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

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال دوم، شماره سوم، پاییز و زمستان ۱۳۹۱ (۸۳-۷۳)

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

مریم دهستانی اردکانی[۱]، محسن کافی[۲]، مهران عنایتی شریعت پناهی[۳]*، مریم جعفرخانی کرمانی[۳]، محمدرضا فتاحی مقدم[۴]، مهناز عروجلو[۵]

۱، 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: ۹۱/۲/۲۰)

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

M. DEHESTANI ARDAKANI[1], M. KAFI[2], M. ENAYATI SHARIATPANAHI[3]*, M. JAFARKHANI-KERMANI[4], M. R. FATTAHI MOGHADAM[5] AND M. OROOJLOO[6]
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

چکیده

کشت میکروسپور یکی از روش‌های کارآمد تولید گیاهان هاپلوئید می‌باشد. در پژوهش حاضر، سیستم کشت میکروسپور در دو رقم تتراپلوئید رز ('Apollo' و 'Amarosa') مورد بررسی قرار گرفت. عواملی شامل محیط جداسازی میکروسپورها (AB و B)، محیط القای جنین‌زایی در میکروسپورها (AT3) به‌همراه 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 میکروسپورها در مراحل مختلف نموی جهت کشت استفاده شد اما بیشتر آن‌ها در مرحله انتهای تک‌سلولی بودند. به‌منظور حذف آلودگی‌های باکتریایی و قارچی، غنچه‌ها قبل از کشت با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱۵، ۳۰ و ۶۰ ثانیه یا هیپوکلریت‌سدیم (۳/۵ درصد) به‌مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. بهترین روش ضدعفونی غنچه‌ها تیمار با هیپوکلریت‌سدیم (۳/۵ درصد) به مدت ۱۰ دقیقه تشخیص داده شد. دو محیط جداسازی تفاوت معنی‌داری در زنده‌مانی میکروسپورها نشان ندادند. در میان محیط‌های القایی مورد بررسی، در رقم 'Amarosa'، بالاترین میزان زنده‌مانی میکروسپورها در محیط AT3 به‌همراه قند گلوکز به‌دست آمد. محیط‌های کشت القایی در رقم 'Apollo'، تفاوت معنی‌داری در زنده‌مانی میکروسپورها 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

* نویسنده مسئول: مهران عنایتی شریعت پناهی
E-mail: mehran.shariatpanahi@abrii.ac.ir

مقدمه

رزها به‌طور وسیع در فضای سبز و به‌عنوان گل‌های شاخه‌بریده در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند. جنس *Rosa* مهم‌ترین جنس خانواده رزاسه بوده و شامل حدود ۲۰۰ گونه و بیش از ۱۸۰۰۰ رقم می‌باشد (Mirali *et al*. 2012). اصلاح رز در گذشته عمدتاً به‌وسیله روش‌های کلاسیک انجام می‌پذیرفت اما محدودیت‌هایی 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 انتقال‌ژن را به آن‌ها به‌خصوص از گونه‌های دیپلوئید مشکل کرده است (Meynet *et al*. 1996). تلاقی بین گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید ایجاد تریپلوئیدهای عقیم یا نیمه‌عقیم می‌کند (Wylie. 1954). هنگامی‌که انجام تلاقی‌های بین‌گونه‌ای در رزهای با سطوح پلوئیدی مختلف با مشکل روبرو شد، محققین بر آن شدند تا نسبت به تولید گیاه هاپلوئید از گیاه تتراپلوئید (درحالی‌که قادر به تولید گل و گرده باشد) اقدام نمایند و سپس از هاپلوئیدهای حاصل که دی‌هاپلوئید می‌باشند 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 والدین اینبرد در برنامه‌های اصلاحی تولید گیاهان F_1 استفاده شوند (Mohan Jain *et 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 می‌توانند 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 مسیر گامتوفیتیکی آن‌ها به اسپروفیتیک، ضروری می‌باشد. سرما، گرما، گرسنگی کربنی و کلشیسین از جمله تنش‌های پرمصرف جهت القای جنین‌زایی میکروسپور می‌باشند (Shariatpanahi *et al*. 2006a). استفاده از تنش به شکل پیش‌تیمار اولین بار توسط Nitsch and Norreel (1973) روی بساک‌ها یا میکروسپورهای *Datura* گزارش شد. پیش‌تیمار گرمایی معمولاً در دمای ۳۳–۳۷°C به‌مدت چند ساعت تا چندین روز استفاده می‌شود، درحالی‌که تیمار سرمایی در دمای ۴–۱۰°C از چند روز تا چندین هفته کاربرد دارد. همچنین قراردادن میکروسپورها در محیط‌های بدون منابع کربن متابولیزه برای مثال در محیط‌های حاوی مانیتول، نیز موفقیت‌آمیز بوده است (Germana, 2011).

Guha and Maheshwari (1966) برای اولین بار جنین‌زایی دانه‌گرده در *Datura innoxia* را گزارش کردند. اگرچه بسیاری از گونه‌ها پاسخ خوبی به کشت‌بساک می‌دهند و جنین‌زایی میکروسپور به‌طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است، اما بسیاری از آن‌ها همچنان سخت پاسخ ده[1] هستند. کشت بساک تاکنون در دو جنس از خانواده رزاسه شامل توت‌فرنگی و سیب با موفقیت انجام شده است (Hennry *et al*. 1996, Hofer *et al*. 1990). اما در رز کشت‌بساک و میکروسپور موفقیت‌آمیز نبوده است. Tabaeezadeh and Khosh-Khui (1981) القای کالوس از کشت‌بساک دو گونه از جنس رز را گزارش کردند. آن‌ها کالوس‌های هاپلوئید از گونه‌های تتراپلوئید رز به‌دست آوردند، اما موفق به

1. Recalcitrant

باززایی کالوس‌ها نشدند. بنابراین منشأ میکروسپوری آن‌ها معلوم نیست. Gudin and Arene (1991) با بررسی جوانه‌زنی دانه‌های گرده رز در شرایط درون‌شیشه، نتیجه گرفتند که میزان جوانه‌زنی تحت تاثیر pH محیط کشت قرار می‌گیرد. Meynet *et al.* (1996) موفق شدند از طریق پارتنوژنز با استفاده 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. بیشترین درصد زنده‌مانی میکروسپورها در تیمارهای گرسنگی کربنی (محیط B) به‌مدت ۴ روز در دمای ۴°C 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.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

نمونه‌های رز دو رقم 'Apollo' و 'Amarosa' از کلکسیون باغ رز پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) جمع‌آوری شد. اولین مرحله مهم در جنین‌زایی میکروسپور، تعیین مرحله 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-فنیل‌ایندول[1] (DAPI) جهت تعیین مرحله مناسب نموی رنگ‌آمیزی شدند (Vergne *et al.* 1987). از ترکیبات اتانول (۷۰ درصد) به مدت ۱۵، ۳۰ و۶۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۳/۵ درصد (w/v) (۳/۵cc هیپوکلریت سدیم تجاری با آب‌مقطر به حجم ۱۰۰cc رسانده شد) به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه جهت ضدعفونی‌کردن 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 ۵۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از جداسازی میکروسپورها از بساک، به‌منظور شفاف‌سازی مایع کدر به‌دست‌آمده 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 ته‌نشین‌شده نهایتاً با اضافه‌کردن محیط کشت دوباره تعلیق شده و به پتری‌دیش‌های ۶ سانتی‌متری منتقل شدند. بلافاصله پس از کشت، با رنگ‌آمیزی میکروسپورها توسط ماده FDA[2] و مشاهده آن‌ها با میکروسکوپ فلورسنت زنده‌مانی میکروسپورها محاسبه گردید (Heslop-Harrison and Heslop-Harrison. 1970).

ترکیب محیط‌های کشت

محیط B جهت جداسازی میکروسپورها و اعمال تیمارهای گرسنگی طبق روش Kyo and Harada

1. 4', 6-diamidino-2- phenylindole
2. Fluorecein diacetate

(1986) تهیه گردید. محیط B حاوی ۱/۴۹ میلی‌گرم در لیتر KCl، ۰/۱۲ میلی‌گرم در لیتر $MgSO_4$، ۰/۱۱ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2$، ۰/۱۴ میلی‌گرم در لیتر KH_2PO_4 و ۵۴/۷ گرم در لیتر مانیتول با pH برابر ۷ بود. محیط AB با افزودن ۰/۳M سوربیتول و ۰/۳M مانیتول به محیط B آماده شد (Shariatpanahi *et al*. 2006b). به‌منظور القای 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 آمینواسید لاکتوالبومین هیدرولیزات مورد استفاده قرار گرفتند. محیط AT3 حاوی عناصر ماکرو محیط N6 (۱۹۵۰ میلی‌گرم در لیتر KNO_3، ۲۷۷ میلی‌گرم در لیتر $(NH4)_2SO_4$، ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر KH_2PO_4، ۱۶۶ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2\times2H_2O$، ۱۸۵ میلی‌گرم در لیتر $MgSO_4\times7H_2O$) به‌علاوه عناصر میکرو محیط کشت MS، ویتامین‌های محیط B5، ۱۲۵۶ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین، ۱۹۵۰ میلی‌گرم در لیتر MES -(*N*-morpholino)-2] [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 لیتر لاکتالبومین هیدرولیزات (AT3-LM)، AT3 با گلوکز (AT3-G)، AT3-G با ۱۰ گرم در لیتر لاکتالبومین هیدرولیزات (AT3-LG)، AT3 با ساکارز (AT3-S) و AT3-S با ۱۰ گرم در لیتر لاکتالبومین هیدرولیزات (AT3-LS) بودند.

تیمار گرسنگی

میکروسپورهای ایزوله‌شده به مدت ۳ روز در محیط B که یک محیط بدون کربوهیدرات و نیتروژن است کشت و در دماهای ۴، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد، 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.

تنش‌های 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 ۳۰°C و تنش سرمایی به مدت ۷ و ۱۴ روز در ۴°C قرار گرفتند. ۲۵°C به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس پتری‌های حاوی میکروسپورهای جداشده به انکوباتور ۲۵°C انتقال داده شدند.

طرح آماری

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.

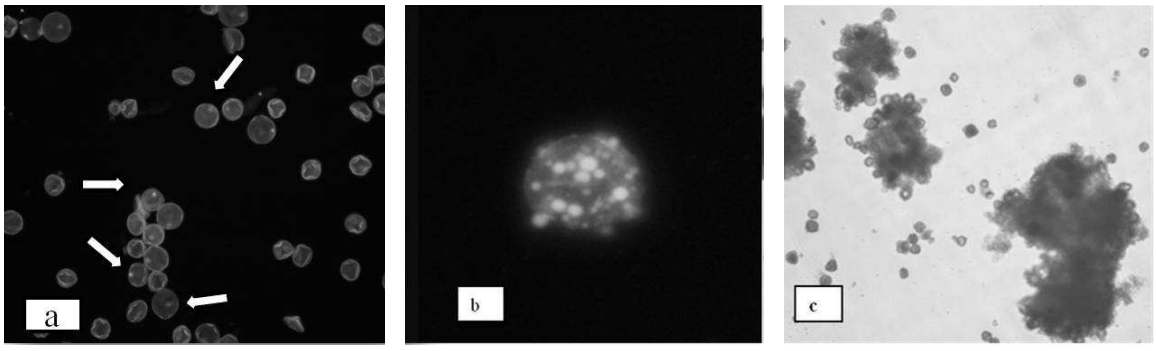
نتایج و بحث

مرحله نموی میکروسپورها و ضدعفونی غنچه‌ها

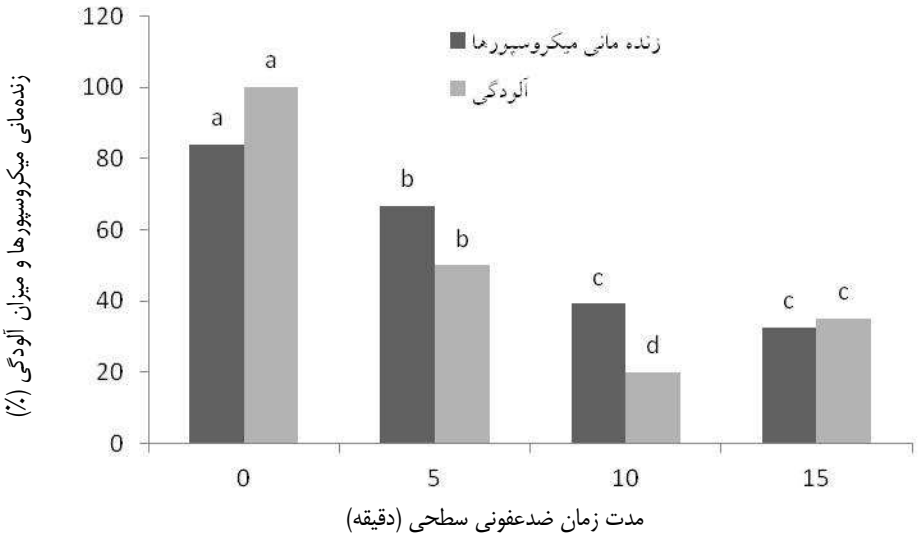
تعیین مرحله نموی مناسب برای میکروسپورها جهت جداسازی و کشت موفق آن‌ها بسیار حیاتی و مهم است و متناسب با گونه گیاهی ممکن است متفاوت باشد. غنچه‌ها یا سنبله‌ها معمولا زمانی که میکروسپورها در مرحله انتهای تک‌هسته‌ای یا ابتدای دوهسته‌ای هستند جهت کشت میکروسپور برداشت می‌شوند (Ferrie and Caswell. 2010). ترکیبی از مراحل نموی میکروسپورها برای شروع کشت مورد استفاده قرار گرفت اما اکثریت آن‌ها در مرحله انتهای تک‌هسته‌ای بودند که در این مرحله هسته سلول بزرگ شده و به دلیل بزرگ‌شدن واکوئل در کناره دیواره‌سلول قرار می‌گیرد (شکل ۱a). براساس مرحله نموی میکروسپورها، زمانی که کاسبرگ‌ها کمی باز 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 پیش‌تیمار استفاده شد، میکروسپورها در مرحله دوهسته‌ای بهترین پاسخ را دادند؛ اما هنگامی‌که به جای آن تنش گرمایی به‌کار گرفته شد، میکروسپورهای تک‌هسته‌ای جوان‌تر 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 می‌دهند (Heberle-Bors. 1989). نتایج به‌دست‌آمده با Tabaeezadeh and Khosh-Khui (1981) 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 تخریب‌کننده ضدعفونی سطحی، تیمارها باید در حداقل زمانی که مواد گیاهی عاری از آلودگی می‌شوند، نگهداری شوند (Ferrie and Caswell. 2010). با توجه به اینکه بین ۱۰ و ۱۵ دقیقه تفاوت معنی‌داری در میزان زنده‌مانی میکروسپورها مشاهده نشد، در ادامه غنچه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه توسط هیپوکلریت سدیم ضدعفونی سطحی شدند. براساس مطالعات انجام شده، یکی از متداول‌ترین 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 قطره توئین به‌مدت چند دقیقه (تا ۱۵ دقیقه) و همین‌طور چندین مرتبه شستشو با آب مقطر استریل می‌باشد (Ferrie and Caswell. 2010). Ahmadi *et al*. (2009) نیز بهترین تیمار 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



شکل ۲- اثر مدت زمان ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم بر زنده‌مانی و آلودگی میکروسپورها

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

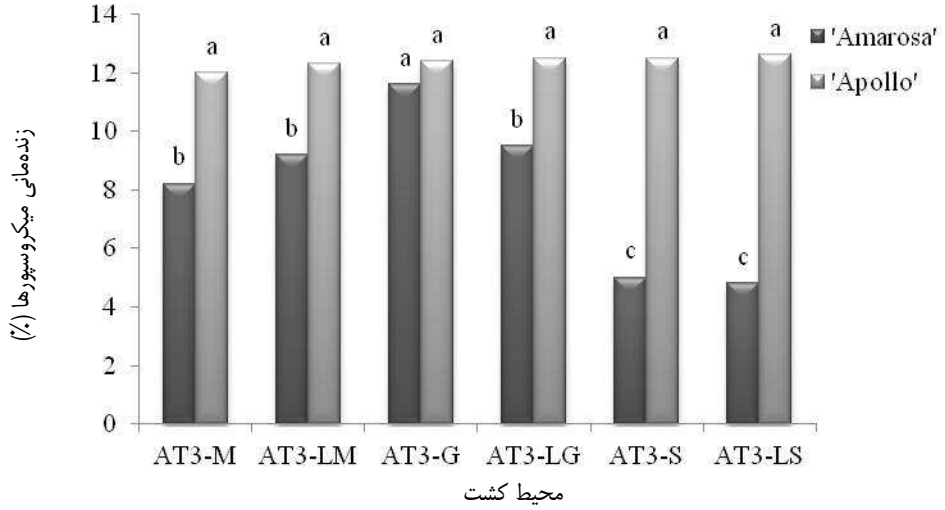
منابع تغییرات	محیط جداسازی		منابع تغییرات	الکل ۷۰٪	
	درجه آزادی	میانگین مربعات		درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط جداسازی	1	0.008^{ns}	تیمار زمانی	2	0.008^{ns}
خطا	4	0.045	خطا	6	0.005

ns عدم معنی‌دار

محیط های جداسازی و کشت

ارزیابی دو محیط جداسازی میکروسپورها شامل AB و B تفاوت معنی‌داری در میزان زنده‌مانی میکروسپورها نشان نداد (جدول ۱). در حقیقت، ترکیبات محیط AB شبیه B است با این تفاوت که مقدار ۰/۳M سوربیتول و ۰/۳M مانیتول به آن افزوده شده است (Shariatpanahi *et al.* 2006b). عامل مهم در محیط جداسازی B، وجود مانیتول در تنظیم فشاراسمزی محیط است که نقش مهمی در زنده‌مانی میکروسپورها ایفا می‌کند و در مواردی مثل گندم ترکیب مانیتول و سوربیتول در محیط AB نتیجه بهتری می‌دهد، حال آنکه در رز تفاوتی مشاهده نشد. علی‌رغم محیط جداسازی، محیط‌کشت القایی یک عامل مهم در موفقیت جنین‌زایی میکروسپورها می‌باشد. ارزیابی محیط‌های کشت متفاوت در رقم 'Apollo' تفاوت معنی‌داری 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 میکروسپور همانند محیط‌های کشت‌بافتی نیازمند عناصر ماکرو و میکرو، ویتامین‌ها و یک منبع کربوهیدرات می‌باشند (Ferrie and Caswell. 2010). در رقم 'Amarosa' بالاترین میزان زنده‌مانی میکروسپورها در محیط AT3 با قند گلوکز (AT3-G) مشاهده شد (شکل ۳). منبع کربوهیدرات به‌علت اثرات اسمزی و تغذیه‌ای، برای تولید جنین در کشت میکروسپور ضروری است. اثر غلظت کربوهیدرات ممکن است مربوط به تنظیم فشاراسمزی در طی فاز القایی باشد (Sunderland

and Dunwell, 1997). همان‌طور که به‌نظر می‌رسد بعداً در طی دوره کشت، غلظت‌های بالای منبع کربنی تخریب‌کننده می‌باشد. مشخص شده است که ساکارز در جو و توتون به‌سرعت متابولیز شده و با تجمع مقدار زیادی نشاسته از تکوین جنین جلوگیری می‌کند (Shariatpanahi *et al*. 2006a). در حالی‌که مالتوز به‌کندی تجزیه شده و منجر به جنین‌زایی میکروسپور می‌گردد (Shariatpanahi *et al*. 2006a). ثابت شده است که در چاودار گلوکز بیش از ساکارز تحریک‌کننده 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 (Germana. 2011) که با نتایج به‌دست‌آمده در میزان زنده‌مانی میکروسپورهای رز در محیط‌های حاوی ساکارز مطابقت داشت، اما در مورد مالتوز مطابقت نداشت.



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

تنش‌های 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 به‌عنوان القاگر جنین‌زایی در میکروسپورهای جداشده برخی گونه‌ها مانند تنباکو (Kyo and Harada, 1986)، گندم (Touraev *et al*. 1996)، برنج (Ogawa *et al*. 1994)، جو (Hoekstra *et al*. 1992) یا کشت بساک برنج (Raina and Irfan, 1998) و چاودار (Ma *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 تشکیل ساختارهای چندسلولی در دو رقم مورد بررسی نشان ندادند (جدول ۲). در رقم 'Amarosa'، تیمار گرسنگی به‌مدت سه روز در دمای ۴°C باعث القای جنین شد (شکل ۱c)، اما تعداد جنین‌های به‌دست آمده اندک بود. تیمارهای دمای بالا و گرسنگی طولانی‌مدت (۳۰°C به مدت ۵ و ۷ روز) القای جنین را به‌میزان چشمگیری کاهش داد. زمانی که میکروسپورها تحت تنش‌های طولانی قرار

می‌گیرند، درصد زنده‌مانی آن‌ها کاهش یافته و بنابراین از ادامه مسیر به سمت جنین‌زایی باز می‌مانند. نتایج به‌دست‌آمده با Touraev *et al*. (1996) که گزارش کردند در کشت‌بساک ۹ ژنوتیپ گندم زمستانه تحت تنش‌های گرسنگی و گرمایی جنین‌زایی میکروسپورها با بازدهی بالا صورت گرفته است، مطابقت نداشت (Touraev *et al*. 1996). کاهش سنتز RNA و فعالیت پروتئین کیناز از جمله خصوصیات میکروسپورهای گرسنه تنباکو می‌باشد (Touraev *et al*. 1996). یک ژن کوچک HSP 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 می‌تواند زمینه‌ای برای تحقیقات آینده باشد، ولی با توجه به اینکه برای اولین بار جنین‌زایی میکروسپورها در رز گزارش می‌گردد 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

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
رقم	1	0.014^{ns}
دما	2	0.335^{ns}
رقم × دما	2	0.987^{ns}
خطا	12	0.177

ns عدم معنی‌دار

تنش‌های حرارتی

میکروسپورها در حالت طبیعی مسیر گامتوفیتیک را طی کرده و به دانه‌گرده تبدیل می‌شوند، تنش می‌تواند مسیر گامتوفیتیک را به اسپروفیتیک تغییر داده و منجر به جنین‌زایی میکروسپورها گردد. برای این منظور، تنش‌های گرمایی و سرمایی به‌طور گسترده مورداستفاده قرار می‌گیرند (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 ۳۰°C به‌مدت ۷ روز، ۴°C به‌مدت ۱۴ روز و ۲۵°C مشاهده شد (شکل ۴). بالاترین میزان تشکیل ساختارهای چندسلولی در دمای ۳۰°C 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 ۴ °C نگه‌داری شدند و پس از جداسازی میکروسپورها مجددا تحت تنش گرمایی (۳۰°C) به مدت ۷ روز قرار گرفتند. در اثر تنش‌گرمایی چندین پروتئین تنش‌گرمایی (HSPs)[1] مانند HSP70 سنتز می‌شوند که از آپوپتوسیس[2] جلوگیری می‌کنند (Shariatpanahi *et al*. 2006a). به هرحال، جنین‌های القایی از میکروسپورها در تیمارهای تنش‌گرمایی (۳۰°C) به‌مدت ۷ روز و تنش‌سرمایی (۴°C) به‌مدت ۱۴ روز به‌دست آمدند. گزارش شده است که تنش‌سرمایی موجب القای جنین‌زایی در گونه‌هایی مانند تنباکو (Duncan & Heberle. 1976) شده است. در اثر تنش سرمایی، میزان کل آمینواسیدهای آزاد افزایش می‌یابد که ممکن است هدایت‌گر میکروسپورها جهت سازگاری با تغییرات متابولیک و القای جنین‌زایی باشد (Shariatpanahi *et al*. 2006a).

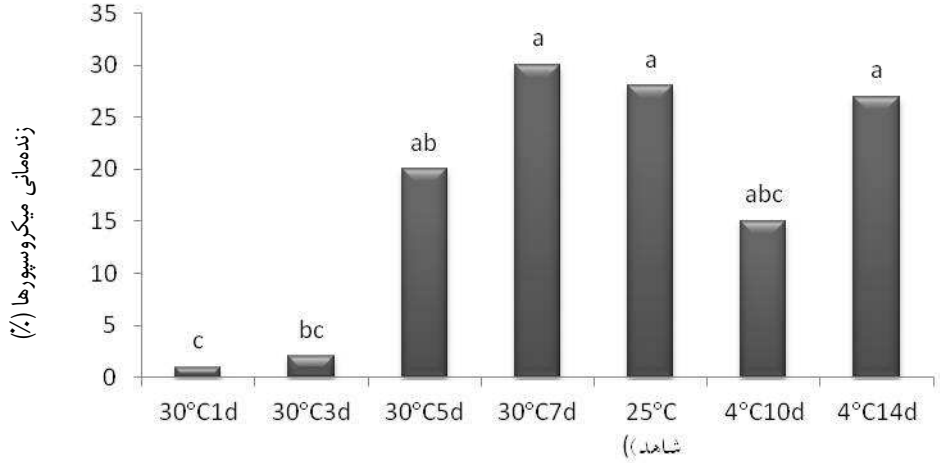
نتیجه‌گیری کلی

پژوهش حاضر اولین گزارش موفق القای جنین از میکروسپورهای جداشده رز (*Rosa hybrid* L.) در شرایط درون‌شیشه می‌باشد. از میان مراحل مختلف نموی میکروسپورها، مرحله انتهای تک‌هسته‌ای

1. Heat Shock Proteins
2. Apoptosis

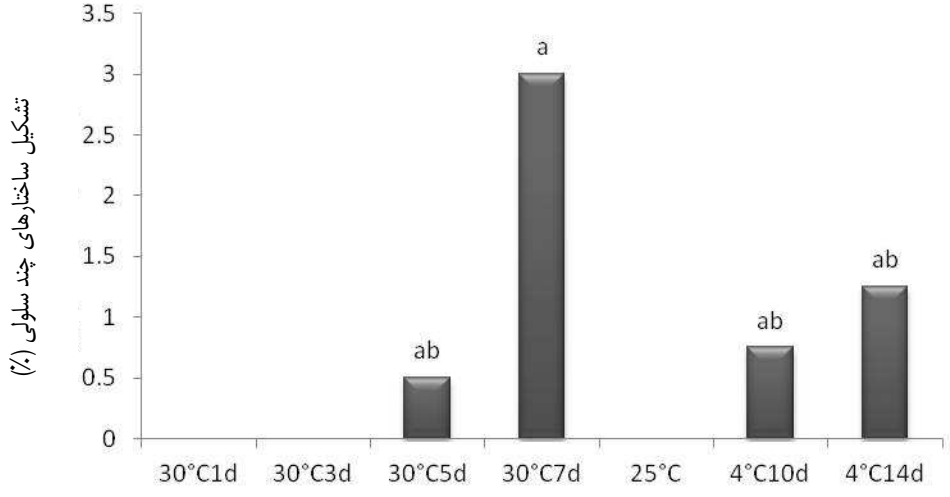
بهترین اثر را در باززایی جنین‌ها نشان داد. ضدعفونی سطحی غنچه‌ها با هیپوکلریت‌سدیم ۳/۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه موجب افزایش زنده‌مانی میکروسپورها و کاهش میزان آلودگی گردید.

ارزیابی محیط‌های جداسازی میکروسپورها تفاوت معنی‌داری در زنده‌مانی آن‌ها نشان نداد. در رقم 'Amarosa' محیط کشت AT3-G بهترین محیط القایی بود. بیشترین بازدهی تشکیل ساختارهای چندسلولی در تیمارهای تنش‌گرمایی (۳۰°C) به‌مدت ۷ روز به‌دست آمد. به‌طورکلی، بهترین شرایط القای جنین‌زایی میکروسپورها تنش‌گرمایی (۳۰°C) به‌مدت ۷ روز و تنش‌سرمایی (۴°C) به‌مدت ۷ روز بود.



تنش دمایی (درجه سانتی‌گراد) و مدت زمان آن (روز)

شکل ۴- اثر تنش دمایی بر زنده‌مانی میکروسپورهای *Rosa hybrida* cv. Apollo



تنش دمایی (درجه سانتی‌گراد) و مدت زمان آن (روز)

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

سپاسگزاری

پژوهش حاضر بخشی از رساله دکتری رشته گل و گیاهان زینتی دانشگاه تهران می‌باشد که تحت حمایت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) در قالب طرح شماره ۸۸۰۰۶-۸۷۰۴-۰۵-۰۵-۱۲ انجام 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 male-female 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 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 ME, Belogradova K, Hessamvaziri L, Heberle-Bors E, Touraev A (2006b) Efficient 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.