

تعیین سیتولوژیکی مراحل مختلف توسعه میکروسپور در چهار رقم گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill)

رسول نجیب^۱ - محمد فارسی^{۲*} - امین میرشمسی کاخکی^۳ - سعیدرضا وصال^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۷/۱۳

چکیده

تولید لاین‌های خالص به‌وسیله القاء آندروژنز راه‌حلی امیدبخش و جایگزین برای برنامه‌های اصلاح کلاسیک می‌باشد. این تکنولوژی در گوجه‌فرنگی به توسعه و اصلاح روش‌ها نیازمند است. یکی از عوامل موفقیت القاء آندروژنز در گوجه‌فرنگی استفاده از میکروسپورهایی است که در مرحله مناسب نمو قرار داشته باشند. بررسی سیتولوژیکی دقیق‌ترین روش برای تعیین مرحله مناسب نمو میکروسپورها است. در این مطالعه بررسی خصوصیات سیتولوژیکی میکروسپورها و دانه‌های گرده در طی روند نمو طبیعی و ارتباط بین طول جوانه گل و طول بساک صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که همبستگی بین طول جوانه گل و طول بساک معنی‌دار است ($r = 0.78, P < 0.001$). در بررسی‌های سیتولوژیکی مشخص شد که مسیر طبیعی نمو میکروسپور در گوجه‌فرنگی شامل سه فاز تقسیم میوز تا تشکیل تتراد، تفکیک تترادها و بلوغ میکروسپور به دانه‌گرده است که میکروسپورها در هر مرحله از لحاظ اندازه و خصوصیات مورفولوژیکی با هم متفاوت هستند. بیشترین فراوانی میکروسپورهای مرحله میوز تا اواسط مرحله میکروسپورهای تک‌هسته‌ای در جوانه‌های با طول ۴-۹ میلی‌متر مشاهده شد. بنابراین از این نتایج می‌توان برای تعیین زمان مناسب برداشت جوانه‌های گل در مطالعات القاء آندروژنز جهت انحراف میسر نمو طبیعی میکروسپورها به سمت مسیر اسپوروفیتی برای القاء کالوس یا القاء مستقیم جنین‌های هاپلوئیدی بهره جست.

واژه‌های کلیدی: القاء آندروژنز، نمو میکروسپور، هاپلوئیدی

مقدمه

زمان‌بر است (۱، ۲ و ۴). ایجاد فن‌آوری‌های کارآمد جدید نظیر تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف‌شده^۵ یک راه‌حل کارآمد و سریع برای تهیه لاین‌های خالص است. علاوه بر این گیاهان هاپلوئید در ژنتیک و مهندسی ژنتیک نیز دارای کاربردهای فراوانی از جمله اصلاح به روش موتاسیون، ایجاد نقشه‌های ژنتیکی بر پایه چندشکلی و انتقال ژن به لاین جنسی نر هستند (۳).

آندروژنز مهمترین منبع تولید گیاهان هاپلوئید در شرایط درون‌شیشه است که سبب انحراف گامت‌های نر نابالغ از مسیر تمایز طبیعی و قرار گرفتن در مسیر اسپوروفیتی می‌شود (۱۴). با وجود اهمیت بالای آندروژنز، در گوجه‌فرنگی هنوز دشواری‌های زیادی در این راه باقی مانده است. دلیل این امر ممکن است به خاطر سرسخت بودن این گیاه باشد (۲ و ۱۵). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که در القاء آندروژنز پنج عامل ژنوتیپ، مرحله نمو میکروسپور، شرایط رشدی گیاه مادری، پیش‌تیمار و ترکیبات محیط کشت موثر است (۱۸). ژنوتیپ و مرحله نمو میکروسپور نسبت به سایر عوامل دارای اهمیت

گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill) یکی از مهمترین محصولات سبزی و صیفی می‌باشد که علاوه بر مصارف خوراکی به عنوان یک گیاه مدل برای مطالعات سیتولوژیکی و سیتوژنتیکی استفاده می‌شود. تاکنون صدها وارته گوجه‌فرنگی با استفاده از روش‌های مدرن اصلاح نباتات معرفی شده‌اند. از میان این روش‌ها، تولید بذر هیبرید گوجه‌فرنگی به دلیل افزایش عملکرد و امکان محافظت طبیعی از حقوق به‌نژادگر بسیار مورد توجه مؤسسات تولید بذر سبزیجات قرار گرفته است. برای تولید بذر هیبرید نیاز به تولید لاین‌های خالص با قدرت ترکیب‌پذیری بالا می‌باشد که تولید این لاین‌ها با استفاده از روش‌های مرسوم نظیر خودگشنی پرهزینه و

۱، ۲ و ۳- 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)
۴-استادیار گروه پژوهشی بقولات، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد
DOI: 10.22067/jhorts4.v0i0.36609

بیشتری هستند (۲ و ۷).

گرفت. جوانه‌های گل در ساعات اولیه صبح جمع‌آوری و در داخل ظروف درب بسته حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. ابتدا جوانه‌های گل با اندازه ۷/۹-۲ میلی‌متر به ۶ گروه با تفاوت فاصله یک میلی‌متر گروه‌بندی شده و جوانه‌های هر گروه در پتری‌دیش‌های دارای کاغذ صافی مرطوب قرار داده شدند. سپس این جوانه‌ها به مدت حداقل ده دقیقه در یخچال قرار گرفتند.

به منظور بررسی همبستگی بین طول جوانه‌گل و طول بساک‌های داخل آن از داخل هر گروه سه جوانه‌گل به صورت تصادفی انتخاب و طول آنها محاسبه شد. در ادامه در زیر لوپ اقدام به جداسازی بساک‌ها نموده و طول بساک‌ها برای هر جوانه‌گل اندازه‌گیری شد. برای هر رقم طول ۶۰ بساک و در مجموع طول ۲۴۰ بساک مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور بررسی خصوصیات میکروسپورها و دانه‌های گرده در طی مسیر نمو طبیعی برای هر رقم ۱۰-۵ جوانه گل در هر فاصله طولی و از هر جوانه‌گل سه بساک جداسازی شد. بساک‌ها جهت رنگ‌آمیزی به مدت ۱۵ دقیقه در محلول رنگی استوکارمین ۴٪ قرار گرفتند. در ادامه پس از اسکواش کردن بساک‌ها، بررسی‌های لازم با میکروسکوپ‌های نوری تحقیقاتی المپیوس BX51 با بزرگنمایی شیئی 40X و 100X صورت پذیرفت.

به منظور تعیین فراوانی نسبی هر مرحله از توسعه میکروسپور و دانه‌گرده، حداقل ۱۰۰ میکروسپور به طور تصادفی در نقاط مختلف اسلایدهای تهیه شده شمارش شد. میانگین فراوانی نسبی مراحل مختلف پیش‌میوزی، میوزی، تتراد، میکروسپورهای جوان و پیر و دانه‌های گرده جوان و بالغ به همراه انحراف معیار آنها محاسبه شد. عکس‌برداری به کمک دوربین دیجیتال DP70 انجام گرفت. کلیه آنالیزها و رسم نمودار با استفاده از نرم‌افزار آماری JMP 8 صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

بررسی سیتولوژیکی نمو طبیعی میکروسپور

مرحله زمانی برداشت بساک‌ها برای القاء هاپلویدی بسیار حساس و تعیین‌کننده است. به منظور تعیین مرحله مناسب جهت انجام پیش‌تیمار، القاء جنین‌زایی و تغییر در مسیر نمو طبیعی میکروسپورها بایستی خصوصیات سیتولوژیکی آنها در مراحل مختلف تقسیم و نمو بررسی شود (۳). در اکثر تحقیقات انجام گرفته بر روی القاء آندروژنز در گوجه‌فرنگی نیز مرحله مناسب نمو میکروسپور بررسی شده است. نتایج در بیشتر تحقیقات نشان می‌دهد که فاصله زمانی بین تقسیم میوز تا اواسط مرحله میکروسپورهای تک‌هسته‌ای برای پاسخ به آندروژنز در این گیاه مناسب است. البته بایستی به این نکته توجه نمود که هر چند میکروسپورهای درون یک بساک در مراحل

مرحله نمو میکروسپور هنگامی که بساک‌ها جهت القاء کالوس در شرایط درون‌شیشه از جوانه گل جداسازی می‌شوند، بسیار حساس و تعیین‌کننده است. به عبارت بهتر انتخاب بساک‌ها در مرحله مناسبی از نمو میکروسپور اهمیت زیادی در فراوانی القاء کالوس دارد. این عامل بایستی در گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف گیاهی مورد ارزیابی قرار گیرد (۱۸). اثبات شده است که میکروسپورهای نهاندانگان فقط در صورتی که در یک دوره نمو معین کشت گردند، می‌توانند از مسیر نمو طبیعی خود منحرف شوند. به‌علاوه زمانی که دانه‌های گرده به مرحله نمو کامل میکروسپورها رسیده باشند، کالوس و یا گیاهیچه ایجاد نمی‌کنند (۸ و ۱۸). در بیشتر گونه‌های گیاهی، مرحله تتراد تا قبل از آغاز مرحله میکروسپورهای دوهسته‌ای مناسب‌ترین مرحله جهت القاء آندروژنز معرفی شده است (۷). طبق مطالعات انجام گرفته در گوجه‌فرنگی القاء آندروژنز ممکن است در مراحل مختلفی از نمو میکروسپور صورت بگیرد، اما مناسب‌ترین مرحله فاصله زمانی بین تقسیم میوز تا اواسط مرحله میکروسپورهای تک‌هسته‌ای است (۲). البته در تعیین دقیق مناسب‌ترین مرحله بایستی به رقم، نوع پیش‌تیمار و روش کشت در شرایط درون‌شیشه توجه نمود (۳ و ۱۹).

تعیین مرحله نمو میکروسپور و دانه‌های گرده با استفاده از داده‌های سیتولوژیکی سخت و وقت‌گیر می‌باشد، اما از روش‌های دیگر مثل داده‌های مورفولوژیکی بسیار دقیق‌تر است. تشخیص مرحله نمو براساس طول بساک یا طول جوانه‌گل در بسیاری از گونه‌ها قابل قبول است و ارزیابی نسبتاً دقیقی را از موقعیت نمو میکروسپورها ارائه می‌نماید. البته در صورت وجود همبستگی معنی‌دار بین طول بساک و طول جوانه‌گل می‌توان برای سهولت کار از معیار طول جوانه‌گل به جای طول بساک استفاده نمود (۱۰، ۱۶، ۱۸ و ۲۱). هدف از این تحقیق بررسی وجود ارتباط معنی‌دار بین طول جوانه‌گل و طول بساک و بررسی خصوصیات میکروسپورها در اندازه‌های مختلف طولی جوانه‌گل جهت تعیین مرحله مناسب نمو میکروسپور در چهار ژنوتیپ گوجه‌فرنگی است.

مواد و روش‌ها

بذور چهار رقم گوجه‌فرنگی با نام‌های موبیل هلند، بیکر، U. S. Agriseed و خرم در فاصله سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۲ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد کشت شدند. در طی دوره رشد عملیات داشت مطابق با نیاز گیاه به طور دقیق صورت پذیرفت و گیاهان در بهار و تابستان تحت شرایط نسبتاً کنترل شده و با شرایط دمایی روزانه $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ و شبانه $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ و تحت نور طبیعی رشد کردند. جمع‌آوری جوانه‌های گل جهت انجام آزمایشات در بازه زمانی ۴۰-۱۰ روز پس از شروع گلدهی برای هر رقم انجام

میکروسپورها رخ داده باشد که طی آن سلول رویشی و زایشی حاصل می‌شود و این اولین تقسیم میتوزی هسته هاپلوئید است. در این حالت اندازه دانه‌های گرده ۱۴ میکرون بود (شکل ۱، ۱۹). در طول مراحل بعدی تمایز دانه‌های گرده، سلول زایشی تقسیم شده تا دو گامت نر را به وجود آورد که در لقاح مضاعف درون کیسه جنینی نقش دارند.

نتایج در هر چهار رقم مورد مطالعه نشان داد که جوانه‌های گل با حدود ۳/۹-۲ میلی‌متری بیشترین فراوانی میکروسپورهای مراحل پیش از آغاز میوز را داشتند. جوانه‌های گل ۴-۴/۹ میلی‌متری بیشتر حاوی میکروسپورهای مرحله میوزی و تتراد بودند و در اندازه جوانه گل بیشتر از ۵ میلی‌متر میکروسپورهای جوان و پیر مشاهده شدند. فراوانی نسبی میکروسپورها و دانه‌های گرده در هر اندازه طولی جوانه گل در هر رقم مورد مطالعه به همراه انحراف معیار در جداول ۱، ۲، ۳ و ۴ آمده است. نتایج یافته‌های سیمارو و همکاران (۱۵) در بررسی رقم نر بارور گوجه‌فرنگی حاکی از آن است که جوانه‌های گل کمتر از ۴ میلی‌متر در مرحله پیش‌میوزی قرار دارند. جوانه‌های گل ۴-۵ میلی‌متر (حاوی بساک‌های ۳-۲ میلی‌متر) در مرحله میوزی، جوانه‌های گل ۶-۵ میلی‌متر در مرحله تتراد و اواخر میوز، جوانه‌های گل ۸-۶ میلی‌متر حاوی میکروسپورهای جوان و پیر و جوانه‌های گل بیش از ۸ میلی‌متر حاوی دانه‌های گرده بالغ هستند که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارند. اما یافته‌های سومرز و همکاران نشان داد که بساک‌های کمتر از ۳/۵ میلی‌متر در مرحله میوز تا اوایل مرحله تک‌هسته‌ای قرار دارند. این بساک‌ها در برخی ارقام در جوانه‌های گل ۳-۵ میلی‌متری و در برخی دیگر در جوانه‌های گل ۸-۳/۵ میلی‌متری قرار دارند که با نتایج حاصل از این آزمایش اختلاف دارند (۱۴).

مختلفی از نمو قرار دارند اما برای تعیین اندازه مناسب جوانه‌های گل، مشاهده سیتولوژیکی مراحل نمو میکروسپور و دانه گرده و فراوانی نسبی این مراحل از اهمیت زیادی برخوردار است.

در این تحقیق نتایج حاصل از بررسی سیتولوژیکی نمو میکروسپورها نشان داد در ابتدا سلول‌های مادر میکروسپور که دایره‌ای شکل با اندازه حدود ۸ میکرون هستند (شکل ۱، ۱) تقسیمات میوز I و میوز II را انجام دادند. سلول‌های در حال تقسیم به شکل چندوجهی با اندازه ۹-۱۲ میکرون بودند (شکل ۱، ۲-۹). میکروسپورهای هاپلوئید که بدین طریق تشکیل شدند، در ابتدای مسیر و قبل از ایجاد دیواره بین سلولی در داخل دیواره ضخیم تتراد به شکل دایره مانند قرار داشتند و اندازه آنها حدود ۱۵ میکرون بود (شکل ۱، ۱۰). در ادامه این روند، بین سلول‌های حاصل از تقسیم میوز، دیواره سلولی تشکیل شد و در این حالت اندازه آنها به ۱۷-۱۹ میکرون رسید (شکل ۱، ۱۱-۱۲). پس از پاره شدن دیواره تتراد، میکروسپورهای جوان با اندازه حدود ۹-۱۰ میکرون که در ابتدای مرحله تک‌هسته‌ای بودند ایجاد شدند. در این حالت میکروسپورهای جوان فاقد هرگونه لوب و به صورت دایره‌ای شکل بودند (شکل ۱، ۱۳-۱۴).

در طی مسیر تکوین دانه گرده، دیواره میکروسپور حالت لوب‌دار پیدا کرد و بر مقدار اگزین دیواره سلولی افزوده شد تا به تدریج میکروسپورهای مراحل اواسط و اواخر تک‌هسته‌ای با اندازه ۱۳-۱۲ میکرون با سه لوب شکل گرفتند (شکل ۱، ۱۷-۱۵). به تدریج بر تعداد لوب‌های دانه گرده افزوده شد، به طوری که در زمان بلوغ دیواره‌های پنج تا شش لوبی تشکیل شدند که در پراکنش دانه گرده نقش دارند. در این حالت اندازه دانه‌های گرده ۱۴ میکرون بود (شکل ۱، ۱۸). احتمالاً در همین زمان بایستی تقسیم نامتقارن هسته

جدول ۱- درصد توزیع مراحل توسعه میکروسپور / دانه گرده در اندازه‌های مختلف طولی جوانه گل در رقم Mobil-Netherlands

Table 1- Distribution of microspore / pollen development percentage at different flower bud length sizes of the tomato cv. Mobil-Netherlands

طول جوانه گل Flower buds length (mm)	مرحله توسعه Development stage				
	پیش میوزی Pre-meiotic	میوزی Meiotic	تتراد Tetrad	میکروسپور جوان و پیر Young and late microspores	دانه گرده جوان و بالغ Young and mature pollen.
2-2.9	100 ± 0	-	-	-	-
3-3.9	77.7 ± 3.9	22.2 ± 3.9	-	-	-
4-4.9	6.36 ± 1.9	78.3 ± 3.2	15.2 ± 2.8	-	-
5-5.9	-	17.7 ± 3.6	5.6 ± 2.2	63.5 ± 4.6	13 ± 3.2
6-6.9	-	-	-	-	100 ± 0
7-7.9	-	-	-	-	100 ± 0

جدول ۲- درصد توزیع مراحل توسعه میکرواسپور / دانه گرده در اندازه‌های مختلف طولی جوانه گل در رقم Baker

Table 2- Distribution of microspore / pollen development percentage at different flower budlength sizes of tomato cv.Baker

طول جوانه گل Flower buds length (mm)	مرحله توسعه Development stage				
	پیش میوزی Pre-meiotic	میوزی Meiotic	تتراد Tetrad	میکرواسپور جوان و پیر Young and late microspores	دانه گرده جوان و بالغ Young and mature pollen
2-2.9	100 ± 0	-	-	-	-
3-3.9	64.2±4.5	35.7±4.5	-	-	-
4-4.9	17.3± 3.8	68.3 ± 4.7	14.2±3.5	-	-
5-5.9	-	42.1± 4.8	-	43.1±4.9	14.7 ±3.5
6-6.9	-	-	-	29.6±6.2	70.3± 6.2
7-7.9	-	-	-	-	100 ±0

جدول ۳- درصد توزیع مراحل توسعه میکرواسپور / دانه گرده در اندازه‌های مختلف طولی جوانه گل در رقم خرم

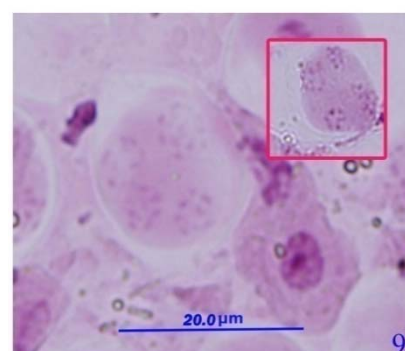
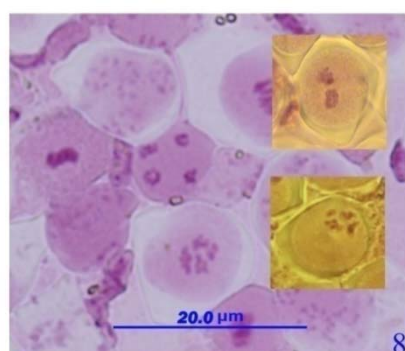
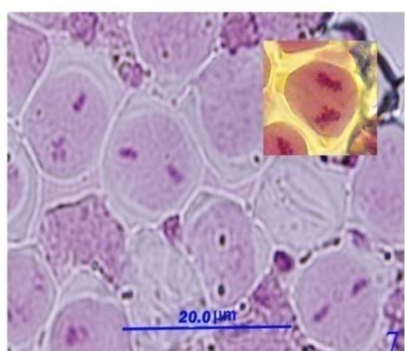
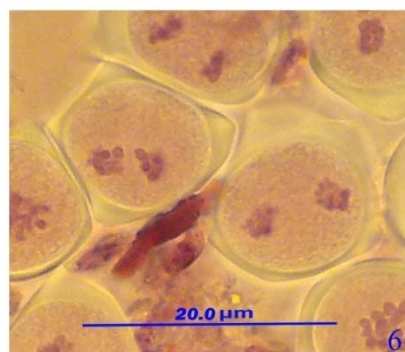
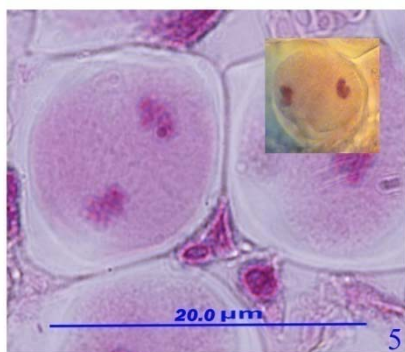
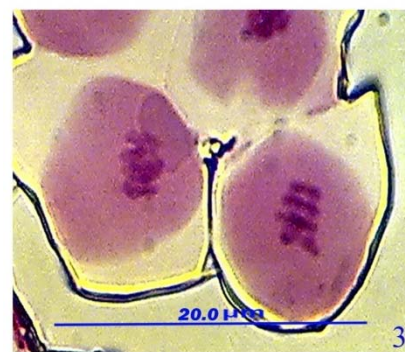
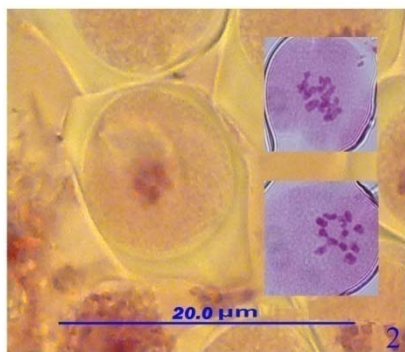
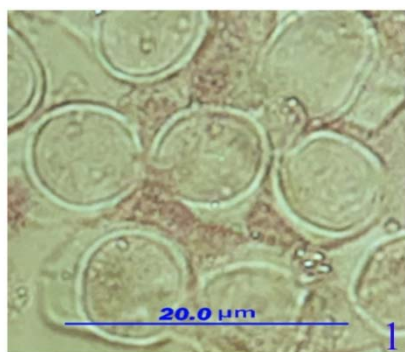
Table 3- Distribution of microspore / pollen development percentage at different flower budlength sizes of tomato cv.Khoram

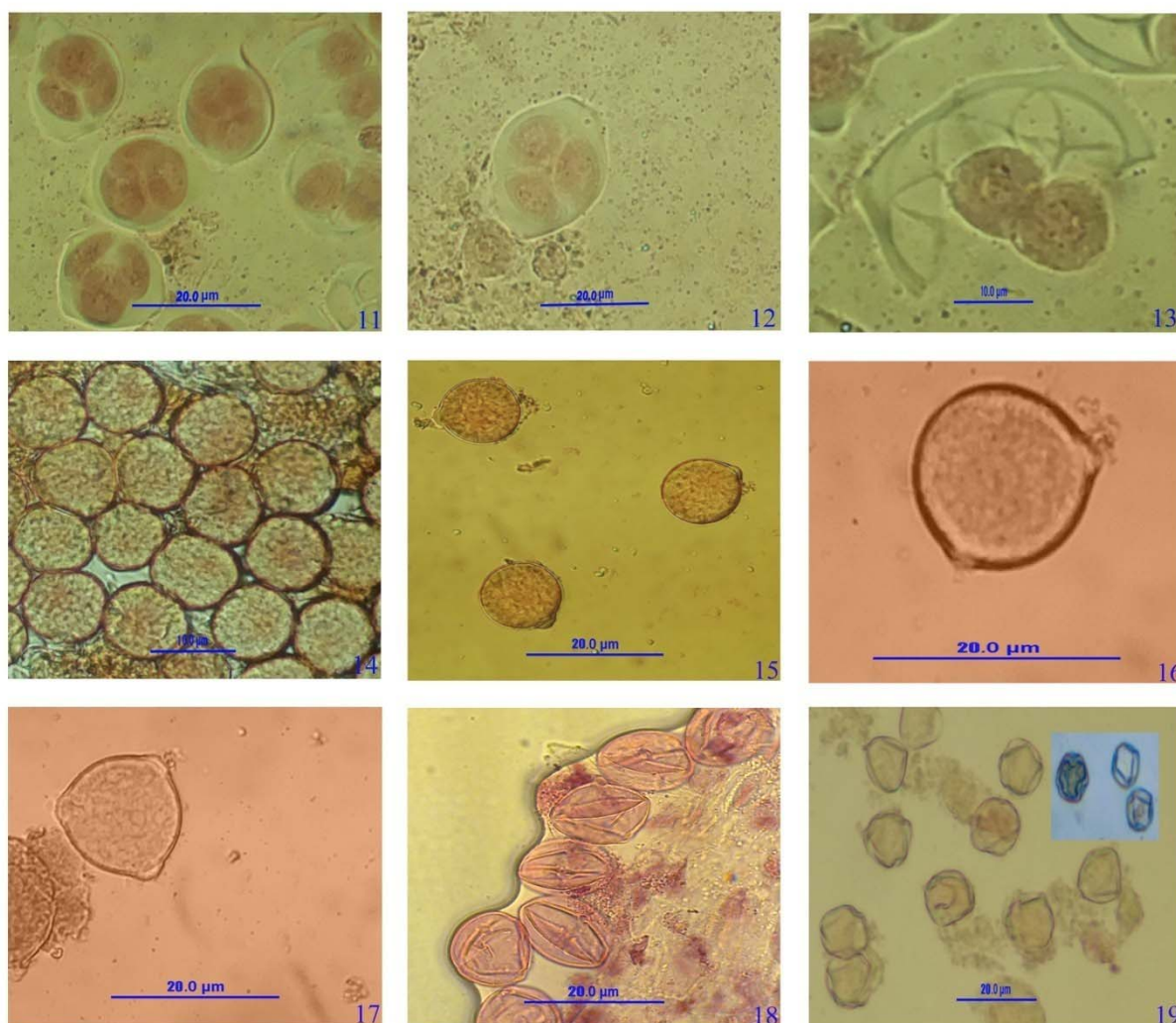
طول جوانه گل Flower buds length (mm)	مرحله توسعه Development stage				
	پیش میوزی Pre-meiotic	میوزی Meiotic	تتراد Tetrad	میکرواسپور جوان و پیر Young and late microspores	دانه گرده جوان و بالغ Young and mature pollen
2-2.9	100 ± 0	-	-	-	-
3-3.9	69.9±3.9	29.1±3.9	-	-	-
4-4.9	4.8± 1.2	85.9 ± 2.1	9.22±1.7	-	-
5-5.9	-	15.5± 2.6	-	84.4±2.6	-
6-6.9	-	-	-	91.6±2.4	8.39± 2.4
7-7.9	-	-	-	-	100 ±0

جدول ۴- درصد توزیع مراحل توسعه میکرواسپور / دانه گرده در اندازه‌های مختلف طولی جوانه گل در رقم U. S. Agriseed

Table 4- Distribution of microspore / pollen development percentage at different flower budlength sizes of tomato cv. U. S. Agriseed

طول جوانه گل Flower buds length (mm)	مرحله توسعه Development stage				
	پیش میوزی Pre-meiotic	میوزی Meiotic	تتراد Tetrad	میکرواسپور جوان و پیر Young and late microspores	دانه گرده جوان و بالغ Young and mature pollen
2-2.9	100 ± 0	-	-	-	-
3-3.9	26.6±3.8	73.3±3.8	-	-	-
4-4.9	16.1± 3.8	62.3 ± 5.0	-	21.5±4.2	-
5-5.9	-	32.4± 4.3	-	52.6±4.6	14.9 ±3.3
6-6.9	-	-	-	21.5±4.2	78.4± 4.2
7-7.9	-	-	-	-	100 ±0





شکل ۱- مراحل مختلف تقسیم و نمو طبیعی میکرواسپور در گوجه فرنگی. ۱) مرحله پیش میوزی؛ ۲-۹) مراحل مختلف تقسیم شامل پروفاز، متافاز، آنافاز و تلوفاز میوز I و II؛ ۱۰) سلول آغازین تتراد؛ ۱۱-۱۲) سلولهای تتراد رنگ آمیزی شده که دیواره بین سلولی در آنها تشکیل شده است؛ ۱۳-۱۴) میکرواسپورهای ابتدای تک هسته‌ای؛ ۱۵-۱۷) میکرواسپورهای انتهایی تک هسته‌ای؛ ۱۸-۱۹) افزوده شدن تعداد لوب‌ها و اولین میتوز هاپلوئید. Figure 1- Steps of tomato microspore division and development. 1) Pre-meiotic; 2-9) Stages of prophase, metaphase, anaphase and telophase of meiosis I and II; 10) Tetrad early cells; 11-12) Stained tetrad cells, with developed cell walls; 13-14) Early stage of the mononuclear microspore; 15-17) Late stage of mononuclear microspores; 18-19) Added to the number of lobes and the first haploid mitosis.

جدا می‌شود که در این حالت میکرواسپورها دایره‌ای شکل هستند. طی مرحله بلوغ به تدریج بر تعداد لوب‌های دیواره میکرواسپور افزوده می‌شود. در نهایت در کلزا و ذرت دانه‌های گرده بالغ با پنج تا شش لوب شکل می‌گیرند. اما در سورگوم دانه‌های گرده با سه لوب ایجاد می‌شود.

به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های ساندرلند (۱۲) مطابقت دارد. وی بیان کرد در اکثر گیاهان سه فاز در مسیر گامتزایی طبیعی وجود دارد. فاز اول با تقسیم میوز آغاز شده و تا تشکیل تتراد ادامه می‌یابد. در فاز دوم تفکیک تترادها صورت می‌گیرد

نتایج بررسی سیتولوژیکی نمو میکرواسپور در برخی گیاهان مانند کلم (۲۰) و نارگیل (۱۲) نشان داده است که میکرواسپورها فقط در مراحل ابتدایی میوز I حالت چند وجهی دارند و در سایر مراحل میوز به حالت دایره‌ای شکل هستند. یافته‌های سیتولوژیکی در بسیاری از گیاهان دیگر مانند کلزا (۲)، ذرت (۶) و سورگوم (۱۱) نشان می‌دهد که میکرواسپورها از بین مسیرهای ممکن در میکرواسپوروز، مسیر طبیعی تشکیل دانه گرده را در پیش می‌گیرند. طی این روند سلول‌های میکرواسپور در فرایند میوز و قبل از آن حالت چند وجهی دارند. سپس هسته میکرواسپورهای تک هسته‌ای از سلول‌های تتراد

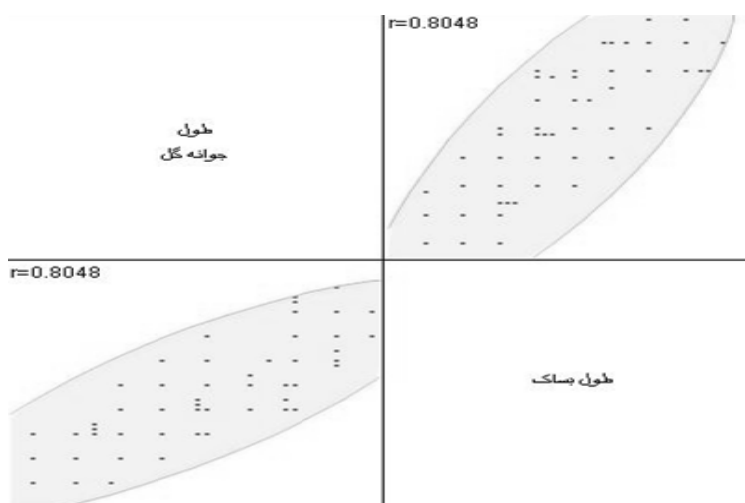
و میکروسپیورهای انفرادی ایجاد می‌شود. فاز سوم نیز شامل بلوغ هر یک از میکروسپیورها به دانه گرده می‌باشد.

همبستگی بین طول جوانه گل و طول بساک

در مطالعات آندروژنز پس از تعیین مرحله مناسب نمو میکروسپیور، جهت سهولت و تسریع از معیارهای طول جوانه گل و یا طول بساک جهت کشت در شرایط درون شیشه استفاده می‌شود. هر چند طول بساک نسبت به طول جوانه گل همبستگی بالاتری با مرحله نمو میکروسپیور دارد و از این جهت معیار ارزشمندتری به نظر می‌رسد، اما معایبی همچون طولانی بودن زمان اندازه‌گیری طول بساک، مشکلات تکنیکی همچون سخت شدن و پیچیدگی فرایند استریل سازی ریزنمونه را نیز به همراه دارد. بنابراین در برخی گیاهان با گل‌های ریز، استفاده از معیار طول جوانه گل به جای طول بساک توصیه می‌شود. البته استفاده از این معیار زمانی امکان‌پذیر است که همبستگی معنی‌داری بین طول بساک و طول جوانه گل وجود داشته باشد (۲، ۹، ۱۰ و ۲۱).

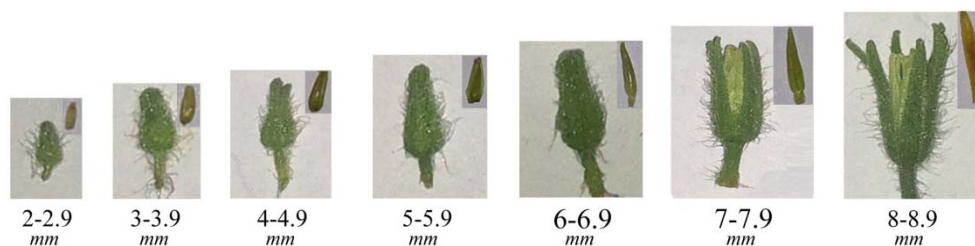
در مطالعه حاضر نتایج بررسی ارتباط بین طول جوانه گل و طول بساک در هر یک از چهار رقم موبیل‌هلند، بیکر، خرم و U. S. Agriseed نشان داد که همبستگی معنی‌داری بین طول بساک و طول جوانه گل وجود دارد. از آنجا که میزان همبستگی در بین ارقام

مورد مطالعه با هم اختلاف معنی‌داری نداشت، لذا ابتدا داده‌ها با هم ادغام شده و سپس همبستگی میان طول جوانه گل و طول بساک محاسبه شد. نتایج در ارقام مورد مطالعه نشان داد که میزان همبستگی بین طول بساک و طول جوانه گل در این چهار رقم گوجه‌فرنگی ۸۰٪ می‌باشد. این همبستگی در سطح بالایی (۰/۰۰۰۱ < P) معنی‌دار بود (شکل ۲). به عبارت دیگر در این ارقام گوجه‌فرنگی می‌توان به جای استفاده از طول بساک جهت تعیین بساک‌های مناسب برای کشت در شرایط درون شیشه، از معیار طول جوانه گل استفاده نمود (شکل ۳). آزمایشات کسپر بائور و ویلسون (۹) در توتون و ین و همکاران (۱۰) در سویا نیز نشان داد که می‌توان از معیار طول جوانه گل برای انتخاب بساک‌های مناسب جهت کشت در شرایط درون شیشه استفاده نمود. اما آزمایشات توماسی و همکاران (۱۶) در برخی گیاهان خانواده شب‌بو مثل *Lesquerella fendleri* حاکی از آن بود که پارامترهای زیادی سبب می‌شوند تا همبستگی بین طول جوانه گل و طول بساک پایین باشد (۱۰). در گوجه‌فرنگی سومرز و همکاران (۱۳) بیان نمودند که این همبستگی در ارقام مختلف ممکن است متفاوت بوده و حتی در برخی ارقام این همبستگی وجود نداشته باشد. نتایج بررسی‌های این محققان نشان داد که در برخی ارقام گوجه‌فرنگی به شرط وجود همبستگی معنی‌دار بین طول جوانه گل و طول بساک می‌توان از معیار طول جوانه گل استفاده نمود.



شکل ۲- نمودار نقاط پراکنده همبستگی بین طول جوانه گل و طول بساک گوجه‌فرنگی

Figure 2- Scatterplot of correlation between the tomato flower bud and anthers length



شکل ۳- جوانه‌های گل و بساک‌های موجود در آن‌ها در اندازه‌های مختلف طولی در گوجه‌فرنگی

Figure 3- Different size of Flower buds and anthers in tomatoes

نتیجه‌گیری کلی

فراوانی نسبی میکروسپورهای میوزی تا اواسط تک‌هسته‌ای جهت کشت در شرایط درون‌شیشه‌ای مناسب است. روند نمو میکروسپور نیز نشان داد که مسیر گامت‌زایی طبیعی در این چهار رقم گوجه‌فرنگی سه فاز دارد و در هر فاز اندازه میکروسپورها و خصوصیات ظاهری آن‌ها متفاوت است. از این یافته می‌توان برای تعیین مرحله مناسب جهت انجام پیش‌تیمار، تغییر در روند نمو طبیعی میکروسپور و القاء جنین‌زایی استفاده نمود.

براساس نتایج حاصل از این تحقیق به دلیل وجود همبستگی معنی‌دار بین طول جوانه گل و طول بساک می‌توان از معیار طول جوانه‌گل به جای طول بساک برای تعیین میکروسپورهای مناسب جهت کشت در شرایط درون‌شیشه استفاده نمود. نتایج بررسی‌های سیتولوژیکی در اندازه‌های مختلف طولی جوانه‌گل در چهار رقم مورد مطالعه نشان داد که اندازه جوانه‌گل بین ۴-۴/۹ میلی‌متری (حاوی بساک‌هایی با طول تقریبی ۳-۴ میلی‌متر) به دلیل داشتن بالاترین

منابع

- Bal U., and Abak K. 2005. Induction of symmetrical nucleus division and nucleus multicellular structures from the isolated microspores of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 19(1):35-42.
- Bal U., and Abak K. 2007. Haploidy in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Euphytica*, 158:1-9.
- EnayatiShariatpanahi M., and Emami Meybodi D. 2009. Microspore: a haploid cell with various applications in genetics and plant breeding. *Modern Genetics Journal*, 4(3):5-16. (in Persian)
- EnayatiShariatpanahi M., and Herbele-Bros E. 2009. Induction of embryogenesis in microspores of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Microtom. *Seed and Plant Production Journal*, 25-2(3):315-328. (in Persian)
- Forster B.P., and Thomas W.T. 2003. *Doubled haploids in genetic mapping and genomics*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Goralski G., Rozier F., and Matthys E. 2004. Cytological features of various microspore derivatives appearing during culture of isolated maize microspores. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47(1):75-83.
- Jain S. M., Sopory S. K., and Villeux R. E. (eds). 1997. *In vitro* haploid production in higher plants. Vol. 1, kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Jain S. M., Sopory S. K., and Villeux R. E. (eds). 1997. *In vitro* haploid production in higher plants. Vol. 5, kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Kasperbauer M. J., and Wilson H. M. 1979. Haploid plant production and use. In: Durbin R. D. (eds). *Nicotiana procedures for experimental use*. Washington, United States Department Of Agriculture Technical Bulletin, 1586:33-39.
- Lauxen M., Kaltchuk-Santos E., Ching-yeh H., and Callegari-Jacques S. M. 2003. Association between floral bud size and developmental stage in soybean microspores. *Brazilian Archives Of Biology And Technology* 46:515-520.
- Marina I., Tsvetova L., and Elkonin A. 2013. Cytological investigation of pollen development in sorghum line with male sterility induced by sodium ascorbate in tissue culture. *American Journal of Plant Sciences* 4:11-18.
- Perera P. I. P. 2003. Cytological examination of microspore development for microspore and anther culture of coconut (*Cocos nucifera* L). Printed in Sri Lanka, Cocos, 15:53-59.
- Summers W. L., Jaramillo T. B. 1992. Microspore developmental stage and anther length influence the induction of tomato anther callus. *Horticultural Science* 27:838-840.
- Segui-Simarro J. M., and Nuez F. 2008. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. *Cytogenet Genome Research* 120:358-369.

- 15-Segui-Simarro J.M., and Martinez P. 2011. Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops (a Review). *Plant Cell Reports* 30:765-778.
- 16-Tomasi P., Dierig D. A.; Backhaus R. A. and Pigg K. B. 1999. Floral bud and mean petal length as morphological predictors of microspore cytological stage in *Lesquerella*. *Horticulture Science*, 34:1269-1270.
- 17-Touraev A., and Heberle-Bors E. 2005. Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. *Planta* 219:141-146.
- 18-Touraev A., Brian P., and Mohan S. (eds). 2009. *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer Science.
- 19-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* 18:312-317.
- 20-Zhijun L. I., Yanrong Z., and Chunyan L. I. 2009. Cytological observation of the microspore development of chinese kale and false pakchoi. *Agricultural China* 3(1):24-28.
- 21-Zhao D. X., Yang X., Yan-Chen H. and Sheng W.H. 2013. Cytological investigation of anther development in DGMS line shaan-GMS in (*Brassica napus* L). *Czech J. Genetics Plant Breeding*, 49:16-23.