

به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی

دوره ۲ ■ شماره ۱ ■ بهار و تابستان ۱۳۹۳

صفحه‌های ۱-۱۲

بررسی اثر تنش‌های سرمایی، گرمایی و شیمیایی در القای آندروژنز در گیاه زینتی لیسیانتوس (*Eustoma grandiflorum*)

محمد مهدی فخرائی*^۱، مصطفی عرب^۲، مهران عنایتی شریعت‌پناهی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، شیراز، ایران
۲. استادیار گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، ایران
۳. دانشیار بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۷/۷

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۱/۱۰/۱۲

چکیده

روش‌های متعددی برای تولید گیاهان هاپلوئید وجود دارد که یکی از انواع کارآمد آن‌ها آندروژنز به‌ویژه کشت میکروسپور است. نتایج مطالعات متعدد نشان می‌دهد که اعمال تنش به‌منزله یک عامل محرک، در القای رویان‌زایی میکروسپور مؤثر است. در آزمایش اول اثر تیمار دمایی شامل تنش سرما و تنش گرما به همراه کنترل بررسی شد. در آزمایش دوم اثر 2,4-D و در آزمایش سوم اثر PEG-4000 در محیط کشت بررسی شدند. در ادامه از تنش‌های دیگری شامل pH بالای محیط القا، اتانول و همچنین دور بالای سانتریفیوژ در القای آندروژنز استفاده شد. نتایج نشان داد که بر اثر پیش‌تیمار سرمایی 4°C به مدت یک روز تقسیم سلولی صورت گرفت؛ همچنین با تنش گرمایی 35°C به مدت دو روز تقسیم سلولی ایجاد شد. از میان تنش‌های دمایی، پیش‌تیمار 35°C به مدت یک روز کارآمدترین تنش، در القای آندروژنز بود. بهترین تیمار تنش 2,4-D برای القای آندروژنز، غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر بود؛ که موجب ایجاد بیشترین ساختار چندسلولی شد. در تنش پلی‌اتیلن گلیکول نیز بیشترین تغییرات مطلوب با تیمار ۰/۸۴- مگاپاسکال مشاهده شد. pH های ۶/۵ و ۷ سبب شروع تقسیم سلولی میکروسپورها و ایجاد ساختار چندسلولی شدند. پیش‌تیمار سانتریفیوژ با دور بالا، فقط سبب تولید میکروسپورهای متورم شد.

کلیدواژه‌ها: تنش‌های دمایی، تنش‌های شیمیایی، کشت میکروسپور، PEG-4000؛ 2,4-D

مقدمه

لیسیانتوس^۱ با نام علمی *Eustoma grandiflorum* از خانواده Gentianaceae است، که در باغبانی به منزله یک گل گلدانی، فضای آزاد و شاخه بریده در بیشتر نقاط دنیا کشت می شود و در بازارهای جهانی اهمیت زیادی دارد (۱۶، ۲۰ و ۲۹). لیسیانتوس محصول نسبتاً جدیدی است، با وجود این به سرعت در رده ده گل برتر شاخه بریده دنیا قرار گرفته 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 شود. این گل زیبا علاوه بر رنگ آبی انواع رنگها و فرمها را دارد (۱۷). روش های متعددی برای تولید گیاهان هاپلوئید و به دنبال آن گیاهان هاپلوئید مضاعف وجود دارد که یکی از آنها روش آندروژنز است، که به دو روش کشت بساک و میکروسپور انجام می شود (۲). آندروژنز سریع ترین روش ممکن برای رسیدن به هموزیگوسیتی است که موجب آسان شدن پژوهش های اصلاحی و ژنتیکی می شود (۹).

تنش به منزله یک عامل جرقه ای، در تمایز و رویان زایی میکروسپور لازم و ضروری است (۳ و ۳۲). انواع پیش تیمارهای متداول تنش زای به کار برده شده در آندروژنز عبارت اند از: پیش تیمارهای سرما، گرما، گرسنگی (ازت و منبع کربوهیدرات)، اسمولیتها (جاذب آب) و پرتو دهی گرده با دز پایین پرتوهای یون ساز مثل گاما (۹). اتانول و سانتریفیوژ با دور بالا به منزله تنش القا کننده رویان زایی در *Brassica napus* گزارش شده است (۲۴) و (۲۵). از تنش هایی که جدیداً در القای آندروژنز به کار گرفته شده می توان به pH بالای محیط و القا کننده های

شیمیایی مانند 2,4-D و PEG^۲ اشاره کرد (۳ و ۳۲).

کشت میکروسپور در لیسیانتوس برای اولین بار در دنیا، طی این پژوهش انجام شد. شایان ذکر است، لیسیانتوس یکی از معدود گل های با ارزش و تجاری شاخه بریده ای است که از طریق جنسی (بذر) تکثیر می شود و کشورمان سالانه اقدام به واردات مستقیم میلیون ها بذر F₁ یا نشای حاصل از بذر آن می کند. با توجه به اینکه آندروژنز مخصوصاً کشت میکروسپور توجیه پذیرترین، سریع ترین و پربازده ترین روش هاپلوئیدی است و هاپلوئیدی اولین گام در رسیدن به تولید بذر هیبرید F₁ با ایجاد لاین های اینبرد است (۳، ۳۲ و ۳۳)، این پژوهش می تواند به عنوان نقطه آغازی در دستیابی به بذر F₁ این گل با ارزش و تجاری از طریق فناوری های نوین و روش های بیوتکنولوژی در دنیا محسوب شود. همچنین با توجه به اینکه تمامی بذر F₁ گل و سبزی کشور تنها از طریق واردات تأمین می شود و در این پژوهش برای اولین بار کشت میکروسپور یک محصول باغبانی در ایران انجام شد، این پژوهش می تواند به عنوان گامی مؤثر در بومی سازی این فناوری نوین در اصلاح و تولید بذر F₁ این محصول و سایر محصولات باغی تلقی شود. هدف از این پژوهش ارزیابی تأثیر انواع تنش (دمایی، اتانول، pH، بالا، سانتریفیوژ با دور بالا و تنش های شیمیایی با 2,4-D و PEG) در القای آندروژنز لیسیانتوس از طریق کشت میکروسپور بود.

مواد و روش ها

رقم استفاده شده در این پژوهش رقم پرترفردار «ماریاچی پیور وایت»^۳ بود که از گلخانه ای در شهرستان پاکدشت تهیه شد. این رقم بیشترین سطح زیر کشت و فروش را در

2. Polyethylene glycol
3. Mariachi Pure White'

1. Lisianthus

برای جداسازی میکروسپورها از بساک غنچه لیسیانوس با توجه به ارزیابی‌های انجام شده از محیط جداسازی B₅ با ۱۳ درصد ساکارز و pH مساوی ۶ استفاده شد و با کمک مغناطیسی (که توسط همزن حرارتی درون ظروف شیشه‌ای می‌شد) جداسازی انجام شد. پس از جداسازی میکروسپورها، سوسپانسیون از میکروسپورهای جدا شده در محیط جداسازی به دست آمد. این سوسپانسیون در شرایط کاملاً گندزدایی شده از الک آزمایشگاهی ۵۸ میکرومتری عبور داده شد و در ارلن قرار گرفت؛ سپس هر ۳۰ میلی‌لیتر از آن را در یک فالكون ۵۰ میلی‌لیتر ریخته و فالكون‌ها در سانتریفیوژ قرار داده شد. دو بار سانتریفیوژ به مدت پنج دقیقه با ۱۴۰۰ دور در دقیقه^۳ به منظور جداسازی، پاک‌سازی و رسوب میکروسپورها انجام شد (۷). در راستای نتایج به دست آمده ۴ تا ۵ میلی‌لیتر محیط مایع^۴ NLN (۲۳) با ۱۳ درصد ساکارز و pH مساوی ۵/۸ به رسوب میکروسپور ته فالكون اضافه شد و چند بار به هم زده شد تا سوسپانسیون کاملاً یکنواخت شود (۴).

آزمایش ۱: بررسی اثر انواع پیش‌تیمارهای حرارتی و دمایی

اثر پنج تیمار تنش دمایی شامل تنش سرمایی یک و دو روز در ۴ °C (۱۰، ۱۴، ۱۸، ۲۷ و ۳۴) و تنش گرمایی یک و دو روز در ۳۵ °C (۳۱) و بدون تنش دمایی، بررسی شد.

آزمایش ۲: القای تنش شیمیایی با 2,4-D

از 2,4-D به منظور القاکننده تنش شیمیایی با غلظت‌های ۱۵، ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد (۱، ۱۲ و ۱۵). ابتدا رسوب میکروسپورها داخل میکروتیوپ‌ها

بین ارقام موجود لیسیانوس به خود اختصاص داده است و از پرفرودارترین و تجاری‌ترین ارقام لیسیانوس است. در گزارش‌های قبلی رقم ماریاچی پیور وایت پاسخگوترین رقم به القای آندروژنز معرفی شده بود (۵)؛ همچنین پاسخگوترین مرحله به القای آندروژنز و به عبارتی بهترین مرحله تکاملی دانه‌گرده برای کشت میکروسپور در لیسیانوس مرحله تک‌هسته‌ای شناخته شد (۵) و اندازه غنچه گل در مرحله تک‌هسته‌ای، ۲/۵ - ۳/۵ سانتی‌متر تعیین شد (۶ و ۸). در این پژوهش نیز از همین رقم و غنچه‌های ۲/۵ - ۳/۵ سانتی‌متر که در مرحله تک‌هسته‌ای بودند استفاده شد.

آزمایش‌های مربوط به کشت میکروسپور لیسیانوس در آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران انجام شد. گندزدایی وسایل و ظروف حاوی آب مقطر و محیط جداسازی با دمای ۱۲۱ °C و فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع^۱ در اتوکلاو و برخی از وسایل در آن انجام گرفت؛ اما با توجه به حساس بودن بعضی ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه به حرارت اتوکلاو، محیط کشت با فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرونی گندزدایی شد. ضد عفونی و گندزدایی غنچه‌ها زیر هود لامینار^۲ در داخل فالكون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ - ۴۰ میلی‌لیتر هیپوکلیت سدیم ۳/۵ درصد با تکان دادن (درون یخ و شیکر)، به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت و پس از آن سه مرتبه با آب مقطر شست‌وشو شد. شایان ذکر است که به منظور از بین رفتن احتمال مرگ میکروسپورها تمام محلول‌های گندزدایی، آب مقطر، محیط جداسازی میکروسپور و محیط کشت قبل از استفاده در یخچال ۴ °C نگهداری شدند. درون هر ظرف شیشه‌ای ۲۵ تا ۳۰ بساک قرار گرفت.

3. rpm

4. Lichter media

1. Kg/cm²

2. Air laminar flow hood

پتری با دو دور پارافیلیم درزگیری شد. پتری‌ها پس از اعمال پیش تیمارها، در دمای ۲۵°C و شرایط تاریکی انکوبه شدند. تحول و تغییرات میکروسپورها پس از کشت و انکوبه کردن، با میکروسکوپ اینورت^۱ موجود در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ساخت ژاپن- شرکت نیکون^۲) مشاهده شد.

نتایج و بحث

آزمایش ۱: بررسی اثر انواع پیش تیمارهای حرارتی و دمایی همان طور که انتظار می رفت در کشت میکروسپورها بدون تنش دمایی (در دمای ۲۵ °C) تغییر مشهودی در ساختمان و ساختار میکروسپورها ایجاد نشد، که علت این پدیده را می توان به وجود نداشتن عاملی القاکننده برای تغییر مسیر گامتوفیتی به اسپروفیتی میکروسپورها در این تیمار ارتباط داد (۳۲). بر اثر پیش تیمار سرمایی ۴ °C به مدت یک روز تقسیم سلولی انجام شد (شکل ۱- الف)، که این پیش تیمار دمایی با همان مدت یک روز در فلفل تند (*Capsicum Martondur1* (۳۴) و به مدت دو روز در رقم *Brassica glandum* (*Triticum turgidum* L.) (۱۰) و کلزا (*napus* L.) (۱۴) و در مدت هفت روز در ژنوتیپ G459 کلزا (۲۷) سبب ایجاد بیشترین رویان زایی شد و همچنین در سبب این پیش تیمار سرمایی از سایر پیش تیمارهای دمایی در فعال سازی مسیر توسعه ای اسپروفیتی میکروسپورها کارآمدتر بود (۱۸).

دو مکانیسم پیشنهادی برای اثر سرما در القای آندروژنز در کشت میکروسپور وجود دارد. یکی ساخته شدن دو پروتین از نوع پروتین های حرارتی HSP^۳ (با نام های tom111 و tom66) هست، که برای محافظت از سلول ها

ریخته شد و پس از افزودن غلظت های مورد نظر 2,4-D به آن ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند؛ سپس با همان زمان و دور اولیه (پنج دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰) سانتریفیوژ شدند. در ادامه محیط مایع NLN با ۱۳ درصد ساکارز و pH مساوی ۵/۸ به رسوب میکروسپور ته فالكون اضافه و چند بار به هم زده شد تا سوسپانسیون کاملاً یکنواخت شود (۱۵).

آزمایش ۳: القای تنش شیمیایی با PEG

اثر تنش با ماده شیمیایی PEG که به منزله یک اسمولیت عمل می کند، مطالعه شد. PEG-4000 را که به صورت جامد است، در چهار تیمار ۰/۶۱، ۰/۸۴، ۱/۰۱- و ۱/۳۴- مگاپاسکال، در محیط های کشت حل شد و پس از گندزدایی محیط و انجام مراحل کشت، اثر هر یک از تیمارها بر القای آندروژنز بررسی شد (براساس پروتکل ارائه شده در منابع ۲۱ و ۲۲).

آزمایش ۴: اتانول

اثر اتانول در چهار تیمار ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ میلی لیتر بر لیتر در القای تنش بررسی شد (براساس پروتکل ارائه شده در منبع ۲۶).

آزمایش ۵: تنش pH بالا

در این آزمایش اثر سه pH بالا محیط مایع NLN-13 شامل ۶/۵ و ۷ و ۷/۵ در القای آندروژنز در لیسیتوس بررسی شد (براساس پروتکل ارائه شده در منبع ۱۱).

آزمایش ۶: تنش سانتریفیوژ با دور بالا

در آزمایش ششم اثر دور بالای سانتریفیوژ (g ۱۱۰۰۰ (۸۰۹۸/۹۷ rpm)) به مدت ۳۰ دقیقه قبل از کشت به منزله یک تنش در القای آندروژنز میکروسپورهای لیسیتوس بررسی شد (براساس پروتکل ارائه شده در منبع ۲۵).

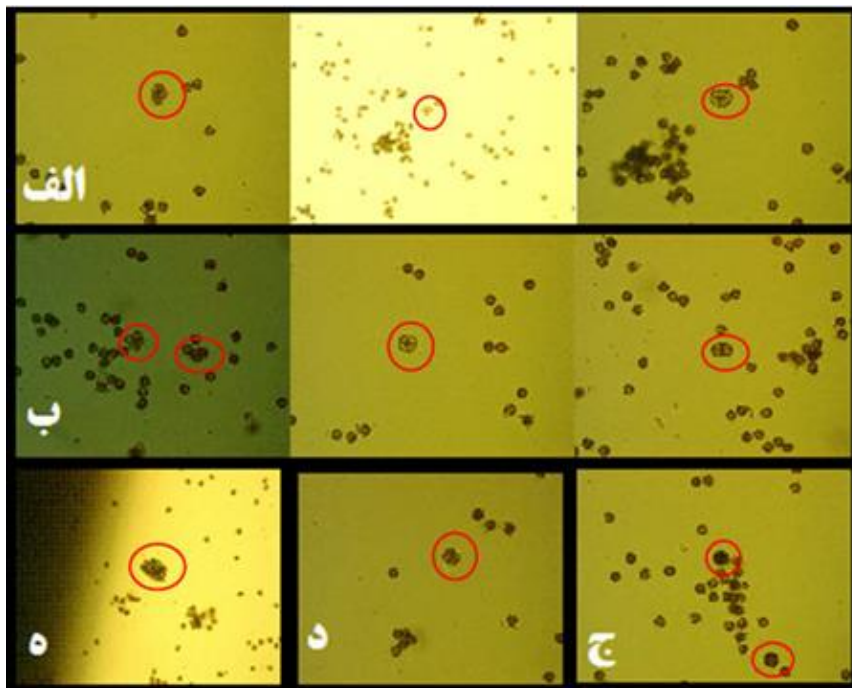
در ادامه ۶ میلی لیتر از محیط مایع NLN در پتری های شش سانتی متر ریخته شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی میکروسپور به پتری ها اضافه و هر

1. Inversion microscope
2. NIKON
3. Heat-Shock Protein

ساختار چندسلولی^۱ کاملاً نمایان شد (شکل ۱-ه). در تنش گرمایی نیز دو مکانیسم در کشت میکروسپور وجود دارد. اولین مکانیسم ساخته شدن پروتین‌هایی از نوع پروتین‌های حرارتی HSP است که سبب اختلال در ساخت پروتین‌های گامتوفیتی و موجب تولید پروتین‌های اسپروفیتی می‌شوند و همچنین این پروتین‌ها از مرگ سلول‌ها ممانعت می‌کنند و سبب زنده ماندن میکروسپوره‌های تغییر برنامه یافته برای حرکت در مسیر اسپروفیتی می‌شوند. مکانیسم دیگر تغییر در مراحل تمایز سلولی است که موجب کاهش فعالیت پروتین کیناز می‌شود. این دو مکانیسم سبب تغییر مسیر گامتوفیتی به اسپروفیتی میکروسپورها می‌شود (۳ و ۳۲).

در برابر سرما ساخته می‌شوند که با مکانیسمی نام مشخص این دو پروتین سبب تغییر مسیر گامتوفیتی به اسپروفیتی میکروسپورها می‌شود (۳، ۳۰ و ۳۲). مکانیسم دیگر آهسته تر شدن مراحل رشد فیزیولوژیکی است که موجب کمبود مواد غذایی و گرسنگی می‌شود و گرسنگی به نوبت خود موجب تغییر مسیر گامتوفیتی به اسپروفیتی میکروسپورها می‌شود (۳ و ۳۲).

با تنش گرمایی 35°C به مدت دو روز تقسیم سلولی ایجاد شد (شکل ۱-ب)، که با نتیجه انجام شده در کشت میکروسپور انگور منطبق بود (۳۱). از میان تنش‌های دمایی، پیش تیمار 35°C به مدت یک روز کارآمدترین تنش بر میکروسپوره‌های کشت شده بود، که پس از متورم شدن میکروسپورها (شکل ۱-ج) و تقسیم سلولی (شکل ۱-د)،



شکل ۱. الف) تقسیم سلولی میکروسپورها با پیش تیمار سرمایی 4°C به مدت یک روز؛ ب) تقسیم سلولی میکروسپورها با تنش گرمایی 35°C به مدت دو روز؛ ج) متورم شدن؛ د) تقسیم سلولی؛ ه) ساختار چندسلولی، میکروسپورها با پیش تیمار 35°C به مدت یک روز

تنش در کشت میکروسپور شناخته شد (۱).

2,4-D نه تنها اثر هورمون رشدی دارد، بلکه اگر در غلظت‌های بالا استفاده شود می‌تواند به‌عنوان یک تیمار تنش‌زا در القای آندروژنز کشت میکروسپور به کار رود (۱۵). رگیون و همکاران در سال ۲۰۰۶ با بررسی کل الگوی بیان ژنوم آرابیدوپسیس نشان دادند 2,4-D علاوه بر نقش‌های متداول تنظیم‌کننده‌های رشد مثل انواع دیگر اکسین‌ها، اتیلن و ابسیزیک اسید، می‌تواند برای اعمال تقسیم و گسترش سلول نقش تنشی داشته باشد (۲۸). 2,4-D با تغییرات در فیزیولوژی و بیان ژن سلول، می‌تواند نقش احتمالی در ایجاد تنش برای تولید رویان هاپلوئید داشته باشد (۱۳).

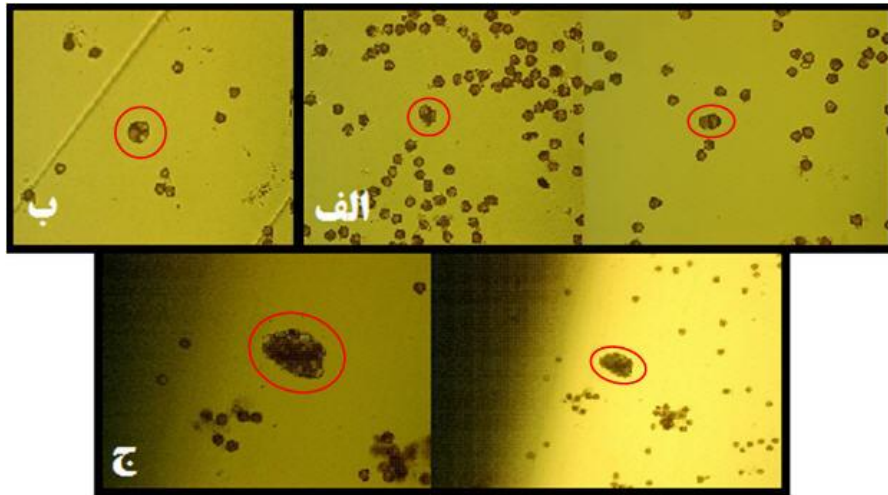
ژن (ANTI-AUXIN-RESISTANT 3, AAR3) در At3g28970 در آرابیدوپسیس ۴۵ درصد همولوگ با ژن NtDCN1 توتون و تنباکو دارد (ژن که بر اثر تنش گرما موجب تغییر مسیر گامتوفیتی به اسپروفیتی میکروسپورها می‌شود)، که در آرابیدوپسیس به فعالیت ریشه پاسخ می‌دهد (۱۹). بنابراین، می‌توان پیشنهاد کرد که این ژن توسط اکسین از نوع 2,4-D فعال شود و با تغییر مسیر گامتوفیتی به اسپروفیتی میکروسپورها سبب رویان‌زایی هاپلوئیدی شود. با این حال این فرضیه باید آزمایش‌های دقیق‌تری شود. زمان لازم برای اثرگذاری تیمار 2,4-D روی میکروسپورها (کمتر از یک ساعت) در مقایسه با سلول‌های سوماتیکی (بیشتر از یک روز) خیلی کمتر است و این می‌تواند ناشی از حساسیت بالاتر میکروسپورها به تیمار 2,4-D باشد (۱۵). به‌طور کلی، می‌توان پیشنهاد کرد که 2,4-D به‌طور مستقیم از طریق فعال‌کردن ژن‌های رویان‌زا و یا به‌طور غیرمستقیم با اثر بر روی بیان مسیر تولید اکسین، اتیلن و ابسیزیک اسید با تغییر مسیر گامتوفیتی به اسپروفیتی میکروسپورها شرایط رویان‌زایی هاپلوئیدی را فراهم کند (۱۵).

در سال ۲۰۱۱ گزارش شد که ژن NtDCN1، یک پروتین ۳۰ کیلو دالتونی متشکل ۲۵۹ اسید آمینه (که بر اثر تنش گرمایی موجب تغییر برنامه‌ریزی و تکامل رشد و نمو میکروسپور توتون و تنباکو می‌شود) را رمزگذاری می‌کند. آن‌ها دریافتند که RNAi حاصل از NtDCN1 مانع از تغییر مسیر گامتوفیتی به اسپروفیتی میکروسپورها و تشکیل رویان هاپلوئید می‌شود (۱۹). تنش گرمایی به‌منزله یک تغییردهنده توسعه مسیر میکروسپور، از ویژگی شناخته‌شده در بسیاری از گیاهان است که در نهایت سبب ایجاد رویان و گیاه هاپلوئید از میکروسپور می‌شود (۱۹).

آزمایش ۲: القای تنش شیمیایی با 2,4-D

در تیمار تنش 2,4-D با غلظت ۱۵ و ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر تغییری مشاهده نشد. با اعمال تیمارهای تنش شیمیایی 2,4-D با مقادیر ۲۵ و ۴۵ میلی‌گرم بر لیتر میکروسپورها شروع به تقسیم سلولی کردند و تقسیم سلولی در این پیش‌تیمارها مشاهده شد (شکل ۲-الف و ب). در تیمار تنش 2,4-D با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر ساختار چندسلولی به‌وضوح نمایان بود (شکل ۲-ج). بهترین تیمار تنش 2,4-D برای القای آندروژنز، غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر بود؛ که سبب ایجاد بیشترین ساختار چندسلولی شد.

در کشت میکروسپور کلزا غلظت‌های ۲۵ و ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بیشترین میزان رویان‌زایی به‌دست آمد و غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D همانند نتایج این پژوهش کمترین کارایی را در کلزا داشت (۱۵). با اعمال تنش 2,4-D به‌مدت ۳۰ دقیقه با میزان ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میلی‌گرم بر لیتر در کشت میکروسپور گندم نان رقم فلات در تمام تیمارها رویان‌زایی مشاهده شد. برخلاف نتایج مشاهده‌شده در گندم، در این پژوهش و همچنین در کلزا، تیمار ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در تعداد رویان اختلاف معناداری با شاهد (بدون اعمال تیمار 2,4-D) داشت اما این تیمار در گندم نان رقم فلات به‌منزله برترین تیمار القای



شکل ۲. تقسیم سلولی میکروسپورها در تیمار تنشی 2,4-D با غلظت‌های: الف) ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر؛ ب) ۴۵ میلی‌گرم بر لیتر؛ ج) ساختار چندسلولی در پیش تیمار 2,4-D با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر

مطلوب در تیمار PEG ۰/۸۴- مگاپاسکال مشاهده شد. نتایج این پژوهش کاملاً با پژوهش انجام شده در گیاه (*Jatropha curcas*) تطابق داشت؛ از بین تیمارهای ۰/۶۱-، ۰/۸۴- و ۱/۰۱- مگاپاسکال PEG-4000، تیمار ۰/۸۴- مگاپاسکال را کارآمدترین تیمار PEG در القای آندروژنز گزارش کردند (۲۲). این تنش نیز از پیش تیمارهای شیمیایی و نو در کشت میکروسپور به حساب می‌آید که کمتر از آن استفاده شده است. از دیگر مثال‌های موفق استفاده از PEG-4000 به عنوان تنش شیمیایی می‌توان در گیاه کلزا اشاره کرد (۲۱). به نظر می‌رسد تنش شیمیایی PEG با ایجاد تنش اسمزی و کاهش توانایی میکروسپورها در تجزیه و مصرف مواد غذایی به نوعی ایجاد تنش گرسنگی بر روی میکروسپورها و در نهایت فعال‌سازی مسیر توسعه‌ای اسپوروفیتی می‌شود (۳۲).

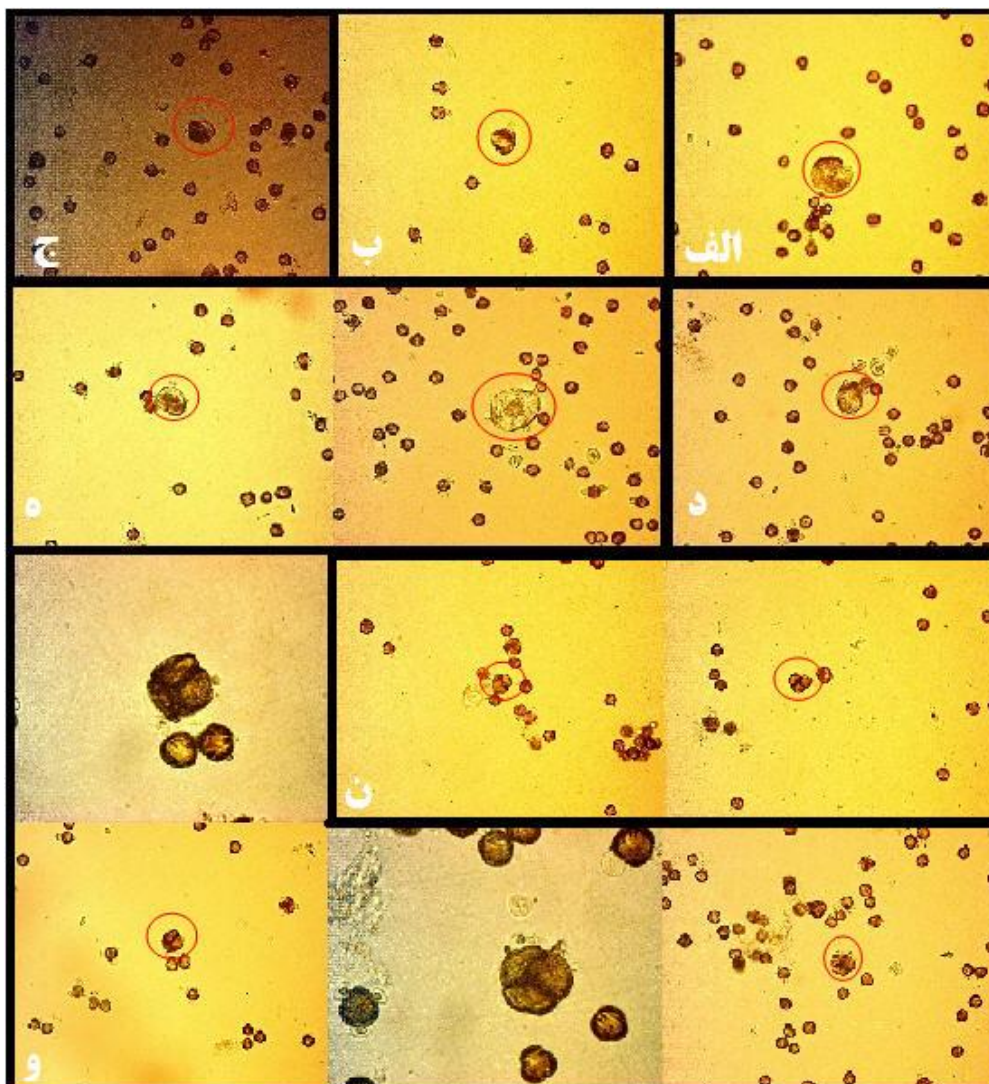
آزمایش ۴: اتانول

در تنش اتانول بیشتر میکروسپورها مردند و تنش اتانول، تیمار مناسبی برای القای آندروژنز در لیسیانوس ارزیابی نشد که نتایج به دست آمده با بیشتر پژوهش‌های قبلی مطابقت داشت (۳۲).

در سال ۲۰۱۱ برای اولین بار در دنیا با استفاده از تیمار 2,4-D به تنهایی موفق به القای آندروژنز و رویان‌زایی در کلزا شدند اما در کل این پیش تیمار شیمیایی نو در کلزا، نسبت به تنش گرمایی بازده کمتری داشت؛ در نتایج این پژوهش پیشنهاد شد این تنش نوشیمیایی در گیاهانی که به تنش‌های متداول مثل گرما، سرما، گرسنگی و کلشی‌سین پاسخ نمی‌دهند و یا سخت پاسخ می‌دهند مناسب است (۱۵). براساس پژوهش انجام شده 2,4-D به عنوان یک تنش نو در القای آندروژنز و رویان‌زایی میکروسپورهای گندم معرفی می‌شود (۱).

آزمایش ۳: القای تنش شیمیایی با PEG

تنش شیمیایی با PEG-4000 با تیمار ۱/۰۱- مگاپاسکال در محیط کشت تغییری در میکروسپورها ایجاد نکرد؛ اما در تمام تیمارهای PEG با تیمارهای ۰/۶۱-، ۰/۸۴- و ۱/۳۴- مگاپاسکال میکروسپورها متورم شدند (شکل ۳- الف، ب و ج). دیواره میکروسپورها با تنش ۰/۶۱- و ۰/۸۴- مگاپاسکال PEG پس از متورم شدن میکروسپور، شروع به ترکیدن کردند (شکل ۳- د و ه)؛ سپس تقسیم سلولی در این میکروسپورها ایجاد شد (شکل ۳- ن و و). بیشترین تغییرات



شکل ۳. متورم شدن میکروسپورها در پیش تیمار PEG به میزان‌های: الف) ۰/۶۱- مگاپاسکال؛ ب) ۰/۸۴- مگاپاسکال و ج) ۱/۳۴- مگاپاسکال؛ ترکیدن دیواره میکروسپور با تیمار PEG به میزان‌های: د) ۰/۶۱- مگاپاسکال؛ ه) ۰/۸۴- مگاپاسکال؛ تقسیم سلولی در پیش تیمار PEG به میزان‌های: ن) ۰/۶۱- مگاپاسکال؛ و) ۰/۸۴- مگاپاسکال

آزمایش ۵: تنش pH بالا

نتیجه این آزمایش چنین بود که pH مساوی ۷/۵ تغییراتی را در میکروسپورها ایجاد نکرد اما pH مساوی ۷ و ۶/۵ سبب شروع تقسیم سلولی میکروسپورها و ایجاد ساختار چندسلولی شد (شکل ۴- ب و ج). در کشت میکروسپور کلم از میان تیمارهای pH برابر ۵/۶، ۵/۸، ۶، ۶/۲، ۶/۴ و ۶/۶، تیمار تنشی pH مساوی ۶/۲ و ۶/۴ در ژنوتیپ

تنها در تیمار ۵۰ میلی لیتر بر لیتر اتانول میکروسپورهای متورم شده محدودی مشاهده شد (شکل ۴- الف). از جمله محدود موارد موفق گزارش شده در استفاده از اتانول به عنوان تنش‌زا در القای آندروژنز می‌توان به تعداد محدود رویان تولدشده در کلزا اشاره کرد (۲۶). به نظر می‌رسد در بیشتر موارد گزارش شده اتانول سبب ایجاد سمیت در میکروسپورها و در نهایت مرگ آن‌ها می‌شود (۳۲).

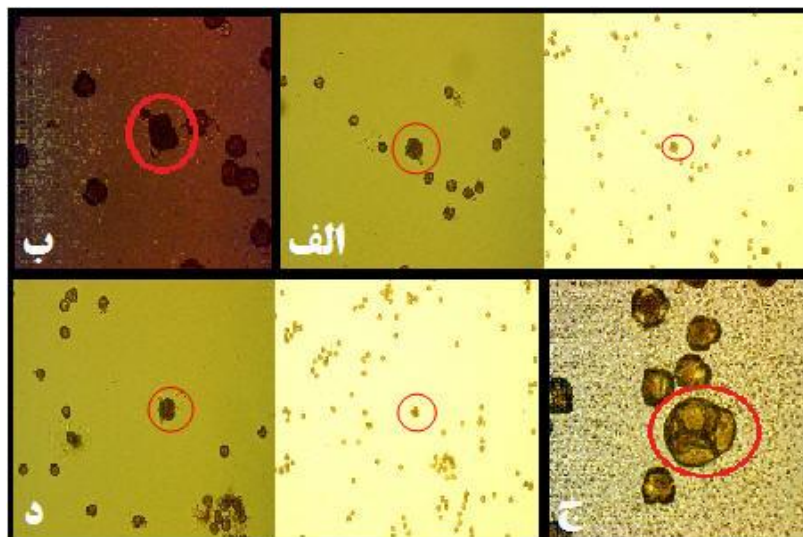
در فرایند القای آندروژنز نیاز به تغییر مسیر میکروسپورها از مرحله گامتوفیتی به اسپروفیتی است، که در این فرایند ابتدا میکروسپورها متورم می‌شوند و برخی اوقات سوسپانسیون تولید می‌کنند؛ سپس با تقسیم سلولی، ساختار چندسلولی ایجاد می‌شود و در نهایت رویان‌های هاپلوئید از این ساختار چندسلولی پدید می‌آیند (۳، ۳۲ و ۳۳). در این پژوهش برای اولین بار، کشت میکروسپور لیسیانوس در دنیا انجام شد و نتایج امیدوارکننده‌ای با دستیابی به ساختار چندسلولی در زمینه رسیدن به القای آندروژنز در لیسیانوس به دست آمد. شایان ذکر است که لیسیانوس از محدود گل‌های شاخه‌بریده و با ارزش تجاری بالایی است که با بذر تکثیر می‌شود. مراحل اولیه القای آندروژنز به روش کشت میکروسپور که از مناسب‌ترین، سریع‌ترین و کارآمدترین روش‌های دست‌یابی به بذر F_1 است (۳، ۳۲ و ۳۳)، در این پژوهش انجام گرفت. مشاهده ساختار چندسلولی در کشت میکروسپور این گل با ارزش، برای اولین بار در دنیا، نتیجه امیدوارکننده‌ای برای ادامه پژوهش‌ها در این زمینه و کوتاه‌تر کردن مسیر تولید بذر F_1 این محصول را فراهم آورده است.

Zhonggan No. 8^۴ بهترین نتایج گرفته شد و بیشترین رویان‌زایی هاپلوئیدی به دست آمد (۳۵). در گل میمون و تنباکو با pH مساوی ۶/۵ بیشترین میزان ساختار چندسلولی ایجاد شد اما در pH مساوی ۷، ۸ و ۸/۵ میزان پاسخ به آندروژنز کمترین مقدار بود.

پاسخ‌ندادن به آندروژنز در pH های بسیار بالا می‌تواند به علت فاصله گرفتن از pH بهینه در کشت میکروسپور (pH مساوی ۵/۸) باشد، که سبب ایجاد شرایط نامطلوب برای تقسیم میکروسپورها می‌شود. به‌طور کلی، در مواردی pH بالا سبب تغییر مسیر توسعه‌ای میکروسپورها می‌شود که pH بالا بتواند با جذب ساکارز گرسنگی را برای میکروسپورها فراهم کند، اما در مورد کشت میکروسپور گل میمون و تنباکو و این پژوهش ظاهراً این شرایط تنش‌ی بر اثر کاربرد pH بالای ۷ فراهم نشده است (۳۲ و ۳۵).

آزمایش ۶: تنش سانتریفیوژ با دور بالا

پیش‌تیمار سانتریفیوژ با دور ۱۱ هزار (۸۰۹۸/۹۷ rpm) و به مدت ۳۰ دقیقه بعد از جداسازی و قبل از کشت میکروسپورها سبب تولید میکروسپورهای متورم در محیط کشت شد (شکل ۴-د).



شکل ۴. الف) میکروسپورهای متورم شده در تیمار ۵۰ میلی‌لیتر بر لیتر اتانول؛ ساختار چندسلولی در: ب) تیمار تنش pH مساوی ۶/۵ و ج) تیمار تنش pH مساوی ۷؛ د) ایجاد میکروسپورهای متورم با پیش‌تیمار تنشی سانتریفیوژ با دور بالا

نتیجه گیری کلی

از مجموعه آزمایش‌های انجام شده پیش تیمارهای تنش سرمایی 4°C به مدت یک روز، گرمای 35°C به مدت ۱ و ۲ روز، 2,4-D با غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر، تیمار ۰/۸۴- مگاپاسکال PEG-4000 و همچنین pH مساوی ۷ بهترین تیمارها برای القای آندروژنز در لیسپانتوس ارزیابی شدند. بر اثر این تیمارهای تنشی بیشترین تقسیم سلولی و ساختار چندسلولی ایجاد شد. از میان تنش‌های ارزیابی شده، پیش تیمار 35°C به مدت یک روز کارآمدترین تنش، در القای آندروژنز لیسپانتوس بود.

منابع

۱. طایفه افشاری ب.، عنایتی شریعت پناهی م. و وهاب زاده م (۱۳۹۰) «بررسی جنین‌زایی میکروسپور در هیبریدهای مختلف گندم نان (*Triticum aestivum*) (L) و معرفی پیش تیمار تنشی ۲،۴-D برای افزایش کارایی جنین‌زایی». زیست فناوری گیاهان زراعی. (۱): ۱۳-۲۱.
۲. عبدالمهی م. ر.، معینی ا.، حدادی پ. و جلالی جواران م (۱۳۸۲) «رویان‌زایی از کشت جدایه‌های میکروسپوری در ارقام مختلف کلزا (*Brassica napus*) (L)». پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی. ۶۰: ۴۸-۵۲.
۳. عنایتی شریعت پناهی م. و امامی میدی د (۱۳۸۸) «میکروسپور: سلولی هاپلوئید با کاربردهای متنوع در ژنتیک و اصلاح نباتات». مجله ژنتیک نوین. ۴(۳): ۵-۱۶.
۴. فخرائی م. م.، عرب م.، عنایتی شریعت پناهی م.، لطفی م.، عزیزی نیا ش. و ظل انوار ف (۱۳۹۰) «اثر متقابل غلظت‌های مختلف و انواع کربوهیدرات و پنج نوع محیط کشت بر آندروژنز رقم ماریچی سفید خالص

لیسپانتوس *Eustoma grandiflorum* 'Mariachi Pure

White». هفتمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران.

۵. فخرائی م. م.، عرب م.، عنایتی شریعت پناهی م.، لطفی م.، عزیزی نیا ش. و ظل انوار ف (۱۳۹۰) «تأثیر رقم، اندازه غنچه و مرحله تکامل دانه‌گرده (میکروسپوروزنز) بر آندروژنز گل لیسپانتوس (*Eustoma grandiflorum*) از طریق کشت میکروسپور». همایش ملی کشاورزی پایدار - دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا. ۱۳۳-۱۳۸.

۶. فخرائی م. م.، عرب م.، عنایتی شریعت پناهی م.، لطفی م.، عزیزی نیا ش. و ظل انوار ف (۱۳۹۰) «ارزیابی بهترین روش رنگ‌آمیزی هسته میکروسپور گل لیسپانتوس (*Eustoma grandiflorum*) (با رنگ فلورسنتی DAPI و سه معرف استوکارمن، استواورسئین و فوشین)». هفتمین کنگره باغبانی ایران. ۳۵۷-۳۷۸.

۷. فخرائی م. م.، عرب م.، عنایتی شریعت پناهی م.، لطفی م.، عزیزی نیا ش. و ظل انوار ف (۱۳۹۰) «تعیین بهترین روش و محیط جداسازی (ایزوله کردن) و زمان و دور سانتریفیوژ در کشت میکروسپور گل لیسپانتوس (*Eustoma grandiflorum*)». هفتمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران.

۸. فخرائی م. م.، عرب م.، عنایتی شریعت پناهی م.، لطفی م.، عزیزی نیا ش. و یونسی حمزه خانلو م (۱۳۸۹) «بررسی مراحل تکامل دانه‌گرده (میکروسپوروزنز) در چند رقم گل لیسپانتوس (*Eustoma grandiflorum*) با استوکارمن». دومین کنگره ملی تخصصی زیست‌شناسی محققان سراسر کشور. ایران. صفحه ۴۴۰.

به نژادی گیاهان زراعی و باغی

16. Halvy AH and Kofranek AM (1984) Evaluation of lisianthus as a new flower crop. Hort Science. 19(6): 845-847.
17. Harbaugh BK (2007) LISIANTHUS. In: Anderson Neil O (Eds.), Flower Breeding and Genetics. Springer. 824p.
18. Höfer M, Touraev A and Heberle-Bors E (1999) Induction of embryogenesis from isolated apple microspores. Plant Cell Reports. 18: 1012-1017.
19. Hosp J, Ribarist A, Szaszka K, Jin Y, Tasshpulatov A, Baumann M, Resch T, Friedmann C, Ankele E, Voronin V, Palme K, Touraev A and Heberle-Bors E (2011) A tobacco homolog of DCN1 is involved in cellular reprogramming and in developmental transitions. Available at precedings.nature.com (Nature Precedings: hdl:10101/npre.2011.5728.1).
20. Ichimura K and Korenaga M (1998) Improvement of vase life and petal color expression in several cultivars of cut Eustoma flowers by sucrose with 8-hydroxyquinoline sulfate. Bulletin of the National Research Institute of Vegetables, ornamental plants and tea, Japan. 13:31-39.
21. Ilić-Grubor K, Attree SM and Fowke LC (1998) Induction of microspore-derived embryos of Brassica napus L. with polyethylene glycol (PEG) as osmoticum in a low sucrose medium. Plant Cell Reports. 17(5): 329-333.
22. Li C, Yu M, Chen F and Wang S (2010) In vitro maturation and germination of Jatropha curcas microspores. International Journal of Agriculture and Biology. 12(4): 541-546.
23. Lichter R (1982) Induction of haploid plants from isolated pollen of Brassica napus. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie. 105: 427-434.
9. ناصریان خیابانی ب.، مجد ف.، ودادی س.، رحمانی ا. و موسوی شلمانی م. ا (۱۳۸۴) «بررسی تأثیر ژنوتیپ، پیش‌تیمار سرمایی، دزهای پایین اشعه گاما و هورمون 2,4-D در واکنش به کشت پرچم گندم». مجله علوم زراعی ایران. ۷(۱): ۸۶-۹۶.
10. Bakos F, Fábíán A and Barnabás B (2007) Isolated microspore cultures of a Hungarian durum wheat (*Triticum turgidum* L.) cultivar, Martondur1. Acta Agronomica Hungarica. 55(2): 157-164.
11. Barinova I, Clement C, Martiny L, Baillieu F, Soukupova H, Heberle-Bors E and Touraev A (2004) Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. Planta. 219: 141-146.
12. Emamifar M, Shariatpanahi ME, Habibzadeh S, Nematzadeh GA and Oroojlo A (2008) Induction of microspore embryogenesis with 2,4-D instead of heat shock in Brassica napus L. cv. Topas. Proceeding of the second international student conference of biotechnology. University of Tehran.
13. Feher A, Pasternak TP and Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 74b: 201-228.
14. Gu HH, Hagberg P and Zhou WJ (2004) Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Growth Regulation. 42: 137-143.
15. Habibzadeh S, Shariatpanahi ME, Amiri R, Emamifar M, Oroojloo M, Nematzadeh G, Sadat Noori SA and Heberle-Bors E (2011) Effect of 2,4-D as a Novel Inducer of Embryogenesis in Microspores of Brassica napus L. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding. 47(3): 114-122.

24. Pechan PM, Barteis D, Brown DCW and Schell J (1991) Messenger-RNA and protein changes associated with induction of Brassica microspore embryogenesis. *Planta*. 184: 161-165.
25. Pechan PM and Keller WA (1988) Identification of potentially embryogenic microspores in Brassica napus. *Physiologia Plantarum*. 74(2): 377-384.
26. Pechan PM and Keller WA (1989) Induction of microspore embryogenesis in Brassica napus L. by gamma irradiation and ethanol stress. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 25(11): 1073-1074.
27. Peng M, Ziauddin A and Wolyn DJ (1997) Development of asparagus microspores in vivo and in vitro is influenced by gametogenic stage and cold treatment. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 33(4): 263-268.
28. Raghavan C, Ong EK, Dalling MJ and Stevenson TW (2006) Regulation of genes associated with auxin, ethylene and ABA pathways by 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid in Arabidopsis. *Functional and Integrative Genomics*. 6: 60-70.
29. Reid MS (2001) Cut flowers and Greens. Department of Environmental Horticulture, University of California, Davis, CA. 36 p.
30. Sabehat A, Lurie S and Weiss D (1998) Expression of small heat-shock proteins at low temperatures: a possible role in protecting against chilling injuries. *Plant Physiology*. 117: 651-658.
31. Sefc KM, Ruckebauer P and Regner F (1997) Embryogenesis in microspore culture of Vitis subspecies. *Vitis*. 36: 15-20.
32. Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle-Bors E and Touraev A (2006) Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiologia Plantarum*. 127: 519-534.
33. Shariatpanahi ME and Touraev A (2010) Microspores and their applications in basic and applied plant sciences. In: Columbus F (Eds.), *Pollen: Structure, Types and Effects*. Nova Science Publishers. pp. 217-234.
34. Supena EDJ, Muswita W, Suharsono S and Custers JBM (2006) Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*. 107: 226-232.
35. Yuan S, Su Y, Liu Y, Fang Z, Yang L, Zhuang M, Zhang Y and Sun P (2012) Effects of pH, MES, arabinogalactan-proteins on microspore cultures in white cabbage. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 110: 69-76.