مطالعه واکنش به باززایی از جنین نارس در ارقام گندم دوروم
(Triticum turgidum var. *durum)*

سید شهرام میراجاق و احمد ارزانی*

چکیده

واکنش ۲۸ رقم گندم دوروم (Triticum turgidum var. durum) به کشت جنین نارس در محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS)، در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تولید جنینهای نارس در شرایط محیطی مناسب، کشت گیاهان در سیستم هیدروپونیک با جریان چرخشی و در گلدانهایی در گلخانه انجام شد. چگونگی باززایی جنینهای نارس در زمانهای ۲، ۴، ۸ و ۱۶ روز پس از تلقیح جنین، از طریق سنجش درصد و سرعت باززایی در محیط کشت، برای کلیه ژنوتیپ‌ها یادداشت برداری شد. تجزیه واریانس داده‌های حاصل به صورت طرح کرتهای خرد شده در زمان، در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۵ تکرار و ۴ زمان انجام گرفت.

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که در بین ارقام تفاوت معنی‌داری از نظر ظرفیت باززایی وجود دارد. حداکثر ظرفیت یا سرعت باززایی (دو روز پس از تلقیح) جنین نارس در رقم "شاهیوندی" که رقم بومی منطقه غرب ایران است، مشاهده گردید. رقم "Awl_1/Sbl_4" با متوسط ۴۸/۵ درصد و ارقام "هاگلا" و "آفن کیل" با متوسط ۸۰ درصد به ترتیب دارای کمترین و بیشترین متوسط باززایی در طی مدت یادداشت برداری بودند. اهمیت سرعت باززایی بالا از لحاظ صرفه جویی در وقت، هزینه و احتمال ایجاد تنوع سوماکلونی کمتر در برنامه‌های به نژادی، حایز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی *-گندم دوروم، کشت جنین، باززایی، جنین نارس*

مقدمه

کشت جنین گیاهی یکی از شاخه‌های کشت بافت گیاهی بوده که برای حل مشکلات کاربردی و پژوهشی در علوم گیاهی و کشاورزی به کار می‌رود. این روش بر مبنای جدا نمودن جنین استریل و انتقال آن به یک محیط کشت مناسب جهت ادامه رشد و نمو تحت شرایط بهینه پایه‌گذاری شده است (۲۳و۲۰) . کشت جنین در محیط آزمایشگاهی مجالی است برای ارزیابی و بررسی عواملی که رشد جنین را در شرایط کنترل شده تحت تأثیر قرار می‌دهند. همچنین امکان تعیین فاکتورهای تنظیم کننده رشد اندام آغازین گیاهچه را فراهم نموده، نیز می‌توان از آن در مطالعه تغییرات شیمیایی و متابولیکی جوانه‌زنی جنینهایی که در داخل بذور محصور هستند بدون هیچ گونه دخالتی از بافتهای فرعی بهره جست

* به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1377.2.3.6.4]

(۱۸و۲۴). درک کنترل تمایز و نیازهای غذایی جنینهای جوان در حال رشد و نمو، شناخت رابطهٔ قسمتهای مختلف جنین با فرم نهایی آن در کشت، مطالعه تغییرات نیازهای غذایی جنین در مراحل مختلف نمو، بررسی نقش بافتهای جنبی مانند لپه‌ها و آندوسپرم در رشد و نمو جنین، مطالعه جوانه‌زنی و مطالعه بهاره‌سازی از دیگر جنبه‌های کشت جنین بشمار می‌روند (۲۱،۲۵و۲۸). مهم‌ترین جنبه‌های کاربردی کشت جنین نارس شامل کوتاه نمودن دوره نسل گیاه، غلبه بر خواب بذر، نجات جنین آمفی هاپلویید در تلاقیهای بین گونه‌ای و بین جنسی، نجات جنین هاپلویید حاصل از تلاقی بین گونه‌ای، احیاء ژرم پلاسم و تولید کالوس برای انتقال ژن از طریق مهندسی ژنتیک می‌باشد(۱۸و۲۹).

با وجود کاربردها و استفاده‌هایی که تاکنون از کشت جنین به عمل آمده است، نمی‌توان گفت که کشت جنین فرایند ساده‌ای است. لنج[1] (نقل از ۲۳) با کشت ۱۸۸۸ جنین جو فقط ۲۰۱ گیاه زنده به دست آورد. دلایل بازده پایین را می‌توان مشتمل بر خسارت ناشی از آلودگی، اندازهٔ بسیار کوچک جنین هنگام جداسازی، قطع نمو جنین، صدمه به جنین و شرایط مصنوعی (محیطهای غذایی) دانست.

همچنین موفقیت کشت جنین بستگی زیادی به ژنوتیپ و مرحلهٔ نمو جنین در هنگام جدا شدن و قرار گرفتن در محیط آزمایشگاهی دارد (۲۳). در ضمن، جنینهای نارس جدا شده از یک گل آذین بسته به وضعیت محیطی گیاهان دهندهٔ جنین، عکس العملهای متفاوتی نسبت به کشت از خود نشان می‌دهند (۸). نیازهای غذایی جنینهای گیاهی در طی نمو در شرایط طبیعی[2]، از دو قسمت هتروتروفی و اتوتروفی تشکیل شده است. مرحله مهم و بحرانی در رشد و نمو جنین، زمان عبور از فاز هتروتروفی به فاز اتوتروفی است که در گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد (۲۵). جنینهای هتروتروف (پیش جنینها)[3] کوچکتر و نارستر از اتوتروف‌ها هستند، لذا در حضور تنظیم کننده‌های رشد و محیطهای غذایی غنی رشد می‌کنند. لیکن در مرحله اتوتروفی، جنین به منابع خارجی تنظیم کننده رشد نیاز ندارد (۹،۲۱،۲۴و۲۹). به عقیده اکثر محققین، برای کشت بافت غلات (گندم، ذرت و جو) محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) و گامبورگ (B5) مناسب‌ترین هستند (۹و۱۵).

گندم آلوتتراپلوییید دوروم که برای تولید ماکارونی و اسپاگتی اختصاص داشته و در سطح جهان عمدتاً به همین منظور کشت و کار می‌گردد، از دیدگاه اقتصادی برای بسیاری از کشورها حایز اهمیت است (۱۰). در کشور ما به لحاظ سازگار بودن محیط جهت کشت این گیاه و این که یکی از مراکز اولیه منشاء گندم دوروم بوده و برای اولین بار ۱۰۰۰۰ سال قبل یعنی ۲۰۰۰ هزار سال قبل از اهلی شدن گندم نان (۸۰۰۰ هزار سال قبل) در ایران اهلی شده است (۳) ، پژوهشهای به نژادی آن جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص می‌دهد. از آن‌جایی که در مطالعات کشت بافت و اصلاح نباتات صرفه‌جویی در وقت، هزینه و احتمال ایجاد تنوع سوماکلونی کمتر، به لحاظ کاربردهای به نژادی کشت جنین در اصلاح نباتات و مهندسی ژنتیک، اهمیت دارد، بنابراین آزمایش در جهت شناسایی ارقام گندم دوروم با ظرفیت باززایی مطلوب طراحی و اجرا گردیده است.

مواد و روشها

مواد ژنتیکی و کشت گیاهان

گیاهان تأمین کنندهٔ جنین نارس شامل ۲۸ ژنوتیپ گندم دوروم، مشتمل بر دو رقم بومی منطقه خرم‌آباد و شهرکرد ("شاهیوندی" و "شهتاس")، ۲۲ رقم تهیه شده از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و ۴ رقم سوریه‌ای تهیه شده از ایکاردا[4] به نامهای "Awl_1/Sbl_4" ، "Awl_4/Bit" ، "ماسارا-۱" و "ام ربیع-۵" بودند که در سال ۱۳۷۴ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان کشت

۱-Lange, 1969 ۲-In vivo ۳-Proembryo ۴-ICARDA

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1377.2.3.6.4]

شدند. ژنوتیپ‌های گندم دوروم جهت جلوگیری از تراکم کار، در طی تاریخ کاشتهای متناوب درگلدان و سیستم جریان چرخشی هیدروپونیک[1] که قبلاً توسط ارزانی و داروی(۱) توصیف شده است، کشت شدند. در این سیستم از محلول غذایی هاگلند (۱۶) استفاده شد. گلدانها هر ۴-۳ روز یک بار آبیاری و هر ۱۰ روز یک بار نیز با محلول غذایی هاگلند تغذیه شدند.

کشت جنین نارس

به منظور استحصال جنینهای نارس، خوشه‌های حاوی دانه‌های نارس، در مرحله رسیدگی شیری از بوته‌ها برداشت گردید، که تحت شرایط این آزمایش، این مرحله نموی مطابق با ۱۶-۱۴ روز پس از گرده‌افشانی بود. لازم به ذکر است، از هرکدام از محیطهای هیدروپونیک وگلدان به تعداد مساوی خوشه برای هر تیمار (رقم) برداشت گردید و مورد استفاده قرار گرفت. بذور نارس ابتدا به مدت ۱۰-۵ دقیقه توسط محلول وایتکس ۲۰ درصد (حاوی ۵ درصد هیپوکلریت سدیم) و سپس الکل اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی گردیدند و توسط آب مقطر استریل مورد شستشو قرار گرفتند. جنینهای نارس به همراه اسکوتلوم در شرایط استریل (لامین ایرفلو[2]) استخراج شده و در پتری دیش‌های ۹ سانتیمتری، محتوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت قرار داده شدند. از محیط کشت موراشیک و اسکوگ به انضمام ۱ میلیگرم در لیتر ایندول استیک اسید، ۱ میلیگرم در لیتر بنزیل آمینوپورین[3] و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز استفاده شد. برای جامد نمودن محیط کشت از آگارز[4] به مقدار ۲/۸ گرم در لیتر استفاده گردید. مواد شیمیایی مورد استفاده در این آزمایش از نوع آزمون شده برای کشت سلولی از شرکت سیگما بود.

در این مطالعه در هر پتری دیش ۱۰ جنین نارس اسکوتلوم دار ۲-۱/۵ میلیمتری کشت داده و به ازای هر رقم گندم دوروم ۵ پتری‌دیش به عنوان ۵ تکرار در نظر گرفته شد. ظروف پتری محتوی جنین ابتدا به منظور جوانه زنی به مدت ۳-۲ روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در داخل ژرمیناتور قرار گرفت (۲۵). سپس به منظور ادامه رشد و تشکیل رنگدانه کلروفیل در دمای ۲ ±۲۰ درجه سانتیگراد و فتوپریود ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی در انکوباتور نگهداری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این آزمایش تعداد باززایی جنینهای نارس در ۲،۴،۸و۱۶ روز پس از تلقیح برای هر ژنوتیپ، جداگانه یادداشت برداری و در هر تکرار و هر زمان به درصد تبدیل شد. سپس به منظور تجزیه واریانس درصد باززایی ارقام در زمان، پس از تبدیل زاویه‌ای داده‌ها ($ArcSin\sqrt{x}$) از طرح کرتهای یکبار خرد شده در زمان، در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۵ تکرار و ۴ زمان استفاده گردید (۱۱). سرعت باززایی جنینهای نارس از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{سرعت باززایی} = \sum_{n=1}^{i} \left(\frac{\text{تعداد جنین باززایی شده تا روز } i}{\text{تعداد روز پس از تلقیح جنین}}\right)$$

بنابراین در این آزمایش فرمول محاسبهٔ سرعت باززایی در طول ۱۶ روز از این قرار است:

$$\text{سرعت باززایی} = A/2 + A\text{-}B/4 + C\text{-}B/8 + D\text{-}C/16$$

که A، B، C و D به ترتیب درصد جنینهای باززایی شده در ۲، ۴، ۸ و ۱۶ روز پس از تلقیح می‌باشد. سپس به منظور ارزیابی آماری داده‌های مربوط به واکنش ارقام مختلف به کشت جنین نارس از طریق سرعت باززایی، از روش آماری طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار استفاده شد. از برنامهٔ تجزیه واریانس نرم افزار کامپیوتری اس.ا.اس (۲۶) و برنامه آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار نرم افزار کامپیوتری ام. استات (۱۴) برای مقایسه میانگینها استفاده به عمل آمد.

۱-Hydroponic recirculating system ۲-Lamin air flow ۳-6-Benzilamino purine(BAP) ۴-Agarose, Sigma type 1A

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1377.2.3.6.4]

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس درصد و سرعت باززایی جنینهای نارس در ارقام مورد مطالعه

منابع تغییرات	درجات آزادی	میانگین مربعات				
		درصد باززایی (روز پس از تلقیح)				سرعت باززایی
		۲	۴	۸	۱۶	
رقم	۲۷	۶۲۱/۷۷**	۳۴۳/۰۷**	۳۹۹/۳۶**	۱۲۷/۸۴	۷۰/۷۹**
خطا	۱۱۲	۹۱/۴۶	۵۷/۸۷	۱۴۲/۴۶	۱۱۰/۳۸	۸/۳۸

** - در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است.

نتایج و بحث

تفاوت بین ارقام از نظر درصد باززایی جنین نارس، در هر کدام از زمانهای ۲، ۴ و ۸ روز پس از تلقیح در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید ولی در ۱۶ روز پس از تلقیح معنی‌دار نشد (جدول ۱).

مقایسه میانگینهای ارقام مورد مطالعه برای درصد باززایی (جدول ۲) نشان می‌دهد که رقم "شاهیوندی" با ۵۶ درصد در دو روز پس از تلقیح، رقم "بلیخ-۲" با ۷۸ درصد در چهار روز پس از تلقیح، رقم "هاگلا" با ۱۰۰ درصد در هشت روز پس از تلقیح و ارقام "Awl_4/Bit" ، "هاگلا"، "PI ۴۰۱۰۰" ، "استورک" ، "استرومسوا" ، "آفن کیل" و "پاردلا" هر کدام با ۱۰۰ درصد در ۱۶ روز پس از تلقیح به ترتیب بیشترین درصد باززایی را داشتند. این نتیجه حاکی از این است که با وجود اختلاف معنی‌دار بین درصد باززایی ارقام در ۲، ۴ و ۸ روز پس از تلقیح، گذشت زمان این اختلاف راکاهش داده، به ترتیبی که در ۱۶ روز واکنش کلیه ارقام به باززایی به ۱۰۰ درصد نزدیک شده و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری (در سطح یک درصد) بین آنها مشاهده نگردید. با این وجود، در این زمان (۱۶ روز پس از تلقیح) ارقام "نلی-۱" و Awl_1/Sbl_4 به ترتیب با ۸۴ و ۸۸ درصد کمترین میزان باززایی را دارا بودند. رقم Awl_1/Sbl_4 با متوسط ۴۸/۵ درصد و ارقام "هاگلا" و "آفن کیل" با متوسط ۸۰ درصد به ترتیب دارای کمترین و بیشترین متوسط درصد باززایی جنینهای نارس در طول زمان یادداشت برداری بودند. سایر ارقام نیز اختلاف معنی‌داری داشتند، بدین ترتیب که با آزمون مقایسه میانگین ده گروه که در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند رتبه بندی شدند. این نتیجه ناشی از تنوع ژنتیکی موجود میان ارقام مورد مطالعه برای ظرفیت باززایی جنین نارس می‌باشد که با سایر گزارشها (۵، ۸، ۱۹و۲۴) هماهنگی دارد. این گزارشها نقش بارزی برای ژنوتیپ گیاه دهندهٔ جنین نارس در تعیین درصد باززایی گیاهی قایل هستند. باسکاران و اسمیت (۸) معتقدند که اختلاف ژنوتیپی ممکن است به سطوح متفاوت هورمون‌های مترشحه داخلی (درون‌زا) مربوط باشد. حتی عکس‌العملهای متفاوت ریز نمونه‌های یک ژنوتیپ می‌تواند به علت تفاوت شیب غلظت این هورمون‌ها باشد که در این صورت انتخاب غلظت تنظیم کننده‌های رشد، به ویژه اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها در محیط کشت بی‌تأثیر نیست (۱۹و۲۴).

نتایج تجزیه واریانس واکنش ارقام در زمانهای تلقیح نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری از لحاظ درصد باززایی در سطح یک درصد بین زمانهای مختلف تلقیح جنین نارس وجود دارد (جدول ۳). به همین ترتیب مقایسهٔ میانگینهای زمانهای یادداشت برداری ۲، ۴، ۸و ۱۶ روز پس از تلقیح به ترتیب ۲۶، ۵۷، ۸۸و۹۶ درصد باززایی جنینهای نارس را به خود اختصاص دادند (شکل ۱). مقایسه میان این دوره‌های زمانی نشان دهنده روند نزولی افزایش درصد باززایی ارقام، ناشی از افزایش سن کشت می‌باشد. همان طوری که ملاحظه می‌شود میانگین کل درصد باززایی ارقام در ۱۶ روز پس از تلقیح هنوز به ۱۰۰ درصد نرسیده است، ولی به طور قطع اختلاف ژنوتیپی

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1377.2.3.6.4]

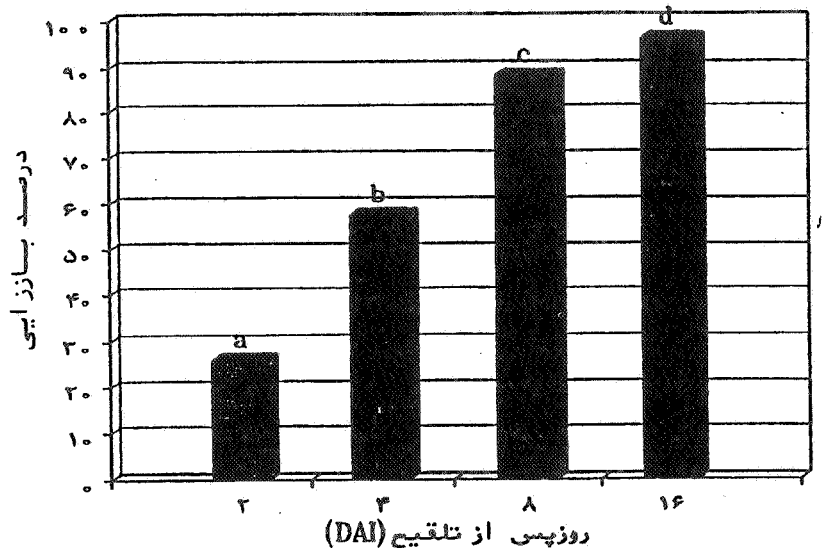
جدول ۲- مقایسه میانگینهای درصد و سرعت باززایی جنینهای نارس ارقام تحت مطالعه

کد	رقم	درصد باززایی (روز پس از تلقیح)				سرعت باززایی
		۲	۴	۸	۱۶	
۱	ام ربیع - ۵	۱۲ g-j*	۳۴ h	۶۶ ef	۹۸	۱۷/۵ ij
۲	Awl_1/Sbl_4	۱۲ g-j	۳۴ h	۶۰ f	۸۸	۱۶/۵ j
۳	Awl_7/Bit	۱۸ g-j	۴۰ h-g	۷۶ def	۱۰۰	۲۰/۵ f-j
۴	ماسارا-۱	۴ j	۵۲ c-h	۸۴ b-f	۹۶	۱۸/۷ hij
۵	آلتار-۸۴	۲۴ c-h	۴۶ e-h	۹۰ a-e	۹۸	۲۳/۵ d-i
۶	الواگ-۲	۱۶ g-i	۵۰ d-h	۸۸ a-e	۱۰۰	۲۲/۰ e-j
۷	کوریفلا	۲۲ d-h	۶۲ a-f	۹۰ a-e	۹۲	۲۴/۶ c-h
۸	آکانچی	۸ ij	۵۲ c-h	۸۴ b-f	۹۲	۱۱/۵ hij
۹	دیپر-۶	۱۸ f-i	۵۶ b-g	۹۲ a-d	۹۸	۲۳/۴ d-i
۱۰	مکزیکال-۷۵	۱۶ f-j	۴۶ e-h	۸۰ c-f	۹۰	۲۰/۴ g-j
۱۱	استرمسوال-۱	۱۴ g-j	۵۰ d-h	۸۶ a-e	۹۴	۲۱/۰ f-j
۱۲	سلتا	۱۸ f-j	۴۴ fgh	۹۲ a-d	۹۶	۲۱/۷ e-j
۱۳	بومر-۲۴	۱۴ f-j	۵۲ c-h	۹۸ ab	۹۸	۲۲/۲ d-j
۱۴	شهتاس	۲۲ d-h	۷۴ ab	۹۴ abc	۹۶	۲۶/۶ b-g
۱۵	شاهیوندی	۵۶ a	۷۰ a-d	۹۴ a-d	۹۶	۳۴/۶ a
۱۶	بلیخ-۲	۲۸ b-g	۷۸ a	۹۴ a-d	۹۸	۲۸/۷ a-e
۱۷	نیل	۵۰ ab	۷۶ ab	۹۴ a-d	۹۶	۳۳/۹ ab
۱۸	هاگلا	۴۴ a-e	۷۶ ab	۱۰۰ a	۱۰۰	۳۳/۰ ab
۱۹	PI ۴۰۱۰۰	۲۰ e-i	۶۰ a-g	۹۲ a-d	۱۰۰	۲۴/۵ c-h
۲۰	استورک	۴۶ a-d	۶۲ a-f	۹۲ a-d	۱۰۰	۳۱/۲ abc
۲۱	راسکان-۳۹	۴۰ a-f	۶۶ a-e	۹۲ a-d	۹۴	۲۹/۹ a-d
۲۲	استرومسوا	۴۸ abc	۷۲ abc	۹۶ abc	۱۰۰	۳۳/۲ ab
۲۳	آفن کیل	۴۶ a-d	۷۶ a	۹۸ ab	۱۰۰	۳۳/۴ ab
۲۴	پاردلا-۱	۳۲ a-g	۶۰ a-g	۹۴ a-d	۱۰۰	۲۷/۶ a-f
۲۵	پریون - ۱	۵۰ ab	۷۲ ab	۹۲ a-d	۹۸	۳۳/۷ ab
۲۶	نلی - ۱	۲۲ d-h	۵۰ d-h	۷۸ c-f	۸۴	۲۱/۹ e-j
۲۷	آسته گاتا	۱۴ f-j	۴۰ gh	۸۴ a-e	۹۲	۱۹/۵ hij
۲۸	MT/HO/حیدر	۱۲ hij	۵۴ c-h	۸۸ a-e	۹۲	۲۰/۷ f-j

*- در هر ستون اعدادی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند براساس آزمون LSD تفاوت معنی دار ندارند ($P<0/01$).

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1377.2.3.6.4]



شکل ۱- مقایسه درصد باززایی در زمانهای مختلف یادداشت برداری پس از تلقیح جنینهای نارس ارقام گندم دوروم

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس درصد باززایی جنینهای نارس ارقام تحت مطالعه

منابع تغییرات	درجات آزادی	میانگین مربعات
رقم	۲۷	۹۸۳/۱۲**
خطای الف	۱۱۲	۲۰۲/۵۹
زمان (روز)	۳	۸۹۰۱۳/۹۷**
رقم × زمان	۸۱	۱۶۹/۶۴**
خطای ب	۳۳۶	۶۶/۵۳

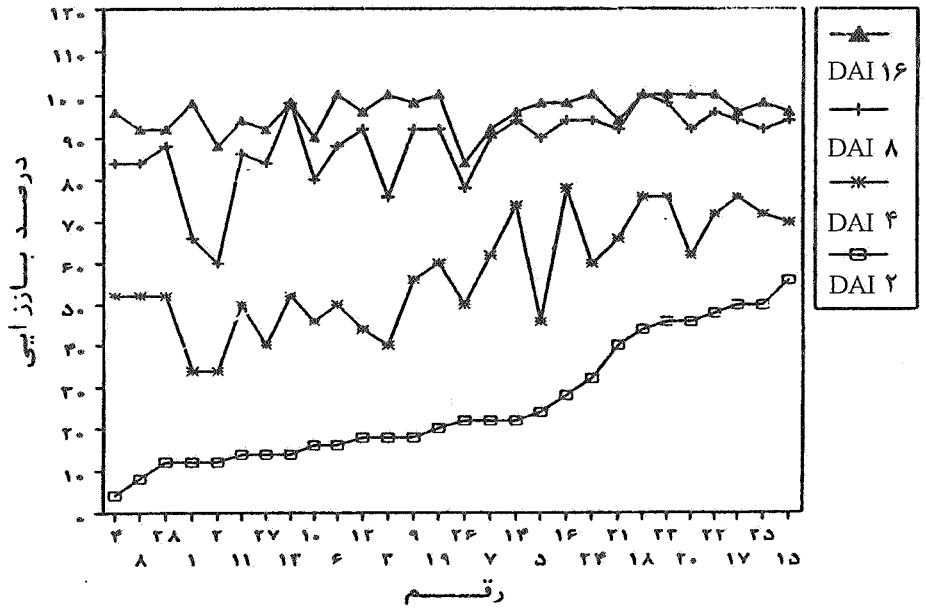
**- در سطح احتمال یک درصد معنی دار است.

بین ارقام بسیار کمتر از زمانهای قبل از آن می‌باشد، به طوری که در دو روز پس از تلقیح حداکثر تنوع بین ارقام مشاهده می‌شود (شکل ۲). در این زمان رقم "ماسار-۱" با ۴ درصد و رقم "شاهیوندی" با ۵۶ درصد به ترتیب کمترین و بیشترین باززایی را داشته‌اند. از آن‌جا که حصول حداکثر ظرفیت باززایی در حداقل زمان مطلوب‌ترین است، لذا رقم "شاهیوندی " در بین ارقام بهترین واکنش را از خود نشان داده است. اما همان طور که در شکل ۲ ملاحظه می‌شود این رقم در مراحل بعدی یادداشت برداری از چنین روندی برخوردار نبوده است. علت آن مربوط به اثر متقابل بسیار معنی‌دار (یک درصد) رقم و زمان تلقیح می‌باشد (جدول ۳). بدین مفهوم که درصد باززایی جنینهای نارس ارقام تحت مطالعه در زمانهای مختلف (روز پس از تلقیح) بسیار متفاوت است و حداکثر ظرفیت باززایی جنین نارس هر رقم در زمان معینی به وقوع می‌پیوندد.

طبق گزارشهای گال و مونلا (هر دو به نقل از ۱۳)، ارقام گندم در طی بلوغ بذر از لحاظ میزان سیتوکنین‌هاو اکسین‌ها متفاوت هستند، لذا پاسخ بهتر برخی از ارقام به علت مقدار هورمون درون زای گیاهی و تأثیر تنظیم کنندگی آنها می‌باشد، که این خود احتمالاً تحت تأثیر حضور ژن‌های متفاوت کنترل کنندهٔ پاسخ به باززایی کشت جنین در ارقام مختلف می‌باشد. گزارشهای موجود (۷و۱۷) حاکی از نقش ژن‌ها یا بخشی از ژنوم گندم در واکنش مطلوب به کشت بافت از جمله ظرفیت باززایی

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1377.2.3.6.4]



شکل ۲- اثر متقابل رقم و زمان (روز پس از تلقیح جنین نارس = DAI) برای درصد باززایی ارقام گندم دوروم

می‌باشد، که در این مطالعات کروموزوم‌های گیاهی که در باززایی گیاهی مؤثر بوده‌اند مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. شناسایی مناطق کروموزومی مسئول قابلیت باززایی بالا می‌تواند در انتخاب برتر ژنوتیپ‌ها برای انتقال ژنتیکی[1] مؤثر واقع شود (۱۳). ماتیاس و آتکینسون (۲۰) معتقدند که تنوع آللی در گندم ممکن است از طریق تأثیر بر متابولیسم هورمونی، بر رشد کالوس[2] جنین‌زای سوماتیکی و باززایی گیاهی عمل نماید. علاوه بر این، بن عامر و همکاران (۷) نشان دادند که آلل پاکوتاهی Rht_8 دارای اثر ناچیزی بر رشد کالوس و درصد باززایی گندم می‌باشد، در حالی که آلل ppd_1 (مسئول حساسیت به طول روز) تأثیر عمده‌ای بر همان ویژگیهای کشت بافت دارد. بنابراین می‌توان اظهار نمود که بروز مستقیم یا غیرمستقیم یک یا تعدادی ژن، باززایی ژنوتیپ‌هایی را که قابلیت باززایی بالایی دارند کنترل می‌کند. البته در رابطه با تأثیر ژنوتیپ در واکنش به کشت بافت، حتی نباید از نقش DNA سیتوپلاسمی غافل بود (۲).

این امکان نیز وجود دارد که برخی از اجزای محیط کشت در تنظیم تظاهر بعضی از ژن‌ها نقش داشته باشند. به عنوان مثال طبق گزارش فنل و همکاران (۱۳) رقم گندم "ستیا" دارای ظرفیت باززایی بالاتری در یک محیط کشت نسبت به دو محیط کشت دیگر تحت آزمایش بود. در مقابل، این موضوع برای رقم "مونیا" صادق نبود زیرا تفاوت آماری معنی‌داری از لحاظ ظرفیت باززایی بین سه محیط کشت وجود نداشت. در چنین مواردی ژنوتیپ نسبت به محیط کشت عامل مهمتری است، که پتانسیل باززایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. نقش ژنوتیپ به عنوان عامل تعیین کننده در پاسخ مطلوب به کشت بافت، در سایر گیاهان نیز گزارش شده است. به عنوان مثال ارزانی و همکاران (۴) تنوع ژنتیکی برای جنین‌زایی و اندام‌زایی سوماتیکی حاصل از کشت بذر طالبی در محیط آزمایشگاهی را گزارش نموده‌اند.

ارقام گندم دوروم از لحاظ سرعت باززایی جنینهای نارس در محیط کشت MS تفاوت بسیار معنی‌داری داشتند (جدول ۱). دامنه این اختلاف از حداکثر ۳۴/۶ درصد در روز در رقم "شاهیوندی" و حداقل ۱۶/۵ درصد در روز در رقم "Awl_1/Sbl_4" متغیر بوده و با مقایسه میانگینهای مربوطه،

۱-Transformation ۲-Callus

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1377.2.3.6.4]

ارقام مختلف در ده گروه متمایز از یکدیگر رتبه بندی می‌شوند (جدول ۲). در کل رقم "شاهیوندی" بالاترین سرعت باززایی را داشت که در زمان یادداشت برداری اول نیز بالاترین درصد باززایی به این رقم اختصاص یافته و نیز در متوسط زمانهای یادداشت برداری جزو بهترین ارقام بود. قابل توجه است که رقمی که باززایی مستقیم سریع‌تری داشته باشد از لحاظ صرفه‌جویی در وقت، هزینه و احتمال ایجاد تنوع سوماکلونی[1] مطلوب‌تر است. از مقایسه درصد و سرعت باززایی ارقام متوجه می‌شویم که پایین بودن درصد باززایی ارقام "هاگلا" ، "آفن کیل" ، "استرومسوا" "پریون-۱" به ترتیب مربوط به کمتر بودن و بیشتر بودن سرعت باززایی جنینهای نارس این ارقام به ویژه در زمان اول یادداشت برداری بوده است. به طور کلی، سرعت و درصد باززایی ارقام در این مطالعه، نسبت به سایر مطالعات مشابه در گندم نان (۶و۱۳) بیشتر بوده است، که می‌توان بخش عمده‌ای از این واکنش بهتر ارقام را به محیط مطلوب ترگیاهان تأمین‌کنندهٔ جنین در هیدروپونیک نسبت داد. اثر مطلوب محیط هیدروپونیک در واکنش جوامع تریتیکاله به کشت بساک نیز توسط ارزانی و داروی (۱) توصیف گردیده است.

سرعت باززایی گیاه از جنین نارس گندم دوروم از لحاظ کاربردهای به نژادی، خصوصیتی مطلوب و موردنظر است، زیرا در موارد استفاده جهت تسریع نسل گیاه (یا طول دوره اصلاحی)، نجات جنین هاپلوییید، نجات ژرم پلاسم، ترانسفورماسیون ژنی و تسریع در باززایی اهمیت بسیاری دارد. گندم دوروم نه تنها به عنوان یک گیاه زراعی مهم بلکه به عنوان جد تتراپلوییید گندم (با فرمول ژنومی AABB) جهت ایجاد گندم آمفی هاپلوییید به منظور انتقال ژن‌های مطلوب به گندم نان و مطالعه فیلوژنی گندمهای پلی پلوییید نیز به کار می‌رود(۳). این گندم همچنین برای ایجاد تریتیکالهٔ هگزاپلوییید، که گسترده‌ترین نوع آن در سطح دنیا می‌باشد، با چاودار (RR) تلاقی می‌یابد.

نتایج این آزمایش از لحاظ تأثیر در واکنش به باززایی از جنین نارس و کلاً واکنش به کشت بافت، موافق نتایج مطالعات سیرز و دکارد (۲۷) و ماداک و همکاران (۱۹) و بر خلاف نتایج اوزیاس اکینز و واسیل (۲۲) ، که ژنوتیپ را عاملی غیراساسی دانسته‌اند، می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشاهدات مربوط به واکنش ارقام دوروم مورد مطالعه نسبت به باززایی جنین نارس در محیط کشت آزمایشگاهی نشان داد که این ارقام از این لحاظ به طور معنی‌داری متفاوتند ($P<0/01$). حداکثر پتانسیل باززایی جنین نارس در حداقل زمان (دو روز پس از تلقیح جنین بر روی محیط کشت) در رقم "شاهیوندی" مشاهده گردید، که در حقیقت بهترین واکنش را در میان ارقام تحت مطالعه از خود نشان داد. اما این رقم در مراحل بعدی یادداشت برداری از چنین روندی برخوردار نبود، که علت آن به اثر متقابل بسیار معنی دار رقم × زمان تلقیح نسبت داده شد. در کل "شاهیوندی" با بالاترین سرعت باززایی به عنوان برترین ژنوتیپ شناخته شد و خصوصیت سرعت باززایی بالا، از لحاظ صرفه‌جویی در وقت، هزینه و احتمال ایجاد تنوع سوماکلونی کمتر در به کارگیری کشت جنین در برنامه‌های به نژادی حایز اهمیت است.

سپاسگزاری

هزینه‌های مربوط به این طرح بخشی از محل اعتبارات دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان و بخشی دیگر از سوی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی تأمین گردیده است که بدین‌وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

۱- Somaclonal variation

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1377.2.3.6.4]

منابع مورد استفاده

1- Arzani, A. and N.L. Darvey. 1993. Hydroponic and anther culture: tools for rapid breeding in forage cereals. pp. 83-91. *In* B.C. Imrie and I.B. Hacker (eds.) Focused plant improvment: toward responsible and sustainable agriculture. Proc. 10th Australian Plant Breeding Conf. April, 1993.

2- Arzani, A. and N.L. Darvey. 1996. Possitive effect of timopheevii cytoplasm on anther culture response of triticale. pp. 391-393. *In* H. Guedes-Pinto, N.L. Darvey and V.P. Carnide (eds.). Triticale: Today and Tomorrow. Kluwer Academic Publ., The Netherlands.

3- Arzani, A., M. Poursiahbidi and A. Rezaei. 1998. Geographical affinity as a potential cause of high crossability between *Triticum turgidum* landraces and *Aegilops* originated from western Iran. pp. 147-149. *In* A.E. Slinkard (ed.) Vol. 2, Proc. 9th Int. Wheat Genetic Symp., 2-7 August, 1998, Univ. of Saskatchewan, Saskatoon, Canada.

4- Arzani, A., K. Shimonishi, Y. Asano and K. Oosawa. 1989. Somatic embryogenesis and organogenesis from *in vitro* seed culture of melon. Japan. J. Breeding, (Suppl. 2): 108-109.

5- Balatero, C.H. and N.L. Darvey. 1993. Influence of selected wheat and rye genotypes on the direct synthesis of hexaploid triticale. Euphytica, 66: 179-185.

6- Barakat, M.N. 1994. Combining abilities of *In vitro* traits in wheat (*Triticum aestivum* L.) immature embryo culture. Euphytica, 76: 169-175.

7- Ben Amer, I.M., A.J. Worland and R. Schlegel. 1992. *In vitro* culture variation of wheat and rye caused by genes affecting plant growth habit *in vivo*. Euphytica, 61:233-240.

8- Bhaskaran, S. and R.H. Smith. 1990. Regeneration in cereal tissue culture: a review. Crop Sci. 30: 1328-1336.

9- Bright, S.W.J. and M.G.K. Jones. 1985. Cereal Tissue and Cell Culture. Martinus Nijhoff/DV. W. Junk Publishers. Dordrecht.

10- CIMMYT annual report. 1972. International Maize and Wheat Improvement, Mexico.

11- Compton. M.E. 1994. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 37:217-242.

12- Feldman, M. and E.R. Sears. 1981. The wild gene resources of wheat. Scientific American, 244:102-112.

13- Fennel, S., N. Bohorova, M. Van Ginkel, J. Crossa and D. Hoisington. 1996. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats. Theor. Appl. Genet. 92: 163-169.

14- Freed, R.D. 1986. MSTAT Manual. Michigan State Univ. Press, MS, USA.

15- Gamborg, O.L. 1991. Media preparation. pp. 1-24. In K. Lindsey (eds.) Plant Tissue Culture Manual-Fundamentals and Applications. Kluwer Academic Publ. The Netherlands.

16- Hoagland, D.R. and D.I. Arnon. 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Agric. Exp. Stn. Circu. pp. 307-332.

17- Kaleikau, E.K., R.G. Sears and B.S. Gill. 1989. Control of tissue culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. 78: 783-787.

18- Kumar, K. 1995. An Introduction to Plant Tissue Culture. New Central Book Agency LTD, India. 189p.

19- Maddock, S.E., V.A. Lancaster, R. Risiott and J. Franklin. 1983. Plant regeneration from culture immature embryo and inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Experimental Botany, 34: 915-926.

20- Mathias, R.J. and E. Atkinson. 1988. *In vitro* expression of genes affecting whole plant phenotype- the effect of Rht/Gai alleles on the callus culture response of wheat (*Triticum aestivum* L.) Theor. Appl.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1377.2.3.6.4]

Genet. 75: 474-479.

21- Narayanaswami, S. and K. Norstog. 1964. Plant embryo Culture. Bot. Rev. 30: 587-628.

22- Ozias-Akins, P. and I.K. Vasil. 1982. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): Evidence for somatic embryogenesis. Protoplasma, 110: 95-105.

23- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. Marinus Nijhoff Publ.

24- Raghavan, V. 1980. Embryo culture. Int. Rev. Cytol. 11B: 205-240.

25- Ruzdon, M.K. 1995. An Introduction to Plant Tissue Culture. Oxford & IBH Publishing Co. UK, 398p.

26- SAS Institute. 1993. SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth Edition. SAS Institute. Cary, NC.

27- Sears, R.G. and E.L. Deckard. 1982. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. Crop Sci. 22: 546-550.

28- Sharma, H.C. and B.S. Gill. 1982. Effect of embryo age and culture media on plant growth and vernalization response in winter wheat. Euphytica, 31:629-634.

29- Sharma, D.R., R. Kaur and K. Kumar. 1996. Embryo rescue in plant-a review. Euphytica, 89:325-337.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1377.2.3.6.4]