

تولید جنین های هاپلوئید از طریق کشت میکروسپور در گندم (*Triticum aestivum* L.)

شاهرخ قرنجیک^۱، احمد معینی^{۲*}، امیر موسوی^۳ و هوشنگ علیزاده^۴
۱، دانشجوی دکتری و دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، ۳، استادیار پژوهشگاه
ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی ۴، استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۵/۹/۱۵ - تاریخ تصویب: ۸۵/۱۲/۹)

چکیده

در تحقیق حاضر، تعداد هشت رقم از گندم های هگزپلوئید تجاری ایران از نظر پاسخ به کشت میکروسپور مورد ارزیابی قرار گرفتند. پیش تیمار سنبله ها با محرک های شیمیایی القاء کننده جنین زایی (شامل ۲- هیدروکسی نیکوتینیک اسید، 2,4-D و BAP) در دمای ۳۳ °C به مدت ۷۲-۴۸ ساعت اعمال شد. جداسازی میکروسپورها با روش آسیاب کردن سنبله ها در محلول جداسازی میکروسپورها (۰/۳ mol L⁻¹ مانیتول) انجام گرفت. سپس، کشت توأم میکروسپورها با چند عدد تخمدان تازه گندم در محیط کشت مایع NPB99، با تراکم ۴ × ۱۰^۲ میکروسپور در هر میلی لیتر، در پتری دیش های یکبار مصرف (۶۰×۱۵ mm) و در شرایط ۲۷ °C و تاریکی انجام شد. ۳-۴ هفته پس از کشت، میزان پاسخ ارقام گندم مورد مطالعه به کشت میکروسپور ارزیابی گردید. بررسی های سیتولوژیکی با استفاده از میکروسکوپ معکوس نشان داد که ساختارهای چند سلولی، تقریباً یک هفته بعد از کشت تشکیل می گردند. در طول هفته دوم، دیواره میکروسپورها شکافته شده و جنین های نارس جوانه می زنند. رشد و بلوغ این جنین ها، در طی ۱۰ تا ۱۴ روز بعد انجام می گیرد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس، تفاوت های معنی داری از نظر میزان تشکیل جنین، بین ارقام وجود داشت که این امر نشان دهنده وابستگی ژنتیکی این صفت می باشد. ارقام گندم فلات و مغان^۱ به ترتیب با میانگین تولید ۱۴۲۷±۸۱/۵۸ و ۱۱۰۸ ± ۵۴/۵۵ جنین در واحد سنبله، به عنوان ژنوتیپ های برتر از نظر جنین زایی شناسایی شدند.

واژه های کلیدی: هاپلوئید، کشت میکروسپور، جنین زایی، گندم هگزپلوئید

مقدمه

در نهایت درصد کمی ناخالصی هم باقی می ماند، ولی در روش تولید درون شیشه ای هاپلوئیدهای مضاعف شده، طی یک نسل به هموزیگوسیتی کامل می رسیم (۱۹). ضمناً گزینش، پیشرفت ژنتیکی مطلوبی را در نتاج نشان داده و واریانس ژنتیکی افزایشی، به راحتی در هاپلوئید های مضاعف شده معلوم می گردد، چون تنوع ناشی از غالبیت در

تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف شده از طریق کشت میکروسپور، در برنامه های به نژادی و دست ورزی های ژنتیکی از اهمیت زیادی برخوردار است. در روشهای کلاسیک به نژادی، حداقل ۵ تا ۶ نسل خودگشنی برای رسیدن به حد مطلوب هموزیگوسیتی لازم است. به علاوه،

گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته اند (۷،۲۰). پاسخ ژنوتیپ های مورد مطالعه عموماً به فاکتورهای ژنتیکی و محیطی وابسته بوده اند و برخی ژنوتیپ‌ها به طور طبیعی واکنش بهتری در پاسخ به تغییرات محیطی و انواع تیمارهای تنشی که روی میکروسپورها اعمال می‌گردد، نشان می‌دهند (۱۸، ۲۴).

تولید گیاهان هموزیگوس با استفاده از تکنیک کشت میکروسپور، به عنوان بهترین و مؤثرترین روش تولید گیاهان هاپلوئید، می‌تواند علاوه بر صرفه جویی در هزینه ها، برنامه‌های به نژادی گندم را تسریع نموده و مکمل مناسبی برای روشهای رایج به نژادی باشد. در ایران تاکنون تحقیقی بر روی کشت میکروسپورهای گندم انجام نگرفته است. در تحقیق حاضر، برای اولین بار در ایران، تعداد هشت رقم از گندم های هگزاپلوئید تجاری ایران از نظر پاسخ به کشت میکروسپور مورد ارزیابی قرار گرفتند. هدف این تحقیق، تعیین میزان پاسخ به جنین زایی در کشت میکروسپورهای برخی از ژنوتیپ های گندم موجود در کشور و همچنین شناسایی و تعیین فاکتورهای تأثیرگذار در القاء ساختارهای چند سلولی و تولید جنین های هاپلوئید در گندم می باشد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی: هشت رقم از گندم های هگزاپلوئید بهاره ایرانی (مغان ۱، تجن، فلات، اترک، امید، توباری، قدس و مرودشت)، مواد گیاهی این آزمایش را تشکیل دادند. بذور این ارقام در سال ۱۳۸۴ از بخش غلات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد.

تهیه گیاهان مادری

کشت گیاهان مادری در اتاق رشد کنترل شده در دمای $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (روز) و $15 \pm 2^\circ\text{C}$ (شب) و رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی ($250-300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$) و ۸ ساعت تاریکی انجام شد. آبیاری به موقع و تیمارهای کودی لازم جهت بدست آوردن گیاهان مادری با کیفیت بالا در طی دوره رشد، اعمال گردید.

آنها حذف شده است. همچنین، تفرق صفات در طی نسلهای باززایی گیاه به حداقل می‌رسد (۴).

تولید گیاهان تراریخته از طریق بافتهای هاپلوئید یکی از اهداف با ارزش در مهندسی ژنتیک محسوب می‌شود، زیرا پس از انتقال ژن به بافت هاپلوئید و مضاعف کردن کروموزومهای آن، می‌توان گیاهان تراریخته کاملاً هموزیگوس برای ژن انتقال یافته را باززایی کرد (۴،۱). روش های متعددی جهت تولید گیاهان هاپلوئید و به دنبال آن گیاهان هاپلوئید مضاعف شده وجود دارد که یکی از این روشها آندروژنز^۱ می باشد که به دو روش، کشت بساک^۲ و کشت میکروسپور^۳ انجام می‌شود. محققین از طریق هاپلوئیدهای مضاعف شده توانسته اند ارقام جدیدی از غلات بویژه جو، ذرت و برنج را اصلاح و معرفی کنند (۱۹). کشت میکروسپور، روشی است که به لحاظ مزایای آن بر کشت بساک، بیشتر مورد توجه محققین قرار گرفته است. بطور کلی، عمده ترین مزایای کشت میکروسپور نسبت به کشت بساک عبارتند از: کاهش باززایی گیاهان دیپلوئید به دلیل حذف بافت های دیپلوئید دیواره بساک، حذف مواد ممانعت کننده رشد میکروسپورها که در کشت بساک از دیواره بساک ترشح می‌شوند، مشاهده و بررسی دقیق تمام مراحل جنین زایی، جذب بهتر و یکنواخت مواد غذایی به دلیل تماس مستقیم میکروسپورها با محیط کشت، تبدیل مستقیم اکثر میکروسپورها به جنین و در نتیجه کاهش تولید شیمر به دلیل عدم تشکیل کالوس و مناسب بودن میکروسپورها برای مطالعات موتاسیون و انتقال ژن (۵،۱۲،۱۵).

فاکتورهای مختلفی القای ساختارهای پیش جنینی در کشت میکروسپورهای گندم را تحت تأثیر قرار می‌دهند از قبیل: ژنوتیپ گیاه، شرایط رشد گیاهان مادری، مرحله رشد و نمو میکروسپورها، رژیم نوری، روش جداسازی میکروسپورها، شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط کشت (۶، ۱۱، ۱۶، ۱۹). برای القاء جنین زایی در آندروژنز، تیمارهای تنشی (تنش غذایی، دمای بالا یا پائین) به طور

1. Androgenesis
2. Anther culture
3. Microspore Culture

(۵) سوسپانسیون بدست آمده به درون لوله های فالكون ۵۰ ml ریخته شد و سپس با دور $g \times 100$ به مدت سه دقیقه سانتریفوژ شد.

(۶) رسوب حاصل از مرحله قبل، توسط ۲ ml از محلول مانیتول به حالت سوسپانسیون در آمد.

(۷) توسط میکروپیپت، ۲ ml سوسپانسیون میکروسپورهای مرحله قبل بر روی ۵ ml محلول مالتوز استریل (0.58 mol L^{-1}) موجود در لوله فالكون ۱۵ ml اضافه شده و در دور $g \times 100$ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد.

(۸) با استفاده از میکروپیپت، ۳ ml از فاز بالایی (حاوی میکروسپورهای زنده) برداشته شد و به منظور شستشو، به فالكون دیگر حاوی ۱۰ ml محلول جداسازی میکروسپورها اضافه شده و سپس در دور $g \times 100$ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد.

(۹) در فالكون دیگری، فاز پایینی (رسوب) حاصل از مرحله ۷ را در ۱۲ ml آب مقطر حل کردیم (جهت شمارش تعداد کل میکروسپورها) و در دور $g \times 100$ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد.

(۱۰) روشناور حاصل از هر دو سانتریفوژ حذف شد و رسوب حاصل از میکروسپورهای فاز بالایی در ۳ ml محیط کشت فیلتر استریل شده NPB99 (۱۲) و رسوب حاصل از فاز پایینی در ۳ ml آب مقطر به حالت سوسپانسیون درآمد. (۱۱) تعداد میکروسپورهای هر فاز توسط لام مخصوص شمارش سلول (هموسیتمتر^۵) تعیین گردید. میکروسپورهای فاز پایینی، بعد از شمارش حذف شدند. تعداد کل میکروسپورها، از جمع تعداد میکروسپورهای دو فاز بالایی و پایینی بدست می آیند.

(۱۲) میکروسپورهای فاز بالایی در یک لوله فالكون حاوی ۱۰ ml محیط کشت حل گردید و در دور $g \times 100$ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شدند.

(۱۳) روشناور حذف و رسوب حاصل در محیط کشت جنین زایی و با تراکم حدود 4×10^3 میکروسپور در هر میلی لیتر حل شد.

جمع آوری و پس از حذف تمام برگهای ساقه سنبله، به استثناء برگ پرچم، قاعده آنها بلافاصله در ظرف حاوی آب مقطر قرار گرفت. از بساک های گلچه های بخش میانی سنبله ها برای تعیین مرحله رشد و نمو میکروسپورها به روش سیئولوژیکی، از طریق رنگ آمیزی با استوکارمن استفاده گردید.

پیش تیمار میکروسپورها با محرک های شیمیایی

پس از حذف بخش های انتهایی، سنبله ها در ظرف استریل حاوی ۵۰ ml از محلول پیش تیمار القاء کننده جنین زایی ($0.1 \text{ gl}^{-1} \text{-HNA}^1, 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} \text{ 2, 4-D}_2, 10^{-6} \text{ mol l}^{-1} \text{ BAP}^3$) (اتوکلاو شده) قرار داده شدند. سپس، سنبله ها را با پاکت های پلاستیکی پوشانده و انتهای باز آن، به منظور جلوگیری از آلودگی و از بین رفتن آب محیط پیش تیمار، درزگیری شد. سپس، ظرف حاوی سنبله ها به مدت ۲۲-۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای $^{\circ}\text{C}$ ۲۳ و تاریکی، نگهداری شد.

جداسازی و خالص سازی میکروسپورها

(۱) در شرایط استریل، سنبله های گندم با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۲٪ به مدت ۱۵ دقیقه، و سپس سه بار شستشو با آب مقطر استریل، ضدعفونی سطحی شدند.

(۲) سنبلچه ها به درون ظرف بلندر^۴ (آسیاب آزمایشگاهی) استریل منتقل شدند (از سنبلچه های ۳ تا ۶ سنبله، برای یک دور آسیاب استفاده شد).

(۳) میزان ۴۰ ml از محلول جداسازی میکروسپورها (محلول 0.3 mol L^{-1} مانیتول) را به ظرف بلندر اضافه کرده و سنبلچه ها به مدت ۲۰ ثانیه در سرعت حدود ۲۲۰۰ rpm آسیاب شدند.

(۴) مخلوط بدست آمده با استفاده از الک استریل $100 \mu\text{m}$ فیلتر گردید و سپس ظرف بلندر، دو بار با ۵ ml محلول مانیتول آبکشی شد.

^۴ - 2-hydroxynicotinic acid

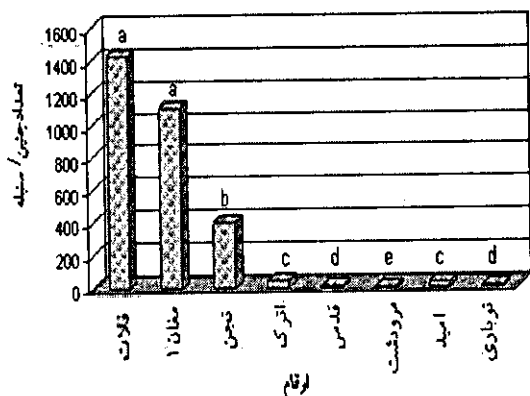
^۲ - 2,4-dichloro phenoxyacetic acid

^۳ - 6-benzylaminopurine

^۴ - Blender

^۵ - Hemacytometer

میانگین $1427 \pm 81/58$ و $1108 \pm 54/55$ جنین در واحد سنبله، دارای بیشترین تعداد جنین در بین ارقام مورد بررسی بودند. بعد از این دو رقم، به ترتیب ارقام تجن ($405 \pm 19/74$)، اترک ($47 \pm 6/19$) و امید ($39/25 \pm 8/7$)، جنین زایی بالاتری نسبت به بقیه ارقام داشتند. کمترین میزان تولید جنین مربوط به ارقام توباری ($18/75 \pm 3/5$)، قدس ($14/75 \pm 2/9$) و مرودشت ($4/5 \pm 1/25$) بود. دامنه تغییرات وسیع میزان تولید جنین در بین ارقام مورد مطالعه، بیانگر وابستگی ژنتیکی بالای این صفت می باشد. فاکتورهای متعددی القای ساختارهای چند سلولی و تولید جنین‌های گامتوفیتی را در کشت میکروسپورگندم تحت تأثیر قرار می‌دهند. مطالعات و تحقیقات انجام شده بر روی کشت میکروسپور در گیاهان گوناگون نشان داده‌اند که خصوصیات ژنوتیپی، تاثیر زیادی بر روی پاسخ گیاه به کشت میکروسپور دارد. هیو و کاشا (۱۹۹۷)، ۵ رقم گندم را همراه با ۴ هیبرید بین آنها از نظر پاسخ دهی به کشت میکروسپور مورد مقایسه قرار داده‌اند و نتیجه گرفتند که رقم مارکوئیس^۱، بیشترین جنین و رقم چریس^۲، بیشترین گیاه سبز را تولید کردند (۸).



شکل ۱- مقایسه میانگین تعداد جنین در واحد سنبله در ارقام مختلف گندم هگزاپلوئید ایران

- 1. Marquis
- 2. Chris

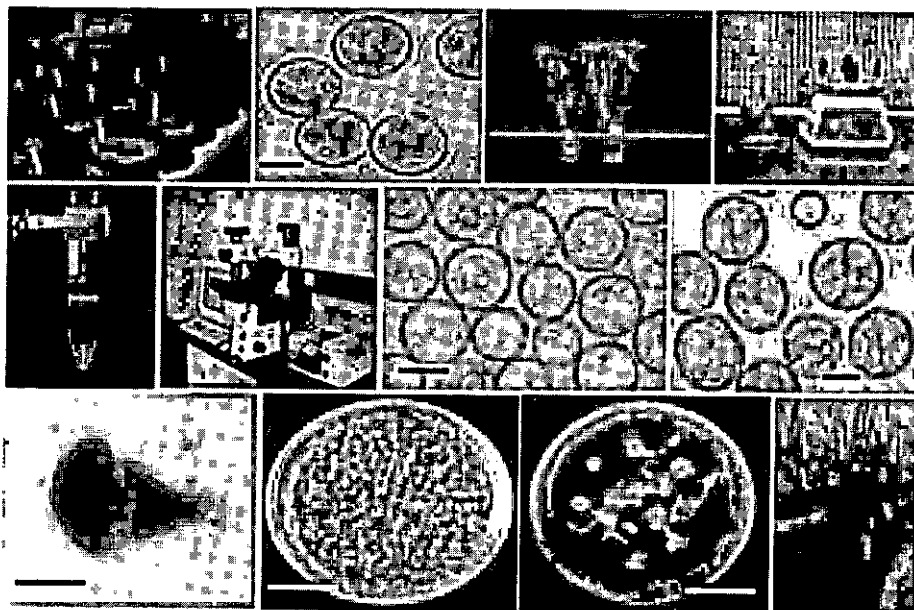
لیتر کشت شد و تعداد جنین های تشکیل شده به ازای هر سنبله پس از ۳۰ روز، شمارش شدند. تجزیه واریانس آماری نتایج و مقایسه میانگین ها به روش آزمون چند دامنه ای دانکن و با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت.

جدول ۱- ترکیب محیط کشت NPB99، استفاده شده برای

اجزاء	(mg l ⁻¹)
KNO ₃	1415
(NH ₄) ₂ SO ₄	232
CaCl ₂ .2H ₂ O	83
KH ₂ PO ₄	200
MgSO ₄ .7H ₂ O	93
H ₃ BO ₃	5
MnSO ₄ . 4H ₂ O	5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5
CoCl ₂ .6 H ₂ O	0.0125
Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	0.0125
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0125
KI	0.4
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCL	0.5
Thiamine-HCl	5
Myo-inositol	50
Glutamine	500
Phenylacetic acid	1
2,4- D	0.2
Kinetin	0.2
Maltose	90000
pH=7	

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی عکس‌العمل ارقام مورد مطالعه به کشت میکروسپور و مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها برای صفت جنین‌زایی در شکل ۱ نشان داده شده است. جدول تجزیه واریانس برای صفت جنین‌زایی نشان داد که از نظر میزان تشکیل جنین، بین ارقام اختلاف معنی‌داری وجود دارد که این امر نشان دهنده وابستگی ژنتیکی این صفت می‌باشد. در این آزمایش، ارقام گندم فلات و مغان ۱ به ترتیب با



شکل ۲- مراحل تولید گیاهان هاپلوئید گندم از طریق کشت میکروسپور (رقم فلات).

الف) کشت گیاهان مادری در اتاق رشد کنترل شده. ب) رنگ آمیزی میکروسپورهای گندم با استوکارمن ۲٪ (مرحله تک هسته‌ای) ج) پیش تیمار سنبله‌های جاوی میکروسپورها در مرحله نمودی مناسب در محلول القاء کننده شیمیایی. د) جداسازی میکروسپورها به روش آسیاب کردن. ه) تفکیک میکروسپورهای زنده و مرده در شیب غلظت مالتوز ۲۱٪. و) میکروسکوپ معکوس جهت مشاهده روند تکامل میکروسپورها. ز) میکروسپورهای جنین‌زا با ساختار چند واکوئلی و سیتوپلاسم فشرده مرکزی بعد از پیش تیمار در محلول القاء کننده شیمیایی. ر) ساختارهای چند سلولی تشکیل شده بعد از ۱۰ روز در محیط کشت مایع NPB99. ن) ساختارهای پیش جنینی تشکیل شده بعد از ۱۸ روز. ل) انبوه جنین‌های تشکیل شده ۲۸ روز پس از شروع کشت. ط) باززایی گیاه از جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور در محیط کشت باززایی گیاه ۲-۱۹۰. ع) انتقال گیاهان سبز از شرایط *in vitro* به شرایط *ex vitro*.

تکامل میکروسپورها، با استفاده از رنگ آمیزی استوکارمن ۲٪، استفاده شد. بر اساس نتایج بدست آمده، زمانیکه ۱-۵٪ از ریشکها از غلاف برگ پرچم بیرون آمده باشد و در برخی از ارقام زمانیکه هنوز ریشکها بیرون نیامده باشند، میکروسپورها در مرحله رشد و نمودی مناسب جهت کشت میکروسپور می‌باشند. در مرحله تک هسته‌ای میانی، واکوئل نسبتاً بزرگ بوده و در وسط سلول واقع شده است و هسته نیز در کنار آن قرار دارد. در مرحله تک هسته‌ای انتهایی واکوئل بزرگتر شده و بیشتر حجم سلول را شامل می‌شود و هسته نیز در مجاورت دیواره سلول واقع شده است (شکل ۲).

در تحقیقی، میکروسپورها در مراحل مختلف نمودی از مرحله تک هسته‌ای ابتدایی^۱ تا دو هسته‌ای^۲ کشت شدند و مشخص گردید که وابستگی شدیدی بین میزان جنین‌زایی و مرحله نمو میکروسپور وجود دارد و فقط میکروسپورهایی

ژنهای اختصاصی جنینی که در مراحل اولیه جنین‌زایی میکروسپور گندم دخیل هستند، تعیین شده‌اند و به نظر می‌رسد که این ژنها مراحل رشد و نمودی میکروسپورها را کنترل می‌کنند و با تغییرات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی مربوط به تمایز جنین در شرایط درون شیشه‌ای، مرتبط می‌باشند (۸، ۱۸).

محققین معتقدند که مرحله رشد و نمودی میکروسپور بیشترین تأثیر را در موفقیت کشت میکروسپور در مقایسه با سایر متغیرها دارد. اغلب محققین، بهترین مرحله کشت میکروسپور گندم را تک هسته‌ای میانی تا تک هسته‌ای انتهایی ذکر کرده‌اند (۲، ۸، ۹). برخی از محققین نیز مرحله تک هسته‌ای انتهایی تا اوایل دو هسته‌ای را مناسبتر تشخیص داده‌اند (۲۰، ۱۵). در تحقیق حاضر، جهت تعیین مرحله مناسب برداشت سنبله‌ها از شاخس‌های مرفولوژیکی و بررسی‌های سیتولوژیکی استفاده گردید. برای این منظور، از بساکها سنبله‌های وسطی سنبله‌ها جهت تعیین مرحله

1. Early uninucleat stage

2. Binucleat stage

میکروسپوره‌های پیش تیمار نشده یا القاء نشده ($45 \mu\text{m}$) -۴۵ دارند. (۲۵)

در تحقیقی که توسط لیو و همکاران (۲۰۰۲) انجام گرفت، غلظت بهینه ۲- هیدروکسی نیکوتینیک اسید در محلول پیش تیمار میکروسپورها برای القای جنین‌زایی و تشکیل جنین‌های بالغ، حدود 100 mg l^{-1} تعیین گردید. این محققین مشاهده کردند، زمانیکه میکروسپورها از سنبله‌های پیش تیمار نشده جداسازی می‌شدند، اکثراً به سمت تکامل دانه گرده توسعه یافته و معمولاً پس از کشت در محیط کشت القاء جنین‌زایی از بین می‌روند (۲۲، ۱۵). در تحقیق حاضر نیز، از ۲- هیدروکسی نیکوتینیک اسید با غلظت 100 mg l^{-1} در محلول پیش تیمار سنبله‌ها استفاده گردید. استفاده از ۲- هیدروکسی نیکوتینیک اسید در تحقیقات قبلی نیز باعث افزایش کارایی کشت بساک گندم گردیده بود (۱۲). محلول‌های القاء کننده شیمیایی توسط سیستم آوندی ساقه جذب شده و به بساکها و متعاقباً به میکروسپورها منتقل می‌شوند و دمای 33°C ، کارایی سرعت انتقال این مواد را به میکروسپورها افزایش می‌دهد. دماهای پایین‌تر نیز قابل استفاده هستند ولی باعث کندی انتقال مواد و همچنین رشد سنبله‌ها و در نتیجه خروج سنبله‌ها از غلاف می‌گردند. مدت زمان بهینه دوره پیش تیمار، برحسب ژنوتیپ و دمای پیش تیمار متفاوت بوده و حدود ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای 33°C می‌باشد (۱۲).

محققین معتقدند مراحل جداسازی میکروسپورها بایستی به نحوی باشد که حداقل خسارت را به میکروسپورها وارد نماید. محققین روش‌های مختلف جداسازی میکروسپورها را مورد استفاده قرار داده‌اند. با وجود اینکه تمام روش‌ها به نظر می‌رسد که قابل استفاده باشند، ولی تنها، جداسازی میکروسپورها با استفاده از آسیاب آزمایشگاهی نتایج قابل تکرار با فراوانی بالای میکروسپوره‌های زنده و جنین‌زا تولید کرده است. در این راستا عواملی مثل سرعت و مدت زمان آسیاب سنبله‌ها از فاکتورهای تعیین کننده می‌باشند. این روش در گندم توسط محققین مختلفی مورد استفاده قرار گرفته است (۲۳، ۲۲، ۱۷، ۱۵، ۶) و گوستافسون و همکاران (۱۹۹۵) در مقایسه با سایر روش‌ها، این روش را پیشنهاد نموده‌اند (۶).

که در مرحله تک هسته‌ای انتهایی تا دو هسته‌ای ابتدایی بودند، تشکیل جنین دادند (۲۰). تراکم میکروسپورها در محیط کشت، عامل مهم دیگری است که اثر مستقیمی بر روی پاسخ آنها به جنین‌زایی دارد، زیرا میکروسپورها باید برای استفاده از منبع محدود غذایی با هم رقابت نمایند. گوستافسون و همکاران (۱۹۹۵) اثر چندین غلظت مختلف میکروسپور را بر روی قدرت زنده بودن آنها مورد بررسی قرار داده و گزارش کردند که تراکم میکروسپورها در ابتدای کشت و همچنین در طول کشت، بر روی رشد و تقسیم آنها تأثیر دارد و به عنوان یک عامل تعیین کننده عمل می‌نماید. در گزارشات مختلف کشت میکروسپور گندم، تراکم میکروسپورها معمولاً بین 4×10^3 تا 4×10^5 استفاده شده است (۳). در این تحقیق، تراکم میکروسپورها با استفاده از لام مخصوص شمارش سلول تعیین گردید و در کلیه کشت‌ها از تراکم 4×10^2 میکروسپور در هر میلی‌لیتر در ابتدای کشت استفاده شد (۱۴، ۱۵).

نتایج مطالعات نشان داده‌اند که جنین‌زایی میکروسپوره‌های گندم می‌تواند از طریق اعمال پیش تیمارهای گوناگون شامل استفاده از سرما، گرما، تنش غذایی و محرک‌های شیمیایی به صورت جداگانه یا به صورت تلفیقی القاء گردد. این پیش تیمارها می‌تواند در مراحل مختلفی از قبیل پیش تیمار بر روی گیاهان بخشنده، سنبله‌ها و بساکهای جدا شده اعمال شوند (۲۲، ۲۱، ۲۰). در این تحقیق، از پیش تیمار شیمیایی شامل ۲- هیدروکسی نیکوتینیک اسید به همراه هورمون‌های 2,4-D و BAP به منظور القاء جنین‌زایی در میکروسپورها استفاده گردید. بعد از اعمال پیش تیمار و جداسازی میکروسپورها، مشاهده گردید که میکروسپوره‌های جنین‌زا معمولاً دارای واکوئل بزرگ مرکزی هستند که به دلیل تشکیل رشته‌های سیتوپلاسمی که از میان واکوئل عبور می‌کنند، چندین واکوئل کوچک را تشکیل می‌دهد که بلافاصله بوسیله دیواره سلولی احاطه می‌گردند. این واکوئل دور تا دور مجموعه سیتوپلاسم مرکزی قرار گرفته‌اند و ساختار شبه ستاره‌ای را تشکیل می‌دهند (شکل ۲). در این تحقیق، همچنین مشاهده شد که میکروسپوره‌های جنین‌زا، معمولاً، اندازه‌های بزرگتر (حدود $50 \mu\text{m}$) از میانگین

میکروسکوپ معکوس^۱ بر روی میکروسپورهای ارقام در شرایط متفاوت کشت، جهت بررسی مراحل مختلف القاء و نمو جنین ها و یافتن شاخص های سیتولوژیکی برای شناسایی میکروسپورهای جنین زا انجام گرفت. تشخیص اولیه میکروسپورهای جنین زا از میان انواع غیر جنین زا، نه تنها در بهینه سازی کشت برای گونه های زراعی با اهمیت، ولی نامستعد از نظر کشت میکروسپور مفید است، بلکه در جداسازی ژنهایی که نقش کلیدی در تشکیل سلول های جنین زا ایفا می نمایند نیز با ارزش خواهد بود (۱۰).

نتایج تحقیقات نشان داده است که استفاده از چند عدد تخمدان زنده به همراه کشت میکروسپورها، نقش بسیار مؤثری در توسعه جنین زایی ایفا می نماید و این توسعه به خاطر ترشح موادی از تخمدان (مثل فنیل استیک اسید^۲ و آنالوگ های آن) در محیط کشت می باشد که باعث تقویت محیط کشت و افزایش پاسخ میکروسپورها می شود (۸،۲). اخیراً محققین ترکیباتی از خانواده آرابینوگالاکتان را در کشت میکروسپورهای گندم مورد استفاده قرار دادند و مشاهده کردند این مواد در افزایش قدرت زنده ماندن میکروسپورها و همچنین در بهبود قدرت باززایی جنین های بدست آمده نقش دارند. با وجود اینکه این مواد به تنهایی نیز باعث تشکیل جنین می شدند، ولی بهترین نتیجه زمانی حاصل می شد که به همراه تخمدان زنده به محیط اضافه می شدند (۱۳). هیو و کاشا (۱۹۹۷)، اثر کشت تخمدان را در کشت میکروسپورهای ایزوله گندم مورد بررسی قرار دادند و اعلام کردند علاوه بر فنیل استیک اسید، مواد دیگری هم از تخمدانها منتشر می شوند که باعث افزایش پاسخ به کشت می شود و استفاده از کشت توأم میکروسپورها با تخمدانها، اختلافات بین ژنوتیپها (در هر دو فاز القاء و جنین زایی) را کاهش می دهد (۸). تورآو و همکاران (۱۹۹۶)، از هر دو نوع کشت، بدون تخمدان، و با تخمدان، استفاده کرده و مشاهده کردند که در کشت های بدون تخمدان هیچ جنینی تشکیل نگردید (۲۰). در تحقیق حاضر، نیز، حتی زمانیکه جمعیت بسیار زیادی از میکروسپورهای جنین زا در محیط کشت فاقد تخمدان زنده

صورت گرفته است (۱۷،۱۶،۳). نتایج مطالعات نشان داده اند که در کشت میکروسپور گندم بهترین کربوهیدرات، مالتوز می باشد (۳). پائین بودن سرعت هیدرولیز مالتوز باعث می شود تا گلوکز بر حسب نیاز جنین آزاد شده و برای مدت طولانی تری در اختیار جنین قرار گیرد (۳،۲۱،۲۰). از طرفی فشار اسمزی محیط کشت که عامل مهمی در تکامل میکروسپورها به سمت جنین های بالغ بوده و تعداد و اندازه جنین ها را تحت تأثیر قرار می دهد، با استفاده از غلظت های متفاوت قند مالتوز قابل تنظیم است. لیو و همکاران (۲۰۰۲) نتیجه گرفتند، که بهترین فشار اسمزی محیط کشت برای تشکیل جنین حدود $200 \text{ mOsmol kg}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ می باشد که این میزان فشار اسمزی با استفاده از ۹۰ گرم در لیتر قند مالتوز بدست می آید (۱۴،۱۵). در این تحقیق نیز از قند مالتوز به عنوان منبع کربوهیدرات و به میزان ۹۰ گرم در لیتر در تهیه محیط کشت میکروسپورها استفاده گردید.

در صورت مناسب بودن محیط کشت، میکروسپورهای جنین زا، اولین تقسیم سلولی خودشان را تقریباً ۱۲ ساعت بعد از کشت آغاز می نمایند. این تقسیم برخلاف فرآیند نرمال دانه گرده، از نوع تقسیمات متقارن می باشد (۱۵). تقسیم متقارن، فقط در سلول هایی که هسته آنها در مرکز سلول قرار گرفته، می تواند انجام شود که این حالت در میکروسپورهای جنین زای القاء شده توسط پیش تیمار شیمیایی مشاهده می گردد. ساختارهای چند سلولی که هنوز در داخل دیواره میکروسپورها (اگزین) قرار گرفته اند تقریباً یک هفته بعد، تشکیل می گردند. تجمع دانه های نشاسته ای در سلول های ناحیه محدودی در مجاورت دیواره میکروسپور و اغلب در نزدیکی منفذ جنینی در تمام ساختارهای چند سلولی انجام می گیرد شکل ۲ (۱۰،۱۵). در طول هفته دوم، دیواره میکروسپورها از ناحیه مقابل منفذ جنینی شکافته شده و جنین های نارس جوانه می زنند. رشد و بلوغ این جنین ها، در طی ۱۰ تا ۱۴ روز بعد انجام می گیرد (شکل ۲).

شایان ذکر است که در این تحقیق به دلیل نبود رقم شاهد، جهت مقایسه ارقام و بهینه سازی شرایط کشت، بررسی های سیتولوژیکی گسترده ای با استفاده از

1- Inverted microscope

2- Phenyleacetic acid (PAA)

بدون تخمدان هیچ جنینی تشکیل نگردید (۲۰). در تحقیق حاضر نیز، حتی زمانی که جمعیت بسیار زیادی از میکروسپورهای جنین‌زا در محیط کشت فاقد تخمدان زنده کشت می شدند، اکثریت میکروسپورهای در حال توسعه، از تقسیمات سلولی بعدی باز می ماندند.

تحقیق حاضر، اولین گزارش از کشت موفقیت آمیز میکروسپورهای گندم در ایران است که طی آن روند تکوینی جنین زایی میکروسپورها نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. با بهینه سازی پاسخ به کشت میکروسپور و افزایش جنین زایی و باززایی گیاه، می توان از این تکنولوژی در راستای دستیابی سریع به هموزیگوسی و در نتیجه تسریع برنامه های به نژادی گندم، به خوبی استفاده نمود. از طرفی با انتقال ژن به مواد هاپلوئیدی گندم می توان ژن(های) کنترل کننده صفات مطلوب زراعی (نظیر مقاومت به آفات یا بیماریها، مقاومت به علفکشها و غیره) را نیز منتقل کرد و پس از دو برابر کردن کروموزومها، گیاهان تراریخت کاملاً هموزیگوت تولید کرد.

محیط کشت و افزایش پاسخ میکروسپورها می شود (۸،۲). اخیراً محققین ترکیباتی از خانواده آرابینوگلاکتان را در کشت میکروسپورهای گندم مورد استفاده قرار دادند و مشاهده کردند این مواد در افزایش قدرت زنده ماندن میکروسپورها و همچنین در بهبود قدرت باززایی جنین های بدست آمده نقش دارند. با وجود اینکه این مواد به تنهایی نیز باعث تشکیل جنین می شدند، ولی بهترین نتیجه زمانی حاصل می شد که به همراه تخمدان زنده به محیط اضافه می شدند (۱۳). هیو و کاشا (۱۹۹۷)، اثر کشت تخمدان را در کشت میکروسپورهای ایزوله گندم مورد بررسی قرار دادند و اعلام کردند علاوه بر فنیل استیک اسید، مواد دیگری هم از تخمدانها منتشر می شوند که باعث افزایش پاسخ به کشت می شود و استفاده از کشت توأم میکروسپورها با تخمدانها، اختلافات بین ژنوتیپها (در هر دو فاز القاء و جنین زایی) را کاهش می دهد (۸). تورآو و همکاران (۱۹۹۶)، از هر دو نوع کشت، بدون تخمدان، و با تخمدان، استفاده کرده و مشاهده کردند که در کشت های

REFERENCES

1. Altpeter, F., V. Vasil, V. Srivastava, E. Stöger, & I. K. Vasil. 1996. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant Cell Reports*. (16): 12-17.
2. Bruins, M. B. M., M. Rakoczy-Trojan, M. Waska, & C. H. A. Snijders. 1996. Isolated microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.), the effect of co-culture of wheat or barley ovaries on embryogenesis. *Cereal Research Communications*. (24): 401-109.
3. Cistue L., K.J. Kasha. 2005. Gametic Embryogenesis in *Triticum*: a study of some critical factors in haploid (Microspore) embryogenesis. Pp.321-342. in: A. Mujib, J. Samaj (eds): *Somatic Embryogenesis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
4. Dormann, M. 1999. Genetic transformation of embryogenic microspores. *Agro Evo Oilseed Research Center*. Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
5. Dormann, M., H. M. Wang & M. Oelck. (2001). Transformed embryogenic microspores for the generation of fertile homozygous plants. United States Patent, Patent No.: US 6,316,694 B1.
6. Gustafson, V.D., P. S. Baenziger, M. S. Wright, W.W. Stroup & Y. Yen. 1995. Isolated wheat microspore culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 42: 207-213.
7. Hu, T. & K.J. Kasha. 1999. A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. *Genome*. 42(3): 432-441.
8. Hu, T. & K.J. Kasha. 1997. Improvement of isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary co-culture. *Plant Cell Reports*. (16): 520-525.
9. Hu T.C., A. Ziauddin, E. Simion, K.J. Kasha. 1995. Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) in a defined media. I. Effects of pretreatment, isolation methods, and hormones. *In Vitro Cell Dev. Biol.* (31): 79-83
10. Indrianto A., I. Barinova, A. Touraev & E. Herberle-Bors. 2001. Tracking individual wheat microspore *in vitro*: identification of embryogenesis microspores and body axis formation in the embryo. *Planta*. (212): 163-174.

18. Reynolds, T.L. 1997. Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology*. 33(1): 1-10.
19. Shugar, L. 1998. Application of doubled-haploid systems. Hyland seeds, W.G. Thomson and Sons Limited-Narin, Ontario, Canada.
20. Touraev, A., A. Indrianto, I. Wratschko, O. Vicente, & E. Heberle-Bors. 1996. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sexual Plant Reproduction*. 9(4): 209-215.
21. Touraev, A., O. Vicente, & E. Heberle-Bors. 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science Reviews*. 2(8): 297-302.
22. Zheng, M.Y., W. Liu, Y. Weng, E. Polle, & C. F. Konzak. 2001. Culture of freshly isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores treated with inducer chemicals. *Plant Cell Reports*. (20): 685-690.
23. Zheng, M.Y., Y. Weng, W. Liu, & C. F. Konzak. 2001. The effect of ovary-conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*. (20): 802-807.
24. Zhou, H., & C.F. Konzak. 1997. Influence of genetic and environmental factors on anther culture response of wheat. *Journal of Applied Genetics*. 38(4): 393-406.