تاثیر رقم و تراکم کشت کوتیلدون بر باززایی نوساقه در کلزا (*Brassica napus* L.)

Effect of Cultivar and Density of Cultured Cotyledons on Shoot Regeneration in Rapeseed (*Brassica napus* L.)

دانیال کهریزی[۱*]، علی هاتف سلمانیان[۲] و علی‌رضا زبرجدی[۱]

چکیده

در این پژوهش اثر دو رقم تجاری کلزا (PF-7045-91 و SLM-046)، تراکم ریزنمونه (در دو سطح ۱۵ و ۳۰ کوتیلدون در یک پتری‌دیش به قطر ۱۰ سانتی‌متر) و اثر متقابل آن‌ها روی باززایی نوساقه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین رقم‌های کلزا از نظر باززایی نوساقه اختلاف معنی‌دار وجود دارد، به‌طوری‌که رقم PF-7045-91 (با ۷۴٪ باززایی) برتر از رقم SLM-046 (با ۵۶٪ باززایی) شناخته شد. بین دو تراکم کشت شده نیز از این لحاظ اختلاف معنی‌دار وجود داشت، به‌طوری‌که تراکم ۱۵ ریزنمونه (با ۷۹٪ باززایی) برتری معنی‌داری نسبت به تراکم ۳۰ ریزنمونه (با ۵۱٪ باززایی) نشان داد. هم‌چنین نتایج آزمون تجزیه واریانس حاکی از عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین اثر متقابل رقم در تراکم کشت بود.

واژه‌های کلیدی: کلزا ، کوتیلدون، باززایی

۱. استادیاران گروه پژوهشی بیوتکنولوژی مقاومت به خشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۲. دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری، تهران

*: نویسنده مسوول

مقدمه

به‌کارگیری روشهای مهندسی ژنتیک نقش مهمی در اصلاح گیاهان داشته و منجر به تولید ارقامی شده که از نظر صفات با ارزش کشاورزی و اقتصادی بسیار حائز اهمیت می‌باشند. انتقال ژن به گیاهان به‌منظور به‌نژادی آن‌ها، وابسته به توسعه روشی کارا برای باززایی نوساقه‌های زنده و سبز از بافت‌های کشت شده و روش تراریختی مناسب می‌باشد. در این روش سلول، بافت، اندام و یا هر قطعه جدا شده‌ای از گیاه (ریزنمونه) در یک محیط غذایی مصنوعی و در شرایط استریل کشت می‌گردد. تولید تعداد زیاد گیاه کامل، در مدت زمان کوتاه‌تر نسبت به شرایط طبیعی، از مزایای عمده کشت بافت گیاهی و لازمه فن‌آوری مهندسی ژنتیک می‌باشد (Hooykass & Schilperoort, 1992. and Mukhopadhyay *et al*., 1992).

در کشت بافت گیاهی شرایط متعدد و پیچیده‌ای دخالت می‌کنند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه، ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی اشاره نمود (معینی و کهریزی، ۱۳۸۲؛ کهریزی و همکاران، ۱۳۸۶الف). دانه‌های روغنی بعد از غلات به عنوان دومین منبع تامین کننده کالری برای جوامع بشری محسوب می‌شوند. کلزا (Rapeseed)، بعد از سویا و نخل روغنی، سومین منبع تولید روغن نباتی در جهان بوده و در مناطق معتدل، به‌عنوان مهم‌ترین گیاه روغنی به شمار می‌رود و حدود ۱۳ درصد روغن خوراکی جهان را تامین می‌کند. این گیاه در طی ۲۰ سال گذشته گیاهانی مانند بادام زمینی، آفتابگردان و پنبه دانه را پشت سر گذاشته و به دلیل کیفیت بالای روغن و کنجاله غنی از پروتئین، یکی از مهم‌ترین گیاهان روغنی به‌شمار می‌رود. بر این اساس سطح زیر کشت این گیاه در چند سال گذشته توسعه چشم‌گیری داشته است (ERS, 2001).

تاکنون در کشت بافت و مهندسی ژنتیک گیاه کلزا از ریزنمونه‌های مختلفی استفاده شده است که از مهم‌ترین آن-ها می‌توان کوتیلدون و هیپوکوتیل را نام برد (زبرجدی و همکاران ۱۳۸۳؛ کهریزی و همکاران ۱۳۸۶؛ Zebarjadi *et al.* 2006 وKahrizi *et al*. 2007).

در سال ۱۹۹۴، Ono و همکاران، اثر ژنوتیپ، ترکیب هورمونی و سن ریزنمونه را بر روی باززایی نوساقه از ریزنمونه‌های کوتیلدون ۱۰۰ ژنوتیپ گیاه *Brassica napus* را بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که بیشترین فراوانی باززایی نوساقه (۷۰٪) از کاربرد ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP و بدون استفاده از اکسین به‌دست آمد. چنگ و همکاران (Cheng *et al*., 2001) ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل، قطعات ریشه و میان‌گره‌ای گیاه *Brassica oleracea* و ترکیب‌های مختلف هورمون‌های NAA، IAA، TDZ و BAP را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش کردند که در میان ریزنمونه‌های مختلف، هیپوکوتیل و قطعات میان‌گره‌ای در حضور BAP بیشترین باززایی (۹۰٪) را داشته‌اند. هم‌چنین IAA و TDZ نیز افزایش معنی‌داری در باززایی نوساقه نشان دادند. در سال ۲۰۰۷ سلمانیان و کهریزی تاثیر ژنوتیپ و نوع ریزنمونه بر روی باززایی گیاهچه‌های کلزا به‌منظور استفاده در تحقیقات مهندسی ژنتیک را مطالعه کردند و مشخص گردید که عوامل ژنوتیپ، نوع ریزنمونه و اثرات متقابل آن‌ها دارای اثرات معنی‌داری روی باززایی گیاهچه‌های کلزا بود. آن‌ها هم‌چنین گزارش کردند که ریزنمونه کوتیلدونی دارای کارایی بالاتری برای باززایی می‌باشد.

با توجه به این‌که تاثیر تراکم ریزنمونه روی باززایی نوساقه در کشت بافت گیاهان مختلف گزارش شده ولی در رابطه با کلزا چنین اطلاعاتی وجود ندارد، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر رقم گیاه کلزا، تراکم کوتیلدون‌های کشت شده و اثرات متقابل آن‌ها روی ایجاد نوساقه و باززایی گیاهچه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بذور کلزا (*Brassica napus*) ارقام PF-7045-91 و SLM-046 از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه گردید. این بذور با استفاده از محلول سفید کننده هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ به علاوه چند قطره تریتون ۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه همراه با تکان دادن استریل شدند. سپس ۳ مرتبه شستشو هر بار به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل انجام گرفت. بذور فوق در محیط جوانه‌زنی حاوی نصف غلظت نمک‌های محیط MS (Murashige and Skoog,1962) کشت داده شدند و در اتاق رشد، با زمان نوردهی شبانه‌روزی ۱۶ ساعت روشنایی در درجه حرارت ۲۵°C در روشنایی و ۱۵°C در تاریکی نگهداری گردیدند.

کوتیلدون‌های گیاهچه‌های ۵ روزه که طول دمبرگ آن‌ها ۲ میلی‌متر بود، جدا شدند و جوانه انتهایی آن‌ها به‌طور کامل قطع گردید. دمبرگ‌ها در عمق ۲ میلی‌متری محیط کشت پایه MS حاوی ۴/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز (pH=۵/۸) قرار داده شدند.

صفت مورد بررسی فراوانی باززایی نوساقه بود که طبق تعریف عبارت از نسبت تعداد نوساقه تولید شده به تعداد ریزنمونه کشت شده در هر پتری‌دیش می‌باشد. تجزیه آماری این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل با دو عامل، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام شد. عامل اول ژنوتیپ که سطوح آن شامل ۲ رقم کلزای تجاری و عامل دوم تراکم ریزنمونه بود که از دو سطح ۱۵ و ۳۰ کوتیلدون در یک پتری‌دیش به قطر ۱۰cm تشکیل می‌شد. نوساقه‌های ایجاد شده از کشت کوتیلدون پس از شمارش، به محیط کشت پایه MS بدون هورمون منتقل شدند. پس از این‌که طول نوساقه‌ها به اندازه حدود ۸-۱۰cm رسید به محیط پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA، ۲۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم درلیتر آگار (pH=۵/۸) جهت ریشه‌زایی منتقل گردیدند.

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده (با ارتفاع حدود ۱۰cm)، به گلدان‌های کوچک حاوی خاک استریل (ترکیب یکسانی از پیت، ورمی‌کولیت و پرلیت) منتقل شدند. این نمونه‌ها تا زمان استقرار کامل و سازگاری با شرایط گلدانی، با محیط مایع حاوی نصف نمک‌های MS آبیاری شدند. برای سازگاری تدریجی با شرایط طبیعی (حفظ رطوبت نسبی بالا و کنترل آلودگی) از سرپوش‌های شفاف استفاده گردید. پس از سازگاری، سرپوش‌ها حذف گردید و به شرایط طبیعی خاک منتقل شدند. این گیاهچه در گلخانه کنترل شده با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، و دمای ۲۵°C در روز و ۱۵°C در شب منتقل شدند و تا زمان بذرگیری در همان شرایط باقی ماندند.

داده‌های به‌دست آمده، با استفاده از نرم افزارهای MSTATC تجزیه آماری شدند. با توجه به این‌که اکثر داده‌ها بر اساس درصد بودند، برای این‌که دارای توزیع نرمال باشند، از تبدیل داده زاویه‌ای Arcsin $\sqrt{X}$ استفاده شد (Westhof, 1999). تجزیه واریانس با استفاده از آزمون F و مقایسه میانگین از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ انجام شد.

نتایج و بحث

به‌منظور تولید گیاهان تراریخت، ابتدا باید فراوانی باززایی را بهینه سازی نمود. ژنوتیپ گیاه مورد بررسی، یکی از عومل موثر بر فراوانی باززایی می‌باشد. چنان‌چه امکان دسترسی به تنوعی از ژنوتیپ‌های گیاهی وجود داشته باشد، لازم است که در قالب یک طرح آزمایشی مناسب بهترین ژنوتیپ برای هر ریزنمونه انتخاب گردد. انجام طرح آزمایشی مناسب برای انتخاب بهترین ارقام، تجزیه و تحلیل اطلاعات را در مراحل بعدی انتقال ژن راحت‌تر نموده، اجرای طرح ساده‌تر و هزینه اجرای آن کمتر می‌شود. در پژوهش قبلی مشخص گردید که در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی دو رقم تجاری کلزا PF-7045-91 و SLM-046 و ریزنمونه کوتیلدون دارای بیشترین فراوانی باززایی می‌باشند (Salmanian & Kahrizi, 2007).

پس از کشت کوتیلدون‌های مناسب روی محیط ویژه و واکشت‌های لازم، نوساقه‌هایی روی آن‌ها ایجاد شد (شکل ۱). نوساقه‌های حاصل از کشت کوتیلدون‌ها ناشی از اندام‌زایی مستقیم از انتهای بریده می‌باشد و انتظار می‌رود که کم‌ترین تنوع سوماکلونال را داشته باشند. گزارش‌ها نشان می‌دهد که نوساقه‌هایی که از کشت هیپوکوتیل ایجاد شده‌اند، ابتدا مرحله کالوس‌زایی را طی کرده‌اند و در اثر باززایی غیر مستقیم تشکیل شده‌اند. به‌همین سبب ممکن است در آن‌ها تنوع سوماکلونال مشاهده گردد (Evan *et al*. 2003؛ و Cheng *et* al. 2001). اگر چه تنوع سوماکلونال هم به نوبه خود جهت انتخاب در شرایط درون شیشه‌ای از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Kahrizi *et al*., 2007a)، اما هدف این پژوهش نبود. در این مطالعه جهت حفظ ساختار ژنتیکی از ریزنمونه کوتیلدون استفاده گردید. دلایل مختلفی را می‌توان ارائه نمود که چرا در کشت هیپوکوتیل تولید کالوس اتفاق می‌افتد، ولی در کشت کوتیلدون باززایی مستقیم مشاهده می‌شود. اول این‌که در کشت هیپوکوتیل چنان‌که قبلاً ذکر گردید، معمولاً از تنظیم کننده‌های رشد اکسینی قوی با مقادیر بالا استفاده شده است که به‌کارگیری این مواد در محیط کشت، تعادل هورمونی ریز نمونه را شدیداً به‌هم زده و باعث ایجاد توده سلولی تمایز نیافته می‌شود. این در حالی است که در کشت کوتیلدون از تنظیم کننده سیتوکنینی به همراه مقدار کم و ضعیف اکسین استفاده شده است. هم‌چنین برای تفسیر این موضوع باید به نوع بافت و ریزنمونه مورد استفاده هم توجه شود. برنامه و تمایز بافت کوتیلدونی بسیار مشابه برنامه و تمایز برگ می‌باشد و به همین دلیل تمایل به باززایی مستقیم دارد و این در حالی است که بافت هیپوکوتیل تمایز کمتری داشته و می‌توان برای تولید هر بافت جدیدی از آن استفاده نمود. هم‌چنین شرایط فیزیولوژیکی ریزنمونه‌ها تاثیر زیادی روی نوع باززایی آن دارد (Kahrizi *et al*., 2007b). نتیجه با اهمیتی که از کشت کوتیلدون به‌دست آمد، امکان باززایی چندین نوساقه از یک

کوتیلدون می‌باشد که این موضوع در ریز ازدیادی و مهندسی ژنتیک کلزا بسیار حائز اهمیت می‌باشد (شکل ۱).

نتایج تجزیه واریانس باززایی نوساقه از ارقام و تراکم‌های مختلف ریزنمونه‌ها در جدول شماره ۱ مشاهده می‌گردد.

کشت کوتیلدون ها
Culture of cotyledons

کوتیلدون آماده برای کشت
Desired cotyledon for culturing

کشت بذور
Culture of seeds

طویل شدن و ریشه دار شدن گیاهچه ها
Elongation and rooting of plantlets

رشد و تکثیر نوساقه ها
Growth and multiplication of shoots

باززایی نوساقه ها
Regeneration of shoots

شکل ۱: مراحل باززایی نوساقه از طریق کشت کوتیلدون در کلزا

Fig. 1:. Shoot regeneration stages via cotyledon culture in rapeseed

جدول ۱: تجزیه واریانس باززایی نوساقه از کوتیلدون‌های دو رقم کلزا در دو تراکم کشت مختلف

Table1: Analysis of variance of shoot regeneration from cotyledons in two cultivars and two culture densities in rapeseed

منبع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean of squares
رقم Cultivar	1	4.63 **
تراکم Density	1	14.44 **
رقم × تراکم Cultivar × Density	1	0.55 ns
خطای آزمایش Error	12	0.28
کل Total	15	%C.V. =5.39

**: وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ (Significant P<0.1)

ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار (Non-significant)

جدول تجزیه واریانس فوق نشان می‌دهد که برای باززایی نوساقه از کوتیلدون‌های گیاه کلزا، اختلاف معنی‌دار بین دو رقم وجود دارد. هم‌چنین بین دو تراکم کشت شده نیز برای صفت فوق اختلاف معنی‌دار مشاهده می‌شود، ولی برای اثرات متقابل رقم در تراکم کشت کوتیلدون، اختلافات معنی‌دار نمی‌باشند. در مقایسه میانگین داده‌ها بهتر می‌توان این نتایج را مشاهده نمود که در جدول شماره ۲ آورده شده است.

جدول ۲: مقایسه میانگین اثر رقم و تراکم کوتیلدون بر روی باززایی نوساقه کلزا
Table2: Mean comparison of cultivar and culture density effects on shoot regeneration in rapeseed

تیمار Treatment	درصد باززایی Regeneration percutago
رقم Cultivar	
PF-7045-91	85.0 a
SLM-046	63.0 b
تراکم Density	
۱۵ ریزنمونه 15 explants	87.0 a
۳۰ ریزنمونه 30 explants	57.0 b
رقم × تراکم Cultivar × Density	
PF × ۱۵ ریزنمونه PF×15 explants	91.0 a
PF × ۳۰ ریزنمونه PF×30 explants	57.3 c
SLM × ۱۵ ریزنمونه SLM×15 explants	66.0 b
SLM × ۳۰ ریزنمونه SLM×30 explants	42.7 d

حروف غیر مشابه بین سطوح هر تیمار بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین آن‌ها است.
Means in each column, followed by the similar letters are not significantly different at the 1% probability

طبق جدول شماره ۲، رقم PF-7045-91 بالاترین درصد باززایی نوساقه (۸۵٪) از طریق کشت کوتیلدون را نشان داده است و رقم SLM-046 (با ۶۲٪ باززایی نوساقه) پس از آن قرار دارد ولی بین این دو رقم نیز در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

هم‌چنین بر اساس جدول فوق، تراکم ۱۵ کوتیلدون در هر پتری‌دیش دارای فراوانی باززایی نوساقه بیشتری (۸۷٪) نسبت به ۳۰ کوتیلدون در هر پتری (۵۷٪) می‌باشد. این کاهش باززایی که برای ریزنمونه‌های دیگر در گیاهان مختلف مطالعه شده است، می‌تواند به‌علت تولید مواد سمی و مضر از سوی ریزنمونه‌های غیر باززا باشد (معینی و کهریزی، ۱۳۸۲) و یا این‌که ممکن است افزایش رقابت بین ریزنمونه‌ها، باعث این امر شود (Kahrizi *et al*., 2007a).

هم‌چنین جدول مقایسه میانگین نشان می‌دهد که اثر متقابل PF × ۱۵ ریزنمونه ۹۱٪ باززایی دارای بیشترین میانگین در میان سایر اثرات متقابل است. نکته قابل توجه در رابطه با اثرات متقابل این است که جدول تجزیه واریانس این نوع اثر را برای درصد باززایی غیرمعنی‌دار نشان داد و این در حالی است که بر اساس نتایج مقایسه میانگین، این نوع اثر با سطح بالای ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد. چنان‌که ملاحظه می‌شود تمامی اثرات متقابل، در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهند. این نکته بیان‌گر ضعف آزمون تجزیه واریانس در این رابطه می‌باشد و لذا لازم است مقایسه میانگین تیمارها انجام شود تا بتوان با اطمینان بیشتری قضاوت نمود. علت این موضوع احتمالاً به نوع توزیع فراوانی داده‌ها بر می‌گردد، به‌طوری‌که این توزیع به طریقی است که اثرات مثبت و منفی همدیگر را خنثی نموده و با وجود اختلاف در اثر تیمارها، تجزیه واریانس آن را معنی‌دار نشان نمی‌دهد (Westhof, 1999) .

وجود اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها، با نتایج Zhang and Bhalla (1999) در کلزا مطابقت دارد. پژوهش‌گران مذکور به‌منظور بهینه‌سازی شرایط انتقال ژن روی ۷ رقم کلزا و برای فراوانی باززایی از دو ریزنمونه کوتیلدون و هیپوکوتیل مطالعه کردند و اختلافات بین ارقام را بسیار معنی‌دار گزارش نمودند. وابستگی فراوانی باززایی به ژنوتیپ این را می‌رساند که جهت ریزازدیادی و یا انتقال ژن باید ژنوتیپ‌هایی به‌کار گرفته شوند که دارای درصد باززایی بالایی باشند. چنان‌چه رقم مناسبی (از نظر خصوصیات زراعی)

وجود داشته باشد ولی فراوانی باززایی کمی داشته باشد، می‌توان از طریق دورگ‌گیری با ژنوتیپ دارای فراوانی باززایی بالا، این صفت را به ژنوتیپ برتر منتقل کرد. بر خلاف نتایج به دست آمده از این پژوهش، Menze و Mollers در سال ۱۹۹۹ گزارش کردند که برای باززایی نوساقه از کوتیلدون و هیپوکوتیل کلزا اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نشده است. علت عدم تطابق بین نتایج تحقیقات، عمدتاً به اختلاف در ارقام و ژنوتیپ‌های مورد استفاده بر می‌گردد، به‌طوری‌که برخی محققین از دامنه وسیعی از ژنوتیپ‌ها استفاده کرده‌اند که تنوع بالایی برای صفت مورد نظر در خود دارند. بعضی از پژوهش‌گران نیز ژنوتیپ‌هایی را در پژوهش خود استفاده کرده‌اند که برای متغیر مورد مطالعه تنوع ندارند. از طرف دیگر صفت باززایی تحت کنترل ژنتیکی می‌باشد که تا کنون برای باززایی گیاهان مختلف از ریزنمونه‌های مختلف ژن‌های زیادی برای کروموزوم‌های مختلف گزارش شده است (Kahrizi *et al*., 2000; Pierik, 1987; Smith, 2000).

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۱-۲ متن انگلیسی مراجعه شود.

Effect of Cultivar and Density of Cultured Cotyledons on Shoot Regeneration in Rapeseed (*Brassica napus* L.)

Kahrizi[1*], D., Salmanian[2], A. H. and Zebarjadi[1], A. R.

Absteract

The objective of the present research was to study the effect of genotypes (2 commercial cultivars of repeseed, PF-7045-91 and SLM-046) and explant densities (15 and 30 cotyledons in 10 cm in diometer Petri dishes) on shoot regeneration. Results showed that there were significant differences between rapeseed cultivars and explant densities, but no significant interaction effect was observed between investigated parameters. The cultivar PF-7045-91 was better regenerated with average of 85% regenerated cotyledons than the other one with 62%. Higher percentage of regeneration (87%) was also recorded for treatment with 15 cotyledons in Petri dish rather than 30 cotyledons.

Keywords: Rapeseed, Cotyledon, Regeneration

References

Burton, G. W. and de Vane R. W 1953. Estimating heritability in tall Fescue (*Festuca arundinaceia*) from replicated clonal material. Agronomy Journal 45, 478-481.

Cheng, P. K., Lakshmanan P. and Swarup S. 2001. High frequency direct shoot regeneration and continuous production of rapid-cycling *Brassica oleracea* in *in vitro*. In Vitro Cellular and Developmental Biology 37: 592-598.

Economic Research Service (ERS). 2001. Oil crops situation and outlook. OCS-2000, Oct. 2001. ERS, USDA. p. 66.

Evan D.E., Coleman, J.O.D. and Kearns, A. 2003. Plant Cell Culture. Bios Scientific Publishers. Pp 153-158.

Hooykass, P. J. J. and Schilperoort, R. A. 1992. Agrobacterium and plant genetic engineering. Plant Molecular Biology 19: 15-38.

Johnson, H. W., Robinson H. F. and Comstock R. W. 1955. Estimates of genetic and environmental variability in Soybeans. Agronomy Journal 47, 314-318.

Kahrizi, D., Arminian, A., and Masomi Asl, A. 2007. B. In Vitro Plant Breeding. Razi University Publications.

Kahrizi, D., Moieni A. and Bozorghpour R. 2000. Effect of genotype and hydrocarbone source upon androgenesis in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). Seedling and Seed. 16(1): 41-51.

Kahrizi, D., Salmanian, A. H., Afshari A., Moieni, A. and Mousavi, A. 2007. Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate. Plant Cell Reports 26: 95-104.

Kahrizi, D., Salmanian, A. H and Zebarjadi, A. 2007. Effect of plant genotype, explant and *Agrobacteriun* strain on transformation efficiency in rapeseed (*Brassica napus* L.). Modern Genetics Journal. 2(3): 53-62.

Menze, A. and Mollers, C. 1999. Transformation of different Brassica napus cultivars with three different strains of Agrobacterium rhizogenes. New Horizos for an old crop. Proceeding of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia.

Mukhopadhyay, A., Arumugam, N., Nandakumar, P. B. A., Pradhan A. K., Gupta V. and Pental D. 1992. Agrobacterium-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by mode of shoot regeneration. Plant Cell Reports 11: 506-513.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15: 473-497.

Ono, Y., Takahata, Y. and Kaizuma, N. 1994. Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (*Brassica napus* L.). Plant Cell Reports 14: 13-17.

Pierik, R. L.M. 1987. In vitro of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

Salmanian, A. H. and Kahrizi, D. 2007. Study on effect of genotype and explant type on shoot regeneration in rapeseed (*Brassica napus* L.). Iranian Biology Journal. 20(3): 171-179

Smith, R. H. 2000. Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments. Academic Press.

Westhof, E. 1999. Practical Statistics for Experimental Biologists. 2nd edition by Wardlaw A.C.. John Wiley & Sons, Chichester, P. 255.

1. Assistant Professors, Department of Biotechnology Research for Drought Resistance, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah

2. Associate Professor. National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology,Tehran

∗: Corresponding author

Zebarjadi, A. R., Jalali Javaran, M., Salmanian, A. H., Karimzadeh, G., Moeini, A. and Mousavi, A. 2006. Transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) plants with sense and antisense constructs of the fatty acid elongase gene. Iranian Journal of Biotechnology, 4(2): 79-87.

Zhang, Y and Bhalla, P. L. 1999. Shoot regeneration potential from seedling explants of Australian cultivars of oil seed rape (*Brassica napus* L.). New Horizos for an old crop. Proceeding of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 1-6= ۱-۶).