ارزیابی بهترین روش رنگ آمیزی هسته میکروسپور گل لیسیانتوس *Eustoma grandiflorum* (با رنگ فلورسنتی DAPI و سه معرف استوکارمن، استواورسئین و فوشین)

محمد مهدی فخرائی (١)، مصطفی عرب (٢)، مهران عنایتی شریعت پناهی (٣)، محمود لطفی (٢)، شیوا عزیزی نیا (٢)، فاطمه ظل انوار (٤)

١- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح گیاهان باغبانی دانشگاه تهران ٢- عضو هیئت علمی گروه باغبانی دانشگاه تهران ٣- عضو هیئت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ٤- دانشجو سابق زیست شناسی عمومی دانشگاه شیراز

گل لیسیانتوس *Eustoma grandiflorum* در بیشتر نقاط دنیا کشت می شود 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 از رنگ** فلورسنتی DAPI برای رنگ آمیزی هسته میکروسپور لیسیانتوس استفاده شد. پس از مراحل رنگ آمیزی با رنگ فلورسنتی DAPI، به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٤°C و ٣٧°C (به عنوان دو تیمار معمول) میکروسپورها درون DAPI قرار گرفتند. در آزمایش دیگری، از سه معرف استوکارمن ٢ ٪، استواورسئین و فوشین، هر کدام به مدت ٥، ١٥، ٣٠، ٦٠، ١٢٠، ١٨٠، ٢١٠ و ٢٤٠ دقیقه استفاده شد. با DAPI پاسخ مناسبی دریافت نشد، که می تواند به علت سخت و ضخیم بودن دیواره میکروسپور باشد. در رنگ آمیزی با استوکارمن ٢ ٪ پس از ١٨٠ دقیقه، هسته به طور مشخص قابل رؤیت بود. استواورسئین معرف مناسبی جهت رنگ آمیزی هسته میکروسپور شناخته نشد. با معرف فوشین بعد از ٦٠ دقیقه، هسته به صورت لکه های تیره رنگ درون میکروسپور دیده شد. در نهایت بهترین روش رنگ آمیزی برای هسته میکروسپورهای لیسیانتوس، استفاده از معرف استوکارمن ٢ ٪ به مدت ١٨٠ و ٢١٠ دقیقه تعیین شد.

کلمات کلیدی: گل لیسیانتوس؛ هسته میکروسپور؛ رنگ فلورسنتی DAPI؛ استوکارمن؛ استواورسئین؛ فوشین

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 ٢٠٠١؛ Ichimura و Korenaga ١٩٩٨). 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). در سال ٢٠٠٧ برای نخستین بار میکروسپروژنز و مگاسپوروژنز در رقم زرد لیسیانتوس توسط معرف هماتوکسیلین بررسی شد (Xinyu و همکاران ٢٠٠٧). فخرائی و همکاران میکروسپروژنز چهار رقم لیسیانتوس با معرف استوکارمن ٢ ٪ تعیین کردند (فخرائی و همکاران ١٣٨٩).

در این پژوهش برای اولین بار در دنیا از رنگ فلورسنتی DAPI (4’,6-diamidino-2-phenylindole) برای رنگ آمیزی هسته میکروسپور و دانه گرده لیسیانتوس استفاده شد؛ و همچنین سه معرف استوکارمن، استواورسئین و فوشین (در طول زمان های متفاوت) استفاده گردید تا به روش مناسبی برای رنگ آمیزی هسته میکروسپور گل شاخه بریده لیسیانتوس برسیم.

مواد و روش‌ها:

رنگ آمیزی با رنگ فلورسنتی DAPI

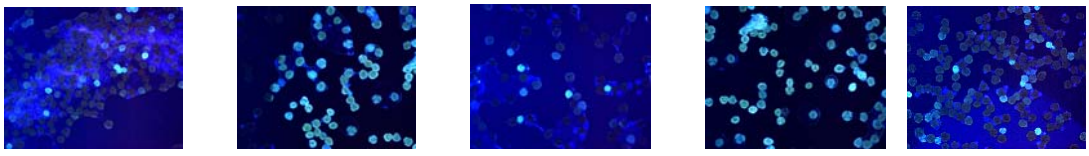
برای رنگ آمیزی DAPI، ابتدا ml ١ از محیط کشت حاوی میکروسپورهای از قبل کشت شده را داخل تیوب های ml ١/٥ پخش کردیم و در ٢٠٠٠ دور در دقیقه (٣١٤g) به مدت ٣ دقیقه سانتریفیوژ شد؛ سپس محیط رویی هر تیوپ (روشناور) را برداشته و روی رسوب ته نشین شده به مقدار ml ١ محلول اسید استیک (١): الکل اتانول (٣) اضافه شد. پس از گذشتن ٢٠ دقیقه مجدد با همان سرعت و زمان سانتریفیوژ شده بعد از برداشت روشناور، روی رسوب باقی مانده به مقدار ml ١ اتانول ٥٠ ٪ اضافه کرده و بلافاصله سانتریفیوژ انجام شد و بعد از برداشتن اتانول بالای رسوب میکروسپور، روی رسوب باقی مانده DAPI ٢٠ µl و lµ ١٠ گلایسرول ٧٨ ٪ به منظور ته نشین کرده میکروسپورها اضافه شد و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٤°C و ٣٧° C به عنوان دو تیمار معمول قرار داده شد و پس از ٢٤ ساعت سانتریفیوژ کرده و رسوب باقی مانده را روی لام گذاشته و بعد از قرار دادن لامل در زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند.

رنگ آمیزی با استوکارمن، استواورسئین و فوشین

در آزمایش دیگری پس از سانتریفیوژ محیط کشت حاوی میکروسپور، رسوب میکروسپورهای باقی با سه معرف ویژه رنگ آمیزی مواد وراثتی (اسید نوکلئیک): استوکارمن ٢ ٪، استواورسئین و فوشین، هر کدام به طول زمان های ٥، ١٥، ٣٠، ٦٠، ١٢٠، ١٨٠، ٢١٠ و ٢٤٠ دقیقه رنگ آمیزی گردید و سپس با میکروسکوپ نوری مشاهده شد.

نتایج و بحث:

معمول ترین نوع رنگ آمیزی هسته میکروسپور و دانه گرده، DAPI و استوکارمن می باشد و دقیق ترین آن DAPI است. به همین منظور پس از کشت میکروسپور لیسیانتوس، میکروسپورها را در رنگ فلورسنتی DAPI به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٤°C نگهداری شد و پس از با میکروسکوپ فلورسنت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی مشاهده شد؛ که با این تیمار پاسخ مناسبی دریافت نشد و هسته میکروسپور رنگ نگرفت. در تیمار دیگر به جای دمای ٤°C از دمای ٣٧°C به مدت ٢٤ ساعت استفاده گردید؛ که این بار همان طور که در (شکل ١) مشاهده می شود، میکروسپورها به طور پراکنده رنگ گرفتند و در این تیمار نیز هسته میکروسپورها به طور مشخص به خود رنگ نگرفتند. پدیده رنگ نگرفتن هسته میکروسپور با تیمارهای متداول رنگ آمیزی با DAPI را می توان به سخت و ضخیم بودن دیواره میکروسپور ربط دهیم؛ که در برخی گونه های گیاهان زینتی و دارویی با دیواره سخت چنین پدیده ای سابقه داشته است.



شکل ١) رنگ آمیزی میکروسپورهای لیسیانتوس با رنگ فلورسنتی DAPI

در آزمایشی دیگر به منظور دستیابی، بهترین روش جایگزین رنگ آمیزی با DAPI، از سه معرف استوکارمن ٢ ٪، استواورسئین و فوشین برای رنگ آمیزی هسته میکروسپور استفاده شد. هر یک از معرف ها با تیمارهای زمانی، به مدت ٥، ١٥، ٣٠، ٦٠، ١٢٠، ١٨٠، ٢١٠ و ٢٤٠ دقیقه به کار رفتند.

در رنگ آمیزی با استوکارمن ٢ ٪ پس از ١٨٠ دقیقه هسته به طور مشخص قابل رؤیت بود و رنگ آمیزی شد اما در مدت ٥، ١٥، ٣٠، ٦٠ و ١٢٠ دقیقه هسته رنگ نگرفت. در صورتی که رنگ آمیزی هسته میکروسپور گیاهان زراعی با استوکارمن ٢ ٪ در زمان های کمتر از ١٥ دقیقه صورت می پذیرد؛ به عنوان مثال هسته میکروسپور کلزا در حدود ٥ دقیقه با استوکارمن ٢ ٪ به طور کامل رنگ می گیرد و دیر رنگ گرفتن هسته میکروسپور لیسیانتوس نشانه ای دیگر برای ضخیم بودن دیواره ی

میکروسپور گل لیسیانتوس است. در (شکل ۲) هسته های رنگ آمیزی شده با استوکارمن ۲ ٪ به مدت ۲۱۰ دقیقه در مراحل تتراد و در (شکل ۳) هسته های رنگ آمیزی شده با استوکارمن ۲ ٪ به مدت ۲۱۰ دقیقه در مرحله تک هسته ای را مشاهده می‌کند.

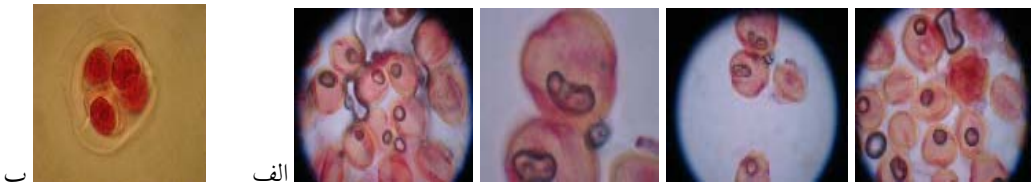
شکل ۲) رنگ آمیزی هسته میکروسپورهای لیسیانتوس مراحل تتراد لیسیانتوس با استوکارمن ۲ ٪ به مدت ۲۱۰ دقیقه

شکل ۳) رنگ آمیزی هسته میکروسپورهای تک هسته‌ای لیسیانتوس با استوکارمن ۲ ٪ به مدت ۲۱۰ دقیقه

استواورسئین معرف مناسبی جهت رنگ آمیزی هسته میکروسپور نبود و در تمام زمان ها تنها دیواره میکروسپور را رنگ آمیزی نمود و هسته را نمایان نکرد (شکل ٤).

شکل ٤) رنگ آمیزی میکروسپورهای لیسیانتوس با استواورسئین

دیواره میکروسپورهای رنگ شده با معرف فوشین در تمام تیمارهای زمانی قرمز رنگ شدند و در ٦٠ دقیقه هسته به صورت لکه‌های تیره رنگ درون مکروسپور به وضوح نمایان شد (شکل ٥)؛ اما در زمان های پس از ٦٠ دقیقه (١٢٠، ١٨٠، ٢١٠ و ٢٤٠ دقیقه) دیواره رنگ قرمز تیره به خود گرفت و مانع از نمایان شدن هسته گشت (شکل ٦).



شکل ٥) رنگ آمیزی هسته میکروسپورهای (الف) تک هسته‌ای و (ب) تتراد، لیسیانتوس با فوشین به مدت ٦٠ دقیقه

شکل ٦) رنگ آمیزی میکروسپورهای لیسیانتوس با فوشین به مدت ١٢٠ دقیقه

در نهایت بهترین روش رنگ آمیزی برای هسته میکروسپورهای لیسیانتوس، استفاده از معرف استوکارمن ۲ ٪ به مدت ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه تعیین شد.

منابع:

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.

(B. K, Harbaugh. LISIANTHUS) .Neil O, Anderson. 2007. Flower Breeding and Genetics. Springer. 824p.

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.

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

Xinyu, Y.; Wang, Q.; Li, Y. 2007. Microsporogenesis, Megasporogenesis, and the Development of Male and Female Gametophytes in Eustoma grandiflorum. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 76 (3): 244–249.

Assessment of best method of dyeing microspore of lisianthus flower (*Eustoma grandiflorum*) (with DAPI fluorescent dye and three detector acetocarmine, aceto-orcein and fuchsin)

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

Abstract

in a most local of world cultured *Eustoma grandiflorum* lisianthus's flower and Partly new Produce that Quickly hold in 10 Prevalent flowers class from Amputate flower in world. in this Research for the first time in world use DAPI fluorescent dye for lisianthus microspore nucleus dyeing. After the stages of dyeing with DAPI fluorescent dye, for 24 hour in 4 centigrade degree and 3 centigrade degree (such as two Common treatments) microspors set in DAPI. In the other test ,use three detector, 2% acetocarmine, aceto-orcein and fuchsin, each one for 5,15,30,60,120,180,210and 240 minute. Receipt no Suitable response with DAPI, that can because of microspore wall strong and thick-set. in dyeing whith 2% acetocarmine, after 180 minutes, nucleus Were visible. Aceto-orcein is not suitable indicator for microspore nucleus dyeing. Whit fuchsin indicator, after 60 minutes, nucleus saw such as dark spots in the microspore. At the end the best method of dyeing for lisianthus nucleus microspores was use 2% acetocarmine indicator for 180 and 210 min .

Keywords: Lisianthus flower, Microspore nucleus, DAPI fluorescent dye, Acetocarmine, Aceto-orcein, Fuchsin