Crop Biotech.
Spring & Summer (2013) 4: 61-68

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره چهارم، بهار و تابستان ۱۳۹۲ (۶۸- ۶۱)

اثرات موتاژن EMS بر القاء جنین‌زایی میکروسپور و باززایی گیاهان هاپلوئید در کلزا (*Brassica napus* L.)

مریم توکلی[۱] و مهران عنایتی شریعت‌پناهی[۲]*
۱، دانشجوی کارشناسی‌ارشد دانشگاه کرمانشاه ، ۲، استادیار بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۱۹ ـ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۶/۴)

Effect of EMS on Microspore Embryogenesis Induction and Haploid Plant Regeneration in Rapeseed (*Brassica napus* L.)

M. TAVAKOLI[1] AND M. E. SHARIATPANAHI[2]*
1, M. Sc. Student, Kermanshah University, Kermanshah, Iran. 2, Assistant Professor, Department of Tissue Culture and Gene Transformation, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran;
(Received: February 8, 2013 - Accepted: August 26, 2013)

چکیده

تحقیق حاضر با هدف بهینه‌سازی به‌کارگیری تکنیک موتاسیون در جنین‌زایی میکروسپورهای کلزا انجام شد. هیبریدهای Hyola 401 و Hyola 420 به‌عنوان مواد گیاهی و موتاژن شیمیایی EMS (اتیل متان سولفونات) استفاده گردیدند. استوک EMS برای غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد با استفاده از محیط کشت NLN13 تهیه و میکروسپورها در غلظت‌های موردنظر و با زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه تیمار شدند. بعد از اعمال تیمار، میکروسپورها در محیط NLN13 کشت و سپس به‌مدت ۱۴ روز در دمای ۳۰°C قرار داده شدند. نتایج نشان داد که در هر دو هیبرید در غلظت ۰/۱ درصد موتاژن و زمان ۹۰ دقیقه بیشترین تعداد جنین‌ها به‌دست آمد. هر سه غلظت به‌کار برده شده از EMS و شاهد در مدت زمان ۹۰ دقیقه از نظر جنین‌زایی اختلاف معنی‌داری با هم داشتند و هر چه غلظت در این زمان افزایش یافت تعداد جنین‌های به‌دست آمده کمتر بود. جنین‌ها پس از انتقال به محیط B_5 همراه با اسیدجیبرلیک و نگهداری در دمای ۴°C و تاریکی به‌مدت ۱۰ روز به انکوباتور با دمای ۲۵°C منتقل شدند. گیاهچه‌های رشدکرده به محیط باززایی B_5 بدون اسیدجیبرلیک انتقال یافتند. در هر دو هیبرید غلظت ۰/۳٪ از EMS که در مدت زمان ۹۰ دقیقه اعمال شده بود، دارای بیشترین میزان باززایی کل بود.

واژه‌های کلیدی: میکروسپور، موتاسیون، EMS، جنین‌زایی، باززایی

Abstract

In this study, an experiment was designed for optimization of mutation application on microspore embryogenesis of canola, regeneration of embryos and producing haploid plants, from Hayola 401 and Hayola 402 hybrids using EMS mutagen treatments. EMS stocks were prepared for 0.1, 0.2 and 0.3 percent using NLN13 culture medium and then microspores were cultured in NLN13 medium. Then, they were stressed by heat shock (30°C for 14 days). The results showed that in both hybrids by 0.1 % mutagen treatment for 90 minutes, the highest numbers of embryos achieved. So in the 90 minutes durations all of three applied concentrations from EMS and the control had significant differences and by increasing the concentration along this duration, fewer embryos were achieved. Afterwards, embryos were transferred to B5 medium containing gibberellic acid and incubated at 25°C and after full growth they were transferred to B5 medium without gibberellic acid. The results in both hybrids showed that the highest numbers of regenerates were produced when EMS (0.3% for 90 min) was applied to isolated microspores.

Keywords: Microspores, Mutation, EMS, Embryogenesis, Regeneration

نویسنده مسئول: مهران عنایتی شریعت‌پناهی
E-mail: mehran.shariatpanahi@abrii.ac.ir

مقدمه

کلزا با داشتن ٪۴۵-۴۰ روغن و ٪۴۵-۳۸ پروتئین در فهرست دانه‌های روغنی قابل کشت در کشور قرار گرفته است (Negaresh. 2008). تکنیک موتاسیون به‌طور وسیعی به‌منظور بهبود کیفیت محصولات زراعی و ایجاد مقاومت به بیماری‌ها و آفات به‌کار برده می‌شود. این تکنیک می‌تواند تعداد زیادی ژرم‌پلاسم با خصوصیات مطلوب و جدید را فراهم کند (Liu *et al.*, 2005). ترکیب تکنیک موتاسیون و گزینش در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) مخصوصاً در سطح هاپلوئیدی، اجازه انتخاب صفاتی را می‌دهد که به‌وسیله ژن‌های مغلوب یا غالب کنترل می‌شوند و بدین‌وسیله می‌تواند جهش‌یافته‌های مطلوب را افزایش دهد (Liu *et al.*, 2005). روش‌های متعددی جهت تولید گیاهان هاپلوئید و به دنبال آن گیاهان دابلدهاپلوئید وجود دارد که یکی از عمومی‌ترین آن‌ها آندروژنز می‌باشد که به دو روش کشت بساک و کشت میکروسپور انجام می‌گیرد (Enayti Shariatpanahi and Emami Meybodi. 2009). مستقل‌بودن از دیواره بساک، ایده‌آل‌بودن میکروسپورها برای اعمال تیمارهای موتاژن و بررسی موتاسیون‌ها، امکان استفاده از آن‌ها در انتقال‌ژن و توانایی تولید تعداد زیادی لاین دابلدهاپلویید از مزایای کشت میکروسپور می‌باشد (Palmer and Keller. 1999). کشت میکروسپورهای کلزا برای اولین بار توسط Litcher در سال ۱۹۸۲ گزارش گردید. کشت میکروسپور کلزا ابزاری مفید جهت تولید گیاهان هاپلوئید و لاین‌های هموزیگوت در برنامه‌های اصلاحی و یک سیستم مؤثر برای دستکاری‌های ژنتیکی می‌باشد (Barro *et al.*, 2001).

نتیجه نمو طبیعی میکروسپور در گیاه تمایز آن به دانه‌گرده و انجام لقاح با سلول تخمک می‌باشد. اما میکروسپورهای جداشده دو مسیر را پیش رو دارند: در صورت عدم‌اعمال تنش و کشت در محیط آزمایشگاهی و شرایط درون‌شیشه‌ای (*In vitro*) به دانه‌گرده رسیده و بالغ و گامتوفیت نر بارور تمایز پیدا می‌کند و در صورت اعمال تنش میکروسپورها از مسیر گامتوفیتی خارج و وارد مسیر اسپروفیتی می‌شوند. به‌عبارتی به‌طور مکرر تقسیم شده و به سمت جنین‌زایی هدایت می‌شوند و در نتیجه تولید جنین می‌کنند (Maluszynski. 2003). تنش‌ها به سه دسته کلی تقسیم شده‌اند: دسته اول تنش‌هایی است که به فراوانی مورد استفاده قرار می‌گیرند مانند سرما، گرما، کمبود موادغذایی و کلشی‌سین. دسته دوم تنش‌هایی که کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند مانند اشعه‌گاما، تنش اتانول، تیمار سانتریفیوژ، کاهش فشار اسمزی و آبسیزیک‌اسید. دسته سوم تنش‌هایی هستند که جدیداً مورد استفاده قرار گرفته‌اند شامل pH بالای محیط، الیگوساکارید کاراگینن، تنش‌های فلزهای سنگین و القاءکننده‌های شیمیایی می‌باشند (Shariatpanahi *et al.*, 2006). اختلاف در میزان جنین‌زایی در میان گونه‌ها، ژنوتیپ‌ها و در میان گیاهان با ژنوتیپ یکسان دیده می‌شود (Ferrie. 2003). استفاده از یک موتاژن در کشت میکروسپور یا کشت‌بساک در گونه‌های کمی انجام شده است. EMS یک موتاژن با کاربرد گسترده است اما انواع دیگری نظیر ENU (اتیل نیتروز)، سدیم‌آزید (NaN_3) یا اشعه گاما نیز استفاده شده است (Polsoni *et al.*, 1988). در کشت میکروسپورهای جو تیمارشده با سدیم‌آزید بیشترین میزان جنین‌زایی در غلظت ۰/۰۰۰۱ مولار برای مدت یک ساعت به‌دست‌آمده است (Castillo *et al.*, 2001). در آزمایشی اثر اشعه گاما (دز ۱۰ گری) باعث افزایش جنین‌زایی در بساک‌های کشت شده و کاهش جنین‌زایی در میکروسپورهای کلزا شد (Macdonald *et al.*, 1988). تحقیق حاضر با هدف بهینه‌سازی به‌کارگیری تکنیک موتاسیون (با استفاده از موتاژن EMS) بر جنین‌زایی میکروسپورهای کلزا و باززایی جنین‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش بذور هیبریدهای Hyola 401 و Hyola 420 از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه و در گلخانه‌های پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کشت شدند. غنچه‌های کلزا به‌طول مناسب ۴/۵-۳/۵ میلی‌متر که دارای میکروسپورهایی در مرحله انتهای تک‌سلولی بودند، از هیبریدهای مذکور در گلخانه جدا و سپس در اتاق کشت زیر لامینار در هیپوکلریت‌سدیم ۳/۵ ٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. سپس سه بار شستشو با آب‌مقطر استریل هر دفعه به‌مدت سه دقیقه انجام شد. جهت جداسازی میکروسپورها، بساک‌ها در داخل محیط جداسازی (۱۳٪ ساکارز با pH= ۶) له شدند. محلول سوسپانسیون حاوی میکروسپورها از الک آزمایشگاهی با اندازه سوراخ‌هایی به قطر ۶۸ میکرومتر عبور داده شد. سوسپانسیون حاوی میکروسپورها، داخل لوله‌های آزمایشگاهی ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس دو بار با سرعت ۱۲۷۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و سپس مایع سبزرنگ رویی حذف شد. رسوب

زردرنگ ته‌نشین شده با اضافه‌کردن ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت NLN-13 رقیق گردید. به‌منظور ایجاد جهش، میکروسپورها به داخل میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری توزیع شدند و ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت NLN-13 (Lichter. 1982) حاوی EMS (Ethyl methanesulfonate) با غلظت‌های متفاوت ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد حجمی به آن‌ها اضافه شده، سپس به‌مدت ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه در داخل یخچال نگهداری شدند. پس از اعمال تیمار دو بار شستشو با محیط کشت NLN-13 و سانتریفیوژ آن با ۲۰۰۰ rpm به‌مدت ۱ دقیقه انجام گرفت. برای کشت میکروسپورها در هر پتری‌دیش ۶ سانتی‌متری، ۵/۸ میلی‌لیتر از محیط NLN-13 توزیع شد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروسپورهای رقیق‌شده به آن اضافه گردید. سپس میکروسپورها ابتدا به‌مدت ۱۴ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و بعد از آن به‌مدت سه هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار گرفتند. جنین‌ها در مرحله لپه‌ای یا نیزه‌ای شکل به محیط باززایی B5 حاوی اسیدجیبرلیک (۰/۰۱ mg/l) منتقل شدند. به‌منظور تیمار سرمایی جهت جلوگیری از جنین‌زایی ثانویه و تولید گیاهچه‌های نرمال، جنین‌ها در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ روز قرار داده شدند. سپس جنین‌ها به داخل اتاق رشدی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. گیاهچه‌های تولیدشده به محیط B5 بدون اسیدجیبرلیک در داخل شیشه انتقال داده شدند.

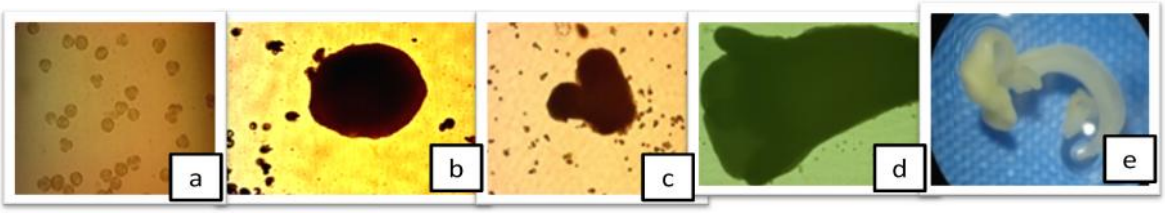
ظروفی که به EMS آغشته شدند یکبار مصرف بودند و بعد از استفاده ابتدا EMS آن خنثی شده و بعد در نایلون و سطل مخصوصی جمع‌آوری و سوزانده شدند. باقیمانده EMS استفاده‌شده هرگز نباید در چاه فاضلاب ریخته شود. EMS هرگز در آب شسته و حل نمی‌شود لذا باقیمانده EMS استفاده‌شده و ظروف آلوده در محلول سدیم‌تیوسولفات ۵٪ ($Na_2S_2O_3$) به‌مدت ۲۴ ساعت و در زیر هود نگهداری و بعد از غیرفعال و خنثی‌شدن EMS، در نایلون و سطل مخصوص جمع‌آوری و سوزانده شد. در مرحله اول میانگین تعداد جنین‌های تشکیل‌شده از ۲۵ غنچه و در مرحله دوم درصد جنین‌های باززایی شده (تعداد گیاهچه‌های رشدکرده و نرمال و قابل انتقال به محیط B5 بدون اسیدجیبرلیک یا باززایی کل) برای هر دو هیبرید محاسبه گردید.

آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل و بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. در آزمایش‌ها ابتدا آزمون نرمال‌بودن توسط نرم‌افزار MINITAB انجام گرفت. طبق نمودار نرم افزار MINITAB، در صورت نیاز به تبدیل داده به‌دلیل عدم نرمال‌بودن از تبدیل مناسب داده‌ها استفاده شد. پس از انجام تجزیه واریانس و مقایسه میانگین، داده‌ها به مقیاس اصلی خود باز گردانده شدند. کلیه تجزیه واریانس‌ها و مقایسه میانگین‌ها با نرم‌افزار MSTATC انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون دانکن در سطح احتمال پنج و یک درصد انجام گردید. نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

بررسی جنین‌های حاصل از میکروسپورهای هیبرید Hyola 401

میکروسپورهای جداشده از هیبریدهای Hyola 401 و Hyola 420 به‌منظور افزایش القاء جنین‌زایی ابتدا تحت تأثیر پیش‌تیمار EMS با غلظت‌های متفاوت ۰/۱٪، ۰/۲٪ و ۰/۳٪ و در زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس تیمار حرارتی ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۴ روز بر روی آن‌ها اعمال شد. میکروسپورها مراحل مختلف جنین‌زایی را در داخل محیط NLN13 طی کرده و برای رشد کامل و تشکیل جنین‌های نرمال یا نیزه‌ای شکل به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند (شکل۱).



شکل ۱– مراحل مختلف جنین‌زایی میکروسپور در کلزا. a: میکروسپور سه لوپی. b: جنین کروی. C: جنین قلبی. d و e: جنین نیزه‌ای و نرمال

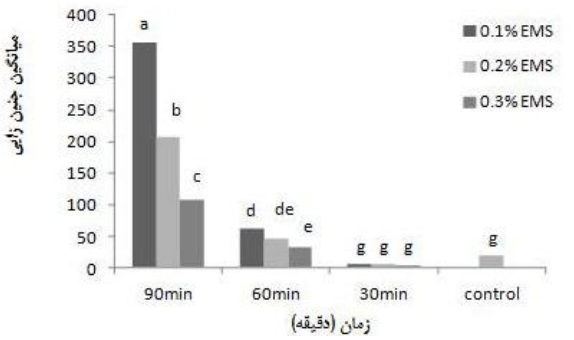
جدول ۱ نشان می‌دهد که اختلاف بین مدت زمان تیمار، غلظت‌های اعمال‌شده و اثر متقابل آن‌ها از نظر تعداد جنین‌های حاصل از میکروسپورها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج شکل ۲ حاکی از آنست که اثر متقابل

غلظت و زمان در میزان کل جنین‌زایی هیبرید Hyola 401 در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. به‌طوری‌که بیشترین تعداد جنین زمانی مشاهده شد که غلظت ۰/۱ درصد از EMS به‌مدت ۹۰ دقیقه برروی میکروسپورها اعمال شد. بعد از آن به‌ترتیب غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۳ درصد و با مدت زمان ۹۰ دقیقه بیشترین میزان جنین‌زایی را نشان دادند. (شکل ۴). این اختلافات معنی‌دار بین غلظت‌ها و شاهد در مدت زمان اعمال تیمار ۶۰ دقیقه نیز مشاهده شد. میزان کشندگی EMS بر سلول‌ها بررسی نشد به این ترتیب، پس از زمان ۹۰ دقیقه، غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد در مدت زمان ۶۰ دقیقه بیشترین میزان جنین‌ها را تولید و اختلافات معنی‌داری با هم داشتند. اما وقتی که مدت زمان اعمال تیمار، ۳۰ دقیقه بود، هیچ یک از غلظت‌های یاد شده با هم و در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند (شکل ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس زمان تیمار EMS، غلظت تیمار EMS و اثرات متقابل آن‌ها برروی جنین‌زایی در هیبرید Hyola 401

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
دما	۲	۵/۹۹**
غلظت	۳	۰/۵۵**
دما × غلظت	۶	۰/۱۳**
خطا	۳۴	۰/۰۱۶

** اختلاف معنی دار در سطح ۱٪



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و زمان بر میزان جنین‌زایی میکروسپورهای کلزا در هیبرید Hyola 401

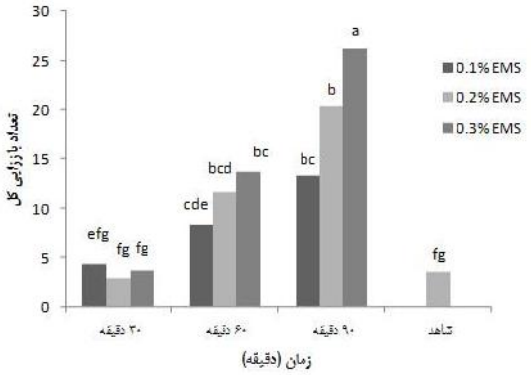
بررسی جنین‌های حاصل از میکروسپورهای هیبرید Hyola 420

نتایج تجزیه واریانس مندرج در جدول ۲ نشان داد که اثر زمان، غلظت و اثر متقابل آن‌ها از نظر تعداد جنین‌های حاصل از میکروسپورها دارای اختلاف بسیار معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد می‌باشد. همان‌طور که از شکل ۳ بر می‌آید در مدت زمان ۹۰ دقیقه غلظت ۰/۱ درصد EMS به‌کار رفته، بیشترین میزان جنین‌زایی را نشان می‌دهد و اختلاف معنی‌داری با سایر غلظت‌ها و زمان‌ها دارد و ضمناً شاهد (غلظت صفر EMS) کمترین میزان جنین‌زایی را نشان می‌دهد. در مدت زمان ۹۰ دقیقه هر سه غلظت به‌کار برده شده از EMS و همچنین شاهد دارای اختلاف معنی‌داری باهم بودند که نشان‌دهنده تأثیر EMS در غلظت ۰/۱ درصد بر افزایش میزان جنین‌زایی است. اما هرچه غلظت در این زمان افزایش می‌یابد، میزان جنین‌زایی روبرو کاهش می‌یابد اما در مقایسه با شاهد تعداد جنین‌های بیشتری مشاهده شد و این اختلاف بین شاهد و غلظت‌ها معنی‌دار بود. نتایج نشان می‌دهد این موتاژن شیمیایی در هر دو هیبرید می‌تواند بر روی صفت جنین‌زایی تأثیر بگذارد و باعث افزایش آن بشود. این افزایش تنها در غلظت پایین EMS (۰/۱ درصد) مشاهده می‌شود که با افزایش زمان اعمال تیمار، تأثیر آن نیز بیشتر می‌شود.

جدول ۲- تجزیه واریانس زمان، غلظت و اثرات متقابل آن‌ها برروی جنین‌زایی در هیبرید Hyola 420

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
دما	۲	۰/۶۷**
غلظت	۳	۰/۴۲**
دما × غلظت	۶	۰/۲۱**
خطا	۳۴	۰/۰۱۱

** اختلاف معنی دار در سطح ۱٪



شکل۳- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و زمان برجنین‌زایی میکروسپورهای کلزا در هیبرید Hyola 420

EMS موجب جهش‌های نقطه‌ای می‌شود. موتاژن EMS گروه‌های آلکیلی را به‌وسیله پیوندهای هیدروژنی به اکسیژن با گوانین اضافه می‌کند و ۶-۵ آلکیلی گوانین را تولید می‌کند که با تیمین (به جای سیتوزین) جفت می‌شود و سبب جابجایی A/T با G/C می‌شود. EMS روی قطعه بسیار کوچکی از کروموزوم که حامل یک یا چند ژن می‌باشد، اثر می‌گذرد (Waungh *et al.*, 2006). هنگامی‌که غلظت

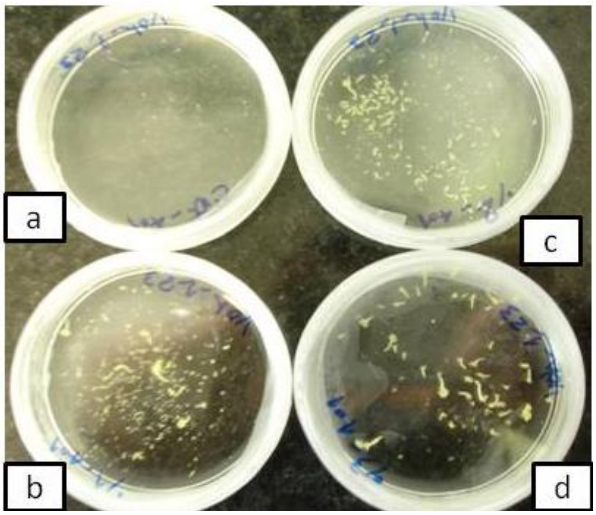
EMS بیشتر می‌شود، خاصیت سمی پیدا می‌کند و باعث مرگ میکروسپورهای بیشتری می‌شود، گرچه نتایج نشان داد که باز هم تعداد جنین‌های تولیدی در غلظت‌های بالاتر، از شاهد بیشتر است. این نتایج حاکی از آن بوده است که EMS در غلظت و زمان مشخص می‌تواند در کنار شوک حرارتی، عامل محرکی برای افزایش میزان جنین‌زایی در میکرسپورهای کلزا باشد. سودمندی استفاده از موتاژن برای تحریک آندروژنز (نرزایی) در غلظت‌های کم موتاژن (برای EMS، سدیم‌آزید و اشعه گاما) گزارش شده است (Vagra *et al.*, 1976; Macdonald *et al.*, 1988; Lee and Lee. 2002).

Polsoni *et al.*, (1998) اثرات موتاژن EMS را برروی جنین‌زایی کلزا بررسی کردند و مشاهده کردند که غلظت ۰/۱ درصد EMS به‌مدت ۶۰ دقیقه، ۴۵ درصد جنین‌زایی را کاهش می‌دهد که با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق مطابقت نداشت. به‌نظر می‌رسد ژنوتیپ نقش مهمی در این رابطه دارد. غلظت و مدت زمان مورد استفاده از تیمار موتاژن به گونه‌ها، ژنوتیپ‌ها و انواع موتاژن‌های مورد استفاده بستگی دارد (Ahmad *et al.*, 1991; Zhang and Takahata. 1999).

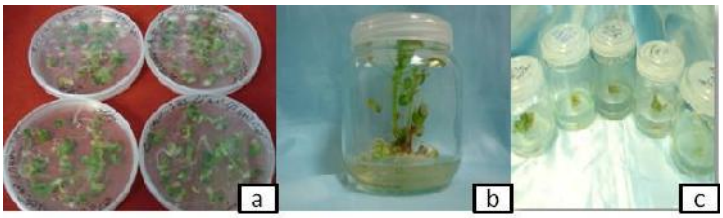
He-yun wan *et al.*, (2007) گزارش نمودند که غلظت‌های پایین EMS می‌تواند محرکی برای جنین‌زایی باشد. آن‌ها غلظت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۱ درصد از EMS را بر روی میکروسپورهای ایزوله‌شده و جنین‌هایی که در مرحله لپه‌ای شکل بودند در گیاه کلزا آزمایش کردند. زمان‌های به‌کار برده شده ۱، ۵ و ۱۵ ساعت بود. بهترین نتیجه هنگامی به‌دست آمد که میکروسپورهای ایزوله‌شده با غلظت ۰/۰۱ درصد EMS و مدت ۵ ساعت تیمار شدند و بیشترین تعداد جنین‌ها را به‌دست آوردند (He-yun wan *et al.*, 2007). تحریک جنین‌زایی در غلظت پایین EMS (۰/۱ درصد) در هیبریدهای Hyola 401 و Hyola 420 با نتایج آزمایشات فوق مطابقت داشت.

بررسی باززایی گیاهچه‌های حاصل از میکروسپور در هیبرید Hyola 401

پس از انتقال جنین‌ها به محیط باززایی B5 همراه با جیبرلیک‌اسید، درصد باززایی جنین‌ها و گیاهچه‌های تولیدشده یا باززایی کل محاسبه شد و اثر EMS بر باززایی کل مورد بررسی قرار گرفت. تعداد گیاهچه‌هایی که در پتری‌دیش‌ها رشد کرده بودند برای هر غلظت و زمان مشخص شمرده شده و سپس به محیط نهایی B5 بدون جیبرلیک‌اسید انتقال داده شدند (شکل ۵). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین غلظت‌های مختلف و زمان‌های متفاوت اعمال تیمار موتاژن تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول ۳). نتایج حاکی از آن است که وقتی میکروسپورها تحت تیمار ۹۰ دقیقه و غلظت های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد قرار می‌گیرند دارای باززایی بیشتری می‌باشند، به‌طوری‌که دارای اختلاف معنی‌داری با سایر غلظت‌ها و زمان‌ها هستند (شکل ۶). تیمار ۶۰ دقیقه و غلظت‌های آن نیز تفاوت معنی‌داری را با زمان ۳۰ دقیقه نشان می‌دهد و دارای تعداد گیاهچه‌های باززا شده بیشتری می‌باشد. با وجود نتایج به‌دست‌آمده به‌نظر می‌رسد عوامل مهم دیگری نظیر میزان بلوغ جنین در زمان انتقال به محیط باززایی، طول دوره جنین‌زایی و سنین مختلف جنین می‌تواند تأثیر معنی‌داری بر روی درصد باززایی جدا از مسأله تیمار EMS داشته باشد.



شکل ۴- مقایسه فراوانی جنین‌های تشکیل‌شده از میکروسپورهای تیمارشده با EMS (در زمان ۹۰ دقیقه و غلظت‌های متفاوت) در هیبرید Hyola 401 a- شاهد (بدون تیمار EMS). b- EMS ۰/۱ ٪ . c- EMS ۰/۲٪ d- EMS ۰/۳٪



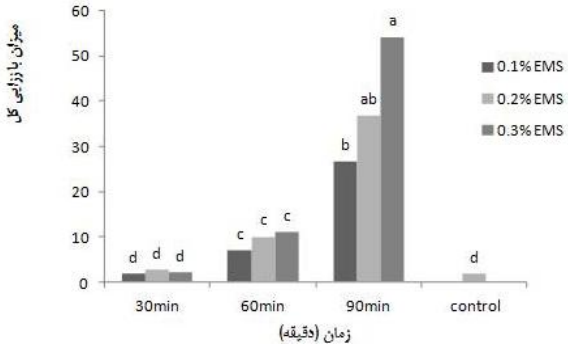
شکل ۵- باززایی جنین‌ها و تولید گیاهچه‌ها. a: باززایی جنین‌ها در محیط B5 همراه با جیبرلیک‌اسید. b و c: انتقال گیاهچه‌ها به محیط B5 بدون جیبرلیک‌اسید

این در حالی است که جنین‌زایی هنگامی افزایش پیدا کرد که میکروسپورها با غلظت پایین‌تری از EMS و زمان بیشتر تیمار شده بودند. این موضوع نشان می‌دهد که میزان جنین‌زایی می‌تواند با راندمان تبدیل جنین‌ها به گیاهچه ارتباط مستقیمی نداشته باشد. Habibzadeh (2008) اثر تیمار شیمیایی 2,4-D را بر روی جنین‌زایی و باززایی میکروسپورهای کلزا بررسی کردند و متوجه شدند که بیشترین میزان جنین‌زایی مربوط به کنترل (تیمار حرارتی) می‌باشد اما بیشترین میزان باززایی هنگامی است که میکروسپورها تحت تنش شیمیایی 2,4-D با میزان ۲۵ mg/l و به‌مدت ۲۰ دقیقه قرار می‌گیرند.

جدول ۳- تجزیه واریانس زمان، غلظت و اثرات متقابل آن‌ها برروی باززایی گیاهچه‌ها در هیبرید Hyola 401

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
دما	۲	۲/۴۴**
غلظت	۳	۱/۱۹**
دما × غلظت	۶	۰/۴۶**
خطا	۳۴	۰/۰۳

** اختلاف معنی دار در سطح ۱٪



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و زمان بربازززایی کل میکروسپورهای کلزا در Hyola 401

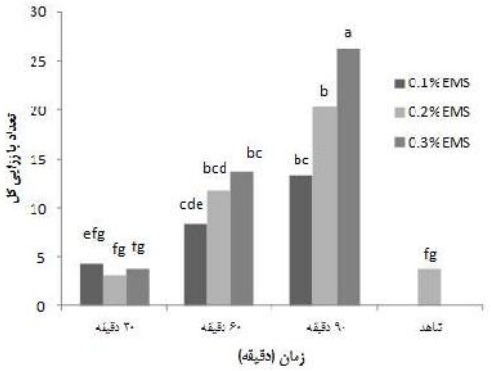
بررسی باززایی گیاهچه‌های حاصل از میکروسپور در هیبرید Hyola 420

همان‌طور که از جدول تجزیه واریانس شماره ۴ بر می‌آید اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف زمان، غلظت و اثرات متقابل آن‌ها وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین تعداد گیاهچه‌های باززا نشان داد که بیشترین فراوانی باززایی مربوط به تیمار میکروسپورها با EMS در غلظت ۰/۳ درصد و زمان ۹۰ دقیقه بود به‌طوری‌که اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با سایر غلظت‌ها و زمان‌ها نشان داد (شکل ۷). در واقع هرچه به سمت غلظت‌ها و زمان‌های بالاتر می‌رویم، جنین‌ها توانایی بیشتری برای باززایی پیدا کردند. تیمار میکروسپورها با زمان و غلظت کم نیز در بین غلظت‌های اعمال شده، کمترین تعداد گیاهچه‌های باززا شده را داشت. وجود اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های بالای EMS (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد) و مدت زمان‌های طولانی‌تر (۶۰ دقیقه و ۹۰ دقیقه) با زمان و غلظت‌های پایین‌تر (۰/۱ درصد و نیم‌ساعت) نشان‌دهنده این مطلب بود که EMS می‌تواند به‌عنوان محرکی برای افزایش توانایی باززایی جنین‌ها به‌کار برده شود. این مطلب در مورد هیبرید Hyola 401 نیز صدق می‌کند.

جدول ۴- تجزیه واریانس زمان، غلظت و اثرات متقابل آن‌ها برروی باززایی گیاهچه‌ها در هیبرید Hyola 420

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
دما	۲	۱۱/۳۴**
غلظت	۳	۵/۸۵**
دما × غلظت	۶	۴/۷۶**
خطا	۳۴	۳/۳۷

** اختلاف معنی دار در سطح ۱٪



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و زمان بربازززایی کل میکروسپورهای کلزا در Hyola 420

Lee and Lee (2002) اثر تیمار EMS را بر روی القاء کالوس‌های حاصل از پرچم در برنج به‌منظور تولید موتانت‌های پایدار بررسی کردند. نتایج تحقیق حاکی از آن بود که وقتی غلظت ۰/۵ درصد از EMS را به‌مدت ۶ ساعت برروی پرچم‌های کشت‌شده برنج به‌کار می‌بردند نسبت به کنترل، القاء کالوس افزایش پیدا کرد اما باززایی گیاهان کاهش پیدا کرد. این مطلب نشان می‌دهد که EMS می‌تواند جنین‌زایی، القاء کالوس و باززایی گیاهان را تحت تأثیر قرار دهد. نوع گیاه مورد استفاده، زمان و غلظت تیمار و ژنوتیپ در این مسئله بسیار مهم می‌باشد. Hu (1983) گزارش کرد که تیمار با EMS باززایی گیاهان سبز را کاهش داده اما آلبینو را افزایش می‌دهد. گاهی اوقات تیمارهای جهش‌زا، نسبت به تحریک کشت پرچم از قبل پاسخ‌های آندروژنیک را می‌دهند (Zhang *et al.*, 1992). این نتیجه مشخص می‌کند که دیواره پرچم نقش مهمی را برای اولین تقسیم میکروسپور دارد. Pan *et al.*, (1983) گزارش کردند که آغاز توسعه کالوس از میکروسپور به بافت دیواره پرچم وابسته است. گزارش شده است که فراوانی آندروژنیک در تیمار با EMS که فوراً بعد از کشت‌بساک انجام می‌شود می‌تواند کاهش یابد، اما هنگامی که ۱۰ روز بعد از کشت‌بساک تیمار با EMS انجام می‌شود، به‌علت حفظ دیواره بساک در این مدت، اولین تقسیم میکروسپورها به راحتی انجام شده است. به همین دلیل هنگامی که بعد از ۱۰ روز تیمار با EMS صورت می‌گیرد، افزایش القاء کالوس در مقایسه با کنترل دیده می‌شود. آن‌ها اعلام کردند که فراوانی باززایی کل در تیمار ۰/۵ درصد EMS، هنگامی که ۱۰ روز بعد از کشت بساک انجام می‌شود، در مقایسه با کنترل افزایش می‌یابد اما فراوانی موتانت‌های پایدار در مقایسه با کنترل کمتر می‌باشد. این مسئله نشان می‌دهد که مرحله کشت میکروسپور و زمان تیمار EMS برای مرحله تقسیم میکروسپور، می‌تواند در ایجاد موتانت‌های پایدار و باززایی کل مهم باشد (Lee and Lee. 2002). نتایج این تحقیق حاکی از آن بود که در صورتی که میکروسپورهای کلزا در مرحله انتهای تک‌سلولی کشت شوند و تیمار با EMS بر روی آن‌ها انجام شود، افزایش باززایی کل در غلظت و زمان مشخص تیمار با EMS (غلظت ۰/۳ درصد و زمان ۹۰ دقیقه) دیده می‌شود. غلظت بالاتر EMS می‌تواند محرکی برای افزایش توانایی جنین‌ها برای باززایی کل باشد اما ممکن است فراوانی موتانت‌های پایدار را در مقایسه با کنترل کاهش دهد که بررسی این موضوع در آینده پیشنهاد می‌شود. در تحقیق حاضر موتانت‌های ایجادشده در مرحله بذردهی در گلخانه بوده و بعداً به مزرعه برای ارزیابی‌های مزرعه‌ای منتقل خواهند شد.

به اختصار نتایج حاصل از این آزمایش حاکی از آن است که غلظت ۰/۱ درصد EMS بهترین غلظت برای افزایش جنین‌زایی در هر دو هیبرید می‌باشد ولی غلظت ۰/۳ درصد EMS بهترین غلظت برای افزایش تولید جنین‌های نرمال و بالابردن میزان باززایی است. غلظت‌های مختلف EMS در مدت زمان پایین اعمال تیمار تأثیری بر جنین‌زایی ندارد. به‌طورکلی موتاژن شیمیایی EMS علاوه بر ایجاد جهش می‌تواند باعث افزایش جنین‌زایی و باززایی در میکروسپورهای کلزا شود. این افزایش گرچه در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت می‌تواند فرق داشته باشد اما در مقایسه با کنترل در تمامی صفات مورد بررسی افزایش را نشان می‌دهد. از آنجایی‌که ژنوتیپ‌های مختلف پاسخ‌های متفاوتی را می‌توانند نشان می‌دهند پیشنهاد می‌گردد که بررسی لازم در مورد دیگر ژنوتیپ‌های کلزا انجام گیرد. همچنین موتاژن‌های فیزیکی شکست‌های بزرگتری را ایجاد می‌کنند که استفاده از آن‌ها و موتاژن‌های شیمیایی دیگر نظیر سدیم‌آزید در آینده پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

این تحقیق از پروژه تحقیقاتی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به شماره ۸۸۰۰۴-۸۶۰۱-۰۵۵۵-۰۵-۱۳ استخراج گردیده است. بدین‌وسیله از خانم مهندس مهناز عروجلو به خاطر کمک‌های آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Ahmad I, Day JP, MacDonald MV, Ingram DS (1991) Haploid culture and UV mutagenesis in rapid-cycling Brassica napus for the generation of resistance to

chlorsulfuron and Alternaria brassicicola. Annals of Botany, 67: 521.

Barro F, Fernandez J, Escobar M, Vega DL, Martin M (2001) Double haploid of *Brassica carinata* with modified euric acid content through mutagenesis by EMS treatment of isolated microspore. Plant Breeding, 120: 262-264.

Castillo AM, Cistue L, Valles MP, Sanz JM, Romagosa I, Mollina-cano JL (2001) Efficient production of androgenic doubled-haploid mutants in barley by the application of sodium azide to anther and microspore cultures. Plant Cell Rep., 20:105-111.

Enayati Shariatpanahi M, Emami Meybodi D (2009) Microspores: a haploid cell with various applications in genetics and plant breeding. Modern Genetics Journal, 4:5-19.

Ferrie AMR (2003) Microspore culture of *Brassica* species. Pp. 205-215. In: Maluszynski M., Kasha K. J.,Forster B. P., Szarejko I (eds). Doubled haploid production in crop plants, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.

Habibzadeh S (2008) Study of factors affecting microspore embryogenesis and regeneration of doubled haploids in rapeseed. M.Sc. thesis. Abouraihan Campus. Tehran University.

He-yun Wan G, Chen S, Zonglai XU, Jin, Tang G, Zhou W (2007) Effects of mutagenic treatments of isolated microspores and microspore –derived embryos on embryogenesis and plant regeneration in oilseed rape. International Rapeseed Congress. 20070326-30.

Hu Z (1983) Stimulating pollen haploid culture mutation in *Oryza sativa* subsp. Keng (Japonica). Pp. 291-301. In: Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement.

Lee JH, Lee SY (2002) Selection of stable mutant from cultured rice anther treated with ethyl methan sulfunic acid. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 71: 165-171.

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

Liu S, Wang H, Zhang J, Fitt BDL, Evans Z, Xu N, Liu Y, Yahg W, Guo X (2005) In vitro mutation and selection of double – haploid *Brassica napus* lines with improved resistance to scelrotinia sclerotiorum. Plant Cell Rep. 24:133-144.

Macdonald MV, Hadwiger MA, Aslam FN, Ingram DS (1988) The enhancement of another culture efficiency in *Brassica napus* ssp. Oleifra Metzg. (sinks) using low doses of gamma irradiation. New Phytol. 110: 101-107.

Maluszynski M (2003) Double haploid production in crop plants. Pp. 351-361. In: IEAE, Printed in the Netherlands.

Negaresh A (2008) Self confidence in production of oil crops needs at least three set of 5-year-programs. Sunflower Journal 27: 28-35.

Shariatpanahi ME, Bal UU, Heberle-Bors E, Touraev A (2006) Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. Physiologia Plantarum 127: 519-534.

Palmer CE, Keller WE (1999) Haploidy. Pp. 247-286. In: Gomez-Campo, C. (ed). Biology of Brassica Coenospecies. Elsevier Science B.V.

Polsoni L, Kott LS, Beversdorf WD (1988) Large-scale microspore culture technique for mutation selection studies in *Brassica napus*. Canadian Journal of Botany 66: 1681-1685.

Pan JL, Gao GH, Dan H (1983) Initial types of wheat pollen cells and their development in another culture. In: Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. 11: 117-129.

Vagra J, Novak FJ, Vyskot B (1976) Anther culture of *Nicotinia tabacum* L. mutatnts. Theoretical and Applied Genetics. 47: 109-114.

Waungh R, Leader, DJ, MC Callum N, Caldwell D (2006) Harvesting the potential of induced biological diversity. Trends in Plant Science, 11: 71-79.

Zhang YX, Bouvier I, Lespinasse Y (1992) Microspore embryogenesis induced by low gamma dose irradiation in apple. Plant Breeding, 108: 173-176.

Zhang FL, Takahata Y (1999) Microspore mutagenesis and in vitro selection for resistance to soft rot disease in chinese cabbage (*Brassica campestris* L. sp. Pekinesis). Breeding Science, 49: 161-166.