Crop Biotech. Vol. 2, No. 3, Autumn and Winter 2012-2013

بررسی اثر تنشهای دمایی و گرسنگی بر جنینزایی میکروسپور در کشت میکروسپورهای جدا شده دو رقم رز (.*Rosa hybrida* L) تتراپلوئید

مریم دهستانی اردکانی^ا، محسن کافی^۲، مهران عنایتی شریعت پناهی^۳، مریم جعفرخانی کرمانی^۳، محمدرضا فتاحی مقدم^۳، مهناز عروجلو^۵

۰، ۲، ۴، دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار گروه علوم و مهندسی باغبانی و فضای سبز پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج ایران. ۳، ۵، استادیاران و کارشناس بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج. (تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۳۰ – تاریخ تصویب: ۹۱/۱/۳۰)

Investigation of the Effects of Temperature and Starvation Stresses on Microspore Embryogenesis in Two Tetraploid Roses (*Rosa hybrid* L.) via Isolated Microspore Culture Technique

M. DEHESTANI ARDAKANI¹, M. KAFI², M. ENAYATI SHARIATPANAHI³, M. JAFARKHANI-KERMANI⁴, M. R. FATTAHI MOGHADAM⁵ AND M. OROOJLOO⁶

1, 2, 4, Ph.D. Student, Professor, and Associate Professor, Department of Horticultural Science & Landscape Architecture, Faculty of Agricultural Science & Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, 3, 5, Assistant Professors and Lab Assistant, Department of Tissue Culture and Gene Transformation, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj,

Iran

(Received: April. 18, 2012 - Accepted: May. 9, 2012)

Abstract

One of the most commonly used methods to produce doubled haploid plants is microspore culture. In this research work, the isolated microspore culture system in two rose cultivars i.e. Apollo and Amarosa was investigated. Important factors including isolation media (AB, B), AT3 induction medium with different carbohydrate sources (sucrose, maltose or glucose) and amino acid source (lactalbumin hydrolysate) were studied. Carbon starvation and temperature (heat and cold) treatments as two important stresses alone or in combination with each other for various periods were evaluated on the induction of symmetrical (sporophytic) divisions. A mixture of different developmental stages of microspores was used to initiate the cultures but the majority of them were at late uni-cellular stage. For eliminating bacterial or fungal contaminants, buds were surface-sterilized by immersion in 70% ethanol for 15, 30, 60 Sec. or 3.5% (w/v) sodium hypochlorite solution for 5, 10, 15 min prior to microspore isolation. The best sterilization procedure was observed when microspores were sterilized with sodium hypochlorite (%3.5) for 10 minutes. Two isolation media did not show a significant difference on the viability of microspores. Among induction media tested, in cv. Amarosa, the highest viability was observed in AT3 medium supplemented by glucose. Induction media in Apollo cultivar did not show a significant difference on viability of microspores. Combination of starvation (B medium) and cold (4°C) treatments for 3 days induced formation of pro-embryos in cv. Amarosa. Present investigation reports a protocol for induction of embryogenic developement in rose (Rosa hybrida) microspores.

Keywords: Embryogenesis, Isolated microspore culture, Rose (*Rosa hybrida*), Stress

چکیدہ

کشت میکروسیور یکی از روش،های کارآمد تولید گیاهان هایلوئید میباشد. در پژوهش حاضر، سیستم کشت میکروسپور در دو رقم تتراپلوئید رز ('Apollo' و 'Amarosa') مورد بررسی قرار گرفت. عواملی شامل محیط جداسازی میکروسیورها (AB و B)، محیط القای جنینزایی در میکروسپورها (AT3) به همراه منابع مختلف کربوهیدرات (ساکارز، مالتوز یا گلوکز) و آمینواسید لاکتالبومین هیدرولیزات مورد مطالعه قرار گرفتند. اثر تنشهای گرسنگی و دمایی بهتنهایی و یا بهصورت توام با مدت زمانهای گوناگون بر تقسیمات متقارن (اسپروفیتی) مورد ارزیابی قرار گرفت. از میکروسیورها در مراحل مختلف نموی جهت کشت استفاده شد اما بیشتر آنها در مرحله انتهای تکسلولی بودند. بهمنظور حذف آلودگیهای باکتریایی و قارچی، غنچه ها قبل از کشت با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱۵، ۳۰ و ۶۰ ثانیه یا هییوکلریتسدیم (۳/۵ درصد) بهمدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. بهترین روش ضدعفونی غنچهها تیمار با هبیو کلریت سدیم (۳/۵ در صد) به مدت ۱۰ دقیقه تشخیص داده شد. دو محیط جداسازی تفاوت معنیداری در زندهمانی میکروسپورها نشان ندادند. در میان محيطهاي القايي مورد بررسي، در رقم 'Amarosa'، بالاترين ميزان زندهمانی میکروسپورها در محیط AT3 بههمراه قند گلوکز بهدست آمد. محیطهای کشت القایی در رقم 'Apollo'، تفاوت معنیداری در زندهمانی میکروسیورها نشان ندادند. ترکیبی از تنشهای گرسنگی و سرمایی بهمدت سه روز موجب القای جنین در رقم 'Amarosa' گردید. در پژوهش حاضر برای اولین بار جنینزایی میکروسپورهای رز گزارش می گردد.

واژههای کلیدی: جنینزایی، کشت میکروسپورهای جداشده، رز (.Rosa hybrida L.)، تنش

مقدمه

رزها بهطور وسيع در فضای سبز و بهعنوان گلهای شاخهبریده در سراسر جهان مورد استفاده قرار می گیرند. جنس Rosa مهم ترین جنس خانواده رزاسه بوده و شامل حدود ۲۰۰ گونه و بیش از ۱۸۰۰۰ رقم می باشد (Mirali et al. 2012). اصلاح رز در گذشته عمدتاً بهوسیله روشهای کلاسیک انجام می پذیرفت اما محدودیت هایی که در این تکنیکها وجود دارد بهنژادگران را به سوی استفاده از ارقامی که غالباً وحشی هستند، سوق داده است (Paimer et al. 1996). تتراپلوئیدی در ارقام مهم رز، آنالیز ژنتیکی و انتقال ژن را به آنها بهخصوص از گونههای دیپلوئید مشکل کرده است (Meynet et al. 1996). تلاقى بين گونەھاى دیپلوئید و تتراپلوئید ایجاد تریپلوئیدهای عقیم یا نيمەعقىم مىكند (Wylie. 1954). ھنگامىكە انجام تلاقیهای بینگونهای در رزهای با سطوح پلوئيدى مختلف با مشكل روبرو شد، محققين بر أن شدند تا نسبت به توليد گياه هاپلوئيد از گياه تتراپلوئيد (درحالی که قادر به تولید گل و گرده باشد) اقدام نمایند و سپس از هاپلوئیدهای حاصل که دیهاپلوئید می باشند در تلاقی با ارقام وحشی دیپلوئید استفاده کنند و از گونههای دیپلوئید به ارقام تتراپلوئید ژن را انتقال دهند (Meynet et al. 1996). روش هاپلوئیدی، موجب کمکردن دوره اصلاحی برای ایجاد لاینهای هموزیگوت (خالص ژنتیکی) در گیاهان دگرگشن (مانند رز) میگردد که میتوانند متعاقباً بهعنوان والدين اينبرد در برنامههای اصلاحی (Mohan Jain *et* استفاده شوند F_1 استفاده شوند .al. 1996)

جنینزایی میکروسپور از طریق کشتبساک یا میکروسپور یکی از روشهای متداول و کارآمد برای تولید گیاهان دابلدهاپلوئید میباشد. کشت میکروسپورهای جداشده نسبت به سایر تکنیکهای

مورد استفاده مزیتهای زیادی دارد (Touraev et al. 2001). میکروسپورها می توانند به تعداد زیاد جداسازی شده و توانایی تولید میلیونها سلول هاپلوئید منفرد با پتانسیل جنینزایی را دارا میباشند (Touraev et al. 2001). در مسیر جنینزایی میکروسپورها، اعمال تنشهای غیر زنده برای تغییر مسير گامتوفيتيکی آنها به اسپروفيتيک، ضروری می باشد. سرما، گرما، گرسنگی کربنی و کلشیسین از جمله تنشهای پرمصرف جهت القای جنینزایی (Shariatpanahi et al. ميكروسپور مى باشند (2006a. استفاده از تنش به شكل پيش تيمار اولين بار توسط Nitsch and Norreel روى بساکها یا میکروسپورهای Datura گزارش شد. پیشتیمار گرمایی معمولاً در دمای ۳۲-۳۳ بهمدت چند ساعت تا چندین روز استفاده می شود، درحالی که تیمار سرمایی در دمای C°۱۰-۴ از چند روز تا چندین هفته کاربرد دارد. همچنین قراردادن میکروسپورها در محیطهای بدون منابع کربن متابولیزه برای مثال در محیطهای حاوی مانیتول، نیز موفقيت آميز بوده است (Germana, 2011).

اولین Guha and Maheshwari ابرا جنین ایی دانه گرده در Datura innoxia را گزارش کردند. اگرچه بسیاری از گونه ها پاسخ خوبی گزارش کردند. اگرچه بسیاری از گونه ها پاسخ خوبی میکروسپور به کشتبساک میدهند و جنین زایی میکروسپور به مطور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است، اما بسیاری از آن ها همچنان سخت پاسخ ده هستند. کشت بساک تاکنون در دو جنس از خانواده رزاسه شامل توتفرنگی و سیب با موفقیت انجام شده است شامل توتفرنگی و سیب با موفقیت انجام شده است در رز کشتبساک و میکروسپور موفقیت آمیز نبوده (Hennry et al. 1996, Hofer et al. 1996). اما در رز کشتبساک و میکروسپور موفقیت آمیز نبوده (1981) القای کالوس از کشتبساک دو گونه از

^{1.} Recalcitrant

مناسب برداشت غنچه میباشد. غنچهها در مراحل مختلف نموی از میانی تا انتهای تکسلولی انتخاب و با استفاده از ۰/۱ میلیگرم در لیتر ماده ۴، ۶– دیآمینو-۲-فنیل ایندول ((DAPI) جهت تعیین مرحله مناسب نموی رنگآمیزی شدند vergne *et* مرحله مناسب نموی رنگآمیزی شدند ۲۰ درصد ۱۹87) مدت ما، ۳۰ و ۶۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۵/۳ درصد (w/v) (۳/۵۵) هیپوکلریت سدیم تجاری با آبمقطر به حجم ۱۰۰ در سانده شد) به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه جهت ضدعفونی کردن غنچههای رز استفاده شد. پس از ضدعفونی، غنچهها سه مرتبه هر مرتبه به مدت پنج دقیقه با آبمقطر استریل شستشو داده شد.

جداسازی و کشت میکروسپورها

بساکها و محیط شستشو (AB و B) در یک شیشه پنج میلیلیتری حاوی یک مگنت کوچک ریخته و شیشه بهمدت ۳–۲ دقیقه روی استیرر با ۸۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. <u>پس</u> از جداسازی میکروسپورها از بساک، بهمنظور شفافسازی مایع کدر بهدست آمده از بقایای دیوارههای سلولی بساک و میکروسپورها، مایع از فیلتر با قطر منافذ ۵۸ میکرون عبور داده شد. مایع فیلترشده در فالکونهای سانتریفوژ ریخته و بهمدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C سانتریفوژ -Beckman GS) 6R USA) گردید. عملیات سانتریفیوژ دو مرتبه صورت گرفت. مایعرویی دور ریخته شده و رسوب تەنشىن شدە نھايتاً با اضافەكردن محيط كشت دوبارە تعلیق شده و به پتری دیش های ۶ سانتی متری منتقل شدند. بلافاصله پس از کشت، با رنگآمیزی میکروسپورها توسط ماده FDA و مشاهده آنها با ميكروسكوپ فلورسنت زندهمانى ميكروسپورها محاسبه گردید Heslop-Harrison and

جنس رز را گزارش کردند. آنها کالوسهای هایلوئید از گونههای تتراپلوئید رز بهدست آوردند، اما موفق به باززايي كالوسها نشدند. بنابراين منشأ ميكروسپوري آنها معلوم نيست. Gudin and Arene (1991) با بررسی جوانهزنی دانههای گرده رز در شرایط درون شیشه، نتیجه گرفتند که میزان جوانهزنی تحت تاثیر pH محیط کشت قرار می گیرد. Meynet et al. موفق شدند از طريق پارتنوژنز با استفاده al. از گردههای نابارور پرتوتابیشده از یک رقم تتراپلوئید رز، گیاه دیهاپلوئید بهدست آورند. .Ahmadi et al (2009) جنینزایی میکروسپور را در Rosa hybrida cv. Apollo بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که بهترین تکنیک جداسازی، محیط جداسازی و محیط کشت بهترتیب میله آهنربایی، محیط B و محیط AT3 همراه با ۹۰ گرم در لیتر مالتوز است. بيشترين درصد زندهماني ميكروسپورها در تیمارهای گرسنگی کربنی (محیط B) بهمدت ۴ روز در دمای C°۴ بهدست آمد. بنابراین توسعه روشهای جدید غیروابسته به ژنوتیپ از طریق مطالعه و بهبود پروتکلهای موجود و درک عمیق و کنترل جنینزایی میکروسپور، ضروری میباشد. با توجه به اینکه امروزه میکروسپور در مطالعات گیاهی در دنیا جایگاه ویژهای پیدا کرده و به ابزاری مهم در انواع مطالعات گیاهی کاربردی و پایه تبدیل شده است، هدف تحقیق حاضر بررسی عوامل موثر بر جنینزایی میکروسپور رز و پاسخ ۲ رقم مختلف آن نسبت به عوامل فوق میباشد.

م**واد و روش ها** مواد گیاهی

'Amarosa' و 'Apollo' و 'Amarosa' از کلکسیون باغ رز پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) جمع آوری شد. اولین مرحله مهم در جنینزایی میکروسپور، تعیین مرحله

^{1. 4&#}x27;, 6-diamidino-2- phenylindole

^{2.} Fluorecein diacetate

نیتروژن است کشت و در دماهای ۴، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد، در شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از اتمام مدت زمان اعمال تنش، میکروسپورها به محیط کشت AT3 منتقل شدند. در تمامی مراحل رطوبت محل نگهداری پتریدیشها ثابت نگه داشته شد. تنشرهای حرارتی و سرمایی

میکروسپورهای رقم 'Apollo' پس از جداسازی و کشت بهمنظور اعمال تنش حرارتی به مدت ۱، ۳، ۵ و ۷ روز در دمای ۲۰°۲ و تنش سرمایی به مدت ۷ و ۱۴ روز در ۲۰°۴ قرار گرفتند. ۲۵°۲ بهعنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس پتریهای حاوی میکروسپورهای جداشده به انکوباتور ۲۵°۲ انتقال داده شدند.

طرح أمارى

تیمارها با استفاده از مقایسات آماری تکرار دار در قالب طرح کاملاً تصادفی و یا فاکتوریل با پایه کاملاً تصادفی با حداقل سه تکرار (هر پتری یک تکرار) مقایسه شدند. تجزیه و تحلیل دادهها با استفاده از نرمافزار آماری MSTATC انجام شد.

نتايج و ب**ح**ث

مرحله نموی میکروسپورها و ضدعفونی غنچهها

تعیین مرحله نموی مناسب برای میکروسپورها جهت جداسازی و کشت موفق آنها بسیار حیاتی و مهم است و متناسب با گونه گیاهی ممکن است متفاوت باشد. غنچهها یا سنبلهها معمولا زمانی که میکروسپورها در مرحله انتهای تکهستهای یا ابتدای دوهستهای هستند جهت کشت میکروسپور برداشت میشوند (Ferrie and Caswell. 2010). ترکیبی از مراحل نموی میکروسپورها برای شروع کشت مورد استفاده قرار گرفت اما اکثریت آنها در مرحله انتهای استفاده قرار گرفت اما اکثریت آنها در مرحله انتهای بزرگ شده و به دلیل بزرگشدن واکوئل در کناره دیوارهسلول قرار می گیرد (شکل ۱۵). براساس مرحله نموی میکروسپورها، زمانی که کاسبرگها کمی باز .Heslop-Harrison. 1970)

ترکیب محیطهای کشت

محیط B جهت جداسازی میکروسپورها و اعمال تیمارهای گرسنگی طبق روش Kyo and Harada (1986) تهیه گردید. محیط B حاوی ۱/۴۹ میلی گرم در لیتر MgSO₄، میلیگرم در لیتر KCl، میلی ۰/۱۱ میلیگرم در لیتر CaCl₂، ۰/۱۴ میلیگرم در pH و KH₂PO₄ و κH₂PO₄ گرم در لیتر مانیتول با برابر ۷ بود. محیط AB با افزودن ۰/۳M سوربیتول و ۰/۳M مانیتول به محیط B آماده شد (Shariatpanahi et al. 2006b). بەمنظور القاى جنینزایی میکروسپورهای رز، محیط پایه AT3 (Touraev et al. 1996) با سه منبع مختلف کربوهیدرات شامل مالتوز (۹۰ گرم در لیتر)، گلوکز (۴۵ گرم در لیتر)، ساکارز (۸۵ گرم در لیتر) با یا بدون أمينواسيد لاكتوالبومين هيدروليزات مورد استفاده قرار گرفتند. محیط AT3 حاوی عناصر ماکرو محیط N6 (۱۹۵۰ میلی گرم در لیتر KNO₃، ۲۷۷ میلی گرم در لیتر NH4)₂SO₄)، ۴۰۰ میلیگرم در لیتر ،CaCl₂×2H₂O میلیگرم در لیتر ۱۶۶،KH₂PO₄ ۱۸۵ میلیگرم در لیتر MgSO₄×7H₂O) بهعلاوه عناصر میکرو محیط کشت MS، ویتامین های محیط B5، ۱۲۵۶ میلیگرم در لیتر گلوتامین، ۱۹۵۰ میلی گرم در لیتر NES- (N-morpholino) میلی گرم در لیتر ethanesulfonic acid] و ۹۰ گرم در لیتر مالتوز بود. محیطهای القایی مورد آزمایش شامل AT3 با مالتوز (AT3-M)، AT3-M همراه با ۱۰ گرم در ليتر لاكتالبومين هيدروليزات (AT3-LM)، AT3 با گلوکز (AT3-G)، AT3-G با ۱۰ گرم در لیتر لاكتالبومين هيدروليزات (AT3-LG)، AT3 با ساکارز (AT3-S) و AT3-S با ۱۰ گرم در لیتر لاكتالبومين هيدروليزات (AT3-LS) بودند. تيمار گرسنگی

میکروسپورهای ایزولهشده به مدت ۳ روز در محیط B که یک محیط بدون کربوهیدرات و

www.SID.ir

شده و تعدادی از گلبرگهای درون غنچه گل قابل مشاهده بودند زمان مناسب برای برداشت غنچهها تشخیص داده شد. معلوم شده است که مرحله نموی میکروسپور عامل پیچیدهای است که بر موفقیت کشت آن بسیار اثرگذار است. بهطورکلی حساسیت میکروسپورها به تنشهای القایی در مراحل مختلف نموی (مراحل انتهای تکهستهای تا ابتدا و میانی دوهستهای) بسیار متفاوت است. (Touraev et al. (2001، در Nicotiana tabacum، زمانی که از گرسنگی بهعنوان پیش تیمار استفاده شد، میکروسپورها در مرحله دوهستهای بهترین پاسخ را دادند؛ اما هنگامی که به جای آن تنش گرمایی به کار گرفته شد، میکروسپورهای تکهستهای جوان تر مناسب بودند (Touraev et al. 1996). مشخص شده است که در اثر تجمع مواد ذخیره، میکروسپورها ظرفیت جنینزایی خود را از دست داده و مسیر گامتوفیتیک را ادامه می دهند . (Heberle-Bors) (1989. نتایج بهدست آمده با Tabaeezadeh and (1981) Khosh-Khui که مرحله انتهای تکهستهای را بهعنوان بهترین مرحله کشت بساک رز انتخاب کردند، مطابقت داشت.

بهمنظور حذف آلودگیهای قارچی و باکتریایی، غنچهها قبل از جداسازی میکروسپورها ضدعفونی سطحی شدند. سه تیمار ضدعفونی با الکل تفاوت

معنیداری در زندهمانی میکروسپورها نشان نداد (جدول ۱) و از طرفی میزان آلودگی در این تیمارها بالا بود (در این آزمایش میزان آلودگی بهصورت ظاهری سنجیده شد). در اثر ضدعفونی غنچهها با هیپوکلریت سدیم ۳/۵ درصد به مدت ۱۰ و یا ۱۵ دقیقه کمترین میزان آلودگی و بیشترین درصد زندهمانی مشاهده شد (شکل ۲). بهمنظور اجتناب از اثرات تخريب كننده ضدعفونى سطحى، تيمارها بايد در حداقل زمانی که مواد گیاهی عاری از آلودگی می شوند، نگهداری شوند. (Ferrie and Caswell. (2010. با توجه به اینکه بین ۱۰ و ۱۵ دقیقه تفاوت معنی داری در میزان زندهمانی میکروسپورها مشاهده نشد، در ادامه غنچهها به مدت ۱۰ دقیقه توسط هيپوكلريت سديم ضدعفوني سطحي شدند. براساس مطالعات انجام شده، یکی از متداول ترین روشهای مورد استفاده جهت ضدعفونی سطحی، فروبری کوتاهمدت (۲–۱ دقیقه) ماده گیاهی در اتانول (۷۰ درصد) و سپس غوطهوری در هیپوکلریتسدیم (۶ درصد یا کمتر) با یک قطرہ توئین بەمدت چند دقیقه (تا ۱۵ دقیقه) و همین طور چندین مرتبه شستشو با آب مقطر استریل می باشد .(Ferrie and Caswell (2009) Ahmadi et al. .2010) نيز بهترين تيمار ضدعفونی غنچههای رز را هیپوکلریتسدیم ۳/۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه معرفی کردند.



شکل ۱- رنگآمیزی میکروسپورها با DAPI در: a مرحله انتهای تکسلولی b ساختار چندسلولی c جنین بهدستآمده از کشت میکروسپورهای جداشده

www.SID.ir



جدول ۱- تجزیه واریانس دادههای حاصل از ضدعفونی غنچهها با الکل ۷۰ درصد و دادههای حاصل از بررسی زندهمانی محیطهای جداسازی میکروسپورها

	محيط	جداسازی		الکل ۷۰٪	
منابع تعييرات -	درجه آزادی	میانگین مربعات	منابع تعييرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
محيط جداسازي	1	0.008 ^{ns}	تیمار زمانی	2	0.008 ^{ns}
خطا	4	0.045	خطا	6	0.005
ns عدم معنیدار					

محیط های جداسازی و کشت

ارزیابی دو محیط جداسازی میکروسپورها شامل AB و B تفاوت معنی داری در میزان زنده مانی میکروسپورها نشان نداند (جدول ۱). در حقیقت، ترکیبات محیط AB شبیه B است با این تفاوت که مقدار ۸۳۸۰ سوربیتول و ۸۳/۰ مانیتول به آن (Shariatpanahi *et al.* مانیتول به آن افزوده شده است .B و ۸۳/۰ مانیتول به آن مانیتول در تنظیم فشاراسمزی محیط است که نقش مهمی در زنده مانی میکروسپورها ایفا می کند و در مهمی در زنده مانی میکروسپورها ایفا می کند و در مواردی مثل گندم ترکیب مانیتول و سوربیتول در محیط AB نتیجه بهتری می دهد، حال آنکه در رز تفاوتی مشاهده نشد. علی رغم محیط جداسازی، محیط کشت القایی یک عامل مهم در موفقیت

جنینزایی میکروسپورها میباشد. ارزیابی محیطهای کشت متفاوت در رقم 'Apollo' تفاوت معنی داری در زندهمانی میکروسپورها نشان ندادند (شکل ۳). برای انحراف میکروسپورها به سمت جنینزایی باید محیط کشت مناسب، سرشار از موادغذایی و شرایط مناسب کشت فراهم گردد. محیطهای کشت مناسب کشت فراهم گردد. محیطهای کشت منارمند ماند محیطهای کشتبافتی نیازمند میکروسپور همانند محیطهای کشتبافتی نیازمند (Ferrie and Caswell) عناصر ماکرو و میکرو، ویتامینها و یک منبع کربوهیدرات میباشند . (Ferrie and Caswell) زندهمانی میکروسپورها در محیط TAS با قند گلوکز زندهمانی میکروسپورها در محیط AT3 با قند گلوکز مساهده شد (شکل ۳). منبع کربوهیدرات به علت اثرات اسمزی و تغذیهای، برای تولید جنین در کشت میکروسپور ضروری است. اثر غلظت (Shariatpanahi et al. 2006a). ثابت شده است که در چاودار گلوکز بیش از ساکارز تحریک کننده است (Germana. 2011)، که با نتایج بهدستآمده مطابقت داشت. در کشت میکروسپور سیب بیشترین درصد جنینزایی در محیط حاوی مالتوز و کمترین میزان در محیط حاوی ساکاروز مشاهده شد میزان در محیط حاوی ساکاروز مشاهده در میزان زندهمانی میکروسپورهای رز در محیطهای حاوی ساکارز مطابقت داشت، اما در مورد مالتوز مطابقت نداشت. کربوهیدرات ممکن است مربوط به تنظیم فشاراسمزی در طی فاز القایی باشد Sunderland) فشاراسمزی در طی فاز القایی باشد Sunderland) میرسد بعداً در طی دوره کشت، غلظتهای بالای میرسد بعداً در طی دوره کشت، غلظتهای بالای منبع کربنی تخریبکننده میباشد. مشخص شده منبع کربنی تخریبکننده میباشد. مشخص شده منبع کربنی تحریبکننده میباشد. مشخص شده و با تجمع مقدار زیادی نشاسته از تکوین جنین شده و با تجمع مقدار زیادی نشاسته از تکوین جنین (Shariatpanahi *et al.* میکندی تجزیه شده و منجر به جنینزایی میکروسپور می گردد



شکل ۳– اثر محیطهای کشت القایی (AT3-M, AT3-LM, AT3-G, AT3-LG, AT3-S, AT3-LS) بر زندهمانی Rosa hybrida cv. (Amarosa & Apollo) میکروسپورهای

(Raina and Irfan, برنج (Raina and Irfan, مورد استفاده (1998 و چاودار (1904 *et al.* 2004) مورد استفاده قرار گرفته است. در این تحقیق ترکیبی از تنشهای دمایی و گرسنگی ارزیابی شدند. سه دمای مورد استفاده در زمان اعمال تنش گرسنگی تفاوت معنیداری بر زندهمانی میکروسپورها و بازدهی معنیداری بر زندهمانی میکروسپورها و بازدهی مورد ممان دادند (جدول ۲). در رقم 'Amarosa' باعث تیمار گرسنگی بهمدت سه روز در دمای ۲۰° باعث القای جنین شد (شکل ۱۵)، اما تعداد جنینهای تنش های مورد استفاده جهت جنینزایی میکروسپورها تنش گرسنگی

یکی از موثرترین تنشهای مورد استفاده برای القای جنینزایی، گرسنگی قندی میباشد (Shariatpanahi *et al.* 2006a). تنش گرسنگی به عنوان القاگر جنینزایی در میکروسپورهای جداشده (Kyo and Harada, گندم (Kyo and Harada)، برنج برخی گونهها مانند تنباکو (Touraev *et al.* 1996)، برنج (Hoekstra *et al.* 9)، جو

تنشهای حرارتی میکروسیورها در حالت طبیعی مسیر گامتوفیتیک را طی کرده و به دانهگرده تبدیل میشوند، تنش می تواند مسیر گامتوفیتیک را به اسپروفیتیک تغییر داده و منجر به جنینزایی میکروسپورها گردد. برای این منظور، تنشهای گرمایی و سرمایی بهطور گسترده مورداستفاده قرار می گیرند (Shariatpanahi) et al. 2006a). تاثیر دماهای مختلف بر زندهمانی میکروسپورهای رز (cv. Apollo) و القای تقسیمات متقارن در شکلهای ۴ و ۵ نشان داده شده است. بیشترین درصد زندهمانی میکروسپورها در C°۳۰ بهمدت ۷ روز، C°۴ بهمدت ۱۴ روز و C°۲۵ مشاهده شد (شکل ۴). بالاترین میزان تشکیل ساختارهای چندسلولی در دمای ^C۰۰C به مدت ۷ روز بهدست آمد (شکل ۵). بهترین شرایط برای القای ساختارهای چندسلولی (شکل ۱b) و نمو بعدی آنها به سمت جنینزایی وقتی ایجاد شد که غنچههای گل بهمدت ۱۴ روز در دمای C° ۴ نگهداری شدند و پس از جداسازی میکروسپورها مجددا تحت تنش گرمایی (۳۰°C) به مدت ۷ روز قرار گرفتند. در اثر تنشگرمایی چندین پروتنین تنشگرمایی (HSPs) مانند HSP70 سنتز می شوند که از آپوپتوسیس جلوگیری می کنند (Shariatpanahi et al. (2006a. به هرحال، جنينهای القايی از میکروسیورها در تیمارهای تنش گرمایی (۳۰°۲) بهمدت ۷ روز و تنش سرمایی (۴°C) بهمدت ۱۴ روز بهدست آمدند. گزارش شده است که تنش سرمایی موجب القای جنینزایی در گونههایی مانند تنباکو (Duncan & Heberle. 1976) شده است. در اثر تنش سرمایی، میزان کل آمینواسیدهای آزاد افزایش می یابد که ممکن است هدایت گر میکروسیورها جهت سازگاری با تغییرات متابولیک و القای جنینزایی باشد .(Shariatpanahi et al. 2006a)

2. Apoptosis

بهدست آمده اندک بود. تیمارهای دمای بالا و گرسنگی طولانیمدت (°C به مدت ۵ و ۷ روز) القای جنین را بهمیزان چشمگیری کاهش داد. زمانی که میکروسپورها تحت تنشهای طولانی قرار می گیرند، درصد زندهمانی آن ها کاهش یافته و بنابراین از ادامه مسیر به سمت جنینزایی باز می مانند. نتایج بهدست آمده با Touraev et al. (1996) که گزارش کردند در کشتبساک ۹ ژنوتیپ گندم زمستانه تحت تنشهای گرسنگی و گرمایی جنينزايى ميكروسپورها با بازدهى بالا صورت گرفته است، مطابقت نداشت (Touraev et al. 1996). کاهش سنتز RNA و فعالیت پروتئین کیناز از جمله خصوصیات میکروسپورهای گرسنه تنباکو میباشد HSP). یک ژن کوچک (Touraev et al. 1996) در دانههای گرده دو سلولی اولیه گرسنه در تنباکو بیان میشود که ممکن است از آپوپتوسیس جلوگیری کند. در زمان تیمار گرسنگی، تغییرات کمی و کیفی در فعالیتهای پروتئین کیناز نیز نشان داده شده است (Shariatpanahi et al. 2006a). البته در آزمایشات حاضر بازدهی تولید جنین بالا نبود که این خود می تواند زمینه ای برای تحقیقات آینده باشد، ولی با توجه به اینکه برای اولین بار جنینزایی میکروسپورها در رز گزارش می گردد از اهمیت بالایی برخوردار است. متاسفانه در این پژوهش موفقیت کامل در باززایی جنینها حاصل نشد.

جدول ۲– تجزیه واریانس اثر دما و رقم بر میزان						
زندهمانی میکروسپورها در اثر تنش گرسنگی						
میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغييرات				
0.014 ^{ns}	1	رقم				
0.335 ^{ns}	2	دما				
0.987 ^{ns}	2	رقم × دما				
0.177	12	خطا				

ns عدم معنیدار

^{1.} Heat Shock Proteins

نتیجهگیری کلی

پژوهش حاضر اولین گزارش موفق القای جنین از

میکروسپورهای جداشده رز (.Rosa hybrid L) در شرایط درون شیشه می باشد. از میان مراحل مختلف

نموی میکروسپورها، مرحله انتهای تکهستهای

بهترین اثر را در باززایی جنینها نشان داد. ضدعفونی

سطحی غنچهها با هیپوکلریتسدیم ۳/۵ درصد بهمدت ۱۰ دقیقه موجب افزایش زندهمانی

میکروسپورها و کاهش میزان آلودگی گردید.

ارزیابی محیطهای جداسازی میکروسپورها تفاوت معنیداری در زندهمانی آنها نشان نداد. در رقم 'Amarosa' محیط کشت G-AT3 بهترین محیط القایی بود. بیشترین بازدهی تشکیل ساختارهای چندسلولی در تیمارهای تنش گرمایی (۲۰°۲) بهمدت ۷ روز بهدست آمد. بهطورکلی، بهترین شرایط القای جنینزایی میکروسپورها تنش گرمایی (۲۰°۲) بهمدت ۷ روز و تنش سرمایی (۲۰°۲) بهمدت ۷ روز بود.



شکل ۵- اثر تنش دمایی بر میزان تشکیل ساختارهای چند سلولی در Rosa hybrida cv. Apollo

www.SID.ir

حمایت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) در قالب طرح شماره ۸۸۰۰۶–۸۷۰۴-۲ ۱۵–۰۰–۱۲ انحام شد.

REFERENCES

- Ahmadi T, Mashayekhi K, Kermani MJ, Ghasemnejad A, Shariatpanahi ME, Hasanloo 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). M.Sc. thesis. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Faculty of Agriculture. (In Farsi)
- Duijs JG, Voorrips RE, Visser DL, Custers JBM (1992) Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. Euphytica. 60: 45–55.
- Duncan EJ, Heberle E (1976) Effect of temperature shock on nuclear phenomena in microspores of *Nicotiana tabacum* and consequently on plantlet production. Protoplasma. 90: 173–177.
- Ferrie AMR, Caswell KL (2010) Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tiss Org. Cult. 12: 204-210.
- Germana MA (2011) Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 104: 283–300.
- Gudin S, Arene L (1991) Influence of the pH of the stigmatic exudates on malefemale interaction in *Rosa hybrida* L. Sex Plant Reports. 4: 110–112.
- Guha S, Maheshwari SC (1966) Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. Nature. 5057: 97–98.

Heberle-Bors E (1989) Isolated pollen

سپاسگزاری پژوهش حاضر بخشی از رساله دکتری رشته گل و گیاهان زینتی دانشگاه تهران میباشد که تحت

culture in tobacco: plant reproductive development in a nutshell. Sex Plant Reports. 2: 1–10.

- Hennry R, Raymond R, Miller A (1996) Haploid plant regeneration from anther cultures of three North American cultivars strawberry (*Fragaria ananassa* Duch). Plant cell Reports. 15: 905-909.
- Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y (1970) Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: Intracellular hydrolysis of fluoresce in diacetate. Stain Technol. 45:115–120.
- Hoekstra S, van Zijderveld MH, Louwerse JD, Heidekamp F, van der Mark F (1992) Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv 'Igri'. Plant Sci. 86: 89–96.
- Hofer M, Hanke V (1990) Induction of androgenesis *in vitro* in apple and sweet cherry. Acta Hort. 280: 333– 336.
- Keller WA, Rajhathy T, Lacapra J (1975) *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*. Can J Genet Cytol. 17:655–666.
- Kyo M, Harada H (1986) Control of the developmental pathway of tobacco pollen *in vitro*. Planta. 168: 427–432.
- Ma R, Guo YD, Pulli S (2004) Comparison of anther and microspore culture in the embryogenesis and regeneration of rye (*Secale cereale*). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 76:147– 157.
- Mirali N, Aziz R, Nabulsi I (2012) Genetic characterization of *Rosa damascena* species growing in

different regions of Syria and its relationship to the quality of the essential oils. Int. J. Med. Arom. Plants. 2(1): 41-52.

- Meynet J, Botton E, Eychene J, Aime F (1996) Optimization of a method for the haploidization of cultivated roses. Acta Hort. 424: 399-401.
- Mohan jain S, Sopory SK, Veilleux RE (1996). *In vitro* Haploid Production in Higher Plants. Voluml-4, Kluwer Academic Publishers, Finland.
- Nitsch, C, 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. CR Acad Sci, Paris. 276: 303-306.
- Ogawa T, Fukuoka H, Ohkawa Y (1994) Induction of cell division of isolated pollen grains by sugar starvation in rice. Breed Sci. 44: 75–77.
- Paime JG, Semeniuk P, Stewart RN (1996) Roses and blackspot.1. Pathogenicity to excised leaflets of *Diplocarpon rosea* from seven geographic locations. Phytopath. 56-1277-82.
- Raina SK, Irfan ST (1998) High frequency of embryogenesis and plantlet regeneration from isolated microspores of Indica rice. Plant Cell Rep. 17: 957–962.
- Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle-Bors E, Touraev A (2006a) Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro*

embryogenesis. Physiol. Plant. 127: 519-534.

- Shariatpanahi Belogradova K. ME, Hessamvaziri L, Heberle-Bors E, Efficient Touraev Α (2006b) embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (Triticum aestivum L.) microspores without stress pretreatment. Plant Cell Rep. 1294-1299.
- Sunderland N, Dunwell JM (1977) Anther and pollen culture. In: Street HE (ed) Plant tissue and cell culture. Oxford, Blackwell, pp 223–265.
- Tabaeezadeh Z, Khosh-Khui M (1981) Anther culture of Rose. Scientia Horticulturae. 15: 61-66.
- Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O, Heberle-Bors E (1996) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperatures. Sex Plant Rep. 9: 209–215.
- Touraev A, Pfosser M, Heberle-Bors E (2001) The microspore: a haploid multipurpose cell. Adv Bot Res 35: 53–109.
- Vergne P, Delvallee I, Dumas C (1987) Rapid assessment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permeabilization. Stain Technol. 62: 299–304.
- Wylie AP (1954) The history of the garden roses, Part 2. Journal of Royal. Horticultural Society. 79: 8-24.