نشریه علمی سازمان انرژی اتمی ایران
شمارهٔ ۲۲، صفحات ۶۴-۵۶، ۱۳۷۹

بررسی تأثیر زادمون، محیط کشت و تیمار سرد بر کشت بساک لاین‌های موتاسیون زای گندم

بهنام ناصریان خیابانی - فرامرز مجد - مسعود رحیمی:
مرکز تحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای - سازمان انرژی اتمی ایران
مصطفی ولیزاده - حمدالله کاظمی: دانشگاه تبریز

چکیده

این تحقیق در جریان سالهای ۷۶-۱۳۷۵ در آزمایشگاه کشت بافت در مرکز تحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران انجام گرفت. تأثیر عوامل زادمون «ژنوتیپ»[۱]، پیش تیمار سرد و محیط کشت بر تولید کال[۲] از بساک لاین‌های موتاسیون‌زای گندم مورد بررسی قرار گرفت. بساکهای ۴ لاین موتاسیون‌زا، حاصل از ۳ رقم گندم امید، طبسی و روشن که در بخش کشاورزی تولید شده بودند و ۲ رقم شاهد امید و طبسی در محیطهای تغییر یافتهٔ P_2 و C_{17} کشت شدند. تعدادی از سنبله‌ها نیز پس از پیش تیمار سرد در این دو محیط کشت شدند. نتایج حاصل نشان داد که میزان تولید کال و گیاهان تک لاد (هاپلوئید)[۳] به شدت تحت کنترل عوامل ژنتیکی است. بین زادمون‌ها در مقدار تولید کال و گیاه، اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود داشت. پیش تیمار سرد و محیط کشت در پیشرفت کار تأثیر محسوسی نداشتند. امّا تعامل پیش تیمار سرد و محیط کشت اختلاف معنی‌داری، در سطح ۱٪ داشتند و بهترین نتیجه از کشت بساکهای پیش تیمار نشده در محیط تغییر یافتهٔ C_{17} بدست آمده است.

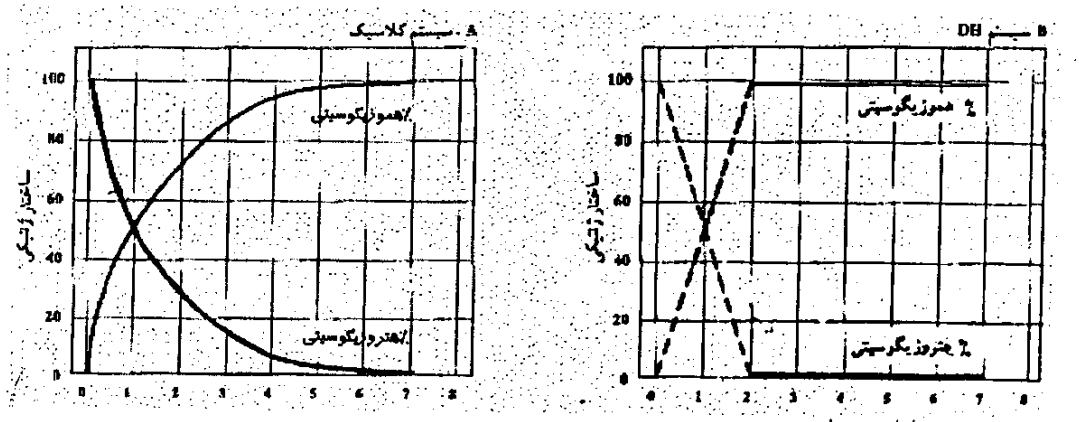
۱- مقدمه

تولید گیاهان تک لاد به منظور اصلاح نباتات و مطالعات مربوط به آن در بسیاری از گیاهان زراعی و باغی همواره مورد استفاده قرار می‌گیرد. مزیّت عمدهٔ روش دولاد شده[۴] در اجرای برنامه‌های اصلاحی، کوتاه کردن دورهٔ اصلاح نباتات و افزایش کارایی گزینش آنهاست[۱۰]. در روش اصلاح سنتی و همچنین استفاده از روش اصلاحی دگرگون سازی سریع (موتاسیون)، دست کم شش نسل «خودگُشنی» برای دستیابی به حد نصاب جورتخمی (هموزیگوسیتی)[۵] لازم است. بدیهی است، با در نظر گرفتن کلیّه ژن‌ها حتی بعد از تعداد زیادی نسل خودگُشنی، جور تخم (هموزیگوت)[۶] کامل بدست نمی‌آید، در حالیکه در روش دولاد شده دستیابی به جورتخمی کامل در یک نسل امکان‌پذیر است، که از نظر تثبیت ژنهایی که صفات کمّی دارند حائز اهمیت است(شکل ۱).

مزیّت افزایش کارایی گزینش در روش تک لاد، بیشتر در موارد صفات کمّی مورد توجّه است. در این روش جوراجوری (واریانس) افزایشی تنها جزئی از جوراجوری ژنتیکی در لاینهاست که ارزش اصلاح‌پذیری واقعی آنها را مشخص می‌سازد. در روشهای سنّتی و روش اصلاح موتاسیونی، جوراجوری غالب نیز وجود دارد که سبب می‌شود ارزش اصلاح‌پذیری واقعی آنها نمود پیچیده داشته باشد.

برای تولید تک‌لاد در گندم (Triticum aestivum L.) دو روش اساسی وجود دارد: حذف کروموزوم در آمیزش بین‌گونه‌ای و آمیزشهای دور[۷] و کشت آزمایشگاهی گامِت (گرده[۸] یا تخمک[۹]). شرایط انتخاب و بکارگیری روش تولید گیاهان تک لاد در برنامه‌های اصلاحی عبارتند از: تولید مقدار کافی گیاه تک‌لاد که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد؛ لاینهای دولاد شده بدست آمده باید به لحاظ یاخته شناختی (سیتولوژیکی)

1- genotype
2- callus
3- Haploid
4-doubled haploid
5- Homozygosity
6- Homozygote
7- Wide hybridization
8- Microspore
9- Megaspore



برای ساده نمایی فقط یک جفت‌زن در نظر گرفته شده است

زمان لازم برای تولید دولادشده

شکل ۱: مقایسهٔ روشهای دولاد شده و متداول در تولید نتایج جور تخم

پایدار و طبیعی بوده و لاینهای تولید شده می‌بایست نمونه‌ای تصادفی از یاخته‌های زایشی والدین باشند. کشت بساک گندم، به عنوان روشی مفید برای تولید گیاهان دولاد شده بکار رفته است. «کشت بساک»، به کشت بساکهای حاوی گرده اطلاق می‌شود که برای تولید گیاهان تک لاد در محیط مصنوعی کشت می‌شوند.

تعداد کروموزوم‌های گیاهان تک لاد تولید شده، به وسیلهٔ روشهای مناسب دو برابر شده و سبب تولید گیاهان دولاد کاملاً جور تخم می‌شود. عوامل متعدّدی در کشت بساک گندم مؤثرند که از آن جمله می‌توان زادمون گیاهِ دهندهٔ بساک، محیط کشت و انواع پیش تیمارها را نام برد. بیشتر زادمون‌ها برای جنین‌زایی نیاز به پیش تیمار دارند. پیش تیمار سنبله‌های خیسانده شده در دمای ۳°C تأثیر قابل توجّهی در کشت بساک دارد[۹]. نورل و نیتسج [نقل از ۳] متذکر شده‌اند که سرما قبل از کشت بساک تقسیم نامنظّم میتوزی را در گیاه قطع کرده و باعث افزایش گرده با دو یاختهٔ هم اندازه می‌شود. این دانه‌های گرده منبع مناسبی برای جنین‌زایی هستند.

پیش تیمار سرد در مورد گندم، برخلاف آنچه در بارهٔ جو صادق است، برای جنین‌زایی همواره موثّر نبوده است. مطالعات اخیر مارسولائیس و همکاران[۹] و کریم‌زاده و همکاران [۸] نشان داده است که هر زادمون به ترکیب و تنظیم خاص پیش تیمار سرد و مدت سرد کردن نیاز دارد؛ به همین جهت نمی‌توان تیمار سرد ویژه‌ای را برای همهٔ زادمون‌های گندم بکار برد.

فراوانی کال‌زایی و توانایی باززایی از کال‌های تک لاد در گندم برحسب زادمون گیاه‌دهنده تغییر می‌کنند. تنوع ژنتیکی در پاسخ به کشت بساک در تمام ارقام آزمایش شده گندم قبل تشخیص است. ایجاد جنین، باززایی گیاه از جنین‌های ایجاد شده و درصد گیاهان سبز، از صفات وراثت‌پذیر گیاهان دهنده هستند و به وسیلهٔ ژنهای کمّی کنترل می‌شوند[۶و۷و۱۱]. تجزیهٔ دی‌آلل و برآورد وراثت‌پذیری ویژهٔ پاسخ به کشت بساک گندم به توسط اکیز و کوانزاک[۴]، ارزش بالایی در حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد را نشان داده است. ترکیب محیط کشت یکی از مهمترین عوامل در نرزایی گیاه است[۳و۱۲]. در محیطهای جدید C_{17} و P_2 غلظت یون‌های آمونیوم و نیترات نسبت به محیط‌های دیگر کمتر است[۱۱].

با توجه به تأثیر زادمون و اثرهای محیط کشت و انواع پیش تیمارها بر تولید گیاهان دولاد شده و نیاز به استفاده از این روش در ایجاد ارقام جدید، تحقیق در این زمینه ضرورت دارد. براین اساس آزمایشی انجام گرفت تا پاسخ به کشت بساک در گندمهای ایرانی و موتاسیون زاهای حاصل از آنها و همچنین امکان تولید گیاهان دولاد شده بررسی شود.

۲ـ مواد و روشها

در این بررسی از ۴ لاین موتاسیون‌زای امید (4-64-0)، طبسی (T-66-58-3)، روشن -۲ (R-2) و روشن -۱۳ (R-13) و ۲رقم شاهد (امید "O" و طبسی "T") استفاده شده است.

بذرهای این ۶ رقم در گلدانهایی به قطر ۱۵ سانتیمتر کاشته

شدند و پس از رسیدن به مرحله دو برگی به اتاقک سرد در دمای ۵°C-۴ و نوردهی به مدّت ۱۲ ساعت منتقل شدند. پس از گذشت ۶ تا ۸ هفته، بوته‌های بهاره شده به گلخانه پلاستیکی در نور ۳۰۰۰۰ لوکس و دماهای ۲۰ درجه (در روز) و ۱۶ درجه (در شب) منتقل شدند. سنبله‌های این گیاهان در زمان مناسب (یعنی زمانی که بیشتر گرده‌ها در اواسط و اواخر مرحلهٔ تک هسته‌ای بودند) برداشت شدند. تعیین زمان مناسب کشت به وسیلهٔ رنگ‌آمیزی گرده‌ها با اَستوکارمِن ۲٪ و بررسی مراحل رشد در زیر میکروسکوپ انجام گرفت.

برای ضدعفونی کردن سطحی سنبله‌ها، از الکل اتیلیک ۷۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه استفاده کرده و سپس آنها را با آب مقطر شسته‌ایم؛ پس از این مرحله، سنبله‌ها را در محلول هیپوکلریت سدیوم به اضافه چند قطره «توئین ۲۰» به مدت ۱۵ دقیقه قرارداده‌ایم و به همین مدت آنها را در شرایط استریل با آب مقطر استریل شده شسته‌ایم. پس از این مراحل ضد عفونی کردن، بساکها را جداکرده و در دو محیط تغییریافتهٔ P_2 و C_{17} (جدول ۱) کاشته‌ایم. دسته‌ای از سنبله‌ها قبل از کشت به مدت یک هفته در دمای ۴ تا ۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی تیمار شدند؛ سپس بساک آنها جدا و در هر دو محیط پیش گفته کشت گردیدند.

محیط P_2 حاوی مواد زیر:

توفوردی (D - ۲،۴)	۲mg/l
kinitin	۰/۵mg/l
Thiamin,HCl	۱mg/l
Glutamine	۲۰۰ mg/l
Ficoll	٪۱۵

و محیط C_{17} حاوی مواد زیر است:

توفوردی	۲mg/l
kinitin	۰/۵mg/l
Ficoll	٪۱۵

علاوه بر این، محیط C_{17} به وسیلهٔ اسیدهای آمینه و ویتامینها غنی شده بود(جدول ۲). کشتها در گرمخانه با دمای ۲۸°C و در تاریکی قرارداده شدند.

کالهایی که اندازه آنها ۰/۵ تا ۱ میلیمتر بود به محیط تغییریافتهٔ M.S حاوی ۰/۵mg/l نفتالین استیک اسید (NAA) و ۰/۵mg/l کاینیتین منتقل شدند و تحت تابش نور ۱۲۰۰ لوکس با دورهٔ نوری ۱۶ ساعت در روز و ۸ ساعت در شب و دمای ۲۵°C قرار گرفتند.

جدول ۱ - ترکیب محیطهای کشت بساک و محیط کشت باززایی کال‌های بدست آمده درگندم

ترکیب	C_{17} (mg/l)	P_2 (mg/l)	Ms* (mg/1)
KNO_3	۱۴۰۰	۱۱۵۰	۱۹۰۰
$(NH_4)_2SO_4$	-	۱۰۰	-
KH_2PO_4	۴۰۰	۲۰۰	۱۷۰
$Ca(NO_3)_2,4H_2O$	-	۱۰۰	-
$CaCl_2,2H_2O$	۱۵۰	-	۴۰۰
$MgSO_4,4H_2O$	۱۵۰	۱۲۵	۳۷۰
NH_4NO_3	۳۰۰	-	۱۶۵۰
KCl	-	۳۵	-
$MnSO_4,4H_2O$	۱۱/۲	-	۲۲/۳
$ZnSO_4,7H_2O$	۸/۶	-	۸/۶
H_3BO_3	۶/۲	-	۶/۲
KI	۰/۸۳	-	۰/۸۳
$CuSO_4,5H_2O$	۰/۰۲۵	-	۰/۰۲۵
$CoCl_2,H_2O$	۰/۰۲۵	-	۰/۰۲۵
$FeSO_4,7H_2O$	۲۷/۸	۲۷/۷	۲۷/۸
Na_2EDTA	۳۷/۳	۳۷/۳	۳۷/۳
Sucrose	۹۰۰۰۰	۹۰۰۰۰	۳۰۰۰۰
Ficoll	۱۵۰۰۰۰	۱۵۰۰۰۰	-
Potato extract		٪۱۰	-

* محیط کشت باززایی

پس از باززایی «کال‌ها» به صورت گیاهان سبز - آلبینو (فاقد رنگ)، گیاهان سبز به محیط $\frac{1}{2}$M.S حاوی ۲g/l زغال فعّال شده برای ریشه‌زایی منتقل شدند و پس از رشد کافی ریشه، به گلدانهایی به قطر ۱۰ سانتیمتر حاوی دو قسمت خاک پیت و یک قسمت خاک برگ انتقال یافتند. با انجام مطالعات یاخته‌زایی، شامل رنگ‌آمیزی بخشینهٔ (مریستم)[10] انتهای ریشه به روش فولگن و بررسی

10- meristem

«کاریوتایپ[11] (هسته مون) میتوزی»، گیاهان تک‌لاد و دولاد را مشخص کرده و سپس به دو برابر کردن کروموزوم‌های گیاهان تک‌لاد اقدام شد.

جدول ۲ـ مواد مکمّل (ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه) اضافه شده به محیط کشت C_{17}

ترکیب	محیط کشت C_{17} (Mg/l)
Thiamin - HCl	۱/۵
Pyrodoxine - HCl	۰/۵
Nicotinic acid	۰/۵
Biotin	۱/۵
folic acid	۰/۵
Glycine	۲۰۰
Alanine	۳۵/۶
Arginine	۸۴/۳
Proline	۴۶
Serine	۴۲
Asparatic acid	۵۳/۲
Asparagine	۱۵۸/۵
Mayo - inositol	۱۰۰
Glutamine	۱۵۰

برای این منظور، محلول حاوی ۰/۰۵٪ کلشیسین، ۲٪ دی متیل سولفوکسید (DMSO) و ۱۰mg/l اسیدژیبرلیک تهیه شد. ریشه این گیاهان را از ۲ سانتیمتر پایین‌تر از طوقه قطع کرده و آنها را به مدت ۵ ساعت در دمای ۲۰°C در این محلول قرار داده‌ایم، سپس ریشه و طوقه گیاهان تیمار شده با آب روان شستشو و به خاک منتقل شدند. این عمل در مرحله ۶-۴ برگی انجام گرفت. در این بررسی صفات کال زایی و گیاه‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش به صورت سازه‌ای (فاکتوریل) در قالب «طرح کاملاً تصادفی» با ۶ بار تکرار اجرا شد. در این آزمایش، زادمون ۶ نمونه، پیش تیمار سرد ۲ نمونه و محیط کشت ۲ نمونه مورد بررسی قرار گرفتند.

علاوه بر تجزیهٔ جوراجوری، از روشهای آماری غیر پارامتری مان - ویتنی و کروسکال - والیس برای تجزیه داده‌ها استفاده شد، آزمون دانکن به منظور تجزیهٔ میانگین‌ها بکار رفت؛ برای تمام داده‌ها تبدیل log x+1 بکار رفت.

۳ـ نتیجه گیری و بحث

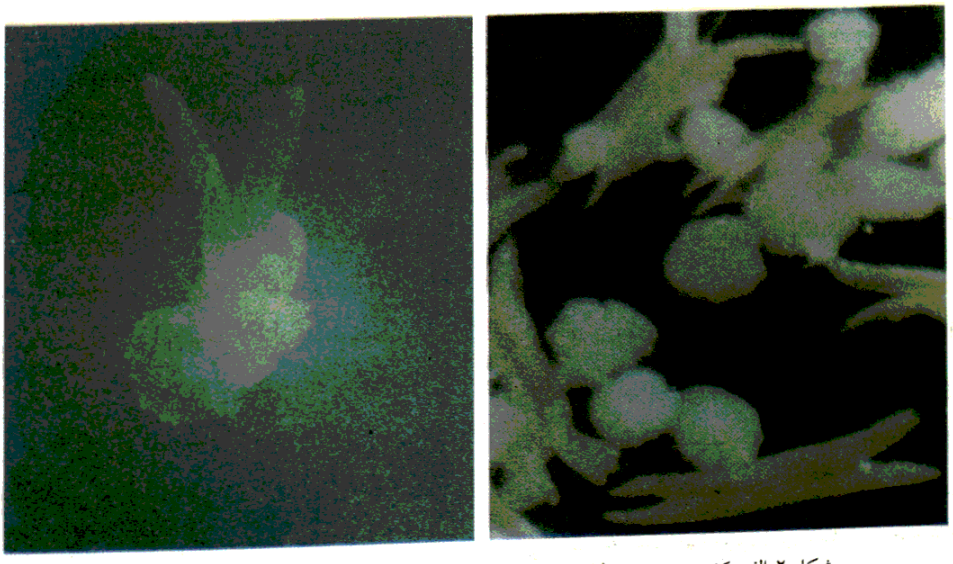
بساک‌های کشت شده ۳۰ تا ۳۴ روز پس از کشت، کال‌زایی کردند (شکل ۲). همین که اندازه آنها به ۱ تا ۲ میلی‌متر رسید به محیط باززایی منتقل شدند و پس از ۱۰ تا ۱۴ روز، گیاهان سبز - آلبینو را تولید کردند.

چون تعداد گیاهان سبز - آلبینوی تولید شده کمتر از مقداری بود که بتوان آنها را به صورت طرح آزمایش تکراردار تجزیه نمود، به همین جهت در این بررسی، تنها به تجزیه آماری درصد کال‌زایی پرداخته شد. تجزیهٔ جوراجوری در موارد زادمون، پیش تیمار سرد و محیط کشت بساک به صورت سازه‌ای (فاکتوریل) در قالب طرح کاملاً تصادفی نامتعادل انجام شد. (محیط برخی از کشتها به سبب آلودگی و محیط بعضی از تکرارها به علّت خشک شدن حذف شدند به همین جهت طرح به صورت نامتعادل تجزیه شد). قبل از تجزیه جوراجوری به وسیلهٔ آزمون «با رتلت» به منظور بررسی یکنواختی اشتباهات آزمایش، زادمون طبسی به علت معنی‌دار شدن X^2 آزمون، از تجزیه حذف شد و تجزیهٔ جوراجوری برای پنج زادمون دیگر انجام گرفت. نتایج تجزیه جوراجوری برای خاصیت کال‌زایی در زادمون‌های مورد آزمایش، در جدول ۳ مندرج است. در بین زادمونهای مورد بررسی در سطح معنی‌دار ۱٪، اختلاف معنی‌دار دیده شد. وجود اختلاف معنی‌دار بین سطوح زادمون، به علّت وجود تنوع ژنتیکی بالا در پاسخ به کشت بساک (کال‌زایی و گیاه‌زایی) در بین زادمون‌های مختلف گندم است. Anderson و همکاران[۱]، Chu [۲]، Foroughi و Zeller [۵] و Ouyang [۱۱] در گزارشهای جداگانه‌ای تنوع ژنتیکی در پاسخ به کشت بساک را گزارش داده‌اند. مقایسه میانگین سطوح زادمون با آزمون Duncan نشان داد که موتاسیون زای روشن ۲ بالاترین مقدار کال زایی را داشته است. موتاسیون‌زای امید، اگر چه کال‌زایی کمتری نسبت به موتاسیون‌زای روشن ۲ داشت، ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود و به لحاظ پاسخ به کشت بساک می‌توان این دو

11- karyotype

زادمون را در یک گروه قرارداد. زادمونهای موتاسیون‌زای روشن ۱۲، طبسی و امید شاهد کمترین میزان کال‌زایی را داشتند (شکل ۳). درصد گیاهزایی و باززایی از کالهای بدست آمده نشان می‌دهد زادمون‌هایی که کال زایی بالاتر داشته‌اند، الزاماً گیاهان بیشتری تولید نکرده‌اند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که پاسخ به کشت بساک در میان زادمون‌های گندم به شدّت توّسط زادمون گیاهِ‌دهنده محدود می‌شود و تنها تعداد معدودی از آنها عکس‌العمل مطلوب نسبت به کشت بساک دارند. همچنین مکان ژنهای کنترل‌کنندهٔ این دو صفت از هم جدا می‌باشد. از مقایسه موتاسیون‌زای امید و شاهد آن می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً پرتودهی باعث ایجاد موتاسیون در ژنهای کنترل کنندهٔ صفات کال‌زایی و افزایش درصد کال زایی نسبت به والدین شده است. تحقیقات Ouyang نشان داد که در پاسخ به کشت بساک، ترکیب فعالیت ژنها (یعنی اثر غالب) و روایستایی [۱۲] مؤثّر است؛ چون گَردهٔ تک‌لاد، نیم جور تخم [۱۳] و دیواره بساک ناجور تخم [۱۴] است پس عوامل ژنتیکی کنترل‌کننده در دیوارهٔ بساک قراردارند و چون زادمونهای مورد استفاده، همگی لاین تثبیت شده و جور تخم بودند و اثر غالب تنها در نتایج ناجور تخم دیده می‌شد می‌توان آنرا علت پایین بودن عملکرد آنها در پاسخ به کشت بساک دانست. برای اثبات این فرضیه، بهتر است از نتایج دورگهٔ این زادمون‌ها جهت بررسی بیشتر استفاده شود.

جدول ۳ نشان می‌دهد که تعامل محیط کشت بساک با پیش تیمار سرد، همچنین تعامل سه جانبه زادمون، محیط کشت و تیمار سرد در سطح معنی‌دار ۱٪، اختلاف معنی‌داری در مورد صفت کال‌زایی داشتند. عوامل اصلی پیش تیمار سرد، محیط کشت و تعامل آنها اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. چون از برخی کشتها هیچ کالی بدست نیامد. اکثر یافته‌ها عدد صفر بودند و این امر باعث پراکندگی نابهنجار یافته‌ها شد به طوری که حتی این پراکندگی نابهنجار با وجود تبدیل یافته‌ها اصلاح نگردید؛ علت عمده بالا بودن ضریب تغییرات (CV) آزمایش نیز همین امر بوده است و چون یکی از مفروضات تجزیه و جوراجوری توزیع بهنجار یافته‌هاست، این فرض بدین ترتیب نقض می‌شود. برای اطمینان از نتیجه آزمون F [۱۵] منابع تغییری که اختلاف معنی‌دار نشان نداده بودند با روشهای آماری غیر پارامتری آزمون شدند و نتایج آن در جدول ۴ مندرج است.



الف

ب

شکل ۲: الف. کال‌زایی در محیط کشت ۲ ، ب. باززایی کال جنین‌زا به صورت گیاه سبز.

12- Epistasis
13- Hemizygote
14- Heterozygote
15- Fisher Teste

جدول ۳ـ خلاصه تجزیهٔ جوراجوری درصد کال‌زایی در زادمون‌های گندم

منابع تغییر	درجه آزادی انتخاب	میانگین مربعات درصد کال‌زایی
زادمون	۴	۱/۴۴۵۶**
پیش تیمار سرد	۱	۰/۲۸۳۶n.s
محیط کشت بساک	۱	۰/۴۴۳۳n.s
زادمون × پیش تیمار سرد	۴	۰/۱۸۷۶n.s
زادمون × محیط کشت بساک	۴	۰/۱۷۸۶n.s
پیش تیمار سرد × محیط کشت بساک	۱	۱/۷۷۳۴**
زادمون × پیش تیمار سرد × محیط کشت بساک	۴	۰/۸۲۰۹**
خطای آزمایش	۱۰۲	۰/۲۲۵۲
ضریب تغییرات	٪۱۲۶/۲۸	

** معنی‌دار در سطح ۱٪

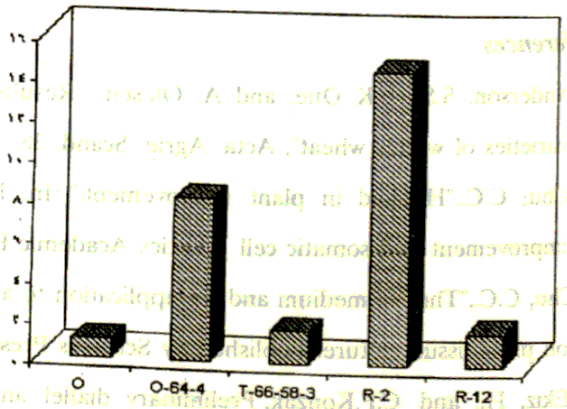
n.s: اختلاف غیر معنی‌دار

جدول ۴ - آزمون منابع تغییر با استفاده از روشهای آماری غیرپارامتری

منبع تغییر	روش مورد استفاده	آمار مورد محاسبه	پارامترمورد مقایسه
پیش تیمارسرد	مان-ویتنی	Z= ۰/۹۹۶۷n.s	Z
محیط کشت بساک	مان-ویتنی	Z= ۱/۶۲n.s	Z
زادمون × پیش تیمار سرد	کروسکال - والیس	H= ۱۴/۹۲n.s	X^2
زادمون × محیط کشت بساک	کروسکال - والیس	H=۳۱/۷۹**	X^2

با توجه به جدول‌های ۳ و ۴، می‌توان تفاوت بین زادمونها را علّت معنی‌دار شدن تعامل سه جانبه زادمون و پیش‌تیمار سرد و محیط کشت دانست، همچنین اجرای پیش تیمار سرد با عدم اجرای آن تفاوتی نداشته است. این نتیجه با یافته‌های کریم‌زاده و همکاران[۸] و مارسولایس و همکاران[۹] مطابقت دارد. در گندم برخلاف سایر گیاهان علفی نظیر جو، انجام پیش‌تیمار سرد در میزان کال‌زایی نتیجهٔ مثبتی نداشته است، بنابراین استفاده از این تیمار در صورتی توصیه می‌شود که درجه حرارت و مدت زمان مناسب برای جنین‌زایی زادمون‌های مختلف تعیین گردد.

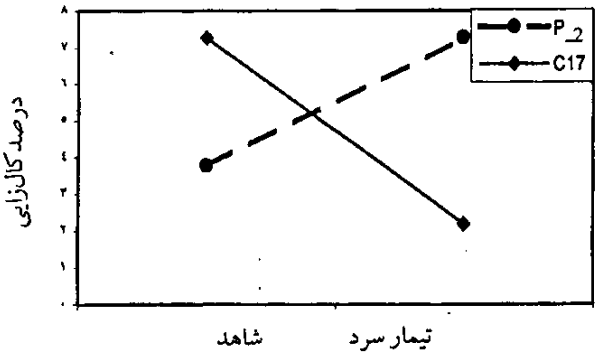
مقدار تولید کال در دو محیط P_2 و C_{17} اختلاف معنی‌داری



شکل ۳: مقایسه میانگین درصد کال‌زایی زادمون‌های گندم

نداشت. محیط کشت سیب‌زمینی به سبب اینکه از عصاره سیب‌زمینی استفاده می‌شود حاوی املاح، ویتامینها و اسیدهای آمینه است. محیط C_{17} نیز به طور مصنوعی با ویتامینها و اسیدهای آمینه غنی شده بود، بنابراین تفاوت دو محیط به حداقل رسیده بود.

تعامل زادمون و محیط کشت در آزمون کروسکال - والیس در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار نشان داد. با توجّه به اینکه بین محیط‌های کشت اختلاف قابل ملاحظه‌ای نبود، این تعامل معنی دار قاعدتاً به علّت اختلاف بین زادمون‌های مختلف مورد استفاده می‌باشد. در تعامل محیط کشت و پیش تیمار سرد در سطح ۱٪، اختلاف معنی‌دار وجود دارد. تجزیه و تحلیل میانگین نشان داد که کشت بساک‌ها در محیط C_{17} بدون پیش تیمار سرد بهترین درصد کال‌زایی را داشته است در حالی که انجام پیش تیمار سرد منجر به کاهش کال‌زایی شده است اما در محیط P_2 بیشترین درصد کال‌زایی با انجام پیش تیمار سرد حاصل شده است(شکل ۴). به عبارت دیگر محیط کشت بساک در نحوه تأثیر پیش تیمار سرد مؤثّر است.



شکل ۴: تعامل پیش تیمار سرد و محیط کشت بساک در ژنوتیپ‌های گندم

با توجّه به نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌شود:

۱ - برای تولید گیاهان دولاد شده بهتر است از روشهایی دیگر نظیر دورگ گندم با ذرت که وابستگی کمتری به زادمون دارند استفاده شود.

۲ - چون بین محیط‌های کشت مورد استفاده در میزان کال‌زایی تفاوت قابل توجهی وجود نداشت، بهتر است از محیط کشت P_2 استفاده شود. زیرا اولاً فراهم آوردن آن آسانتر است، ثانیاً بخش اعظم مواد آن به وسیلهٔ عصاره سیب‌زمینی تهیه می‌شود و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه می‌باشد.

۳ - به علت ارتباط کاربرد پیش تیمار سرد به زادمون و محیط کشت، باید به هنگام استفاده از این پیش تیمار به این امر توجه داشت.

References

1. Anderson, S.S., L.K Due, and A. Olesen, "Results with anther culture in some important Scandinavian varieties of winter wheat", Acta. Agrie. Scand. 38, 281-292(1988).
2. Chu, C.C.,"Haploid in plant improvement," In: L.K. Vas, L.W.R.Scowroft, and K.J.Frey (Eds). Plant improvement and somatic cell genetics Academic Press. PP: 129-158 (1982).
3. Chu, C.C.,"The N6 medium and it's application to anther culture of cereal crops", Proceeding of symposium on plant tissue culture. Published by Sciences Press, Peking, China. PP: 43-53 (1987).
4. Ekiz, H., and C.F.Konzak,"Preliminary diallel analysis of anther culture response in wheat (Triticum aestivum L)," Plant Breeding. 113,47-52 (1994).

5. Foroughi - Wehr, B.,and F.G.Zeller," In vitro microspore reaction of different German wheat cultures," Theor. Appl. Genet. 79,77(1990).

6. Ghaemi, M., and A. Sarrafi," The effect of "D" genome from synthetic wheat lines in anther culture responese," Plant Breeding. 112,76 (1994).

7. Henry, Y., and J. De. Buyser,"Effect of the 1B/1R translocation on culture ability in wheat (Triticum aestivum L.) Plant Cell," Reports. 4,307 (1985).

8. Karim Zadeh, H.G., G.Kovaes, and B.Barnabas," Effect of cold treatment and different culture medium on androgenic capacity of two winter wheat genotypes", Cearal Research Communication. 23(3), 223(1995).

9. Marsolais, A. A., G.Seguin - Swart and K.J. Kasha, "The influence of anther cold pre- treatments and donor plant genotypes on, invitro androgenesis in wheat (Triticum aestivum L.) Plant Cell Tissue and Organ Culture", 3,69(1984).

10. Masojc, P., O. M. Lakow, R. I. H. MC - Kenzie and N. K. Howes,"Responsive to anther culture in cultivars and F1 crosses of spring wheat", Can. J. Plant. Sci. 73,777(1983).

11. Ouyang, J. W.,"Induction of pollen plant in Triticum aestivum", H. Han, and Y. Hongyuan (Eds). Haploid of higher plant invirtro," China Academic Publishers. Beijing. PP26-41(1989).

12. Trottier, M.C., J. Collin, and A. Comeav,"Comparison of media for their aptitude in wheat anther culture, Plant Cell Tissue and Organ Culture. 35,59(1993).

AEOI Scientific Bulletin

No.22,pp.56-64,2001

Effect of genotype , culture medium and cold pre-treatment on anther culture of wheat (T. aestivum L.) mutant lines.

B. Naserian Khyabani, F.Majd , M. Rahimi

Nuclear Research center for Agriculture and Medicine, A.E.O.I,

P.O. Box. 31585, Karaj- Iran.

M. Valizadeh, H. kazemi - Tabriz university

Abstract

This research was conducted in Tissue Culture Laboratory of the Nuclear Research Center for Agriculture and Medicine in the Atomic Energy Organization of Iran in 1996-1997. The objective was to investigate the effect of genotype, culture medium and cold pretreatment in calli production from anthers. Anthers of four mutant lines obtained from three cvs,(Omid, Tabassi and Roshan) were produced in the Nuclear Agriculture Center and two check cvs,(Omid and Tabassi) were cultured in two media P_{II} and modified C_{17}. Some of the spikes before plating were kept in dark at 4-5°C for one week. The result indicated that the genotype of donar plants had a significant effect on the calli and plants formation. Cold pre-treatment and medium type had no effect on the calli formation, but interaction between the two factors was very significant, and the best result was obtained when anthers were cultured in modified C_{17} medium without cold pre-treatment.