

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

ظاهره محمودی قهساره، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی، سیروس قبادی و آقا فخر میرلوحی^۱

چکیده

اهمیت هاپلوئیدها در زمینه ژنتیک و اصلاح گیاهان برای مدت‌های طولانی است که شناخته شده است. به نژادی از طریق تولید گیاهان هاپلوئید، روشی مناسب برای تسریع برنامه‌های اصلاحی و مطالعات ژنتیکی در گندم است. روش‌های معمول مورد استفاده برای ایجاد گیاهان هاپلوئید 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 هاپلوئید در شش ژنوتیپ گندم استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد که تولید هاپلوئیدی از هر دو روش وابسته به ژنوتیپ بوده و از پتانسیل بالایی برخوردار می‌باشد. یکی از مشکلات عمده کشت بساک بازده پایین گیاهان سبز هاپلوئید است. در این ارزیابی، از روش کشت بساک، ۷۰/۷٪ از گیاهان باززا شده گیاهچه‌های آلبینو، و ۲۹/۳٪ از آنها سبز بودند در حالی که در روش تلاقی گندم با ذرت تمام گیاهچه‌های حاصل از این تلاقی سبز و از نظر سطح پلوئیدی، هاپلوئید بودند. به‌طور کلی چنین نتیجه‌گیری شد که روش تلاقی گندم و ذرت، روشی عملی و مناسب برای ایجاد گیاهان هاپلوئید در ژنوتیپ‌های گندم است و در مقایسه با روش کشت بساک از پتانسیل بالاتری در تولید هاپلوئید برخوردار است. روش کشت بساک به دلیل 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

ژنتیکی و... استفاده می‌شوند (۱، ۹). تولید خودبه‌خودی هاپلوئیدها 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 کلالة همراه با تأخیر،

گیاهان هاپلوئید دارای نیمی از کروموزوم‌های گیاه والد خود هستند و به عنوان ابزار قدرتمندی برای تحقیقات پایه، از جمله: ژنتیک، سیتوژنتیک، جداسازی آنیوپلوئیدها، بررسی جفت شدن کروموزوم‌ها، دست‌یابی سریع به خلوص ژنتیکی، نقشه‌های

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

گیاهان هاپلوئید 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 هاپلوئید تأثیری ندارند و در واقع می‌توان گفت این روش وابسته به ژن‌های Kt 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 سانتروم کروموزوم‌های 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 به دلیل عدم تشکیل آندوسپرم توانایی زنده ماندن ندارند و بنابراین نجات جنین برای رشد آنها ضروری می‌باشد. این روش، به منظور تسریع برنامه‌های اصلاحی و به‌نژادی استفاده می‌شود و مزیت‌های آن شامل تولید لاین‌های هموزیگوت، ایجاد ارقامی با صفات مطلوب و استفاده از لاین‌های دابل هاپلوئید برای تهیه نقشه ژنتیکی است. تولید گیاهان هاپلوئید 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 کارایی روش کشت بساک و تلاقی بین جنسی گندم با ذرت در ایجاد گیاهان هاپلوئید در گندم هگزاپلوئید و بررسی عکس العمل ژنوتیپ‌های مختلف نسبت به این دو روش بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش، ۶ ژنوتیپ گندم هگزاپلوئید به نام‌های قدس (حاصل تلاقی ارقام ایرانی و مکزیک)، کرج ۱ (حاصل

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 هاپلوئید 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 هاپلوئیدها در گندم شامل کشت بساک، کشت میکروسپور، دورگ‌گیری بین جنسی گندم با *Hordeum bulbosum* و تلاقی گندم × ذرت می‌باشد (۱ و ۳). در گندم کشت بساک دارای پتانسیل بالایی برای تولید گیاهان هاپلوئید می‌باشد و ایجاد گیاهان هاپلوئید از این طریق برای مطالعات جهش به ویژه برای انتخاب جهش یافته‌های مغلوب، ایجاد تنوع گامتوکلونال، تولید لاین‌های آنیوپلوئید، انتخاب لاین‌های با کروموزوم‌های جابه‌جا شده یا دارای کروموزوم‌های اضافی سودمند می‌باشد (۱۷). استفاده از این روش در گندم به دلیل پاسخ متفاوت بساک‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف، تولید گیاهان آبینو، ایجاد گیاهان با سطوح پلیپیدی مختلف از جمله آنیوپلوئیدها (Aneuploid) و میکسوپلوئیدها (Mixoploids)، دارای محدودیت بوده و برای اهداف خاصی استفاده می‌شود (۴ و ۲۱). روش دیگری که به منظور تولید هاپلوئیدی در گندم استفاده می‌شود دورگ‌گیری بین جنسی است. در تلاقی بین جنسی، ناسازگاری کروموزومی منجر به حذف کروموزوم‌های پایه نر از جنین، در ابتدای نمو آن گردیده که پس از نجات جنین و انتقال آن به محیط کشت مناسب، گیاهچه‌های هاپلوئید حاصل می‌شوند (۱۸). نخستین بار در سال ۱۹۷۵، بارکلی (۲) تولید هاپلوئیدی 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 Kt_1 و Kt_2 که به ترتیب روی کروموزوم‌های ۵B و ۵A گندم قرار دارند، استفاده از این تکنیک را برای تولید هاپلوئیدی محدود می‌کند (۲). تلاقی بین جنسی گندم و ذرت، روشی مناسب برای ایجاد

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 بر اساس $\text{Arc sin} x^2$ 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 خوسه

بر اساس گزارش‌های ارائه شده توسط محققین، زمان مناسب کشت بساک، زمانی است که میکروسپور در مرحله تک هسته‌ای باشد (۱۷،۷ و ۲۱). این مرحله قبل از نخستین تقسیم میتوز یعنی اواسط یا اواخر مرحله تک هسته‌ای است و می‌تواند با یک صفت ساده مورفولوژیکی تطبیق داد. به عنوان مثال در ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این پژوهش مرحله مناسب از لحاظ مورفولوژیک مطابق با زمانی بود که خوسه‌ها 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 خوسه‌های 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 خوسه

غلاف‌های دارای خوسه‌های مناسب پس از برداشت و انتقال به آزمایشگاه کشت بافت گیاهی، با الکل ۹۶٪ به صورت اسپری، استریل و در زیر هود خوسه‌ها از غلاف خارج گردیدند. سپس بساک‌ها در محیط کشت CHB (۶) حاوی

تلاقی رقم روشن و یک رقم خارجی، Grebe و Hautman (دو رقم از استرالیا) و DNB، ENB (ارقام ساختگی از دانشگاه سیدنی استرالیا) به عنوان گیاه دهنده بساک و هم‌چنین به عنوان پایه مادری در تلاقی گندم × ذرت و ۴ سینگل کراس ذرت به شماره‌های ۷۰۴، ۶۴۷، ۶۶۷ و ۶۱ به عنوان پایه پدری استفاده شدند. بذرهاى 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 ۴۰۰ W) در پاییز سال ۱۳۸۱ کشت شدند و مراقبت‌های 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، خوسه‌های گندم اخته گردیده و با پاکت کاغذی نیمه شفاف پوشانیده شدند. پس از آن زمانی که کلاله‌ها آماده پذیرش گرده بودند، با گرده تازه جمع‌آوری شده از بوته‌های ذرت گرده افشانی شدند و سپس محلول توفوردی (۱۰۰ ppm) به بالاترین میان‌گره تزریق گردید.

۲. نجات جنین

چهارده روز بعد از گرده افشانی، خوسه‌های تلاقی داده شده جمع‌آوری و با الکل ۷۰٪ استریل شدند. سپس بذرهاى نارس تشکیل شده در شرایط استریل (لامینار فلو) خارج و با الکل ۹۶٪ ضد عفونی شدند. شکافتن بذرهاى 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 (۱۴) و به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند (شکل ۱). هنگامی که جنین‌ها به گیاهچه‌های با طول ۴ - ۵ سانتی‌متر رسیدند، از محیط کشت خارج و پس از

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 بذره‌های 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 (شکل ۲). 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 خودگشایی صورت گیرد، کارایی 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 - ۲ مرتبه تزریق هورمون توفوردی در بالاترین میان‌گرمه 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 تعداد ۴۶/۳٪ در رقم کرج و ۲۳/۳٪ 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 (جدول ۲). در این بررسی، رقم‌های Grebe و Hautman به ترتیب با ۱۴/۴ و ۱/۶ 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

۲ mg/l ۲-D، ۲، ۱ mg/l کاینیتین، ۹۰ g/l مالتوز و ۲/۸ g/l آگارز کشت و در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفت. بسته به ژنوتیپ ۳-۶ هفته بعد، بساک‌ها تولید کالوس کردند. کالوس‌ها به منظور باززا شدن به محیط کشت MS همراه با ۱ mg/l بنزیل آدنین، ۱ mg/l اسید ایندول تری استیک اسید، ۳۰ g/l ساکارز و ۲/۸ g/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.

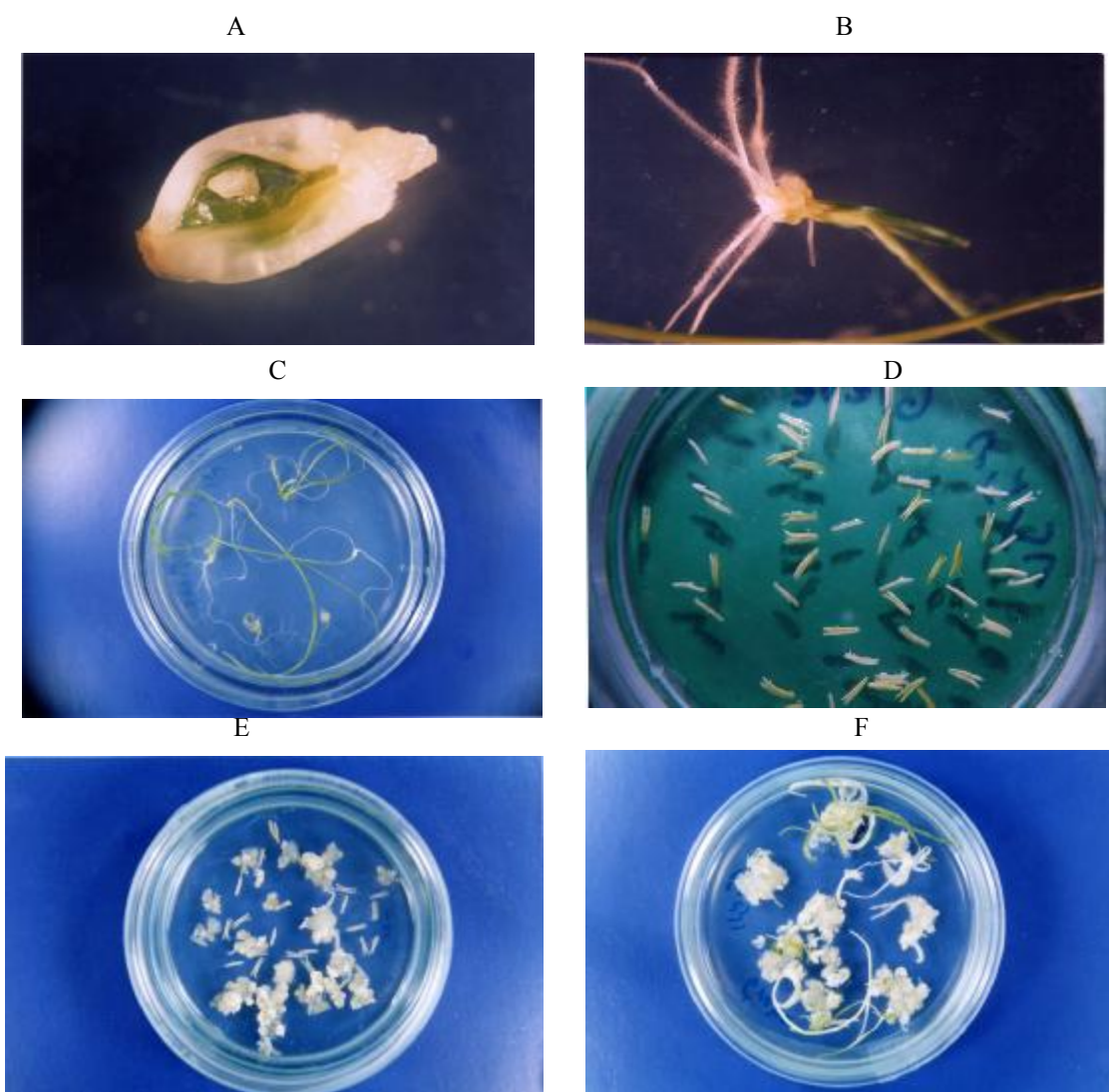
۳. جمع‌آوری داده‌ها و تجزیه و تحلیل آن

در این بررسی تعداد بساک کشت شده، گیاهان باززا شده، گیاهان سبز و آلبینو یادداشت برداری شد و سپس تبدیل داده‌ها بر اساس $\text{Arc sin } \sqrt{x}$ 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 هاپلوپیدی از طریق تلاقی گندم و ذرت ساختارهایی شبیه به بذر تشکیل شد که به استثنای آندوسپرم دارای قسمت‌های اصلی بذر گندم بود. در بذره‌های 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: بذره‌های 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.



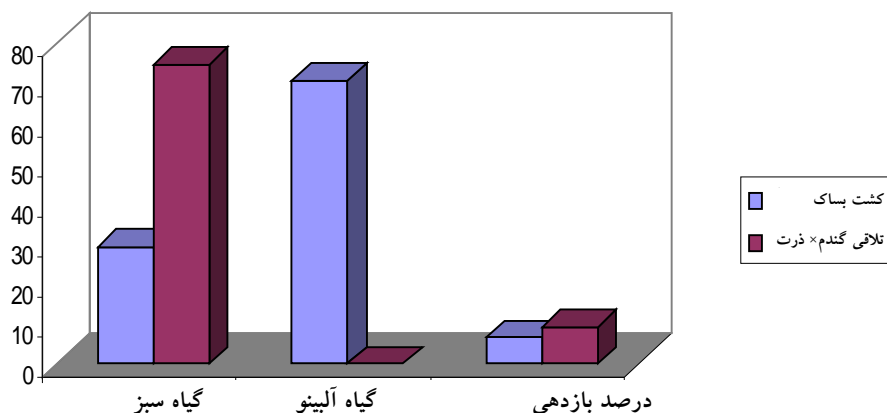
شکل ۱. تولید گیاه هاپلوئید از روش تلاقی گندم با ذرت و کشت بساک A-C. مراحل مختلف تشکیل گیاهچه در روش تلاقی گندم با ذرت. A. جنین حاصل از تلاقی گندم و ذرت ۱۴ روز بعد از گرده افشانی B, C. گیاهچه‌های حاصل از این تلاقی D-E-F. مراحل کشت بساک گندم D. کشت بساک در محیط CHB. E تشکیل کالوس جنین زا و غیر جنین‌زا F. باززایی گیاهچه سبز و آلبینو

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

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

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

نمودار مقایسه دو روش کشت بساک و تلاقی گندم × ذرت



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

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

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

***: معنی دار در سطح ۰/۰۰۱
ns: غیر معنی دار

(جدول ۳ و شکل ۲).

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

دادند و گزارش نمودند که پاسخ به تلاقی بین ژنوتیپ های گندم معنی دار است. هم چنین تأثیر معنی دار 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 کالوس ها به محیط باززایی، ۱۰۰۴ گیاه باززا شد که ۲۹/۳٪ از آنها گیاهچه های سبز و ۷۰/۷٪ آنها، گیاهچه های آلبینو بودند

جدول ۳. پاسخ به کشت بساک در ژنوتیپ‌های گندم هگزاپلوئید

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

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

مقایسه روش‌ها

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 Greabe 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.

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 ۱ و ۳). سید طباطبایی (۱۷) به‌منظور بررسی میوز جبرانی، از دو روش تلاقی گندم × ذرت و روش کشت بساک در چهار ژنوتیپ Greabe, Hautman, ENB و DNB در تولید گیاهان هاپلوئید استفاده کرد. نتایج این بررسی نشان داد که درصد تولید گیاهان هاپلوئید 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 به دلیل 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 جنین‌زا بسیار مناسب است و باززایی کالوس‌های تشکیل شده بهتر صورت می‌گیرد در حالی که محیط کشت استفاده شده توسط سید طباطبایی (۱۷) محیط MC۱۷

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

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

***: معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱
ns: غیر معنی‌دار

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 سنبلیچه‌های گندم با ذرت تا مرحله انتقال گیاهان باززا شده به گلدان حدود یک ماه زمان نیاز است، در حالی که در تکنیک کشت بساک ۴-۶ 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 هاپلوئید ایجاد کرد.

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

- روش کشت بساک به دلیل تنوع گامتوکلونال و ایجاد گیاهان با سطوح مختلف پلوئیدی (میکسوپلوئید، آنیوپلوئید، پلی‌هاپلوئید، هگزاپلوئید...) برای اهداف خاصی استفاده می‌شود. به عنوان 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 هاپلوئیدی، روش تلاقی گندم و ذرت،

بوده که این محیط نسبت به محیط CHB از کارایی 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 کشت CHB به کار رفته برای کشت بساک است. در روش کشت بساک، جهت کالوس‌گیری، 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 به دلیل تجزیه تعدادی از مواد، این محیط باید با استفاده از روش اولترافیلتراسیون استریل شود که زمان بر و پرهزینه 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

روشی عملی و مناسب برای ایجاد گیاهان هاپلوئید در زنتوپ‌های گندم است و در مقایسه با روش کشت بساک، از پتانسیل بالایی در تولید گیاهان هاپلوئید 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. Maqueira, G. Chen, E.V. Ananiev, W.E. Odland, C. D. Russell, A. D. Stec, S. M. Livingston, H. W. Rines and R. Phillips. 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.