مجله علمی ترویجی گل و گیاهان زینتی (۱۳۹۵)، ۱(۲): ٤٤- ٥٠

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

احمدی تکتم[۱ و ۲]، 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: ۱۳۹٤/۰۲/۱٦، تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹٤/۰٦/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۷/۱۹

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-15 at 23:34 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.4.9]

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 (NLN، AB، B)، محیط کشت القایی (NLN، A2، AT_3(I)، AT_3(II) و AT_3(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 AT_3(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

یکی از روش‌های به‌نژادی، کاهش سطح پلوئیدی است که شامل: ایجاد بافت‌ها یا گیاهان هاپلوئید (n۱) از والدین هتروزیگوت و دو برابر کردن کروموزوم‌ها در بافت‌ها یا گیاهان برای به دست آوردن گیاهان دیپلوئید (n۲) که به عنوان هاپلوئیدهای دو برابر شده شناخته شده‌اند، می‌باشد. در سطح هاپلوئیدی هر ژن منفرد است. بعد از دو برابر 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 (gynogensis) 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

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 دی هاپلوئید 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 دابل‌هاپلوئید)، 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 مارکرمولکولی، 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 نرزایی، 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 تحقیق بررسی اولیه عوامل موثر بر القای مسیر جنین‌زایی در میکروسپورهای 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 پیما ۱۳۸۵). برای تعیین دقیق‌تر مرحله تکامل میکروسپورها در مراحل مختلف نموی، میکروسپورها با استفاده از ۲۰µl 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).

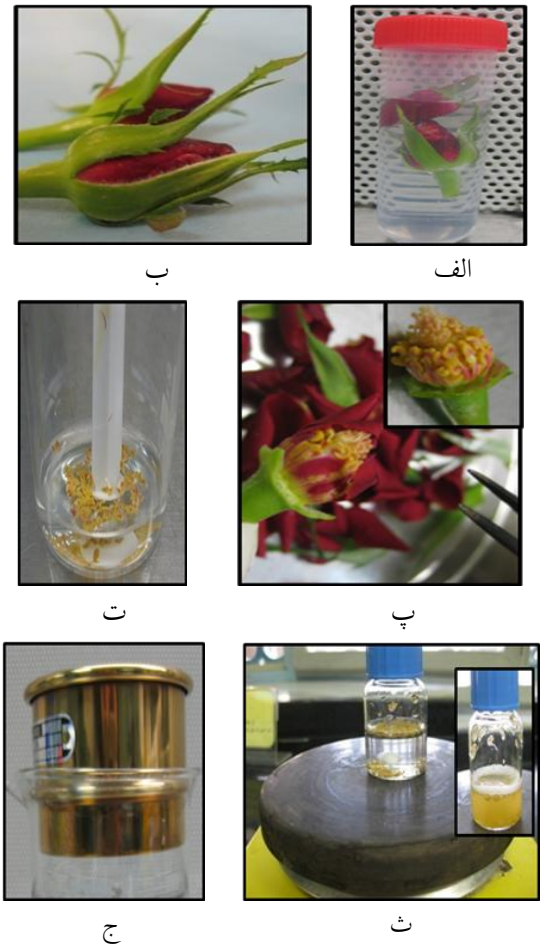
جداسازی و کشت میکروسپورها

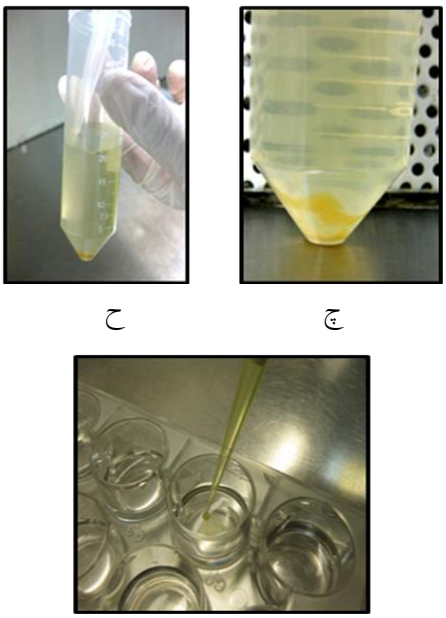
پس از ضدعفونی کردن، غنچه‌ها، کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها را جدا کرده (شکل ۱- پ) و بساک‌ها به منظور جداسازی میکروسپورها در درون بشر حاوی محیط شستشو (NLN-13، AB و B) قرار گرفتند و با دو روش، جداسازی انجام شد: الف) له کردن بساک با استفاده از پیستون انتهای سرنگ: که در این روش بساک‌ها درون محیط شستشو با استفاده از انتهای 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 ٤ دقیقه در روی همزن مغناطیسی با ۵۰۰ دور قرار داده شد

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-15 at 23:34 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.4.9]

(شکل ۱- ث). بعد از جداسازی، میکروسپورها ابتدا با مش اندازه ۹۰ و سپس ٦٣ میکرومتری فیلتر شدند (شکل ۱- ج) و محلول زرد رنگ حاصل داخل تیوب‌های ۵۰ میلی لیتری ریخته شد و با سرعت ۱۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤°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 ۱۰۰ µl 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.


الف ب پ ت ث ج


چ ح 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 pH = ۵/۸، A_2 (Indrianto *et al*. 1999) با pH = ٦/٢ و محیط پایه AT_3 (Touraev *et al*. 1996a) با سه منبع مختلف کربوهیدرات شامل AT_3(I) ۹۰ گرم در لیتر مالتوز، AT_3(II) ۱۸۰ گرم در لیتر مالتوز و AT_3(III) ۹۰ گرم در لیتر گلوکز و با pH = ٦/٢ می‌شدند. بعد از تهیه سوسپانسیون، میکروسپور در این سه محیط کشت شدند.

طرح آماری

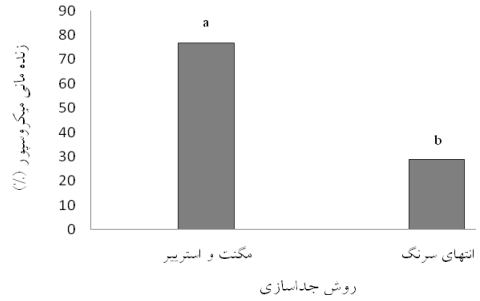
تیمارها با استفاده از مقایسات آماری دارای تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی و یا فاکتوریل با پایه کاملا تصادفی با حداقل سه تکرار مقایسه شدند. از نرم افزار SAS و MSTATC و مقایسه میانگین با آزمون LSD جهت آنالیز داده‌ها استفاده گردید.

نتایج و بحث

روش جداسازی و محیط شستشو

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-15]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.4.9]
[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-15 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

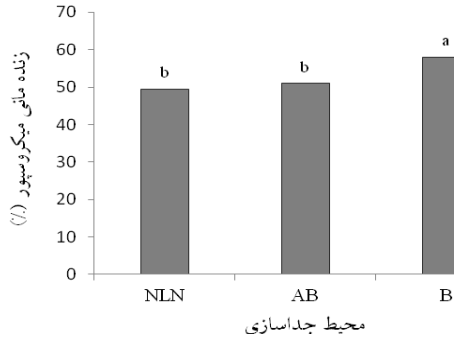
در بررسی روش جداسازی و محیط شستشو بین اثرات ساده تیمارها، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد، اما بین اثر متقابل روش جداسازی و محیط جداسازی اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت. در روش‌های جداسازی میکروسپور شامل روش آهن‌ربا و همزن مغناطیسی و روش انتهای سرنگ تفاوت معنی‌داری بین این دو روش وجود داشت. بیشترین درصد زنده‌مانی میکروسپور 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 میکروسپور برساند.



شکل ۲- اثر روش جداسازی بر درصد زنده‌مانی میکروسپور رز

حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ٥٪ با آزمون LSD می‌باشد.

در بین دو روش جداسازی، روش آهن‌ربا و همزن مغناطیسی صدمه کمتری به میکروسپورها رساند. در سال ۱۹۹۹ هوفر و همکاران در یک بررسی روش جداسازی میکروسپور 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 ٦۰ تا ۸۰ درصد میکروسپورها زنده بودند، در حالیکه با روش جداسازی با انتهای سرنگ درصد زنده‌مانی میکروسپورها ۲۷٪ بود. ویگو و همکاران در سال ۲۰۰۲ چهار روش جداسازی مختلف شامل ورتکس، همزن مغناطیسی، glass bar grinding و همزن را بر درصد زنده‌مانی میکروسپورهای گندم آزمایش کردند و نشان دادند که بیشترین درصد زنده‌مانی در روش جداسازی با مخلوط‌کن به دست آمد. شکل (۳) نشان می‌دهد که بیشترین درصد زنده‌مانی میکروسپور 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 میکروسپور تنباکو به کار برده شد. همچنین هوفر در سال ۱۹۹۹ این محیط را برای جداسازی میکروسپور سیب مورد استفاده قرار داد و بیشترین درصد زنده‌مانی و جنین‌زایی را به دست آورد.



شکل ۳- اثر محیط جداسازی بر درصد زنده‌مانی میکروسپور رز

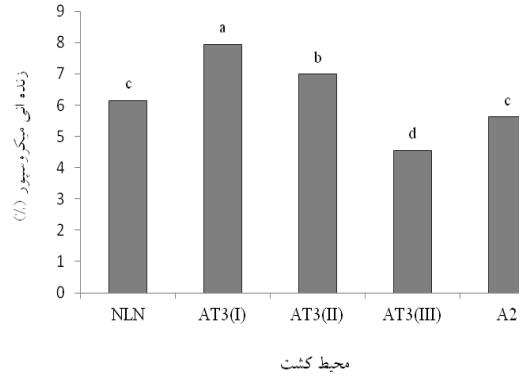
حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ٥٪ با آزمون LSD می‌باشد.

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 (٤) نشان می‌دهد که محیط کشت AT_3(I) حاوی ۹۰ گرم در لیتر مالتوز بیشترین درصد زنده‌مانی میکروسپور را به خود اختصاص داده است و زنده‌مانی تفاوت معنی‌داری وجود دارد. محیط کشت القایی یکی از فاکتورهای مؤثر در زنده‌مانی میکروسپور و تغییر مسیر رشد میکروسپور 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 میکروسپور ایفا می‌کند.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-15 at 23:34 +0330 on Tuesday December 15th 2020]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.4.9]

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



شکل ٤- اثر محیط کشت القایی بر درصد زنده‌مانی میکروسپور رز

حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ٥٪ با آزمون LSD می‌باشد.

نتایج این آزمایش نشان داد که میکروسپورهای 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 میکروسپورهای 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 میکروسپور گونه‌های مختلف می‌باشد. در گندمیان مالتوز مناسب ترین قند است، در حالیکه ساکارز، گلوکز و فروکتوز برای میکروسپور سمی هستند. در جو مشخص شده است که ساکارز به سرعت متابولیزه شده و با تجمع مقدار زیادی نشاسته از تکوین جنین جلوگیری می‌کند. در حالیکه مالتوز به کندی تجزیه شده و منجر به جنین‌زایی میکروسپور می‌شود. در کشت میکروسپور سیب، بیشترین درصد جنین‌زایی در محیط حاوی مالتوز و در محیط حاوی ساکارز کمترین درصد جنین‌زایی مشاهده شد (*et al.* 1999 Höfer). میکروسپورهای 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 میکروسپورهای 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 میکروسپور سیب نیز مناسب‌ترین غلظت مالتوز بین ۲۵۰ تا ۳۵۰ میلی مولار می‌باشد. بنا بر گزارشات به دست آمده، نوع و غلظت کربوهیدرات بستگی به گیاه و گونه دارد (*et al.* 1999 Höfer). دهستانی و همکاران(۱۳۹۱) با بررسی محیط کشت القایی AT_3 به همراه سه منبع کربوهیدرات (مالتوز، ساکارز و گلوکز)، بالاترین میزان زنده‌مانی میکروسپورها را در محیط AT_3 به همراه گلوکز در رقم Amorosa گزارش کردند. درحالیکه در مورد رقم Apollo تفاوت معنی‌داری در زنده‌مانی میکروسپورها 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 میکروسپور رز، عوامل مختلف موثر بر زنده‌مانی میکروسپور بررسی شدند. موارد ذیل از جمله عواملی است که در این آزمایش تأثیر زیادی بر روی زنده‌مانی میکروسپور داشت و

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-15]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.4.9]
[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-15 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

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 کارشناسی‌ارشد. دانشگاه مازندران.

دهستانی اردکانی م، کافی م، عنایتی شریعت پناهی م، جعفرخانی کرمانی م، فتاحی مقدم م و عروجلو 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): ۸۱-۷۱.

راه پیما س (۱۳۸۵). بررسی کشت بساک در رز (رز هیبرید و رز مینیاتوری). پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد 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, Heberie-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 Herberle-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.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-06]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.4.9]
[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-15 at 23:34 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

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 Maryam [1], Mashayekhi Kambiz[2]

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, AT_3 with 90 $g.L^{-1}$maltose, AT_3 with 180 $g.L^{-1}$ maltose, AT_3 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 AT_3 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*.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2020-12-06 at 23:34 +0330 on Tuesday December 15th 2020]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1395.1.2.4.9]