Archive of SID

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره دهم، تابستان ۱۳۹۴ (۲۹-۱۷)

Crop Biotech.
Summer (2015) 10: 17-29.

# القای تقسیمات اسپوروفیتی و تشکیل ساختارهای رویانی در کشت میکروسپور گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

بهزاد احمدی[۱]، رسول اصغری ذکریا[۲]، مهران عنایتی شریعت‌پناهی[۳*]، ناصر زارع[٤]، پژمان آزادی[٥]

۱. دانش‌آموخته دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات ، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۲، ٤. دانشیار و استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۳، ٥. دانشیار و استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۳/۳- تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/٦/۲۸)

# Induction of symmetrical nucleus divisions and formation of embryo structures in isolated microspore culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

**Behzad Ahmadi[1], Rasoul Asghari Zakaria[2], Mehran Enayati Shariatpanahi[3*], Naser Zare[4], Pejman Azadi[5]**

1. Ph.D. student, Faculty of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. 2, 4. Associate Professor, Assistant Professor, Faculty of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. 3, 5. Associate Professor and Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), AREEO, Karaj. Iran.

(Received: May 24, 2015 - Accepted: Sep. 19, 2015)

**چکیده**

در این تحقیق، اثر تیمار سرمایی (٤ درجه سانتیگراد به مدت ۱ الی ۵ روز) در ترکیب با شوک گرمایی (۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ الی ۱۰ روز) و همچنین اثر کلشی‌سین (۲۵ الی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۲٤ الی ۷۲ ساعت) بر القای تقسیمات اسپوروفیتی و رویان‌زایی میکروسپور در دو رقم هیبرید گوجه فرنگی (برلینا و پتوپراید) بررسی شد. ساختارهای منتج از کشت میکروسپور با بیشتر از ۱۰ هسته تنها در رقم برلینا و در کشت‌هایی مشاهده گردید که به مدت ۱ و ۲ روز تحت تیمار سرمایی ٤ درجه سانتیگراد و سپس به مدت ۲ روز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. همچنین تیمار سرمایی به مدت ۱ یا ۲ روز و سپس ۲ روز دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به طور موثری موجب تشکیل ساختارهای ۱۰-۹ هسته‌ای در هر دو رقم گردید. ساختارهای با بیشتر از ۵ هسته در هیچکدام از کشت‌هایی که به مدت ۱۰ روز تحت تیمار دمایی ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند بودند مشاهده نگردید. در رقم برلینا، ساختارهای ۱۰-۹ هسته-ای در تیمار ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کلشی‌سین به مدت ٤۸ ساعت رویت شدند در حالیکه در رقم پتوپراید، در هیچکدام از تیمارها ساختارهای با بیشتر از ۸ هسته تشکیل نگردید. رویان‌های کروی تنها در محیط کشت دو لایه و تیمار ٤ درجه سانتیگراد به مدت ۲ و ۵ روز و سپس ۲ روز دمای ۳۰ درجه سانتیگراد تشکیل شدند. در صورت انتخاب دوره مناسب پیش تیمار گرمایی و سرمایی می‌توان رویان‌زایی را در میکروسپورهای گوجه‌فرنگی القا نمود.

**واژه‌های کلیدی:** تنش سرمایی، تنش گرمایی، کلشی‌سین، گوجه‌فرنگی، میکروسپور.

**Abstract**

In this study, the effect of cold treatment (4 °C for 1 to 5 days) in combination with heat shock (30 °C for 1 to 10 days) and also colchicine treatment (25 to 100 mg/l for 24 to 72 h) were assessed on induction of sporophytical divisions in isolated microspore culture in two hybrid tomato cultivars (‘Berlina’ and ‘Petoperide’). Microspore-derived structures with more than 10 nuclei were only observed in cv. ‘Berlina’ and in the cultures incubated for 1 or 2 days at 4 °C and then for 2 days at 30°C. In addition, cold treatment for 1 or 2 days and then 2 days at 30°C could efficiently induce formation of microspore-derived structures with 9-10 nuclei in both cultivars tested. No microspore-derived structure with more than 5 nuclei was observed in the cultures treated at 30°C for 10 days. In the cv. ‘Berlina’, microspore-derived structures with 9-10 nuclei were detected when 25 mg/l colchicine was used for 48 h, while in cv. ‘Petoperide’, microspore-derived structures with more than 8 nuclei were not observed in all treatments tested. Globular embryos were only produced in two-layer culture medium when treated at 4°C for 2 and 5 days and then subjected to 30°C for 2 days. Microspore embryogenesis could be induced in tomato if appropriate duration of cold and heat treatment was selected.

**Keywords:** Cold stress, Heat stress, Colchicine, Tomato, Microspore

* نویسنده مسئول: مهران عنایتی شریعت‌پناهی

E-mail: mehran.shariatpanahi@abrii.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID



## مقدمه

گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.) یکی از گیاهان با ارزشی است که طی یک قرن گذشته مورد توجه زیادی قرار گرفته است. این گیاه غنی از ویتامین‌های A و C و فیبر بوده، و عاری از کلسترول می‌باشد. همچنین گوجه فرنگی دارای مقدار قابل توجهی لیکوپن است که این ترکیب از مهمترین آنتی اکسیدان‌های کاروتنوئیدی بوده و سلول را از رادیکال‌های آزاد آسیب رسان به بسیاری از بخش‌های گیاه، محافظت می‌نماید. علاوه بر این، اثرات ضد سرطانی این ترکیب توسط برخی از محققان گزارش شده است (Afroz *et al*., 2010).

تاکنون صدها واریته گوجه فرنگی با استفاده از روش‌های مختلف اصلاح نباتات معرفی شده‌اند. از میان این روش‌ها، تولید بذور هیبرید به دلیل افزایش معنی‌دار در عملکرد F1، قیمت بالا و امکان محافظت از حقوق بهنژادگر، کارآمدترین و جذاب‌ترین فن‌آوری برای موسسات تولید بذر سبزیجات می‌باشد. همچنین ارقام هیبرید از بنیه[1] بالاتر، یکنواختی، مقاومت و تحمل بیشتر به تنش‌های زنده و غیر زنده برخوردار می‌باشند (Tay, 2002). اصلاح بذور هیبرید F1 از طریق روش‌های ایجاد نرعقیمی و برگداننده نر باروری، به دسترسی تجاری به لاین‌های خالص[2] وابسته است. در اصلاح نباتات سنتی، به علت ماهیت خودگشن گوجه‌فرنگی، برای ایجاد لاین‌های خالص، به طور عمده از روش‌های اصلاحی مرسوم بعد از دورگ‌گیری از قبیل روش شجره‌ای، توده‌ای و نتاج تک بذر استفاده می‌گردد که این روش‌ها اغلب بسیار وقت گیر و پرهزینه می‌باشند (Shariatpanahi *et al*., 2007). امروزه، زیست فناوری گیاهی از طریق سیستم‌های تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف[3] (روش کشت بساک و کشت میکروسپور) مدت زمان رسیدن به خلوص[4] کامل را بطور قابل توجهی کاهش داده است. علاوه بر این، این تکنیک برای جداسازی جهش یافته‌ها، انتقال ژن و اصلاح معکوس[5] نیز ایده‌آل می‌باشد. به دلیل پایداری و هموژن بودن گیاهان هاپلوئید مضاعف، کارآیی گزینش نیز به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد، زیرا انتخاب در میان گیاهان صددرصد خالص انجام می‌شود (Babbar *et al*., 2004; Wijnker *et al*., 2012).

در حالت طبیعی، میکروسپورها مسیر تکاملی خود را برای تولید دانه گرده بالغ طی می‌نمایند. تحت شرایط خاصی می‌توان مسیر تکاملی میکروسپورها را به سمت رویان‌زایی منحرف نمود. از عوامل موثر بر رویان‌زایی میکروسپور می‌توان به ژنوتیپ والد مادری، مرحله تکاملی میکروسپور، ترکیبات محیط کشت، تراکم کشت و تنش القایی اشاره نمود (Babbar *et al*., 2004; Ferrie and Caswell, 2011). از مهمترین تنش‌هایی که برای القای رویان‌زایی میکروسپور استفاده می‌شوند می‌توان به تنش سرمایی، گرمایی، گرسنگی، تنش اسمزی و کلشی‌سین اشاره نمود (Shariatpanahi *et al*., 2006). با وجود اهمیت فراوان گوجه‌فرنگی، اطلاعات بسیار محدودی در رابطه با نرزایی[6] و عوامل موثر بر آن در اختیار می‌باشد. در طول ۴۰ سال گذشته تلاش بسیار زیادی برای تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف چه از طریق کشت میکروسپور و چه کشت بساک صورت گرفته است ولی با این وجود، پروتکل موفق و قابل اعتمادی در این زمینه وجود ندارد (Bal and Abak, 2007; Seguí-Simarro *et al*., 2011). تحقیق Zagorska و همکاران (۱۹۹۸) بر روی کشت بساک در ۸۵ رقم هیبرید گوجه فرنگی نشان داد که تنها ارقام محدودی (۱۵ هیبرید) توانایی باززایی گیاه

1. Vigor
2. Inbred lines
3. Doubled haploid
4. Homozygosity
5. Reverse breeding
6. Androgenesis

www.SID.ir

Archive of SID



هاپلوئید را دارا می‌باشند که نشان دهنده وابستگی بسیار زیاد این صفت با ژنوتیپ والد مادری می‌باشد (Zagorska *et al*., 1998). تحقیق Motallebi-Azar و همکاران (۲۰۰۴) بر روی کشت بساک چهار رقم گوجه فرنگی نشان داد که صفات کالوس‌زایی و باززایی گیاهچه توسط اثر ژنتیکی- افزایشی کنترل می‌شوند. در حالیکه صفت رشد کالوس تحت تاثیر اثر ژنتیکی- غیر افزایشی می‌باشد. همچنین، Motallebi-Azar و Panahandeh (۲۰۱۰) نشان دادند که تیمار سرمایی تاثیر معنی‌داری بر القای کالوس‌زایی در بساک‌های کشت شده ندارد ولی کارایی باززایی را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. در تحقیق دیگر، Seguí-Simarro و Nuez (۲۰۰۷) و Corral-Martínez و همکاران (۲۰۱۰) تعدادی گیاه هاپلوئید مضاعف از طریق کشت بساک تولید نموده‌اند. با این وجود، بسیاری از این گیاهان، تنوع بالایی از لحاظ سطح پلوئیدی و مورفولوژیکی نشان داده‌اند (Zagorska *et al*., 2004; Corral-Martínez *et al*., 2010; Seguí-Simarro *et al*., 2011). مطالعات بسیار محدودی در رابطه با کشت جدایه‌های میکروسپور گوجه فرنگی در اختیار می‌باشد. نتایج حاصل از تحقیق Varghese و Yadav (۱۹۸۶) و همچنین Seguí-Simarro و Nuez (۲۰۰۷) حاکی از تشکیل ساختارهای شبه رویان در کشت جدایه‌های میکروسپور بود که این ساختارها متاسفانه از نوع کاذب (غیر منتج از میکروسپور) بوده و ناشی از تریکوم‌ها (ساختارهای گرز مانندی که در سطح اپیدرم غنچه‌ها قرار دارند) می‌باشند (بحث شده توسط Bal *et al*., 2012).

با توجه به اینکه گوجه فرنگی از گیاهان بسیار سر سخت به نرزایی می‌باشد، نیاز به تحقیقات گسترده و وسیع در رابطه با عوامل تاثیرگذار بر رویان‌زایی میکروسپور وجود دارد (Segui-Simarro *et al*., 2011). در این تحقیق، تاثیر تیمار سرمایی (۴ درجه سانتیگراد به مدت ۰، ۱، ۲ و ۵ روز) در ترکیب به صورت فاکتوریل با شوک گرمایی (۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۰، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ روز) و همچنین اثر کلشی‌سین (۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر القای تقسیمات اسپوروفیتی و رویان‌زایی میکروسپور در دو رقم گوجه فرنگی (برلینا و پتوپراید) مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### پرورش گیاهان مادری

در این تحقیق، ارقام هیبرید برلینا و پتوپراید مورد بررسی قرار گرفتند. گیاهان مادری در گلخانه با شرایط دمایی روزانه ۳۰-۲۵ درجه سانتیگراد و شبانه ۲۰-۱۵ درجه سانتیگراد تحت شرایط نور طبیعی پرورش داده شدند. گیاهان مادری دو بار در هفته آبیاری گردیدند.

### تعیین مرحله تکاملی میکروسپورها

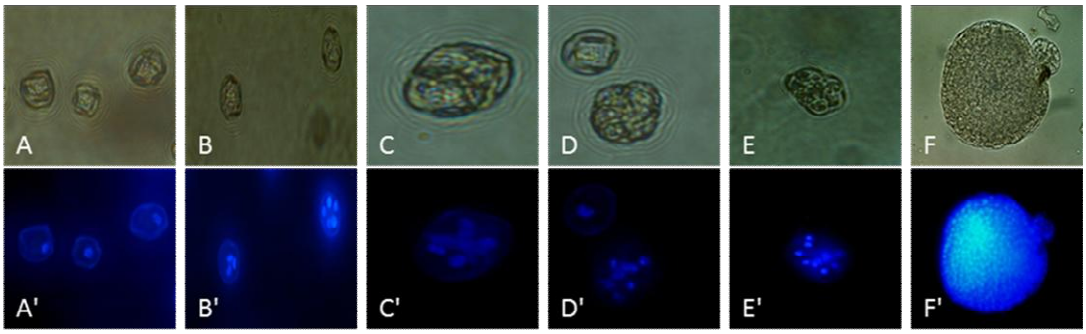
بعد از گذشت تقریباً دو ماه از کشت بذور، گیاهان مادری وارد مرحله گل‌دهی شده و اولین غنچه‌ها ظاهر شدند. مرحله تکاملی میکروسپورها با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی هسته[1] (DAPI) تعیین گردید (Vergne *et al*., 1987). غنچه‌های ۷-۵ میلی متری حاوی میکروسپورهای مرحله تکاملی اواسط تا اواخر تک‌هسته‌ای (شکل ۱؛A, A') برداشت گردیدند. در اکثر گونه‌ها، این مرحله، مناسب‌ترین مرحله جهت القای رویان‌زایی میکروسپور می‌باشد (Shariatpanahi *et al*., 2006).

1. 4', 6-Diamidino-2-phenylindole

www.SID.ir

Archive of SID






شکل ۱. کشت جدایه‌های میکروسپور گوجه فرنگی. A, A': میکروسپورهای مرحله تکاملی اویل تا اوخر تک‌هسته‌ای؛ B, B': میکروسپورهای ۵-۳ هسته‌ای؛ C, C': میکروسپور ۸-۶ هسته‌ای؛ D, D': میکروسپور ۹-۸ هسته‌ای؛ E, E': میکروسپور حاوی بیشتر از ۱۰ هسته؛ F, F': رویان کروی

## ضدعفونی کردن غنچه‌ها و کشت میکروسپور

غنچه‌های برداشت شده توسط هیپوکلریت سدیم ۳ درصد (v/v) به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و در ادامه، غنچه‌ها سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه توسط آب مقطر استریل خنک (۴ درجه سانتیگراد) شستشو داده شدند. بساک‌ها با استفاده از پنس در شرایط استریل از غنچه‌ها جدا شده و در محیط B[1] (این محیط برای جداسازی میکروسپورها مناسب می‌باشد؛ Touraev *et al*., 1996a) با استفاده از همزن مغناطیسی به مدت ۲ دقیقه به خوبی کوبیده شدند. مخلوط حاصل از توری پلاستیکی با مش[2] دارای منافذ به قطر ۴۰ میکرومتر عبور داده شد و سوسپانسیون حاصل در تیوب‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری جمع آوری گردید. سپس سوسپانسیون با شدت ۱۱۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۴ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع فوقانی رسوب میکروسپور دور ریخته شد و به رسوب بدست آمده مجددا ۱۵ میلی لیتر محیط B اضافه گردید. این عمل دوبار تکرار شد. نهایتاً میکروسپورها در پتری دیش‌های ۶ سانتی‌متری حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط NLN[3] حاوی ۱۳ درصد ساکارز (Lichter, 1982) و تراکم $۴\times۱۰^{۴}$ میکروسپور در هر میلی‌لیتر کشت گردیدند.

1. B-medium
2. Mesh
3. Lichter-modified Nitsch and Nitch medium

## کشت میکروسپور در محیط دو لایه

در این مرحله، از محیط کشت دو لایه برای رویان‌زایی میکروسپور استفاده گردید. محیط تحتانی از نوع B5 (Gamborg *et al*., 1968) جامد حاوی ۲۰ گرم در لیتر ساکارز، pH=۵/۷ و ۷ گرم در لیتر آگار (Duchefa Biochemie) و محیط فوقانی نیز B5 مایع حاوی ۲۰ گرم در لیتر ساکارز ( Duchefa Biochemie) بود. بساک‌های رقم برلینا توسط پنس از غنچه‌های ضد عفونی شده جدا و به محیط فوقانی منتقل شدند. در این روش، بساک‌های کشت شده پس از گذشت چند روز (۵-۳ روز) باز شده و میکروسپورها به داخل محیط کشت آزاد می‌گردند. این شیوه کشت، یکی از روش‌های جداسازی میکروسپور بدون اعمال هر گونه فشار فیزیکی (مانند له کردن توسط هاون، همزن مغناطیس و یا پالس الکتریکی) جهت به حداقل رسانیدن صدمات به میکروسپورها می‌باشد.

## اعمال تیمارهای فیزیکی و شیمیایی

برای القای مسیر اسپوروفیتی در میکروسپورهای کشت شده، از تنش‌های فیزیکی وشیمیایی استفاده گردید. تیمار سرمایی (۴ درجه سانتیگراد به مدت ۰، ۱، ۲ و ۵ روز) و شوک گرمایی (۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۰، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ روز) در ترکیب با هم به

www.SID.ir

Archive of SID



صورت فاکتوریل به عنوان تیمارهای فیزیکی و کلشی‌سین (۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) به عنوان القا کننده شیمیایی رویان‌زایی مورد بررسی قرار گرفتند. در روش کشت دو لایه، بساک‌ها پس از کشت در محیط فوقانی تحت تیمار سرمایی ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ و ۵ روز و شوک گرمایی ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱، ۲ و ۵ روز (۱ روز ۴ درجه سانتیگراد و ۱۰ روز ۳۰ درجه سانتیگراد به علت نمود ضعیف در این مرحله حذف گردیدند) قرار گرفتند. هسته‌ها توسط رنگ اختصاصی DAPI رنگ‌آمیزی و توسط میکروسکوپ فلورسنت معکوس مشاهده شدند. کلیه آزمایشات به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۴ تکرار (هر پتری دیش معادل یک تکرار) اجرا گردیدند. داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS (ver. 16) تجزیه شده و میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه دانکن[1] (DMRT) در سطح احتمال ۵٪ با همدیگر مقایسه شدند.

## نتایج و بحث

در شرایط عادی، میکروسپورها مسیر از قبل برنامه‌ریزی شده به سمت تولید دانه گرده بالغ را طی می‌نمایند. تحت شرایط خاص و با اعمال تنش‌های مناسب، می‌توان مسیر تکاملی میکروسپورها را به سمت رویان‌زایی منحرف نمود. از جمله تنش‌هایی که عمدتا به منظور القای مسیر اسپوروفیتی در میکروسپورها استفاده می‌شوند، می‌توان به تنش‌های سرمایی و گرمایی اشاره نمود (Shariatpanahi *et al*., 2006). نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هسته میکروسپورها در هر دو رقم نشان داد که در شرایط عدم اعمال تنش، میکروسپورها فاقد تقسیمات متقارن بودند (جدول‌های ۴-۱). نتایج این تحقیق همچنین حاکی از مؤثر بودن تیمار سرمایی در ترکیب با تیمار گرمایی بر القای تقسیمات اسپوروفیتی در میکروسپورهای گوجه فرنگی بود. در شرایط اعمال شوک گرمایی بدون تیمار سرمایی، تنها ساختارهای ۵-۳ هسته‌ای (شکل ۱؛B,B') و ۸-۶ هسته‌ای (شکل ۱؛C, C') تشکیل شدند.

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثر دوره‌های مختلف پیش تیمار سرمایی (۴ درجه سانتیگراد) و گرمایی (۳۰ درجه سانتیگراد) بر القای تقسیمات هسته در میکروسپورهای گوجه فرنگی رقم برلینا

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | تقسیم نشده | ۵-۳ هسته‌ای | ۸-۶ هسته‌ای | ۱۰-۹ هسته‌ای | بیشتر از ۱۰ هسته |
| سرما (A) | 3 | $191.3^{*}$ | $24.7^{ns}$ | $34.4^{*}$ | $4.6^{**}$ | $2.8^{**}$ |
| گرما (B) | 4 | $1031.7^{**}$ | $364.5^{**}$ | $21.0^{ns}$ | $16.2^{**}$ | $5.0^{**}$ |
| اثر متقابل (A×B) | 12 | $178.5^{*}$ | $92.4^{*}$ | $3.2^{ns}$ | $0.9^{ns}$ | $0.55^{ns}$ |
| اشتباه آزمایشی | 60 | 60.8 | 36.3 | 11.2 | 0.67 | 0.46 |
| ضریب تغییرات | - | 11 | 26 | 45 | 14 | 13 |

ns، * و **: به ترتیب نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد می‌باشند.

1. Duncan's multiple range test

www.SID.ir

Archive of SID



ساختارهای منتج از میکروسپور با ۱۰-۹ هسته (شکل ۱؛ D, D') در رقم برلینا و در شرایط تیمار سرمایی ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱, ۲ و ۵ روز و سپس ۲ روز ۳۰ درجه سانتیگراد مشاهده شدند، در حالیکه در رقم پتوپراید، تنها در تیمار سرمایی ۱ روز و تیمار گرمایی ۲ روز تشکیل شدند. ساختارهای منتج از کشت میکروسپور با بیشتر از ۱۰ هسته (شکل ۱؛ E, E') نیز تنها در رقم برلینا و در کشت‌هایی که به مدت ۱ و ۲ روز تحت تیمار سرمایی (۴ درجه سانتیگراد) و سپس به مدت ۲ روز تحت تیمار دمایی ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفته بودند، مشاهده شدند. به دلیل برتری نسبت به رقم پتوپراید، از رقم برلینا برای کشت میکروسپور در محیط کشت دو لایه استفاده گردید. رویان کروی (شکل ۱؛ F, F') تنها در محیط کشت دولایه و در تیمار ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ و ۵ روز و سپس ۲ روز ۳۰ درجه سانتیگراد تشکیل گردیدند (جداول ۵ و ۶). تکنیک کشت دو لایه برای اولین بار توسط Sunderland و Roberts در سال ۱۹۷۷ و در گیاه توتون معرفی شد (Zheng, 2003) و پس از آن، به طور موفقیت آمیزی برای القای رویان‌زایی میکروسپور در بسیاری از گیاهان نظیر آسپاراگوس (Peng and Wolyn, 1999)، گندم (Zheng, 2003) و فلفل (Supena and Custers, 2011) مورد استفاده قرار گرفته است. نتایج حاصل از تحقیق Bal و Abak (۲۰۰۵) نشان داد که با استفاده از تنش گرسنگی می‌توان تقسیمات متقارن را در میکروسپورهای گوجه فرنگی القا نمود ولی ساختارهای رویانی تشکیل نگردید. تشکیل رویان کروی در این تحقیق، نشان دهنده برتری ترکیب تیمارهای سرمایی و گرمایی در مقایسه با تنش انفرادی گرسنگی می‌باشد. مطابق بررسی منابع موجود، این تحقیق، اولین گزارش مبنی بر تشکیل رویان کروی از جدایه‌های میکروسپور گوجه فرنگی می‌باشد. تکامل رویان‌های کروی تشکیل شده به رویان اژدری یا کوتیلدونی در دست بررسی می‌باشد.

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر دوره‌های مختلف تیمار سرمایی (۴ درجه سانتیگراد) و شوک گرمایی (۳۰ درجه سانتیگراد) بر القای تقسیمات هسته در میکروسپورهای کشت شده گوجه فرنگی رقم برلینا

| تیمار دمایی (روز) | | تقسیمات هسته (درصد) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۴ درجه | ۳۰ درجه | تقسیم نشده | ۵-۳ | ۸-۶ | ۱۰-۹ | بیشتر از ۱۰ هسته |
| | 0 | 100 a* | - | - | - | - |
| | 1 | 93 ± 2.6 ab | 7 ± 2.6 e | - | - | - |
| 0 | 2 | 64 ± 5.2 de | 34 ± 6.8 bc | 2 ± 1.8 c | - | - |
| | 5 | 59 ± 6.9 f | 41 ± 6.9 a | - | - | - |
| | 10 | 74 ± 6.3 cd | 26 ± 6.3 bc | - | - | - |
| | 0 | 87 ± 7.9 bc | 13 ± 7.9 de | - | - | - |
| | 1 | 61 ± 9.4 ef | 35 ± 7.1 ab | 4 ± 2/6 c | - | - |
| 1 | 2 | 48 ± 8.8 g | 36 ± 5.9 ab | 9 ± 3.3 b | 5 ± 2.8 b | 2 ± 1.1 b |
| | 5 | 82 ± 7.6 bc | 18 ± 7.6 d | - | - | - |
| | 10 | 93 ± 4.4 ab | 7 ± 4.4 e | - | - | - |
| | 0 | 82 ± 8.4 bc | 18 ± 8.4 d | - | - | - |
| | 1 | 51 ± 6.5 fg | 42 ± 4.4 a | 7 ± 3.6 bc | - | - |
| 2 | 2 | 25 ± 10.7 h | 37 ± 5.3 a | 19 ± 4.9 a | 11 ± 5.2 a | 8 ± 2.6 a |
| | 5 | 71 ± 10.1 cd | 23 ± 6.6 cd | 6 ± 4.1 c | - | - |
| | 10 | 88 ± 4.3 bc | 12 ± 4.3 e | - | - | - |
| | 0 | 74 ± 9.1 cd | 26 ± 9.1 bc | - | - | - |
| | 1 | 63 ± 12.4 e | 31 ± 6.4 bc | 6 ± 4.9 c | - | - |
| 5 | 2 | 52 ± 9.7 fg | 37 ± 4.8 a | 9 ± 5.3 b | 2 ± 1.4 b | - |
| | 5 | 82 ± 10.4 bc | 14 ± 5.2 de | 4 ± 3.6 c | - | - |
| | 10 | 90 ± 6.4 ab | 10 ± 6.4 e | - | - | - |

*: در هر ستون، حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ توسط آزمون چند دامنه دانکن (DMRT) می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس اثر دوره‌های مختلف پیش تیمار سرمایی (۴ درجه سانتیگراد) و گرمایی (۳۰ درجه سانتیگراد) بر القای تقسیمات هسته در میکروسپورهای گوجه فرنگی رقم پتوپراید

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | تقسیم نشده | ۵-۳ هسته‌ای | ۸-۶ هسته‌ای | ۱۰-۹ هسته‌ای | بیشتر از ۱۰ هسته |
| سرما (A) | 3 | 90** | 42.7** | 20.6** | - | - |
| گرما (B) | 4 | 97.5** | 54.5** | 12.3** | - | - |
| اثر متقابل (A×B) | 12 | 54.5** | 28.5** | 8.4** | - | - |
| اشتباه آزمایشی | 60 | 16.3 | 10.8 | 2.3 | - | - |
| ضریب تغییرات | - | 6 | 31 | 36 | - | - |

ns، * و **: به ترتیب نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد می‌باشند.

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر دوره‌های مختلف تیمار سرمایی (۴ درجه سانتیگراد) و شوک گرمایی (۳۰ درجه سانتیگراد) بر القای تقسیمات هسته در میکروسپورهای کشت شده گوجه فرنگی رقم پتوپراید.

| تیمار دمایی (روز) | | تقسیمات هسته (درصد) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۴ درجه | ۳۰ درجه | تقسیم نشده | ۵-۳ | ۸-۶ | ۱۰-۹ | بیشتر از ۱۰ هسته |
| | 0 | 100 a* | - | - | - | - |
| | 1 | 96 ± 2.9 ab | 4 ± 2.9 d | – | – | – |
| 0 | 2 | 91± 5.5 ab | 9 ± 5.5 cd | – | – | – |
| | 5 | 86 ± 6.9 bcd | 12 ± 3.9 bc | 2 ± 1.4 b | – | – |
| | 10 | 89 ± 4.8 bc | 11 ± 4.8 cd | – | – | – |
| | 0 | 95 ± 2.0 ab | 5 ± 2.0 d | – | – | – |
| | 1 | 76 ± 7.4 de | 18 ± 5.2 a | 6 ± 2.1b | – | – |
| 1 | 2 | 66 ± 8.9 e | 18 ± 6.0 a | 12 ± 4.5 a | 7 ± 1.8 a | – |
| | 5 | 83 ± 5.6 cde | 17 ± 5.6 ab | – | – | – |
| | 10 | 93 ± 3.3 ab | 7 ± 3.3 cd | – | – | – |
| | 0 | 83 ± 4.4 cde | 17 ± 4.4 ab | – | – | – |
| | 1 | 79 ± 7.3 de | 19 ± 5.1 a | 2 ± 0.8 b | – | – |
| 2 | 2 | 88 ± 5.5 bcd | 12 ± 5.5bc | – | – | – |
| | 5 | 85 ± 4.6 cd | 15 ± 4.6 bc | – | – | – |
| | 10 | 96 ± 1.3 ab | 4 ± 1.3 d | – | – | – |
| | 0 | 85 ± 6.6 cd | 12 ± 3.9 bc | 3 ± 1.0 b | – | – |
| | 1 | 89 ± 3.4 bc | 11 ±3.4 cd | – | – | – |
| 5 | 2 | 83 ± 7.8 cde | 17 ± 7.8 ab | – | – | – |
| | 5 | 91 ± 4.2 ab | 9 ± 4.2 cd | – | – | – |
| | 10 | 100 a | – | – | – | – |

*: در هر ستون، حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ توسط آزمون چند دامنه دانکن (DMRT) می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



جدول ۵. نتایج تجزیه واریانس اثر دوره‌های مختلف تیمار سرمایی (۴ درجه سانتیگراد) و شوک گرمایی (۳۰ درجه سانتیگراد) در محیط کشت دو لایه بر القای تقسیمات هسته در میکروسپورهای گوجه فرنگی رقم برلینا

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | تقسیم نشده | ۵-۳ هسته‌ای | ۸-۶ هسته‌ای | بیشتر از ۹ هسته | رویان کروی |
| سرما (A) | 1 | 192.3* | 151.7* | 5.0ns | 1.7ns | 0.8ns |
| گرما (B) | 2 | 997.4** | 279.5** | 67.3** | 48.8** | 6.0** |
| اثر متقابل (A×B) | 2 | 4.3ns | 3.5ns | 1.4ns | 1.5ns | 0.7ns |
| اشتباه آزمایشی | 18 | 39.6 | 24.9 | 8.1 | 0.9 | 0.4 |
| ضریب تغییرات | – | 10 | 18 | 34 | 12 | 0.4 |

ns، * و **: به ترتیب نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد می‌باشند.

جدول ۶. مقایسه میانگین اثر دوره‌های مختلف تیمار سرمایی (۴ درجه سانتیگراد) و شوک گرمایی (۳۰ درجه سانتیگراد) در محیط کشت دو لایه بر القای تقسیمات هسته در میکروسپورهای گوجه فرنگی رقم برلینا

| تیمار دمایی (روز) | | تقسیمات هسته (درصد) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۴ درجه | ۳۰ درجه | تقسیم نشده | ۵-۳ | ۸-۶ | بیشتر از ۹ هسته | رویان کروی |
| | 1 | 58 ± 7.3 c* | 38 ± 6.9 a | 4 ± 1.7 b | - | - |
| 2 | 2 | 29 ± 10.8 d | 41 ± 7.7 a | 16 ± 6.0 a | 10 ± 4.3 a | 4 ± 1.6 a |
| | 5 | 82 ±7.8 ab | 18 ± 7.8 cd | - | - | - |
| | 1 | 71 ± 12.4 b | 25 ± 6.4 bc | 4 ± 1.9 b | - | - |
| 5 | 2 | 48 ± 11.7 c | 32 ± 8.6 ab | 11 ± 5.5 ab | 7 ± 3.1 a | 2 ± 0.9 a |
| | 5 | 84 ± 7.7 a | 10 ± 4.0 d | 6 ± 2.9 b | - | - |

*: در هر ستون، حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ توسط آزمون چند دامنه دانکن (DMRT) می‌باشد.

اعمال تیمار سرمایی در سطح گیاه مادری، غنچه‌ها یا سنبله‌های جدا شده و همچنین بساک و میکروسپورهای کشت شده موجب تغییر مسیر تکاملی میکرروسپورها به سمت رویان‌زایی در طیف وسیعی از گیاهان زراعی نظیر گندم، جو، توتون، برنج، کلزا، چاودار و تریتیکاله شده است (Touraev *et al*., 2001; Shariatpanahi *et al*., 2006). Seguí-Simarro و Nuez (۲۰۰۷) نشان دادند که تیمار سرمایی ۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶ روز، کارآیی تقسیمات اسپوروفیتی میکروسپورها و همچنین باززایی گیاهان را از بساک‌های کشت شده گوجه فرنگی افزایش می‌دهد. نتایج حاصل از تحقیق Motallebi-Azar و Panahandeh (۲۰۱۰) نیز بر روی کشت بساک گوجه فرنگی نشان داد که تیمار سرمایی ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۶ و ۴۸ ساعت، باززایی گیاهچه‌ها را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. تیمار سرمایی موجب افزایش غلظت آمینو اسیدهای آزاد و در نتیجه تغییر برنامه متابولیکی میکروسپورها شده که برای منحرف کردن مسیر تکاملی به سمت رویان‌زایی مورد نیاز می‌باشد. همچنین مطالعات در گیاه گوجه فرنگی نشان داده‌اند که پس از تیمار سرمایی، بیان ژن‌های کد کننده پروتئین‌های شوک گرمایی[1] (HSPs) مانند *tom111* و *tom66* افزایش می‌یابد (Sabehat *et al*., 1998). چنین به نظر می‌رسد که افزایش بیان HSPها موجب توقف مسیر تکاملی میکروسپورها به سمت تشکیل دانه گرده بالغ می‌شود (Zhao *et al*., 2003). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که HSP ها موجب تخریب دوک تقسیم و میکروتوبول‌ها شده و به این ترتیب موجب بازآرایی اسکلت سلولی و در نتیجه تغییر در چرخه سلولی میکرسپورها به سمت فرآیند رویان‌زایی می‌شوند (Simmonds and Keller,

1. Heat shock proteins

www.SID.ir

Archive of SID



1999; Shariatpanahi *et al*., 2006). در این تحقیق، تاثیر منفی دوره‌های طولانی تیمار دمایی ۳۰ درجه سانتیگراد بر القای تقسیمات اسپوروفیتی در هر دو رقم مشاهده گردید به طوریکه ساختارهای با بیشتر از ۵ هسته در هیچکدام از کشت‌هایی که به مدت ۱۰ روز تحت تیمار دمایی ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفته بودند، رؤیت نگردید. همچنین، تقسیمات اسپوروفیتی در کشت‌هایی که تحت تیمار سرمایی و گرمایی قرار نگرفته بودند، مشاهده نشد. تاثیر تیمار گرمایی نیز بر بازآرایی اسکلت سلولی میکروسپورها گزارش شده است (Simmonds and Keller, 1999). همچنین، تیمار گرمایی موجب افزایش بیان ژن‌های کد کننده میتوژن فعال کننده پروتئین کیناز[1] (MAPK) شده و به این ترتیب موجب القای رویان‌زایی در میکروسپورها می‌شود (Segui-Simarro *et al*., 2005; Zoriniants *et al*., 2005).

کلشی‌سین نیز از جمله القا کننده‌های شیمیایی می‌باشد که برای آغازش رویان‌زایی میکروسپور در بسیاری از گونه‌ها مورد استفاد قرار گرفته است (Touraev *et al*., 1996b; Herrera *et al*., 2002; Würschum *et al*., 2012). نتایج این تحقیق حاکی از موثر بودن تیمار کلشی‌سین بر القای تقسیمات اسپوروفیتی در میکروسپورهای کشت شده در هر دو رقم گوجه فرنگی بود (جدول‌های ۱۰-۷).

جدول۷. نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت‌ها و دوره‌های مختلف تیمار کلشی‌سین بر القای تقسیمات هسته در میکروسپورهای گوجه‌فرنگی رقم برلینا

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | تقسیم نشده | ۵-۳ هسته‌ای | ۸-۶ هسته‌ای | ۱۰-۹ هسته‌ای |
| غلظت (A) | 3 | $32.5^{ns}$ | $3.4^{ns}$ | $4.1^{ns}$ | - |
| دوره (B) | 2 | $308.3^{**}$ | $163.6^{**}$ | $16.7^{**}$ | - |
| اثر متقابل (A×B) | 6 | $26.7^{ns}$ | $18.1^{ns}$ | $17.9^{**}$ | - |
| اشتباه آزمایشی | 36 | 17.7 | 13.8 | 2.3 | - |
| ضریب تغییرات | - | 6 | 33 | 22 | - |

ns، * و **: به ترتیب نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد می‌باشند.

جدول ۸. مقایسه میانگین اثر غلظت‌ها و دوره‌های مختلف تیمار کلشی‌سین بر القای تقسیمات هسته در میکروسپورهای کشت شده گوجه فرنگی رقم برلینا

| تیمار کلشی‌سین | | تقسیمات هسته (درصد) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| غلظت کلشی‌سین (میلی گرم در لیتر) | دوره تیمار (ساعت) | تقسیم نشده | ۵-۳ | ۸-۶ | ۱۰-۹ |
| 0 | 24 | 97 ± 1.3 a* | 3 ± 1.3 d | - | - |
| | 48 | 100 a | - | - | - |
| | 72 | 95 ± 2.7ab | 5 ± 2.7 cd | - | - |
| 25 | 24 | 84 ± 9.8 bc | 16 ± 9.8 ab | - | - |
| | 48 | 70 ± 11.0 d | 14 ± 6.6 bc | 13 ± 4.9 a | 3 ± 1.4 a |
| | 72 | 79 ± 7.6 cd | 19 ± 5.8 a | 2 ± 1.1 b | - |
| 50 | 24 | 88 ± 6.3 bc | 7 ± 4.2 bc | 5 ± 2.9 b | - |
| | 48 | 81 ± 10.5 c | 19 ± 10.5 a | - | - |
| | 72 | 96 ± 3.0 a | 4 ± 3.0 cd | - | - |
| 100 | 24 | 100 a | - | - | - |
| | 48 | 100 a | - | - | - |
| | 72 | 100 a | - | - | - |

*: در هر ستون، حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ توسط آزمون چند دامنه دانکن (DMRT) می‌باشد.

1. Mitogen-activated protein kinase

www.SID.ir

Archive of SID



جدول ۹. نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت‌ها و دوره‌های مختلف تیمار کلشی‌سین بر القای تقسیمات هسته در میکروسپورهای گوجه فرنگی رقم پتوپراید

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | تقسیم نشده | ۵-۳ هسته‌ای | ۸-۶ هسته‌ای | ۱۰-۹ هسته‌ای |
| غلظت (A) | 3 | $5.6^{ns}$ | $2.6^{ns}$ | $3.2^{ns}$ | - |
| دوره (B) | 2 | $353.3^{**}$ | $281.6^{**}$ | $4.2^{ns}$ | - |
| اثر متقابل (A×B) | 6 | $69.6^{**}$ | $51.3^{**}$ | $7.1^{*}$ | - |
| اشتباه آزمایشی | 36 | 19.4 | 8.0 | 2.5 | - |
| ضریب تغییرات | - | 5 | 19 | 41 | - |

ns، * و **: به ترتیب نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد می‌باشند.

جدول ۱۰. مقایسه میانگین اثر غلظت‌ها و دوره‌های مختلف تیمار کلشی‌سین بر القای تقسیمات هسته در میکروسپورهای کشت شده گوجه فرنگی رقم پتوپراید

| تیمار کلشی‌سین | | تقسیمات هسته (درصد) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| غلظت کلشی‌سین (میلی گرم در لیتر) | دوره تیمار (ساعت) | تقسیم نشده | ۵-۳ | ۸-۶ | ۱۰-۹ |
| 0 | 24 | 100 a* | – | – | - |
| | 48 | 100 a | – | – | - |
| | 72 | 98 ± 1.3 a | 2 ± 1.3 c | – | - |
| 25 | 24 | 93 ± 3.6 a | 7 ± 3.6 bc | – | - |
| | 48 | 81 ± 6.9 b | 14 ± 3.3 ab | 5 ± 1.7 a | – |
| | 72 | 77 ± 8.1 bc | 23 ± 8.1 a | – | - |
| 50 | 24 | 68 ± 9.7 c | 25 ± 5.8 a | 7 ± 3.4 a | - |
| | 48 | 76 ± 8.2 bc | 24 ± 8.2 a | – | - |
| | 72 | 92 ± 3.7 ab | 8 ± 3.7 bc | – | - |
| 100 | 24 | 100 a | - | - | - |
| | 48 | 100 a | - | - | - |
| | 72 | 100 a | - | - | - |

*: در هر ستون، حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ توسط آزمون چند دامنه دانکن (DMRT) می‌باشد.

در رقم برلینا، ساختارهای ۱۰-۹ هسته‌ای تنها در تیمار ۲۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۴۸ ساعت مشاهده شدند. ساختارهای ۸-۶ هسته‌ای نیز در تیمارهای ۲۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت و همچنین غلظت ۵۰ میلی گرم به مدت ۲۴ ساعت رویت گردیدند. در رقم پتوپراید، در هیچکدام از غلظت‌ها و دوره‌های تیماری، ساختارهای با بیشتر از ۸ هسته مشاهده نگردید. ساختارهای ۸-۶ هسته‌ای در تیمارهای ۲۵ میلی‌گرم به مدت ۲۴ ساعت و ۵۰ میلی گرم به مدت ۲۴ ساعت مشاهده شدند. نتایج حاصل از تحقیق Shariatpanahi و همکاران (۲۰۰۷) بر روی کشت میکروسپور گوجه فرنگی نشان داد که ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کلشی‌سین به مدت ۷۲ ساعت مناسب‌ترین تیمار برای القای تقسیمات متقارن در رقم تحقیقاتی میکروتوم می‌باشد. تحقیق Motallebi-Azar و Panahandeh (۲۰۱۰) نیز نشان داد که کلشی‌سین تا غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر، موجب افزایش کالوس‌زایی و باززایی گیاهچه از بساک‌های کشت شده گوجه فرنگی می‌شود، اما غلظت‌های بالاتر اثر بازدارندگی نشان دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که با وجود موثر بودن کلشی‌سین بر القای تقسیمات اسپورفیتی

www.SID.ir

Archive of SID



در میکروسپورهای کشت شده گوجه فرنگی، در هیچکدام از تیمارها، ساختارهای رویانی مشاهده نگردید.

کلشی‌سین با چسپیدن به هترودیمرهای توبولین $\alpha$ و $\beta$ موجب تخریب میکروتوبول‌ها و در نتیجه بر هم خوردن تقسیم نامتقارن هسته میکروسپورها می‌شود که این تغییرات در نهایت موجب القای رویان‌زایی در میکروسپورها می‌شود (Zhao *et al*., 1996; Shariatpanahi *et al*., 2006). در مقایسه با رقم پتوپراید، تقسیمات متقارن بیشتری در میکروسپورهای رقم برلینا مشاهد شد. ژنوتیپ گیاه مادری تاثیر بسزایی بر رویان‌زایی میکروسپور دارد و این تأثیر نه تنها از گونه‌ای به گونه‌ای دیگر بلکه درون ژنوتیپ‌های یک گونه نیز متفاوت است. علاوه بر تغییرات درون و برون گونه‌ای، گاه در بین واریته‌ها و یا ارقام یک ژنوتیپ نیز تغییرات مشاهده می‌شود (Zamani *et al*., 2003; Shumilina *et al*., 2015). در این تحقیق، تاثیر منفی غلظت بالای کلشی‌سین بر القای تقسیمات اسپوروفیتی در هر دو رقم مشاهده گردید به طوری‌که تقسیمات متقارن در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و در همه دوره‌های تیماری القا نگردید. نتایج این تحقیق نشان داد که در صورت انتخاب دوره مناسب پیش تیمار سرمایی و گرمایی و همچنین دوره و غلظت مناسب کلشی‌سین، می‌توان تقسیمات متقارن را در میکروسپورهای گوجه فرنگی القا نمود. همچنین، این تحقیق اولین گزارش مبنی بر تشکیل رویان‌های کروی از جدایه‌های میکروسپور گوجه فرنگی می‌باشد. رویان‌های حاصله تنها در محیط کشت دو لایه و در تیمار ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ و ۵ روز و سپس ۲ روز ۳۰ درجه سانتیگراد تشکیل شدند. در محیط کشت دو لایه، بساک‌ها چند روز پس از کشت باز شده و میکروسپورها به داخل محیط کشت آزاد می‌گردند. میکروسپورهای القا شده با انجام تقسیمات پی‌درپی، ساختارهای رویانی را تشکیل می‌دهند. تکامل و بلوغ رویان‌های حاصله و باززایی گیاهان هاپلوئید مضاعف در دست بررسی می‌باشد.

## سپاسگزاری

پژوهش حاضر بخشی از پایان‌نامه دکتری گروه اصلاح نباتات دانشگاه اردبیل است که تحت حمایت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران در قالب پروژه شماره ۱۲-۰۵-۰۵-۹۴۵۱-۹۴۰۰۰۱ انجام شد.

## REFERENCES

Afroz A, Chaudhry Z, Rashid U, Rashid Khan M, Muhammed Ali G (2010) Enhanced regeneration in explants of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) with the treatment of coconut water. African J. Biotech. 24(9): 3634-3644.

Babbar SB, Agarwal PK, Sahay S, Bhojwani SS (2004) Isolated microspore culture of *Brassica*: an experimental tool for developmental studies and crop improvement. Indian J. Biotech. 3: 185-202.

Bal U, Abak K (2007) Induction of symmetrical nucleus division and multicellular structures from the isolated microspores of *Lycopersicon esculentum* Mill. Biotech. Biotech. Equip. 19(1): 35-42.

Bal U, Abak K (2007) Haploidy in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): a critical review. Euphytica 158: 1-9.

Bal U, Shariatpanahi ME, Castro AJ, Emery D, Clement C, Dehestani-Ardakani M, Mozaffari K, Touraev A (2012) Pseudo-embryogenic structures in anther and isolated microspore cultures *in vitro*: a cautionary guide. Czech J. Genet. Plant Breed. 48(2): 51-60.

Corral-Martínez P, Nuez F, Seguí-Simarro

www.SID.ir

Archive of SID



JM (2010) Genetic, quantitative and microscopic evidence for fusion of haploid nuclei and growth of somatic calli in cultured *ms10*$^{35}$ tomato anthers. Euphytica. 178: 215-228.

Ferrie AMR, Caswell KL (2011) Isolated microspore culture techniques and recent progressfor haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 104: 301-309.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima L (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.

Herrera JC, Moreno LG, Acuna JR, Pena MD, Osorio D (2002) Colchicine-induced microspore embryogenesis in coffee. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 71(1): 89-92.

Lichter R (1982) Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol. 105: 427-434.

Motallebi-Azar A, Khosrowshahli M, Valizadeh M, Masiha S, Moini A, Sharabianlou Z (2004) Combination ability and heritability of callogenesis and shoot regeneration from cultured anthers of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Iran J. Agri. Sci. 36(5): 1113-1122.

Motallebi-Azar A, Panahandeh J (2010) Effects of colchicine and cold duration pretreatments on androgenesis responses of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) via anther culture. Russ. Agri. Sci. 36(5): 338-341.

Peng M, Wolyn DJ (1999) Improved callus formation and plant regeneration for shed microspore culture in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Plant Cell Rep. 18(1): 954-958.

Sabehat A, Lurie S, Weiss D (1998) Expression of small heat shock proteins at low temperatures. Plant Physiol. 117(2): 651-658.

Seguí-Simarro JM, Testillano PS, Jouannic S, Henry Y, Risueno MC (2005) Mitogen-activated protein kinases are developmentally regulated during stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. Histochem. Cell Biol. 123: 541-551.

Seguí-Simarro JM, Nuez F (2007) Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by *in vitro* culture of tomato isolated microspores and whole anthers. J. Exp. Bot. 58(5): 1119-1132.

Seguí-Simarro JM, Corral-Martínez P, Parra-Vega V, González-García B (2011) Androgenesis in recalcitrant *Solanaceous* crops. Plant Cell Rep. 30(5): 765-778.

Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle-Bors E, Touraev A (2006) Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. Physiol. Plant. 127(4): 519-534.

Shariatpanahi ME, Touraev A, Heberle-Bors E (2007) Induction of embryogenesis in microspores of tomato (*Lycoporsicum esculontum* Mill) cv. Microtom. Seed Plant Improv. J. 25(3): 317-330.

Shumilina DV, Shmykova NA, Bondareva LL, Suprunova TP (2015) Effect of genotype and medium culture content on microspore-derived embryo formation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. chinensis ) cv. Lastochka. Biol. Bull. 42(4): 302-309.

Simmonds DH, Keller WA (1999) Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis in *Brassica napus*. Planta. 208: 383-391.

Supena EDJ, Custers JBM (2011) Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Sci. Hort. 130(4): 769-774.

Tay D (2002) Vegetable Hybrid Seed Production.pp: 128-139. In Proceedings International Seed Seminar: Trade, Production and Technology. McDonald M and Contreras S (eds). Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e IngenieríaForestal, Departamento de CienciasVegetales. October, 15th and 16th, 2002. Santiago - Chile.

Touraev A, Ilham A, Vicente O, Heberle-Bors E (1996a) Stress induced microspore embryogenesis from tobacco microspores: an optimized system for molecular studies. Plant Cell Rep. 15: 561-565.

Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O, Heberle-Bors E (1996b) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticuma estivum* L.) induced by starvation at high temperature. Plant Reprod. 9(4): 209-215.

Touraev A, Pfosser M, Heberle-Bors E

www.SID.ir

Archive of SID



(2001) The microspore: a haploid multipurpose cell. Adv. Bot. Res. 35: 53-109.

Varghese TM, Yadav G (1986) Production of embryoids and calli from isolated microspores of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in liquid media. Biol. Plant. 28(2): 126-129.

Vergne P, Delvallee I, Dumas C (1987) Rapid assessment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permealization. Stain. Technol. 62: 299-304.

Wijnker E, van Dun K, de Snoo CB, Lelivelt CLC, Keurentjes JJB, Naharudin NS, Ravi M, Chan SWL, de Jong H, Dirks R (2012) Reverse breeding in *Arabidopsis thaliana* generates homozygous parental lines from a heterozygous plant. Nature Genet. 44:467-470.

Würschum T, Tucker MR, Reif JC, Maurer HP (2012) Improved efficiency of doubled haploid generation in hexaploid triticale by *in vitro* chromosome doubling. BMC Plant Biol. 12:109.

Zagorska NA, Shtereva A, Dimitrov BD, Kruleva MM (1998) Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)I. Influence of genotype on androgenetic ability. Plant Cell. Rep. 17: 968-973.

Zagorska NA, Shtereva LA, Kruleva MM, Sotirova VG, Baralieva DL, Dimitrov BD (2004) Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). III. Characterization of the regenerants. Plant Cell Rep. 22: 449-456.

Zamani I, Gouli-Vavdinoudi E, Kovacs G, Xynias I, Roupakias D, Barnabas B (2003) Effect of parental genotypes and colchicine treatment on the androgenic response of wheat F1 hybrids. Plant Breed. 122(4): 314-317.

Zhao JP, Simmonds DH, Newcomb W (1996) Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. Topas. Planta 198: 433-439.

Zhao JP, Newcomb W, Simmonds D (2003) Heat-Shock proteins 70 kDa and 19 kDa are not required for induction of embryogenesis of *Brassica napus* L. cv. Topas microspores. Plant Cell Physiol. 44(12): 1417-1421.

Zheng MY (2003) Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*)-doubled haploid production via induced embryogenesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 73: 213-230.

Zoriniants S, Tashpulatov AS, Heberle-Bors E, Touraev A (2005) The role of stress in the induction of haploid microspore embryogenesis. In: Palmer CE, Keller WA, Kasha KJ (eds) Biotechnology in Agriculture and Forestry. 56: 35-52.

www.SID.ir