مجله کشاورزی، جلد 9، شماره 1، بهار 1386، صص 50-39

بررسی کالوس‌زایی و باززایی از جنین نارس ارقام گندم

پوراندخت گلکار [*]، احمد ارزانی [**] و سید علی محمد میرمحمدی میبدی [***]

چکیده

دستورزی‌های ژنتیکی و گزینش تنوع سوماکلونی در گیاهان از طریق کشت کالوس، از روشهای مفید برای اصلاح گیاهان می‌باشند. در این تحقیق، واکنش 25 رقم گندم نان (*Triticum aestivum* L.)، به کشت جنین نابالغ از لحاظ القای کالوس و باززایی گیاه، در شرایط درون شیشه‌ای ارزیابی شد. از محیط کشت موراشیک و اسکوک (MS) حاوی دو میلی‌گرم در لیتر2،4- دای کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) و 0/1 میلی‌گرم در لیتر کاینتین به عنوان محیط کشت القای کالوس استفاده شد. واکنش ارقام به القای کالوس از طریق ارزیابی درصد کال‌زایی و متوسط سرعت رشد قطر کالوس (میلی‌متر در روز) و ارزیابی واکنش ارقام به باززایی گیاه از کالوس با استفاده از اندازه‌گیری معیارهای درصد باززایی و سرعتباززایی انجام شد. میانگین درصد کال‌زایی در پایان دوره یادداشت‌برداری از 46 تا 95 درصد به‌ترتیب در ارقام شعله و کراس‌سرخ تخم متغیر بود. رقم کراس سرخ تخم از نظر پاسخ به کال‌زایی و رقم الوند از نظر بیشترین میزان باززایی گیاهچه از کالوس در کوتاه‌ترین زمان کشت درون شیشه‌ای، به‌عنوان برترین ارقام شناخته شدند. رقم الوند برترین رقم از نظر کالوس‌دهی و باززایی به ازای کل جنین نابالغ کشت شده شناخته شد.

کلمات کلیدی: القاء، باززایی، جنین، کالوس، گندم

[*] - کارشناس ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان - ایران

[**] - استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان – ایران

(نویسنده مسئول مکاتبات : a_arzani@cc.iut.ac.ir)

[***] - دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان - ایران

مقدمه

جنین نارس فراوان‌ترین ریزنمونه در مطالعات کشت کالوس و روشهای تراریزش ژن در گندم می‌باشد (5). واکنش جنین زایگوتی گندم به القای کالوس در کشت درون شیشه‌ای توسط محققان زیادی مطالعه شده است (4 و 9). بررسی تأثیر عوامل مختلف (نظیر ژنوتیپ گیاه دهنده جنین، انتخاب مرحله مناسب نموی جنین، محیط کشت مناسب، تنظیم‌کننده‌های رشد و ریزنمونه مناسب) برای بهبود شرایط القای کالوس و باززایی از جنین، از مهمترین مطالعات می‌باشد (20 و 23). کاهش زمان دوره اصلاحی و غلبه بر مشکلات تلاقی‌پذیری گیاه، نجات جنین هاپلویید حاصل از تلاقی بین گونه‌ای و تولید کالوس برای انتقال ژن از مهمترین جنبه‌های کاربردی کشت جنین نارس می‌باشد (6 و 12). از تولید کالوس و باززایی آن برای تکثیر کلونی، گزینش درون شیشه‌ای، ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده با استفاده از تنوع سوماکلونی ناشی از محیط کشت و در مهندسی ژنتیک به منظور انتقال ژن موردنظر از منبعی بیگانه به گیاه زراعی استفاده شده است (1 و 6).

بهبود باززایی از کالوس و تولید گیاه کامل تحت تأثیر عوامل مختلف نظیر ژنوتیپ گیاه دهنده جنین و تنظیم‌کننده‌های رشد می‌باشد (7 و 23). میزان موفقیت در رشد کالوس و باززایی گیاه از آن در غلات بستگی زیادی به فعالیت ریزنمونه جدا شده دارد. به‌طور کلی قسمت‌های رویشی گیاهان نسبت به قسمت‌های زایشی آمادگی بیشتری برای باززایی دارند و قابلیت ژنتیکی باززایی در تمام ارقام وجود دارد (3). علاوه بر عوامل فیزیولوژیکی مؤثر بر باززایی، 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 (2).

در گندم از ریزنمونه‌های مختلفی نظیر گل آذین نارس و جنین بالغ برای تولید کالوس استفاده شده است. ولی کشت جنین نارس گندم به عنوان بهترین ریزنمونه در مطالعات کشت کالوس در گندم شناخته شده است (5، 7 و 20). کشت جنین نارس گندم به منظور القاء کالوس اولین بار در 1982 انجام شد (24). باززایی گیاه از کالوس یک پدیده مرفوژنتیکی پیچیده می‌باشد که عوامل داخلی و خارجی فیزیولوژیکی نقش مهمی در آن ایفا می‌کنند (10). هورمون‌هایی نظیر ایندول -3- استیک اسید (AAI) و بنزیل آدنین (BA) به عنوان بهترین منابع تنظیم‌کننده رشد برای باززایی در گندم شناخته شده است (23).

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 هورمون‌های مصنوعی مورد استفاده و شرایط محیطی گیاه اعلام نموده‌اند (15 و 18). تعدادی ژن در کنترل باززایی ژنوتیپ‌های با قابلیت باززایی زیاد، مؤثر است (2) و آلل نیمه پاکوتاهی Rht_8 در گندم نقش اساسی در رشد کالوس و صفات مرتبط با باززایی دارد (2). تشکیل نقاط

سبز رنگ بر روی کالوس، یک معیار خوب برای کالوس‌های جنین‌زای گندم می‌باشد. ژنوتیپ‌هایی از گندم که به صورت پاییزه کشت شده‌اند، قابلیت تولید جنین‌های سوماتیکی و باززایی بیشتری را دارند (22). پاسخ واریته‌های بومی گندم نسبت به واریته‌های اصلاح شده به القای کالوس و باززایی بیشتر است (11). در یک تحقیق 2-1 میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D و 2-0/25 میلی‌گرم در لیتر کاینتین به‌عنوان بهترین ترکیب هورمونی برای القای کالوس معرفی شده است (14). در یک تحقیق، قابلیت القاء و باززایی از کالوس در 84 لاین گندم سیمیت بررسی و تفاوت بین ژنوتیپ‌ها معنی‌دار بود (9). تعداد 107 واریته گندم نان از نظر فراوانی القای کالوس و توانایی باززایی بررسی و مشاهده شد که توانایی ژنوتیپ‌های دارای واکنش بهتر به محیط کشت برای باززایی و انتقال ژن بهتر است (16). همبستگی بین صفات مناسب برای کشت بافت از نظر توانایی تولید کالوس و باززایی، در کشت جنین نابالغ 48 رقم گندم نان معنی‌دار گزارش شده است (25). در یک تحقیق، رقم گندم فلات که یک لاین سیمیت (Seri#82) حاوی جابه‌جایی کروموزومی 1BL.1RS است به‌همراه رقم خارجی آمیگو با جابجایی کروموزومی 1AL.1RS، مطالعه استفاده شد. نتایج اثر مثبت بازوی کروموزوم شماره 1 چاودار از رقم 'امپریال' بر روی رشد و تمایز کشت کالوس و به‌طور کلی بهبود واکنش به کشت بافت در گندم نشان داد (13).

باتوجه به اینکه آگاهی از عکس‌العمل ارقام به کشت جنین نارس برای تولید کالوس و باززایی به منظور کاربردهای متعاقب به‌نژادی در شرایط درون شیشه‌ای حایز اهمیت می‌باشد، در تحقیق حاضر واکنش ارقام رایج کشور به کشت جنین از نظر القای کالوس و باززایی بررسی شد.

مواد و روشها

در این تحقیق، 25 رقم گندم نان (شامل 20 رقم رایج کشور تهیه شده از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و سه رقم خارجی و دو واریته ساختگی [1] گندم تهیه شده از مرکز بین‌المللی اصلاح گندم و ذرت [2]، در آبان سال 1383 در گلخانه‌های پژوهشی دانشگاه صنعتی اصفهان کشت شد. برداشت خوشه‌ها برای استفاده از جنین نارس، 16-14 روز پس از گرده‌افشانی انجام شد. جنین‌های نارس ابتدا در محلول وایتکس حاوی پنج درصد هیپوکلریت سدیم قرار داده شد و سپس به وسیله الکل اتیلیک 70 درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی و درنهایت با آب مقطر دو بار استریل شستشو شد. جنین‌های نارس پس از جدا کردن، به پتری دیش‌های محتوی محیط کشت موراشیک و اسکوک منتقل و اسکوتلوم بذر در جهت بالا داده شد. برای جامد نمودن محیط کشت از آگار نوع آزمون شده برای کشت سلولی از شرکت سیگما به مقدار نه

1 - Synthetic wheat

2 - CYMMYT

گرم در لیتر استفاده شد. به منظور القای کالوس در هر پتری دیش پنج جنین نارس و به ازای هر رقم 10 تکرار درنظر گرفته شد. در این مرحله ظروف پتری در دمای (2±)24 درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور در محیط تاریکی نگهداری شد.

ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌ها به کشت جنین نابالغ، صفات درصد کال‌زایی و سرعت رشد قطر کالوس (میلی‌متر در روز) اندازه‌گیری شد. محاسبه درصد کال‌زایی با یادداشت‌برداری تعداد جنین‌های القاء شده در 4، 8، 12 و 16 روز پس از تلقیح جنین انجام شد. قطر هر یک از کالوس‌ها (میلی‌متر) در هر تکرار در چهار دوره زمانی یادداشت‌برداری و در زیر استریومیکروسکوپ با استفاده از فرمول (1) تعیین شد (8) :

$$\text{قطرکالوس} = \sqrt{\text{عرض} * \text{طول}} \qquad (1)$$

برای محاسبه سرعت رشد کالوس [1] در زمان‌های یادداشت‌برداری پس از تلقیح از فرمول‌های (2) و (3) استفاده شد (8) :

$$cgr_4=\frac{d_{16}}{4} \quad cgr_3=\frac{d_{12}}{4} \quad cgr_2=\frac{d_8}{4} \quad cgr_1=\frac{d_4}{4} \qquad (2)$$

$$cgr = \frac{cgr_4+cgr_3+cgr_2+cgr_1}{4} \qquad (3)$$

در این فرمول، d_4 ، d_8 ، d_{12} و d_{16} قطر کالوس‌ها در هر یک از چهار مرحله اندازه‌گیری است که از تفاضل قطر هر مرحله از مرحله قبلی محاسبه شد. حدود یک ماه پس از القای کالوس، نمونه‌های کالوس حاصل به محیط کشت باززایی منتقل شد. بدین منظور از محیط کشت MS (19) حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد ایندول 3- استیک اسید (IAA) و بنزیل آدنین (BA) و هر یک با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. ابتدا نمونه‌های کالوس به مدت یک هفته در انکوباتور تاریکی و دمای (2±)24 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس به انکوباتور با دمای (1±)26 درجه سانتی‌گراد با 16 ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی منتقل شد. بعد از 7، 14 و 21 روز پس از انتقال کالوس‌ها به محیط باززایی، تعداد کالوس‌های باززا شده به منظور ارزیابی سرعت و درصد باززایی گیاهچه از کالوس، ثبت و در هر تکرار و هر زمان به درصد تبدیل شد. درصد کال‌زایی و درصد باززایی قبل از اجرای تجزیه واریانس با تبدیل زاویه‌ای $\arcsin\sqrt{x}$ تبدیل شد (8). سپس تجزیه واریانس داده‌های درصد و سرعت باززایی ارقام به صورت طرح کرت‌های خرد شده در زمان انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. تجزیه خوشه‌ای صفات با روش WARD و با استفاده از شش نرم‌افزار SPSS انجام شد.

1 - Callus growth rate

نتایج و بحث

القای کالوس

تفاوت درصد کال‌زایی از جنین نارس ارقام گندم نان، برای اثر اصلی رقم، اثر فرعی زمان و اثر متقابل رقم × زمان معنی‌دار بود ($P < 0/01$). تفاوت ارقام گندم نان نسبت به القای کالوس در چهار دوره زمانی معنی‌داری بود. به‌طوری‌که تفاوت واکنش ارقام در چهار روز اول پس از تلقیح نسبت به کشت جنین نارس و تولید کالوس بسیار زیاد بود (جدول 1). در دوره زمانی اول رقم کراس سرخ تخم با 86 و رقم شعله با 2/5 درصد کال‌زایی به‌ترتیب بیشترین و کمترین واکنش را به کشت بافت داشتند. لازم به ذکر است که رقم فلات در اولین دوره زمانی از نظر درصد کال‌زایی در گروه متوسط و رقم آمیگو در مقام آخر بود. واکنش این دو رقم در دوره زمانی دوم و سوم متوسط و در دوره چهارم جزو برترین ارقام از نظر فراوانی تولید کالوس بودند. رقم گندم فلات یک لاین سیمیت (Seri#82) حاوی جابه‌جایی 1BL.1RS و رقم خارجی آمیگو دارای جابجایی کروموزومی 1AL.1RS است. بازوی کوچک کروموزوم شماره 1 (1RS) حاصل از چاودار در واکنش مطلوب این ارقام در کالوس‌زایی مؤثر بوده است که با گزارشات مبنی بر اثر مثبت بازوی 1RS. بر کشت کالوس در گندم تطابق دارد (13). در پایان دوره کال‌زایی، برای 68 درصد ارقام، میزان واکنش به کال‌زایی کامل و 100 درصد بود یعنی واکنش 92 درصد از ارقام واکنش بالاتر از 80 درصد بود. مجموعاً علاوه بر رقم، اجزای محیط کشت هم بر فراوانی القای کالوس مؤثر می‌باشند (24). نتایج تجزیه واریانس سرعت رشد قطر کالوس (میلی‌متر در روز) نشان داد که تفاوت ارقام مورد مطالعه از نظر صفت رشد کالوس در زمان‌های مختلف یادداشت‌برداری معنی‌دار است. به‌طوری‌که میانگین سرعت رشد کالوس در چهار روز اول کشت حداکثر بوده و با گذشت زمان کاهش یافته است (شکل 1). بدین‌ترتیب متوسط سرعت رشد در دوره اول زمانی برای ارقام مورد مطالعه از 0/40 به 0/14 میلی‌متر قطر در روز در دوره چهارم کاهش یافت. ارقام از نظر سرعت رشد کالوس در چهار دوره زمانی یادداشت‌برداری در سه گروه متمایز بودند (شکل 1). تنوع ژنتیکی بین ارقام مورد مطالعه از نظر سرعت رشد کالوس بسیار زیاد و از 0/31 در رقم کراس سرخ تخم تا 0/21 میلی‌متر در روز در ارقام بومی ایلام و قدس متغیر بود (شکل 2). سایر محققان نیز از معیار سرعت رشد کالوس به عنوان معیاری مهم در ارزیابی واکنش ارقام به کال‌زایی و قابلیت پاسخ به کشت بافت نام برده‌اند (20). بنابر اظهار محققین سرعت رشد زیادتر کالوس برخی از ژنوتیپ‌ها در محیط کشت، مشابه وجود مکانیسم‌های ژنتیکی (نظیر اپیستازی و غالبیت) این صفت می‌باشد (9).

جدول 1 - میانگین‌های اثر متقابل رقم و زمان و اثر اصلی رقم برای درصد کال‌زایی جنین‌های نارس ارقام گندم

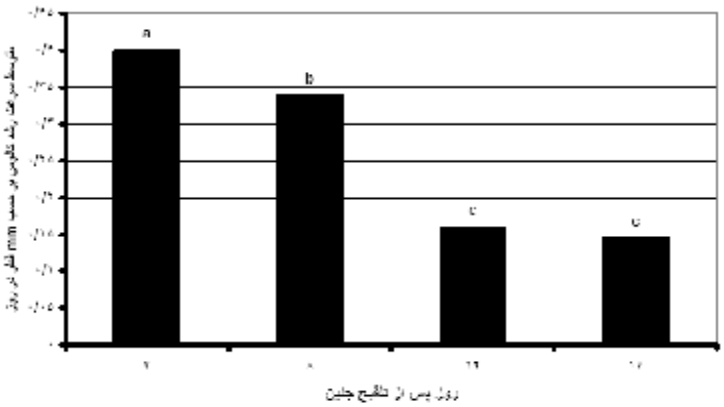
ردیف	رقم	روز پس از تلقیح								میانگین	
		4		8		12		16		کال‌زایی (درصد)	
1	نیک نژاد	32/5	t-x	85	a-j	100	a	100	a	79	d-j
2	تجن	17/5	xyz	67	j-o	95	abc	100	a	70	i-m
3	زاگرس	48	p-u	61	m-q	61	m-q	61	m-q	57	no
4	داراب	37	t-w	74	f-n	91	a-g	100	a	75	f-l
5	کراس سرخ تخم	86	a-i	97	ab	100	a	100	a	95	a
6	قدس	68	i-n	84	a-k	90	a-h	100	a	85	a-g
7	شه داس	61	m-q	86	a-i	97	ab	100	a	86	a-f
8	فلات	57	n-s	77	c-m	80	b-l	82	a-l	74	g-l
9	روشن	69	i-n	92	a-f	96	ab	100	a	89	a-e
10	مهدوی	76	d-m	96	ab	100	a	100	a	93	ab
11	پاستور	20	w-z	74	f-n	91	a-g	100	a	71	h-l
12	زرین	39	s-v	72	h-n	88	a-h	90	a-h	70	h-l
13	شعله	2/5	z	44	q-u	65	l-p	74	f-n	46	o
14	آتیلا 5	14	yz	75	e-n	80	b-l	100	a	67	k-n
15	کراس‌امید	19/5	w-z	91/5	a-g	96	ab	96	ab	75	f-l
16	الموت	39	s-v	89	a-h	94	a-d	100	a	81	c-h
17	بومی ایلام	31	t-y	92	a-f	96	ab	100	a	80	c-i
18	الوند	59	m-r	80	b-l	93	a-e	100	a	83	b-g
19	نوید	33	t-x	91	a-g	91	a-g	100	a	79	f-k
20	مغان	49	o-t	84	a-k	93	a-e	100	a	81	c-h
21	چینی بهاره	19	w-z	57	n-s	89	a-h	91	a-g	64	lmn
22	آمیگو	9/5	z	73	g-n	89	a-h	100	a	68	j-n
23	Croc/*Ae. squarrosa*	74	f-n	92	a-f	96	ab	100	a	90	a-d
24	Altar84/*Ae.squarrosa*	66	k-p	96	ab	100	a	100	a	91	abc
25	اینیا	24	*v*-z	41	r-v	80	b-l	91	a-g	59	mn

در هر ستون تفاوت میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک معنی‌دار نیست (P< 0/05).

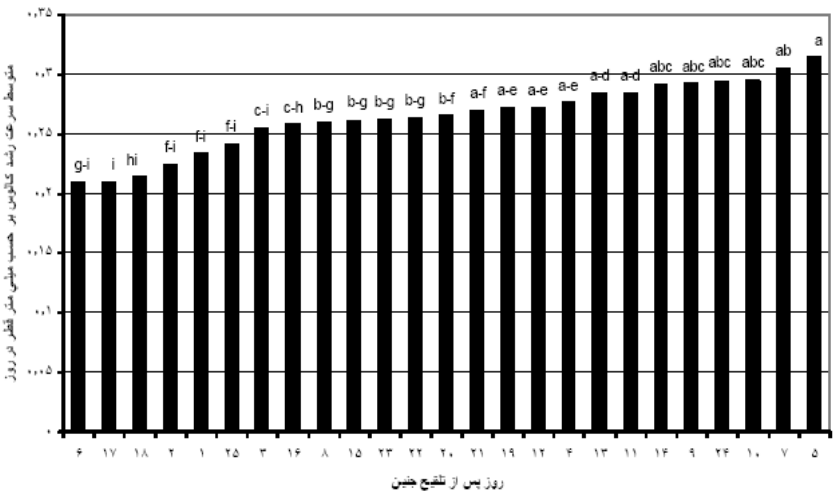
جدول 2 - ضرایب همبستگی بین صفات مختلف (در محیط کال‌زایی و باززایی) در ارقام گندم مورد مطالعه

صفات	1	2	3	4
درصد کال‌زایی	1			
متوسط سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطر در روز)	0/15	1		
درصد باززایی از کالوس	0/57**	-0/25	1	
سرعت باززایی از کالوس	0/56**	0/24	0/97**	1

* و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد (n=25)



شکل 1 - مقایسه متوسط سرعت رشد کالوس ارقام گندم مورد مطالعه در زمان‌های مختلف یادداشت‌برداری



شکل 2 - مقایسه متوسط سرعت رشد قطرکالوس (میلی‌متر در روز) ارقام گندم

باززایی از کالوس

تفاوت ارقام گندم از نظر درصد باززایی گیاهچه از کالوس معنی‌دار بود (P< 0/01). همچنین تفاوت ارقام از نظر درصد باززایی در دوره‌های زمانی مختلف معنی‌دار بود (P< 0/05). اثر متقابل رقم × زمان نیز معنی‌دار بود نشان داد که واکنش ارقام گندم در زمان‌های مختلف از نظر فرآیند باززایی از کالوس متفاوت بود. حداکثر و حداقل میانگین درصد باززایی دوره زمانی موردنظر به‌ترتیب مربوط به ارقام الوند و اینیا (71/3 و 13/7 درصد) بود. میانگین، ارقام گندم نان از نظر درصد باززایی، در جدول (3) ارایه شده است. واکنش ارقام فلات و آمیگو (حاوی بازوی 1RS) دارای نسبت به فراوانی باززایی گیاهچه از کالوس در طی سه دوره زمانی ذکر متوسط بودند و از نظر سرعت باززایی، هر دو رقم در رتبه دوم بودند. استفاده از لاین‌های با جایگزینی کروموزومی نشان داده است که کروموزوم 1R مانع از ایجاد کالوس‌های باززایی کامل شده است (21). اگرچه در تحقیق حاضر کالوس‌زایی دو رقم حاوی بازوی کروموزومی 1RS` پس از 16 روز حداکثر بود ولی باززایی کالوس‌های آنها با تأخیر زمانی انجام شده است. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که تفاوت‌های ژنوتیپی ممکن است به دلیل متفاوت بودن میزان هورمون‌های مترشحه داخلی (درون‌زا) باشد (3). تفاوت در مقدار و تأثیر هورمون‌های داخلی (3)، متفاوت بودن ژن‌های کنترل‌کننده پاسخ به باززایی کشت جنین نارس (15)، تنوع آللی در گندم (15) و تأثیر برخی از اجزای محیط کشت در تنظیم تظاهر برخی از ژن‌های موثر در باززایی گندم نان (18 و 22) از عوامل مؤثر در پاسخ متفاوت ژنوتیپ‌های گندم نان می‌باشند. تفاوت ارقام مورد بررسی از نظر سرعت باززایی نیز معنی‌دار بود (جدول 3). ارقام نوید و الوند با 9/6 درصد در روز بیشترین سرعت باززایی را داشتند. چون حداکثر پتانسیل باززایی در حداقل زمان یک پدیده مطلوب است (20) و لذا رقم الوند دارای بهترین واکنش از نظر حداکثر درصد باززایی را داشت، بنابراین به عنوان برترین رقم از نظر توانایی زیاد باززایی از کالوس در نظر گرفته شد.

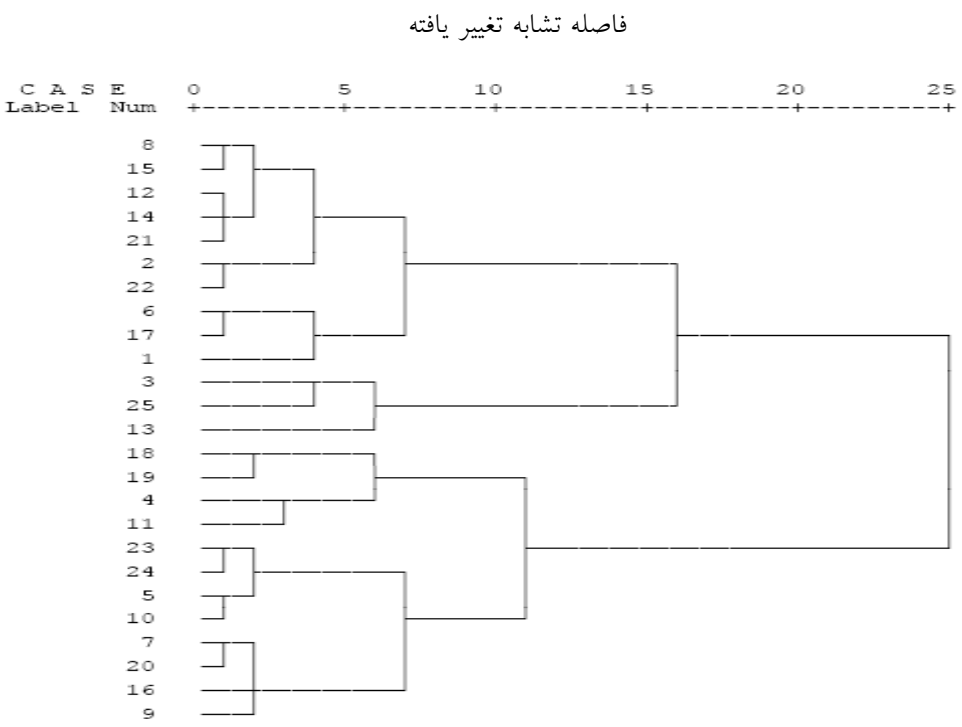
روابط بین صفات

ضریب همبستگی بین سرعت رشد کالوس و درصد کال‌زایی 0/15 بود (P< 0/05) (جدول 4). این موضوع نشان می‌دهد که صفات درصد کال‌زایی و سرعت رشد کالوس می‌تواند از نظر ژنتیکی مستقل از یکدیگر باشند. همبستگی فراوانی درصد گیاهچه‌های بازرا شده از کالوس و فراوانی القای کالوس از جنین‌های نابالغ در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مثبت و معنی‌دار بود (جدول 4). سایر محققان وجود همبستگی مثبت و معنی‌دار بین این صفات را گزارش کرده‌اند (20)، این امر می‌تواند مشابه وجود مکانیسم‌های مشابه در کنترل ژنتیکی این دو صفت و وجود یا ژن‌های موثر بر فراوانی القای کالوس و باززایی بر روی کروموزوم‌های یکسان باشد (20).

جدول 3 - مقایسه میانگین‌های درصد و سرعت باززایی گیاهچه از کالوس ارقام گندم تحت مطالعه

ردیف	رقم	درصد باززایی (روز پس از انتقال به محیط باززایی)						متوسط درصد باززایی		سرعت باززایی	
		7		14		21					
1	نیک نژاد	15	**yz**	24/2	**u-z**	26/4	**t-z**	22	**gh**	bc	2/9
2	تجن	18/7	**w-z**	55/0	**e-m**	61/8	**c-k**	45/2	**a-h**	abc	5/6
3	زاگرس	12/5	**z**	28/3	**s-z**	34/7	**p-w**	25	**fgh**	bc	3/2
4	داراب	25/0	**u-z**	65/0	**b-j**	71/6	**a-e**	53/8	**a-f**	abc	6/7
5	کراس سرخ تخم	13	**r-y**	66/6	**a-i**	73/3	**a-d**	56/7	**a-f**	abc	7/2
6	قدس	16/8	**xyz**	39/0	**m-u**	47/0	**k-q**	34/4	**c-h**	abc	4/3
7	شه داس	23/5	**u-z**	47/5	**k-q**	51/6	**h-o**	40/9	**a-h**	abc	5/2
8	فلات	20/5	**v-z**	38/5	**n-u**	42/6	**l-t**	33/9	**c-h**	abc	4/4
9	روشن	29/0	**s-y**	52/5	**g-n**	58/3	**d-l**	46/6	**a-g**	abc	6/0
10	مهدوی	13/8	**r-y**	56/0	**e-l**	62/7	**c-k**	44/16	**c-h**	abc	7/0
11	پاستور	52/0	**j-p**	67/2	**a-h**	70/0	**a-f**	62/4	**abc**	ab	7/9
12	زرین	12/5	**z**	42/5	**l-t**	48/3	**k-q**	34/4	**c-h**	abc	4/2
13	شعله	19/4	**q-x**	25/0	**l-s**	49/0	**g-n**	27/8	**a-h**	abc	4/8
14	آتیلا 5	11/0	**z**	46/3	**k-r**	49/0	**j-p**	35/5	**c-h**	abc	6/0
15	کراس‌امید	5/5	**z**	46/8	**k-q**	49/3	**j-p**	33/9	**c-h**	abc	3/9
16	الموت	29/0	**s-y**	55/5	**e-m**	55/5	**e-m**	46/7	**a-g**	abc	6/0
17	بومی ایلام	12/5	**z**	37/5	**yz**	42/0	**u-z**	30/7	**h**	c	4/7
18	الوند	53/8	**f-n**	77/8	**abc**	82/0	**a**	71/2	**a**	a	9/6
19	نوید	57/6	**d-l**	68/8	**a-g**	82/7	**g-n**	69/7	**ab**	a	9/6
20	مغان	26/4	**t-z**	41/7	**l-t**	50/2	**i-p**	39/5	**b-h**	abc	5/2
21	چینی بهاره	5/5	**z**	35/5	**o-v**	48/3	**k-q**	29/8	**d-h**	bc	3/5
22	آمیگو	32/5	**v-z**	44/2	**u-z**	53/0	**m-u**	43/3	**e-h**	abc	5/9
23	**Croc/*Ae. squarrosa***	25/0	**u-z**	73/0	**a-d**	80/4	**ab**	59/5	**a-e**	ab	7/7
24	**Altar84/*Ae.squarrosa***	44/3	**l-s**	66/6	**a-i**	70/8	**a-e**	60/6	**a-d**	ab	8/1
25	اینیا	2/3	**z**	15/4	**n-u**	23/3	**l-t**	13/7	**l-t**	abc	1/6

در هر ستون تفاوت میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک نیست ($P< 0/05$).



شکل 3 - نمودار خوشه‌ای ارقام گندم مورد مطالعه از نظر صفات مرتبط با کالزایی و باززایی

تجزیه خوشه‌ای

تجزیه خوشه‌ای با استفاده از صفات اندازه‌گیری شده در محیط کشت القای کالوس و باززایی انجام شد (شکل 3). برای تفکیک گروه‌های واقعی بین ارقام گندم از لحاظ پاسخ ارقام به صفات ارزیابی شده در کشت بافت با انجام آزمون F- بیل و قطع دندروگرام در فاصله اقلیدسی چهار، چهار گروه متفاوت ایجاد شد. ارقام داراب، پاستور، الوند و نوید، با تشکیل یک گروه جداگانه به عنوان بهترین گروه از نظر القای کالوس و باززایی گیاه شناخته شدند. ارقام کراس سرخ تخم، شهداس، روشن، مهدوی، المـوت، مغـان، Croc/*Ae. squarrosa* و Altar84/*Ae.squarrosa* در گروه رتبه دوم بودند. ارقام نیک‌نژاد، تجن، قدس، فلات، آتیلا 5، کراس امید، بومی ایلام، چینی بهاره و آمیگو در گروه ارقام با واکنش متوسط و در رتبه سوم بودند. ارقام زاگرس، شعله و اینیا، به عنوان ضعیف‌ترین گروه از نظر واکنش به کشت بافت و در رتبه چهارم بودند. نتایج نشان داد که پاسخ متفاوت ارقام مختلف گندم نان به تولید کالوس و باززایی گیاهچه می‌تواند نشانه متفاوت بودن توانایی ژنوتیپ‌ها در استفاده از آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی با استفاده از کشت بافت باشد. در روشهای انتقال ژن از طریق مهندسی ژنتیک لازم

است که از روشهای کارا، سریع و کاربردی بـرای باززایی گیاه از کـالوس در حـداقل زمـان ممکـن استفاده شود تا احتمال ایجاد تنوع سـوماکلونی در طی فرآیند کـشت بافـت و ایجـاد واریانـت‌هـای ژنتیکی پایدار کاهش یابـد. در روشـهای گـزینش درون‌شیشه‌ای به منظور مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده، با انتخاب کالوس‌های مقاوم به عامـل بازدارنده در محیط کشت و سـپس بـاززایی آن و انجام ارزیابی‌های مزرعه‌ای، امکان تولیـد گیاهـان مقاوم جدید در زمانی کوتاه‌تـر میـسر مـی‌گـردد. چون نقش کنترل ژنتیکی پاسخ به کشت بافت در شـرایط درون شیـشه‌ای در گنـدم حـایز اهمیـت است، لذا در طرح‌های به‌نژادی که بر پایه کـشت بافت استوار است توصـیه مـی‌شـود کـه از ارقـام کـراس سـرخ تخـم و الونـد بـه عنـوان والـد در تلاقی‌ها استفاده شود.

References

1 . Ahloowalia BS (1982) Plant regeneration from callus culture in wheat, Crop Sci. 28: 405-410.

2 . Ben Amer LM, Korzum V, Worland AJ and 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, Theor. Appl. Genet. 94: 1047-1052.

3 . Bhaskaran S and Smith RH (1990) Regeneration in cereal tissue culture: a review, Crop Sci. 30: 1328-1336.

4 . Bohorova NE, Pfeeiffer WH, Mergoum M, Crossa J, Pacheco M and Estahol P (2001) Regeneration potential of CIMMYT durum wheat and triticale varieties from immature embryos, Plant Breed 120: 291-294.

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

6 . Chawla HS (2000) Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers Inc., Enfield, USA 368 P.

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

8 . Compton ME (1994) Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 37: 217-242.

9 . Fennell SN, Bohorova M, Crossa J and Hoisington D (1996) Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats, Theor. Appl. Genet. 92: 163-169.

10 . Hagio T, Ichiri SS and Yamada T (2002) Efficient plant regeneration through morphogenesis in Japanese commercial variety of wheat, In Vitro Cell. Dev. Biol. 38: 1394.

11 . Hunsinger H and 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 Breed 98: 119-123.

12 . Kumar De K (1995) An Introduction to Plant Tissue Culture. New Central Book Agency LTD, 185 p.

13 . Langridge P, Lazzeri P and Lorz H (1991) A segment of rye chromosome 1 enhances growth and embryogenesis of calli derived from immature embryos of wheat, Plant Cell Rep. 10: 148-151.

14 . Liu HJ, Misso SH, Kamijima O and Sawano M (1990) Effects of plant growth regulators on the response of immature wheat embryo culture, Plant Tiss. Cult. Lett. 7: 170-176.

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

16 . Machii H, Mizuno H, Hirabayashi T, Li H and Hagio T (1998) Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures, Plant Cell Tiss. Org. Cult. 53: 67-74.

17 . Maddock SE, Lancaster VA, Risiott R and Franklin J (1983) Plant regeneration from cultured immature embryo inflorescences of 25 cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.), J. Exp. Bot. 34: 915-926.

18 . Mendoza MG and Kaeppler HF (2002) Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.), In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 38: 39-45.

19 . Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant 15: 473-479.

20 . Ozgen M, Turet M, Ozcan S and Sancak C (1996) Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. Plant Cell Rep. 115: 455-458.

21 . Pershina LA, Dobrovlskaya OB, Rakovtseva TS, Kravtsova LA, Shchapova AI and Shumny VK (2003) The effect of rye chromosomes on callus induction and regeneration in callus culture of immature embryos of wheat-rye substitution lines, *Triticum aestivum* L. Saratovskaya 29-*Secale cereale* L. cultivar Onokhoiskaya, Rus. J. Genet. 8: 1073-1080.

22 . Richard H and Carman JG (1998) Embryogenic of immature wheat embryos: Genotype, donor plant environment, and endogenous hormone levels. Crop Sci. 38: 249-253.

23 . Satyvathi VV, Jauhar PP, Elias EM and Rao MB (2004) Effects of growth regulators on *in vitro* plant regeneration in durum wheat, Crop Sci. 44: 1839-1846.

24 . Sears RG and Deckard EL (1982) Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. Crop Sci. 22: 546-550.

25 . Wu BH, Zheng YL, Liu DC and Zhou YH (2002) Trait correlation of immature embryo culture in bread wheat, Plant Breed 121: 1-5.

Callus Induction and Plant Regeneration from Immature Embryos of Wheat Cultivars

P. Golkar *, A. Arzani ** and S. A. M. Mirmohammadi Meibodi***

Abstract

Genetic manipulation and selection of favorable somaclonal variant from callus culture are supplementary tools for plant breeding. Immature embryos are the most frequently used explant source for *in vitro* culture. Response of 25 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes to callus induction and plant regeneration from immature embryo culture was evaluated under *in vitro* condition. Basal MS medium supplemented with 2 mg/L 2, 4-D and 0.1 mg/L kinetin was used for callus induction. Callus induction rate and callus growth rate were used as callus induction criteria of cultivars derived immature embryo culture. Response of cultivars to regeneration from callus was evaluated using the percentage and rate of plant regeneration. Average percent of callus production ranged from 46 to 95 percent in "Sholeh" and "Cross Sorkh Tokhm" cultivars, respectively." Cross Sorkh Tokhm" in view point of callus induction and "Alvand" with considering the regeneration from callus at the shortest time, were ranked as the superior genotypes. Considering the total plants regenerated from the cultured immature embryos, "Alvand", was ranked as the superior genotypes.

Key words: Callus, Embryo, Induction, Regeneration, *Triticum aestivum*

* - Msc., Agronomy and Plant breeding Department, Agriculture Faculty, Isfehan University of Technology, Isfehan - Iran

** - Professor, Agronomy and Plant breeding Department, Agriculture Faculty, Isfehan University of Technology, Isfehan – Iran (Corresponding author: **a_arzani@cc.iut.ac.ir)**

** * - Associate Professor, Agronomy and Plant breeding Department, Agriculture Faculty, Isfehan University of Technology, Isfehan – Iran