

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 کارشناسی ارشد دانشگاه کرمانشاه، ۲، استادیار بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۱۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۶/۴)

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

M. TAVAKOLI¹ 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)

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

چکیده

تحقیق حاضر با هدف بهینه‌سازی به کارگیری 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 به مدت 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 به دست آمد. هر سه غلظت به کار 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 به دست آمده کمتر بود. جنین‌ها پس از انتقال به محیط B₅ همراه با اسیدجیبرلیک و نگهداری در دمای ۲۵°C و تاریکی به مدت ۱۰ روز به انکوباتور با دمای ۲۵°C منتقل شدند. گیاهچه‌های رشد کرده به محیط باززایی B₅ 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

کلشی سین. دسته دوم تنش‌هایی که کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند مانند اشعه گاما، 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 الفاء‌کننده‌های 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 کشت بساک 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 تیمار شده با سدیم‌آزید بیشترین میزان جنین‌زایی در غلظت $0/0001$ مولار برای مدت یک ساعت به دست آمده 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 پژوهش‌کنده بیوتکنولوژی کشاورزی کشت شدند. غنچه‌های کلزا به طول مناسب $4/5-3/5$ میلی‌متر که دارای میکروسپورهایی در مرحله انتهایی تک‌سلولی بودند، از هیبریدهای مذکور در گلخانه جدا و سپس در اتاق کشت زیر لامینار در هیپوکلریت سدیم $3/5\%$ به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. سپس سه بار شستشو با آب مقطر استریل هر دفعه به مدت سه دقیقه انجام شد. جهت جداسازی میکروسپورها، بساک‌ها در داخل محیط جداسازی (13% ساکارز با $\text{pH}=6$) له شدند. محلول سوسپانسیون حاوی میکروسپورها از الک آزمایشگاهی با اندازه سوراخ‌هایی به قطر 68 میکرومتر عبور داده شد. سوسپانسیون حاوی میکروسپورها، داخل لوله‌های آزمایشگاهی 50 میلی‌لیتری ریخته و سپس دو بار با سرعت 1270 rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و سپس مایع سبزرنگ رویی حذف شد. رسوب

مقدمه

کلزا با داشتن $45-40\%$ روغن و $38-45\%$ 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). مستقل بودن از دیواره بساک، ایده‌آل بودن میکروسپورها برای اعمال تیمارهای موتاژن و بررسی موتاسیون‌ها، امکان استفاده از آن‌ها در انتقال ژن و توانایی تولید تعداد زیادی لاین دابلدهاپلوئید 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 جدا شده دو مسیر را پیش رو دارند: در صورت عدم اعمال 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 مواد غذایی و

از غیرفعال و خنثی شدن EMS، در نایلون و سطل مخصوص جمع‌آوری و سوزانده شد. در مرحله اول میانگین تعداد جنین‌های تشکیل شده از ۲۵ غنچه و در مرحله دوم درصد جنین‌های باززایی شده (تعداد گیاهچه‌های رشد کرده و نرمال و قابل انتقال به محیط B5 بدون اسیدجیبرلیک یا باززایی کل) برای هر دو هیبرید محاسبه گردید.

آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل و بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. در آزمایش‌ها ابتدا آزمون نرمال بودن توسط نرم‌افزار MINITAB انجام گرفت. طبق نمودار نرم افزار MINITAB، در صورت نیاز به تبدیل داده به دلیل عدم نرمال بودن 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.

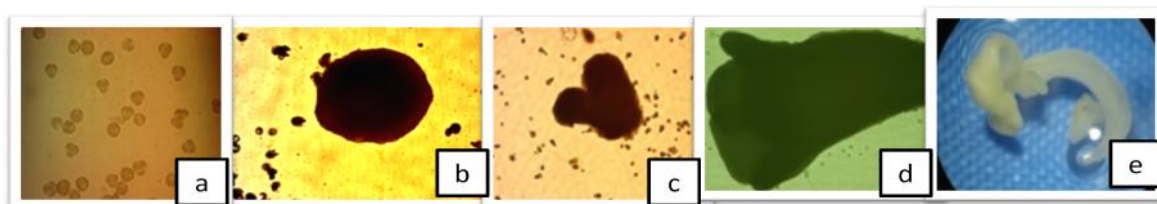
نتایج و بحث

بررسی جنین‌های حاصل از میکروسپورهای هیبرید Hyola 401

میکروسپورهای جدا شده از هیبریده‌های Hyola 401 و Hyola 420 به منظور 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 به مدت 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 (شکل ۱).

زردرنگ ته‌نشین شده با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت NLN-13 رقیق گردید. به منظور 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 به مدت 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 به مدت 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 رقیق شده به آن اضافه گردید. سپس میکروسپورها ابتدا به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و بعد از آن به مدت 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. به منظور تیمار سرمایی جهت جلوگیری از جنین‌زایی ثانویه و تولید گیاهچه‌های نرمال، جنین‌ها در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 تولید شده 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 استفاده شده هرگز نباید در چاه فاضلاب ریخته شود. EMS هرگز در آب شسته و حل نمی‌شود لذا باقیمانده EMS استفاده شده و ظروف آلوده در محلول سدیم‌تیوسولفات ۵٪ (Na₂S₂O₃) به مدت ۲۴ ساعت و در زیر هود نگهداری و بعد



شکل ۱- مراحل مختلف جنین‌زایی میکروسپور در کلزا. a: میکروسپور سه لوبی. b: جنین کروی. c: جنین قلبی. d و e: جنین نیزه‌ای و نرمال

جنین‌های حاصل از میکروسپورها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج شکل ۲ حاکی از آنست که اثر متقابل

جدول ۱ نشان می‌دهد که اختلاف بین مدت زمان تیمار، غلظت‌های اعمال شده و اثر متقابل آن‌ها از نظر تعداد

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.

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 به مدت ۹۰ دقیقه بر روی میکروسپورها اعمال شد. بعد از آن به ترتیب 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 ۲- تجزیه واریانس زمان، غلظت و اثرات متقابل آن‌ها بر روی جنین‌زایی در هیبرید Hyola 420

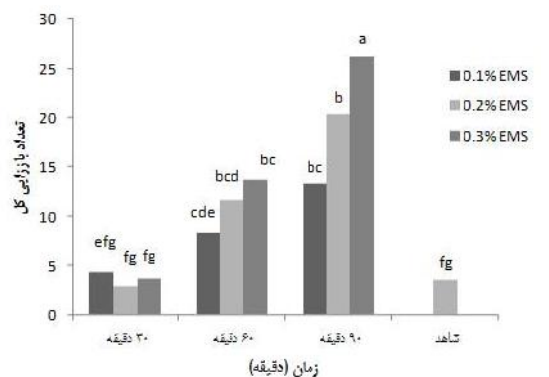
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
دما	۲	۰/۶۷**
غلظت	۳	۰/۴۲**
دما × غلظت	۶	۰/۲۱**
خطا	۳۴	۰/۰۱۱

** اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪

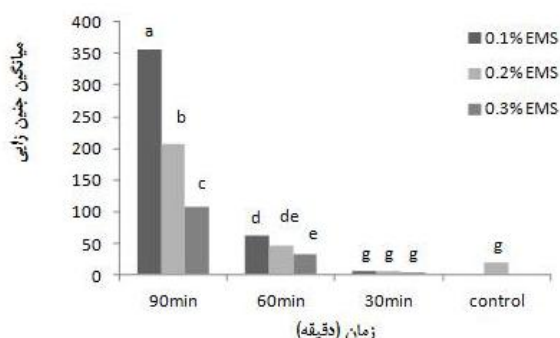
جدول ۱- تجزیه واریانس زمان تیمار EMS، غلظت تیمار EMS و اثرات متقابل آن‌ها بر روی جنین‌زایی در هیبرید Hyola 401

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

** اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و زمان بر جنین‌زایی میکروسپورهای کلزا در هیبرید Hyola 420



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

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). هنگامی که غلظت

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

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

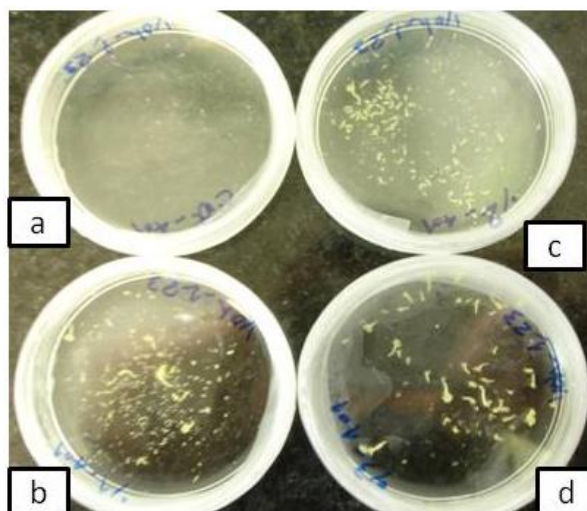
در هیبرید Hyola 401

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 غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد قرار می‌گیرند دارای باززایی بیشتری می‌باشند، به طوری که 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 به‌دست آمده 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.

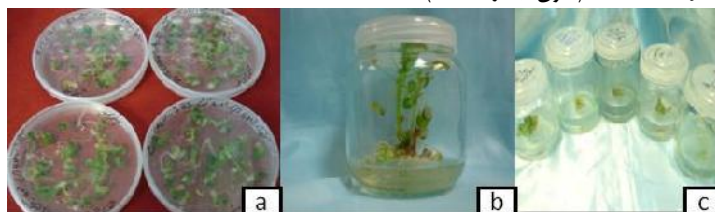
EMS بیشتر می‌شود، خاصیت سمی پیدا می‌کند و باعث مرگ میکروسپورهای بیشتری می‌شود، گرچه نتایج نشان داد که باز هم تعداد جنین‌های تولیدی در غلظت‌های بالاتر، از شاهد بیشتر است. این نتایج حاکی از آن بوده است که EMS در غلظت و زمان مشخص می‌تواند در کنار شوک حرارتی، عامل محرکی برای افزایش میزان جنین‌زایی در میکروسپورهای کلزا باشد. سودمندی استفاده از موتاژن برای تحریک آندروژنز (نرزاری) 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 بر روی 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



شکل ۴- مقایسه فراوانی جنین‌های تشکیل شده از میکروسپورها تیمار شده 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.

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 به طوری که 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 بر روی باززایی گیاهچه‌ها در هیبرید Hyola 420

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

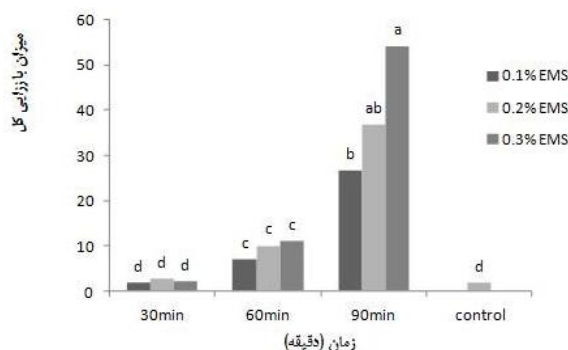
** اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪

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 به مدت ۲۰ دقیقه قرار می‌گیرند.

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

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

** اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪



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

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 انتهایی 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 ایجاد شده در مرحله بذردهی در گلخانه بوده و بعداً به مزرعه برای ارزیابی‌های مزرعه‌ای منتقل خواهند شد.

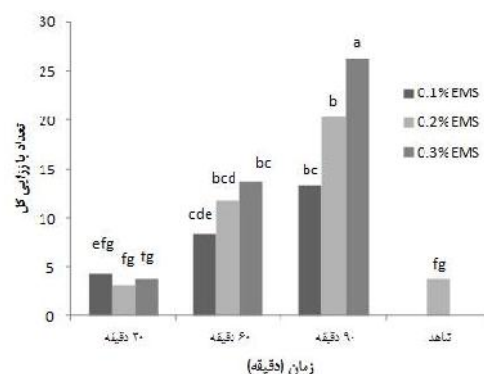
به اختصار نتایج حاصل از این آزمایش حاکی از آن است که غلظت ۰/۱ درصد EMS بهترین غلظت برای افزایش جنین‌زایی در هر دو هیبرید می‌باشد ولی غلظت ۰/۳ درصد EMS بهترین غلظت برای افزایش تولید جنین‌های نرمال و بالابردن میزان باززایی است. غلظت‌های مختلف EMS در مدت زمان پایین اعمال تیمار تأثیری بر جنین‌زایی ندارد. به‌طور کلی 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 ۸۸۰۰۴-۸۶۰۱-۸۶۵۵-۰۵-۱۳ 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



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت و زمان بر باززایی 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 به مدت ۶ ساعت بر روی پرچم‌های کشت‌شده برنج به کار 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

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 sulfonic 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 sclerotinia 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. mutants. *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.