

افزایش زنده‌مانی میکروسپورهای رز (رقم آپولو) برای ایجاد گیاهان هاپلوئید

احمدی تکتم^۱، شریعت پناهی مهران^{۱*}، جعفرخانی کرمانی مریم^۱، مشایخی کامبیز^۲

۱. بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج وزارت جهاد کشاورزی

۲. دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

✉ *mehran.shariatpanahi@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۱۶، تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۴/۰۶/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۷/۱۹

چکیده

یکی از روش‌های به‌نژادی در تولید گیاهان هاپلوئید کشت میکروسپور می‌باشد. این تحقیق در جهت بهینه‌سازی فرایند تولید گیاهان هاپلوئید با استفاده از روش کشت میکروسپور در رز رقم آپولو (*Rosa hybrida* cv. Apollo) انجام شد. عوامل تأثیرگذار بر زنده‌مانی میکروسپورها از جمله روش‌های جداسازی میکروسپورها (انتهای پیستون سرنگ، آهن‌ربا و هم‌زن مغناطیسی)، محیط جداسازی (B، AB، NLN)، محیط کشت القایی (AT₃(I)، A2، NLN، AT₃(II) و AT₃(III)) مورد مطالعه قرار گرفتند. بهترین روش جداسازی توسط آهن‌ربا و هم‌زن مغناطیسی تشخیص داده شد. در میان محیط‌های جداسازی محیط جداسازی B (محیط فاقد مواد غذایی) بیشترین درصد زنده‌مانی میکروسپور را نشان داد. در میان محیط‌های کشت القایی محیط AT₃(I) با ۹۰ گرم در لیتر مالتوز بالاترین میزان زنده‌مانی را نشان داد. نتایج تحقیق حاضر بهترین روش جداسازی میکروسپورها و بهترین محیط کشت جداسازی و القایی را با حداکثر میزان زنده‌مانی میکروسپور را برای تحقیقات آینده در زمینه القای هاپلوئیدی در رز ارائه نمود.

کلمات کلیدی: رز، میکروسپور، هاپلوئیدی

مقدمه

شدن کروموزوم، که در تئوری یک کپی همسان از هرکروموزوم هاپلوئید ساخته می‌شود، ژن گیاه حاصله هموزیگوت خواهد شد. بنابراین گیاه هاپلوئید دو برابر شده کاملاً خالص ژنتیکی است (Baenziger et al. 1984). جنین هاپلوئید می‌تواند از یک سلول تخم (gynogenesis) یا از یک سلول گامتوفیتیک دیگر (apogamy) یا از یک گامت نر (androgenesis) به دست آید (Khush et al. 1996). هنگامی که تلاقی بین گونه‌های رز با عدم موفقیت

یکی از روش‌های به‌نژادی، کاهش سطح پلوئیدی است که شامل: ایجاد بافت‌ها یا گیاهان هاپلوئید (۱n) از والدین هتروزیگوت و دو برابر کردن کروموزوم‌ها در بافت‌ها یا گیاهان برای به دست آوردن گیاهان دیپلوئید (۲n) که به عنوان هاپلوئیدهای دو برابر شده شناخته شده‌اند، می‌باشد. در سطح هاپلوئیدی هر ژن منفرد است. بعد از دو برابر

تحقیق بررسی اولیه عوامل موثر بر القای مسیر جنین‌زایی در میکروسپوره‌های جدا شده رز می‌باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی

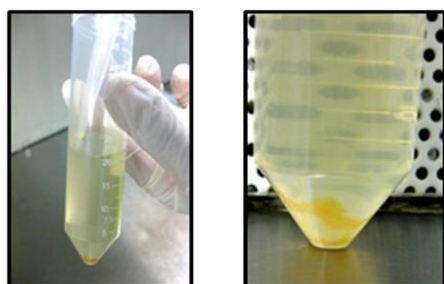
نمونه‌های رز رقم آپولو (Apollo) از کلکسیون ذخایر ژنتیکی رز پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) جمع‌آوری شد. بهترین مرحله برای کشت میکروسپور یا بساک گل رز زمانی است که تعدادی از کاسبرگ‌های غنچه باز شده و گلبرگ‌ها نمایان و در حال باز شدن بودند (شکل ۱-الف) و بساک‌ها کاملاً زرد و میکروسپورها در مرحله تک‌هسته‌ای میانی تا انتهایی هستند (راه پیمای ۱۳۸۵). برای تعیین دقیق‌تر مرحله تکامل میکروسپورها در مراحل مختلف نموی، میکروسپورها با استفاده از ۲۰ μl ماده DAPI رنگ‌آمیزی شدند. غنچه‌ها پس از برداشت با محلول هیپوکلریت سدیم ۳/۵ درصد در زیر لامینار ضدعفونی شدند. پس از ۱۵ دقیقه سه بار با آب استریل هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند (شکل ۱-ب).

جداسازی و کشت میکروسپورها

پس از ضدعفونی کردن، غنچه‌ها، کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها را جدا کرده (شکل ۱-پ) و بساک‌ها به منظور جداسازی میکروسپورها در درون بشر حاوی محیط شستشو (NLN-13، AB و B) قرار گرفتند و با دو روش، جداسازی انجام شد: الف) له کردن بساک با استفاده از پیستون انتهایی سرنگ: که در این روش بساک‌ها درون محیط شستشو با استفاده از انتهایی سرنگ له شدند (شکل ۱-ت). ب) روش جداسازی با آهن‌ربا و هم‌زن مغناطیسی: در این روش بساک‌ها و محیط شستشو را در یک شیشه ۵ میلی لیتری حاوی یک آهن‌ربای کوچک ریخته و شیشه به مدت ۴ دقیقه در روی هم‌زن مغناطیسی با ۵۰۰ دور قرار داده شد

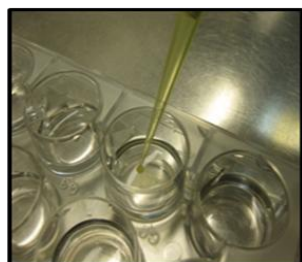
همراه شد، محققین بر آن شدند تا نسبت به تولید گیاه هاپلوئید از گیاه تتراپلوئید (در حالی که قادر به تولید گل و گرده باشد) اقدام نمایند و سپس از هاپلوئیدهای ایجاد شده که دی‌هاپلوئید می‌باشند، در تلاقی با ارقام وحشی دیپلوئید استفاده کنند و از گونه‌های دیپلوئید به ارقام تتراپلوئید ژن‌های مقاوم به بیماری‌های قارچی را انتقال دهند (Meynet et al. 1996). برای این منظور، بعد از انجام تلاقی بین گیاه دی‌هاپلوئید بدست آمده و رقم وحشی، با استفاده از روش تلاقی برگشتی، ژن مورد نظر از رقم دیپلوئید وحشی به رقم دی‌هاپلوئید انتقال داده می‌شود و بعد از آن با دو برابر کردن کروموزوم‌های گیاه دی‌هاپلوئید با استفاده از تیمار کلشی‌سین، ژن مورد نظر در رقم مورد نظر تثبیت می‌شود و گیاهان تتراپلوئید حاصل می‌شود. به علاوه این روش (ایجاد گیاه هاپلوئید و به دنبال آن ایجاد دابل هاپلوئید)، موجب کم کردن دوره به‌نژادی برای ایجاد لاین‌های هموزیگوت در گیاهان دگرگشن (مانند رز) که به عنوان والدین تلاقی در برنامه‌های بعدی استفاده می‌شوند، خواهد شد. ضمناً، گیاهان هاپلوئید مضاعف شده در نقشه‌یابی‌های ژنتیکی با استفاده از مارکر مولکولی، آنالیز QTL و در مطالعات سیتوژنتیکی، انتقال ژن و به‌نژادی از طریق موتاسیون استفاده می‌شوند (Mohan Jain et al. 1996). همچنین، با کاهش سطح پلوئیدی در یک گیاه اتوتتراپلوئید، می‌توان تأثیر سطوح مختلف پلوئیدی را بر روی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی رزها مطالعه نمود. به طور کلی در گیاهان از سه روش نرزاری، ماده‌زایی و حذف کروموزومی برای تولید گیاهان هاپلوئید استفاده می‌شود. تا کنون در رز فقط از روش ماده‌زایی (پارتنوژنز) استفاده شده است که کارایی تولید گیاهان هاپلوئید در آن کم است (Meynet et al. 1996)، در صورتی که بتوان از روش آندروژنز استفاده کرد، احتمال به دست آوردن گیاهان هاپلوئید و نرخ آن بسیار زیاد خواهد بود. هدف از این





ح

چ



خ

شکل ۱- مراحل ضدعفونی، جداسازی و کشت میکروسپور رز

محیط‌های کشت القایی در این تحقیق محیط‌های کشت گوناگونی آزمایش شدند. این محیط‌های کشت شامل NLN-13 (Lichter, 1982) با $\text{pH} = 5/8$ ، AT_3 (Indrianto *et al.* 1999) با $\text{pH} = 6/2$ و محیط پایه AT_3 (Touraev *et al.* 1996a) با سه منبع مختلف کربوهیدرات شامل $\text{AT}_3(\text{I})$ ۹۰ گرم در لیتر مالتوز، $\text{AT}_3(\text{II})$ ۱۸۰ گرم در لیتر مالتوز و $\text{AT}_3(\text{III})$ ۹۰ گرم در لیتر گلوکز و با $\text{pH} = 6/2$ می‌شدند. بعد از تهیه سوسپانسیون، میکروسپور در این سه محیط کشت شدند.

طرح آماری

تیمارها با استفاده از مقایسات آماری دارای تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی و یا فاکتوریل با پایه کاملاً تصادفی با حداقل سه تکرار مقایسه شدند. از نرم افزار SAS و MSTATC و مقایسه میانگین با آزمون LSD جهت آنالیز داده‌ها استفاده گردید.

نتایج و بحث

روش جداسازی و محیط شستشو

(شکل ۱- ث). بعد از جداسازی، میکروسپورها ابتدا با مش اندازه ۹۰ و سپس ۶۳ میکرومتری فیلتر شدند (شکل ۱- ج) و محلول زرد رنگ حاصل داخل تیوب‌های ۵۰ میلی لیتری ریخته شد و با سرعت 1500 rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای 4°C سانتریفیوژ (Beckman GS-6R USA) شدند (شکل ۱- چ). رسوب ته‌نشین شده با اضافه کردن محیط کشت رقیق شد (شکل ۱- ح). برای اعمال تنش‌های شیمیایی، از مالتی‌دیش استفاده شد که داخل هر خانه مالتی‌دیش ۲ میلی لیتر محیط کشت و $100 \mu\text{l}$ میکروسپورهای رقیق شده اضافه شد (شکل ۱- خ). پس از جداسازی میکروسپورها، به منظور بررسی تأثیر دو روش و سه محیط جداسازی بر روی زنده‌مانی میکروسپورها با استفاده از محلول FDA رنگ‌آمیزی و توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند.



ب



الف



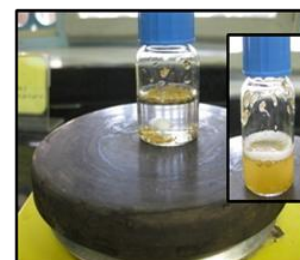
ت



پ

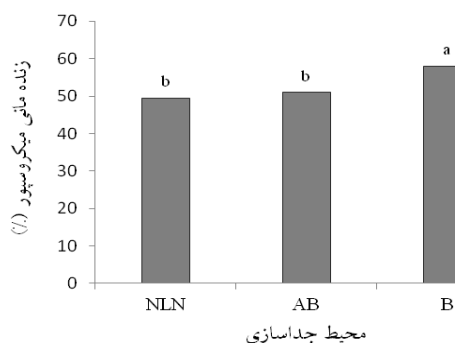


ج



ث

که بیشترین درصد زنده‌مانی در روش جداسازی با مخلوط‌کن به دست آمد. شکل (۳) نشان می‌دهد که بیشترین درصد زنده‌مانی میکروسیپور مربوط به محیط B و کمترین درصد زنده‌مانی مربوط به محیط NLN و AB می‌باشد و بین این دو اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. محیط B برای اولین بار توسط تورائف و هبرل در سال ۱۹۹۹ برای جداسازی میکروسیپور تنباکو به کار برده شد. همچنین هوفر در سال ۱۹۹۹ این محیط را برای جداسازی میکروسیپور سیب مورد استفاده قرار داد و بیشترین درصد زنده‌مانی و جنین‌زایی را به دست آورد.



شکل ۳- اثر محیط جداسازی بر درصد زنده‌مانی میکروسیپور رز حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون LSD می‌باشد.

محیط‌های کشت القایی

ارزیابی محیط‌های کشت القایی نشان داد که بین ترکیبات مختلف محیط کشت القایی از نظر تأثیر بر روی درصد جنین‌زایی دارد. شکل (۴) نشان می‌دهد که محیط کشت $AT_3(I)$ حاوی ۹۰ گرم در لیتر مالتوز بیشترین درصد زنده‌مانی میکروسیپور را به خود اختصاص داده است و زنده‌مانی تفاوت معنی‌داری وجود دارد. محیط کشت القایی یکی از فاکتورهای مؤثر در زنده‌مانی میکروسیپور و تغییر مسیر رشد میکروسیپور به سمت اسپروفیتی یا به عبارتی القاء محیط $AT_3(III)$ با ۹۰ گرم در لیتر گلوکز کمترین درصد زنده‌مانی را دارد. نوع و غلظت کربوهیدرات در محیط کشت نقش مهمی در کشت میکروسیپور ایفا می‌کند.

در بررسی روش جداسازی و محیط شستشو بین اثرات ساده تیمارها، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد، اما بین اثر متقابل روش جداسازی و محیط جداسازی اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت. در روش‌های جداسازی میکروسیپور شامل روش آهن‌ربا و هم‌زن مغناطیسی و روش انتهای سرنگ تفاوت معنی‌داری بین این دو روش وجود داشت. بیشترین درصد زنده‌مانی میکروسیپور مربوط به روش آهن‌ربا و هم‌زن مغناطیسی بود که شکل (۲) این تفاوت را به وضوح نشان می‌دهد. بهترین روش جداسازی، روشی است که کمترین آسیب را به میکروسیپور برساند.



شکل ۲- اثر روش جداسازی بر درصد زنده‌مانی میکروسیپور رز حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون LSD می‌باشد.

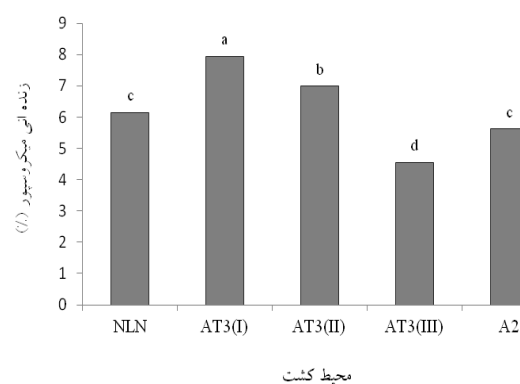
در بین دو روش جداسازی، روش آهن‌ربا و هم‌زن مغناطیسی صدمه کمتری به میکروسیپورها رساند. در سال ۱۹۹۹ هوفر و همکاران در یک بررسی روش جداسازی میکروسیپور با انتهای سرنگ و روش آهن‌ربا و هم‌زن مغناطیسی را در سیب مقایسه کردند. بر اساس نتایج این محققان، در روش جداسازی با آهن‌ربا و هم‌زن مغناطیسی ۶۰ تا ۸۰ درصد میکروسیپورها زنده بودند، در حالیکه با روش جداسازی با انتهای سرنگ درصد زنده‌مانی میکروسیپورها ۲۷٪ بود. وینگو و همکاران در سال ۲۰۰۲ چهار روش جداسازی مختلف شامل ورتکس، هم‌زن مغناطیسی، glass bar grinding و هم‌زن را بر درصد زنده‌مانی میکروسیپورهای گندم آزمایش کردند و نشان دادند

مقدار زیادی نشاسته از تکوین جنین جلوگیری می‌کند. در حالیکه مالتوز به کندی تجزیه شده و منجر به جنین‌زایی میکرواسپور می‌شود. در کشت میکرواسپور سیب، بیشترین درصد جنین‌زایی در محیط حاوی مالتوز و در محیط حاوی ساکارز کمترین درصد جنین‌زایی مشاهده شد (et al. 1999 Scott). میکرواسپورهای برخی گونه‌ها همچون جو (Scott et al. 1994) و گل میمون (Barinova et al. 2002) توانایی زنده ماندن در محیط حاوی ساکارز را ندارند و بلافاصله بعد از جداسازی و کشت در این محیط می‌میرند. در مطالعه حاضر نیز، زنده‌مانی میکرواسپورهای رز در محیط حاوی ساکارز کاهش یافت. در این بررسی سه غلظت مالتوز مورد آزمایش قرار گرفت که با توجه به نتایج بهترین غلظت ۹۰ گرم در لیتر یا ۲۵۰ میلی‌مولار مالتوز بود. در کشت میکرواسپور سیب نیز مناسب‌ترین غلظت مالتوز بین ۲۵۰ تا ۳۵۰ میلی‌مولار می‌باشد. بنا بر گزارشات به دست آمده، نوع و غلظت کربوهیدرات بستگی به گیاه و گونه دارد (Höfer et al. 1999). دهستانی و همکاران (۱۳۹۱) با بررسی محیط کشت القایی AT_3 به همراه سه منبع کربوهیدرات (مالتوز، ساکارز و گلوکز)، بالاترین میزان زنده‌مانی میکرواسپورها را در محیط AT_3 به همراه گلوکز در رقم *Amorosa* گزارش کردند. در حالیکه در مورد رقم *Apollo* تفاوت معنی‌داری در زنده‌مانی میکرواسپورها مشاهده نکردند.

دستورالعمل ترویجی

ایجاد گیاهان هاپلوئید روشی به‌نژادی برای تولید گیاهان هموزیگوت است که فرآیند به‌نژادی را کاهش می‌دهد. به این منظور، در تحقیق حاضر جهت بهینه‌سازی کشت میکرواسپور رز، عوامل مختلف موثر بر زنده‌مانی میکرواسپور بررسی شدند. موارد ذیل از جمله عواملی است که در این آزمایش تأثیر زیادی بر روی زنده‌مانی میکرواسپور داشت و

یکی از مهمترین ترکیبات محیط کشت، نوع کربوهیدرات می‌باشد. موفقیت نرزاری با فیزیولوژی قند و متابولیسم آن در میکرواسپور ارتباط دارد. پژوهش‌ها نشان داده است که مولکول قند به عنوان یک مولکول سیگنالی برای تنظیم ژنی که در القاء جنین‌زایی میکرواسپور دخالت دارد، عمل می‌کند. حضور نشاسته، شاخص استعداد و پتانسیل میکرواسپور برای نرزاری می‌باشد. مشخص شده است که نشاسته موجود در میکرواسپور نمی‌تواند وارد برنامه نرزاری شود (et al. Scott 1995).



شکل ۴- اثر محیط کشت القایی بر درصد زنده‌مانی میکرواسپور رز

حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ با آزمون LSD می‌باشد.

نتایج این آزمایش نشان داد که میکرواسپورهای کشت شده در محیط‌های NLN حاوی ساکارز و محیط $AT_3(III)$ حاوی گلوکز بیشتر به سمت نشاسته‌ای شدن رفتند و وارد مسیر گامتوفیتی شدند. در حالیکه میکرواسپورهای کشت شده در محیط‌های حاوی مالتوز بزرگتر شده و نشاسته‌ای نشدند. البته بعد از مدتی رشد آنها متوقف شد و علائمی از ورود به مسیر اسپروفیتی مشاهده نشد. مالتوز و ساکارز عمومی‌ترین قند مورد استفاده در محیط القاء برای کشت بساک و میکرواسپور گونه‌های مختلف می‌باشد. در گندمیان مالتوز مناسب‌ترین قند است، در حالیکه ساکارز، گلوکز و فروکتوز برای میکرواسپور سمی هستند. در جو مشخص شده است که ساکارز به سرعت متابولیزه شده و با تجمع

- توصیه می‌شود در ادامه تحقیقات مورد استفاده قرار گیرد:
- ۱ - جدا سازی میکروسپور با روش آهنربا و همزن مغناطیسی
- ۲ - استفاده از محیط کشت B جهت جداسازی میکروسپور
- ۳ - کشت میکروسپورهای جدا شده در محیط کشت AT_3 با ۹۰ گرم مالتوز

منابع

- امامی فر م (۱۳۸۸). بررسی عوامل مؤثر در جنین‌زایی و باززایی کلزا (*Brassica napus* L.) به روش کشت میکروسپور. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه مازندران.
- دهستانی اردکانی م، کافی م، عنایتی شریعت پناهی م، جعفرخانی کرمانی م، فتاحی مقدم م و غوجلو م (۱۳۹۱). بررسی اثر تنش‌های دمایی و گرسنگی بر جنین‌زایی میکروسپور در کشت میکروسپورهای جدا شده از دو رقم رز (*Rosa hybrida* L.) تتراپلوئید. مجله علمی ترویجی زیست فناوری گیاهان زراعی: ۲(۳): ۷۱-۸۱.
- راه پیما س (۱۳۸۵). بررسی کشت بساک در رز (رز هیبرید و رز مینیاتوری). پایان‌نامه کارشناسی ارشد به‌نژادی نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.

- Baenziger PS, Kudirke DT, Schaeffer GW, Lazar MD (1984). In: JP Gustafson (Ed) Genetic Manipulation in Plant Improvement. Plenum Press, New York. 385-414.
- Barinova L, Zhexembekova M, Barsova E, Lukyanov S, Heberle-Bors E, Touraev A (2002). Antirrhinum majus microspore maturation and transient transformation in vitro. J Experimental Bot. 53(371): 1119-1129.
- Höfer M, Touraev A, Heberle-Bors E (1999). Induction of embryogenesis from isolated apple microspores. Plant Cell Rep. 18: 1012-1017.
- Indrianto A, Heberle-Bors E, Touraev A (1999). Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. Plant Sci. 143 (1): 71-79.
- Khush GS, Virmani SS (1996). Haploids in plant breeding. In: Mohan Jain S, Sopory S K, Veilleux RE (eds) In vitro Haploid production in Higher plants Vol 1 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 11-33.
- Lichter R (1982). Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z Pflanzenphysiol. 105:427-434.
- Meynet J, Botton E, Eychene J, Aime F (1996). Optimization of a method for the haploidization of cultivated roses. Acta Hort. 424: 399-401.
- Mohan Jain S, Sopory SK, Veilleux RE (1996). In vitro Haploid Production in Higher Plants. Volume 1-4 Kluwer Academic publishers. pp453.
- Rodrigues LR, Forte BdeC, Oliveira JMS, Mariath JEA, Bodanese-Zanettini MH (2004). Effect of light conditions and 2,4-D concentration in soybean anther culture. Plant Grow Reg. 44: 125-131.
- Scott P, Lyne RL (1994). The effect of various carbohydrate sources upon the initiation of embryogenesis from barley microspores. Plant Cell Tiss Org Cult. 36: 129-133.
- Touraev A, Ilham A, Vicente O Heberle-Bors E (1996). Efficient microspore embryogenesis from tobacco microspores: an optimized system for molecular studies. Plant Cell Rep. 15: 561-565.
- Touraev A 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.



Weiguo L, Zheng MY, Polle EA, Konzak CF (2002). Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. Crop Sci. 42: 686-692.

Improving the Viability of Microspores in *Rosa hybrida* cv. Apollo for Haploid Induction

Ahmadi Toktam^{1&2}, E. Shariatpanahi Mehran^{1*}, Jafarkhani Kermani Maryam¹, Mashayekhi Kambiz²

1. Department of Tissue Culture and Gene Transformation, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII),
Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO)

2. Gorgan University of Agriculture and Natural Resources

✉* mehran.shariatpanahi@abrii.ac.ir

Abstract

Production of haploid plants in ornamentals is one of the breeding methods which have been restricted to only a few species. In order to optimize haploid culture in *Rosa*, the effects of two stress elements (Colchicine and 2,4-D) on microspore viability of *R. hybrida* cv. Apollo were studied. Two isolation techniques (pestle and magnet bar), three isolation media (NLN, AB, B), five induction media (NLN, A2, AT₃ with 90 g.L⁻¹ maltose, AT₃ with 180 g.L⁻¹ maltose, AT₃ with 90 g.L⁻¹ glucose) were also compared. The results showed that, the best isolation technique, isolation medium and induction medium were to use magnet-bar, B medium (medium without any nutrients) and AT₃ medium containing 90 g.L⁻¹ maltose respectively. These results provided useful information on microspore isolation and survival for further studies in haploid induction in *Rosa*.

Keywords: Haploidy, Microspore, *Rosa*.