بررسی اثرات رقم، پیش تیمار و محیط کشت القاء رویان زایی در کشت میکروسپورهای جدا شده گندم هگزاپلوئید

حمید شیردل مغانلو[1]، احمد معینی[1*] و امیر موسوی[2]

[1] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

[2] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: ٨٨/٦/٩ تاریخ پذیرش: ٨٩/٤/٢٧

چکیده

گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف شده دارای اهمیت زیادی در تولید لاینهای هموزیگوس، آنالیز ژنتیکی، نقشه یابی ژنوم، انتقال ژن و غیره می باشند. از میان روشهای تولید گیاهان هاپلوئید، کشت میکروسپورهای جدا شده به دلیل مزایایی که دارد از اهمیت ویژه ای برخوردار است. کارآیی کشت میکروسپور های جدا شده تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی است. در این پژوهش، اثرات ٣ فاکتور رقم (در ٢ سطح: مغان١ و اترک)، پیش تیمار (در ٤ سطح: شاهد، ٢١ روز سرما، ٧ روز سرما + مانیتول و سرما + (شیمیایی + گرما)) و محیط کشت القاء رویان زایی (در ٥ سطح: NPB-99، CHB-2، W14، C17 و P2) بر کشت میکروسپورهای جدا شده گندم هگزاپلوئید بررسی شده است. نتایج نشان داد که اثر متقابل معنی داری بین ارقام با پیش تیمار و محیط کشت القاء رویان زایی وجود داشت. در پژوهش حاضر، در هر دو رقم (مغان١ و اترک) مورد مطالعه پیش تیمار "٧ روز سرما + مانیتول" بالاترین میانگین رویان زایی(٤/٦٦ ± ٨١/٣٣ و ٢/٣٣ ± ٩٢/٣٣)، باززایی گیاه کل (٢/٠٢ ± ٢٩/٣٣ و ٠/٣٣ ± ٣٩/٣٣) و باززایی گیاه سبز (٠/٦٨ ± ١٢/٤٦ و ١/٣٥ ± ٢٧/٠٣) را داشت. از نظر محیط کشت، برای رقم مغان١ بالاترین میانگین رویان زایی (٧ ± ٤٢٢/٠٨)، باززایی گیاه کل (١/٤٥ ± ٣١/٦٦) و باززایی گیاه سبز (٢/٢٩ ± ٢٦/٥) توسط کشت میکروسپورهای جدا شده این رقم در محیط کشت C17 حاصل شد، در حالی که رقم اترک بالاترین میانگین رویان زایی (٨/٧٧ ± ٢١١/٧٥) و باززایی گیاه سبز (٠/٧٦ ± ٣٢/٥٣) را در محیط کشت CHB-2 داشت و بالاترین میانگین باززایی گیاه کل (٣/٧٨ ± ٥١) در این رقم با استفاده از محیط کشت W14 به دست آمد.

واژه های کلیدی: کشت میکروسپورهای جدا شده، پیش تیمار، محیط کشت القاء رویان زایی، گندم هگزاپلوئید، رقم

* نویسنده مسئول، تلفن: ٤٨٢٩٢١٠١، پست الکترونیکیMoieni_a@modares.ac.ir

مقدمه

هاپلوئیدی، موضوع مهمی در مطالعات پایه و علوم کاربردی می باشد. به طور کلی گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف شده دارای کاربردهای متنوعی بوده که می توان به تولید لاینهای هموزیگوس، مطالعات ژنتیکی، القاء موتاسیون، نقشه یابی ژنوم، انتقال ژن و غیره اشاره نمود (٣، ١٣ و ٢٦). در حقیقت، در اصلاح نباتات، توجه ویژه ای به گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف شده مبذول می گردد.

به طور کلی برای تولید گیاهان هاپلوئید، از سه روش شامل آندروژنز (کشت بساک و میکروسپورهای جدا شده)، ژینوژنز و حذف کروموزومی استفاده می شود که از میان آنها روش کشت میکروسپورهای جدا شده از مزایای متعددی برخوردار است از جمله اینکه میکروسپورها را

Archive of SID

www.SID.ir

می توان به تعداد زیادی جداسازی نمود که خود موجب فراهم آوردن میلیونها سلول هاپلوئید دارای پتانسیل رویان زایی می گردد (٢٤)، ضمن اینکه کلیه مراحل تشکیل رویان را می توان به طور مستقیم مورد بررسی قرار داد (١١). همچنین در این روش، مشکل تشکیل رویان از سلولهای بافت دیواره بساک وجود ندارد و ضمناً میکروسپورها، مواد گیاهی بسیار مطلوبی برای برنامه های انتقال ژن می باشند (٣ و ٢٧).

تحقیقات مختلفی بر روی عوامل مؤثر بر کشت میکروسپورهای جدا شده شامل ژنوتیپ، فیزیولوژی گیاه بخشنده، مرحله نموی میکروسپور، پیش تیمار و ترکیب محیط کشت صورت گرفته است (٩ و ٢٧). تا کنون از پیش تیمارهای سرما (٨)، سرما در ترکیب با گرسنگی (١٠)، گرما در ترکیب با گرسنگی (٢٣)، شیمیایی به تنهایی و در ترکیب با گرما (١٦ و ٢٨)، به طور موفقیت آمیزی در گندم استفاده شده است. همچنین از محیطهای کشت متفاوتی شامل CHB-2 (١٨)، A2 (٢٣)، MMS3 (٩)، NPB-99 (١٦)، W14 (١٤ و ١٥)، C17 (٧) و غیره توسط محققین جهت کشت میکروسپورهای جدا شده گندم استفاده گردیده است. محیط کشت P2 در کشت بساک موفقیت آمیز گزارش شده است (١٧). با این وجود، تعداد مقالات منتشر شده در مورد مقایسه پیش تیمارها و همچنین محیطهای کشت مختلف در یک گونه، کم می باشد (١٢، ٢١ و ٢٢). در مورد ارقام گندم ایرانی، تعداد تحقیقات انجام شده در مورد کشت میکروسپورهای جدا شده بسیار کم است (١). لذا در پژوهش حاضر، اثر سه پیش تیمار مختلف (٢١ روز سرما، ٧ روز سرما + مانیتول و سرما + (شیمیایی + گرما)) و همچنین پنج محیط کشت مختلف (NPB-99، CHB-2، W14، C17 و P2) بر صفات رویان زایی، باززایی گیاه کل و باززایی گیاه سبز در کشت میکروسپورهای جدا شده دو رقم گندم هگزاپلوئید ایرانی (مغان١ و اترک) مورد بررسی قرار گرفته است.

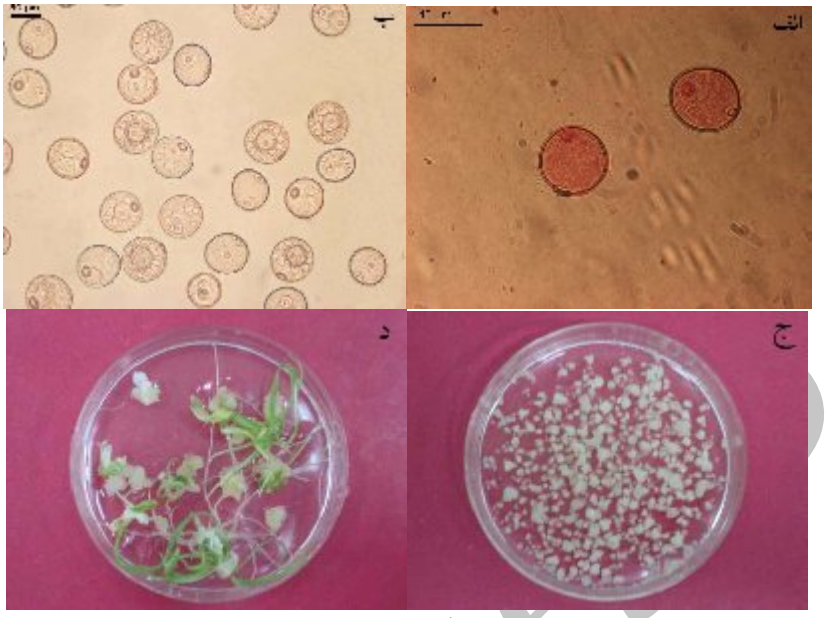
مواد و روشها

مواد گیاهی: دو رقم گندم هگزاپلوئید بهاره ایرانی، شامل مغان١ و اترک، تهیه شده از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تولید نهال و بذر وزارت کشاورزی، مواد گیاهی این آزمایش را تشکیل داده و در شرایط مزرعه کشت شدند. این دو رقم بر پایه نشان دادن تنوع مناسب در آزمایشهای اولیه برای صفات مورد مطالعه(رویان زایی، باززایی گیاه کل و باززایی گیاه سبز) ، در پژوهش حاضر مورد استفاده قرار گرفتند.

پیش تیمار: سنبله ها، در مرحله تک هسته ای میانی تا انتهایی نمو میکروسپورها برداشت شده و در پیش تیمار قرار داده شدند (شکل ١ قسمت الف). در پژوهش حاضر، دو آزمایش کاملاً مجزا انجام شده است. در آزمایش اول، اثرات رقم و پیش تیمار و در آزمایش دوم، اثرات رقم و محیط کشت بر کشت میکروسپورهای جدا شده گندم هگزاپلوئید بررسی شده اند. در آزمایش اول، به منظور القاء رویان زایی، سه پیش تیمار شامل سرما (قرار دادن قاعده سنبله ها در یک بشر ml ٤٠٠ حاوی ml٢٠٠ آب معمولی و نگهداری آنها در ٤ درجه سانتی گراد به مدت ٢١ روز)، سرما + مانیتول (سنبله ها بعد از حذف ریشکها در پتری دیش شیشه ای به قطر cm ١٠ حاوی ml ٤٠ محلول مانیتول ٠/٤ مولار غوطه ور گردیده و سپس به مدت ٧ روز در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شدند) و تیمار سرما + (شیمیایی + گرما) (که طی آن ابتدا سنبله ها به مدت یک هفته در ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شده و سپس به محلول شیمیایی حاوی mg ١٠٠ در لیتر 2-HNA، $mol. L^{-1}$ $١٠^{-٦}$ از 2,4-D و $mol. L^{-1}$ $١٠^{-٦}$ از BAP منتقل شده و به مدت ٤٨ ساعت در ٣٣ درجه سانتی گراد قرار داده شدند) مورد استفاده قرار گرفتند. در تیمار شاهد، سنبله ها در پیش تیمار قرار داده نشدند و بلافاصله پس از برداشت، میکروسپورها جداسازی و کشت شدند. در آزمایش دوم، از پیش تیمار سرمایی (قرار دادن

Archive of SID
www.SID.ir

سنبله ها به مدت ٢١ روز در ٤ درجه سانتی گراد) استفاده گردید و پس از آن، میکروسپورهای جداسازی شده در چند محیط کشت القاء رویان زایی کشت شدند تا اثر آنها روی رویان زایی بررسی شود.



شکل ١- (الف) میکروسپورها در مرحله تک هسته ای (رنگ آمیزی شده با استوکارمن ٢ درصد) **(ب)** میکروسپورهای القاء شده پس از اعمال پیش تیمار **(ج)** تولید رویان پس از ٣٠ روز نگهداری در دمای ٢٨ درجه سانتی گراد و تاریکی **(د)** تشکیل گیاهچه ها، دو هفته پس از انتقال رویانها به محیط باززایی در گیاه گندم.

جدول ١- تنظیم کنندهای رشد گیاهی و pH محیطهای کشت القاء رویان زایی استفاده شده برای کشت میکروسپورهای جدا شده گندم در آزمایش حاضر

محیط کشت	تنظیم کننده های رشد گیاهی	pH
NPB-99	0.2 mg l^{-1} 2,4-D + 0.2 mg l^{-1} Kinetin + 1 mg l^{-1} PAA	7.0
C17	0.2 mg l^{-1} 2,4-D + 0.2 mg l^{-1} Kinetin + 1 mg l^{-1} PAA	5.8
W14	2.0 mg l^{-1} 2,4-D + 0.5 mg l^{-1} Kinetin	5.8
CHB-2	0.5 mg l^{-1} 2,4-D + 0.5 mg l^{-1} Kinetin	5.4
P2	1.5 mg l^{-1} 2,4-D + 0.5 mg l^{-1} Kinetin	5.8

PAA: Phenylacetic acid
2,4-D: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

جداسازی میکروسپورها: پس از اعمال پیش تیمار سنبله ها و در مورد تیمار شاهد بلافاصله پس از برداشت آنها، سنبله ها توسط محلول ١/٥ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ٢٠ دقیقه ضدعفونی شده و سه مرتبه توسط آب مقطر استریل آب کشی گردیدند. سپس، سنبلچه های هر سنبله جدا گردیده و به داخل ظرف استریل بلندر(2 speed warring, Christison)، منتقل شدند (برای هر مرتبه آسیاب کردن، سنبلچه های به دست آمده از ٤ سنبله استفاده شدند). پس از آن، ٤٠ ml محلول جداسازی میکروسپورها (مانیتول M ٠/٣) که قبلاً توسط اتوکلاو استریل شده بود به داخل ظرف بلندر اضافه گردید. سنبلچه ها طی ٢٠ ثانیه در دور کند، آسیاب گردیدند. سوسپانسیون حاصل از آسیاب کردن، از الک آزمایشگاهی با منافذی به قطر ١٠٠ µm عبور داده شد. سپس با استفاده از ١٠ ml دیگر از محلول جداسازی میکروسپورها، ظرف بلندر شسته شده و از الک عبور داده شد. در نهایت، سوسپانسیون حاصله، در دو لوله فالکون ٥٠ ml استریل (از قرار ٢٥ ml در هر لوله) توزیع و در g × ١٠٠ به مدت ٣ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. پس از سانتریفیوژ، محلول روشناور حذف و رسوب حاصله، توسط ٢ ml از محلول جداسازی میکروسپورها، دوباره به

www.SID.ir

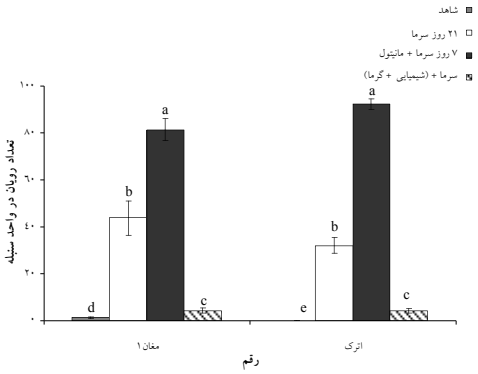
حالت سوسپانسیون درآمده و به صورت قطره قطره بر روی ml ۵ محلول مالتوز ۲۱ درصد استریل شده موجود در یک لوله فالکون ml ۱۵، منتقل شده و در دور g × ۱۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از آن، ml ۳ از باند بالایی جدا و در ml ۱۰ از محلول جداسازی میکروسپورها حل شده و مجدداً در دور g × ۱۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، محلول روشناور حذف و رسوب میکروسپورها با استفاده از ml ۱۰ محیط کشت به حالت سوسپانسیون درآمده و در دور g × ۱۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس، محلول روشناور حذف و رسوب حاصله توسط ml ۲ محیط کشت، مجدداً، به حالت سوسپانسیون درآمد. سپس، تراکم میکروسپورها به وسیله هموسیتومتر (لام شمارش سلول) تعیین شده و سپس با افزودن محیط کشت، تراکم بر روی $۱۰^{٤}$ × ۱ میکروسپور در هر میلی لیتر، تنظیم گردید.

کشت میکروسپورهای جدا شده و باززایی گیاه: محیط کشت القاء رویان زایی مورد استفاده در آزمایش اول (بررسی اثرات رقم و پیش تیمار بر کشت میکروسپورهای جدا شده گندم هگزاپلوئید) شامل NPB-99 (١٦) بود و در آزمایش دوم (بررسی اثرات رقم و محیط کشت بر کشت میکروسپورهای جدا شده گندم هگزاپلوئید) از پنج محیط کشت مختلف شامل NPB-99 (١٦)، C17 (٢٥)، W14 (٢٠)، CHB-2 (٥) و P2 (٦) استفاده گردید. در تمام محیطهای کشت مورد استفاده از $g\ l^{-1}$ ۹۰ مالتوز به عنوان منبع هیدرات کربن استفاده شد (مشاهده تنظیم کننده های رشد مورد استفاده در محیطهای کشت و همچنین pH آنها به جدول ۱ مراجعه شود). پس از تنظیم تراکم میکروسپورها، سوسپانسیون میکروسپورها به میزان ml ۵ در هر پتری دیش پلاستیکی (mm ۱۵ × ۵۵) توزیع و تعداد ۱۰ تخمدان از همان رقم گندم نیز به هر پتری دیش اضافه شد. سپس، پتری دیشها پس از درزگیری شدن توسط سه دور پارافیلم، به مدت ۳۰ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و تاریکی نگهداری شدند و بعد از این مدت، تعداد رویانهای تشکیل شده شمارش شد (شکل۱ قسمت ج) و ۱۰۰ رویان به اندازه حدود mm ۲ از هر کشت، جهت باززایی گیاه به محیط ۲-۱۹۰ (۲۹) منتقل شده و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و فتوپریود ١٦ ساعت روشنایی و شدت نور Lux ۳۰۰۰، به مدت ۲ هفته نگهداری شده و پس از آن، تعداد گیاهان سبز و آلبینو باززایی شده، شمارش گردید (شکل۱ قسمت د). در آزمایش اول، در تیمار شاهد و همچنین در پیش تیمار سرما + (شیمیایی + گرما) در هر دو رقم به دلیل تعداد بسیار اندک رویانهای تولید شده، آنها به محیط باززایی گیاه منتقل نشدند. همچنین، به همین دلیل در آزمایش دوم، رویانهای تولید شده در محیط کشت P2، به محیط باززایی گیاه منتقل نشدند.

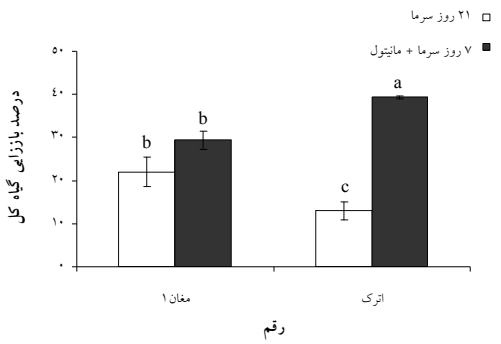
آنالیز داده ها: آزمایش اول (بررسی اثرات رقم و پیش تیمار بر کشت میکروسپورهای جدا شده گندم هگزاپلوئید)، به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. در مورد صفت رویان زایی فاکتورها عبارت بودند از ژنوتیپ در ۲ سطح (ارقام مغان۱ و اترک) و پیش تیمار در ٤ سطح و برای صفات باززایی گیاه فاکتورها عبارت بودند از ژنوتیپ در ۲ سطح و پیش تیمار در ۲ سطح. آزمایش دوم (بررسی اثرات رقم و محیط کشت بر کشت میکروسپورهای جدا شده گندم هگزاپلوئید)، نیز به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. در مورد صفت رویان زایی، فاکتورها عبارت بودند از ژنوتیپ در ۲ سطح و محیط کشت در ۵ سطح و برای صفات باززایی گیاه فاکتورها عبارت بودند از ژنوتیپ در ۲ سطح و محیط کشت در ٤ سطح. در آزمایشهای ذکر گردیده هر مرتبه کشت مجزا به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شده است. در واقع برای انجام هر مرتبه کشت، میکروسپورهای ٤ سنبله جدا شد و پس از حصول تراکم مورد نظر ($۱۰^{٤}$ × ۱ میکروسپور در هر میلی لیتر)، سوسپانسیون حاصل به میزان ml ۵ در هر پتری دیش توزیع گردید و پس از تشکیل

www.SID.ir

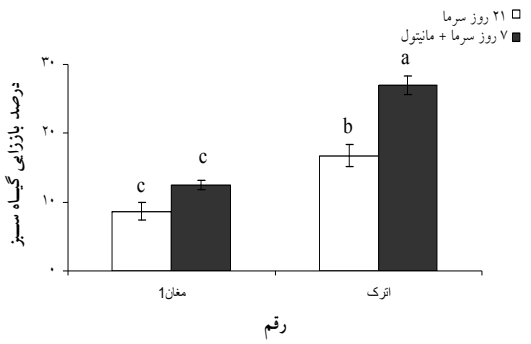
رویان، رویانهای حاصل از هر مرتبه کشت مجزا شمارش و بر عدد ٤ (تعداد سنبله مورد استفاده در هر مرتبه کشت) تقسیم گردید تا تعداد رویان در واحد سنبله به دست آید. برای بررسی باززایی گیاه کل و بازایی گیاه سبز، ١٠٠ عدد از رویانهای هر مرتبه کشت مجزا به محیط باززایی گیاه منتقل شد و در نهایت پس از باززایی گیاه، درصد باززایی گیاه کل و باززایی گیاه سبز محاسبه گردید. در این پژوهش، از نرم افزار SPSS جهت آنالیز داده ها استفاده گردید. همچنین برای نرمال کردن داده ها در صورت نیاز از تبدیل جذری و لگاریتمی بر حسب مورد استفاده گردید. مقایسه میانگینها به روش LSD در سطح احتمال ٥ درصد انجام شد.



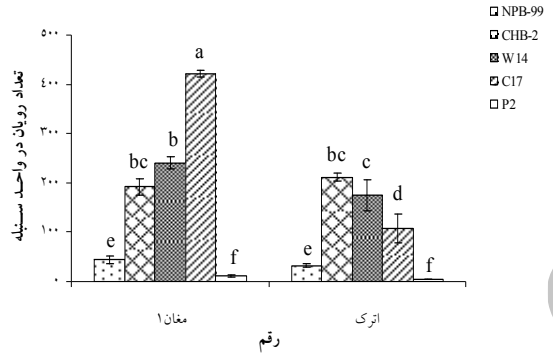
شکل ٢- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم با پیش تیمار برای صفت رویان زایی (حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ٥ درصد می باشد.)



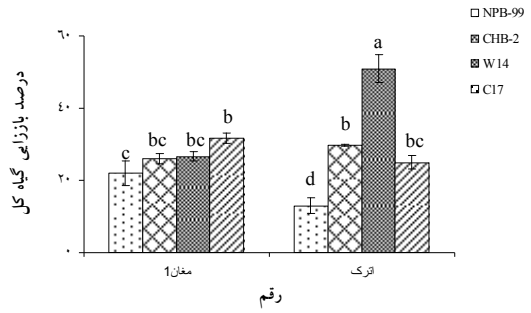
شکل ٣- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم با پیش تیمار برای صفت درصد باززایی گیاه کل (حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ٥ درصد می باشد.)



شکل ٤- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم با پیش تیمار برای صفت درصد باززایی گیاه سبز (حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ٥ درصد می باشد.)

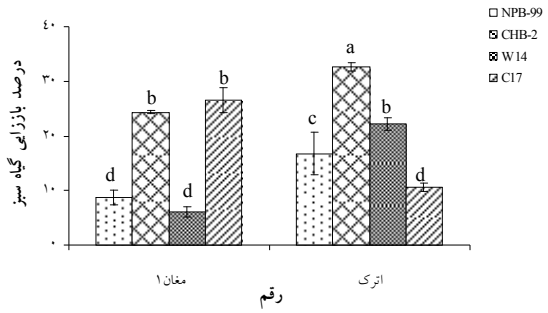


شکل ٥- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم با محیط کشت برای صفت رویان زایی (حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ٥ درصد می باشد.)



شکل ٦- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم با محیط کشت برای صفت باززایی گیاه کل (حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ٥ درصد می باشد.)

www.SID.ir



شکل ۷- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم با محیط کشت برای صفت باززایی گیاه سبز (حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشد.)

نتایج

آزمایش اول (اثرات رقم و پیش تیمار بر کشت میکروسپورهای جداشده گندم هگزاپلوئید): اثر متقابل رقم با پیش تیمار برای صفات مورد بررسی در این آزمایش شامل رویان زایی و باززایی گیاه سبز در سطح احتمال ۵درصد و همچنین باززایی گیاه کل در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود لذا اثرات ساده رقم و پیش تیمار فاقد اعتبار هستند (جدول ۲) و فقط مقایسه میانگین اثرات متقابل ذکر شده است (اشکال۳،۲ و٤). شکل ۲ نشان می دهد که باوجود معنی دار شدن اثر متقابل رقم با پیش تیمار در مورد صفت رویان زایی (جدول ۲)، ارقام مورد مطالعه تقریباً روند مشابه ای را داشته اند. به نظر می رسد با توجه به این روند مشابه و معنی دار بودن اثر متقابل، نوع این اثر متقابل به صورت تغییر در مقدار می باشد، هرچند که تغییرات فاکتور در سطوح یکدیگر شدید نبوده است. ترکیب تیماری هر دو رقم با پیش تیمار ۷ روز سرما + مانیتول، بیشترین میزان رویان زایی را داشته است (مغان یک ٤/٦٦ ± ۸۱/۳۳ و اترک ۲/۳۳ ± ۹۲/۳۳ رویان در واحد سنبله). همان طور که ملاحظه می گردد پیش تیمار ۲۱ روز سرما پس از پیش تیمار ۷ روز سرما + مانیتول، نسبت به سایر تیمارها برتر می باشد. کمترین میزان رویان زایی نیز مربوط به تیمار شاهد بوده است (۰/۳۳ ± ۱/۳۳ رویان در واحد سنبله در رقم مغان۱ و در رقم اترک اصلاً رویانی حاصل نشد).

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در آزمایش اول

منبع تغییرات	درجه آزادی			میانگین مربعات		
	رویان زایی	باززایی گیاه کل	باززایی گیاه سبز	رویان زایی	باززایی گیاه کل	باززایی گیاه سبز
رقم (A)	۱	۱	۱	۰/۰٤٥*	۰/۷٥۰ns	۳۸٤/٤۲۷**
پیش تیمار (B)	۳	۱	۱	۳/۳۸۱**	۸٥۰/۰۸۳**	۱٤۹/٦۷۲**
رقم × پیش تیمار (AB)	۳	۱	۱	۰/۰۳۱*	۲۷۰/۷٥۰**	۳۱/٦۸۸*
خطای آزمایشی	۱٦	۸	۸	۰/۰۰۸	۱٥/٤۱۷	٤/۸۹۰
C.V.				٪۷/۸	٪۱٥/۱	٪۱۳/٦

**، * و ns به ترتیب وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱٪، وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و عدم وجود اختلاف معنی دار می باشند.

مقایسه میانگین تیمارهای مورد آزمایش برای صفات درصد باززایی گیاه کل و درصد باززایی گیاه سبز به ترتیب در اشکال ۳ و ٤ نشان داده شده اند. رقم اترک با پیش تیمار ۷ روز سرما + مانیتول، بهترین میزان باززایی گیاه کل را داشته است (۰/۳۳ ± ۳۹/۳۳ درصد). در رقم مغان۱، اگرچه اعمال پیش تیمار ۷ روز سرما + مانیتول منجر به در صد باززایی گیاه کل بیشتری (۲/۰۲ ± ۲۹/۳۳ درصد) نسبت به اعمال پیش تیمار ۲۱ روز سرما (۳/٤٦ ± ۲۲درصد) شده است اما اختلاف معنی داری بین این دو پیش تیمار ملاحظه نشد. همچنین رقم اترک با پیش تیمار

Archive of SID
www.SID.ir

٧ روز سرما + مانیتول، بالاترین درصد باززایی گیاه سبز را داشته است (١/٣٥ ± ٢٧/٠٣ درصد) در حالی که در رقم مغان١، بین پیش تیمار ٧ روز سرما + مانیتول و ٢١ روز سرما برای صفت باززایی گیاه سبز، اختلاف معنی داری ملاحظه نشد (به ترتیب ٠/٦٨ ± ١٢/٤٥ و ١/٢٩ ± ٨/٦٥ درصد).

جدول ٣- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در آزمایش دوم

منبع تغییرات	درجه آزادی			میانگین مربعات		
	رویان زایی	باززایی گیاه کل	باززایی گیاه سبز	رویان زایی	باززایی گیاه کل	باززایی گیاه سبز
رقم (A)	١	١	١	٦١/٣٥٥**	١/٩٤E-٠٠٥^{ns}	٩٩/٧١٥**
محیط کشت (B)	٤	٣	٣	١٩٧/٦٨٨**	٠/١٢٧**	٣٠٣/٤١٢**
رقم × محیط کشت (AB)	٤	٣	٣	٢٨/٦٣٥**	٠/٠٧٢**	٢٨٦/٨٣٥**
خطای آزمایشی	٢٠	١٦	١٦	١/٥٥٣	٠/٠٠٥	٩/٦٧٨
C.V.				٪١١/٨	٪٥	٪١٦/٨

**، * و ^{ns} به ترتیب وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ١٪، وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ٥٪ و عدم وجود اختلاف معنی دار می باشند.

آزمایش دوم (اثرات رقم و محیط کشت بر کشت میکروسپورهای جدا شده گندم هگزاپلوئید): اثرات متقابل رقم با محیط کشت از لحاظ صفت رویان زایی در سطح احتمال ١ درصد معنی دار بود (جدول٣) ، لذا فقط مقایسه میانگین اثرات متقابل در شکل ٥ ذکر شده است. این شکل نشان می دهد که رقم مغان١ با محیط کشت C17، بیشترین میزان رویان زایی را داشته (٧/٧١ ± ٤٢٢/٠٨ رویان در واحد سنبله) و در گروه a قرار گرفته است. در حالی که در رقم اترک، محیط کشت CHB-2 (٨/٧٧ ± ٢١١/٧٥ رویان در واحد سنبله) نسبت به محیطهای کشت دیگر برتر بوده است، هرچند که این محیط کشت با محیط کشت W14 (٣١ ± ١٧٥ رویان در واحد سنبله) تفاوت معنی داری نداشته است. هر دو رقم با محیط کشت P2 کمترین میزان رویان زایی را داشته و در گروه f قرار گرفته اند (مغان یک ١/٩٠ ± ١١/٢٥ و اترک ٠/٣٠ ± ٤/١٦ رویان در واحد سنبله). سایر ترکیبات تیماری در بین این دو محدوده قرار گرفته اند. همچنین در هر دو رقم، محیطهای کشت CHB-2، W14 و C17 نسبت به دو محیط کشت NPB-99 و P2 به طور معنی داری از نظر میزان رویان زایی برتر بوده اند.

در مورد صفات درصد باززایی گیاه کل و درصد باززایی گیاه سبز نیز، اثر متقابل رقم با محیط کشت در سطح احتمال ١ درصد معنی دار شد (جدول٣) و لذا فقط مقایسه میانگین اثرات متقابل برای صفات درصد باززایی گیاه کل و درصد باززایی گیاه سبز به ترتیب در اشکال ٦ و ٧ نشان داده شده است. رقم اترک در محیط کشت W14، بیشترین باززایی گیاه کل را داشته (٣/٧٨ ± ٥١ درصد) و در گروه a قرار گرفته است، درحالی که همین رقم با محیط کشت NPB-99 کمترین باززایی گیاه (٢/٠٨ ± ١٣ درصد) را داشته و در گروه d قرار گرفته است. در مورد رقم مغان١، بالاترین درصد باززایی گیاه کل مربوط به محیط کشت C17 (١/٤٥ ± ٣١/٦٦ درصد) و کمترین مربوط به محیط کشت NPB-99 (٣/٤٦ ± ٢٢ درصد) بوده است. به طور کلی رقم اترک در مقایسه با رقم مغان١ از پتانسیل باززایی گیاه بیشتری برخوردار می باشد. در مورد باززایی گیاه سبز، رقم اترک با محیط کشت CHB-2 بیشترین باززایی گیاه سبز (٠/٧٦ ± ٣٢/٥٣ درصد) را داشته است و رقم

Archive of SID
www.SID.ir

مغان١ با محیطهای کشت NPB-99 و W14 (به ترتیب ١/٣٠ ± ٨/٦٨ و ٠/٩٦ ± ٦/١٣ درصد) و همچنین رقم اترک با محیط کشت C17 (٠/٨٣ ± ١٠/٦٠ درصد) کمترین باززایی گیاه سبز را داشته اند.

بحث

ژنوتیپ و عوامل محیطی، دو عامل تأثیرگذار و مهم در آندروژنز می باشند. در گندم، تولید گیاهان هاپلوئید از طریق آندروژنز توسط سه صفت رویان زایی، باززایی گیاه کل و نسبت گیاه سبز به آلبینو که به طور مستقل به ارث می رسند، کنترل می گردد (٤). در مطالعه کشت بساک ٤٩ ژنوتیپ گندم هگزاپلوئید که توسط Moieni و Sarrafi (١٩٩٥)، صورت گرفت، تنوع ژنتیکی معنی داری میان ژنوتیپها برای همه صفات ملاحظه شده است(١٧). همچنین مشخص شده است که ارقام دارای دانه سخت (قرمز و سفید) نسبت به ارقام دارای دانه نرم، پاسخ بالاتری به کشت میکروسپورهای جدا شده از خود نشان می دهند (١٦). به طور کلی گزارشات نشان می دهند که صفات آندروژنیک، توارثی بوده و تنوع برای آنها مشاهده می گردد. نتایج حاصل از آزمایش حاضر نیز وجود تنوع ژنتیکی برای صفات رویان زایی و باززایی گیاه سبز در دو رقم مغان١ و اترک از طریق کشت میکروسپورهای جدا شده نشان می دهد. مطالعات مختلف نشان می دهد که عوامل دیگری مانند پیش تیمار، محیط کشت القاء رویان زایی و غیره نیز تأثیر بسیار مهمی بر آندروژنز دارند (٩، ١٢ و ٢٦). به عبارت دیگر می توان گفت که صفات آندروژنیک تحت تأثیر عوامل محیطی نیز هستند. ضمناً اثر متقابل معنی داری بین ژنوتیپ و عوامل محیطی وجود دارد که نتایج حاصل از این پژوهش، نیز این موضوع را به وضوح نشان می دهد، به طوری که در آزمایش اول، اثرات متقابل رقم و پیش تیمار و در آزمایش دوم، اثرات متقابل رقم و محیط کشت القاء رویان زایی معنی دار شده بودند.

اگرچه در بعضی گونه ها، میکروسپورها به طور طبیعی دارای پتانسیل ذاتی برای رویان زایی می باشند، اما فراوانی تولید رویان در آندروژنز بدون استفاده از پیش تیمار، معمولاً خیلی کم می باشد، بنابراین استفاده از پیش تیمار مناسب به منظور القاء رویان زایی برای کسب نتایج خوب لازم می باشد. تا کنون از پیش تیمارهای مختلفی شامل سرما (٨)، سرما در ترکیب با گرسنگی (١٠)، گرما در ترکیب با گرسنگی (٢٣)، شیمیایی به تنهایی و در ترکیب با گرما (٨ و ١٦)، به طور موفقیت آمیزی در گندم استفاده شده است. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان می دهد که در بعضی ارقام مانند مغان ١، کشت مستقیم میکروسپورهای جدا شده، یعنی بدون اعمال پیش تیمار، در محیط کشت رویان زایی (NPB-99) حاوی مالتوز برای القاء رویان زایی میکروسپورها کافی می باشد، به دلیل اینکه مالتوز به تدریج هیدرولیز شده و باعث گرسنگی دادن به میکروسپورها می شود (١٢)، اما در بعضی از ارقام مانند اترک، کشت مستقیم میکروسپورهای جدا شده در محیط کشت حاوی مالتوز نمی تواند موجب القاء رویان زایی گردد و پیش تیماری مانند "سرما + گرسنگی" برای القاء رویان زایی لازم می باشد. به طور کلی می توان گفت که برخی ارقام نسبت به تنش بسیار حساس بوده و به کوچکترین تنش پاسخ می دهند و کم و بیش رویان تولید می نمایند، مانند ارقام مغان١ و فلات (٢)، اما برخی مانند رقم اترک در مقابل تنش از خود مقاومت نشان داده و اعمال تنش شدید جهت رویان زایی آنها لازم می باشد. به هر حال با وجود امکان تولید رویان بدون اعمال پیش تیمار در برخی از ارقام مانند مغان١ و فلات، جهت حصول نتیجه مطلوب می بایست پیش تیمار مناسب اعمال گردد (٢). اگرچه نتایج بسیار خوبی از اعمال پیش تیمار تلفیقی "شیمیایی + گرما" توسط Liu و همکاران (٢٠٠٢)، به دست آمده است، اما به نظر می رسد که ترکیب سرما با این پیش تیمار ها ("شیمیایی + گرما") دارای اثر مطلوبی بر کشت میکروسپورهای جدا شده نبوده و اعمال سه تنش

Archive of SID
www.SID.ir

مختلف، حتی می تواند اثر منفی داشته باشد(١٦). به طور کلی نتایج به دست آمده از این پژوهش، اثر متقابل معنی دار رقم و پیش تیمار را برای صفات رویان زایی، باززایی گیاه کل و باززایی گیاه سبز نشان می دهد. اما با این حال، دو رقم مورد مطالعه تقریباً روند مشابهی را در پاسخ به پیش تیمارهای استفاده شده در آزمایش حاضر داشتند و بالاترین میزان رویان زایی، باززایی گیاه کل و باززایی گیاه سبز در هر دو رقم در اثر اعمال پیش تیمار "٧ روز سرما + گرسنگی" به دست آمده است و بنابر این به نظر می رسد که بتوان این پیش تیمار را جهت حصول موفقیت در کشت میکروسپور ارقام مختلف بررسی کرد.

نتایج حاصل از این آزمایش در مورد تأثیر محیطهای کشت و اثر متقابل محیط کشت و ژنوتیپ روی رویان زایی در کشت میکروسپورهای جدا شده گندم، در توافق با نتایج سایر محققین می باشد (١٤، ٢١). به طور کلی تحقیقات نشان داده است که منابع هیدرات کربن، نیتروژن و تنظیم کننده های رشد گیاهی تأثیر مهمی بر آندروژنز دارند (١٢، ١٩، ٢١). بنابراین به دلیل یکسان بودن منبع هیدرات کربن در تمام محیطهای کشت القاء رویان زایی استفاده شده در این پژوهش، به نظر می رسد که اختلاف ملاحظه شده بین ترکیبهای تیماری مورد مطالعه، عمدتاً به دلیل تفاوت در میزان و نوع نیتروژن استفاده شده و همچنین تنظیم کننده های رشد به کار رفته در این محیطهای کشت و حتی pH آنها باشد و پاسخ متفاوت ارقام به این محیطهای کشت، احتمالا به نیازهای متفاوت ژنوتیپها بر می گردد.

به طور کلی، در این پژوهش، اثر متقابل رقم با پیش تیمار و نیز رقم با محیط کشت القاء رویان زایی معنی دار بود، که خود نشان می دهد ژنوتیپ و عوامل محیطی، دو عامل تأثیر گذار و مهم در کشت میکروسپورهای جدا شده گندم می باشند و هر دو این عوامل صفات رویان زایی، باززایی گیاه کل، باززایی گیاه آلبینو و باززایی گیاه سبز را تحت تأثیر قرار می دهند. با توجه به نتایج به دست آمده، می توان پیش تیمار "٧ روز سرما + مانیتول" را به عنوان پیش تیماری مؤثر و مناسب برای هر دو رقم پیشنهاد کرد. درمورد محیط کشت، به طور اختصاصی می توان برای رقم مغان١، محیط کشت C17 و برای رقم اترک، محیطهای کشت CHB-2 و W14 را پیشنهاد نمود. بدیهی است که با انجام آزمایشات تکمیلی، در آینده، می توان عملکرد صفات آندرو ژنیک از طریق کشت میکروسپورهای جدا شده را بهبود بخشیده و نتایج حاصل از آزمایشات این پژوهش، بستر مناسبی برای پیشرفتهای آتی خواهد بود.

منابع

١. قرنجیک، ش.، معینی، ا.، موسوی، ا.، علیزاده، ه. (١٣٨٦). تولید جنین های هاپلوئید از طریق کشت میکروسپور در گندم. مجله علوم کشاورزی ایران، دوره ها ١-٣٨، شماره ٢: ٢٧٥-٢٦٧.

٢. شیردل مغانلو، ح.، معینی، ا.، موسوی، ا. (١٣٨٦). بررسی اثرات ژنوتیپ، شرایط رشد گیاهان مادری، پیش تیمار و محیط کشت القاء رویان زایی در کشت میکروسپور گندم. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس.

1. Abdollahi M.R. Moieni A. Mousavi A. Salmanian A.H. Jalali Javaran M. and Majdi M. (2007). Effect of integrated bombardment and Agrobacterium transformation system on transient GUS expression in hypocotyls of rapeseed (*Brassica napus* L. cv. PF_{704}) microspore-derived embryos. Pak. J. Biol. Sci.10: 3141-3145.

2. Agache S. Bachelier B. de Buyser J. Henry Y. and Snape J. (1989). Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines.Theor. Appl. Genet. 77: 7–11.

3. Chu C. Hill R. and Brule-babel A. (1990). High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. Plant Sci. 66: 255-262.

4. Chuang C.C. Ouyang J.W. Chia H. and Chou S.M. (1978). A set of potato media for wheat anther culture. In: Plant Tissue Culture. Proc., Science Press, Peking, PP. 51-56.

Archive of SID
www.SID.ir

5. Cistue L. Soriano M. Castillo A.M. Valles M.P. Sanz J.M. and Echavarri B. (2006). Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Rep. 25: 257–264.

6. Gustafson V.D. Baenziger P.S. Wright M.S. Stroup W.W. and Yen Y. (1995). Isolated wheat microspore culture. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 42: 207–213.

7. Hu T. and Kasha K.J. (1997). Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. Plant Cell Rep. 16: 520–525.

8. Hu T. and Kasha K.J. (1999). A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. Genome 42: 432–441.

9. Indrianto A. Barinova I. Touraev A. and Heberle-Bors E. (2001). Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. Planta 212: 163–174.

10. Indrianto A. Heberle-Bors E. and Touraev A. (1999). Assessment of various stresses and carbohydrates for their effects on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. Plant Sci. 143:71–79

11. Kasha K.J. Yao Q. Simion E. Hu T. and Oro R. (1995). Production and application of doubled haploids in crops. In: Induced mutation and molecular teqniques for crop improvement. Proc., Vienna, Austeria, PP. 23-37.

12. Lantos C. Jancso M. and Pauk J**.** **(**2005). Microspore culture of small grain cereals. Acta Physiologia Plantarum 27: 631-639.

13. Lantos C. Paricsi S. Zofajova A. Weyen J. and Pauk J. (2006). Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with Hungarian cultivars. Acta Biologica Szegediensis. 50: 31-35.

14. Liu W. Zheng M.Y. Polle E.A. and Konzak C.F. (2002). Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. Crop Sci. 42: 686–692.

15. Moieni A. and Sarrafi A. (1995). Genetic analysis for haploid-regeneration responses of hexaploid-wheat anther cultures. Plant Breed. 114: 247–249.

16. Mejza S.J. Morgant V. DiBona D.E. and Wong J.R. (1993). Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum* L. Plant Cell Rep. 12: 149-153.

17. Olsen F.L. (1988). Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of *Hordeum vulgare* L. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagines as nitrogene sources. Carlsberg Res. Commun. 52: 393-404.

18. Ouyang J.W. Jia S.G. Zhang C. Chen XD and Feny G.H. (1988). A new synthetic medium (W14 medium) for wheat anther culture. In: Annual Report for 1988 of Institute of Genetics. Academia Sinica: Beijing, PP. 91-92.

19. Patel M. Darvey N.L. Marshall D.R. and Berry J.O. (2004). Optimization of culture conditions for improved plant regeneration efficiency from wheat microspore culture. Euphytica 140: 197–204.

20. Shirdelmoghanloo H. Moieni A. and Mousavi A. (2009). Effects of embryo induction media and pretreatments in isolated microspore culture of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Falat). African Journal of Biotechnology 8(22): 6134-6140.

21. Touraev A. Indrianto A.Wratschko I. Vicente O. and Heberle-Bors E. (1996). Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. Sex Plant Reprod. 9: 209–215.

22. Touraev A. Pfosser M. and Heberle-Bors E. (2001). The microspore: a haploid multipurpose cell. Adv. Bot. Res. 35: 53–109.

23. Wang P. and Chen Y.R. (1986). A study on the application of C17 medium for anther culture. Acta Bot. Sin. 28: 38-45.

24. Zheng M.Y. (2003). Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.) - doubled haploid production via induced embryogenesis. Plant Cell Tiss. and Org. Cult. 73: 213-230.

25. Zheng M.Y. Liu W. Weng Y. Polle E. and Konzak C.F. (2001). Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores treated with inducer chemicals. Plant Cell Rep. 20: 685–690.

26. Zheng M.Y. Weng Y. Liu W. and Konzak C.F. (2002). The effect of ovary-conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Rep. 20: 802-807.

27. Zhuang J.J. and Xu J. (1983). Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: Cell and Tissue Culture Techniques

Archive of SID

www.SID.ir

for Cereal Crop Improvement. Hu H, Vega MR eds., Science Press: Beijing, PP: 431-432.

Effects of Cultivar, Pretreatment and Embryo Induction Medium in Isolated Microspore Culture of Hexaploid Wheat (*Triticum aestivum* L.)

Shirdelmoghanloo H.[1], Moieni A.[1] and Mousavi A.[2]

[1] **Plant Breeding and Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN**

[2] **Plant Biotechnology Dept., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. IRAN**

Abstract

Haploids and doubled haploids plants are important materials for production of genetically homozygous lines, genetic analysis, induction of mutation, genome mapping etc. Among the haploid plants production methods, isolated microspore culture has advantages over other methods. The efficiency of microspore culture is influenced by different factors. In this research, the effects of 3 factors including cultivar (in 2 levels: Moghan1 and Atrak), pretreatment (in 4 levels: control, 21 days cold, 7 days cold + mannitol and cold + (chemical + heat)) and embryo induction medium (in 5 levels: NPB-99, C17, W14, CHB-2 and P2) in isolated microspore culture of hexaploid wheat were investigated. Results showed significant interaction effects between cultivars and pretreatment and embryo induction medium. In both of the studied cultivars (Moghan1 and Atrak), "7 days cold + mannitol" pretreatment produced the highest mean of embryogenesis (81.33 ± 4.66 & 92.33 ± 2.33), total plant regeneration (29.33 ± 2.02 & 39.33 ± 0.33) and green plant regeneration (12.46 ± 0.68 & 27.03 ± 1.35). In the case of medium, in cultivar Moghan1 the highest means of embryogenesis (422.08 ± 7), total plant regeneration (31.66 ± 1.45), and green plant regeneration (26.5 ± 2.29) were produced using C17 medium, but cultivar Atrack produced the highest means of embryogenesis (211.75 ± 8.77) and green plant regeneration (32.53 ± 0.76) in CHB-2 medium, and the highest mean of total plant regeneration (51 ± 3.78) in W14 medium.

Keywords: Isolated microspore culture, Pretreatment, Embryo induction medium, Hexaploid Wheat, Cultivar

Archive of SID

www.SID.ir