بررسی میکروسکوپی مراحل تشکیل دانه و سقط جنین در انگور بی‌دانه ایرانی

مهدی محمّدی*[۱]، محمّدرضا دادپور[۲]، علی اسکندری[۱] اعظم برزویی[۱] و الهام محجل‌کاظمی[۲]

[۱]پژوهشگر و عضو هیئت‌علمی پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، کرج

[۲] عضو هیئت‌علمی دانشگاه تبریز، تبریز

*نویسنده مسئول: MahdiMohamadi1982@yahoo.com

چکیده

انگور سلطانین از مهم‌ترین ارقام بیدانه (استنوسپرموکارپ) به‌شمار می‌آید که علت بی‌بذری در آن، تحلیل رفتن جنین ذکر شده است. بررسی مراحل نمو دانه و تعیین زمان سقط جنین، می‌تواند در کارهای اصلاحی و مطالعات زیست‌شناسی حائز اهمیت باشد. با توجه به مشکلات خاص تهیه نمونه‌های میکروسکوپی از گیاهان چندساله، در این پروژه رشد و نمو بذر با استفاده از تکنیک‌های بافت‌شناسی کلاسیک مورد بررسی قرار گرفته است. نمونه‌ها از ایستگاه تحقیقاتی کهریز ارومیه برداشت شدند و سپس در تثبیت‌کننده قرار گرفتند. در ادامه نمونه‌ها پارافین‌دهی شده و سپس با میکروتوم برش زده شدند. در نهایت پس از رنگ‌آمیزی با روش پاس- هماتوکسیلن، مراحل لقاح، رشد و نمو جنین، پوسته‌ها و آندوسپرم توسط میکروسکوپ نوری بررسی و از ساختار تخمک و بذر عکس‌برداری شد. بررسی‌ها نشان داد که در رقم بی‌دانه، پس از لقاح مضاعف، رشد و نمو سلول تخم و آندوسپرم دچار تأخیر می‌شود. یعنی سلول تخم پس از گرده‌افشانی، اولین تقسیم خود را انجام داده و سلول‌های رأسی و تحتانی تشکیل شده بود؛ ولی پس از آن، تقسیم‌ها متوقف شد. در ۲۰ روز پس از گرده‌افشانی، یک‌سری رسوبات قهوه‌ای رنگ در اطراف سلول تخم مشاهده شد. تقسیم آندوسپرم نیز به‌صورت هسته‌های آزاد در کیسه جنینی مشاهده شدند؛ ولی ادامه روند متوقف شد. همچنین در دیواره‌های عرضی سلول‌ها، به‌طور کاملاً مشخصی ضخیم‌شدگی دیده شد. در مراحل پایانی، در سلول‌های بافت خورش، جمع‌شدگی و دژنره‌شدن مشاهده شد و پوسته داخلی نیز از پوسته خارجی جدا شده بود. یکی از مهم‌ترین عوامل موفقیت در تکنیک نجات جنین، سن برداشت جنین یا تخمک است.

کلمات کلیدی: **فیکساتور، پارافین‌دهی، میکروتوم و رنگ‌آمیزی**

مقدمه

بی‌دانگی در انگور در دو گروه کارنتی[۱] و سلطانین[۲] قابل بررسی است. در بی‌دانگی کارنتی، کیسه جنینی تشکیل نمی‌گردد و بر این اساس، امکان باروری و پیدایش بذر نیز وجود ندارد. در بی‌دانگی سلطانین، که بر پایه استنوسپرموکارپی استوار است، گرده‌افشانی و باروری روی می‌دهد و بذر نیز پدید می‌آید؛ با این حال، پس از چندی، جنین سقط می‌شود و رشد حبه‌ها تا زمان رسیدگی میوه، بدون حضور بذر کامل، ادامه می‌یابد (Pratt, C. 1971).

در کارهای دورگه‌گیری، که به‌منظور انتقال ژن‌های واریته‌های وحشی یا واریته‌هایی که دارای صفت بخصوص مطلوبی هستند به واریته‌های زراعی استفاده می‌شود؛ نتاج حاصل از تلاقی بیدانه در بیدانه یا بیدانه در دانه‌دار دچار سقط، پیش از رسیدن کامل می‌شوند و به همین دلیل از تکنیک نجات‌جنین استفاده می‌شود که در آن تخمک یا جنین نارس جدا شده از تخمک به محیط غذائی مایع یا جامد انتقال می‌یابد تا ادامه رشد و نمو خود را در آنجا طی

[1]- Currants
[2] -Sultanin

کند (Bharathy *et al.*,2005 ،Yang *et al.*, 2007). مهم‌ترین عوامل جهت موفقیت در تکنیک نجات جنین، محیط کشت مناسب، سن برداشت جنین یا تخمک و ژنوتیپ گیاه است (Bharathy *et al.*,2005 ،Yang *et al.*, 2007).

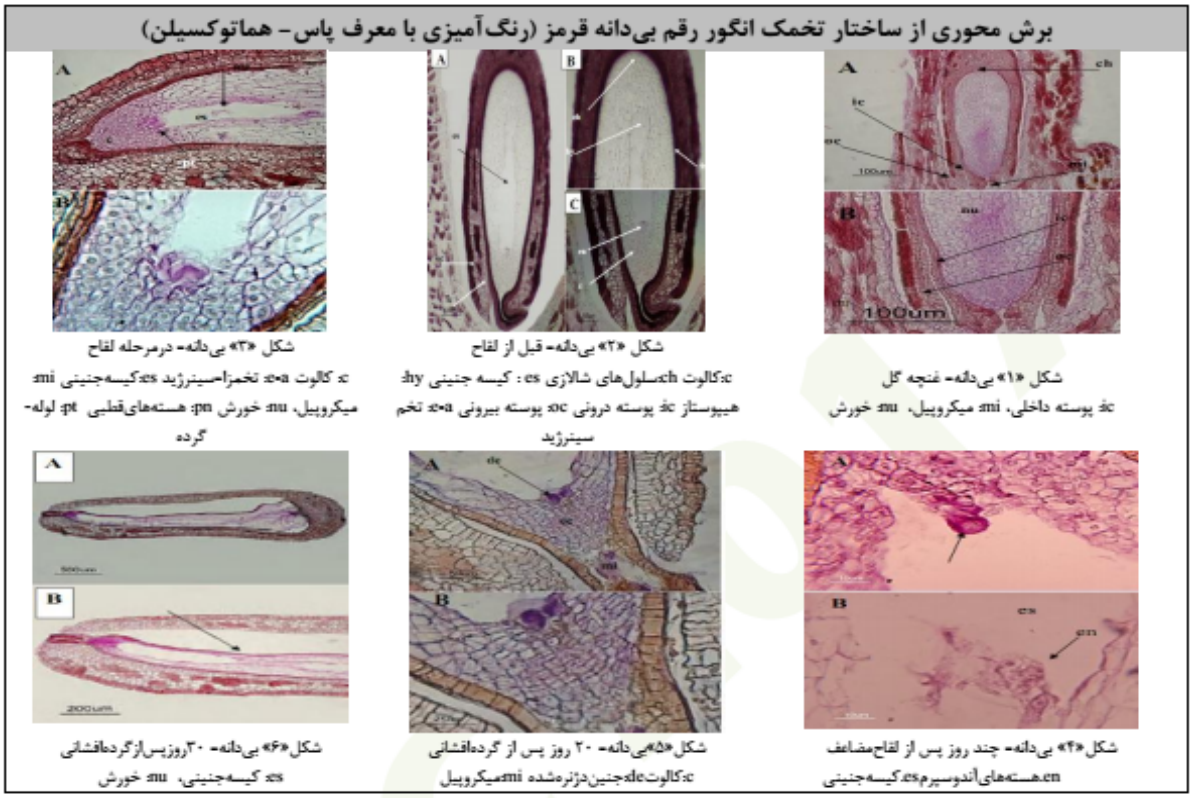
بیشتر فرآیندهای نمو تخمک و پیدایش جنین در سطح میکروسکوپی روی می‌دهند، از این‌رو بهره‌گیری از روش های مناسب بافت‌شناسی و عکس‌برداری، برای بررسی ساختاری بی‌دانگی در انگور، اجتناب‌ناپذیر خواهد بود. تهیه نمونه‌های میکروسکوپی از درختان، دارای مشکلات خاصی است که می‌توان به سفتی بافت‌ها، وجود تانن‌ها و ترکیبات فنلی در آن اشاره نمود، که با مواد شیمیائی بکار رفته در فیکساتور ترکیب، از تثبیت بهینه جلوگیری می‌کند (Ruzin, S.E. 1999).

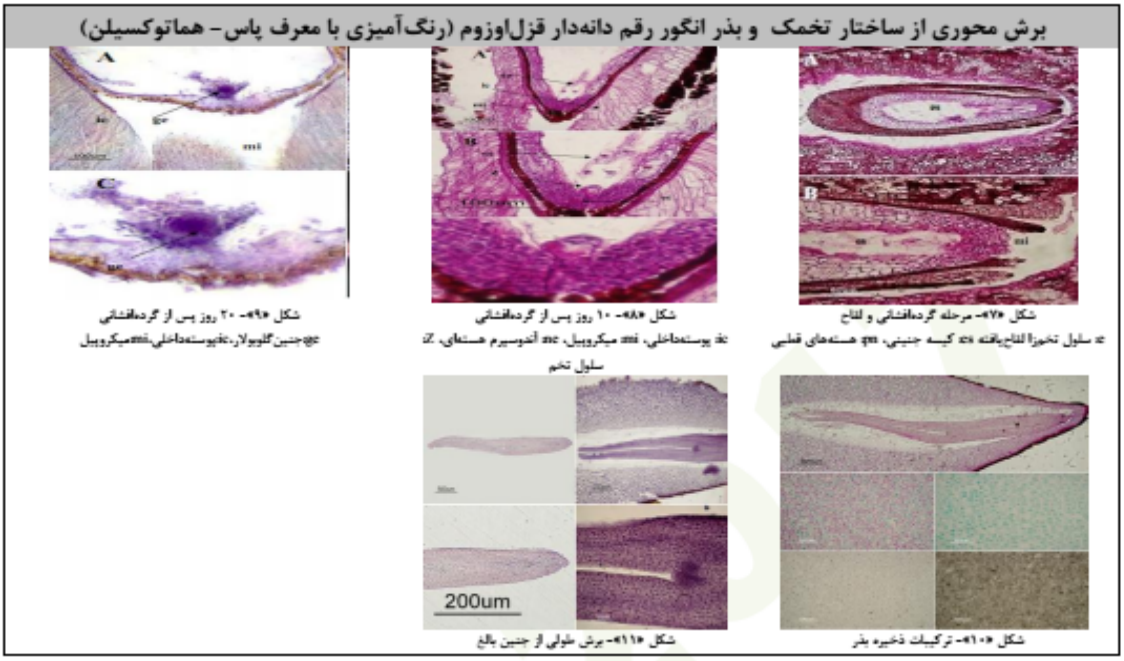
مواد و روش‌ها

نمونه‌های برداشت شده شامل سلطانین (بیدانه ایرانی) و قزل اوزوم (حاوی بذر حقیقی) بودند. نمونه‌ها از خوشه‌هایی که در مرحله مشابه فنولوژیکی بودند برداشت شده و برای نمونه‌برداری‌های بعدی علامت‌گذاری شدند. گیاهان مورد استفاده در ایستگاه تحقیقاتی کهریز ارومیه، ۸ ساله بوده و به روش هدایت روسیمی کوردون (۴ × ۲ متر) تربیت شده بودند. نمونه‌ها طی مرحله ۱۰ روز پیش از ریزش کلاهک تا ۶۰ روز پس از آن (با فواصل زمانی ۵ روزه، یک گل‌آذین به ازای هر شاخه، و ۵ شاخه به ازای هر گیاه و ۲۰ گیاه در کل آزمایش)، جمع‌آوری شد و بلافاصله در فیکساتور FAA تثبیت شدند(Raghavan, C. 2006) .. پس از آن در آزمایشگاه سیتوشیمی دانشکده علوم دانشگاه تبریز، بر اساس طول مادگی در مراحل اولیه و بر اساس طول میوه در مراحل بعدی تقسیم‌بندی شدند. نمونه‌های تثبیت‌شده پارافین‌دهی شده و سپس با میکروتوم روتاری با ضخامت ۸-۱۰ میکرون، به‌صورت محوری برش زده شدند. رنگ‌آمیزی نمونه‌ها نیز با استفاده از معرف هماتوکسیلن- اسید پریدیک - شیف انجام گرفت و در نهایت پس از مونتاژ لام‌ها، در زیر میکروسکوپ نوری برررسی و عکس‌برداری شدند (Raghavan, C. 2006).

نتایج و بحث

مشاهدات نشان داد پس از لقاح مضاعف، فرآیندهای بعد از تشکیل سلول تخم، آندوسپرم و تقسیم‌های بعدی، دچار تاخیر زمانی غیرطبیعی شده و در نتیجه، جنین در رقم بی‌دانه سقط می‌شود (شکل ۱ تا ۴ رقم بی‌دانه. اشکال به دو گروه بی‌دانه و دانه‌دار تقسیم‌بندی شده‌اند. شکل B در واقع بزرگ‌نمایی شکل A می‌باشد). سلول تخم در ۱۵-۲۵ روز پس از گرده‌افشانی، اولین تقسیم خود را انجام داده و سلول‌های رأسی و تحتانی (بازال) تشکیل شده بودند، ولی پس از آن، تقسیم‌ها متوقف شده بود (شکل ۴ و ۵ رقم بی‌دانه). اندازه تخمک‌ها در این مرحله ۶ تا ۸ میلی‌متر بودند. تقسیم سلول آندوسپرم به‌صورت هسته‌ای انجام شده بود که به‌صورت هسته‌های آزاد در کیسه جنینی مشاهده شدند ولی ادامه تقسیم‌ها متوقف شده بود (شکل ۴ رقم بی‌دانه). همچنین در دیواره‌های عرضی سلول‌های کالوت (سلول‌های نزدیک محل سفت یا میکروپیل که محل ورود لوله گرده می‌باشد)، به‌طور کاملاً مشخصی ضخیم‌شدگی دیده شد (شکل ۵ رقم بی‌دانه). در مراحل پایانی، در سلول‌های بافت خورش، جمع‌شدگی و دژنره شدن مشاهده گردید (شکل ۶ بی‌دانه). پوسته داخلی نیز از پوسته خارجی جدا شده بود (شکل ۶ رقم بی‌دانه). در ۲۰ روز پس از گرده‌افشانی، یک سری رسوبات قهوه‌ای رنگ در اطراف سلول تخم مشاهده شد (شکل ۵ رقم بی‌دانه). این در حالی بود که در رقم قزل اوزوم (رقم دانه‌دار)، ما شاهد تشکیل جنین گلوبولار و رشد آندوسپرم در ۲۰ روز پس از گرده‌افشانی بودیم (شکل ۱ تا ۵ رقم دانه‌دار). این نتایج با آزمایش‌های عبادی و همکاران در سال ۱۳۸۰ه.ش، و کورکوتال در سال ۲۰۰۵ میلادی تا حدود زیادی مطابقت دارد. یکی از مهم‌ترین عوامل موفقیت در تکنیک نجات جنین، سن برداشت جنین یا تخمک است. (Korkutallkl, I. 2005).





سپاس‌گذاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانم از استاد راهنمای پایان‌نامه خویش، سرکار خانم دکتر محبوبه علی‌اصغرپور، استاد بازنشسته دانشکده علوم دانشگاه تبریز، و همچنین مدیر گروه سابق دانشکده علوم، آقای دکتر علی موافقی تشکر نمایم.

منابع

Batigina, T.B. 2006. Embryology of flowering plants: Terminology and concepts. Science Publishers. Volume 2: seed, 786 pages.

Bharathy, P. V., Karibasappa, G. S., Patil, S. G. and Agrawal, D. C. 2005. In ovule rescue of hybrid embryos in Flame seedless grapes-Influence of pre-bloom sprays of benzyladenine. Scientia Horticulturae. 106: 353-359.

Korkutallkl, I. 2005. Embryo abortion in some new seedless table grape (Vitis vinifera) varieties. International Journal of Botany. 1: 1-4.

Pratt, C. 1971. Reproductive anatomy in cultivated grapes - a review. American. Journal of Enology and Viticulture. 22: 92-109.

Raghavan, C. 2006. Double fertilization. Emberyo and endosperm development in flowering plants. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Ruzin, S.E. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Oxford University Press, New York.

WEI, J., and SUN, M-X. 2002. Embryo Sac Isolation in Arabidopsis thaliana: A Simple and Efficient Technique for Structure Analysis and Mutant Selection. Plant Molecular Biology Reporter 20: 141–148.

Yang, D., Li, W., Li, S., Yang, X., Wu, J. and Cao, Z. 2007. In vitro embryo rescue culture of F1 progenies from crosses between diploid and tetraploid grape varieties. PGR. 51: 63-71.

The Microscopic Study of Seed Formation Stages and Embryo Abortion Mechanisms in *Vitis vinifera*

Mahdi Mohamadi[1]*, MohamadReza Dadpour [2], Ali Eskandari [1], Azam Borzoyi [1] and Elham Mohajel Kazemi[2]

[1*]Researcher and Faculty Member of Nuclear Science and Technology Institute, Nuclear Agriculture Institute, Atomic Energy Organization, Karaj

[2] Faculty Member of Tabriz University, Tabriz

*Corresponding Author: MahdiMohamadi1982@yahoo.com

Abstract

Thompson seedless is the most important cultivar which is produced seedless or stenospermocaripc fruit due to embryo abortion. Although seedlessness is recognized as a valuable characteristic for consumers, but from the breeding viewpoint, it encompasses many restrictions. Therefore, the study of seed structure to determine the embryo abortion time in the stenospermocarpic grapes is very important in breeding projects and biological studies. To date, there is no sufficient information on this field due to many methodological barriers. In present work, using the classic histological studies, we attempted to demonstrate the developmental pathways of embryo in seedless grape. For this purpose, samples were taken from full bloom until fruit maturation every 5 days from Kahriz Research Station (Urmian) and fixed in FAA, embedded in paraffin, sectioned with rotary microtome, stained with PAS-Hematoxilen and viewed under microscope and photography. The results were shown that development of zygote and endosperm after double fertilization was delayed and arrested at 15- 20 days after pollination in the Sultanin. On the contrary, in "Gizil Üzum" cultivar, we observed globular embryo and well developed endosperm at 20 days after pollination. Parallel to above mentioned phenomenon in Sultanin, callout cells membrane was started to thicken. Also, some brown compounds were detected in the vicinity of the pre-embryo at 20 day after pollination. This type of embryos was identified with degenerated nucleus which tends to separate inner coat from outer coat.

***Keyword*: Fixator, embedded in paraffin, rotary microtome and staining**