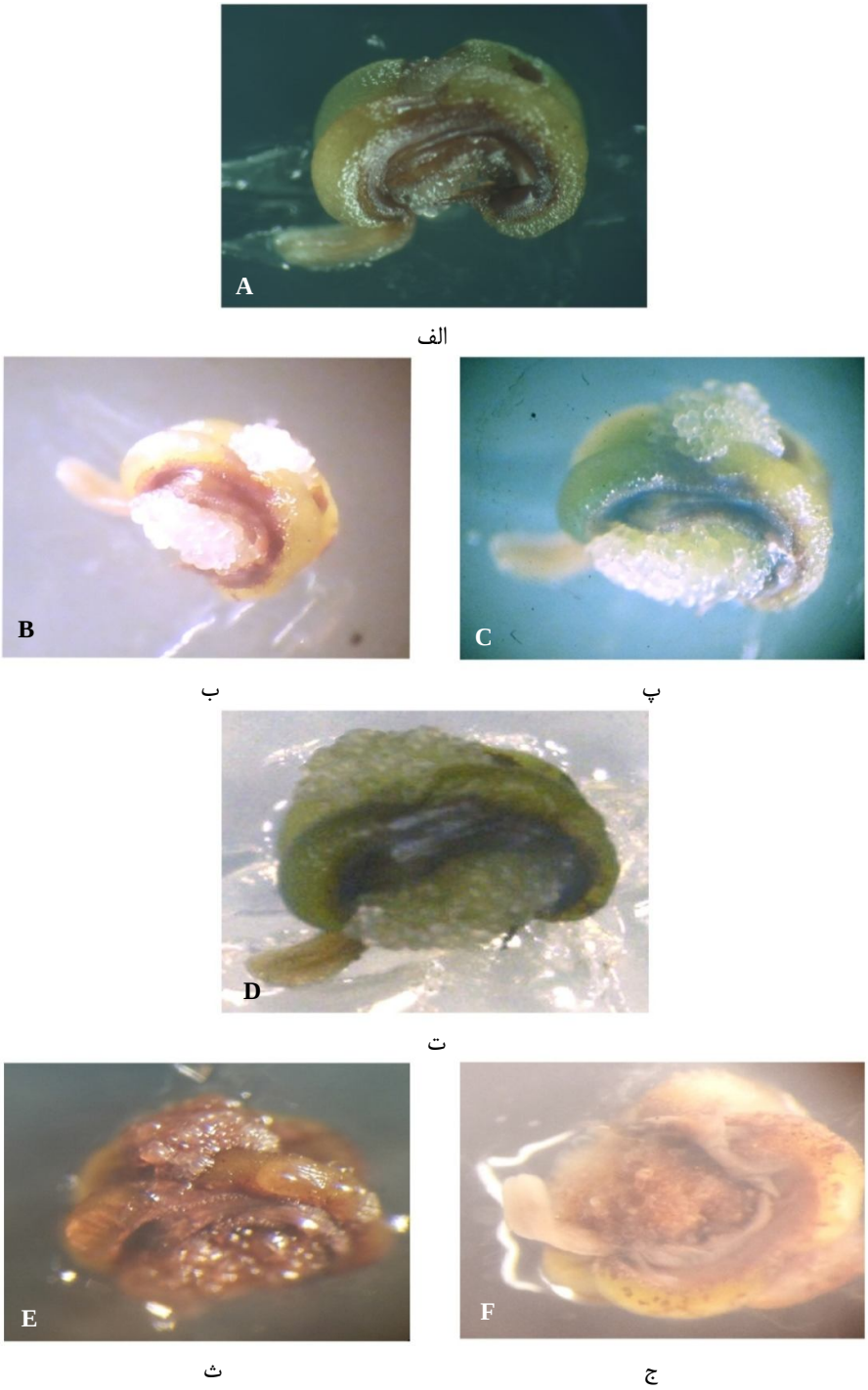
ژنوتیپ Genotype	فراوانی نسبی مشاهده شده* (Observed)	فراوانی نسبی مورد انتظار (Eexpected)	$(O-E)^2/E$
Mobil-Netherlands	0.64	0.25	15.21
Baker	0	0.25	6.25
Khoram	0.36	0.25	1.21
U. S. Agriseed	0	0.25	6.25
Sum	1	1	$\chi^2 = 28.92$

* فراوانی نسبی مشاهده شده از مجموع کل کالوس‌های القاء شده

* Observed frequency of the calluses induced

زاگورسکا و همکاران (11) نیز در بررسی 80 رقم توانستند در 53 رقم کالوس تولید کنند اما میزان رشد بسیار پایین بود. بیشترین نرخ القاء کالوس مربوط به لاین‌های حامل ژن نرعقیمی $ms10^{35}$ بود. بالاترین فراوانی القاء کالوس در این آزمایشات 34/5 درصد و پایین‌ترین میزان 3/1 درصد بود.

بساک‌هایی که کالوس‌زایی در آن‌ها القاء شده بود به‌صورت مرتب مورد بررسی قرار گرفتند. در تمام کالوس‌های القاء شده، رشد کالوس در طی دو هفته ابتدایی پس از مشاهده اولین تغییرات به‌شدت کند بود (شکل 6، الف).



شکل6- تصویر بساک‌ها در زیر لوپ پس از ظهور اولین تغییرات. دو هفته ابتدایی (الف) هفته سوم و چهارم (ب و پ) اواخر هفته چهارم (ت) و اواخر هفته پنجم (ث و ج) در گوجه‌فرنگی

Figure 6- Images of anthers under the loop after the first appearance of changes. A). The first two weeks. B - C). Third and fourth week. D). The end of the fourth week. E - F). The end of the fifth week in tomato.

در هفته سوم پس از مشاهده اولین تغییرات سرعت رشد افـزایش یافت و این روند تا اواخر هفته چهارم ادامه داشت (شکل 6، ب - ت). با کند شدن روند سرعت رشـد پـس از چهـار هفتـه از ظهـور اولـین تغییرات، کالوس‌های القاء شده به محیطی تـازه بـا همـان ترکیبـات محیط اولیه واکشت شدند، اما هیچگونه تغییری در اندازه و ضـخامت کالوس‌های القاء شده صورت نپذیرفت. از انتهای هفته پنجم پـس از ظهور اولین تغییرات به بعد کالوس‌ها قهوه‌ای شده و مردند (شکل 6، ث - ج).

این نتایج تا حدی مشابه یافته‌هـای زاگورسـکا و همکـاران (12) است. آنها نیز بیان کردند که دو هفته بعد از کشت بساک‌ها متورم و در نهایت پاره شده و کالوس‌های سبز یا زرد رنگ را تولیـد نمودنـد. حدود یک ماه پس از ظهور اولین تغییرات، کالوس‌ها با سرعت زیادی رشد کردند اما ده روز بعد سرعت رشد به‌شدت کند شد و کـالوس‌هـا پس از قهوه‌ای شدن مردند. سیمارو (9) نیز بیان کرد که سه روز بعد از کشت، اولین پاسخ‌ها به شکل تغییرات ظاهری پدیدار شدند. ده روز بعد نیز توده سفید بزرگی در نواحی مختلف بساک‌ها ظاهر شد و شش هفته بعد از کشت، جوانه‌هایی جهت اندام‌زایی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج نشان داد که آندروژنز در گوجه‌فرنگی تحت تاثیر ژنوتیپ است و ارقام موبیل هلند و خرم پتانسیل نسبتا بالایی جهـت القاء و رشد کالوس از خود نشان می‌دهند. بنابراین بـا بهبـود شـرایط فیزیولوژیکی رشد گیاه مادری و تغییرات در ترکیبات محیط کشت در آزمایشات بعدی می‌توان فراوانی القاء کالوس و ضخامت کالوس‌های تولیدی در این ارقام را افزایش داد و بدین ترتیب به موفقیت‌هایی در زمینه تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف در گوجه‌فرنگی دست پیدا کرد.

منابع

1- Chlyah A., Taarji B., and Chlyah H. 2004. Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.): Anther culture and Induction of androgenesis. In: Bajaj Y. (eds), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 12, pp. 442-457.

2- Doy C.H., and Gresshoff P.M. 1972. Development and differentiation of haploid tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Planta 107, pp. 161-170.

3- FAO. 2009. FAOSTAT. http://faostat.fao.org

4- Jain S.M., Sopory S.K., and Villeux R.E. (eds). 1997. *In vitro* haploid production in higher plants. Vol. 5, In: W. L. Summers (ed.) Haploid plantlet production in tomato, pp. 219-231.

5- Panahi M.E.S., Touraev A., Herbele-Bros E. 2009. Induction of embryogenesis in microspores of Tomato (*Lycopersicum esculrntum* Mill) cv. Microtom. Seed and Plant Production Journal, Vol. 25-2, No. 3, pp 315-328.

6- Sharp W.R., Dougall D.K., and Paddock E.F. 1981. Haploid plantlets and callus from immature pollen grains of *Nicotiana* and *Lycopersicon*. The journal of the Torrey Botanical Society 98, pp. 219-222.

7- Summers W.L., Jaramillo J., and Bailey T. 1992. Microspore developmental stage and anther length influence the induction of tomato anther callus. Horticultural Science 27, pp. 838-840.

8- Shamina Z.B., and Dao N. 1996. Tomato anther culture. K. A. Timiryazev Institute of plant physiology, Moscow USSR, pp. 355-370.

9- Segui-Simarro J.M., and Martinez P. 2011. Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops (a Review). Plant Cell Reports 30, pp. 765-778.

10- Touraev A., Brian P., and Mohan S. (eds). 2009. Advances in Haploid Production in Higher Plants. Springer Science, pp. 3-7.

11- Zagorska N.A., Shtereva A., and Dimitrov B.D. 1997. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): I. Influence of genotype on androgenetic ability. Plant Cell Reports 17, pp. 968-973.

12- Zagorska N.A., Shtereva A., and Dimitrov B.D. 1998. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): II. Factors affecting induction of androgenesis. Plant Cell Reports 18, pp. 312-317.

13- Zagorska N.A., Shtereva A., and Dimitrov B.D. 2004. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): III. Characterization of the regenerants. Plant Cell Reports 22, pp. 449-456.