Archive of SID

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال پنجم، شماره سیزدهم، بهار ۱۳۹۵ (۲۶-۱۳)

Crop Biotech.
Spring (2016) 13: 13-26.

مطالعه برخی عوامل مؤثر بر جنین‌زایی میکروسپورها و باززایی گیاهچه‌ها در کلزا (*Brassica napus* L.)

پیمان شریفی[1*]، احمد معینی[2]

۱. دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، گروه زراعت و اصلاح نباتات، رشت، ایران

۲. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۲/۲۵- تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۳/۳۰)

Effects of some factors on microspore embryogenesis and plantlet regeneration in *Brassica napus* L.

Peyman Sharifi[1*], Ahmad Moieni[2]

1. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
2. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: Mar. 15, 2016 -Accepted: Jun. 20, 2016)

چکیده

برخی عوامل موثر بر جنین‌زایی در کشت میکروسپورهای جداشده کلزا و باززایی گیاهچه‌ها از جنین‌های حاصله در آزمایش‌هایی جداگانه بررسی شدند. آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل دو فاکتوره و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شدند. در تمام آزمایش‌ها، ارقام در سه سطح شامل گلوبال (Global)، اپشن (Option) و پی‌اف ($PF_{7045/91}$) فاکتور اول را تشکیل می‌دادند. میکروسپورها از غنچه‌های به طول ٤-۳ میلی‌متر جدا و در محیط کشت NLN-13 کشت شدند. میکروسپورهای کشت‌شده به مدت ١٤ روز در معرض تنش دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی قرار گرفتند و پس از آن به اتاق رشدی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در داخل یک لرزاننده منتقل گردیدند. برای باززایی، جنین‌های ۳۵-۲۵ روزه به محیط کشت جامد B_5 منتقل شدند و بعد از حدود ۲۰ تا ۲۵ روز، گیاهچه‌های طبیعی، گیاهچه‌های غیر طبیعی، جنین‌های ریشه‌دار و جنین‌های تغییرنکرده شمارش شدند. در آزمایش اول جنین‌زایی اثر حجم محیط کشت، رقم و نیز اثرمتقابل آنها معنی‌دار بود. در رقم گلوبال، حجم ۱۲/۵ میلی‌لیتر محیط کشت با متوسط تولید ٦۹۵/۵ جنین در هر پتری‌دیش، بیشترین میزان جنین‌زایی را داشت. در آزمایش دوم جنین‌زایی، اثر زغال فعال و اثرمتقابل دو فاکتور معنی‌دار بود. در آزمایش سوم جنین‌زایی منابع مختلف هیدرات کربن با هم اختلاف معنی‌دار داشتند. در آزمایش اول باززایی، اسید جیبرلیک اثر معنی‌دار بر تعداد جنین‌های تغییرنکرده، گیاهچه‌های غیرطبیعی، گیاهچه‌های طبیعی و جنین‌های ریشه‌دار داشت و اثرمتقابل اسید جیبرلیک و رقم بر گیاهچه‌های طبیعی معنی‌دار بود. در آزمایش دوم باززایی، اثرمتقابل عامل ژلی و رقم بر گیاهچه‌های طبیعی معنی‌دار بود.

واژه‌های کلیدی: باززایی، جنین‌زایی، کشت میکروسپور، کلزا، گیاهان هاپلوئید.

Abstract

The effect of some factors on embryogenesis from isolated microspore and plantlet regeneration from microspore-derived embryos was studied separately in *Brassica napus*. Experiments carried out in factorial based on completely randomized design. The first factor in all of the experiments was cultivars contained Global, Option and $PF_{7045/91}$. The microspores were isolated from 3-4 mm buds and cultured on NLN-13 medium. Cultures incubated at 30˚C and darkness for 14 days, and then transferred to shaker in the growth chamber at 25˚C. In regeneration experiment, embryos with 20-25 days old were transferred to B_5 medium and nearly 20-25 days after transferring embryos, normal regenerated plantlets, abnormal regenerated plantlets, rooted embryos and non differentiated embryos were counted. In the first embryogenesis experiments, the effects of medium volume, cultivar and interaction effects of two factors were significant. In Global cultivar, the highest values of embryos (695.5 per Petri) were observed in 12.5 ml medium volume. In the second embryogenesis experiment, the interaction between activated charcoal and cultivar on embryogenesis was significant. In the third embryogenesis experiment, the form of carbohydrate had a significant effect on embryo yield. In the first experiment of plantlet regeneration, GA_3 had significant effect on normal regenerated plantlets, abnormal regenerated plantlets, rooted embryos and non differentiated embryos and the interaction between GA_3 and cultivar was significant for normal regenerated plantlets. In the second experiment of plantlet regeneration, the interaction between gelling agent and cultivar was significant on normal regenerated plantlets.

Keywords: Embryogenesis, Haploid Plants, Microspore Culture, Rapeseed, Plant Regeneration.

* نویسنده مسئول: پیمان شریفی

E-mail: peyman.sharifi@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) یک گونه آلوتتراپلوئید (2n = 4x = 38) است که از تلاقی گونه‌های دیپلوئید *B. rapa* و *B. oleracea* بوجود آمده است. تولید لاین‌های خالص در بسیاری از گونه‌های زراعی از طریق روش‌های کلاسیک انجام می‌پذیرد، اما از مهمترین معایب این روش‌ها، طولانی مدت و پرهزینه بودن آنها است. پژوهشگران برای رفع این مشکل از روش‌های کشت بافت و سلول استفاده کرده‌اند که در این زمینه به موفقیت‌های چشمگیری از طریق کشت بساک و کشت میکروسپورهای ایزوله دست یافته‌اند. با استفاده از این تکنیک‌ها مدت زمان ۱۲- ۱۰ ساله پروژه اصلاحی و تولید لاین خالص به حدود ۵ سال کاهش داده شده است (Lemonnier *et al*., 2001; Mohan *et al*., 1996). در جنس براسیکا (*Brassica*)، پژوهش‌ها برای تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف‌شده بوسیله جنین‌زایی میکروسپور در اواسط دهه ۱۹۷۰ میلادی آغاز گردید. کشت میکروسپورهای کلزا برای اولین بار در سال ۱۹۸۲ توسط لیچتر به صورت موفقیت‌آمیزی انجام پذیرفت (Lichter, 1982). شروع آزمایش‌های مزرعه‌ای، ۲/۵ سال بعد از کشت میکروسپورهای گیاهان هیبرید F_1 کارایی این روش را نشان می‌دهد. کشت میکروسپورهای ایزوله می‌تواند کارایی زیادی در اصلاح نباتات داشته باشد، بطوریکه از این روش می‌توان برای انتخاب درون شیشه‌ای، تولید گیاهان تراریخت، تکنوللوژی بذر مصنوعی و تولید لاین‌های هموزیگوت (خالص ژنتیکی) استفاده کرد (Kucera *et al*., 2002).

باززایی گیاهچه طبیعی از جنین‌های به دست آمده از کشت میکروسپور، یکی از مراحل مهم در تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف شده است که مرحله رشد و بلوغ جنین و اندازه جنین از عوامل مهم موثر بر این مرحله محسوب می‌شوند. جنین‌های کروی شکل قابلیت باززایی گیاه را دارند، ولی با پیشرفت مراحل رشد جنین، قابلیت باززایی افزایش پیدا می‌کند (Takahata, 1997). علاوه بر شرایط فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی جنین، عوامل محیطی متعددی از قبیل دمای اتاق رشد، فقدان تنظیم‌کننده‌های رشد مانند اسید آبسیزیک و نیز شدت نور و مرحله انتقال جنین‌ها به محیط باززایی بر فراوانی باززایی گیاه موثر هستند. در کشت میکروسپور، تعداد جنین‌ها بسیار حائز اهمیت است و باید سعی کرد که این تعداد تا حد مقدور بیشتر باشد. تعداد جنین‌ها تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی است. عوامل محیطی متعددی جنین‌زایی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. Aslani و همکاران (۲۰۰۵) در تحقیقی نشان دادند که علاوه بر ژنوتیپ گیاه، شرایط رشد گیاهان مادری عامل تعیین‌کننده‌ای در موفقیت‌آمیز بودن تکنیک کشت میکروسپور به شمار می‌آید. همچنین غلظت ساکارز در محیط کشت مایع القاء جنین نیز حائز اهمیت بود و میزان ۱۳۰ گرم در لیتر مناسب تشخیص داده شد. بررسی اثر تیمار سرمادهی در باززایی جنین‌ها نیز نشان داد که یک تیمار سرمایی ۴ درجه سانتی‌گراد اثر کاملاً معنی‌داری بر روی افزایش باززائی جنین‌ها داشت، در حالیکه اثر سن جنین در میزان باززایی معنی‌دار نبود. همچنین Hosseinpour (۲۰۰۳) در تحقیق خود تعدادی گیاه هاپلوئید مضاعف‌شده در کلزا تولید نمود. علاوه بر این Abdullahi و همکاران (۲۰۰۳) نیز در تحقیق خود برخی فاکتورهای موثر بر جنین‌زایی میکروسپور را مورد بررسی قرار دادند. Oroojloo و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیقی نشان دادند که بهترین روش برای غلبه بر جنین‌زایی ثانویه، انتقال جنین‌های لپه‌ای شکل به محیط B_5 حاوی اسید جیبرلیک (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) و نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و تاریکی به مدت ۱۰ روز و سپس انتقال به روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود.

در این پژوهش، در قالب آزمایش‌هایی جداگانه،

www.SID.ir

Archive of SID

تأثیر حجم محیط کشت، مقادیر مختلف زغال فعال و منابع مختلف هیدرات کربن در محیط کشت القاء جنین بر روی میزان جنین‌زایی میکروسپورها و همچنین تأثیر غلظت‌های مختلف اسید جیبرلیک و نوع ژل بر باززایی گیاه از جنین‌های حاصل از کشت میکروسپورهای چند رقم کلزای بهاره، بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از سه رقم کلزای بهاره گلوبال (Global)، اپشن (Option) و پی‌اف ($PF_{7045/91}$) به دست آمده در اتاق رشد کنترل شده استفاده گردید. رژیم نوری اتاق رشد شامل ۸ / ۱۶ ساعت (تاریکی/ روشنایی) با دمای ۱۰°C / ۱۵ درجه سانتی‌گراد (شب / روز) بود. نور اتاق رشد، توسط لامپ‌های ۴۰۰ وات بخار سدیم (250/400W، ML، IP55) به میزان ۵۵۰۰ لوکس تأمین گردید. از محیط IMM (Fletcher *et al*., 1998) حاوی ۱۳٪ ساکارز (در آزمایش سوم منابع هیدرات کربن متفاوت بودند) و pH=۶ استفاده شد. همچنین جهت جدا کردن میکروسپورها، غنچه‌هایی با طول ۴-۳ میلی‌متر مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت مایع NLN-13 (Fletcher *et al*., 1998) حاوی ۱۳٪ ساکارز، فاقد هورمون و pH=۶ برای کشت میکروسپورهای ایزوله مورد استفاده قرار گرفت. محیط‌های جداسازی و کشت میکروسپورها به ترتیب توسط اتوکلاو کردن و فیلتر کردن (۰/۲۲ میکرومتر) استریل شدند.

در هر مرحله، تعداد ۱۰۰ غنچه به طول ۴-۳ میلی‌متر، مطابق با مرحله انتهای تک‌هسته‌ای و یا ابتدای دو هسته‌ای میکروسپورها، انتخاب و توسط هیپوکلریت سدیم (وایتکس) ۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه استریل سطحی و سپس دو مرتبه با آب مقطر استریل سرد و هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه، شسته شدند. سپس، غنچه‌ها به داخل ظرف مخلوط‌کن کوچک[1] سرد منتقل شده و ۳۰ میلی‌لیتر از محیط جداسازی میکروسپورها به آنها اضافه شده و برای سه مرتبه و هر مرتبه به مدت ۱۰ ثانیه به وسیله مخلوط‌کن آسیاب شدند. مخلوط به دست آمده روی فیلتر ۱۰۰ میکرومتر که خود روی فیلتر ۵۰ میکرومتر قرار داشت منتقل شد. دیواره‌های ظرف مخلوط‌کن با ۲۰ میلی‌لیتر از محیط جداسازی (IMM) شسته شد. سوسپانسیون میکروسپورهای بدست آمده دو مرتبه در سرعت ۱۲۷۰ rpm و هر مرتبه به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از اولین سانتریفیوژ، مایع فوقانی حذف و رسوب بدست آمده مجدداً توسط ۵۰ میلی‌لیتر از محیط IMM به حالت سوسپانسیون در آمد و در دومین سانتریفیوژ پس از حذف مایع فوقانی، رسوب حاصله توسط ۴ میلی‌لیتر محیط کشت NLN-13 به حالت سوسپانسیون در آمد. تراکم میکروسپورها توسط لام شمارش مشخص و تراکم ۶۰۰۰۰ میکروسپور در هر میلی‌لیتر، تنظیم شد. سوسپانسیون میکروسپورها جهت کشت در پتری‌دیش‌های استریل شیشه‌ای (با قطر ۱۲ سانتی‌متر) توزیع گردید. پتری‌دیش‌ها جهت تیمار تنش حرارتی، به مدت ۱۴ روز به انکوباتور تاریک با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سپس به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی لرزاننده‌ای با سرعت ۴۰ rpm منتقل شدند.

الف) آزمایش‌های جنین‌زایی

آزمایش اول؛ تأثیر حجم محیط کشت بر جنین‌زایی

این آزمایش به صورت فاکتوریل دو فاکتوره، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار انجام شد. ارقام به‌عنوان فاکتور اول و حجم محیط کشت در هر پتری‌دیش در چهار سطح (۵، ۷/۵ ، ۱۰ و ۱۲/۵ میلی‌لیتر) فاکتور دوم را تشکیل می‌دادند و در مجموع

1. Micro blender

www.SID.ir

Archive of SID

۱۲۰ پتری‌دیش در این آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. توضیح اینکه، تراکم محیط کشت نشان‌دهنده تعداد میکروسپور در یک میلی‌لیتر از محیط کشت است و حال آنکه در تحقیق حاضر در تمام حجم‌های محیط کشت از تراکم ۶۰۰۰۰ میکروسپور در هر میلی‌لیتر استفاده شد. همچنین با توجه به اینکه منظور از حجم محیط کشت، مقدار محیط کشت موجود در ظرف است، تیمار شاهد اینجا فاقد مفهوم است.

آزمایش دوم؛ تأثیر زغال فعال بر جنین‌زایی

این آزمایش نیز به صورت فاکتوریل، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و با ۵ تکرار انجام شد. ارقام و میزان زغال فعال محیط کشت در چهار سطح (۰، ۱، ۲ و ۳ گرم در لیتر) به ترتیب اولین و دومین فاکتور را تشکیل می‌دادند.

آزمایش سوم

تأثیر منابع مختلف هیدرات کربن در محیط کشت مایع NLN-13 (Fletcher *et al*., 1998) روی جنین‌زایی، بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و با ۵ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. سه رقم فوق‌الذکر فاکتور اول و منابع مختلف هیدرات کربن در چهار سطح (ساکارز، مالتوز و شکر معمولی استریل شده از طریق اتوکلاو و فیلتر کردن) فاکتور دوم را تشکیل می‌دادند. هدف این بخش از آزمایش، مقایسه جنین‌زایی در کلزا با استفاده از شکر معمولی (و دو روش استریل آن) با مالتوز و ساکارز بود. در تمام آزمایش‌ها، حدود ۴۰ روز بعد از کشت میکروسپورها، جنین‌های ۰/۵ میلی‌متری و بزرگتر، شمارش و مورد تجزیه‌های آماری قرار گرفتند.

ب) آزمایش‌های باززایی

برای باززایی گیاهچه‌ها از محیط کشت جامد B_5 (Gamborg *et al*., 1968) حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک (GA_3)، ۲٪ ساکارز و ۰/۸٪ آگار-آگار و pH= ۵/۷ استفاده شد. جنین‌های ۲۵- ۳۵ روزه و به اندازه ۴-۳ میلی‌متر و زرد رنگ بر روی این محیط کشت منتقل شدند و هر پتری‌دیش حاوی ۱۰ جنین بود. پس از انتقال جنین‌ها به محیط کشت باززایی، پتری‌دیش‌ها به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی منتقل گردیدند. مطالعه باززایی گیاهچه به صورت آزمایش فاکتوریل دو فاکتوره، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار انجام شد. رقم در سه سطح شامل گلوبال (Global)، اپشن (Option) و پی‌اف ($PF_{7045/91}$) فاکتور اول را در هر دو آزمایش تشکیل می‌داد.

آزمایش اول؛ تأثیر میزان اسید جیبرلیک بر باززایی گیاه‌چه‌ها

در این آزمایش میزان اسید جیبرلیک در چهار سطح (۰ ، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) فاکتور دوم را تشکیل می‌داد.

آزمایش دوم؛ تأثیر نوع ژل بر باززایی گیاهچه‌ها

در این آزمایش نوع ژل شامل آگار-آگار، فیتاژل، آگارز و آگار-آگار + فیتاژل به نسبت ۱:۱ فاکتور دوم را تشکیل می‌داد.

در هر دو آزمایش حدوداً ۲۰ تا ۲۵ روز بعد از انتقال جنین‌ها به محیط کشت باززایی، حالات ذیل اندازه‌گیری شدند (Haddadi *et al*., 2008):

T_1: تعداد گیاهچه‌های طبیعی (گیاهچه‌های دارای برگ‌های طبیعی و ریشه)

T_2: تعداد گیاهچه‌های غیرطبیعی (گیاهچه‌های باززایی شده غیر طبیعی و با جنین‌های ثانویه فراوان بر روی آنها)

T_3: تعداد جنین‌های ریشه‌دار (جنین‌های ریشه‌دار و فاقد نوساقه)

T_4: تعداد جنین‌های تغییر نکرده

برای تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار SPSS و MSTATC استفاده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

الف) آزمایش‌های جنین‌زایی

آزمایش اول؛ تأثیر حجم محیط کشت

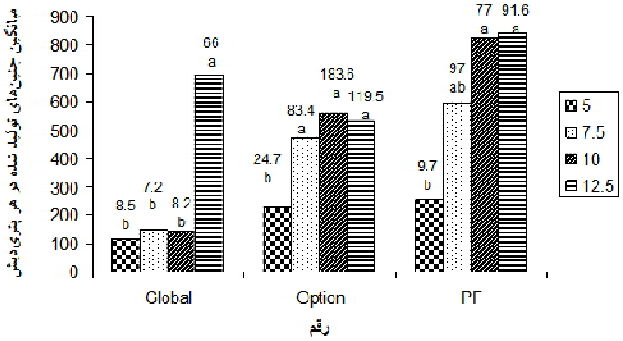
نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر دو فاکتور رقم و حجم محیط کشت و همچنین اثر متقابل آنها در سطح احتمال ۱٪ بر میزان جنین‌زایی معنی‌دار بود. با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل دو فاکتور، مقایسه اثرات اصلی فاقد اعتبار کافی می‌باشد و لذا اثرات ساده هر فاکتور در سطوح فاکتور دیگر مقایسه شده‌اند (Montgomery, 2001). مقایسه میانگین اثر ساده حجم محیط کشت بر متوسط جنین‌زایی در هر رقم در شکل ۲ نشان می‌دهد که در رقم گلوبال، حجم ۱۲/۵ میلی‌لیتر محیط کشت با متوسط تولید ۶۹۵/۵ جنین در هر پتری‌دیش، بیشترین میزان جنین‌زایی را داشت و با ۳ حجم دیگر اختلاف بسیار معنی‌داری داشت. در رقم اپشن، سه حجم ۷/۵، ۱۰ و ۱۲/۵ میلی‌لیتر محیط کشت، بهترین جنین‌زایی را به ترتیب با مقادیر ۴۷۶/۱، ۵۵۹/۵ و ۵۳۰/۵ جنین در هر پتری‌دیش داشتند و بین آنها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در رقم پی‌اف نیز سه حجم ۷/۵، ۱۰ و ۱۲/۵ میلی‌لیتر محیط کشت، بیشترین جنین‌زایی را داشتند و بین آنها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (به ترتیب ۵۹۵/۵، ۸۲۴/۹ و ۸۴۳/۳ جنین در هر پتری‌دیش).

این نتایج نشان می‌دهند که پتانسیل جنین‌زایی رقم پی‌اف نسبت به دو رقم دیگر بهتر می‌باشد و بنابراین میزان جنین‌زایی به ژنوتیپ بستگی دارد. در تطابق با نتیجه تحقیق حاضر، محققین دیگر نیز نشان دادند که بین ژنوتیپ‌ها از نظر جنین‌زایی در کشت میکروسپورهای ایزوله کلزا اختلاف معنی‌دار وجود داشت (Abdullahi *et al.*, 2003; Tavakoli and Shariat Panahi, 2013). به نظر می‌رسد که در رقم گلوبال باید فقط از حجم ۱۲/۵ میلی‌لیتر محیط کشت استفاده کرد و در ارقام اپشن و پی‌اف علاوه بر حجم ۱۲/۵ میلی‌لیتر، حجم ۱۰ میلی‌لیتر نیز نتیجه خوبی داده است. بطور کلی در این آزمایش رقم پی‌اف با متوسط تولید ۸۴۳/۳ جنین در هر پتری‌دیش، بیشترین میزان جنین‌زایی را داشته است. نتایج همچنین نشان می‌دهند که با افزایش حجم محیط کشت، ظاهراً، شرایط موثر بر جنین‌زایی مانند مواد غذایی محیط کشت، تعادل بین حجم هوا و حجم محیط کشت و نیز ترکیب گازهای موجود در داخل پتری‌دیش به صورت مناسبی فراهم می‌شود. کاهش جنین‌زایی در حجم ۵ میلی‌لیتر احتمالاً بدلیل تبخیر شدن بخشی از محیط کشت، افزایش ویسکوزیته و چسبندگی محیط کشت و معلق نبودن و در نتیجه اختلال در رشد و نمو آنها می‌باشد که باعث کاهش جنین‌زایی شده است. این یافته‌ها مطابق با نتایج سایر محققین می‌باشد که از حجم ۱۰ (Grubor *et al.*, 1998) و ۱۲/۵ میلی‌لیتر محیط کشت در هر پتری‌دیش (Fletcher *et al.*, 1998) استفاده کرده‌اند. همچنین در تطابق با نتیجه تحقیق حاضر Habibi Khaniani و Moieni (۱۳۸۸) نشان دادند که حجم‌های مختلف محیط کشت در سطح احتمال یک درصد بر تعداد جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور کلزا تأثیر داشت. در تحقیقی دیگر نیز نشان داده شد که افزایش حجم محیط کشت از ۳ به ۷ میلی‌لیتر در پتری‌دیش سبب افزایش تعداد جنین‌های هاپلوئید در فلفل قرمز گردید (Park *et al.*, 2010).

شکل ۱. جنین‌های تولید شده از میکروسپور کلزا در محیط کشت NLN-13 در رقم پی‌اف ($PF_{7045/91}$)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. مقایسه میانگین تأثیر حجم محیط کشت بر روی جنین‌زایی در ارقام کلزا.
در هر سطح رقم، حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در میزان جنین‌زایی بین حجم‌های مختلف محیط کشت با استفاده از معیار حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵٪ است. اعداد بالای هر ستون، نشان‌دهنده انحراف معیار داده‌های تشکیل‌دهنده هر ترکیب تیماری است.

آزمایش دوم؛ تأثیر زغال فعال بر جنین‌زایی

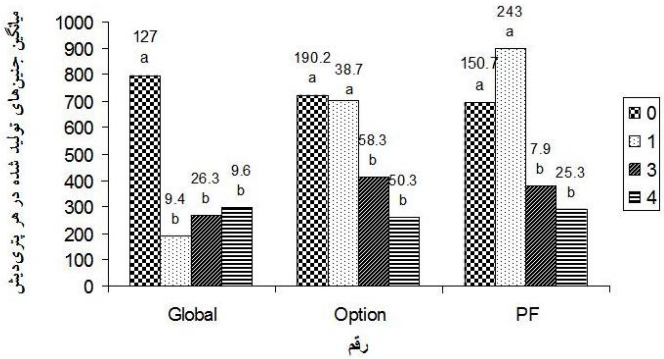
نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر رقم بر میزان جنین‌زایی معنی‌دار نبود، اما اثر زغال فعال و نیز اثر متقابل رقم × زغال فعال در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. اثر ساده زغال فعال در هر سطح رقم (شکل ۳) نشان می‌دهد که در رقم گلوبال، تیمار فاقد زغال فعال با تولید متوسط ۷۹۶/۲ جنین در هر پتری‌دیش، بیشترین میزان جنین‌زایی را داشت. در رقم اپشن، تیمارهای فاقد زغال فعال و ۱ گرم در لیتر زغال به ترتیب با متوسط تولید ۷۲۱/۶ و ۷۰۳ جنین در هر پتری‌دیش، بیشترین میزان جنین‌زایی را داشتند. در رقم پی‌اف، افزایش یک گرم در لیتر زغال فعال به محیط کشت در مقایسه با شاهد (بدون زغال فعال) به ترتیب با تولید متوسط ۹۰۰ و ۶۹۵/۴ جنین در هر پتری‌دیش، باعث افزایش معنی‌دار جنین‌زایی شد.

این نتایج نشان می‌دهد که تأثیر زغال فعال بر جنین‌زایی به رقم بستگی دارد، به عنوان مثال، در رقم گلوبال، تیمار فاقد زغال فعال بهترین پاسخ را داشت. از آنجا که این ماده به عنوان یک ماده جاذب قوی است و احتمالاً بعضی از مواد سمی موجود در محیط کشت و مضر برای جنین‌زایی مثل ترکیبات فنلی ترشح‌شده توسط سلول‌ها و یا بافت‌های زخمی را جذب می‌نماید. لذا اغلب به محیط کشت بافت اضافه می‌گردد و در نتیجه گاهی اوقات رشد را در شرایط درون شیشه‌ای تنظیم می‌کند (Carlos and Dias, 1999). تأثیر متفاوت زغال فعال بر جنین‌زایی در ژنوتیپ‌های مختلف، ممکن است ناشی از ترکیبات متفاوت ترشح‌شده توسط سلول‌ها و یا بافت‌های زخمی در هر کدام از ژنوتیپ‌ها باشد، که پاسخ‌های متفاوت ژنوتیپ‌ها را در پی داشته است. در مورد رقم اپشن تیمار فاقد زغال فعال و یک گرم در لیتر پاسخ مشابه‌ای داشتند، در حالی‌که سایر تیمارها جنین‌زایی را شدیداً و بطور معنی‌داری کاهش دادند. در مورد رقم پی‌اف، افزایش ۱ گرم در لیتر زغال فعال به محیط کشت، جنین‌زایی را بطور معنی‌داری افزایش داد. تأثیر مثبت افزایش ۱ گرم در لیتر زغال فعال بر میزان جنین‌زایی رقم پی‌اف مطابق با نتایج آزمایش‌های بعضی از محققین است. بطوریکه، در آزمایشی مشخص شد که در مورفوتیپ‌های مختلف *Brassica oleraceae*، اضافه کردن ۰/۱ ml زغال فعال (محلولی از زغال فعال شامل ۱ گرم زغال فعال، ۰/۵ گرم آگارز و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر شده) به محیط کشت میکروسپورها، تولید جنین را به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش داد (Dias, 1999). در تحقیقی دیگر نشان داده شد که افزودن ۰/۰۵ درصد زغال فعال به محیط کشت میکروسپورهای کلزا، سبب افزایش میزان جنین‌زایی شد (Liu *et al*., 2003). همچنین در تحقیق دیگری در *B. nigra*، نشان داده

www.SID.ir

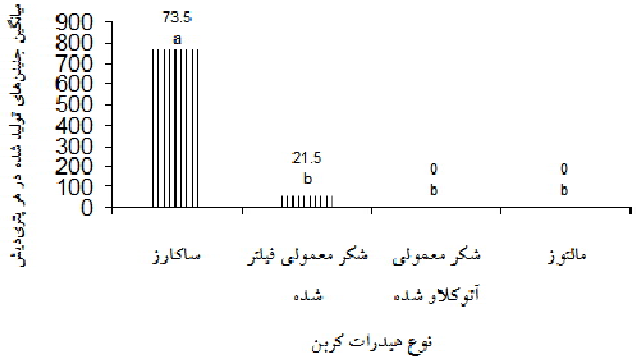
Archive of SID

شد که افزایش یک قطره از محلول ۱٪ زغال فعال به محیط کشت میکروسپورها، سبب افزایش جنین‌زایی شد (Margale and Chevre, 1991). در تحقیق دیگری نیز با استفاده از یک محیط کشت دو لایه شامل زغال فعال، تعداد جنین‌ها در کلزا افزایش یافت (Mathias, 1988). در تطابق با نتیجه تحقیق حاضر، در تحقیقی دیگر افزودن ۱ میلی‌گرم زغال فعال به هر پتری‌دیش در کشت میکروسپور بروکلی (*Brassica oleracea* L.) سبب افزایش جنین‌زایی شد (Na *et al*., 2011). در گونه *Brassica juncea* نیز گزارش شده است که افزودن زغال فعال سبب افزایش جنین‌زایی در کشت میکروسپور می‌گردد (Prem *et al*., 2008). از دیگر نتایج این تحقیق، تأثیر کاهنده زغال فعال بر میزان جنین‌زایی در غلظت‌های بالاتر بود. زغال فعال سبب جذب تنظیم‌کننده‌های رشد و بعضی از مواد غذایی موجود در محیط کشت می‌شود و همچنین حضور زغال فعال موجود در محیط کشت می‌تواند از طریق جذب کاتیون‌های محیط کشت، سبب افزایش pH گردد که این مسئله نیز ممکن است عامل کاهش جنین‌زایی در رقم گلوبال شده باشد (Taji *et al*., 2000). Niu و همکاران (۲۰۱۵) با اضافه مقادیر مختلف زغال فعال در ژنوتیپ‌های کلم، تأثیر مثبت این عامل را در جنین‌زایی میکروسپورها نشان دادند و ملاحظه کردند که در برخی از ژنوتیپ‌ها استفاده از ۰/۱ گرم در لیتر و در برخی دیگر ۰/۲ گرم در لیتر زغال فعال سبب افزایش میزان جنین‌زایی شد.



شکل ۳. مقایسه میانگین تأثیر مقدار زغال فعال بر روی جنین‌زایی در ارقام کلزا

در هر سطح رقم، حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در میزان جنین‌زایی بین مقادیر مختلف زغال فعال موجود در محیط کشت با استفاده از معیار حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵٪ است. اعداد بالای هر ستون، نشان‌دهنده انحراف معیار داده‌های تشکیل‌دهنده هر ترکیب تیماری است.



شکل۴ . مقایسه میانگین تأثیر منابع مختلف هیدرات کربن بر جنین‌زایی در ارقام کلزا

حروف مشترک، نشاندهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین منابع مختلف هیدرات کربن از نظر میزان جنین‌زایی است. اعداد بالای هر ستون، نشان‌دهنده انحراف معیار داده‌های تشکیل‌دهنده هر ترکیب تیماری است.

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش سوم؛ تأثیر منابع مختلف هیدرات کربن

نتایج حاصل از تجزیه واریانس آزمایش تأثیر نوع هیدرات کربن بر جنین‌زایی در کشت میکروسپورهای کلزا نشان می‌دهد که اثر رقم و نیز اثر متقابل بین رقم و منبع هیدرات کربن معنی‌دار نبود، در حالیکه اثر ساده منبع هیدرات کربن بسیار معنی‌دار بود، لذا متوسط جنین‌زایی فقط تحت تأثیر منبع هیدرات کربن مقایسه شد (شکل ۴). این شکل نشان می‌دهد که محیط کشت حاوی ساکارز اتوکلاو شده با متوسط تولید ۷۶۶/۸۷ جنین در هر پتری‌دیش، بهترین تأثیر را بر روی جنین‌زایی داشت. نتایج بدست آمده در مورد تأثیر بسیار مثبت ساکارز بر جنین‌زایی، با نتایج حاصل از تحقیقات گذشته در زمینه کشت میکروسپورهای ایزوله در کلزا و نیز در گیاهان مختلف مطابقت دارد، بطوریکه در آزمایشی مشخص گردید که ساکارز نقش مهمی به عنوان منبع هیدرات کربن برای جنین‌زایی دارد و غلظت‌های بالا (۱۳-۱۰٪) بهترین و مناسبترین غلظت برای جنین‌زایی می‌باشند (Lichter, 1982). ساکارز در محیط کشت احتمالاً دو نقش مجزای منبع هیدرات کربن (نقش تغذیه‌ای) و عامل تنظیم‌کننده فشار اسمزی را دارد (Grubor, 1998). در تطابق با نتیجه تحقیق حاضر مبنی بر عدم جنین‌زایی در شرایط استفاده از شکر معمولی و مالتوز، در تحقیقی جایگزین کردن ساکارز با مونوساکاریدهایی مثل گلوکز، فروکتوز و گالاکتوز یا استفاده از ساکارز در غلظت‌های پایین به همراه یک ماده تعدیل‌کننده فشار اسمزی مانند مانیتول، هیچ جنینی تولید نشد (Hamaoka *et al*., 1991). برخلاف نتایج حاضر، در تحقیقی دیگر تأثیر منابع مختلف هیدرات کربن (ساکارز، مالتوز و گلوکز) بر جنین‌زایی از میکروسپورهای گل رز مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که بیشترین جنین‌ها از محیط کشت حاوی گلوکز بدست آمد (Dehestani Ardakani, 2012). در تحقیقی دیگر از منابع مختلف هیدرات کربن شامل ساکارز، فروکتوز، گلوکز و مالتوز برای جنین‌زایی از میکروسپورهای گونه *Brassica oleracea* استفاده شد و نتایج نشان داد که در محیط کشت حاوی مالتوز با غلظت ۱۳٪، بیشترین تعداد جنین تولید شد (Crista *et al*., 2013). بنابراین با وجود آن‌که در کشت میکروسپور کلزا استفاده از ساکارز مرسوم می‌باشد، در گونه‌های دیگری از این جنس، استفاده از مالتوز همراه با موفقیت بیشتری بوده است.

ب) آزمایش‌های باززایی

آزمایش اول؛ تأثیر میزان اسید جیبرلیک بر باززایی گیاه‌چه‌ها

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر رقم بر روی صفات تعداد گیاهچه‌های طبیعی، گیاهچه‌های غیرطبیعی، جنین‌های ریشه‌دار و جنین‌های تغییرنکرده معنی‌دار نشد، ولی اثر اسید جیبرلیک بسیار معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل رقم و اسید جیبرلیک روی تعداد گیاهچه‌های طبیعی معنی‌دار شد، اما برای سایر صفات معنی‌دار نشد. برای صفت تعداد گیاهچه‌های طبیعی با توجه به معنی‌دار شدن اثر متقابل دو فاکتور، اثرات ساده هر فاکتور در سطوح فاکتور دیگر مقایسه شدند، اما برای سایر صفات از آنجا که فاکتور رقم و اثر متقابل دو فاکتور معنی‌دار نبود، مقایسه میانگین برای اثر اصلی اسید جیبرلیک انجام شد. مقایسه میانگین حاصل از تجزیه جداگانه صفت گیاهچه‌های طبیعی نشان داد که در تیمار فاقد اسید جیبرلیک، بین سه رقم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک، دو رقم پی‌اف و گلوبال با ۳۰٪ باززایی، بطور معنی‌داری بیشترین گیاهچه‌های طبیعی را داشتند. در تیمار ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک هم رقم پی‌اف به ترتیب با ۲۸٪ و ۲۶٪، بیشترین درصد باززایی گیاهچه‌های طبیعی را داشت (شکل ۶). همچنین ملاحظه شد که در ارقام گلوبال و پی‌اف افزایش مقدار اسید جیبرلیک تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر

www.SID.ir

Archive of SID

سبب افزایش باززایی شد و از آن پس از میزان باززایی گیاهچه‌های نرمال کاسته شد. در حالیکه در رقم اپشن بین ۰/۱ و ۰/۲ گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری از نظر آماری وجود نداشت. در تطابق با نتیجه تحقیق حاضر، Ahmadi و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که استفاده از جیبرلیک اسید به میزان ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش جنین‌زایی مستقیم در کلزا شد. Ghazanfari و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند که بیشترین میزان باززایی گیاهچه‌ها از جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور با کاربرد ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک حاصل شد و افزایش بیشتر این ماده سبب کاهش باززایی گیاهچه‌ها شد. همچنین Haddadi و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که استفاده از ۰/۱ و ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک سبب افزایش باززایی گیاهچه‌ها در کشت میکروسپورهای ایزوله کلزا گردید.

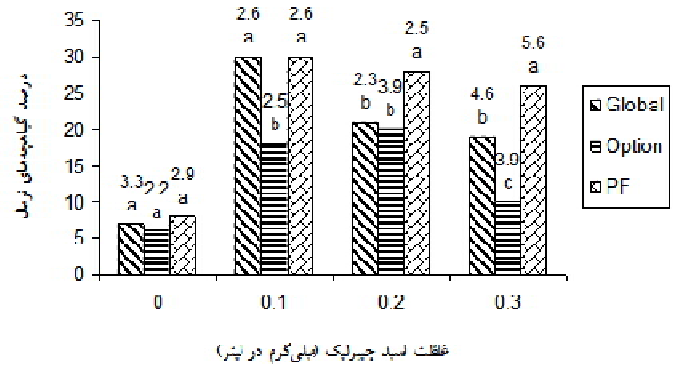
مقایسه میانگین صفات تعداد گیاهچه‌های غیرطبیعی، جنین‌های ریشه‌دار و جنین‌های تغییر نکرده در شکل ۷ نشان داده شده است. این شکل نشان می‌دهد که دو تیمار ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک به ترتیب با میزان تولید ۵۴٪ و ۴۶٪ جنین‌های تغییر نکرده، بیشترین مقدار باززایی غیرطبیعی را داشتند. در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک، ۲۱٪ و در محیط کشت فاقد اسید جیبرلیک، ۹٪ جنین‌ها به گیاهچه‌های غیرطبیعی تبدیل شدند. شکل فوق همچنین نشان می‌دهد که در تیمار ۰/۱میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک، ۲۶٪ جنین‌ها ریشه‌دار بودند. همچنین برای سه تیمار ۰، ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک، به ترتیب ۱۲، ۱۲ و ۱۱ درصد جنین‌ها فقط ریشه‌دار بودند.

بنابراین، نتیجه‌گیری می‌شود برای باززایی گیاهچه‌های طبیعی به مقدار مشخصی از اسید جیبرلیک در محیط کشت نیاز است و نیز به تدریج با افزایش غلظت اسید جیبرلیک از میزان گیاهچه‌های طبیعی کاسته می‌شود و به تعداد گیاهچه‌های غیرطبیعی افزوده می‌شود. نتایج حاضر، مطابق با نتیجه حاصل از آزمایشی است که در آن از محیط کشت جامد B_5 حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک جهت باززایی جنین کلزا استفاده شد و نتایج مثبتی بدست آمد (Grubor *et al*., 1998). در آزمایش دیگری در مورد تأثیر اسید جیبرلیک بر روی باززایی گیاه از هیپوکوتیل‌ها و لپه‌های جنین‌های هاپلوئید مضاعف شده گزارش شده است که وجود ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک (GA3) همراه تنظیم‌کننده‌های رشد و یا بدون آن در محیط کشت B_5، بیشترین تأثیر را بر باززایی گیاهان داشته است (Bagniewska *et al*., 2001).

شکل ۵. گیاهچه‌های باززایی شده از کشت میکروسپور کلزا (رقم پی‌اف)

www.SID.ir

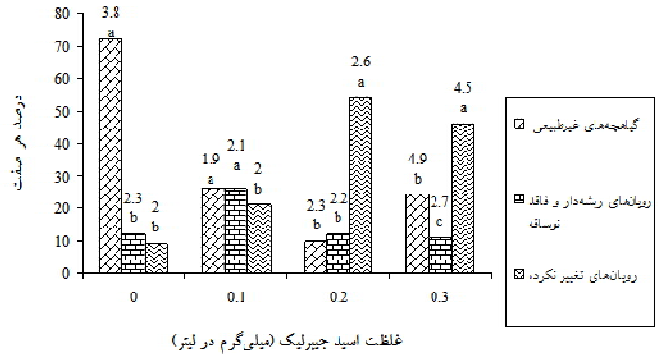
Archive of SID



شکل ۶. اثرات ساده رقم در هر کدام از سطوح اسید جیبرلیک برای صفت باززایی گیاهچه‌های طبیعی
در هر غلظت اسید جیبرلیک، حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بر درصد گیاهچه‌های نرمال بین ارقام مختلف با استفاده از معیار حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵٪ است.
اعداد بالای هر ستون، نشان‌دهنده انحراف معیار داده‌های تشکیل‌دهنده هر ترکیب تیماری است.

آزمایش دوم؛ تأثیر نوع ژل بر باززایی گیاه‌چه‌ها

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر رقم روی چهار صفت مورد مطالعه معنی‌دار نشد، اما اثر نوع ژل معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل رقم و نوع ژل بر دو صفت جنین‌های ریشه‌دار و گیاهچه‌های طبیعی معنی‌دار شد، اما برای دو صفت دیگر معنی‌دار نشد. برای صفت گیاهچه‌های طبیعی که اثر متقابل دو فاکتور معنی‌دار شده است، اثرات ساده رقم در هر سطح نوع ژل مقایسه شده‌اند. مقایسه میانگین حاصل از تجزیه جداگانه صفت تشکیل گیاهچه‌های طبیعی (شکل ۸) نشان داد که در تیمار آگار–آگار، رقم گلوبال با ۳۰٪، بطور معنی‌داری بیشترین میزان باززایی گیاهچه‌های طبیعی را داشت. در تیمار آگار– آگار + فیتاژل، رقم پی‌اف با ۳۶٪، بطور معنی‌داری بیشترین باززایی گیاهچه‌های طبیعی را داشت. همچنین در تیمار آگارز، رقم گلوبال با ۲۳٪ باززایی گیاهچه‌های طبیعی، بطور معنی‌داری بهترین وضعیت را داشت و در تیمار فیتاژل، رقم پی‌اف با ۳۰٪، بطور معنی‌داری بیشترین تعداد گیاهچه‌های طبیعی را تولید کرد. در تطابق با نتیجه تحقیق حاضر، Perera و همکاران (۲۰۱۲) در تحقیقی عامل ژل را در باززایی گیاهچه‌ها از جنین‌های نارگیل بررسی کردند و نشان دادند که بیشترین میزان باززایی در تیمار فیتاژل حاصل شد.



شکل ۷. مقایسه میانگین صفات گیاهان غیر طبیعی، جنین‌های ریشه‌دار و جنین‌های تغییرنکرده در آزمایش تأثیر اسید جیبرلیک
در هر غلظت اسید جیبرلیک، حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین صفات مورد بررسی با استفاده از معیار حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵٪ است.
اعداد بالای هر ستون، نشان‌دهنده انحراف معیار داده‌های تشکیل‌دهنده هر ترکیب تیماری است.

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۸. اثرات ساده رقم در هر کدام از سطوح ژل برای صفت باززایی گیاهچه‌های طبیعی

در هر سطح نوع ژل، حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بر درصد گیاهچه‌های نرمال بین ارقام مختلف با استفاده از معیار حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵٪ است.

اعداد بالای هر ستون، نشان‌دهنده انحراف معیار داده‌های تشکیل‌دهنده هر ترکیب تیماری است.

بطور کلی متوسط تولید گیاهچه‌های طبیعی در تیمارهای آگار–آگار، آگار–آگار + فیتاژل، آگارز و فیتاژل عبارت بودند از ۲۵/۳۳، ۲۸/۶۶، ۱۵/۳۲ و ۲۵/۳۳ که نشان می‌دهد ترکیب آگار–آگار + فیتاژل بهترین تیمار ژلی برای افزایش گیاهچه‌های طبیعی بود و در این شرایط رقم پی‌اف بیشترین میزان گیاهچه‌های طبیعی را تولید کرد (۳۶٪). بر اساس نتایج در تمام ژنوتیپ‌ها و ژل‌ها، تعدادی از گیاهان به صورت غیرطبیعی و عمدتاً همراه با تعداد بسیار زیادی جنین‌های ثانویه باززایی شدند و این نتایج با یافته‌های Huang و همکاران (۱۹۹۱) که گزارش کردند اکثر جنین‌ها به گیاهچه تبدیل نمی‌شوند و به صورت غیرطبیعی باززایی می‌شوند، یا اینکه بر روی آنها جنین‌های ثانویه تشکیل می‌شود، تطابق دارد.

در ارتباط با اثر متقابل معنی‌دار ژنوتیپ × دو فاکتور مورد بررسی (اسید جیبرلیک و نوع ژل) بر میزان باززایی گیاهچه‌ها که در تحقیق حاضر مشاهده شد، Ahmadi (۲۰۱۱) در تحقیقی با مقایسه چهار ژنوتیپ کلزا نشان داد که بیشترین میزان باززایی مستقیم مربوط به رقم Amica بود که با سایر ارقام از نظر باززایی تفاوت معنی‌دار داشت. همچنین در تحقیق دیگری نشان داده شد که نظر صفات جنین‌زایی از میکروسپورهای گندم و باززایی گیاهچه‌ها از جنین‌های حاصله، بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود داشت (Taiefeh Afshari, 2011). در تحقیقی دیگر ملاحظه شد که اثرات ژنوتیپ و محیط و همچنین اثرات متقابل آنها بر باززایی گیاهچه‌ها از جنین‌های حاصل از کشت میکروسپورهای کلزا معنی دار بود. ژنوتیپ Hyola 401 پاسخ پذیرترین و ژنوتیپ NK karibic سخت پاسخ‌ده ترین در بین ژنوتیپ‌ها بودند (Ghodsi, 2014). در تحقیقی دیگر Tarinejad (۲۰۱۳) نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف کلزا پاسخ‌های متفاوتی به باززایی گیاهچه‌ها دادند.

پس از پایان آزمایش‌های باززایی، نمونه‌های ریشه‌دار شده در محیط‌های کشت جدید واکشت گردیدند و گیاهچه‌های جدید تشکیل شدند و به درون گلدان‌های کوچک دارای پرلیت منتقل و تا مرحله سازش را در زیر سرپوش‌های پلاستیکی منفذدار طی کرده و گیاهان گلدانی را ایجاد نمودند. گیاهان حاصل غلاف‌هایی تشکیل دادند و در نهایت بذرهای لاین‌ها جمع‌آوری شدند.

بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق، استفاده از محیط کشت با حجم ۱۰ و ۱۲/۵ میلی‌لیتر، اضافه کردن زغال فعال به میزان ۱ گرم در لیتر به محیط

www.SID.ir

Archive of SID

کشت و همچنین استفاده از ساکارز به عنوان منبع هیدرات کربن محیط کشت جهت نیل به بیشترین میزان جنین در کشت میکروسپورهای ایزوله کلزا توصیه می‌شود. در مورد باززایی گیاهچه‌ها از جنین‌های حاصله، استفاده از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک و آگار–آگار + فیتاژل به عنوان نوع ژل جهت باززایی بهینه گیاهچه‌های طبیعی می‌تواند مفید باشد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که رقم پی‌اف ($PF_{7045/91}$) در مقایسه با دو رقم دیگر از پتانسیل جنین‌زایی و باززایی بیشتری برخوردار بود.

REFERENCES

Abdullahi BR, Moeini A, Haddadi P, Jalali Jorani M (2003) Somatic embryogenesis from isolated microspore culture in different cultivars of canola (*Brassica napus* L.). Paj.& Saz. 3: 48-52. (In Persian)

Ahmadi B, Ghadimzadeh M, Moghaddam AF, Alizadeh K (2011). Embryogenesis and plant regeneration from isolated microspores of *Brassica napus* L. under different incubation time. J. Food Agric. Environ. 9: 434-437.

Ahmadi B (2011) Study some of the factors on embryogenesis of isolated microspores in some of rapseed genotypes. Urmia University. M.Sc. Thesis. (In Persian)

Aslani F, Mozaffari J, Ghannadha MR, Attari AA (2005) Microspore culture for producing haploid plants in different rapeseed (*Brassica napus*) cultivars. Iranian J. Agric. Sci. 36(2): 331-339. (In Persian)

Bagniewska ZA, Cegielska TT, Zenkteler M (2001) Organogenesis initiation and plant regenaration from hypocotyls and cotyledons of androgenic embryos of *Brassica napus* L. Acta Biol. Crac. Seri. Botan. 43: 51-57.

Carlos J, Dias S (1999) Effect of activated charcoal on *Brassica oleraceae* microspore culture embryogenesis. Euphytica, 108: 65-69.

Crista TO, Prisecaru M, Brezeanu C, Brezeanu M (2013) Effect of carbohydrate type over the microspore embryogenesis at *Brassica oleraceae* L. Romanian Biotech. Let. 18(5): 8677-8684.

Dehestani Ardakani M, Kafi M, Shariat Panahi ME, Jafarkhani-Kermani M, Fattahi Moghadam MR, Oroojloo M (2012). Investigation of the effects of temperature and starvation stresses on microspore embryogenesis in two tetraploid roses (*Rosa hybrid* L.) via isolated microspore culture teqnique. Crop Biotech. 2(3): 73-83 (In Persian).

Dias JS (1999). Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis. Euphytica. 108(1): 65-69.

Fletcher R, Coventry J, Kott LS (1998) Doubled haploid technology for spring and winter *Brassica napus*, Technical Bulletin, OAC Publication, Canada.

Gamborg OL, Miller RA, Ojiwa K (1968) Nutrient requirements of suspension culture of soybean root callus. Experim. Cell Res. 50: 151-158.

Ghazanfari P, Abdollahi MR, Moieni A, Moosavi SS (2012). Effect of plant-derived smoke extract on in vitro plantlet regeneration from rapeseed (*Brassica napus* L. cv. Topas) microspore-derived embryos. Inter. J. Plant Prod. 6 (3): 309-324.

Ghodsi A (2014) Study the haploied plant regeneration in rapeseed by microspores embryogenesis. Alborz PNU University. M.Sc. Thesis. (In Persian)

Grubor IK (1998) A novel approach to microspore embryogenesis in *Brassica napus*. Ph.D. Thesis, University of Suskatchewan, Saskaton, Canada.

Grubor IK, Attree SM, Fowke LC (1998) Induction of microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. with

www.SID.ir

Archive of SID

polyethylene glycol (PEG) as osmoticum in low sucrose medium. Plant Cell Rep. 17: 329-333.

Habibi Khaniani B, Moieni A (2010) the effects of petri type and medium volume on embryogenesis of isolated microspores of canola (*Brassica napus* L. cv. PF704). National congress of water, Soil, Plant and Agriculture Mechanizasion, Dezful, Islamic Azad University, Dezful Branch (In Persian).

Haddadi P, Moieni A, Karimzadeh G, Abdollah MR (2008) Effects of gibberellin, abscisic acid and embryo desiccation on normal plantlet regeneration, secondary embryogenesis and callogenesis in microspore culture of *Brassica napus* L. cv. PF704. Inter. J. Plant Prod. 2 (2): 153-162.

Hamaoka Y, Sato S, Iwai S (1991) Effects of sugars, amino acids and embryogenesis in pollen culture of *Brassica campestris*. Abstract of XII Plant Tissue Culture Co. Nagoya, Japan, pp. 222.

Hosseinpour B (2003) Production of haploid plants via microspore culture in canola. MSc. Thesis, College of Agriculture, Mazandaran University, Sari, Iran. (In Persian)

Huang B, Swanson EB, Baszcynski CL, Macrae WD, Bardour E, Armavil V, Wohe L, Arnoldo M, Rozakis S, Westecott M, Keats RF, Kemble R (1991) Application of microspore culture to canola improvement. In: The Proceeding of 8th International Rapeseed Congress, McGregor, D. L., Saskatoon, Canada, pp: 298-302.

Kucera V, Vyvadllova M, Kima M (2002) Utilization of doubled haploids in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) breeding. J. Genet. Plant Breed. 38: 50-54.

Lemonnier C, Chatelet C, Kloareg B, Potin P (2001) Carrgeenan oligosaccharides enhance stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica oleracea* var. italica. Plant Sci. 160: 1211 -1220.

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

Liu XP, Liu ZW, Tu JX, Chen BY, Fu TD (2003) Improvement of microspores culture techniques in *Brassica napus* L. Yi Chuan. 25(4): 433-6.

Margale E, Chevre AM (1991) Factors affecting embryo production from microspore culture of *B. nigra.* Eucarp. Cruciferae Newsl. 14715: 100-101.

Mathias R (1988). An improved *in vitro* procedure for embryoids derived from isolated microspore of rape (*Brassica napus*). Plant Breed. 100: 320 – 322.

Mohan JS, Sopory SK, Veilleux RE (1996) *In vitro* haploid production in higher plants. Kluwer Academic Publishers.

Montgomery DC (2001) Design and analysis of experiments. John Wiley and Sons, INC, New York.

Na H, Kwak JH, Chun C (2011) The effects of plant growth regulators, activated charcoal, and AgNO3 on microspore derived embryo formation in broccoli (*Brassica oleracea* L. var.italica). Hort. Environ. Biotech. 52(5): 524-529.

Niu RQ, Zhang Y, Tong Y, Liu ZY, Wang YH, Feng H (2015) Effects of p-chlorophenoxyisobutyric acid, arabinogalactan, and activated charcoal on microspore embryogenesis in kale. Genet. Mol. Res. 14 (2): 3897-3909.

Oroojloo M, Shariatpanahi ME, Habibzadeh S, Emamifar M, Javidfar F (2011) Effect of temperature on microspore embryogenesis and regeneration of doubled haploid plants in three canola (*Brassica napus* L.) hybrids. Seed Plant Improv. J. 27(2): 167 – 182. (In Persian)

Park EJ, Lee JS, An DJ, Kim MZ (2010). The effect of medium change after pretreating microspores, medium addition, and volume of under solid medium in double layer culture on the

www.SID.ir

Archive of SID

production of embryos in isolated microspore culture of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). J. Plant Biotech. 37(4): 494-504.

Perera PIP, Kularatene JDJS, Weerakoon LK (2011) Effect of gelling agent and selective sub-culturing on hyperhydricity in anther-derived Coconut embryos. Cord 27 (2): 26-37.

Prem D, Gupta K, Agnihotri A (2005) Effect of various exogenous and endogenous factors on microspore embryogenesis in Indian mustard. (*Brassica juncea* L. Czern and Coss). In Vitro Cel. Develop. Biol. Plant. 41: 266-273.

Taiefeh Afshari B (2011) Study the effecting factors on embryogenesis of microspores in production of doubled haploied plants in wheat. *Zanjan University*. M.Sc. Thesis. (In Persian)

Tarinejad AR (2013). The effect of pre-treatment, genotypes and the age of cotyledonary explants on shoot regeneration in canola. Tech. J. Engin. App. Sci. 3(13): 1255-1261.

Tavakoli M, Shariat Panahi ME (2013). Effect of EMS on microspore embryogenesis induction and haploid plant regeneration in rapeseed (*Brassica napus* L.). Crop Biotech. 4: 61-68. (In Persian)

Taji A, Kumar PP, Lakshmanan P (2000) *In vitro* plant breeding. (text book) Food Products Press.

Takahata Y (1997) Microspore culture. In: Recent Advances in Oilseed *Brassica*, eds. Kalia, H. R. and Gupta, S. K., pp: 160-181. Kayani Publishers, Ludhiana.

Tomas E, Wenzel G (1975) Embryogenesis from microspore of *Brassica napus* Pflanzenzucht. 74: 77-78.

www.SID.ir