Archive of SID

"نهال و بذر"
جلد ۲۲ ، شماره ۳، سال ۱۳۸۵

تولید لاین‌های دابلد هاپلویید گندم با استفاده از روش کشت ساقه‌های بریده شده در تلاقی گندم و ذرت و ارزیابی برخی صفات زراعی

Production of Doubled Haploid Lines of Wheat Using Detached Tillering Method in Cross Between Wheat and Maize, and Evaluation of some Agronomic Characters

فرشاد بختیار، رضا بزرگی‌پور و سعید شهابی

مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

تاریخ دریافت: ۱۳۸٤/٤/۹

چکیده

بختیار، ف.، بزرگی‌پور، ر.، و شهابی، س. ۱۳۸۵. تولید لاین‌های دابلدهاپلوئید گندم با استفاده از روش کشت ساقه‌های بریده شده در تلاقی گندم و ذرت و ارزیابی برخی صفات زراعی. **نهال و بذر** ۲۲: ۳٦۷-۳۵۱.

در این تحقیق به منظور تولید لاین‌های دابلد هاپلویید گندم از روش حذف کروموزومی تلاقی گندم و ذرت استفاده شد. مواد گیاهی مورد استفاده شامل بذر هیبرید F1 گندم حاصل از تلاقی‌های زاگرس × کویر، زاگرس× بک کراس روشن زمستانه و زاگرس × Rsh2*10120 به همراه سه ژنوتیپ ذرت H1: KSC108 ، H3: KSC 301 و H7: SC 704 بود. دو روش تولید هاپلویید در گندم شامل روش معمول (A) و روش کشت ساقه‌های بریده شده (B) مورد مقایسه قرار گرفت و صفاتی همچون تعداد بذر تشکیل شده، تعداد جنین‌های به دست آمده و تعداد گیاهچه هاپلویید تولید شده مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع تعداد ۷۵ لاین دابلد هاپلویید تولید گردید. در ارزیابی‌های مزرعه‌ای ٦۰ لاین از لاین‌های دابلد هاپلویید تولید شده، صفاتی همچون تاریخ ظهور سنبله، ارتفاع بوته، تعداد دانه در سنبله و وزن هزاردانه مورد مطالعه قرار گرفتند که تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای بین لاین‌های دابلد هاپلویید از نظر صفات ذکر شده مشاهده شد. در نهایت تعداد ۱۵ لاین جهت انجام ارزیابی‌های بعدی انتخاب و در آزمایش‌های منطقه‌ای سازگاری و پایداری قرار داده شدند.

واژه‌های کلیدی: گندم ، دابلد هاپلویید، حذف کروموزومی، کشت ساقه‌های بریده شده.

این مقاله بر اساس نتایج به دست آمده از اجرای طرح تحقیقاتی شماره ۸۲۰۸۷-۱۲-۱۰۷ مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

واژه هاپلویید یک اصطلاح عمومی مورد استفاده به منظور مشخص کردن یک ارگانیسم با تعداد کروموزم‌های گامتی است (نصف تعداد طبیعی کروموزوم برای هر گونه). با توجه به این که گیاه هاپلویید از یک سلول گامتی کیسه جنینی ویا دانه گرده به وجود آمده است می‌توان آن را اسپروفیت مستقلی دانست که دارای تعداد کروموزوم‌هایی برابر با گامتوفیت خود می‌باشد (Jain ., 1996). هاپلوییدهایی که دقیقاً از یک گونه دیپلویید تولید گردیده‌اند منوپلویید نامیده می‌شوند. منوپلوییدها درمقایسه با هاپلوییدهای به دست آمده از گونه‌های پلی پلویید که دارای بیشتر از یک ژنوم بوده و پلی هاپلویید نامیده می‌شوند، دارای یک ژنوم ساده هستند(Kasha, 1974).

گیاه دابلد هاپلویید با دو برابر نمودن تعداد کروموزوم‌های یک گیاه هاپلویید به وجود می‌آید. در گونه‌های دیپلویید وآلوپلویید، دابلد هاپلوییدهای تولید شده برای تمام مکان‌های ژنی کاملاً هموزایگوت هستند، در صورتی که در گونه‌های آتوپلی پلویید دو برابر کردن تعداد کروموزم‌های یک دی هاپلویید معادل سه تا چهار نسل خود گشنی بوده وگیاه حاصله کاملاً هموزایگوت نخواهد بود. باید توجه داشت که اصطلاح دای هاپلویید برای دیپلوییدهای به دست آمده از یک آتوتتراپلویید با استفاده از روش هاپلوییدی به کار برده می‌شود و مساوی یک دابلد هاپلویید به دست آمده از یک گونه دیپلویید نمی‌باشد (Belling and Blakeslee, 1922).

تولید گیاهان هاپلویید در بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی گزارش شده است. اولین هاپلویید در گونه‌های گیاهان گلدار، توسط بلینگ و بلیکسلی(Belling and Blakeslee, 1922) در گیاه داتوره گزارش شد. اولین گیاه هاپلویید تولید شده در محیط مصنوعی از کشت بساک درگیاه توسط دو محقق هندی به دست آمد (Guha and Maheshwari, 1966). تولید گیاه هاپلویید با استفاده از روش حذف کروموزومی اولین باردر گیاه جو زراعی و از طریق تلاقی با گزارش شد (Kasha and Kao, 1970).

باروری در نتیجه تلاقی بین گندم هگزاپلویید و ذرت اولین بار توسط زنکتلر و نیتزشه (Zenkteler and Nitzsche, 1984) گزارش شد. آن‌ها ۳ الی ۹ روز بعد از گرده‌افشانی تولید جنین‌های کروی شکلی به قطر ۱۰- ۱۵ میکرومتر را گزارش کردند. تحقیقات در این زمینه ادامه یافت تا این که لوری و بنت (Laurie and Bennett, 1986) گزارش خود را در زمینه تولید هاپلویید از طریق تلاقی گندم و ذرت ارائه کردند. زانگ و همکاران (Zhang ., 1996) با مطالعه جنین‌زائی در تلاقی بین گندم و ذرت مشاهده نمودند که تولید جنین در این هیبریدها با جنین‌های حاصل از خود گشنی گیاه گندم

www.SID.ir

Archive of SID

متفاوت است.توسعه جنین در هیبریدهای فوق همزمان با تشکیل آندوسپرم نبود و در نتیجه هسته آندوسپرم آزادانه در کیسه جنینی باقی مانده و بدون آن که تا مرحله چند سلولی توسعه یابد پس از مدتی از بین می‌رفتند. سلول‌های متقاطر در تخمک‌های بارور حاصل از تلاقی گندم و ذرت همانند تخمک‌های خود تلقیح شده به سرعت از بین می‌روند. جنین‌های تشکیل شده در صورت باقی ماندن بر روی گیاه به علت عدم وجود مواد غذایی آندوسپرم از بین خواهند رفت، در نتیجه برای تولید هاپلویید در تلاقی گندم و ذرت باید از تکنیک نجات جنین استفاده کرد. تولید چند جنینی در این تلاقی‌ها می‌تواند به علت تقسیم جنین اولیه ویا تأثیر هورمون 2,4-D باشد (Zhang ., 1996).

روش حذف کروموزومی شامل هیبریداسیون بین گونه‌ای وبین جنسی است. کاشا (Kasha, 1974) این پدیده را به عنوان حذف ترجیحی و تدریجی کروموزوم‌های یک ژنوم خاص در نتیجه هر یک از دو روش کاهش سوماتیکی و یا تقسیم میتوزی سلول‌ها تعریف کرده است. روش حذف کروموزومی کاربرد موفقیت‌آمیزی در تولید هاپلویید جو از طریق تلاقی بین گونه‌ای با داشته است. فورشو و همکاران (Furusho ., 1991) تولید گیاهان هاپلویید جو را از طریق تلاقی جو با ذرت و جو با چاودار ایتالیایی گزارش کردند. ایناگاکی و همکاران (Inagaki ., 1991) میزان تولید هاپلویید در جو را با استفاده از تلاقی با ذرت و مقایسه کردند و دریافتند که میزان تولید هاپلویید جو در تلاقی با ذرت کمتراز تلاقی با است. برکلی (Barcly, 1975) تولید گندم هاپلویید را با استفاده از تلاقی رقم چاینیزاسپرینگ با گزارش کرد. بزرگی پور و اسنپ (Bozorgipour and Snape, 1990) تولید هاپلویید در ارقام گندم ایرانی را با استفاده از روش تلاقی گندم و مورد ارزیابی قرار دادند، در این آزمایش میزان تلاقی‌پذیری برای ارقام گندم ایرانی بسیار کم گزارش شد و در نتیجه استفاده از روش کشت پرچم و یا تلاقی گندم وذرت جهت تولید هاپلویید در ارقام گندم ایرانی پیشنهاد گردید. وجود ناسازگاری در تلاقی بین ارقام گندم با موجب محدودیت کاربرد این روش در اصلاح گندم گردیده است. تولید هاپلویید درگندم اغلب با استفاده از تلاقی با ذرت توسط لوری و بنت(Laurie and Bennett, 1986, 1988). سوئناگا و ناکاجیما (Suenaga and Nakajima, 1989) ماتزک و ماهن (Matzk and Mahn, 1994) و تلاقی با تئوسینت توسط یوشیاما (Ushiyama, 1991) و تلاقی با ارزن مرواریدی توسط ماتزک و ماهن (Matzk and Mahn, 1994) گزارش شده است. عموماً تلاقی بین گندم با ذرت و ارزن

www.SID.ir

Archive of SID

مرواریدی (Pearl millet) دارای بیشترین بازده جهت تولید هاپلوییید در گندم می‌باشد. به طور کلی در رابطه با کاربرد هاپلوییدها در تحقیقات گیاهی می‌توان مطالعات سیتولوژیکی، کشت سلولی، موتاسیون، مطالعات توارثی، مطالعات سیتوپلاسمی و مطالعات فیریولوژی گیاهی اشاره کرد (Kasha and Reinbergs, 1976).

با توجه به تعدد گیاهان زراعی و روش‌های مختلف تولید هاپلوییید در انتخاب روش هاپلوییدی توجه به نکاتی همچون، سازگار بودن روش هاپلوییدی مورد استفاده با اکثر ژنوتیپ‌های گیاه مورد نظر، دارا بودن ثبات ژنتیکی و طبیعی بودن گیاه دابلد هاپلوییید از نظر فنوتیپی و این که گیاهان دابلد هاپلوییدهای تولید شده می‌بایست نمونه‌ای تصادفی از گامت‌های والدین باشند، ضروری است. مزایای اصلی سیستم دابلد هاپلوییدی در مقایسه با سایر روش‌های کلاسیک به نژادی شامل، سرعت بخشیدن به برنامهٔ به‌نژادی و افزایش کارایی سلکسیون در طول برنامه می‌باشد (بزرگی‌پور، ۱۳۷۳).

یکی از کاربردهای نسبتاً جدید لاین‌های دابلدهاپلوییید استفاده از آن‌ها در تهیه نقشه‌های ژنتیکی است. در استراتژی‌های کاربردی به‌نژادی، کشف مشخصه‌های تشخیص‌دهنده نشانگرهای مارکرهای مولکولی (RFLP) مرتبط با فنوتیپ‌ها معمولاً نسبت به جایگاه اثر مستقیم ژن‌ها برای تظاهر صفات در سطح فنوتیپی کفایت می‌نماید. برای این قبیل وابستگی‌ها تفرق جمعیت‌های گیاهی یک پیش نیاز است. در جمعیت لاین‌های دابلد هاپلوییید تعیین هویت نمودن نشانگرها نسبت به اکثر اظهارات فنوتیپی که به طور استثنایی ناشی از هتروزیگوسیتی است مطمئن‌تر می‌باشد (Wenzel ., 1992).

یک ژن به نسبت ۱:۱ برای نشانگرهای مولکولی و فنوتیپی درسطح گیاهی تفرق می‌یابد. زمانی که لازم است صفات با توارث‌پذیری پلی‌ژنیک به صورت نقشه‌های QTL تبدیل شوند اهمیت این موضوع مشخص می‌شود. استفاده از دابلد هاپلوییدها برای تهیه نقشه ژنتیکی ژن‌های اصلی ویا QTL در اکثر گیاهان آغاز گردیده است. در تجزیه QTL، لاین‌های دابلد هاپلوییید مواد بسیار خوبی جهت تکرار حقیقی مطالعه خارج از محیط به منظور مشخص نمودن و جدا کردن اثر متقابل ژنوتیپ × محیط می‌باشند (Jain ., 1996). شرایط رشد و نمو گیاه گندم قبل از تلاقی در میزان بازده تولید هاپلوییید بسیار مهم می‌باشد. استفاده از روش تلاقی‌های دور به منظور تولید هاپلوییید در گندم نیازمند دانه گرده زنده در زمان تلاقی است، بنابراین زمان گل‌دهی گیاه گندم و گیاه گرده دهنده باید همزمان باشند. در نتیجه این روش تنها در فصل و مکانی که هم گندم و هم گیاه گرده دهنده رشد و نمو نمایند عملی است. کاربرد تکنیک‌های مناسب برای ذخیره کردن طولانی مدت دانه گرده و کشت ساقه‌های گندم پس از گرده‌افشانی تحت شرایط

www.SID.ir

Archive of SID

کنترل شده بسیار سودمند می‌باشند. تولید هاپلویید در گندم با استفاده از روش تلاقی‌های دور شامل دو مرحله متوالی تشکیل جنین‌های نارس حاصل از تلاقی و جوانه زدن گیاهچه‌های هاپلویید از جنین‌های نجات یافته می‌باشد. عواملی همچون مرحله توسعه گلچه‌های گندم مورد استفاده برای تلاقی و مراحل رشد و نمو کامل جنین‌های نجات یافته برای جوانه زدن گیاهان هاپلویید بسیار مهم می‌باشد. اصولاً انجام تلاقی در مرحله اولیه توسعه گلچه‌های گندم دارای بیشترین فراوانی تولید جنین است. تکنیک کشت مصنوعی ساقه‌های بریده شده گندم در طی تحقیقات فیزیولوژیکی که بر روی ورنالیزاسیون بذر نارس انجام گردید توسعه یافت. ترکیبات مهم محیط کشت عبارتند از ساکاروز ٤٠ گرم بر لیتر به عنوان ماده غذایی، H_2SO_3 (سولفوروز اسید) ٨ میلی‌لیتر بر لیتر به عنوان ممانعت کننده از آلودگی‌های قارچی محیط کشت مایع، 2,4-D ١٠٠ میلی‌گرم بر لیتر مورد نیاز جهت توسعه جنین‌های هاپلویید حاصل از تلاقی گندم و ذرت. کشت ساقه‌های بریده شده به طور وسیع در تولید هاپلویید گندم در تلاقی با ذرت در مرکز تحقیقات کشاورزی ژاپن (NARC) به کار برده می‌شود. به طور کلی فرایند تولید لاین‌های دابلد هاپلویید از زمان کشت گیاهان گندم تا مرحله برداشت دانه از لاین های دابلد هاپلویید ٩ ماه طول خواهد کشید. به هر حال باید توجه داشت که تولید با راندمان بالا نیازمند سهولت در کنترل مناسب شرایط محیطی است (Masanori, 1997).

با توجه به موارد فوق‌الذکر این تحقیق با هدف بررسی روش‌های تولید به منظور بهینه‌سازی و افزایش راندمان تولید لاین‌های دابلد هاپلویید گندم انجام گردیده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل بذر هیبرید F1 گندم با شجره‌های:

G1: Kavir/Zagros

G2: Hys//Drc*2/7c/3/2*Rsh/4/Zagros

G3: Rsh2*/10120//Zagros

به همراه سه ژنوتیپ ذرت به شرح زیر بود:

H1: KSC 108

H3: KSC 301

H7: SC 704

در این تحقیق از روش متداول در تولید لاین‌های دابلد هاپلویید (A) و روش کشت ساقه‌های بریده شده گندم (B) جهت تولید لاین‌های دابلد هاپلویید استفاده شد.

به منظور همزمان نمودن مرحله گرده‌دهی گیاهان ذرت با مرحله گل‌دهی گیاهان گندم، بذرهای ذرت ٤٥ روز زودتر از بذر گندم کاشته شدند (در هرتاریخ کاشت با فاصله زمانی ١٥ روز تعداد ٥ عدد بذر از هر رقم در تشتک پتری کاشته شد و در فیتوترون با دمای٢٥ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی نگهداری گردید). پس از

www.SID.ir

Archive of SID

تولید جوانه گیاهچه‌ها به گلدان‌های پلاستیکی با قطر۲۲ سانتی‌متر که حاوی مخلوطی از خاک برگ؛ ماسه و خاک مزرعه به نسبت ۱:۱:۲ بود منتقل شدند. گیاهچه‌های حاصل در گلخانه در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد ودوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و۸ ساعت تاریکی تا مرحله تولید گل آذین نر وگرده دهی نگهداری گردیدند. به منظور رشد و نمو بهتر گیاهان ذرت پس از مرحله ۵-٦ برگی هر ۱۵ روز یک بار مقداری کود اوره به گلدان‌ها اضافه گردید.

برای کاشت بذر گندم در هر تاریخ کاشت با فاصله زمانی ۲۰ روز تعداد ۲۵ عدد بذر گندم پس از ضدعفونی در تشتک پتری کاشته شدند و سپس به منظور شکسته شدن خواب بذرها و یکنواخت شدن جوانه‌زنی،یک روز بعد از کاشت به مدت ٤۸ ساعت در دمای٤+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس به فیتوترون با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردید. پس از تولید جوانه، گیاهچه‌های گندم به گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱٤ سانتی‌متر که حاوی مخلوطی از خاک برگ، ماسه و خاک مزرعه به نسبت ۱:۱:۲ بود منتقل و در گلخانه با شرایط دمایی ۲۰ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و۸ ساعت تاریکی تا مرحله تولید سنبله و انجام سایر مراحل آزمایش نگهداری شدند.

در روش معمول (A) پس از خروج دو سوم سنبله گندم از غلاف برگ پرچم، نسبت به عقیم کردن سنبله‌های گندم اقدام شد. برای این منظور پس از حذف گلچه‌های وسط و بریدن دوسوم بالایی لما و پالئا، سه پرچم موجود در هر گلچه به وسیله پنس خارج گردید. بعد از ۲٤ ساعت، دانه‌های تازه گرده ذرت که با استفاده از یک تکه فویل آلومینیومی جمع‌آوری شده بودند به وسیله قلم مو به کلاله گندم منتقل شدند. در این روش ۲٤ ساعت بعد از گرده‌افشانی هورمون 2,4-D با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در داخل ساقه (به آخرین میانگره) و هم در داخل گلچه‌های گرده‌افشانی شده تزریق گردید.

در روش ساقه‌های بریده شده (B) پس از خروج دوسوم سنبله گندم از غلاف برگ پرچم، ساقه‌های گندم از نزدیکی سطح خاک بریده شده و در بشر حاوی آب با دمای محیط قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه سنبله‌های گندم را به مدت ۳ دقیقه در آب گرم با دمای ٤۳ درجه سانتی‌گراد قرار داده، سپس ساقه‌های گندم به بشر حاوی آب با دمای محیط منتقل گردیدند و با استفاده از یک پاکت پلی‌اتیلن سنبله‌ها پوشانده شدند. بعد از ۲٤ ساعت، دانه‌های تازه گرده ذرت که با استفاده از یک تکه فویل آلومینیومی جمع‌آوری گردیده بودند به وسیله قلم مو به کلاله گندم منتقل شدند. در این روش بعد از گرده‌افشانی ساقه‌های بریده شده گندم را به مدت ٤۸ ساعت درون محیط کشت مایع حاوی هورمون 2,4-D با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر قرار داده، سپس ساقه‌ها به محیط کشت مایع بدون هورمون انتقال

www.SID.ir

Archive of SID

داده شدند و به مدت ۱۶-۱۴ روز در فیتوترون با دمای ۲۲/۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، با رطوبت ۶۰ تا ۶۵ درصد نگهداری شدند.

به علت عدم وقوع لقاح مضاعف در کیسه جنینی، بذر تولید شده فاقد مواد ذخیره‌ای (آندوسپرم) است. لذا به منظور تأمین نیازهای غذای جنین هاپلویید تولید شده و ایجاد شرایط مناسب برای رشد و نمو جنین و تبدیل آن به گیاهچه هاپلویید ۱۶روز بعد از گرده‌افشانی با استفاده از تکنیک نجات جنین، جنین‌های هاپلویید به محیط کشت MS منتقل و در فیتوترون با شرایط تاریکی و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

پس از یک الی دو هفته، زمانی که طول ساقه‌چه به حدود ۱ الی ۱/۵ سانتی‌متر رسید، گیاهچه‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند تا با جذب نور و انجام فعالیت‌های فتوسنتزی شروع به رشد نمایند.

با گذشت یک ماه (زمانی که گیاهچه‌ها حداقل سه برگی شده و دارای سیستم ریشه‌ای کامل و قوی می‌باشند) نسبت به انتقال گیاهچه‌های هاپلویید از محیط درون شیشه‌ای به خاک اقدام گردید. سپس در مرحله پنجه‌دهی گیاهچه‌های هاپلویید به منظور دو برابر نمودن تعداد کروموزم‌ها تحت تأثیر کلشسین با غلظت ۰۵/ ۰٪ قرار گرفتند.

به منظور انجام برخی ارزیابی‌های اولیه در سال زراعی ۸۳-۱۳۸۲ نسبت به کاشت لاین‌های دابلد هاپلویید در مزرعه آزمایشی بخش تحقیقات غلات اقدام شد. در این مرحله مقدار ده گرم بذر از ۶۰ لاین دابلد هاپلویید تولید شده که بذر کافی از آن‌ها موجود بود، بر روی خطوط کاشت به طول یک متر و با فاصله خطوط ۳۰ سانتی‌متر زیر سیستم میست کاشته شدند و صفاتی همچون تاریخ ظهور سنبله، ارتفاع بوته، تعداد دانه در سنبله و وزن هزاردانه اندازه‌گیری شد. داده‌های به دست آمده از آزمایش‌های مختلف با استفاده از آزمون X^2 و آزمایش فاکتوریل با پایه طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج و بحث

در این تحقیق به منظور انجام مقایسه‌های مورد نظر، داده‌های مربوط به مراحل تولید گیاهچه‌های هاپلویید (جدول ۱) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

با توجه به جدول ۱، درصد میزان تولید جنین در روش معمول (A) ۶۴/۵٪ و در روش کشت ساقه‌های بریده (B) ۵۵/۷٪ بود. در تحقیقات به عمل آمده توسط (Riera-Lizarazu and Mujeeb Kazi,1990) میزان تولید جنین در روش‌های A و B به ترتیب ۱۲٪ و ۲۸٪ و در تحقیقات انجام شده توسط (Inagaki and Mujeeb Kazi, 1995) میزان تولید جنین در روش‌های A و B به ترتیب ۲۰/۵ ٪ و ۱۹/۴ ٪ گزارش گردیده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- تعداد و درصد فراوانی گلچه گرده‌افشانی شده، بذر تشکیل شده، جنین تشکیل شده و گیاهچه هاپلوئید تولید شده در دو روش معمول (A) و کشت ساقه‌های بریده شده (B)

Table 1. Number and frequency (%) of pollinated floret, seed set, embryo formation and haploid production in conventional (A) and detached tiller culture (B) methods

تلاقی Cross	تعداد گلچه گرده‌افشانی شده No. pollinated floret	بذر تشکیل شده Produced seeds		جنین تشکیل شده Produced embryos		گیاه هاپلوئید تولید شده Produced haploid plants		گیاه دابلد هاپلوئید تولید شده Produced double haploid plants	
		تعداد Number	درصد %	تعداد Number	درصد %	تعداد Number	درصد %	تعداد Number	درصد %
G1H1									
A	110	61	55.45	1	1.63				
B	114	100	69.44	_	_				
G1H3									
A	112	65	58.03	5	7.69	6	75	3	50
B	318	219	68.86	_	_				
G1H7									
A	106	72	67.92	_	_				
B	362	214	59.12	2	0.93				
G2H1									
A	104	69	66.35	18	24.8				
B	372	241	64.78	16	6.63				
G2H3									
A	116	100	68.21	_	_	160	62.99	39	37.24
B	878	673	67.18	25	3.71				
G2H7									
A	474	320	76.5	42	13.13				
B	1074	715	66.75	153	21.4				
G3H1									
A	338	235	69.50	6	2.55				
B	354	247	69.77	1.61	4				
G3H3									
A	384	259	67.44	20	7.72	74	71.15	33	44.59
B	722	486	67.3	19	3.9				
G3H7									
A	588	390	66.33	19	4.78				
B	328	205	62.5	36	17.56				

G: Wheat genotypes, G1: Kavir/ Zagros
G2: Hys//Drc*2/7C/3/2*Rsh/4/Zagros
G3: Rsh 2*/10120//Zagros
H: Maize genotypes, H1: KSC 108
H3: KSC 301
H7: SC 704

با توجه به جدول ۲ تعداد بذر تشکیل شده در تلاقی ژنوتیپ‌های گندم G1 ، G2 و G3 با ژنوتیپ ذرت H1 در هر یک از دو روش A و B در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود. همچنین تعداد جنین تشکیل شده در تلاقی ژنوتیپ‌های گندم G1 ، G2 و G3 با ژنوتیپ ذرت H1 در

www.SID.ir

Archive of SID

هر یک از دو روش A و B در سطح احتمال ۵٪ و با ژنوتیپ‌های ذرت H3 و H7 در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود.

با توجه به جدول ۳ تعداد بذر تشکیل شده در تلاقی ژنوتیپ‌های ذرت H1 ، H3 و H7 با ژنوتیپ گندم G2 در روش B در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود. تعداد جنین تشکیل شده نیز در تلاقی ژنوتیپ‌های ذرت H1 ، H3 و H7 با ژنوتیپ‌های گندم G1 ، G2 و G3 در روش A و با ژنوتیپ‌های گندم G2 و G3 در روش B در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود.

با توجه به جدول ٤ تعداد بذر تشکیل شده در مجموع دو روش A و B در تلاقی بین ژنوتیپ گندم G2 با ژنوتیپ‌های ذرت H1 ، H3 و H7 در سطح احتمال ۱٪ دارای اختلاف معنی‌دار بود. تعداد جنین تشکیل شده در تلاقی ژنوتیپ‌های مختلف گندم با ژنوتیپ‌های ذرت H1 ، H3 و H7 درمجموع دو روش A و B در سطح احتمال ۱٪ دارای اختلاف معنی‌دار بود.

با توجه به جدول ٥ تعداد جنین تشکیل شده در تلاقی بین ژنوتیپ‌های مختلف گندم با ژنوتیپ ذرت H3 در سطح احتمال ۵٪ و با ژنوتیپ‌های ذرت H1 و H7 در سطح احتمال ۱٪ دارای اختلاف معنی‌دار بود.

با توجه به جدول ٦ در تلاقی بین ژنوتیپ‌های مختلف گندم با مجموع ژنوتیپ‌های ذرت H1 ، H3 و H7 میزان تولید بذر و تعداد لاین دابلد هاپلویید تولید شد ه در سطح احتمال ۵٪ و میزان جنین تشکیل شده در سطح احتمال ۱٪ دارای اختلاف معنی‌دار بودند.

برای مقایسه اثر سه ژنوتیپ گندم G1، G2 و G3 به همراه سه ژنوتیپ ذرت G1 ، G3 و G7 و دو روش تولید لاین‌های دابلدهاپلوئید (A و B) بر میزان تولید بذر، ژنوتیپ‌های گندم به عنوان فاکتور اول در سه سطح، ژنوتیپ‌های ذرت به عنوان فاکتور دوم در سه سطح و روش‌های تولید لاین‌های دابلدهاپلوئید به عنوان فاکتور سوم در دو سطح، در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی مورد مقایسه قرار گرفتند.

باتوجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۷)، اثر فاکتور اول (ژنوتیپ‌های F1 گندم) و فاکتور دوم (ژنوتیپ‌های ذرت) با احتمال ۱٪ بر میزان تشکیل بذر معنی‌دار تشخیص داده شد، اما اثر فاکتور سوم (روش‌های انجام کار) بر میزان تشکیل بذر معنی‌دار نبود. اثر متقابل فاکتورهای اول و دوم، در سطح احتمال ۱٪ بر میزان تشکیل بذر معنی‌دار شد ولی اثر متقابل فاکتورهای اول و سوم، دوم و سوم و همچنین فاکتورهای اول و دوم و سوم معنی‌دار نبود.

اثر سه ژنوتیپ گندم G1 ، G2 و G3 به همراه سه ژنوتیپ ذرت H1 ، H3 و H7 و دو روش تولید لاین‌های دابلد هاپلویید (A و B) در میزان تولید جنین هاپلوئید نیز به همان روش مورد مقایسه قرار گرفتند.

باتوجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۷)، اثر فاکتورهای اول، دوم و سوم و اثر متقابل

www.SID.ir

Archive of SID

فاکتورهای دوم و سوم با سطح احتمال ۱٪ و اثر متقابل فاکتورهای اول و دوم و سوم و اثر متقابل فاکتورهای اول و سوم با سطح احتمال ۵٪ در میزان تولید جنین هاپلوئید معنی‌دار تشخیص داده شد.

در آزمایش مزرعه‌ای که به منظور ارزیابی صفات زراعی و وزن هزاردانه تعدادی از لاین‌های دابلد هاپلوئید تولید شده انجام شد، وزن هزار دانه لاین‌های دابلد هاپلوییید در دو شرایط کاشت (در تنش بیماری زنگ زرد و

جدول ٦- مقایسه صفات مختلف در تلاقی بین ژنوتیپ‌های گندم با مجموع ژنوتیپ‌های ذرت H1، H3 و H7

Table 6. Comparison of characters in cross between genotypes of wheat and maize (H1, H3, H7)

Characters	صفات	G1	G2	G3	X^2
		H1+ H3 + H7	H1+ H3 + H7	H1+ H3 + H7	
Pollinated floret	گلچه گرده‌افشانی شده	1152	3018	2714	_
Seed set	بذر تشکیل شده	731	2118	1822	5.989*
Embryo number	جنین تشکیل شده	8	254	104	100.500**
Haploid number	گیاهچه‌هاپلوییید تولید شده	6	160	74	0.860^{ns}
Doubled haploid number	تعداد لاین دابلد هاپلوییید	3	39	33	7.311*

ns، * و ** : به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

ns, * and **: Not significant, significant at 5%, 1% levels, respectively.
G: Wheat genotypes, G1: Kavir/ Zagros, G2: Hys//Drc*2/7c/3/2/*Rsh/Zzgros, G3: Rsh 2*//10120//Zagros
H: Maize genotypes, H1: KSC 108, H3: KSC 301, H7: SC 704

جدول ۷- تجزیه واریانس آزمایش فاکتوریل ۳×۳×۲ مقایسه اثر سه ژنوتیپ گندم G1، G2 و G3 (فاکتور A در سه سطح) به همراه سه ژنوتیپ ذرت H1، H3 و H7 (فاکتور B در سه سطح) و دو روش تولید لاین‌های دابلد هاپلوییید A و B (فاکتور C در دو سطح) بر میزان تولید بذر و جنین

Table 7. Analysis of variance in factorial test for comparison of effects of 3 genotypes of wheat (A factor in 3 levels) and 3 genotypes of maize (B factor in 3 levels) and two methods of production of duobled haploid lines (C factor in 2 levels) in seed set and embryo formation

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات MS	
S. O. V.	df.	Seed	Embryo
Treatment	17	69.18**	58.64**
A	2	242.24**	155.04**
B	2	90.51**	78.04**
C	1	5.55^{ns}	84.50**
B × A	4	96.59**	27.82**
C × A	2	16.68^{ns}	22.79*
C × B	2	0.68^{ns}	66.79**
C × B × A	4	20.42^{ns}	22.45*
Error	54	10.42	8.15
Total	71		

ns، * و ** : به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

ns, * and **: Not significant, significant at 5%, 1% levels, respectively.

www.SID.ir

Archive of SID

بدون تنش بیماری) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۸) به طور نسبی میزان وزن هزار دانه لاین‌های دابلد هاپلویید کاشته شده در تنش بیماری، از میزان وزن هزاردانه لاین‌های دابلد هاپلویید کاشته شده در شرایط بدون تنش بیماری کمتر بود. در شرایط بدون تنش، لاین شماره ۵۱ با ۵۰/۴۸ گرم و لاین شماره ۲۷ با ۲۷/۳۶ گرم به ترتیب دارای بیشترین وکمترین وزن هزاردانه بودند (جدول ۸). در شرایط تنش بیماری لاین شماره۲ با ۳۹/۰۸ گرم و لاین شماره ۲۳ با ۱۵/۵۵ گرم به ترتیب دارای بیشترین و کمترین وزن هزاردانه بودند. بالا بودن وزن هزار دانه در شرایط تنش برای لاین شماره ۲ مربوط به واکنش مقاومت این لاین بود و سطح پایین بیماری اثری بر روی کاهش وزن هزاردانه نداشت. لاین شماره ۵۱ که در شرایط عادی بیشترین میزان وزن هزار دانه را دارا بود در شرایط تنش بیماری نیز از وزن هزار دانه قابل قبولی(۳۷/۳۰ گرم) برخودار بود (واکنش و خصوصیات زراعی لاین‌ها در شرایط تنش بیماری در این مقاله ارائه نشده است).

لاین‌های دابلد هاپلویید مورد بررسی در این تحقیق از نظر میزان ارتفاع بوته نیز دارای تنوع نسبتا خوبی بودند، به طوری که لاین شماره ۲۹ با ارتفاع ۱۱۵ سانتی‌متر و لاین شماره ۲۰ با ارتفاع ۷۰ سانتی‌متر بلند ترین و کوتاه‌ترین ارتفاع بوته را داشتند.

با توجه به نتایج فوق و تجربیات عملی به دست آمده در طی آزمایش، استفاده از روش ساقه‌های بریده شده نسبت به روش معمول دارای برتری‌های بارزی به شرح زیر می‌باشد:

الف- استفاده از روش آب گرم به منظور عقیم نمودن گلچه‌های گندم در این روش موجب صرفه‌جوئی در وقت و افزایش سرعت انجام کار می‌شود.

ب- با توجه به اهمیت بالای کنترل شرایط رشد و نموی (دما، نور و رطوبت) گیاهان گندم در رشد و توسعه جنین‌های هاپلویید تولید شده، استفاده از روش ساقه‌های بریده شده به علت بهره‌گیری از محیط‌های کنترل شده موجب افزایش راندمان میزان تولید جنین و متعاقب آن گیاه هاپلویید می‌شود.

ج- در روش ساقه‌های بریده شده، هورمون 2,4-D که نقش بارزی در میزان تولید و توسعه جنین‌های هاپلویید دارد به طور مؤثرتری در دست رس گیاه قرار می‌گیرد که این امر موجب افزایش میزان تولید جنین و به علاوه صرفه‌جویی در وقت، جهت تزریق هورمون به داخل ساقه‌های گیاه می‌گردد.

منابع مورد استفاده

References

بختیار، ف. ۱۳۷۷. بهبود کیفیت نانوایی ارقام گندم (نوید وکرج ۱)با استفاده از آلل‌های برتر موجود در بزوستایا و اینیا به روش اصلاحی دابلد هاپلوییدی. پایان‌نامه فوق لیسانس دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

www.SID.ir

Archive of SID

بزرگی‌پور، ر. ۱۳۷۳. استفاده از روش هاپلوییدی در غلات. سومین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. صفحه ٧٤-٦٥.

Barcly, I. R. 1975. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) by chromosome elimination. Nature (London) 256: 410-411.

Belling, J., and Blakeslee, A. F. 1922. The assortment of chromosome in triploid Daturas. Am.Nat. 56: 339-144.

Bozorgipour, R., and Snape, J. W. 1990. The crossability of Persian wheat cultivars with *Hordeum bulbosum* and their potential for haploid production. Cereal Research Communication 18: 203-208.

Furusho, M., Suenaga, K., and Nakajima, K. 1991. Production of haploid barley plants from barley × maize and barley × Italian rye grass crosses. Japanese Journal of Breeding 41: 175-179.

Guha, S., and Maheshwari, S. C. 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of Datura *in vitro*. Nature (London) 212: 97-98.

Inagaki, M. 1997. Technical Advances in wheat haploid production using ultra-wide crosses.JIRCAS Journal NO. 4: 51-62

Inagaki, M. N., and Mujeeb-Kazi, A. 1995. Comparison of polyhaploid production frequencies in crosses of hexaploid wheat with maize, pearl millet and sorghum. Breeding Science 45: 157-160.

Inagaki, M. N., WAL, E. K., and Tahir, M. 1991. A comparison of haploid production frequencies in barley crossed with maize and *Hordeum bulbosum.* Cereal Research Communication 19: 385-390.

Jain, S. M., Sopory, S. K., and Velleux, R. E. 1996. *In vitro* Haploid Production in Higher Plants, Vol. Kluwer Academic Publisher, the Netherlands.

Kasha, K. J. 1974. Haploid from somatic cells. pp. 67-87. In: Kahsa, K. J. (ed.). Haploid in Higher Plants, Advances and Potential. The University of Guelph, Guelph, Canada.

Kasha, K. J., and Kao, K. N. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) Nature (London) 225: 874-876.

Kasha, K. J., and Reinbergs, E. 1975. Utilizatioin of haploidy in barley. pp. 315-367. In: Goul, H. (ed.) Barley Genetics. Verlag Karl Thiemig, Munich, Germany.

www.SID.ir

Archive of SID

Laurie, D. A., and Bennett, M. D. 1986. Wheat × Maize hybridization. Canadian Journal of Genetics and Cytology 28: 113-116.

Laurie, A. D., and Bennett, M. D. 1988. The production of haploid wheat plants from wheat × maize crosses. Theoretical and Applied Genetics 79: 393-397.

Masanori, I. 1997. Technical advances in wheat haploid production using ultra-wide crosses. JIRCAS Journal. No. 4: 51-62.

Matzk, F., and Mahn, A. 1994. Improved techniques for haploid production in wheat using chromosome elimination .Plant Breeding 113: 125-129.

Riera-Lizarazu, O., and Mujeeb-Kazi, A. 1990. Maize (*Zea mays* L.) mediated wheat (*Triticum aestivum* L.) polyploid produduction using various crossin methods. Cereal Research Communication 18: 339-345.

Suenaga, K., and Nakajima, K. 1989. Efficient production of haploid wheat (*Triticum aestivum*) through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays*) Plant Cell Reporter 8: 263-266.

Ushiyama, T., Shimza, T., and Kuwabara, Y. 1991. High frequency of haploid production of wheat through intergeneric cross with Teosinet. Japanese Journal of Breeding 41: 353-357.

Wenzel, G., Groner, A., Fadel, F., Jitzlsperger, J., and Foronghiwehr, B. 1992. Production and use of haploids in crop improvement. pp. 169-179. In: Biotechnology and Crop Improvement in Asia. International Crop Research Institute for Semi Arid Tropics. Patenchera, Andra Pradesh, India.

Zenkteler, M., and Nitzsche, W. 1984. Wide hybridization experiments in cereals. Theoretical and Applied Genetics 68: 311-315.

Zhang, G., Friebe, B., Raupp, G. W., Aharrison, S., and Gill, B. S. 1996. Wheat embryogenesis and haploid production in wheat×maize hibrids. Euphytica 90: 315-324.

آدرس نگارندگان:

فرشاد بختیار، رضا بزرگی‌پور و سعید شهابی- بخش تحقیقات غلات، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، صندوق پستی ٤١١٩، کرج ٣١٥٨٥.

www.SID.ir