در
زراعت و باغبانی شماره ۷۳، زمستان ۱۳۸۵
پژوهش و سازندگی

مطالعه پاسخ به کال‌زایی و باززایی گیاه در کشت جنین‌های نارس ذرت

• **سعید خاوری خراسانی**، استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی
• **نسیم منصوری**، دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
• **احمد معینی**، استادیار گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
• **امیر موسوی**، استادیار و محقق پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
• **قاسم کریم‌زاده**، دانشیار گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: مهرماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: فروردین ماه ۱۳۸۵

E. mail: khavaris80@yahoo.com

چکیده

در این پژوهش ۱۰ ژنوتیپ ذرت شامل لاین‌های اینبرد، هیبریدهای سینگل‌کراس و تری وی کراس از ژرم پلاسم موجود در بخش تحقیقات ذرت و گیاهان علوفه‌ای کشور به همراه اینبرد لاین ذرت سفید A۱۸۸ به عنوان شاهد از نظر پاسخ به کال زایی بررسی شدند. ژنوتیپ‌ها در سال زراعی ۱۳۸۳ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس کشت گردیدند. جنین‌های نارس ۱۰ الی ۱۴ روز پس از خود گشنی بوته‌ها جدا و بر روی محیط N۶ کشت شدند. در زمان واکشت ریزنمونه‌ها، کال‌های غیر جنین‌زا حذف و میزان تولید کال‌های جنین زای نوع ۱ و ۲ در ژنوتیپ‌های با واکنش مطلوب تعیین گردید. پس از انتقال ریز نمونه‌ها به محیط کشت، گیاهچه‌های سالم و طبیعی باززایی و به خاک منتقل شدند. نتایج حاصله تفاوت‌های معنی‌داری را بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی از نظر تولید کالوس جنین زا نشان داد، به‌طوری‌که حداکثر فراوانی تولید کال‌های جنین زا را ژنوتیپ‌های A۱۸۸ (شاهد)، S۶۱، SC۷۰۹ و SC۴۰۳ بترتیب با میزان ۹۲٪ ، ۸۸٪، ۸۲٪ و ۸۱٪ به خود اختصاص دادند. با توجه به میزان کالوس زایی بالای مشاهده شده در لاین تجاری زودرس S۶۱ در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها می‌توان از این لاین در برنامه تراریختی ژنتیکی به نحو مطلوبی بهره گرفت. در بررسی میزان باززایی گیاه سبز در ۳ ژنوتیپ (A۱۸۸, S۶۱ شاهد) و SC۷۰۹ تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد، به‌طوریکه هیبرید SC۷۰۹ با میانگین ۳۶/۱۵ درصد و لینه اینبرد S۶۱ با ۱۴/۲۵ درصد کمترین میزان باززایی گیاه را به خود اختصاص دادند.

کلمات کلیدی: جنین نارس، کالوس، باززایی گیاه، ذرت

www.SID.ir

Pajouhesh & Sazandegi No:73 pp: 43-49

Study of callus induction and plant regeneration of maize genotypes (*Zea mays* L.) using immature embryo culture

By: Khavari Khorasani, Assistant Professor and Researcher of Agricultural and Natural Resources of Khorasan Razavi Province Center, Saeed., Mansouri, M.Sc. Student of Plant Breeding at Tarbiat Modares University. Nasim., Moieni, Assistant Prof., of Plant breeding at Tarbiat Modares University, Ahmad., Mousavi, Assistant Professor and Researcher of national Institute for Genetic Engineering and Biotechnology.

In this study, response of 10 maize genotypes consisted of inbred lines, single and three-way crosses with inbred line A188 as control to callus induction and plant regeneration was evaluated at Tarbiat Modarres University in 2004. Immature embryos were excised from donor plants 10-14 days after selfing and were culturd on N6 medium. The non-embryogenic, rizhogenic and watery calli were removed and the embryogenic calli (type 1 and type 2) were subcultured on regeneration medium. Then the normal plantlets were transferred to sterilized soil. The results showed significant differences among corn genotypes for producing embryogenic callus. The highest frequency of embryogenic callus produced by S61, A188, SC709, with 92%, 88% and 82%, respectively. Analysis of variance for regeneration on 3 genotypes (S61, A188 and SC709) showed significant differences between genotypes. Hybrid SC709 with 36.12% and inbred line S61 with 14.25% had the highest and lowest percent of plant regeneration, respectively.

Key words: Immature embryo, Callus types, Plant regeneration, *Zea mays L.*

مقدمه

کشت درون شیشه‌ای ذرت اولین بار به وسیله لارو در سال ۱۹۴۹ گزارش شد، اما تا سال ۱۹۷۵ که گرین و فیلیپس توانستند گیاه سبز باززایی کنند به تعویق افتاد(۱۱). از سویی بخش‌های مختلف گیاه مثل اندام‌ها یا بافت‌ها (نظیر لپه‌های جنین نارس زیگوتی) و یا تک سلول‌هایی نظیر پروتوپلاست‌ها و میکروسپورها می‌توانند برای کشت درون شیشه‌ای ذرت مورد استفاده قرار گیرند(۴). کشت جنین‌های زیگوتی نارس در مراحل ابتدایی نمو متداول‌ترین ریز نمونه مورداستفاده برای کشت بافت ذرت است (۱۴).

در ذرت دو نوع کالوس جنین‌زا نوع ۱ و ۲ بر اساس مورفولوژی تعیین وشناسایی شده‌اند، کالوس نوع ۱، یک توده فشرده سلولی است که جنین‌های سوماتیکی تولید می‌کند و نمایانگر ساختارهای مرکب و سازمان یافته است. این نوع کالوس براحتی از طریق کشت جنین نارس ذرت بدست می‌آید (۱۱). شایان ذکر است که کالوس‌های نوع ۱ از بافت مریستم نوساقه و بخش‌های شبه لپه‌ای تشکیل شده‌اند. کالوس نوع ۲ ترد و شکننده است و توانایی تولید گیاه را در طول زمان حفظ می‌کند و به دلیل طبیعت شکننده‌اش، امکان ایجاد سوسپانسیون سلولی و کشت پروتوپلاست را فراهم می‌کند و برای انواع دستورزی‌های درون شیشه‌ای سودمند است (۴، ۷). باززایی گیاهی از کالوس نوع ۲ اولین بار به وسیله Armstrong و Green(۳) انجام شد. کالوس نوع ۲ با فراوانی کمتری نسبت به نوع ۱ القا شده و از ژنوتیپ‌های محدودتری بدست می‌آید(۲۱،۱۹،۷). شایان ذکر است که از نظر مرحله نموی ابتدا کالوس نوع ۲ و سپس نوع ۱ تشکیل می‌شود و به همین ترتیب نیز این انواع شناسایی شده‌اند(۱۹).

بر خلاف اینکه کالوس‌های نوع ۱ و ۲ هر دو از سلول‌های اولیه داخل لپه‌ها منشأ می‌گیرند (۱۱)، اما به نظر می‌رسد اختلافات موجود به دلیل اثرات ژنوتیپ جنین (۷) مرحله نموی جنین ، تنوع محیطی مؤثر بر گیاهان مادری(۲) و محیط کشت باشد، کما اینکه در تحقیقی معلوم گردید که افزودن ال-پرولین به محیط کشت N۶ تشکیل کالوس جنین‌زای نوع ۲ را القا می‌کند(۳). از سویی Henry و همکاران (۱۲) در تجزیه ژنتیکی واکنش گیاهان به کشت بافت‌های سوماتیکی دریافتند که بازوی بلند کروموزم شماره ۹ ذرت در جنین‌زایی و باززایی گیاهی نقش اساسی دارد. همچنین وراثت پذیری بالایی برای تولید و القای کالوس جنین‌زا و نیز باززایی گیاه از جنین‌های نارس ذرت برآورد شده است. در واقع القای کالوس می‌تواند به وسیله تلاقی ژنوتیپ‌های غیر پاسخ دهنده با ژنوتیپ‌های پاسخ دهنده بهبود یابد (۲۰). در تحقیقی Rao و همکاران (۱۸) جنین‌های نارس ۵ لینه اینبرد و یک هیبرید ذرت ۱-DHM و یک ذرت شیرین را از نظر راندمان کال‌زایی و جنین‌زایی ارزیابی کردند. از بین این ژنوتیپ‌ها ذرت هیبرید ۱-DHM فراوانی بالایی(۵۲٪) از جنین زایی سوماتیکی در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر (۳۸- ۱۰ درصد) بر روی محیط کشت حاوی $2.4D\ 3\ mg\ l^{-1}$ و ۳٪ ساکارز نشان دادند(۱۸). در تحقیقی که Carvalho و همکاران برای غربال ۱۱۳ لینه اینبرد ذرت گرمسیری برای القای کالوس از جنین‌های نارس زیگوتی انجام دادند دو مورفوتیپ از کالوس ترد و شکننده مشاهده کردند، به طوری‌که اینبرد لاین های ۴۸ ، ۱۰۹ و ۷۰۵ کالوس‌های نرم و شکننده‌ای تولید کردند که در درون یک ماده موسیلاژی جنین‌های سوماتیکی بسیاری داشتند، اما اینبردهای ۲۹۹، ۳۴۰، ۳۶۶، ۳۸۹ و ۳۹۸ کالوس شکننده، ترد و غیرموسیلاژی با جنین‌های سوماتیکی خیلی کمتری تولید کردند (۷).

Archive of SID
www.SID.ir

ملکی و همکاران با استفاده از جوانه انتهایی گیاهچه‌های بذری ژنوتیپ‌های ذرت شیرین توانستند به تکثیر سریع و باززایی گیاه اقدام نمایند(۲). این روش برای ژنوتیپ‌های ذرت دندان اسبی بررسی نشده است.

صلواتی وهمکاران در پژوهشی واکنش ۲۵ ژنوتیپ ذرت شامل ۱۲ اینبرد لاین، ۱۱ هیبرید سینگل کراس، یک هیبرید دابل کراس و یک کمپوزیت آزاد گرده افشان را از نظر کالوس زایی و باززایی از کشت جنین بالغ بررسی کردند. جنین بالغ لاین‌های اینبرد در هیبریدهای ذرت در محیط کشت N۶ وMS کشت و از نظر صفات مختلف ارزیابی شد. نتایج نشان داد که واکنش ژنوتیپ‌ها به کالوس‌زایی و باززایی گیاهچه از کالوس حاصل از جنین بالغ بسیار متفاوت است. بیشترین ظرفیت تولید کالوس بر اساس وزن تر و خشک، در اینبرد لاین IL۸ ، هیبریدهای SC۹(IL۶ × IL۱۰′) و SC۷(IL۸ × IL۴′) و بالاترین میزان رشد نسبی و سرعت رشد کالوس به ترتیب در اینبرد لاین IL۱ و هیبرید SC۹ مشاهده شد(۱). در رابطه با شناسایی ژنوتیپ‌های برتر ذرت از نظر میزان پاسخ به کال‌زایی در کشت جنین نارس گزارشی ارائه نشده است. از آنجائی که برای تمامی گونه‌های غلات ریز نمونه جنین‌نارس، برای کشت بافت مطلوب می‌باشد، از طریق آن می‌توان با جنین‌زایی سوماتیکی گیاهان بارور زیادی را باززایی کرد(۶).

هدف از این تحقیق بررسی واکنش برخی ژنوتیپ‌های ذرت موجود در کشور از جنبه تولید کالوس جنین زا از کشت جنین نارس می‌باشد تا از این طریق بتوان موفقیت روش‌های تراریختی ژنتیکی را در ذرت افزایش داد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال زراعی ۱۳۸۳ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. در ذیل مراحل انجام آزمایش تشریح می‌گردد.

الف)گیاهان دهنده جنین نارس

بذور ۱۰ ژنوتیپ ذرت شامل ۵ لینه اینبرد به نام‌های TVA۹۲۶, A۱۸۸-۱-۴۲-OH۴۳/۱، K۱۲۶۳/۲ ۴ هیبرید سینگل کراس KSC۴۰۳، KSC۳۰۲ (ذرت شیرین رقم دانه طلایی)، OSSK۴۹۹, SC۷۰۹ و هیبرید تری وی کراس TWC۶۰۰ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی واقع پیکان شهر کشت و مورد ارزیابی قرار گرفت. به محض خروج اولین بلال‌ها بر روی بوته ها و قبل از اینکه رشته‌های ابریشمی(کاکل‌ها) ظاهر شوند، بلال‌ها با پاکت پوشانیده شدند و ۱ الی ۲ روز بعد یعنی موقعی‌که طول کاکل‌ها به حدود ۲ تا ۳ سانتی‌متر رسید، خودگرده افشانی بوته‌ها انجام گردید. بلال‌ها ۱۰ الی ۱۴ روز پس از گرده افشانی، یعنی زمانی که اندازه جنین‌های نارس به حد ۱ الی ۲ میلی‌متر رسیدند از بوته جدا شدند و پس از حذف پوشش‌های بلال، سطح بلال‌ها با اتانول ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه ضدعفونی شدند. سپس بلال‌ها با محلول تجاری سدیم هیپوکلریت ۲/۵ ٪ (v/v) به مدت ۱۵ دقیقه شستشو شدند. سپس بلال‌ها ۲ بار با آب مقطر استریل شده به مدت ۱۰ دقیقه شستشو شدند. شایان ذکر است که در مواقعی که چند بلال در یک روز برداشت می‌شد ، بلال ها ضدعفونی شده به مدت ۴-۲ روز در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

ب) جداسازی و کشت جنین‌های نارس

بخش بالایی کاریوپسیس[1] با یک تیغ جراحی تیز بریده و تعداد ۱۰ جنین نارس زیگوتی آسیب ندیده به طول ۱ تا میلی‌متر ۲ (شکل۱-الف) جدا و در محیط کشت جامد القای کالوس در پتری دیش‌های ۱۰سانتیمتر یکبار مصرف کشت گردیدند. جنین‌های نارس بر طبق دستورالعمل آزمایشات قبلی (۹)، از جهت محور جنینی یا سطح صاف لپه‌ها در تماس با محیط کشتN۶ (۱۰) قرار گرفتند.

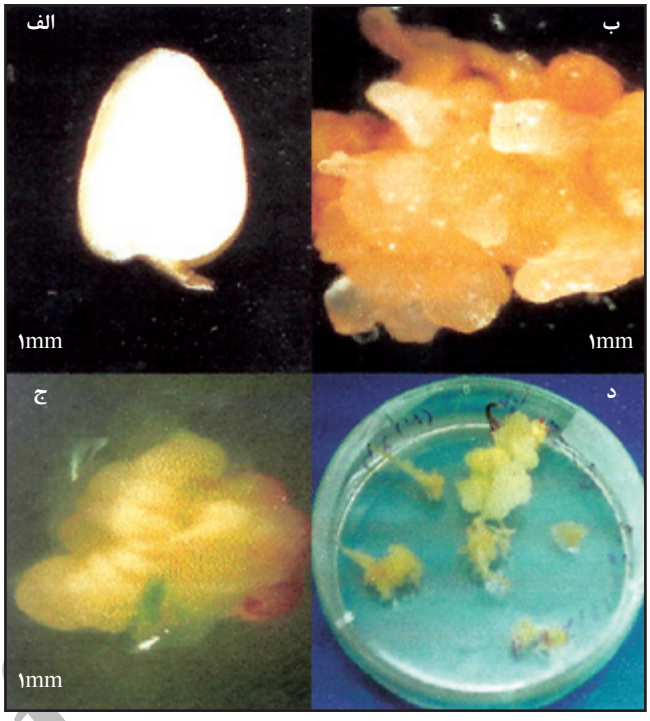
ج) محیط کشت و شرایط انکوباسیون

محیط کشت القای[2] کالوس حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های N۶ (۳). $^{-1}$ l ۱mg هورمون ۲.۴D، ۲۵mm پرولین، $^{-1}$ l ۱۰۰mg کازئین هیدرولیزات، $^{-1}$ l ۱۰mg نیترات نقره، ۲٪ ساکارز و $^{-1}$ l ۷g آگارآگار بود. انکوباسیون در دما ی ۲۵ تا ۲۷ درجه سانتیگراد و در تاریکی ممتد صورت گرفت. کالوس‌های حاصل به فواصل ۲ تا ۴ هفته‌ای براساس سرعت رشد در محیط تازه واکشت شدند. ترکیبات محیط نگهداری[3] یا واکشت کاملاً مشابه محیط القا بود، با این تفاوت که نیترات نقره از محیط کشت حذف گردید. جنین‌های سوماتیکی کروی شکل که بر روی محیط کشت القا و تکثیر تشکیل شدند بر روی محیط باززایی، تبدیل به گیاهچه شدند.

پس از ۴ الی ۶ هفته (۲ بار واکشت) انتقال کالوس‌های جنین‌زا به محیط باززایی[4] انجام شد. در مرحله اول انکوباسیون در دمای ۲۵ تا ۲۸درجه سانتیگراد در نور و به مدت ۲ الی ۳ هفته انجام پذیرفت. ترکیب محیط باززایی شامل نمک‌ها و ویتامین‌های N۶ (۱۰)، $^{-1}$ l ۱mg هورمون NAA،۶٪ ساکارز و $^{-1}$ l ۷g آگارآگار بود. پس از ۳-۲ هفته معمولاً کالوس‌ها در این محیط سفید و سخت شدند و در مرحله دوم جهت رشد بیشتر، گیاهچه‌ها به محیط مناسب بلوغ گیاهچه‌ها[5] منتقل شدند. ترکیب این محیط کشت شامل نمک‌ها و ویتامین‌های MS (۱۷)، $^{-1}$ l ۲g میواینوزیتول، ۲٪ ساکارز و $^{-1}$ l ۶g آگارآگار بود. جهت بلوغ گیاهچه‌ها میزان نمک‌ها و ویتامین‌ها به نصف کاهش یافت و تنها $^{-1}$ l ۱mg میواینوزیتول مصرف شد. در مرحله باززایی، انکوباسیون در دما ی ۲۵ تا ۲۷درجه سانتیگراد و در شرایط نور با شدت $^{-2}$ s $^{-1}$ ۱۰۰-۱۵۰μ mol m انجام شد. pH تمامی محیط‌های کشت بر روی ۵/۸ و با استفاده از KOH یک نرمال تنظیم شد. گیاهچه‌ها ابتدا از پتری‌دیش به لوله آزمایش(شکل۲-ب) و سپس به گلدان منتقل شدند. جهت انتقال گیاهچه‌ها به خاک، ابتدا آگار اطراف ریشه‌ها به دقت با آب شسته شد و گیاهان به گلدان‌های حاوی خاک و پیت ماس به‌نسبت ۲ به ۱ منتقل و در فیتوترون با دوره نوری ۱۶/ف ۸ ساعت نور/تاریکی در دمای ۲۵درجه سانتیگراد و نور $^{-2}$ s $^{-1}$ ۱۰۰-۱۵۰μ mol m نگهداری شدند. جهت حفظ رطوبت و سازگاری گیاهچه‌ها با شرایط محیطی، کیسه‌های پلاستیکی شفاف بر روی گیاهان کشیده شد و به مرور زمان با ایجاد منافذی بر روی کیسه‌ها، گیاهان به شرایط بیرون عادت داده شدند. سپس گیاهان به اتاقک رشد با دوره نوری ۸/۱۶ ساعت نور/ تاریکی و دمای ۱۸/۲۵ درجه سانتیگراد (روز/ شب) و شدت نور $^{-2}$ s $^{-1}$ ۳۵۰ -۴۰۰μ mol m قرار داده شدند تا بالغ

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱: واکنش به کال‌زایی در کشت جنین های نارس زیگوتی ذرت
۱ -الف) جنین نارس زیگوتی ذرت ۱-ب) نمونه‌ای ازکالوس جنین زا
۱ - ج) نمونه‌ای از کالوس غیرجنین‌زا ۱- د) واکنش جنین های نارس در محیط کال زایی در اینبرد لاین تجاری S۶۱

شده و تولید بذر نمودند.

د) تجزیه آماری

نتایج بررسی واکنش ژنوتیپ های ذرت به کال‌زایی با استفاده از آزمون ناپارامتری Kruskal-Wallis و از طریق نرم افزار آماری SPSS انجام شد (شایان ذکر است که به‌دلیل نامساوی بودن تعداد تکرار در ژنوتیپ‌های مورد بررسی امکان استفاده از طرح‌های آماری کلاسیک وجود نداشت). ضمناً در هر ژنوتیپ بسته به میزان ماده گیاهی موجود، حداقل ۴ پتری با ۱۰ جنین نارس در هر ظرف کشت شدند. همچنین فراوانی باززایی گیاهی ۳ ژنوتیپ S۶۱ ، A۱۸۸ و SC۷۰۹ در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تکرار با یکدیگر مقایسه شد. در هر پتری‌دیش ۱۸ ریزنمونه کشت و به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. تجزیه واریانس آماری و مقایسه میانگین‌ها بر اساس مقاله Comptorn (۸) از طریق نرم افزار MSTAT-C انجام شد.

نتایج و بحث

واکنش ژنوتیپ‌های مختلف ذرت به تولید کالوس جنین زا از طریق کشت جنین نارس زیگوتی نشان داد که ژنوتیپ‌های هیبرید OSSK۴۹۹، SC۷۰۳، KSC۳۰۲ و اینبرد لاین‌های TVA۹۲۶، K۱۲۶۳/۲-۱ و OH۴۳/۱-۴۲، فقط کالوس جنین زای نوع ۱ را تولید نمودند، در صورتی که بقیه ژنوتیپ‌های مورد بررسی یعنی A۱۸۸ ، SC۷۰۹، KSC۴۰۳، S۶۱ هر دو نوع کالوس جنین زا نوع ۱ و ۲ را تولید نمودند. بنابراین ژنوتیپ‌های مورد بررسی تفاوت های قابل ملاحظه‌ای با یکدیگر دارند (جدول ۱). نتیجه آزمون آماری ناپارامتری کروسکال – والیس۶ از نظرصفت تولید کال جنین زا (نوع ۱ یا ۲ یا هر دو نوع) نیز نشان داد که اینبرد لاین تجاری زودرس S۶۱ و اینبرد لاین ذرت سفید A۱۸۸ به ترتیب با میانگین ۹۰/۶ و ۸۵/۸ درصد بیشترین میزان کال جنین‌زا را در بین لاین‌های مورد بررسی به خود اختصاص دادند. هیبریدهای سینگل کراس SC۷۰۹ ، KSC۴۰۳ و هیبرید تری وی کراس TWC۶۰۰ از نظر تولید کال جنین زا در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (جدول ۲).

همانطوری‌که قبلاً اشاره شد تولید کالوس جنین زای نوع ۲ فقط در برخی از ژنوتیپ‌های ذرت مورد بررسی مشاهده گردید. نتایج تحقیقات نشان داده است که القای کالوس جنین‌زای سوماتیکی نوع ۱ و ۲ تحت کنترل ژنتیکی است(۳).

متغیر گروه‌بندی : ژنوتیپ

محققین در مقایسه اثر ژنوتیپ بر روی القای کالوس جنین‌زای سوماتیکی نوع ۱ و ۲ در لاین‌های اینبرد A۱۸۸و B۷۳ ملاحظه کردند که لاین B۷۳ در مقایسه با A۱۸۸ یک لاین با واکنش ضعیف است(۳). همچنین Tomes و Smith فراوانی کمی از القای کالوس نوع ۲ را در ژنوتیپ اینبرد لاین B۷۳ مشاهده کردند (۲۱). Tomes گزارش کرد القای کالوس

شکل ۲- باززایی گیاهی از جنین‌های نارس زیگوتی ذرت
۲ - الف) تولید نوساقه در جنین‌های نارس زیگوتی کشت شده
۲ - ب) اندام‌زایی در جنین‌های نارس زیگوتی کشت شده در اینبرد لاین تجاری S۶۱

www.SID.ir

جنین‌زای نوع ۲ با فراوانی کمتری نسبت به نوع ۱ در یک ژنوتیپ خاص رخ می‌دهد و بیشتر در معرض تنوع محیطی مؤثر بر شرایط رشد گیاه مادری است (۲۰).

شایان ذکر است که اغلب محققین در آزمایشات کشت جنین نارس ذرت از اینبرد لاین خاصی به نام A۱۸۸ استفاده کرده‌اند. این لاین اینبرد ارزش زراعی ندارد، اما مزیت آن پتانسیل بالای تولید کالوس جنین زا (نوع ۱و ۲)، سوسپانسیون سلولی و باززایی گیاهی مطلوب است (۹). در این پژوهش نیز بذر اینبرد لاین A۱۸۸ از طریق مکاتبه با Van lammerane از کشور هلند تهیه گردید و به عنوان شاهد مثبت در کنار سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش کالوس‌های جنین زای نوع ۱ و ۲ به‌طور متوالی هر ۲ الی ۴ هفته براساس سرعت رشدشان واکشت گردیدند و بعضاً واکشت در ژنوتیپ‌هایی نظیر S۶۱، A۱۸۸ تا ۹ ماه ادامه یافت. البته ظرفیت باززایی گیاه معمولاً در کالوس‌های جوان و در ماه‌های اولیه کشت کالوس‌ها غالباً بیشتر بود. Carvalho و همکاران نشان دادند که کالوس‌های نوع ۱ و ۲ می‌توانند به‌مدت ۲۴ ماه برای بسیاری از ژنوتیپ‌ها حفظ شوند، لیکن قابلیت باززایی گیاه معمولاً در کالوس ۴ ماهه بیشترین مقدار است و براساس نوع اینبرد تا ۱۵ ماه پس از کشت هم بالا باقی می‌ماند. این وضعیت می‌تواند احتمالاً به‌دلیل انتخاب بخش‌هایی از کالوس‌ها یا جنین‌های سوماتیکی باشد که نسبت سلول‌های جنین‌زا را افزایش داده است. کالوس‌های مسن‌تر از ۲۵ ماه باززایی کمی داشتند، اما برخی اینبرد لاین‌ها تا بیش از ۳۵ ماه از زمان کشت هم باززایی خوبی را نشان دادند(۷).

در این آزمایش اینبرد لاین‌های A۱۸۸ و S۶۱ پس از ۹ ماه از زمان کشت جنین نارس توانستند وضعیت مطلوب خود را برای باززایی گیاهی به میزان بالاتری از سایر لاین‌ها حفظ نمایند. البته آنچه حائز اهمیت است شرایط یکنواخت کشت برای تمامی ژنوتیپ‌های مورد بررسی برای بررسی پاسخ به کال‌زایی می‌باشد. در این آزمایش سعی شد شرایط کشت گیاهان مادری برای تمامی مواد ژنتیکی مورد بررسی تا حد امکان بهینه و یکنواخت باشد، اما چون جنین نارس تمامی ژنوتیپ‌های مورد بررسی بدلیل تفاوت در زمان رسیدگی همزمان کشت نشده‌اند، لذا تفاوت‌های مشاهده شده بین ژنوتیپ‌ها از نظر میزان تولید کالوس جنین زا می‌تواند علاوه بر عوامل ژنتیکی، متأثر از عوامل محیطی هم باشد. لینه‌های اینبرد S۶۱، A۱۸۸ TVA۹۲۶ به‌دلیل زودرس بودن ، زودتر از سایر اینبردهای به گلدهی رسیده و کشت جنین نارس آنها زودتر انجام شد، در صورتی که اینبرد لاین های K۱۲۶۳/۲-۱ و OH۴۳/۱-۴۲ به‌ترتیب به‌دلیل میان رس و دیر رس بودن دوره رشد طولانی‌تری داشتند، لذا عملاً کشت جنین‌های نارس آنها دیرتر از سایر اینبرد لاین ها انجام شد. ارقام هیبرید مورد بررسی هم از این قاعده مستثنی نبودند، به‌طوری که هیبریدهای KSC۳۰۲ و KSC۴۰۳ (ذرت شیرین رقم دانه طلایی) و هیبرید سینگل کراس یوگسلاوی OSSK۴۹۹ زودرس تر از هیبریدهای TWC۶۰۰ و SCV۷۰۹ بوده‌اند ، بنابراین امکان کشت همزمان جنین نارس تمامی این ژنوتیپ‌ها میسر نبود.

جدول ۱ - نتایج تجزیه واریانس صفت تولید کال جنین زا و غیرجنین زا در ژنوتیپ

صفات	درجه آزادی	آماره کای اسکوئر
کالوس جنین زا	۹	۴۵/۴۶**
کالوس غیر جنین زا	۹	۵۹/۴۰**

** معنی دار در سطح احتمال ۱٪

جدول ۲- رتبه ژنوتیپ‌ها از نظر درصد تولید کالوس جنینی‌زا باآزمون ناپارامتری کروسکال- والیس

ژنوتیپ	تعداد تکرار	درصد تولید کال جنین زا	رتبه
S۶۱	۲۳	۹۰/۶	۱
A۱۸۸	۱۰	۸۵/۸	۲
SC۴۰۳	۱۶	۸۲/۱	۳
SC۷۰۹	۶	۸۱	۴
TW۶۰۰	۲۰	۶۳/۸	۵
OH۴۳/۱- ۴۲	۱۳	۵۳/۳۱	۶
K۱۲۶۳/۲-۱	۴	۳۹/۹	۷
KSC۳۰۲	۱۰	۳۹/۰	۸
TVA۹۲۶	۶	۳۹/۰	۹
OSSK۴۹۹	۱۴	۳۹/۰	۱۰

هرپتری دیش به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شده و ۱۰ جنین در هر پتری دیش کشت گردیده است

www.SID.ir

عامل مهم دیگر اندازه جنین نارس زیگوتی در زمان کشت می‌باشد. نتایج تحقیقات قبلی نشان داده است که جنین‌های نارس بزرگتر از ۲میلی‌متر کال زایی مطلوبی ندارند و اغلب به‌دلیل تمایز یافتن تولید ریشه‌چه و ساقه‌چه می‌نمایند و تمایل زیادی به اندام زایی مستقیم و تشکیل گیاه دارند، در صورتی که جنین‌های کوچک با اندازه ۱ الی۱/۵ میلی‌متر(شکل ۱-الف) به‌خوبی تولید کالوس جنین‌زا می‌نمایند(شکل۱-ب). Armstrong وGreen (۳) نیز معتقدند که اندازه جنین به عنوان شاخص قابل اعتمادتری در مرحله القای کالوس نسبت به سن جنین محسوب می‌شود. به علاوه قابل ذکر است که سن جنین تحت تاثیر فصل رشد می‌باشد و معمولاً در اواسط تابستان جنین های نارس رشد سریعتری نسبت به اواخر تابستان دارند، بنابراین اندازه جنین معیار برتری از سن جنین در کشت جنین نارس زیگوتی ذرت می‌باشد.

عقیده محققین در ارتباط با کنترل ژنتیکی جنین‌زایی در کشت بافت‌های سوماتیکی ذرت تا حدی مشابه است، به‌طوری که اغلب اثر غالبیت ژنی یا حداقل غالبیت ناقص را در رابطه با تشکیل کالوس نوع ۱، مؤثر برشمرده‌اند (۱۲ ، ۱۳ ، ۲۱). به‌علاوه برخی محققین حداقل یک ژن اصلی و برخی دو ژن مغلوب اپیستاتیک اصلی و دو ژن فرعی را دخیل می‌دانند. همچنین در خصوص تشکیل کالوس نوع ۲ در کشت بافت‌های سوماتیکی ذرت به نقش یک ژن اصلی اشاره شده است (۱۲).

نظر به اینکه القای کالوس جنین‌زا می‌تواند بوسیله تلاقی ژنوتیپ‌های غیر پاسخ دهنده با ژنوتیپ‌های با پاسخ مطلوب و کشت جنین نارس هیبرید اصلاح شود و یا از طریق گزینش برای القای کالوس جنین‌زا در بین نتاج حاصل از تلاقی در نسل تفرق بهبود یابد (۱۳ ، ۲۰ ، ۲۱ ، ۲۲). بنابراین با توجه به وضعیت مطلوب اینبرد لاین تجاری زودرس S۶۱ از نظر تولید کالوس جنین‌زا می‌توان از طریق تلاقی این لاین با لاین‌های با واکنش ضعیف نظیر OH۴۳/۱-۴۲ و یا دیگر لاین‌های تجاری رایج در کشور نظیر MO۱۷ وB۷۳، این خصوصیت ژنتیکی را بهبود بخشید. همچنین قابلیت بازایی گیاهی از کالوس نوع ۱ (شکل ا-د) از طریق به نژادی و انتخاب بهبود یافته است. تشکیل ساختارهای جنینی قابل بازایی از لاینA۱۸۸ و هیبریدهای A۱۸۸ × A۶۱۹ و A۱۸۸ ×B۷۳ در تحقیقات Armstrong و همکاران (۳) مشاهده گردیده است. به‌علاوه اثرات افزایشی ژنی برای تلاقی‌های A۱۸۸ × A۶۱۹ , B۷۳ × A۱۸۸ معنی‌دار بود که حاکی از مؤثر بودن انتخاب برای ساختارهای قابل بازایی است. با توجه به اینکه در تحقیقات قبلی خصوصیت تولید کالوس جنین‌زا از اینبرد لاین غیرتجاری A۱۸۸ به لاین‌های تجاری نظیر B۷۳ انتقال یافته است، لذا شناسایی ویژگی تولید کالوس جنین‌زا در اینبرد لاین تجاری S۶۱ می‌تواند به عنوان نقطه قوتی در به نژادی سایر لاین‌های تجاری نظیر B۷۳ و MO۱۷ در کشور تلقی گردد. استفاده از کالوس نوع ۱ حاصل از کشت جنین نارس زیگوتی برای انتقال ژن، به‌دلیل وابستگی کمتر به ژنوتیپ می‌تواند نسبت به کالوس نوع ۲ حائز اهمیت باشد، کما اینکه کالوس جنین زای حاصل از جنین‌های نارس زیگوتی (۲۵) یا جنین‌های گامتی (۲۴، ۴)، بافت‌های هدف مؤثری برای انتقال ژن به روش بمباران ذره‌ای هستند.

بازایی گیاهی

جنین‌های نارس زیگوتی ذرت پس از تشکیل کالوس جنین‌زا به محیط کشت بازایی انتقال یافتند و توانستند تولید اندام، گیاهچه و گیاه بالغ نمایند(شکل۲-الف و ب). در این پژوهش میزان بازایی در ۳ ژنوتیپ, SC۷۰۹ A۱۸۸, S۶۱ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس آماری نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد بررسی تفاوت‌های معنی‌داری از نظر میزان بازایی گیاه سبز با یکدیگر دارند، به طوری‌که ژنوتیپ شماره ۲ (هیبرید (SC۷۰۹ با میانگین ۳۶/۱۵ درصد و ژنوتیپ شماره ۱ (اینبرد لاین S۶۱) با ۱۴/۲۵ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین میزان بازایی گیاهی را به خود اختصاص دادند. اینبرد لاین‌های A۱۸۸(شاهد) و S۶۱ علیرغم اینکه میزان تولید کالوس جنین‌زای بیشتری داشتند، اما فراوانی بازایی کمتری نسبت به هیبرید SC۷۰۹ نشان دادند(جدول ۳).

از ژنوتیپ‌هایی نظیر TVA۹۲۶و OH۴۳/۱-۴۲ در شرایط این آزمایش گیاه سبز بازایی نشد. این تفاوت‌ها می‌تواند علاوه بر تفاوت‌های ژنتیکی موجود بین ژنوتیپ‌ها، متأثر از شرایط متفاوت محیطی اعم از طول

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین بازایی گیاهی در ژنوتیپ‌های ذرت

ژنوتیپ	رتبه	درصد بازایی	کلاس
SC۷۰۹	۱	۳۶/۱۵	A
A۱۸۸	۲	۳۱/۷۵	AB
S۶۱	۳	۱۴/۲۵	B

کلاس‌های با حروف غیر مشابه اختلاف آماری معنی دار با یکدیگر دارند

فصل رشد، سن یا اندازه متفاوت کالوس‌ها و غیره باشد، کما اینکه ممکن است همین ژنوتیپ‌ها در صورتی که در محیط‌های کشت دیگری مورد آزمون قرار گیرند، واکنش متفاوتی را نشان دهند. در این تحقیق به نظر می‌رسد ویژگی ژنتیکی ارقام و لاین‌ها از نظر تولید کالوس جنین‌زا نقش مؤثرتری را نسبت به سایر عوامل ایفا می‌کند. به عنوان مثال در شرایط این آزمایش بازایی گیاه از ژنوتیپ‌های TVA۹۲۶ و OH۴۳/۴۲-۱ میسر نشد . ژنوتیپ‌های مذکور به میزان زیادی کالوس ریشه‌ای[۷] (۱۵) تولید کردند (شکل ۱-ج). این نوع کالوس قابلیت جنین‌زایی و تولید گیاه سبز را ندارد. Bronsema و همکاران (۵) در مقایسه دو ژنوتیپ اینبرد لاین A۶۳۲ و A۱۸۸ از نظر تشکیل کالوس جنین‌زا و بازایی در کشت جنین نارس ذرت مشاهده کردند که اینبرد لاین A۶۳۲ تنها کالوس ریشه‌زا تولید نمود و در شرایط آزمایش مذکور نتوانست بازایی شود. بنابراین تکثیر رویشی نیز وابسته به خصوصیات ژنتیکی واریته‌ها یا لاین‌های اینبرد مورد استفاده است (۶). شایان ذکر است که حتی تغییر از کالوس نوع ۱ به نوع ۲ از طریق کم کردن غلظت ساکارز از ۶ به ۲ درصد در تحقیقات محققین قبلی (۶، ۲۳) به اثبات رسیده است.

با توجه به اهمیت بازایی گیاه که وابستگی زیادی به ژنوتیپ دارد, صلواتی و همکاران (۱) در ارزیابی واکنش ۲۵ ژنوتیپ ذرت از نظر بازایی از کشت جنین بالغ, نتیجه‌گیری کردند که لاین‌های اینبرد IL۹ و IL۱۰ و نیز هیبریدهای SC۷۰۴ و SC۳۰۱ برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی متکی به کشت بافت، در ذرت قابل توصیه می‌باشند.

در ارزیابی دو نوع کالوس جنین زا به نظر می‌رسد تفاوت بین کالوس‌ها به دلیل اختلاف آنها در مرحله نموی باشد، مشابه نتایجی که Welter و همکاران (۲۶) گزارش نموده‌اند. به‌علاوه کالوسی که بافت موسیلاژی تولید

Archive of SID

www.SID.ir

کرد تمایل داشت این خصوصیات را در طول زمان حفظ نماید(۷).

پاورقی‌ها

1- Caryopses
2- Induction medium
3- Maintenaince
4- Regeneration medium
5- Plantlet promotion
6- Kruskal-Wallis
7 - Rhizogenic callus

منابع مورد استفاده

۱- صلواتی، م. ر.، ارزانی، ا. میر لوحی، آ. ف. و بانکه ساز، ا. ۱۳۷۹؛ کالوس زایی و باززایی گیاهچه از جنین بالغ در لاین‌های اینبرد و هیبریدهای ذرت. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، جلد ۴، شماره ۴. صفحه ۴۳- ۵۶. دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان.

۲- ملکی زنجانی، ب.، عبدمیشانی، س. و محمدی ج. ۱۳۷۶؛ تکثیر سریع در ذرت (*Zea mays L.*) با استفاده از جوانه انتهایی. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۲۸ شماره ۱. صفحه ۴۳ تا ۵۱. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.

3-Armstrong, C. L., and Green, C.E. 1985; Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-Prolin. Planta. 164: 207-214.

4-Aulinger, I. E. 2002; Combination of *in vitro* androgenesis and biolistic transformation : An approach for breeding transgenic maize (*Zea mays* L.) lines. Ph.D Thesis of Natural Science, Zurich, Swiss.

5- Brettschneider, R. Becker, D., and Lorz, H. 1997; Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. Theor. Appl. Genet. 94:737-748.

6- Bronsema, F. B. F.,Van Oostveen,W.J.F., and Van Lammeren, A.A.M. 1997; Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature maize embryos of the inbred lines A188 and A632. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 50 (1): 57-65.

7-Carvalho, C. H. S., Bordallo, P. N., Abreu, L. L., Valicente, F. H., Bressan, W., and Paiva, E. 1997; TypeΠ callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. Plant Cell Reports. 17:73-76.

8- Comptorn, M. E. 1994; Statistical methods for the analysis of plant tissue culture data.. Plant Cell, Tiss and Organ Cult. 37: 217-242.

9-D'Halluin, K., Bonue, E., Bossut, M., Beukeleer, M., and Leemans, J. 1992; Trangenic maize plants by tissue electroporation. Plant Cell. 4: 1495-1505.

10-Galatowitsch, M. 2002; Maize somatic embryogenesis. Galat002@tc.umn.edu.

11- Henry Y., Vain, P., and De Buyser, J. 1994; Genetic analysis of *in vitro* tissue culture response and regeneration capacities. Euphytica. 79:45-58.

12-Hodege S. 1986; Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. Bio/Tech. 4:219-222.

13-Jimenez, V. M., and Bangerth F. 2001; Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. Plant Sience. 160: 247-257.

14-M'orocz, S., Donn. G., Nemeth, J., and Dudits, D. 1990; An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. Theor. Appl. Genet. 80:721-726.

15-Marilyn A. L., and Harda, J. J. 1993; Embryogenesis in higher plants: An overview. The Plant Cell. 5: 1361-1369.

16- Matthys-Rochon, E., Piola F., Le Deunff, E., Mol, R., and Dumas, C. 1998. *In vitro* development of maize immature embryos: a tool for embryogenesis analysis. Exp. Bot.. V: 49(322): 839-845.

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

18-Rao, K.V., Suprasanna P., and Reddy, G.M. 1990. Genotypic differences and effects of amino acids on somatic embryogenesis in immature embryo calli. Maize Genetics Cooperation Newsletter. http: //www.maizegdb/mnl/

19-Sprague E., and Dudley, F. 1988; Corn and corn improvement. Cell/ Tissue Culture and *in vitro* Manipulation. Chapter 5. PP: 347-354.

20-Tomes, D. T. 1985; Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. In: Bright SWJ and Jones MGK(eds). Cereal Tissue and Cell Culture, (pp: 172-205). MartinusNijihoff/Dr. W.Junk Publishers, Dordrecht.

21-Tomes, D. T., and Smith O. S. 1985; The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. Theor. Appl. Genet. 70(5): 505-509.

22-Usha, R. D., Hadiuzzaman, S., and Sarker, R. H. 2001; Somatic embryogenesis and regeneration of plantlet from immature embryos of maize (*Zea mays* L.). Plant Tissue Culture. 11(1): 65-75.

23-Vasil, V., Lu, C., and Vasil, I. K. 1985; Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). Protoplasma. 127: 1-8.

24-Wan Y., Widholm, J. M., and Lemaux, P.G. 1995; Type 1 callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (*Zea mays* L.). Planta 196: 7-14.

25-Wan, Y., and Lemaux, P. G. 1994a; Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. Plant Physiol. 104:37-48.

26-Welter, M.E., Clayton, D.S.Miller, M. A., and Petolino, J. F. 1995; Morphotypes of friable embryogenic maize callus. Plant Cell Reports. 14:725-729.

Archive of SID

www.SID.ir