Archive of SID

مجله علوم کشاورزی ایران
دوره ۱-۳۸، شماره۲، ۱۳۸۶ (۲۷۵-۲۶۷)

تولید جنین های هاپلوئید از طریق کشت میکروسپور در گندم (*Triticum aestivum* L.)

شاهرخ قرنجیک[۱]، احمد معینی*[۲]، امیر موسوی[۳] و هوشنگ علیزاده [۴]
۱، ۲، دانشجوی دکتری و دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، ۳، استادیار پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی ۴، استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۵/۹/۱۵- تاریخ تصویب: ۸۵/۱۲/۹)

چکیده

در تحقیق حاضر، تعداد هشت رقم از گندم های هگزاپلوئید تجاری ایران از نظر پاسخ به کشت میکروسپور مورد ارزیابی قرار گرفتند. پیش تیمار سنبله ها با محرک های شیمیایی القاء کننده جنین زایی (شامل ۲- هیدروکسی نیکوتینیک اسید،2,4-D و BAP) در دمای ۳۳ °C به مدت ۷۲-۴۸ ساعت اعمال شد. جداسازی میکروسپورها با روش آسیاب کردن سنبله ها در محلول جداسازی میکروسپورها (۰/۳ mol L^{-1} مانیتول) انجام گرفت. سپس، کشت توأم میکروسپورها با چند عدد تخمدان تازه گندم در محیط کشت مایع NPB99 ، با تراکم $10^3\times$ ٤ میکروسپور در هر میلی‌لیتر، در پتری‌دیش‌های یکبار مصرف (۶۰×۱۵ mm) و در شرایط ۲۷ °C و تاریکی انجام شد. ٤-۳ هفته پس از کشت، میزان پاسخ ارقام گندم مورد مطالعه به کشت میکروسپور ارزیابی گردید. بررسی های سیتولوژیکی با استفاده از میکروسکوپ معکوس نشان داد که ساختارهای چند سلولی، تقریباً یک هفته بعد از کشت تشکیل می‌گردند. در طول هفته دوم، دیوارهٔ میکروسپورها شکافته شده و جنین‌های نارس جوانه‌می‌زنند. رشد و بلوغ این جنین ها، در طی ۱۰ تا ١٤ روز بعد انجام می گیرد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس، تفاوت های معنی داری از نظر میزان تشکیل جنین، بین ارقام وجود داشت که این امر نشان دهنده وابستگی ژنتیکی این صفت می‌باشد. ارقام گندم فلات و مغان۱ به ترتیب با میانگین تولید ۱٤۲۷±۸۱/۵۸ و ٥٤/٥٥ ± ۱۱۰۸ جنین در واحد سنبله، به عنوان ژنوتیپ های برتر از نظر جنین زایی شناسایی شدند.

واژه های کلیدی: هاپلوئید، کشت میکروسپور ، جنین زایی ، گندم هگزاپلوئید

مقدمه

تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف شده از طریق کشت میکروسپور، در برنامه‌های به‌نژادی و دست ورزی های ژنتیکی از اهمیت زیادی برخوردار است. در روشهای کلاسیک به نژادی، حداقل ۵ تا ۶ نسل خودگشنی برای رسیدن به حد مطلوب هموزیگوسیتی لازم است. به علاوه، در نهایت درصد کمی ناخالصی هم باقی می ماند، ولی در روش تولید درون شیشه ای هاپلوئیدهای مضاعف شده، طی یک نسل به هموزیگوسیتی کامل می رسیم (۱۹). ضمناً گزینش، پیشرفت ژنتیکی مطلوبی را در نتاج نشان داده و واریانس ژنتیکی افزایشی، به راحتی در هاپلوئید های مضاعف شده معلوم می گردد، چون تنوع ناشی از غالبیت در

*نویسنده مسئول: احمد معینی تلفن:۰۹۱۲-۳۴۸۴۳۶۴۹ E-mail:moieni_a@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

آنها حذف شده است . همچنین، تفرق صفات در طی نسلهای باززایی گیاه به حداقل می رسد(۴).

تولید گیاهان تراریخته از طریق بافتهای هاپلویید یکی از اهداف با ارزش در مهندسی ژنتیک محسوب می شود، زیرا پس از انتقال ژن به بافت هاپلویید و مضاعف کردن کروموزومهای آن، می توان گیاهان تراریخته کاملاً هموزیگوس برای ژن انتقال یافته را بازیابی کرد (۴،۱). روش های متعددی جهت تولید گیاهان هاپلوئید و به دنبال آن گیاهان هاپلوئید مضاعف شده وجود دارد که یکی از این روشها آندروژنز[1] می باشد که به دو روش ، کشت بساک[2] و کشت میکروسپور[3] انجام می شود. محققین از طریق هاپلوئیدهای مضاعف شده توانسته اند ارقام جدیدی از غلات بویژه جو ، ذرت و برنج را اصلاح و معرفی کنند (۱۹). کشت میکروسپور، روشی است که به لحاظ مزایای آن بر کشت بساک، بیشتر مورد توجه محققین قرارگرفته است. بطور کلی، عمده‌ترین مزایای کشت میکروسپور نسبت به کشت بساک عبارتند از: کاهش باززایی گیاهان دیپلوئید به دلیل حذف بافت های دیپلوئید دیوارهٔ بساک، حذف مواد ممانعت کننده رشد میکروسپورها که در کشت بساک از دیواره بساک ترشح می شوند، مشاهده و بررسی دقیق تمام مراحل جنین زایی، جذب بهتر و یکنواخت مواد غذایی به دلیل تماس مستقیم میکروسپورها با محیط کشت، تبدیل مستقیم اکثر میکروسپورها به جنین و در نتیجه کاهش تولید شیمر به دلیل عدم تشکیل کالوس و مناسب بودن میکروسپورها برای مطالعات موتاسیون و انتقال ژن (۵،۱۲،۱۵).

فاکتورهای مختلفی القای ساختارهای پیش جنینی در کشت میکروسپورهای گندم را تحت تأثیر قرار می‌دهند از قبیل : ژنوتیپ گیاه، شرایط رشد گیاهان مادری، مرحله رشد و نموی میکروسپورها، رژیم نوری، روش جداسازی میکروسپورها، شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط کشت (۶ ، ۹،۱۱، ۱۶، ۱۹). برای القاء جنین زایی در آندروژنز، تیمارهای تنشی (تنش غذایی، دمای بالا یا پائین) به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته اند (۷،۲۰). پاسخ ژنوتیپ های مورد مطالعه عموماً به فاکتورهای ژنتیکی و محیطی وابسته بوده اند و برخی ژنوتیپ‌ها به طور طبیعی واکنش بهتری در پاسخ به تغییرات محیطی و انواع تیمارهای تنشی که روی میکروسپورها اعمال می‌گردد، نشان می‌دهند (۱۸، ۲۴).

تولید گیاهان هموزیگوس با استفاده از تکنیک کشت میکروسپور، به عنوان بهترین و مؤثرترین روش تولید گیاهان هاپلوئید، می تواند علاوه بر صرفه جوئی در هزینه ها، برنامه های به نژادی گندم را تسریع نموده و مکمل مناسبی برای روشهای رایج به نژادی باشد. در ایران تاکنون تحقیقی بر روی کشت میکروسپورهای گندم انجام نگرفته است. در تحقیق حاضر ، برای اولین بار در ایران ، تعداد هشت رقم از گندم های هگزاپلوئید تجاری ایران از نظر پاسخ به کشت میکروسپور مورد ارزیابی قرار گرفتند. هدف این تحقیق ، تعیین میزان پاسخ به جنین زایی در کشت میکروسپورهای برخی از ژنوتیپ های گندم موجود در کشور و همچنین شناسایی و تعیین فاکتورهای تأثیرگذار در القاء ساختارهای چند سلولی و تولید جنین های هاپلوئید در گندم می باشد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی: هشت رقم از گندم های هگزاپلوئید بهاره ایرانی(مغان۱، تجن، فلات، اترک ،امید، توبارى، قدس و مرودشت)، مواد گیاهی این آزمایش را تشکیل دادند. بذور این ارقام در سال ۱۳۸۴ از بخش غلات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد.

تهیه گیاهان مادری

کشت گیاهان مادری در اتاق رشد کنترل شده در دمای ۲۵ ± ۲ °C (روز) و ۱۵ ± ۲ °C (شب) و رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی($۲۵۰-۳۰۰ \mu mol\ m^{-2}\ S^{-1}$) و ۸ ساعت تاریکی انجام شد. آبیاری به موقع و تیمارهای کودی لازم جهت بدست آوردن گیاهان مادری با کیفیت بالا در طی دوره رشد، اعمال گردید.

1.Androgenesis
2.Anther culture
3.Microspore Culture

www.SID.ir

Archive of SID

جمع آوری و پس از حذف تمام برگهای ساقه سنبله ، به استثناء برگ پرچم، قاعده آنها بلافاصله در ظرف حاوی آب مقطر قرار گرفت. از بساک های گلچه‌های بخش میانی سنبله‌ها برای تعیین مرحله رشد و نموی میکروسپورها به روش سیتولوژیکی، از طریق رنگ آمیزی با استوکارمن استفاده گردید.

پیش تیمار میکروسپورها با محرک‌های شیمیای

پس از حذف بخش‌های انتهایی، سنبله ها در ظرف استریل حاوی ۵۰ml از محلول پیش تیمار القاء کننده جنین زایی (0/1 gl^{-1}2-HNA[1], 10^{-6}mol l^{-1} 2, 4-D2[2], 10^{-6}mol l^{-1} BAP[3]) (اتوکلاو شده) قرار داده شدند. سپس، سنبله‌ها را با پاکت‌های پلاستیکی پوشانده و انتهای باز آن، به منظور جلوگیری از آلودگی و از بین رفتن آب محیط پیش تیمار، درزگیری شد. سپس، ظرف حاوی سنبله‌ها به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۳ °C و تاریکی، نگهداری شد.

جداسازی و خالص سازی میکروسپورها

۱) در شرایط استریل، سنبله‌های گندم با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۲٪ به مدت ۱۵ دقیقه، و سپس سه بار شستشو با آب مقطر استریل، ضدعفونی سطحی شدند.

۲) سنبلچه ها به درون ظرف بلندر[4] (آسیاب آزمایشگاهی) استریل منتقل شدند (از سنبلچه های ۳ تا ۶ سنبله، برای یک دور آسیاب استفاده شد).

۳) میزان ۴۰ml از محلول جداسازی میکروسپورها (محلول ۰/۳ mol L-1 مانیتول) را به ظرف بلندر اضافه کرده و سنبلچه ها به مدت ۲۰ ثانیه در سرعت حدود ۲۲۰۰rpm آسیاب شدند.

۴) مخلوط بدست آمده با استفاده از الک استریل ۱۰۰ µm فیلتر گردید و سپس ظرف بلندر، دو بار با ۵ ml محلول مانیتول آبکشی شد.

۵) سوسپانسیون بدست آمده به درون لوله های فالکون ۵۰ ml ریخته شد و سپس با دور ۱۰۰ × g به مدت سه دقیقه سانتریفوژ شد.

۶) رسوب حاصل از مرحله قبل، توسط ۲ ml از محلول مانیتول به حالت سوسپانسیون در آمد.

۷) توسط میکروپیپت، ۲ ml سوسپانسیون میکروسپورهای مرحله قبل بر روی ۵ ml محلول مالتوز استریل(۰/۵۸ mol L^{-1}) موجود در لوله فالکون ۱۵ ml اضافه شده و در دور ۱۰۰ × g به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد.

۸) با استفاده از میکروپیپت، ۳ ml از فاز بالایی (حاوی میکروسپورهای زنده) برداشته شد و به منظور شستشو، به فالکون دیگر حاوی ۱۰ml محلول جداسازی میکروسپورها اضافه شده و سپس در دور ۱۰۰× g به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد.

۹) در فالکون دیگری، فاز پایینی (رسوب) حاصل از مرحله ۷ را در ۱۲ ml آب مقطر حل کردیم (جهت شمارش تعداد کل میکروسپورها) و در ۱۰۰× g دور به مدت ۳ دقیقه سانتریقوژ شد.

۱۰) روشناور حاصل از هر دو سانتریقوژ حذف شد و رسوب حاصل از میکروسپورهای فاز بالایی در ۳ ml محیط کشت فیلتر استریل شده NPB99 (۱۲) و رسوب حاصل از فاز پایینی در ۳ ml آب مقطر به حالت سوسپانسیون درآمد.

۱۱) تعداد میکروسپورهای هر فاز توسط لام مخصوص شمارش سلول (هموسیتومتر[5]) تعیین گردید. میکروسپورهای فاز پایینی، بعد از شمارش حذف شدند. تعداد کل میکروسپورها، از جمع تعداد میکروسپورهای دو فاز بالایی و پایینی بدست می‌آیند.

۱۲) میکروسپورهای فاز بالایی در یک لولهٔ فالکون حاوی ۱۰ ml محیط کشت حل گردید و در دور ۱۰۰ × g به مدت ۳ دقیقه سانتریقوژ شدند.

۱۳) روشناور حذف و رسوب حاصل در محیط کشت جنین زایی و با تراکم حدود ۴×۱۰^{۳} میکروسپور در هر میلی لیتر حل شد.

[1] – 2-hydroxynicotinic acid
[2] – 2,4-dichloro phenoxyacetic acid
[3] – 6-benzylaminopurine
[4]- Blender
[5]- Hemacytometer

www.SID.ir

Archive of SID

لیتر کشت شد و تعداد جنین های تشکیل شده به ازای هر سنبله پس از ۳۰ روز، شمارش شدند. تجزیه واریانس آماری نتایج و مقایسه میانگین ها به روش آزمون چند دامنه ای دانکن و با استفاده از نرم افزار spss انجام گرفت.

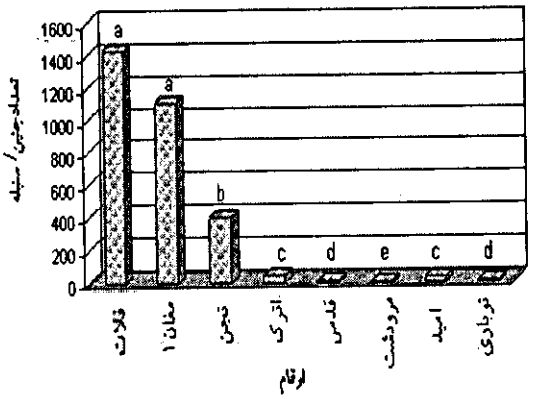
جدول۱- ترکیب محیط کشت NPB99 ، استفاده شده برای جنین زایی میکروسپورهای گندم

اجزاء	(mgl^{-1})
KNo_3	1415
$(NH4)_2SO_4$	232
$CaCl2.2H_2O$	83
KH_2PO_4	200
$MgSO_4.7H_2O$	93
H_3BO_3	5
$MnSO_4.4H2O$	5
$ZnSO4.7H2O$	5
$CoCl.6\ H2O$	0.0125
$Na_2MoO_4.7H_2O$	0.0125
$CuSO_4.5H_2O$	0.0125
KI	0.4
Na_2EDTA	37.3
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCL	0.5
Thiamine-HCl	5
Myo-inositol	50
Glutamine	500
Phenylacetic acid	1
2,4- D	0.2
Kinetin	0.2
Maltose	90000
pH=7	

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی عکس‌العمل ارقام مورد مطالعه به کشت میکروسپور و مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها برای صفت جنین‌زایی در شکل۱ نشان داده شده است. جدول تجزیه واریانس برای صفت جنین‌زایی نشان داد که از نظر میزان تشکیل جنین، بین ارقام اختلاف معنی‌داری وجود دارد که این امر نشان دهنده وابستگی ژنتیکی این صفت می‌باشد. در این آزمایش، ارقام گندم فلات و مغان۱ به ترتیب با میانگین ۸۱/۵۸±۱۴۲۷ و ۵۴/۵۵ ± ۱۱۰۸ جنین در واحد سنبله، دارای بیشترین تعداد جنین در بین ارقام مورد بررسی بودند. بعد از این دو رقم، به ترتیب ارقام تجن (۱۹/۷۴±۴۰۵)، اترک (۶/۱۹±۴۷) و امید (۸/۷±۳۹/۲۵)، جنین زایی بالاتری نسبت به بقیه ارقام داشتند. کمترین میزان تولید جنین مربوط به ارقام توباری (۳/۵±۱۸/۷۵)، قدس (۲/۹±۱۴/۷۵) و مرودشت (۱/۲۵±۴/۵) بود. دامنه تغییرات وسیع میزان تولید جنین در بین ارقام مورد مطالعه، بیانگر وابستگی ژنتیکی بالای این صفت می باشد.

فاکتورهای متعددی القای ساختارهای چند سلولی و تولید جنین‌های گامتوفیتی را در کشت میکروسپورگندم تحت تأثیر قرار می‌دهند. مطالعات و تحقیقات انجام شده بر روی کشت میکروسپور در گیاهان گوناگون نشان داده‌اند که خصوصیات ژنوتیپی، تاثیر زیادی بر روی پاسخ گیاه به کشت میکروسپور دارد. هیو و کاشا (۱۹۹۷)، ۵ رقم گندم را همراه با ۴ هیبرید بین آنها از نظر پاسخ دهی به کشت میکروسپور مورد مقایسه قرار داده‌اند و نتیجه گرفتند که رقم مارکوئیس،[1] بیشترین جنین و رقم چریس[2]، بیشترین گیاه سبز را تولید کردند (۸).

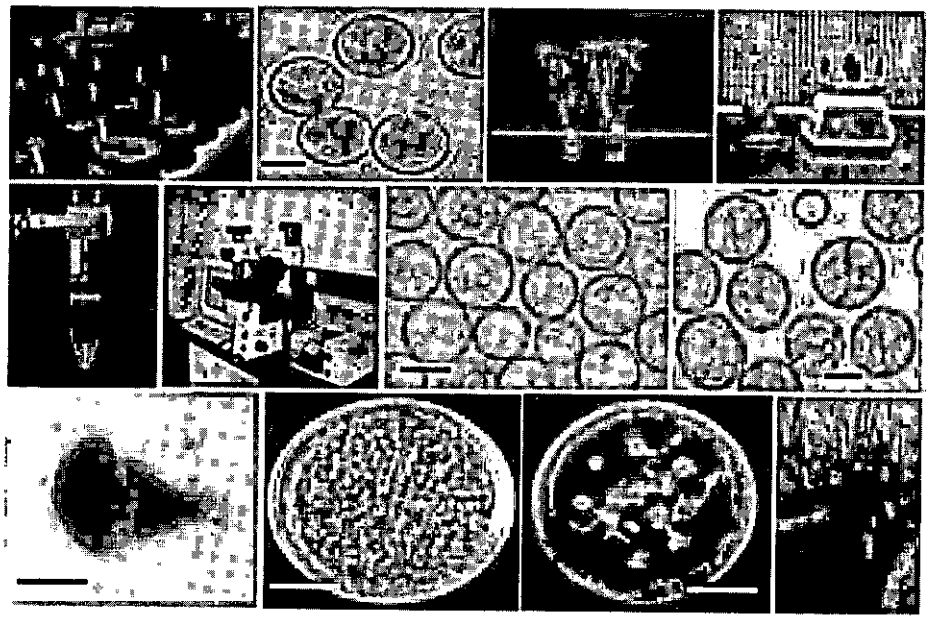


شکل۱- مقایسه میانگین تعداد جنین در واحد سنبله در ارقام مختلف گندم هگزاپلوئید ایران

1. Marquis
2. Chris

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲- مراحل تولید گیاهان هاپلوئید گندم از طریق کشت میکروسپور (رقم فلات).

الف) کشت گیاهان مادری در اتاق رشد کنترل شده. ب) رنگ آمیزی میکروسپورهای گندم با استوکارمن ۲٪ (مرحله تک هسته‌ای) ج) پیش تیمار سنبله های حاوی میکروسپورها در مرحله نموی مناسب در محلول القاء کننده شیمیایی. د) جداسازی میکروسپورها به روش آسیاب کردن. ه) تفکیک میکروسپورهای زنده و مرده در شیب غلظت مالتوز۲۱٪ . و) میکروسکوپ معکوس جهت مشاهده روند تکامل میکروسپورها. ز) میکروسپورهای جنین زا با ساختار چند واکوئلی و سیتوپلاسم فشرده مرکزی بعد از پیش تیمار در محلول القاء کننده شیمیایی. ر) ساختارهای چند سلولی تشکیل شده بعد از ۱۰ روز در محیط کشت مایع NPB99. ن) ساختارهای پیش جنینی تشکیل شده بعد از ۱۸ روز. ل) انبوه جنین های تشکیل شده ۲۸ روز پس از شروع کشت. ط) باززایی گیاه از جنین های حاصل از کشت میکروسپور در محیط کشت باززایی گیاه ۲-۱۹۰. ع) انتقال گیاهان سبز از شرایط *in vitro* به شرایط *ex vitro*.

ژنهای اختصاصی جنینی که در مراحل اولیه جنین زایی میکروسپور گندم دخیل هستند، تعیین شده‌اند و به نظر می‌رسد که این ژنها مراحل رشد و نموی میکروسپورها را کنترل می‌کنند و با تغییرات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی مربوط به تمایز جنین در شرایط درون شیشه ای، مرتبط می‌باشند (۸، ۱۸).

محققین معتقدند که مرحله رشد و نموی میکروسپور بیشترین تأثیر را در موفقیت کشت میکروسپور در مقایسه با سایر متغیرها دارد. اغلب محققین، بهترین مرحله کشت میکروسپور گندم را تک هسته‌ای میانی تا تک هسته‌ای انتهایی ذکر کرده‌اند (۲، ۸، ۹). برخی از محققین نیز مرحله تک هسته‌ای انتهایی تا اوایل دو هسته‌ای را مناسبتر تشخیص داده‌اند (۲۰، ۱۵). در تحقیق حاضر، جهت تعیین مرحله مناسب برداشت سنبله‌ها از شاخص‌های مرفولوژیکی و بررسی های سیتولوژیکی استفاده گردید. برای این منظور، از بساکها سنبلچه‌های وسطی سنبله ها جهت تعیین مرحله تکامل میکروسپورها، با استفاده از رنگ آمیزی استوکارمن ۲٪ ، استفاده شد. بر اساس نتایج بدست آمده، زمانیکه cm ۱- ۰/۵ از ریشکها از غلاف برگ پرچم بیرون آمده باشد و در برخی از ارقام زمانیکه هنوز ریشکها بیرون نیامده باشند، میکروسپورها در مرحله رشد و نموی مناسب جهت کشت میکروسپور می‌باشند. در مرحله تک هسته‌ای میانی، واکوئل نسبتاً بزرگ بوده و در وسط سلول واقع شده است و هسته نیز در کنار آن قرار دارد. در مرحله تک هسته‌ای انتهای واکوئل بزرگتر شده و بیشتر حجم سلول را شامل می‌شود و هسته نیز در مجاورت دیواره سلول واقع شده است (شکل۲).

در تحقیقی، میکروسپورها در مراحل مختلف نموی از مرحله تک هسته‌ای ابتدایی[1] تا دو هسته‌ای[2] کشت شدند و مشخص گردید که وابستگی شدیدی بین میزان جنین‌زایی و مرحله نمو میکروسپور وجود دارد و فقط میکروسپورهایی

1. Early uninucleat stage
2.Binucleat stage

www.SID.ir

Archive of SID

که در مرحله تک هسته‌ای انتهایی تا دو هسته‌ای ابتدایی بودند، تشکیل جنین دادند (۲۰). تراکم میکروسپورها در محیط کشت، عامل مهم دیگری است که اثر مستقیمی بر روی پاسخ آنها به جنین‌زایی دارد، زیرا میکروسپورها باید برای استفاده از منبع محدود غذایی با هم رقابت نمایند. گوستافسون و همکاران (۱۹۹۵) اثر چندین غظت مختلف میکروسپور را بر روی قدرت زنده بودن آنها مورد بررسی قرار داده و گزارش کردند که تراکم میکروسپورها در ابتدای کشت و همچنین در طول کشت، بر روی رشد و تقسیم آنها تأثیر دارد و به عنوان یک عامل تعیین کننده عمل می‌نماید. در گزارشات مختلف کشت میکروسپور گندم، تراکم میکروسپورها معمولا بین ۴×۱۰^{۳} تا ۴×۱۰^{۵} استفاده شده است (۳). در این تحقیق، تراکم میکروسپورها با استفاده از لام مخصوص شمارش سلول تعیین گردید و در کلیه کشت‌ها از تراکم ۴×۱۰^{۳} میکروسپور در هر میلی‌لیتر در ابتدای کشت استفاده شد (۱۴،۱۵).

نتایج مطالعات نشان داده‌اند که جنین زایی میکروسپورهای گندم می‌تواند از طریق اعمال پیش تیمارهای گوناگون شامل استفاده از سرما، گرما، تنش غذایی و محرک‌های شیمیایی به صورت جداگانه یا به صورت تلفیقی القاء گردد. این پیش تیمارها می‌تواند در مراحل مختلفی از قبیل پیش تیمار بر روی گیاهان بخشنده، سنبله‌ها و بساکهای جدا شده اعمال شوند (۲۲،۲۱،۲۰). در این تحقیق، از پیش تیمار شیمیایی شامل ۲- هیدروکسی نیکوتینیک اسید به همراه هورمون‌های 2,4-D و BAP به منظور القاء جنین زایی در میکروسپورها استفاده گردید. بعد از اعمال پیش تیمار و جدا سازی میکروسپورها، مشاهده گردید که میکروسپورهای جنین‌زا معمولاً دارای واکوئل بزرگ مرکزی هستند که به دلیل تشکیل رشته‌های سیتوپلاسمی که از میان واکوئل عبور می‌کنند، چندین واکوئل کوچک را تشکیل می‌دهد که بلافاصله بوسیله دیواره سلولی احاطه می‌گردند. این واکوئل دور تا دور مجموعه سیتوپلاسم مرکزی قرار گرفته‌اند و ساختار شبه ستاره‌ای را تشکیل می‌دهند(شکل۲). در این تحقیق، همچنین مشاهده شد که میکروسپورهای جنین زا، معمولاً، اندازه‌ای بزرگتر(حدود ۵۰ µm) از میانگین میکروسپورهای پیش تیمار نشده یا القاء نشده (۴۵ µm-۲۵) دارند.

در تحقیقی که توسط لیو و همکاران (۲۰۰۲) انجام گرفت، غلظت بهینه ۲- هیدروکسی نیکوتینیک اسید در محلول پیش تیمار میکروسپورها برای القای جنین‌زایی و تشکیل جنین‌های بالغ، حدود $۱۰۰\ mg\ l^{-1}$ تعیین گردید. این محققین مشاهده کردند، زمانیکه میکروسپورها از سنبله‌های پیش تیمار نشده جداسازی می شدند، اکثراً به سمت تکامل دانه گرده توسعه یافته و معمولاً پس از کشت در محیط کشت القاء جنین زایی از بین می‌روند (۲۲،۱۵). در تحقیق حاضر نیز، از ۲- هیدروکسی نیکوتینیک اسید با غلظت $۱۰۰\ mg\ l^{-1}$ در محلول پیش تیمار سنبله ها استفاده گردید. استفاده از ۲- هیدروکسی نیکوتینیک اسید در تحقیقات قبلی نیز باعث افزایش کارآیی کشت بساک گندم گردیده بود (۱۲). محلول های القاء کننده شیمیایی توسط سیستم آوندی ساقه جذب شده و به بساکها و متعاقباً به میکروسپورها منتقل می‌شوند و دمای ۳۳ °C، کارآیی سرعت انتقال این مواد را به میکروسپورها افزایش می دهد. دماهای پایین تر نیز قابل استفاده هستند ولی باعث کندی انتقال مواد و همچنین رشد سنبله‌ها و در نتیجه خروج سنبله ها از غلاف می‌گردند. مدت زمان بهینه دورهٔ پیش تیمار ، برحسب ژنوتیپ و دمای پیش تیمار متفاوت بوده و حدود ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۳ °C می‌باشد (۱۲).

محققین معتقدند مراحل جداسازی میکروسپورها بایستی به نحوی باشد که حداقل خسارت را به میکروسپورها وارد نماید. محققین روش‌های مختلف جداسازی میکروسپورها را مورد استفاده قرار داده‌اند. با وجود اینکه تمام روش ها به نظر می‌رسد که قابل استفاده باشند، ولی تنها، جداسازی میکروسپورها با استفاده از آسیاب آزمایشگاهی نتایج قابل تکرار با فراوانی بالای میکروسپورهای زنده و جنین‌زا تولید کرده است. در این راستا عواملی مثل سرعت و مدت زمان آسیاب سنبله ها از فاکتورهای تعیین کننده می‌باشند. این روش در گندم توسط محققین مختلفی مورد استفاده قرار گرفته است (۲۳،۲۲،۱۷،۱۵،۶) و گوستافسون و همکاران (۱۹۹۵) در مقایسه با سایر روش‌ها، این روش را پیشنهاد نموده اند (۶).

www.SID.ir

Archive of SID

صورت گرفته است (۱۷،۱۶،۳). نتایج مطالعات نشان داده‌اند که در کشت میکروسپور گندم بهترین کربوهیدرات، مالتوز می‌باشد (۳). پائین بودن سرعت هیدرولیز مالتوز باعث می‌شود تا گلوکز بر حسب نیاز جنین آزاد شده و برای مدت طولانی تری در اختیار جنین قرار گیرد (۲۱،۲۰،۳). از طرفی فشار اسمزی محیط کشت که عامل مهمی در تکامل میکروسپورها به سمت جنین‌های بالغ بوده و تعداد و اندازه جنین‌ها را تحت تأثیر قرار می دهد، با استفاده از غلظت های متفاوت قند مالتوز قابل تنظیم است. لیو و همکاران (۲۰۰۲) نتیجه گرفتند، که بهترین فشار اسمزی محیط کشت برای تشکیل جنین حدود $mOsmol\ kg^{-1}\ H_2O$ ۳۰۰ می‌باشد که این میزان فشار اسمزی با استفاده از ۹۰ گرم در لیتر قند مالتوز بدست می آید (۱۵،۱۴). در این تحقیق نیز از قند مالتوز به عنوان منبع کربوهیدرات و به میزان ۹۰ گرم در لیتر در تهیه محیط کشت میکروسپورها استفاده گردید.

در صورت مناسب بودن محیط کشت، میکروسپورهای جنین‌زا، اولین تقسیم سلولی خودشان را تقریباً ۱۲ ساعت بعد از کشت آغاز می‌نمایند. این تقسیم برخلاف فرآیند نرمال دانه گرده، از نوع تقسیمات متقارن می باشد(۱۵). تقسیم متقارن، فقط در سلول هایی که هسته آنها در مرکز سلول قرار گرفته، می تواند انجام شود که این حالت در میکروسپورهای جنین زای القاء شده توسط پیش تیمار شیمیایی مشاهده می گردد. ساختارهای چند سلولی که هنوز در داخل دیواره میکروسپورها (اگزین) قرار گرفته‌اند تقریباً یک هفته بعد، تشکیل می‌گردند. تجمع دانه های نشاسته ای در سلول های ناحیه محدودی در مجاورت دیواره میکروسپور و اغلب در نزدیکی منفذ جنینی در تمام ساختار های چند سلولی انجام می گیرد شکل۲ (۱۵،۱۰). در طول هفته دوم، دیوارهٔ میکروسپورها از ناحیه مقابل منفذ جنینی شکافته شده و جنین‌های نارس جوانه می‌زنند. رشد و بلوغ این جنین ها، در طی ۱۰ تا ۱۴ روز بعد انجام می گیرد (شکل۲).

شایان ذکر است که در این تحقیق به دلیل نبود رقم شاهد، جهت مقایسه ارقام و بهینه سازی شرایط کشت، بررسی های سیتولوژیکی گسترده ای با استفاده از میکروسکوپ معکوس[1] بر روی میکروسپورهای ارقام در شرایط متفاوت کشت، جهت بررسی مراحل مختلف القاء و نمو جنین ها و یافتن شاخص های سیتولوژیکی برای شناسایی میکروسپورهای جنین زا انجام گرفت. تشخیص اولیه میکروسپورهای جنین زا از میان انواع غیر جنین زا، نه تنها در بهینه سازی کشت برای گونه های زراعی با اهمیت، ولی نامستعد از نظر کشت میکروسپورمفید است، بلکه در جداسازی ژنهایی که نقش کلیدی در تشکیل سلول های جنین زا ایفا می نمایند نیز با ارزش خواهد بود(۱۰).

نتایج تحقیقات نشان داده است که استفاده از چند عدد تخمدان زنده به همراه کشت میکروسپورها، نقش بسیار مؤثری در توسعه جنین‌زایی ایفا می‌نماید و این توسعه به خاطر ترشح موادی از تخمدان (مثل فنیل استیک اسید[2] و آنالوگ‌های آن) در محیط کشت می‌باشد که باعث تقویت محیط کشت و افزایش پاسخ میکروسپورها می‌شود(۸،۲) . اخیراً محققین ترکیباتی از خانواده آرابینوگالاکتان را در کشت میکروسپورهای گندم مورد استفاده قرار دادند و مشاهده کردند این مواد در افزایش قدرت زنده ماندن میکروسپورها و همچنین در بهبود قدرت باززایی جنین های بدست آمده نقش دارند. با وجود اینکه این مواد به تنهایی نیز باعث تشکیل جنین می شدند، ولی بهترین نتیجه زمانی حاصل می شد که به همراه تخمدان زنده به محیط اضافه می شدند(۱۳). هیو و کاشا (۱۹۹۷)، اثر کشت تخمدان را در کشت میکروسپورهای ایزوله گندم مورد بررسی قرار دادند و اعلام کردند علاوه بر فنیل استیک اسید، مواد دیگری هم از تخمدانها منتشر می‌شوند که باعث افزایش پاسخ به کشت می‌شود و استفاده از کشت توأم میکروسپورها با تخمدان‌ها، اختلافات بین ژنوتیپ‌ها (در هر دو فاز القاء و جنین‌زایی) را کاهش می‌دهد(۸). تورآو و همکاران(۱۹۹۶)، از هر دو نوع کشت، بدون تخمدان، و با تخمدان، استفاده کرده و مشاهده کردند که در کشت‌های بدون تخمدان هیچ جنینی تشکیل نگردید(۲۰). در تحقیق حاضر، نیز، حتی زمانیکه جمعیت بسیار زیادی از میکروسپورهای جنین‌زا در محیط کشت فاقد تخمدان زنده

1- Inverted microscope
2- Phenyleacetic acid (PAA)

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت و افزایش پاسخ میکروسپورها می‌شود(۸،۲) . اخیراً محققین ترکیباتی از خانواده آرابینوگالاکتان را در کشت میکروسپورهای گندم مورد استفاده قرار دادند و مشاهده کردند این مواد در افزایش قدرت زنده ماندن میکروسپورها و همچنین در بهبود قدرت باززایی جنین های بدست آمده نقش دارند. با وجود اینکه این مواد به تنهایی نیز باعث تشکیل جنین می شدند، ولی بهترین نتیجه زمانی حاصل می شد که به همراه تخمدان زنده به محیط اضافه می شدند(۱۳). هیو و کاشا (۱۹۹۷)، اثر کشت تخمدان را در کشت میکروسپورهای ایزوله گندم مورد بررسی قرار دادند و اعلام کردند علاوه بر فنیل استیک اسید، مواد دیگری هم از تخمدانها منتشر می‌شوند که باعث افزایش پاسخ به کشت می‌شود و استفاده از کشت توأم میکروسپورها با تخمدان‌ها، اختلافات بین ژنوتیپ‌ها (در هر دو فاز القاء و جنین‌زایی) را کاهش می‌دهد(۸). تورآو و همکاران(۱۹۹۶)، از هر دو نوع کشت، بدون تخمدان، و با تخمدان، استفاده کرده و مشاهده کردند که در کشت‌های بدون تخمدان هیچ جنینی تشکیل نگردید (۲۰). در تحقیق حاضر نیز، حتی زمانیکه جمعیت بسیار زیادی از میکروسپورهای جنین‌زا در محیط کشت فاقد تخمدان زنده کشت می شدند، اکثریت میکروسپورهای در حال توسعه، از تقسیمات سلولی بعدی باز می‌ماندند.

تحقیق حاضر، اولین گزارش از کشت موفقیت آمیز میکروسپور های گندم در ایران است که طی آن روند تکوینی جنین زایی میکروسپورها نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. با بهینه سازی پاسخ به کشت میکروسپور و افزایش جنین زایی و باززایی گیاه، می توان از این تکنولوژی در راستای دستیابی سریع به هموزیگوسیتی و درنتیجه تسریع برنامه های به نژادی گندم، به خوبی استفاده نمود. از طرفی با انتقال ژن به مواد هاپلوییدی گندم می توان ژن(های) کنترل کننده صفات مطلوب زراعی (نظیر مقاومت به آفات یا بیماریها، مقاومت به علف‌کش‌ها و غیره) را نیز منتقل کرد و پس از دو برابر کردن کروموزوم‌ها، گیاهان تراریخت کاملاً هموزیگوت تولید کرد.

REFERENCES

1. Altpeter, F., V. Vasil, V. Srivastava, E. Stöger, & I. K. Vasil.1996. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. Plant Cell Reports. (16): 12-17.
2. Bruins, M. B. M., M. Rakoczy-Trojan, M. Waska, & C. H. A. Snijders. 1996. Isolated microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.), the effect of co-culture of wheat or barley ovaries on embryogenesis. Cereal Research Communications.(24):401-109.
3. Cistue L., K.J. Kasha. 2005.Gametic Embryogenesis in Triticum : a study of some critical factors in haploid (Microspore) embryogenesis. Pp.321-342. in: A.Mujib, J. Samaj (eds): Somatic Embryogenesis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
4. Dormann, M.1999. Genetic transformation of embryogenic microspores. Agro Evo Oilseed Research Center. Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
5. Dormann, M., H. M. Wang & M. Oelck. (2001). Transformed embryogenic microspores for the generation of fertile homozygous plants. United States Patent, Patent No.: US 6,316,694 B1.
6. Gustafson, V.D., P. S. Baenzigerm, M. S. Wright, W.W. Stroup & Y. Yen.1995. Isolated wheat microspore culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 42: 207-213.
7. Hu, T. & K.J. Kasha.1999. A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. Genome. 42(3): 432-441.
8. Hu, T. & K.J. Kasha.1997. Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. Plant Cell Reports. (16): 520–525.
9. Hu T.C., A. Ziauddin, E. Simion, K.J. Kasha.1995. Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) in a defined media. I. Effects of pretreatment, isolation methods, and hormones. In Vitro Cell Dev. Biol. (31):79–83
10. Indrianto A., I. Barinova, A. Touraev & E. Herberle-Bors. 2001. Tracking individual wheat microspore *in vitro*: identification of embryogenesis microspores and body axis formation in the embryo. Planta.(212):163-174.

www.SID.ir

Archive of SID

18. Reynolds, T.L.1997. Pollen embryogenesis. Plant Molecular Biology. 33(1): 1-10.
19. Shugar, L.1998. Application of doubled-haploid systems. Hyland seeds, W.G. Thomson and Sons Limited-Narin, Ontario, Canada.
20. Touraev, A., A. Indrianto, I. Wratschko, O. Vicente, & E. Heberle-Bors. 1996. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. Sexual Plant Reproduction. 9(4): 209-215.
21. Touraev, A., O. Vicente, & E. Herberle-Bors. 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. Trends in Plant Science Reviews. 2(8): 297-302.
22. Zheng, M.Y., W. Liu, Y. Weng, E. Polle, & C. F. Konzak. 2001. Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores treated with inducer chemicals. Plant Cell Reports. (20): 685–690.
23. Zheng, M.Y., Y. Weng, W. Liu, & C. F. Konzak. 2001.The effect of ovary-conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Reports. (20): 802–807.
24. Zhou, H., & C.F. Konzak.1997. Influence of genetic and environmental factors on anther culture response of wheat. Journal of Applied Genetics. 38(4): 393-406.

www.SID.ir