بررسی امکان تولید گیاه هاپلویید نخود (*Cicer arietinum* L.) به روش کشت این‌ویترو

سعیدرضا وصال[۱]، عبدالرضا باقری[۲] و عباس صفرنژاد[۳]

چکیده

به منظور بررسی پاسخ آندروژنیک ارقام نخود، دو رقم پیروز و کرج ۳۱-۶۰-۱۲، که به ترتیب نماینده‌ای از تیپ‌های دسی و کابلی هستند، برای انجام کشت بساک انتخاب شدند. بساک‌های حاوی میکروسپورهای تک‌هسته‌ای منتخب از غنچه‌های گل تیمار شده در شرایط سرما (۷ تا ۱۰ روز)، در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های متفاوت دو تنظیم کننده رشدی توفوردی (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و کینتین (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت گردیدند. برای باززایی، از محیط‌های کشت MS و بلیدز تغییر یافته با ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشد و غلظت متفاوت ساکارز استفاده شد.

نتایج نشان داد که اثر تنظیم کننده‌های رشدی توفوردی و کینتین در القای کالوس بسیار معنی‌دار است، و با افزایش غلظت هرکدام از این تنظیم کننده‌ها میزان القای کالوس به طور معنی‌داری کاهش یافت. محیط کشت حاوی غلظت‌های کم هر دو تنظیم کننده رشدی (۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب برای توفوردی و کینتین) بهترین واکنش القای کالوس را در پی داشت. هم‌چنین، اثر متقابل ژنوتیپ × غلظت‌های توفوردی نیز معنی‌دار شد، به طوری که رقم پیروز نسبت به رقم دیگر، در واکنش به غلظت‌های متفاوت توفوردی، پاسخ بهتری به القای کالوس از خود نشان داد. تمایز کالوس‌ها و القای اندام‌زایی در محیط کشت MS حاوی NAA و BA با سه درصد ساکارز، و جنین‌زایی در کالوس‌های حاصل از بساک در محیط کشت بلیدز غنی شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۱۰ درصد ساکارز اتفاق افتاد. بررسی سیتولوژیک کالوس‌ها، وجود سلول‌های هاپلویید و تنوع کروموزومی را به اثبات رساند. بنابراین، بهینه کردن غلظت تنظیم کننده‌های رشد در محیط کشت القا، و استفاده از محیط‌های کشت مختلف پایه با غلظت مشخصی از ساکارز، می‌تواند بهبود باززایی از بساک‌های نخود را به دنبال داشته باشد. به نظر می‌رسد تعیین مشخصهٔ کالوس‌ها از مرحله القا تا باززایی، و نیز تعیین اثر پیش‌تیمار سرما در آزمایش‌های بعدی بتواند در بهبود پاسخ به کشت بساک در نخود مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: *القای کالوس، باززایی، کشت بساک، نخود، هاپلویید*

---

۱. مربی زراعت، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲. دانشیار بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۳. استادیار بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان خراسان

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.9.3]

مقدمه

با توجه به اهمیت نخود در میان حبوبات از لحاظ سطح زیرکشت و تولید، و نیز جایگاه زراعی و تأمین بخشی از پروتئین مورد نیاز کشور، لزوم پژوهش در زمینه‌های اصلاحی، و به ویژه رفع موانع اصلاحی این گیاه بیش از پیش احساس می‌شود (۱). امروزه تولید گیاهان هاپلویید از طریق کشت بساک، به عنوان یکی از ابزارهای اصلاحی مکمل در بهبود بسیاری از گیاهان زراعی به شمار می‌رود (۵، ۷ و ۱۵). علاقه به تولید گیاه هاپلویید عموماً به کاربرد آنها برمی‌گردد. هاپلوییدها بیان موتاسیون‌های مغلوب و کشف نوترکیب‌های ویژه را آسان کرده و کارایی انتخاب را افزایش می‌دهند (۵، ۱۳ و ۱۸). به علاوه، با دو برابر کردن شمار کروموزوم‌های گیاهان هاپلویید، تولید سریع گیاهان هموزیگوس را امکان‌پذیر ساخته و می‌توان از آنها به عنوان لاین‌های اینبرد در تولید گیاهان هیبرید بهره برد (۳ و ٤).

به غیر از برخی پژوهش‌های پراکنده در زمینهٔ تولید گیاهان هاپلویید در بقولات، تاکنون مطالعات منسجم و سیستماتیکی در هیچ یک از گونه‌های آن صورت نگرفته است (۱۵). نبود اطلاعات پایه در زمینه کشت بساک این گیاهان از عوامل دیگر رکود تولید هاپلوییدی در این گیاهان می‌باشد (۳ و ۹). به طور کلی، واکنش تیره بقولات نسبت به آندروژنز از طریق کشت بساک با مشکل همراه است. به همین دلیل به گیاهان سرسخت مشهور شده‌اند. کارهای اولیه کشت بساک گیاهان این تیره مانند سویا، یونجه، شبدر (۳) و نخود (۸) به تولید کالوس و یا تشکیل ساختارهای شبه جنینی منجر شده است. افزون بر آن، از کالوس‌های حاصل از کشت بساک شبدر برسیم (*Trifolium alexanderium*) گیاهچه‌های هاپلویید حاصل شده است (۱۱). صفرنژاد (۱۵) موفق شد علاوه بر تولید گیاه از کشت بساک در یونجه، گیاهانی به دست آورد که برخی از آنها در برابر تنش خشکی نسبت به گیاهان والد خود پس از ۳۰ روز بی‌آبی مقاومت نشان دهند.

خان و قوش (۸) برای اولین بار در حبوبات، القای آندروژنز از طریق کشت بساک را در نخود بررسی نمودند. نتیجه آزمایش آنها تولید کالوس و دانه‌های گرده چندهسته‌ای بود، که در برخی موارد علایمی از اندام‌های ریشه‌مانند نیز مشاهده شد. هم‌چنین، بجاج و گوسال (۳) جنین‌زایی و تنوع کروموزومی را در کالوس‌های حاصل از بساک‌های سه رقم نخود گزارش نمودند، ولی جوانه‌زنی یا تولید گیاهچه از این جنین‌ها صورت نگرفت. پژوهش‌ها نشان داده است که عوامل بسیاری واکنش کشت بساک را در گیاهان تحت تأثیر قرار می‌دهند. به عنوان مثال، در ژنوتیپ‌های مختلف برنج تنوع زیادی در مورد کشت‌پذیری بساک‌ها دیده شده است، بدین نحو که روند کلی در این مطالعات، برتری ارقام ژاپونیکا نسبت به ایندیکا را نشان می‌دهد (۵ و ۱۷). از عوامل دیگر می‌توان به نقش پیش‌تیمارهای سرما و مرحله نمو میکروسپورها اشاره نمود، که افزایش القای کالوس و جنین را در بساک‌های کشت شده موجب می‌شود (۹ و ۱۰). استفاده از محیط کشت پایه مناسب و ترکیب و غلظت مشخصی از هورمون‌ها برای دست‌یابی به بهترین واکنش آندروژنز در کشت بساک، از نکات مهم دیگری است که در منابع مختلف به آنها اشاره شده است (۲، ۳، ۵ و ١٤).

گرچه تاکنون محیط کشت پایه MS با ترکیبات هورمونی و مواد آلی مختلف در کشت بساک نخود به کار رفته است (۲ و ۳)، با این حال به نظر می‌رسد نبود مطالعات سیستماتیک در زمینه مقدار و نوع هورمون‌ها، و نیز استفاده نکردن از دیگر محیط‌های کشت پایه، احتمالاً از دلایل ناکامی در تولید هاپلوییدی در این گیاه باشد. بنابراین، در این پژوهش بررسی سیستماتیک هورمون‌ها به منظور القای کالوس و تلاش برای باززایی از بساک‌های کشت شده دو رقم نخود، با تغییر محیط کشت پایه، غلظت ساکارز و هورمون‌ها، و هم‌چنین بهینه کردن شرایط کشت مد نظر بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی به کار رفته در این آزمایش دو رقم نخود به نام

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.9.3]

کرج ۳۱-۶۰-۱۲ و پیروز بود، که به ترتیب نماینده دو تیپ معروف کابلی و دسی بوده و از بانک بذر دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. به منظور به دست آوردن غنچه‌های گل، بذور این ارقام پس از ضدعفونی با سم ویتاواکس دو درصد، در فضای باز و در خاک کشت شد. با فرا رسیدن مرحله گل‌دهی، آن دسته از غنچه‌های گل و بساک‌هایی که ویژگی‌های مورفولوژیک آنها در مرحله نمو در مطالعات سیتولوژیک به کمک رنگ‌آمیزی با محلول یک درصد استوکارمین غالباً در مرحله تک هسته‌ای تعیین شده بود، به فاصله هر سه روز یک بار صبح زود جمع‌آوری و برای اعمال پیش‌تیمار سرما به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند.

به منظور تلقیح (Inoculation) بساک‌ها در محیط کشت، عمل ضدعفونی غنچه‌های گل با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱۰ دقیقه، و در پی آن سه مرتبه شست‌شو با آب مقطر استریل جمعاً به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. تعداد ٤۰ بساک مناسب پس از جدا کردن از میله پرچم به وسیله سوزن و پنس در زیر بینی‌کولار و در محفظه استریل، به محیط‌های کشت القای کالوس درون هر یک از ظروف پتری منتقل، و اطراف درب آنها به وسیله پارافیلم کاملاً مسدود شده و به اتاقک رشد با شرایط نیمه تاریکی (شدت نور ۸ میکرومول بر متر مربع در ثانیه) و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت.

محیط‌های کشت القای کالوس شامل محیط کشت پایه MS (۱۲) با تلفیق غلظت‌های مختلف دو هورمون توفوردی (2,4-D) و کینتین (Kinetin) برحسب میلی‌گرم در لیتر به شرح ذیل بود:

M_1: 2,4D(1)+Kinetin(0.1) M_2: 2,4-D(1)+Kinetin(0.2)
M_3: 2,4-D(1)+Kinetin(0.5) M_4: 2,4-D(2)+Kinetin(0.1)
M_5: 2,4-D(2)+Kinetin(0.2) M_6: 2,4-D(2)+Kinetin(0.5)
M_7: 2,4-D(3)+Kinetin(0.1) M_8: 2,4-D(3)+Kinetin(0.2)
M_9: 2,4-D(3)+Kinetin(0.5)

برای ارزیابی القای کالوس در تیمارهای محیط کشت القا، نخست درصد واکنش (نسبت کالوس‌های حاصل به شمار بساک‌های کشت شده) برای هر تکرار محاسبه شد، و تجزیه آماری بر اساس آن صورت گرفت.

به منظور تلاش برای باززایی گیاهچه، کالوس‌ها یا دستجات سلولی به دست آمده در مرحله القا، شش هفته بعد به محیط کشت MS و بلیدز تغییر یافته (۱۵) با ترکیبات هورمونی مشخص شده در جدول ۱ منتقل، و در اتاقک رشد با شرایط فتوپریودی ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ٥٤ میکرومول بر متر مربع در ثانیه نگهداری شدند.

برای آزمایش‌های سیتولوژیک، از کالوس‌های کشت شده در کمترین مقدار هورمونی در محیط کشت القا استفاده شد. پس از آن کالوس‌ها به مدت یک شب در محلول فیکساتیو (محلول ۳ به ۱ به ترتیب اتانول ۹۵ درصد به اسید استیک خالص) قرار گرفتند، و سپس در اسید کلریدریک یک نرمال در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹ دقیقه هیدرولیز، و در نهایت با فولگن و استوکارمین برای مشاهده کروموزوم‌ها رنگ‌آمیزی شدند.

تجزیه داده‌ها به روش آزمایش فاکتوریل ۳×۳×۲ در چارچوب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد. فاکتورها شامل هورمون‌های توفوردی و کینتین، هر کدام سه سطح و دو رقم بودند. به منظور رسیدن به توزیع نرمال یا نزدیک به نرمال داده‌ها، تبدیل آرک سینوس انجام شد. پس از آن تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC، و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

القای کالوس

نخستین آثار تورم در بساک‌ها و تولید کالوس پس از گذشت هفت روز از کشت آنها در محیط‌های کشتی با مقادیر کم هورمون توفوردی و کینتین (محیط‌های کشت M_1 تا M_5) آشکار شد، و پس از گذشت ۲۸ روز در تیمارهای مناسب توده‌های کالوس با اندازه‌های مختلف به خوبی شکل گرفتند. رنگ کالوس‌های تولید شده از شیری تا کرم متمایل به سبز

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.9.3]

جدول ۱. محیط‌های کشت به کار رفته و درصد باززایی کالوس‌های حاصل از کشت بساک

محیط کشت	فرمولاسیون	شمار کالوس‌های منتقل شده	درصد باززایی از کالوس‌ها
R_1	MS (بدون هورمون) + ساکارز (۳۰ گرم در لیتر)	٤٠	–
R_2	NAA MS (۰/۲) + BA(۰/٤[a]) + ساکارز (۳۰ گرم در لیتر)	٤٠	٥
R_3	Bio_2Y[b] + Kin (۱) + LAA(۰/٥) + ساکارز (٤٠ گرم در لیتر)	۲۰	–
R_4	Bio_2Y + Kin (۰/٥) + ساکارز (۱۰۰ گرم در لیتر)	۲۰	۱۰

a : غلظت هورمون‌ها بر اساس میلی‌گرم در لیتر

b : محیط کشت بلیدز تغییر یافته (به متن مراجعه شود)

متفاوت، و از انواع کالوس‌های فشرده و سخت بودند، که در واکنش‌های بعدی به تدریج نرم و شکننده شده، و در برخی از واکنش‌ها ساختارهای گلوبولی شکل نظیر ساختارهای شبه جنینی ملاحظه گردید. ویژگی‌های فوق با گزارش‌های دیگر در زمینه کشت بساک نخود مشابهت‌های زیادی نشان داد (۲ و ۸).

تأثیر ژنوتیپ

نتایج حاصل از تجزیه آماری اثر رقم نشان داد که میان دو رقم نخود مورد بررسی از نظر درصد کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰٥$) وجود دارد. به گونه‌ای که رقم پیروز با میانگین کل ۱۷/۷ درصد کالوس‌زایی در بساک‌های کشت شده، نسبت به رقم کرج ۳۱-٦۰-۱۲ با میانگین ۱۱/۱ درصد، صرف نظر از محیط‌های کشت به کار رفته، برتری معنی‌داری در القای کالوس از خود بروز داد. در آزمایش‌های کشت بافت نخود، واکنش ضعیف‌تر تیپ کابلی گزارش شده است (۲). بجاج و گوسال (۳) در بررسی واکنش کشت بساک ارقام نخود هندی، تأثیر ژنوتیپ بر کشت‌پذیری و القای کالوس را از عوامل مهم بیان کرده‌اند. گذشته از آن، در بسیاری از پژوهش‌های مربوط به کشت بساک در گیاهان مختلف نیز تأثیر عوامل ژنتیکی در کنترل این فرایند کاملاً آشکار شده است (۳، ۷، ۱۳، ١٤ و ۱۸). چن و چن (٤) نیز نشان دادند که پاسخ آندروژنی توسط ژن‌هایی کنترل می‌شود که می‌توان در اثر تلاقی آنها را به ژنوتیپ‌هایی منتقل کرد که در برابر کشت بساک پاسخ ضعیفی دارند. بنابراین، کنترل ژنتیکی از عوامل مهم تأثیرگذار در کشت بساک می‌باشد.

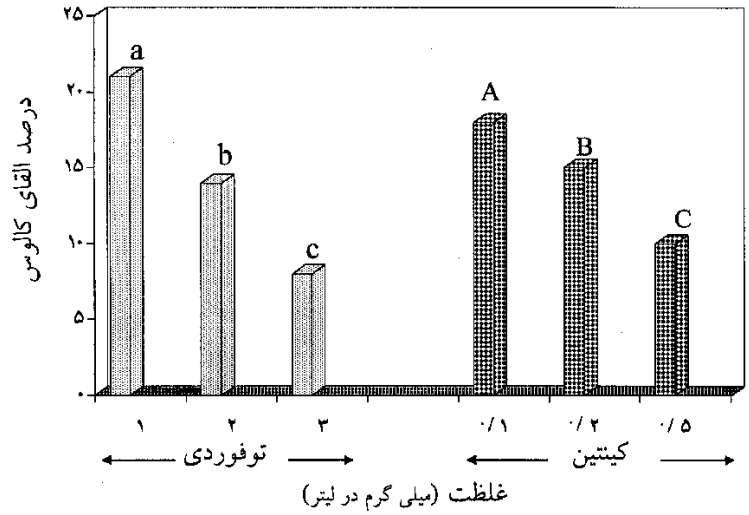
تنظیم‌کننده‌های رشد

تأثیر هورمون‌های توفوردی و کینتین هر یک به صورت جداگانه، از نظر درصد القای کالوس بسیار معنی‌دار ($P<۰/۰۰۰۰۱$) بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که افزایش در غلظت هر یک از این دو هورمون روند کاهش در القای کالوس را سبب شده است (شکل ۱)، به طوری که در مورد هورمون توفوردی بیشترین کالوس‌زایی (۲۱ درصد) در سطح یک میلی‌گرم در لیتر و کمترین القای کالوس (۸ درصد) در سطح سه میلی‌گرم در لیتر اتفاق افتاد. گرچه تاکنون در آزمایش‌های کشت بساک نخود غلظت‌های مختلف توفوردی مورد ارزیابی قرار نگرفته، با این حال در کشت بساک شبدر برسیم مشخص شده است که افزایش بیش از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی نکروزه شدن کالوس‌ها را به دنبال داشته است (۱۱). به این ترتیب، در برخی از ژنوتیپ‌ها و ریزقلمه‌ها حساسیت به غلظت توفوردی وجود داشته، و لزوم بهینه کردن احساس می‌شود.

در مورد هورمون کینتین نیز بیشترین و کمترین القای کالوس به ترتیب در سطح ۰/۱ و ۰/٥ میلی‌گرم در لیتر اتفاق افتاد (شکل ۱). با توجه به مقادیر نسبتاً کمتر هورمون کینتین به کار رفته در مقایسه با توفوردی، و نزدیکی بین مقادیر آن، چنین استنباط می‌شود که سطوح بالاتر این هورمون احتمالاً شدت

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.9.3]



شکل ۱. تأثیر جداگانه هورمون‌های توفوردی و کینتین بر درصد القای کالوس

کالوس‌زایی را به نحو چشم‌گیری کاهش خواهد داد. در بیشتر آزمایش‌های مربوط به کشت بساک در نخود نیز عملاً غلظت پایین سیتوکینین، مثلاً ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۰۲۱ میلی‌گرم در لیتر BA استفاده شده است (۲ و ۸). گرچه حضور توفوردی سبب القای کالوس، رشد و تمایززدایی سلول‌ها می‌گردد، ولی حضور کینتین به تقسیم سلولی کمک کرده، رشد و نگهداری بعدی کالوس را موجب می‌شود (۲). در یونجه ثابت شده است که حضور اکسین برای القای جنین‌زایی و سیتوکنین برای حداکثر واکنش ضروری می‌باشد (۱۶).

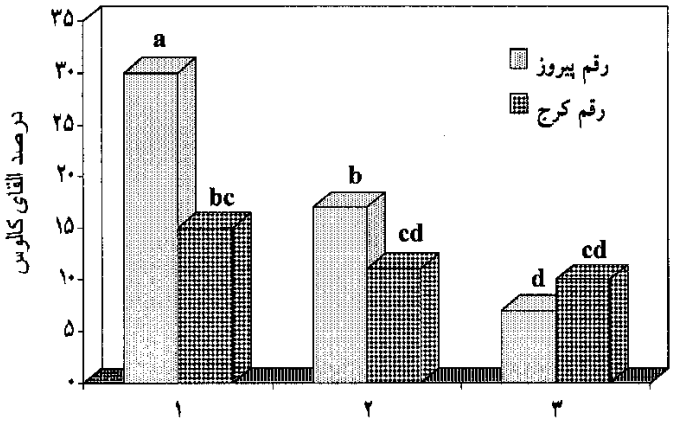
از نکات قابل توجه دیگر، اثر متقابل معنی‌دار ($P<0/00001$) غلظت هورمون توفوردی و رقم بود (شکل ۲). به سخن دیگر، میزان واکنش دو رقم به کار رفته در این آزمایش در برابر غلظت معینی از هورمون توفوردی یکسان نبوده و اختلاف زیادی را نشان دادند. پاسخ رقم پیروز با افزایش میزان هورمون توفوردی به شدت کاهش یافت، در حالی که روند کاهش در رقم دیگر اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۲). از سوی دیگر، واکنش رقم پیروز نسبت به رقم دیگر در مقادیر پایین هورمون توفوردی بسیار بیشتر بود. در آزمایش‌های دیگر نیز واکنش متفاوت ارقام مختلف در یک ترکیب هورمونی ویژه ملاحظه شده است (۲ و ۱۸). به عنوان مثال، بجاج و گوسال (۳) در کشت بساک نخود در محیط کشت MS حاوی دو میلی گرم در لیتر توفوردی، بین رقم G54 و Har Chole به ترتیب با ۳۹ و ۵۲/۵ درصد، اختلافی معادل ۱۳/۵ درصد در کالوس‌زایی مشاهده کردند.

اثر متقابل محیط کشت و رقم

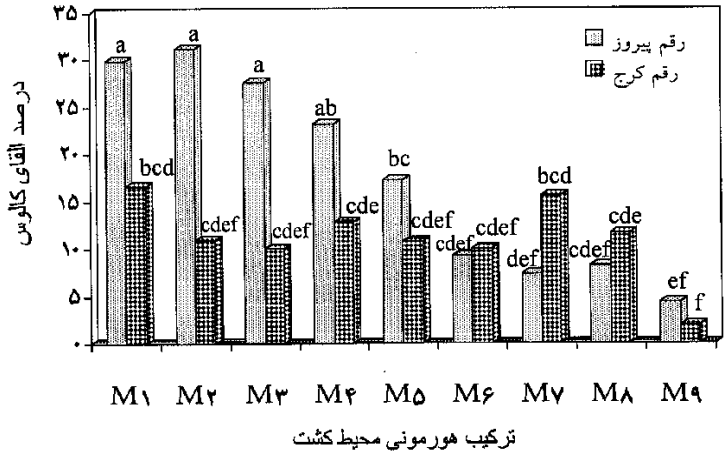
مقایسه میانگین‌های اثر متقابل محیط کشت و رقم، که در حقیقت اثر متقابل هورمون‌های توفوردی، کینتین و رقم بود، مشخص کرد که اختلاف قابل توجه و معنی‌داری، به ویژه در محیط‌های کشت M_1 تا M_4 در واکنش ارقام قابل مشاهده است (شکل ۲). به طوری که در محیط کشت M_2، رقم پیروز با ۳۲/۲ درصد بیشترین واکنش به القای کالوس، و در همان محیط کشت، رقم کرج ۳۱-۶۰-۱۲ با ۱۰/۹ درصد، اختلاف کاملاً معنی‌داری با آن داشت. در محیط کشت M_9 با بالاترین مقدار هر یک از هورمون‌های توفوردی و کینتین کمترین القای کالوس ملاحظه گردید. به طور کلی، شکل ۳ روند تدریجی کاهش پاسخ به القای کالوس را، با توجه به افزایش غلظت هر دو هورمون، خصوصاً در رقم پیروز (رقم مستعد)، به نمایش گذاشت. یی و همکاران (۱۸) نیز در بررسی تغییرات مقادیر هورمون توفوردی و زآتین در کشت بساک جو، حساسیت بیشتر رقم مستعد را به افزایش مقدار این دو هورمون گزارش کرده‌اند.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.9.3]



شکل ۲. تأثیر سطوح مختلف هورمون توفوردی بر درصد القای کالوس دو رقم نخود



شکل ۳. اثر متقابل ترکیب محیط‌های کشت هورمونی و رقم بر درصد القای کالوس

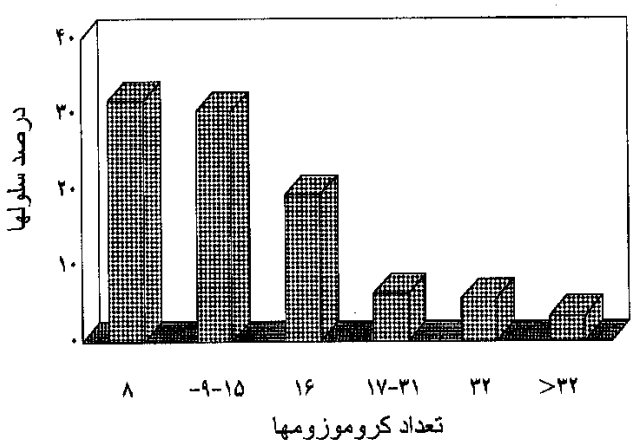
باززایی

کالوس‌های حاصل از ۹ محیط کشت متفاوت هورمونی برای انجام باززایی به محیط‌های کشت مختلف (جدول ۱) انتقال یافتند. در این مرحله، محیط کشت پایه و غلظت ساکارز، بر خلاف دیگر گزارش‌های موجود در زمینه کشت بساک نخود، تغییر داده شد تا نقش آنها در باززایی از کالوس معین شود. بررسی‌های مشاهده‌ای نشان داد با انتقال چهار قطعه کالوس (حداقل قطر سه میلی‌متر) به محیط کشت R_1 (جدول ۱) پس از چهار هفته، ۷۵ درصد آنها علایمی از سبز رنگ شدن و رشد اندک را بروز دادند. با این حال، رشد آنها طی این مدت کاملاً متوقف شده و کم کم در حدود نیمی از آنها به رنگ قهوه‌ای تبدیل و سپس نکروزه شدند. از ٤٠ قطعه کالوس انتقال یافته به محیط کشت R_2 پس از گذشت چهار هفته، باززایی ساقچه (در رقم پیروز) و باززایی ریشه در رقم کرج با فراوانی پنج درصد مشاهده شد. در مرحله سوم، به دلیل لزوم آزمایش‌های سیتولوژیک و پاسخ ضعیف‌تر رقم کرج ۳۱-٦۰-۱۲ به القای کالوس، تنها ۲۰ قطعه کالوس رقم پیروز به محیط‌های کشت R_3 و R_4 انتقال یافت، که در محیط کشت R_4 جنین‌های قلبی و شیپوری شکل در سطح کالوس‌ها پدیدار، و با انتقال آنها به محیط کشت MS بدون هورمون، جوانه‌زنی صورت گرفت، و دو مورد از این جنین‌ها تولید ریشه‌چه و ساقچه نمودند.

به نظر می‌رسد محیط کشت پایه (بلیدز تغییر یافته) و افزایش غلظت ساکارز (۱۰۰ گرم در لیتر)، از عوامل اصلی در باززایی از طریق جنین‌زایی در محیط کشت R_4 باشد. زیرا در

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.9.3]



شکل ٤. وضعیت کروموزومی سلول‌های کالوس حاصل از بساک

بقولات دانه‌ریز همچون یونجه، محیط کشت بلیدز تغییر یافته، واکنش خوبی در جنین‌زایی و باززایی از کالوس‌های القا شده از بساک به همراه داشته است (۱۵). به دلیل نیازهای غذایی متفاوت برای القای آندروژنز و رشد جنین‌های آندروژنیک، محیط کشت پایه و ترکیب مواد آن، به ویژه نیتروژن آمونیومی، نقش مهمی در کنترل القا و نمو گیاهچه‌های سالم بر عهده دارد (۵). بنابراین، در پژوهش حاضر، غلظت مواد در محیط کشت بلیدز تغییر یافته احتمالاً در نحوه واکنش جنین‌زایی نقش مهمی داشته است. هم‌چنین، گزارش‌ها نشان می‌دهد که ساکارز به عنوان عامل تغذیه‌ای و اسمزی عمل کرده و در القای کالوس و باززایی نقش بسزایی دارد (۲ و ۵)، به طوری که در برنج و جو غلظت زیاد ساکارز سبب افزایش باززایی گیاهان سبز شده است (۵).

از عوامل دیگری که احتمالاً در تشکیل جنین‌ها مؤثر بوده است پیش‌تیمار سرماست. گرچه در آزمایش‌های دیگر کشت بساک نخود تیمار سرما به مدت سه روز اعمال شده است (۲ و ۳)، ولی در این آزمایش این مدت به ۷-۱۰ روز افزایش یافت. در پژوهش‌های کشت بساک در غلات، پیش‌تیمار ۹ تا ۱۲ روز برای افزایش کالوس‌زایی و تشکیل جنین مفید پیشنهاد شده است (۵، ۱۷ و ۱۸). در ذرت پیش‌تیمارهای ۹ تا ۱۳ روز عملکرد شبه جنین را به ترتیب ۳/۹ تا ۱۱/۸ برابر بیشتر از شاهد (بدون پیش‌تیمار سرما) افزایش داده است (۱۷). بنابراین، به نظر می‌رسد مجموعه‌ای از عوامل فوق در جنین‌زایی در محیط کشت R_4 نقش داشته‌اند.

بررسی‌های سیتولوژیک

در بررسی سیتولوژیک کالوس‌ها، افزون بر تنوع در اندازه سلول‌ها، تنوع در شمار کروموزوم‌ها نیز کاملاً آشکار بود. به گونه‌ای که در میان ۸۸ سلول قابل شمارش از نمونه‌های مختلف (شکل ٤)، ۳۱/۸ درصد از آنها سلول‌های هاپلویید (n=8)، ۱۹/۳ درصد دیپلویید، ۵/٦ درصد تتراپلویید و بقیه آنوپلویید بودند، که با نتایج بررسی‌های سیتولوژیک خان و قوش (۹) در کالوس‌های حاصل از کشت بساک (یعنی ۲۸/۱ درصد) تقریباً مشابهت داشت، ولی با نتایج بجاج و گوسال (۳)، مبنی بر وجود ۱۷ درصد سلول‌های هاپلویید، هم‌خوانی نداشت. احتمالاً تفاوت‌های ژنوتیپی در این امر تأثیر داشته است. به هر حال، عواملی نظیر درآمیختن هسته‌های رویشی و زایشی دانه گرده، رشد میکروسپورهای کاهش نیافته، و هم‌چنین تأثیر هورمون‌هایی همچون توفوردی ممکن است در بروز پلی‌پلوییدی و آنوپلوییدی تأثیر داشته باشند (٦).

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج نشان داد که در واکنش آندروژنز، تأثیر ژنوتیپ بسیار بارز بوده، و رقم مستعد (رقم پیروز) در برابر

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.9.3]

تغییرات غلظت هورمون‌ها از حساسیت بیشتری برخوردار است. به هر حال، تأثیر مثبت مقادیر کم دو هورمون توفوردی و کینتین در القای کالوس و در قسمت باززایی برخلاف دیگر پژوهش‌های صورت گرفته، تغییر محیط کشت پایه، میزان ساکارز و باززایی‌های انجام شده، اطلاعات بیشتری در اختیار قرار داد. هم‌چنین، با اثبات حضور سلول‌های هاپلوییـد در کالوس‌های حاصل از کشت بساک، می‌توان انتظار داشت که با رفع موانع باززایی بتوان گیاهچه‌های هاپلوییـد را در این گیاه تولید کرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و دانشکده کشاورزی آن دانشگاه، به خاطر تأمین هزینه و امکانات اجرایی این طرح صمیمانه تشکر می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱. باقری، ع.، ا. نظامی، ع. گنجعلی و م. پارسا. ۱۳۷٦. *زراعت و اصلاح نخود* (ترجمه). انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

2. Bajaj, Y. P. S. 1990. Biotechnology of Agriculture and Forestry 10, Legume and Oilseed Crops I. Springer Verlag, Berlin.
3. Bajaj, Y. P. S. and S. S. Gosal. 1987. Pollen embryogenesis and chromosomal variation in cultured anther of chickpea. Int. Chickpea Newslett. 17: 12-13.
4. Chen, Z. and Q. Chen. 1993. Genetic studies of rice (*Oryza sativa* L.) anther culture response. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 34: 177-182.
5. Gossal, S. S., A. S. Sandhu, J. S. Sandhu-Gill, R. Singh, B. Khehra, G. S. Sidhu and H. S. Dhaliwal. 1997. Haploidy in rice. PP. 1-35. *In*: J. Mohan, S. K. Spory and R. E. Veiliux (Eds.), *In vitro* Haploid Production in Higher Plants. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands.
6. Henry, Y., J. L. Marcotte and J. Buysen. 1996. The effect of aneuploidy on karyotype abnormalities in wheat plants regenerated from short and long term somatic embryogenesis. Plant Sci. 114: 101-109.
7. Hou, L., S. E. Ullrich and A. Kleinhofs. 1994. Inheritance of anther culture traits in barley. Crop Sci. 34: 1243-1247.
8. Khan, S. K. and P. L. Ghosh. 1983. *In vitro* induction of androgenesis and organogenesis in *Cicer arietinum* L. Current Sci. 52: 891-893.
9. Kultchuk-Santos, E., J. E. Mariath and E. Mandstock. 1997. Cytological analysis of early microspore divitions and embryo formation in cultured soybean anthers. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 49: 107-115.
10. McKersie, B. D. and D. C. W. Brown. 1997. Somatic embryogenesis and artificial seeds. PP. 111-143. *In*: B. D. Mchersie and D. C. Brown (Eds.), Biotechnology and the Improvement of Forage Legume. CAB International, USA.
11. Mokhtarzadeh, A. and M. J. Constantine. 1978. Plant regeneration from hypocotyl and anther-derived callus of berseem clover. Crop Sci. 18: 567-572.
12. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
13. Reddy, Y. S. and S. K. Leelavathi. 1985. Influence of genotype and culture medium on microspore callus induction and green plant regeneration in anthers in *Oryza sativa*. Physiol. Plant. 63: 309-314.
14. Rokka, V. M., I. P. T. Valkonen and E. Pehu. 1995. Production and characterization of haploids from somatic hybrids between *Solanum brevidens* and S. *tuberosum* through anther culture. Plant Sci. 112: 85-95.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.9.3]

15. Safarnejad, A. 1996. Improvement in salt and drought tolerant alfalfa (*Medicago sativa* L.) using tissue culture and molecular genetic techniques. Ph.D. Thesis, The University of Liverpool, England.
16. Skokut, T. A., J. Manchester and J. Schaefer. 1985. Regeneration in alfalfa tissue culture stimulation of somatic embryo production by amino acids and N-15 NMR determination of nitrogen utilization. Plant Physiol. 79: 579-583.
17. Yam, J., Q. Xue and J. Zhu. 1986. Genetic studies of anther culture ability of rice (*Oryza sativa*). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 45: 253-258.
18. Ye, J. M., B. L. Harvey and K. N. Kao. 1985. Effect of 2,4-D and zeatin riboside on pollen callus induction in barley anther culture. Can. J. Plant Sci. 65: 29-32.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.2.9.3]