مجله به‌زراعی نهال و بذر
جلد ۲-۲۵ ، شماره ۳، سال ۱۳۸۸

# القای جنین‌زایی میکروسپور در گوجه‌فرنگی (*Lycopersicum esculentum* Mill) رقم میکروتوم

# Induction of Embryogenesis in Microspores of Tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill) cv. Microtom

مهران عنایتی شریعت پناهی[۱]، آلیشر تورائیف[۲] و اروین هبرل برز[۳]

۱- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی، کرج.

۲ و ۳- استاد مرکز بیولوژیکی وین، اتریش.

**تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۷/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۴/۲۵**

## چکیده

**عنایتی شریعت پناهی، م.، تورائیف، آ.، و هبرل برز، ا. ۱۳۸۸.** القای جنین‌زایی میکروسپور در گوجه‌فرنگی (*Lycopersicum esculentum* Mill) رقم میکروتوم. **مجله به‌زراعی نهال و بذر ۲-۲۵ (۲):** ۳۲۸ - ۳۱۵.

**روش به‌نژادی هاپلوییدی کارآمدترین و سریع‌ترین روش جهت تهیه لاین‌های خالص می‌باشد. در این تحقیق، روش کشت میکروسپور به منظور توسعه پروتکل جنین‌زایی مطالعه گردید. اثر تنش‌های مختلف شامل سرما، گرما، گرسنگی و کلشیسین بر روی القای جنین‌زایی میکروسپور بررسی شد. میکروسپورها در مراحل مختلف نموی از غنچه‌های گل ضدعفونی شده، جدا گردیده و در محیط AT3 یا B ، با و یا بدون کلشی‌سین، در درجه حرارت‌های مختلف و زمان‌های متفاوت کشت شدند. بعد از اعمال تنش، میکروسپورها به محیط تغییر یافته AT3 تکمیل شده با تنظیم کننده‌های رشدی انتقال یافته و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی نگهداری شدند. نتایج نشان داد که مرحله نموی انتهای تک هسته‌ای میکروسپور، محیط B و روش همزن مغناطیسی به ترتیب مناسب‌ترین مرحله، محیط و روش جداسازی میکروسپورها بودند، ضمنا تیمار کلشی‌سین ($۲۵\ ^{\mu M}$) به همراه تنش درجه حرارت پائین (۴ °C) به مدت ۷۲ ساعت باعث القاء جنین‌زایی و تقسیمات اسپوروفیتی در بیش از ۳۵ درصد از میکروسپورهای کشت شده و نهایتاً تشکیل کالوس و ساختارهای جنینی گردید.**

**واژه‌های کلیدی: گوجه‌فرنگی، کشت میکروسپور، جنین‌زایی، کلشی‌سین، هاپلویید**

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: shariatpanahi@abrii.ac.ir

**مقدمه**

گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill) از مهم‌ترین محصولات سبزی و صیفی می‌باشد که علاوه بر مصرف خوراکی، به عنوان گیاه مدل نیز جهت مطالعات سیتولوژیکی و سیتوژنتیکی استفاده می‌شود. تاکنون صدها واریته گوجه‌فرنگی با استفاده از روش‌های اصلاح نباتات مدرن معرفی شده است. از میان این روش‌ها، تولید بذور هیبرید $F_1$ بدلیل افزایش معنی‌دار در عملکرد میوه، قیمت بالا و امکان محافظت طبیعی از حقوق به‌نژادگر، کارآمدترین و جذاب‌ترین فن‌آوری برای موسسات تولید بذر سبزیجات می‌باشد. اصلاح بذور هیبرید $F_1$ علاوه بر استفاده از روش‌های ایجاد نر عقیمی و برگرداننده نر باروری، به دسترسی تجاری به لاین‌های اینبرد نیز وابسته است. برای ایجاد لاین‌های اینبرد معمولاً از روش‌های پرهزینه و زمان بر نظیر خودگشنی استفاده می‌شود. ایجاد فن‌آوری‌های کارآمد جدید نظیر هاپلوئیدهای مضاعف شده (دابلد هاپلوییدها) می‌تواند یک راه حل کارآمد و سریع برای تهیه لاین‌های خالص باشد. متاسفانه علیرغم اهمیت این فن‌آوری، تاکنون پروتکل قابل اعتماد و تکرارپذیری برای تولید لاین‌های دابلد هاپلویید در گوجه‌فرنگی ارایه نشده است. در پاره‌ای از تحقیقات، کشت بساک گوجه‌فرنگی منجر به تولید کالوس (Gresshoff and Doy, 1972; Sharp *et al*., 1972) و در موارد نادر شاخه‌زایی با سطوح مختلف پلوییدی شده که در مراحل اولیه از بین رفته‌اند و گیاه دابلد هاپلوییدی تولید نشده است (Jaramillo and Summer, 1991; Brasileiro *et al.*, 1999). البته محققان دیگر موفق به باززایی گیاهان کامل گردیده‌اند (Ziv *et al.*, 1982; zagorska *et al.*, 1998; Sharp *et al.*, 2004) ولی اکثراً دارای سطوح پلوییدی غیر نرمال و یا ناهنجاری‌های کروموزومی بودند و ضمناً منشاء میکروسپوری آنها نیز تایید نشده است. اثر ترکیبات محیط کشت مانند عناصر میکرو و ماکرو و تنظیم‌کننده‌های رشد بر القای جنین‌زایی میکروسپور نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Gresshoff and Doy, 1972; Sharp *et al.*, 1972). القای جنین‌زایی میکروسپور در گوجه‌فرنگی توسط فاکتورهای زیادی کنترل می‌شود و هنوز پروتکلی که حتی در یک ژنوتیپ تکرارپذیر باشد و نتایج مشابهی را ایجاد نماید، شناسایی نشده است. هدف تحقیق حاضر بررسی امکان ایزوله کردن میکروسپورهای زنده و القای جنین‌زایی در میکروسپورهای جدا شده گوجه‌فرنگی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها**

رقم گوجه‌فرنگی میکروتوم (Microtom) بدلیل دوره رشدی کوتاه تا گلدهی, تولید بوته‌های کوچک و مناسب بودن برای کشت در داخل فیتوترون، مورد استفاده قرار گرفت.

گیاهان در فیتوترون با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰ درصد و روشنایی ۱۶ هزار لوکس پرورش داده شدند. اولین مرحله مهم در جنین‌زایی میکروسپور، جداسازی میکروسپورهای زنده تحت شرایط استریل است. ضدعفونی سطحی مطلوب بایستی باعث محافظت بافت‌های تیمار شده در برابر تمامی آلودگی‌ها و زنده نگه داشتن آن‌ها شود. بدین منظور از ترکیبات اتانول (۷۰ و ۹۰٪ به مدت ۱۰ ثانیه، ۳۰ ثانیه، ۱ و ۲ دقیقه)، هیپوکلریت سدیم (۵٪ و ۱۰٪ به مدت ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه) و آب اکسیژنه (۱۰ و ۳۰٪ به مدت ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه) جهت استریل کردن غنچه‌های گوجه‌فرنگی استفاده شد. دو روش جداسازی شامل له‌کردن غنچه‌ها و همزن مغناطیسی جهت جداسازی میکروسپورها از غنچه‌های گوجه‌فرنگی با دو تیمار محیط کشت گرسنگی و غنی بکار برده شد. در محیط کشت گرسنگی B (Kyo and Harada, 1986) از کربوهیدراتهای غیر قابل تجزیه مانیتول و سوربیتول به میزان ۰/۳ و ۰/۶ و ۰/۹ مولار و در محیط غنی از کربوهیدرات قابل تجزیه مالتوز و ساکارز به میزان ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ مولار استفاده گردید.

میکروسپورها با له‌کردن بساک‌های غنچه به طول تقریبی ۵-۴ میلی‌متر, در محیط کشت به وسیله نوک تیپ پایپتور و عبور از غربال ۴۰$^{\mu m}$ جدا گردیدند. میکروسپورهای جدا شده در محیط AT3 (Touraev and Heberle-Bors, 1999) یا محیط گرسنگی B، با و بدون کلشی‌سین و در درجه حرارت‌های مختلف با دوره‌های زمانی متنوع کشت شدند.

به منظور بررسی اثر تنش در تغییر برنامه میکروسپورها به سمت جنین‌زایی، پیش تیمارهای درجه حرارت بالا(۳۳ درجه سانتی‌گراد)، درجه حرارت پائین ا(۴ درجه سانتی‌گراد)، گرسنگی (محیط فقیر B از نظر منابع نیتروژن و کربوهیدرات) و کلشی‌سین (۲۵ $^{\mu M}$) به تنهایی و یا به صورت ترکیبی شامل درجه حرارت پائین و گرسنگی و همچنین درجه حرارت پائین وکلشی‌سین مستقیماً بر روی میکروسپورهای جدا شده اعمال گردیدند. تشکیل هسته‌های با اندازه برابر، همان‌طور که قبلاً در گونه‌های دیگرنیز توصیه شده است (Aionesei *et al.*, 2005) بعنوان نشانگر جهت تغییر برنامه میکروسپورها به سمت جنین‌زایی مورد استفاده قرار گرفت.

تنش‌های مورد اشاره بعنوان تیمار در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. صفات مورد ارزیابی شامل فراوانی تقسیمات متقارن ( Symmetrical divisions)یا اسپوروفیتی در میکروسپورها شامل متقارن دوسلولی، متقارن سه‌سلولی و متقارن چند سلولی، فراوانی تقسیمات نامتقارن (Asymmetrical divisions) یا گامتوفیتی در میکروسپورها، فراوانی میکروسپورهای مرده و فراوانی میکروسپورهای تک‌هسته‌ای بود. فراوانی ساختارهای چند سلولی

(Multi-cellular structures) منتج از میکروسپور بعد از گذشت سه هفته از کشت از طریق رنگ‌آمیزی با ماده رنگی اختصاصی DAPI (4', 6-diamidino-2-Phenylindole) تعیین گردید. داده‌های ارایه شده در این مقاله، میانگین با انحراف معیار (Means ± SD) حاصل از چهار تکرار می‌باشند. میانگین هر تکرار از حداقل چهار نمونه مختلف منتج شده است. برای هر نمونه حداقل ۶۰۰ میکروسپور شمارش گردید. تجزیه واریانس بر اساس موازین طرح آماری مورد استفاده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام گرفت.

**نتایج و بحث**

**الف) بهینه‌کردن ضدعفونی سطحی غنچه‌های گوجه‌فرنگی و جداسازی میکروسپورهای زنده**

نتایج نشان داد که بیشترین فراوانی میکروسپورهای زنده (بیش از ۷۰ درصد) از غنچه‌های ضدعفونی شده با محلول $H_2O_2$ (۱۰٪) بمدت ۱۰ دقیقه که در یک میلی‌لیتر محیط کشت گرسنگی B (شامل ۰/۳ مولار مانیتول) در داخل تیوب‌های اپندورف با استفاده از نوک تیپ پایپتور له شدند، بدست آمد. ضدعفونی غنچه‌های گوجه‌فرنگی با اتانول به طور موفقیت‌آمیزی در گونه‌هایی نظیر گندم, جو و تنباکو استفاده شده است و هیپوکلریت‌سدیم نیز به طور گسترده در غلات و بسیاری از دو لپه‌ایها مورد استفاده قرار گرفته است. این در حالی است که استفاده از اتانول و هیپوکلریت سدیم برای میکروسپورهای گوجه‌فرنگی مضر بود و باعث کاهش زنده‌مانی آنها شد. روش همزن مغناطیسی با سرعت پایین و زمان کوتاه باعث عدم رهاسازی میکروسپورهای بساک و در سرعت بالا موجب افزایش میکروسپورهای مرده شد. به علاوه از کشت تک غنچه جهت دستیابی به جمعیت‌های هموژن از گل‌های گوجه‌فرنگی با اندازه یکسان استفاده شد.

**ب) اثر تنش‌های حرارتی و گرسنگی بر القای تقسیمات اسپروفیتی در کشت میکروسپور گوجه‌فرنگی**

به منظور بررسی اثر تنش در تغییر رفتار میکروسپورها به سمت جنین‌زایی و ایجاد میکروسپورهای جنین‌زا، ابتدا تنش‌های متداول شامل درجه حرارت بالا (۳۳ درجه سانتی‌گراد)، درجه حرارت پائین (۴ درجه سانتی‌گراد) و گرسنگی (محیط B) به تنهایی و یا به صورت ترکیبی بر روی میکروسپورهای جدا شده اعمال گردید (جدول ۱). در گیاهان مختلف گزارش گردیده که میکروسپورها می‌توانند زمانی که تحت تنش قرار می‌گیرند، از مسیر گامتوفیتی خود خارج شده و وارد فاز القای جنین‌زایی شوند (Nitsch and Norreel, 1972; Touraev *et al.*, 1997). بدین منظور برخی از تنش‌ها مانند تنش‌های حرارتی و گرسنگی با موفقیت در بسیاری از گونه‌های گیاهی به کار رفته‌اند

(Shariatpanahi *et al.*, 2006). در گوجه‌فرنگی گزارشات کمی مبنی بر بررسی برخی از تنش‌ها در القای میکروسپورهای جنین‌زا وجود دارد (Shtereva *et al.*, 1998; Brasileiro *et al.*, 1999) . در این تحقیق، تفاوت معنی‌داری بین تنش‌های درجه حرارت پائین، درجه حرارت بالا و گرسنگی در مقایسه با شاهد (بدون تنش) از نظر فراوانی میکروسپورهای دارای تقسیمات متقارن یا اسپوروفیتی مشاهده نگردید (جدول ۱). تنها زمانی که شوک حرارتی بر روی میکروسپورها اعمال شد، ساختارهای سه هسته‌ای با اندازه برابر مشاهده گردید که موفق به ادامه تقسیم و تشکیل ساختارهای چند سلولی نشدند (جدول ۱). تنش گرسنگی به تنهایی هیچ اثری نداشت. تنش درجه حرارت پائین به تنهایی و یا در ترکیب با تنش گرسنگی باعث افزایش سلولهای زنده شد، اما اثر معنی‌داری بر روی القای تقسیمات اسپروفیتی نداشت (جدول ۱). نتایج تحقیق حاضر نتایج تحقیقات قبلی مبنی بر کم تاثیر بودن تنش‌های مرسوم شامل درجه حرارت پائین، درجه حرارت بالا و پرتوتابی در القای ساختارهای چند سلولی و جنین‌زایی را در میکروسپور تایید می‌نماید، هر چند تحقیقات گذشته عمدتاً از طریق کشت بساک بوده و به جای جنین، کالوس تولید گردید و در صد بالایی از گیاهان باززایی شده از کالوس‌ها، منشا سوماتیکی و غیر از میکروسپور داشتند (Shtereva *et al.*, 1998; Brasileiro *et al.*, 1999) و اطلاعاتی در خصوص نحوه تاثیر مستقیم تنش بر تقسیم میکروسپورها در گوجه‌فرنگی تاکنون در دسترس نبوده است. در برخی از گزارشات نشان داده شده است که برخی تنش‌ها بر روی میکروسپورهای جدا شده در القای جنین‌زایی موثر تر از تیمار بر روی بساک، غنچه گل و یا در سطح گیاه می‌باشند (Touraev and Heberle-Bors, 1999).

تیمار دمای پائین سنبله‌های جدا شده و غنچه‌های گل باعث القای جنین‌زایی میکروسپور در جو، برنج، گندم نان، گندم دوروم، تریتیکاله و مرکبات شدند (Touraev *et al.*, 2001) شده است. پیش تیمار سرما همچنین باعث افزایش فراوانی همانندسازی داخلی (Endo-reduplication) شده که متعاقباً منجر به افزایش دابلد هاپلوئیدهای خودبخودی گیاهان می‌گردد (Amssa *et al.*, 1980). تنش گرمایی نیز برای القای جنین‌زایی میکروسپور در کلزا، گندم، تنباکو، بادمجان و تیموفی استفاده شده است (Touraev *et al.*, 1997). تنش گرسنگی یکی از موثرترین القاء کننده‌های جنین‌زایی میکروسپور در بسیاری از گیاهان مهم مانند تنباکو، گندم، برنج، جو و سیب می‌باشد (Touraev *et al.*, 2001). تغییرات هسته‌ای و سیتوپلاسمی در تنش گرسنگی دیده شده است که باعث القای تمایز پلاستیدها، تاخیر در ایجاد دیواره سلول‌های رویشی، ظهور واکوئل‌های بزرگ، کوچک شدن هسته‌های قطبی در

جدول ۱- اثر درجه حرارت بالا و پائین و گرسنگی بر روی فراوانی تقسیمات اسپوروفیتی میکروسپورهای گوجه‌فرنگی

Table 1. Effect of high and low temperatures and starvation stresses on the division symmetry of tomato microspores

| Stress | تنش | Symmetric (%) متقارن (٪) | | | | نامتقارن (٪) | تک-سلولی | مرده |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | کل | دو هسته به اندازه یکسان | سه هسته | بیش از سه هسته | | | |
| | | Total | 2 nuclei of equal size | 3 nuclei | >3 nuclei | Asymmetric (%) | Uni-cellular (%) | Dead (%) |
| Control (non-stress) | شاهد (بدون اعمال تنش) | 7.2 ± 0.4bc | 7.2 ± 0.4bc | 0 | 0 | 2.1 ± 0.2a | 33.4 ± 3.3bc | 57.3 ± 3.2c |
| Starvation B/25ºC/4d | گرسنگی | 7.6 ± 0.2b | 7.6 ± 0.2ab | 0 | 0 | 0.8 ± 0.1cd | 34.2 ± 1.9bc | 57.4 ± 1.8c |
| Low temperature 4ºC/AT3/4d | درجه حرارت پائین | 6.3 ± 0.4d | 6.3 ± 0.4de | 0 | 0 | 1.4 ± 0.3b | 45.1 ± 5.1a | 47.2 ± 5.3d |
| Low temperature & Starvation 4ºC/B/4d | درجه حرارت پائین و گرسنگی | 7.8 ± 0.2ab | 7.8 ± 0.2ab | 0 | 0 | 1.1 ± 0.1bc | 38 ± 2.9b | 53.1 ± 3.1cd |
| High temperature 33ºC/AT3/1d | درجه حرارت بالا | 8.6 ± 0.1a | 8.2 ± 0.1a | 0.4±0.1 | 0 | 1.5 ± 0.2b | 29.9 ± 2c | 60 ± 2.2c |

فراوانی تقسیمات پس از گذشت ۳ هفته از طریق رنگ‌آمیزی با محلول رنگی DAPI تعیین گردید. داده‌ها بصورت "انحراف معیار± میانگین" حاصل از ۴ تکرار ارایه شده است.
میانگین های دارای حروف یکسان در هر ستون در سطح ($P\leq0.01$) معنی دار نمی باشند.

Frequency of divisions was counted after 3 weeks in samples stained with DAPI. Means ± SD of four replications.
Means, within each columm, followed by the same letter(s) are not significantly different at the $P\leq0.01$.
d=day= روز

سلولهای رویشی، تغییر در کروماتین، ساختار هسته، ترکیبات فسفولیپید پلاسمالما و کاهش در اندازه هستک‌ها، می‌شود (Garrido *et al.*, 1995). با وجود تمامی گزارش‌های مورد اشاره مبنی بر القای جنین‌زایی در میکروسپور گیاهان مختلف با استفاده از تنش‌های سرما، گرما و گرسنگی، در گوجه‌فرنگی استفاده از این تنش‌های معمول منجر به القای جنین‌زایی نگردید.

**ج) اثر کلشی‌سین به عنوان القاءکننده مسیر جنین‌زایی در میکروسپورهای کشت شده گوجه‌فرنگی**

در سری دیگری از آزمایش‌ها، اثر کلشی‌سین به عنوان یک تنش شیمیایی بر روی میکروسپورهای جدا شده مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). صرف نظر از ممانعت تشکیل دوک توسط کلشی‌سین، نشان داده شده است که این ماده سبب القای جنین‌زایی در کشت میکروسپور کلزا (Zaki and Dikinson, 1991; Zhao *et al.*, 1996)، قهوه (Herrera *et al.*, 2002) و در کشت بساک ذرت (Obert and Barnabas, 2004) شد. در این تحقیق، مناسب‌ترین غلظت کلشی‌سین جهت القای تقسیمات اسپوروفیتی و سمیت کمتر، مقدار $^{\mu M}$ ۲۵ معادل ۱۰ میلی‌گرم در لیتر مانند کلزا تعیین گردید (Zhao *et al.*, 1996). پس از اعمال تیمار کلشی‌سین، کشت‌ها جهت حذف این ماده شیمیایی شستشو گردیدند. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است تیمار کلشی‌سین به تنهایی در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت توانست میزان ۱۲/۵ درصد تقسیمات اسپوروفیتی را القاء نماید که به طور معنی‌داری از شاهد بیشتر بود. افزایش مدت تیمار کلشی‌سین به ۷۲ ساعت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد باعث مرگ بیش از ۷۰ درصد میکروسپورهای کشت شده گردید. ترکیب تنش کلشی‌سین با تیمار درجه حرارت پائین بهترین نتیجه را به دنبال داشت. این در حالی است که در کلزا تنش کلشی‌سین به تنهایی و یا در ترکیب با تنش گرما برای القای جنین‌زایی میکروسپور به کار می‌رود و تنش درجه حرارت پائین مورد توجه نمی‌باشد (Simmonds, 1994; Zhao *et al.*, 1996). در این تحقیق، کشت‌های میکروسپوری که با کلشی‌سین($^{\mu M}$ ۲۵) به مدت ۷۲ ساعت در درجه حرارت پائین (۴ °C) تیمار گردیدند، ۳۵/۵ ٪ تقسیمات اسپوروفیتی نشان دادند که بیش از ۲۵٪ از میکروسپورهای تغییر برنامه شده، تولید ساختارهای چند سلولی و متعاقباً کالوس و جنین نمودند. در گندم تیمار میکروسپورها با کلشی‌سین تنها باعث افزایش درصد باززایی گیاهان بارور از ۱۵ به ۵۳ درصد می‌شود (Hansen and Andersen, 1998) ولی به عنوان القاءکننده جنین‌زایی در میکروسپور گزارش نشده است در حالی که در کلزا (Zhao *et al.*, 1996) کلشی‌سین به عنوان القاکننده عمل نموده است و چنین نتیجه‌ای در

جدول ۲- اثر کلشی‌سین به تنهایی و یا در ترکیب با تنش درجه حرارت پائین بر روی فراوانی تقسیمات اسپوروفیتی میکروسپورهای گوجه‌فرنگی

Table 2. Effect of colchicine alone or with low temperature on the frequency of sprophytic divisions of tomato microspores

| وضعیت میکروسپور و تقسیمات هسته ای آن در کشت *in vitro* | | کلشی‌سین Colchicine (25µM = 10 mg/l) | | | | شاهد (بدون اعمال تنش) Control (no stress) AT3/25°C |
|---|---|---|---|---|---|---|
| State of microspore and microspore nucleus during *in vitro* culture | | 24 h | | 72 h | | |
| | | 25ºC | 4ºC | 25ºC | 4ºC | |
| Symmetric (%) متقارن (٪) | Total کل | 12.5 ± 1.8c | 20.5 ± 1.3b | 6.1 ± 0.6d | 35.4 ± 1.7a | 7.2 ± 0.4d |
| | 2 nuclei دو هسته | 12 ± 1.8c | 17.1 ± 1.5b | 6.1 ± 0.6d | 26.1 ± 1.5a | 7.2 ± 0.4d |
| | 3-4 nuclei ۳-۴ هسته | 0.4 ± 0.1c | 2.6 ± 0.2b | 0 | 6.3 ± 0.5a | 0 |
| | 6 nuclei بیش از ۶ هسته | 0 | 0 | 0 | 0.6 ± 0.1 | 0 |
| Asymmetric (%) | نامتقارن (٪) | 2.7 ± 0.4ab | 3.2 ± 0.4a | 0.7 ± 0.1d | 1.8 ± 0.4c | 2.1 ± 0.2bc |
| Uni-cellular (%) | تک-سلولی (٪) | 44.5 ± 2.1b | 53 ± 3.6a | 20.1 ± 1.3d | 16.7 ± 1.2d | 33.4 ± 3.3c |
| Dead (%) | مرده (٪) | 40.3 ± 3.6c | 23.3 ± 3d | 73.1 ± 2a | 46.2 ± 2.7c | 57.3 ± 3.2b |

فراوانی تقسیمات پس از گذشت سه هفته از طریق رنگ‌آمیزی با محلول رنگی DAPI تعیین گردید. داده‌ها بصورت "انحراف معیار± میانگین" حاصل از چهار تکرار ارایه شده است.

میانگین‌ها به روش دانکن ($P\leq0.01$) مقایسه شده‌اند. میانگین‌های دارای حروف یکسان در هر ستون در سطح احتمال ($P\leq0.01$) معنی‌دار نمی‌باشند.

The frequency of divisions was counted after three weeks in samples stained with DAPI.

Means ± SD of four replications. Means within each column, followed by the same letter are not significantly different at the $P\leq0.01$.

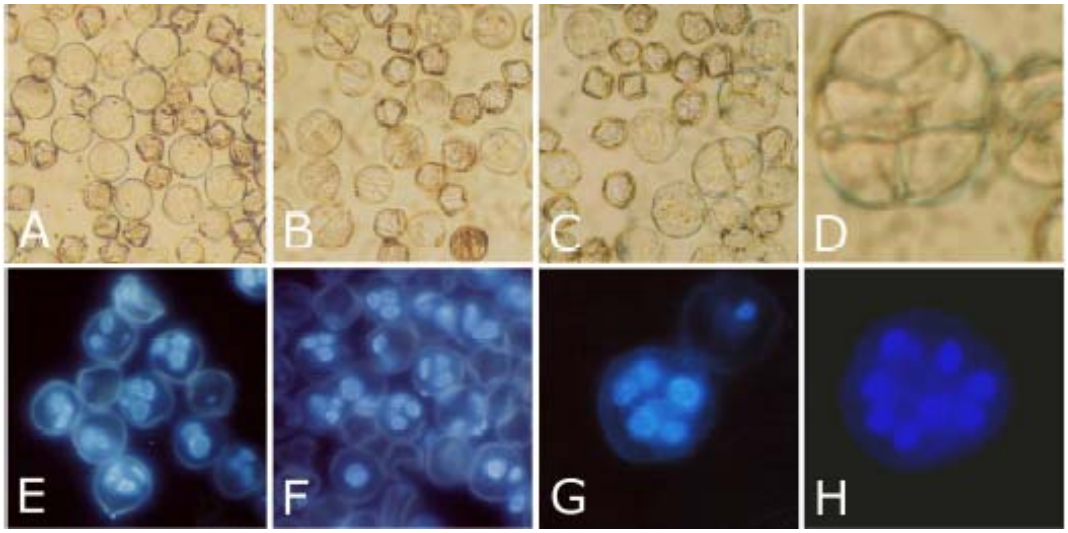
این بررسی در گوجه‌فرنگی نیز حاصل شده است. تیمار میکروسپورها با کلشی‌سین در غلظت ۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۱۵ ساعت در کلزا باعث القای جنین‌زایی و تولید تعداد زیادی جنین سالم با کارایی بالای تولید گیاهان دابلد هاپلوئید (۸۳ تا ۹۱ درصد) شده است (Zhou *et al*., 2002).

پاسخ میکروسپور گوجه‌فرنگی به تیمار کلشی‌سین مانند کلزا (Zhao *et al*., 1996) به مرحله تکوین میکروسپور بستگی دارد به طوری که در هر دو گونه بهترین مرحله پاسخ‌دهی انتهای مرحله تک سلولی می‌باشد. تخریب سایتوسکلتال در مرحله معینی از توسعه سلول تعجب‌آور نیست به دلیل اینکه میکروتوبول‌های میکروسپورهای تک سلولی در قیاس با دانه‌های گرده نارس در مرحله دو سلولی نسبت به تیمار کلشی‌سین بسیار حساس‌تر می‌باشند (Zhao and Simmonds, 1995).

کلشی‌سین با اتصال به توبولین‌های آلفا و بتا باعث دپلیمرزه شدن میکروتوبول‌ها گردیده و متعاقباً از یک طرف باعث تغییر مکان هسته میکروسپورها به قسمت مرکزی و القای تقسیمات برابر (اسپوروفیتی) و از طرف دیگر توقف سنتز توبولین‌های اختصاصی گرده و مانع از ادامه مراحل نمو میکروسپور به دانه گرده و نهایتاً تغییر مسیر میکروسپورها به سمت مسیر جنین‌زایی می‌گردد (Simmonds, 1994). در این بررسی به نظر می‌رسد تنش سرمایی نیز به دلیل کند کردن فعالیت‌های حیاتی سلول، نوعی تنش گرسنگی به طور غیر مستقیم به میکروسپورها اعمال می‌نماید که در ترکیب با تنش کلشی‌سین امکان تغییر مسیر میکروسپورها رابه سمت مسیر اسپروفیتی تسهیل می‌کند. ژنوتیپ یکی از فاکتورهای موثر آندروژنز در گوجه‌فرنگی می‌باشد. در این تحقیق ۳۵/۴٪ تقسیمات اسپروفیتی و بیش از ۲۵٪ ساختار چند سلولی(۳ تا ۹ سلول) با تیمار کلشی‌سین در ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۷۲ ساعت در رقم گوجه‌فرنگی میکروتوم بدست آمد. در چهار ژنوتیپ دیگر (72-225, 72-460, 72-362 و 72-116) نیز که از طریق تلاقی با میکروتوم بدست آمد، تقسیمات اسپروفیتی و ساختارهای چند سلولی تقریباً نتایجی مشابه با میکروتوم نشان داد. نتایج نشان داد که تیمارهای فوق در ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی می‌توانند جهت برنامه‌ریزی مجدد میکروسپورها به سمت مرحله اسپروفیتی استفاده شوند.

**د) بهینه کردن شرایط کشت برای بهبود جنین‌زایی میکروسپور در گوجه‌فرنگی**

در مرحله بعدی، بهینه کردن شرایط کشت به منظور نگهداری فعالیت برنامه نویسی مجدد میکروسپورها انجام گرفت. بعد از کشت میکروسپور در محیط AT3 با ۲۵ میکرو مولار کلشی‌سین در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و مدت ۷۲ ساعت، آنها مورد شستشو قرار گرفته و به محیط‌های " M1S, NN, NLN, FHG, N6, AT3" انتقال داده شدند. در کلیه آزمایش‌ها بیشترین فراوانی میکروسپورهای با تقسیمات




شکل ۱: مراحل جنین‌زایی میکروسپور در گوجه‌فرنگی: A–میکروسپورهای مرحله انتهایی تک- سلولی در زمان ایزوله کردن؛ B- میکروسپورهای با تقسیمات اسپوروفیتی پس از گذشت یک هفته در محیط AT3؛ C- ساختارهای چند سلولی پس از گذشت ۳ هفته از کشت؛ D- ساختارهای جنینی؛ E و F- تقسیمات اسپوروفیتی در میکروسپورها از طریق رنگ‌آمیزی با DAPI؛ G–میکروسپور با شش هسته؛ H- ساختار چند سلولی.

Fig. 1. Stages of microspore embryogenesis in tomato: A. Freshly isolated late uni-cellular microspores; B. Initial divisions of embryogenic microspores after 7 days of culture in medium AT3; C. Multi-cellular structures formed after 3 weeks of culture; D. Embryo-like structure; E and F. Symmetrically divided microspores stained with DAPI; G. Symmetrically divided microspore with six nuclei; H. Multi-cellular structure.

برابر (۳۵/۴٪) در محیط AT3 مشاهده گردید. بنابراین تغییرات بیشتر بر روی محیط AT3 انجام شد. مقادیر نیتروژن از ۴۱ میلی مولار به ۲۴ میلی‌مولار و نسبت آمونیاک به آمونیوم از ۵:۱ به ۹:۱ و نیتروژن ارگانیک به غیر ورگانیک فراوانی میکروسپورهای با تقسیمات برابر سلولی از ۳۵/۴٪ تا ۴۰٪ گردید. همچنین کربوهیدرات‌های متفاوت (ساکارز, مالتوز و...) و ترکیبات مختلف و غلظت‌های متفاوت هورمون‌های گیاهی (2,4-D, IAA, NAA, PAA, BAP, Kinetin and Zeatin) در محیط AT3 ارزیابی شد. بهترین شرایط برای تقسیمات از ۱:۱/۵ به ۹:۱ تغییر داده شد, چراکه تحقیق و بررسی در جو این سه خصوصیت برای تشکیل جنین از میکروسپورهای توتی پوتنت بسیار مهم بود (Mordhorst and Lorz, 1993). اصلاح بعضی از ترکیبات محیط کشت باعث تغییر در هماهنگ میکروسپور استفاده از ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر زاتین، که به محیط تغییر یافته AT3 با ۹۰ گرم در لیتر مالتوز اضافه شدند، بود. ساختارهای چند سلولی با بیش از ۹ سلول تشکیل گردید (شکل ۱) اما منجر به تولید گیاه نشد. برخی از این ساختارها جنین هستند. این فراوانی تقسیمات مشابه

گونه‌های پاسخ‌پذیری به کشت میکروسپور مانند تنباکو و گندم که دابلد هاپلوئیدها در آنها می‌توانند به تعداد زیاد تولید شوند، می‌باشد.

گیاه گوجه‌فرنگی به روش کشت میکروسپور به سختی پاسخ می‌دهد و در بسیاری از تحقیقات گذشته حتی در مرحله جداسازی میکروسپورهای زنده مشکل داشتند، با این وجود در این بررسی برای اولین بار مراحل مهم و کلیدی در کشت میکروسپور گوجه‌فرنگی که شامل جداسازی میکروسپورهای زنده، شناسایی تنش القاکننده مسیر اسپوروفیتی در میکروسپورها، ایجاد فراوانی بالایی از ساختارهای چند سلولی و نهایتاً تشکیل جنین (البته با فراوانی پائین) با موفقیت انجام گردید. هر چند فراوانی جنین‌های کاملاً توسعه یافته، نسبتاً پایین است و باززایی خوبی نشان نمی‌دهند. بنابراین بهینه‌سازی باززایی گیاهان هاپلویید/دابلد هاپلوئید از جنین‌های تشکیل شده هدف اصلی در تحقیقات آینده می‌باشد. پیشنهاد می‌شود اعمال تیمارهای هورمونی در مراحل انتهایی جنین‌زایی جهت توسعه بهتر جنین‌ها مورد توجه و بررسی قرار گیرد.

با توجه به اینکه پروتکل معرفی شده در این بررسی علاوه بر رقم میکروتوم، در چهار ژنوتیپ F1 نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایجی مشابه میکروتوم بدست آمد، به نظر می‌رسد وابستگی ژنتیکی این پروتکل معنی‌دار نیست. هرچند پیشنهاد می‌شود در سایر ژنوتیپ‌های قابل دسترس نیز مجدداً این پروتکل مورد بررسی قرار گیرد.

از آنجایی که در این بررسی کلشی‌سین باعث القای مسیر اسپوروفیتی در میکروسپورها گردید بنابراین پیشنهاد می‌شود موادی مانند تریفلورالین و اورایزلین که اثراتی مشابه کلشی‌سین با سمیت کمتر دارند نیز مورد ارزیابی قرار گیرند.

انتخاب غنچه‌های با میکروسپورهای مرحله انتهایی تک-هسته‌ای در زمان کشت بسیار مهم می‌باشد. چراکه میکروسپورهای جوان‌تر و یا دانه‌های گرده نارس به تیمار کلشی‌سین پاسخ نمی‌دهند. برای این منظور توصیه می‌شود از میکروسکوپ فلوروسنت و رنگ‌آمیزی میکروسپورها با ماده رنگی DAPI جهت شناسایی مرحله نموی میکروسپورها استفاده گردد.

**سپاسگزاری**

بدین وسیله از خانم فاطمه تورائیفا بخاطر پرورش و نگهداری گیاهان و دولت جمهوری اسلامی ایران به خاطر فراهم کردن امکان این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

**References**

**Aionesei, T. E., Touraev, A., and Heberle-Bors, E. 2005.** Pathways to microspore embryogenesis. pp. 11-34. In: Palmer C. E., Keller W. A., Kasha K. J.(eds.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 56. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

**Amssa, M., De Buyser, J., and Henry, Y. 1980.** Origin of diploid plants obtained by *in vitro* culture of anthers of young wheat (*Triticum aestivum* L.). Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences. Série D, Sciences naturelles 290: 1095-1097.

**Brasileiro, A. C. R., Willadino, L., Guerra, M., Colaco, W., Meunier, I., and Camara, T. R. 1999.** Anther development stage and gamma radiation effects on tomato anther-derived callus formation. Scientia Agricola 56:1-14.

**Garrido, D., Vicente, O., Heberle-Bors, E., and Isabel Rodriguez-Garcia, M. 1995.** Cellular changes during the acquisition of embryogenic potential in isolated pollen grains of *Nicotiana tabacum*. Protoplasma 186: 220-230.

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

**Hansen N. J. P., and Andersen S. B. 1998.** In vitro chromosome doubling with colchicine during microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). Euphytica 102: 101-108.

**Herrera, J. C., Moreno, L. G., Acuna, J. R., Pena M. D., and Osorio, D. 2002.** Colchicine-induced microspore embryogenesis in coffee. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71: 89-92.

**Jaramillo, J., and Summers, W. L .1991.** Dark-light treatments influence induction of tomato anther callus. Hortscience 26: 915-916.

**Kyo, M., and Harada, H .1986.** Control of the developmental pathway of tobacco pollen in vitro. Planta 168: 427-432.

**Mordhorst, A.P., and Lörz, H. 1993.** Embryogenesis and development of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores are influenced by the amount and composition of nitrogen sources in culture media. Journal of Plant Physiology 142: 485-492.

**Nitsch, C., and Norreel, B. 1973.** Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen de *Datura innoxia* cultive dans l'anthere ou isole de l'anthere. Comptes rendus de l'Académie des sciences., Paris, 276: 303-306.

**Obert, B., and Barnabas, B. 2004.** Colchicine induced embryogenesis in maize. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 283-285.

**Shariatpanahi, M. E., Bal, U., Heberle-Bors, E., and Touraev, A. 2006.** Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. Physiologia Plantarum 127:519-534.

**Sharp, W. R., Dougall, D. K., and Paddock, E. F. 1971.** Haploid plantlets and callus from immature pollen grains of *Nicotiana* and *Lycopersicon*. The journal of the Torrey Botanical Society 98: 219-222.

**Sharp, W. R., Raskin, R. S., and Sommer, H. E .1972.** The use of nurse culture in the development of haploid clones in tomato. Planta 104: 357-361

**Shtereva, L. A., Zagorska, N. A., Dimitrov, B. D., Kruleva, M. M., and Oanh, H. K. 1998.** Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) Π. Factors affecting induction of androgenesis. Plant Cell Reports 18: 312-317.

**Simmonds, D. H. 1994.** Mechanism of induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus*: significance of the preprophase band of microtubules in the first sporophytic division. In: Akkasn (Ed.) Biomechanics of active movement and division of cells (NATO ASI series). Springer-Verlag, Berlin, pp. 569-574.

**Touraev, A., Vicente, O., and Heberle-Bors, E. 1997.** Initiation of microspore embryogenesis by stress. Trends in Plant Science 2: 297–302.

**Touraev, A., and Heberle-Bors, E. 1999.** Microspore embryogenesis and *in vitro* pollen maturation in tobacco. In: Hall RD (Ed.) Methods in Molecular Biology, Vol.111: Plant Cell Culture Protocols. Humana Press Inc. Totowa, NJ, pp. 281-291.

**Touraev A., Pfosser M. and Heberle-Bors, E. 2001**. The microspore: a haploid multipurpose cell. Advances in Botanical Research 35: 53-109.

**Zagorska, N. A., Shtereva, L. A., Dimitrov, B. D., and Kruleva, M. M. 1998.** Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) I. Influence of genotype on androgenic ability. Plant Cell Reports 17:968-973.

**Zagorska, N. A., Shtereva, L. A., Kruleva, M. M., Sotirova, V. G., Baralieva, D. L., and Dimitrov, B. D. 2004.** Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon*

*esculentum* Mill) III. Characterization of the regenerants. Plant Cell Reports 22:449-456.

**Zaki, M. A. M., and Dickinson, H. G. 1991.** Microspore-derived embryos in *Brassica*: The significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. Sexual Plant Reproduction 4: 48-55.

**Zhao, J. P., and Simmonds, D. H. 1995.** Application of trifluralin to embryogenic microspore cultures to generate doubled haploid plants in *Brassica napus*. Physiologia Plantarum 95: 304-309

**Zhao, J. P., Simmonds, D. H., and Newcomb, W. 1996.** Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. *Topas*. Planta 198: 433-439.

**Zhou, W. J., Hagbery, P., and Tang, G. X. 2002.** Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicine treatment of isolated microspores in spring *Brassica napus*. Euphytica 128: 27-34.

**Ziv, M., Hedary, D., and Kedar, N .1982.** Dihaploid plants regenerated from tomato anther *in vitro*. Proceeding of The 5th International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Tokyo, Pp. 549-550.