مطالعه بروز ناهنجاری‌های مراحل میکروسپورزایی گیاه سیر

احمدرضا عباسی‌فر*[۱]، فرشاد دشتی [۲]، عبدالکریم چهرگانی‌راد [۳]
[۱]* استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک
[۲] دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
[۳] استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی سینا همدان
*نویسنده مسئول: Abbasifar1965@yahoo.com

چکیده

ارقام تجاری سیر همگی عقیم هستند. میکروگامتوژنز در نهاندانگان زیادی مطالعه شده است، اما در گیاه سیر بندرت و در سیرهای ایرانی تاکنون گزارش نشده است و اطلاعات بسیار کمی در زمینه میکروگامتوژنز در این محصول مهم وجود دارد. درک فرآیندهای گامت‌زایی، می‌تواند به هیبریداسیون، نمو بذر زنده و اصلاح سنتی در سیر کمک نموده و آن را تسهیل نماید. سه همگروه فریدونکنار، چینی زابل و آستانه‌اشرفیه که شرایط لازم برای تشکیل گرده را داشتند، برای انجام این آزمایش انتخاب گردیدند. برای بررسی ناهنجاری‌های ایجاد شده در مراحل میکروسپورزایی از بساک و دانه گرده هر سه همگروه منتخب، نمونه‌گیری به‌عمل آمد. پس از تثبیت و نگهداری نمونه‌ها در فیکساتور، مراحل آماده‌سازی آن‌ها جهت مطالعات میکروسکوپی انجام گردید. نتایج نشان داد که انواع نرعقیمی و مجموعاً ۱۳ نوع ناهنجاری وجود دارد که مهم‌ترین آن، توقف نمو دانه‌های گرده بود. ناهنجاری‌های شناسایی شده در مراحل تکوین دانه گرده سیرهای ایرانی برای اولین بار در این تحقیق شناسایی و گزارش شدند. همچنین نتایج نشان داد که بخش اعظم نرعقیمی‌های مشاهده شده متأثر از عقیمی ساختاری و بخشی نیز در اثر شرایط محیطی ایجاد شده است.

***کلمات کلیدی:* بساک، تکوین، میکروگامتوژنز، نرعقیمی، هیبریداسیون**

مقدمه

میکروگامتوژنز در نهاندانگان زیادی مطالعه شده است. اما در گیاه سیر بندرت انجام شده و در سیرهای ایرانی تا کنون گزارش نشده است. اگرچه باروری در تعدادی از ژنوتیپ‌های سیر که عمدتاً بومی آسیای مرکزی هستند، گزارش شده است (Etoh et al.,1988; Pooler and Simon, 1993 and1994; Jenderek and Hanna, 2000; Kamenetsky et al., 2005)، ولی ارقام تجاری سیر همگی عقیم بوده و اطلاعات بسیار اندکی در زمینه میکروگامتوژنز در این محصول مهم وجود دارد.

نتایج پژوهش محققین نشان داد که ژنوتیپ‌های گلده سیر از نظر باروری و توانایی تولید گرده زنده متفاوت هستند که احتمالاً به خاطر وجود ناهنجاری‌ها در اندام‌زایی گل می‌باشد (Shemesh etal., 2012). دلایل عقیمی سیر رقابت برای مواد غذایی بین جوانه‌های رویشی و گل در گل‌آذین در حال نمو (Koul and Gohil, 1970)، تخریب تاپتوم (Novak, 1972)، بیماری‌های شبه تخریب‌کننده یا فاسدکننده‌ای که توسط میکوپلاسما و یا ویروس‌ها القاء می‌شود (Konvicka, 1973)، حذف‌های کروموزومی (Etoh, 1985) و ناهنجاری در نمو کیسه رویان (Etoh, 1985) ذکر شده است. محققین نرعقیمی در سیر را متأثر از عوامل مختلفی مانند شرایط محیطی، تغذیه، بیماری‌ها و جهش‌ها دانسته و عنوان داشتند بیان فنوتیپی نرعقیمی متفاوت بوده و از عدم وجود کامل اندام‌های نر، ناتوانی برای توسعه بافت‌های اسپورزا (نبود میوز)، سقط گرده در طول نمو آن، تا عدم باز شدن بساک‌ها یا ناتوانی گرده بالغ برای جوانه‌زنی روی کلاله سازگار را دربرمی‌گیرد (Shemesh et al.,2012).

هدف از این پژوهش، بررسی بروز ناهنجاری‌های احتمالی در مراحل تکوین بساک و دانه گرده در سه همگروه سیر منتخب از آزمایش مقدماتی این پژوهش که شرایط لازم برای تشکیل گرده را داشتند به نام‌های فریدونکنار، چینی زابل و آستانه‌اشرفیه بود. این گزارش اولین مطالعه در خصوص میکروگامتوژنز در همگروه‌های سیر ایرانی است و برای اولین بار فرآیندهای زایشی سیرهای کشور ایران در این تحقیق مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

از بین ۴۰ همگروه سیر استفاده شده در آزمایش‌های مقدماتی، سه همگروه سیر فریدونکنار، چینی زابل و آستانه اشرفیه که شرایط بهتری را برای تشکیل گل، گل‌آذین، بساک و دانه گرده داشتند، برای انجام این آزمایش انتخاب شدند. برای بررسی ناهنجاری‌های ایجاد شده در مراحل میکروسپورزایی بساک و دانه گرده، از مراحل مختلف تشکیل گل‌آذین، جوانه گل تا تشکیل بذر در هر سه همگروه منتخب، نمونه‌گیری به عمل آمد.

برای آماده‌سازی نمونه‌ها جهت مطالعات میکروسکوپی، مراحل متعددی بر روی آن‌ها شامل تثبیت، شستشو، آب گیری، شفاف‌سازی، نفوذ دادن پارافین، قالب‌گیری، برش‌گیری، رنگ‌آمیزی و چسباندن بر روی لام انجام گرفت (Chehregani Rad et al.,2008; Chehregani Rad and Sedaghat 2009; Mohsenzadeh et al.,. 2012 and Chehregani Rad et al., 2014).

نتایج و بحث

مطالعه برش‌های میکروسکوپی تهیه شده از مراحل مختلف میکروسپورزایی در بساک و همچنین مراحل تکوین دانه گرده نشان داد که همگروه‌های سیر ایرانی منتخب در مراحل میکروسپورزایی دچار ناهنجاری‌های متعددی شده‌اند که در نهایت، این ناهنجاری‌ها منجر به نرعقیمی در سیرهای ایرانی می‌شوند. ناهنجاری‌های شناسایی شده که برای اولین بار در همگروه‌های سیر ایرانی گزارش می‌شوند عبارت‌اند از:

۱-نرعقیمی کامل. وجود ساختارهای غیرطبیعی یا مورفولوژی معیوب بساک‌ها که طی مراحل اولیه نمو گل اتفاق افتاد، منجر به نرعقیمی کامل گل شد. میکروگامتوژنز پیش از این در مراحل نموی یک یا دو هسته‌ای میکروسپور متوقف شده و گامتوژنز هرگز کامل نشد. در این نوع نرعقیمی، بساک‌ها ضمن تغییر رنگ از سبز به زرد تیره، در مراحل اولیه نمو، تخریب شدند. بنابراین، گل‌ها به‌طور کامل عقیم هستند و سرانجام جوانه‌های گل در مرحله پیش از شکوفایی، پژمرده شدند. مرحله پیشرفته این نوع عقیمی را می‌توان در گل‌آذین‌های با تعداد سوخیزه هوایی بالا دید. در این گل‌آذین‌ها، گل‌ها در همان مراحل اولیه رشد، در اثر فشار ناشی از رقابت شدید سوخیزه‌های هوایی، از رشد و نمو باز مانده و کاملاً تخریب شده و از بین رفته و عقیمی کامل را نشان دادند.

۲- توقف نمو کامل دانه‌های گرده. از رایج‌ترین انواع نرعقیمی در هر سه همگروه سیر مطالعه شده، این نوع نرعقیمی بود. در این نوع ناهنجاری، دانه‌های گرده مراحل نمو را طی کرده، ولی قبل از تبدیل به گرده کامل، تخریب شده و درون کیسه گرده به‌صورت گرده‌های پوک و ناقص مشاهده شدند.

۳- عدم رنگ‌پذیری دانه‌های گرده با استفاده از استوکارمن. در هر سه همگروه، میزان رنگ‌پذیری دانه‌های گرده با استوکارمن کمتر از ۱۰٪ بود که نشان از زنده بودن بسیار کم دانه‌های گرده در آن‌ها می‌باشد. این نتیجه با نتایج سایر محققین (Etoh et al.,1996; Pooler and Simon,1994; Jenderek and Hanna, 2000)که میزان رنگ‌پذیری دانه‌های گرده را متفاوت و در همگروه‌های سیر نرعقیم بسیار پایین دانستند، مطابقت دارد.

۴- نرعقیمی خاص. این نوع نرعقیمی را می‌توان به دو گروه تقسیم نمود. در گروه اول، روی یک گل یک یا چند بساک زرد و پژمرده شده و محتوی گرده عقیم (پوک) وجود داشت، درحالی‌که بساک‌های دیگر به رنگ سبز (در بساک نارس) یا ارغوانی (در بساک رسیده) بوده و به نمو خود ادامه داده و محتوی گرده سالم بودند. در گروه دوم، یک گل از

گل‌آذین دارای بساک زرد و محتوی گرده عقیم بودند، درحالی‌که گل یا گل‌های دیگر از همان گل‌آذین، دارای بساک‌های به رنگ ارغوانی بوده و به نمو خود ادامه داده و محتوی گرده سالم بودند. فقط گروه اول این نوع نرعقیمی توسط محققین گزارش شده است.

۵- تشکیل اجسام شبه رویان در درون بساک. این نوع ناهنجاری که بسیار متنوع مشاهده گردید، در بین هر سه همگروه نسبتاً شایع بود. در این پدیده در درون بساک، توده‌های سلولی شبه رویان به‌جای میکروسپورها تشکیل شدند. این نوع ناهنجاری بسیار متنوع مشاهده گردید.

۶- به هم چسبیدن دانه‌های گرده. در این ناهنجاری، دانه‌های گرده تولید شده درون بساک به‌صورت غیر عادی بهم‌دیگر چسبیده بودند. مرحله سیتوکینز به خوبی انجام نشده و لایه کالوزی تحلیل نرفته تا گرده‌ها از هم‌دیگر جدا شوند. بنابراین، دانه‌های گرده به‌صورت یک توده مشاهده گردیدند. همچنین گرده‌های موجود در این توده به هم چسبیده، مراحل نمو کامل را طی نکرده و به‌صورت ورقه‌ای و تغییر شکل یافته باقیمانده و این اتفاق تا قبل از ایجاد میکروسپور جوان رخ داد و به همین دلیل گرده‌افشانی نیز صورت نگرفت.

۷- اختلال در میوز. یکی از شایع‌ترین ناهنجاری‌های مشاهده شده، بروز اختلال در میوز و توقف در نمو میکروسپورها بود. علیرغم اینکه بساک بالغ و لایه مکانیکی کامل شده و لایه تاپی نیز از بین رفت، به دلیل اختلالات به وجود آمده، نمو سلول‌های مادر گرده در حال میوز متوقف گردید. تنوع زیادی از نظر اختلال در مراحل میوز دانه گرده مشاهده گردید. مثلاً دانه گرده بدون طی مراحل میوز و بدون تولید اگزین در حال تبدیل به گرده بود و در کنار آن سلول‌های مادر گرده مشاهده شد. دیادی دیده شد که یک تقسیم نامساوی را انجام داده و دو هسته با اندازه نامساوی را ایجاد نموده است و یا در یک حجره بساک دو تتراد در حال سیتوکینز دیده شد که یکی از تترادها دارای آرایش خطی[1](لینیر) است و تتراد دیگری دارای آرایش تتراهدرال[2](چهار وجهی که سه وجه آن دیده می‌شود) بود، در حالیکه هر دو می‌بایست از یک الگو تبعیت نمایند. گرده دارای بی‌نظمی در صفحه متافازی۱ و گرده دارای ناهنجاری به دلیل جدا شدن یک کروموزوم در متافاز۱ مشاهده گردید. سلول‌های مادر گرده‌ای دیده شد که از نظر اندازه با هم متفاوت هستند که این ناهنجاری محسوب می‌شود. در یکی از سلول‌های مادر گرده، حالت دفع مواد ژنتیکی دیده شد که این پدیده غیر عادی بوده و ناهنجاری محسوب می‌شود. تترادی دیده شد که دو هسته آن تشکیل و دوتای آن تشکیل نشده است. تترادی دیده شد که مراحل نمو را طی کرده، ولی در همان مرحله انتهای تتراد باقیمانده و هسته‌ها از یکدیگر جدا نشده و نمو میکروسپور در همین مرحله متوقف شده است.

۸- دانه‌های گرده غیر طبیعی. وجود دانه‌های گرده غیر طبیعی، باریک، کشیده و اغلب داسی یا حلالی شکل در بساک‌ها قابل توجه بود. این دانه‌های گرده فاقد محتویات سلولی بوده و قادر به باروری نیستند.

۹- ناهمگنی در شکل، اندازه و مراحل نمو دانه‌های گرده. از شایع‌ترین ناهنجاری‌های مشاهده شده، عدم هماهنگی در مراحل نمو دانه گرده در درون یک بساک و حتی در درون یک حجره بود. مثلاً همزمان گرده عادی، سلول مادر گرده و پلی‌پلوئیدی در کنار هم مشاهده گردید. گرده‌های کامل (ولی پوک) در کنار سلول‌های مادر گرده یعنی ناهمزمانی یا سینکرونوس[3]نبودن در مراحل رسیدگی و تکوین دانه‌های گرده در یک حجره مشاهده شد. همچنین یک تتراد در کنار گرده‌های کامل و ناقص و تغییر شکل یافته مشاهده گردید. این مقدار فاصله زمانی بین تکوین گرده‌ها در یک بساک و حجره کاملاً غیر طبیعی بوده و ناهنجاری محسوب می‌شود.

1 Linear
2 Tetrahedral
3 Synchronous

۱۰- باز نشدن دیواره بساک. در بسیاری از موارد و در همه همگروه‌های مورد بررسی، علیرغم اینکه بساک‌ها از نظر ساختاری رسیده بودند و صرف‌نظر از اینکه درصد زیادی از گرده‌ها عقیم بودند، دیواره بساک باز نشده و عملاً گرده هایی آزاد نشدند.

۱۱- نمو کیسه رویانی در دانه گرده (پدیده نمک[4]). تشکیل کیسه رویانی (ساختاری شبیه به رویان) در دانه گرده و برگشت از حالت جنسی را پدیده نمک گویند (Bati gina, 2008). یکی از شایع‌ترین ناهنجاری‌های مشاهده شده در بساک همگروه‌های مطالعه شده، پدیده نمک بود. دانه‌های گرده‌ای که این پدیده را نشان دادند، در مرحله سلول مادر گرده متوقف شده و به سمت رویان‌زایی حرکت کردند. علاوه بر این، از موارد قابل توجه بروز پدیده نمک در پریموردیم پرچم بود. وقوع این پدیده در دانه‌های گرده و پریموردیم پرچم سیر تاکنون گزارش نشده و از موارد نادر محسوب می‌گردد. از موارد بسیار نادر دیگر مشاهده شده در پدیده نمک، تشکیل کیسه رویانی از سلول‌های انفرادی لایه تاپی بود که دیویس در سال ۱۹۶۸ آن را در تیره کاسنی گزارش کرد (Bati gina, 2008).

۱۲- تبدیل و تغییر شکل لایه تاپی ترشحی به لایه تاپی پلاسمودیومی (تهاجمی). از ناهنجاری‌های بسیار مهم مشاهده لایه تاپی از نوع تهاجمی یا پلاسمودیم در دیواره بساک بود. علیرغم اینکه برخی از محققین لایه تاپی جوانه‌های گل و گل‌های اکوتیپ بارور سیر را از نوع ترشحی گزارش کرده‌اند (Shemesh et al.,2012)، ولی جاری[5]و شیوانا[6]سلول‌های بیش از حد بزرگ شده[7]لایه تاپی (غول‌آسا شدن سلول‌ها) و تغییر شکل لایه تاپی ترشحی به تاپی پلاسمودیم را از علایم نرعقیمی سیتوپلاسمی[8]گزارش داده‌اند (Bati gina, 2008). بنابراین، می‌توان استنباط نمود که همگروه‌های مورد بررسی در این پژوهش، دارای نرعقیمی سیتوپلاسمی باشند.

۱۳- عدم سازمان‌یابی و تمایز بساک. در بررسی پریموردیم برخی از پرچم‌ها مشخص گردید که دیواره بساک به‌جای چندلایه فقط دارای یک‌لایه می‌باشد و عملاً سازمان‌یابی و تمایز در دیواره و کل بساک ایجاد نشده و بافت هاگزا[9]تمایز پیدا نکرده است. در این پدیده پریموردیم پرچم واکوئله شده و پریموردیم پرچم غیرطبیعی هم از نظر شکل و هم از نظر بافت مشاهده گردید. این نوع ناهنجاری که نهایتاً منجر به نرعقیمی می‌شود، در هر سه همگروه مورد ارزیابی به‌طور قابل توجهی مشاهده شد. از موارد جالب توجه در این نوع ناهنجاری، وجود پریموردیم پرچمی سازمان و تمایز یافته و پریموردیم پرچمی سازمان و تمایز نیافته به‌صورت همزمان در یک گل بود.

منابع

Bati gina, T, B. 2008. Embryology of flowering plants, words and concepts, Volume 1, reproductive organs of flowers.Reza Nejad, F and Chehregani, A. Kerman Shahid Bahonar University. Page 597. (in Persian)

Chehregani Rad, A., Mohsenzadeh, F. Ekhtari, S. and TajikEsmaili S. 2014. Ovule and megagametophyte development in Adonis flammea Jacqu: Report of ovule and embryo abortion. Journal of Cell and Tissue 4: 397-405

Chehregani, A. and Sedaghat, M. 2009. Pollen Grain and Ovule Development in Lepidium vesicarium L. (Brassicaceae). International Journal of Agriculture and Biological Science 11(5): 601-605

Chehregani, A. Tanaomi, N. and Ranjbar, M. 2008. Pollen and anther development in Onobrychis schahuensis Bornm. (Fabaceae). International Journal of Botany 4(2): 241-244.

Etoh, T. 1985. Studies on the sterility in garlic, Allium sativum L". Memoirs of the Faculty of Agriculture of Kagoshima University 21:77-132.

4 Nemec
5 Johri
6 Shivanna
7 Hypertrophied
8 Cytoplasmic male sterility (CMS)
9 Sporogenous tissue

Etoh, T. Noma, Y. Nishitarumizu, Y. and Wakomoto, T. 1988. Seed productivity and germin ability of various garlic clones collected in Soviet Central Asia. Memoirs of the Faculty of Agriculture of Kagoshima University 24:29–139.

Jenderek, M.M and Hanna, R.M. 2000. Seed producing ability of garlic (Allium sativum L.) clones from two public U.S. collections". Proceedings of the Third International Symposium on Edible Alliaceae, Athens, Georgia, USA. 73–75.

Kamenetsky, R. Shafir, I.L. Khassanov, F. Kik, C. Van Heusden, A.W. Ginkel, M.V. Burger-Meijer, K. Auger, J. Arnault, I. and Rabinowitch, H.D. 2005. Diversity in fertility potential and organosulphur compounds among garlics from central Asia. Biodiversity and Conservation 14:281–295.

Konvicka, O. 1973. The causes of sterility in Allium sativum L. Biology of Plants. 15 (2): 144–149.

Koul, A.K. and Gohil, R.N. 1970. Causes averting sexual reproduction in Allium sativum Linn". Cytologia 35:197-202.

Mohsenzadeh, F. Chehregani Rad, A. and Ekhtari S. 2012. Study on Developmental Stage of Gynoecium and Megagametophyte in Rannunculus arvenisis L. Journal of Cell and Tissue 3(3): 201-210.

Novak, F.J. 1972. Tapetal development in the anthesis of Allium sativum L. and Allium longicuspis Regel". Experientia 28: 1380–1381.

Pooler, M. R. and Simon, P. W. 1993. Garlic flowering in response to clone, photoperiod, growth temperature, and cold storage. HortScience, 28: 1085–1086.

Pooler, M. R and P. W, Simon. 1994. True seed production in garlic". Sexual Plant Reproduction 7: 282–286.

Shemesh, E. Winiarczyk, K. Błaszczyk, L. Kosmala, A. Rabinowitch, H. D. and Kamenetsky, R. 2012. Male gametogenesis and sterility in garlic (Allium sativum L.) barriers on the way to fertilization and seed production. Planta. DOI 10.1007/s00425-012-1748-1.

Study of Abnormalities in Stages of Garlic Microsporogenesis

Ahamad reza Abbasifar[1]*, Farshad Dashti[2], Abdoulkarim Chehregani Rad[3]

[1] Assistant Professor, Department of Horticulture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Arak

[2] Associate Professor, Department of Horticulture, College of Agriculture, University of Buali Sina Hamedan

[3] Professor, Department of Biology, College of Sciences, University of Buali Sina Hamedan

Corresponding Author: Abbasifar1965@yahoo.com

Abstract

All of commercial garlic cultivars are sterile. Microgametogenesis has been studied in many angiosperms, but there are a few reports about microgametogenesis in garlic and this is the first report in Iranian garlics. Understanding the process of gametogenesis, could help to hybridization, seed development and the traditional breeding of garlic and facilitate it. Three clones including Fereydunkenar, Chiniyeh Zabul and Astaneh Ashrafieh that they had the necessary conditions for the formation of the pollen; was selected to perform this experiment. To evaluation of anomalies caused by microsporogenesis stages of anthers and pollen, samples were taked from all three clones. After fixing and maintenance of samples in the fixator, stage of preparing them for microscopic studies was performed. Results showed that there are types of male sterility and a total of 13 anomalies that most important one was stopping the development of the pollen grain. Anomalies detected in the evolution stages of pollen development in Iranian garlics for the first time were identified and reported in this study. The results also showed that the majority of male sterility was related to structural sterility and partly has been caused by environmental conditions.

Keywords: **anther, evolution, microsporogenesis, male sterility, hybridization**