نشریه زراعت
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۲، پاییز ۱۳۹۰

مطالعه اثر تیمار نوری بر میزان جنین‌زایی و باززایی گیاهچه‌ها در کشت میکروسپورهای سه رقم کلزای بهاره

• **پیمان شریفی** (نویسنده مسئول)
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، گروه زراعت و اصلاح نباتات، رشت، ایران
• **احمد معینی**
دانشیار دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات دانشگاه تربیت مدرس
تاریخ دریافت: خرداد ماه ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۱۳۸۸
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۱۲۸۲۹۱۹۷
Email: kadose@yahoo.com

چکیده

استفاده از روش هاپلوئیدهای مضاعف‌شده می‌تواند برای اهداف اصلاحی از جمله کاهش طول دوره اصلاحی کاربرد داشته باشد. در تحقیق حاضر تاثیر تیمار نوری بر جنین‌زایی از کشت میکروسپورها در سه رقم کلزا؛ گلوبال، اپشن و پی‌اف و همچنین باززایی گیاهچه‌ها از جنین‌های حاصله در طی دو آزمایش جداگانه مورد مطالعه قرار گرفت. در آزمایش اول میزان جنین‌زایی میکروسپورها در محیط کشت NLN-۱۳ تحت تاثیر سه تیمار نوری شامل تاریکی مطلق، ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و تناوب یک روز تاریکی و یک روز ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۵ تکرار مطالعه شد. نتایج حاکی از معنی‌دار شدن اثر رقم، تیمار نوری و همچنین اثر متقابل بین دو فاکتور بود. تیمار تاریکی در دو رقم گلوبال و پی‌اف تأثیر معنی‌داری بر روی میزان جنین‌زایی داشت و سبب افزایش معنی‌دار میزان جنین‌زایی در مقایسه با دو تیمار دیگر شده است و در این دو رقم، میزان جنین‌زایی در تیمار تاریکی در گروه a قرار گرفت. اما در رقم اپشن سه تیمار نوری تفاوت معنی‌داری با همدیگر ندارند و نشان می‌دهد که در این رقم جنین‌زایی تحت تأثیر تیمار نوری قرار نگرفته است. در آزمایش دوم نیز میزان باززایی گیاه از جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی دو فاکتوره با ۱۰ تکرار مطالعه شد. رقم شامل گلوبال، اپشن و پی‌اف فاکتور اول و جنین‌های بدست آمده در شرایط تاریکی و ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی فاکتور دوم را تشکیل دادند. نتایج حاکی از آن است که فقط اثر رقم بر روی میزان باززایی گیاهچه‌ها معنی‌دار بود. نتایج همچنین نشان داد که رقم پی‌اف بیشترین تعداد گیاهچه‌های باززایی شده را داشت و در گروه a قرار گرفت.

کلمات کلیدی: کشت میکروسپور، جنین‌زایی، باززایی ، تیمار نوری، *Brassica napus* L.

www.SID.ir

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 92 pp: 95-102

The effects of photoperiod on embryogenesis of microspore culture in three spring rapeseed cultivars

By: Peyman Sharifi, Department of Agronomy and Plant Breeding, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rash , Iran. (Corresponding Author; Tel: +989112829197) Ahmad Moieni, Associate Professor of Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

Application of doubled haploid method can be used for breeding objectives such ac reduction time of breeding periods. In this research, the effects of photoperiod on embryo production from microspore culture of three rapeseed cultivars; Global, Option and PF7045/91 and plantlet regeneration in embryo-derived from microspores were studied in two separate experiments. In the first experiment, embryo production were analyzed from microspores cultured in NLN-13 medium influenced by photoperiod treatments were; darkness, 16/8 (light/dark) and alternative daily darkness and 16/8 (light/dark) in a factorial experiment based on completely randomized design with two factors in 5 replications. The results showed that there were significant differences between two factors and interaction between them on embryogenesis. The numbers of embryos were increased significantly in Global and PF7045/91 cultivars under darkness condition and embryogenesis were laid in group A for this two cultivar. However, the effect of photoperiod was not significant on embryogenesis in Option cultivar. In the second experiment, the plant regeneration in embryos-derived from microspores was evaluated in a factorial experiment based on completely randomized design with two factors in 10 replications. Cultivar contain Global, Option and PF7045/91 and embryo-derived from microspores under darkness and 16/8 (light/dark) were first and second factor, respectively. The results indicated that only the cultivars had significant differences. The results also indicated PF7045/91 cultivar had the highest plantlet regeneration and was set in group A.

Key words: Rapeseed, *Brassica napus* L., Microspore Culture, Embryogenesis, Plant regeneration photoperiod.

Archive of SID

مقدمه

برای تولید ارقام اصلاح شده در گیاهان مختلف می‌توان از روش های اصلاحی کلاسیک استفاده کرد، اما مهمترین معایب این روش‌ها طولانی بودن دوره اصلاحی در آنها و همچنین هزینه بالای آنها می‌باشد (۱۶). با استفاده از روش هاپلوئیدهای مضاعف شده می‌توان طول برنامه اصلاحی را بطـور قابل ملاحظه‌ای کاهش داد. گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف شـده می‌توانند برای اهداف مختلف دیگری مانند انتخاب گیاهان جهش یافته، مطالعات بیوشیمیایی و مهندسی ژنتیک کاربرد داشته باشند (۱۰). در حال حاضـر تکنولوژی هاپلوئیدهای مضاعف شـده در نقاط مختلفی از دنیـا به عنوان یـک روش مکمل بـرای تولید لینه‌هـای هموزیگوس در کلـزا مورد اسـتفاده قرار می‌گیرد (۲۵). مرحله نمو میکروسـپورها از عوامـل موثر در موفقیت کشـت میکروسـپور می‌باشـد. مراحل مختلف نمو میکروسـپورها شـامل مرحله تتـراد، مرحله تک هسـته‌ای ابتدایی، مرحله تک هسـته‌ای میانی، مرحله تک هسته‌ای واکوئل‌دار، مرحله تک هسـته‌ای انتهایـی واکوئل‌دار، مرحله تک هسـته‌ای انتهایی و مرحله دو هسـته‌ای می‌باشد(۲۹). مطالعات سیتولوژیکی نشان می‌دهند که مرحله مناسـب جنین‌زایی از کشـت میکروسـپور در کلزا مرحله تک هسته‌ای انتهایی تا دو هسـته‌ای ابتدایی می‌باشد (۹). در این زمینه مشخص شده اسـت که اندازه غنچه بر روی میزان جنین‌زایی موثر می‌باشـد، بطوریکه Eyasu و همـکاران نشـان داده‌اند که غنچه‌هایی بـه طول ۲/۵ تا ۳/۲۵ میلی‌متر سـبب تولید بیشـترین میزان جنین از کشت میکروسپورها در *Brassica carinata* می‌شـود (۸). در باززایی گیاهان، عوامل مختلفی مانند مرحله رشد و نمو، بلوغ و اندازه جنین موثر می‌باشند (۲۷).

جنس براسـیکا شـامل گونه‌های بسـیاری از جمله کلزا می‌باشد. از زمانیکه تولید جنین‌های هاپلوئید از میکروسـپورهای کلزا برای اولین بار توسـط Lichter در سال ۱۹۸۲ گزارش شـد (۲۱)، پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در توسـعه سیستم مناسب تولید جنین از میکروسپور حاصل شـده است (۳۰). کشت میکروسپورهای ایزوله روش مناسبی برای تولید لاین‌های هموزیگوت می‌باشد و اغلب واریته‌های کلزا نسبت به این روش پاسخ مثبت می‌دهند (۲۸).

از جهت تاثیر نوع ژنوتیپ مشـخص شده است که انواع بهاره معمولاً پاسخ‌دهی بیشتری نسـبت به انواع پاییزه از نظر میزان جنین‌زایی دارند (۲۳). حال در بین تیپ‌های فوق ژنوتیپ نیز یکی از عوامل اصلی موفقیت در تولید جنین از کشت میکروسپورها و بساک در جنس براسیکا می‌باشد. تاثیر این فاکتور در تمام گونه‌های براسیکا که کشت بساک و میکروسپور در آنها انجام گرفته مشـاهده شده است (۵). در گونه *B. napus* از نظر جنین‌زایـی تنوع بالایی وجود دارد، یعنی ارقام مختلف از نظر جنین‌زایی با یکدیگر متفاوت می‌باشـند، اما رابطه مشخصی بین خصوصیات عمومی ژنوتیپ‌ها و حداکثر توانایی جنین‌زایی هنوز به روشنی تعریف نشده است (۱۶). در زمینه تأثیر ژنوتیپ مشـخص شده است که اثر متقابل ژنوتیپ و محیـط نیز در بعضی از گونه‌های جنس براسـیکا وجود دارد به نحوی که، بعضی ژنوتیپ‌ها در شـرایط محیطی ویژه‌ای به کشـت میکروسـپور

www.SID.ir

پاسخ می‌دهند. در تحقیقی گیاهان بدست آمده از مزرعه بهتر از گیاهان کشت شده در گلخانه به کشت میکروسپور پاسخ دادند یعنی اثر متقابل (ژنوتیپ × محیط) وجود داشت (۲۴). در زمینه تاثیر ژنوتیپ بر روی باززایی در ارقام مختلف کلزا در تحقیقی فراوانی باززایی گیاه بسته به رقم متفاوت و از ۴۷-۱ درصد درصد متغیر گزارش گردید (۲۰).

عوامل مختلف محیطی مانند درجه حرارت و روشنایی بر فراوانی جنین‌زایی از کشت میکروسپورهای کلزا موثر می‌باشند. در زمینه تأثیر روشنایی از آزمایشات مشخص شده است که تاریکی تقویت کننده جنین‌زایی می‌باشند، در صورتی که نور سفید برای جنین‌زایی بازدارنده می‌باشد (۲۶). عموماً کشت بساک و میکروسپورهای ایزوله در شرایط تاریکی نگهداری می‌شوند. بعد از تشکیل جنین‌ها کشت‌ها به روشنایی منتقل می‌شوند تا رشد و نمو جنین افزایش یابد، در کشت بساک *B. oleraceae* نگهداری در تاریکی نسبت به تیمار روشنایی بهتر بوده است (۳۱). در تحقیقی میکروسپورهای ایزوله کلزا پس از کشت به مدت ۷ روز به تاریکی منتقل گردید و در نتیجه این تحقیق میزان جنین‌زایی به طور قابل توجهی افزایش یافت (۳۲). عبداللهی و همکاران در تحقیقی تأثیر شوک گرمایی و تراکم میکروسپور را در محیط کشت مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که قرار دادن محیط کشت با تراکم ۶۰۰۰۰ میکروسپور در هر میلی‌لیتر در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد برای ۱۰ روز و سپس انتقال به ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت می‌تواند بیشترین مقدار جنین را تولید نماید (۳). Gu و همکاران در آزمایشی دریافتند که بیشترین میزان باززایی گیاهچه از جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور کلزا بدون واکشت با استفاده از تعویض محیط کشت و کاهش غلظت ساکارز حدود ۴۸ ساعت بعد از انتقال جنین‌ها به محیط باززایی سبب افزایش میزان باززایی می‌شود (۱۴). شریفی و همکاران تعدادی از عوامل موثر بر جنین‌زایی میکروسپورها و باززایی گیاهچه‌ها در کلزا را مورد مطالعه قرار دادند و به نقش مثبت اسید جیبرلیک در باززایی گیاهچه‌های نرمال اشاره نمودند و نشان دادند که برای باززایی گیاهان طبیعی به مقدار مشخصی از اسید جیبرلیک در محیط کشت نیاز است و نیز به تدریج با افزایش غلظت اسید جیبرلیک از میزان گیاهان طبیعی کاسته می‌شود (۱).

فراوانی بالای جنین‌های بدست آمده از این سیستم ابزار مناسبی برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی کلزا می‌باشد. استفاده از این تکنیک در حال حاضر با موفقیت هایی همراه بوده است، به نحوی که با استفاده از کشت میکروسپور، در کشور کانادا، رقام زیادی از کلزا مانند: Plumbshot، Phoenix، LoLinda، Kingfisher، Kastan و Tornado، Sumit تولید شده است (۴)

هدف از تحقیق حاضر مطالعه تأثیر تیمار نوری بر میزان جنین‌زایی میکروسپورهای کلزا و باززایی گیاهچه‌ها از جنین‌های حاصل از میکروسپورها و همچنین ارزیابی اختلافات احتمالی موجود بین سه رقم مورد مطالعه از نظر صفات فوق می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت میکروسپورهای ایزوله کلزا

در این تحقیق از سه رقم کلزای بهاره (Option)،(Global) و (PF۷۰۴۵/۹۱) که از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه گردیده بود، استفاده شد. ارقام فوق جز ارقام بهاره و دو صفر، با میزان روغن حدود ۴۰ تا ۴۵ درصد، دارای قوه نامیه بالایی (بیش از ۹۰ درصد) و مخصوص کشت در مناطق معتدل و گرم و مرطوب می‌باشند. آزمایشات در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس در سال ۱۳۸۱ انجام شد. بذور این ارقام در یک اتاق رشد کنترل شده با شدت نور اتاق رشد ۵۵۰۰ لوکس و تیمار نوری اتاق رشد شامل ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/ روشنایی) با دمای ۱۰ / ۱۵ درجه سانتی گراد (شب / روز) کشت گردیدند. برای تامین نور اتاق رشد، از ۶ لامپ ۴۰۰ وات بخار سدیم (IP۵۵ ، ML ، ۲۵۰/۴۰۰W) استفاده شد. از محیط IMM(۱۱) حاوی ۱۳ درصد ساکارز، جهت جدا کردن میکروسپورها از غنچه‌ها و از محیط کشت مایع NLN-۱۳ (۱۱) حاوی ۱۳ درصد ساکارز و فاقد هورمون برای کشت میکروسپورهای ایزوله استفاده گردید (جدول ۱). محیط‌های جداسازی و کشت میکروسپورها به ترتیب توسط اتوکلاو کردن و فیلتر کردن (۰/۲۲ میکرومتر)، استریل شدند.

محیط ایزولاسیون میکروسپورها در این تحقیق، مطابق با پرتکل Fletcher و همکاران (۱۱) تهیه گردید. برای تهیه این محیط، ۱۳۰ گرم ساکارز را در داخل یک لیتر آب حل کرده و pH محلول حاصل روی ۶ تنظیم گردید و سپس در داخل بطری‌هایی تقسیم شد بطوری که در هر بطری حدود ۱۰۰ میلی لیتر محلول ریخته شد و سپس درب آنها را محکم بسته شد و در داخل اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه با دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۲ بار قرار گرفتند تا استریل شوند، سپس در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و طی آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند (۱۱).

محیط کشت NLN-۱۳ به دلیل وجود برخی ویتامین‌ها و مواد حساس به دمای بالا، توسط دستگاه فیلتراسیون (Millipore) استریل گردید. دستگاه فیلتراسیون دارای فیلترهای به قطر ۰/۲۲ mμ با استفاده از اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۲ بار به مدت ۳۰ دقیقه استریل شدند. همراه این دستگاه بطری‌هایی با حجم حدود نیم لیتر نیز برای ریختن محیط کشت استریل شده، توسط اتوکلاو استریل گردیدند. پس از استریل نمودن به زیر لامینار روشن منتقل شده و با الکل ۷۰ درصد، شیلنگ مربوط به پمپ خلاء ضدعفونی شده و پمپ روشن شد و به لوله مخصوص دستگاه متصل گردید. در اثر خلاء ایجاد شده، محیط کشت از فیلتر عبور کرده و آلودگی‌های آن گرفته می‌شود. پس از اتمام کار دستگاه، ابتدا قبل از خاموش کردن پمپ خلاء، شیلنگ آن از دستگاه فیلتراسیون جدا و سپس پمپ خاموش شد و محیط کشت استریل شده در بطری‌هایی که همراه دستگاه استریل شده بودند توزیع گردید و درب آنها بسته و با فویل آلومینیوم پوشیده شد و پس از حدود یک هفته از این محیط برای کشت میکروسپور استفاده گردید (۱۱).

از هر کدام از ارقام تعداد ۱۰۰ غنچه به طول ۴-۳ میلی‌متر، مطابق با مرحله تک‌هسته‌ای انتهایی و دوهسته‌ایی ابتدایی، انتخاب و با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه استریل سطحی و سپس دو مرتبه با آب مقطر استریل سرد (۴ درجه سانتی گراد) و هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه، شسته شدند. در مرحله بعد، غنچه‌ها به داخل ظرف سرد (۴ درجه سانتی گراد) مخلوط‌کن کوچک (میکروبلندر) منتقل

Archive of SID

شده و سپس ۳۰ میلی‌لیتر از محیط جداسازی میکروسپورها به آنها اضافه شـد. غنچه‌ها سـه مرتبه و هر بار به مدت ۱۰ ثانیه بوسـیله مخلوط‌کن آسـیاب شدند. مخلوط بدست آمده برای جداسازی میکروسپورها بر روی دو فیلتر که به ترتیب دارای قطر ۱۰۰ و ۵۰ میکرومتر بودند، منتقل گردید و سپس دیواره‌های ظرف مخلوط‌کن با ۲۰ میلی‌لیتر از محیط جداسازی میکروسـپورها شسته شد. محلول بدست آمده نیز به روی فیلترها منتقل شـد. سوسپانسیون میکروسپورهای بدست آمده دو بار و با سرعت ۱۲۷۰ دور در دقیقـه (شـعاع چرخش: ۱۵۵ میلی‌متر) و هـر مرتبه به مدت ۴ دقیقه سـانتریفیوژ گردید. بعد از اولین سـانتریفیوژ، مایع فوقانی حذف و رسـوب بدسـت آمده مجددا توسـط ۵۰ میلی‌لیتر از محیط جداسازی میکروسپورها به حالت سوسپانسیون در آمد و در دومین سانتریفیوژ پس از حذف مایع فوقانی، رسـوب حاصل توسـط ۴ میلی‌لیتر محیط کشـت NLN-۱۳ به حالت سوسپانسـیون درآمد. تراکم میکروسـپورها توسط لام شمارش تعیین و سپس با توجه به تراکم ۶۰۰۰۰ میکروسپور در هر میلی‌لیتر، حجم سوسپانسیون میکروسپورها تنظیم شد و جهت کشت به پتری‌دیش‌های اسـتریل (با قطر ۱۵ سانتی متر)، از قرار ۱۲/۵ میلی‌لیتر در هر پتری‌دیش توزیع گردید. پتری‌دیش ها با دو لایه پارافیلم درزگیری و جهـت پیش تیمار حرارتی، به مدت ۱۴ روز به انکوباتور تاریک با دمای ۳۰ درجه سـانتی گراد در شرایط ثابت و بدون استفاده از شیکر) منتقل شـدند. بعد از پیش‌تیمار حرارتی، پتری‌دیش‌ها به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سـانتی گراد و بر روی شـیکری با سرعت ۴۰ دور در دقیقه منتقل شدند و در این مرحله، سه تیمار تیمار نوری به شرح زیر اعمال شد:

۱- تیمار تاریکی مطلق

۲- ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی

۳- تناوب یک روز تاریکی و یک روز ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی

مطالعه جنین‌زایی بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام شـد. به دلیل اینکه در این تحقیق هدف بررسی تاثیـر رقم، تیمار نـوری و اثرات متقابل آنها بوده اسـت، در هر دو مورد جنین‌زایـی و باززایی گیاهچـه از جنین‌های حاصله از آزمایش فاکتوریل اسـتفاده گردید. هر پتری‌دیش به عنوان یک تکرار محسـوب شـد و در مجموع ۴۵ پتری‌دیش مورد بررسـی قرار گرفـت. در حدود ۴۰ روز بعد از کشـت میکروسـپورها، جنین‌های دارای اندازه حدود ۰/۵ میلی‌متر و بزرگتر، شـمارش و مورد تجزیه و تحلیـل آماری قرار گرفتند. از آنجا که اگر داده‌های حاصـل از یک آزمایش توزیع نرمال نداشته‌باشـند، تجزیه آماری آنها درسـت و معتبر نمی‌باشـد و بایسـتی اقدام به تبدیل داده‌ها نمـود (۲)، داده‌های آزمایـش حاضر نیز با توجه به عدم داشـتن توزیع نرمـال، به روش تبدیل لگاریتمی نرمال گردیدنـد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزارهای SPSS و MSTATC استفاده گردید. برای تبدیل داده‌ها از روش‌های مختلف تبدیل اسـتفاده گردید که در نهایت با تبدیل لگاریتمی داده‌ها به نحو بارزتری توزیع نرمال را نشـان دادند. در مواردی کـه اثر متقابل دو فاکتور معنی‌دار بودند برای مقایسـه میانگین، به جای اینکه یک سطح خاص از هر کدام از فاکتورها یا عوامل به طور کلی مورد بررسـی قرار گیرد و به عنوان یک سـطح مناسـب توصیه شود، سطوح مختلف یک فاکتور در هر کدام از سطوح فاکتور دیگر به صورت جداگانه مورد تجزیه واریانس و مقایسه میانگین قرار گرفتند و به عبارتی دیگر به جای اظهارنظر در مورد اثرمتقابل فاکتورها، اثرات سـاده یکی از فاکتورها در سطوح فاکتور دیگر مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۲).

باززایی گیاه کامل از جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور

برای باززایی گیاهچه، از محیط کشـت جامـد B۵ (۱۲) حاوی ۰/۱ (میلی گرم در لیتر) اسید جیبرلیک (GA۳)، ۲ درصد ساکارز و ۰/۸درصد آگار- آگار و (pH= ۷/۵) اسـتفاده شـد. این محیط کشت با استفاده از اتـوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه اسـتریل گردید و سـپس در پتری‌دیش‌های یـک بار مصرف (به قطر ۱۰ سـانتی متر) و به میـزان ۱۲/۵ میلی‌لیتر در هر پتری‌دیش‌توزیع گردید. جنین‌زایی در کشـت میکروسـپورهای کلزا به صورت جنینی زایی مسـتقیم و بدون تشـکیل کالوس بوده است. پس از ۲۵ تـا ۳۵ روز جنین‌هایی به انـدازه۴-۳ میلی‌متر به روی این محیط کشـت منتقل شدند و هر پتری‌دیش حاوی ۱۰ جنین بود. پس از انتقال جنین‌ها به محیط باززایی، پتری‌دیش‌ها به اتاق رشـد کنترل شـده‌ای با دمای ۲۵ درجه سـانتی گراد و تیمار نـوری ۱۶/۸ (تاریکی/ نور) منتقل گردیدنـد. مطالعه باززایی گیاه به صـورت آزمایش فاکتوریل دو فاکتوره، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار انجام شد. رقم در سه سطح گلوبال، اپشـن و پی‌اف فاکتور اول و جنین‌های بدست آمده در دو سطح شـامل جنین‌های بدسـت آمده در تاریکی و جنین‌های بدست آمده در شـرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی فاکتور دوم را تشکیل دادند. با توجه به اینکه جنین‌های حاصله در دو شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکـی و تنـاوب یک روز در میان تاریکی، ۱۶ سـاعت نور و ۸ سـاعت تاریکی، علی‌رغم تفاوت کمی، از لحاظ ظاهری با یکدیگر تفاوت نداشتند، بـرای آزمایش باززایی از جنین‌های حاصله از تاریکی و ۱۶ سـاعت نور و ۸ سـاعت تاریکی اسـتفاده شد و به عبارتی فاکتور دوم فقط در دو سطح بود. هر تکرار از یک پتری‌دیش حاوی ۱۰ جنین تشـکیل شد. حدود ۳۰ روز بعـد از انتقال جنین‌ها به محیط کشـت باززایی، تعداد گیاهچه‌های باززایی شده طبیعی یعنی گیاهچه‌های حاوی برگها و ریشه های طبیعی، شمارش شـدند. داده‌ها به روش تبدیل لگاریتمی نرمال گردیدند و برای تجزیـه و تحلیل آماری از نرم افزارهای SPSS و MSTATC اسـتفاده گردید.

نتایج و بحث

تأثیر روشنایی و تاریکی بر جنین‌زایی

میکروسپورهای هر سه رقم استفاده شده در این تحقیق، جنین تولید کردند و در واقع تولید جنین به صورت مسـتقیم انجام شد و کالوس‌زایی در مرحله تولید جنین وجود نداشته است. لازم به ذکر است که جنین‌های تولید شده در شرایط مختلف نوری از نظر رنگ با همدیگر تفاوت داشتند. به نحوی که جنین‌های رشـد کرده در تیمار تاریکی مطلق، به رنگ زرد متمایل به کرم و جنین‌های رشـد کرده در دو تیمار ۱۶ سـاعت نور و ۸ ساعت تاریکی و تناوب یک شبانه روز تاریکی و یک شبانه روز ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی به رنگ سبز بودند (شکل ۱). البته از لحاظ ظاهری (و نه کمی و آماری) به جز تفاوت در رنگ جنین‌های حاصله که می‌توان آن را به شـرایط فتوسنتز و در نتیجه تقویت رنگدانه‌ها نسبت داد، تفاوت محسوسـی بین جنین‌های حاصله مشـاهده نگردید، کـه این موضوع به

Archive of SID

راحتی از شکل ۲ قابل استنتاج و مشاهده می‌باشد. البته همانطور که در زیر ملاحظه می‌شود، صفت جنین‌زایی بین ارقام مختلف و تحت تأثیر تیمارهای نوری مختلف نیز با یکدیگر دارای تفاوت می‌باشند.

نتایج تجزیه واریانس برای صفت جنین‌زایی جدول ۲ نشان می‌دهد، که اثرات ساده رقم و تیمارهای مختلف نوری و همچنین اثرات متقابل بین دو فاکتور (رقم و تیمار نوری) در سطح احتمال ۱ درصد با همدیگر اختلاف معنی‌داری دارند و نشان می‌دهد که دو فاکتور مورد مطالعه بطور مستقل عمل نکرده‌اند. بدیهی است که در این صورت مقایسه میانگین اثر اصلی ژنوتیپ و تیمار نوری اعتبار کافی ندارد و به منظور بررسی ماهیت اثرات ساده، تجزیه جداگانه انجام گرفت (۲۲) و اثرات ساده فاکتور تیمار نوری در هر کدام از سطوح رقم برای صفت جنین‌زایی مورد بررسی قرار گرفت و به عبارتی نشان داده شد که سطوح مختلف تیمار نوری بر روی هر کدام از صفات به چه نحوی تأثیرگذار می‌باشند.

بنابر توجیه فوق، اثر ساده ۳ تیمار نوری برای هر کدام از ارقام در جدول ۳ نشان داده شده است. در رقم گلوبال، میزان جنین‌زایی تحت تأثیر سطوح مختلف تیمار نوری با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند و در بین سه تیمار نوری مورد مطالعه، میزان جنین تولید شده در شرایط تیمار تاریکی بطور معنی‌داری با سایر تیمارها اختلاف داشته و تحت شرایط تاریکی در رقم مذکور بیشترین تعداد جنین تولید شده است. مقایسه میانگین میزان جنین تولید شده در تیمارهای نوری مختلف نشان می‌دهد که در رقم گلوبال، میزان جنین‌زایی در تیمار تاریکی در گروه a و در دو تیمار نوری دیگر در گروه b قرار گرفته‌اند. در رقم پی‌اف نیز بین سه تیمار نوری از نظر میزان جنین‌زایی تفاوت معنی‌دار وجود دارد و میزان جنین‌زایی در این رقم با توجه به نوع تیمار نوری متفاوت است، به نحوی که در این رقم نیز همانند رقم گلوبال در تیمار تاریکی بیشترین میزان جنین از کشت میکروسپور تولید شده است و جنین‌زایی در سه تیمار نوری مختلف در سه گروه مجزا قرار گرفته‌اند. در رقم Option میزان جنین‌زایی در سه تیمار تیمار نوری تفاوت معنی‌داری با همدیگر ندارند و نشان می‌دهد که در این رقم، جنین‌زایی تحت تأثیر تیمار نوری قرار نگرفته است و میزان جنین‌زایی در شرایط مختلف تیمار نوری از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان نمی‌دهند. بطور کلی این نتایج نشان می‌دهد که در دو رقم Global و PF۷۰۴۵/۹ تیمار تاریکی برای جنین‌زایی بطور معنی‌داری موثر بوده است و سبب افزایش معنی‌دار میزان جنین‌زایی در مقایسه با دو تیمار دیگر که سطوحی از روشنایی را طی مراحل جنین‌زایی دریافت داشته‌اند، شده است. حال آنکه در رقم اپشن تیمار نوری اثر معنی‌داری بر روی میزان جنین‌زایی نداشته است و تحت شرایط مختلف نوری میزان جنین برابر از نظر آماری تولید شده است. Taji و همکاران در بحث مربوط به بررسی عوامل موثر بر روی موفقیت کشت میکروسپور و جنین‌زایی سوماتیک اظهار داشته‌اند که تاریکی و نور آبی تقویت‌کننده جنین‌زایی می‌باشند، در صورتیکه نور سفید برای جنین‌زایی بازدارنده می‌باشد (۲۶). عموماً کشت بساک و میکروسپورهای ایزوله در شرایط تاریکی نگهداری می‌شوند و بعد از تشکیل جنین، محیط‌های کشت به روشنایی منتقل می‌شوند تا رشد و نمو جنین افزایش یابد. در این راستا، در نتایج حاصل از تحقیق Yang و همکاران، همانند نتایج بدست‌آمده از مطالعه حاضر، مشخص شده است که نگهداری کشت بساک در جنس براسیکا در تاریکی در مقایسه با شدت نور ۱۰ w/m بهتر بود و میزان جنین بیشتری تولید گردید (۳۱). Kintzios و همکاران در آزمایشی تأثیر روشنایی بر جنین‌زایی سوماتیکی فلفل را مطالعه نمودند و نشان دادند اگر ریزنمونه‌ها ابتدا به مدت سه هفته در تاریکی قرار داده شوند و سپس به روشنایی منتقل شوند در مقایسه با حالتی که از ابتدا به مدت ۴ هفته در روشنایی قرار گرفتند، تعداد جنین تولید شده افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند (۱۹). در مورد تأثیر تاریکی بر روی جنین‌زایی در سایر گیاهان نیز مطالعه شده است و مشخص گردیده است که، قرار دادن کشت سلولی در تاریکی برای جنین‌زایی سوماتیک در بعضی دیگر از گونه‌ها نیز مفید می‌باشد، در این زمینه می‌توان به خیار (۶)، خربزه (۱۷) و رز (۱۸) اشاره کرد که در تمام آزمایشات مذکور، افزایش جنین‌زایی سوماتیک در نتیجه اعمال تیمار تاریکی مشاهده شده است. در این تحقیق برای دو ژنوتیپ PF و Global در تاریکی جنین‌زایی بهتری انجام شده است و میزان جنین تولیدی در تیمار تاریکی در مقایسه با دو تیمار دیگر بیشتر بوده است و در هر دو رقم با تیمارهای دیگر از نظر آماری متفاوت بوده است. تاریکی از اثر بازدارندگی نور بر روی بسیاری از پروسه‌های بیولوژیکی گیاهی، همانند تأثیر منفی آن بر روی رشد سلول‌های جنین‌زا، می‌تواند جلوگیری نماید. بنابراین، کشت در تاریکی از راه‌های مختلف، مانند محدود کردن نمو پلاستیدها به کلروپلاست، از تمایز بافت ریزنمونه کشت شده جلوگیری می‌کند (۱۳). تاریکی علاوه بر تأثیر مثبت بر روی جنین‌زایی سوماتیک بر روی سایر فرآیندهای کشت بافت و سلول نیز موثر می‌باشد، در این راستا مشخص شده است که وقتی برگ‌های اکالیپتوس به مدت ۳۰ روز در تاریکی قرار گرفتند، میزان باززایی گیاهچه از ریزنمونه‌ها افزایش یافت (۷).

نتایج باززایی گیاهچه از جنین‌های حاصل از میکروسپور

حدود ۳۰ روز بعد از انتقال جنین‌ها به محیط کشت باززایی، تعداد گیاهچه‌های باززایی شده طبیعی (شکل۳) یعنی گیاهچه‌های حاوی برگ ها و ریشه طبیعی، شمارش شده و سپس مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس جدول ۲ نشان می‌دهد که سه رقم مورد مطالعه در سطح احتمال ۱ درصد با همدیگر اختلاف معنی‌دار دارند، اما اثر تیمار نوری و همچنین اثر متقابل دو فاکتور مورد مطالعه معنی‌دار نیست. بنابراین با توجه به نتیجه حاصله می‌توان اظهار نمود که تاثیر شرایط نوری مختلف در مرحله جنین‌زایی، بر روی گیاهچه‌های بوجود آمده از آن جنین‌ها، تأثیر ندارد و به عبارتی جنین‌هایی که در شرایط نوری مختلف حاصل شده‌اند، در مرحله باززایی با یکدیگر تفاوت معنی‌دار آماری ندارند. با توجه به معنی‌دار شدن فاکتور رقم، مقایسه میانگین‌ها بین ارقام انجام گرفت و نتایج حاصله نشان دادند که رقم پی‌اف بیشترین تعداد گیاهچه‌های باززایی شده را داشت و در گروه a قرار گرفت (جدول ۴).

تعداد گیاهچه‌های بدست آمده در این تحقیق با کارهای بعضی محققین نیز مطابقت دارد. بطوریکه در تحقیقی مشخص شده است که در کلزا فراوانی باززایی گیاه کامل از میکروسپور اغلب کم و از ۱ تا ۴۷ درصد متغیر است. بررسی بافت جنین‌های لپه‌ای نشان داده است که ارتباط آوندی غیر طبیعی بین محور ساقه و ریشه یکی از علل پایین بودن باززایی

Archive of SID

جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهنده محیط‌های کشت لازم برای جدا نمودن میکروسپورها (IMM)، جنین‌زایی (NLN-۱۳) و باززایی گیاهچه‌ها (B۵).

اجزاء			NLN-۱۳	IMM	B۵
عناصر پر مصرف	Macroelement ($mg\ l^{-1}$)				
نیترات پتاسیم	Potassium Nitrate	KNO۳	۱۲۵	-	۲۵۰۰
سولفات منگنز هپتاهیدرات	Manganese Sulphate Heptahydrate	$MnSO_4.4H_2O$	۱۲۵	-	۲۵۰
نیترات کلسیم تتراهیدرات	Calcium Nitrate Tetrahydrate	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	۵۰۰	-	-
فسفات منوپتاسیم	MonoPotassium Phosphate	KH_2PO_4	۱۲۵	-	-
کلرید کلسیم	Calcium Chloride	$CaCl_2$	-	-	۱۵۰
سولفات آمونیوم	Ammonium Sulphate	$(NH_4)2SO_4$	-	-	۱۳۴
فسفات سدیم منوهیدرات	Sodium Phosphate Monohydrate	$NaH_2PO_4.H_2O$	-	-	۱۵۰
عناصر کم مصرف	Microelement ($mg\ l^{-1}$)				
سولفات منگنز تتراهیدرات	Manganese Sulphate Tetrahydrate	$MnSO_4.4H_2O$	۲۲/۳۰	-	۱۰
اسید بوریک	Boric Acid	H_3BO_3	۶/۲	-	۳
سولفات روی هپتاهیدرات	Zinc Sulfate Heptahydrate	$ZnSO_4.4H_2O$	۸/۶	-	۲
مولبیدات سدیم دی‌هیدرات	Sodium Molybdate Dihydrate	$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۲۵	-	۰/۲۵
سولفات مس پنتاهیدرات	Copper(II) Sulfate pentahydrate	$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۲۵	-	۰/۲۵
کلرید کبالت هپتاهیدرات	Cobalt Chloride Hexahydrate	$CoCl_2.6H_2O$	۰/۰۲۵	-	۰/۲۵
یدید پتاسیم	Potassium Iodide	KI	-	-	۰/۷۵

میزان ساکارز در دو محیط جدا نمودن میکروسپورها (IMM) و جنین‌زایی (NLN-۱۳) ۱۳درصد و در محیط کشت باززایی گیاهچه‌ها (B۵) ۲ درصد بوده است. محیط ایزولاسیون فقط حاوی ۱۳درصد ساکارز می‌باشد.

www.SID.ir

جدول ۲- تجزیه واریانس برای صفت جنین‌زایی و باززایی گیاهچه از جنین‌های تولید شده در شرایط نوری مختلف

منابع تغییرات	جنین زایی		باززایی	
	درجه آزادی (d.f.)	میانگین مربعات (MS)	درجه آزادی (d.f.)	میانگین مربعات (MS)
رقم (A)	۲	۰/۱۸۷۵**	۲	۰/۸۱۵**
تیمار نوری (B)	۲	۰/۲۶۲۵**	۱	۰/۰۶۸ns
رقم × تیمار نوری (A × B)	۴	۰/۱۶۲۵**	۲	۰/۲۶۴ ns
خطای آزمایشی	۳۶	۰/۰۳۲۳	۵۴	۰/۱۳۳
		C.V. =۶/۷۸٪		C.V.= ٪۱۳/۹۷

***و**: وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪**

ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار

C.V: ضریب تغییرات

A: رقم، B: تیمار نوری و A × B: اثر متقابل رقم در تیمار نوری

جدول۳- اثرات ساده تیمار نوری در هر کدام از سطوح رقم برای صفت جنین‌زایی

رقم	d.f.	MS	p۳	p۲	p۱
P در گلوبال	۲	۰/۰۴۸ **	۲/۵ ± ۰/۱۴ b	۲/۳۶ ±۰/۲۳ b	۲/۷۹±۰/۰۳ a
P در پی‌اف	۲	۰/۰۶۳ **	۲/۶۳ ± ۰/۰۵ b	۲/۴۲ ± ۰/۰۸ c	۲/۹۱ ±۰/۱۹ a
P در اپشن	۲	ns	۰/۰۰۷	۲/۸۱ ± ۰/۰۵ a	۲/۶۷± ۰/۴ a

P : تیمار نوری (شامل: p۱= تاریکی، p۲= ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و p۳ = تناوب یک روز در میان p۱ و p۲

رقم: گلوبال(Global)، اپشن (Option) و پی‌اف (PF ۷۰۴۵/۹۱)

MS: میانگین مربعات

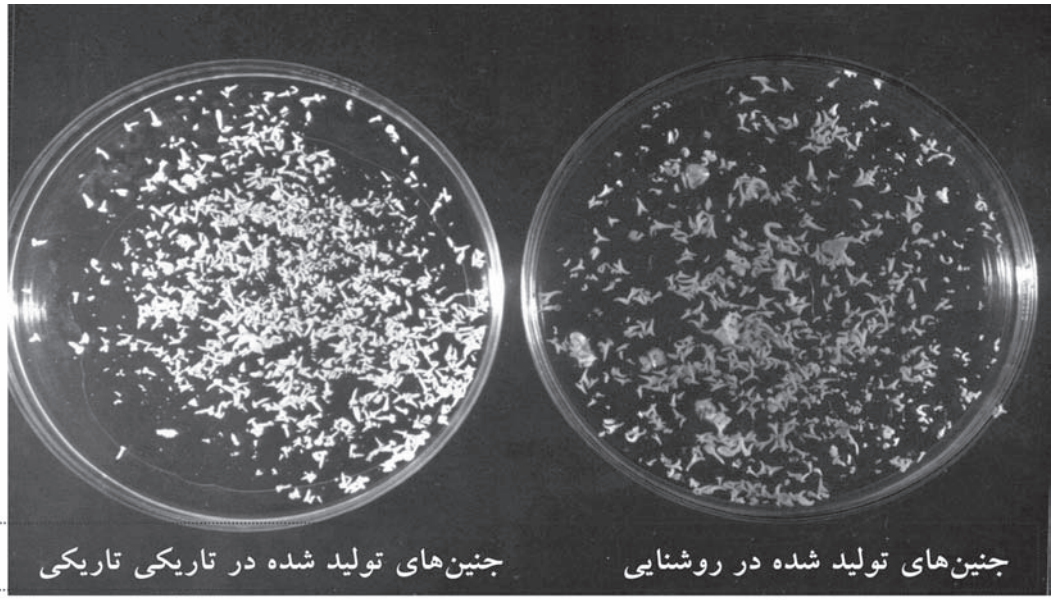
در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح احتمال ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

جدول ۴- مقایسه میانگین درصد باززایی گیاهچه طبیعی در ارقام مختلف کلزا

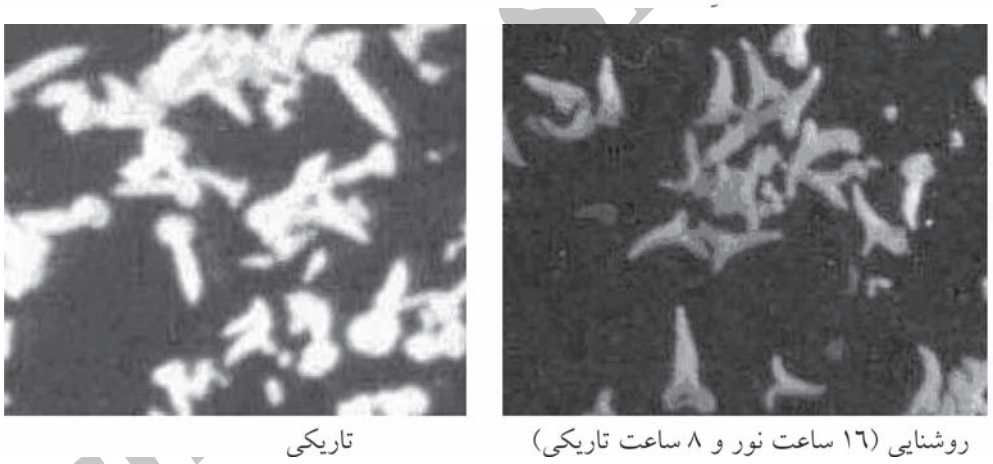
رقم	متوسط تعداد گیاهچه
گلوبال	۱۷± ۰/۱۱ ab
پی‌اف	۱۸± ۰/۴۱۶ a
اپشن	۱۴± ۰/۱۴ b

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح احتمال ۱٪ دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

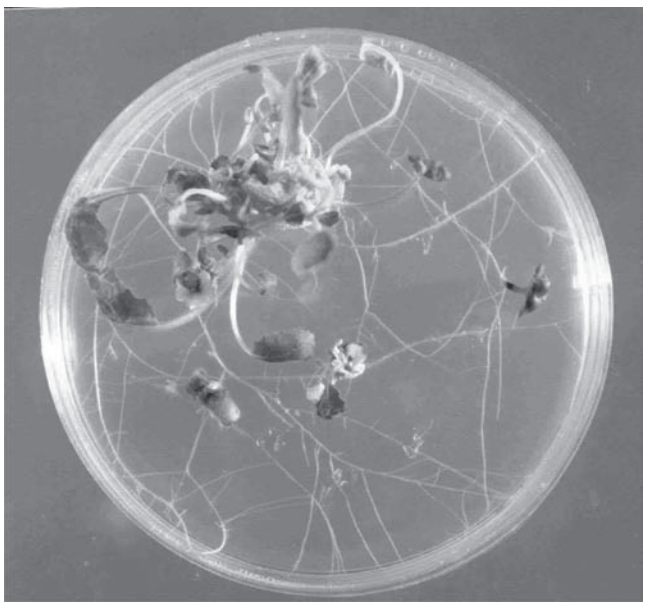
www.SID.ir



شـکل ۱- جنین‌هـای بدسـت آمـده در شـرایط تاریکـی مطلـق و روشـنایی (۱۶ سـاعت نـور و ۸ سـاعت تاریکـی) در رقم گلوبـال. پتری‌دیش قـرار گرفته در شـرایط روشـنایی دارای جنین‌هـای متمایل به سـبز و پتری‌دیش حاصل شده از شرایط تاریکی حاوی جنین‌های سفید متمایـل به زرد می‌باشـند. در هر کدام از پتری‌هـا تعـداد زیـادی جنین از کشـت میکروسـپورهای ایزولـه کلزا به دسـت آمده‌اند.



شـکل ۲- جنین‌های بدسـت آمده در شرایط تاریکـی مطلق و تیمارهای دارای سـطوحی از روشـنایی در رقم گلوبال. همانطور که ملاحظه می‌گردد جنین‌های حاصل از تیمار ۱۶ سـاعت نور و ۸ سـاعت تاریکی به رنگ سـبز روشن و جنین‌های حاصل از تاریکی سفید می‌باشند.



شکل ۳- گیاهچه باززایی شده از جنین های حاصل از کشت میکروسپور کلزا در رقم پی اف از ۱۰ جنین قرار داده شـده برای باززایی پتری دیش یکی از جنین ها به گیاهچه کامل تبدیل شـده اسـت. تعداد از آنها در مراحل اولیه رشد هسـتند و تعدادی دیگر نیز بدون هیچ گونه تغییری در محیط کشت قرار دارند..

www.SID.ir