مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۵، شماره ۱، سال ۱۳۸۳ (۱۷۶-۱۶۷)

مطالعه اثرات ژنوتیپی گندم هگزاپلوئید روی تولیدگیاهان هاپلوئید آن از طریق تلاقی با ذرت

گودرز نجفیان[1] و تی بی سینگ[2]
۱، استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج
۲، استاد دانشگاه کشاورزی، حجابی‌پانت هندوستان
تاریخ پذیرش مقاله ۸۲/٤/۱۸

خلاصه

استفاده از گیاهان هاپلوئید در برنامه های بهنژادی می تواند به طور قابل توجه ای موجب صرفه جویی در زمان شود. این کار با تولید لاینهای خالص دبل هاپلوئید از گیاهان هاپلوئید از طریق دو برابر کردن تعداد کروموزومهای آنها صورت میگیرد. به منظور تولید گیاهان هاپلوئید از گندمهای هگزاپلوئید هندوستان از طریق تلاقی با ذرت و نیز مطالعهٔ اثرات ژنوتیپی گیاه گندم در این تحقیق ۵ هیبرید گندم هگزاپلوئید (W_1-W_5) که از تلاقی های مختلف گندم × گندم بدست آمده بودند با یک واریته ترکیبی ذرت بنام کانچان تلاقی داده شدند. در این تلاقی‌ها گیاه ذرت بعنوان والد پدری یا گرده دهنده استفاده شد. پس از گرده‌افشانی گلچه‌های اخته شده گیاه گندم با گرده تازهٔ ذرت، بمدت ۳ روز تیمار هورمونی روی خوشه های تلاقی داده شده اعمال گردید. به این ترتیب که در روز اول و دوم پس از گرده افشانی محلول ۷۵ قسمت در میلیون 2-4-D و در روز سوم پس از گرده‌افشانی محلول ۳۰۰ قسمت در میلیون اسید جیبرلیک روی خوشه‌ها اسپری گردید. پس از ١٤ روز از تاریخ گرده‌افشانی خوشه‌های تلاقی داده شده جمع‌آوری و برای وجود جنین مورد بررسی قرار گرفتند. عکس‌العمل ژنوتیپ‌های مورد بررسی گندم برای جنین‌زایی متفاوت بود. بهترین ژنوتیپ در این رابطه W_1 با ۱۲/۸٪ جنین‌زایی بود در حالیکه ضعیف‌ترین ژنوتیپ W_2 بود که تنها ۲/۵٪ از بذورتشکیل شده در خوشه‌های تلاقی داده شدهٔ آن، حاوی جنین بودند. میانگین جنین‌زایی ژنوتیپ‌های گندم W_2، W_4 و W_5 به طور معنی‌داری از میانگین ژنوتیپ‌های W_1 وW_3 کمتر بود. بررسی و اندازه‌گیری لوله گرده ذرت در۳۰ دقیقه پس از گرده‌افشانی در دو ژنوتیپ W_1 و W_5 نشان داد که سرعت رشد لوله گردهٔ ذرت در ژنوتیپ W_1 به طور معنی‌داری از ژنوتیپ W_5 بیشتر بوده است. جنین‌زایی ژنوتیپ W_1 نیز از جنین‌زایی ژنوتیپW_5 بیشتر بود. بنظر میرسد که جنین‌زایی کمتر در بعضی ژنوتیپ‌های گندم در تلاقی‌های گندم با ذرت بدلیل رشد آهسته و بطئی لوله گرده در آنها باشد که این خود احتمال دارد ناشی از وجود یک سیستم تلاقی‌پذیری ضعیف متفاوت با سیستم ژنهای Kr باشد.

واژه‌های کلیدی: حذف کروموزوم، تلاقی‌های دور، هاپلوئیدی، ذرت، گندم

مقدمه

بهنژادی از طریق گیاهان هاپلوئید فصل جدیدی در برنامه‌های اصلاحی است که بدلیل تولید لاین‌های کاملا خالص از نسل F_1 یک تلاقی خاص در طی یک مدت بسیار کوتاه در مقایسه با روشهای سنتی دارای پتانسیل استفاده در برنامه‌های به نژادی گندم است. این کار با تولید گیاه هاپلوئید و سپس بدست آوردن لاینهای کاملا خالص دبل هاپلوئید از طریق دو برابر کردن تعداد کروموزومهای آنها میسر است. برای اینکه یک سیستم تولید گیاهان دبل هاپلوئید (DH) به صورت موفق در یک برنامه بهنژادی بکار رود بایستی شرایط ذیل را داشته باشد

مکاتبه کننده: گودرز نجفیان

تا در مقایسه با روشهای به نژادی سنتی مقرون به صرفه باشد (۲۲).

الف) تولید آسان تعداد زیادی گیاه هاپلوئید دوبل شده از تمامی ژنوتیپ های برنامه بهنژادی

ب) لاینهایDH بایستی ازلحاظژنتیکینرمال و پایدار باشند.

ج) تولید لاینهای دبل هاپلوئید بایستی شامل نمونهای تصادفی از گامتهای والدینی باشد.

تولید گیاهان هاپلوئید گندم از دیرباز با روشهایی نظیر کشت بساک، دانه گرده و حتی کشت تخمدان و تخمک میسر بوده است و هنوز مورد استفاده است اما وجود مشکلاتی نظیر تولید گیاهان آلبینو، وابستگی زیاد به ژنوتیپ باعث شده تا روشهای دیگری مورد جستجو و بررسی قرار گیرند. در این رابطه فرآیند حذف کروموزومی که در برخی از تلاقیهای دور منجر به تولید جنین هاپلوئید با کروموزومهای پایه مادری میگردد، روش مناسبی تشخیص داده شده است. ابتدا در سال ۱۹۷۰ کاشا و کائو با تلاقی جو معمولی *Hordeum vulgare* با جو وحشی *H. bulbosum* موفق شدند جنینهای هاپلوئید از جو معمولی را بدست آورند و با کشت آنها گیاه هاپلوئید تولید کنند. در سال ۱۹۷۵ بارکلی این تکنیک را در مورد گندم اجرا کرد و با تلاقی گندم با جو وحشی توانست گیاه هاپلوئید گندم تولید کند. اما بزرگترین عیب این روش نیز وابستگی زیاد آن به ژنوتیپ بود طوریکه در برخی ژنوتیپهای گندم عکس العمل به صفر رسیده و جنینی بدست نمیآید. علت این وابستگی وجود یک سیستم کنترل کننده تلاقی پذیری[1] بود که شامل وجود دو ژن Kr_1 و Kr_2 است. در این سیستم در صورت وجود دو ژن مذکور در حالت غالب ژنوتیپ دارنده آنها قابلیت تلاقی موفق با جو وحشی را از دست داده و یا درصد بسیار ناچیزی جنین تولید می کند.

در سال ۱۹۸۴ زنکتیلرو نیچ گزارش کردند که تلاقی گندم با ذرت منجر به تشکیل جنین میشود و در نهایت طی سالهای ۱۹۸۶ و ۱۹۸۸ لاوری و بینت توانستند از تلاقیهای گندم با ذرت جنین هاپلوئید و متعاقب آن گیاه هاپلوئید گندم بدست آورند. این روش به نظر میرسید که بتواند سه شرط ذکر شده در بالا را بر آورده سازد و در ضمن فرآیند حذف کروموزوم در این روش بسیار سریعتر از روش استفاده از جو وحشی است. در سیستمهای تلاقی گندم با جو وحشی و ذرت، جنین و بذری که تشکیل میشود اگر چنانچه روی گیاه مادری به حال خود رها شوند پس از ۱۸-۱۶ روز تغییر رنگ داده و از بین میروند که یکی از دلایل آن عدم وجود اندوسپرم نرمال در این بذرها ذکر شده است. برای جلوگیری از سقط جنین تشکیل شده لازم است که پس از ۱۶-۱۴ روز از تاریخ گرده افشانی بذور تشکیل شده برای وجود جنین مورد بررسی قرار گرفته و در صورت وجود، جنینهای تشکیل شده در محیط عاری از میکرب روی محیط غذایی مصنوعی قرار داده شوند تا رشد کرده و گیاهچه تولید کنند. تاکنون مطالعات زیادی در زمینه تلاقیهای ذرت × گندم صورت گرفته که برخی از آنها اثرات ژنوتیپی برای گیاه گندم روی درصد جنین زایی گزارشکردهاند (۸، ۱۹، ۲۰، ۲۴). برخی از این مطالعات غیر مؤثر بودن و یا کم تأثیر بودن ژنهای تلاقیپذیری Kr را در تلاقیهای گندم با ذرت ذکرکردهاند (۱۲، ۱۴). در مورد مطالعاتی که در ایران در این رابطه انجام گرفتهاند، میتوان به منابع شماره ۱ تا ۳ اشاره نمود. در این تحقیقات از روش تلاقی گندم با ذرت برای تولید گیاهان هاپلوئید گندم و دو برابر کردن تعداد کروموزومهای آنها برای اهداف خاص دیگری از جمله بررسی مقاومت به زنگ زرد و کیفیت نانوایی لاینهای دبل هاپلوئید استفاده شده است و مطالعات انجام شده در جهت بررسی اثرات ژنتیکی گیاه گندم در موفقیت تکنیک نبوده است. در کل در مورد تلاقیهای گندم با ذرت هنوز مشخص نگردیده است که اثرات ژنوتیپی مورد اشاره در برخی گزارشها نتیجه یک سیستم تلاقیپذیری باشند. هدف از این تحقیق نیز تولید گیاهان هاپلوئید از گندمهای هگزاپلوئید هند در تلاقی با ذرت و مطالعه اثرات ژنوتیپی والد مادری یعنی گیاه گندم روی برخی از جوانب این تلاقیها از جمله سرعت رشد لوله گرده ذرت در داخل کلاله گل گندم است.

مواد و روشها

مواد گیاهی

در این تحقیق پنج هیبرید F_1 گندم هگزاپلوئید در نظر گرفته شده و بعنوان والد مادری برای انجام تلاقیهای با ذرت

1-Crossability

مورد استفاده قرار گرفتند. این گندمهای هیبرید در سال زراعی قبل از طریق تلاقی والدهای مختلف گندم ایجاد شده بودند و برای سهولت در اینجا با کدهای W_1 تا W_5 مشخص شده اند (جدول ۱). والد پدری در تلاقی‌ها یک واریته ترکیبی ذرت بنام کانچان[1] بود. این واریته ترکیبی به صورت تصادفی انتخاب گردید و قبلا برای این منظور مورد استفاده قرار نگرفته بود و لذا احتمال موفقیت تلاقی آن با گندم برای این منظور نیز نا مشخص بود.

جدول ۱- شجرهٔ ژنوتیپ‌های پنجگانهٔ استفاده شده در تلاقی‌های ذرت × گندم در این تحقیق

کد	شجره
W_1	UP 2003 × UP 262
W_2	UP 2003 × HP 1731
W_3	UP 2003 × Raj 3991
W_4	UP 262 × UP 2425
W_5	Raj 3991 × UP 2425

کشت مواد گیاهی و انجام تلاقی های ذرت × گندم

ژنوتیپ‌های گندم (W_1-W_5) در شرایط مزرعه در دو تاریخ کاشت به فاصله ۱۵ روز کشت شدند. گیاهان ذرت در گلدانهای بزرگ در دو تاریخ کاشت در داخل گلخانه تحت شرایط گرما و نور طبیعی کشت گردیدند. علاوه بر گلخانه ۸ تاریخ کاشت ذرت در شرایط مزرعه با فواصل یک هفته‌ای برای حصول اطمینان از وجود گرده تازه ذرت در زمان گلدهی گندمها کاشت گردیدند. دو روز قبل از گرده‌افشانی خوشه‌های گندم از ژنوتیپ‌های پنجگانه به صورت دستی و معمول با استفاده از روش قطع گلوم اخته گردیده و پوشانده شدند. پس از دو روز گرده تازه ذرت که از گیاهان داخل گلخانه جمع‌آوری شده بود برای گرده افشانی خوشه‌های اخته شده مورد استفاده قرار گرفت. برای حصول اطمینان از زنده بودن دانه‌های گرده، تیمار محلول یدید پتاسیم روی آنها صورت گرفت (با تیمار این محلول دانه‌های گرده زنده ظاهر تیره به خود گرفته و دانه‌های گردهٔ غیر فعال ظاهر روشن از خود نشان می‌دهند). خوشه‌های گرده افشانی شده برای مدت دو روز پس از گرده افشانی با محلول ۷۵ قسمت در میلیون توفوردی و در روز سوم پس از گرده‌افشانی با محلول ۳۰۰ قسمت در میلیون اسید جیبرلیک اسپری شدند. اسپری کردن هورمون در هر روز تنها شامل یک نوبت در غروب و به صورت یک اسپری در هر یک از دو طرف هر خوشه بود.

نجات جنین و بازیابی گیاهان هاپلوئید

پس از ۱۶-۱۴ روز از تاریخ گرده افشانی خوشه‌های گرده‌افشانی شده جمع آوری و بذورتشکیل شده در آنها شمارش گردیده و برای وجود جنین در داخل هود کشت بافت مورد بررسی قرار گرفتند. جنین‌های بدست آمده روی محیط کشت MS با نصف غلظت معمول (از لحاظ مواد معدنی) و با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسید نیکوتینیک، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تیامین، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر پیریدوکسین ، ۲ میلی‌گرم در لیتر گلایسین و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز در شرایط عاری از میکرب کشت گردیدند. جنین‌های کشت داده شده برای ۵ تا ۶ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شده و سپس به اتاق رشد با دمای تقریبا ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. زمانیکه گیاهچه‌های با طول ۵ تا ۱۵ سانتی‌متر بدست آمدند، در یک خزانهٔ تابستانی در داخل گلخانه برای بازیابی گیاهان هاپلوئید به گلدان منتقل شدند.

تأیید هاپلوئیدی

برای تأیید هاپلوئیدی گیاهچه‌های بدست آمده از طریق شمارش کروموزومی، قسمت نوک ریشه آنها در محلول تثبیت کننده ثابت شده و نمونه‌های میکروسکوپی به روش اسکواش طبق روش لاو و لاو (۱۹۷۵) تهیه گردیدند. رنگ آمیزی با استفاده از استوکارمین ۲٪ صورت گرفت و اسلایدهای تهیه شده در زیر میکرسکوپ نوری برای مطالعه سلولهای در حال تقسیم متافازی مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت وجود، تعداد کروموزومهای آنها بدقت شمارش گردیدند.

مطالعات رشد لوله گرده

رشد لوله گردهٔ ذرت در داخل کلاله گل گندم با استفاده از خوشه‌هایی که از تلاقی‌های انجام شده روی ژنوتیپ‌های W_1 و W_5 در فواصل زمانی ۳۰ دقیقه، ۶۰ دقیقه و ۵ ساعت بعد از گرده افشانی فیکس شده بودند و طبق روش دی سوزا (۱۹۷۲)

1- Kanchan

رنگ آمیزی شدند، مورد مطالعه قرار گرفت. برای اینکار مادگی‌های گندم که در محلول الکل اتیلیک – اسید لاکتیک به نسبت ۲ به ۱ فیکس شده بودند، ابتدا با اسید کلریدریک ۱ نرمال بمدت ۱۰ دقیقه تیمار شده و بمدت ۲/۵ –۱ دقیقه با محلول ۱٪ Cotton blue (که حاوی اسید لاکتیک، فنول، گلیسرول و آب مقطر به نسبت‌های ۱:۱:۱:۱بود)مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفتند و سپس با محلول ۴۰٪ اسید لاکتیک، اسید ارتو فسفریک و آب مقطر به نسبت ۱:۱:۱ به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه رنگبری گردیدند. سپس کلالهٔ این مادگی‌ها روی لام جدا شده و در یک قطره اسید لاکتیک قرار داده شده و پس از قرار دادن یک لامل روی آنها در زیر میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. طول لوله گرده با استفاده از یک میکرومتر چشمی اندازه‌گیری شد. این کار تنها در مورد خوشه‌هایی که ۳۰ دقیقه بعد از گرده افشانی فیکس شده بودند ممکن بود زیرا لولهٔ گرده در این فاصله هنوز وارد محور اصلی کلالهٔ گل گندم نشده است.

روشهای آماری

از آنجایی که پنج ژنوتیپ گندم (W_1-W_5) مورد استفاده در این تحقیق در تعداد دفعات نامساوی با والد ذرت تلاقی داده شدند، تجزیهٔ واریانس بین این ژنوتیپ‌ها با استفاده از مدل طرح کاملا تصادفی با تعداد تکرارهای نا مساوی مطابق گومز و گومز (۱۹۸۴) صورت گرفت. صفات مورد ارزیابی عبارت بودند از درصد تولید بذر (درصد گلچه‌هایی که بذر تولید کرده بودند)، درصد تشکیل جنین (تعداد بذرهای حاوی جنین تقسیم بر تعداد کل بذرهای بدست آمده ضرب در ۱۰۰)، درصد جوانه زنی جنین‌ها (تعداد جنین‌های جوانه زده تقسیم بر تعداد جنین‌های کشت شده ضرب در ۱۰۰) و درصد بازیابی گیاهچه (تعداد گیاهچه‌های بدست آمده تقسیم بر تعداد جنین‌های کشت شده ضرب در ۱۰۰). در مورد دو صفت اخیر تنها سه ژنوتیپ W_1، W_3 و W_5 مورد استفاده قرار گرفتند زیر تعداد جنین‌های تشکیل شده در دو ژنوتیپ دیگر قابل توجه نبود. داده‌ها با استفاده از تبدیل‌های $\text{Arc Sin}\,(x)^{1/2}$ و $(x+0.5)^{1/2}$ مطابق با وضعیت آنها برای هر صفت مورد تبدیل واقع شدند. برای مقایسهٔ میانگین طول لولهٔ گرده در ژنوتیپ‌های W_1 و W_5 آزمون t - استیودنت طبق استیل و توری (۱۹۶۰) استفاده شد.

نتایج و بحث

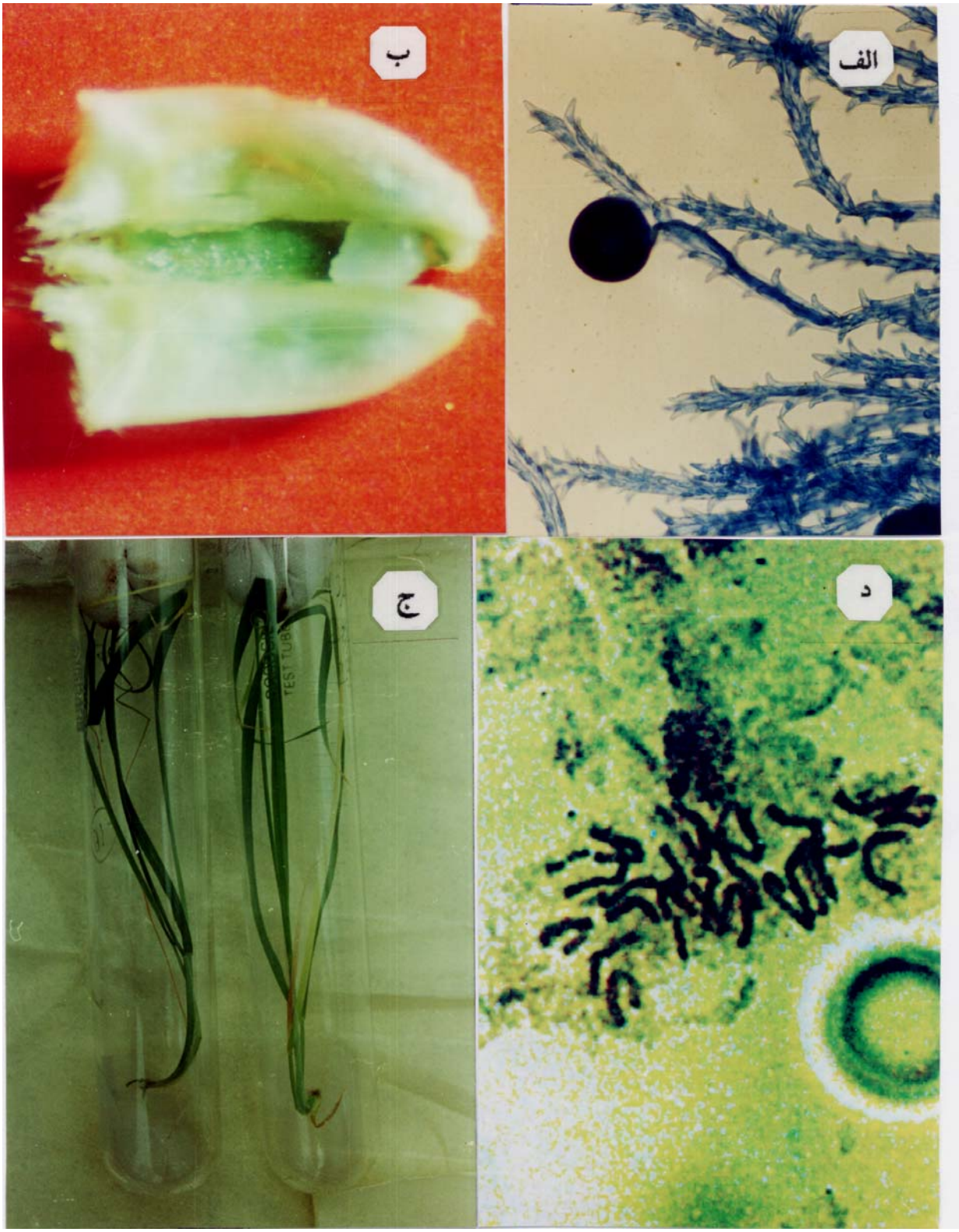
درصد تولید بذر

در نتیجه تلاقی‌های ذرت × گندم ساختارهای شبه بذر که در اینجا بذر نامیده می‌شوند تشکیل شدند که برخی از آنها حاوی جنین بودند (شکل ۱-ب). برای درصد تولید بذر تجزیهٔ واریانس F معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های پنجگانه W_1-W_5 نشان داد (جدول۲). مقایسهٔ میانگین‌های این ژنوتیپها برای درصد تولید بذر نشان داد که ژنوتیپ‌های W_1-W_4 میانگینهای مشابه داشته و در یک گروه قرار گرفتند درحالیکه W_5 به تنهایی با میانگین کمتر در گروه دوم قرار گرفت (جدول ۳). از آنجایی که تنها W_5 تفاوت معنی‌دار با دیگر ژنوتیپ‌ها داشت اینگونه نتیجه‌گیری شد که این امر ممکن است در اثر دریافت هورمون کمتر بوده باشد زیرا درصد تولید بذر در تلاقی‌های ذرت × گندم کاملا تحت تأثیر هورمون است و در آزمایش دیگری نشان داده شده است که گلچه‌هایی که هورمون دریافت کرده بودند بدون توجه به گرده افشانی بذر تولید کردند در حالیکه آن دسته از گلچه‌هایی که هورمون دریافت نکرده بودند مادگی به صورت چروکیده باقی مانده و در واقع بذر تولید نگردید (۱۷). بنابراین درصد تولید بذر کمتر مربوط به تلاقی‌های انجام شده روی ژنوتیپ W_5 در اثر فاکتورهایی بوجود آمده که دریافت هورمون را تحت تأثیر قرار داده‌اند و در این رابطه میتوان به مورفولوژی خوشه‌های W_5 اشاره کرد که باریکتر بوده و گلومها بسته‌تر بودند و لذا این امر احتمالا باعث دریافت هورمون کمتری در روش اسپری کردن شده است. اختلاف غیر معنی دار بین چهار ژنوتیپ دیگر این نتیجه‌گیری را تأیید کرد که درصد تولید بذر حداقل مستقیما توسط ژنوتیپ گیاه گندم تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد.

جدول ۲- نتیجهٔ تجزیهٔ واریانس برای دو صفت درصد تولید بذر و درصد تولید جنین در میان ژنوتیپ های پنجگانهٔ مورد بررسی.

منابع تغییر	درجات آزادی	درصد تولید بذر		درصد تولید جنین	
		SS	MS	SS	MS
ژنوتیپ ها	۴	۱/۴۸	۰/۳۷**	۱۳/۵۵	۳/۳۸۷۵**
اشتباه	۱۸	۱/۲۸	./.۷۱	۷/۸۸	./۴۳۸
جمع	۲۲	۲/۷۶	-		
ضریب تغییرات		٪۲/۸		٪۲۳/۲	

** : معنی دار در سطح احتمال ۱٪



شکل ۱- الف) میزان رشد لوله گرده ذرت در داخل کلاله گل گندم در خلال ۳۰ دقیقه بعد از گرده افشانی ب) نمونهٔ بذر حاصله از تلاقی های ذرت × گندم که حاوی جنین است ج) گیاهچه های بازیابی شده از نجات جنین های حاصله از تلاقی های ذرت × گندم د) تعداد کروموزوم های یک گیاهچهٔ هاپلوئید حاصله از تلاقی های ذرت × گندم

جدول ۳- عکس العمل ژنوتیپهای مورد بررسی گندم در تلاقی با ذرت برای صفات مورد مطالعه.

ژنوتیپ‌های گندم	گلچه‌های گرده‌افشانی شده	بذرهای تولید شده	جنین‌های تولید شده	جنین‌های کشت شده	جنین‌های جوانه زده	گیاهچه‌های بازیابی شده
W1	۳۷۷۲	۳۴۲۶ a(٪۹۰/۸)	۴۳۹ a(٪۱۲/۸)	۳۰۱	۱۹۱ a(٪۶۳/۵)	۸۶ a(٪۲۸/۶)
W2	۱۰۹۱	۹۷۳ a(٪۸۹/۱)	۲۴ c(٪۲/۵)	-	-	-
W3	۷۲۶	۶۴۱ a(٪۸۸/۳)	۶۲ ab(٪۹/۷)	۳۶	۲۲ a(٪۶۱/۱)	۱۱ a(٪۳۰/۶)
W4	۴۴۶	۴۳۴ a(٪۹۷/۳)	۱۵ bc(٪۳/۴)	-	-	-
W5	۱۲۵۵	۹۹۰ b(٪۷۸/۹)	۵۳ bc(٪۵/۳)	۲۹	۱۴ a(٪۴۸/۳)	۷ a(٪۲۴/۱)
جمع	۷۲۹۰	۶۴۶۴	۵۹۳	۳۶۶	۲۲۷	۱۰۴
میانگین	-	۱۲۹۲/۸ (٪۸۸/۷)	۱۱۸/۶ (٪۹/۲)	-	۷۵/۷ (٪۶۲/۰)	۳۴/۷ (٪۲۸/۴)

میانگین های دارای حرف یا حروف یکسان در داخل هر ستون نشاندهندهٔ عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال حداقل ۵٪ هستند.

درصد تولید جنین

مطابق جدول ۲ یک مقدار F بسیار معنی دار برای اختلاف بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ درصد جنین‌زایی وجود داشت که نشان می‌دهد حداقل ۲ ژنوتیپ دارای درصد تولید جنین متفاوت از هم بوده‌اند. برای این صفت مقایسه میانگین‌ها نشان داد که W_1 با میانگین ۱۲/۸٪ ژنوتیپ برتر بود و با ژنوتیپ W_3 (۹/۷٪) در یک گروه برتر قرار گرفتند. ژنوتیپ W_2 با ۲/۵٪ تولید جنین ضعیف‌ترین ژنوتیپ بود (جدول ۳).

دامنه درصد تولید جنین در ژنوتیپ‌های پنجگانه در تکرارهای متفاوت به صورت W_1 از ۵/۱ تا ۱۷/۵٪ ، W_2 از ۱/۲ تا ۴/۱٪ ، W_3 از ۶/۲ تا ۱۲/۶٪ ، W_4 از ۰ تا ۹/۷٪ و W_5 از ۲/۲ تا ۹٪ بود. اختلاف بسیار معنی‌دار برای درصد تولید جنین در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان داد که اختلاف در عکس‌العمل آنها برای این صفت در اثر فاکتورهای تصادفی نبوده و نشأت گرفته از خصوصیات ذاتی هر ژنوتیپ است. از آنجائیکه مطالعات مربوط به رشد لولهٔ گرده نیز یک اختلاف معنی‌دار بین طول لوله گردهٔ ذرت در کلالهٔ گل ژنوتیپ های W_1 و W_5 در فاصلهٔ ۳۰ دقیقه بعد از گرده افشانی نشان داد، اینگونه استنباط می‌گردد که ممکن است در برخی از ژنوتیپ‌های هگزاپلوئید گندم سیستم یا سیستم های دیگری برای تلاقی پذیری وجود داشته که متفاوت از سیستم ژنهای Kr (سیستم تلاقی‌پذیری مؤثر در تلاقی گندم با جو وحشی*H. bulbosum*) هستند ولی همانند آن آنچنان قوی نیستند که کاملا رشد لوله گردهٔ ذرت را در داخل کلاله گل آن ژنوتیپ‌های گندم محدود کنند. اما سرعت رشد لوله گرده را کاهش داده و در نتیجه درصد تولید جنین را نیز کاهش می دهند. در این تحقیق میانگین تولید جنین ژنوتیپ W_1 ۱۲/۸٪ بود در حالیکه W_5 ۵/۳٪ جنین تولید نمود و این امر با طول بیشتر لوله گردهٔ ذرت (رشد سریع‌تر) در تلاقی‌های انجام شده روی ژنوتیپ W_1 نسبت به W_5 در یک زمان معین همراه بود. تنوع ژنوتیپی گندم‌های هگزاپلوئید برای درصد تولید جنین در تلاقی‌های ذرت × گندم توسط دیگر محققین نیز گزارش شده است (۶، ۱۲ ، ۱۴، ۱۸، ۲۰، ۲۴، ۲۵).

درصد جوانه‌زنی جنین‌ها

از ۳۶۶ جنین کشت داده شده ۲۲۷ مورد(۶۲٪) روی محیط کشت جوانه زدند و توسعه ساقه و ریشه را آغاز نمودند (جدول ۳). سه ژنوتیپ گندم W_1 ، W_3 و W_5 در تولید جنین بیشتر از ژنوتیپ‌های W_2 و W_4 موفق بودند و بنابراین برای مطالعهٔ اثرات ژنوتیپی گیاه گندم روی درصد جوانه‌زنی جنین و درصد بازیابی گیاهچه مورد استفاده قرارگرفتند. برای درصد جوانه زنی

جنین اختلاف معنی داری بین سه ژنوتیپ مورد بررسی مشاهده نشد که بیانگر اینست احتمالا جوانه زنی جنین‌های تولید شده در تلاقی‌های ذرت×گندم مستقیما توسط ژنوتیپ گیاه مادر (گندم) تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد. اما میانگین‌های این سه ژنوتیپ که در جدول ۳ نشان داده شده‌اند مقدار کوچکتری برای ژنوتیپ W_5 نسبت به دو ژنوتیپ دیگر نشان می‌دهند. این ژنوتیپ همانطوریکه در قبل مورد بحث قرار گرفت درصد جنین‌زایی کمتری هم نسبت به ژنوتیپ‌های W_1 و W_3 نشان داد (جدول ۳). بنظر می‌رسد که میانگین W_5 اگر چه دارای اختلاف معنی‌داری تحت شرایط این تحقیق با دیگر ژنوتیپ‌ها نشان نداد ولی به طور قابل توجه نسبت به W_1 و W_3 کوچکتر است. این امر می‌تواند در رابطه با سایر خصوصیات این ژنوتیپ مورد تفسیر قرار گیرد. در مورد ژنوتیپ W_5 برای صفت درصد تولید بذر اینگونه نتیجه‌گیری شد که احتمالا مورفولوژی خوشه‌های آن در دریافت میزان هورمون مؤثر بوده و لذا این امر باعث درصد تولید بذر کمتر شده و توسعه جنین‌های تشکیل شده را تحت تأثیر قرار داده است. اگر هورمون به هر دلیلی به اندازهٔ کافی به گیاهان گندم تلاقی داده شده با گردهٔ ذرت نرسد جنین‌های هاپلوئید ممکن است به طور کامل و کارا تکامل نیافته و این امر میتواند جوانه‌زنی آنها را تحت تأثیر قرار دهد. تأثیر آشکار غلظت هورمون بر روی تکامل و اندازهٔ جنین‌های هاپلوئید در تلاقی‌های گندم × ذرت توسط دیگران مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است (۲۶، ۲۷). برخی گزارشها مانند چن و همکاران (۱۹۹۶)، بیچ و همکاران (۱۹۹۸)و سوئناگا و ناکاجی‌ما (۱۹۸۹) به تأثیر اندازهٔ جنین روی جوانه‌زنی آن اشاره کرده‌اند و ناکارآمدی جنین‌های کوچک را در جوانه‌زنی گزارش کرده‌اند. در مورد درصد کمتر جوانه‌زنی جنین مربوط به ژنوتیپ W_5 در این تحقیق نیز می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در اثر عدم دریافت هورمون کافی توسط خوشه‌های این ژنوتیپ درصد تولید بذر و اندازهٔ جنین‌های تشکیل شده مورد تأثیر قرار گرفته است که در نتیجهٔ آن درصد جوانه‌زنی این جنین‌ها نیز تحت تأثیر قرار گرفته است.

درصد بازیابی گیاهچه

از کل ۲۲۷ جنین جوانه زده تنها ۱۰۴ مورد گیاهچه‌هایی با طول ۱۵-۵ سانتی‌متر تولید کردند که برای بازیابی مناسب بودند (شکل ۱- ج). بقیهٔ این جنین‌ها رشد بطئی و نمو آهسته گیاهچه‌های ناکامل را نشان دادند که در نهایت رشد آنها متوقف گردید. در مورد درصد بازیابی گیاهچه نیز اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی مشاهده نشد. این بدین معنی است که برای درصد بازیابی گیاهچه ژنوتیپ گیاه گندم تولید کننده جنین مستقیما مؤثر نیست. برخی از جنین‌ها جوانه زده ولی به گیاهچه‌های کامل تکامل نیافتند. در این مورد فاکتورهای دیگری ممکن است دخالت داشته باشند.

شمارش کروموزومی سلولهای در حال تقسیم میتوزی نوک ریشهٔ گیاهچه‌های بدست آمده هاپلوئیدی آنها را تأیید نمود که همواره در سلولهای با قابلیت شمارش کروموزومی، ۲۱کروموزوم مشاهده گردید که نصف ریختهٔ ارثی گندم هگزاپلوئید است (شکل ۱- د). متوسط درصد بازیابی گیاهچه درژنوتیپ‌هایW_1، W_3 و W_5 ۲۸/۴٪ بود (جدول ۳). بنظر می‌رسد زمانی که یک جنین جوانه زد برخی فاکتورهای دیگر در رشد و تکامل آن به گیاهچه مؤثرند تا تأثیر گیاه مادری که جنین روی آن تولید شده است. در این رابطه شرایط محیط غذایی و اتاق رشد کشت‌ها (دما و نور) می‌تواند ذکر شود. یکی از فاکتورهایی که تکامل و نمو جنین‌ها را به گیاهچه محدود می‌کند عدم وجود یکی از قطب‌های تولید کنندهٔ ریشه چه یا ساقه چه در آنها بود. در این تحقیق برخی از جنین‌ها تنها یک ساقهٔ اولیه کوچک بدون ریشه تولید نمودند. ممکن است آسیب رسیدن به جنین در هنگام انتقال به محیط کشت از علل این امر باشد. در هر حال تعدادی از جنین‌ها به این دلایل قادر به رشدو نمو ایده آل نیستند. از آنجایی که محیط کشت MS بدون اضافه کردن هورمون‌های رشد استفاده شد، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اینگونه محیط کشت تنها رشد و توسعه جنین‌های کامل را فراهم می‌کند و جنین‌هایی که در یکی از قطب‌های دو گانه انگیزش ریشه یا ساقه ناکارآمد باشند نمیتوانند توسط محیط کشتی که تنظیم کننده‌های رشد به آن اضافه نشده بخوبی پشتیبانی گردند. احتمالا انتقال جنین‌هایی که تنها ساقه تولید کرده‌اند به محیط کشت با ترکیبات هورمونی مناسب می‌تواند یک راه برای ریشه دار کردن آنها باشد.

مطالعات رشد لوله گرده

بررسی‌های رشد لوله گرده که تنها درمورد تلاقی‌های انجام شده روی ژنوتیپ‌های W_1 و W_5 انجام شد نشان داد که در خلال ۳۰ دقیقه بعد از گرده افشانی، لوله‌های گردهٔ ذرت وارد

شاخه‌های جانبی کلالهٔ مادگی گل گندم شده‌اند (شکل ۱-الف) و یک ساعت بعد از گرده افشانی طویل‌ترین لوله‌های گرده ذرت وارد محور اصلی مادگی شده‌اند. برای اندازه‌گیری طول لولهٔ گرده تنها نمونه‌هایی که ۳۰ دقیقه بعد از گرده افشانی فیکس شده بودند بکار رفتند و در مورد خوشه‌هایی که بعد از ۱ و ۵ ساعت از زمان گرده افشانی ثابت شده بودند، لولهٔ گرده رشد زیادی نموده و وارد محورهای اصلی مادگی (خامه) و تخمدان گل گندم شده بودند و لذا اندازه گیری آنها مقدور نبود.

نتایج آزمون t – استیودنت برای میانگین طول لولهٔ گرده ذرت (۳۰ دقیقه بعد از گرده افشانی) اختلاف معنی‌داری را بین تلاقی‌های انجام شده روی ژنوتیپ‌های W_1 و W_5 نشان داد که مشخص ساخت سرعت رشد لولهٔ گردهٔ ذرت در کلاله گل این ژنوتیپ‌ها با هم مساوی نبوده است. در این رابطه میانگین طول لولهٔ گرده در تلاقی‌های انجام شده روی W_1 بزرگتر (رشد سریعتر) از تلاقی‌های انجام شده روی ژنوتیپ W_5 بود (جدول ۴). این امر با عملکرد این ژنوتیپها برای درصد تولید جنین موافق بود که نشان می‌دهد ژنوتیپ W_5 عامل رشد آهسته‌تر لولهٔ گرده ذرت در داخل کلاله گلهای آن و به طبع آن درصد تولید جنین کمتر است. این نتیجه‌گیری در تأیید تفسیر قسمت‌های قبل مبنی بر احتمال وجود برخی سیستم‌های تلاقی‌پذیری ضعیف در مورد تلاقی‌های ذرت × گندم است. با همهٔ این تفاسیر تلاقی‌های ذرت × گندم آنقدر کارا هستند که بتوان به صورت عملی و کاربردی از آنها در برنامه‌های بهنژادی برای تولید عمدهٔ گیاهان هاپلوئید گندم اقدام نمود.

جدول ۴- آزمون t برای طول لولهٔ گردهٔ ذرت در تلاقی های انجام شده روی ژنوتیپ های W_1 و W_5 .

	تلاقی های W_1	تلاقی‌های W_5
میانگین طول لولهٔ گرده (میکرون)	۲۵۹/۱۵۶	۲۱۵/۱۹۲
واریانس	۵۸۰۳/۹۹۶	۱۶۲۹/۳۱۶
انحراف معیار	۷۶/۱۸۴	۵۴/۰۰۳
مقدار t برای اختلاف میانگین ها	۲/۸۲۴۸	
درجه آزادی	۶۳	
مقدار α	۰/۰۰۶۲	

سپاسگزاری

بدینوسیله از سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ایران بخاطر فراهم آوردن امکان ادامهٔ تحصیل در دورهٔ دکتری برای نگارندهٔ اول و انجام این تحقیق قدردانی می‌گردد.

مراجع مورد استفاده REFERENCES

۱. بختیار، ف.، ر. بزرگی پور و ک. نظری. ۱۳۷۷. استفاده از روش به نژادی هاپلوئیدی در گندم به منظور ایجاد ارقام پرمحصول و مقاوم به زنگ زرد، پنجمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران، کرج ، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، شهریور ۱۳۷۷.

۲. بختیار، ف. و ر. بزرگی پور. ۱۳۷۹. بررسی کیفیت نانوایی لاینهای دابلد هاپلوئید گندم با استفاده از روش الکتروفورز پروتئین های ذخیره ای بذر، مجله علوم کشاورزی ایران ، جلد ۳۱ ، صفحات ۷۹۸-۷۸۵.

۳. بزرگی پور، ر. ۱۳۷۳. استفاده از روش هاپلوئیدی در غلات ، سومین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران، تبریز، ایران.

4.Barclay , I.R. 1975. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. *Nature* 256: 410-411.

5.Bitsch, C., S. Groger, & T. Lelley. 1998. Effect of parental genotypes on haploid embryo and plantlet formation in wheat × maize crosses. *Euphytica* 103: 319-323.

6.Chen, X.M., H.J. Xu, J.F. Zhou, J.X. Lin, & H.Z. Zhang. 1996. A study on the increasing frequencies of plant production during embryo culture in crosses between wheat and maize. *Scientia Agricultura Sinica* 29(4): 29-32.

7.D'Souza, L. 1972. Staining pollen tubes in styles of cereals with cotton blue: fixation by ethanol-lactic acid for enhanced differentiation. *Stain Tech.* 47: 107-108.

8.Giura, A. 1994. Preliminary results of wheat polyhaploid production using wheat × maize crosses. *Romanian Agricultural Research*. 1: 1-4.

9.Gomez, K.A. & A.A. Gomez. 1984. Statistical procedures for agricultural research, IInd edition, John Wiley and Sons Inc.

10.Kasha, K.J. & K. N. Kao . 1970. High frequency of haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) . Nature 225 : 874-875.
11. Laurie, D.A. & M.D. Bennett.1986. Wheat × maize hybridization . *Can. J. of Genet. Cytol.* 28(2) : 313-316.
12.Laurie, D.A. & M.D. Bennett. 1987. The effect of the crossability loci Kr_1 and Kr_2 on fertilization frequency in hexaploid wheat × maize crosses. *Theor. Appl. Genet.* 73(3): 403-409.
13.Laurie, D.A. & M.D. Bennett. 1988. The production of haploid wheat plants from wheat × maize crosses. *Theor. Appl. Genet.* 76(3): 393-397.
14.Lefebvre, D. & P. Devaux. 1996. Doubled haploids of wheat from wheat × maize crosses: genotypic influence, fertility and inheritance of the 1BL-IRS chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 93(8): 1267-1273.
15.Love, A. & D. Love. 1975. Plant chromosomes. J. Cramer, Germany, 184 p.
16.Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
17.Najafian, G. 2001. Production of haploids through wheat × maize crosses in Indian hexaploid wheats. Ph.D. Thesis , G. B. Pant University of Agriculture and Technology , Pantnagar , India.
18.Oury, F.X., M. Pichon, & M. Ronsset. 1993. A comparison of 2 haploidization methods in bread wheat: anther culture and interspecific hybridization with maize. *Agronomie* 13(2): 95-103.
19.Riera-Lizarazu, O. & A. Mujeeb-Kazi. 1993. Polyhaploid production in the Triticeae: Wheat × *Tripsacum* crosses. *Crop Sci.* 33: 973-976.
20.Sadasivaiah, R.S., B.R. Orshinsky, & G.C. Kozub. 1999. Production of wheat haploid using anther culture and wheat × maize hybridization techniques. *Cer. Res. Comm.* 27(1-2): 33-40.
21.Snape, J.W., E. Simpson, & B.B. Parker. 1986. Criteria for the selection and use of doubled haploid systems in cereal breeding programmes. In: Horn, W.; C.J. Jensen; W. Odenbach and O. Schieder eds. Genetic manipulation in plant breeding. Walter de Gruyter, Berlin. pp. 217-229.
22.Steel, R.G.D. & J.H. Torrie. 1960. Principles and procedures of statistics, McGraw-Hill Book Company, Inc.
23.Suenaga, K. & K. Nakajima. 1989. Efficient production of haploid wheat (*Triticum aestivum*) through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays*). *Plant Cell Rep.* 8: 263-266.
24.Suenaga, K., M. Tamaki, & K. Nakajima. 1991. Influence of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) genotypes on haploid wheat production in crosses between wheat and maize. *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour*. 6: 131-142.
25.Suenaga, K., A.R. Morshedi, & N.L. Darvey. 1997. Haploid production of Australian wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars through wheat × maize (*Zea mays* L.) crosses. *Aust. J. Agric. Res.* 48: 1207-1211.
26.Sun, J.S., T.G. Lu, & H.W. Xin. 1995. Induction of haploid durum wheat plants through pollination with maize pollen. *Acta Botanica Sinica* 37(6): 452-457.
27.Zhang, J., B. Friebe, W.J. Raupp, S.A. Harrison, & B.S. Gill. 1996. Wheat embryogenesis and haploid production in wheat × maize hybrids. *Euphytica* 90(3): 315-324.
28.Zenkteler, M. D. & W. Nitzsch 1984. Wide hybridization experiments in cereals. *Theor. Appl. Genet.* 68 : 311-315.

A Study of Hexaploid Wheat Genotypic Effects on Its Haploid Production thruogh Crossing with Maize

G. NAJAFIAN[1] AND T.B. SINGH[2]
1, Assistant Professor, Research, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran. 2, Professor, Faculty of Agriculture, G. B. Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar, India
Accepted July, 9. 2003

SUMMARY

Application of haploid plants in breeding programs can provide a considerable saving of time. This is possible by development of pure doubled haploid lines from haploid plants through doubling of their chromosome complement. In order to produce haploid plants from Indian hexaploid wheats through crossing with maize and also to study genotypic effects of wheat plants, five F_1 hybrids of wheat (W_1-W_5) which had been obtained from crossing of different hexaploid wheat varieties were crossed to a composite variety of maize named Kanchan. In these crosses maize plants were used as pollen parent. After pollination of emasculated wheat florets with maize pollen, for three days hormonal treatment was applied on crossed spikes. Through this operation 75 ppm solution of 2,4-D for two days and 300 ppm solution of Gibberellic acid in the 3rd day after pollination were sprayed on pollinated spikes. Fourteen days after pollination spikes were collected and searched for seed and embryo formation. Response of these wheat genotypes was different for embryo formation rate. The best genotype was W_1 with 12.8% embryo formation while the poorest genotype W_2 produced 2.5% embryo from total number of obtained seeds. The mean performances of wheat genotypes, W_2, W_4 and W_5 for embryo production rate were significantly lower than W_1 and W_3. The pollen tube growth measurements conducted on W_1 and W_5 crosses showed a significant difference in length of pollen tube, 30 minutes after pollination inside the stigma of these two wheat parents. W_1 possessed a higher mean of pollen tube length than W_5, which was in agreement with their embryo production percentage. It was concluded that the lower speed growth of maize pollen tube inside the stigma of some wheat genotypes, followed by lower performance in embryo production may be due to some weak systems of crossability, different from Kr genes system which need to be further studied.

Key words: Chromosome elimination, Wide cross, Haploidy maize, Wheat