

Scientific Short Article

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

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

مهناز عروجلو^۱، مهران عنایتی شریعت‌پناهی^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.، عنایتی شریعت‌پناهی، م.، دهستانی، م.، بی‌همتا، م. ر. و جعفرخانی کرمانی، م. ۱۳۹۱. تأثیر 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 دی‌هپلوئیدها از ارقام تتراپلوئید تجاری، امکان تلاقی با گونه‌های وحشی دیپلوئید و متعاقباً انتقال ژن‌های مطلوب از گونه‌های دیپلوئید به دی‌هپلوئید را فراهم می‌کند

(Meynet et al., 1994, 1996). تولید هاپلوئیدها از دی‌هپلوئیدها 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

آندروژنز است که به دو روش کشت بساک و کشت میکروسپور انجام می‌شود (عنایتی شریعت‌پناهی و امامی‌مبیدی، ۲۰۰۹). تاکنون در رز فقط از روش ماده‌زایی (پارتنوژنز) با استفاده از گرده‌های نابارور پرتوتایی 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)؛ اما در رز کشت بساک و میکروسپور موفقیت‌آمیز نبوده است. طب‌بای زاده و خوش‌خوی (Tabaizadeh 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.

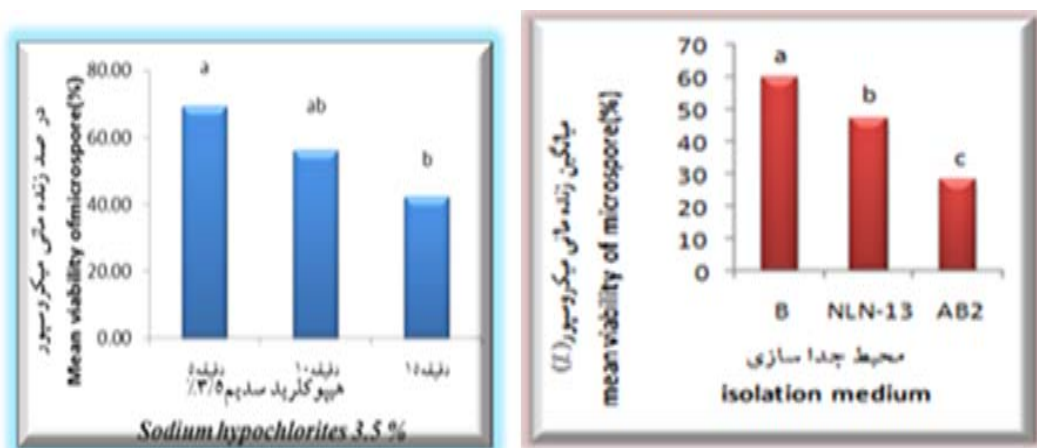
در این آزمایش از رقم تتراپلوئید تجاری رز HAV1 استفاده شد. گیاهان در فیتوترون با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰ درصد و روشنایی ۱۶ هزار لوکس پرورش داده شدند. اولین مرحله مهم در جنین‌زایی میکروسپور، تعیین مرحله مناسب غنچه است. غنچه‌هایی که اکثریت میکروسپورهایشان در مرحله انتهایی تک سلولی بودند، با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) شناسایی شدند. از هیپوکلریت سدیم (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)، (1) AT3 (شامل محیط پایه AT3 به علاوه لاکتالومین حاوی ۹۰ گرم در لیتر مالتوز)، (2) AT3 (شامل محیط پایه AT3 به علاوه لاکتالومین حاوی ۴۵/۱ گرم در لیتر گلوکز)، (3) AT3 (شامل محیط پایه AT3 به علاوه لاکتالومین حاوی ۸۵/۵ گرم در لیتر ساکارز)، TM، TMG، A₂60، 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

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 ضد عفونی سطحی میکروسپورها نشان داد که ضد عفونی 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 ضد عفونی 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). هیپوکلریت سدیم 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 تورائف 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

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 رنگ آمیزی با ماده رنگی اختصاصی DAPI تعیین شد. آزمایش‌ها در قالب طرح آزمایشی کاملاً 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 رنگ آمیزی 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 کنار 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



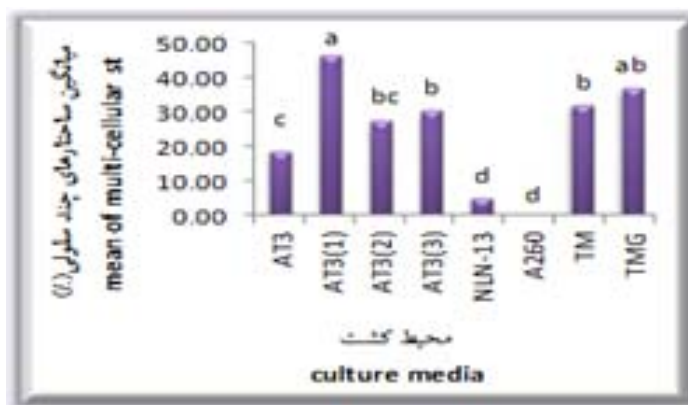
شکل ۱- مقایسه میانگین اثر مدت زمان ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۳/۵٪ و محیط جداسازی بر درصد زنده ماننی میکروسپورهای رز (حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون دانکن است)

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)

شد و در محیط کشت A₂60 ساختارهای چندسلولی مشاهده نشد. محیط های 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 معنی داری در سطح ۵٪ نداشتند (شکل ۲). مقایسه میانگین نشان می دهد که لاکتالومین روی درصد تشکیل ساختارهای چند سلولی تاثیر مثبتی داشته است و باعث تغییر مسیر رشد میکروسپور به سمت اسپوروفیتی یا به عبارتی القای جنین زایی شد (شکل ۲) اما پس از چهار هفته رشد ساختارهای پیش جنین متوقف شد. به نظر می رسد که لاکتالومین که دارای منبع غنی

جداسازی B، وجود مانیتول در تنظیم فشار اسمزی محیط است که بسیار بر زنده ماننی میکروسپورها نقش ایفاء می کند و در مواردی مثل گندم ترکیب مانیتول و سوربیتول در محیط AB بهترین نتیجه را می دهد حال آن که در رز مانیتول به تنهایی توسط میکروسپورها ترجیح داده شد. میکروسپورهای جدا شده از غنچه های رز رقم HAV1 به منظور القای جنین زایی در محیط های مختلف (AT3)، (AT3(1)، (AT3(2)، (AT3(3)، (TM، (TMG، (A₂60 و (NLN-13 کشت شده و در تنش حرارتی ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت هفت روز قرار گرفتند.

نتایج نشان داد که در محیط کشت AT3(1) بیشترین درصد ساختارهای چندسلولی تشکیل



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 $p=0.05$).

میکروسپور سبب بیشترین درصد جنین‌زایی در محیط حاوی مالتوز حاصل شد در حالی که در محیط حاوی ساکارز کمترین درصد جنین‌زایی مشاهده شد (Hofer *et al.*, 1999). در این بررسی محیط‌های حاوی لاکتالومین به علاوه قندهای مختلف به القای جنین‌زایی نسبت به بقیه محیط کشت‌ها پاسخ بهتری داده و بیشترین ساختارهای چندسلولی در محیط دارای لاکتالومین 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.

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. در حالی که مالتوز به کندی تجزیه شده و منجر به جنین‌زایی میکروسپور می‌شود (Shariatpanahi *et al.*, 2006). در کشت

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

References

- Ahmadi, T. 2009.** Comparing the *in vivo* and *in vitro* morphological characteristics and essence content of a hexaploid rose with its triploid progenitor (*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.
- Henry, R., Raymond, R., and Miller, A. 1999.** Haploid plant regeneration from anther cultures of three North American cultivars of strawberry (*Fragaria 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,

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., Iham, 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 haploid population in *Brassica napus* through microspore culture. *Euphytica* 149: 169-177.

