ارزیابی اثر غلظت های مختلف ساکارز و نوع محیط کشت در آندروژنز رقم ماریچی سفید خالص لیسیانتوس *Eustoma grandiflorum* 'Mariachi Pure White'

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* در بازارهای جهانی از اهمیت بالایی برخوردار است. در این پژوهش برای اولین بار در دنیا، کشت میکروسپور گل لیسیانتوس انجام شد. آندروژنز سریع ترین و مؤثرترین روش جهت تولید گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئیدها برای آزاد نمودن رقم جدید محسوب می شوند. هم اکنون بسیاری از شرکت های تجاری و موسسات دولتی در کشورهای مختلف به کار تولید استفاده از هاپلوئیدهای مضاعف شده مشغولند. علاقه به تولید گیاهان هاپلوئید، عموما به کاربرد آن ها بر می گردد. در این پژوهش برهمکنش چهار سطح ۱۷۰ mg/L و ۱۳۰، ۱۰۰، ٦٠ مالتوز (به عنوان منبع کربوهیدرات) با پنج نوع محیط کشت مایع NLN، B_5، NN، MS و NLN ½ در القای آندروژنز لیسیانتوس، مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین میزان تغییر میکروسپور ها مربوط به محیط NLN و NLN ½ بود. در تیمارهای محیط NLN با ٦٠ mg/L ساکارز و محیط NLN ½ با ۱۷۰ mg/L ساکارز ساختار چند سلولی به طور نمایان مشخص بود.

کلمات کلیدی: گل لیسیانتوس، آندروژنز، کشت میکروسپور، ساکارز، محیط کشت مایع

مقدمه:

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 را به خود اختصاص داده است، که علت این موضوع فرم و شکل زیبا، دوام و عمر پس از برداشت بالا و رنگ آبی منحصر به فرد آن است، که به طور گسترده به عنوان گل شاخه بریده، گلدانی و فضای آزاد استفاده می گردد. این گل زیبا علاوه بر رنگ آبی انواع رنگ ها و فرم ها را دارد (Harbaugh 2007). آندروژنز سریع ترین و موثرترین روش جهت تولید گیاهان هاپلوئید و دابلد هاپلوئیدها برای آزاد نمودن رقم جدید محسوب می شوند (کهریزی و همکاران ۱۳۷۹). هم اکنون بسیاری از شرکت های تجاری و موسسات دولتی در کشورهای مختلف به کار تولید استفاده از هاپلوئیدهای مضاعف شده مشغولند (حسینی سالکده و همکاران ۱۳۷٦). علاقه به تولید گیاهان هاپلوئید، عموما به کاربرد آن ها بر می گردد (وصال و همکاران ۱۳۸۱).

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 آندورژنز 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:

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 ۴۰-۳۰ 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 ml ۵۰ ریخته و فالکون ها را در سانتریفیوژ قرار دادیم. به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ١٤٠٠ سانتریفیوژ انجام شد. پس از سانتریفیوژ 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 سانتریفیوژ کردیم. این مرتبه روشناور را که روشن‌تر از مرتبه قبل بود، را بر داشتیم.

این پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی، با فاکتورهای چهار سطح غلظت ساکارز و پنج سطح نوع محیط کشت انجام شد. از ساکارز در چهار غلظت gr/l ٦٠ (Kim و همکاران ۲۰۰۸؛ Tang و همکاران ۲۰۰٦؛ Nägeli و همکاران ۱۹۹۹؛ Peng و Wolyn ۱۹۹۹؛ Peseitelli و همکاران ۱۹۹۰؛ Datta و همکاران ۱۹۸۷) و gr/l ۱۰۰ (Górecka و همکاران ۲۰۱۰؛ Ochatt و همکاران ۲۰۰۹؛ Kim و همکاران ۲۰۰۸؛ Ferrie و همکاران ۲۰۰۷؛ Kernan و Ferrie ۲۰۰٦؛ Lionneton و همکاران ۲۰۰۱؛ Ferrie و همکاران ۱۹۹۹؛ Baillie و همکاران ۱۹۹۲؛ Sato و همکاران ۱۹۸۹؛ Dietert و همکاران ۱۹۸۲؛ Bajaj ۱۹۷٤) و gr/l ۱۳۰ (Ochatt و همکاران ۲۰۰۹؛ Dai و همکاران ۲۰۰۸؛ Prem و همکاران ۲۰۰۸؛ Kim و همکاران ۲۰۰۸؛ Ferrie و همکاران ۲۰۰۷؛ Tang و همکاران ۲۰۰٦؛ Kernan و Ferrie ۲۰۰٦؛ Prem و همکاران ۲۰۰۵؛ Lionneton و همکاران ۲۰۰۱؛ Ferrie و همکاران ۱۹۹۹؛ Ilic´-Grubor و همکاران ۱۹۹۸؛ Baillie و همکاران ۱۹۹۲؛ Duijs و همکاران ۱۹۹۲؛ Wilen و همکاران؛ Peseitelli و همکاران ۱۹۹۰؛ Sato و همکاران ۱۹۸۹؛ Bajaj ۱۹۷٤) و gr/l ۱۷۰ (Ochatt و همکاران ۲۰۰۹؛ Bal و Abak ۲۰۰۵؛ Lionneton و همکاران ۲۰۰۱؛ Mollers و همکاران؛ Ferrie و همکاران ۱۹۹۹؛ Baillie و همکاران ۱۹۹۲؛ Dunwell و Thurling ۱۹۸۵) استفاده کردیم.

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 ١٩٨٥) **و محیط MS** (Supena و همکاران ٢٠٠٦؛ Pulido و همکاران ٢٠٠٥؛ Borderies و همکاران ٢٠٠٤؛ Wojnarowiez و همکاران ٢٠٠٢؛van den Bulk **و همکاران ١٩٩٤**؛ Hoekstra **و همکاران ١٩٩٢**؛ Datta **و همکاران ١٩٩٠**؛ Datta **و Wenzel** ١٩٨٧؛ Dietert و همکاران ١٩٨٢؛ Bajaj ١٩٧٤) **و محیط ½ NLN** (Wang و همکاران ٢٠٠٩).

در ادامه ٥-٤ ml 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، ٦ ml محیط مایع ریخته شد. پس از آن ٢٠٠ µl 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.

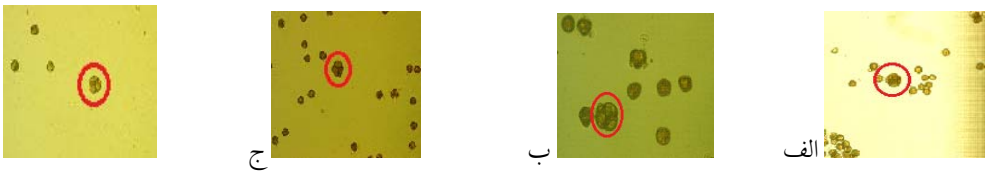
نتایج و بحث:

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.

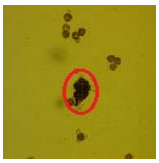
بیشترین میزان تغییر میکروسپورها مربوط به محیط ½ NLN و NLN بود. در تیمارهای محیط NLN با ١٧٠ mg/l ساکارز علاوه بر متورم شدن میکروسپور، دیواره میکروسپور ترکید و سلول های میکروسپورهای شروع به خارج شدن از دیواره میکروسپور کردند، همچنین میکروسپور شروع به تشکیل سوسپانسور کرد (شکل ١). شروع تقسیم سلولی و ساختار چند سلولی (مالتی سلولار) در تیمارهای محیط ½ NLN با ٦٠ mg/l ساکارز، محیط ½ NLN با ١٠٠ mg/l ساکارز، محیط NN با ١٠٠ mg/l ساکارز و محیط MS با ١٣٠ mg/l ساکارز مشاهده گردید (شکل ٢). در تیمارهای محیط NLN با ٦٠ mg/l ساکارز و محیط ½ NLN با ١٧٠ mg/l ساکارز ساختار چند سلولی به طور نمایان مشخص بود (شکل ٣).

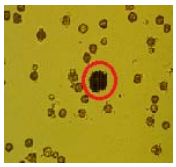
الف ب

شکل ١) الف- ترکیدن دیواره میکروسپور و ب – شروع به تشکیل سوسپانسور در تیمارهای محیط NLN با ١٧٠ mg/l ساکارز


الف ب ج د

شکل ٢) ساختار چند سلولی در تیمارهای – الف) محیط ½ NLN با ٦٠ mg/l ساکارز، ب) محیط ½ NLN با ١٠٠ mg/l ساکارز، ج) محیط NN با ١٠٠ mg/l ساکارز و ج) محیط MS با ١٣٠ mg/l ساکارز


الف


ب

شکل ۲) ساختار چند سلولی در تیمارهای – الف) محیط NLN با ٦٠ mg/l ساکارز ، ب) محیط NLN ½ با ۱۷۰ mg/l ساکارز

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:

حسینی سالکده، س. ق.، عبدمیشانی، س.، احمدیان، پ.، امیدی، م. ۱۳۷۷. تاثیر ژنوتیپ و پیش تیمار سرمایی در کشت بساک جو. مجله علوم کشاورزی ایران. ۲۹(۲):۳۸۹-۳۹٦.

کهریزی، د.، معینی، ا.، بزرگی پور، ر. ۱۳۷۹. 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. 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.

وصال، س. ر.، باقری، ع.، صفرنژاد، ع. ۱۳۸۱. بررسی امکان تولید گیاه هاپلوئید نخود (Cicer arietinum L.) به کشت این ویترو. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ٦(٢):٦٧-٧٦.

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.

K. Górecka, U. Kowalska, D. Krzyzanowska, W. Kiszczak. 2010. Obtaining carrot (*Daucus carota* L.) plants in isolated microspore cultures. J Appl Genet. 51(2):141–147.

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. Kim, I. Jang, J. Kim, E. 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.

Effect Evaluation of different density of sucrose and a kind of medium in androgenesis in 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]

Abstract

Lisianthus flower *Eustoma grandiflorum* have high importance in world agora. lisianthus flower microspore culture In this research for the first time in world. Androgenesis is the rapid and reliable method for haploid plants production and double haploids are for patented new type. Now many commercial societies and government Institutions in different countries employ output the double haploids. Interest to produce haploid plants, commonly used it is related. In this research survey repercussion of four level such as 60, 100, 130 and 170 mg/l maltose (such as carbohydrate source) with five kind of liquid medium NLN, B5, NN, MS and ½ NLN to induct lisianthus androgenesis. Maximum variable in microspores was proper to medium NLN and ½ NLN. In treatment NLN with 60 mg/l sucrose and ½ NLN with 170 mg/l sucrose multicellular structure was available appearance.

Keywords: Lisianthus flower, Androgenesis, Microspore culture, Sucrose, Liquid medium