تاثیر تنش pH بالا و 2,4-D با غلظت بالا به عنوان القا کننده تنش در آندروژنز گل لیسیانتوس *Eustoma grandiflorum*

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

لیسیانتوس *Eustoma grandiflorum* در باغبانی به عنوان یک گل تزیینی گلدانی، فضای آزاد و شاخه بریده مطرح است. در این پژوهش برای اولین بار در دنیا، کشت میکروسپور گل لیسیانتوس انجام شد. روش های متعددی جهت تولید گیاهان هاپلوئید وجود دارد که یکی از روش ها آندروژنز می باشد. آندروژنز سریع ترین روش ممکن برای رسیدن به هموزیگوسیتی است. تنش به عنوان یک عامل جرقه ای، در تمایز و جنین زایی میکروسپور لازم و ضروری است. از تنش هایی که جدیدا در القای آندروژنز به کار گرفته شده می توان به pH بالای محیط و القا کننده های شیمیایی مانند 2,4-D اشاره کرد. به منظور القا کننده تنش شیمیایی اثر 2,4-D با غلظت های mg/L ٤٥ و ۳۵، ۲۵، ۱۵ بررسی شد. در آزمایشی دیگر از سه مقدار بالای pH، یعنی ٦/٥ و ۷ و ۷/٥ (به عنوان دیگر عامل محرک و تنش زا در القای آندروژنز) استفاده شد. بهترین تیمار 2,4-D جهت القای آندروژنز، غلظت mg/L ۳۵ بود؛ که باعث ایجاد بیشترین ساختار چند سلولی شد. ۷ و pH=٦/٥ باعث شروع تقسیم سلولی میکروسپورها و ایجاد ساختار چند سلولی شد.

کلمات کلیدی: گل لیسیانتوس؛ آندروژنز؛ کشت میکروسپور؛ تنش؛ 2,4-D؛ pH

مقدمه:

لیسیانتوس *Eustoma grandiflorum* از خانواده Gentianaceae، که در باغبانی به عنوان یک گل تزیینی گلدانی، فضای آزاد و شاخه بریده در بیشتر نقاط دنیا کشت می شود؛ موطن اصلی آن مناطق مرکزی و جنوب آمریکا (دشت های نبراسکا، کلرادو و تگزاس) و مکزیک است، اما بیشتر در ژاپن توسعه پیدا کرده است و از اهمیت بالایی در بازارهای جهانی برخوردار است (Reid ۲۰۰۱؛ Ichimura و Korenaga ۱۹۹۸). روش های متعددی جهت تولید گیاهان هاپلوئید و به دنبال آن گیاهان هاپلوئید مضاعف وجود دارد که یکی از روش ها آندروژنز می باشد، که به دو روش کشت بساک و میکروسپور انجام می شود (عبدالهی و همکاران ۱۳۸۲). آندروژنز سریع ترین روش ممکن برای رسیدن به هموزیگوسیتی است، که موجب آسان شدن تحقیقات اصلاحی و ژنتیکی می گردد (ناصریان خیابانی و همکاران ١٣٨٤). کشت میکروسپور یکی از تکنیک های موثر و مطمئن برای تولید تعداد زیادی از گیاهان هموزایگوس به شمار می رود. در این روش بازیافت تعداد زیادی از گیاهان هاپلویئد به علت دارا بودن تعداد زیادی میکروسپور روشی است که اخیرا به علت مزایای آن بر کشت بساک، مورد توجه قرار گرفته است (اصلانی و همکاران ١٣٨٤). تنش به عنوان یک عامل جرقه‌ای، در تمایر و جنین زایی میکروسپور لازم و ضروری است. (عنایتی شریعت پناهی و امامی میبدی ۱۳۸۸؛ Shariatpanahi و همکاران ۲۰۰٦). انواع پیش تیمارهای متداول تنش‌زای به کاربرده شده در آندروژنز عبارت است از: پیش تیمارهای سرما، گرما، گرسنگی (ازت و منبع کربوهیدرات)، اسمولیت ها (جاذب آب) و پرتودهی گرده با دز پایین پرتوهای یونساز مثل گاما می باشد. (ناصریان خیابانی و همکاران ١٣٨٤). از تنش هایی که جدیدا در القای آندروژنز به کار گرفته شده می‌توان به pH بالای محیط و القا کننده های شیمیایی مانند 2,4-D اشاره کرد (عنایتی شریعت پناهی و امامی میبدی ۱۳۸۸؛ 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 زمینه ی رسیدن به القای آندروژنز در گل لیسیانتوس (که تنها گل با ارزش شاخه بریده ای است که با بذر تکثیر می گردد) 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:

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش از گلخانه ای در شهرستان پاکدشت تهیه گردید. در این پژوهش از رقم ماریچی سفید **'Mariachi Pure White'** استفاده شد (علت انتخاب این رقم، نتایج آزمایش های انجام شده بود، که این رقم را به عنوان یک رقم پاسخگو به آندروژنز شناخته بودیم و همچنین این رقم بیشترین سطح زیر کشت و فروش را در بین ارقام موجود لیسیانتوس به خود اختصاص داده است). 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، mm ٢٥ تا mm ٣٥ تعیین گشت(**فخرائی و همکاران ١٣٨٩**). 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 ٥٠ میلی لیتری حاوی ml ٤٠-٣٠ هیپوکلریت سدیم ٣/٥ 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 $121^{\circ}C$ و فشار ١/٢ 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 ٠/٢ میکرونی گندزدایی شد.

به منظور استخراج و جداسازی میکروسپورها از بساک (باتوجه به نتایج یافته های قبلیمان)، محیط B_5-13 با ١٣ 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 ٢٥ تا ٣٠ بساک قرار می‌گرفت. سوسپانسیون حاصل را در شرایط کاملا گندزدایی شده، از الک آزمایشگاهی ٥٨ mμ عبور داده؛ سپس هر ml ٣٠ از آن را در یک فالکون ml ٥٠ ریخته و فالکون ها را در سانتریفیوژ قرار دادیم. به مدت ٥ دقیقه با دور rpm ١٤٠٠ 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.

به منظور القا کننده تنش شیمیایی از 2,4-D با غلظت های mg/l ٤٥ و mg/l ٤٥ و ٣٥، ٢٥، ١٥ استفاده شد (**Shariatpanahi و همکاران ٢٠١٠**؛ **Emamifar و همکاران ٢٠٠٨**؛ حبیب زاده اردبیلی و همکاران ١٣٨٨). ابتدا رسوب میکروسپورها را داخل میکروتیوپ ها ریخته و غلظت های مورد نظر 2,4-D را به آن ها افزوده و به مدت ٣٠ دقیقه در دمای اتاق می گذاریم. سپس با همان زمان و دور اولیه (٥ دقیقه با دور rpm ١٤٠٠) سانتریفیوژ می کنیم. در ادامه محیط

مایع NLN با ١٣ در صد ساکارز و pH=٥/٨ به رسوب میکروسپور ته فالکون اضافه کرده و چند بار به هم می زنیم تا سوسپانسیون کاملا یکنواخت گردد.

در آزمایشی دیگر اثر سه مقدار بالای pH محیط مایع NLN-13 را در القای تنش به منظور آندروژنز در گل لیسیانتوس بررسی نمودیم. به این منظور از سه pH، ٦/٥ و ٧ و ٧/٥ استفاده شد (Barinova و همکاران ٢٠٠٤).

٦ ml از محیط مایع NLN-13 در پتری های ٦ cm ریخته و سپس تنظیم کننده های رشد را بر اساس تیمار ها به پتری‌ها اضافه نمودیم. پس از آن ٢٠٠ lμ 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 ٢٥°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:

در مسیر آندروژنز نیاز به تغییر مسیر گامتوفیتیکی به اسپروفیتیکی است، که در این فرآیند ابتدا میکروسپورها متورم می شوند و برخی اوقات سوسپانسور تولید می کنند؛ سپس با تقسیم سلولی ساختار چند سلولی (مالتی سلولار) ایجاد می گردد و در نهایت جنین های هاپلوئید از این ساختار چند سلولی پدید می آیند.

در تیمار تنش 2,4-D با غلظت ١٥ mg/l تغییری مشاهده نشد. در تیمار تنش 2,4-D با غلظت ٤٥ mg/l علاوه بر تورم میکروسپور، دیواره میکروسپور ترکید و سلول های میکروسپورهای شروع به خارج شدن از دیواره میکروسپور کردند (شکل ١). تیمارهای تنش 2,4-D با غلظت های ٣٥ mg/l و ٢٥ میکروسپورهای متورم شده و ساختار چند سلولی نمایان بود (شکل ٢). بهترین تیمار تنش 2,4-D جهت القای آندروژنز، غلظت ٣٥ mg/l بود؛ که باعث ایجاد بیشترین ساختار چند سلولی شد.

الف ب

شکل ١) الف- میکروسپور متورم و ب – میکروسپور ترکیدن دیواره میکروسپور، در تیمار تنش 2,4-D با غلظت ١٥ mg/l

الف ب

شکل ٢) میکروسپور متورم و ساختار چند سلولی در – الف) تیمار تنش 2,4-D با غلظت های ٢٥ mg/l و ب) تیمارتنش 2,4-D با غلظت‌های ٣٥ mg/l

نتیجه آزمایش دوم چنین بود که، pH=٧/٥ تغییراتی را در میکروسپورها ایجاد نکرد؛ اما ٧ و pH=٦/٥ باعث شروع تقسیم سلولی میکروسپورها و ایجاد ساختار چند سلولی شد (شکل ٣).

الف ب

شکل ٣) ساختار چند سلولی در – الف) تیمار تنش pH=٦/٥ و ب) تیمار تنش pH=٧

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:

اصلانی، ف.، مظفری، ج.، قنادها، م. ر.، خواجه احمد عطاری، ا. ع. ١٣٨٤. کشت میکروسپور و تولید گیاهان هاپلوئید در ارقام مختلف کلزا (*Brassica napus*). مجله علوم کشاورزی ایران. ٣٦(٢):٣٣١-٣٣٩.

حبیب زاده اردبیلی، ص.، عنایتی شریعت پناهی، م.، عروجلو، م.، امامی فر، م. ١٣٨٨. بهینه سازی جنین زایی میکروسپور و باززایی گیاهان هاپلویید در گیاه روغنی کلزا (*Brassica napus* L.). مجموعه مقالات ششمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. ایران. تهران (برج میلاد).

عبدالهی، م. ر.، معینی، ا.، حدادی، پ.، جلالی جواران، م. ١٣٨٢. رویان زایی از کشت جدایه های میکروسپوری در ارقام مختلف کلزا (*Brassica napus* L.). پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی. ٦٠: ٤٨-٥٢.

عنایتی شریعت پناهی، م.، امامی میبدی، د. ١٣٨٨. میکروسپور: سلولی هاپلوئید با کاربردهای متنوع در ژنتیک و اصلاح نباتات. مجله ژنتیک نوین. ٤(٣): ٥-١٦.

کهریزی، د.، معینی، ا.، بزرگی پور، ر. ١٣٧٩. اثر ژنوتیپ و منابع هیدارت کربن روی آندروژنز گندم هگزاپلوئید (*Ttiticum aestivum* L.). ١٦(١):٤١-٥١.

محمد مهدی فخرائی، مصطفی عرب، مهران عنایتی شریعت پناهی، محمود لطفی، شیوا عزیزی نیا، مهدی یونسی حمزه‌خانلو. ١٣٨٩. 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.

ناصریان خیابانی، ب.، مجد، ف.، ودادی، س.، رحمانی، ا.، موسوی شلمانی، م. ا. ١٣٨٤. بررسی تاثیر ژنوتیپ، پیش تیمار سرمایی، دزهای پایین اشعه گاما و هورمون 2,4-D در واکنش به کشت پرچم گندم. ٧(١):٨٦-٩٦.

Barinova, C. Clement, L. Martiny, F. Baillieu, H. Soukupova, E. Heberle-Bors, A. Touraev. 2004. Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. Planta .2004 219:141–146.

M .E. Shariatpanahi, M. Emamifar, S. Habibzadeh, R. Amiri, G. Nematzadeh, M. Oroojloo. 2010. Effect of 2,4-D as an inducer of embryogenesis in microspores of Brassica napus L. Proceeding of the International Conference "Green Plant Breeding Technologies", February 2-5, Vienna, Austria, oral presentation, p.17.

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. Emamifar, M .E. Shariatpanahi, S. Habibzadeh, GA. Nematzadeh, A. Oroojlo. 2008. Induction of microspore embryogenesis with 2,4-D instead of heat shock in Brassica napus L. cv. Topas. Proceeding of the second international student conference of biotechnology. University of Tehran.

Efficacy of high pH stress and 2,4-D with high density such as stress induction in androgenesis in Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*)

Mohammad Mehdi Fakhraei[1], Mostafa Arab [2], Mehran E. Shariatpanahi[3], Mahmoud Lotfi[2], Shiva Azizinia[2], fatemeh zelanvar[4]

Abstract

Eustoma grandiflorum lisianthus is a Ornamental flowers in pot flowers, open space and cut flowers. In this research Sequel culture of lisianthus flower microspore for the first time in world. Several methods are Available to Manufacture haploid plants that one of this methods is androgenesis. Androgenesis is the quickest Thinkable method for Receive to homozygocity. Stress such as sparkle Element, in differentiation and microspore embryogenesis is necessary and important. Newly stresses that use in androgen induct can Referral to high pH and chemical inductors like 2,4-D. Survey for chemical stress inductor 2,4-D Effect with 15, 25, 35 and 45mg/l density. In the other test use three high Value of pH , mean 6/5 , 7 and 7/5 (for the other motive element and stress in androgenesis induct). The best attendance was 2,4-D for induct androgener, 35 mg/l density; that was Author to creation maximum multiple structure. 6/5 and 7 pH Author to start microspore cell division and creation multicellular structure.

Keywords: Lisianthus flower, Androgenesis, Microspore culture, Stress, pH, 2,4-D