Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 13:03 IRST on Monday December 6th 2021

مقایسه روش‌های تلاقی گندم × ذرت و کشت بساک در تولید گیاهان هاپلویید گندم

طاهره محمودی قهساره، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی، سیروس قبادی و آقا فخر میرلوحی[1]

چکیده

*اهمیت هاپلویدها در زمینه ژنتیک و اصلاح گیاهان برای مدت‌های طولانی است که شناخته شده است. به نژادی از طریق تولید گیاهان هاپلویید، روشی مناسب برای تسریع برنامه‌های اصلاحی و مطالعات ژنتیکی در گندم است. روش‌های معمول مورد استفاده برای ایجاد گیاهان هاپلویید در گندم شامل کشت بساک، کشت میکروسپور، تلاقی بین جنسی گندم× **Hordeum bulbosum** و گندم × ذرت می‌باشد. در این پژوهش از روش تلاقی گندم × ذرت و کشت بساک برای تولید گیاهان هاپلویید در شش ژنوتیپ گندم استفاده شد.*

نتایج این بررسی نشان داد که تولید هاپلوییدی از هر دو روش وابسته به ژنوتیپ بوده و از پتانسیل بالایی برخوردار می‌باشد. یکی از مشکلات عمده کشت بساک بازده پایین گیاهان سبز هاپلویید است. در این ارزیابی، از روش کشت بساک، ۷۰/۷٪ از گیاهان بازرا شده گیاهچه‌های آلبینو، و ۲۹/۳٪ از آنها سبز بودند در حالی‌که در روش تلاقی گندم با ذرت تمام گیاهچه‌های حاصل از این تلاقی سبز و از نظر سطح پلوییدی، هاپلویید بودند. به‌طور کلی چنین نتیجه‌گیری شد که روش تلاقی گندم و ذرت، روشی عملی و مناسب برای ایجاد گیاهان هاپلویید در ژنوتیپ‌های گندم است و در مقایسه با روش کشت بساک از پتانسیل بالاتری در تولید هاپلویید برخوردار است. روش کشت بساک به‌دلیل تنوع مورفولوژیکی در گیاهان سبز و تولید گیاهان آلبینو برای اهداف خاصی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *کشت بساک، تلاقی گندم و ذرت، هیبریداسیون بین جنسی*

مقدمه

گیاهان هاپلویید دارای نیمی از کروموزوم‌های گیاه والد خود هستند و به عنوان ابزار قدرتمندی برای تحقیقات پایه، از جمله: ژنتیک، سیتوژنتیک، جداسازی آنیوپلوییدها، بررسی جفت شدن کروموزوم‌ها، دست‌یابی سریع به خلوص ژنتیکی، نقشه‌های ژنتیکی و... استفاده می‌شوند (۱، ۹). تولید خودبه‌خودی هاپلویدها در طبیعت بسیار نادر بوده و معمولاً ایجاد آنها از طریق آپومیکسی یا پارتنوژنز (تولید جنین از تخم لقاح نیافته) می‌باشد. در زمینه تولید مصنوعی آنها کوشش‌های فراوانی شده که می‌توان به گرده افشانی کلاله همراه با تأخیر،

۱. به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، مربی و دانشیار بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 13:03 IRST on Monday December 6th 2021

استفاده از گرده‌های اشعه دیده، تیمار هورمونی، شوک حرارتی، کشت بساک، کشت میکروسپور و دورگ گیری بین جنسی و بین گونه‌ای اشاره کرد(۴).

ایجاد گیاهان هاپلویید روشی با ارزش در بررسی‌های ژنتیک گیاهی و برنامه‌های عملی اصلاح نباتات می‌باشد که تاکنون به روش‌های مختلف در گندم صورت گرفته است (۹). روش‌های مورد استفاده برای تولید هاپلوییدها در گندم شامل کشت بساک، کشت میکروسپور، دورگ‌گیری بین جنسی گندم با *Hordeum bulbosum* و تلاقی گندم × ذرت می‌باشد (۱ و۳). در گندم کشت بساک دارای پتانسیل بالایی برای تولید گیاهان هاپلویید می‌باشد و ایجاد گیاهان هاپلویید از این طریق برای مطالعات جهش به ویژه برای انتخاب جهش یافته‌های مغلوب، ایجاد تنوع گامتوکلونال، تولید لاین‌های آنیوپلویید، انتخاب لاین‌های با کروموزوم‌های جابه‌جا شده یا دارای کروموزوم‌های اضافی سودمند می‌باشد(۱۷). استفاده از این روش در گندم به‌دلیل پاسخ متفاوت بساک‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف، تولید گیاهان آلبینو، ایجاد گیاهان با سطوح پلوییدی مختلف از جمله آنیوپلوییدها(Aneuploid) و میکسوپلوییدها (Mixoploids)، دارای محدودیت بوده و برای اهداف خاصی استفاده می‌شود (۴ و۲۱). روش دیگری که به منظور تولید هاپلوییدی در گندم استفاده می‌شود دورگ‌گیری بین جنسی است. در تلاقی بین جنسی، ناسازگاری کروموزومی منجر به حذف کروموزم‌های پایه نر از جنین، در ابتدای نمو آن گردیده که پس از نجات جنین و انتقال آن به محیط کشت مناسب، گیاهچه‌های هاپلویید حاصل می‌شوند (۱۸). نخستین بار در سال ۱۹۷۵ ، بارکلی (۲) تولید هاپلوییدی از روش دورگ‌گیری بین جنسی را در تلاقی گندم با *Hordeum bulbosum* گزارش کرد. موفقیت دورگ‌گیری بین جنسی گندم با *Hordeum bulbosum* بستگی به ژنوتیپ گندم دارد. وجود دو ژن ناسازگار Kr۱ وKr۲ که به ترتیب روی کروموزوم‌های 5B و 5A گندم قرار دارند، استفاده از این تکنیک را برای تولید هاپلوییدی محدود می‌کند (۲). تلاقی بین جنسی گندم و ذرت، روشی مناسب برای ایجاد گیاهان هاپلویید می‌باشد که نخستین بار توسط لوری و بنت (۱۱) در سال ۱۹۸۶ گزارش شد. در این روش ژن‌های ناسازگاری که در تلاقی گندم و *Hordeum bulbosum* تأثیر داشتند، در فراوانی تشکیل جنین هاپلویید تأثیری ندارند و در واقع می‌توان گفت این روش وابسته به ژن‌های Kr نیست(۱۲). در این تکنیک کروموزوم‌های ذرت در اولین چرخه‌های تقسیم سلولی حذف می‌شوند. طی بررسی‌های انجام شده در این زمینه مشخص شده است که حدود ۷۰ درصد کروموزوم‌های ذرت در اولین تقسیم سلول حذف و زمانی که جنین‌ها در مرحله ۸ سلولی هستند تمام کروموزوم‌های ذرت حذف می‌شوند(۱۳). حذف کروموزومی را به عدم همولوژی کروموزوم‌های ذرت با کروموزوم‌های پایه مادری (گندم) و اتصال سانترومر کروموزم‌های ذرت به رشته‌های دوکی و در نتیجه حرکت محدود آنها در طی متافاز و آنافاز نسبت می‌دهند(۱۰). جنین‌های تشکیل شده در تلاقی گندم × ذرت به‌دلیل عدم تشکیل آندوسپرم توانایی زنده ماندن ندارند و بنابراین نجات جنین برای رشد آنها ضروری می‌باشد. این روش، به‌منظور تسریع برنامه‌های اصلاحی و به‌نژادی استفاده می‌شود و مزیت‌های آن شامل تولید لاین‌های هموزیگوت، ایجاد ارقامی با صفات مطلوب و استفاده از لاین‌های دابل هاپلویید برای تهیه نقشه ژنتیکی است. تولید گیاهان هاپلویید و پیرو آن دو برابر کردن کروموزوم‌ها یک روش سودمند برای ایجاد لاین‌های خالص در کوتاه‌ترین زمان ممکن است(۴).

هدف از این پژوهش مقایسه کارآیی روش کشت بساک و تلاقی بین جنسی گندم با ذرت در ایجاد گیاهان هاپلویید در گندم هگزاپلویید و بررسی عکس العمل ژنوتیپ‌های مختلف نسبت به این دو روش بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش، ۶ ژنوتیپ گندم هگزاپلویید به نام‌های قدس(حاصل تلاقی ارقام ایرانی و مکزیکی)، کرج۱ (حاصل

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 13:03 IRST on Monday December 6th 2021

تلاقی رقم روشن و یک رقم خارجی) Grebe، و Hautman (دو رقم از استرالیا) وDNB،ENB (ارقام ساختگی از دانشگاه سیدنی استرالیا) به‌عنوان گیاه دهنده بساک و هم‌چنین به‌عنوان پایه مادری در تلاقی گندم × ذرت و۴ سینگل کراس ذرت به شماره‌های ۷۰۴، ۶۴۷، ۶۶۷ و ۶۱ به عنوان پایه پدری استفاده شدند.

بذرهای ژنوتیپ‌های گندم هر دو هفته یک‌بار در گلخانه و مزرعه و ژنوتیپ‌های ذرت هر هفته در شرایط گلخانه همراه با نور طبیعی و نور مصنوعی (شدت نور ۷۰۰۰– ۹۰۰۰ لوکس ساطع شده از لامپ سدیمی W ۴۰۰) در پاییز سال ۱۳۸۱ کشت شدند و مراقبت های زراعی لازم تا به مرحله فیزیولوژیک مورد نظر برای ادامه آزمایش‌ها انجام گرفت.

تلاقی گندم و ذرت

۱. نحوه تلاقی

مطابق روش لوری و بنت (۱۲) دو تا سه روز قبل از گرده افشانی، خوشه‌های گندم اخته گردیده و با پاکت کاغذی نیمه شفاف پوشانیده شدند. پس از آن زمانی که کلاله‌ها آماده پذیرش گرده بودند، با گرده تازه جمع آوری شده از بوته‌های ذرت گرده افشانی شدند و سپس محلول توفوردی (۱۰۰ ppm) به بالاترین میان گره تزریق گردید.

۲. نجات جنین

چهارده روز بعد از گرده افشانی، خوشه‌های تلاقی داده شده جمع آوری و با الکل ۷۰ ٪ استریل شدند. سپس بذرهای نارس تشکیل شده در شرایط استریل (لامینار فلو) خارج و با الکل ۹۶٪ ضدعفونی شدند. شکافتن بذرهای مورد نظر از ناحیه شکاف بذر در زیر بینوکولار صورت گرفت. در صورت وجود جنین در داخل بذرها، با استفاده از یک سوزن استریل بر روی محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ کشت داده شدند(۱٤) و به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند(شکل ۱). هنگامی‌که جنین‌ها به گیاهچه‌های با طول ۵ – ۴ سانتی متر رسیدند، از محیط کشت خارج و پس از شستشوی ریشه و عاری شدن از آگار به گلدان‌هایی که حاوی ماسه، خاک و کود آلی با نسبت حجمی ۴ : ۱ :۰/۵ بودند، منتقل شدند.

۳. جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

صفات مورد اندازه‌گیری در این پژوهش عبارت از تشکیل ساختار بذر، تشکیل جنین و جوانه زنی بودند. تبدیل داده‌ها براساس $\text{Arc sinx}^{\frac{1}{2}}$ صورت گرفت و تأثیر ژنوتیپ در تشکیل ساختار بذر و تشکیل جنین با استفاده از برنامه SAS مدل Proc GLM تجزیه و تحلیل شد.

کشت بساک

۱. انتخاب خوشه

بر اساس گزارش‌های ارائه شده توسط محققین، زمان مناسب کشت بساک ، زمانی است که میکروسپور در مرحله تک هسته‌ای باشد(۷،۱۷و۲۱). این مرحله قبل از نخستین تقسیم میتوز یعنی اواسط یا اواخر مرحله تک هسته‌ای است و می‌توان با یک صفت ساده مورفولوژیکی تطبیق داد. به‌عنوان مثال در ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این پژوهش مرحله مناسب از لحاظ مورفولوژیک مطابق با زمانی بود که خوشه‌ها هنوز از غلاف بیرون نیامده و ۲/۵ – ۱ سانتی‌متر (بسته به ژنوتیپ و شرایط دمایی مختلف) از ریشک‌های آن از غلاف خارج شده بود ولی در مواردی نیز بررسی‌های سیتولوژیکی برای اطمینان از انتخاب انجام گرفت. به منظور تعیین مرحله نمو میکروسپور، بساک‌هایی از خوشه‌های موجود در مزرعه انتخاب گردید، آن‌گاه یک قطره محلول استوکارمن جهت رنگ آمیزی گرده‌ها به آن اضافه و با فشار یک سوزن گرده‌ها از بساک خارج شد و توسط میکروسکوپ مرحله نمو آنها بررسی گردید(۱۷).

۲. ضد عفونی خوشه

غلاف‌های دارای خوشه‌های مناسب پس از برداشت و انتقال به آزمایشگاه کشت بافت گیاهی، با الکل ۹۶٪ به‌صورت اسپری، استریل و در زیر هود خوشه‌ها از غلاف خارج گردیدند. سپس بساک‌ها در محیط کشت CHB (٦) حاوی

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 13:03 IRST on Monday December 6th 2021

۲mg/l ٤-D، ۲، ۱mg/l کاینتین، ۹۰g/l مالتوز و ۲/۸g/l آگارز کشت و در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد در تاریکی قرار گرفت. بسته به ژنوتیپ ۶-۳ هفته بعد، بساک ها تولید کالوس کردند. کالوس‌ها به منظور باززا شدن به محیط کشت MS همراه با ۱mg/l بنزیل آدنین، ۱mg/l اسید ایندول تری استیک اسید، ۳۰g/l ساکارز و۲/۸g/l آگارز انتقال یافتند و در دمای ۲۷-۲۵ درجه با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند(شکل ۱). گیاهان باززا شده پس از ریشه‌زایی به گلدان انتقال یافتند.

۳. جمع‌آوری داده‌ها و تجزیه و تحلیل آن

در این بررسی تعداد بساک کشت شده، گیاهان باززا شده، گیاهان سبز و آلبینو یادداشت برداری شد و سپس تبدیل داده‌ها بر اساس $\text{Arc sin}\, x^{\frac{1}{2}}$ صورت گرفت و با استفاده از برنامه SAS مدل Proc GLM مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

تلاقی گندم و ذرت

در روش تولید هاپلویدی از طریق تلاقی گندم و ذرت ساختارهایی شبیه به بذر تشکیل شد که به استثنای آندوسپرم دارای قسمت‌های اصلی بذر گندم بود. در بذرهای حاصل از این تلاقی یک لایه خارجی وجود داشت که از رشد تخمدان منشأ و در داخل آن یک کیسه سبز رنگ و یک کیسه شفاف قرار گرفته بود. جنین در داخل کیسه شفاف، شناور بود (شکل ۱). عدم وجود آندوسپرم در اغلب بذرها این تلاقی را می‌توان به عدم تلقیح سلول زایشی موجود در لوله گرده ذرت با سلول‌های قطبی موجود در تخمدان نسبت داد.

مطابق مشاهدات موجود در این بررسی، بذرهایی که در اثر تلاقی گندم با ذرت حاصل می‌شوند را می‌توان در چهار گروه، دسته‌بندی کرد. اول: بذرهایی که فقط دارای جنین بودند. دوم: بذرهای که علاوه بر جنین، مقداری آندوسپرم در آنها مشاهده می‌شد. سوم: بذرهایی که در آنها فقط آندوسپرم تشکیل شده بود و گروه چهارم: بذرهایی که فاقد جنین و آندوسپرم بودند. نتیجه این بررسی در این خصوص، مطابقت کامل با نتایج لوری و بنت داشت(۱۱).

جنین‌های حاصل از این تلاقی به اشکال و اندازه‌های مختلف بودند که در بین آنها، جنین‌های بزرگ و متوسط قابلیت تبدیل به گیاهچه را داشتند و جنین‌های کوچک اغلب توانایی تبدیل شدن به گیاهچه را نداشتند.

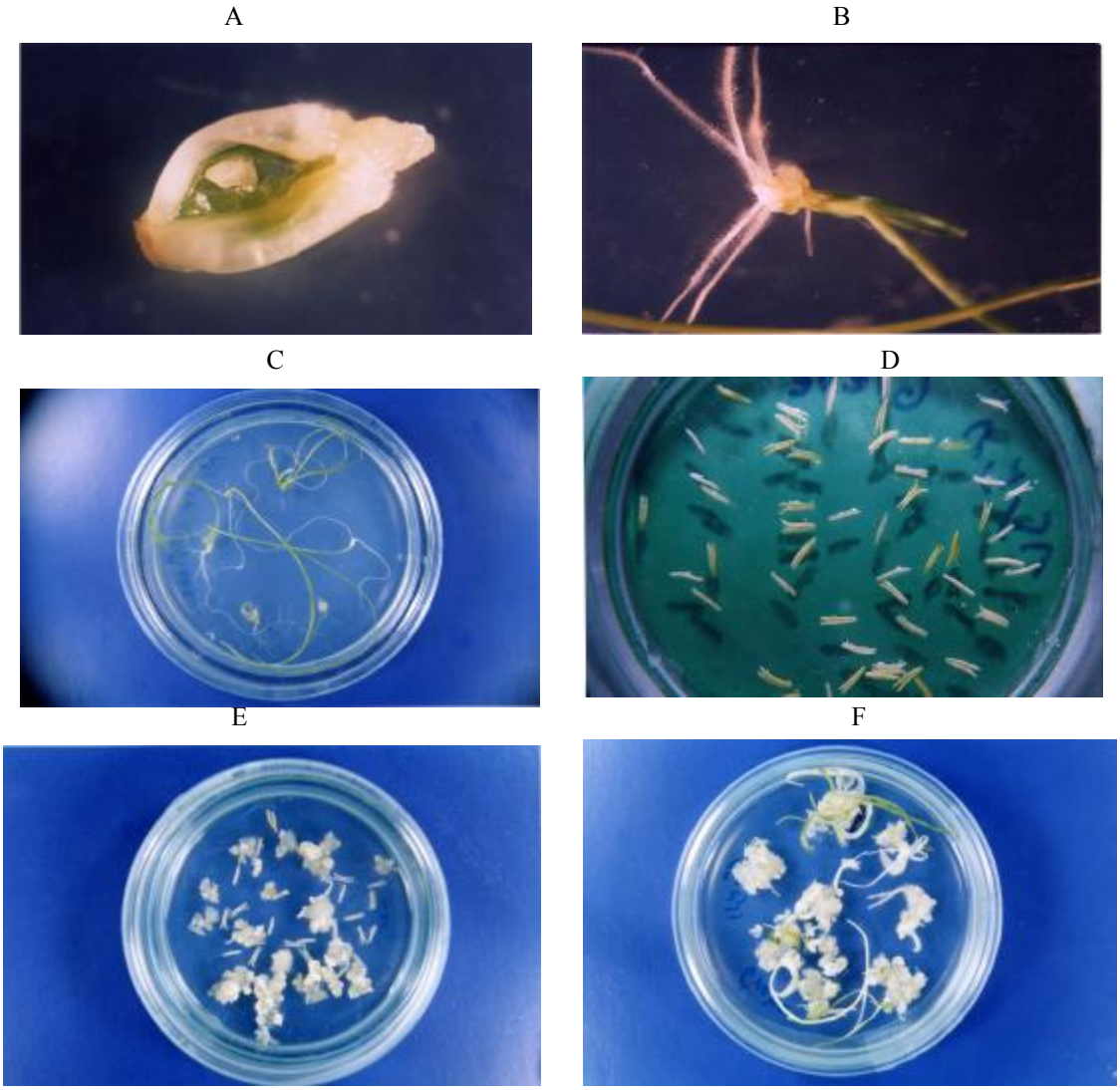
تعداد ۳۵۷۸ گلچه گندم با گرده ذرت تلاقی داده شد که در ۲۳۲۱(۶۴/۸ ٪) مورد ساختار بذر تشکیل گردید و از کل بذرهای تشکیل شده ۱۶ ٪ آنها حاوی جنین، ۰/۵ ٪ آنها دارای جنین و آندوسپرم ناقص بودند (جدول ۱). ۷۴/۶ ٪ از جنین‌های کشت شده جوانه زدند و به گیاهچه تبدیل شدند(شکل۲). ایجاد ساختارهای بذر مانند و تشکیل جنین را می‌توان با بهبود تلاقی، افزایش داد. طبق بررسی‌های انجام شده، در صورتی که عمل اخته کردن انجام نگیرد و گرده‌افشانی با ذرت قبل از خودگشنی صورت گیرد، کارآیی تولید جنین به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد (۱۷). هم‌چنین تشکیل ساختار بذر در ژنوتیپ‌هایی که این ساختار به سختی در آنها ایجاد می‌شود با ۳ ـ ۲ مرتبه تزریق هورمون توفوردی در بالاترین میان‌گره و گذاشتن یک قطره هورمون توفوردی روی گلچه بهبود می‌یابد. این عمل در رقم کرج ۱ و DNB به‌دلیل عدم تشکیل ساختار بذر مانند در بسیاری از گلچه‌های گرده‌افشانی شده انجام شد که در نتیجه منجر به تشکیل ساختار بذر به تعداد۴۶/۳٪ در رقم کرج و۲۳/۳ ٪ در DNB گردید (جدول ۱).

تأثیر ژنوتیپ گندم در تشکیل جنین و گیاه

در بین ژنوتیپ‌های گندم تفاوت معنی‌داری از نظر تشکیل ساختار بذر و جنین در تلاقی با ذرت مشاهده شد(جدول۲). در این بررسی، رقم‌های Grebe و Hautman به ترتیب با ۱۴/۴ و۱/۶ درصد از بالاترین و پایین‌ترین درصد بازدهی(۱۰۰ × تعداد گلچه‌های گرده‌افشانی شده / تعداد گیاهان باززا شده) برخوردار بودند(جدول ۱). سوئناگا و همکاران (۱۹) و چرکائوی و همکاران (۵) تأثیر ژنوتیپ‌های والدینی گندم را در تلاقی با ذرت مورد بررسی قرار

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 13:03 IRST on Monday December 6th 2021



شکل۱. تولید گیاه هاپلویید از روش تلاقی گندم با ذرت و کشت بساک A-C . مراحل مختلف تشکیل گیاهچه در روش تلاقی گندم با ذرت. A. جنین حاصل از تلاقی گندم و ذرت ۱۴ روز بعد از گرده افشانیB,C . گیاهچه‌های حاصل از این تلاقیD-E-F. مراحل کشت بساک گندمD . کشت بساک در محیط CHB. E تشکیل کالوس جنین زا و غیر جنین‌زاF. باززایی گیاهچه سبز و آلبینو

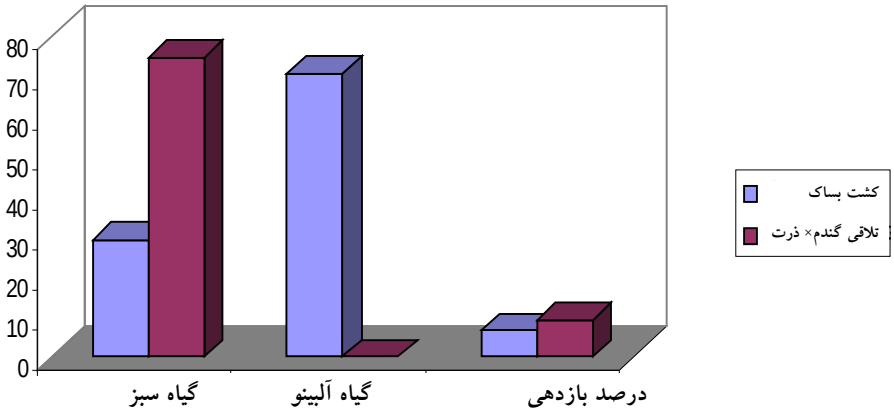
جدول ۱. کارایی تشکیل جنین و باززایی گیاه در ۶ ژنوتیپ گندم در تلاقی گندم با ذرت

ژنوتیپ گندم	تعدادگلچه گرده افشانی شده	تشکیل ساختار بذر		تشکیل جنین		گیاه باززا شده		درصد بازدهی*
		درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
Grebe	۱۷۰۵	۷۴/۲	۱۲۶۶	۲۳/۳	۲۹۵	۸۳/۳	۲۴۶	۱۴/۴
کرج	۸۲	۴۶/۳	۳۸	۱۵/۷	۶	۶۶/۶	۴	۴/۸
قدس	۸۸۵	۶۶/۴	۵۸۸	۱۷	۱۰۰	۶۱	۶۱	۶/۸
Hautman	۴۷۹	۷۱/۱	۳۴۱	۶/۱۵	۲۱	۳۸	۸	۱/۶
ENB	۱۰۰	۴۵	۴۵	۱۳/۳	۶	۶۶/۶	۴	۴
DNB	۳۲۷	۲۳/۳	۷۳	۱۷/۸	۱۳	۴۶/۱	۶	۱/۸
جمع	۳۵۷۸	۶۴/۸	۲۳۲۱	۱۶	۴۴۱	۷۴/۶	۳۲۹	۹/۱

*: ۱۰۰ × تعداد گلچه‌های گرده افشانی شده / تعداد گیاهان باززاشده

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 13:03 IRST on Monday December 6th 2021



شکل ۲. مقایسه دو روش کشت بساک و تلاقی گندم × ذرت

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در روش تلاقی گندم با ذرت

منابع تغییر	درجه آزادی	ساختار بذر		تشکیل جنین		بازایی	
		MS	F value	MS	F value	MS	F value
ژنوتیپ	۵	۱/۳***	۲۵/۸۱	۰/۱۲***	۹/۱۷	۰/۱۹	۰/۶۷ ns
خطا	۱۰۷	۰/۰۵		۰/۰۱۵		۰/۰۲	

***: معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱

ns : غیر معنی‌دار

دادند و گزارش نمودند که پاسخ به تلاقی بین ژنوتیپ‌های گندم معنی‌دار است. هم‌چنین تأثیر معنی‌دار ژنوتیپ گندم در تشکیل جنین در سال ۱۹۹۴ توسط صرافی و همکاران(۱۶) در ۲۱ رقم گندم و در سال ۱۹۹۸ توسط سعیدی و همکاران (۱۵) در ۷ رقم گندم در تلاقی با ذرت گزارش شده است.

کشت بساک

در این پژوهش کشت بساک در ۶ ژنوتیپ گندم مورد استفاده در آزمایش تلاقی گندم با ذرت انجام گرفت. از ۴۴۹۰ بساک کشت شده، ۱۵۱۰ بساک تولید کالوس کردند. در اغلب موارد از یک بساک کالوس ایجاد شد. پس از انتقال کالوس‌ها به محیط باززایی، ۱۰۰۴گیاه باززا شد که ۲۹/۳٪ از آنها گیاهچه‌های سبز و ۷۰/۷ ٪ آنها، گیاهچه‌های آلبینو بودند (جدول ۳ و شکل۲).

بازده پایین گیاهان هاپلویید سبز از مشکلات اصلی کشت بساک می‌باشد. بررسی‌ها نشان داده که ایجاد گیاهان سبز در کشت بساک غلات تحت کنترل ژن‌های هسته (با آثار افزایشی و غیر افزایشی) و سیتوپلاسم است(۸). هم‌چنین فقدان یا نقص در ژنوم پلاستید میکروسپور بسیار مؤثر در تولید گیاهچه‌های آلبینو است(۷). المسلم و همکاران (۱) در بررسی روی تولید هاپلویدی از طریق روش تلاقی گندم با ذرت، مشاهده کردند که تمام گیاهان حاصل از این تلاقی سبز می‌باشند. آنها دلیل این پدیده را حضور سیتوپلاسم کامل والد ماده و وراثت آن توسط پایه مادری در این تلاقی‌ها دانسته و فرض کردند که در کشت بساک اگرچه میکروسپورهای کشت شده دارای مجموعه کامل از ژن‌های مربوط به هسته می‌باشند ولی ممکن است فقدان یا

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 13:03 IRST on Monday December 6th 2021

جدول ۳. پاسخ به کشت بساک در ژنوتیپ‌های گندم هگزاپلویید

ژنوتیپ گندم	تعداد بساک کشت شده	کالوس		گیاه باززا شده		گیاه سبز		گیاه آلبینو		درصد بازدهی گیاه سبز*
		درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
Greabe	۱۳۲۰	۶۸/۱	۹۰۰	۸۸/۶	۷۹۸	۲۷/۳	۲۱۸	۷۲/۶	۵۸۰	۱۶
کرج	۲۳۰	۱۸/۲	۴۲	۳۵/۷	۱۵	۱۳/۳	۲	۸۶/۶	۱۳	۰/۸۶
قدس	۱۰۳۰	۱۵/۹	۱۶۴	۲۹/۲	۴۸	۲۹/۱	۱۴	۷۰/۸	۳۴	۱/۳
Hautman	۴۴۰	۲۰/۹	۹۲	۷۳/۹	۶۸	۳۵/۲	۲۴	۶۴/۷	۴۴	۵/۴
ENB	۱۷۰	۲۴/۷	۴۲	۲۶/۱	۱۱	۳۶/۳	۴	۶۳/۶	۷	۲/۳
DNB	۱۳۰۰	۲۰/۷	۲۷۰	۲۳/۷	۶۴	۵۰	۳۲	۵۰	۳۲	۲/۴
جمع	۴۴۹۰	۳۳/۶	۱۵۱۰	۶۶/۴	۱۰۰۴	۲۹/۲	۲۹۴	۷۰/۷	۷۱۰	۶/۵

* : ۱۰۰ × تعداد بساک کشت شده / تعداد گیاه سبز باززاشده

کامل نبودن وراثت سیتوپلاسمی، موجب تولید گیاهان آلبینو گردد.

تأثیر ژنوتیپ‌های والدینی در پاسخ به کشت بساک

نتایج نشان داد که در بین ژنوتیپ‌های مختلف گندم تفاوت معنی‌داری در تشکیل کالوس و باززایی گیاه وجود دارد(جدول ۴). ژنوتیپ Grebe از بالاترین درصد تشکیل کالوس و باززایی گیاه و ژنوتیپ قدس از کمترین مقدار برخوردار بود(جدول ۳). هم‌چنین اثر ژنوتیپ بر باززایی گیاه سبز معنی‌دار بود و در رقم DNB بالاترین درصد باززایی گیاه سبز (۵۰٪) مشاهده شد (جدول ۳). از طرفی در بین ژنوتیپ‌های مختلف از نظر باززایی گیاه آلبینو تفاوتی دیده نشد و درصد باززایی و تشکیل گیاه آلبینو در بین آنها از ۸۶/۶-۵۰ درصد متغیر بود. دوراماسی- التراتپ و همکاران (۷) اثر ژنوتیپ در تشکیل کالوس و باززایی گیاه کشت بساک را برای ۱۰ ژنوتیپ گندم مورد ارزیابی قرار دادند و تفاوت معنی‌داری در پاسخ به کشت بساک و باززایی مشاهده نمودند. هم‌چنین در ژنوتیپ‌های مختلف تفاوت معنی‌داری در تولید گیاهان آلبینو مشاهده کردند که با نتایج این پژوهش مغایرت داشت. دلیل این مغایرت را می‌توان به تأثیر شرایط محیطی در مناطق جغرافیایی مختلف، استفاده از ژنوتیپ‌های متفاوت در دو پژوهش و تولید بالای گیاه آلبینو در تمام ژنوتیپ‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر و در نتیجه معنی‌دار نشدن عکس العمل ژنوتیپ‌های متفاوت در ایجاد گیاه آلبینو ربط داد.

مقایسه روش‌ها

با بررسی نتایج موجود، درصد گیاهان باززا شده بین ژنوتیپ‌های مختلف گندم، در روش تلاقی گندم با ذرت بین ۳۸ الی ۸۳/۳ درصد و در کشت بساک از ۲۳/۷ الی ۸۸/۶ درصد متغیر بود با این تفاوت که در روش تلاقی گندم با ذرت تمام گیاهان باززاشده سبز و از سطوح پلوییدی نرمال برخوردار بودند، ولی در روش کشت بساک از ۱۰۰۴ گیاه باززاشده، ۲۹/۲٪ گیاهچه‌های سبز و ۷۰/۷٪ آنها، آلبینو بودند(جدول‌های ۱و ۳). سید طباطبایی(۱۷) به‌منظور بررسی میوز جبرانی، از دو روش تلاقی گندم × ذرت و روش کشت بساک در چهار ژنوتیپ Grebe، Hautman، ENB و DNB در تولید گیاهان هاپلویید استفاده کرد. نتایج این بررسی نشان داد که درصد تولید گیاهان هاپلویید در روش تلاقی گندم با ذرت بین ۲۳/۲۱ الی ۶۶/۷ درصد و در روش کشت بساک بین ۱۱/۰۱ الی ۲۳/۸۳ درصد بود. بر اساس نتایج ذکر شده، درصد گیاهان باززا شده از روش کشت بساک در این پژوهش با نتایج سید طباطبایی (۱۷) اختلاف قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهد که علت آن می‌تواند به‌دلیل تفاوت در شرایط محیطی گیاه‌دهنده بساک و استفاده از محیط‌های کشت متفاوت باشد. محیط کشت مورد استفاده در این پژوهش محیط CHB بود که این محیط برای تولید کالوس جنین زا بسیار مناسب است و باززایی کالوس‌های تشکیل شده بهتر صورت می‌گیرد در حالی‌که محیط کشت استفاده شده توسط سید طباطبایی (۱۷) محیط MC۱۷

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 13:03 IRST on Monday December 6th 2021

جدول ۴. تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در روش کشت بساک

منابع تغییر	درجه آزادی	تشکیل کالوس		بازززایی		سبز		آلبینو	
		MS	Fvalue	MS	Fvalue	MS	Fvalue	MS	Fvalue
ژنوتیپ	۵	۰/۱۷	۷۷/۹۲***	۰/۴۰	۴۰/۱۷***	۰/۰۴	۴/۱۲***	۰/۰۳	۰/۹۷ns
خطا	۱۱	۰/۰۰۲		۰/۰۱		۰/۰۱		۰/۰۴	

***: معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱

ns : غیر معنی‌دار

بوده که این محیط نسبت به محیط CHB از کارآیی کمتری برخوردار است.

علاوه بر موارد فوق، موارد زیر را نیز می‌توان در مقایسه دو روش در نظر گرفت:

– در روش تلاقی گندم با ذرت از محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ (بدون هورمون) استفاده می‌شود که هزینه آن بسیار کمتر از محیط کشتCHB به کار رفته برای کشت بساک است. در روش کشت بساک، جهت کالوس گیری، بساک‌ها روی محیط کشت CHB همراه با هورمون کشت می‌شوند و پس از کالوس‌گیری، کالوس‌ها به منظور باززایی به گیاه باید به محیط کشت MS همراه با هورمون انتقال یابند.

– قند مورد استفاده در محیط کشت MS، ساکارز ولی قند مورد نیاز در محیط کشت CHB، مالتوز بوده که هزینه آن در مقایسه با ساکارز بسیار بیشتر است.

– برای استریل کردن محیط کشت MS از اتوکلاو استفاده شد در حالی که در روش کشت بساک به‌دلیل تجزیه تعدادی از مواد، این محیط باید با استفاده از روش اولترافیلتراسیون استریل شود که زمان بر و پر هزینه است.

– در روش تلاقی گندم × ذرت ، استفاده از گرده تازه عامل بسیار مهمی می‌باشد. بنابراین رفتن گندم به خوشه باید با گرده‌دهی ذرت هم‌زمان باشد ولی در روش کشت بساک چنین مشکلی وجود ندارد.

– در تکنیک کشت بساک، میکروسپورها باید جهت مرحله تک هسته‌ای بررسی شوند و در روش تلاقی گندم × ذرت نیاز به اخته کردن خوشه قبل از گرده افشانی با ذرت می‌باشد. البته می‌توان بدون اخته کردن، یعنی یک روز قبل از آزاد شدن گرده‌ها، کلاله گندم را با گرده ذرت تلاقی داد(۱۷).

در روش تلاقی گندم × ذرت از زمان تلاقی سنبلچه‌های گندم با ذرت تا مرحله انتقال گیاهان باززا شده به گلدان حدود یک ماه زمان نیاز است، در حالی‌که در تکنیک کشت بساک ۶-۴ هفته طول می‌کشد که بساک‌ها تولید کالوس کنند و پس از آن باید کالوس‌ها را به محیط باززایی انتقال داد تا از آن گیاه باززا شود که این مرحله ۲-۱ هفته زمان نیاز دارد. از طرف دیگر، از زمان باززایی گیاه تا بزرگ و ریشه‌دار شدن آن و سپس انتقال گیاهان به گلدان حدوداً یک ماه زمان نیاز است. بنابراین در روش تلاقی گندم با ذرت در مدت زمان کمتری می‌توان گیاه هاپلویید ایجاد کرد.

– گیاهان باززا شده از روش تلاقی گندم × ذرت گیاهانی هاپلویید و سبز هستند در حالی که در روش کشت بساک اکثریت گیاهان حاصل آلبینو و گیاهان سبز هم از سطوح پلوییدی مختلف برخوردار است.

– روش کشت بساک به‌دلیل تنوع گامتوکلونال و ایجاد گیاهان با سطوح مختلف پلویدی(میکسوپلویید، آنیوپلویید، پلی‌هاپلویید، هگزاپلویید...) برای اهداف خاصی استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال زمانی که هدف ایجاد تنوع و انتخاب باشد از این روش می‌توان استفاده کرد و در صورتی که ثبات ژنوتیپ مطرح باشد، روش تلاقی گندم × ذرت مناسب‌تر است.

بنابراین به طور کلی می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که در بین این دو روش تولید هاپلوییدی، روش تلاقی گندم و ذرت،

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

روشی عملی و مناسب برای ایجاد گیاهان هاپلویید در ژنوتیپ‌های گندم است و در مقایسه با روش کشت بساک، از پتانسیل بالایی در تولید گیاهان هاپلویید برخوردار است و از روش کشت بساک باید برای اهداف خاصی استفاده نمود.

منابع مورد استفاده

1. Almouslem, A.B., P.P. Jauhar, T.S. Peterson, V.R. Bommineni and M.B. Rao. 1998. Haploid durum wheat production via hybridization with maize. Crop Sci. 38: 1080- 1087.
2. Barclay, I.R.1975. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. Nature. 256: 410-411.
3. Bitsch, C., S. Groger and T. Lelley. 1998. Effect of parental genotypes on haploid embryo and plantlet formation in wheat × maize crosses. Euphytica 103: 319- 323.
4. Chawla, H.S.2000. Introduction to plant biotechnology. Science Publishers, Enfield, NH.
5. Cherkaoui, S., O. Lamsaouri, A. Chlyah and H. Chlyah. 1999. Durum wheat × maize crosses for haploid wheat production influence of parental genotypes and various experimental factors. Plant Breed 28 : 31-35.
6. Chu, C.C., R. D. Hill and A.L. Brule-Babel. 1990. High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in Triticum aestivum l. on monosaccharide containing media. Plant Sci. 66: 255-262.
7. Dogramaci-Altuntepe, M., T.S. Peterson and P.P. Juhar. 2001. Anther culture-derived regeneration of durum wheat and their cytological characterization. J. Hered 92: 56-64.
8. Ekis, H. and C.F. Konzak.1991. Nuclear and Cytoplasmic control of anther culture response in wheat: 1: Analyses of alloplasmic lines. Crop Sci. 31: 1421-1427.
9. Jauhar, P. P., M. Dogramaci-Altuntepe, T. S. Peterrson and A.B.Almouslem. 2000. Seedset on synthetic haploids of durum wheat: Cytological and molecular investigations. Crop Sci. 40: 1742-1749.
10. Kynast, R.G., O. Riera-Lizarazu, M. Isabel Valles, R.J. Okagaki, S.B. Maquieira, G. Chen, E.V. Ananiev, W.E. Odland, C. D. Russell, A. D. Stec, S. M. Livingston, H. W. Rines and R. Pillips. 2001. A complete set of maize individual chromosome additions to the oat genome. Plant Physiol. 125: 1216-1227.
11. Laurie, D.A. and M.D. Bennett.1986. Wheat × Maize hybridization. Can.J.Genet. Cytol. 28: 313-316.
12. Laurie, D. A. and M.D. Bennett.1987. The effect of the cross ability loci Kr1 and Kr2 on fertilization frequency in hexaploid Wheat × Maize crosses. Theor. Appli.Genet. 73: 403-409.
13. Laurie, D.A. and M.D. Bennett. 1989. The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat × maize crosses. Genome 32: 953-961.
14. Murashige, T. and Skooge. 1962. A rivised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-497.
15. Saidi, N., O. Chlyah and H. Chlyah. 1998. Production of green haploid durum wheat plants by pollination of wheat with maize. Can. J. Bot. 76: 652- 656.
16. Sarafi, A., N. Amrani and G. Alibert. 1994. Haploid regeneration from tetraploid wheat using maize pollen. Genome 37: 176-178.
17. Sayed-Tabatabaei, B.E. 1996. Meiotic restitution and tissue culture in wheat and triticale. Ph.D. Thesis. University of Sydney.
18. Suenaga, K. and K. Nakajima. 1993. Segregation of genetic markers among wheat doubled haploids lines derived from wheat × maize crosses. Euphytica 65: 145-152.
19. Suenaga, K., M. Tamaki and 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. Argrobiol. 6: 131-142.
20. Suenaga, K. and K. Nakajima. 1989. Efficient production of haploid wheat (*Triticum aestivum)* through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays)*. Plant Cell Reports 8: 263-266.
21. Zhou, H. and C. Konzak. 1992. Genetic control of green plant regeneration from anther culture of wheat. Genome 35: 957-961.

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 13:03 IRST on Monday December 6th 2021

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com