تکثیر سریع در ذرت (Zea mays L.) با استفاده از جوانه انتهایی

بهرام ملکی زنجانی ، سیروس عبد میشانی و جعفر محمدی

بترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد ، استادگروه زراعت و اصلاح نباتات

دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و استادیار

دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

تاریخ پذیرش مقاله ۷۵/۳/۲

خلاصه

برای پیدا نمودن یک روش مناسب جهت باززایی و تکثیر درگیاه ذرت ، آزمایشی با استفاده از ۵ ژنوتیپ ذرت شیرین به اجرا درآمد. از انجائیکه در تکثیر سریع یکی از فاکتورهای مهم تولید چند شاخه در یک گیاهچه است تا بتوان از آنها در تهیه ریز نمونه استفاده نمود، لذا به تولید کلامپ (MSC) به عنوان منبع مهم ریز نمونه توجه گردید . ریز نمونه مورد استفاده عبارت از جوانه انتهایی گیاهچه های تولید شده از بذر بود که پس از تهیه ، این ریز نمونه ها روی محیطهای کشت پایه (MS) همراه با ۵۰۰ میلی گرم کازئین هیدرولیزات (CH) و مقادیر ۹،۴/۵ و۱۸ میکرومول N6 بنزیل آدنین (BA) بمدت چهار هفته در روشنایی ودمای ۲۷±۱ $\mathring{C}$ قرارگرفتند. این آزمایش در قالب فاکتوریل با طرح پایه بلوک کامل تصادفی پیاده گردید. بین سطوح مختلف هورمونی (BA) بکارفته اختلاف معنی داری وجود داشت. بیشترین مقدار تولید کلامپ در یک ریز نمونه بطور متوسط ۷۹/۴۸ درصد مربوط بـه محیط کشت پایه (MS) همراه با CH(۵۰۰ mg/l) و BA (۱۸ μ M) بوده است. اختلاف معنی داری بین ژنوتیپهای مختلف از نظر تولید کلامپ مشاهده نگردید. نمونه ها پس ازگذشت چهار هفته واکشت می‌شدندو انهایی که روی محیط کشت پایه (MS) قرار می گرفتند تولید ساقه و ریشه نموده و پس از این مرحله به خاک گلدان منتقل گردیدند. تعداد گیاهان تولید شده پس از ۱۲ هفته حدود ۵۰۰-۴۸۰ گیاهچه از یک ریز نمونه شمارش گردید.

واژه های کلیدی : تکثیر ذرت ، ذرت ، جوانه انتهایی ، ژنوتیپ ، باززایی و کلامپ

مقدمه

تکنیک کشت بافت ابزار بسیار مفیدی بـرای تکـثیر کـلونی سریع گیاهان می باشد که امروزه بطور وسیعی از آن استفاده می شود . همچنین این تکنیک روشی موفق برای تکثیر لاینهای گیاهانی است که امکان تکثیر آنها بطرق جنسی وجود ندارد و از نظر اقتصادی در برنامه های اصلاحی بسیار با صرفه می باشد رامن و همکاران (۱۰).

کشت بافت روشی کارا و قابل اعتماد برای ازدیاد گیاهانی که از طریق تغییر شکل سلولی و آن قسمت از تحقیقات موفق مهندسی ژنتیک بوجود آمده اند می باشد پونزی کوس و واسیل (۹ و ۱۵). تکثیر غیر جنسی براحتی از طریق کشت مریستم انتهایی امکان پـذیر می باشد رامن و همکاران (۱۰) تولید کـلامپ (MSC) از طـریق کشت جوانه های انتهایی در ذرت روشی سریع و کارآمد برای تولید گیاهان جدید می باشد هنگ زونگ و همکاران (۱٦). تولید مجدد گیاهان بارور از طریق کشت نوک سـاقه ذرت روشـی بـرای تکـثیر کلونال بذور ذرت می باشد. از روش کشت بـافت بـرای نگـهداری کلونال لاینهای حاصل از یک بذر منفرد برای مدت ۱۵ نسلْ مورد اسـتفاده قـرار گـرفته است بـومنین و هـمکاران (۱). ضـرورت حـفظ نگـهداری بـذور اصـلاح شـده و لایـنهای حـاصل از

گزینش نیاز به روشی کارا و قابل اعتماد دارد. اخیرا" دانشمندان از تکثیر کلونال برای همین منظور یعنی تکثیر و نگهداری یک ژنوتیپ گیاهی استفاده می کنند همچنین تهیه گیاه از جنین های ایزوله که مورد دستکاری های ژنتیکی قرار گرفته اند و همچنین سلولهای مریستی تغییر شکل یافته از طریق مهندسی ژنتیک احتیاج به تولید مجدد گیاهان بارور دارند.

ما از این روش برای تولید گیاهان یکسان از بذور F1استفاده می کنیم، تا در برخی شرایط که امکان تولید وجود ندارد یا احتیاج به زمان طولانی دارد ،این روش جایگزینی مناسبی برای روشهای قبلی باشد. همچنین پیدا نمودن یک روش کشت بافت گیاه ذرت که به ما اجازه‌دهد که جوانه های نابجاونیز جوانه های انتهایی حاصل از ذرت را با فراوانی بالا تولید نمائیم از اهداف این پروژه می باشد . همچنین از این روش می توان در بانکهای ژن و مراکز تحقیقاتی برای نگهداری لاینها و هیبریدها استفاده نمود. بسیاری از لاینها از جمله گیاهان نر عقیم برای حفظ خصوصیات ژنتیکی خودشان باید بطریقی تکثیر یابند. لذا این روش می تواند برای این منظور نیز مورد استفاده قرار گیرد.

از آنجائیکه کشت بافت پیشنیاز مهندسی ژنتیک می باشد و برای تولید گیاهان بارور کامل از سلولهای تغییر یافته نیاز به روشی قابل اعتماد می باشد لذا ارائه نتایج این تحقیق می تواند راهگشای علم جدید بیوتکنولوژی بوده باشد.

از روشهای معمول تکثیر ذرت استفاده از کالوس و کشت سوسپانسیونی و کشت مریستم ها و جوانه هامی باشد که هریک دارای معایبی می باشند. در کشتهای از طریق کالوس و کشت سوسپانسیونی امکان تغییرات و تمایززیاد بوده و گیاهان حاصله با گیاهان اولیه متفاوت می باشند که ممکن است با اهداف تکثیر مغایرت داشته باشد و در کشت های معمول مریستم نیز تعداد گیاهان تولیدی ممکن است خیلی کم باشد لذا پیش بینی می شود راه حد واسطی بین اینها یعنی تولید کلامپ روشی مناسب برای تکثیر ذرت باشد .

مواد و روشها

برای تهیه مواد گیاهی مورد نیاز این تحقیق، از بذور بالغ ۵ ژنوتیپ ذرت شیرین (Zea mays L.)که انتخابی هیبریدهای موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج بود استفاده شد . به جهت سهولت در امر نامهای H1 تاH5 به این هیبریدهااختصاص داده شد.

(KSC 400= H1 , KSC 401/2 = H2 , KSC 401/5=H3,KSC403/5=H4,KSC 405=H5)

ریزنمونه‌مورداستفاده‌عبارت‌ازجوانه‌های انتهایی گیاهچه های تولید شده از بذور مذکور بوده که برای تهیه اینها ابتدا بذرها ضد عفونی می شدند طریقه ضدعفونی به این صورت انجام می گرفت که ابتدا بذرها بمدت ۱۰ ثانیه در الکل اتانل ۹۰% قرار گرفته و بعد با آب مقطر شستشو داده می شدند و سپس بذور در داخل هیپوکلرید سدیم ۵% بمدت ۲۵ الی ۳۰ دقیقه قرار گرفتند که به این محلول ۰/۱ درصد تووین ۲۰ اضافه می گردید که این ماده خاصیت نفوذ پذیری محلول فوق را بالا می برد و در این مدت کاملا" تکان داده می شدند تا مواد کلا" بابذور تماس داشته باشند و پس از آن بذور را از محلول هیپوکلرید سدیم خارج شده و سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده می شدند لازم به ذکر است که تمام این مراحل داخل دستگاه اتاقک کشت انجام می شد . پس از ضد عفونی سطحی بذور اینها روی محیط کشت آگار غذایی بمدت ۴۸ ساعت جهت تست آلودگی کشت می شدند، این محیط کشت عبارت بود از آگار غذایی با نام تجارتی oxold cod cm3 ساخت کشور انگلستان که برای تهیه یک لیتر از این محیط کشت ۲۸ گرم آگار غذایی را وزن نموده و با ۳۰ گرم ساکاروز در یک لیتر آب مقطر در روی همزن مغناطیسی حل نموده ، پس از حل نمودن آگار در آب و تنظیم pHدر ۷/۴ آن را بداخل اتوکلاو منتقل کرده و پس از استریل کردن بمدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱C، محلول حاصل را در زیر هود استریل در ظروف مورد نظر (پتری دیش ۹ سانتی متری) که قبلا" استریل شده اند ریخته و می گذاریم به حالت نیمه جامد درآید. پس از اطمینان از عدم آلودگی بذور که عده‌ای از آنها جوانه می زنند، آنها را در شرایط استریل زیر هود استریل به محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوک (MS)فاقد هورمون و مواد تنظیم کننده رشد جهت جوانه زنی و رشد گیاهچه های بذری منتقل می کردیم. برای جوانه زنی معمولا" از پتری های ۹ سانتیمتری استفاده می شد که پس از قرار گرفتن بذور روی محیط کشت داخل این پتری ها،دور پتری ها توسط پارافیلم مسدود می گردید تا از هرگونه آلودگی احتمالی‌جلوگیری‌شود.پس ازکشت دانه ها در محیط MS پتری های مورد نظر به انکوباتور ۲۴±۱Ċ منتقل می شدند و بمدت

۵ روز در شرایط تاریکی در این محیط قرار می گرفتند پس از شروع جوانه زنی و رشد ساقه چه، انتهای ساقه را که حدود ۵ تا ٦ میلیمتر طول دارد قطع کرده و به عنوان ریز نمونه از آن استفاده می نمودیم . جوانه انتهایی واقع در داخل گیاهچه ها، معمولا" در داخل غلاف ساقه قرار دارد و در حال طویل شدن می باشد. قسمتی از گیاهچه بطول ۵ میلیمتر، انتهای جوانه با سه برگ اولیه را تشکیل می دهد از آنجائیکه ساقه گیاهان خانواده گرامینه بخصوص ذرت متشکل از برگهای بهم پیچیده می باشد و پیدا نمودن قسمت مریستم ساقه مشکل می باشد و در این مرحله کوتاه بودن ساقه، جدا کردن انتهای شاخه را با اشکال مواجه می سازد که تنها بررسی آن در زیر بینوکولر امکان پذیر است . برای پرهیز از له شدن مریستم و جلوگیری از کارهای اضافی دیگر که منجر به آلودگی می شود، همان ۵ میلیمتر انتهای شاخه را به عنوان ریز نمونه در نظر می گیریم .

معمولا" بهترین ریز نمونه های مورد نظر (جوانه انتهایی) از گیاهچه های بذری تولید شده در ۷ روز بدست می آید ، که‌در این موقع طول گیاهچه ها به ۲ - ۳ سانتیمتری می رسد . پس از تهیه ریز نمونه از این گیاهچه ها اینها در محیط کشت پایه (MS)که حاوی ۵۰۰ میلی گرم کازئین هیدرولیزات (CH)است به عنوان شاهد و نیز محیط های دیگر که علاوه بر اینها حاوی مقادیر ۴/۵ ، ۹ و ۱۸ میکرومول ازماده‌تنظیم‌کننده رشد N6 بنزیل آدنین (BA) می باشند کشت می شدند (جدول ۱) و pH محیط روی ۵/۸ تنظیم می شد. ظروف مورد استفاده در این قسمت ارلن مایرهای ۲۵۰ میلیمتربوده که درب آنها بتوسط پنبه و فویل آلومینیومی مسدود می گردد. ریز نمونه ها بطور افقی کمی مایل، بطوریکه انتهای آن داخل محیط کشت باشد قرار گرفتند معمولا" هر تیمار شامل یکی از سطوح ماده تنظیم کننده رشد بود که در هریک از این ظروف ۴ ریز نمونه کشت می شد و هر تیمار شامل ۳ ارلن بود، به این ترتیب درهر تیمار ۱۲ ریز نمونه وجود داشت که تحت آزمایش فاکتوریل با طرح پایه بلوک کامل تصادفی مورد مطالعه قرار می گرفتند. از هر مجموعه ۲ بار دیگر در زمانهای مختلف به عنوان بلوک استفاده می شد. فاکتورها عبارت بودند از ژنوتیپ و مواد تنظیم کننده رشد ، و سطوح این فاکتورها در ژنوتیپ متشکل از ۵ هیبرید مورد استفاده و در مواد تنظیم کننده رشد مقادیر بکار رفته (BA)بوده است .

ارلنهای حاوی ریز نمونه های کشت شده به اطاقک رشد با دمای $27 \pm 1^{\circ}C$ منتقل می گردیدند.

دستگاه اتاقک رشد (گروس چمبر) که به صورت اتوماتیک کار می کرد دارای ۱۰ لامپ فلورسنت معمولی بود که با ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تنظیم شده بود و در ضمن رطوبت لازم را دستگاه تامین می نمود. طول دوره پرورش این گیاهچه ها چهار هفته بود که پس از پایان این مدت گیاهچه های تولیدی یادداشت برداری وموردمقایسه قرار می‌گرفتندونتایج‌حاصله که‌به صورت درصد یادداشت برداری شده‌بودندپس‌ازتبدیل $Arc\ Sin\ \sqrt{X} + 0/5$ مورد تجزیه و تحلیل قرار می گرفتند.

صفات مورد بررسی پس از گذشت چهار هفته عبارت از مقدار کالوس تشکیل شده تولید ریشه ، تعداد شاخه ها و همچنین طول ساقه ، فاصله میانگره ها بود و هدف اصلی بررسی تولید کلامپ (MSC)در هریک از سطوح هورمونی بوده است. معمولا" تجزیه داده های آزمایشی با برنامه کامپیوتری MSTAT-C انجام می پذیرفت و نیز نتایج دوباره با ماشین حساب دستی کنترل شد از نمونه ها در مقاطع مختلف عکس و اسلاید تهیه گردید.

گیاهچه های حاصله پس از کشت بمدت چهار هفته در محیطهای مذکور که بیشتر بصورت کلامپ بودند معمولا" واکشت می شدند هر توده کلامپ بر اساس وسعت به ۳ تا ۵ نمونه تقسیم می شد. معمولا" واکشت در زیر دستگاه اتاقک کشت و تحت شرایط استریل محیطی توسط پنس وتیغ جراحی استریل انجام می گرفت. تعدادی از نمونه های تقسیم شده روی محیط پایه (MS)باضافه کازئین هیدرولیزات کشت می شدند و نیز تعدادی دیگر روی محیط کشت قبلی که در آن رشد کرده بودند، واکشت می گردیدند سپس واکشت های بعدی در طول چهار هفته بعد انجام می گرفت و تعداد گیاهان تولید شده در هر نوبت یادداشت برداری می گردید در نهایت گیاهان تولید شده پس از واکشت های متعدد بر روی محیط کشت پایه (MS)منتقل می گردید و پس از آنکه به حدود ۲ تا ۳ برگی می رسیدند به محیط مخصوص ریشه دار شدن منتقل و پس از آن در حدود ۳ تا ۵ برگی از محیط این ویترو خارج و به محیط گلدان منتقل می شدند. خاک گلدانها حاوی ۵۰ درصد شن و ۵۰ درصد خاک سبک همراه با مواد آلی بوده که در آون تحت حرارت ٦۰ درجه سانتیگراد تا حدی استریل شده بودند. در انتقال از محیط کشت دقت فراوان به عمل می آمد که ریشه ها قطع

نگردند،ابتدا ارلن های حاوی گیاهچه های نمونه ها مقداری در آب گرم (بن ماری) قرار میگرفتند تا محیط جامد بصورت مایع درآید و پس از شستشو ریشه ها به آرامی در گلدان نشاء شده و این گلدانها در داخل محفظه ای شیشه ای با رطوبت مناسب که هرچند ساعت توسط اسپری تامین می شد رشد داده می شدند و بتدریج که گیاه به محیط خارج عادت میکرد به هوای آزاد آزمایشگاه یا گلخانه منتقل می شدند و در نهایت گیاهان تولیدی از لحاظ وضعیت سلامت و پیدایش گلها بررسی می شدند.

نتایج

روشهای ضدعفونی به ژنوتیپ مورد استفاده بستگی دارد و این موضوع در آزمایشات انجام شده مورد تائید قرار گرفت. به عنوان مثال روش مورد استفاده بالا روی H3کمتر تاثیر داشت و برای رفع آلودگی روش دیگری مورد مطالعه قرار گرفت و تیمار دیگری در رفع آلودگی این ژنوتیپ در شرایط انجام شده قابل توجه می باشد.

رفع آلودگی از گیاهانی که در شرایط مزرعه یا گلخانه تولید می شوند کار مشکلی است و با توجه به مراحل مختلف رشد و با صرف وقت زیاد قابل ضدعفونی می باشد با توجه به این مشکلات می توان گفت استفاده از بذر جهت تهیه ریز نمونه دارای اطمینان بیشتری است.

نحوه قرار گرفتن ریز نمونه در روی محیط کشت در تولید کلامپ و جهت دهی گیاه موثر می باشد. روی این اصل برای اطمینان بیشتر آزمایشات مشابهی طرح ریزی و اجرا شدو نتیجه چنین حاصل شد که وقتی ریز نمونه بصورت عمودی کشت می شوند ، در بیشتر مواقع فقط یک گیاه تولید می شود. قرار گرفتن افقی ریز نمونه در محیط کشت منجر به تولید کلامپ می گردد و بهترین وضعیت برای تولید کلامپ موقعی است که ریز نمونه بصورت افقی مایل بطوریکه انتهای آن داخل محیط کشت قرار گیرد می باشد .

در مطالعه شرایط مختلف نوری جهت تولید کلامپ نتیجه زیر حاصل شد:ضمن مطالعه تاثیر روشنایی و تاریکی در تولید کلامپ در دو شرایط روشنایی ۱۲ ساعت و تاریکی مطلق معلوم شد که در روش بالا هیچ تفاوت محسوسی نمونه ها از خود نشان نمی دهند و تولید کلامپ نسبت به نور بی تفاوت می باشد.

از مطالعه نمونه های حاصله پس از کشت ریز نمونه جوانه انتهایی بمدت چهار هفته در محیطهای کشت پایه حاوی ماده تنظیم کننده رشد BAاین نتیجه بدست آمد که در هیچیک از نمونه هاکالوس ایجاد نمی شود و BA تاثیری در تولید کالوس ندارد (جدول ۲).

با بالا رفتن میزان ترکیبات BAدر محیط کشت ریشه زایی گیاه کم می شود و بیشترین میزان ریشه زایی مربوط به محیط کشت پایه(MS)بوده و بعد از ترکیب محیط کشتی که حاوی BA به مقدار ۴/۵ میکرومول می باشد دارای بیشترین ریشه دهی می باشد و به ترتیب زیاد شدن مقدار BA در محیط ریشه دهی کمتر می گردد و در محیط کشت پایه حاوی ۱۸ میکرومول BA ریشه دهی متوقف می گردد (جدول ۳).

اندازه ساقه در محیط کشت حاوی ۴/۵ میکرومول طبیعی BA بوده و در چهار هفتگی بطور متوسط در حدود ۱۲ سانتیمتر

جدول ۱ - ترکیب محیطهای کشت مورد استفاده

ترکیب محیط	علامت اختصاری
MS پایه + CH (۵۰۰ mg)+BA (۴/۵ μ M)	A1
Ms پایه +CH (۵۰۰ mg)+ BA(۹ μ M)	A2
Ms پایه + CH (۵۰۰ mg) + BA(۱۸ μ M)	A3

جدول ۲ - میزان کالوس زائی در محیط کشت مورد استفاده

	A1	A2	A1
H1	-	-	-
H2	-	-	-
H3	-	-	-
H4	-	-	-
H5	-	-	-

-- بدون تولید کالوس

بوده است و هرچه میزان BAدر محیط افزوده می گردد اندازه ساقه کوتاهتر شده و بیشتر در محیطهای حاوی مقادیر ۹ و ۱۸ میکرومول BAبصورت کلامپ با ارتفاع کم دیده می شود. و به همین جهت نیز فاصله میانگره ها با ارتفاع ساقه بستگی دارد . آنچه بیشتر از همه مشهود است و هدف اصلی این آزمایش می باشد تعداد شاخه های جانبی یاظهور کلامپ می باشد که در کل بنظر می رسد کلامپ پدیده جالبی برای تکثیر و باززایی در ذرت باشد و لذا بیشتر نتایج و همچنین تجزیه داده ها برای این صفت انجام پذیرفت (جدول ۴).

کلامپ (MSC)عبارت است از توده فشرده و متراکم از گیاهچه ها که با فراهم شدن شرایط مناسب به گیاه کامل تبدیل می شوند تراکم زیاد جوانه ها گاهی بعضی از آنها را وادار به تولید برگ می کند. و از آنجائیکه ساقه اکثر غلات از جمله ذرت از بهم پیچیدن برگها (غلاف برگ) بوجود می آید ، در اینجا تراکم بیش از حد مانع تشکیل ساقه می شود که با واکشت و کاهش تراکم آنها قابل تبدیل به گیاه کامل می باشند. کلامپها در این آزمایش از هفته دوم شروع به تشکیل نموده و در پایان هفته چهارم به صورت گیاهچه هایی در می آیندکه فاقد ریشه بودند در این مرحله کلامپهای تشکیل شده بر حسب درصد یادداشت برداری و پس از تبدیل Arc Sin √X +۰/۵ مورد تجزیه قرار گرفتند و نتایج زیر بدست آمد (جدول ۵).

۱ - تجزیه داده های حاصل از آزمایش نشان داد که بین تکرارها (بلوکها) تفاوت معنی داری وجود نداشت. این امر بیانگر وجود دقت و اطمینان بیشتر به ادامه آزمایش بود. پس می توان گفت داده ها تصادفی نبوده و نتیجه تاثیر BAمی باشد.

۲ - فاکتور A (ژنوتیپ): بین ژنوتیپهای مورد مطالعه سطح احتمال اشتباه ۱ % =α اختلاف معنی داری مشاهده نشد و حاکی از آن است که بین ژنوتیپها از لحاظ ماده تنظیم کننده رشد BA در سطوح مختلف اختلاف معنی داری وجود ندارد و همه ژنوتیپها نسبت به این ماده پاسخ یکسانی داده اند.

۳ - فاکتور B(سطوح مختلف BA)،این آزمایش نشان داد که بین سطوحBAمورد استفاده از لحاظ تولید کلامپ اختلاف معنی داری وجود دارد، لذا با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن سطوح مختلفBAبکار رفته بترتیب ۱۸ ، ۹ و ۴/۵ میکرومول نتایج بهتری داشتند.

جدول ۳ - میزان ریشه دهی در محیطهای استفاده شده

	A1	A2	A3
H1	+++		
H2	++++		
H3	+++++	+++	
H4	++++++	++	
H5	+++++	+	

+ بعنوان ۱۰ درصد

جدول ۴ - تولید کلامپ در محیطهای استفاده شده

	A1	A2	A1
H1	+	+++++	+++++++
H2	++	+++	++++++++
H3	-	++++++	+++++
H4	+	+++	+++
H5	-	++	++++

+ بعنوان ۱۰ درصد

۴ - اثر متقابل دو فاکتور A(ژنوتیپ) و B (سطوح مختلفBA) معنی دار نشده است .

-نتایج آزمون چند دامنه ای دانکن :

MS = ۲۱۴/۴ خطا

۲۸ = درجه آزادی خطا

LSD = ۱۰/۴۵

SX = ۳/۷۸۱ α = %۵

میانگین های اصلی

بدون تبدیل	با تبدیل	بترتیب
۷۹/۴۸	۶۳/۴۲A =میانگین ۳	۱۲/۳۶G =میانگین ۱
۵۹/۰۰	۵۰/۴۸B =میانگین ۲	۵۰/۴۸ =میانگین ۲
۴/۸	۱۲/۳۶C =میانگین ۱	۶۳/۴۲A =میانگین ۳

جدول ۵ - تجریه واریانس داده ها با تبدیل Arc sin √ X + 5

منابع تغییرات	درجات آزادی	SS	MS	F	پروب
تکرار	۲	۸۰/۲۴۷	۴۰/۱۲۴	۰/۱۸۷۱	
فاکتور A	۴	۱۵۴۱/۱۴۲	۳۸۵/۲۸۶	۱/۷۹۶۷	۰/۱۵۷۶
فاکتور B	۲	۲۱۱۴۰/۴۷۴	۱۰۵۷۰/۲۳۷	۴۹/۲۹۱۳	۰/۰۰۰۰
اثر متقابل AxB	۸	۲۱۱۹/۸۰۷	۲۶۴/۹۷۶	۱/۲۳۵۶	۰/۰۳۱۵۶
خطا	۲۸	۶۰۰۴/۴۳۴	۲۱۴/۴۴۴		
جمع	۴۴	۳۰۸۸۶/۱۰۴			

۳/۷۸۱۰ = Sy میانگین گروه ۱ برای ۱۵ مشاهده

۴/۸۸۱۳ = Sy میانگین گروه ۲ برای ۹ مشاهده

۳/۷۸۱۰ = Sy میانگین گروه ۴ برای ۱۵ مشاهده

۸/۴۵۴۷ = Sy میانگین گروه ۶ برای ۳ مشاهده

چون فاکتور Bمعنی دار شده است لذا با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن برای میانگین سه سطح هورمونی گروه بندی لازم انجام شده و نشان می دهد که اولا" هر سه سطح هورمونی با هم متفاوت بوده، ثانیا" سطح هورمونی BA = ۱۸ میکرومول با میانگین ۷۹/۴۸ درصد تولید کلامپ در کلامپ Aقرار دارد و سطح هورمونی BA= ۹ میکرومول با میانگین ۵۹٪ تولید کلامپBبوده و سطح هورمونی BA = ۴/۵ میکرومول با میانگین ۴/۸ درصد کلامپCکمترین میزان را دارا می باشد.

معمولا" پس از گذشت چهار هفته پس از کشت ریز نمونه ها کلامپ حاصل می شد بدلیل متراکم بودن این توده برای رسیدن به گیاه احتیاج به واکشت می باشد، که معمولا" واکشت های بعدی پس از چهار هفته صورت می گرفت و پس از هر واکشت نمونه ها روی دو محیط کشت قرار می گرفتند. نمونه هایی که واکشت شده روی محیط کشت قبلی خود که حاوی ماده تنظیم کننده رشد BA بوده قرار می گرفتند ،دوباره در ظرف مدت چهار هفته کلامپ حاصل می‌نمودند که این مسئله تا ۴ واکشت صورت گرفت و تراکم به ترتیب در واکشت های بعدی کمتر می شد عده‌ای از نمونه های واکشت شده که روی محیط کشت MS پایه قرار می گرفتند تولید ساقه می نمودند در اینجا هم بستگی به تراکم توده کلامپ داشته است . توده ای که دارای تراکم کمتر بود گیاهان یا ساقه های کامل تولید می نمود. معمولا" برای اخذ نتیجه مطلوب بهترین واکشت جهت تهیه ساقه مرحله دوم یا سوم بود که تراکم به نسبه در اینها کمتر می باشد نمونه ها پس از تولید ساقه در محیط کشت MSپایه ریشه دار می شدند جدا نمودن این‌ساقه هااز توده کلامپ باید با دقت صورت می پذیرفت .

از مطالعه گیاهان کامل تولید شده از این ریز نمونه نتیجه چنین حاصل شد که این گیاهان تولیدی از لحاظ ظاهری یکسان می باشند و تغییراتی در بین آنها از لحاظ فنوتیپی مشاهده نمی شود.

نتیجه دیگر نگهداری یک گیاه از این طریق برای مدت طولانی در محیط این ویترو بود که به این طریق نمونه ای از کلامپها تا مدت یکسال و نیم فقط با واکشت روی محیط های کشت جدید در داخل انکوباتور نگهداری گردید . همچنین شمارش تعداد گیاهان از یک ریز نمونه بروش تکثیر از طریق کلامپ بررسی شد که البته کار مشکلی می باشد زیرا کلامپ همانطور که اشاره شد بسیار فشرده می باشد ولی با محاسبه اینکه اگر یک کلامپ حاصل از یک ریز نمونه بعد از چهار هفته به ۴ قسمت تقسیم شده و هریک از اینها در واکشت بعدی به چهار قسمت دیگر تقسیم شود ۱۶ کلامپ بدست می آید که در هرکدام اینها بطور متوسط ۳۰ جوانه وجوددارد پس از ۱۰ هفته ۵۰۰-۴۸۰ گیاه از یک ریز نمونه بدست می آید.

بحث

پتانسیل تولید ساقه های رویشی زیاد در بسیاری از گیاهان گزارش گردیده است ، از جمله آنها می توان به ازدیاد از این طریق

در گل میخک اشاره نمود که توسط داویز و هانان با استفاده از ماده تنظیم کننده رشد BA در سال ۱۹۷۷ گزارش گردیده است که مقدار ماده مورد استفاده در این سطح یک میکرومول بوده است مشکل ایشان تولید گیاهان غیر نرمال و رنگارنگ بوده است ولی با استفاده از ترکیب BA ، NAA با موفقیت گیاهان نرمال را تولید نموده‌اند مثالهای مشابهی در گیاهان دیگر از جمله نیشکر (هیزو همکاران) وجود دارد.

تکثیر غیر جنسی در ذرت با استفاده از کشت ریز نمونه جوانه انتهایی توسط ک . رامن و همکاران (۱۰) گزارش گردید که آنها توانستند با موفقیت از طریق کشت جوانه انتهایی ذرت در محیط کشت پایه گیاه تولید نموده و با اضافه نمودن مواد تنظیم کننده رشد BA و کینیتین بیشتری را نتیجه بگیرند منتها تعداد گیاهچه های تولیدی پس از اضافه نمودن ۱ تا۳ میلیگرم از هریک از این مواد کم بوده است. مشکلات عمده ای که قبل از کارهای ایشان وجود داشت عبارت بوده از عدم ریشه زایی و نیز تولید گیاهان غیر نرمال و کوتاه بودن ارتفاع این گیاهان ، که این مشکلات توسط رامن و همکاران در سال ۱۹۷۸ با استفاده از کشت ریز نمونه جوانه انتهایی رفع گردید و در نهایت تولید یکسان و کلون از گیاهان ذرت را گزارش نمودند.

مک دانیال و پولینگ نیز تشکیل اندامهای هوایی گیاه از مریستم انتهایی را گزارش نمودند همچنین استفاده از ماده تنظیم کننده رشد سایتوکنین مثل بنزیل آدنین (BA) در ایجاد شوتهای نابجا از طریق کشت جوانه انتهایی در بسیاری از گیاهان توسط هووانگ گزارش گردید (٦). هنگ و زونگ و همکاران تشکیل ساقه و همچنین تولید کلامپ (MSC) را در ذرت با استفاده از کشت جوانه انتهایی برای ۲۰ ژنوتیپ گزارش نمودند ماده تنظیم کننده رشد مورد استفاده برای این منظور عبارت از بنزیل آدنین (BA) بوده است (۱٦).

مانیز در تحقیق خود استفاده از ریز نمونه جوانه انتهایی را در تولید گیاهان یکسان و کلون مطالعه نموده و نیز استفاده از ماده تنظیم کننده رشد بنزیل آدنین (BA) را برای این منظور و نیز تکثیر از طریق تولید کلامپ بررسی نمودیم با موفقیت توانستیم در ژنوتیپهای مورد استفاده خود به نتایج موفقیت آمیزی در تکثیر کلونی و ازدیاد و باززایی گیاه دست یابیم. تعداد گیاهانی که از طریق تولید کلامپ دارای مزیت‌زیادی می‌باشدکه صرفه‌جوئی درزمان می‌باشدومی توان از آن برای ازدیاد بذور حاصل از تحقیقات مهندسی ژنتیک استفاده نمود. همچنین در تکثیر بذور لاینها و هیبریدهای F1 نیز کمک شایان توجهی به متخصصین اصلاح نباتات می نماید.

REFERENCES

1 - Bommineni, V & R. Greyson. 1989. Recovery of feritle plant from isolated, cultured maize shoot tip. plant , cell, tissue and organ culture 19 : 225-234.

2 - Davis, M.J. Bakwer R. & tlanan .J.J. 1977. Clonal multiplication of carnation by micropagation .J.AM. Soc, Nort Sci. 102, 48-53.

3 - Green , C.E. 1977. Prospects for crop improvement in the field of cell culture. Hort .Sci. 12 , 131-4.

4 - Green , C. 1978. Cell and tissue culture of maize.In Gentics and Breeding of Maixe, ed D.B. walden , 794 pp. John wiley & sons , New York.

5 - Gordan, K. 1977. Current status of plant cell and organ culture .Hort science .12.127-30.

6 - Hu, C. & Y. Wang (1983). Meristem , shoot tip , and but culture . In :Hand book of plant tissue culture (Evans, D.A. sharp , W.R. Ammirato ,P.V. , Yamada , Y.eds. Vol.1:177-227. Macmillan , New York.

7 - Murashigne , T.Skoog , F.(1962). F.(1962). Arevised medium forapid growth and bioassay with tobacco tissue culture physiol .plany . 15, 473-97.

8 - Murashige , T.Skoog.F. (1974) Plant propagation though tissue culture. Ann. Rev.Pl.Physiol. 25,135-66.

9 - Potrykus ,I. (1990) Gene transfer to plant : assessment and perspective .Physiol .Plant 79, 125-134.

10- Raman ,K.D.B. Walden & R.I. Greyson (1980). Propagation of Zea mays L. by shoot tip culture ann. Bot 45, 183-189.

11- Reinert ,J. & Bajaj , Y. P.S. (ed) 1977. Applied and fondamental aspects of plant cell, tissue and orange culture ,springer-verlag.Berline.803pp.

12- Rhodes,C. 1978.Shoot ti culture :possiblities for the propagation of clonal lines. Maize. Cenet.Coop. new slett. 52:102-1013- Rhodes , C.A. mettler , L. J. Mascarenhas, D.Detmer, J.J. (1988) Genetically transformed maize plant from protoplast. Science 240, 204-207.

13- Vasil, I.K. .(1987). Developing cell and tissue culture systems for the improvment of cereal and grass crop.,J.Plant Physiol .128,193-218.

14- Vasil , I.K. (1990) The realities and challenges of plant biotechnology 6,296-300.

15- Zohong, H. , Srinivasan , C.Striklen , M.B. (1992). In vitro morphogenesis of corn (Zea mays L.) I.Differentation of multiple shoot culmp and somatic embryos from shoot tip planta 187,783-789.

Iranian J.Agric.Sci. Vol.28 No.2 1997

In vitro Rapid Propagation in Zea Mays Using Shoot-tip

B.MALEKI ZANJANI, C.ABD MISHANI AND J.MOHAMMADI

Former Graduate Student , Professor College of Agriculture ,

University of Tehran , and Assistant Professor ,College of

Agriculture , University of Zanjan , Iran.

Accepted 22 May 1996

SUMMARY

For finding a suitable teachnique for micropropagation and regeneration in sweet corn (Zea mays L.) an experiment was carried out, using 5 sweet corn cultivars. One of the most important factor for micropropagation of crops is to obtion a multiple shoot clumps using shoot-tip explants. The basal medium , was MS , supplemented with 500 mg casein hydrolysate (CH) and 3 levels (4/5,9 and 18 m)of BA were compared .The culture were kept in plant growth cabient in 27 + 1 C for 4 weeks, and the experiment was studied in a factorial arrengement with a rendomized complete block design. There was a significant difference between difference BA levels. The highest multiple shoot clumps (MSC) was observed at 18 μ M BA 79/4% but the MSC production was very low in other treatments. There was nosignificant difference between different genotypes in respect to MSC production . rate, the explants were subcultured on MS medium every 4 weeks intervals. The plantets to show then were transferred to the pot. After 12 weeks 480-500 plantlets were produced from each explant.