فصلنامه علمی - پژوهشی گیاه و زیست بوم
سال ۱۰، شماره ۴۱، زمستان ۱۳۹۳

تولید گیاهان دابل هاپلوئید کلزا از طریق القاء جنین‌زایی ثانویه در جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور

عباس یداللهی[۱]، محمدعبداللهی[۲]، محمود دانایی[۳]، کیانوش شیرمحمدی*[۳]

چکیده

در این آزمایش، اثر منابع مختلف کربن، اسید آبسزیک به تنهایی و به همراه پلی اتیلن گلیکول در غلظت های مختلف بر روی دو صفت درصد رویان‌های اولیه پاسخ ده به رویان‌زایی ثانویه و میانگین تعداد رویان‌های ثانویه در هر رویان اولیه در سه رقم گلوبال، پی اف و آپشن کلزا مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین اثرات متقابل برای صفت درصد رویان‌های پاسخ ده به رویان‌زایی ثانویه حاکی از این است که سوربیتول ۰/۲ و ۰/۳ مولار بیشترین اثر را روی درصد رویان زایی ثانویه را داشتند. در ارتباط با صفت میانگین تعداد رویان‌های القاء شده ثانویه روی رویان‌های اولیه رقم آپشن گلوکز ۰/۳ مولار بیشترین تعداد رویان ثانویه و فروکتوز در همه غلظت‌ها کمترین تعداد رویان ثانویه را به ازای هر رویان اولیه میکروسپوریتولید کردند. مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف اسید آبسزیک نشان داد که افزایش غلظت اسید آبسزیک بر القاء رویان های ثانویه اثر منفی داشته و غلظت صفر میلی‌مولار (شاهد) بیشترین تعداد رویان های ثانویه را تولید کرده است. اما در ارتباط با صفت بلوغ رویان‌های ثانویه روی رویان‌های اولیه، اسید آبسزیک در هر ۳ رقم اثر مثبت داشت. تجزیه واریانس اثر پلی‌اتیلن گلیکول و اسید آبسزیک بر صفت میانگین تعداد رویان‌های ثانویه القاء شده در رقم آپشن اختلافات معنی‌داری را بین سطوح اثر ساده پلی اتیلن گلیکول و اثرات متقابل پلی اتیلن گلیکول و اسید آبسزیک به ترتیب در سطح ۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ نشان داد، در حالی که، اثر ساده اسید آبسزیک معنی‌دار نگردید. همچنین تاثیر پلی‌اتیلن گلیکول و اثرات متقابل پلی اتیلن گلیکول و آبسزیک اسید بر بلوغ رویان‌های ثانویه، به ترتیب در سطح ۱و ۵ درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول برای صفت میانگین تعداد رویان‌های ثانویه القاء شده بر روی رویان های اولیه میکروسپوری در رقم گلوبال حاکی از آن است که پلی اتیلن گلیکول در رویان‌زایی ثانویه اثر منفی داشته و باعث کاهش این صفت گردیده است.

واژه‌های کلیدی: کلزا، کشت میکروسپور، جنین‌زایی ثانویه، اسید آبسزیک، پلی اتیلن گلیکول

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن باشگاه پژوهشگران جوان ، رودهن. ایران
۲- دانشگاه بوعلی همدان، دانشکده کشاورزی، گروه کشاورزی. همدان. ایران
۳- دانشگاه آزاداسلامی واحد رودهن ، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات ،رودهن، ایران
* مکاتبه کننده: (shkiyanoosh@yahoo.com)

تاریخ دریافت: تابستان ۹۰ تاریخ پذیرش: زمستان ۹۰

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

کلزا با نام علمی *Brassica napus* L. و نام انگلیسی Rapeseed، از خانواده Brassicaceae (کلمیان) و دارای ۳۸ کروموزوم (2n= 4x =38) می‌باشد. از نظر گیاهشناسی، کلزا گیاهی علفی و خودگشن با دوره رشد یک ساله و میزان خودگشنی آن بیش از ۷۰ ٪ می‌باشد (عزیزی و همکاران، ۱۳۷۸). کلزا به دلیل داشتن اهمیت غذایی ویژه، در دنیا مورد توجه اصلاح گران قرار گرفته است. به طوری که کشورهایی مانند چین، کانادا، هند و کشورهای اروپایی نظیر فرانسه، آلمان و انگلستان در زمینه تولید این گیاه به پیشرفت‌های قابل توجهی رسیده‌اند و در مجموع ۹۸/۴ درصد تولید جهانی کلزا را بر عهده دارند. این گیاه پس از سویا و نخل روغنی مقام سوم را در تامین روغن جهانی دارد و حدود ۱۴/۷ درصد تولید روغن نباتی جهان را به خود اختصاص داده است (بی نام، ۱۳۸۲).

مهم‌ترین روش‌های اصلاحی که برای اصلاح کلزا به کار می‌روند عبارت‌اند از: انتخاب توده‌ای، به نژادی شجره‌ای، گزینش بالک، تلاقی برگشتی، انتخاب دوره‌ای، اصلاح واریته‌های ساختگی و به کارگیری دورگ‌ها. از معایب این روش‌ها طولانی بودن دوره آن‌ها می‌باشد. امروزه، متخصصین اصلاح نباتات به دنبال روش‌های دیگری هستند که بتوانند این مدت را به حداقل ممکن برسانند تا در وقت و هزینه‌های سنگین برنامه‌های اصلاح نباتات صرفه‌جویی شود. اصلاح از طریق سیستم هاپلوئیدی از جمله این روش‌ها می‌باشد.

یکی از روش‌های تولید گیاهان هاپلوئید آندروژنز (نرزایی) است که گامت‌های نر به صورت رویان تکامل می‌یابند که این روش در بسیاری از گیاهان زراعی استفاده شده است (Poehlman & Sleper, 1995). آندروژنز شامل کشت بساک و میکروسپور می‌شود. در واقع یک واحد ژنتیکی (میکروسپور) و خاصیت توتی پتنسی سلول گیاهی، اساس کشت بساک را برای تولید گیاه هاپلوئید تشکیل می‌دهد. میکروسپورهای داخل بساک به جای تولید گامت نر تغییر مسیر داده و کالوس یا رویان تولید می‌نمایند (Kumar, 1995).

کشت میکروسپور کلزا

کشت میکروسپور کلزا برای اولین بار توسط Lichter (1982) گزارش شد. برای اولین بار در ایران، پاسخ به کشت میکروسپورهای ایزوله کلزا در سه رقم بهاره گلوبال (Global)، پی اف (PF_{704}) و مالوکا (Maluka) و سه رقم پاییزه شامل Ceres، Slmo46 و Bounty، طی سه مرحله آزمایش بررسی گردید که طی آن، تعداد محدودی رویان و گیاه به دست آمد که در نوع خود اولین قدم موفقیت‌آمیز محسوب میگردید (باقری، ۱۳۷۹). در تحقیق دیگرییک رقم کلزای بهاره گلوبال و دو رقم پاییزه Colvert و Okapi از نظر پاسخ به کشت میکروسپور مورد مقایسه قرار گرفتند و با توجه به بهتر شدن شرایط رشد گیاهان مادری، تعداد زیادی رویان به دست آمد (خنجی، ۱۳۸۰).

درتحقیقات بعدی،به منظور بهینه‌سازی رویان‌زایی میکروسپور در ارقام پاسخ ده و باززایی گیاه از رویان‌های هاپلوئید، فاکتورهای مختلفی از جمله اثر شوک‌های گرمایی و تراکم میکروسپور بر روی رویان‌زایی و نیز اثر اندازه رویان بر روی باززایی رویان‌های هاپلوئید به دست آمده عبدالهی (۱۳۸۱)، اثر حجم محیط کشت و نوع ظرف مورد استفاده بر روی میزان رویان‌زایی میکروسپورها، حبیبی (۱۳۸۲) استفاده از زغال فعال، نوع هیدرات کربن

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده شده در محیط کشت و اثر رژیم نوری بر روی باززایی گیاه از رویان‌های هاپلوئید (شریفی، ۱۳۸۲)، استفاده از غلظت‌های مختلف هورمون‌های اسید جیبرلیک (GA_3) و اسید آبسزیک (ABA) و آبگیری رویان‌ها در زمان‌های مختلف در آزمایشات باززایی گیاه، حدادی (۱۳۸۳) در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس مطالعه شدند.

Nehlin *etal* (1995) اثرات تیمارهای مختلفی اعم از تیمارهای فیزیکی و تیمارهای هورمونی در شرایط نور و تاریکی را برای القاء جنین‌زایی ثانویه، بر روی جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور کلزا، رقم *توپاس*[1]، بررسی کرده‌اند. در این مطالعه، بهترین نتایج در زمینه القاء جنین‌زایی ثانویه، با کشت حدود ۱۰ جنین کامل بدون زخم در پتری دیش‌هایی با حجم ml ۱۲-۱۰ محیط کشت و با قطر cm ۹ و در شرایط تاریکی و بدون افزودن تنظیم کننده‌های رشد به دست آمد.

همچنین، در تحقیق دیگری مشاهده گردید که میزان جنین‌زایی ثانویه در گیاه کلزا پریمور[2]، در حضور غلظت‌های بالای اکسین و سیتوکینین در محیط کشت کاهش می‌یابد و در این تحقیق لایه های سلولی نازک، قادر به تولید جنین‌های ثانویه بیشتری بودند (Shu & Loh, 1987). هدف از انجام این آزمایش بررسی تاثیرات منابع مختلف کربن و اسید آبسزیک به همراه پلی‌اتیلن گلیکول بر میزان جنین‌زایی ثانویه در جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور بود.

مواد و روش‌ها

سه رقم کلزای بهاره گلوبال (Global)، پی اف (PF_{704}) و آپشن (Option)، تهیه شده از شرکت سهامی خاص توسعه کشت دانه های روغنی مواد گیاهی این تحقیق را تشکیل دادند .بذور گیاهان مادری در اتاق رشد با شدت نور ۵۵۰۰ لوکس (۳۰۰ $Em\mu^{-2}S^{-1}$)، فتوپریود h ۱۶/۸ (تاریکی/ روشنایی) و دمای °C ۱۵/۱۰ (شب/روز) قرار داده شدند. حدودا ۶۰ روز پس از کشت و شروع غنچه‌دهی، با توجه به نتایج آزمایش‌های گذشته و همچنین مقالات مختلف، غنچه‌هایی به طول ۳/۵-۲/۵میلی‌متر که‌بهترین‌غنچه‌ها‌برای کشت میکروسپور می‌باشند، از این گیاهان انتخاب و برداشت شدند.

ابتدا ۱۰۰ عدد غنچه با اندازه ۳/۵ـ۲/۵ میلی‌متر، که حاوی میکروسپورهای رویان زا بودند، از گیاهان کشت شده در اتاق رشد انتخاب گردیدند و با سدیم هیپوکلریت ۵/۲۵٪ (وایتکس) به مدت ۱۰ دقیقه به طور کامل سترون و ضدعفونی شده و دو مرتبه با آب مقطر سترون و سرد شده در دمای °C۴، هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه، شستشو داده شد.

غنچه‌های سترون شده توسط پنس به داخل کاپ آسیاب منتقل شدند.و ml ۳۰ محیط جداسازی میکروسپورها به داخل کاپ اضافه گردید.محیط جدا سازی میکروسپورها در این تحقیق، طبق یک پروتکل کانادایی تهیه گردیدکه حاوی۱۳٪ ساکارز با pH=۶ و فاقد هر گونه هورمون بود (Fletcher *etal*., 1998). غنچه‌ها، طی ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۱۰ ثانیه آسیاب شدند. سوسپانسیون حاصل از آسیاب‌کردن‌غنچه‌ها،به ترتیب از دو الک آزمایشگاهی با سوراخ‌هایی به قطر ۱۰۶ و ۵۳ میکرومتر که بر روی هم قرار داشتند، عبور داده شد. سوسپانسیون میکروسپورها به لوله‌های سانتریفیوژ سترون منتقل شدند و سپس این لوله‌ها با ۱۲۷۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. میکروسپورهای

[1]-*Brassica napus cv. Topas*

[2]-*Brassica napus olifera cv*

Archive of SID
www.SID.ir

رسوب کرده دوباره به همراه ۲۵ml محلول جداسازی سانتریفیوژ شدند. دوباره محلول بالای میکروسپورها حذف گردید و میکروسپورها به طور خالص در ته لوله‌های سانتریفیوژ باقی ماندند. تراکم به کار رفته در کل آزمایش‌ها، ۴۰۰۰۰ میکروسپور در هر میلی‌لیتر محیط کشت بود. پس از تعیین تراکم میکروسپور مورد نیاز، سوسپانسیون حاوی میکروسپورها،به‌حجم‌جدیدرسانده‌شد و سوسپانسیون حاصل در داخل پتری دیش‌های شیشه‌ای به ابعاد ۱۵mm×۱۰۰، به مقدار ml ۱۲/۵، توزیع و به انکوباتوری با دمای $30^{\circ}C$ و تاریکی منتقل شدند.

محیط کشت باززایی استفاده شده در این آزمایش، محیط B_5حاوی mgl^{-1} ۰/۱ اسیدژیبرلیک بود Gamborg *etal* (1968) رویان‌های ۳۰ روزه لپه‌ای شکل به اندازه حدود ۶ میلی‌متر پس از القاء رویان‌زایی ثانویه، به این محیط کشت منتقل گردیدند (در هر پتری دیش ۱۰ عددرویان قرار داده شد).

در قسمت اول این آزمایش اثر منابع مختلف کربن در غلظت‌های مختلف بر روی دو صفت درصد رویان‌های اولیه پاسخ ده به رویان‌زایی ثانویه و میانگین تعداد رویان‌های ثانویه در هر رویان اولیه در سه رقم گلوبال، پی اف و آپشن مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش برای هر رقم در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد به این ترتیب که منبع کربن در ۴ سطح شامل (ساکاروز، گلوکز، فروکتوز و سوربیتول) به عنوان عامل اول و غلظت منبع کربن نیز در ۴ سطح (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴مولار) به عنوان فاکتور دوم در ۳ تکرار (هر پتری دیش یک تکرار) نظر گرفته شد. لازم‌به ذکراست که سه منبع کربن گلوکز، فروکتوز و سوربیتول همراه با ساکاروز ۰/۱ مولار استفاده شدند.

در قسمت دوم این تحقیق اثر پلی اتیلن گلیکول و اسید آبسزیک بر روی نرخ رویان‌زایی ثانویه و بلوغ این رویان‌ها (تعداد رویان‌های ثانویه در مرحله اژدری شکل) در۳ رقم گلوبال، پی اف و آپشن بررسی گردید. برای این منظور در یک آزمایش اثر اسید آبسزیک با ۶ غلظت مختلف شامل (۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰میکرومولار)بر روی نرخ رویان‌زایی ثانویه و بلوغ رویان‌ها در قالب یک طرح به طور تصادفی با ۳ تکرار بررسی گردید. در آزمایش سوم اثر متقابل اسید آبسزیک و پلی‌اتیلن گلیکول بر روی رویان‌زایی ثانویه و بلوغ رویان‌های ثانویه به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب یک طرح به طور کامل تصادفی در ۳ تکرار بررسی گردید. در این آزمایش پلی اتیلن گلیکول در ۳ سطح (۴۰۰۰،۶۰۰۰ و شاهد) به عنوان فاکتور اول و اسید آبسزیک در ۲ سطح (۰ و ۴۰ میکرو مولار) به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شد.

نتایج

تجزیه واریانس برای اثر نوع و غلظت منبع کربن بر روی دو صفت میانگین تعداد رویان های القاء شده ثانویه در هر رویان میکروسپوری اولیه و درصد رویان‌های پاسخ ده به رویان‌زایی ثانویه در ارقام مورد مطالعه در جدول ۱ خلاصه شده است. بر اساس نتایج حاصل، اثر نوع منبع کربن، غلظت منبع کربن و اثرات متقابل آن‌ها بر روی دو صفت مورد مطالعه در معنی‌دار ($P<0.01$) بودند. به خاطر معنی‌دار شدن اثرات متقابل دو عامل، مقایسه میانگین‌ها برای اثرات ساده انجام نشد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱- تجزیه واریانس تعداد رویان های ثانویه در هر رویان اولیه و درصد رویان های پاسخ ده به رویان‌زایی ثانویه در ارقام مختلف

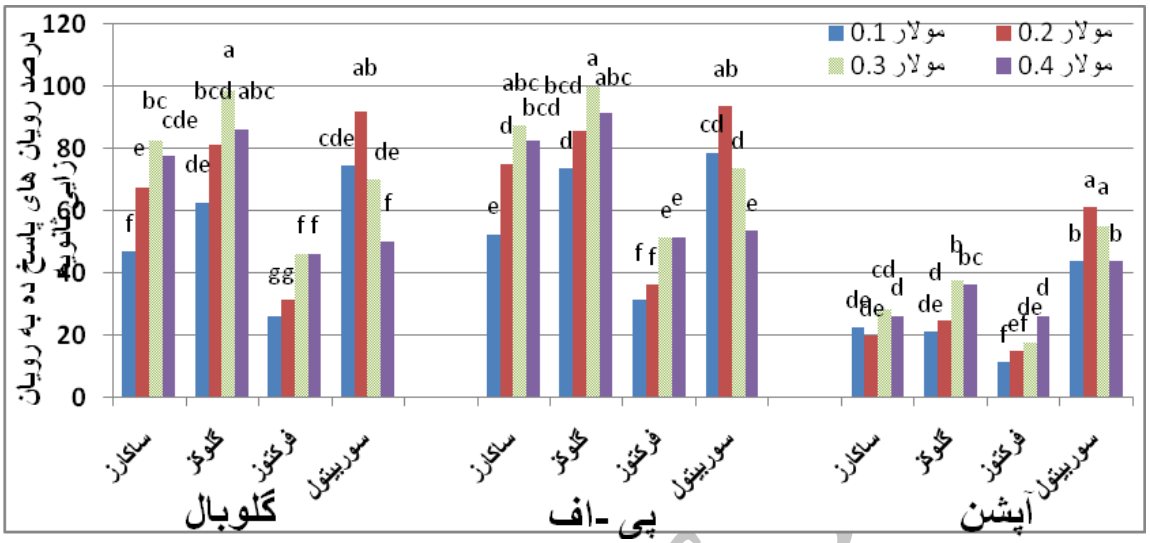
منابع تغییرات	میانگین مربعات					
	تعداد رویان های ثانویه در هر رویان اولیه			درصد رویان های پاسخ ده به رویان‌زایی ثانویه		
	پی-اف	گلوبال	آپشن	پی-اف	گلوبال	آپشن
رقم	482.5***	7.5***	1.878***	4528.5***	4674.1***	2579.6***
منبع کربن	145.5***	1.3***	.773***	745.1***	810.2***	238.0***
غلظت	22.6***	1.2***	.174***	478.9***	531.1***	108.4**
منبع کربن × غلظت						

** معنی دار در سطح ۱٪

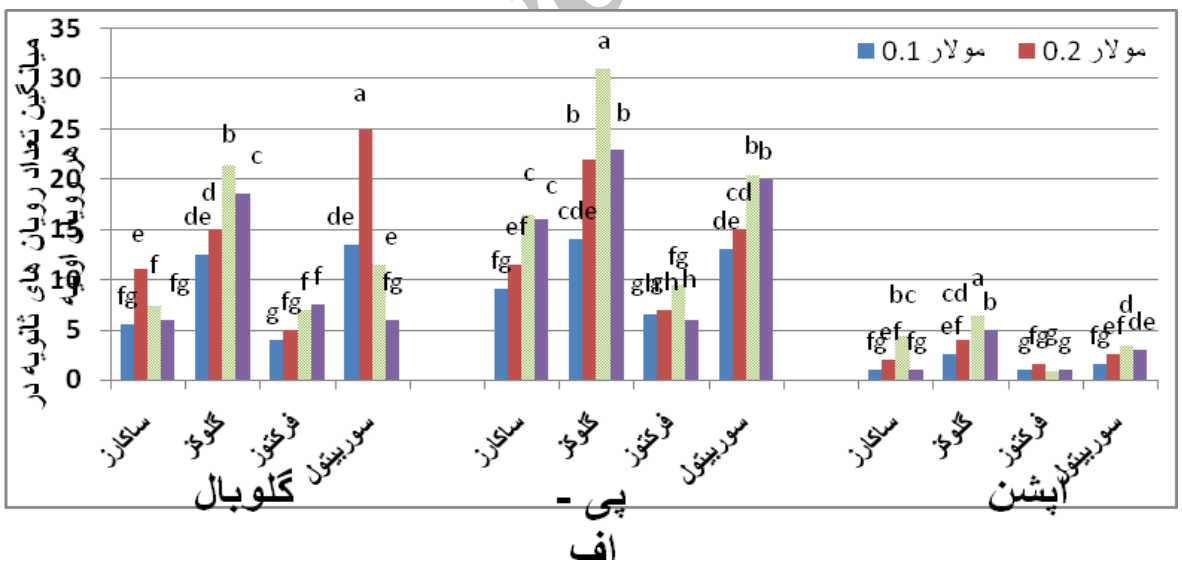
در رقم پی- اف مقایسه میانگین اثرات متقابل برای صفت درصد رویان‌های پاسخ ده به رویان‌زایی ثانویه نشان داد که گلوکز ۰/۳ مولار به همراه ساکاروز ۰/۳ مولار وسوربیتول ۰/۲ مولار بیشترین مقدار را داشته در حالی که فروکتوز ۰/۱ و ۰/۲ مولار کمترین اثر را بر رویاین صفت نشان دادند. در ارتباط با صفت میانگین تعداد رویان‌های القاء شده ثانویه بر روی رویان‌های اولیه در رقم پی اف، گلوکز ۰/۳ مولار بیشترین تعداد رویان ثانویه را به ازای هر رویان اولیه میکروسپوری تولید کرد. در رقم گلوبال، گلوکز ۰/۳ مولار به همراه سوربیتول ۰/۲مولار بیشترین درصد رویان‌زایی ثانویه را داشتند. در حالی که در این رقم نیز فروکتوز ۰/۱ و ۰/۲ مولار کمترین اثر را بر روی رویان‌زایی ثانویه نشان دادند. در ارتباط با صفت میانگین تعداد رویان‌های القاء شده ثـانویه بـر روی رویـان‌های اولیه رقـم گلوبال سوربیتول ۰/۲ مولار بیشترین تعداد رویان ثانویه وفروکتوز ۰/۱ مولار کمترین تعداد رویان ثانویه را به ازای هر رویان اولیه میکروسپوری تولید کردند. در رقم آپشن برای صفت درصد رویان‌های پاسخ ده به رویان‌زایی ثانویه سوربیتول ۰/۲ و ۰/۳ مولار بیشترین اثر را داشت. در ارتباط با صفت میانگین تعداد رویان‌های القاء شده ثانویه بر روی رویان‌های اولیه رقم آپشنگلوکز ۰/۳ مولار بیشترین تعداد رویان ثانویه و فروکتوز در همه غلظت‌ها کمترین تعداد رویان ثانویه را به ازای هر رویان اولیه میکروسپوری تولید کردند (شکل۱).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱- مقایسه اثرات متقابل انواع قند و غلظت بر روی درصد رویان های پاسخ ده به رویان‌زایی ثانویه در ارقام مختلف



شکل۲- مقایسه اثرات متقابل انواع قند وغلظت بر روی میانگین تعداد رویان های ثانویه در هر رویان اولیه در ارقام مختلف

www.SID.ir

اثر توأم اسید آبسزیک و پلی اتیلن گلیکول بر روی رویان‌زایی ثانویه و بلوغ رویان های ثانویه بر روی رویان های اولیه حاصل از کشت میکروسپور کلزا ارقام گلوبال، پی اف و آپشن بررسی گردید.

نتایج جدول تجزیه واریانس برای صفت میانگین تعداد رویان‌های ثانویه در هر رویان اولیه در رقم گلوبال اختلافات معنی‌داری را در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ درصد به ترتیب برای اثرات پلی اتیلن گلیکول و اسید آبسزیک نشان داد. اثرات متقابل پلی اتیلن گلیکول و اسید آبسزیک اختلاف معنی داری از نظر تعداد رویان‌های ثانویه القا شده بر روی رویان‌های اولیه نشان ندادند. در ارتباط با بلوغ رویان‌های ثانویه رقم گلوبال بر روی رویان های اولیه میکروسپوری اثرات ساده پلی اتیلن گلیکول و اسید آبسزیک اختلافات معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ درصد و اثرات متقابل پلی اتیلن گلیکول و اسید آبسزیک اختلافات معنی‌داری در سطح ۰/۰۵درصد نشان دادند .(جدول۳)

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر ABA و پلی اتیلن گلیکول بر روی میانگین تعداد رویان های ثانویه در هر رویان اولیه و درصد رویان های پاسخ ده به رویان زایی ثانویه در ارقام مختلف

میانگین مربعات

منابع تغییرات	تعداد رویان های ثانویه در هر رویان اولیه			درصد رویان های پاسخ ده به رویان زایی ثانویه		
	پی-اف	گلوبال	آپشن	پی-اف	گلوبال	آپشن
منبع تغیر						
پلی اتیلن گلیکول	۲۳/۷***	۱۳/۴**	۱۰/۰۶***	۲۰۲۶/۳***	۱۸۸۵/۷***	۳۰۸۴/۲***
اسید آبسزیک	۶/۰**	۶۰/۸***	۰/۹۳^{ns}	۱۹/۵^{ns}	۲۳۲۳/۶***	۳۲۱/۲*
پلی اتیلن گلیکول × اسید آبسزیک	۵/۱**	۳/۱^{ns}	۴/۲۵**	۸۷۸/۳***	۱۲۴/۷*	۱۴۵۷/۹***

*، **، ns: به ترتیب معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد و عدم اختلاف معنی

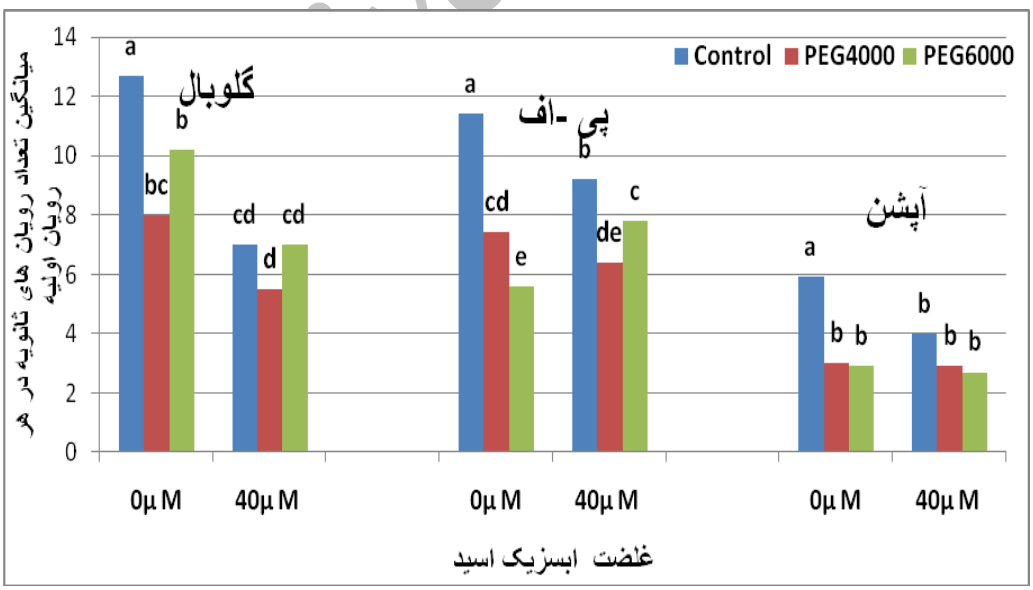
Archive of SID

www.SID.ir

آنالیز واریانس رقم پی اف برای اثرات پلی اتیلن گلیکول و اسید آبسزیک بر روی صفت میانگین تعداد رویان‌های ثانویه به ازای هر رویان اولیه، اختلافات معنی‌داری را برای اثرات ساده پلی اتیلن گلیکول، اسید آبسزیک و اثرات متقابل در سطح ۰/۰۱درصد نشان داد. برای صفت بلوغ رویان‌های ثانویه نیز اختلافات معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ درصد بین اثر ساده پلی‌اتیلن گلیکول و اثرات متقابل پلی اتیلن گلیکول و اسید آبسزیک مشاهده گردید ولی سطوح ساده اسید آبسزیک اختلاف معنی‌داری نشان ندادند.(جدول۳)

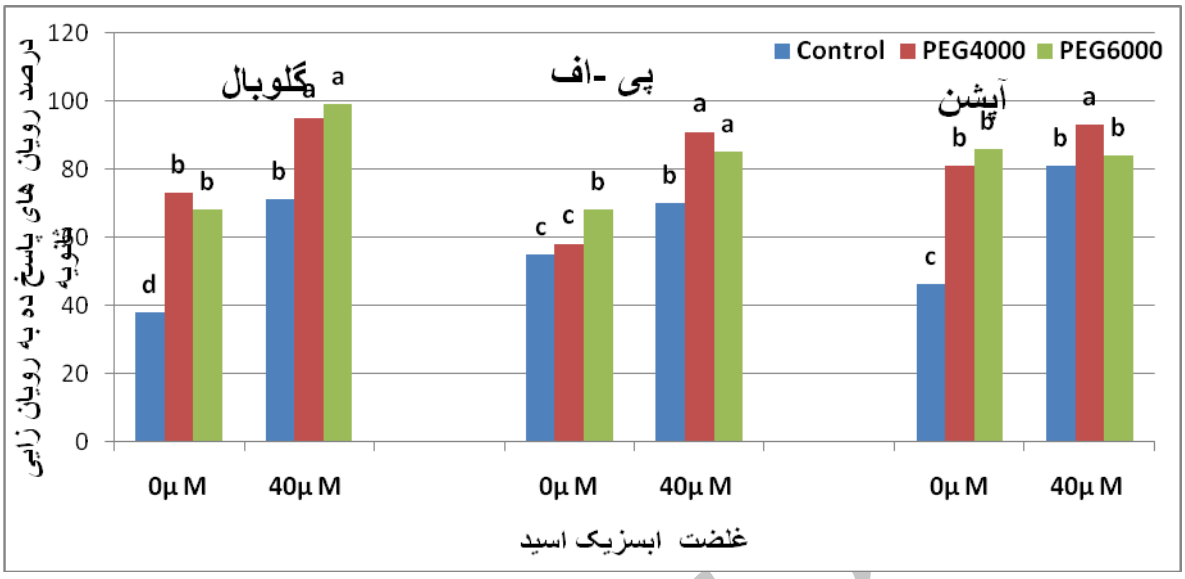
آنالیز واریانس اثر پلی‌اتیلن گلیکول و اسید آبسزیک بر روی صفت میانگین تعداد رویان‌های ثانویه القاء شده در رقم آپشن اختلافات معنی‌داری بین سطوح اثر ساده پلی اتیلن گلیکول و اثرات متقابل پلی اتیلن گلیکول و اسید آبسزیک به ترتیب در سطح ۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ درصد نشان داد در حالی که اثر ساده اسید آبسزیک معنی‌دار نگردید. در ارتباط با صفت بلوغ رویان‌های ثانویه سطوح اثر ساده پلی‌اتیلن گلیکول و اثرات متقابل پلی اتیلن گلیکول و اسید آبسزیک به ترتیب در سطح ۰/۰۰۱ درصد و سطوح اثر ساده اسید آبسزیک در سطح ۰/۰۵ درصد اختلافات معنی‌داری را نشان دادند (جدول۳).

مقایسه میانگین اثرات برای صفت متوسط تعداد رویان‌های ثانویه القاء شده در دو رقم پی اف و آپشن نشان می‌دهد که هم آبسزیک اسید و هم پلی اتیلن گلیکول اثرات کاهشی بر روی القاء رویان‌های ثانویه داشته اند و تیمار شاهد بیشترین تعداد رویان‌های ثانویه را تولید کرد. اما استفاده از پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰۰ همراه با ۴۰ میکرو مولار اسید آبسزیک بیشترین اثر را در بلوغ رویان‌های ثانویه القاء شده در هر ۳ رقم گلوبال، پی اف و آپشن نشان داد (شکل ۳ و۴).

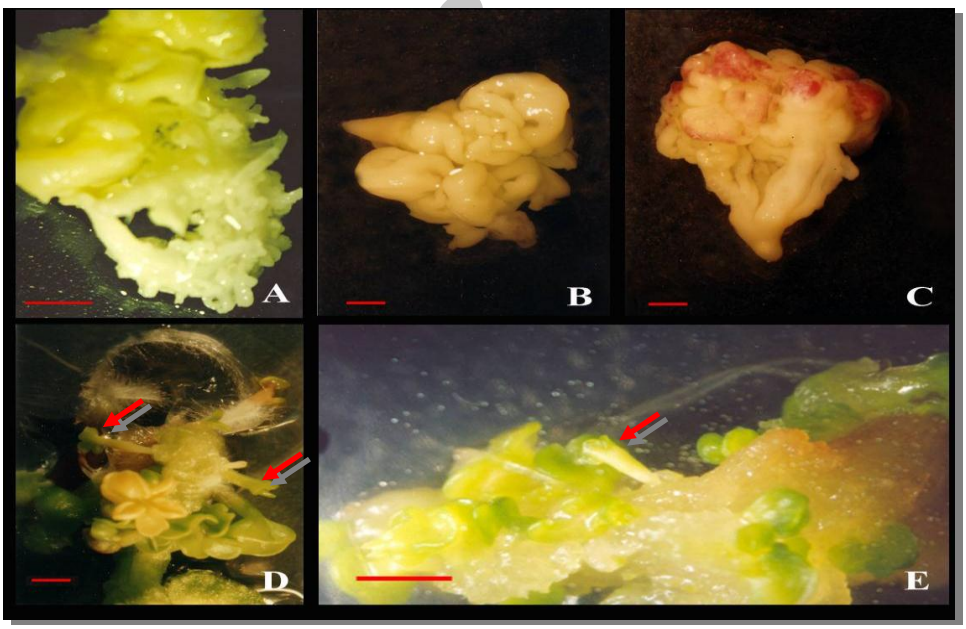


شکل ۳- اثرات متقابل کاربرد پلی اتیلن گلیکول و اسید آبسزیک بر روی تعداد رویان‌های ثانویه القاء شده بر روی رویان‌های حاصل از کشت میکروسپور کلزا ارقام گلوبال، پی اف و آپشن

www.SID.ir



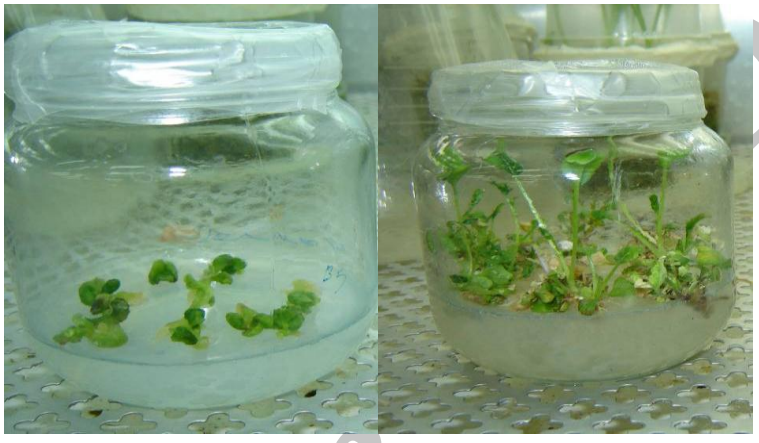
شکل۴- اثرات متقابل کاربرد پلی اتیلن گلیکول و اسید آبسزیک بر روی درصد رویان‌های پاسخ ده به رویان‌زایی



شکل ۵.- القاء رویان‌زایی ثانویه بر روی رویان‌های حاصل از کشت میکروسپور کلزا. A:رویان‌زایی ثانویه نرمال، B و C: اشکال غیر طبیعی رویان‌های ثانویه القاء شده، D و E: رویان های ثانویه بالغ در مراحل اژدری شکل و لپه‌ای شکل. بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ میکرو متر

www.SID.ir

پس از القاء و بلوغ رویان های ثانویه بر روی رویان‌های حاصل از کشت میکروسپور کلزا این رویان‌ها با احتیاط و در شرایط کامل استریل جدا شدند و در محیط کشت باززایی B5 حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک قرار گرفتند. مشاهده گردید که رویان‌هایی که با اسید آبسیزیک و پلی اتیلن تیمار شده بودند در آزمایشات باززایی نیز باززایی مناسب‌تری در مقایسه با رویان‌های تیمار نشده نشان دادند. مراحل باززایی گیاه از رویان های ثانویه حاصل از کشت میکروسپور کلزا، ارقام گلوبال، پی اف و آپشن در شکل‌های ۶ و ۷ نشان داده شده است.



شکل۶- باززایی گیاه از رویان‌های ثانویه جدا شده از رویان های اولیه حاصل از کشت میکروسپور کلزا بر روی محیط باززایی B_5حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر اسید جیبرلیک

شکل ۷- انتقال گیاهچه های باززایی شده از رویان های ثانویه به پرلیت و سازگاری این گیاهچه‌ها به محیط خارج از شیشه

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

عوامل مختلفی بر بلوغ جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور تاثیر می‌گذارند. در این زمینه مشخص شده است که اسید آبسیزیک، هورمون مهمی در تنظیم مرحله بلوغ جنین می باشد. در جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور، مقدار اندکی اسید آبسیسیک تولید می‌شود و در نتیجه بلوغ نرمال اتفاق نمی‌افتد، اما در عوض جنین‌ها زودتر جوانه زده و با دستکاری در کشت می‌توان به مرحله بلوغ نرمال رسید.

کاربرد ابسیزیک اسید و ساکارز بر روی بلوغ و باززایی رویان‌های سوماتیکی در گواوا نیز تاثیر معنی‌داری را نشان دادند (Rai *etal*., 2008).

مطالعات متعدد و مشابهی در بسیاری از گیاهان نظیر *Acacia nilotica* (Garg *etal* (1996)، *Aesculus hippocastanum* (Capuana & Debergh 1997)، Panax ginseng (Langhansova *etal*., 2004) و *Psidium guajava* L. (Rai *etal*., 2009) نیز نشان از بهبود بلوغ رویان‌های ثانویه تحت تاثیر تیمارپلی اتیلن گلیکول به تنهایی و یا همراه با آبسزیک اسید دارد .

کاربرد ترکیب پلی‌اتیلن گلیکول به همرا آبسزیک اسید امروزه به عنوان یکی از روش‌های متداول برای تحریک‌بلوغ رویان‌ها محسوب می‌گردد (Linossier *etal*., 1997; Bozhkov & von Arnold 1998).

در توجیه بلوغ بیشتر رویان‌های تیمار شده با اسید آبسزیک می‌توان این گونه توضیح داد که اسید آبسزیک به دلایل زیر منجر به بلوغ بیشتر رویان‌های به دست آمده از میکروسپورهای کلزا می‌گردند:

۱ –تسریع در بلوغ رویان‌ها: اسید آبسزیک با افزایش بیان ژن‌های موثر در بلوغ رویان‌ها باعث تسریع در بلوغ آن‌ها می‌گردد (Morris *etal*., 1990 ; Williamson *etal*., 1985).

۲–افزایش مقاومت به خشکی: آنالیزهای مولکولی مشخص کرده است که، بین رویان‌های تیمار، شده و تیمار نشده با اسید آبسزیک در داشتن ژنی به نام Lea gene تفاوت وجود دارد به طوری که، در رویان‌های تیمار شده با اسید آبسزیک این ژن بیان می‌گردد و منجر به افزایش مقاومت به خشکی می‌شود و در نهایت باززایی بهتر صورت می‌گردد (Wakui & Takahata, 2002). همچنین در آزمایشات دیگری توسط Beversdorf & Kott (۱۹۹۰) مشخص شده است که پیش تیمار جنین‌ها با سرما، اسید آبسیسیک (ABA) و آبگیری جزیی می‌تواند تقویت کننده باززایی باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش درصد رویان‌های ثانویه و متوسط تعداد رویان‌های ثانویه القا شده با کاربرد سوربیتول و گلوکوز همراه بوده است که با یافته‌های Te-chato & Hilae(2007) مطابقت داشت.

تحقیقات متعددی حاکی از آن است که منبع قند به کار رفته در محیط‌های کشت از اثر معنی‌دار بر روی جنین‌زایی در بسیاری از گونه‌ها بوده است (Daigny *etal*., 1996).

در پایان می‌توان گفت مقایسه میانگین سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول برای صفت میانگین تعداد رویان‌های ثانویه القاء شده بر روی رویان‌های اولیه میکروسپوری در رقم گلوبال حاکی از آن است که پلی اتیلن گلیکول در رویان‌زایی ثانویه اثر منفی داشته و باعث کاهش این صفت گردیده است.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

باقری، ه .۱۳۷۹. بررسی پاسخ به کشت میکروسپورهای ایزوله در تعدادی از ژنوتیپ‌های کلزا. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس، ۸۴ ص.

بی نام.۱۳۸۲. میزان تولید دانه‌های روغنی. - سال یازدهم - شماره ۳۱۳۵. انتشارات موسسه تحقیقات دانه‌های روغنی.

حبیبی، ب.۱۳۸۲. بهینه‌سازی پاسخ به کشت میکروسپورهای ایزوله کلزا (*Brassica napus* L.). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۲۳ ص.

حدادی، پ.۱۳۸۳. اثرات GA_3، آبگیری جنین، ABA و نوع ظرف بر روی باززایی گیاه در کشت میکروسپور ایزوله کلزا (*Brassica napus* L.). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۷۷ ص.

خنجی، ی.۱۳۸۰. مطالعه آندروژنز در برخی از ارقام کلزا (*Brassica napus* L.) و گندم هگزاپلوئید (*Triticum aestivum* L.). پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس، ۱۲۴ص.

شریفی، پ.۱۳۸۲. بهینه سازی جنین زایی و باززایی گیاه از کشت میکروسپورهای ایزوله کلزا(*Brassica napus* L.). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۵۱ص.

عبدالهی، م. (۱۳۸۱). اثربرخی فاکتورها روی تولید جنین و باززایی گیاه در کشت میکروسپورهای ایزوله کلزا(*Brassica napus* L.). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس،۱۲۰ص.

عزیزی، م.، ا. سلطانی، و س. خاوری خراسانی. (۱۳۷۸). کلزا. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۲۳۰ص.

Bozhkov, PV., S.von Arnold. 1998.Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of Picea abies somatic embryos. Physiol Plant 104:211–224

Capuana M., PC. Debergh. 1997. Improvement of the maturation and germination of horse chestnut somatic embryos. Plant Cell Tiss Org Cult 48:23–29

Daigny, G., H. Paul, RS. Sangwan, BS. Sangwan-Norreel. 1996. Factors influencing secondary somatic embryos in Malux 9 domestica Borkh. (cv. 'Gloster 69'). Plant Cell Rep 16:153–157

Fletcher, R., J. Coventry, and L. S. Kott. 1998. Double Haploid Technology for Spring and Winter *Brassica napus*, Technical Bulletin, OAC Publication, Canada

Archive of SID

www.SID.ir

Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K.Ojiwa. 1968. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root callus. Experimental Cell Research, 50: 151-158.Science Department- University of Guelph- Guelph.

Garg L., NN. Bhandari, V. Rani, SS. Bhojwani.1996. Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endosperm cultures of Acacia nilotica. Plant Cell Rep 15:855–858

Kott, L.S., and W. D. Beversdorf. 1990. Enhanced plant regeneration from microspore derived embryos of *Brassica napus* by chilling, partial desiccation and age selection. Plant Cell Tissue Culture, **23:** 187 -192.

Langhansova L., H. Konradova, T. Vanek. 2004. Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of Panax ginseng somatic embryos. Plant Cell Rep 22:725–730

Lichter, R. 1982 Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspore of different *Brassicacea* species. Plant Breeding, **103:** 119-123

Linossier L., P. Veisseire, F. Cailloux, A. Coudret. 1997. Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on Hevea brasiliensis somatic embryos development. Plant Sci 124:183–191

Morris, P.C., A. Kumar, D.J. Bowles. 1990. Osmotic stress and abscisic acid induce expression of the weat *Em*genes. Eur. J. Biochem 190: 625-630

Nehlin L., C. Mollers, and K.Glimelius. 1995. Induction of secondary embryogenesis in MDEs of *Brassica napus* L. Plant Science 111: 219-227

Rai MK., VS. Jaiswal, U. Jaiswal. 2008. Effect of ABA and sucrose on germination of encapsulated somatic embryos of guava (Psidium guajava L.). Sci Hort 117:302–305

Rai MK., VS. Jaiswal, U. Jaiswal. 2009. Effect of selected amino acids and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos of guava (Psidium guajava L.). Sci Hort 121:233–236

Shu, W., C. S. Loh, 1987. Secondary embryogenesis in long-term cultures of winter oilseed rape, *Brassica napus* ssp. oleifera.*New phytologist* 107, 39–46.

Shu, W., C. S. Loh, 1991. Secondary embryogenesis from thin cell layers of *Brassica napus* spp. Oleifera. New Phytology, 119: 427-432.

Archive of SID

www.SID.ir

Wakui, K., Y. **Takahata.** 2002. Isolation and expression of Lea gene in desiccation-tolerant microspore-derived embryos in Brassica spp. Physiologia Plantarum 116: 223-230

Te-chato, S., A. Hilae. 2007. High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. *var.* tenera). Journal of Agricultural Technology 3(2): 345-357.34.

Archive of SID

www.SID.ir