ارزیابی اثر متقابل غلظت های متفاوت کینتین و 2,4-D در القای هاپلوئیدی گل لیسیانتوس *Eustoma grandiflorum* توسط 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 محصول نسبتا جدیدی است که به سرعت در رده ده گل برتر از گل های شاخه بریده در دنیا قرار گرفته است. در این پژوهش برای اولین بار در دنیا، کشت میکروسپور گل لیسیانتوس انجام شد. گیاهان هاپلوئید برای استفاده در برنامه به نژادی و تحقیقات ژنتیک بنیادی در گیاهان عالی از اهمیت زیادی برخوردار است. کشت میکروسپور یکی از تکنیک های مؤثر و مطمئن برای تولید تعداد زیادی از گیاهان هموزایگوس به شمار می رود؛ که اخیرا به علت مزایای آن بر کشت بساک، مورد توجه قرار گرفته است. در این پروژه تاثیر تنظیم کننده های رشد را در القای هاپلوئیدی لیسیانتوس از طریق کشت میکروسپور، مورد بررسی قرار دادیم. اثر متقابل سه سطح غلظت ۲ mg/L و ۱، ۰/۵ 2,4-D و سه میزان ۱ mg/L و ۰/۵، ۰/۱ کینتین مورد بررسی قرار گرفت. در تیمار ۰/۵ mg/L 2,4-D با ۰/۵ mg/L کینتین تقسیم سلولی صورت گرفت و ساختار چند سلولی (مالتی سلولار) دیده شد؛ همچنین در تیمار ۲ mg/L 2,4-D همراه ۱ mg/L کینتین میکروسپور ها شروع به تقسیم سلولی کردند.

کلمات کلیدی: گل لیسیانتوس، هاپلوئیدی، کشت میکروسپور، کینتین؛ 2,4-D؛ تنظیم کننده رشد گیاهی

مقدمه:

تولید گل های شاخه بریده یکی از رشته های صنعت گل و گیاهان زینتی است، که نقش مهمی در شکوفایی اقتصاد برخی از کشورهای جهان ایفا می کند. بر اساس بررسی های به عمل آمده ایران از لحاظ سطح زیر کشت مقام هفدهم جهان را داراست، ولی در بین کشورهای صادر کننده در ردیف صد و هفتم قرار دارد (رکنی ۱۳۸۳؛ صفدری و کاظمی تبار ١٣٨٦). 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). گیاهان هاپلوئید را که حاوی نیمی از مجموعه کروموزوم ها می باشند، می توان از طریق کشت بساک و میکروسپور که در وضعیت رسیدگی خاصی هستند به دست آورد (هنر نژاد ۱۳۷۱). گیاهان هاپلوئید برای استفاده در برنامه به نژادی و تحقیقات ژنتیک بنیادی در گیاهان عالی از اهمیت زیادی برخوردار است. 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. پتانسیل تولید گیاهان هاپلوئید در کشت میکروسپور بالا بوده و تولید سریع لاین های خالص از میکروسپورهای ایزوله، مهمترین ویژگی آن در برنامه های اصلاحی می باشد (اصلانی و همکاران ١٣٨٤).

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 ی دگرگشنی 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.

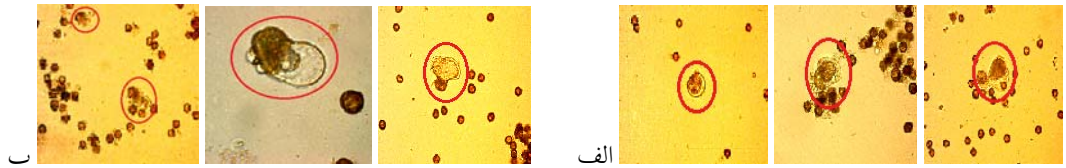
به منظور استخراج و جداسازی میکروسپورها از بساک (باتوجه به نتایج یافته های قبلیمان)، محیط B_5-13 با ١٣ در صد ساکارز و با pH=٦ مورد استفاده قرار گرفت. پس از جدا سازی بساک ها از غنچه ها با پنس در شرایط گندزدایی شده، به کمک مگنتی که توسط هیتر استیرر درون گلسفایر می‌گردید، میکروسپورها از بساک ها، ایزوله و جدا شدند. درون هر گلسفایر ٢٥ تا ٣٠ بساک قرار می‌گرفت. سوسپانسیون حاصل را در شرایط کاملا گندزدایی شده، از الک آزمایشگاهی μm ٥٨ 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. در ادامه ml ٥-٤ 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. ml ٦ از محیط مایع NLN-13 در پتری های cm ٦ ریخته و سپس تنظیم کننده های رشد را بر اساس تیمار ها به پتری‌ها اضافه نمودیم.

در این پروژه تاثیر تنظیم کننده های رشد را در القای هاپلوئیدی لیسیانتوس از طریق کشت میکروسپور مورد بررسی قرار دادیم. این پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی، با فاکتورهای سه سطح غلظت از دو نوع تنظیم کننده رشد انجام گرفت. از سه سطح 2,4-D با میزان های mg/l ٠/٥ (Milewska-Pawliczuk ١٩٨٧)، mg/l ١ (Guo و Pulli ٢٠٠٠؛ Cistu´e و همکاران ٢٠٠٦)، mg/l ٢ (Mofidabadi و همکاران ٢٠٠١) و سه سطح کینتین با مقادیر mg/l ٠/١ (Guo و Pulli ٢٠٠٠)، mg/l ٠/٥ (Oleszczuk و همکاران ٢٠٠٤؛ Mofidabadi و همکاران ٢٠٠١)، mg/l ١ (Cistu´e و همکاران ٢٠٠٦) استفاده شد.

پس از آن ۲۰۰ 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 ۲۵°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:

تمام تیمارهای هرمونی 2,4-D و کینتین به مرحله متورم شده میکروسپور (که اولین مرحله تغییر مسیر گامتوفیتیکی به اسپروفیتیکی است) رسیدند (شکل ۱-الف)؛ اما تیمار ۱ mg/l 2,4-D با ۰/۵ mg/l کینتین در این مرحله متوقف شد. در همه‌ی تیمارهای به جز تیمار ۱ mg/l 2,4-D با ۰/۵ mg/l کینتین، علاوه بر تورم میکروسپور، دیواره میکروسپور ترکید و سلول های میکروسپورهای شروع به خارج شدن از دیواره میکروسپور کردند (شکل ۱-ب). تنها در تیمار 2,4-D ۰/۵ mg/l با ۰/۵ mg/l کینتین تقسیم سلولی صورت گرفت و و ساختار چند سلولی (مالتی سلولار) دیده شد؛ همچنین در تیمار mg/l ۲ 2,4-D همراه ۱ mg/l کینتین میکروسپور ها شروع به تقسیم سلولی کردند (شکل ۲).



شکل ۱) الف- میکروسپور متورم و ب - ترکیدن دیواره میکروسپور، در چند تیمار به کارگرفته شده

شکل ۳) الف) ساختار چند سلولی در 2,4-D ۰/۵ mg/l با ۰/۵ mg/l کینتین و ب) شروع به تقسیم سلولی در تیمار mg/l ۲ 2,4-D همراه ۱ mg/l کینتین

در فرآیند القای هاپلوئیدی از طریق کشت میکروسپور نیاز به تغییر مسیر گامتوفیتیکی به اسپروفیتیکی است، که در این فرآیند ابتدا میکروسپورها متورم می شوند؛ 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 و پس از انتقال به محیط بازایی مناسب تبدیل به گیاهچه هاپلوئید می شوند.

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.

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.

هنر نژاد، ر. ۱۳۷۲. اثر محیط کشت مختلف بر جنین زایی و تشکیل گیاهان هاپلویئد از میکروسپورهای جو (*Hordeum vulgare* L.). مجله علوم کشاورزی ایران. ٢٤(٣و٤):١٦-٢٨.

A. J. MOFIDABADI, A. JORABCHI, S. SHAHRZAD, F. MAHMODI. 2001. New Genotypes Development of *Populus euphratica* OLIV. Using Gametoclonal Variation. Silvae Genetica. 50:275–279.

Guo, Y.-D., Pulli, S. 2000. An efficient androgenic embryogenesis and plant regeneration method through isolated microspore culture in Timothy (Phleum pratense L.). Plant Cell Reports**.** 19:761-767.

Ichimura, K.; Korenaga. M. 1998; Improement of vase life and petal color expression in several cultioars of cut Eustoma flowers using sucrose with 8-hydroxyquinoline sulfate. Bull. Natl. Res. Veg. Ornam. Plants & Tea. Japan. 13:31-39.

L. Cistu´e, M. Soriano, A. M. Castillo, M. P. Vall´es, J. M. Sanz, B. Ech´avarri. 2006. Production of doubled haploids in durum wheat (Triticum turgidum L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Rep. 25: 257–264.

Milewska-Pawliczuk, E. 1987. Induction of androgenesis in vitro in various genetic forms of Secale cereal. Biologia Plantarum. 29:295-298.

Reid, M. S. 2001. Cut flowers and Greens. Department of Environmental Horticulture, University of California, Davis, CA.

S. Oleszczuk, S. Sowa, J. Zimny. 2004. Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (× Triticosecale Wittmack) cv. Bogo. Plant Cell Rep. 22:885–893.

Assessment of interplay different density of kinetin and 2,4-D in haploid induction in Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) via microspore culture

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

Abstract

lisianthus flower of *Eustoma grandiflorum* from the family of Gentianaceae and partly new product that quickly set on ten over class from the pot flower in the world. Cultured microspore of lisianthus flower in this research for the first time in a world. For use in program haploid plants on the Strain and basic genetic Researches in high plants have much importance. Cultured microspore is one of the Impressive and ensure techniques for Production too many of homozygous plants.; that recently regarded because of that benefit scale to anther. In this project survey effect of growth regulator inlisianthus haploid induction from the way of microspore culture. Survey interplay of three level on density (0/5, 1 and 2 mg/l) 2, 4-D and three Scales 0/1, 0/5 and 1 kinetin. In attendance 0/5 mg/l 2,4-D with 0/5 mg/l kinetin accomplish cell division and saw multi cellular structure; also in Attendance 2, 4-D 2mg/l with 1mg/l kinetin microspores start to cell division.

Keywords: Lisianthus flower, Haploid, Microspore culture, Kinetin, 2,4-D, Plant growth regulators