بررسی پاسخ به جنین‌زایی در کشت بساک ژنوتیپ‌های ذرت

Study on Embryogenesis Response of Maize (*Zea mays* L.) Genotypes to Anther Culture

سعید خاوری خراسانی[1]، احمد معینی[2]، امیر موسوی[3] و محمد گلباشی[4*]

چکیده

تولید گیاهان هاپلویید با استفاده از کشت بساک در برنامه‌های بِه‌نژادی و پژوهش‌های بنیادی گیاهان عالی از اهمیت زیادی برخوردار است. در این پژوهش قابلیت آندروژنز در پاسخ به کشت بساک 44 ژنوتیپ ذرت و نیز اثر پیش‌تیمار سرمایی، نوع محیط کشت و جهت قرار دادن بساک‌ها روی محیط کشت بر میزان جنین‌زایی بررسی شد. نتایج اولیه کشت بساک‌ها نشان دهنده پاسخ مثبت فقط 8 ژنوتیپ شامل S61،TWC605 ، K74/1، SC709، DH5×DH7، A188، LA12 و ETH-M82 به جنین‌زایی بود. به دلیل پاسخ ضعیف جنین‌زایی در اغلب ژنوتیپ‌های ذرت مورد بررسی در این پژوهش، برای انجام آزمایش‌های بعدی از دو ژنوتیپ برتر DH5×DH7 و ETH-M82 استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌ها در آزمایش اول نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها و محیط‌های کشت مورد بررسی از نظر تعداد ساختارهای شبه جنینی تشکیل شده، تفاوت معنی‌داری وجود داشت، ولی بین پیش تیمارهای سرمایی 14 و 21 روزه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. مقایسه میانگین‌ها در آزمایش دوم نشان داد که محیط کشت Yu-pei حاوی $mg1^{-1}$ 90 ساکارز با تولید 21/82 ساختار شبه جنینی در 100 بساک کشت شده، بهترین محیط کشت القای جنین‌زایی می‌باشد. در آزمایش سوم نیز معلوم شد که بهترین نحوه قرارگیری بساک‌ها روی محیط کشت از جهت لبه بساک می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کشت بساک، ساختار شبه جنینی، ذرت، گیاه هاپلویید

Archive of SID

1. عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی
2. دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران
3. عضو هیئت علمی پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک، تهران
4. دانشجوی دکتری تخصصی نانوبیوتکنولوژی دانشگاه تهران
*: نویسنده مسوول

www.SID.ir

مقدمه

روش تولید درون شیشه‌ای گیاهان هاپلویید مضاعف شده، اجازه‌ی دست‌یابی سریع به لینه‌های هموزیگوت را مهیا می‌کند و از این‌رو به‌طور قابل ملاحظه‌ای زمان لازم برای اصلاح هیبریدها را کاهش می‌دهد. در روش‌های کلاسیک به‌نژادی، حداقل 6 نسل خویش‌آمیزی برای رسیدن به حد نساب هموزیگوتی زمان لازم است، ولی در روش تولید هاپلوییدهای مضاعف شده طی یک نسل به هموزیگوتی کامل و صد در صد حاصل می‌شود (Pohelman, 1995; Buter *et al*., 1997; Shugar, 1998). به‌علاوه هاپلوییدهای مضاعف تفرق نمی‌یابند و چون گیاهان هموزیگوت تفرق ندارند، کاربرد آن‌ها نیز راحت‌تر است و از خطرات مرتبط با زودآزمونی در طی خویش‌آمیزی کاسته می‌شود (Buter, 1997). استفاده از هاپلوییدها، در برنامه‌های به‌نژادی به منظور تولید گیاهان کاملا هموزیگوت در تعداد کمی از گونه‌های زراعی میسر شده است. البته تاکنون پژوهش‌گران از طریق هاپلوییدهای مضاعف شده توانسته‌اند ارقام جدیدی از غلات به‌ویژه جو، ذرت، برنج و گندم را اصلاح و معرفی نمایند (Shugar, 1998). مثال‌هایی از کاربردهای متعدد هاپلوییدها در تحقیقات بنیادی شامل تهیه نقشه و تجزیه‌های ژنتیکی، القای موتاسیون‌ها، تراریختی، کشت پروتوپلاست و دورگ‌گیری سوماتیکی، مطالعات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، تولید بذر مصنوعی و حفظ ژرم‌پلاسم می‌باشد (Aulinger, 2002). شایان ذکر است که در ذرت خصوصیات منحصر به فرد ژنتیکی لینه‌های هاپلویید مضاعف نه تنها برای اصلاح هیبریدها مفید به‌نظر می‌رسد، بلکه برای کاربردهایی نظیر گزینش درون شیشه‌ای در جهت ایجاد مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، تهیه نقشه ژنی و تراریختی ژنتیکی حائز اهمیت می‌باشند (Aulinger, 2002).

کشت بساک یکی از ساده‌ترین و متداول‌ترین روش‌های تولید گیاهان هاپلویید محسوب می‌شود و در بیش از 200 گونه گیاهی گزارش شده است (Buter, 1997). آندروژنز به‌وسیله کشت بساک ذرت اولین بار در اواخر دهه 1970 به‌ترتیب به‌وسیله Nitsch (1977) و گروه تحقیقاتی 401 در چین گزارش شد و از آن به بعد این روش به‌طور قابل ملاحظه‌ای بهبود یافته است (Kuo *et al*., 1978). تولید ساختارهای شبه جنینی در ذرت از طریق کشت بساک برای اولین بار در سال 1974 توسط چینی‌ها گزارش شد (Genovesi and Collins, 1982)، ولی پیشرفت در کشت بساک ذرت به دلایل تعداد معدود ژنوتیپ‌های مستعد نر زایی، نیاز به یک محیط کشت غیر معمول (Genovesi and Collins, 1982; Barloy and Beckert, 1993)، فراوانی کم شبه جنین‌های تولید شده، راندمان پایین باززایی گیاه و خودگشنی ناموفق به‌منظور تولید بذر، روند آهسته‌ای داشته است (Barloy and Beckert, 1993). پیشرفت‌های اخیر در روش کشت بساک همچون جایگزینی مالتوز با ساکارز، آگارز با آگار، پیش تیمار، مانیتول، سرما و غیره گام‌های مثبتی در بهینه-سازی این روش به شمار می-آیند (Buter, 1997). عوامل مختلفی از قبیل ژنوتیپ، شرایط رشد گیاه مادری، مرحله نمو میکروسپورها (مرحله تک-هسته‌ای انتهایی تا اوایل دو هسته‌ای)، رژیم نوری، محیط کشت القای ساختارهای جنینی و شبه جنینی را در کشت بساک و سوسپانسیون میکروسپورهای ذرت تحت تاثیر قرار می‌دهند (Jahne and Lorz, 1995). ژنوتیپ گیاه شاید مهم-ترین عامل موثر بر نرزایی درون شیشه‌ای باشد. تولید هاپلوییدها از طریق کشت بساک و میکروسپورهای ذرت و کاربرد آن‌ها به دلیل وابستگی شدید آن به ژنوتیپ (Dieu and Beckert. 1986; Baroy and Beckert. 1989) و میزان پاسخ پایین آن (Pretova *et al*., 1993; Jahne and Lorz, 1995; Genovesi and Collins, 1989) محدود شده است.

در بررسی واکنش 159 ژنوتیپ ذرت به نر زایی، فقط 9 ژنوتیپ واکنش مثبت به جنین‌زایی نشان دادند. به‌علاوه با استفاده از ژنوتیپ‌های برگزیده و بهبود محیط‌کشت، بیش-ترین پاسخ به نرزایی در بساک‌ها فقط 7% بوده است (Genovesi and Collins 1982). در مطالعه دیگری 6000-8000 بساک در هر ژنوتیپ کشت شدند و پاسخ متفاوتی دیده شد، به‌نحوی که در بررسی 100 لاین تجاری ژنتیکی غیر خویشاوند، 50% ژنوتیپ‌ها توانستند ساختارهای شبه جنینی تولید نمایند. به‌علاوه فقط از 30% از ژنوتیپ‌های مورد آزمون گیاهان سبز باززایی شدند (Barloy and Beckert, 1993).

کشت بساک ذرت در ایران، ابتدا توسط صولتی و همکاران در سال 1375 دانشگاه صنعتی اصفهان انجام گردید که به‌دلیل عدم واکنش ژنوتیپ‌های مورد بررسی به جنین‌زایی گزارشی در این‌باره منتشر نشده است. این پژوهش اولین گزارش موفقیت آمیز کشت بساک ذرت در ایران می-باشد.

هدف از این پژوهش، مطالعه نر زایی در ژنوتیپ‌های ذرت و بررسی پاسخ به جنین‌زایی و باززایی گیاهی در کشت

Archive of SID

www.SID.ir

بساک به‌منظور تولید گیاهان هاپلویید می‌باشد تا به‌عنوان یک روش مکمل به‌توان روند برنامه اصلاح و معرفی هیبریدهای ذرت با عملکرد بالا و صفات برتر را تسریع نمود و از این ویژگی در مطالعات بنیادی به‌ویژه در تهیه نقشه‌های ژنتیکی و مکان‌یابی صفات استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، در بررسی اولیه 44 ژنوتیپ به‌عنوان ماده گیاهی در طی 3 سال زراعی 1382، 1383 و 1384 از نظر پاسخ به نر زایی درون شیشه‌ای در کشت بساک و تولید ساختارهای شبه جنینی مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول1). بذرهای ژنوتیپ‌های مورد بررسی در برگیرنده طیف وسیعی از ژرم‌پلاسم ذرت موجود در بخش تحقیقات ذرت و گیاهان علوفه‌ای موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کشور بودند که شامل 16 اینبردلاین ذرت، 24 هیبرید سنیگل کراس و 4 هیبرید تری وی کراس می‌باشند. بذرهای هیبرید سینگل‌کراس DH5×DH7 از موسسه تحقیقات INRA فرانسه و هیبرید ETH–M82 از موسسه تحقیقات ETH زوریخ کشور سویس دریافت گردید.

منشا اصلاحی بسیاری از لاین‌ها و هیبریدهای ذرت مورد استفاده در این پژوهش از جمعیت‌ها و توده‌های بومی مواد ژنتیکی دریافتی از سیمیت مکزیک (مرکز تحقیقات بین‌المللی گندم و ذرت) و لاین‌های اصلاحی مکزیک و آمریکای لاتین می‌باشد.

بذرهای ژنوتیپ‌ها در طی 3 سال زراعی 1382، 1383 و 1384 در دو محیط مزرعه و اتاق رشد کنترل شده کشت گردیدند. در گلخانه بذر هر ژنوتیپ در گلدان‌های نایلونی به قطر 20 cm و عمق 28 cm و در مزرعه نیز به‌طور مداوم و هر دو هفته یک بار کشت شدند تا همواره دسترسی به گل آذین‌های نر برای کشت بساک باشد.

جدول 1: اسامی ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی در کشت بساک ذرت
Table 1: List of maize genotypes used for anther culture

هیبرید Hybrid	هیبرید Hybrid	اینبرد لاین (والدین) Inbred line
KSC108 (S61 X TVA926)	TWC600	K9653/2
KSC301 (S61 X K722)	TWC603	K1263/1
KSC302 (K2331 X K1264/5-1)	TWC605	K3640/8
KSC340 (K2816 X K1263/1)	TWC647	K74/1
KSC403 (K'13 X K82/1)	S61× MO17	S61
KSC500 (R59 X OH43/1-42)	K19×S61	B73
KSC604 (B73 X K722)	BC182 *	K2331
KS647 (B73 X K1264/5-1)	BC288 *	K2816
KSC700 (K74/1 X K18)	BC385 *	LA12
SC701 (unknown)	OSSK444*	MO17
SC703 (unknown)	OSSK499 *	A188
KSC704 (B73 X MO17)	DH5 × DH7 (Doubled haploid)	K19
SC709 (unknown)	ETH-M24 (Doubled haploid)	OH43/42-1
SC720 (unknown)	ETH-M72 (Doubled haploid)	KE72012/12
	ETH-M82 (Doubled haploid)	TVA926

*= Commercial hybrids (unknown parents)

Archive of SID

www.SID.ir

تعیین مرحله نموی دانه گرده

در هر دو محیط اتاق رشد کنترل شده و مزرعه، گل‌های نر در مرحله نمو مناسب میکروسپورها، مرحله تک-هسته‌ای میانی تا تک‌هسته‌ای انتهایی (Nageli; 1998; Buter, 1997; Jahne and Lorz, 1995; pretova *et al*. 1993) یا مرحله نمو تک‌هسته‌ای میانی تا اوایل دو هسته‌ای میکروسپورها (Aulinger, 2002; Mac Donald, 1992) برداشت شدند. مرحله نمو میکروسپورها به‌وسیله رنگ‌آمیزی با استوکارمن 2% (Nageli, 1998) و سپس مشاهده با میکروسکوپ معکوس Olympus مدل IX71 (TH4-200) تعیین گردید. اغلب پژوهش‌گران زمان مناسب برداشت گل-های نر از نظر مورفولوژیکی، مرحله پیش از خروج گل نر از داخل غلاف برگ پرچمی دانسته‌اند (Aulinger, 2002; Nageli, 1998; Buter, 1997; Jardinaud *et a1*., 1995).

پیش تیمار بساک‌ها

پس از برداشت گل آذین نر در مرحله مناسب از نظر نمو، آن‌ها در داخل دستمال کاغذی مرطوب و سپس فویل آلومینیومی قرار داده و برای اعمال شوک سرمایی به‌مدت 14 روز دمای $8^{\circ}C$ به یخچال منتقل شدند (Buter, 1997). پس از اعمال پیش تیمار سرمایی، ضدعفونی سنبلچه‌ها با استفاده از محلول سدیم هیپوکلریت 2-1/5% (V/V) انجام گردید. به منظور افزایش راندمان جنین‌زایی بساک‌ها، سنبلچه‌ها در محیط مایع پیش‌کشت (که ترکیبات آن شامل $mg1^{-1}$ 109/3 مانیتول، $mg1^{-1}$ 50 ال- اسکوربیک اسید، $mg1^{-1}$ 10 نیکوتینیک اسید، $mg1^{-1}$ 0/1 بیوتین، $mg1^{-1}$ 0/5 نیترات نقره و $mg1^{-1}$ 125 ال- پرولین با pH 5/8 می‌باشد) قرار گرفتند و در دمای $8^{\circ}C$ در یخچال به مدت 3 روز دیگر پیش-تیمار شدند (Nageli, 1998; Buter, 1997; Jahne and lorz, 1995; Genovesi and Yingling, 1990; Pretova, 1993).

کشت بساک‌ها

پس از انجام مراحل ضدعفونی سنبلچه‌ها، بساک‌ها توسط پنس از گلچه‌ها خارج و برای کشت آن‌ها از پتری‌های یک‌بار مصرف به ابعاد mm 60×15 که حاوی ml 8 محیط کشت مایع یا جامد می‌باشد، استفاده گردید. در هر پتری دیش 25 بساک کشت شدند و سپس پتری‌ها پس از درز گیری با 2 دور پارافیلم در دمای $^{\circ}C$ 27 و در تاریکی قرار داده شدند.

محیط جنین‌زایی

در این پژوهش از 5 محیط کشت برای جنین‌زایی بساک‌ها شامل محیط‌های کشت Yu-Pei (YP)، YPm (یا YP تغییر یافته N6 IMSS) و محیط کشت القای کالوس (CI) استفاده شد. شایان ذکر است که محیط‌های کشت Yu-Pei با پروتکل (Ku *et a1*., 1981)، محیط کشت N6 Chu *et* (*a1*., 1975) IMSS و IML بر طبق پروتکل (Saisingtong *et a1*., 1996) و محیط کشت CI طبق پروتکل (Nageli, 1998) تهیه شدند. محیط‌های YP،YPm و N6 جامد، محیط IMSS نیمه جامد و (CI) مایع بود. ترکیب محیط کشت IML مشابه با محیط کشت IMSS می‌باشد، با این تفاوت که کلشیسین در این محیط حذف شده و $mg1^{-1}$ 1500 فیتاژل به آن اضافه گردیده است. بساک‌ها قبل از کشت در محیط نیمه جامد IMSS به مدت یک هفته در محیط کشت مایع IML و در دمای $10^{\circ}C$ پیش تیمار شدند (Saisingtong *et a1*. 1996). میزان پاسخ ژنوتیپ‌ها به نرزایی از طریق شمارش تعداد ساختارهای شبه جنینی در 100 بساک کشت شده در هر ژنوتیپ تعیین گردید.

باززایی گیاه

در این پژوهش از 3 محیط کشت باززایی YPnase (Gaillard *et a1*. 1991) و (Murashige and Skoog, 1962) MS و RM (Saisingtong *et a1*. 1996) استفاده شد. pH محیط در محدوده 5/7 تا 5/9 تنظیم گردید. پس از این‌که تعداد ساختارهای شبه جنینی (اعم از کالوس یا جنین) در هر پتری‌دیش شمارش شدند، شبه جنین‌ها به‌محیط کشت باززایی گیاه منتقل گردیدند. محیط‌های کشت باززایی گیاه شامل سه محیط کشت جامد YPnase (Gaillard *et a1*. 1991)، MS (Murashige and Skoog, 1962) و RM (Saisingtong *et a1*. 1996) بود. در حدود 4 الی 6 هفته پس از کشت ساختارهای شبه جنینی روی محیط کشت باززایی، گیاهچه‌ها ظاهر گردیدند. گیاهچه‌های حاصله پس از تشکیل ریشه کافی به بستر کشت مناسب منتقل و در شرایط نوری با دوره 16/8 ساعت تاریکی/نور و شدت نور $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ 100-150 و دمای $^{\circ}C$ 25 در اتاق رشد کنترل شده قرار گرفتند. یک الی 2 هفته بعد، گیاهان به گلدان‌های بزرگ‌تر به ابعاد cm 22×15 حاوی خاک، ماسه و کود دامی به نسبت 1:1:2 منتقل شدند. بعد گیاهچه‌های حاصل به اتاق رشد گیاهان مادری یعنی شرایط نور بیش‌تر $\mu molm^{-2}S^{-1}$ 300-350 و دوره نوری 16/8 ساعت و دمای

www.SID.ir

Archive of SID

25/18 (شب/روز) منتقل گردیدند تا گیاهان حاصله بالغ شده و اندام‌های زایشی و احتمالا بذر در آن‌ها تشکیل گردد.

تعیین سطح پلوییدی گیاهان باززایی شده

به‌منظور تعیین سطح پلوییدی گیاهان باززایی شده ذرت، ابتدا از روش شمارش کروموزوم‌های مریستم نوک ریشه گیاهان باززایی شده استفاده شد. نظر به این‌که تعیین سطح پلوییدی ذرت با استفاده از روش شمارش کروموزوم-های مریستم نوک ریشه، روشی وقت‌گیر می‌باشد، در این پژوهش فقط سطح پلوییدی تعداد معدودی از نمونه‌ها با این روش تعیین شد و کلیه ارزیابی‌های سطح پلوییدی گیاهان باززایی شده در این پژوهش، با استفاده از دستگاه فلوساتیومتر مدل Partec I در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی انجام گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصله از بررسی پاسخ آندروژنیک ژنوتیپ‌های مختلف ذرت به کشت بساک در جدول (2) آمده است. در این بررسی از بین 44 ژنوتیپ مورد بررسی، تنها 8 ژنوتیپ (18/6% از ژنوتیپ‌ها) شامل DH5×DH7 ،ETH-M82 A188، S61، LA12،K74/1 (ذرت شیرین)، TWC605 و SC709 پاسخ مثبت نشان دادند. از طرفی فقط هیبرید DH5×DH7 یعنی 2/6% از ژنوتیپ‌ها پاسخ خوب نشان دادند. در مقایسه واکنش آندروژنیک گیاهان جو، گندم و ذرت معلوم شد که در ذرت از بین 40 و 55 ژنوتیپ مورد بررسی به‌ترتیب فقط 3 و 4 ژنوتیپ پاسخ خوبی به کشت بساک و میکروسپور نشان دادند. منظور از عکس‌العمل خوب تشکیل حداقل 10 ساختار شبه جنینی در کشت 100 بساک می-باشد، در صورتی‌که در جو 100% و در گندم بیش از 77% ژنوتیپ‌های مورد بررسی به کشت بساک عکس‌العمل مناسب نشان دادند (Buter, 1997). در بررسی کشت بساک 27 ژنوتیپ ذرت، 17 ژنوتیپ مورد بررسی به کشت بساک پاسخ مثبت دادند، به‌طوری‌که فراوانی تولید جنین فقط در 9 ژنوتیپ مورد بررسی حدود 1% بود و لاین‌های R16, Pa91, H99 و نیز هیبرید Pa91 (H99×FR16) × به‌عنوان بهترین ژنوتیپ‌ها معرفی شدند (Petolino and Jones, 1986).

میانگین تولید ساختارهای شبه جنینی در هیبرید DH5×DH7، در این پژوهش، 17/6% بود (جدول 2). میانگین تولید ساختارهای شبه جنینی در ژنوتیپ مذکور در آزمایشات پژوهش‌گران قبلی از 1/6% تا 36% (2) و 49% (3) متغیر می‌باشد در این پژوهش میانگین بالاتر تولید ساختارهای شبه جنینی در ژنوتیپ DH5× DH7 با استفاده از محیط کشت مایع IML و سپس محیط کشت نیمه جامد IMSS، (17/6%) نسبت به محیط کشت جامد YPm (8%)، می‌تواند متاثر از ترکیب متفاوت محیط کشت آن‌ها باشد. وجود کلشیسین در محیط کشت مایع IML (به میزان mgL^{-1} 250 به مدت یک هفته) طبق نظر برخی پژوهش‌گران می-تواند تاثیر مثبت و قابل توجهی در بهبود جنین‌زایی و باززایی گیاه داشته باشد (Wan and Widholm, 1993). برخی پژوهش‌گران معتقدند که کلشیسین به تنهایی می‌تواند عاملی باشد که جنین‌زایی را در کشت بساک ذرت تحریک یا آغاز نماید (Obert and Barnábas, 2004). در این پژوهش، میانگین ساختارهای شبه‌جنینی حاصل از کشت بساک ژنوتیپ ETH-M82، 8% برآورد گردید (جدول 2).

آلینگر (Aulinger, 2002) فراوانی تولید ساختارهای شبه جنینی در ژنوتیپ ETH-M82 را بین 5/8% تا 15/5% گزارش نمود. در این پژوهش تنها ژنوتیپ ETH-M82 توانست در 3 محیط کشت متفاوت IMSS، YPm و CI پاسخ مثبت نشان دهد. مهم‌ترین خصوصیت محیط کشت YP را سطح بالای ساکارز، وجود ذغال فعال و ازت معدنی به شکل کازیین هیدرولیزات بیان کرده‌اند (Genovesi and Collins, 1982). محیط کشت CI برای کال‌زایی در کشت بساک‌ها مناسب است، زیرا در ترکیب این محیط کشت هورمون اکسین 2,4,D به میزان mgL^{-1} 2 به‌کار رفته است، در صورتی‌که در محیط‌های دیگر کشت بساک ذرت نه تنها از هورمون اکسین استفاده نشده است، بلکه آنتی‌اکسین TIBA نیز به‌کار رفته است (جدول 2).

به‌نظر می‌رسد مصرف آنتی‌اکسین در کشت بساک ذرت احتمالا به‌دلیل میزان بالای هورمون‌های داخلی بافت کشت شده باشد (Aulinger, 2002). هیبریدهای تری‌وی-کراس TWC605 و سینگل کراس SC709 به‌ترتیب با فراوانی‌های 1/5% و 5/% فقط در محیط کشت IMSS عکس‌العمل نشان دادند. همان‌طوری‌که قبلا ذکر شد بساک-های این ژنوتیپ‌ها ابتدا در محیط کشت مایع IML حاوی mgL^{-1} 250 کلشیسین پیش‌تیمار شدند و سپس به محیط کشت نیمه جامد IMSS بدون کلشیسین انتقال یافتند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول2: عکس‌العمل آندروژنز در ژنوتیپ‌های پاسخ‌دهنده ذرت در محیط‌های کشت استفاده شده
Table 2: Response of responsive genotypes to androgenesis at various anther culture madia

ژنوتیپ Genotype	محیط کشت Culture media				
	IMSS	N6	YPm	YP	CI
DH5×DH7	17/6%		8%		-
ETH-M82	8/5%	-	2%	-	2%
TWC 605	1/5%	-	-	-	-
SC 709	0/5%	-	-	-	
S61	2%	-	-	-	-
A188	-	0/75%	-	-	-
K74/1	-	-	1%	-	-
LA12	-	1/5%	1/5%	-	-

IMSS: Induction Medium Semi Solid **CI**: Callus Induction **YPm**: Modified YP Medium

میزان عکس‌العمل ژنوتپ A188 در محیط N6، 75/% بود که حاکی از عکس‌العمل ضعیف آندروژنیک آن می‌باشد. ویژگی محیط کشت N6 در این پژوهش، تنها میزان بالای ساکارز ($120\ gL^{-1}$) آن می‌باشد که می تواند تا حدی توجیه کننده عکس‌العمل این ژنوتیپ در محیط مذکور باشد. اینبرد لاین A188 به‌عنوان یک لاین غیر پاسخ دهنده از نظر کشت بساک معرفی شده است. (Genovesi and Collins, 1982) اینبرد لاین A188 همراه با اینبرد لاین‌های B73 و MO17 به‌عنوان ژنوتیپ‌هایی طبقه‌بندی گردید که یا به آندروژنز پاسخ نداده‌اند یا این‌که پاسخ بسیار ضعیفی داشته‌اند. در این پژوهش، هم اینبرد لاین‌های B73 و MO17 و نیز هیبرید آن‌ها، یعنی KSC704 هیچ گونه عکس‌العملی نشان ندادند و این یافته‌ها با نتایج (Genovesi and Collins, 1982) و (Petolino and Jones, 1986) مطابقت دارد.

واکنش ژنوتیپ‌های K74/1 در محیط کشت YPm حدود 1% بود، در صورتی‌که لاین ذرت سفید شیرین (LA12) با متوسط فراوانی 1/5% توانست در دو محیط کشت N6 و YPm ساختارهای شبه جنینی تشکیل دهد. دیگر ژنوتیپ‌های مورد بررسی پاسخ مثبتی نشان ندادند. نبود پاسخ آندروژنیک در سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این پژوهش می‌تواند نقش ژن‌ها در کنترل صفت آندروژنز را به وضوح نشان داد. اکثر پژوهش‌گران معتقدند که خصوصیات آندروژنیک به‌صورت ژنتیکی کنترل می‌شود و این خصوصیت مطمئناً مغلوب نیست (Barloy and Beckert, 1993). بنابراین می‌توان انتظار داشت خصوصیات آندروژنیک از ژنوتیپ‌های بسیار پاسخ دهنده نظیر DH5×DH7 و ETH-M82 که در این آزمایش عکس‌العمل خوبی داشته‌اند به سایر ژنوتیپ‌های برگزیده نظیر لاین‌های تجاری MO17، B73 و S61 قابل انتقال باشد.

نتایج آزمایشات پاسخ به جنین‌زایی در کشت بساک ذرت:

آزمایش اول: بررسی اثر محیط کشت و پیش‌تیمار سرمایی بر القای جنین‌زایی در کشت بساک ژنوتیپ‌های ذرت

در این آزمایش اثر 5 محیط کشت بساک مختلف (شامل محیط‌های کشت IMSS, Ypm, N6, Yu-Pei IMS) و دو پیش‌تیمار سرمایی (14 و 21 روز نگه‌داری بساک‌ها در دمای $8^{\circ C}$ در یخچال) بر القای جنین‌زایی در دو هیبرید ETH-M82 و DH5×DH7 بررسی شد. این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با 5 تکرار انجام گردید. تجزیه واریانس داده ها نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها و نیز بین محیط‌های کشت مورد بررسی از نظر تعداد ساختارهای شبه‌جنینی تشکیل شده، تفاوت معنی‌دار وجود داشت، ولی بین پیش‌تیمار سرمایی 14 و 21 روزه تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد (جدول 3). در رابطه با تاثیر پیش تیمار سرمایی، Tsay و همکاران (1986) تیمار سرمایی 9- 6 روزه را در دمای $9^{\circ C}$ به همراه 9% ساکارز در محیط کشت را نسبت به تیمار سرمایی 12 روزه برتر دانسته‌اند (Tsay *et al.*, 1986)، در صورتی‌که دیگر پژوهش‌گران (Aulinger, 2002; Nageli, 1998)، تیمار سرمایی 14 روزه را مناسب دانسته‌اند. برخی از پژوهش‌گران نیز تیمار سرمایی 28-21 روز در دماهای مختلف را بررسی کرده‌اند، لیکن به-

Archive of SID
www.SID.ir

دلیل متفاوت بودن مواد گیاهی و شرایط محیطی کشت، نتایج حاصله با هم تفاوت زیادی داشته و بعضاً متناقض‌اند. محیط کشت مایع IMS با میانگین 15/05 ساختار شبه-جنینی در 100 بساک کشت شده، بیش‌ترین میزان را به خود اختصاص داد، درصورتی‌که محیط کشت N6، با 3/726 ساختار شبه‌جنینی در 100 بساک کشت شده کم‌ترین مقدار را داشت. محیط کشت IMS به‌صورت مایع می‌باشد و مشاهدات این پژوهش نشان می‌دهد که فراوانی القای جنین‌زایی در محیط‌های کشت مایع به‌دلیل امکان دسترسی بهتر به مواد غذایی موجود در محیط کشت نسبت به محیط-های کشت جامد برای بساک ذرت بیشتر می‌باشد (شکل1).

جدول3 : تجزیه واریانس محیط‌های کشت بساک مورد بررسی از نظر تعداد ساختارهای شبه جنینی تشکیل شده در ژنوتیپ‌های ذرت

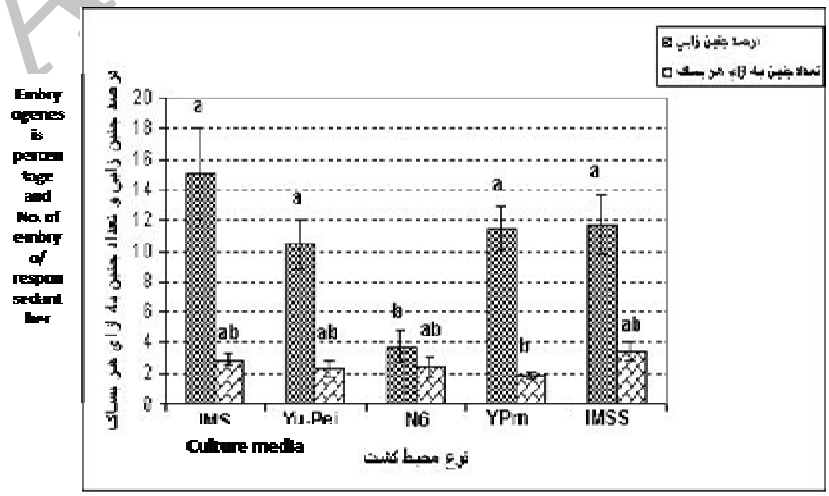
Table 3. Analysis of variance for embryo-like structures (ELSs) of maize genotypes on different anther culture media

میانگین مربعات Mean of squre تعداد ELS در هر بساک پاسخ داده No. of ELSs / Responsed Anthers	بساک‌های پاسخ داده (%) Responsed Anthers	درجه آزادی Degree of Freedom	منبع تغییرات Source of Variation
2/013**	938/012**	1	رقم Variety
0/011*	345/667**	4	محیط کشت Culture media
0/004$^{n.s}$	122/044$^{n.s}$	1	پیش‌تیمار سرمایی Cold Pre- Treatment
0/004$^{n.s}$	179/563*	4	رقم × محیط کشت Variety × Culture media
0/001 $^{n.s}$	12/355$^{n.s}$	1	رقم × سرما Variety × Culture media
0/007 $^{n.s}$	6/044$^{n.s}$	4	محیط کشت × سرما Vriety × Cold Pre-Treatment
0/006$^{n.s}$	92/925$^{n.s}$	4	رقم × محیط کشت × سرما Variety × Culture media × Cold Pre-Treatment
0/004	59/630	80	خطا Erorr
		99	کل Total
2/44	20/61		CV (%)

ELS: ساختارهای شبه جنینی res ELS: Embryo

** و *: اختلاف آماری معنی‌دار به‌ترتیب در سطح احتمال آماری 1% و 5% n.s: اختلاف آماری غیر معنی‌دار در سطح احتمال 5%

ns, * and ** : not significant , significant at 5% and 1% level of probability, respectively.



شکل1: اثر نوع محیط‌کشت بر درصد جنین‌زایی و تعداد جنین به ازای هر بساک پاسخ داده ذرت

Fig1: Effect of culture media on embryogenesis percent and number of embryos / responsed anthers of maize

Archive of SID

www.SID.ir

در خصوص پاسخ ضعیف محیط کشت N6 در القای جنین‌زایی، به‌نظر می‌رسد میزان بالای ساکارز یعنی $120\ gl^{-1}$ در محیط کشت می‌تواند عامل محدود کننده‌ای باشد، با توجه به این‌که مصرف $60\ gl^{-1}$ تا $90\ gl^{-1}$ ساکارز در محیط‌های کشت القای جنین‌زایی متداول بوده و توصیه شده است (Aulinger, 2002; Nageli, 1998). شایان ذکر است که اصولا محیط کشت مبتنی بر فرمولاسیون محیط کشت N6 (Chu, 1981) و یا محیط کشت Ypm (Ku *et al*., 1981) که با $10^{-4}M$ FeEDTA تقویت شده باشد، به‌طور معمول برای کشت بساک ذرت مورد استفاده قرارگرفته است (Buter, 1997).

در این پژوهش نیز از محیط‌های کشت N6 و Yu-Pei (YP) و یا تغییر یافته آن‌ها استفاده گردید. نکته حایز اهمیت دیگر آن است که محیط‌های IMSS، IMS و YP توسط فیلتر استریل و محیط‌های N6, YPm با اتوکلاو کردن استریل شدند. به‌علاوه محیط‌های کشت IMS, IMSS حاوی زغال فعال نیز هستند. فیلتراستریل کردن محیط کشت که برای ضد عفونی محیط‌های کشت مایع انجام می‌شود توانسته است فراوانی ساختارهای شبه جنینی را در مقایسه با اتوکلاو کردن محیط کشت القا افزایش دهد (Buter *et al*. 1993; MacDonald, 1992).

این تفاوت به‌دلیل تشکیل مواد بازدارنده در طی هیدرولیز ساکارز یا کربوهیدرات‌های دیگر در زمان اتوکلاو کردن است، زیرا محیط کشت در معرض درجه حرارت‌های بالا قرار می‌گیرد (Buter *et al*. 1993). در این پژوهش محیط کشت IMS نسبت به محیط کشت‌های دیگر یعنی YPm و N6 که تنها اتوکلاو شده اند، برتری داشت. به‌نظر می‌رسد مزیت اولیه زغال فعال در محیط کشت جذب مواد بازدارنده‌ی محیط است که در طی فرآیند اتوکلاو شدن تولید گردیده است.

آزمایش دوم: بررسی اثر کربوهیدرات‌ها بر پاسخ به جنین‌زایی در کشت بساک ذرت

در این آزمایش اثر، نوع و میزان کربوهیدرات‌ها شامل 5 تیمار کربوهیدرات $45\ g1^{-1}$ ساکارز+ $45\ g1^{-1}$ مالتوز، $60\ g1^{-1}$ ساکارز، $90\ g1^{-1}$ ساکارز، $90\ g1^{-1}$ مالتوز و $120\ g1^{-1}$ ساکارز در محیط کشت مایع Yu-pei بر پاسخ به جنین‌زایی ژنوتیپ DH5×DH7 ذرت در قالب طرح کاملا تصادفی با 8 تکرار بررسی شد. شایان ذکر است که معیار انتخاب مقادیر کربوهیدرات مورد استفاده در این آزمایش، بر اساس محیط کشت‌های متداول مورد استفاده در کشت بساک ذرت بوده است. نتایج تجزیه واریانس حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین نوع و غلظت کربوهیدرات‌ها بر پاسخ به جنین‌زایی بساک‌ها می‌باشد (جدول4).

مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که محیط کشت Yu-pei حاوی $90\ g1^{-1}$ ساکارز با تولید 21/82 ساختار شبه‌جنینی در 100 بساک کشت شده، بهترین محیط کشت القای جنین‌زایی برای ژنوتیپ DH5×DH7 می‌باشد. ضمنا محیط کشت Yu-pei که حاوی $60\ g1^{-1}$ ساکارز، می‌باشد با تولید 18/09 شبه‌جنین در 100 بساک کشت شده، تفاوت معنی‌داری با محیط کشت حاوی $90\ g1^{-1}$ ساکارز نداشت. بساک‌های کشت شده در محیط کشت‌های حاوی $45\ g1^{-1}$ ساکارز + $45\ g1^{-1}$ مالتوز و نیز محیط کشت حاوی $120\ g1^{-1}$ ساکارز به‌ترتیب با 7/61 و 8/14 ساختار شبه‌جنینی در 100 بساک کشت شده، ضعیف‌ترین پاسخ را نشان دادند (شکل 2).

جدول 4: تجزیه واریانس بررسی اثرات کربوهیدرات‌ها بر القای جنین زایی در کشت بساک ذرت ژنوتیپ DH5×DH7

Table 4: Analysis of variance for carbohydrates effects on embryogenesis induction of DH5 ×DH7 maize genotype anther culture

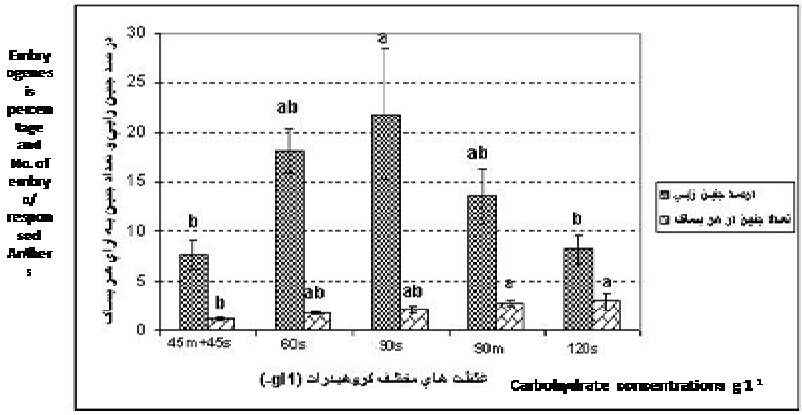
منبع تغییرات Source of Variation	درجه آزادی Degree of Freedom	میانگین مربعات Mean of Squre	
		بساک‌های پاسخ داده (درصد) Responsed Anthers (%)	تعداد ELS در هر بساک پاسخ داده No. of ELSs/ Resonsed Anthers
کربوهیدرات Carbohydrate	4	306/307*	40/04 *
خطا Error	35	97/955	1/512
کل Total	39		
CV (%)		25/56	5/8

** و *: اختلاف آماری معنی‌دار به‌ترتیب در سطح احتمال آماری 1% و 5% n.s: اختلاف آماری غیر معنی‌دار در سطح احتمال 5%

ELS: ساختارهای شبه جنینی ELS: ebryo like structures

ns, * and ** : not significant , significant at 5% and 1% level of probability, respectively.

www.SID.ir



شکل 2: اثرات کربوهیدرات بر درصد جنین‌زایی و تعداد جنین در هر بساک پاسخ داده ذرت

Fig 2: The effects of carbohydrate on embryogenesis percent and number of embryos /responsed anthers of maize

Tsay و همکاران (1986) در بررسی تاثیر عوامل موثر بر باززایی گیاهان هاپلویید از طریق کشت بساک ذرت دریافتند که 9% ساکارز در محیط کشت N6 می‌تواند نسبت به 3، 6، 12 و یا 15 درصد ساکارز بهتر باشد. نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نیز با نتایج (Tsay *et al*. 1986; Buter, 1993; Nageli, 1998; Aulinger, 2002،) مطابقت دارد.

هم‌چنین پژوهش‌ها نشان داده است که کربوهیدرات ساکارز بهترین نتیجه را در القای جنین‌زایی ذرت دارد، گرچه غلظت‌های 6% تا 15% توصیه شده‌اند، اما در اکثر آزمایش‌ها معلوم شده که غلظت 9% ساکارز مطلوب می‌باشد، با این وجود برای برخی از ژنوتیپ‌ها غلظت 12% ساکارز علی‌رغم اختلاف غیر معنی‌دار آماری بهتر به‌نظر می‌رسد (Genovesi and Collins, 1982).

بررسی نتیجه تاثیر کربوهیدرات بر صفت تعداد ELS در هر بساک نشان داد که محیط کشت حاوی $120\ g1^{-1}$ ساکارز، با میانگین 2/91 ساختار شبه‌جنینی در هر بساک کشت شده، بیش‌ترین میزان را داشت، البته محیط کشت حاوی $90\ g1^{-1}$ ساکارز یا مالتوز و نیز محیط کشت دارای $60\ g1^{-1}$ ساکارز هم از نظر تعداد ELS تولید شده در هر بساک، تفاوت معنی‌داری را با محیط کشت حاوی $120\ g1^{-1}$ ساکارز نشان ندادند. با توجه به‌نتایج متفاوت به‌دست آمده در این بخش نسبت به بخش قبلی، به‌نظر می‌رسد صفت درصد بساک‌های القا شده برای جنین‌زایی با تعداد ELS در هر بساک رابطه مثبتی ندارد، بلکه حتی احتمال می‌رود در شرایطی که تعداد بساک کم‌تری برای جنین‌زایی القا شده باشند، به دلیل رقابت کم‌تر، ساختارهای شبه‌جنینی حاصله به تعداد بیش‌تری ظاهر شوند و یا از اندازه بزرگ‌تری در مقایسه با زمانی که تعداد بساک بیش‌تری پاسخ نشان داده اند، برخوردار می‌باشند.

بررسی اثر غلظت‌های مختلف ساکارز در محیط کشت N6 بساک ذرت نشان داد که در غلظت 3% ساکارز هیچ یک از بساک‌های کشت شده شبه‌جنین تولید نکردند، ولی در غلظت 6% و 9% ساکارز به‌ترتیب 9% و 12% از بساک‌ها تولید ساختارهای شبه‌جنینی نمودند. با افزایش غلظت ساکارز به 12% و 15%، پاسخ تا حد تولید 0/5% ساختار شبه جنینی در 100 بساک کشت شده کاهش یافت (Tsay *et al*. 1986). نتایج حاصله از این پژوهش با نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های (Tsay, *et al*. 1986 Buter *et al*. 1993; Nageli, 1998; Aulinger, 2002.) مطابقت دارد، اما غلظت 12% ساکارز که توسط (Genovesi and collines, 1982) و نیز (Obert and Barnábas, 2004)، برای کشت بساک برخی ژنوتیپ‌های ذرت توصیه شده است، در ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این آزمایش مطلوب نمی‌باشد.

آزمایش سوم: بررسی تاثیر نحوه قرارگیری بساک‌ها بر روی محیط کشت القای جنین‌زایی

در این آزمایش اثر سه نحوه قرارگیری بساک‌ها روی محیط کشت (شامل کشت بساک‌ها از جهت لبه بر روی محیط‌کشت، کشت از پهنای بساک و کشت به صورت تصادفی (معمولی) بر میزان القای جنین زایی در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با 5 تکرار بررسی شد. محیط‌کشت مورد استفاده (Jardinaud *et a1*. 1995a Ypm) حاوی $60\ g.\ l^{-1}$ ساکارز می‌باشد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که با وجود برتری تیمار نحوه قرارگیری بساک‌ها از جهت لبه بر روی محیط‌کشت، بین تیارهای اعمال شده تفاوت معنی‌داری از نظر میزان القای جنین‌زایی وجود ندارد (جدول5).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 5: تجزیه واریانس تاثیر نحوه قرارگیری بساک‌های ذرت بر روی محیط القای جنین‌زایی

Table 5: Analysis of variance for the effects of maize anthers position on induction medium

منبع تغییر Source of Vriation	درجه آزادی Degree of Freedom	میانگین مربعات Means of Squres	
		بساکهای پاسخ داده (%) Responsed Anthers (%)	تعداد ELSدر هر بساک پاسخ داده No. of ELSs / Responsed Anthers
نحوه کشت بساک kind of Anther Culture	2	5/056 n.s	0/284 n.s
خطا Error	15	4/944	1/470
کل Total	17		
CV (%)		22/20	12/52

ns: اختلاف آماری غیر معنی‌دار در سطح احتمال 5%

ELS: ساختارهای شبه جنینی

ns: not significant. ELS: embryo like structures

بر اساس نتایج به‌دست آمده در هر دو صفت مورد بررسی، یعنی درصد بساک‌های پاسخ نشان داده و نیز تعداد ELS در هر بساک پاسخ داده، معلوم گردید که بهترین وضعیت قرارگیری بساک‌ها بر روی محیط کشت، از جهت لبه بساک می‌باشد و در درجه بعدی کشت بساک‌ها به‌طور تصادفی (معمولی) مطلوب می‌باشد، به طوری‌که درصد بساک‌های پاسخ نشان داده در کشت از جهت لبه 4/32 و در کشت معمولی 3/33 بود، لیکن در نحوه کشت از طرف پهنا، فقط 2/5% از بساک ها به جنین‌زایی پاسخ مثبت نشان دادند.

در بررسی عوامل مؤثر بر باززایی گیاهان‌هاپلویید از طریق کشت بساک ذرت گزارش شد که جهت قرارگیری بساک‌ها از جهت لبه یا پهنا بر روی محیط کشت جنین زایی، تشکیل بیشتر ساختارهای شبه جنینی را تحریک می‌کند. به‌علاوه در پیش تیمارهای مطلوب دمایی و شرایط مناسب محیط کشت، بیش از 12% از بساک‌های کشت شده توانستند شبه جنین تولید نمایند (Tsay *et al*. 1986). نتایج حاصله از این پژوهش با پژوهش‌ها (Tsay *et al*. 1986) مطابقت و هماهنگی دارد. البته شایان ذکر است که تفاوت موجود بین تیمارهای این آزمایش از نظر آماری غیر معنی‌دار می‌باشد، لیکن روند برتری تیمارها نسبت به‌هم کاملاً مشابه با نتایج Tsay وهمکاران می‌باشد. لازم به توضیح است که در رابطه با نحوه قرارگیری بساک‌ها روی محیط کشت گزارش دیگری ارائه نشده است. در رابطه با صفت تعداد ELS در هر بساک نیز تفاوت‌های موجود بین تیمارهای اعمال شده در این تحقیق غیر معنی‌دار برآورد گردید، به‌طوری‌که در تیمار کشت بساک از جهت لبه، بساک‌ها توانستند 8/83 ساختار شبه جنینی تولید نمایند، در صورتی‌که در تیمار کشت معمولی و کشت از جهت پهنا به‌ترتیب6/0 و 5/1 ساختار شبه جنینی تولید گردید. به‌علاوه میانگین تعداد ساختار شبه جنینی در هر بساک در تیمارهای نحوه قرارگیری بساک‌ها برروی محیط کشت تفاوت غیر معنی‌دار داشتند، به طوری‌که تیمار کشت بساک از لبه با 2/286 بیش‌ترین و تیمار کشت تصادفی با 1/853 ساختار شبه جنینی در هر بساک کم‌ترین تعداد ساختار شبه جنینی را داشتند.

از آن‌جایی که درون هر بساک تعدادی بسیار زیادی میکروسپور وجود دارد، بنابراین به‌منظور تولید جنین یا ساختارهای شبه جنینی در کشت بساک‌ها، انتظار می‌رود که رقابت شدیدی بین میکروسپورهای درون هر بساک به‌وجود آید، پس در روش کشت بساک از جهت لبه بر روی محیط کشت، با توجه به این‌که میکروسپورهای کمتری در تماس با محیط کشت قرار می‌گیرند، انتظار می‌رود بتوانند به خوبی رشد و نمو یافته و به سوی تشکیل ساختارهای شبه جنینی پیش روند. ضمناً جذب و توزیع مواد غذایی ممکن است که با نحوه قرار گرفتن بساک‌ها بر روی محیط کشت مرتبط باشد.

ارزیابی باززایی گیاه از کشت بساک ذرت: باززایی گیاه از کشت بساک دو ژنو تیپ DH7 × DH5 و ETH – M82 با موفقیت و با فراوانی مطلوبی صورت پذیرفت. شایان ذکر است که فراوانی القای ساختارهای شبه جنینی در سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این پژوهش بسیار کم بود و هیچ‌یک از جنین‌های حاصله نیز باززایی نشدند. محیط باززایی گیاهی برای جنین‌های هاپلویید دراین پژوهش در سه محیط MS (1962) و RM (Saisingtong, 1996) بود. نتایج بررسی‌ها (Jardinaud, 1995) Ypnase (Murashige and Skoog,

Archive of SID

www.SID.ir

حاکی از عدم مطلوبیت محیط RM توصیه شده توسط (Saisingtong *et al*. 1996) جهت باززایی گیاه در ژنوتیپ های مورد بررسی در این پژوهش بود، به‌نحوی که رشد ساختارهای شبه جنینی حاصله از کشت بساک در این محیط پس از مدت زمان 4 الی 8 هفته متوقف شد و سپس ساختارهای شبه جنینی نکروزه شده و از بین رفتند. از سویی با ارزیابی مشاهده ای پاسخ بساک‌ها در محیط‌های کشت باززایی گیاه، معلوم شد که محیط Ypnase جهت باززایی از مطلوبیت بیشتری نسبت به محیط‌های کشت MS و RM برخوردار است. برخی پژوهش‌گران نظیر (Hassan *et al* 2001)، با استفاده از محیط‌های کشت رایج برای بساک ذرت نظیر N6 و Yu-Pei و تغییر در ترکیب هورمونی محیط‌های کشت جنین‌زایی, باززایی مستقیم گیاهچه را در کشت بساک ذرت گزارش نموده‌اند. دراین پژوهش ژنوتیپ‌های DH5×DH7 و ETH-M82 توانستند در مواردی در محیط کشت IMS یا Yu-Pei به‌طور مستقیم تولید ریشچه و ساقچه و متعاقب آن گیاهچه نرمال نمایند. بنابر این، قابلیت باززایی مستقیم در محیط کشت القای جنین وجود دارد.

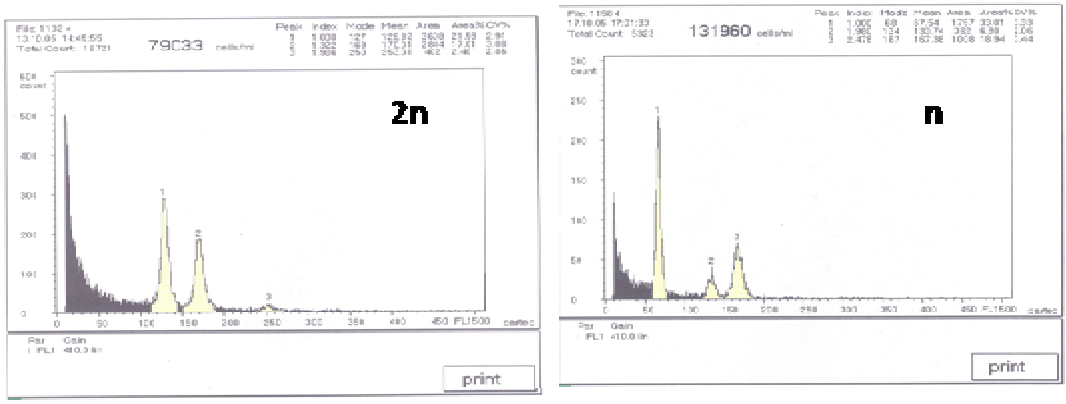
تعیین سطح پلوییدی گیاهان باززایی شده از طریق کشت بساک: بر طبق نتایج پژوهش‌ها انجام شده (Aulinger, 2002), میزان Fl_1 Gain Par (فلورسانس نسبی) مناسب دستگاه فلوسایتومتر، برای نمونه های ذرت حدود 400 می‌باشد, و نقطه Peak Fl100 و Fl200 به‌ترتیب مراحل G1 و G2 یا M (تقسیم میتوز) می باشند, به‌طوری‌که این نقاط به‌عنوان ماده گیاهی دیپلویید یا هاپلویید مضاعف شده تفسیر می‌شود، در صورتی‌که نقطه‌های Peak بین Fl50 و Fl 100 به‌عنوان مواد گیاهی هاپلویید شناخته می‌شود. شایان ذکر است که در این پژوهش Fl_1 Gain Par مناسب به‌طور تجربی حدود 390 برآورد شد، بنابراین تمامی نمونه‌ها به‌صورت یک‌نواخت بر اساس همین معیار با دستگاه بررسی شدند. شکل3 نمونه‌ای از شکل‌های فلوسایتومتری مربوط به دو نمونه گیاه هاپلویید و دیپلویید ذرت را نشان می‌دهد. از گیاه جعفری به عنوان استاندارد در کنار نمونه‌های ذرت استفاده شد. از طرفی با توجه به این‌که گیاه ذرت, نظیر سیب‌زمینی دارای دو نقطه پیک (اوج) می‌باشد که یکی مربوط به G1 یعنی قبل از سنتز DNA و دیگری مربوط به مرحله G2 (پس از سنتز DNA) است، لذا استفاده از گیاه دیپلویید ذرت به‌عنوان شاهد در کنار نمونه‌های باززایی شده منطقی به‌نظر نمی‌رسد، چون پیک مربوط به G2 گیاه هاپلویید می‌تواند بر روی پیک G1 گیاه دیپلویید منطبق گردد و لذا ارزیابی مطلوبی انجام نخواهد شد. از طرفی اگر گیاه مورد بررسی دارای سلول‌های با سطوح مختلف پلوییدی (پلی‌سوماتی) باشد، نتایج منحنی‌های به‌دست آمده می‌تواند منحرف کننده باشد.

نتایج فلوساتیومتری نشان داد که از 40 گیاه ارزیابی شده که با شاهد جعفری مقایسه گردیده‌اند، 10 گیاه (یعنی 25% گیاهان) دیپلویید و 30 گیاه (75% گیاهان) هاپلویید می‌باشند. (Aulinger, 2002) در ارزیابی سطح پلوییدی گیاهان باززایی شده از کشت بساک به‌روش فلوسایتومتری، گزارش کرد که پیک نمونه بین اعداد 50 تا 100 نشان دهنده طبیعت هاپلوییدی (n=x=10) گیاه مورد بررسی است، در صورتی‌که اعداد 100 تا 200 دیپلویید بودن (2N=2X=20) را اثبات می‌کند (Aulinger, 2002).

پژوهش‌گران در ارزیابی سطح پلوییدی 53 گیاه باززایی شده از کشت بساک به‌روش شمارش کروموزوم‌های نوک ریشه ذرت دریافتند که 51 گیاه هاپلویید (96/30 %) و فقط 2 گیاه دیپلویید 3/7% می‌باشد. به‌علاوه از کل 43 گیاه نرمال باززایی شده، 2 گیاه آلبینوز و 41 گیاه سبز بودند (Tsay *et al*, 1986). نکته حائز اهمیت دراین پژوهش آن است که چون در بخشی از محیط‌های کشت مورد استفاده در جنین‌زایی بساک‌ها از کلشیسین به میزان $250\ m\ g\ l^{-1}$ در محیط IML استفاده گردید، لذا این ترکیب می‌تواند تا حدودی فراوانی گیاهان دیپلویید را در بین گیاهان ارزیابی شده افزایش دهد. چون نمونه‌های بساک ذرت ابتدا به‌مدت 3 الی 7 روز در محیط IML حاوی کلشیسن مایع کشت شدند و بعد به محیط کشت نیمه جامد IMSS بدون کلشیسین منتقل گردیدند، بنابر این یکی از دلایل فراوانی بیشتر گیاهان دیپلویید در این پژوهش نسبت به نتایج پژوهش‌گران قبلی (Obert and Barnábas, 2004) می‌تواند مصرف کلشیسین در محیط القای جنین زایی (IML) در مراحل اولیه کشت بساک ذرت باشد. از طرفی مطالعات نشان داده است که فاکتورهای ژنتیکی کنترل کننده تولید جنین‌های آندروژنیک بسیار حائز اهمیت هستند (Fennel and Hauptman, 1992). بالطبع شناخت و انتقال خصوصیات آندروژنیک برگزیده می‌تواند در اصلاح کشت بساک و میکروسپور ذرت کار آمد و سودمند باشد. بهبود ژنتیکی آندروژنز درون شیشه‌ای به‌وسیله نوترکیبی افراد حاصل از کشت میکروسپور امکان‌پذیر است (Petolino and Jones, 1986).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل3: نمونه‌ای از فلوسایتومتری مربوط به دو نمونه گیاه هاپلویید (شکل راست) و دیپلویید ذرت (شکل چپ). گیاه جعفری به‌عنوان استاندارد در نظر گرفته شده است

Fig 3: Samples of flowcytometery on haploid (abow) and diploid (below) plants of maize (standard plant is jafari)

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های 9-10 متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir