

بررسی تولید گیاهان هاپلوئید پیازهای خوراکی بومی ایران (*Allium cepa* L.)
به روش ماده‌زایی در محیط درون شیشه‌ای*

Study of Haploid Production in Iranian Oninos (*Allium cepa* L.)

Via *in vitro* Gynogenesis

محمد رضا حسندخت، عبدالکریم کاشی، برونو کامپیون و رضا بزرگی پور

دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۷۹/۴/۹

چکیده

حسندخت، م. ر.، کاشی، ع.، کامپیون، ب. و بزرگی پور، ر. ۱۳۷۹. بررسی تولید گیاهان هاپلوئید پیازهای خوراکی بومی ایران (*Allium cepa* L.) به روش ماده‌زایی در محیط درون شیشه‌ای. نهال و بذر ۱۶: ۳۱۲-۳۰۰.

ارقام پیاز خوراکی (*Allium cepa* L.) ایرانی دارای صفات مطلوب فراوانی هستند، اما عملکرد برخی از آن‌ها نسبت به ارقام هیبرید خارجی کمتر است، بنابراین تهیه هیبرید F_1 از آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد. به روش‌های مختلفی می‌توان لاین خالص تهیه کرد. تولید لاین خالص به روش سنتی وقت‌گیر و پرهزینه است، در صورتیکه با روش ماده‌زایی در محیط درون شیشه‌ای در مدت کوتاه‌تری می‌توان به لاین‌های خالص دست یافت. به منظور بررسی عکس‌العمل توده‌های بومی ایران به روش ماده‌زایی در محیط درون شیشه‌ای، آزمایشی روی شش توده ایرانی قرمز آذرشهر، سفید کاشان، سفید کمره خمین، سفید قم، دُرچه اصفهان و قولی قصه زنجان و دو رقم ایتالیایی بورتانا (Boretana) و ک ال آر (KLR) در دو محیط کشت JAF و F_6 انجام شد. نتایج نشان داد که محیط‌های کشت مورد استفاده بر درصد تولید جنین، درصد گل‌های تشکیل دهنده کالوس و درصد گل‌های شیشه‌ای شده اثر معنی‌داری داشته و همچنین اثر متقابل معنی‌داری بین محیط کشت و توده‌های پیاز وجود داشت. محیط کشت F_6 در مقایسه با JAF دارای درصد جنین و گل‌های تشکیل دهنده کالوس بیشتر و گل‌های شیشه‌ای شده کمتر بود. بیشترین درصد جنین در توده قولی قصه زنجان و کمترین آن در سفید کمره خمین به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: پیاز خوراکی، ماده‌زایی، هاپلوئید.

* قسمتی از رساله دکتری نگارنده اول.

مقدمه

پياز خوراکی (2n=16) یکی از سبزی‌های مهم خانواده آلیاسه (Alliaceae) است. فلات ایران به عنوان بخشی از آسیای مرکزی محل پیدایش و اهلی شدن پیاز خوراکی است (Raymond, 1999; Brewster, 1994). در ایران هم‌اکنون بیش از بیست توده پیاز بومی توسط کشاورزان کاشته می‌شود که برخی از آن‌ها دارای صفات مطلوبی مانند مقاومت به تریس (Lewis, 1997) خاصیت انباری طولانی و شکل و رنگ بازارپسند می‌باشند. بیشتر ارقام محلی پیاز ایرانی با این که دارای صفات کیفی مطلوبی می‌باشند، ولی در مقایسه با ارقام هیبرید خارجی از عملکرد کمتری برخوردارند. بنابراین تهیه هیبریدهایی با صفات مطلوب و عملکرد قابل قبول ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به دگرگرفته‌افشانی به لحاظ پروتاندري (حالتی که اندام نر زودتر از اندام ماده می‌رسد) خالص‌سازی آن‌ها از طریق گیاهان هاپلوئید راه را برای دستیابی به سایر هدف‌های به‌نژادی و تولید سریع‌تر هیبرید F_1 هموار می‌سازد، همچنین گیاهان هاپلوئید می‌توانند در مطالعه جهش‌ها و ایجاد تغییرات سماتیکی مورد استفاده قرار گیرند (Keller, 1990). تولید هاپلوئید و سپس دوبرابر کردن کروموزوم‌های آن به ایجاد دابلدهاپلوئید می‌انجامد که سریع‌ترین روش دستیابی به اینتریدینگ کامل در طی یک مرحله است (ارزانی، ۱۳۷۵). علیرغم تلاش‌های فراوان در کشت بساک پیاز، این‌گونه هیچ‌عکس‌العملی به نرزیایی (Androgenesis) نشان نداده است. کامپیون و همکاران (Campion *et al.*, 1984) تنها تقسیم هسته را در بساک‌های کاشته شده مشاهده کردند ولی نتایج بیشتری به دست نیاوردند. گوها و جوهری (Guha and Johri, 1966) تلاش‌هایی برای کشت تخمدان‌های پیاز انجام دادند. آن‌ها تشکیل بذر و گیاهچه را تنها در کشت تخمدان‌ها و تخمک‌های گرده‌افشانی شده مشاهده کردند. در طی دهه اخیر استفاده از ماده‌زایی برای تولید گیاه هاپلوئید پیاز معمول شـد (1989; Campion and Azzimonti, 1988; Campion and Alloni, 1990; Muren, Keller, 1990). هم‌اکنون روش القاء گیاهان هاپلوئید پیاز از کشت تخمدان‌های گرده‌افشانی نشده و گل کامل در محیط درون‌شیشه‌ای پیشرفت‌های زیادی کرده است و به طور موفقیت‌آمیزی توسط شرکت‌های تولید بذر مورد استفاده قرار می‌گیرد. به روش‌های مختلف از جمله کشت تخمک (Campion and Alloni, 1990)، کشت تخمدان و گل کامل (Keller, 1990) می‌توان گیاه هاپلوئید پیاز تولید کرد، اما کشت جوانه گل نسبت به کشت تخمدان و تخمک نه تنها تعداد جنین بیشتری تولید می‌کند، بلکه نیازمند نیروی کار کمتری می‌باشد (Campion *et al.*, 1992). آزمایش‌های انجام شده نشان داد که ژنوتیپ یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در واکنش به روش ماده‌زایی در محیط درون‌شیشه‌ای است (Muren, 1989). جوفریا و همکاران (Geoffriau *et al.*, 1997)، بوهانک و یاکسی (Bohane and Jakse, 1999) عکس‌العمل مواد ژنتیکی متعلق به مناطق

پياز خوراکی (2n=16) یکی از سبزی‌های مهم خانواده آلیاسه (Alliaceae) است. فلات ایران به عنوان بخشی از آسیای مرکزی محل پیدایش و اهلی شدن پیاز خوراکی است (Raymond, 1999; Brewster, 1994). در ایران هم‌اکنون بیش از بیست توده پیاز بومی توسط کشاورزان کاشته می‌شود که برخی از آن‌ها دارای صفات مطلوبی مانند مقاومت به تریس (Lewis, 1997) خاصیت انباری طولانی و شکل و رنگ بازارپسند می‌باشند. بیشتر ارقام محلی پیاز ایرانی با این که دارای صفات کیفی مطلوبی می‌باشند، ولی در مقایسه با ارقام هیبرید خارجی از عملکرد کمتری برخوردارند. بنابراین تهیه هیبریدهایی با صفات مطلوب و عملکرد قابل قبول ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به دگرگرفته‌افشانی به لحاظ پروتاندري (حالتی که اندام نر زودتر از اندام ماده می‌رسد) خالص‌سازی آن‌ها از طریق گیاهان هاپلوئید راه را برای دستیابی به سایر هدف‌های به‌نژادی و تولید سریع‌تر هیبرید F_1 هموار می‌سازد، همچنین گیاهان هاپلوئید می‌توانند در مطالعه جهش‌ها و ایجاد تغییرات سماتیکی مورد استفاده قرار گیرند (Keller, 1990). تولید هاپلوئید و سپس دوبرابر کردن کروموزوم‌های آن به ایجاد دابلدهاپلوئید می‌انجامد که سریع‌ترین روش دستیابی به اینتریدینگ کامل در طی یک مرحله است (ارزانی، ۱۳۷۵). علیرغم تلاش‌های فراوان در کشت بساک پیاز، این‌گونه هیچ‌عکس‌العملی به نرزیایی (Androgenesis) نشان نداده است. کامپیون و همکاران

و بزرگترین گل‌ها به دو دسته مساوی تقسیم و روی محیط‌های کشت القاء جنین F_6 و JAF (جدول ۱) توصیه شده توسط کامپیون و همکاران (Campion *et al.*, 1995) قرار داده شدند. هر دو محیط کشت به شکل مایع با غلظت دو برابر تهیه ($pH = 5.9$) و پس از استریل کردن با فیلتر (۰/۲۲ میکرومتر) به مخلوط آگار و آب که قبلاً به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۱۹ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شده بود، افزوده شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل و طرح پایه کاملاً تصادفی شامل شش ژنوتیپ و دو محیط کشت بود. هر واحد آزمایشی شامل ۴۰۰ گل در دو تکرار بود. در هر تشتک پتری 90×15 میلی‌متر ۳۰ گل کاشته شد. گل‌های کاشته شده در محیط‌های کشت JAF و F_6 به محیط‌های کشت F_6 CY و M_6 (جدول ۱) منتقل و تا پایان آزمایش روی این محیط‌ها نگهداری شدند (Campion *et al.*, 1995). کشت‌ها در شرایط نوری ۱۶ ساعت با استفاده از لامپ‌های فلورسنت ($62 \mu EM^{-2} S^{-1}$) و دمای ۲۷/۲۳ (شب/روز) قرار داده شدند. صفات تعداد جنین، تعداد گیاه باززایی شده، تعداد گل تولیدکننده کالوس و تعداد گل شیشه‌ای شده در هر ۱۰۰ گل کاشته شده یادداشت برداری و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. سطح پلوئیدی گیاهان باززایی شده با رنگ آمیزی سلول‌های انتهایی ریشه و شمارش کروموزومی به روش فولگن تعیین شد (Campion and Alloni, 1990).

همچنین با استفاده از میکروسکوپ طول ده سلول نگهبان روزنه برگ به طور تصادفی اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها در محاسبات آماری

جغرافیایی مختلف امریکا، اروپا و ژاپن را به روش ماده‌زایی در محیط درون‌شیشه‌ای مورد آزمایش قرار دادند و هر دو گروه نتیجه گرفتند که ارقام آمریکایی نسبت به اروپایی و ژاپنی درصد جنین بیشتری تولید می‌کنند. با توجه به این که پیازهای خوراکی بومی ایران از نظر واکنش به روش ماده‌زایی در محیط درون‌شیشه‌ای ناشناخته‌اند، آزمایشی با دو محیط کشت با استفاده از شش توده بومی پیاز انجام شد. هدف مطالعه حاضر ارزیابی واکنش توده‌های بومی به روش تولید هابلوئید در محیط درون‌شیشه‌ای و تولید لاین‌های خالص مورد استفاده برای برنامه‌های به‌نژادی پیاز بود.

مواد و روش‌ها

در این بررسی شش توده پیاز ایرانی به اسامی قرمز آذرشهر، سفید کاشان، سفید کمره خمین، سفید قم، درچه اصفهان و قولی قصه زنجان و دو رقم ایتالیایی بورتانا (Borettana) و ک ال آر (KLR) مورد استفاده قرار گرفت. برای اجرای آزمایش ابتدا تعداد بیست پیاز از هر توده انتخاب و پس از ضدعفونی با متیل تیوفانات (با نام تجاری توپسین‌ام) در گلخانه بدون سیستم گرمایی از آذرماه ۱۳۷۷ کاشته و تا خرداد ماه ۱۳۷۸ در گلخانه نگهداری شدند. پس از گل‌دهی و در مرحله نزدیک به شکوفایی گل‌ها، چترهای گل جمع‌آوری و به مدت ۱۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱٪ ضدعفونی و سه بار با آب مقطر که به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۱۹ درجه سانتی‌گراد و فشار ۰/۹ اتمسفر استریل شده بود، شستشو شدند. گل‌ها در محیط استریل از چتر جدا

جدول ۱ - ترکیب محیط‌های کشت مورد استفاده در آزمایش

Table 1. Composition of media used in the experiment

ترکیب Composition	محیط‌های کشت الفاء جنین Embryo Induction Media				محیط کشت باززایی گیاه Plant Regeneratioin Medium(M ₄)	محیط کشت ریز ازدیادی Micropropagation Medium(M ₃)
	F ₆	M ₆	JAF	F ₆ CY		
Macroelements ماکروالمان‌ها						
BDS	+	-	+	+	+	+
MS	-	+	-	-	-	-
Microelements میکروالمان‌ها						
B5	+	-	+	+	+	+
MS		+				
Vitamines ویتامین‌ها						
Thiamine-HCL (mg-l) تیامین	2	2	2	2	2	2
Pyridixine (") پیریدوکسین	1	1	1	1	1	1
Nicotinic acid (") اسید نیکوتینیک	1	1	1	1	1	1
Calcium panthtenate(") پانتوتات کلسیم	1	1	1	1	1	1
Myo-inosifol (") میواینوزیتول	500	500	500	500	500	500
Growth regulators مواد تنظیم کننده رشد گیاهی						
2, 4-D (mg-l) نوفریدی	2	-	-	-	-	-
Benzyl adenine (") بنزیل آدنین	2	-	-	-	-	-
Ancymidol (") آنسیمیدول	-	-	-	0.5	-	-
2, 3, 5 triiodobenzoic acid ۲ و ۳ و ۵ تری بدوینزوتیک اسید")	-	-	0.1	-	-	-
Indol acetic acid (") اسید اندول استیک	-	-	-	5	-	-
2, isopentil adenine (") ایزوپنتیل آدنین	-	-	-	-	5	-
Naphtaliene acetic acid (") اسید نفتالین استیک	-	-	-	-	-	0.3
Carbohydrates قندها						
Sucrose (grl-l) ساکارز	100	-	100		40	40
Glucose (") گلوکز	-	50	-	-	-	-
pH	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9

بدون تنظیم‌کننده رشد می‌باشد (Campion et al., 1995) کاشته شدند (جدول ۱) و در شرایط نوری ($34 \mu\text{Em}^{-2}\text{S}^{-1}$) و درجه حرارت قبلی قرار داده شدند تا به گیاه کامل تکامل یابند (شکل ۲). یادداشت‌برداری‌ها در تخمدان‌های ژنوتیپ‌های مورد آزمایش نشان داد که القاء جنین‌ها پس از ۶۱ تا ۱۰۰ روز کشت روی محیط کشت‌های القاء جنین به طول می‌انجامد. پیاز قوی قصه زنجان با بیشترین درصد تولید جنین، اولین جنین را ۲۶۹ روز پس از کشت تولید کرد. منشاء ماده‌زایی جنین‌ها وقتی تأیید شد که آن‌ها هنوز تا حدودی با باقیمانده تخمک پوش (Integument) پیچیده شده بودند. در برخی موارد این پوشش‌ها مانند پوشش بندرهای کاملاً تکامل یافته از تخمک‌های گرده‌افشانی شده سیاه بودند. نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که محیط کشت‌های مورد استفاده بر روی درصد تولید جنین، درصد گل‌های تشکیل‌دهنده کالوس و درصد گل‌های شیشه‌ای شده به ترتیب در سطح ۵ درصد و ۱ درصد اثر معنی‌دار داشتند. محیط کشت القایی F_6 دارای دو میلی‌گرم 2, 4-D و دو میلی‌گرم BA و ساکارز بود، در حالی که محیط کشت القایی JAF دارای ۵/۰ میلی‌گرم ۲، ۳، ۵- تری‌یدوبنزویک اسید (TIBA) و گلوکز بود. تأثیر مثبت 2, 4-D و BA بر جنین‌زایی پیاز توسط مورن (Muren, 1989)، کامپیون و همکاران (Campion et al., 1992, 1995)، جوهاز و مارتینوویچ (Juhász and Martinovich, 1995) و مارتینز و همکاران (Martinez et al., 1997)

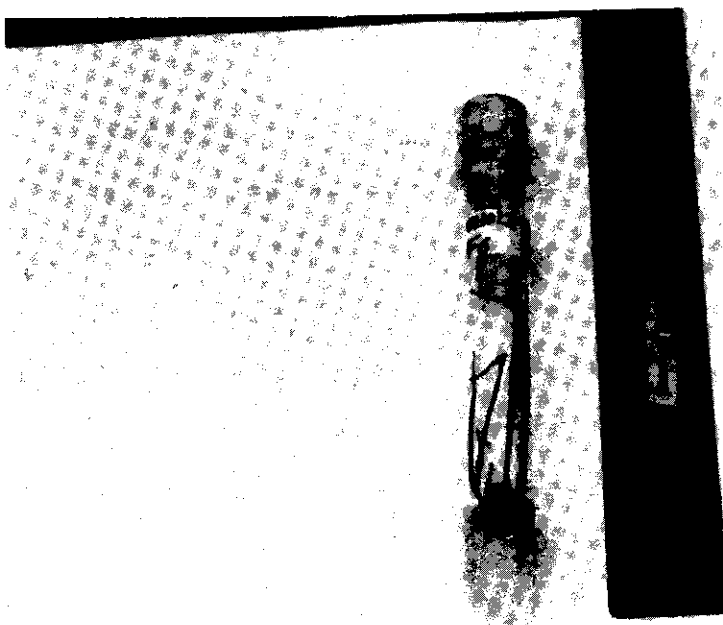
منظور شد. وقتی گیاهان هاپلوئید در محیط درون شیشه‌ای تولید پیاز کوچک کردند، پیازها در محیط استریل به دو نیمه تقسیم و به مدت ۷۲ ساعت با ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کلشیسین در محیط کشت M_3 (جدول ۱) در تاریکی تیمار و پس از طی این مدت ریز نمونه‌ها با آب مقطر استریل شستشو (Campion et al., 1995) و ریزازدیادی در محیط کشت M_3 صورت گرفت (Kahane et al., 1992). هر ۲۵ روز یک بار عمل جدا کردن گیاهچه‌های تکثیر شده و کاشت روی محیط کشت تازه M_4 (جدول ۱) انجام شد. گیاهان دابلدهاپلوئید ریشه‌دار به خاک منتقل و در گلخانه با دمای ۱۷ درجه سانتی‌گراد و نور طبیعی قرار داده شدند تا پس از سازگاری با شرایط محیطی به مزرعه منتقل شوند.

نتایج و بحث

گل‌های کاشته شده در محیط کشت بعد از یک یا دو روز باز و کلاله آن‌ها طویل شد. ۵-۶ روز بعد بساک‌ها دژنره و بعد از ۱۰ روز میکروسپورها از بین رفتند. تخمدان‌ها رشد کاملاً متفاوتی داشتند و در روز سوم بعد از کاشت شروع به طویل شدن کردند و تا ۲۵ روز بعد از کشت این عمل ادامه یافت. به منظور حذف مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی گل‌ها به محیط کشت‌های M_6 و F_6 CY (جدول ۱) منتقل شدند (Campion et al., 1995). جنین‌های خارج شده از گل (شکل ۱) در شرایط استریل از تخمک جدا و روی محیط کشت M_4 که



شکل ۱ - جنین ماده‌زای پیاز تشکیل شده در محیط کشت M_6
Fig. 1. Gynogenic embryo of onion formed on M_6 medium



شکل ۲ - گیاه هاپلوئید پیاز باززایی شده در محیط کشت M_4
Fig. 2. Regenerated haploid plant of onion on M_4 medium

دارای آب زیاد است. چنین وضعیتی در محیط‌های کشت جامد که غلظت آگار آن کم باشد، نیز مشاهده می‌شود (باقری، ۱۳۷۶). بین توده‌ها از نظر درصد تولید جنین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، اما از نظر گل‌های، تشکیل دهنده کالوس و گل‌های شیشه‌ای شده با هم اختلاف معنی‌دار داشتند. اثر متقابل محیط کشت و توده از نظر درصد تولید جنین، درصد گل‌های تشکیل دهنده کالوس و درصد گل‌های شیشه‌ای شده معنی‌دار بود (جدول ۳). محیط کشت F_6 نسبت به JAF دارای درصد جنین و کالوس بیشتر بود (شکل‌های ۳ و ۴). همچنین درصد گل‌های شیشه‌ای شده در محیط کشت F_6 کمتر از JAF بود. این نتایج با تحقیقات انجام شده توسط کامپیون و همکاران (Capmion *et al.*, 1995) و آلونی (Campoin and Alloni, 1990) مطابقت داشت. با توجه به نتایج فوق محیط کشت F_6 می‌تواند به عنوان محیط کشت مناسب برای تولید گیاهان هاپلوئید در پیازهای خوراکی بومی ایران معرفی

جوفریا و همکاران (۱۹۹۷) و بوهانک و یاکسی (Bohanec and Jakse, 1995, 1999) گزارش شده است. چون 2, 4-D در برخی گیاهان باعث جلوگیری از حرکت اکسین‌های طبیعی می‌شود (Katekar and Geissler, 1980) و به نظر می‌رسد که جنین‌زایی پیاز در اثر تجمع اکسین‌های طبیعی در گل صورت می‌گیرد (کامپیون، منتشر نشده)، بنابراین تصور شد که استفاده از مواد ممانعت‌کننده از حرکت قطبی اکسین بتواند موجب افزایش جنین‌زایی شود، اما کاربرد ۲، ۳، ۵- تری‌یدوبنزویبیک اسید که بدین منظور استفاده شد نتوانست منجر به افزایش درصد جنین‌زایی شود، ولی باعث افزایش درصد باززایی گیاه گردید. همچنین استفاده از آنسیمیدول از گروه پرمیدین‌ها (بازدارنده سنتز ژیرلین)، IAA و 2iP در محیط کشت F_6 CY تأثیری در افزایش جنین‌زایی نداشت. گل‌های شیشه‌ای شده به علت آب‌گیری زیاد به صورت نیمه شفاف دیده شدند. این حالت زمانی اتفاق می‌افتد که محیط کشت

جدول ۲ - نتایج تجزیه واریانس جنین‌زایی، کالوس‌زایی و شیشه‌ای شدن گل‌ها

Table 2. Analysis of variance of embryogenesis, callus formation and hyperhydration

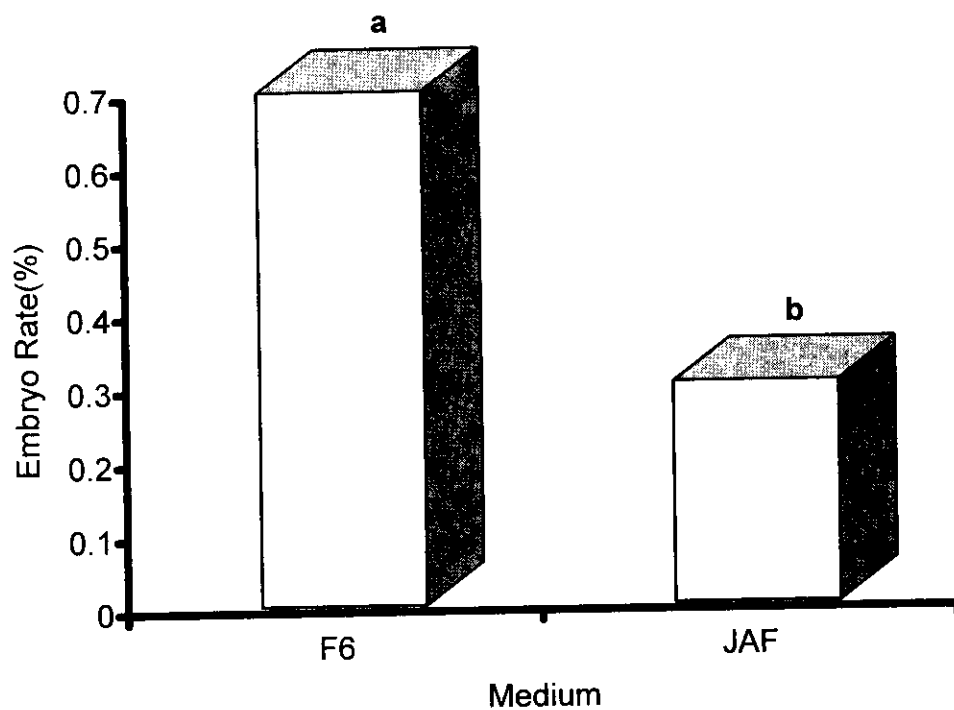
S.O.V.	منابع تغییرات	df	میانگین مربعات MS		
			Embryo جنین (%) rate (%)	Callus تشکیل کالوس (%) formation (%)	Hyperhydrated گل‌های شیشه شده (%) flowers (%)
Replication	تکرار	1	0.339 ^{ns}	0.059 ^{ns}	0.016 ^{ns}
Medium (Med)	محیط کشت	1	0.813*	38.072**	2.556**
Population (Pop.)	توده	5	0.256 ^{ns}	2.411**	4.784**
Pop. x Med.	توده x محیط کشت	5	0.476*	1.103**	0.998**
Error	اشتباه آزمایشی	11	0.107	0.115	0.093

ns = Non significant.

ns = عدم اختلاف معنی‌دار.

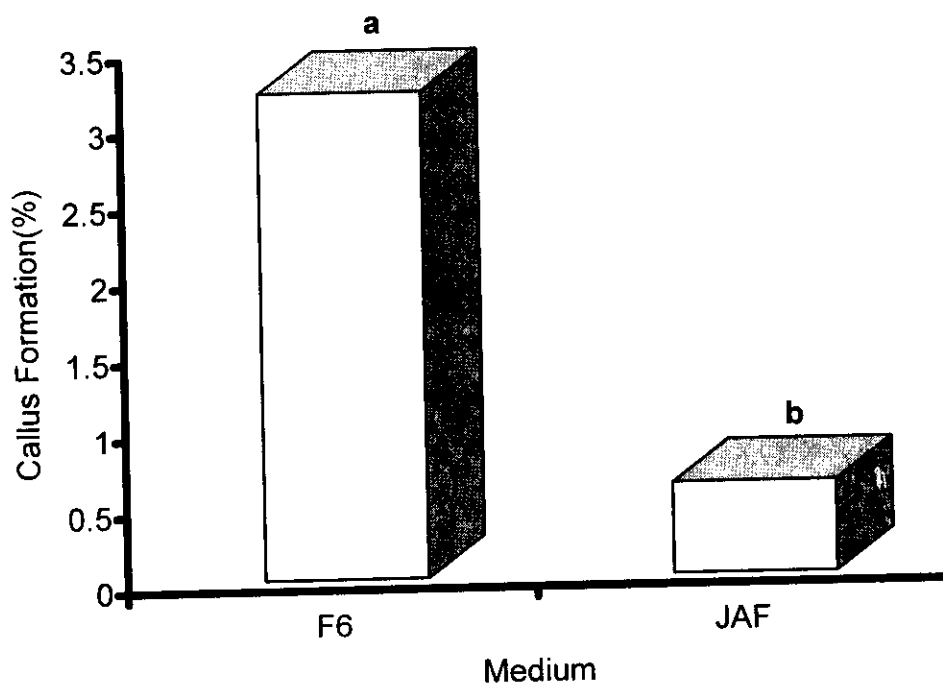
* and ** = Significant at 5% and 1% levels respectively.

*، ** - اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ و ۱٪.



شکل ۳- اثر محیط کشت بر درصد جنین‌زایی

Fig. 3. Effect of medium on embryo production percentage



شکل ۴- اثر محیط کشت بر درصد کالوس‌زایی

Fig. 4. Effect of medium on percentage of callus formation

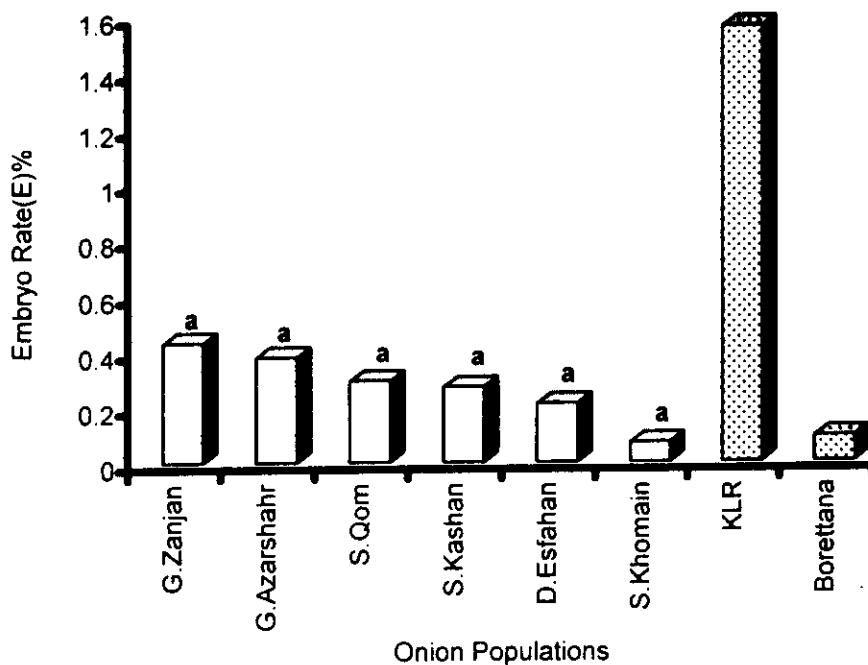
جدول ۳- اثر متقابل محیط کشت و رقم از نظر جنین زایی، کالوس زایی و شیشه‌ای شدن گل‌ها

Table 3. Interaction between medium and cultivar on embryogenesis, callus formation and hyperhydration

Medium x Cultivar	محیط کشت x رقم	درصد تولید	درصد تشکیل	درصد گل‌های
		جنین	کالوس	شیشه‌ای شده
		Embryo rate (%)	Callus formation (%)	Hyperhydrated flowers (%)
Ghermez-e-Azarshahr x F ₆	F ₆ x قرمز آذرشهر	0.409 bc	2.505 c	1.374 e
Gholighesh-e-Zanjan x F ₆	F ₆ x فولی قسه زنجان	0.813 b	2.017 cd	2.737 bc
Sefid-e-Qom x F ₆	F ₆ x سفید قم	0.347 bc	4.007 b	0.000 f
Dorcheh-e-Esfahan x F ₆	F ₆ x درجه اصفهان	0.374 bc	2.413 c	2.365 c
Borettana x F ₆	F ₆ x بورتانا	0.265 bc	2.397 c	2.365 c
KLR x F ₆	F ₆ x ک ال آر	1.708 a	4.939 a	1.609 de
Ghermez-e-Azarshahr x JAF	JAF x قرمز آذرشهر	0.639 bc	0.529 bc	3.140 b
Gholighesh-e-Zanjan x JAF	JAF x فولی قسه زنجان	0.442 bc	0.000 g	2.262 cd
Sefid-e-Qom x JAF	JAF x سفید قم	0.391 bc	0.000 g	0.391 f
Dorcheh-e-Esfahan x JAF	JAF x درجه اصفهان	0.265 bc	1.214 ef	1.411 e
Borettana x JAF	JAF x بورتانا	0.000 c	0.000 g	4.363 a
KLR x JAF	JAF x ک ال آر	0.000 c	1.421 de	1.613 d

تولید کردند و توده‌های قرمز آذرشهر، سفید قم، سفید کاشان و درجه اصفهان نتایج حد واسطی داشتند (شکل ۵). دو رقم ایتالیایی بورتانا و ک ال آر به ترتیب ۰/۰۹ و ۱/۵۶٪ جنین تولید کردند. درصد جنین به دست آمده در این تحقیق (۱/۵۶ - ۰/۰۷) کمتر از مقادیر گزارش شده توسط مورن (Muren, 1989)، کامپیون و همکاران (Campion et al., 1992, 1995)، جوفریا و همکاران (Geoffriau et al., 1997)، بوهانک و یاکسی (Bohance and Jakse, 1999)

شود. کمتر بودن درصد گل‌های شیشه‌ای شده در محیط F₆ سودمندی این محیط را دو چندان می‌کند. تنها درصد کمی از گل‌های کاشته شده (۴/۷٪) از ناحیه شهدان‌های کاسبرگ، کالوس تولید کردند. در این کالوس‌ها اندام‌زایی اتفاق افتاد و در بیشتر موارد گیاهچه کامل و پیاز تشکیل شد. گرچه پیازهای ایرانی از نظر درصد جنین تولید شده اختلاف آماری معنی‌داری با هم نشان ندادند، اما توده فولی قسه زنجان و سفید کمره خمین به ترتیب بیشترین (۴۳/۰٪) و کمترین (۰/۰۷٪) جنین



شکل ۵- مقایسه جنین‌زایی ارقام پیاز ایرانی و ایتالیایی

Fig. 5. Comparison of embryo rate in Iranian and Italian onions



شکل ۶- مرحله متافاز پیاز هاپلوئید

Fig. 6. Metaphase of haploid onion

درجه اصفهان، قولی قصه زنجان، قرمز آذرشهر و سفید کاشان نتایج حد واسطی داشتند. اثر محیط‌های کشت F_6 و JAF روی درصد جنین‌زایی متفاوت بود و اگر چه محیط کشت JAF دارای گلوکز به جای ساکارز بود، اما نسبت به محیط F_6 درصد جنین کمتری تولید کرد. ۲۴٪ جنین‌های کشت شده روی محیط کشت M_4 ، تنها تولید ریشه کردند و ۷۶٪ آن‌ها به گیاهچه کامل تبدیل شدند. سطح پلوئیدی گیاهان باززایی شده توسط آزمون سیتولوژیکی نشان داد که همه گیاهان تولید شده هاپلوئید ($n=8$) بودند (شکل ۶). اندازه‌گیری طول سلول‌های نگهبان روزنه به عنوان معیاری از سطح پلوئیدی نشان داد که طول سلول‌های نگهبان روزنه برگ گیاهان دیپلوئید بیشتر از هاپلوئید بود. این نتایج با تحقیقات انجام شده توسط کین و روتینو (Qin and Rotino, 1995) مطابقت دارد. منشاء گیاهچه‌های هاپلوئید ماده‌ها در پیاز هنوز ناشناخته است. تیان و یانگ (Tian and Yang, 1989) گزارش کردند که جنین‌های ماده‌ها در *Allium tuberosum* از قرینه‌ها منشاء می‌گیرند. تقریباً همه سلول‌های هاپلوئید کیسه جنینی ممکن است مسئول آغازش گیاهان هاپلوئید ماده‌ها باشند.

بود. بوهانک و یاکسی (۱۹۹۹) نشان دادند که گیاهان مادری در دو سال متوالی درصد جنین مشابهی تولید می‌کنند در حالی که جو فریا و همکاران (۱۹۹۷) تنوع زیادی را در مواد ژنتیکی مشابه در سال‌های متوالی مشاهده کردند. آن‌ها با آزمایش روی گیاهان مادری مشابه تغییراتی بین ۹-۱۷٪ را در سه سال متوالی گزارش کردند. بنابراین ممکن است پتانسیل توده‌های بومی ایران برای تولید جنین بیشتر از مقادیر گزارش شده در این تحقیق باشد. از نظر درصد گل‌های تشکیل‌دهنده کالوس و درصد گل‌های شیشه‌ای شده، پیازهای ایرانی اختلاف بسیار معنی‌داری با هم داشتند. پیاز سفید قم بیشترین درصد کالوس و کمترین درصد گل‌های شیشه‌ای شده را در محیط کشت F_6 تولید کرد. چون جنین‌زایی سوماتیک و استفاده از تنوع سوماکلونال هم اکنون کاربرد زیادی در ایجاد موتاسیون‌ها و گیاهان تراریخته دارند، بنابراین پیاز قم از این نظر نسبت به سایر توده‌ها از اهمیت بیشتری برخوردار است. قابلیت ریز ازدیادی پیاز سفید قم نیز در محیط کشت M_6 قابل توجه بود در حالی که پیاز سفید کمره خمین در این محیط کمترین واکنش را نشان داد و ارقام

References

- منابع مورد استفاده
 ارزانی، ا. ۱۳۷۵. دابل هاپلوئیدی و کارایی آن در اصلاح نباتات. مجموعه مقالات کلیدی چهارمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان، صفحه ۶۶-۳۹.
 باقری، ع. ر. ۱۳۷۶. مبانی کشت بافت‌های گیاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، شماره ۲۱۱، صفحه ۴۰۶.

Bohanec, R., and Jakse, M. 1999. Variation in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions. Plant Cell Report 18: 737-742.

- Brewster, J.L. 1994.** Onion and other vegetable alliums. CAB International Publication. P. 45.
- Campion, B., Falavigna, A., and Schiavi, M. 1984.** Efforts for *in vitro* androgenesis in onion (*Allium cepa* L.). Eucarpia 3th. Allium Symposium Wageningen, September 4- 6, 1984, P. 110.
- Campion, B., and Azzimonti, M.T. 1988.** Evaluation of ploidy level in haploid plants of onion (*Allium cepa* L.) obtained through *in vitro* gynogenesis. Eucarpia 4th. Allium Symposium Wellesbourne (UK), September 6-9, 1988, pp. 85-89.
- Campion, B., and Alloni, C. 1990.** Induction of haploid in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture 20: 1-6.
- Campion, B., Azzimonti, M.T., Vicini, E., Schiavi, M., and Falavigna, A. 1992.** Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis. Plant Science 86: 97-104.
- Campion, B., Perri, E., Azzimonti, M.T., Vicini, E., and Schiavi, M. 1995.** Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.) Plant Breeding 114: 243-246.
- Dunstan, D.I., and Short, K.C. 1977.** Improved growth of tissue cultures of the onion (*Allium cepa* L.). Physiol. Plant 41: 70-72.
- Geoffriau, E., Kahane, R., and Rancillac, M. 1997.** Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.). Euphytica 94: 37-44.
- Guha, S., and Johri, B.M. 1966.** *In vitro* development of ovary and ovule of onion (*Allium cepa* L.). Phytomorphology 16: 353-364.
- Juhasz, G.A., and Martinovich, L. 1995.** *In vitro* gynogenesis induction in Hungarian line of onion (*Allium cepa* L.). Bulletin of the vegetable crops research institute Kecskemet 27: 37-43.
- Kahane, R., Rancillac, M., and Teysseidier, B. 1992.** Long term multiplication of onion (*Allium cepa* L.) by cyclic shoot regeneration *in vitro*. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture 28: 281-288.
- Katekar, G.F., and Geissler, E. 1980.** Auxin transport inhibitors. Plant Physiology 66: 1190-1195.

- Keller, J. 1990.** Culture of unpollinated ovules, ovaries and flower bud in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion. *Euphytica* 47: 241-247.
- Lewis, T. 1997.** Thrips as Crop Pests. CAB International Publication. pp. 740.
- Martinez, L., Agüero, C., and Golmarini, C.R. 1997.** Obtention of haploid plants by ovaries and ovules culture in onion (*Allium cepa* L.). Proc 2th. In : Symposium Edible Alliaceae (ed.). J.L. Burda and C.R. Golmarini, Acta Hort. 433. ISHS 1997, pp. 447-453.
- Qin, X., and Rotino, G.L. 1995.** Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of *in vitro* grown androgenic pepper plants. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* 41: 145-146.
- Raymond, A.T.G. 1999.** Vegetable Seed Production. CAB International Publication, UK. p. 328.
- Tian, H.Q., and Yang, H.Y. 1989.** Haploid embryogeny and plant regeneration unpollinated ovary culture of *Allium tuberosum*. *Acta Biol. Exp. Sinica* 22: 139-147.

 آدرس نگارندگان:

محمدرضا حسندخت و عبدالکریم کاشی - گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.

پروین کامپیون - انستیتو تحقیقات سبزی و صیفی، میلان، ایتالیا.

رضا بزرگی پور - بخش تحقیقات ژنتیک و ذخایر توارثی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، صندوق پستی ۴۱۱۹، کرج ۳۱۵۸۵.