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*)

محمدمهدی 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، پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۱/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۷/۷

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 به‌منزلهٔ 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 ۴ °C به‌مدت یک روز تقسیم سلولی صورت گرفت؛ همچنین با تنش گرمایی ۳۵ °C به‌مدت دو روز تقسیم سلولی ایجاد شد. از میان تنش‌های دمایی، پیش‌تیمار ۳۵ °C به‌مدت 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.

* نویسنده مسئول Email: mmfakhraei@ut.ac.ir

مقدمه

لیسیانتوس[1] با نام علمی *Eustoma grandiflorum* از خانوادهٔ Gentianaceae است، که در باغبانی به‌منزلهٔ یک گل گلدانی، فضای آزاد و شاخه‌بریده در بیشتر نقاط دنیا کشت می‌شود و در بازارهای جهانی اهمیت زیادی دارد (۱۶، ۲۰ و ۲۹). لیسیانتوس محصول نسبتاً جدیدی است، با وجود این به‌سرعت در ردهٔ ده گل برتر شاخه‌بریدهٔ دنیا قرار گرفته است که علت این موضوع فرم و شکل زیبا، دوام و عمر پس از برداشت بالا و رنگ آبی منحصر به‌فرد آن است که به‌طور گسترده به‌عنوان گل شاخه‌بریده، گلدانی و فضای آزاد استفاده می‌شود. این گل زیبا علاوه بر رنگ آبی انواع رنگ‌ها و فرم‌ها را دارد (۱۷). روش‌های 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 می‌شود (۲). آندروژنز سریع‌ترین روش ممکن برای رسیدن به هموزیگوسیتی است که موجب آسان‌شدن پژوهش‌های اصلاحی و ژنتیکی می‌شود (۹).

تنش به‌منزلهٔ یک عامل جرقه‌ای، در تمایز و رویان‌زایی میکروسپور لازم و ضروری است (۳ و ۳۲). انواع پیش‌تیمارهای متداول تنش‌زای به کار برده‌شده در آندروژنز عبارت‌اند از: پیش‌تیمارهای سرما، گرما، گرسنگی (ازت و منبع کربوهیدرات)، اسمولیت‌ها (جاذب آب) و پرتودهی گرده با دز پایین پرتوهای یون‌ساز مثل گاما (۹). اتانول و سانتریفیوژ با دور بالا به‌منزلهٔ تنش القاکنندهٔ رویان‌زایی در *Brassica napus* گزارش شده است (۲۴ و ۲۵). از تنش‌هایی که جدیداً در القای آندروژنز به کار گرفته‌شده می‌توان به pH بالای محیط و القاکننده‌های شیمیایی مانند 2,4-D و PEG[2] اشاره کرد (۳ و ۳۲).

کشت میکروسپور در لیسیانتوس برای اولین‌بار در دنیا، طی این پژوهش انجام شد. شایان ذکر است، لیسیانتوس یکی از معدود گل‌های باارزش و تجاری شاخه‌بریده‌ای است که از طریق جنسی (بذر) تکثیر می‌شود و کشورمان سالانه اقدام به واردات مستقیم میلیون‌ها بذر F_1 یا نشای حاصل از بذر آن می‌کند. با توجه به اینکه آندروژنز مخصوصاً کشت میکروسپور توجیه‌پذیرترین، سریع‌ترین و پربازده‌ترین روش هاپلوئیدی است و هاپلوئیدی اولین گام در رسیدن به تولید بذر هبرید F_1 با ایجاد لاین‌های اینبرد است (۳، ۳۲ و ۳۳)، این پژوهش می‌تواند به‌عنوان نقطهٔ آغازی در دستیابی به بذر F_1 این گل باارزش و تجاری از طریق فناوری‌های نوین و روش‌های بیوتکنولوژی در دنیا محسوب شود. همچنین با توجه به اینکه تمامی بذر F_1 گل و سبزی کشور تنها از طریق واردات تأمین می‌شود و در این پژوهش برای اولین‌بار کشت میکروسپور یک محصول باغبانی در ایران انجام شد، این پژوهش می‌تواند به‌عنوان گامی مؤثر در بومی‌سازی این فناوری نوین در اصلاح و تولید بذر F_1 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 تنش‌های شیمیایی با 2,4-D و PEG) در القای آندروژنز لیسیانتوس از طریق کشت میکروسپور بود.

مواد و روش‌ها

رقم استفاده‌شده در این پژوهش رقم پرطرفدار «ماریاچی پیور وایت»[3] بود که از گلخانه‌ای در شهرستان پاکدشت تهیه شد. این رقم بیشترین سطح زیر کشت و فروش را در

1. Lisianthus

2. Polyethylene glycol
3. Mariachi Pure White’

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

آزمایش‌های مربوط به کشت میکروسپور لیسیانتوس در آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران انجام شد. گندزدایی وسایل و ظروف حاوی آب‌مقطر و محیط جداسازی با دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع[1] در اتوکلاو و برخی از وسایل در آون 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[2] در داخل فالکون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ـ ۴۰ میلی‌لیتر هیپوکلریت سدیم ۳/۵درصد با تکان‌دادن (درون یخ و شیکر)، به‌مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت و پس از آن سه‌مرتبه با آب‌مقطر شست‌وشو شد. شایان ذکر است که به‌منظور از بین رفتن احتمال مرگ میکروسپورها تمام محلول‌های گندزدایی، آب‌مقطر، 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. برای جداسازی میکروسپورها از بساک غنچهٔ لیسیانتوس با توجه به ارزیابی‌های انجام‌شده از محیط جداسازی B_5 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، سوسپانسیونی از میکروسپورهای جداشده در محیط جداسازی به دست آمد. این سوسپانسیون در شرایط کاملاً گندزدایی‌شده از الک آزمایشگاهی ۵۸ میکرومتری عبور داده شد و در ارلن قرار گرفت؛ سپس هر ۳۰ میلی‌لیتر از آن را در یک فالکون ۵۰ میلی‌لیتر ریخته و فالکون‌ها در سانتریفیوژ قرار داده شد. دو بار سانتریفیوژ به‌مدت پنج دقیقه با ۱۴۰۰ دور در دقیقه[3] به‌منظور جداسازی، پاک‌سازی و رسوب میکروسپورها انجام شد (۷). در راستای نتایج به‌دست‌آمده ۴ تا ۵ میلی‌لیتر محیط مایع NLN[4] (۲۳) با ۱۳درصد ساکارز و pH مساوی ۵/۸ به رسوب میکروسپور ته فالکون اضافه شد و چند بار به هم زده شد تا سوسپانسیون کاملاً یکنواخت شود (۴).

آزمایش۱: 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.

آزمایش۲: القای تنش شیمیایی با 2,4-D

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

1. Kg/cm^2
2. Air laminar flow hood
3. rpm
4. Lichter media

ریخته شد و پس از افزودن غلظت‌های مورد نظر 2,4-D به آن‌ها به‌مدت 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 ۱۳درصد ساکارز و pH مساوی ۵/۸ به رسوب میکروسپور ته فالکون اضافه و چند بار به هم زده شد تا سوسپانسیون کاملاً یکنواخت شود (۱۵).

آزمایش۳: القای تنش شیمیایی با PEG

اثر تنش با مادهٔ شیمیایی PEG که به‌منزلهٔ یک اسمولیت عمل می‌کند، مطالعه شد. PEG-4000 را که به‌صورت جامد است، در چهار تیمار ۰/۶۱-، ۰/۸۴-، ۱/۰۱- و ۱/۳۴- مگاپاسکال، در محیط‌های کشت حل شد و پس از گندزدایی محیط و انجام مراحل کشت، اثر هر یک از تیمارها بر القای آندروژنز بررسی شد (براساس پروتکل ارائه‌شده در منابع ۲۱ و ۲۲).

آزمایش۴: اتانول

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

آزمایش۵: 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 لیسیانتوس بررسی شد (براساس پروتکل ارائه‌شده در منبع ۱۱).

آزمایش۶: تنش سانتریفیوژ با دور بالا

در آزمایش ششم اثر دور بالای سانتریفیوژ (g ۱۱۰۰۰ (۸۰۹۸/۹۷ rpm)) به‌مدت ۳۰ دقیقه قبل از کشت به‌منزلهٔ یک تنش در القای آندروژنز میکروسپورهای لیسیانتوس بررسی شد (براساس پروتکل ارائه‌شده در منبع ۲۵).

در ادامه ۶ میلی‌لیتر از محیط مایع NLN در پتری‌های شش سانتی‌متر ریخته شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی میکروسپور به پتری‌ها اضافه و هر پتری با دو دور پارافیلم درزگیری شد. پتری‌ها پس از اعمال پیش‌تیمارها، در دمای ۲۵°C و شرایط تاریکی انکوبه شدند. تحول و تغییرات میکروسپورها پس از کشت و انکوبه‌کردن، با میکروسکوپ اینورت[1] موجود در پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ساخت ژاپن- شرکت نیکون[2]) مشاهده شد.

نتایج و بحث

آزمایش۱: بررسی اثر انواع پیش‌تیمارهای حرارتی و دمایی

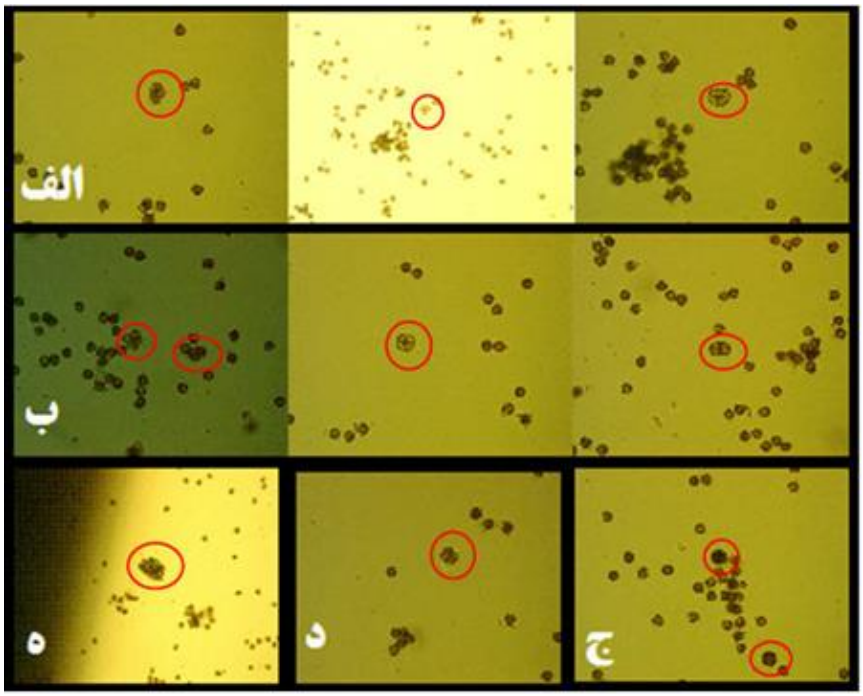
همان‌طور که انتظار می‌رفت در کشت میکروسپورها بدون تنش دمایی (در دمای ۲۵ °C) تغییر مشهودی در ساختمان و ساختار میکروسپورها ایجاد نشد، که علت این پدیده را می‌توان به وجودنداشتن عاملی القاکننده برای تغییر مسیر گامتوفیتی به اسپروفیتی میکروسپورها در این تیمار ارتباط داد (۳۲). بر اثر پیش‌تیمار سرمایی ۴ °C به‌مدت یک روز تقسیم سلولی انجام شد (شکل۱ـ الف)، که این پیش‌تیمار دمایی با همان مدت یک روز در فلفل تند (*Capsicum annuum* L.) (۳۴) و به‌مدت دو روز در رقم Martondur1 گندم (*Triticum turgidum* L.) (۱۰) و کلزا (*Brassica napus* L.) (۱۴) و در مدت هفت روز در ژنوتیپ G459 کلزا (۲۷) سبب ایجاد بیشترین رویان‌زایی شد و همچنین در سیب این پیش‌تیمار سرمایی از سایر پیش‌تیمارهای دمایی در فعال‌سازی مسیر توسعه‌ای اسپوروفیتی میکروسپورها کارآمدتر بود (۱۸).

دو مکانیسم پیشنهادی برای اثر سرما در القای آندروژنز در کشت میکروسپور وجود دارد. یکی ساخته‌شدن دو پروتین از نوع پروتین‌های حرارتی HSP[3] (با نام‌های tom66 و tom111) هست، که برای محافظت از سلول‌ها

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

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 آهسته‌ترشدن 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 ۳۵ °C به‌مدت دو روز تقسیم سلولی ایجاد شد (شکل ۱ـ ب)، که با نتیجهٔ انجام‌شده در کشت میکروسپور انگور منطبق بود (۳۱). از میان تنش‌های دمایی، پیش‌تیمار ۳۵ °C به‌مدت یک روز کارآمدترین تنش بر میکروسپورهای کشت‌شده بود، که پس از متورم‌شدن میکروسپورها (شکل ۱ـ ج) و تقسیم سلولی (شکل ۱ـ د)، ساختار چندسلولی[1] کاملاً نمایان شد (شکل ۱ـ ه). در تنش گرمایی نیز دو مکانیسم در کشت میکروسپور وجود دارد. اولین مکانیسم ساخته‌شدن 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 زنده‌ماندن میکروسپورهای 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).



شکل ۱. الف) تقسیم سلولی میکروسپورها با پیش‌تیمار سرمایی ۴ °C به‌مدت یک روز؛ ب) تقسیم سلولی میکروسپورها با تنش گرمایی ۳۵ °C به‌مدت دو روز؛ ج) متورم‌شدن؛ د) تقسیم سلولی؛ ه) ساختار چندسلولی، میکروسپورها با پیش‌تیمار ۳۵ °C به‌مدت یک روز

1. Multicellular

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 به‌منزلهٔ یک تغییردهندهٔ توسعهٔ مسیر میکروسپور، از ویژگی شناخته‌شده در بسیاری از گیاهان است که درنهایت سبب ایجاد رویان و گیاه هاپلوئید از میکروسپور می‌شود (۱۹).

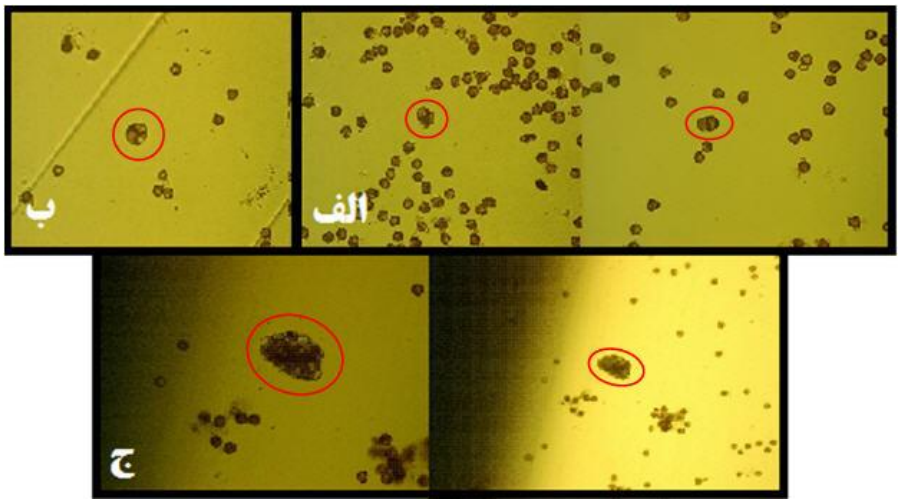
آزمایش۲: القای تنش شیمیایی با 2,4-D

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 (شکل۲ـ الف و ب). در تیمار تنش 2,4-D با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر ساختار چندسلولی به‌وضوح نمایان بود (شکل۲ـ 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 با 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 به‌منزلهٔ برترین تیمار القای تنش در کشت میکروسپور شناخته شد (۱).

2,4-D نه‌تنها 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) At3g28970 در آرابیدوپسیس ۴۵درصد 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. بااین‌حال 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 حساست بالاتر میکروسپورها به تیمار 2,4-D باشد (۱۵). به‌طورکلی، 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).



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 پیش‌تیمار 2,4-D با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر

در سال ۲۰۱۱ برای اولین‌بار در دنیا با استفاده از تیمار 2,4-D به‌تنهایی موفق به القای آندروژنز و رویان‌زایی در کلزا شدند اما در کل این پیش‌تیمار 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 انجام‌شده 2,4-D به‌عنوان یک تنش نو در القای آندروژنز و رویان‌زایی میکروسپورهای گندم معرفی می‌شود (۱).

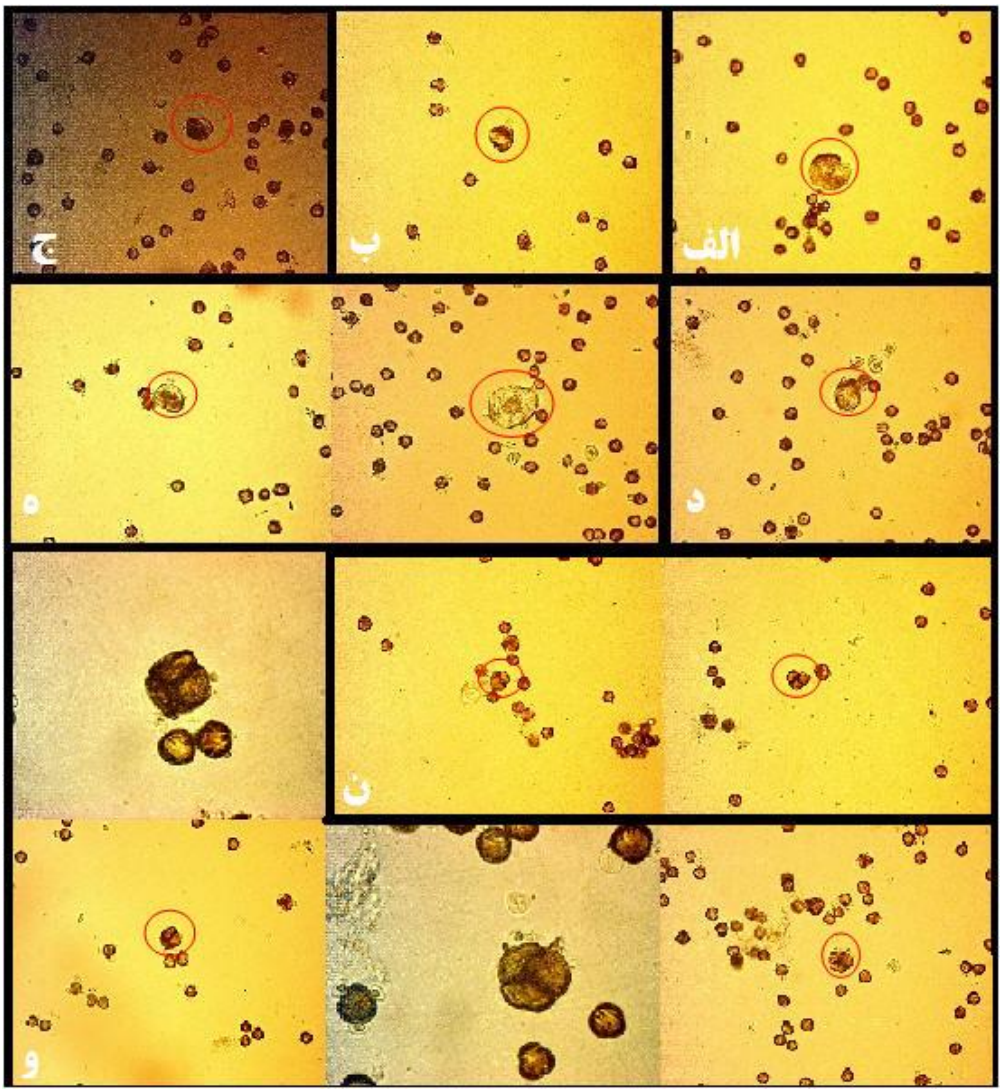
آزمایش ۳: القای تنش شیمیایی با PEG

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 (شکل۳ـ الف، ب و ج). دیوارهٔ میکروسپورها با تنش ۰/۶۱- و ۰/۸۴- مگاپاسکال PEG پس از متورم‌شدن میکروسپور، شروع به ترکیدن کردند (شکل۳ـ د و ه)؛ سپس تقسیم سلولی در این میکروسپورها ایجاد شد (شکل۳ـ ن و و). بیشترین تغییرات مطلوب در تیمار PEG ۰/۸۴- مگاپاسکال مشاهده شد.

نتایج این پژوهش کاملاً با پژوهش انجام‌شده 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 پیش‌تیمارهای شیمیایی و نو در کشت میکروسپور به‌حساب می‌آید که کمتر از آن استفاده شده است. از دیگر مثال‌های موفق استفاده از PEG-4000 به‌عنوان 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 به‌نوعی ایجاد تنش گرسنگی بر روی میکروسپورها و درنهایت فعال‌سازی مسیر توسعه‌ای اسپوروفیتی می‌شود (۳۲).

آزمایش۴: اتانول

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



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

تنها در تیمار ۵۰ میلی‌لیتر بر لیتر اتانول میکروسپورهای متورم‌شده محدودی مشاهده شد (شکل۴ـ الف). ازجمله معدود موارد موفق گزارش‌شده در استفاده از اتانول به‌عنوان نتش‌زا در القای آندروژنز می‌توان به تعداد محدود رویان تولدشده در کلزا اشاره کرد (۲۶). به نظر می‌رسد در بیشتر موارد گزارش‌شده اتانول سبب ایجاد سمّیت در میکروسپورها و درنهایت مرگ آن‌ها می‌شود (۳۲).

آزمایش۵: تنش pH بالا

نتیجهٔ 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 (شکل۴ـ 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

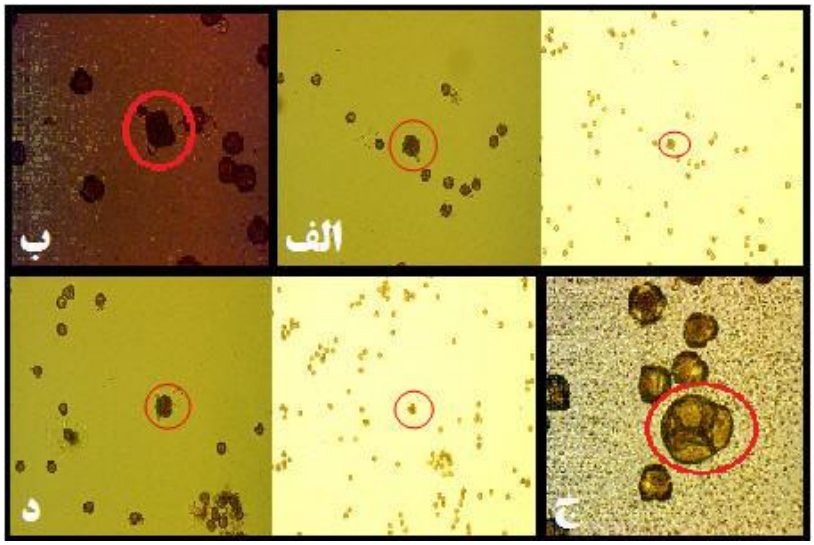
'Zhonggan No. 8' بهترین نتایج گرفته شد و بیشترین رویان‌زایی هاپلوئیدی به دست آمد (۳۵). در گل میمون و تنباکو با pH مساوی ۶/۵ بیشترین میزان ساختار چندسلولی ایجاد شد اما در pH مساوی ۷، ۸ و ۸/۵ میزان پاسخ به آندروژنز کمترین مقدار بود.

پاسخ‌ندادن به آندروژنز در pH های بسیاربالا می‌تواند به‌علت فاصله‌گرفتن از pH بهینه در کشت میکروسپور (pH مساوی ۵/۸) باشد، که سبب ایجاد شرایط نامطلوب برای تقسیم میکروسپورها می‌شود. به‌طورکلی، 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).

آزمایش۶: تنش سانتریفیوژ با دور بالا

پیش‌تیمار سانتریفیوژ با دور g ۱۱ هزار (۸۰۹۸/۹۷ rpm) و به‌مدت ۳۰ دقیقه بعد از جداسازی و قبل از کشت میکروسپورها سبب تولید میکروسپورهای متورم در محیط کشت شد (شکل۴ـ د).

در فرایند القای آندروژنز نیاز به تغییر مسیر میکروسپورها از مرحلهٔ گامتوفیتی به اسپروفیتی است، که در این فرایند ابتدا میکروسپورها متورم می‌شوند و برخی اوقات سوسپانسور تولید می‌کنند؛ سپس با تقسیم سلولی، ساختار چندسلولی ایجاد می‌شود و درنهایت رویان‌های هاپلوئید از این ساختار چندسلولی پدید می‌آیند (۳، ۳۲ و ۳۳). در این پژوهش برای اولین‌بار، کشت میکروسپور لیسیانتوس در دنیا انجام شد و نتایج امیدوارکننده‌ای با دستیابی به ساختار چندسلولی در زمینهٔ رسیدن به القای آندروژنز در لیسیانتوس به‌دست آمد. شایان ذکر است که لیسیانتوس از معدود گل‌های شاخه‌بریده و با ارزش تجاری بالایی است که با بذر تکثیر می‌شود. مراحل اولیهٔ 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. مشاهدهٔ ساختار چندسلولی در کشت میکروسپور این گل باارزش، برای اولین‌بار در دنیا، نتیجهٔ امیدوارکننده‌ای برای ادامهٔ پژوهش‌ها در این زمینه و کوتاه‌ترکردن مسیر تولید بذر F_1 این محصول را فراهم آورده است.



شکل ۴. الف) میکروسپورهای متورم‌شده 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

نتیجه‌گیری کلی

از مجموعهٔ آزمایش‌های انجام‌شده پیش‌تیمارهای تنش سرمایی ۴ °C به‌مدت یک روز، گرمای ۳۵ °C به‌مدت ۱ و ۲ روز، 2,4-D با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر، تیمار ۰/۸۴- مگاپاسکال PEG-4000 و همچنین pH مساوی ۷ بهترین تیمارها برای القای آندروژنز در لیسیانتوس ارزیابی شدند. بر اثر این تیمارهای تنشی بیشترین تقسیم سلولی و ساختار چندسلولی ایجاد شد. از میان تنش‌های ارزیابی‌شده، پیش‌تیمار ۳۵ °C به‌مدت یک روز کارآمدترین تنش، در القای آندروژنز لیسیانتوس بود.

منابع

۱. طایفه افشاری ب.، عنایتی شریعت‌پناهی م. و وهاب‌زاده م (۱۳۹۰) «بررسی جنین‌زایی میکروسپور در هیبریدهای مختلف گندم نان (Triticum aestivum L) و معرفی پیش‌تیمار تنشی D-۲،۴ برای افزایش کارایی جنین‌زایی». زیست‌فناوری گیاهان زراعی. ۱(۱): ۱۳-۲۱.

۲. عبدالهی 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 شریعت‌پناهی م. و امامی میبدی 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 شریعت‌پناهی م.، لطفی م.، عزیزی‌نیا ش. و ظل‌انوار ف (۱۳۹۰) «اثر متقابل غلظت‌های مختلف و انواع کربوهیدرات و پنج نوع محیط کشت بر آندروژنز رقم ماریچی سفید خالص لیسیانتوس Eustoma grandiflorum 'Mariachi Pure White'». هفتمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران.

۵. فخرائی م. م.، عرب م.، عنایتی شریعت‌پناهی م.، لطفی م.، عزیزی‌نیا ش. و ظل‌انوار ف (۱۳۹۰) «تأثیر رقم، اندازهٔ غنچه و مرحلهٔ تکامل دانه‌گرده (میکروسپوروژنز) بر آندروژنز گل لیسیانتوس Eustoma grandiflorum از طریق کشت میکروسپور». همایش ملی کشاورزی پایدار – دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین – پیشوا. ۱۳۳_ ۱۳۸.

۶. فخرائی م. م.، عرب م.، عنایتی‌شریعت پناهی م.، لطفی م.، عزیزی‌نیا ش. و ظل‌انوار ف (۱۳۹۰) «ارزیابی بهترین روش رنگ‌آمیزی هستهٔ میکروسپور گل لیسیانتوس Eustoma grandiflorum (با رنگ فلورسنتی DAPI و سه معرف استوکارمن، استواورسئین و فوشین)». هفتمین کنگرهٔ باغبانی ایران. ۳۵۷_ ۳۷۸.

۷. فخرائی م. م.، عرب م.، عنایتی‌شریعت پناهی م.، لطفی م.، عزیزی‌نیا ش. و ظل‌انوار ف (۱۳۹۰) «تعیین بهترین روش و محیط جداسازی (ایزوله‌کردن) و زمان و دور سانتریفیوژ در کشت میکروسپور گل لیسیانتوس Eustoma grandiflorum». هفتمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران.

۸. فخرائی م. م.، عرب م.، عنایتی شریعت‌پناهی م.، لطفی م.، عزیزی‌نیا ش. و یونسی حمزه‌خانلو م (۱۳۸۹) «بررسی مراحل تکامل دانه‌گرده (میکروسپوروژنز) در چند رقم گل لیسیانتوس Eustoma grandiflorum با استوکارمن». دومین کنگرهٔ ملی تخصصی زیست‌شناسی محققان سراسر کشور. ایران. صفحه ۴۴۰.

۹. ناصریان خیابانی ب.، مجد ف.، ودادی س.، رحمانی ا. و موسوی شلمانی م. ا (۱۳۸۴) «بررسی تأثیر ژنوتیپ، پیش‌تیمار سرمایی، دزهای پایین اشعهٔ گاما و هورمون 2,4-D در واکنش به کشت پرچم گندم». مجلهٔ علوم زراعی ایران. ۷(۱): ۸۶–۹۶.

10. Bakos F, Fábián 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.

16. Halvy AH and Kofranek AM (1984) Evalution 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, Ribaritst 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.

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, Ruckenbauer 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 annuum 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.