مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۸ ، شماره ۲، سال ۱۳۹۱

مقاله کوتاه علمی

Scientific Short Article

تاثیر محیط‌های جداسازی و کشت بر القای جنین‌زایی میکروسپور در رز (*Rosa hybrida*)

Influence of Lsolation and Culture Media on Induction of Microspore Embryogenesis in Roses (*Rosa hybrida)*

مهناز عروجلو[۱]، مهران عنایتی‌شریعت‌پناهی[۲]، مریم دهستانی[۳]، محمدرضا بی‌همتا[۴] و مریم جعفرخانی کرمانی[۵]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه بیوتکنولوژی، کرج
۲ و ۵- استادیار، موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کشور، کرج
۳ و ۴- به ترتیب محقق و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱/۲۰ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۵/۹**

چکیده

عروجلو، م.، عنایتی‌شریعت‌پناهی، م.، دهستانی، م.، بی‌همتا، م. ر. و جعفرخانی کرمانی، م. ۱۳۹۱. تاثیر محیط‌های جداسازی و کشت بر القای جنین‌زایی میکروسپور در رز (***Rosa hybrida***). **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۸: ۳۳۳ - ۳۲۷.**

اصلاح رز از قرن هفدهم میلادی با انجام تلاقی و انتخاب جهش یافته‌ها برای تولید ارقام جدید آغاز شد (Gudin, 2000). بسیاری از رزهای اصلاح شده حساس به بیماری‌های قارچی هستند و تلاقی با گونه‌های دیپلوئید نسبتاً مقاوم به دلیل ناسازگاری و تفاوت سطح پلوئیدی میسر نیست (Gudin, 2000). تولید دی هاپلوئیدها از ارقام تتراپلوئید تجاری، امکان تلاقی با گونه‌های وحشی دیپلوئید و متعاقباً انتقال ژن‌های مطلوب از گونه‌های دیپلوئید به دی‌هاپلوئید را فراهم می‌کند (Meynet *et al.*, 1994, 1996). تولید هاپلوئیدها از دی هاپلوئیدها و ایجاد دابلدهاپلوئیدها که از آن‌ها به عنوان لاین‌های اینبرد در جهت تولید هیبریدهای F1 استفاده می‌شود، در صورت وجود هتروزیس امکان‌پذیر است (Enayati Shariatpanahi, 2007؛ Enayati ShariatPanahi and Emami Meybodi, 2009).

روش‌های متعددی تولید گیاهان هاپلوئید و به دنبال آن گیاهان دابلدهاپلوئید وجود دارد که یکی از عمومی‌ترین و جدیدترین آن‌ها

نویسنده مسئول: mehran.shariatpanahi@abrii.ac.ir تلفن: ۰۲۶۳۲۷۰۹۶۵۲

Archive of SID

www.SID.ir

آندروژنز است که به دو روش کشت بساک و کشت میکروسپور انجام می‌شود (عنایتی‌شریعت‌پناهی و امامی‌میبدی، ۲۰۰۹). تاکنون در رز فقط از روش ماده‌زایی (پارتنوژنز) با استفاده از گرده‌های نابارور پرتوتابی شده از یک رقم تتراپلوئید، گیاه دی‌هاپلوئید تولید شده است که البته کارایی تولید گیاهان هاپلوئید در آن بسیار پائین بوده است (Meynet *et al.*, 1994, 1996). کشت بساک با موفقیت در دو جنس از خانواده Rosaceae شامل توت‌فرنگی و سیب انجام شده (Hofer, 2004؛ Hofer *et al.*, 1999؛ Hennry *et al.*, 1999) اما در رز کشت بساک و میکروسپور موفقیت‌آمیز نبوده است. طبایی‌زاده و خوش‌خوی (Tabaiizadeh and Khosh-Khui, 1981) اولین گزارش القای کالوس از بساک‌های دو گونه رز تتراپلوئید را ارائه دادند، اما موفق به باززایی از کالوس‌ها نشدند. راه‌پیما (Rahpayma, 2006) کشت بساک رز را مورد بررسی مجدد قرار داد و موفق به بهینه‌سازی کالوس‌زایی شد، هر چند کالوس‌های ایجاد شده از نظر سطح پلوئیدی تتراپلوئید بودند و مشخص نشد که منشا میکروسپوری داشته‌اند. در زمینه کشت میکروسپورهای جدا شده هیچ گزارشی، با وجود مزایای متعدد کشت میکروسپورهای جدا شده در مقایسه با کشت بساک وجود ندارد. بنابراین در این تحقیق روش القای جنین‌زایی میکروسپور مورد مطالعه قرار گرفت.

در این آزمایش از رقم تتراپلوئید تجاری رز HAV1 استفاده شد. 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، تعیین مرحله مناسب غنچه است. غنچه‌هایی که اکثریت میکروسپورهایشان در مرحله انتهایی تک سلولی بودند، با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) شناسایی شدند. از هیپوکلریت‌سدیم (۳/۵٪ به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه) برای ضدعفونی غنچه‌های رز استفاده شد. محیط‌های جداسازی شامل B و AB (Touraev *et al.*, 1996)، NLN (Fletcher *et al.*, 1998) و محیط‌های کشت القایی شامل AT3 (Touraev *et al.*, 1996)، AT3 (1) (شامل محیط پایه AT3 به علاوه لاکتالبومین حاوی ۹۰ گرم در لیتر مالتوز)، AT3(2) (شامل محیط پایه AT3 به علاوه لاکتالبومین حاوی ۴۵/۱ گرم در لیتر گلوکز)، AT3 (3) (شامل محیط پایه AT3 به علاوه لاکتالبومین حاوی ۸۵/۵ گرم در لیتر ساکارز)، TM، TMG، $A_2$60, NLN-13) مورد بررسی قرار گرفتند. سوسپانسیون میکروسپورها، از فیلتر با قطر منافذ ۵۸ µm عبور داده شدند. مایع فیلتر شده دو بار به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰ rpm در دمای ۴°C سانتریفوژ شد. رسوب ته‌نشین شده پس از رنگ‌آمیزی با FDA برای تعیین درصد زنده‌مانی میکروسپورها با استفاده از

Archive of SID

www.SID.ir

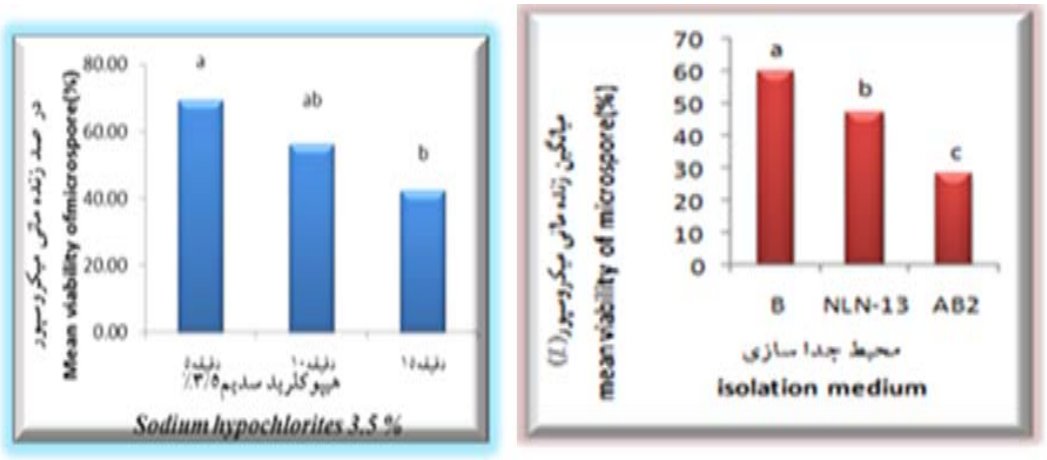
میکروسکوپ فلورسنت، در محیط‌های مختلف کشت و در دماهای مختلف شامل کنترل (۲۵°C) و تنش حرارتی (۳۰°C) در شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از اعمال تنش حرارتی تمامی کشت‌ها به فیتوترون با دمای ۲۵°C و تاریکی انتقال یافتند. صفات مورد ارزیابی شامل فراوانی ساختارهای چند سلولی (Multi-cellular structures) منتج از میکروسپور بعد از گذشت دو هفته از کشت از طریق رنگ‌آمیزی با ماده رنگی اختصاصی DAPI تعیین شد. آزمایش‌ها در قالب طرح آزمایشی کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS، MSTATC و EXCEL و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

پس از جداسازی میکروسپورها و رنگ‌آمیزی با DAPI بهترین مرحله مرحله انتهایی تک‌سلولی که مناسب کشت میکروسپور است و در این مرحله میکروسپورها توانایی تغییر مسیر از گامتوفیتی به سمت اسپوروفیتی را دارند) تعیین شد. مرحله انتهایی تک‌سلولی مرحله‌ای است که در آن هسته سلول بزرگ بوده و در کناره دیواره سلولی به دلیل بزرگ بودن واکوئل قرار می‌گیرد. در گیاهان مختلف، مرحله انتهایی تک‌سلولی به کشت میکروسپور پاسخ خوبی نشان داده و با اندازه غنچه ارتباط مستقیم داشت. نتایج این تحقیق با نتایج طبائی‌زاده و خوشخوی (۱۹۸۱) که از کشت بساک رز به دست آمده بود و آن‌ها نیز مرحله انتهایی تک‌سلولی را به عنوان بهترین مرحله انتخاب کرده بودند، مطابقت داشت.

مقایسه میانگین اثر مدت زمان و نوع ضدعفونی سطحی میکروسپورها نشان داد که ضدعفونی میکروسپورها با هیپوکلریت سدیم ۳/۵ ٪ به مدت ۵ دقیقه بیشترین درصد زنده‌مانی (۶۹/۳٪) و کمترین درصد زنده‌مانی را در مدت ۱۵ دقیقه داشت با این وجود ضدعفونی در ۱۵ دقیقه کمترین آلودگی را در حین کشت نشان داد (شکل ۱). مقایسه میانگین اثر محیط جداسازی روی درصد زنده‌مانی میکروسپورهای رز نشان داد که بهترین محیط جداسازی، محیط B (۵۹/۸۴٪) و کمترین درصد زنده‌مانی مربوط به محیط AB (۲۸/۲٪) بود (شکل ۱). هیپوکلریت‌سدیم به طور گسترده در کشت میکروسپورهای جدا شده غلات و بسیاری از دو لپه‌ای‌ها مانند کلزا مورد استفاده قرار گرفته است (Zhang *et al.*, 2006). در محیط‌های شستشو بیشترین زنده‌مانی در محیط B مشاهده شد که با نتایج احمدی (Ahmadi, 2009) مطابقت دارد. محیط B برای اولین بار توسط توراِئف و هبرل-برز (Touraev and Heberle-Bors, 1999) برای جداسازی میکروسپور توتون به کار برده شد و این محیط برای جداسازی میکروسپور سیب نیز مورد استفاده قرار گرفته و بیشترین درصد زنده‌مانی را به دست آمده است (Hofer *et al.*, 1999). عامل مهم در محیط

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر مدت زمان ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم۳/۵ ٪ و محیط جداسازی بر درصد زنده‌مانی میکروسپورهای رز (حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن است)

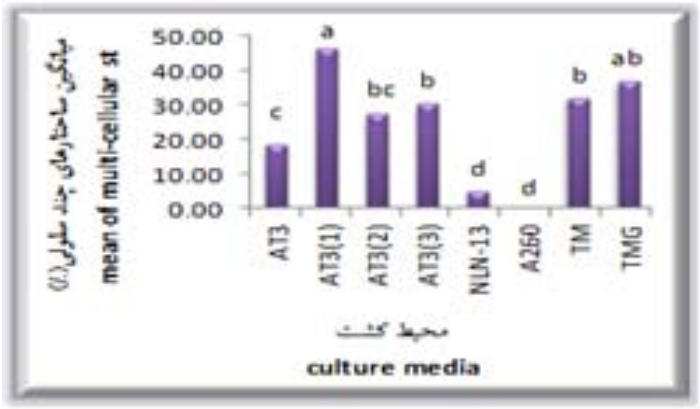
Fig. 1. Mean comparison for the effect of sterilization period with sodium hypochlorite 3.5% and isolation medium on viability of microspores in roses (means with different letters are significantly different at p=0.05)

جداسازی B، وجود مانیتول در تنظیم فشار اسمزی محیط است که بسیار بر زنده‌مانی میکروسپورها نقش ایفاء می‌کند و در مواردی مثل گندم ترکیب مانیتول و سوربیتول در محیط AB بهترین نتیجه را می‌دهد حال آن‌که در رز مانیتول به تنهایی توسط میکروسپورها ترجیح داده شد. میکروسپورهای جدا شده از غنچه‌های رز رقم HAV1 به منظور القای جنین‌زایی در محیط‌های مختلف (AT3، AT3(1)، AT3(2) ، AT3(3)، TM، TMG، $A_{2}60$ و NLN-13) کشت شده و در تنش حرارتی ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز قرار گرفتند.

نتایج نشان داد که در محیط کشت AT3(1) بیشترین درصد ساختارهای چندسلولی تشکیل شد و در محیط کشت $A_{2}60$ ساختارهای چندسلولی مشاهده نشد. محیط‌های AT3 حاوی ۹۰ گرم در لیتر مالتوز، AT3(2)، AT3(3) TM حاوی ۱۷۱/۱۷ گرم در لیتر ساکارز و TMG حاوی ۹۹/۱ گرم در لیتر گلوکز با اختلاف کمی نسبت به هم ساختارهای چندسلولی تشکیل دادند و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ نداشتند (شکل ۲). مقایسه میانگین نشان می‌دهد که لاکتالبومین روی درصد تشکیل ساختارهای چند سلولی تاثیر مثبتی داشته است و باعث تغییر مسیر رشد میکروسپور به سمت اسپوروفیتی یا به عبارتی القای جنین‌زایی شد (شکل ۲) اما پس از چهار هفته رشد ساختارهای پیش جنین متوقف شد. به نظر می‌رسد که لاکتالبومین که دارای منبع غنی

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر محیط کشت روی درصد القای جنین‌زایی میکروسپور رز(اختلاف میانگین‌های دارای حروف مختلف در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار هستند).

Fig. 2. Mean comparison for the effect of induction media on microspore embryogenesis in roses (means with different letters are significantly different at p=0.05).

از اسیدهای آمینه است برای شروع تقسیمات سلولی موثر بوده و باعث افزایش تقسیمات سلولی شده است.

مالتوز و ساکارز عمومی‌ترین قند مورد استفاده در محیط القا برای کشت بساک و میکروسپور گونه‌های مختلف است (Shariatpanahi *et al.*, 2006). در گندمیان مالتوز مناسب‌ترین قند است، در حالی که برای کشت میکروسپور کلزا ساکارز استفاده می‌شود. در جو و توتون مشخص شده است که ساکارز به سرعت متابولیزه شده و با تجمع مقدار زیادی نشاسته از تکوین جنین جلوگیری می‌کند. درحالی که مالتوز به کندی تجزیه شده و منجر به جنین‌زایی میکروسپور می‌شود (Shariatpanahi *et al.*, 2006). در کشت میکروسپور سیب بیشترین درصد جنین‌زایی در محیط حاوی مالتوز حاصل شد درحالی که در محیط حاوی ساکارز کمترین درصد جنین‌زایی مشاهده شد(Hofer *et al.*, 1999).در این بررسی محیط‌های حاوی لاکتالبومین به علاوه قندهای مختلف به القای جنین‌زایی نسبت به بقیه محیط کشت‌ها پاسخ بهتری داده و بیشترین ساختارهای چندسلولی در محیط دارای لاکتالبومین به علاوه مالتوز تشکیل شد. بنابر گزارش‌های به دست آمده، نوع و غلظت کربوهیدرات بسته به گیاه و گونه متفاوت است (Hofer *et al.*, 1999). در این تحقیق ضمن تعیین عوامل موثر بر القای جنین‌زایی میکروسپور برای اولین بار در دنیا جنین‌زایی از میکروسپورهای جدا شده رز گزارش می‌شود.

واژه‌های کلیدی: رز، میکروسپور، جنین‌زایی، تنش، DAPI.

Archive of SID

www.SID.ir

References

Ahmadi, T. 2009. Comparing the *in vivo* and *in vitro* morphological characteristics and essence content of a hexaploid rose with its triploid proginator (*R. hybrida cv.* Iceberg). MSc. Thesis Collage of Agricultural, Mazandaran University, Sari, Iran (in Persian).

Enayati Shariatpanahi, M. 2007. Applications of microspores in agricultural biotechnology. Key Articles, Proceedings of 5th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran, Iran. pp. 851-852 (in Persian).

Enayati Shariatpanahi, M., and Emami Meybodi, D. 2009. Microspores: a haploid cell with various applications in genetics and plant breeding. Modern Genetics Journal 4 (3): 5-19 (in Persian).

Fletcher, R., Coventry, J., and Kott, L. S. 1998. Doubled haploid technology for spring and winter *Brassica napus*. Technical Bulletin, OAC Publication, Canada.

Gudin, S. 2000. Rose: Genetics and breeding. pp. 159-189. In: Janick, J. (ed.) Plant Breeding Reviews, Volume 17. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.

Hennry, R., Raymond, R., and Miller, A. 1999. Haploid plant regeneration from anther cultures of three North American cultivars of strawberry (*Fragaris ananassa* Duch.). Plant Cell Reports 15: 905-909.

Höfer, M, Touraev, A., and Heberle-Bors, E. 1999. Induction of embryogenesis from isolated apple microspores. Plant Cell Reports 18: 1012-1017.

Höfer, M. 2004. *In vitro* androgenesis in apple improvement of the induction phase. Plant Cell Reports 22: 365-370.

Meynet, J., Barrade, R., Duclos, A., and Siadous, R. 1994. Dihaploid plants of roses (Rosa x hybrida) obtained by parthenogenesis induced using irradiated pollen and *in vitro* culture of immature seeds. Agronomie 2: 169-175.

Meynet, J., Botton, E., Eychene, J., and Aime, F. 1996. Optimization of a method for the haploidization of cultivated roses. Acta Horticulturae 424: 399-401.

Rahpayma, S. 2006. Study of anther culture in rosa (*Rosa hybrida and Miniature Rosa*). MSc. Thesis, Collage of Agriculture, Tarbiat Modares University Tehran,

Archive of SID

www.SID.ir

Iran (in Persian).

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.

Tabaiizadeh, Z., and Khosh-Khui, M. 1981. Anther culture of Rose. Scientia Horticulturae 15: 61-66

Touraev, A., Iiham, A., Vicente O., and Herberle-Bors, E. 1996. Stress induced microspore embryogenesis from tobacco microspores: an optimized system for molecular studies. Plant Cell Reports 15: 561-565.

Touraev, A., and Heberle-Bors, E. 1999. Microspore embryogenesis and *in vitro* pollen maturation in tobacco. pp. 281-291. In: Hall, R. (ed.) Plant Cell Culture Protocols 111, Totowa, New Jersey: Humana Press, USA.

Zhang, G. Q., He,Y., Xu, L., Tang, G. X., and Zhou,W. J. 2006. Genetic analysis of agronomic seed quality traits of doubled hapoid population in *Brassica napus* through microspore culture. Euphytica 149: 169-177.

Archive of SID

www.SID.ir