بررسی اثر تنش های دمایی و گرسنگی بر جنین زایی میکروسپور در دو رقم تتراپلوئید رز (*Rosa hybrida*)

مریم دهستانی اردکانی (۱)، مهران عنایتی شریعت پناهی (۲)، محسن کافی (۳)، مریم جعفرخانی کرمانی (۲)، محمد رضا فتاحی مقدم (۳)، مهناز عروجلو (٤)

۱- دانشجو دکتری، گروه علوم و مهندسی باغبانی و فضای سبز پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران ۲-استادیار بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن-پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران ۳- دانشیار گروه علوم و مهندسی باغبانی و فضای سبز پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران ٤- کارشناس بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن-پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

کشت میکروسپور یکی از کاراترین روش‌ها در تولید گیاهان هاپلوئید می باشد. در این پژوهش، کشت میکروسپور جدا شده به منظور القای جنین زایی در کولتیوارهای HAP1 و Amarosa رز (*Rosa hybrida*) مورد بررسی قرار گرفت. مهم ترین عوامل مؤثر بر زنده مانی میکروسپورهای ایزوله شده و تشکیل ساختارهای چند سلولی شامل محیط جداسازی (AB, B)، محیط القایی AT3 همراه با منابع مختلف کربوهیدرات (ساکارز، مالتوز و گلوکز) و منابع مختلف آمینواسید (لاکت آلبومین هیدرولیزات) مورد بررسی قرار گرفتند. تنش های مختلقی مانند گرسنگی کربنی- نیتروژنی، تیمارهای دمایی (گرما و سرما) به تنهایی یا همراه با یکدیگر در آزمایشات مکرر برای القای تقسیمات اسپروفیتی مورد بررسی قرار گرفتند. بیشترین پاسخ دهی مرحله نموی میکروسپورها (انتهای تک سلولی) از طریق رنگ آمیزی با DAPI مشخص شد. حداقل آلودگی در کشت میکروسپورها زمانی به دست آمد که میکروسپورها با هیپوکلریت سدیم (۳/۵٪) به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی شده بودند. دو محیط جداسازی تفاوت معنی داری نشان ندادند. در میان محیط های القایی در کولتیوار Amarosa بیشترین زنده مانی در محیط القایی AT3 همراه با گلوکز به دست آمد. اما محیط های القایی در کولتیوار HAP1 تفاوت معنی داری نشان ندادند. تیمار گرسنگی به مدت ۳ روز در دمای ٤°C جنین زایی را در کولتیوار Amarosa القا کرد. این اولین گزارش از جنین زایی میکروسپور رز است.

کلمات کلیدی: رز، میکروسپور، جنین زایی، استرس، دابلد هاپلوئید

مقدمه:

یکی از روش‌های اصلاحی رز، استفاده از تلاقی به‌خصوص بین ارقام تجاری و گونه‌های وحشی به منظور انتقال ژنهای مفید از گونه‌های وحشی به گونه‌های مورد کشت و کار می باشد. اما تلاقی‌ها با مشکل ناسازگاری یا تفاوت سطح پلوئیدی بین والدین همراه هستند. تولید گیاهان دی‌هاپلوئید از گیاهان تتراپلوئید تجاری امکان تلاقی آنها را با گونه‌های دیپلوئید وحشی میسر می‌سازد. از طرفی در صورت تولید گیاهان هاپلوئید از دی‌هاپلوئیدها (Dihaploids) و سپس تهیه دابلدهاپلوئیدها (Doubled haploids) که از نظر ژنتیکی دارای خلوص ۱۰۰٪ می باشند امکان تولید هیبریدهای F1 از دابلدهاپلوئیدهای تولیدی وجود دارد و این روش اصلاحی می تواند باعث ایجاد تحول معنی‌دار در عملکرد رز های تولیدی گردد که این مساله قبلا در گیاهان زینتی نظیر لیلیوم و درختان میوه نظیر گلابی به نتیجه رسیده است (Amaury et al., 1997 ؛ Bouvier et al., 2002). در میان روش‌های مختلف تولید گیاهان هاپلوئید، روش کشت میکروسپور جدیدترین و کاراترین روش می‌باشد (عنایتی‌شریعت‌پناهی، ١٣٨٦).

مواد و روش‌ها:

در این آزمایش از دو رقم تجاری رز (HAP1 ، Amarosa) استفاده شد. اولین مرحله مهم در جنین‌زایی میکروسپور، تعیین مرحله مناسب غنچه می‌باشد. غنچه‌هایی که اکثریت میکروسپورهایشان در مرحله انتهایی تک سلولی بودند، با استفاده از رنگ آمیزی شناسایی گردیدند. از ترکیبات اتانول (۷۰ ٪ به مدت ۱۵ ثانیه، ۳۰ ثانیه، ٦۰ ثانیه) و هیپوکلریت سدیم (۳/۵ ٪ به مدت ۵ ، ۱۰ و ۱۵ دقیقه) جهت ضدعفونی کردن غنچه‌های رز استفاده شد. محیط‌های جداسازی شاملBو AB، محیط‌های کشت القایی شامل AT3 همراه با منابع مختلف کربوهیدراتی (ساکارز، مالتوز و گلوکز) و آمینواسید (لاکتالبومین‌هیدرولیزات) مورد

بررسی قرار گرفتند. سوسپانسیون میکروسپورها، پس از عبور از فیلتر با قطر منافذ μm ۵۸ سانتریفوژ گردیدند. رسوب ته نشین شده پس از رنگ‌آمیزی با FDA جهت تعیین درصد زنده‌مانی میکروسپورها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت استفاده شدند. نهایتاً در محیط‌های مختلف کشت گردیدند و در دماهای مختلف شامل کنترل(۲۵°C)، تنش سرمایی (٤°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. تیمار گرسنگی نیز با کشت میکروسپورها در محیط B به مدت ۳ روز در دماهای (۲۵، ۳۰ و ٤°C) و سپس انتقال به دمای ۲۵°C صورت گرفت. آزمایش‌ها در قالب طرح آزمایشی کاملا تصادفی در ۳ تکرار انجام شد.

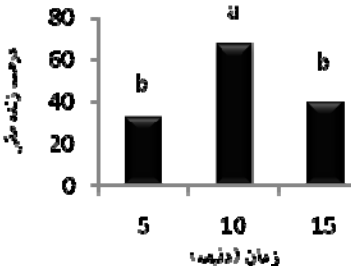
نتایج و بحث:

پس از جداسازی میکروسپورها و رنگ‌آمیزی با DAPI بهترین مرحله برداشت (مرحله انتهایی تک‌سلولی) تعیین شد (شکل ۲). حداقل آلودگی در کشت میکروسپورها زمانی به دست آمد که میکروسپورها با هیپوکلریت‌سدیم (۳/۵٪) به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شده بودند (شکل ۱). تیمار با الکل تفاوت معنی‌داری در زنده‌مانی میکروسپورها نشان نداد (جدول ۱). دو محیط جداسازی B و AB تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (جدول ۲). در کولتیوار HAP1 تفاوت معنی‌داری میان ۷ محیط کشت القایی متفاوت از نظر فراوانی زنده مانی میکروسپورها مورد استفاده مشاهده نشد(جدول ۲)، هرچند زنده‌مانی طولانی مدت در محیط‌های AT3 همراه با گلوکز و لاکتالبومین و AT3 همراه با ساکارز و لاکتالبومین به دست آمد. محیط AT3 همراه با گلوکز بیشترین زنده‌مانی را در کولتیوار Amarosa نشان داد. محیط القایی یک عامل مهم در فرایند جنین‌زایی میکروسپور می‌باشد (Hofer, 2004). تیمار گرسنگی به مدت ۳ روز در دمای ٤°C باعث ایجاد جنین در کولتیوار Amarosa شد(شکل ۲) ، که این نتایج با هوفر و همکاران (۲۰۰٤) مطابقت داشت. این تیمار در زنده‌مانی میکروسپورهای کواتیوار HAP1 تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در تیمارهای دمایی بیشترین تقسیمات سلولی در کولتیوار HAP1 در ۳۰°C به مدت ۷ روز و بیشترین میزان زنده‌مانی میکروسپورها در ۳۰°C به مدت ۷ روز، ۲۵°C و ٤°C به مدت روز ۱٤ به دست آمد(شکل ۳). این تنش‌ها در کولتیوار Amarosa تفاوت معنی‌داری نشان ندادند.

جدول۱: تجزیه واریانس داده های حاصل از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم و الکل

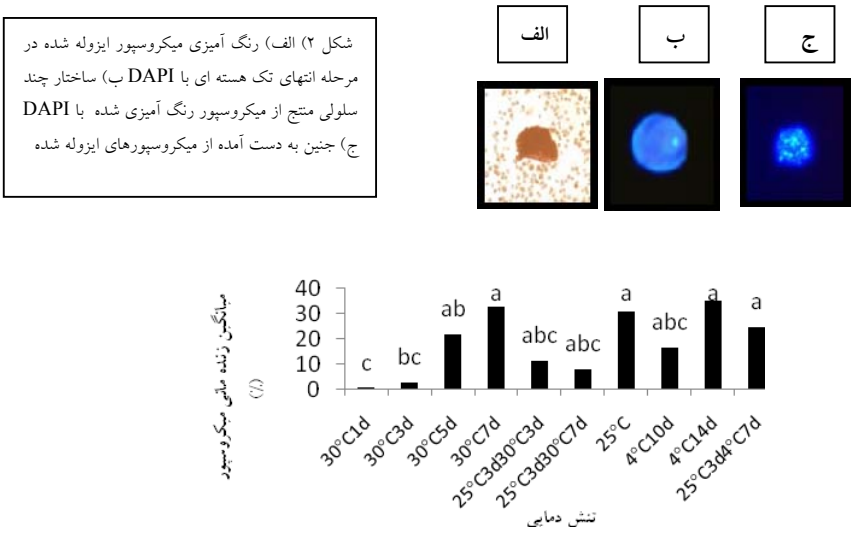
منابع تغییرات	df	میانگین مربعات زنده مانی	منابع تغییرات	df	میانگین مربعات زنده مانی
هیپوکلریت سدیم	۲	۰/۰۰۵*	الکل	۲	۰/۰۰۸^{ns}
خطای آزمایشی	٦	۰/۰۰۱	خطای آزمایشی	٦	۰/۰۰۵

شکل ۱: اثر مدت زمان ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم بر زنده مانی میکروسپورها



جدول۲: تجزیه واریانس داده های حاصل از محیط های ایزولاسیون و محیط کشت در کولتیوارهای HAP1 و Amarosa

محیط ایزولاسیون			محیط کشت در کولتیوار HAP1			محیط کشت در کولتیوار Amarosa		
منابع تغییرات	df	میانگین مربعات زنده مانی	منابع تغییرات	df	میانگین مربعات زنده مانی	منابع تغییرات	df	میانگین مربعات زنده مانی
محیط ایزولاسیون	۱	۰/۰۱۸^{ns}	محیط کشت	٦	/۰۳^{ns}	محیط کشت	۳	۰/۲۵**
خطای آزمایشی	٤	۰/۰٤۵	خطای آزمایشی	۱٤	۰/۰٦	خطای آزمایشی	٦	۰/۰۰۳



شکل ۲) الف) رنگ آمیزی میکروسپور ایزوله شده در مرحله انتهای تک هسته ای با DAPI ب) ساختار چند سلولی منتج از میکروسپور رنگ آمیزی شده با DAPI ج) جنین به دست آمده از میکروسپورهای ایزوله شده

شکل ۳) اثر تنش دمایی بر زنده مانی میکروسپور در ژنوتیپ Apollo

منابع:

۱) عنایتی شریعت پناهی، م و امامی میبدی، د. ۱۳۸۸. میکروسپور: سلولی هاپلوئید با کاربردهای متنوع در ژنتیک و اصلاح نباتات. ژنتیک نوین. شماره ۳. صفحه ۱۶-۵.

2) Amaury, M., Fernandez, A., Nakazaki, T., Yamagata, H., Tanisaka, T. 1997. Production of doubled-haploid plants from *Lilium longiflorum* Thunb. anther culture. Plant Scientia. 123: 179-187.

3) Bouvier, L., Guerif, P., Djulbic, M., Durel, C. E., Chevreau, E., Lespinasse, Y. 2002. Chromosome doubling of pear haploid plants and homozygosity assessment using isozyme and microsatellite markers. Euphytica. 123: 255-262.

4) Hofer M (2004) In vitro androgenesis in apple—improvement of the induction phase. Plant Cell Rep. 22:365–370.

5) Touraev, A., Heberle-Bors, E. 2001. The microspore: a haploid multipurpose cell. Adv Bot Res. 35:53-109.

Investigation the effects of temperature and starvation stresses on microspore embryogenesis in two tetraploid roses (*Rosa hybrida*)

Maryam Dehestani Ardakani[1,2], Mehran E. Shariatpanahi[1], Mohsen Kafi[2], Maryam Jafarkhani Kermani[1], Mahnaz Oroojloo[1]

Department of Tissue Culture and Gene Transformation, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran,

Mahdasht Road, P.O. Box 31535-1897, Karaj, Iran 2) Department of Horticultural Science & Landscape Architecture, Faculty of Agricultural Science & Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, 31587, Iran

Abstract

Microspore culture is one of the most commonly used methods to produce doubled haploid plants. In this research work, isolated microspore culture was studied in order to induce embryogenesis in roses (*Rosa hybrida*) cultivars i.e. HAP1 and Amarosa. Important factors affecting viability of isolated microspores and formation of multi-cellular structures including

isolation media (AB, B), AT3 induction medium with different carbohydrate sources (sucrose, maltose and glucose) and amino-acid source (lactalbumin hydrolysate) were investigated. Different stresses including carbon & nitrogen starvation, temperature treatment (heat and cold) alone or in combination with each other for various times were evaluated on the induction of sporophytic divisions. The most responsive developmental stage of microspores (late uni-cellular) was determined using DAPI staining. The least infection of microspore cultures was observed when microspores sterilized with sodium hypochlorite (%3.5) for 10 minutes. Two isolation media did not show significant difference. Among induction media, in cv. Amarosa, the highest viability of microspores was observed in AT3 induction medium supplemented by glucose. However, induction media in cultivar HAP1 didn't show significant difference. Starvation treatment for 3 days at 4°C could induce embryogenesis in cv. Amarosa. This is the first repot of rose microspore embryogenesis.
Key word: Rose, Microspore, Embryogenesis, Stress, Doubled haploid