مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال اول، شماره اول، پاییز و زمستان ۱۳۹۰ (۲۱-۱۳)

بررسی جنین‌زایی میکروسپور در هیبریدهای مختلف گندم نان (*Triticum aestivum* L.) و معرفی پیش‌تیمار تنشی 2,4-D برای افزایش کارایی جنین‌زایی

بهاره طایفه افشاری [۱]، مهران عنایتی شریعت پناهی [۲]* و مجتبی وهابزاده [۳]
۱، بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، و گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان ۲، بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ۳، بخش تحقیقات غلات، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
(تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۲۵- تاریخ تصویب: ۹۰/۹/۲۸)

چکیده

در این پژوهش از هیبریدهای F_1 شامل M85-6×90، M85-8×90، mv17×شیرودی، کویر×mv17 و کویر× بم، با هدف بهینه‌سازی القای جنین‌زایی در میکروسپورهای جداشده گندم نان استفاده شد. میکروسپورها در محیط کشت A2 با میزان متفاوت قند مالتوز (۶۰ و ۹۰ گرم در لیتر) بسته به ژنوتیپ کشت شدند. نتایج نشان داد که از نظر صفات جنین‌زایی و باززایی بین هیبریدها تفاوت معنی‌دار وجود دارد. اما بین دو میزان قند مالتوز و اثر متقابل آن با ژنوتیپ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. هیبریدهای M85-6×90، mv17×شیرودی و mv17×کویر بیشترین جنین‌زایی را در میان سایر هیبریدها داشتند. اما بالاترین میزان باززایی جنین در هیبریدهای mv17×شیرودی و M85-6×90 مشاهده شد. در این آزمایش هم‌چنین اثر 2,4-D به‌عنوان تنش القاکننده جنین‌زایی در رقم فلات که یک رقم پاسخ‌پذیر به کشت میکروسپور محسوب می‌شود، بررسی گردید. میکروسپورها در سه غلظت ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به مدت ۳۰ دقیقه تحت تیمار قرار گرفتند، درحالی‌که از میکروسپورهای بدون اعمال تیمار 2,4-D به عنوان شاهد استفاده شد. نتایج نشان داد که فراوانی جنین‌زایی در میکروسپورهای تحت تنش با 2,4-D در غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با میکروسپورهای شاهد به‌طور معنی‌دار می‌باشد. بیشترین جنین‌زایی با اعمال ۱۵ میلی‌گرم در لیتر و بالاترین تعداد جنین‌های باززایی‌شده از غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. طبق نتایج بدست‌آمده می‌توان 2,4-D را به‌عنوان یک تنش کارآمد و جدید در القای جنین‌زایی میکروسپورهای گندم معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی: گندم، میکروسپور، جنین‌زایی، دابلدهاپلوئید، 2,4-D (۲ و ۴ دی‌کلرو فنوکسی‌استیک‌اسید)

* نویسنده مسئول: مهران عنایتی شریعت پناهی
E-mail: mehran.shariatpanahi@abrii.ac.ir

مقدمه

مهمترین امتیاز دابلدهاپلوئیدها در اصلاح گیاهان، رسیدن به خلوص کامل ژنتیکی در کمترین زمان ممکن بوده و ژنوتیپ‌های مطلوب در یک نسل، به منظور معرفی رقم و یا لاین خالص به دست می‌آیند. ویژگی خلوص کامل یا عدم تفکیک ژنتیکی جمعیت‌های دابلدهاپلوئید که موجب عدم تنوع نمونه‌برداری در برآورد واریانس و میانگین‌های ژنوتیپی می‌گردد، بسیار ارزشمند است (Snape and Simpson, 1986). جمعیت‌های دابلدهاپلوئید دستاورد بسیار مفیدی برای مطالعه کنترل ژنتیکی صفات مهم زراعی و درک بهتر روابط ژنتیکی بین صفات می‌باشند. در میان فناوری‌های مختلف برای تولید دابلدهاپلوئیدها، جنین‌زایی میکروسپور متداول‌تر است.

میکروسپور در حال‌حاضر در مرکز توجه متخصصین اصلاح‌نباتات و علوم‌گیاهی مدرن قرار دارد. علاوه بر تولید لاین‌های دابلدهاپلوئید کشت‌های میکروسپور می‌توانند در تشخیص نمو گرده، جنین‌زایی، توتی‌پتنسی، چرخه‌سلولی، نقش تنش در نمو، غلبه‌کردن بر موانع تلاقی (نرعقیمی و خودناسازگاری)، القا و انتخاب موتانت‌ها و ایجاد گیاهان تراریخته مورد استفاده قرار گیرند. میکروسپورها سلول‌های هاپلوئیدی بالقوه جنین‌زا می‌باشند که قادر هستند به طور طبیعی به دانه گرده تمایز پیدا کنند، اما میکروسپورهای ایزوله و کشت‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای در صورت عدم اعمال تنش و در یک محیط غنی از مواد غذایی به دانه گرده رسیده تمایز می‌یابند و از طرفی با اعمال تنش به طور مکرر تقسیم و به جنین نمو پیدا می‌کنند (Shariatpanahi *et al*. 2006a). جنین‌زایی میکروسپور به توانایی سلول‌های منفرد هاپلوئید میکروسپور، در جهت تمایز و باززایی به یک گیاه کامل بعد از قرارگرفتن در معرض تنش اطلاق می‌شود (Shariatpanahi *et al*. 2006a). Touraev *et al.* (1997) پیشنهاد کردند که تیمارهای مختلف القایی می‌تواند به مفهوم اشکال مختلف تنش‌های زیستی یا غیرزیستی باشد. این تنش‌ها ابتدا میسر بلوغ میکروسپور را منحرف کرده و مسبب یا القاکننده تقسیمات سوماتیکی سلول می‌شوند (Kasha *et al*. 2003).

برای تکمیل آندروژنز اضافه‌نمودن تنظیم‌کننده‌های رشدی مفید به نظر می‌رسد. برای مثال، در کشت بساک غلات رشد مناسب، بستگی به اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشدی درون‌زا دارد (Zheng. 2003). هر چند که در محیط‌های کشت ساده جنین‌زایی مستقیم، از اکسین کمتر استفاده می‌شود. زمان پاسخ‌گویی سلول‌ها و بافت‌های غلات با غلظت‌های مختلف ترکیبات فیتوهورمون‌ها، در مقایسه با دولپه‌ای‌ها نشان می‌دهد که هورمون‌ها برای رشد و توسعه غلات ضروری هستند، درحالی‌که در دولپه‌ای‌ها مقدار زیادی از هورمون گیاهی تولیدشده وجود دارد. ترکیبات تنظیم‌کننده رشدی که معمولاً در طول فاز القا در کشت بساک گندم استفاده می‌شود شامل 2,4-D و کاینتین می‌باشد (Barnabas. 2003; Pauk *et al.* 2003; Shariatpanahi *et al*. 2006b). کارآمدی مالتوز به عنوان منبع کربوهیدرات نسبت به ساکارز برای غلات ثابت شده است (Hunter. 1988) و به شکل معمول برای القا در کشت میکروسپور و بساک گندم ترجیح داده می‌شود. تجزیه زمان‌بر مالتوز مقدار کمی گلوکز فراهم می‌سازد و تأثیرات مثبت مالتوز بر کشت میکروسپور گندم ممکن است به خاطر اثر گرسنگی بر میکروسپورها در اوایل کشت باشد (Zheng. 2003). همان‌طوری‌که در هر رقم زراعی تنوع وجود دارد، شرایط نمو میکروسپور مناسب

آندروژنز دقیقاً قبل از اولین میتوز گرده تا بعد از آن فراهم می‌باشد. لیکن، بهترین مرحله همیشه قبل از ظهور دانه‌های نشاسته است. در زمان تشکیل میکروسپور در غلات، هسته در محل نزدیک منفذ آن قرار می‌گیرد. درست قبل از میتوز گرده، هسته به سمت نقطه مقابل منفذ مهاجرت کرده و میتوز اتفاق می‌افتد و منجر به تولید سلول‌های رویشی و زایشی می‌شود. سپس هسته رویشی مجدداً به سمت منفذ مهاجرت نموده و هسته زایشی در نقطه مقابل منفذ باقی می‌ماند. این سلول برای تشکیل دو گامت تقسیم می‌گردد. با قراردادن میکروسپورها در درون محیط کشت وقتی می‌توان گیاهان هاپلوئید به‌دست آورد که به هنگام کشت میکروسپور مرحله تکوینی انتهای تک سلولی باشد، یعنی در نیمه راه مهاجرت باشد. باید به خاطر داشت که همه سلول‌های میکروسپور و دانه‌گرده نارس در مرحله نمو یکسان قرار ندارند، این مطلب دلیل اینکه چرا فقط قسمت کمی از جمعیت میکروسپورها در هر کشت مشخص تبدیل به جنین می‌گردند را توضیح می‌دهد. هدف از این تحقیق، بهینه‌سازی القای جنین‌زایی در میکروسپورهای جداشده گندم و مطالعه اعمال پیش‌تیمار تنشی 2,4-D بر میکروسپور در افزایش جنین‌زایی می باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش مواد گیاهی لازم (بذور گندم) از بخش تحقیقات غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر واقع در شهرک نهال و بذر کرج و همچنین از تلاقی‌های انجام شده بین ارقام مورد نظر در مزرعه توسط این بخش تهیه و در گلخانه‌های پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی-کرج کشت گردید. تمام مراحل کشت میکروسپور در بخش تحقیقات کشت‌بافت و انتقال‌ژن این پژوهشکده انجام شد.

در این مطالعه از رقم فلات و هیبریدهای F_1 گندم استفاده شد. این هیبریدها با تلاقی ارقام مقاوم به بیماری ایجاد شده بودند. هیبریدهای تلاقی داده شده در مزرعه شامل mv17×کویر، mv17× شیرودی، کویر× بم، M85-6×90 و M85-8×90 بودند، که در گلدان و در فضای گلخانه و در دمای ۲۲-۱۸ درجه سانتی‌گراد در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی رشد داده شدند. در زمان گلدهی حدود ۱۰-۸ سنبله مناسب انتخاب می‌شود. سنبله‌هایی که داخل غلاف برگ پرچم بوده و تنها به اندازه یک شکاف باریک از داخل غلاف نمایان باشند، مناسب هستند. میکروسپورها در این حالت منطبق با مرحله اواسط تا اواخر تک سلولی می‌باشند (Shariatpanahi *et al.*, 2006b). گلچه‌های جانبی گلوم و گلومل را توسط پنس خارج کرده و هر سه بساک را با نوک پنس گرفته و داخل شیشه حاوی یک مگنت کوچک ۲ سانتی‌متری و محلول شستشوی AB (Shariatpanahi *et al.* 2006b) قرار می‌دهیم. محیط AB شبیه محیط B (Touraev *et al.* 1996) بوده با این تفاوت که علاوه بر مانیتول دارای همان مقدار سوربیتول نیز می‌باشد، ریخته شد. در این حالت همزمان تخمدان‌ها نیز جدا شده و در داخل پتری ۶ سانتی‌متری حاوی محیط کشت A260، (Shariatpanahi *et al.* 2006b) نگهداری می‌شود. با قرارگرفتن شیشه‌ها روی یک همزن مغناطیسی با دور rpm ۶۰۰-۵۰۰ به مدت حدود ۴-۳ دقیقه میکروسپورها از داخل دیواره بساک به درون محیط ریخته شده و به این ترتیب محلول سوسپانسیون سلولی از یک صافی با قطر منافذ ۶۰ میکرومتر عبور داده می‌شود. پس از عبور از صافی میکروسپورها داخل فالکن ۵۰

میلی‌لیتری جمع‌آوری شد و داخل سانتریفیوژ با دور ۱۱۰۰rpm و به مدت ۵ دقیقه قرارداده شدند. این عمل برای خالص‌سازی هر چه بیشتر رسوب حاصل از دیواره‌های سلولی بساک انجام گرفت. رسوب حاصل در محیط کشت A260، (Shariatpanahi *et al.* 2006a) کشت شد. پتری‌های حاوی میکروسپور در تاریکی در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۴ روز از آغاز کشت، تخمدان‌ها به تعداد ۴-۳ عدد در هر میلی‌لیتر به پتری های حاوی میکروسپور اضافه شده و دوباره پس از بستن در پتری‌ها با پارافیلم به انکوباتور ۲۵ درجه و شرایط تاریکی منتقل شدند. بین ۴ تا ۷ روز پس از کشت میکروسپور در گندم ساختارهای ستاره‌ای شکل در مرکز میکروسپورها مشاهده شد که نشانه حرکت آن‌ها به سمت جنین‌زایی است. حدود ۲ هفته پس از کشت، ساختارهای چندسلولی با میکروسکوپ معکوس مشاهده می‌شوند. یک تا یک ماه و نیم پس از کشت، جنین‌ها با اندازه و شکل‌های مختلف و با چشم غیرمسلح قابل مشاهده بودند. جنین‌ها به محیط باززایی A2R، (Shariatpanahi *et al.* 2006b)، که از نظر ترکیبات شبیه محیط کشت A2-60 بوده (با این تفاوت که قند به‌کار رفته در آن ساکارز است و از فیتاژل جهت جامدکردن استفاده شده است) انتقال داده شدند. جنین‌ها پس از استقرار در محیط باززایی به مدت ۱۰- ۷ روز در تاریکی در دمای ۲۵ جهت تیمار سرمایی برای جلوگیری از باززایی غیر نرمال نگهداری و پس از آن به اتاق رشد با شدت نور ۳۰۰۰-۲۰۰۰ لوکس و دمای حدود ۲۰ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند.

به منظور بهینه‌سازی فراوانی میزان جنین‌زایی پیش‌تیمار 2,4-D در سه غلظت (۱۵، ۲۵ و ۳۵ میلی‌گرم در لیتر) و تیمار شاهد بدون 2,4-D مورد آزمون قرار گرفت. چون رقم فلات پاسخ‌پذیرترین ژنوتیپ از میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی به کشت میکروسپور بود (Shariatpanahi *et al.* 2006)، لذا از این ژنوتیپ جهت بررسی پیش‌تیمار 2,4-D استفاده گردید. به منظور مقایسه پاسخ‌پذیری هیبریدهای F_1 مقاوم به بیماری به پروتکل مورد استفاده این هیبریدها بدون اعمال پیش‌تیمار و هورمون در دو محیط کشت یکسان که تنها در مقدار قند (۶۰ و ۹۰ گرم در لیتر) با یکدیگر تفاوت داشتند، کشت شدند و جنین‌های بدست‌آمده، پس از شمارش به محیط‌های باززایی انتقال یافتند. به این ترتیب اثر محیط، همچنین پاسخ‌پذیری به کشت میکروسپور و جنین‌زایی در هیبریدها و اثر متقابل محیط‌کشت (میزان مختلف قند مالتوز) با هیبریدها مورد تجزیه قرار گرفت.

در این پژوهش میزان جنین‌زایی (از روز ۴۵ ام پس از کشت) و نیز جنین‌های باززایی شده محاسبه شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و یا فاکتوریل با پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. آزمون نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام و پس از استفاده از تبدیل مناسب داده‌ها، تجزیه واریانس و مقایسات میانگین با استفاده از نرم‌افزار SAS و MSTATC انجام شد. در مورد مقایسات میانگین از روش دانکن در سطح احتمال ۱٪ استفاده شد.

نتایج و بحث

اثر تیمار 2,4-D بر فراوانی جنین‌زایی در رقم فلات

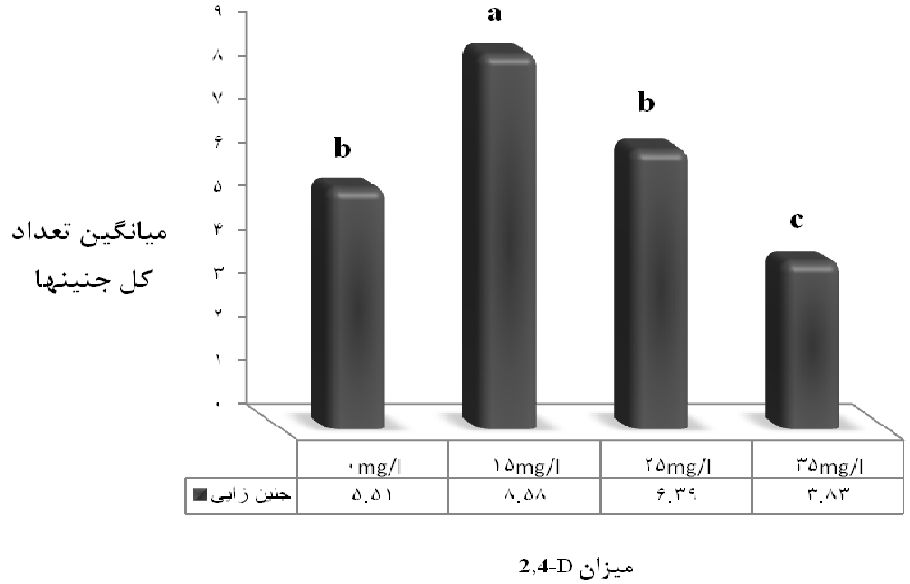
براساس جدول ۱ بین غلظت‌های مختلف ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و تیمار شاهد بدون 2,4-D در میزان جنین‌زایی گندم رقم فلات تفاوت معنی‌داری وجود دارد. این مسئله نشان‌دهنده تأثیر متفاوت سطوح تیمار 2,4-D بر میزان جنین‌زایی

گندم رقم فلات می‌باشد. در مطالعه‌ای مشابه Emamifar *et al.* (2008) و Habibzadeh *et al.* (2011) بر روی کلزا اثر پیش‌تیمار 2,4-D بر روی رقم توپاز و هایولا ۴۲۰ در غلظت‌های بالا (۱۵، ۲۵، ۳۵، ۴۵ میلی‌گرم در لیتر) در برابر تیمار شاهد که تیمار حرارتی بود را مورد بررسی قرار داده و نتیجه گرفتند که اثر پیش‌تیمار 2,4-D بر روی رقم توپاز موجب افزایش کیفیت جنین‌زایی شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن در سطح یک درصد نشان می‌دهد (شکل ۱) که بیشترین میزان جنین‌زایی در غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر بوده و اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد (بدون 2,4-D) و سایر غلظت‌های 2,4-D (۲۵و ۳۵ میلی گرم در لیتر) دارد. تیمار شاهد و غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر اثر یکسانی بر جنین‌زایی داشته و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود نداشت. Patel *et al.* (2004) نیز استفاده از 2,4-D را برای افزایش جنین‌زایی مؤثر دانستند، همچنین بیان کردند اثر 2,4-D به شکل معنی‌داری از لحاظ تولید جنین و باززایی گیاه سبز از PAA بیشتر می‌باشد. Kranz *et al.* (1995) اظهار داشتند که سلول‌های تخم‌زای غیربارور جداشده ذرت پس از تیمار با 2,4-D در غلظت بالا (۲۵، ۳۵ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر) و برای مدت یک ساعت به علت نمو اسپروفیتی القاء شدند. 2,4-D نه تنها اثرات هورمون رشدی دارد، بلکه وقتی در غلظت‌های بالا مورد استفاده قرار بگیرد، می‌تواند به عنوان یک تیمار تنش‌زا عمل کند (Habibzadeh *et al.* 2011). همچنین Shariatpanahi *et al.* (2006a) در گیاه تنباکو اثر غلظت‌های بالای 2,4-D (۲۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) را برای چند ساعت تا یک روز تیمار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در افزایش ساختارهای دوسلولی و چندسلولی تایید کردند. در غلظت ۳۵ میلی‌گرم در لیتر نیز کمترین میزان جنین‌زایی وجود داشت و این میزان دارای اختلاف معنی‌داری با غلظت ۲۵ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر و تیمار شاهد بدون 2,4-D است.

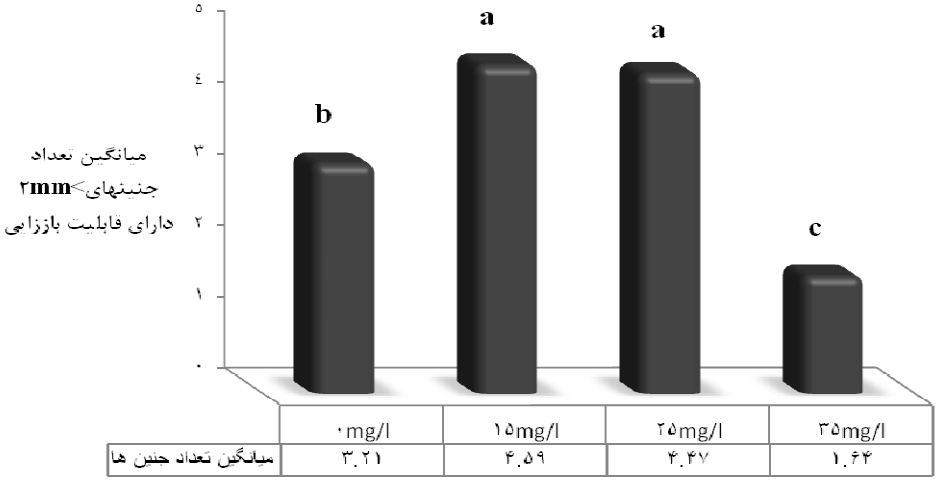
طبق جدول ۱، بین غلظت‌های مختلف ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و تیمار شاهد بدون 2,4-D در رقم فلات اختلاف معنی‌داری بین تعداد جنین‌های به‌دست‌آمده که اندازه آن‌ها بزرگتر از ۲ میلی‌متر می‌باشد، وجود داشت. مقایسات میانگین‌ها نشان داد که تعداد جنین‌های بزرگتر از ۲ میلی‌متر در غلظت ۳۵ میلی‌گرم کمترین و اختلاف معنی‌داری با سایر غلظت‌ها و شاهد دارد (شکل ۲). غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشترین تعداد جنین‌های بزرگ را نشان داد که با شاهد (بدون 2,4-D) اختلاف معنی‌داری داشتند. مشابه این نتایج در رقم توپاز در کلزا نیز نشان داده شده است. در کلزا مطالعه تأثیر 2,4-D در غلظت‌های بالا (۱۵، ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میلی‌گرم در لیتر) در مقایسه با تیمار شاهد (تنش حرارتی) بررسی شد. بیشترین جنین‌زایی (در مرحله جنین‌های نیزه‌ای قابل باززایی) از اثر 2,4-D در غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۳۰ دقیقه بدست آمد. بالاترین میزان گیاهچه‌های نرمال نیز از غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد (Emamifar *et al.* 2008). استفاده از پیش‌تیمار 2,4-D در غلظت‌های ذکر شده برای اولین بار در این پژوهش در مورد کشت میکروسپورهای جدا شده گندم نان مورد آزمون قرار گرفت.

البته اثر مثبت 2,4-D در غلظت‌های کمتر به عنوان اکسین و نه پیش‌تیمار تنشی در کشت میکروسپورهای جدا شده گندم قبلاً گزارش شده است. Liu *et al.* (2002) از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در محیط کشت میکروسپورها استفاده کردند. Shariatpanahi *et al.* (2006b) از یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کاینتین در

کشت میکروسپورهای ایزوله استفاده کردند و میزان باززایی گیاه سبز را به این ترتیب بهبود بخشیدند. در این پژوهش اثر 2,4-D به عنوان پیش‌تیمار، در غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر بالاترین جنین‌زایی را در میان سایر غلظت‌ها (۲۵ و ۳۵ میلی‌گرم در لیتر) و شاهد بدون 2,4-D داشت. در دو غلظت ۲۵ و ۱۵ میلی‌گرم بالاترین تعداد جنین باززایی شده بدست آمد. از آنجا که در کشت میکروسپورهای گندم اثر ژنوتیپ به شدت مؤثر است (Forster *et al.* 2003) و اثرات تنظیم‌کنندگی 2,4-D در سوخت‌وساز اکسین آندروژنز که IAA نامیده می‌شود، نقش معنی‌داری در جنین‌زایی سوماتیکی دارد، پس می‌توان در افزایش جنین‌زایی در ژنوتیپ‌هایی که پاسخ‌پذیری کمی به کشت میکروسپور دارند، از 2,4-D به عنوان یک عامل تنش‌زا در جهت افزایش جنین‌زایی با آزمودن غلظت‌های کم و زیاد و مدت زمان اعمال تیمار و یا حتی با ترکیب با سایر هورمون‌ها بهره برد. از آنجا که



شکل ۱- مقایسه میانگین کل جنین‌ها با استفاده از تیمار 2,4-D در غلظت‌های ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میلی‌گرم در لیتر و تیمار شاهد بدون 2,4-D با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪



میزان 2,4-D

شکل ۲- مقایسه میانگین جنین‌های بزرگتر از ۲ میلی‌متر با استفاده از تیمار 2,4-D در غلظت‌های ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میلی‌گرم در لیتر و تیمار شاهد بدون 2,4-D با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪

در این پژوهش تأثیر مثبت 2,4-D به‌عنوان پیش‌تیمار تنشی در افزایش جنین‌زایی اثبات گردید، این اکسین جهت افزایش جنین‌زایی در کشت میکروسپورهای گندم معرفی می‌شود. تحقیقات زیادی نشان داده که وجود هورمون در محیط جنین‌زایی مؤثر بوده و بیشترین میزان گیاه کامل زمانی بدست می‌آید که جنین‌ها در محیط حاوی هورمون به میزان مناسب رشد یابند (Cistue *et al.* 2006; Kasha *et al.* 2003; Shariatpanahi *et al.* 2006b). بنابراین ممکن است با استفاده توأم از 2,4-D همراه با سایر هورمون‌ها در محیط کشت بتوان باززایی را بهبود بخشید.

جدول ۱- تجزیه واریانس جنین زایی میکروسپور با استفاده از پیش‌تیمار 2,4-D درگندم فلات

منابع تغییرات	درجه آزادی	کل جنین‌ها	جنین‌های باززایی شده
		میانگین مربعات (MS)	
تیمار	۳	۳/۴۹**	۵/۶۵**
خطا	۸	۰/۳	۰/۳۶۲

**: Significant at 1% probability level

بررسی جنین‌زایی و باززایی هیبریدهای F_1 گندم نان در دو محیط کشت با مقادیر مختلف قند مالتوز بدون ترکیب هورمونی

در اینجا هیبریدهای بدست‌آمده از تلاقی‌های انجام‌شده بین لاین‌های مقاوم به بیماری، در محیط کشت A2 بدون ترکیب هورمونی (Shariatpanahi *et al.* 2006b)، اما با استفاده از دو مقدار متفاوت از قند مالتوز مورد مقایسه قرار گرفتند (جدول ۲). این مقایسه با مقادیر مختلف قند مالتوز شامل ۶۰ و ۹۰ گرم در لیتر در قالب طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. Oleszczuk *et al.* (2006) نیز بیشترین عملکرد جنین‌های آندروژنی را از محیط کشت بدون هورمون بدست آوردند. مطابق جدول ۲، اثر محیط و اثر متقابل محیط × ژنوتیپ معنی‌دار نشده، پس می‌توان از محیط با مالتوز ۶۰ گرم نیز استفاده کرد و لزومی به استفاده از مقدار ۹۰ گرم در لیتر مالتوز نمی‌باشد. Shariatpanahi *et al.*

(2006b) نیز در پروتکل جنین‌زایی مستقیم از مقدار ۶۰ گرم در لیتر مالتوز استفاده کردند. Labbani *et al.* (2005) از ۹۰ گرم در لیتر مالتوز در کشت میکروسپور گندم دوروم استفاده کردند. عدم تفاوت معنی‌دار بین اثر متقابل محیط کشت و هیبریدهای گندم نشان داد که استفاده از هر دو محیط کشت بر کشت میکروسپورها اثر یکسانی داشته است. اما معنی‌داربودن اثر هیبریدها نشانه تفاوت در میزان جنین‌زایی میان هیبریدهای گندم نان می‌باشد.

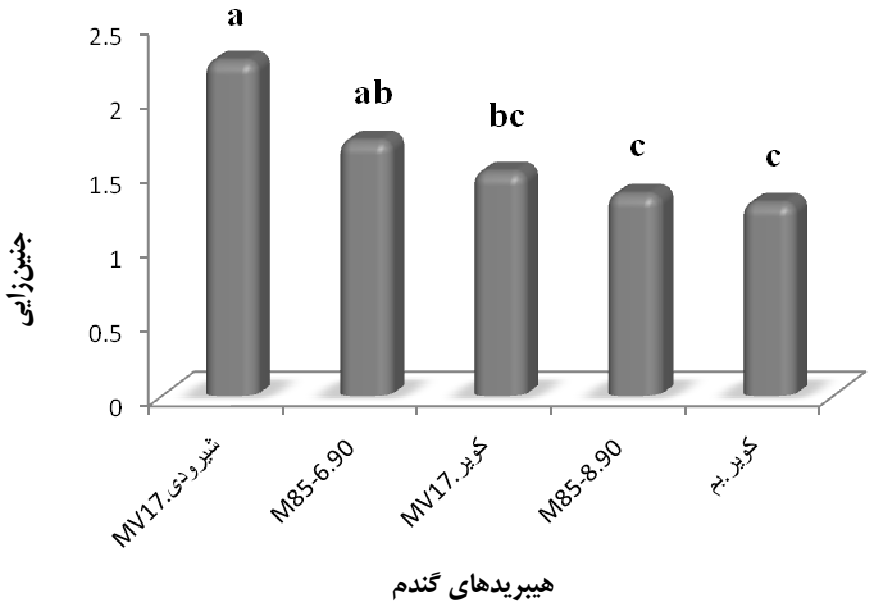
پاسخ به آندروژنز و توانایی باززایی به شکل معنی‌داری به ژنوتیپ وابسته است و می‌توان نتیجه گرفت که صفات آندروژنزی وراثت‌پذیری بالایی دارند (Naserian *et al.* 2008). Zhao *et al.* (1996) نیز اظهار داشتند که آندروژنز متاثر از پیش‌زمینه ژنتیکی گیاه مادری است. با این حال محیط نیز می‌تواند عامل مهم تأثیرگذار در باززایی گیاه و تعداد گیاه سبز تولیدی باشد. مقایسات میانگین بین پنج هیبرید نشان می‌دهد (شکل ۳) که سه هیبرید mv17 × شیرودی و mv17 × کویر و m85-6 × 90 دارای بالاترین فراوانی جنین‌زایی بوده و این مقدار با دو هیبرید m85-8 × 90 و کویر × بم دارای تفاوت معنی‌داری است. در مطالعات مشابه Naserian *et al.* (2008) نیز بین چند ژنوتیپ مورد مطالعه تنها در دو ژنوتیپ بالاترین میزان باززایی و ایجاد کالوس در کشت بساک را بدست آوردند، ضمناً آزمون دانکن نیز نشان داد که ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری مطابق با توان آندروژنزی خود نشان می‌دهند.

جدول ۲- تجزیه واریانس جنین‌زایی میکروسپور در محیط کشت A2 با دو مقدار قند مالتوز ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر در پنج هیبرید گندم

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS) کل جنین‌ها	جنین‌ها باززایی شده
محیط	۱	۰/۰۰۷^{ns}	۰/۱۹۲^{ns}
هیبریدها	۴	۷/۷۱**	۲/۱**
اثر متقابل (محیط×هیبریدها)	۴	۰/۰۰۲^{ns}	۰/۶۵۹^{ns}
خطا	۲۰	۰/۱۶۴	۰/۲۳۶

ns: non –significant
**: Significant at 1% probability level

در این تحقیق اثر ژنوتیپ بر باززایی جنین‌های بدست‌آمده آشکار است (جدول۲). هیبرید mv17×شیرودی بالاترین میزان جنین‌های باززاشده را در میان سایر هیبریدها دارد درحالی که با



شکل ۳- مقایسه میانگین داده‌های حاصل از جنین‌های باززاشده در هیبریدهای گندم

m85-6×90 نیز تفاوت معنی‌داری ندارد. همین‌طور m85-6 × 90 با mv17 × کویر، mv17 × کویر با m85-8×90 و m85-8×90 و بم × کویر از لحاظ باززایی تفاوت معنی‌داری ندارند. دو هیبرید m85-8×90 و بم × کویر نیز کمترین میزان باززایی را دارا بودند. با توجه به جنین‌زایی هیبریدها می‌توان به پاسخ‌پذیری هیبریدها به کشت میکروسپور امیدوار بود. در سایر مطالعات انجام‌شده روی کشت میکروسپور تنوع قابل ملاحظه‌ای بین ارقام در میزان پاسخ‌پذیری به کشت میکروسپور گزارش شده است (Cistue *et al.* 2006; Liu and Devaux, 2003).

سپاسگزاری

نتایج این تحقیق حاصل اجرای پروژه تحقیقاتی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به شماره ۸۶۰۱۲-۰۵-۰۵-۲ بوده و با حمایت‌های مالی این پژوهشکده انجام گردیده است. به این‌وسیله از همکاری مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر نیز تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Barnabas B (2003) Protocol for producing doubled haploid plants from another culture of wheat (*Triticum aestivum* L.), In: Maluszynski M, Kasha kJ, Forster BP, Szarejko, I (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants, A Manual, Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers, pp 65-70.

Cistue L, Soriano M, Castillo AM, Valles MP, Sanz JM, Echavarri B (2006) Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture, Plant Cell Rep. 25: 257-264.

Emamifar M, Shariatpanahi ME, Habibzadeh S, Nematzadeh GA, Oroojlo A (2008) Induction of microspore embryogenesis with 2,4-D instead of heat shock in *Brassica napus* L. cv. Topas. Proceeding of the second international student conference of biotechnology. University of Tehran.

* نویسنده مسئول: مهران عنایتی شریعت پناهی
E-mail: mehran.shariatpanahi@abrii.ac.ir

Forster BP, Thomas WTP (2003) Doubled haploid in genetic mapping and genomics, In: Maluszynski M, Kasha kJ, Forster BP, Szarejko,I (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants, A Manual, Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers, pp 367-390.

Habibzadeh S, Shariatpanahi ME, Amiri R, Emamifar M, Nematzadeh GA, Sadat- Noori S.A., Oroojlo A., Heberle-Bors E (2011) Effect of 2,4-D as a novel inducer of embryogenesis in microspores of *Brassica napus* L. Czech Journal Of Genetics And Plant Breeding. 47, 2011 (3): 114-122.

Hunter CP (1988) Plant regeneration from microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.), Ph.D. Thesis, Wye Collage, University of London.

Kasha KJ, Simion E, Oro R, Shim Y.S (2003) Barley isolated microspore culture protocol, In: Maluszynski M, Kasha kJ, Forster BP, Szarejko, I (eds) Doubled Haploid Production in Crop Plants, A Manual, Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publishers, pp 83-94.

Labbani Z, Richard N, De Buyser J, Picard, E (2005) Chlorophyllian durum wheat plants obtained by isolated microspores culture: importance of the pretreatment. C R Biol. 328: 713-723.

Li H, Devaux P (2003) High frequency regeneration of barley doubled haploid plants from isolated microspore culture. Plant Sci. 164: 379-384.

Liu W, Zheng MY, Polle E, Konzak CF (2002) Highly efficient doubled haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) via induced microspore embryogenesis. Crop Sci. 42: 686-692.

Naserian khiabani B, Vedadi C, Rahmani E, Mosavi M (2008) Response of Iranian wheat genotype to another culture system. Iranian Journal of Biotechnology. 7: 531-535.

Oleszczuk S, Sowa S, Zimmy T (2004) Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspors of hexaploid Triticale (× *Triticosecale Wittmack*) cv.Bogo, Plant Cell Rep. 22: 885-893.

Patel M, Darvey NL, Marshall DR, Berry JO (2004) Optimization of culture conditions of improved plant regeneration efficiency from wheat microspore culture. *Euphytica* 140: 197-204.

Pauk J, Mihaly R, Puolimatka M (2003) Protocol for wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. In: Malszynnski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled haploid production in crop plants: a manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

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

Shariatpanahi ME, Belogradova K, Hessamvaziri L, Heberle-Bors E, Touraev A (2006b) Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. Plant Cell Rep. 25: 1294-1299.

Snape JW, Simpson E (1981) The genetic expectation of doubled haploid lines derived from different filial generations. Theor. Appl. Genet. 60: 123-128.

Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O, Heberle-Bors E (1996) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum*.) induced by starvation at high temperatures. Sex Plant Rep. 9: 209-215.

Touraev A, Vicente O, Heberle-Bors E (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. Trends in Plant Sci. 2: 297-302.

Zhao JP, Simmond DH, Newcomb W (1996) Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. Topas, Planta 198: 433-439.

Zheng MY (2003) Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.) doubled haploid production via induced embryogenesis, Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 73: 213-23.

Crop Biotech. Vol. 1, No. 1, 2012

Microspore Embryogenesis in Different Hybrids of Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Improvement of Embryogenesis Efficiency via 2,4-D Stress Pre-Treatment

B. TAYEFE-AFSHARI[1], M. E. SHARIATPANAHI[2]* AND M. VAHAB-ZADEH[3]

1, Department of Tissue Culture and Gene Transformation, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Mahdasht Road, Karaj, and Department of Agronomy and Plant Breeding, Zanjan University, Zanjan, 2, Department of Tissue Culture and Gene Transformation, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Mahdasht Road, Karaj, 3, Department of Cereals Research, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj

(Received: Nov. 16, 2011 - Accepted: Dec. 19, 2011)

ABSTRACT

The objective of this study was to achieve improved induction of embryogenesis in bread wheat microspores. Some F_1 hybrids i.e M85-6×90, M85-8×90, mv17×shiroudi, mv17×kavir and kavir×bam were used. Microspores were cultured in A2 medium containing different amounts of maltose (60 & 90 g/lit) depending on the genotype used. Analysis of variance for embryogenesis and regenerable embryos showed a highly significant difference between hybrids but there was no significant difference between the media (A2-60 & A2-90) and no interaction effects. M85-6×90, mv17×Shiroudi and mv17×kavir produced the highest ratio of embryogenesis among the hybrids. In the regeneration phase, mv17×Shiroudi and M85-6×90 had the highest frequency of regenerable embryos. The effect of 2,4-D as a novel inducer of microspores embryogenesis in Falat was investigated. Falat is known as the most responsive wheat cultivar to microspore culture technology,. Microspores were subjected to 2,4-D at 3 different concentrations of 15, 25, 35 mg/l for 30 minutes while microspores without any stress treatment were used as the control. The embryogenesis of microspores stressed with 2,4-D were better than that of the control. The highest embryogenesis yield was achieved at 15 mg/l 2,4-D. The most regenerated embryos were obtained at 2,4-D concentrations of 15 and 25 mg/l. According to the results obtained, 2,4-D is introduced as a new embryogenesis inducer in microspores of wheat.

Keywords: Wheat, microspore, embryogenesis, doubled haploid, 2,4-D (2,4-di chlorophenoxyacetic acid)

---

* Corresponding author: M. E. Shariatpanahi E-mail: mehran.shariatpanahi@abrii.ac.ir