بررسی عوامل موثر بر روی زنده مانی و القاء جنین زایی در کشت میکروسپور رز(*Rosa hybrid*)

مهناز عروجلو[۱و۲] ، مهران عنایتی شریعت پناهی [*و۲]، مریم دهستانی[۲و۳] ، محمد رضا بی همتا[۳] ، مریم جعفرخانی کرمانی [۲]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج ۲- بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن-پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، ۳-دانشجوی دکتری دانشگاه تهران ٤- پردیس کشاورزی کرج - دانشگاه تهران

mehran.shariatpanahi@abrii.ac.ir

چکیده

میکروسپور در حال حاضر در مرکز توجه اصلاح نباتات مدرن و علوم پایه قرار دارد. میکروسپورهای جدا شده می توانند در صورت تنش، از مسیر گامتوفیتی خارج شده و در مسیر اسپوروفیتی قرار گیرند و پس از انجام تقسیمات مکرر تولید جنین نمایند. بهترین مرحله(مرحله میانی تا انتهایی تک سلولی) غنچه ها با رنگ آمیزی DAPI تعیین گردید. عوامل موثر بر درصد زنده مانی ,و القای جنین زایی میکروسپورهای جدا شده رز شامل شناسایی مرحله تکوین میکروسپور، تیمار زمانی ضدعفونی با هیپوکلرید سدیم(۵، ۱۰، ۱۵ دقیقه)، محیط جداسازی (B، AB_2، NLN) ، روش جداسازی(استریر، له کردن)، محیط کشت القای جنین زایی (AT3، AT3(1)، NLN-13, $A_2$60) در رقم HAV1 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد میکروسپورهای ضدعفونی شده با کلرید سدیم ۵/۳٪ به مدت ۱۵ دقیقه و جدا شده در محیط جدا سازی B با روش استریر با مگنت و کشت شده در محیطAT3(1). بیشترین درصد زنده مانی را به خود اختصاص داد و باعث القای مسیر جنین زایی میکروسپور ها .و تشکیل ساختارهای چند سلولی گردید.

واژگان کلیدی: میکروسپور، القای جنین زایی ،DAPI ، رز

مقدمه

تولید دی هاپلوئیدها از ارقام تتراپلوئید تجاری رز(*Rosa Hybrida*)، امکان تلاقی با گونه های وحشی دیپلوئید را فراهم می نمایـد. همچنین تولید هاپلوئیدها از دی هاپلوئیدها و ایجاد دابلد هاپلوئیدها که از آنها به عنوان لاین های اینبرد در جهت تولید هیبریـد هـای F1 استفاده می شود، در صورت وجود هتروزیس امکان پذیر می باشد. در میان روشهای مختلف تولید گیاهان هاپلوئید، روش جنـین زایی میکروسپور از جدید ترین روش ها می باشد که در برنامه های مهندسی ژنتیک نیزکاربرد فراوانی دارد (عنایتی شریعت پنـاهی و امامی میبدی، ۱۳۸۸). روشکشت میکروسپورهای جداشـده بـا موفقیـت در سـیب (*Malus domestica*) ازخـانواده *Rosaceae* انجام شده (Hofer et al., 1999, 2004) اما در رز کشت بساک و میکروسپور موفقیت آمیز نبـوده اسـت. اخیـرا در زمینـه کشـت میکروسپورهای جدا شده رز متاسفانه هیچ گزارشی موجود نیست اما با توجه به مزایای متعدد کشت میکروسپور هـای جـدا شـده در مقایسه با کشت بساک ازقبیل جنین زایی مستقیم بدون فاز کالوس، اطمینان از منشا میکروسپوری گیاهان باززایی شده و امکان بررسی مستقیم اثر تنش و سایر فاکتورهای موثر بر جنین زایی میکروسپور بدون مزاحمت بافت اسپوروفیتی دیواره بساک بهتر است بـر روی

روش کشت میکروسپور، تحقیقات گسترده متمرکز گردد. در این تحقیق درصدد هستیم به روش القاء مسیرجنین زایی میکروسپور در رز دست یابیم.

مواد و روش ها

رقم تتراپلوئید رز HAV1، که در فیتوترون،گلخانه و باغ رز پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی نگهداری می شود، مورد استفاده قرار گرفت.گیاهان در فیتوترون با دمای ۲۰ درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی ۷۰ درصد و روشنایی ۱۶ هزار لوکس پرورش داده شدند.اولین مرحله مهم در جنین زایی میکروسپور، تعیین مرحله مناسب غنچه می باشد. غنچه هایی که اکثریت میکروسپورهایشان در مرحله انتهایی تک سلولی بودند، با استفاده از رنگ آمیزی DAPI شناسایی گردیدند. برای بهینه سازی کشت میکروسپور، غنچه ها در تیمار های زمانی مختلف ضدعفونی با هیپوکلرید سدیم ۵/۳٪(۵، ۱۰، ۱۵ دقیقه)، قرار گرفتند. میکروسپورهای غنچه های ضدعفونی شده با روشهای مختلف(استریر، له کردن) در محیط های متنوع (B، AB، NLN) جدا سازی شدند. سوسپانسیون میکروسپورها ، از فیلتر با قطر منافذ ۵۸ µm عبور داده شدند. مایع فیلتر شده دو بار به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰ rpm در دمای ٤°C سانتریفوژ گردید. رسوب ته نشین شده پس از رنگ آمیزی با FDA جهت تعیین درصد زنده مانی میکروسپورها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت استفاده شدند، نهایتاً در محیط های مختلف القایی (AT3، AT3(1)، $A_2$60 ,NLN-13) کشت گردیدند و در دمای ۲۵°□ در شرایط تاریکی نگهداری شدند. آزمایش ها در قالب طرح آزمایشی کاملا تصادفی در ۳ تکرار انجام شد و تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

پس از جداسازی میکروسپورها و رنگ آمیزی با DAP1 بهترین مرحله (مرحله انتهایی تک سلولی که مناسب کشت میکروسپور می باشد و در این مرحله میکروسپور ها توانایی تغییر مسیر از گامتوفیتی به سمت اسپورفیتی را دارد) تعیین شد. مرحله انتهایی تک سلولی مرحله ای است که در آن هسته سلول بزرگ بوده و کم کم در کناره دیواره سلولی به دلیل بزرگ بودن واکوئل قرار می گیرد. در گیاهان مختلف، مرحله انتهایی تک سلولی به کشت میکروسپور پاسخ خوبی نشان داده و با اندازه غنچه ارتباط مستقیم دارد. نتایج این تحقیق با نتایج Tabaiizadeh و Khosh-Khui (۱۹۸۱) که از کشت بساک رز به دست آمده بود و آنها نیز مرحله انتهایی تک سلولی را به عنوان بهترین مرحله انتخاب کرده بودند، نیز مطابقت داشت.

نتایج نشان داد ضدعفونی سطحی میکروسپورها با هیپوکلرید سدیم ۵/۳٪ به مدت ۱۵ دقیقه و جدا سازی میکروسپور با روش استریر بیشترین زنده مانی را داشت . مطابق جدول ۱، مشاهده می شود که بین ترکیبات مختلف محیط شستشو از نظر تاثیر بر روی در صد زنده مانی تفاوت معنی داری در سطح ۱٪ وجود دارد و همچنین اثر محیط کشت بر روی تشکیل تعداد ساختارهای چند سلولی در سطح ۱٪ اختلاف معنی دار داشت. شکل ۱ نشان می دهد که بیشترین درصد زنده مانی میکروسپور مربوط به محیط B و کمترین

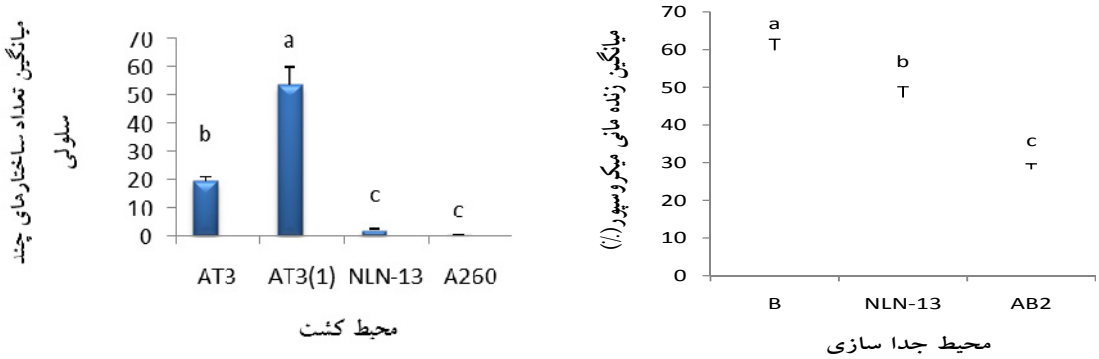
درصد زنده مانی مربوط به محیط AB و AT3(1) بهترین محیط کشت می باشد و بین محیطهای جدا سازی و محیط های کشت اختلاف معنی دار در سطح ۵٪ وجود دارد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر محیط شستشو بر روی زنده مانی و اثر محیط کشت بر روی القاء جنین زایی میکروسپورهای رز

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط جداسازی	۲	۷/۷۶۱**
خطا	۶	۹۵/۱۷

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط القایی	۳	۲۲/۱۸۳۹**
خطا	۸	۵/۴۱

** وجود اختلاف معنی دار در سطح ۱٪



شکل۱- مقایسه میانگین اثر محیط جدا سازی بر روی زنده مانی میکروسپور(سمت راست) و مقایسه میانگین اثر محیط کشت القایی بر روی القاء جنین زایی میکروسپورهای رز (سمت چپ)(حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون LSD می باشد)

در محیط های شستشو بیشترین زنده مانی در محیط B مشاهده شد که با نتایج احمدی در سال ۱۳۸۸ مطابقت دارد. محیط B برای اولین بار توسط تورائف و هبرل در سال ۱۹۹۹ برای جداسازی میکروسپور توتون به کار برده شد. استفاده از این محیط توسط هافر و همکاران در سال ۲۰۰۱ برای جداسازی میکروسپور سیب نیز بیشترین درصد زنده مانی را نشان داد. عامل مهم در محیط جداسازی B، وجود مانیتول در تنظیم فشار اسمزی محیط است که بسیار بر زنده مانی میکروسپورها نقش ایفاء می کنند.

نتیجه گیری کلی

میکروسپورهای کشت شده در محیط القایی AT3(1) تولید ساختارهای چند سلولی و پیش جنینی برای اولین بار در رز نموده اند. پیشنهاد می شود که ژنوتیپ های مختلف رز و تنش های شیمیایی متفاوت برای القاء جنین زایی میکروسپور استفاده گردد.

منابع

۱. احمدی، ت. (۱۳۸۸). مقایسه درون و برون شیشه ای صفات مورفولوژیکی و ترکیبات اسانس رز هگزاپلوئید با رقم والد تریپلوئید(*R. hybrid cv. Iceberg*)

۲. عنایتی شریعت پناهی ،م .امامی میبدی ،د.۱۳۸۸. میکروسپور :سلولی هاپلوئید با کاربردهای متنوع در ژنتیک و اصلاح نباتات ، مجله ژنتیک نوین،دوره چهارم، شماره ۳ صفحات ۱۶-۵ .

3. Touraev, A. and Heberle-Bors, E. (1999). Microspore embryogenesis and *in vitro* pollen maturation in tobacco. In: Hall R, ed. Plant cell culture protocols 111, Totowa, New Jersey: Humana Press, 281 291.
4. Tabaiizadeh, Z. and Khosh-Khui, M.(1981). Anther culture of Rose. Scientia Horticulturae, 15: 61-66.

study of factors affecting viability and induction of embryogenesis in isolated microspore culture 0f roses (*Rosa Hybrida*)

Mahnaz . Oroojloo[1,2] , Mehran E. Shariatpanahi[1,*] , Maryam . Dehestanie[2,3] , Mohammad Reza. Bihamta[4] and Maryam,J. Kermani[2]

1-Islamic Azad university, karaj Branch 2- Department of Tissue Culture and Gene Transformation, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran 3- student Ph.D Tehran University,Karaj Pardis Agriculture 4- Tehran University,Karaj Pardis Agriculture

E-mail: mehran.shariatpanahi@abrii.ac.ir

Abstract

The microspore is at the center of interest in modern plant breeding and basic sciences . Isolated microspores can be switched from the gametophytic pathway towards sporophytic development and embryo formation via stress treatments. The most responsive developmental stage of microspores (late unicellular) were determined via DAPI staining. The most important factors affecting viability and embryogenesis induction of isolated microspores including developmental stage of microspores, sterilization treatment by sodium hypochlorite (5,10,15 minute), isolation media(NLN, AB, B),isolation methods(pestle and magnet bar) and induction media(AT3(1) ،NLN-13, $A_2$60, AT3) were evaluated in cultivar HAV1. According to the results obtained, late unicellular stage , sodium hypochlorite for 15 minute sterilization, isolation medium B, magnet stirring, induction mediumAT3(1) were investigated as the most suitable factors for higher viability and embryogenesis induction percentages in isolated microspores leading to formation of multicellular structures and pro-embryos.

Key word: Microspore, Embryogenesis induction, DAPI, Roses