مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵ شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۱۲-۱۰۱

کالوس‌زایی و باززایی لاین‌های گندم نان از ریزنمونه‌های کولئوپتیلی

Callus induction and regeneration of bread wheat lines from coleoptile explants

علی اکبر غلامی[۱]، علیرضا تاری نژاد*[۲]

Gholami Ali Akbar [1] and Tarinejad Alireza*[2]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، ۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی
دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان کیلومتر ۳۵ جاده تبریز-مراغه

1. MSc. in Biotechnology, 2. Associate Prof.
Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan
Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: atarinejad@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۵)

چکیده

بهینه‌سازی کشت بافت در گندم برای فرآیند انتقال ژن یا کشت سوسپانسیون سلولی امری ضروری است. به منظور بهینه‌سازی کشت بافت، چهار لاین گندم به نام‌های C-D-4, C-D-6, C-D-8, C-D-9، استفاده شد. آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. قابلیت کالوس‌زایی و باززایی لاین‌های تحت تیمارهای مختلف تنظیم کننده‌های رشد مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای کالوس‌زایی از محیط کشت ML1G1 حاوی سه سطح اکسین از نوع توفوردی (۲، ۲/۴ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و برای باززایی از محیط کشت MS و N6 حاوی سطوحی از هورمون‌های NAA، BAP و Kin استفاده شد. با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل لاین در تیمارهای مختلف هورمونی، نتایج نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به لاین C-D-9 (۸۲٪) و سطح ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی با میانگین (۶۰٪) بود. از نظر القاء کالوس جنین‌زا، محیط کشت ML1C2 که حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره بود، بیشترین درصد جنین‌زایی را در لاین‌های C-D-9 و C-D-8 تولید نمود. بیشترین درصد شاخه‌زایی ۲۹/۶۲٪ برای لاین C-D-9 در محیط کشت N6(6) حاوی ۱mg/l BA + ۱mg/l IAA به دست آمد.

واژه‌های کلیدی

توفوردی،
قطعات کولئوپتیل،
کشت بافت،
گندم

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.5.2]

مقدمه

گندم مهم‌ترین محصول ایران و جهان است. سطح زیر کشت این محصول در دنیا برابر ۲۳۰-۲۲۰ میلیون هکتار و در ایران حدود ۵/۶ میلیون هکتار است که از سایر غلات بیشتر و برابر ۲۲ درصد سطح زیر کشت کلیه غلات است (Kazemi Arbat 2005). به همین علت، غذای عمده بیش از ۴۰ کشور جهان است که جوابگوی ۳۵ درصد جمعیت دنیاست (Bushuk 1998). کشت بافت، نوعی تکثیر غیرجنسی است که مزیت آن نسبت به سایر روش‌های مرسوم، تولید تعداد زیادی گیاه در محیط درون شیشه‌ای با محتوای ژنتیکی یکسان و کیفیت یکنواخت، در زمانی کوتاه‌تر و فضایی محدودتر می‌باشد (Tripathi and Tripathi 2003). منظور از بهینه‌سازی کشت بافت در گندم، فراهم نمودن بستر مناسب برای انتقال ژن به این گیاه یا بررسی‌های مراحل مختلف تکوین گیاه در شرایط درون شیشه‌ای است (Tarinejad et al. 2007).

در گندم از ریزنمونه‌های مختلفی نظیر گل‌آذین نارس و جنین بالغ برای تولید کالوس استفاده شده است و تا به حال کشت جنین نارس گندم به عنوان بهترین ریزنمونه در مطالعات کشت کالوس در گندم شناخته شده است (Carman et al. 1988; Chowdhury et al. 1991; Ozgen et al. 1996; NouriDelavar and Arzani 2000). اما استفاده از قطعات برگی حاصل از جوانه‌زنی بذرهای خشک دارای مزایای متعددی است که از جمله می‌توان به سهولت کار و قابل دسترس بودن آن در تمام طول سال اشاره کرد (Yu et al. 2008). غالباً برای تولید بافت کالوس از محیط کشت MS استفاده می‌شود و ساکارز یا گلوکز به عنوان منبع قند به کار می‌رود (Farsi and Zolali 2008). تولید کالوس در گیاهان تک‌لپه‌ای معمولاً مشکل‌تر از گیاهان دولپه‌ای صورت می‌گیرد، به همین دلیل برای القاء و تشکیل کالوس، نیاز به اضافه کردن تنظیم کننده های رشد مصنوعی می‌باشد (Ichihashi and Kato 1986). باززایی گیاه از کالوس یک پدیده مرفوژنتیکی پیچیده می‌باشد که عوامل داخلی و خارجی و فیزیولوژیک گیاه نقش مهمی در آن ایفا می‌کنند (Hagio et al. 2002). میزان موفقیت در رشد کالوس و باززایی گیاه در غلات بستگی زیادی به نوع ریزنمونه دارد. به‌طور کلی قسمت‌های رویشی گیاهان نسبت به قسمت‌های زایشی آمادگی بیشتری برای باززایی دارند و قابلیت ژنتیکی باززایی در این خصوص در تمام ارقام وجود دارد (Bhaskaran and Smith 1990). علاوه بر عوامل فیزیولوژیکی، بسیاری از ژن‌های کنترل‌کننده صفت باززایی در گندم، برنج، جو و سایر گونه‌های گیاهی بررسی شده است که بیانگر کنترل ژنتیکی صفات پاسخگو به کشت بافت می‌باشد (Ben Amer et al. 1999). به‌طور کلی پاسخ ژنوتیپ‌های مختلف گندم نسبت به توانایی باززایی از کالوس متفاوت می‌باشد. بسیاری از محققان وجود این امر ناشی از تفاوت ترکیب و غلظت‌های هورمون‌های داخلی گیاه و تفاوت‌های حساسیت به تنظیم کننده های رشد مصنوعی مورد استفاده و شرایط محیطی گیاه اعلام نموده‌اند (Luica et al. 1997; Tarinejad et al. 2007; Mendoza and Kaeppler et al. 2002). تعدادی ژن در کنترل باززایی ژنوتیپ‌های گندم، مؤثر است (Ben Amer et al. 1999). بررسی‌ها نشان می‌دهد پاسخ ارقام بومی گندم نسبت به ارقام اصلاح‌شده به القای کالوس و باززایی بیشتر است (Hunsinger and Schauz 1987). در تحقیقی ۲-۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D و ۲-۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر کایتین به عنوان بهترین ترکیب هورمونی برای القای کالوس معرفی شده است (Liu et al. 1990). در تحقیق دیگر، قابلیت القاء و باززایی از کالوس در ۸۴ لاین گندم سیمیت مورد بررسی و تفاوت بین ژنوتیپ‌ها معنی‌دار بود (Fennell et al. 1996). در آزمایشی از کشت جنین رسیده برای کالوس‌زایی در گندم استفاده شده و نشان داده شده که بیشترین میزان کالوس‌زایی ۸۸/۳۳٪ در محیط کشت MS دارای 2,4- mg/l 4D و ۱mg/l NAA به دست می‌آید (Turhan and Baser 2003). در پژوهشی دیگر کالوس‌زایی و باززایی ۴۷ ژنوتیپ گندم از ریزنمونه جنین‌رسیده مورد بررسی قرار گرفت. اختلاف معنی‌داری از نظر باززایی، کارایی کشت و ظرفیت باززایی بین ارقام وجود داشت (Zale et al. 2004). تعداد ۱۰۷ واریته گندم نان از نظر فراوانی القای کالوس و توانایی باززایی بررسی و مشاهده شد که ژنوتیپ‌های دارای واکنش بهتر به محیط کشت

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.5.2]

کالوس‌زایی، برای باززایی و انتقال ژن بهتر است (Machii et al. 1998). این پژوهش‌ها نشان می‌دهد اکثر محققین از جنین بالغ به عنوان ریزنمونه در کشت بافت گندم استفاده نموده‌اند ولی باززایی ارقام با استفاده از ریزنمونه جنین بالغ همیشه پایین بوده است. بنابراین، در تحقیق حاضر واکنش چهار رقم گندم نان بـه کشـت قطعات برگی (کولئوپتیل) ازنظر القای کالوس و باززایی در سطوح مختلف هورمون‌های اکسینی و سیتوکینین مورد بررسی قرار گرفت. هدف دیگر انجام این آزمایش، ارائه پروتکل کارآمد برای کشت بافت و ریز ازدیادی چهار رقم گندم و فراهم کردن ابزار کارآمد برای مطالعه انتقال ژن و دست‌ورزی ژنتیکی با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت بافت، در دورنمای آینده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان در سال ۱۳۹۵ اجرا شد. بذور چهار لاین گندم به نام-های (C-D-4, C-D-6, C-D-8, C-D-9) از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. بذوری که ظاهری سالم داشتند برای ضدعفونی و کشت انتخاب شدند. پس از ضدعفونی بذور با الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه، محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۲۵٪ همراه با ۱ قطره توین ۲۰ به مدت ۱۵ دقیقه، در مرحله‌ی آخر این بذور سه بار متوالی به مدت ۱، ۳ و ۵ دقیقه با آب مقطر دو بار استریل زیر هود لامینار شستشو داده شدند. سپس روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند تا آب سطحی آن‌ها کاملاً خشک شوند. سپس برای جوانه‌زنی به محیط MS ½ در شیشه مربا منتقل شدند. وقتی‌که اندازه گیاهچه به ۱۰-۵ سانتی‌متر رسید (شکل ۱)، کلئوپتیل به‌اندازه ۲-۱ سانتی‌متر از بخش ساقه جدا و به قطعات ۲-۱ میلی‌متری برش داده شدند. سپس این قطعات در محیط ML1G1 (Ahmadabadi et al. 2007)، (حاوی ویتامین‌ها و نمک‌های N6 و ۲ میلی‌گرم در لیتر گلایسین، ۲۸۸۰ میلی‌گرم در لیترL - پرولین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین، ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز با اسیدیته ۵/۸) برای القا کالوس قرار گرفتند. در هر پتری دیش که حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت بود، تعداد ۹ ریزنمونه کشت گردید. سپس درب ظروف با پارافیلم بسته شد. نمونه‌ها جهت کالوس‌زایی در شرایط تاریکی و دمای ۱± ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ هفته قرار داده شدند. بعد از شکل‌گیری کالوس‌ها، تعداد کالوس‌های تولید شده در هر پتری‌دیش شمارش و درصد کالوس‌زایی برای هر لاین و هر تیمار به‌طور جداگانه محاسبه گردید. در مرحله بعد کالوس‌های تولید شده جهت رشد ، تکثیر و تولید کالوس‌های جنین‌زا به محیط کشت مشابه ML1C2 (Ahmadabadi et al. 2007)، با این تفاوت که حاوی دو سطح ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر نیترات نقره بود واکشت شدند (شکل ۱). نیترات نقره، به عنوان ممانعت کننده اثر اتیلن، بر تقسیم و تمایز سلولی مؤثر است. دو هفته پس از واکشت، کالوس‌های جنین‌زا برای باززایی گیاه به محیط باززایی ML1R3 (Ahmadabadi et al. 2007)، انتقال داده شدند. محیط کشت‌های استفاده شده برای باززایی، محیط کشت MS و N6 بودند. که هرکدام شامل شش محیط کشت متفاوت بودند (جدول ۱).

بعد از کشت کالوس‌ها در محیط باززایی، ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱ هفته در شرایط تاریکی و دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تیمارگردیدند. بعد از این مدت نمونه‌ها تحت تیمار ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از آغاز باززایی، کالوس‌های تغییر رنگ داده به لوله‌های آزمایش با محیط کشت مشابه منتقل شدند تا فضای کافی برای رشد گیاهچه وجود داشته باشد. شاخه‌های باززا شده به طول ۲ الی ۳ سانتی‌متر، جهت تولید و توسعه‌ی ریشه‌ها، به محیط کشت MS فاقد هورمون حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز انتقال داده شد. گیاهان ریشه‌دار شده از لوله‌ی آزمایش خارج شده و پس از کشت در خاک استریل به محیط سازگار سازی انتقال داده شدند (شکل ۱).

جدول ۱- انواع محیط کشت باززایی مورد استفاده برای ریزنمونه قطعات برگی گندم
Table1-Type of regeneration media used for wheat coleoptile segment explants

محیط کشت	نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد	محیط کشت	نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد	محیط کشت	نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد	محیط کشت	نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد
MS(1)	بدون هورمون	MS(4)	2 mg/l KIN + 0.5 mg/l NAA	N6(1)	0.5 mg/l BAP	N6(4)	0.5 mg/l KIN
MS(2)	1 mg/l IAA + 1 mg/l BA	MS(5)	2 mg/l BAP + 0.5 mg/l IAA	N6(2)	2 mg/l BAP	N6(5)	2 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA
MS(3)	1 mg/l IAA + 0.5 mg/l BA	MS(6)	2 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA	N6(3)	2 mg/l KIN + 0.5 mg/l NAA	N6(6)	1 mg/l IAA + 1 mg/l BA

درصد کالوس‌زایی با استفاده از رابطه ۱ و درصد باززایی با استفاده از رابطه ۲ محاسبه گردید.

$$\text{درصد کالوس زایی} = \frac{\text{تعداد کالوسهای تولید شده}}{\text{تعداد قطعات کلوپتیل کشت شده}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

$$\text{درصد باززایی} = \frac{\text{تعداد کالوسهای باززا شده}}{\text{تعداد کالوسهای انتقال داده شده}} \times ۱۰۰ \quad (۲)$$

نتایج و بحث

شکل ۱ مراحل مختلف کشت بافت، القاء کالوس و باززایی را در گندم نشان می‌دهد. چند روز بعد از اینکه ریزنمونه‌ها در محیط کشت کالوس‌زایی (ML1G1) قرار گرفتند شروع به کالوس‌زایی کردند (شکل ۱). در دو هفته اول رشد کالوس‌ها خیلی کم بود و بعد از دو هفته کالوس‌ها رشد بیشتری از خود نشان دادند. به طوری که بیشترین رشد کالوس بین هفته‌های پنجم و ششم رخ داد. کالوس‌های حاصله از نظر ساختار متراکم، ترد و دارای سطح ناصاف بودند و از لحاظ رنگ کرم تا کرم مایل به زرد (به دلیل قرارگیری در شرایط تاریکی و عدم تولید کلروفیل) بودند. در آزمایش (Mendoza and Kaeppler 2002)، جنین‌های بالغ بعد سه روز و در آزمایش (Chen et al. 2006)، بعد از دو یا سه روز و در آزمایش (Yu et al. 2008)، بعد از سه روز شروع به کالوس-زایی کردند.

تأثیر غلظت توفوردی بر القای کالوس‌زایی قطعات برگی

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از کالوس‌زایی بر روی سطوح مختلف تنظیم کننده های رشد توفوردی نشان داد که بین چهار لاین گندم، سطوح مختلف هورمون توفوردی، اثر متقابل لاین × سطوح مختلف هورمون از نظر درصد کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲).

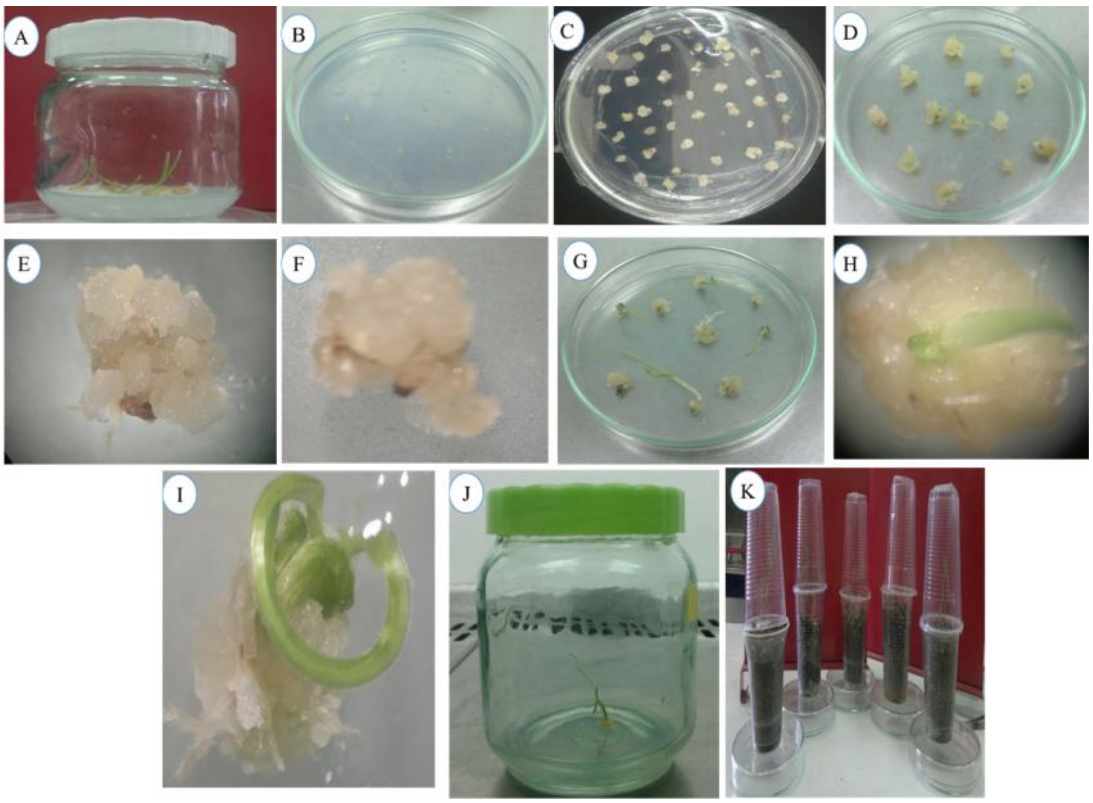
با توجه به معنی‌دار بودن اثرمتقابل، بالاترین میزان کالوس‌زایی را لاین C-D-9 و لاین C-D-8 در سطوح ۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی داشتند و کمترین میزان کالوس‌زایی متعلق به لاین C-D-4 در سطوح ۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی بود. در لاین C-D-9 با تغییر سطوح هورمون توفوردی از ۲ به ۳ میلی‌گرم در لیتر، تغییر معنی‌داری در کالوس‌زایی ایجاد نشد. در حالی که در لاین C-D-4 با افزایش غلظت هورمون توفوردی از ۲/۴ به ۳ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌داری در میزان کالوس‌زایی حاصل شد. در ژنوتیپ C-D-8 برعکس لاین C-D-4، افزایش غلظت هورمون توفوردی از ۲/۴ به ۳ منجر به کاهش معنی‌داری در میزان کالوس-زایی شد. بطور کلی، لاین C-D-9 از توان کالوس‌زایی بالاتری نسبت به سایر لاین‌ها برخوردار بود و در بین تیمارهای مختلف هورمونی، سطح ۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی نسبت به سایر سطوح در اکثر لاین‌ها به کشت بافت بهتر پاسخ نشان‌داده است (شکل ۲).

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.5.2]

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف توفوردی و لاین‌های گندم بر روی درصد کالوس‌زایی از ریزنمونه قطعات کولئوپتیل
Table 2- Variance analysis of 2, 4-D different levels and cultivar on callus induction from coleoptile segment explants

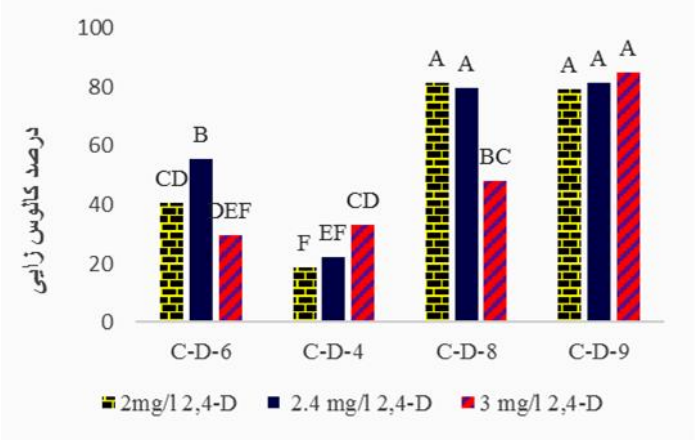
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد کالوس‌زایی
توفوردی	۲	۲/۷۷**
لاین	۳	۴۹/۵۶**
لاین× توفوردی	۶	۳/۸۳**
خطا	۲۴	۰/۳۷۵
ضریب تغییرات (CV٪)		۱۲/۴۵

ns، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ است.
ns,*,** : non significant, significant at 5% and 1% probability level, respectively.



شکل ۱- مراحل کشت و القا کالوس و باززایی گیاه گندم از ریزنمونه قطعات برگی.A: گیاهچه‌های رشد کرده در شرایط استریل روی محیط B.۱/۲ MS: برگ‌های زیر کلئوپتیل برای القا کالوس به قطعات ۲-۱ میلی‌متری تقسیم و کشت شدند. C: القا کالوس از قطعات برگ روی محیط ML1G1 پس از ۵ هفته کشت در تاریکی. D: تکثیر کالوس‌های جنین‌زایی به‌دست‌آمده از قطعات برگ روی محیط ML1C2. E: نمایی نزدیک از یک کالوس جنین‌زا. F: نمای نزدیک از یک کالوس غیر جنین‌زا. G: القا ساقه هوایی از کالوس‌های جنین‌زا به‌دست‌آمده از قطعات برگ در محیط ML1R3. H و I: نمایی نزدیک از یک ساقه هوایی حاصل از کالوس جنین‌زا. J: انتقال گیاهچه‌های حاصل از باززایی به محیط کشت ریشه‌زایی. K: انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به خاک و سازگاری گیاهان به شرایط طبیعی.

Figure 1- Different stage of culture, callus induction and regeneration from wheat coleoptile explants.
a) Growth of seedling under sterile condition on ½ MS media b) Leaves under coleoptile divided into 1-2 mm segments for culture c) callus induction from coleoptile segments on ML1G1 media after 5 weeks from culture. d) proliferation of embryogenic callus obtained from coleoptile segments on ML1G2 media e) Magnification view from embryogenic callus f) Magnification view from non embryogenic callus g) Shoot induction from embryogenic callus on ML1R3 media h&i) Magnification view of shoot resulted from embryogenic callus j) plantlet transfer to shoot induction media k) seedling transfer to sterile soil for accumulation to the environment.



شکل ۲- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی ارقام گندم در سطوح مختلف غلظت هورمون توفوردی
Figure 2 –Mean comparisons of cultivar*2,4-D on callus induction percent

در پژوهشی درگیاه گندم از جنین بالغ، میانگره و بخش‌های محور سنبله به عنوان ریزنمونه و از محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی استفاده نمودند و نتایج نشان داده که کالوس‌زایی به ژنوتیپ ارقام مورد استفاده بستگی دارد. همچنین این محققین نشان دادند حضور اکسین در محیط القاء کالوس ضروری است (O'Hara and Street 1978). در مطالعه‌ای که بر روی کالوس‌زایی از جنین‌های بالغ گندم صورت گرفت درصد کالوس‌زایی در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر توفوردی، ۸۶/۶۷٪ و در محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر توفوردی،۸۷/۸۶٪ و در محیط کشت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی، ۸۵٪ به دست آمد (Bi et al. 2007). در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر توفوردی درصد کالوس‌زایی از جنین‌های بالغ بین ۹۶/۲۰- ۶۸/۷۵٪ متغیر بود (Bi and Wanh 2008). در آزمایش دیگری از ۲ میلی‌گرم در لیتر توفوردی برای القای کالوس استفاده کردند و مشاهده شد که درصد کالوس‌زایی در گندم زراعی بین ۸۵-۸۲٪ و در گندم دوروم بین ۷۹-۷۷٪ می‌باشد (Chauhan et al. 2007). در پژوهشی دیگر مشخص شد که نوع ترکیبات محیط کشت MS و برش طولی (نصف کردن) جنین گندم رسیده در باززایی مؤثر است. ۷۰٪ القای کالوس اولیه در تمام ارقام مورد آزمایش در محیط کشت حاوی ۲mg/l توفوردی به دست آمد (Yu and Wei 2007).

اثر نیترات نقره (AgNO3) بر القاء کالوس جنین‌زا

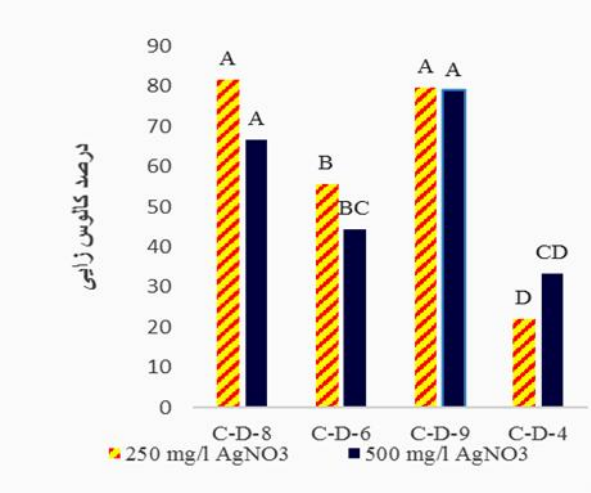
تجزیه واریانس فاکتوریل داده‌های حاصل از کالوس‌زایی بر روی دو سطح نیترات نقره و چهار رقم گندم نشان داد که بین لاین‌های گندم از نظر کالوس‌زایی در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳).

جدول۳- تجزیه واریانس فاکتوریل تأثیر سطوح مختلف نیترات نقره (AgNO3) و ارقام گندم بر روی کالوس‌زایی بر روی ریزنمونه قطعات کولئوپتیل
Table 3- Factorial variance analysis of AgNO3 and cultivar different levels on callus induction from coleoptile segment explants

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد کالوس‌زایی
نیترات نقره (AgNO3)	۱	۰/۴۲۲۷^{ns}
لاین	۳	۲۸/۳۸**
لاین× نیترات نقره (AgNO3)	۳	۱/۳۶*
خطا	۱۶	۰/۳۴۷
ضریب تغییرات (CV٪)		۱۱/۲۴

ns، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده غیر معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ است.
ns,*,** : non significant, significant at 5% and 1% probability level, respectively.

نیترات نقره، به عنوان ممانعت کننده‌ی اثر اتیلن، بر تقسیم و تمایز سلولی مؤثر است. در این بررسی حضور مؤثر نیترات نقره بر کالوس‌زایی، جنین‌زایی و باززایی با توجه به معنی‌دار بودن اثرمتقابل لاین در نیترات نقره تائید شد. با این حال، به نظر می‌رسد این اثر نیز به ژنوتیپ گیاه وابسته است. در حالی که افزایش نیترات نقره در محیط کشت کالوس‌زایی بر لاین C-D-9 بی‌تأثیر و در لاین‌های C-D-8 و C-D-6 تأثیر منفی داشته ولی باعث افزایش کالوس‌زایی در لاین C-D-4 شده است. بیشترین میزان کالوس‌زایی در سطح ۵۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره از لاین C-D-9 به دست آمد. بطورکلی در اکثر لاین‌ها، بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به سطح ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره با میانگین (۵۹/۷۱٪) بود (شکل ۳). نیترات نقره از طریق رقابت در ایجاد پیوند با جایگاه اتصال اتیلن از عمل آن جلوگیری می‌کند. بنابراین باعث تحریک تشکیل کالوس، کالوس‌های جنین‌زا و افزایش باززایی می‌شود (Songstad et al. 1991). همچنین آثار مثبت نیترات نقره روی ژنوتیپ‌های مختلف ذرت (Vain and Dunl 1989) و گندم (Fernandez et al. 1999) نیز گزارش شده است.



شکل ۳- مقایسه‌ی میانگین درصد کالوس‌زایی ارقام مختلف گندم در سطوح مختلف غلظت نیترات نقره ($AgNO_3$)

Figure 3 – Mean comparison of cultivar*$AgNO_3$ media on callus induction percent

تاثیر انواع محیط کشت بر توان باززایی کالوس‌های حاصل از قطعات برگی

برای بررسی اثر انواع محیط کشت در توانایی باززایی لاین‌ها، ابتدا ریزنمونه‌های قطعات برگی آن در محیط کشت حاوی ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی کشت شدند و بعد از تولید کالوس، کالوس‌ها به دو نوع محیط کشت پایه مطابق جدول ۱ (MS و N6) که هرکدام شامل شش محیط کشت باززایی متفاوت بودند منتقل گردیدند. بعد از شش هفته درصد شاخه‌زایی در محیط کشت ثبت گردید. با بررسی داده‌های به‌دست‌آمده از این دو نوع محیط کشت پایه مشخص شد که بین محیط‌های کشت و لاین و اثرمتقابل لاین و محیط کشت از نظر درصد باززایی تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (جدول ۴).

تأثیر محیط کشت MS بر باززایی کالوس‌های جنین‌زا لاین‌های مختلف گندم

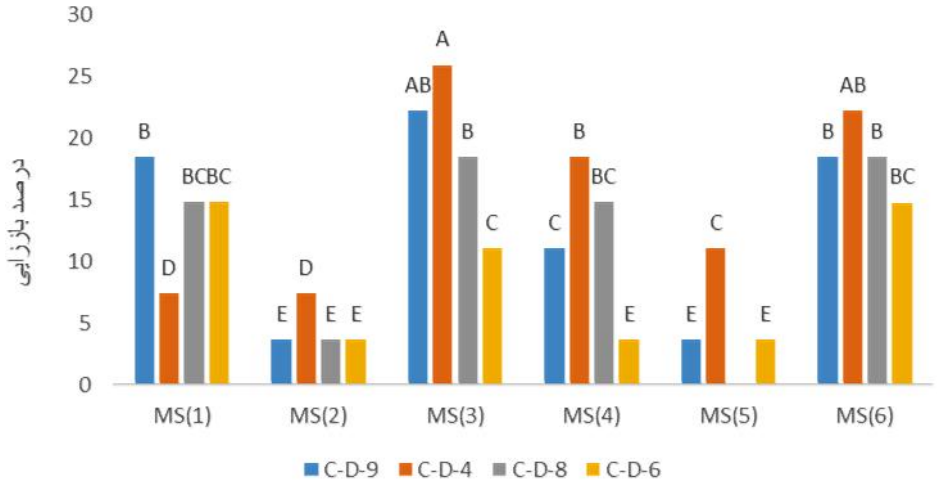
باززایی در این آزمایش بسته به لاین و نسبت به محیط کشت متفاوت بود (جدول۴). بالاترین میزان باززایی لاین C-D-9 در محیط کشت پایه MS حاوی 0.5 mg/l BA +1 mg/l IAA به میزان (۲۲/۲۲٪) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-9 در محیط کشت پایه MS حاوی 1 mg/l BA +1mg/l IAA و mg/l BAP 0.5 mg/l IAA+2 به میزان (۳/۷٪) بود.

جدول ۴- تجزیه واریانس فاکتوریل تأثیر محیط کشت‌های مختلف و لاین‌های مختلف گندم بر روی باززایی بر روی ریزنمونه قطعات برگی
Table 4- Factorial variance analysis of media and lines different levels on regeneration from coleoptile segment explants

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد باززایی
محیط کشت	۱۱	۵/۳۳ **
لاین	۳	۳/۵۴ *
لاین× محیط کشت	۳۳	۰/۴۳۱ ns
خطا	۹۶	۱/۰۶۲
ضریب تغییرات (CV٪)		۱۷/۶۵

ns، * و ** به ترتیب نشان‌دهنده غیر معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ است.
ns,*,** : non significant, significant at 5% and 1% probability level, respectively.

بالاترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت پایه MS حاوی1 mg/l IAA+ 0.5 mg/l BA به میزان (۱۸/۵۱٪) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت پایه MS حاوی 1mg/l IAA+ 1 mg/l BA و 0.5 mg/l IAA+2 mg/l BAP بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت پایه MS فاقد تنظیم کننده رشد و محیط کشت پایه MS حاوی mg/l BAP 1mg/l NAA+2به میزان (۱۴/۸۱٪) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت پایه MS حاوی 1mg/l BA 1 mg/l IAA+ وmg/l BAP 0.5 mg/l IAA+2 و mg/l KIN 0.5 mg/l NAA+2 به میزان (۳/۷٪) بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت پایه MS حاوی 1 mg/l BA 1 mg/l IAA+ 0.5 به میزان (۲۵/۹۵٪) و کمترین باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت پایه MS فاقد تنظیم کننده‌های رشد و محیط کشت پایه MS حاوی1mg/l BA 1 mg/l IAA+ به میزان (۷/۴٪) بود. بطورکلی، بیشترین میزان باززایی دراکثر محیط‌های کشت MS مربوط به لاین C-D-4 و کمترین میزان باززایی در اکثر محیط‌های کشت MS مربوط به لاین C-D-6 بود (شکل ۴).

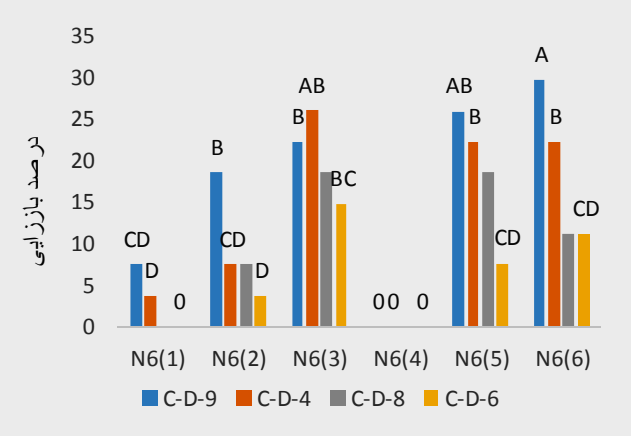


شکل ۴- مقایسه میانگین درصد باززایی ارقام مختلف گندم در محیط کشت‌های مختلف MS

Figure 4 – Mean comparison of cultivar*MS media on regeneration percent

تأثیر محیط کشت N6 بر باززایی لاین‌های گندم

باززایی در این آزمایش بسته به لاین و نسبت به محیط کشت متفاوت بود (جدول۴)که با نتایج سایر محققین نیز مطابقت دارد (Sears and Decard 1982; Mathias and Simpson 1986; Przetakiewicz et al. 2003; Tarinejad et al. 2007). مقایسه میانگین اثر متقابل نشان داد بالاترین میزان باززایی لاین C-D-9، در محیط کشت پایهN6 حاوی 1mg/l BA+1 mg/l IAA به میزان (۲۹/۶۲٪) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-9، در محیط کشت پایهN6 حاویKIN 0.5 mg/l بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت پایهN6 حاویKIN 0.5 mg/l NAA+2 و mg/l BAP 0.5 mg/l NAA+2 به میزان (۱۸/۵۱٪) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-8 در محیط کشت پایهN6 حاوی 0.5 mg/l BAP و 0.5 mg/l KIN بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت پایهN6 حاویKIN 0.5 mg/l NAA+2 به میزان (۱۴/۸۱٪) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-6 در محیط کشت پایهN6 حاوی 0.5 mg/l BAP و 0.5 mg/l KIN بود. بالاترین میزان باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت پایهN6 حاویKIN 0.5 mg/l NAA+2 به میزان (۲۵/۹۵٪) و کمترین میزان باززایی لاین C-D-4 در محیط کشت پایهN6 حاویKIN 0.5 mg/l بود. در نهایت، بیشترین میزان باززایی در محیط کشت N6 مربوط به لاین C-D-9 و کمترین میزان باززایی مربوط به لاین C-D-6 می‌باشد. همچنین برای اکثر لاین‌ها بیشترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت پایهN6 حاوی 0.5 mg/l KIN NAA+2 با میانگین (۲۰/۰۴٪) و کمترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت پایهN6 حاویKIN 0.5 mg/l بود (شکل ۵).



شکل۵- مقایسه میانگین اثرمتقابل ارقام مختلف گندم در محیط کشت مختلف N6 روی درصد باززایی

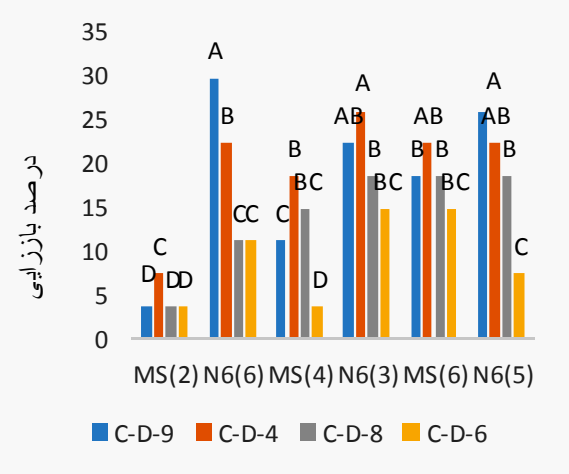
Figure 5 – Mean comparison of cultivar*N6 media on callus induction percent

مقایسه دو به دو محیط کشت‌های مشابه MS با N6 در باززایی ارقام گندم

محیط کشت‌های MS(2) و N6(6) حاوی ۱ mg/l IAA +۱ mg/l BA۱ و محیط کشت‌های MS(4) و N6(3) حاوی mg/l NAA ۰/۵+ mg/l Kin ۲ و محیط کشت‌های MS(6) و N6(5) حاوی mg/l NAA۱mg/l BAP +۱ از نظر درصد باززایی مورد مقایسه قرار گرفتند.

مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت‌ها با لاین‌ها نشان داد که محیط کشت N6 نسبت به محیط کشت MS از توان باززایی بهتری برخوردار است. در نتیجه محیط کشت N6 نسبت به محیط کشت MS پاسخ بهتری به القای باززایی از خود نشان داده است (شکل ۶).

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.5.2]



شکل ۶- مقایسه میانگین دو به دو درصد باززایی ارقام مختلف گندم در محیط کشت مختلف N6 و MS

Figure 6 – Mean comparison of regeneration percent on wheat cultivar in MS and N6 media

در آزمایشی جنین‌زایی و باززایی گیاهچه‌های سبز گندم را بر اساس قطعات برگی از گیاهچه‌های ۳-۳ روزه در بین ژنوتیپ‌های مختلف بررسی و نتیجه گرفتند در بین محیط کشت‌ها، محیط کشت MS نسبت به محیط N6 و L3 از نظر القاء کالوس و تولید گیاهچه بهتر عمل نمودند. همچنین این محققین نتیجه گرفتند فراوانی تشکیل کالوس بعلاوه فراوانی باززایی گیاهی وابسته به ترکیب محیط کشت و غلظت توفوردی است. محیط کشت MS با ۴/۵۹ میکرو مول بر لیتر توفوردی برای کشت قطعات برگی گندم مطلوب بود. افزودن غلظت توفوردی از ۴/۵۹ به ۳۶ میکرو مول روی القاء کالوس اثر مثبت داشت ولی مانع باززایی گیاه می‌شد (Wang and Wei 2004). با وجود این، در این آزمایش محیط کشت N6 نسبت به محیط کشت MS از توان باززایی بهتری برخوردار بود. در مطالعه‌ای، اثرات ژنوتیپ، نوع محیط کشت پایه، غلظت هورمون‌های توفوردی و BAP، همچنین غلظت‌های مختلف آگار (۶، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) را در القای کالوس و باززایی آن در کشت درون‌شیشه‌ای جنین بالغ ۵ رقم گندم را بررسی کردند، این محققین مشاهده کردند که محیط کشت پایه MS در تمامی رقم‌ها نسبت به محیط کشت LS پاسخ بهتری به القای کالوس و باززایی نشان می‌دهد و در غلظت‌های مختلف آگار (۶، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر)، تمامی رقم‌ها در غلظت ۸ میلی‌گرم در لیتر آگار، پاسخ بهتری به باززایی نشان دادند و در غلظت مختلف توفوردی بیشترین درصد القای کالوس برای رقم‌ها متفاوت بوده و بین ژنوتیپ‌ها و غلظت هورمون اثرات متقابل وجود داشت. در مطالعه‌ای از دو نوع محیط کشت پایه‌ی MS (موراشگ و اسکوگ، ۱۹۶۲) و LS (چو و همکاران، ۱۹۷۵) در کشت بافت گندم استفاده شد که محیط کشت پایه‌ی MS بهتر از LS به کشت بافت پاسخ داد (Mehmood et al. 2013). بنابراین با توجه به بررسی‌های انجام شده می‌توان نتیجه گرفت محیط کشت مناسب و هورمون مورد استفاده بسته به ژنوتیپ و شرایط محیط کشت می‌تواند متفاوت باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

در این پژوهش، با در نظر گرفتن تعدادی از فاکتورهای مهم از قبیل اهمیت غذایی و بومی بودن واریته‌های گندم، ریزازدیادی تعدادی از لاین‌های گندم در دست معرفی کشور از قبیل C-D-8، C-D-6، C-D-4 و C-D-9 بررسی و کالوس‌زایی و باززایی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. باتوجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل لاین‌ها و سطوح مختلف هورمون توفوردی نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی در لاین C-D-9 در تمام سطوح مختلف هورمون توفوردی رخ داده و در لاین C-D-8 در سطوح ۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی رخ

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.5.2]

داده که در این دو لاین باهم اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و باتوجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل سطوح مختلف نیترات نقره با لاین‌های مورد استفاده نشان داد که بیشترین میزان کالوس جنین‌زا در لاین‌های C-D-9 وC-D-8 مشاهده شد. بیشترین درصد شاخه‌زایی ۲۹/۶۲٪ برای لاین C-D-9 در محیط کشت N6(6) حاوی ۱mg/l IAA به همراه ۱mg/l BA به دست آمد.

منابع

Ahmadabadi M, Ruf S, Bock R. 2007. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (Zea mays L). Transgenic Research 16(4): 437-448**.**

Ben Amer LM, Korzum V, Worland AJ, Borber A .1999. Genetic mapping of QTL controlling tissue-culture response on chromosome 2B of wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to major genes and RFLP markers. Theoretical Applied Genetic 94: 1047-1052.

Bhaskaran S, Smith RH. 1990. Regeneration in cereal tissue culture: a review, Crop Science 30: 1328-1336.

Bi R, Wanh H. 2008. Primary studies on tissue culture from mature embryos in diploid and tetraploid wheat. Front. Agric. China 2(3): 262-265.

Bi RM, Kou M, Chen LG, Mao SR, Wang HG. 2007. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. Plant Breeding 126: 9-12.

Bushuk W. 1998. Wheat breeding for end product use. Euphytica 100(1): 137-145

Carman JG, Jefferson NE, Campbell WF. 1988. Induction of embryogenic (*Triticum aestivum* L.) calli: I. Quantification of genotype and culture medium effects. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10: 101-106.

Chauhan H, Desai SA, Khurana P. 2007. Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticum aestivum*, *Triticum durum* and *Triticum dicoccum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 91: 191-199.

Chen J, Yue R, Xu H, Chen X. 2006. Study on Plant Regeneration of Wheat Mature Embryos Under Endosperm- Supported Culture. Agricultural Sciences in China 5(8): 572-578.

Chowdhury SH, Kato K, Yamamoto Y, Hayashi K. 1991. Varietal variation in plant regeneration capacity from immature embryos among common wheat cultivars. Jpn. J. Breed 41: 443-450.

Farsi M and Zolali J. 2008. Introduction to Plant Biotechnology. Translate. 4th Edition. Ferdowsi University of Mashhad. 495 pp.

Fennel S, Bohorova N, Ginkel M, Crossa J, Hoisington DA. 1996. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats. Theoretical Applied Genetic 92: 163–169.

Fernandez S, Michaux-Ferriere N MC. 1999. The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Dsef): histology and improvement by AgNO3. Plant Growth Regulation 28: 147-155.

Hagio T, Ichiri SS, Yamada T. 2002. Efficient plant regeneration through morphogenesis in Japanese commercial variety of wheat, In Vitro Cell Developmemt Biology 38: 1394-1396.

Hunsinger H, Schauz K. 1987. The influence of dicamba on somatic embryogenesis and frequency of plant regeneration from cultured immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Breeding 98: 119-123.

Ichihashi S, Kato S. 1986. Clonal Propagation of Iris kaempferi by means of flower organ culture. Bulltein Aichi University Edu 35: 135-143.

Kazemi Arbath H. 2005. Cereal morphology and physiology. Tabriz University Publication: 104

Liu HJ, Misso SH, Kamijima O, Sawano M. 1990. Effects of plant growth regulators on the response of immature wheat embryo culture. Plant Tissue Culture Letters 7: 170-176.

Luica A, Felix FI, Federizzi LC, Lange CE, Handel L. 1997. Genetics of regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. Brazilian Journal of Genetics 15: 473-479.

Machii H, Mizuno H, Hirabayashi T, Li H, Hagio T. 1998. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures" Plant cell, Tissue and Organ Culture 53: 67-74.

Mathias R J, Simpson ES. 1986. The interaction of genotype and culture medium on the tissue culture responses of wheat (*Triticum aestivum* L. em. thell) callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 7(1): 31-37.

Mehmood K, Arsshad M, Muhammad Ali G, Razzaq A. 2013. Tissue culture responses of some wheat

(*Triticum aestivum* L.) cultivars grown in Pakistan. Pakistan Journal Botany 45: 545-549.

Mendoza M G, Kaeppler H F. 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 38: 39-45.

NouriDelavar MZ, Arzani A. 2000. Analysis of callus induction and plant regeneration from immature embryo of rice cultivars. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 4(4): 57-71.

O'Hara JF, Street HE. 1978. Wheat callus culture: the initiation, growth and organogenesis of callus derived from various explant sources. Annals of Botany 42: 1029-1038.

Ozgen M, Turet M, Ozcan S, Sancak C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter wheat genotypes. Plant Breeding 115: 4555-458.

Przetakiewicz A, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A. 2003. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 245-256.

Sears RG, Decard EL. 1982. Tissue culture variability in wheat: Callus induction and plant regeneration. Crop Science 22: 546-550.

Songstad DD, Armstrong CL, Petersen WL. 1991. AgNO3 increases type II callus production from immature embryos of maize inbred B73 and its derivatives. Plant Cell Report 9(12): 699-702.

Tarinejad A, Toorchi M, Habashi A, Pellegrineschi A. 2007. Optimization of gene transfer in Iranian bread wheat cultivars by biolistic bombardment. Journal of Food Agriculture and Environment, 5(3&4): 237-241.

Tripathi L, Tripathi J. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal ofPharmaceutical Research, 2: 243-253.

Turhan H, Baser I. 2003. Callus induction with mature embryo culture technique in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Indian Journal of Agricultural Sciences 73: 399-401.

Vain P, Dunl V. 1989. Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. by AgNO3. Plant cell Tissue and Organ Culture 18: 143-151.

Wang CT, Wei ZM. 2004. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf base. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 149-156.

Yu Y, Wang J, Zhu ML, Wei ZM. 2008. Optimization of mature embryobased high frequency callus induction and plant regeneration from elite wheat cultivars grown in China. Plant Breeding 127: 249-255.

Yu Y, Wei ZM. 2007. Factors affecting efficient plant regeneration from wheat mature embryos. Journal of Molecular Cell Biology 40(6): 443-450.

Zale MJ, Harmony BW, Kimberlee KK, Camille MS. 2004. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 277-281.

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.5.2]