بررسی تاثیر پنج نوع محیط کشت و مقادیر متفاوت مالتوز در القای هاپلوئیدی در رقم ماریچی سفید خالص لیسیانتوس *Eustoma grandiflorum* 'Mariachi Pure White' از طریق کشت میکروسپور

محمد مهدی فخرائی (۱)، مصطفی عرب (۲)، مهران عنایتی شریعت پناهی (۳)، محمود لطفی (۲)، شیوا عزیزی نیا (۲)، فاطمه ظل انوار (٤)

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح گیاهان باغبانی دانشگاه تهران ۲- عضو هیئت علمی گروه باغبانی دانشگاه تهران ۳- عضو هیئت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ٤- دانشجو سابق زیست شناسی عمومی دانشگاه شیراز

گل لیسیانتوس *Eustoma grandiflorum* از خانواده Gentianaceae و از اهمیت بالایی در بازارهای جهانی برخوردار است. در این پژوهش برای اولین بار در دنیا، کشت میکروسپور گل لیسیانتوس انجام شد. تولید گیاهان هاپلوئید به منظور اصلاح نباتات و مطالعات مربوط به آن در بسیاری از گیاهان زراعی و باغی همواره مورد استفاده قرار می گیرد. اهمیت استفاده از گیاهان هاپلوئید و لاین های هموزایگوس در برنامه های اصلاح نژاد از مدت ها پیش بر دانشمندان مسلم گردیده است. در این پژوهش اثر متقابل پنج نوع محیط کشت مایع NLN، B_5، NN، MS و NLN ½ با سه غلظت ۱۲۰ mg/L و ۹۰،٦۰ مالتوز (به عنوان منبع کربوهیدرات) در القای هاپلوئیدی لیسیانتوس از طریق کشت میکروسپور، بررسی شد. **در تیمارهای** محیط NLN ½ با ۹۰ mg/L مالتوز و محیط MS با ٦۰ mg/L مالتوز فقط میکروسپورها متورم تشکیل شد؛ اما در تیمار محیط NLN با ۱۲۰ mg/L مالتوز علاوه بر میکروسپورهای متورم، سوسپانسور ایجاد شد. ساختار چند سلولی در تیمارهای محیط B_5 با ٦۰ mg/L مالتوز و محیط NLN ½ با ۱۲۰ mg/L مالتوز مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: گل لیسیانتوس، هاپلوئیدی، کشت میکروسپور، محیط کشت مایع، مالتوز

مقدمه:

استفاده از گل های شاخه بریده در جهان صنعتی و ماشین زده امروزی یکی از راه های بسیار متداول فرار از زندگی ماشینی و پناه بردن به طبیعت و آوردن عناصر زیبا از طبیعت به محیط زندگی می باشد (جانی قربانی، ۱۳۸۳). گل لیسیانتوس *Eustoma grandiflorum* از خانواده Gentianaceae، در بیشتر نقاط دنیا کشت می شود و از اهمیت بالایی در بازارهای جهانی برخوردار است (Reid ۲۰۰۱؛ Ichimura و Korenaga ۱۹۹۸). لیسیانتوس محصول نسبتا جدیدی است که به سرعت در رده ده گل برتر از گل های شاخه بریده در دنیا قرار گرفته است (Harbaugh 2007). هاپلوئید را می توان سازواره ای تلقی نمود که به اسپوروفیت شباهت دارد؛ با این تفاوت که ژنوم آن در حد گامت تقلیل یافته است (ناصری تفتی و همکاران ۱۳۸۰). تولید گیاهان هاپلوئید به منظور اصلاح نباتات و مطالعات مربوط به آن در بسیاری از گیاهان زراعی و باغی همواره مورد استفاده قرار می گیرد (ناصریان خیابانی و همکاران ۱۳۷۹). اهمیت استفاده از گیاهان هاپلوئید و لاین های هموزایگوس در برنامه های اصلاح نژاد از مدت ها پیش بر دانشمندان مسلم گردیده است (کهریزی و همکاران ۱۳۷۹؛ عبدالهی و همکاران ۱۳۸۲؛ Shariatpanahi و همکاران ۲۰۰٦).

در این پژوهش برای اولین بار در دنیا، کشت میکروسپور گل لیسیانتوس انجام شد و به نتایج امیدوار کننده ای در زمینه‌ی رسیدن به القای آندورژنز در گل لیسیانتوس (که تنها گل با ارزش شاخه بریده ای است که با بذر تکثیر می‌گردد) دست یافتیم. همچنین در این پژوهش هاپلوئیدی در گیاهان باغبانی و مخصوصا گل ها برای اولین بار در ایران با روش کشت میکروسپور به عنوان مناسب ترین و پر عملکردترین روش موجود، که به عنوان جایگزینی برای سایر روش های اصلاحی سنتی در دنیا شناخته شده است، انجام شد. (لازم به ذکر است که تا به حال آندروژنز تنها از طریق کشت بساک در گیاهان باغی فقط در گل اطلسی، گل رز، توت فرنگی، انگور و گوجه فرنگی در ایران صورت گرفته است، که اکثر این موارد نتایج کاملا موفقیت آمیزی را در پی نداشته است.)

مواد و روش‌ها:

رقم مورد استفاده در این پژوهش رقم پرطرفدار سفید از سری ماریچی **'Mariachi Pure White'** بود، که از گلخانه ای در شهرستان پاکدشت تهیه شد. آزمون های سیتولوژیکی به منظور تشخیص بهترین مرحله ی تکامل دانه گرده (میکروسپوروژنز) و بهترین رابطه مرفولوژیکی با این مرحله در آزمایشگاه سیتوژنتیک و اصلاح گیاهان باغبانی گروه باغبانی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران انجام گرفت. با انجام آزمایشی بهترین مرحله تکامل دانه گرده برای کشت میکروسپور در گل لیسیانتوس مرحله تک هسته ای شناخته شد و با آزمون های سیتولوژیکی اندازه غنچه برای رقم سفید ماریچی در مرحله تک هسته‌ای، ۲۵ mm تا ۳۵ mm تعیین گشت(**فخرائی و همکاران ۱۳۸۹**). آزمایش های مربوط به کشت میکروسپور گل لیسیانتوس در آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران انجام شد. ضد عفونی و گندزدایی غنچه ها در زیر هود ایر لامینار فلو در داخل فالکون ۵۰ میلی لیتری حاوی ml ٤۰-۳۰ هیپوکلریت سدیم ۳/۵ درصد با تکان دادن انجام گرفت و پس از آن سه مرتبه با آب مقطر شستشو شد. گندزدایی وسایل و ظروف حاوی آب مقطر و محیط استخراج با دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۲ بار در اتوکلاو انجام گردید؛ اما با توجه به حساس بودن بعضی ویتامین ها و اسید های آمینه به گرمای اتوکلاو، محیط با فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرونی گندزدایی شد.

به منظور استخراج و جداسازی میکروسپورها از بساک (باتوجه به نتایج یافته های قبلیمان)، محیط B_5-13 با ۱۳ در صد ساکارز و با pH=٦ مورد استفاده قرار گرفت. پس از جدا سازی بساک ها از غنچه ها با پنس در شرایط گندزدایی شده، به کمک مگنتی که توسط هیتر استیرر درون گلسفایر می‌گردید، میکروسپورها از بساک ها، ایزوله و جدا شدند. درون هر گلسفایر ۲۵ تا ۳۰ بساک قرار می‌گرفت. سوسپانسیون حاصل را در شرایط کاملا گندزدایی شده، از الک آزمایشگاهی ۵۸ µm عبور داده؛ سپس هر ml ۳۰ از آن را در یک فالکون ۵۰ ml ریخته و فالکون ها را در سانتریفیوژ قرار دادیم. به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱٤۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. پس از سانترفیوژ روشناور (مایع زرد رنگ روی رسوب ته فالکون) را توسط سنپلر با سر سنپلر گندزدایی شده برداشته و پس از اضافه کردن مجدد محیط استخراج یک بار دیگر با همان دور و زمان سانترفیوژ کردیم. این مرتبه روشناور را که روشن‌تر از مرتبه قبل بود، را بر داشتیم.

این پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی، با فاکتورهای پنج سطح نوع محیط کشت و سه سطح غلظت مالتوز انجام شد. محیط‌های کشت مقابل به عنوان محیط کشت مایع استفاده شد: محیط **NLN** (Ochatt و همکاران ۲۰۰۹؛ Zhang و همکاران ۲۰۰۸؛ Ashihara و همکاران ۲۰۰۸؛ Mithila و Hall ۲۰۰۷؛ Segu-Simarro و همکاران ۲۰۰۳؛ Lemonnier-Le Penhuizic و همکارن ۲۰۰۱؛ Anandarajah و همکاران ۱۹۹۱) و محیط **B_5** (Zhang و همکاران ۲۰۰۸؛ Iqbal و Mollers ۲۰۰۳؛ Indrianto و همکاران ۱۹۹۹؛ Iqbal و همکاران ۱۹۹۵؛ Chuong و Beversdorf **۱۹۸۵**؛ Dietert و همکاران ۱۹۸۲) و محیط **NN** (Nehlin و همکاران ۱۹۹٦؛ Nehlin و همکاران ۱۹۹۵؛ Chuong و Beversdorf ۱۹۸۵) **و محیط MS** (Supena و همکاران ۲۰۰٦؛ Pulido و همکاران ۲۰۰۵؛ Borderies و همکاران ۲۰۰٤؛ Wojnarowiez و همکاران ۲۰۰۲؛van den Bulk **و همکاران ۱۹۹٤**؛ Hoekstra **و همکاران ۱۹۹۲**؛ Datta **و همکاران ۱۹۹۰**؛ Datta **و Wenzel** ۱۹۸۷؛ Dietert و همکاران ۱۹۸۲؛ Bajaj ۱۹۷٤) **و محیط ½ NLN** (Wang و همکاران ۲۰۰۹).

مالتوز به عنوان منبع کربوهیدرات، در سه غلظت ٦۰ gr/l (Kim و همکاران ۲۰۰۸؛ Supena و همکاران ۲۰۰٦؛ Guo و Pulli a-۲۰۰۰؛ Guo و Pulli b-۲۰۰۰؛Nägeli و همکاران ۱۹۹۹؛ Davies و Morton ۱۹۹۸؛ Xie و همکاران ۱۹۹۵) و ۹۰ gr/l (Kim و همکاران ۲۰۰۸؛ Zheng و همکاران ۲۰۰۱؛ Guo و Pulli b-۲۰۰۰؛ Nägeli و همکاران ۱۹۹۹؛

Raina و Irfan ۱۹۹۸؛ Davies و Morton ۱۹۹۸؛ Mejza و همکاران ۱۹۹۳) و gr/l **۱۲۰** (Kim و همکاران ۲۰۰۸؛ Guo و Pulli b-۲۰۰۰؛ Nägeli و همکاران ۱۹۹۹) مورد استفاده قرار گرفت.

در ادامه ml ٥-٤ محیط مایع به رسوب میکروسپور ته فالکون اضافه کرده و چند بار به هم می زنیم تا سوسپانسیون کاملا یکنواخت گردد. محیط های کشت همگی با pH=٥/٨ تنظیم شده و پس از گندزدایی در دمای ٤˚C خنک شدند؛ سپس با توجه به تیمارهای مورد نظر، در هر پتری شش سانتی، ml ٦ محیط مایع ریخته شد. پس از آن µl ۲۰۰ از سوسپانسیون حاوی میکروسپور به پتری ها اضافه و هر پتری را با دو دور پارافیلم درزگیری کردیم. پس از اعمال پیش تیمارهای مناسب، پتری ها در دمای ۲٥°C و شرایط تاریکی انکوبه شدند. تحول و تغییرات میکروسپورها، یک ماه پس از کشت با میکروسکوپ اینورت موجود در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی مشاهده گردد.

نتایج و بحث:

القای هاپلوئیدی از طریق آندروژنز نیاز به تغییر مسیر گامتوفیتیکی به اسپروفیتیکی دارد، که ابتدا میکروسپورها متورم می شوند و برخی اوقات سوسپانسور تولید می کنند؛ سپس با تقسیم سلولی، ساختار چند سلولی (مالتی سلولار) ایجاد کرده و در نهایت جنین های هاپلوئید از این ساختار چند سلولی تشکیل می شود و پس از انتقال به محیط بازایی مناسب تبدیل به گیاهچه هاپلوئید می‌شوند.

در تیمارهای محیط NLN ½ با mg/l ۹۰ مالتوز و محیط MS با mg/l ٦۰ مالتوز، فقط میکروسپورها متورم تشکیل شد (شکل ۱)؛ اما در تیمار محیط NLN با mg/l ۱۲۰ مالتوز علاوه بر میکروسپورهای متورم، سوسپانسور ایجاد شد (شکل ۲). ساختار چند سلولی در تیمارهای محیط B_5 با mg/l ٦۰ مالتوز و محیط NLN ½ با mg/l ۱۲۰ مالتوز مشاهده گردید (شکل ۳).

ب الف

شکل ۱) میکروسپور متورم در – الف) **تیمار** محیط NLN ½ با ۹۰ mg/l مالتوز و ب) **تیمار** محیط MS با ٦۰ mg/l مالتوز

ب الف

شکل ۲) الف – میکروسپور متورم و ب – سوسپانسور در تیمار محیط NLN با ۱۲۰ mg/l مالتوز

ب الف

شکل ۳) ساختار چند سلولی در – الف) تیمار محیط B_5 با ٦۰ mg/l مالتوز و ب) تیمار محیط NLN ½ با ۱۲۰ mg/l مالتوز

مشاهده ساختار چند سلولی در کشت میکروسپور این گل با ارزش، برای اولین بار در دنیا، نتیجه ای امیدوار کنند برای ادامه تحقیقات در این زمینه را فراهم آورده است و همچنین می تواند به عنوان گامی موثری در بومی سازی این فناوری نوین در اصلاح و تولید بذر سایر محصولات باغی تلقی شود.

منابع:

عبدالهی، م. ر.، معینی، ا.، حدادی، پ.، جلالی جواران، م. ۱۳۸۲. رویان زایی از کشت جدایه های میکروسپوری در ارقام مختلف کلزا (*Brassica napus* L.). پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی. ٦۰: ٤۸-۵۲.

محمد مهدی فخرائی، مصطفی عرب، مهران عنایتی شریعت پناهی، محمود لطفی، شیوا عزیزی نیا، مهدی یونسی حمزه‌خانلو. ۱۳۸۹. بررسی مراحل تکامل دانه گرده (میکروسپوروژنز) در چند رقم گل لیسیانتوس *Eustoma grandiflorum* با استوکارمن. دومین کنگره ملی تخصصی زیست شناسی محققان سراسر کشور. ایران.

ناصری تفتی، م.، ناصریان خیابانی، ب.، ودادی، س.، رحیمی، م.، رحمانی، ا. ۱۳۸۰. بررسی چند ژنوتیپ با روش کشت بساک. نشریه علمی سازمان انرژی اتمی ایران. ۲٤: ۵۷-٦۷.

ناصریان خیابانی، ب.، مجد، ف.، رحیمی. م.، ولیزاده، م.، کاظمی، ح. ١٣٧٩. بررسی تاثیر زادمون، محیط کشت و تیمار سرد بر کشت بساک لاین های موتاسیون زای گندم. نشریه علمی سازمان انرژی اتمی ایران. ٢٢: ٥٦-٦٤.

E. D. J. Supena, W. Muswita, S. Suharsono, J.B.M. Custers. 2006. Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (Capsicum annuum L.) cultivars. Scientia Horticulturae. 107:226–232.

L. Nehlin, C. Mo11ers, S. Stymne, K. Glimelius. 1996. Fatty acid composition in microspore-derived secondaryembryos of *Brassica napus* L. Plant Science. 120:205-213.

M. E. Shariatpanahi, U. Bal, E. Heberle-Bors, A. Touraev. 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. Physiologia Plantarum. 127:519–534.

M. Kim, I.-C. Jang, J.-A. Kim, E.-J. Park, M. Yoon, Y. Lee. 2008. Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (Capsicum annuum L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Rep. 27:425–434.

S. Ochatt, C. Pech, R. Grewal, C. Conreux, M. Lulsdorf, L. Jacas. 2009. Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (Fabaceae). Journal of Plant Physiology. 166:1314-1328.

T. Wang, H. Li, J. Zhang, B. Ouyang, Y. Lu, Z. Ye. 2009. Initiation and development of microspore embryogenesis in recalcitrant purple flowering stalk (*Brassica campestris* ssp. *Chinensis* var. *purpurea* Hort.) genotypes. Scientia Horticulturae. 121:419-424.

W. Zhang, Q. Fu, X. Dai, M. Bao. 2008. The culture of isolated microspores of ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) and the importance of genotype to embryo regeneration. Scientia Horticulturae. 117:69-72.

Survey efficacy of five kind of medium and different quantities of maltose in induction haploidy in a lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) 'Mariachi Pure White' type

Mohammad Mehdi Fakhraei[1], Mostafa Arab [2], Mehran E. Shariatpanahi[3],
Mahmoud Lotfi[2], Shiva Azizinia[2], fatemeh zelanvar[4]
1 - Msc student of Horticultural Breeding, University of Tehran
2 - Faculty Member at Tehran University Department of Horticulture
3 - Agricultural Biotechnology Institute Faculty Member
4 – student of Biology General at Shiraz University

Abstract

Eustoma grandiflorum lisianthus flower from Gentianaceae family have a high value in world Has. In this Research Competition for the first time in world lisianthus flower microspore culture. Ever use manufacture haploid plants purpose for regeneration of plants and studies about that in many plants Farming and garden's. Significance of use haploid plants and homozygous lines in Regeneration breeding programs Undoubted to scientists long terms ago. Survey Interplay of five kind of liquid medium such as NLN, B5, NN, MS, 1/2NLN by three Density such as 60, 90 and 120 mg/l maltose (such as carbohydrate source) in induction lisianthus haploid from the road of microspore culture. In androgenesis of ½ NLN with 90 mg/l maltose and MS with 60 mg/l maltose only turgid microspore formed; but in treatment NLN with 120mg/l maltose in addition to Turgid microspores, Created suspensor. Saw Multi cellular structure in androgenesis of B5 culture with 6omg/l maltose and ½ NLN with 120mg/l maltose.

Keywords: Lisianthus flower, Haploid, Microspore culture, Maltose, Liquid medium