Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷

کالوس زایی و باززایی ارقام گندم نان از ریزنمونه‌های مختلف

علی اکبر غلامی .M.Sc [1*]، علیرضا تاری‌نژاد .Ph.D [2]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، تبریز، ایران
۲- دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، تبریز، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Gholami.2359@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۶

چکیده

هدف: هدف از انجام این تحقیق، مطالعه بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشدگیاهی، نوع و ترکیبات محیط کشت، ژنوتیب رقم مورد استفاده و نوع ریزنمونه بر قابلیت کالوس‌زایی و باززایی ارقام گندم است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از دو نوع محیط کشت (MS ،N6) و سه ریزنمونه جنین نارس، جنین رسیده و قطعات برگی استفاده شد. برای کالوس‌زایی در ریزنمونه جنین‌رسیده و قطعات برگی از محیط کشت N6 حاوی تنظیم کننده رشد 2, 4-D و برای باززایی از محیط کشت N6 حاوی تنظیم کننده رشد NAA، BAP و Kin استفاده شد. در ریزنمونه جنین نابالغ از برای کالوس زایی و باززایی از محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده رشد مختلف استفاده شد.

نتایج: کالوس‌زایی و باززایی در این تحقیق بسته به ژنوتیپ و نوع ریزنمونه و نوع ترکیبات محیط کشت متفاوت بود. به‌طوری‌که در ریزنمونه جنین نابالغ بیشترین میزان کالوس‌زایی و باززایی مربوط رقم چمران بود. در ریزنمونه جنین بالغ، بیشترین میزان کالوس‌زایی و باززایی مربوط به لاین C-D-9 بود. در ریزنمونه قطعات برگی، بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به لاین C-D-9 و سطح ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D بود. بیشترین درصد شاخه‌زایی مربوط به لاین C-D-9 در محیط کشت (N6(6حاوی mg/l IAA ۱+ mg/l BA ۱به‌دست آمد.

نتیجه گیری: پاسخ به کشت بافت در گندم تحت تأثیر عوامل متعددی از قبیل ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، تنظیم کننده های رشد می‌باشد. از این آزمایش می‌توان این نتیجه را گرفت که نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشدگیاهی مورد استفاده در محیط کشت از رقمی به رقم دیگر برای القای کالوس‌زایی و باززایی گندم متفاوت است و جنین نارس بهترین ریزنمونه و ژنوتیپ رقم مورد استفاده، از مهم‌ترین فاکتورهای تاثیرگذار در کشت بافت گندم است.

واژگان کلیدی: گندم، کشت بافت، جنین نابالغ، جنین بالغ، قطعات برگی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گندم مهم‌ترین محصول ایران و جهان است. سطح زیر کشت این محصول در دنیا برابر ۲۲۰ تا ۲۳۰ میلیون هکتار و در ایران حدود ۵/۶ میلیون هکتار است که از سایر غلات بیشتر و برابر ۲۲ درصد سطح زیر کشت کلیه غلات است (۱). به‌همین علت غذای عمده بیش از ۴۰ کشور جهان است که جوابگوی ۳۵ درصد جمعیت دنیاست (۲). در گندم از ریزنمونه‌های مختلفی نظیر گل‌آذین، جنین نارس و جنین بالغ برای تولید کالوس استفاده شده است و تا به حال کشت جنین نارس گندم به‌عنوان بهترین ریزنمونه در مطالعات کشت کالوس در گندم شناخته شده است (۳، ۴، ۵، ۶) تولید کالوس در گیاهان تک‌لپه‌ای معمولا مشکل‌تر از گیاهان دولپه‌ای صورت می‌گیرد، به‌همین دلیل برای القا و تشکیل کالوس، نیاز به اضافه کردن هورمون‌های مصنوعی می‌باشد (۷). باززایی گیاه از کالوس یک پدیده مروفوژنتیکی پیچیده می‌باشد که عوامل داخلی و خارجی فیزیولوژیک گیاه نقش مهمی در آن ایفا می‌کنند (۸). میزان موفقیت در رشد کالوس و باززایی گیاه در غلات بستگی زیادی به نوع ریزنمونه جداشده دارد. به‌طور کلی قسمت های رویشی گیاهان نسبت به قسمت‌های زایشی آمادگی بیشتری برای باززایی دارند و قابلیت ژنتیکی باززایی در این خصوص در تمام ارقام وجود دارد(۹). اگرچه جنین نابالغ یکی از مناسب‌ترین ریز نمونه‌ها در کشت بافت این غلات می‌باشد، اما به‌عنوان ریزنمونه دارای برخی از معایب نیز می‌باشد. ازجمله در دسترس بودن آن‌ها محدود به دوره‌ی کوتاهی از زمان رشد در سال می‌باشد، جداسازی سخت و مشخص کردن مرحله‌ی کشت مناسب آن مشکل می‌باشد (۱۰). اما به‌دلیل سهولت استفاده از جنین رسیده پژوهشگران ترجیح می‌دهند از این نوع جنین برای مطالعه خود به‌جای جنین نارس استفاده نمایند (۱۱) جنین‌های بالغ به‌دلیل در دسترس بودن در هر فصل از سال، جداسازی آسان و حداقل تغییرپذیری و وضعیت فیزیولوژیکی آن (۱۲) به‌عنوان یک جایگزین مؤثر برای جنین‌های نابالغ می‌باشد. ولی وقتی جنین‌های بالغ به‌عنوان ریزنمونه استفاده می‌شوند فراوانی باززایی از کالوس در مقایسه با جنین‌های نابالغ کم می‌شود (۱۰). امروزه از جنین‌های بالغ به‌همراه آندوسپرم (۱۳)، بدون حمایت آندوسپرم (۱۴) و تکه‌های نازک از آن (۱۵) به‌عنوان ریزنمونه در کشت بافت گندم استفاده می‌شود. کشور ایران به‌دلیل برخورداری از تنوع بالای زیستی بستر مناسب برای تهیه و تولید ارقام مختلف گندم می‌باشد. و با توجه به اینکه میزان پاسخ ارقام بومی گندم نسبت به ارقام اصلاح‌شده از لحاظ القای کالوس و باززایی و انتقال ژن بیشتر است، روی این اصل، در تحقیق حاضر واکنش ریزنمونه‌های جنین بالغ، جنین نابالغ و قطعات برگی ارقام بومی گندم نان، از نظر القای کالوس و باززایی در سطوح مختلف هورمون‌های اکسینی و سیتوکینین مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین هدف از انجام این آزمایش، شناسایی بهترین ژنوتیپ و تعیین مناسب‌ترین ترکیب هورمونی برای کالوس‌زایی و باززایی و ارزیابی ارقام مختلف گندم می‌باشد. ارائه پروتکل کارآمد برای کشت بافت و ریز ازدیادی ارقام مورد مطالعه و فراهم کردن ابزار کارآمد برای مطالعه انتقال ژن و دست‌کاری ژنتیکی با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت بافت در دورنمای آینده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان در سال ۱۳۹۵ انجام گرفت. در این آزمایش ۷ رقم گندم به نام‌های (الوند، اترک، آزادی، شیرودی، چمران، فلات، تجن) و چهار لاین گندم (C-D-4, C-D-6, C-D-8, C-D-9) استفاده شد. بذور گندم از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد.

www.SID.ir

Archive of SID

در ریزنمونه‌های جنین بالغ و جنین نابالغ (ابتدا گندم درگلخانه کشت شده بعد از ۱۶-۱۴ روز پس از گـرده افشانی خوشه‌ها، جنین آن‌ها برداشت شد) بذوری که ظاهری سالم داشتند برای ضدعفونی و کشت انتخاب شدند. ضدعفونی با قرار دادن بذور در الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه و سپس شستشوی بذور با شناور ساختن آن‌ها در آب مقطر استریل آغاز شد. سپس بذور در زیر محفظه‌ی استریل هود لامینار در محلول هیپوکلریت سدیم ۴۵ درصد حجمی (۲/۲۵ درصد ماده‌ی موثره) همراه با ۱ قطره توین ۲۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. در مرحله‌ی آخر این بذور سه بار متوالی به‌مدت ۳،۱ و ۵ دقیقه با آب مقطر دو بار استریل شستشو داده شدند. سپس روی کاغذ صافی استریل قرار داده شد تا آب سطحی آن‌ها کاملا خشک شود در ریزنمونه قطعات برگی، زمانی که بذرهای موردنظر استریلیزاسیون سطحی شدند برای جوانه‌زنی در محیط ½ MS قرار گرفتند. وقتی‌که اندازه گیاهچه به ۵ تا ۱۰ سانتی‌متر رسید، کلئوپتیل به‌اندازه ۲-۱ سانتی‌متر از بخش ساقه جدا شد. این قسمت از برگ به قطعات ۱ تا ۲میلی‌متری تقسیم شد. سپس این قطعات در محیط ML1G1 (۱۶)، (حاوی ویتامین‌ها و نمک‌های N6 و ۲ میلی‌گرم در لیتر گلایسین، ۲۸۸۰ میلی‌گرم در لیترL - پرولین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازوئین، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز با اسیدیته ۵/۸) برای القا کالوس قرار گرفتند ولی در ریزنمونه جنین بالغ (ML1G1) و جنین نابالغ (جدول ۱) مستقیماً بر روی محیط کشت القای کالوس، کشت شدند به نحوی که ناحیه اسکوتلوم آن‌ها رو به بالا باشد. در هر پتری دیش که حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت بود، تعداد ۹ ریزنمونه کشت شد. سپس درب ظروف با پارافیلم بسته شد. نمونه‌ها جهت کالوس‌زایی در شرایط تاریکی و دمای ۱± ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۲ هفته قرار داده شدند. بعد از شکل‌گیری کالوس‌ها، تعداد کالوس‌های تولید شده در هر پتری دیش شمارش شده و درصد کالوس‌زایی برای هر رقم و هر تیمار به‌طور جداگانه محاسبه شد. در مرحله‌ی بعد کالوس‌های تولید شده جهت رشد و تکثیر و تولید کالوس‌های جنین‌زا به محیط کشت مشابه‌ای ML1C2 (۱۶)، با این تفاوت که حاوی ۱۰ mg/l نیترات نقره بود، واکشت شدند. دو هفته پس از واکشت، کالوس‌های جنین‌زا برای باززایی به محیط کشت باززایی مخصوص هر ریزنمونه، جنین بالغ(ML1R3) و جنین نابالغ (جدول۲) و قطعات برگی (جدول ۳) انتقال داده شدند. بعد از کشت کالوس‌ها در محیط باززایی، ابتدا نمونه‌ها به‌مدت ۱ هفته در شرایط تاریکی و دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار گردیدند. بعد از این مدت نمونه‌ها تحت تیمار ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از آغاز باززایی، کالوس‌های تغییر رنگ داده به لوله‌های آزمایش با محیط کشت مشابه منتقل شدند تا فضای کافی برای رشد گیاهچه وجود داشته باشد. شاخه‌های باززا شده به‌طول ۲ الی ۳ سانتی‌متر، جهت تولید و توسعه‌ی ریشه‌ها، به محیط کشت MS فاقد هورمون حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز انتقال داده شد. گیاهان ریشه‌دار شده از لوله‌ی آزمایش خارج شده و پس از کشت در خاک استریل به محیط سازگار سازی انتقال داده شدند (شکل ۵).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱: محیط‌های مختلف القا کالوس در جنین‌های نارس گندم

محیط القا کالوس	ترکیب محیط	منابع
B1	MS (Macro+Micro+vitamins) + Thiamine cl(0.04mg/l) + L-Asparagine(150mg/l) + 2,4-D(2.5mg/l) + Sucrose(60g/l) + Agar(8g/l) pH=5.7 with NaOH	(۱۷)
B2	MS(Macro+Micro) + Glycine(75mg/l) + L-Glutamine(877mg/l) + L-Aspartic acid(266mg/l) + L-Arginine(228mg/l) + 2,4-D(2mg/l) + Kinetin(0.2mg/l)+ Gibberellic acid(0.1mg/l) + Sucrose(30g/l) + Agar(8g/l) pH=5.7 with NaOH	(۱۷)
B3	MS(Macro+Micro) + Thiamine-Hcl(40mg/l) + L-Asparagine(150mg/l) + 2,4-D(2mg/l) + Maltose(20g/l) + Agar(8g/l) pH=5.8 with KOH	(۱۸)
B4	MS(Macro+Micro+vitamins) + myo inositol(100mg/l) + 2,4-D(2mg/l) + Sucrose(30g/l) + Agar(8g/l) pH=5.7 with NaOH	(۱۹)

جدول۲: محیط‌های مختلف مورد استفاده در آزمایش به‌منظور باززایی جنین‌های نارس گندم

محیط باززایی	ترکیب محیط باززایی	منابع
C1	MS(Macro+Micro) + Thiamine cl(0.04mg/l) + L-Asparagine(150mg/l) + IAA(0.5mg/l) + BAP(1mg/l) + Sucrose(20g/l) + Agar(8g/l) pH=5.7 with NaOH	(۱۷)
C2	MS(Macro+Micro) + Thiamine-Hcl(40mg/l) + L-Asparagine(150mg/l) + IAA(0.5mg/l) + BAP(1mg/l) + Kinetin(1mg/l) + Maltose(20g/l) + Agar(8g/l) pH=5.8 with KOH	(۱۸)
C3	MS(Macro+Micro+vitamins) + myo inositol(100mg/l) + IAA(0.5mg/l) + BAP(1mg/l) + Sucrose(30g/l) + Agar(8g/l) pH=5.7 with NaOH	(۱۹)

جدول ۳: انواع محیط کشت باززایی مورد استفاده برای ریزنمونه قطعات برگی گندم

کشت / محیط	ترکیب محیط باززایی	کشت / محیط	ترکیب محیط باززایی	کشت / محیط	ترکیب محیط باززایی	کشت / محیط	ترکیب محیط باززایی
MS(1)	بدون هورمون	MS(4)	0.5 mg/L Kin+ 2 mg/L NAA	N6(1)	0.5 mg/L BAP	N6(4)	0.5 mg/LKin
MS(2)	1 mg/L IAA+ 1 mg/L BA	MS(5)	0.5 mg/L BAP+ 2 mg/L IAA	N6(2)	2 mg/L BAP	N6(5)	2 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA
MS(3)	0.5 mg/L IAA+ 1 mg/L BA	MS(6)	2 mg/L BAP+ 1 mg/L NAA	N6(3)	2 mg/L Kin+ 0.5 mg/L NAA	N6(6)	1 mg/L IAA+1 mg/L BA

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

کالوس‌زایی و باززایی از ریزنمونه جنین نارس

با توجه به اینکه برخی از صفات مورد بررسی مثل صفات مرتبط با کالوس‌زایی مستقل از باززایی هستند بنابراین تجزیه واریانس جداگانه‌ای برای صفات کالوس‌زایی و باززایی انجام شد (جداول ۴ و ۵). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین ارقام گندم مورد مطالعه از نظر کلیه صفات اندازه‌گیری شده تفاوت معنی‌داری حداقل در سطح احتمال ۵ درصد به غیر از درصد القاء کالوس ۳۰ روز بعد از کشت وجود داشت. تفاوت محیط‌های مختلف القای کالوس از نظر کلیه صفات در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). اثر متقابل رقم × محیط القا کالوس برای صفاتی نظیر درصد القا کالوس ۱۵ و ۳۰ روز بعد از کشت، حجم کالوس ۱۵ روز بعد از کشت، درصد نقطه سبز ۷ ، ۲۱ و ۲۸ روز بعد از بازکشت، تعداد نقطه سبز ۱۴ روز بعد از بازکشت، فراوانی باززایی حداقل در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۵). این بدین مفهوم است که ارقام مختلف پاسخ‌های متفاوتی به محیط‌های مختلف القاء کالوس نشان می‌دهند.

بین سطوح مختلف محیط‌های باززایی از نظر صفات درصد نقطه سبز ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز بعد از بازکشت، تعداد نقطه سبز ۱۴ روز بعد از بازکشت، درصد تشکیل ساقه‌چه، فراوانی باززایی تفاوت معنی‌داری حداقل در سطح احتمال ۵ درصد وجود داشت (جدول ۵).

اثرمتقابل رقم × محیط باززایی برای صفاتی نظیر درصد نقطه سبز ۲۱ و ۲۸ روز بعد از بازکشت، تعداد نقطه سبز ۱۴روز بعد از کشت، درصد تشکیل ساقه‌چه، فراوانی باززایی حداقل در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. اثرمتقابل محیط کالوس‌زایی × محیط باززایی برای صفات مورد مطالعه معنی‌دار نبود و بیانگر این مطلب است که اثر دو محیط مختلف برای القاء کالوس و باززایی مستقل از هم بود. ترکیبات تیماری سه جانبه رقم، محیط کالوس‌زایی و محیط باززایی به استثنای صفات درصد نقطه سبز و تعداد نقطه سبز معنی‌دار نبود (جدول ۵).

جدول ٤: تجزیه واریانس صفات مورد اندازه‌گیری در شرایط درون‌شیشه‌ای برای ارقام مورد مطالعه گندم در محیط‌های مختلف القای کالوس

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		درصد القای کالوس بعد از ۱۵ روز	درصد القای کالوس بعد از ۳۰ روز	درصد کالوس جنین‌زا	حجم کالوس ۱۵ روزه	حجم کالوس ۳۰روزه	وزن کالوس
رقم	۶	۳۴۵/۲۴**	۸۴/۴۶ns	۴۹۴/۲۸*	۷/۹۷**	۲/۳۲*	۱/۲۸**
خطای ۱	۲۱	۸۱/۶۹	۱۲۱/۴۱	۱۷۱/۵۱۰	۰/۴۲	۰/۸۶	۰/۱۷
محیط کالوس‌زایی	۳	۱۲۶۱/۵۷**	۴۰۶/۲۷*	۱۲۲۱/۱۶**	۹/۹۹**	۳/۶۲**	۱/۸۴**
رقم×محیط کالوس‌زایی	۱۸	۱۶۰/۴۴*	۲۲۱/۳۳*	۱۶۷/۰۹ns	۰/۷۸*	۰/۶۷ns	۰/۱۴ns
خطای ۲	۵۷	۷۷/۳۴	۱۰۱/۸۴	۱۷۵/۸۶	۰/۴۰	۰/۴۶	۰/۱۰
ضریب تغییرات (CV٪)		۱۰/۰۷	۱۱/۹۰	۲۲/۱۰	۷/۱۳	۶/۳۸	۱۱/۱۵

ns ، * و ** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار درسطح احتمال ۵ درصد و ۱درصد می‌باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵: تجزیه واریانس صفات مورد اندازه‌گیری در شرایط درون شیشه‌ای برای ارقام مورد مطالعه در محیط‌های مختلف القای کالوس و محیط‌های مختلف باززایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		درصد نقطه سبز بعد از ۷ روز	درصد نقطه سبز بعد از ۱۴ روز	درصد نقطه سبز بعد از ۲۱ روز	درصد نقطه سبز بعد از ۲۸ روز	تعداد نقطه سبز در هر کالوس بعد از ۱۴ روز	درصد تشکیل ساقه‌چه	فراوانی باززایی
رقم	۶	۷/۵۲**	۴/۸۱**	۸۱۴۹/۵۹*	۶۱۳۸/۵۶*	۸۸۵/۷۱*	۱/۸۱	۱۷/۰۹**
خطای ۱	۲۱	۰/۹۱	۱/۲۲	۲۲۶/۷۴	۲۲۲۵/۲۵	۲۹۵/۲۲	۰/۶۱	۰/۴۳
محیط *کالوس‌زایی*	۳	۱۱/۵۶**	۲/۸۰**	۵۲۶۱/۲۲**	۵۷۳۰/۹۳**	۸۴۰/۷۴**	۱۶/۵۱	۶۰/۹۳**
رقم×محیط کالوس‌زایی	۱۸	۱/۷۳*	۰/۹۵ns	۲۵۰۵/۹۹*	۲۹۸۰/۲۰*	۳۹۲/۶۸*	۱/۴۴	۶/۵۹*
خطای ۲	۵۷	۰/۸۵	۰/۶۴	۱۲۳۹/۱۴	۱۳۲۱/۶۲	۱۷۴/۶۵	۰/۷۳	۳/۵۶
محیط باززایی	۲	۰/۰۹ns	۱/۶۱**	۵۲۲۹/۹۴**	۴۹۱۹/۶۰**	۶۲۷/۵۴**	۱/۸۲**	۳۲/۴**
رقم* محیط باززایی	۱۲	۰/۲۵ns	۰/۳۱ns	۸۴۶/۴۷**	۱۰۱۵/۱۱**	۱۲۲/۸۸**	۰/۶۲ns	۴/۵۷*
محیط کالوس‌زایی * محیط باززایی	۶	۰/۱۱ns	۰/۰۵۶ns	۳۰۵/۹۴ns	۵۴۴/۸۸ns	۶۹/۴۸ns	۰/۵۰ns	۱/۰۱ns
رقم× محیط کالوس‌زایی* محیط باززایی	۳۶	۰/۴۰**	۰/۲۳ns	۵۳۷/۰۲*	۶۷۳/۴۴**	۸۴/۰۲**	۰/۴۱ns	۲/۷۰ns
خطای ۳	۱۴۹	۰/۲۲	۰/۱۹	۳۳۹/۲۶	۳۴۸/۵۳	۴۲/۵۵	۰/۳۰	۲/۰۳
ضریب تغییرات (CV)		۲۱/۵۳	۱۷/۴۸	۲۹/۳۳	۲۸/۹۳	۲۷/۹۱	۳۰/۱۷	۸/۹۸

ns ، * و ** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار درسطح احتمال ۵ درصد و ۱درصد می‌باشند.

مقایسه میانگین سطوح عوامل مورد مطالعه و ترکیبات تیماری آن‌ها برای صفات مورد مطالعه در جدول ۶، ۷، ۸ نشان داده شده است. ارقام فلات و چمران با ۹۳/۴ و ۹۳/۲ درصد القاء کالوس در ۱۵ روز بعد از کشت برترین ارقام و رقم شیرودی و آزادی با کالوس‌زایی پایینی در همان زمان ضعیف‌ترین ارقام بودند. از نظر تولید کالوس جنین‌زا رقم الوند و چمران به‌ترتیب با ۷۰/۳۵ و ۶۴/۶۳ درصد بهتر از بقیه ارقام نسبت به محیط کالوس‌زایی پاسخ دادند. این رقم تجن کمترین درصد نقطه سبز را ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز بعد از بازکشت در محیط باززایی داشت و رقم چمران بالاترین درصد نقطه سبز را نشان داد. از نظر تعداد نقطه نتایج نشان داد که رقم تجن با القای ۵۰ درصد کالوس جنین‌زا نسبت به سایر، از نظر القاء کالوس جنین‌زا و غیر جنین‌زا ضعیف‌ترین رقم بود. رقم چمران بیشترین و رقم الوند کمترین حجم کالوس را ۱۵ و ۳۰ روز بعد از کشت دارا بودند. بیشترین وزن کالوس مربوط به رقم چمران و کمترین به رقم فلات و الوند با ۲/۵۹ و ۲/۶۹ گرم اختصاص داشت (جدول ۶). مراحل مختلف تولید کالوس در شرایط درون شیشه‌ای در شکل ۴ آورده شده است. سبز در هر کالوس رقم فلات و چمران به‌ترتیب با ۲۹/۵۳ و ۲۸/۰۸ بیشترین و رقم تجن با ۱۶/۶۷ کمترین تعداد نقطه سبز را دارا بودند (جدول ۶). شکل۱ مراحل مختلف باززایی

www.SID.ir

Archive of SID

و ریشه‌زایی را نشان می‌دهد. رقم چمران و آزادی بترتیب با ۱۸/۷۸ و ۳/۹۰ درصد از بیشترین و کمترین درصد تشکیل ساقه‌چه برخوردار بودند. همچنین رقم چمران و الوند بترتیب با ۸۲/۵ و ۷۰/۳ درصد بیشترین و رقم آزادی با ۴۹/۵ درصد کمترین فراوانی باززایی را داشتند. با توجه به نتایج حاصل رقم چمران که یک رقم بهاره است بهترین رقم از نظر پاسخ به کشت بافت جنین نارس بود.

جدول٦ : مقایسه میانگین ارقام مورد مطالعه از نظر صفات درون شیشه‌ای اندازه‌گیری شده

رقم	درصد القاء کالوس بعد از ۱۵ روز		درصد کالوس جنین‌زا		حجم کالوس ۱۵ روزه		حجم کالوس ۳۰روزه		وزن کالوس		درصد نقطه سبز بعد از ۷ روز	
الوند	۹۰/۱۱	AB	۷۰/۳۵	A	۸/۶۸	C	۱۰/۱۶	C	۲/۶۵	BC	۲۹/۹۱	A
اترک	۸۴/۶۴	BC	۵۷/۲۸	BC	۹/۲۷	B	۱۰/۴۶	BC	۲/۹۱	BC	۳۰/۴۶	A
آزادی	۸۲	C	۵۶/۷۸	BC	۸/۸۷	BC	۱۰/۷۳	ABC	۲/۸۷	BC	۱۸/۳۷	A
شیرودی	۸۰/۷۳	C	۵۸/۰۳	BC	۹/۲۳	B	۱۰/۴۷	BC	۲/۹۴	B	۳۳/۶۵	A
چمران	۹۳/۲۰	A	۶۴/۶۳	AB	۱۰/۲۵	A	۱۱/۳۱	A	۳/۴۸	A	۳۴/۵۴	A
فلات	۹۳/۴۰	A	۶۱/۶۱	ABC	۷/۸۶	D	۱۰/۹۵	AB	۲/۵۹	C	۳۳/۵۴	A
تجن	۸۷/۷۸	ABC	۵۰/۷۴	C	۸/۴۷	C	۱۰/۸۴	ABC	۲/۷۵	BC	۲/۵۵	B

رقم	درصد نقطه سبز بعد از ۱٤ روز		درصد نقطه سبز بعد از ۲۱ روز		درصد نقطه سبز بعد از ۲۸ روز		تعداد نقطه سبز در هر کالوس بعد از ۱٤ روز		درصد تشکیل ساقه‌چه		فراوانی باززایی	
الوند	۳۴/۱۷	A	۵۲/۱۲	BC	۵۴/۳۹	B	۱۹/۹۳	BC	۱۶/۵۷	AB	۷۰/۳	AB
اترک	۴۶/۱۷	A	۶۶/۲۷	BC	۶۱/۵۱	AB	۲۲/۸۸	ABC	۸/۲۱	BC	۶۲/۵	BC
آزادی	۳۹/۰۳	A	۵۹/۶۳	ABC	۶۰/۷۴	AB	۲۱/۸۷	ABC	۳/۹۵	C	۴۹/۵	C
شیرودی	۴۵/۲۵	A	۶۹/۸۶	AB	۶۷/۷۳	AB	۲۴/۸۳	ABC	۹/۱۲	ABC	۵۸	BC
چمران	۵۶/۱۰	A	۷۳/۴۷	AB	۷۷/۷۱	A	۲۸/۰۸	AB	۱۸/۷۸	A	۸۲/۵۰	A
فلات	۶۵/۹۳	A	۷۹	A	۸۱/۵۰	A	۲۹/۵۳	A	۱۴/۱۷	AB	۶۰/۲۰	BC
تجن	۱۰/۳۵	B	۴۰	C	۴۸/۵۲	B	۱۶/۶۷	C	۱۱/۱۸	AB	۶۲/۳۰	BC

میانگین های دارای حروف متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد دارند

مقایسه میانگین بین محیط‌های مختلف القای کالوس نشان داد (جدول ۷) که محیط کشت B2 کمترین درصد القای کالوس با متوسط ۷۶/۹۲ و محیط های B3 و B1 به‌ترتیب با متوسط ۹۱/۶۷ و ۹۱/۴۸ بیشترین درصد القای کالوس ۱۵ روز بعد از کشت جنین نارس در محیط کالوس‌زایی داشته است، اگرچه تفاوت محیط B4 نسبت به محیط‌های

www.SID.ir

Archive of SID

B3 و B1 از نظر آماری معنی‌دار نبود. وجود اثر متقابل معنی‌دار بین رقم و محیط کالوس‌زایی نشان داد که عکس العمل رقم به محیط‌های مختلف کالوس‌زایی یکسان نمی‌باشد (جدول ۴). همچنین روند پاسخ به محیط کالوس‌زایی ۳۰ روز بعد از کشت مشابه ۱۵ روز می‌باشد.

از نظر درصد القاء کالوس جنین‌زا (جدول ۷) نتایج تجزیه نشان داد که محیط کشت B1 با القاء ۵۰/۶۴ درصد کالوس جنین‌زا کمترین و محیط‌های B2 و B3 به‌ترتیب با متوسط ۶۷/۱۸ و ۶۲/۰۷ درصد بیشترین کالوس جنین‌زا را تولید کرده اند. همچنین محیط B3 و در گام بعدی محیط کشت B1 بیشترین حجم کالوس ۱۵ و ۳۰ روز بعد از کشت را داشتند. محیط کشت B2 کوچکترین حجم کالوس را در محیط درون شیشه‌ای ارائه نمود، و نیز محیط B3 کالوس با وزن بیشتر و محیط B2 کالوس با وزن کمتری را تولید کرد.

جدول۷ : مقایسه میانگین محیط‌های مختلف کالوس‌زایی برای صفات درون شیشه‌ای

محیط القای کالوس	درصد القای کالوس بعد از ۱۵ روز		درصد القای کالوس بعد از ۳۰ روز		درصد کالوس جنین‌زا		حجم کالوس ۱۵ روزه		حجم کالوس ۳۰روزه		وزن کالوس	
B1	۹۱/۶۷	A	۸۷/۸۲	A	۵۰/۶۴	B	۹/۳۸	A	۱۰/۴۰	B	۲/۹۴	B
B2	۷۶/۹۲	B	۷۸/۶۶	B	۶۷/۱۸	A	۸/۰۹	C	۱۰/۴۶	B	۲/۵۵	C
B3	۹۱/۴۸	A	۸۷/۲۶	A	۶۲/۰۷	A	۹/۵۳	A	۱۱/۱۴	A	۳/۲۰	A
B4	۸۹/۲۲	A	۸۵/۵۲	A	۵۹/۸۰	A	۸/۸۵	B	۱۰/۷۸	AB	۲/۸۷	B

ادامه جدول ۵:

محیط القاء کالوس	درصد نقطه سبز بعد از 7 روز		درصد نقطه سبز بعد از ۱۴ روز		درصد نقطه سبز بعد از ۲۱ روز		درصد نقطه سبز بعد از ۲۸ روز		تعداد نقطه سبز در هر کالوس بعد از ۱۴ روز		درصد تشکیل ساقه‌چه		فراوانی باززایی	
B1	۶/۴۹	B	۲۴/۰۲	B	۵۰/۹۰	B	۵۱/۹۷	B	۱۸/۵۱	B	۱۰/۹۸	C	۴۶/۲	C
B2	۲۸/۴۷	A	۴۳/۷۹	A	۶۷/۹۱	A	۶۹/۲۸	A	۲۵/۱۷	A	۱۳/۰۲	B	۶۵/۷	B
B3	۳۱/۱۲	A	۴۵/۳۱	A	۶۵/۰۲	A	۶۸/۹۳	A	۲۵/۰۱	A	۲۸/۰۹	A	۸۰	A
B4	۳۵/۸۵	A	۴۶	A	۶۷/۵۳	A	۶۷/۹۶	A	۲۴/۸۰	A	۱۲	B	۶۴/۱	B

میانگین های دارای حروف متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد دارند.

از نظر درصد تشکیل ساقه‌چه (جدول ۷)، محیط B3 با ۲۸/۰۹ درصد بیشترین و محیط B1 با ۱۰/۸۹ درصد کمترین ساقه‌چه را تولید نموده است. فراوانی باززایی در این محیط‌ها بترتیب ۸۰ و ۴۶/۲ درصد بود. بنابراین در کل و بدون درنظر گرفتن اثرات متقابل معنی‌دار محیط B3 که شامل ترکیبات

[MS(Macro+Micro) + Thiamine-Hcl(40mg/l) + L-Asparagine(150mg/l) + 2,4-D(2mg/l) + Maltose(20g/l) + Agar(8g/l) pH=5/8with KOH]

است بهترین محیط جهت کالوس‌زایی، تولید کالوس با حجم و وزن بالا، کالوس با تعداد و درصد نقطه سبز بیشتر، کالوس با درصد ساقه‌چه بالا و بویژه تولید کالوس با فراوانی باززایی بالا می‌باشد. مقایسه میانگین بین محیط‌های مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

باززایی (جدول ۸) بیانگر این مطلب است که از نظر درصد نقطه سبز و تعداد در هر کالوس، محیط C3 نسبت به بقیه محیط‌ها از کارایی بالاتری برخوردار بود. این محیط با تولید ۱۴/۹ درصد ساقه‌چه و ۷۲/۶ درصد فراوانی باززایی نسبت به سایر محیط‌ها برتری داشت. ترکیبات تشکیل دهنده محیط C3 بشرح زیر می‌باشد:

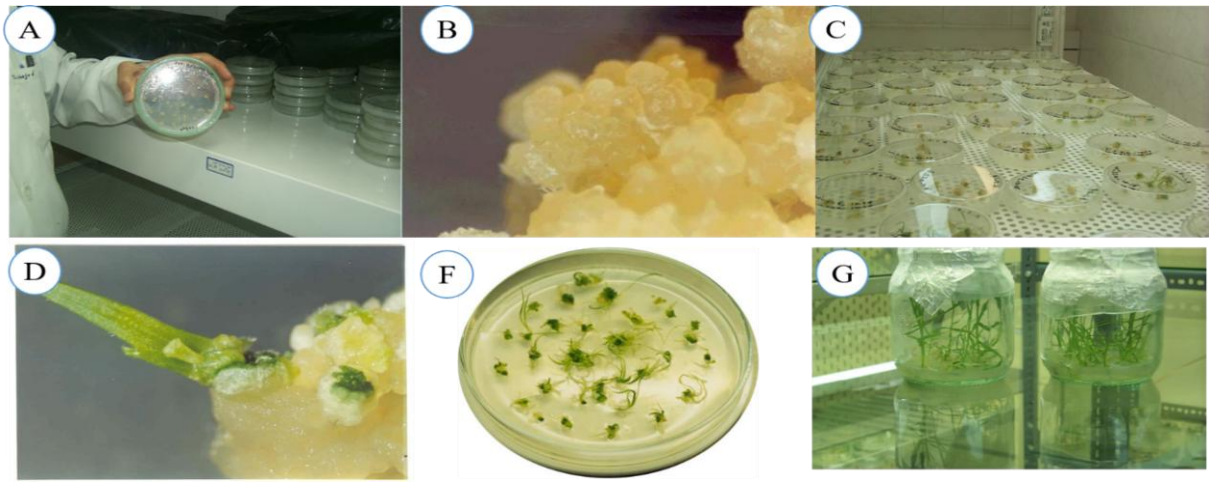
[MS(Macro+Micro+vitamins) + myo inositol(100mg/l) + IAA(0/5mg/l) + BAP(1mg/l) + Sucrose(30g/l) + Agar(8g/l) pH=5/7 with NaOH]

بنابراین، استفاده از محیط موراشیگ اسکوک به‌همراه ویتامین‌ها اسید اندول استیک به‌میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر محیط کشت و BA به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر کارایی باززایی را تا ۷۲/۶ درصد افزایش می‌دهد. نکته جالب در این است که تفاوت محیط C1 و C2 نسبت به محیط C3 در وجود آسیدآمینه آسپاراژین ، تیامین و نیز هورمون سیتوکینین و Kin می‌باشد و بیانگر این موضوع است که در محیط باززایی نیازی به افزودن این مواد نیست و کافی است با افزودن میواینوزیتول به‌جای این مواد کارایی باززایی را تا حدود زیادی بالا برد.

جدول۸: مقایسه میانگین محیط‌های مختلف باززایی برای صفات درون شیشه‌ای

محیط باززایی		درصد نقطه سبز بعد از ۱٤ روز		درصد نقطه سبز بعد از ۲۱ روز		درصد نقطه سبز بعد از ۲۸ روز		تعداد نقطه سبز در هر کالوس		درصد تشکیل ساقه‌چه		فراوانی باززایی	
C	1	B	۳۵/۹۱	B	۵۷/۸۵	B	۶۰/۷۴	B	۲۲/۰۳	B	۸/۹۸	B	۵۸/۲
C	2	B	۳۳/۵۱	B	۵۹/۵۵	B	۶۰/۵۴	B	۲۱/۹۲	B	۹/۵۱	B	۵۹/۸
C	3	A	۴۸/۴۲	A	۷۱/۱۸	A	۷۲/۴۸	A	۲۶/۲۳	A	۱۴/۹	A	۷۲/۶

میانگین های دارای حروف متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ دارند.



شکل ۱: مراحل کشت و القا کالوس و باززایی گیاه گندم از ریزنمونه جنین نارس.A: شروع کالوس دهی در اتاق تاریک یک هفته بعد از کشت جنین نارس گندم B : کالوس زایی جنین‌نارس گندم ٤ هفته بعد از کشت در محیط تاریکیC: ظهور نقطه سبز در محیط باززایی بعد از ۷ روز کشت کالوس‌های

www.SID.ir

Archive of SID

جنین‌زای گندم در محیط روشنایی D : تشکیل جنین سوماتیکی در محیط باززایی در کشت جنین نارس گندمF : باززایی کالوس‌های جنین‌زا در در محیط کشت MS یک ماه بعد از واکشت G : القاء ریشه‌زایی ساقه‌چه‌های تولید شده گندم در محیط کشت 1/2MS

تاثیر غلظت 2, 4-D بر القای کالوس‌زایی قطعات برگی

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از کالوس‌زایی بر روی سطوح مختلف تنظیم کننده های رشد 2, 4-D نشان داد که بین چهار لاین گندم، سطوح مختلف هورمون 2, 4-D، اثر متقابل لاین × سطوح مختلف هورمون از نظر درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۹).

جدول ۹: تجزیه واریانس تاثیر سطوح مختلف 2, 4-D و لاین‌های گندم بر روی درصد کالوس‌زایی از ریزنمونه قطعات کولئوپتیل

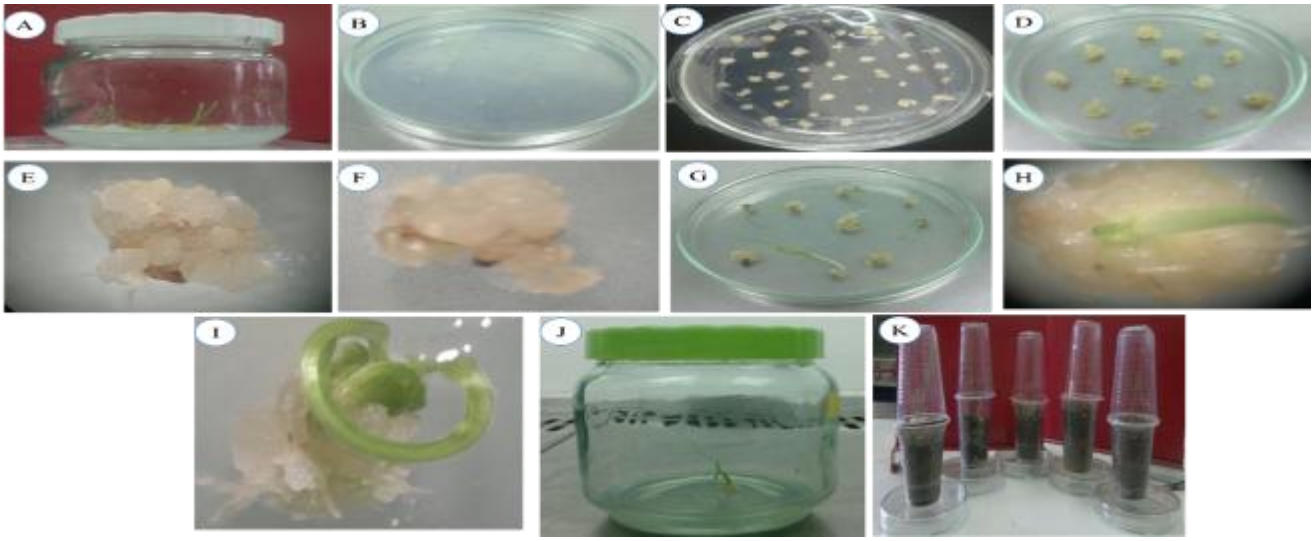
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد کالوس‌زایی
2, 4-D	۲	۲/۷۷**
لاین	۳	۴۹/۵۶**
لاین× 2, 4-D	۶	۳/۸۳**
خطا	۲۴	۰/۳۷۵
ضریب تغییرات (CV٪)		۱۲/۴۵

* و ** به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱درصد است.

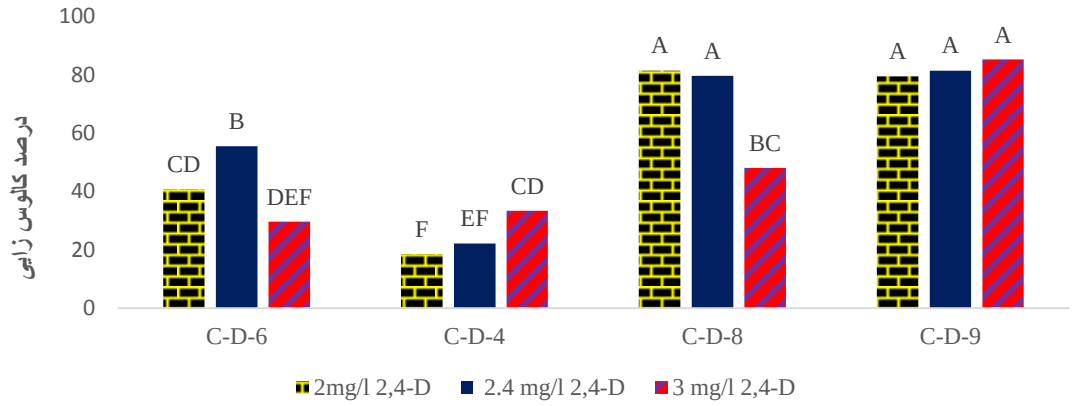
با توجه به معنی‌دار بودن اثرمتقابل، بالاترین میزان کالوس‌زایی را لاین C-D-9 و لاین C-D-8 در سطوح ۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D داشتند و کمترین میزان کالوس‌زایی متعلق به لاین C-D-4 در سطوح ۲ و ۲/۴ میلی گرم در لیتر 2, 4-D بود. در لاین C-D-9 با تغییر سطوح هورمون 2, 4-D از ۲ به ۳ میلی‌گرم در لیتر، تغییر معنی‌داری در کالوس‌زایی ایجاد نشد. در حالی‌که در لاین C-D-4 با افزایش غلظت هورمون 2, 4-D از ۲/۴ به ۳ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌داری در میزان کالوس‌زایی حاصل شد. در ژنوتیپ C-D-8 برعکس لاین C-D-4، افزایش غلظت هورمون 2, 4-D از ۲/۴ به ۳ منجر به کاهش معنی‌داری در میزان کالوس‌زایی شد. به‌طور کلی، لاین C-D-9 از توان کالوس‌زایی بالاتری نسبت به سایر لاین‌ها برخوردار بود و در بین تیمارهای مختلف هورمونی، سطح۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D نسبت به سایر سطوح در اکثر لاین‌ها به کشت بافت بهتر پاسخ نشان‌داده است (شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: مراحل کشت و القاء کالوس و باززایی گیاه گندم از ریزنمونه قطعات برگی.A: گیاهچه‌های رشد کرده در شرایط استریل روی محیط B.۱/۲ MS: برگ‌های زیر کلئوپتیل برای القا کالوس به قطعات ۲-۱ میلی‌متری تقسیم و کشت شدند. C: القا کالوس از قطعات برگ روی محیط ML1G1 پس از ۵ هفته کشت در تاریکی. D: تکثیر کالوس‌های جنین‌زایی به‌دست‌آمده از قطعات برگ روی محیط ML1C2. E: نمایی نزدیک از یک کالوس جنین‌زا. F: نمای نزدیک از یک کالوس غیر جنین‌زا. G: القا ساقه هوایی از کالوس‌های جنین‌زا به‌دست‌آمده از قطعات برگ در محیط ML1R3. H و I: نمایی نزدیک از یک ساقه هوایی حاصل از کالوس جنین‌زا. J: انتقال گیاهچه‌های حاصل از باززایی به محیط کشت ریشه‌زایی. K: انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به خاک و سازگاری گیاهان به شرایط طبیعی.



شکل ۳: مقایسه‌ی میانگین درصد کالوس‌زایی لاین‌های مختلف گندم در سطوح مختلف غلظت هورمون 2, 4-D

www.SID.ir

Archive of SID

تاثیر انواع محیط کشت بر توان باززایی کالوس‌های حاصل از قطعات برگی

برای بررسی اثر انواع محیط کشت در توانایی باززایی لاین‌ها، ابتدا ریزنمونه‌های قطعات برگی آن در محیط کشت حاوی ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D کشت شدند و بعد از تولید کالوس، کالوس‌ها به دو نوع محیط کشت پایه مطابق جدول ۳ (MS و N6) که هرکدام شامل شش محیط کشت باززایی متفاوت بودند منتقل شدند. بعد از شش هفته درصد شاخه‌زایی در محیط کشت ثبت گردید. با بررسی داده‌های به‌دست‌آمده از این دو نوع محیط کشت پایه مشخص شد که بین محیط‌های کشت و لاین و اثرمتقابل لاین و محیط کشت از نظر درصد باززایی تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (جدول ۱۰).

جدول ۱۰: تجزیه واریانس فاکتوریل تاثیر محیط کشت‌های مختلف و لاین‌های مختلف گندم بر روی باززایی بر روی ریزنمونه قطعات برگی

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد باززایی
محیط کشت	۱۱	**۵/۳۳
لاین	۳	*۳/۵۴
لاین× محیط کشت	۳۳	ns۰/۴۳۱
خطا	۹۶	۱/۰۶۲
ضریب تغییرات (cv٪)		۱۷/۶۵

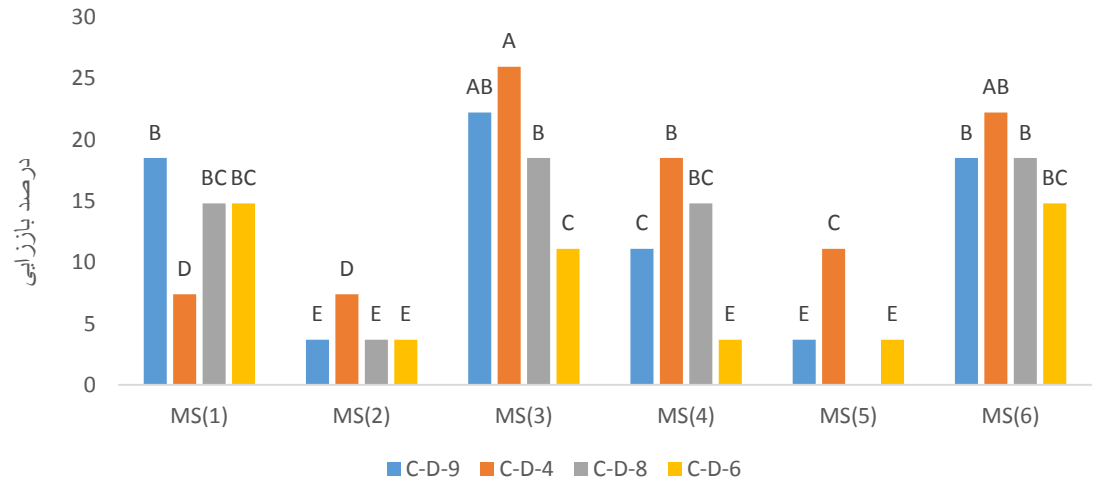
ns، * و ** به‌ترتیب نشان‌دهنده غیر معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱درصد است.

تاثیر محیط کشت MS بر باززایی کالوس‌های جنین‌زا لاین‌های مختلف گندم

باززایی در این آزمایش بسته به لاین و نسبت به محیط کشت متفاوت بود (جدول۱۰). بالاترین میزان باززایی لاین C-D-9 در محیط کشت پایه MS حاوی 1 mg/L IAA+ 0.5 mg/L BA به‌میزان (۲۲/۲۲ درصد) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-9 در محیط کشت پایه MS حاوی 1mg/L IAA+ mg/L BA 1 و 0.5 mg/L BAP به میزان (۳/۷ درصد) بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت پایه MS حاوی 1 mg/L IAA+ 0.5 mg/L BA به‌میزان (۱۸/۵۱ درصد) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت پایه MS حاوی 1mg/L IAA+ 1 mg/L BA و mg/L BAP 0.5 mg/L IAA+2 بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت پایه MS فاقد تنظیم‌کننده رشد و محیط کشت پایه MS حاوی 1mg/L mg/L BAP NAA+2به میزان (۱۴/۸۱ درصد) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت پایه MS حاوی 1mg/L IAA+ 1 mg/L BA و0.5 mg/L IAA+2 mg/L BAP و 0.5 mg/L NAA+2 mg/L Kin به میزان (۳/۷ درصد) بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت پایه MS حاوی1 mg/L IAA+ 0.5 mg/L BA به‌میزان (۲۵/۹۵ درصد) و کمترین باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت پایه MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد و محیط کشت پایه MS حاوی1mg/L IAA+ 1 mg/L BA به‌میزان (۷/۴ درصد) بود. به‌طورکلی، بیشترین میزان باززایی دراکثر محیط‌های کشت MS مربوط به لاین C-D-4 و کمترین میزان باززایی در اکثر محیط‌های کشت MS مربوط به لاین C-D-6 بود (شکل ۴).

www.SID.ir

Archive of SID



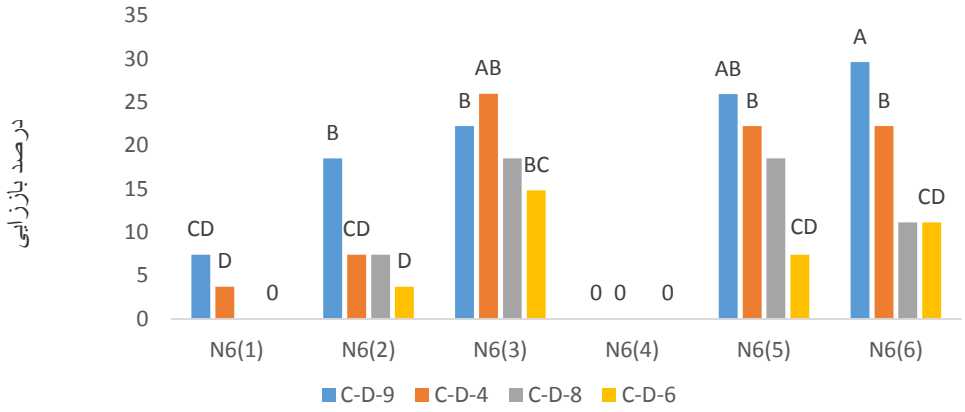
شکل ٤: مقایسه‌ی میانگین درصد باززایی لاین‌های مختلف گندم در محیط کشت مختلف MS

تاثیر محیط کشت N6 بر باززایی لاین‌های گندم

باززایی در این آزمایش بسته به لاین و نسبت به محیط کشت متفاوت بود (جدول۹)که با نتایج سایر محققین نیز مطابقت دارد(۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳) . مقایسه میانگین اثر متقابل نشان داد بالاترین میزان باززایی لاین C-D-9، در محیط کشت پایهN6 حاوی 1mg/L BA+1 mg/L IAA به‌میزان (۲۹/۶۲ درصد) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-9، در محیط کشت پایهN6 حاویmg/LKin 0.5 بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت پایهN6 حاویmg/L Kin 0.5 mg/L NAA+2 mg/L BAP به میزان (۱۸/۵۱ درصد) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت پایهN6 حاوی 0.5 mg/L BAP و 0.5 mg/LKin بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت پایهN6 حاویmg/L Kin 0.5 mg/L NAA+2 به میزان (۱۴/۸۱ درصد) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت پایهN6 حاوی 0.5 mg/L BAP و 0.5 mg/LKin بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت پایهN6 حاویmg/L Kin 0.5 mg/L NAA+2 به میزان (۲۵/۹۵٪) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت پایهN6 حاویmg/LKin 0.5 بود. در نهایت، بیشترین میزان باززایی در محیط کشت N6 مربوط به لاین C-D-9 و کمترین میزان باززایی مربوط به لاین C-D-6 می‌باشد. همچنین برای اکثر لاین‌ها بیشترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت پایهN6 حاوی mg/L 0.5 mg/L NAA+2 Kin با میانگین (۲۰/۰۴ درصد) و کمترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت پایهN6 حاوی 0.5 mg/LKin بود (شکل ۵).

www.SID.ir

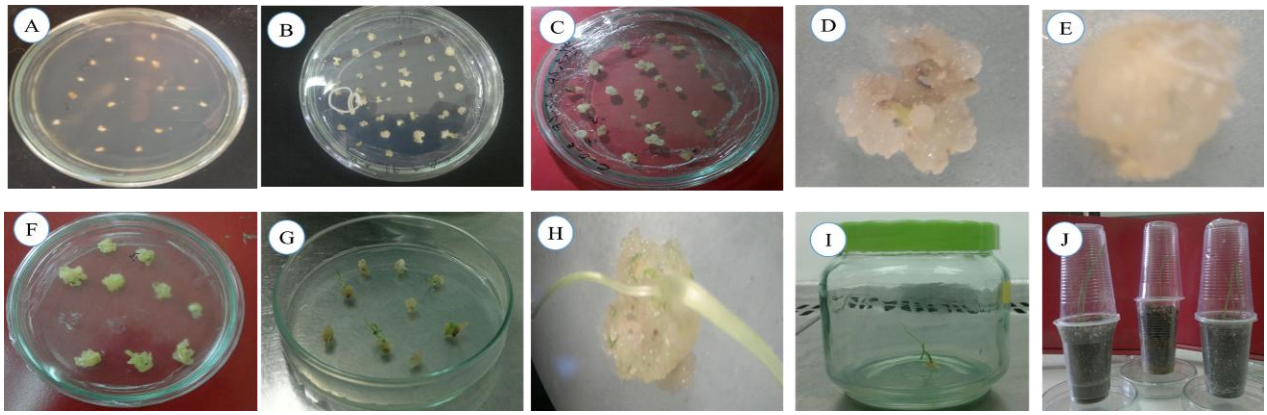
Archive of SID



شکل۵: مقایسه‌ی میانگین اثرمتقابل لاین‌های مختلف گندم در محیط کشت مختلف N6 روی درصد باززایی

القای کالوس و تولید کالوس‌های جنین‌زا در شرایط تاریکی از ریزنمونه جنین بالغ گندم

در این تحقیق برای القای کالوس‌زایی از جنین بالغ و از سه غلظت مختلف هورمون 2, 4-D (۲، ۲/۴ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. چند روز بعد از اینکه ریز نمونه‌ها در محیط کشت کالوس‌زایی (ML1C1) قرار گرفتند شروع به کالوس‌زایی کردند. در دو هفته اول رشد کالوس‌ها خیلی کم بود و بعد از دو هفته کالوس‌ها رشد بیشتری از خود نشان دادند. کالوس‌های حاصله از نظر ساختار متراکم، ترد و دارای سطح ناصاف بودند و از لحاظ رنگ کرم تا کرم مایل به زرد (به دلیل قرارگیری در شرایط تاریکی و عدم تولید کلروفیل) بودند (شکل ۶).



شکل ٦. مراحل مختلف القا کالوس و باززایی گیاه جو از ریزنمونه جنین بالغ. A: کشت جنین بالغ در محیط کالوس‌زایی ML1G1 . B: القا کالوس از جنین بالغبر روی محیط ML1G1 پس از ۵ هفته کشت در تاریکی. C: تکثیر کالوس‌های جنین‌زایی به‌دست‌آمده از جنین بالغ روی محیط. D: نمایی نزدیک از یک کالوس جنین‌زا. E: نمای نزدیک از یک کالوس غیر جنین‌زا. F: ایجاد نقاط سبزرنگ بر روی کالوس بعد از انتقال کالوس به محیط باززایی. G: القا ساقه هوایی از کالوس‌های جنین‌زا به‌دست‌آمده از جنین بالغ در محیط. H: نمایی نزدیک از یک ساقه هوایی حاصل از کالوس جنین‌زا. I: انتقال گیاهچه‌های حاصل از باززایی به محیط کشت ریشه‌زایی. J: انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به خاک و سازگاری گیاهان به شرایط طبیعی.

www.SID.ir

Archive of SID

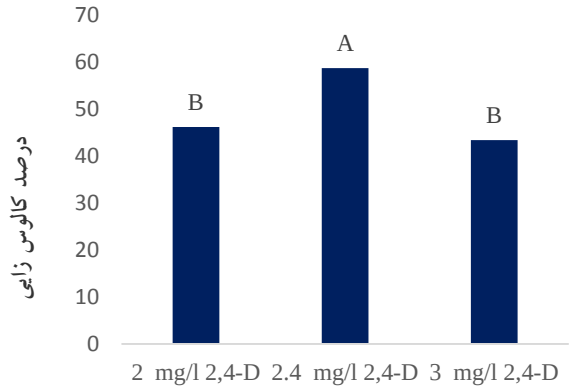
تجزیه واریانس داده‌های حاصل از کالوس‌زایی بر روی سطوح مختلف هورمون 2, 4-D نشان داد که بین چهار لاین گندم، سطوح مختلف هورمون 2, 4-D و نیز اثر متقابل لاین × سطوح مختلف هورمون حداقل در سطح احتمال پنج درصد از نظر درصد کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱۱)

جدول۱۱. تجزیه واریانس فاکتوریل تأثیر سطوح مختلف 2, 4-D و لاین‌های گندم بر روی کالوس‌زایی جنین بالغ گندم

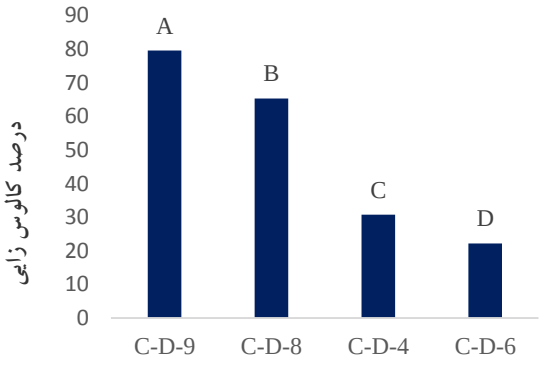
منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد کالوس‌زایی
2,4-D	۲	۶/۴۳۷**
رقم	۳	۵۴/۷۴۸**
2,4-D × رقم	۶	۱/ ۶۷۸*
خطا	۲۴	۰/۷۷۱

ضریب* و ** به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد است.

کالوس‌زایی گندم در این تحقیق بسته به ژنوتیپ و غلظت 2, 4-D متفاوت بود که با نتایج سایر محققین نیز مطابقت دارد(۲۳، ۲۴، ۲۵). بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به لاین C-D-9 (۷۹/۵۵٪) و کمترین میزان کالوس‌زایی مربوط به لاین C-D-6 (۲۲/۲۲٪) بود (شکل ۸). همچنین در سطوح مختلف هورمون 2, 4-D بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به سطح ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر با میانگین (۵۸/۷۷ درصد) بود (شکل ۷). با توجه به معنی‌دار بودن اثرمتقابل، بالاترین میزان کالوس‌زایی را لاین C-D-9 در تمامی غلظت‌های مختلف 2, 4-D و لاین C-D-8 در سطوح ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D تولید کردند و کمترین میزان کالوس‌زایی متعلق به لاین C-D-6 در سطوح ۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D بود (شکل ۹).



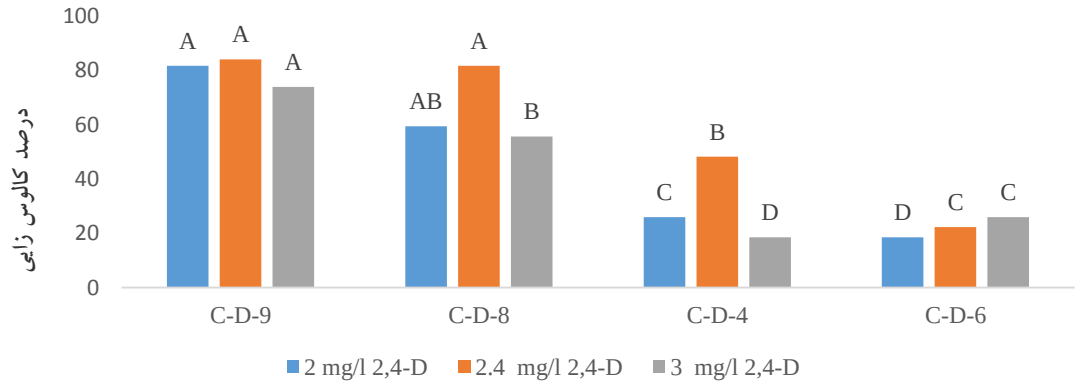
شکل ۷: مقایسه‌ی درصد کالوس‌زایی ارقام گندم در غلظت‌های مختلف هورمون 2, 4-D (۲، ۲/٤ و ۳ میلی‌گرم در لیتر)



شکل ۸: مقایسه‌ی میانگین درصد کالوس‌زایی ارقام مختلف گندم

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۹: مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل ارقام گندم در سطوح مختلف غلظت هورمون 2, 4-D

انتقال کالوس‌های به دست آمده از جنین بالغ گندم به محیط باززایی

بعد از انتقال کالوس به‌دست آمده از بهترین تیمار هورمونی (۲/۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D) حاصل از جنین بالغ گندم در شرایط تاریکی و انتقال کالوس‌ها به محیط جنین‌زایی سوماتیکی حاوی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نیترات نقره، کالوس‌های جنین‌زا در محیط باززایی به‌مدت شش هفته قرار گرفتند و بعد از این مدت میانگین درصد شاخه‌زایی هر رقم ثبت گردید. تجزیه واریانس داده‌های باززایی نشان داد که بین ارقام، محیط‌های مختلف کشت و اثرمتقابل لاین در محیط کشت از نظر درصد شاخه‌زایی حداقل در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱۲).

جدول ۱۲. تجزیه واریانس فاکتوریل تاثیر محیط کشت‌های مختلف و لاین‌های گندم بر روی درصد باززایی جنین بالغ گندم

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد باززایی
محیط کشت	۵	**۹/۳۱
رقم	۳	**۶/۳۰
رقم ×محیط کشت	۱۵	**۱/۹۱۵
خطا	48	0/399

** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد است.

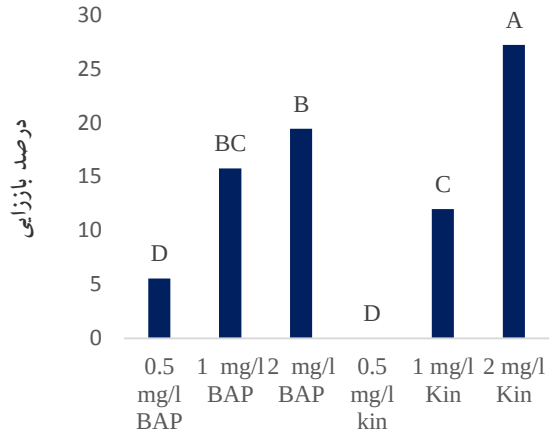
محیط کشت باززایی شامل هورمون Kin در سطوح ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر، و BAP در سطوح ۰/۵، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر بود. تقریباً کمتر از یک هفته پس از کشت کالوس‌ها در محیط باززایی در شرایط روشنایی (نور سفید)، آغاز اندام‌زایی به صورت نقاط سبزرنگ در سطح کالوس‌ها مشاهده گردید. روند تبدیل جنین‌های سوماتیکی به اندام در کالوس‌ها در هفته‌های بعد افزایش یافت. به نحوی که در

www.SID.ir

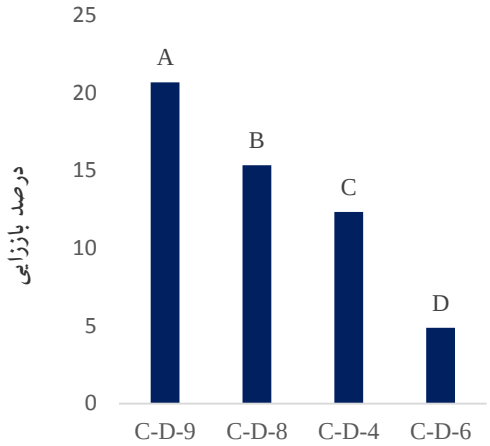
Archive of SID

هفته‌های آخر بر تعداد و رشد نوساقه‌های تشکیل شده اضافه شد.

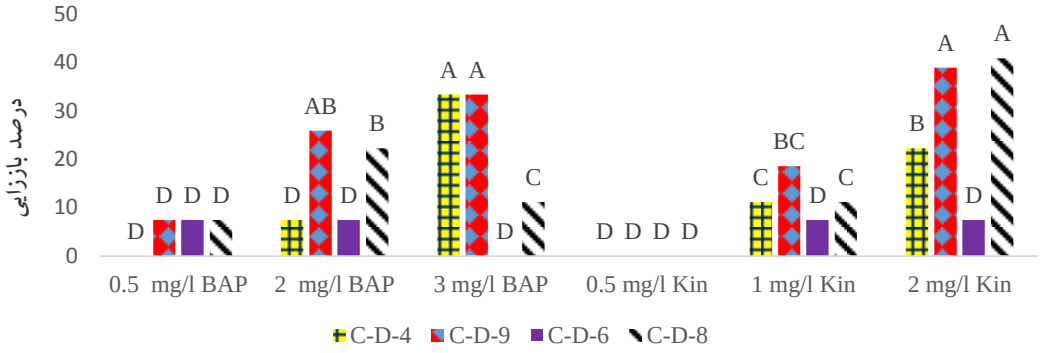
بیشترین میزان باززایی مربوط به لاین C-D-9 با میانگین (۲۰/۶۶ درصد(و کمترین میزان باززایی مربوط به لاین C-D-6 با میانگین (۴/۸۸ درصد) بود (شکل۱۱). همچنین در محیط‌های کشت متفاوت بیشترین میزان میانگین باززایی مربوط به محیط کشت mg/l Kin2 با میانگین ۲۷/۲۲ درصد بود (شکل ۱۰). و با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل محیط‌های کشت متفاوت با لاین‌های مورد مطالعه، بیشترین میزان باززایی در C-D-8 و C-D-9 در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون Kin به میزان (۴۰ درصد) مشاهده شد (شکل ۱۲).



شکل ۱۰: مقایسه‌ی میانگین درصد باززایی محیط‌های کشت متفاوت ارقام گندم



شکل۱۱: مقایسه‌ی میانگین درصد باززایی ارقام گندم مورد مطالعه



شکل ۱۲. مقایسه‌ی میانگین درصد باززایی محیط‌های کشت متفاوت و لاین‌های مختلف گندم

بحث

چندین فاکتور مؤثر درکشت بافت سلول در شرایط آزمایشگاه وجود دارد. یک سری از این فاکتورها داخلی و یک سری از این فاکتورها خارجی هستند. نوع ریزنمونه، ژنوتیپ رقم مورد استفاده و ترکیبات محیط کشت از فاکتورهای مهم درکشت بافت می‌باشد. تصور می‌شود مهم‌ترین فاکتور مؤثر ساختار ژنتیکی ریزنمونه است. در

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشی در گیاه گندم از جنین بالغ، میان‌گره و بخش‌های محور سنبله به‌عنوان ریزنمونه و از محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D استفاده نمودند و نتایج نشان داده که کالوس‌زایی به ژنوتیپ ارقام مورد استفاده بستگی دارد. همچنین این محققین نشان دادند حضور اکسین در محیط القای کالوس ضروری است (۲۶). در مطالعه‌ای که بر روی کالوس‌زایی از جنین‌های بالغ گندم صورت گرفت درصد کالوس‌زایی در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D، ۸۶/۶۷٪ و در محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D، ۸۷/۸۶ درصد و در محیط کشت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D، ۸۵ درصد به‌دست آمد (۲۷). در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D درصد کالوس‌زایی از جنین‌های بالغ بین ۹۶/۲۰-۶۸/۷۵٪ متغیر بود (۲۸). در آزمایشی دیگری از ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D برای القای کالوس استفاده کردند و مشاهده شد که درصد کالوس‌زایی در گندم زراعی بین ۸۵-۸۲ تا ۸۵ درصد و در گندم دوروم بین ۷۷ تا ۷۹ درصد٪ می‌باشد(۲۹).

در پژوهشی دیگر مشخص شد که نوع ترکیبات محیط کشت MS و برش طولی (نصف کردن) جنین گندم رسیده در باززایی مؤثر است. ۷۰٪ القای کالوس اولیه در تمام ارقام مورد آزمایش در محیط کشت حاوی 2, 4-D ۲ mg/l به دست آمد (۳۰). در آزمایشی، از ۳۹ رقم گندم زمستانه برای القای کالوس و باززایی استفاده کردند. برخی از ارقام درصد باززایی خوبی نشان دادند آن‌ها گزارش کردند که درصد القای کالوس و درصد باززایی کاملاً به رقم وابسته است (۲۲). برای باززایی از کالوس‌های به‌دست‌آمده از جنین‌های بالغ حمایت شده با آندوسپرم از هورمون BAP به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA استفاده کردند که حداکثر تشکیل گیاهچه بعد از چهار هفته ۳۵ تا ۴۰ درصد بود (۳۱).

در مطالعه‌ای که بر روی کالوس‌زایی از جنین‌های بالغ گندم صورت گرفت درصد کالوس‌زایی در محیط کشت حاوی ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D ، به ترتیب ۸۶/۶۷ درصد، ۸۷/۸۶ درصد و ۸۵ درصد به‌دست آمد(۲۷). در مطالعه‌ای درصد کالوس‌زایی ژنوتیپ‌های مختلف گندم در محیط کشت حاوی ۸ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D مشاهده کردند که درصد کالوس‌زایی از ۱۱/۶ تا ۸۹/۶ بین ارقام متفاوت بود (۳۲). در آزمایشی از ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D برای القای کالوس استفاده کردند و مشاهده شد که درصد کالوس‌زایی در گندم زراعی بین ۸۲ تا ۸۵ درصد و در گندم دوروم بین ۷۷ تا ۷۹ درصد می‌باشد (۲۹).

در پژوهشی دیگر اثر dicamba در کشت جنین بالغ هفت رقم گندم نان را بررسی شد. مشخص شد که پاسخ کشت بافت به ژنوتیپ و غلظت دیکامبا بستگی دارد (۳۳). بالاترین نرخ رشد کالوس ۶۳/۱ درصد در محیط کشت Linsmaier Skoog حاوی ۵ mg/l dicamba مشاهده شد (۲۴).

نتیجه‌گیری

ریزنمونه جنین نابالغ، بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به ارقام فلات و چمران با ۹۳/۴ و ۹۳/۲ در ۱۵ روز بعد از کشت بود. همچنین در بین محیط کشت‌های متفاوت القای کالوس، محیط کشت B2 کمترین درصد القای کالوس با متوسط ۷۶/۹۲ و محیط‌های B3 و B1 به‌ترتیب با متوسط ۹۱/۶۷ و ۹۱/۴۸ بیشترین درصد القاء کالوس ۱۵ روز بعد از کشت جنین نارس در محیط کالوس‌زایی داشته است. بیشترین میزان باززایی مربوط به رقم چمران و آزادی به‌ترتیب با ۱۸/۷۸ و ۳/۹۰ درصد از بیشترین و کمترین درصد تشکیل ساقه‌چه برخوردار بودند. همچنین رقم چمران و الوند به ترتیب با ۸۲/۵ و ۷۰/۳ درصد بیشترین و رقم آزادی با ۴۹/۵ درصد کمترین فراوانی باززایی را داشتند و

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین در بین محیط کشت‌های متفاوت باززایی محیط کشت C3 با تولید ۱۴/۹ درصد ساقه‌چه و ۷۲/۶ درصد فراوانی باززایی نسبت به سایر محیط‌ها برتری دارد.

ریزنمونه جنین بالغ، بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به لاین C-D-9 به میزان (۷۹/۵۵ درصد) و همچنین در سطوح مختلف هورمون 2, 4-D بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به سطح ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر با میانگین (۵۸/۷۷ درصد) بود. بیشترین میزان باززایی مربوط به لاین C-D-9 با میانگین (۲۰/۶۶٪) و همچنین در محیط‌های کشت متفاوت بیشترین میزان میانگین باززایی مربوط به محیط کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر (Kin) با میانگین (۲۷/۲۲ درصد) بود.

ریزنمونه قطعات برگی، بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به لاین C-D-9 (۸۲٪) و همچنین در سطوح مختلف هورمون 2, 4-D بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به سطح ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر با میانگین (۵۹/۶ درصد) بود. بیشترین درصد شاخه‌زایی ۲۹/۶۲٪ برای لاین C-D-9 در محیط کشت N6(6) حاوی ۱ mg/l IAA به‌همراه ۱ mg/l BA به دست آمد.

منابع

1. Kazemi Arbath, H .2005. Cereal morphology and physiology. Tabriz University Press.104.

2. Bushuk W. 1998. Wheat breeding for end product use. Euphytica 100(1): 137-145.

3. Carman JG, Jefferson NE, Campbell WF .1988. Induction of embryogenic (*Triticum aestivum* L.) calli: I. Quantification of genotype and culture medium effects, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 10: 101-106.

4. Chowdhury SH, Kato K, Yamamoto Y , Hayashi K .1991. Varietal variation in plant regeneration capacity from immature embryos among common wheat cultivars, Jpn. J. Breed. 41: 443-450.

5. NouriDelavar MZ, Arzani A. 2000. Analysis of callus induction and plant regeneration from immature embryo of rice cultivars. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 4(4): 57-71.

6. Ozgen M, Turet M, Ozcan S, Sancak C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter wheat genotypes. Plant Breeding 115(6): 4555-458.

7. Ichihashi S, Kato S. 1986. Clonal Propagation of Iris kaempferi by means of flower organ culture. Bulltein Aichi University Edu 35: 135-143.

8. Hagio T, Ichiri SS, Yamada T. 2002. Efficient plant regeneration through morphogenesis in Japanese commercial variety of wheat, In Vitro Cell. Dev. Biol. 38: 1394-1396.

9. Bhaskaran S, Smith RH. 1990. Regeneration in cereal tissue culture: a review, Crop Sci. 30(6): 1328-1336.

10. Jun ying C, Run qing Y, Hai xian Xin jian C . 2006 . Study on plant regeneration of wheat mature embryo under endosperm-supported culture. Agricultural Sciences in China. 5(8): 572-578.

11. Hess JR, Carman G .1998. Embryogenic competence of immature wheat embryos:genotype, donor plant, environment, and endogenous hormone levels. Crop Sci. 38: 249-253.

12. Yu Y, Wang J, Zhu ML, Wei ZM. 2008. Optimization of mature embryobased high frequency callus induction and plant regeneration from elite wheat cultivars grown in China. Plant Breeding 127: 249-255.

13. Filippov M, Miroshnichenko D, Vernikovskaya D, Dolgov S .2006. The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of

www.SID.ir

Archive of SID

wheat. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 84(2): 213-222.

14. Patnaik D, Khurana P. Genetic transformation of Indian bread (*Triticum aestivum*) and pasta (*Triticum durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo derived calli. BMC Plant Biology. 2003; 3: 1-11.

15. Delporte F, Mostade O, Jacquemin JM .2001. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 67: 73-80.

16. Ahmadabadi M, Ruf S, Bock R. 2007. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L). Transgenic Res 16(4): 437-448.

17. *Bohorova N.E Fennell S. McLean S.D. Pellegrineschi A* . 1999. Laboratory protocols-CIMMYT Applied Genetic Engineering Laboratory. CIMMYT Applied Biotechnology Center, International maize and wheat improvement center.

18. Alexander, P.S., Xia-Yi, K., Dong– Fang, C., and Malcolm, C.E. 2000. Production of fertile transgenic wheat plants via tissue electroporation. Plant Sci., 156: 227-233.

19. Murashige,T. and Skoog, F.1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-497.

20. Mathias R J, Simpson ES. 1986. The interaction of genotype and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L. em. thell) callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 7(1): 31-37.

21. Przetakiewicz A, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A. 2003. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 245-256.

22. Sears RG, Decard EL. 1982. Tissue culture variability in wheat: Callus induction and plant regeneration. Crop Sci 22: 546-550.

23. Tarinejad A, Toorchi M, Habashi A, Pellegrineschi A. 2007. Optimization of gene transfer in Iranian bread wheat cultivars by biolistic bombardment. Journal of Food Agriculture and Environment, 5(3&4): 237-241.

24. Kilinc M .2004. Effects of Dicamba concentration on the embryo cultures of some bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 18(2): 58-61.

249-253.

25. Wang CT, Wei ZM. 2004. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat(*Triticum aestivum* L.) leaf base. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult 77: 149-156.

26. O'Hara JF, Street HE. 1978. Wheat callus culture: the initiation, growth and organogenesis of callus derived from various explant sources. Annals of Botany 42: 1029-1038.

27. Bi RM, Kou M, Chen LG, Mao SR, Wang HG. 2007. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. Plant Breeding 126(1): 9- 12.

28. Bi R, Wanh H. 2008. Primary studies on tissue culture from mature embryos in diploid and tetraploid wheat. Front. Agric. China 2(3): 262-265.

29. Chauhan H, Desai SA, Khurana P. 2007. Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticum aestivum*, *Triticum durum* and *Triticum dicoccum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 91(3): 191-199.

30. Yu Y, Wei ZM. 2007. Factors affecting efficient plant regeneration from wheat mature embryos. Journal of Molecular Cell Biology 40(6): 443-450.

31. Rashid A, Qureshi RH, Hollington PA, Jones RGW. 1999. Comparative response of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to salinity at seedling stage. Agron. Crop Sci. 182: 199-207.

www.SID.ir

Archive of SID

32. Chen J, Yue R, Xu H, Chen X. 2006. Study on Plant Regeneration of Wheat Mature Embryos Under Endosperm- Supported Culture. Agricultural Sciences in China 5(8): 572-578.

33. Turhan H, Baser I. 2003. Callus induction with mature embryo culture technique in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Indian Journal of Agricultural Sciences 73: 399-401.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Spring 2018; 9(1)

Callus induction and regeneration of bread wheat cultivars from Different explants

Gholami AA, M.Sc.[1*], Tarinejad A, Ph.D.

1. MSc, Department of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
2. Department of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

* Email corresponding author: Gholami.2359@gmail.com

Received: 8 Jan. 2018 Accepted: 27 May. 2018

Abstract

Aim: In the current study, the effect of growth regulators, type and composition of the culture medium, genotypes of the used cultivars and type of explants were investigated on the ability of callusing and regeneration of wheat cultivars.

Material and methods: two culture media (N6, MS), three immature embryos, mature embryos and leaf cuttings were used. N6 medium containing growth regulator 2, 4-D was used for callusing of embryo and the leaf pieces, but for regeneration N6 medium containing growth regulators NAA, BAP and Kin was used. For calligraphy and regeneration of immature embryos, MS medium containing a variety of growth regulators were used.

Results: Callus induction and regeneration differed based on the genotype, type of explants and media composition. Chamran variety had the highest rate of callus and regeneration from immature embryo. For the adult embryo, the highest level of calligenesis and regeneration related to the C-D-9 line. In the case of leaf parts, the highest level of callus related to the C-D-9 at the level of 2, 4-D (2.4mg/L). The highest percentage of shoots belonged to the C-D-9 line that was obtained in N6 medium (6) containing IAA (1mg/L) + BA (1mg/L).

Conclusion: Response to tissue culture in wheat is affected by several factors such as genotype, type of explants, growth regulators. Results proved that the type and concentration of used growth regulators in the culture medium differ among cultivars for callus induction and wheat regeneration. The most important factor affecting wheat cultivation was immature embryo explant and the genotype type of the used cultivar.

Key words: Wheat, tissue culture, mature embryos, immature embryos

www.SID.ir