DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.8.6

تولید کالوس شکننده ذرت (*Zea mays* L.) و استفاده از تحلیل سلسله مراتبی برای انتخاب محیط کشت بهینه

سودابه جعفری[1*]، داریوش داودی[2]، هوشنگ علیزاده[3] و پریسا جنوبی[1]

[1] ایران، تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

[2] ایران، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، بخش تحقیقات نانوتکنولوژی

[3] ایران، کرج، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۹

چکیده

تولید سوسپانسیون سلولی یکی از مراحل مهم مطالعه سلول‌های گیاهی است که معمولاً با کشت کالوس رویانزای شکننده انجام می‌شود. هدف اصلی این تحقیق تولید کالوس شکننده و انتخاب یک محیط کشت بهینه برای القای آن در گیاه ذرت بود. با بکارگیری دو محیط پایه موراشیگ–اسکوگ و چو، با غلظت‌های مختلف دو هورمون ۲ و ۴ دی‌کلروفنوکسی‌استیک‌اسید و بنزیل آدنین (جمعاً ۱۶ محیط کشت متفاوت)، القای کالوس بر روی ریزنمونهٔ رویان بالغ ذرت انجام گرفت. معیارهای انتخاب شامل شاخص‌های القای کالوس شکننده، اندازه کالوس، وزن تر کالوس و میزان باززایی، اندازه‌گیری شدند و مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آنالیز واریانس انجام شد. با در نظر گرفتن هر یک از معیارهای انتخاب به تنهایی، محیط‌های بهینهٔ متفاوتی برای القای کالوس معرفی شد. بمنظور تعیین یک محیط بهینه با در نظرگرفتن تمامی معیارها، روش تحلیل سلسله مراتبی بکار گرفته شد. محیط بهینه در این تحقیق، محیط MS دارای ۱ میلی‌گرم‌درلیتر 2, 4-D بود که در آن شاخص‌های القاء، وزن، و اندازه زیاد بودند و میزان باززایی کم بود. برای ارزیابی و تأیید محیط کشت انتخاب شده، ریزنمونه‌ها در محیط برگزیده توسط نرم‌افزار، کشت شدند و نمودار رشد برای وزن تر و خشک کالوس رسم شد. چندین بار واکشت پیاپیِ کالوس‌های رشدیافته در محیط برگزیده انجام گرفت و در آن‌ها اندام‌زایی مشاهده نشد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که می‌توان روش تحلیل سلسله مراتبی را بعنوان یک روش تصمیم‌گیری قابل‌اعتماد برای انتخاب محیط بهینه برای القای کالوس شکننده ذرت بکار برد.

واژه‌های کلیدی: ذرت شیرین، کالوس شکننده، روش تحلیل سلسله مراتبی، شاخص باززایی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۸۰۲۲۵۸۵، پست الکترونیکی: sudabe.jafari@gmail.com

مقدمه

امروزه کشت سلول و بافت گیاهی، بعنوان یکی از ابزارهای متداول در زیست‌فناوری، به یک صنعت تبدیل شده است و محققین تلاش می‌کنند تا محیط کشت‌ها را برای اهداف گوناگون از جمله تولید حداکثری متابولیت‌های ثانویه، ریزازدیادی، تولید گیاهان تراریخته و غیره بهینه‌سازی کنند (۴، ۵، ۲۳،۶، ۲۹). از جمله گیاهانی که کشت بافت آن‌ها مورد توجه است، غلات هستند که بعنوان غذای انسان و دام مورد استفاده قرار می‌گیرند. کشت بافت غلات بیشتر بمنظور مطالعات اصلاح نباتات، مهندسی ژنتیک و تراریختی انجام می‌شود (۳). از آنجا که ریزنمونه‌های تک‌لپه‌ای‌ها به کندی کالوس تشکیل می‌دهند، برخی محققین پیشنهاد کرده‌اند که استفاده از اندام‌های نابالغ تک‌لپه‌ای‌ها (برای مثال رویان نابالغ یا میان‌گره) بعنوان ریزنمونه می‌تواند تولید کالوس را تسریع کند (۸).

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.8.6

یکی از غلات بسیار مهم، ذرت است که از نظر اهمیت سومین غله بعد از گندم و برنج و در مطالعات ژنتیکی و محیط‌زیستی، یک گیاه مدل است (۲۸). بر این اساس، مطالعات متعددی در مورد کشت بافت این گیاه انجام شده است (۱، ۱۲، ۱۴، ۲۱، ۲۲، ۲۶). با توجه به اهمیت ذرت نیاز است تا تحقیقات بیشتری در مورد کشت بافت آن انجام شود.

مطالعات متعددی که تاکنون انجام شده است، نشان داده‌اند عوامل گوناگونی در کشت بافت و تولید کالوس تأثیرگذار بوده‌اند. از عوامل تأثیرگذار، رقم گیاه مورد مطالعه بود (۲۵). همچنین، قطعه ریزنمونه بکاررفته نیز دارای اهمیت بود. اهمیت قطعه ریزنمونه در تحقیقی در مورد گونه‌ای سیر بخوبی نشان داده شد (۳۱). در مطالعه اومر و همکاران (۲۰) نیز اهمیت نوع قطعه ریزنمونه مشخص شد؛ بطوریکه ریزنمونه‌های حاصل از رویان ذرت در مقایسه با ریزنمونه‌های برگی و ساقه‌ای کمتر باعث القای کالوس شدند. مرحله نموّی نیز می‌توانست در تمایززدایی ریزنمونه ذرت تأثیر داشته باشد. در تحقیق خوآرز و همکاران (۱۳) نشان داده شد که ریزنمونه رویان نابالغ ذرت (۱۵ روز پس از گرده‌افشانی) در مقایسه با ریزنمونه حاصل از رویان بالغ، دارای الگوی متفاوتی از تجمع RNAهایی است که در القای کالوس رویانزا نقش دارند. از دیگر عوامل تأثیرگذار نوع و مقدار تنظیم‌کننده‌های رشد بود (۲۶). ارکویونسو و همکاران (۷) تأثیر غلظت اکسین (۱۰-۲ میلی‌گرم‌درلیتر از ۲ و ۴ دی‌کلروفنوکسی‌استیک‌اسید (2, 4-D)) بر القای کالوس دو رقم ذرت را بررسی کردند. در مطالعه اخیر بیشترین مقدار کالوس رویانزا مربوط به رقم سافاک در محیط دارای ۶ میلی‌گرم‌درلیتر 2, 4-D بود. همچنین دو و همکاران (۵) القای ۷۵۲۵ ژن ذرت با 2, 4-D و القاء و تکثیر کالوس را با فرابیان یکی از این ژن‌ها به نام *ZmBBM2* که از عوامل رونویسی است، را گزارش‌کردند. غلظت اکسین نیز می‌توانست از عوامل تأثیرگذار بر اندازه کالوس باشد. در تحقیقی غلظت‌های ۳ و ۵ میلی‌گرم‌درلیتر 2, 4-D باعث افزایش اندازه کالوس دو رقم برنج شد (۲). تحقیقات دیگر اثر سیتوکینین را نیز در القای کالوس نشان داد (۹). برای مثال دو وهمکاران (۵) نشان دادند حتی زمانی‌که برای القای کالوس ذرت از سیتوکینین خارجی استفاده نشد، ژن‌های مسیر تولید سیتوکینین افزایش بیان داشتند.

همانطور که اشاره شد کشت بافت گیاهان با اهداف مختلف صورت می‌گیرد و بسته به هدف، محیط کشت‌ها با ترکیبات مختلف مورد آزمون قرار می‌گیرد و شاخص‌های مختلف اندازه‌گیری می‌شود. بسیار مهم است که بتوان از میان داده‌های بسیار، تصمیم‌گیری‌کرد که محیط بهینه برای کشت کدام است. در این زمینه نرم‌افزارهای تصمیم‌گیری می‌توانند کمک‌کننده باشند. از میان نرم افزارهای تصمیم‌گیری، آن‌ها که بر اساس روش تحلیل سلسله مراتبی (AHP= Analytic Hierarchy Process) طراحی شده‌اند بسیار مناسب هستند. برخی از این نرم افزارها با سیستم AHP که استفاده از آن‌ها در کاربردهای مدیریتی و محیط زیستی (۱۱) متداول است، در زمینه تصمیم‌گیری انتخاب محیط کشت می‌توانند استفاده شوند. روشAHP که توسط ساتی (۲۴) ابداع شد، براساس یک مدل ریاضی و با لحاظ کردن نظر کاربر عمل می‌کند. در این روش، محقق می‌تواند در روند تصمیم‌گیری اعمال نظر کند و نظراتش بصورت کمّی در قضاوت نهایی تأثیر خواهد داشت. فرایندAHP بطور خلاصه شامل چند مرحله است: ۱) تعریف مسأله‌ای که در مورد آن تصمیم‌گیری می‌شود (هدف)؛ ۲) ایجاد سلسله مراتب تصمیم‌گیری (معیارها و گزینه‌ها)؛ ۳) جمع‌آوری اطلاعات مربوط به گزینه‌ها؛ ۴) تخمین وزن هر یک از معیارها؛ ۵) مقایسه‌های دو به دوی گزینه‌ها با توجه به معیارها و ۶) محاسبه درجهٔ سازگاری قضاوت (۱۰). در آخرین مرحلهٔ این رویکرد، ارجحیت‌های عددی برای هر کدام از گزینه‌های مورد تصمیم‌گیری محاسبه می‌شود. این اعداد توانایی نسبی گزینه را برای رسیدن به هدف تصمیم‌گیری نشان می‌دهد

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.8.6

(۲۴). استفاده از روشAHP اصلاح‌شده برای انتخاب محیط القاء و نگهداری کالوس قبلاً توسط نصیری و همکاران (۱۹) در مورد گیاه سرخدار انجام شده است. آن‌ها کارایی روش ارایه شده را برای انتخاب محیط نگهداری کالوس با حداکثر تولید متابولیت ثانویه گزارش دادند.

سوسپانسیون سلولی یکی از ابزارهای مطالعه سلول‌های گیاهی است که معمولاً از کشت کالوس رویانزای شکننده ایجاد می‌شود (۱۸) و در بسیاری از برنامه‌های کاربردی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد اما در فرایند القای کالوس، احتمال ایجاد انواع کالوس (رویانزا یا غیر رویانزا، شکننده یا فشرده و ...) وجود دارد (۹). هدف این تحقیق دستیابی به کالوس رویانزای شکننده و انتخاب محیط کشت بهینه برای القای کالوس در گیاه ذرت شیرین با استفاده از AHP بود.

مواد و روشها

مواد گیاهی: از آنجا که ایجاد کالوس شکننده در ذرت بسته به رقم متغیر است (۲۵)، در ابتدا دانه‌های سه رقم ذرت شامل KORDONA، KSC407 وKSC403 (ذرت شیرین) برای آزمایش انتخاب شد. دانه‌های این ارقام از مؤسسه تحقیقات و اصلاح نهال و بذر تهیه شد.

کشت بذر و تهیهٔ ریزنمونه: ابتدا دانه‌ها با آب شیر و سپس با یک قطره دترجنت و آب شستشو شد. سپس به مدت ده دقیقه در سدیم هیپوکلریت تجاری ۱۰ درصد حجمی قرار داده شد و بعد با آب مقطر استریل، پنج بار آبکشی شد. در شرایط استریل، رطوبت سطح دانه‌ها با قرار دادن آنها روی کاغذ خشک‌کُن استریل گرفته شد. پس از آن، دانه‌ها درون لوله آزمایش‌هایی حاوی محیطی متشکل از آب مقطر و آگار (۸ گرم‌درلیتر) قرارگرفت. محیط و لوله‌های آزمایش قبل از استفاده اتوکلاو شده بودند. ورودی لوله‌ها با استفاده از پارافیلم بسته شد و به مدت دو روز در تاریکی و سپس ۱۰ روز، روزانه ۱۶ ساعت در روشنایی و ۸ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرارگرفت. از بخش‌های مختلف جوانه‌های رشد یافته (برگ، ساقه و ریشه) ریزنمونه تهیه شد.

بمنظور استفاده از رویان بالغ بعنوان ریزنمونه، دانه‌ها بترتیبی که در بالا گفته شد ضدعفونی و برای آب‌گیری و نرم شدن، دو روز در دمای ۴ درجه سلسیوس در تاریکی درون آب مقطر استریل نگهداری شد. در زیر هود لومینار با استفاده از تیغ اسکالپل، رویان بالغ جدا و به قطعات کوچک‌تر برش داده شد و روی محیط کشت قرار گرفت. ابتدا با استفاده از محیط پایه موراشیگ–اسکوگ (MS) برآورد شد کدام ژنوتیپ قابلیت بیشتری برای تولید کالوس دارد. قطعات ریزنمونه از سه رقم با ۵ تکرار (پتری دیش) حاوی ۵ ریزنمونه در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از ۱۰ روز ریزنمونه‌ها از نظر کالوس‌دهی مورد ارزیابی قرارگرفت و قطعه ریزنمونه مناسب انتخاب شد. سپس، وضعیت ریزنمونه مورد نظر در سه رقم مورد بررسی قرارگرفت و رقمی که القاء و رشد کالوس در آن سریع‌تر بود برای این تحقیق انتخاب شد.

محیط کشت القای کالوس: دو محیط پایه MS و چو (N6) به اضافه ۳۰ گرم‌درلیتر ساکارز و ۶ گرم‌درلیتر آگار و چهار غلظت صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم‌درلیتر از هورمون 2,4-D و دو غلظت صفر و ۰/۰۵ میلی‌گرم‌درلیتر بنزیل آدنین (BA) آماده شد. بدین‌ترتیب ۱۶ محیط کشت (شکل ۱) با ۵ تکرار هرکدام دارای ۱۰ ریزنمونه تهیه شد و در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند و هر سه روز یک بار وضعیت ریزنمونه‌ها بررسی شدند. پس از دو هفته شاخص‌های القای کالوس CII= Callus Induction Index ، وزن کالوس CWI= Callus Weight Index ، اندازه کالوس CSI= Callus Size Index ، و باززایی RI= Regeneration Index ، بترتیب زیر محاسبه شدند:

$$CII=\frac{Nc}{Ne}\times 100$$

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.8.6

$$CWI=\frac{\sum_{i=1}^{n} CWi}{N}\times 100$$

$$CSI=\frac{\sum_{i=1}^{n} CSi}{N}\times 100$$

$$RI=\frac{Nr}{Ne}\times 100$$

که در آن‌ها N تعداد کالوس‌های وزن شده، N_c تعداد کل کالوس‌های القاء شده، N_e تعداد کل ریزنمونه‌ها، N_r تعداد باززایی‌ها، CW_i وزن تر یا خشک کالوس و CS_i اندازه کالوس‌ها است.

بررسی آماری: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد. تجزیه واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌های داده‌ها و رسم نمودار با استفاده از نرم افزار SPSS ver.18 انجام گرفت. بدین‌ترتیب که ابتدا با تجزیه واریانس وجود اختلاف معنی‌دار ($P< ۰/۰۵$) بررسی شد. سپس با استفاده از آزمون دانکن مشخص شد اختلاف معنی‌دار بین میانگین کدام داده‌ها وجود داشت.

ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی کالوس‌ها: تصویربرداری دقیق برای سنجش معیارهایی همچون CII، CSI، RI، تغییرات اندازه، رنگ و ظاهر ریزنمونه و کالوس‌ها انجام شد. برای آنالیز تصویرها از نرم افزارImage Tool ver.3 استفاده شد. مورفولوژی کالوس‌ها با استفاده از استریومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت و نوع آن مشخص شد.

روش تحلیل سلسله مراتبی: با استفاده از نرم افزار Expert Choice ver.11 با روش تحلیل سلسله مراتبی محیط کشت بهینه انتخاب شد. برای این منظور ابتدا درخت تصمیم‌گیری (شکل ۱) شامل هدف و معیارها (CII، CWI، CSI، RI و شکننده و رویانزا بودن کالوس) در نرم‌افزار طبق دستورالعمل تعریف شد. شکننده و رویانزا بودن کالوس بصورت زیرشاخه برای CII در نظر گرفته شد. اهمیت و ارجحیت معیارها بر اساس مقیاس ساتی (۱ تا ۹ که ۱ برای اهمیت یکسان و ۹ برای اهمیت فوق‌العاده زیاد است) برای مقایسه دو به دو مشخص شد (۲۴). در این تحقیق اهمیت کالوس شکننده از همه بیشتر و باززایی از همه کمتر بود. گزینه‌ها شامل ۱۶ محیط کشت (شکل ۱ سمت راست) که از M1 تا M16 نامگذاری شده‌اند، در سلسله مراتب برای نرم‌افزار تعریف شد و داده‌های هر یک بر اساس معیار مورد بررسی وارد شد. اهمیت مقادیر هر معیار بصورت تابع خطی در نظر گرفته شد. برای مثال، برای معیار باززایی، در هدف مورد نظر مقدار کمینه بیشترین و مقدار بیشینه کمترین اهمیت را داشت. پس از مقایسهٔ دو به دو بر اساس روشAHP نتایج بصورت گرافیکی و عددی گزارش شد.

بررسی رشد کالوس شکننده در محیط کشت برگزیده: پس از انتخاب محیط بهینه القای کالوس، ریزنمونه در محیط برگزیده کشت شد و طی یک دوره دو هفته‌ای رشد کالوس‌های القاء شده در ۱۵ میلی‌لیتر محیط حاوی آگار ۶ گرم‌درلیتر بررسی و نمودار رشد کالوس بر اساس اندازه‌گیری وزن تر و خشک ترسیم شد (۲۷). مورفولوژی کالوس‌ها از نظر باززایی و ریشه‌دار شدن طی ۸ واکشت ماهانه در محیط برگزیده با و بدون آگار بررسی شد.

نتایج

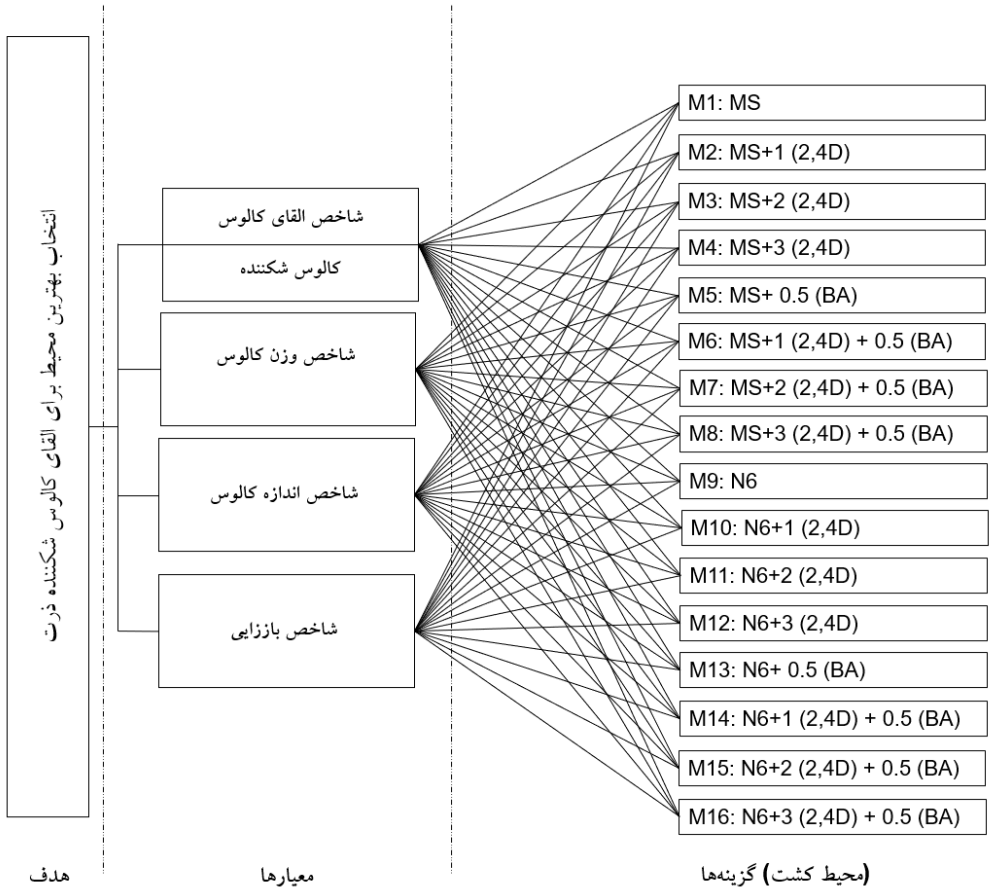
قطعه ریزنمونه رویان بالغ در بین دیگر قطعات مورد استفاده (برگ، ساقه و ریشه) از جوانه‌های ذرت، بیشتر موفق به تولید کالوس شد (جدول ۱). اکثر قطعات جوانه تولید کالوس نکردند و ایجاد زخم در آنها برای القای کالوس صرفاً منجر به قهوه‌ای شدن محل خراش شد. از ریزنمونه رویان بالغ انواع کالوس‌های شکننده رویانزا و فشرده (شکل ۲ الف و ب) ایجاد شد. همچنین باززایی‌های مستقیم و غیرمستقیم مشاهده شد. از بین سه رقم مورد بررسی، در رقـــم KSC 403 (ذرت شیرین) القای کالوس سریع‌تر بود و ریزنمونه رویان بالغ بیشتر برای تولید کالوس القاء شد (جدول۱). بنابراین در ادامه آزمایش‌ها از رویان بالغ ذرت شیرین بعنوان ریزنمونه استفاده شد.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.8.6

جدول۱- مقدار کیفی تولید کالوس از قطعات مختلف ریزنمونه و سه رقم ذرت در ارزیابی اولیه در محیط کشت پایهMS

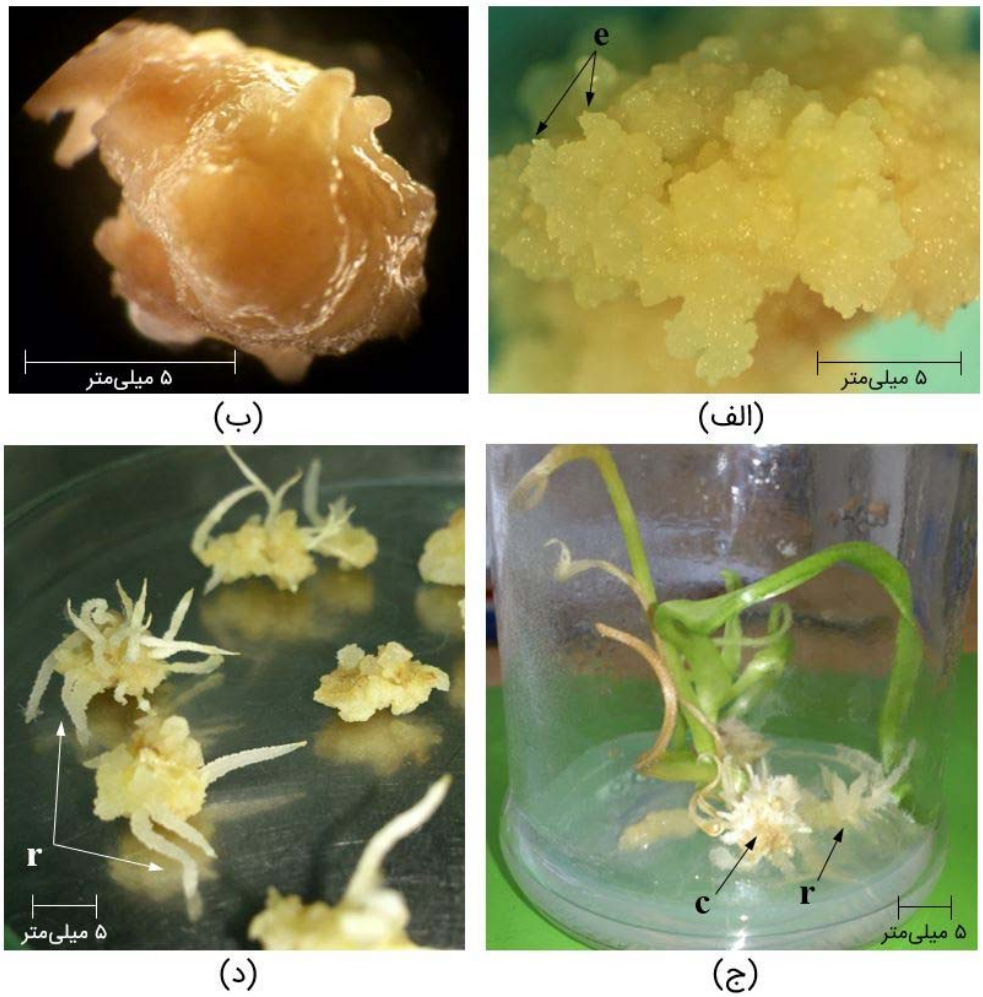
رقم	ریزنمونه برگ	ریزنمونه ساقه	ریزنمونه ریشه	ریزنمونه رویان بالغ
Kordona	کم	کم	کم	متوسط
KSC 403	متوسط	کم	کم	زیاد
KSC 704	کم	کم	کم	متوسط

آنالیز واریانس میانگین داده‌های شاخص‌های القای کالوس، اندازه، وزن و باززایی، تفاوت معنی‌داری ($P< ۰/۰۵$) را در ۱۶ محیط نشان داد. شکل ۳ نمودار شاخص القای کالوس را برای ۱۶ محیط مورد بررسی نشان می‌دهد. طبق آزمون دانکن، ستون‌های دارای حروف مشابه، تفاوت معنی‌دار با یکدیگر ندارند. بر این اساس، در محیط M4 و M12 بیشترین القای کالوس و در محیط پایهM1 وM9 کمترین القای کالوس صورت گرفته است. به‌هرحال، کالوس‌های رشد یافته در محیط M12 بعد از مدتی باززا شدند (شکل ۲ج) و اکثر کالوس‌های شکننده رشد یافته در محیط M4 بعد از مدتی ریشه‌دار (شکل ۲د) شدند. همانطور که در شکل۴ نشان داده شده بزرگ‌ترین میانگین اندازه کالوس در محیط M2 و کمترین این مقدار در محیط M8 ایجاد شده است. باوجود اینکه محیط M4 از نظر القای کالوس مناسب بود، اما اندازه کالوس‌های رشد یافته در آن از برخی محیط‌ها کمتر بود.



شکل۱- سلسله مراتب تصمیم‌گیری برای انتخاب محیط بهینه برای تولید کالوس شکننده ذرت. محیط کشت‌ها از M1 تا M16 نامگذاری شده‌اند. غلظت هورمون‌ها بر اساس میلی‌گرم‌درلیتر است.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.8.6



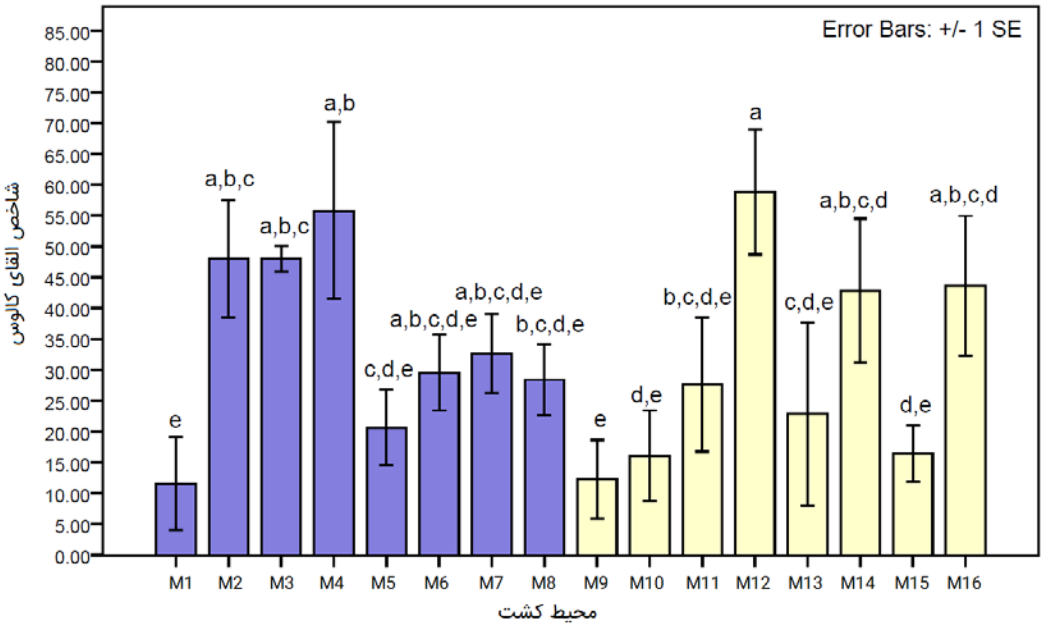
شکل۲- انواع کالوس‌های حاصل از ریزنمونه رویان بالغ ذرت .الف) کالوس شکننده رویانزا در محیط M2، ب) کالوس فشرده در محیط M3، ج) کالوس باززا شده در محیط M12 و د) کالوس ریشه‌دار در محیط M4 .c: کالوس، e: رویان‌نما، r: ریشه.

مقایسه میانگین وزن تر کالوس‌ها تفاوت معنی‌داری (P< ۰/۰۵) را در بین محیط‌های مورد مطالعه نشان داد (شکل۵). بر این اساس بیشترین وزن مربوط به محیط‌های M6، M2 و M5 و کمترین وزن کالوس‌ها مربوط به محیط‌های M12، M16 و M9 بود (شکل۵). در مورد وزن تر کالوس نتایج آزمون دانکن تا حدی نشان داد که وزن تر کالوس‌ها در محیط‌های پایه MS نسبت به محیط‌های پایه N6 بیشتر است. در تحقیق حاضر ایجاد باززایی مورد نظر نبود و در نتیجه، محیطی که کمترین میزان باززایی را داشت مناسب‌تر بود. شکل ۶ نشان‌می‌دهد که بیشترین شاخص باززایی در M15 و کمترین مقدار این شاخص در محیط M4 بدست آمد.

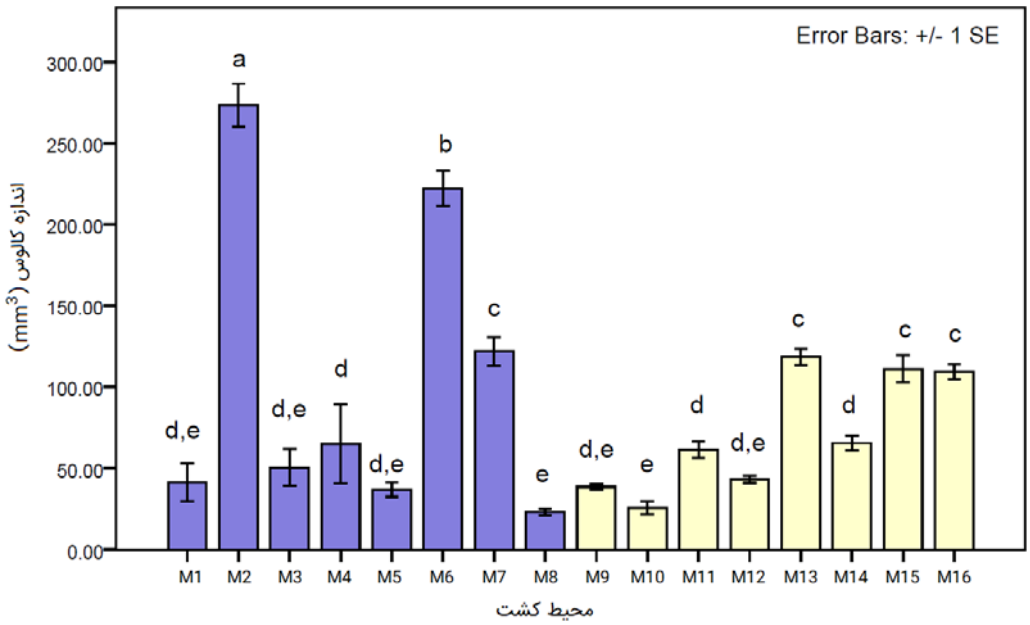
شکل ۷ (چپ) گراف میله‌ای حساسیت دینامیک (Dynamic Sensitivity) را نشان می‌دهد که ارجحیت و اهمیت معیارها را در سلسله مراتب روشAHP مشخص کرده‌است. بر این اساس مقدار اهمیت شاخص القای کالوس شکننده از بقیه بیشتر (۴۴/۴٪) و اهمیت شاخص باززایی از همه کمتر (۳/۵٪) است. اهمیت شاخص اندازه و وزن کالوس برابر ۲۶/۱٪ است. مقدار ناسازگاری، ۰/۰۲ محاسبه شد که نشان‌دهنده صحت قضاوت است. شکل ۷

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.8.6

(راست) ارجحیت محیط‌ها را با توجه به معیارها نشان می‌دهد. بر این اساس بیشترین ارجحیت (۱۷٫۳٪) برای محیط M2 ثبت شد و در نتیجه از بین ۱۶ محیط، این محیط برای القای کالوس شکننده انتخاب شد.

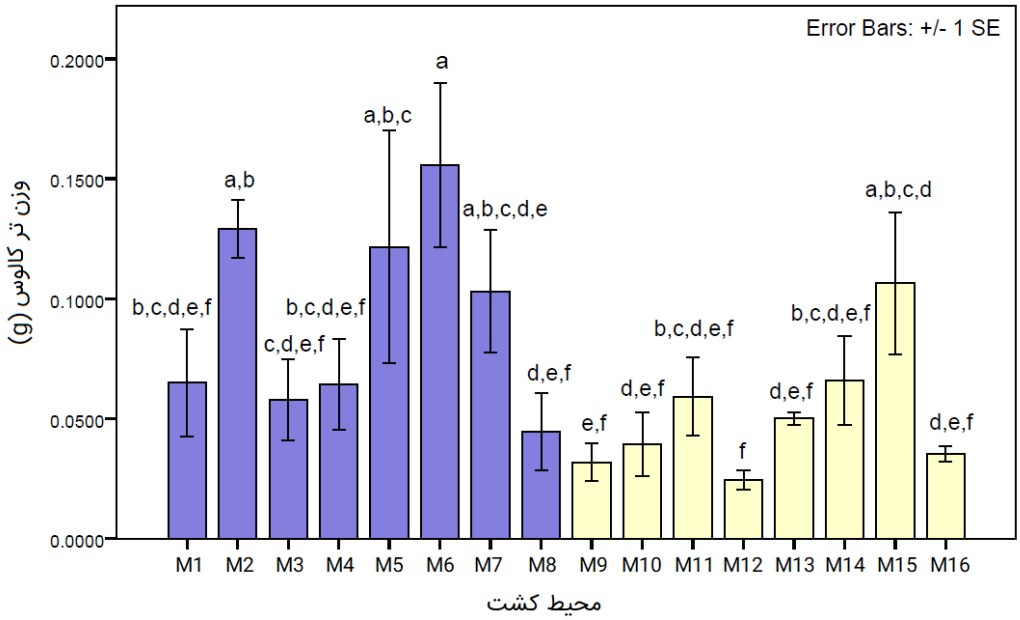


شکل۳- نمودار میانگین شاخص القای کالوس در محیط‌های پایه MS و N6 دارای مقادیر ترکیبی متفاوت از هورمون‌های 2,4-D و BA. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار (P< ۰/۰۵) طبق آزمون دانکن است.

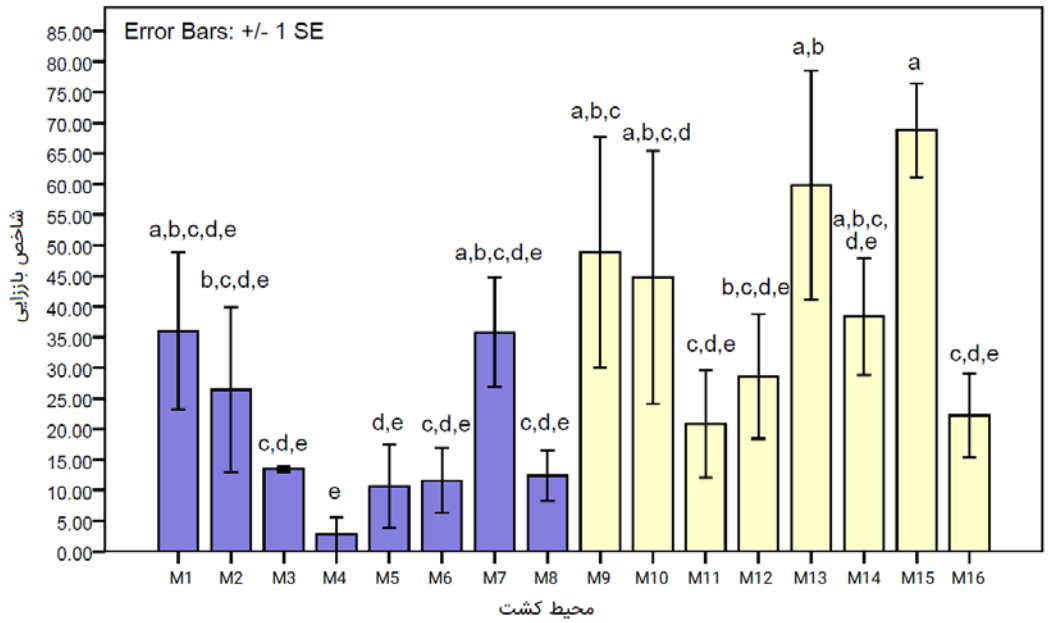


شکل۴- نمودار میانگین شاخص اندازه کالوس. بیشترین میانگین اندازه کالوس در محیط M2 و کمترین میانگین در محیط‌های M8 و M10 است. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار (P< ۰/۰۵) طبق آزمون دانکن است.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.8.6



شکل۵- نمودار میانگین وزن تر کالوس. بیشترین میانگین وزن در محیط‌های M6، M2، M5 و M15 و کمترین وزن در محیط‌های M12 و M9 است. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار (P< ۰/۰۵) طبق آزمون دانکن است.

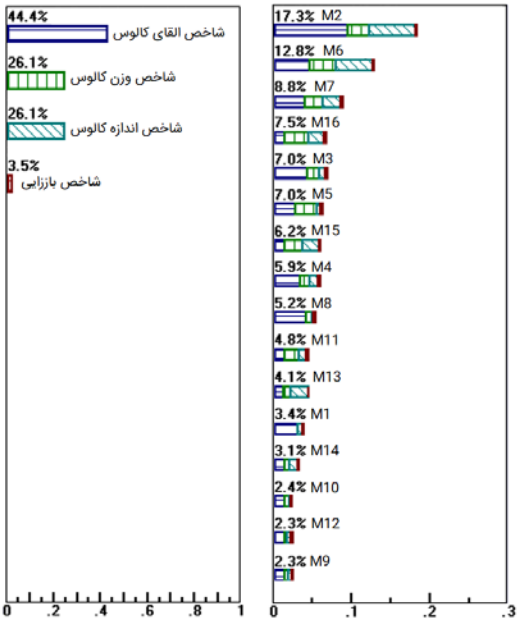


شکل۶- شاخص باززایی مستقیم و غیرمستقیم ریزنمونه رویان بالغ ذرت شیرین. کمترین باززایی M4 و بیشترین باززایی M15 است. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار (P< ۰/۰۵) طبق آزمون دانکن است.

شکل ۸ نمودار رشد بر مبنای وزن تر و خشک کالوس در محیط برگزیده توسط نرم‌افزار (M2) را نشان می‌دهد. همانطور که این شکل نشان می‌دهد از روز اول تا هفتم مرحله رشد اولیه (فاز تاخیرLag phase) و از روز هفتم تا یازدهم رشد بصورت لگاریتمی (فاز تصاعدی Log phase) است و بیشترین مقدار رشد در روز یازدهم است.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.8.6

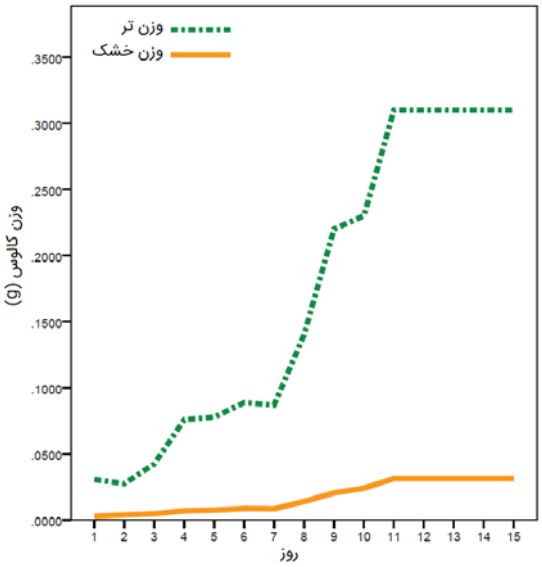
از روز یازدهم به بعد نمودار رشد ثابت مانده است (ابتدای فاز سکون). طی هشت واکشت ماهیانه کالوس‌های شکننده در محیط M2، اندام‌زایی در کالوس‌ها مشاهده نشد در حالی‌که برای مثال، کالوس‌های شکننده رشد یافته در محیط دارای مقادیر بیشتر از هورمون 2, 4-D (M4) پس از دو واکشت ریشه‌دار و کالوس‌های رشد یافته در محیط‌های N6 (M9 تا M16) باززا شدند. این نتایج نشان‌دهنده کارایی روش AHP برای انتخاب محیط کشت بهینه کالوس شکننده ذرت بود.



شکل ۷- گراف میله‌ای در سمت چپ اهمیت و الویت معیارها و در سمت راست ارجحیت محیط‌ها با توجه به معیارها را نشان می‌دهد؛ رسم شده توسط نرم‌افزار Expert Choice

بحث

برخی مطالعات تأثیرنوع ریزنمونه را بر کالوس‌زایی گیاهان مختلف بررسی کرده‌اند (۱۷، ۲۰، ۳۰). نتایج این تحقیق نیز نشان داد علاوه بر رقم، قطعه ریزنمونه برای ایجاد کالوس شکننده در ذرت اهمیت دارد.



شکل۸- منحنی رشد بر مبنای وزن تر و خشک کالوس در محیط برگزیده (M2)

در این تحقیق، قطعات ریزنمونه رویان بالغ بیش از دیگر قطعات (برگ، ساقه و ریشه) در ایجاد کالوس کارآمدی داشتند، در حالی‌که در مطالعه اومر و همکاران(۲۰) ریزنمونه‌های حاصل از رویان در مقایسه با ریزنمونه‌های برگی و ساقه‌ای، کمتر باعث القای کالوس شده بودند که می‌توان این اختلاف را به عواملی از جمله تفاوت در رقم‌های ذرت مورد مطالعه نسبت داد. نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که مقدار تنظیم‌کننده‌های رشد مثل اکسین در میزان القای کالوس از ریزنمونه‌ها حائز اهمیت بوده است بطوریکه القای کالوس در محیط‌های دارای بالاترین میزان هورمون اکسین (۳ میلی‌گرم‌برلیتر 2, 4-D) بیشتر بود. در تحقیق ارکویونسو و همکاران (۷) بیشترین مقدار کالوس در محیط پایه MS دارای ۶ میلی‌گرم‌درلیتر 2, 4-D و در تحقیق اومر و همکاران (۲۰)، در محیط با ۲ میلی‌گرم‌درلیتر 2, 4-D از ریزنمونه رویان بالغ ایجاد شد. به‌هرحال، بنظر می‌رسد غلظت بالای اکسین مورد استفاده، همانطور که برخی تحقیقات نشان داده‌اند (۲۶)، موجب اندام‌زایی کالوس‌ها، که در این تحقیق مورد نظر نبود، شد. در این تحقیق کالوس‌های رشد یافته در محیط M12 بعد از مدتی باززا شدند و اکثر کالوس‌های شکننده رشد یافته در

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.8.6

محیط M4 بعد از مدتی ریشه‌دار شدند. بر اساس نتایج بدست‌آمده بیشتر کالوس‌های رشد یافته در محیط دارای ۳ میلی‌گرم‌درلیتر 2, 4-D که شاخص القای بالایی داشتند از نظر اندازه کوچک بودند. نتایج تحقیق حاضر روند ارتباطی افزایشی اندازه کالوس را با افزایش مقدار اکسین که در پژوهش باربوسا و جیرالدو (۲) در مطالعه کالوس‌زایی برنج نیز مشاهده شده بود، نشان نداد. مقایسه میانگین وزن تر کالوس‌ها تفاوت معنی‌دار (P< ۰/۰۵) بین محیط‌ها را نشان داد و بیشترین وزن تر در محیط M6 بود. علاوه بر این در بیشتر محیط‌هایی که از هورمون سیتوکینین (BA) استفاده شد، میانگین وزن کالوس‌ها بیشتر بود. این نتیجه مانند نتایج دیگر مطالعات (۹) تأثیر سیتوکینین خارجی را بر روند کالوس‌زایی نشان داد. با توجه به نقش ژنتیک در توان کالوس‌زایی ذرت (۱۵) و تأثیر هورمون‌ها بر بیان ژن‌ها، بنظر می‌رسد غلظت‌های هورمونی مورد استفاده در این تحقیق بر بیان ژن‌های دخیل در باززایی کالوس ذرت تأثیر داشته است و باید تحقیقات بیشتری در سطح مولکولی انجام شود. در مورد شاخص باززایی چندین محیط در گروه کمترین مقدار باززایی قرار گرفتند و انتخاب صرفا بر اساس کمترین شاخص باززایی به سهولت میسر نبود. مقدار شاخص باززایی براساس باززایی مستقیم و غیرمستقیم بود، اما مشهود بود که میزان باززایی‌های مستقیم یا ادامه رشد ریزنمونه رویان بالغ، در محیط پایه N6 بیشتر بود. در مطالعهٔ مانی‌وانان و همکاران (۱۶) که از محیط پایه N6 برای القای کالوس رویانزا برای پنج ژنوتیپ ذرت استفاده کردند، محیط دارای ۲ میلی‌گرم‌درلیتر 2, 4-D بیشترین درصد القای کالوس را داشت. نتایج تحقیق حاضر نیز کارایی محیط پایه N6 را برای مطالعاتی با هدف باززایی کالوس ذرت نشان داد. درمجموع، انتخاب براساس هرکدام از معیارها به تنهایی به نتیجه‌ای متفاوت منجر شد و در نتیجه برای تصمیم‌گیری و انتخاب محیط بهینه از روش AHP استفاده شد. بر این اساس بیشترین ارجحیت (۱۷٫۳٪) برای محیط M2 توسط نرم‌افزار محاسبه شد و در نتیجه از بین ۱۶ محیط، این محیط برای القای کالوس شکننده انتخاب شد. طی هشت واکشت ماهیانه کالوس‌های شکننده در محیط برگزیده، اندام‌زایی در کالوس‌ها مشاهده نشد. نتایج کلی این تحقیق کارایی روش AHP برای انتخاب محیط کشت بهینه کالوس شکننده ذرت را نشان داد. انجام پژوهش‌های بیشتر برای بررسی سایر عوامل مؤثر در کالوس‌زایی ذرت پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق رویان بالغ ذرت شیرین بعنوان ریزنمونه مناسب برای القای کالوس شکننده انتخاب شد. از آنجاکه انتخاب محیط کشت القای کالوس شکننده براساس شاخص‌های القای کالوس شکننده، اندازه کالوس، وزن تر کالوس و میزان باززایی منجر به نتیجه‌های متفاوت شد، از روش AHP برای انتخاب محیط بهینه برای القای کالوس با مشخصات مورد نظر استفاده شد. رشد و مورفولوژی کالوس‌ها در محیط برگزیده بررسی و صحت نتایج روش AHP تأیید شد. نتایج این تحقیق کارایی استفاده از نرم‌افزارهای تصمیم‌گیری با روش AHP در انتخاب محیط کشت برای اهداف گوناگون کشت بافت گیاهی را تأیید می‌کند.

سپاسگزاری

از گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران در کرج برای همکاری در انجام این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Ali, F., Ahsan, M., Saeed, N. A., Ahmed, M., Qurban, A., Kanwal, N., Tehseen, M. M., Ijaz, U., Bibi, I., and Niazi, N. K., 2014. Establishment and optimization of callus-to-plant regeneration system using mature and immature embryos of maize (*Zea mays*). International

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.8.6

Journal of Agriculture and Biology, 16(1), PP: 111-117.

2. Barbosa Cepeda, I. D., and Chaparro-Giraldo, A., 2014. Optimization of an in vitro regeneration system for colombian indica rice varieties. Revista Colombiana de Biotecnología, 16(2), PP: 19-29.

3. Brown, D. C. W., and Thorpe, T. A., 1995. Crop improvement through tissue culture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11(4), PP:409-415.

4. Doran, P. M., 2009. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations. Biotechnology and Bioengineering, 103(1), PP: 60-76.

5. Du, X., Fang, T., Liu, Y., Huang, L., Zang, M., Wang, G., Liu, Y. and Fu, J., 2019. Transcriptome profiling predicts new genes to promote maize callus formation and transformation. Frontiers in Plant Science, 10, PP: 1633.

6. Efferth, Th., 2019. Biotechnology applications of plant callus cultures. Engineering, 5, PP: 50-59.

7. Erkoyuncu, M. T., Yorgancılar, M. and Atalay, E., 2017. Effect of some auxin types callus induction from mature embryos of maize genotypes. Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 1(2), PP: 20-23.

8. Fransz, P. F., and Schel, J. H. N., 1991. Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*). Canadian journal of botany, 69(1), PP: 26-33.

9. Ikeuchi, M., Sugimoto, K., and Iwase, A., 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. The Plant Cell, 25(9), PP: 3159-3173.

10. Ishizaka, A., and Labib, A., 2009. Analytic hierarchy process and expert choice: benefits and limitations. OR Insight, 22(4), PP: 201-220.

11. Jafari, S., and Zaredar, N., 2010. Land suitability analysis using multi attribute decision making approach. International Journal of Environmental Science and Development 1(5), PP: 441-445.

12. Jafari, S., Alizadeh, H., Davoodi, D., Jonoubi, P., Majd, A., Shobbar, Z. S., and Zamani, M., 2018. Changes in cytomorphology, expression of retinoblastoma related gene, and superoxide dismutase enzyme activity in maize cell culture exposed to silver nanoparticles. IEEE Transactions on NanoBioscience, 17(4), PP: 380-386.

13. Juárez-González, V. T., López-Ruiz, B. A., Baldrich, P., Luján-Soto, E., Meyers, B. C., and Dinkova, T. D., 2019. The explant developmental stage profoundly impacts small RNA-mediated regulation at the dedifferentiation step of maize somatic embryogenesis. Scientific Reports, 9, PP:14511.

14. Long, Y., Yang, Y., Ge, F., Pan, G. and Shen, Y., 2020. Establishment of a maize callus regeneration system from haploid shoot tips. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 141, PP: 583–592.

15. Ma, L., Liu, M., Yan, Y., Qing, C., Zhang, X., Zhang, Y., Long, Y., Wang, L., Pan, L., Zou, C., and Li, Z., 2018. Genetic dissection of maize embryonic callus regenerative capacity using multi-locus genome-wide association studies. Frontiers in Plant Science, 9, PP: 561.

16. Manivannan, A., Kaul, J., Singode, A., and Dass, S., 2010. Callus induction and regeneration of elite Indian maize inbreds. African Journal of Biotechnology, 9(44), PP: 7446-7452.

17. Mojtavi, S. S., and Omidi, M., 2016. The effect of different concentrations of hormones and explant type on callus induction on persian poppy. Journal of Plant Research (Iranian Jurnal of Biology), 29(1), PP:191-198.

18. Mustafa, N. R., De Winter, W., Van Iren, F., and Verpoorte, R., 2011. Initiation, growth, and cryopreservation of plant cell suspension cultures. Nature protocols, 6(6), PP: 715-742.

19. Nasiri, J., Naghavi, M. R., Alizadeh, H., Moghadam, M. R. F., Mashouf, A., and Nabizadeh, M., 2015. Modified AHP-based decision-making model toward accurate selection of eligible maintenance media for production of taxanes in *Taxus baccata* callus culture. Acta Physiologiae Plantarum, 37(6), PP:110.

20. Omer, R. A., Matheka, J. M., Runo, S., Ali, A. M., Kuria, E., Masiga, C., Mugoya, C., and Machuka, J., 2012. Effects of auxin and source of explants on callus induction of tropical maize. Biotechnology, 11(4), PP: 225-231.

21. Pathi, K. M., Tula, S., Huda, K. M. K., Srivastava, V. K., and Tuteja, N., 2013. An efficient and rapid regeneration via multiple shoot induction from mature seed derived embryogenic and organogenic callus of Indian maize (*Zea mays* L.). Plant Signaling and Behavior, 8(10), PP: e25891.

22. Rafiq, M., Fatima, T., Husnain, T., Bashir, K., and Riazuddin, S., 2005. Effect of different media on callus formation and regeneration of

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.8.6

different genotypes of maize (*Zea mays* L.). Plant Tissue Culture, 15, PP: 57-65.

23. Rao, S. R., and Ravishankar, G. A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20, PP: 101-153.

24. Saaty, T. L., 1987. The analytic hierarchy process; what it is and how it is used. Mathematical Modelling, 9(3-5), PP: 161-176.

25. Shaban, R., Abdel-rahman, M., Abdelsalam, N. R., and El-wakil, H., 2014. Friable callus induction on some maize varieties. Journal of Applied Sciences, 4(3), PP: 443-447.

26. Sheridan, W. F., 1975. Tissue Culture of Maize; callus induction and growth. Physiologia Plantarum, 33, PP: 151-156.

27. Smith, R., 2012. Plant Tissue Culture: techniques and experiments. Academic Press, 3rd ed., PP: 208

28. Strable, J., and Scanlon, M. J., 2009. Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology. Cold Spring Harbor Protocols 4(10), PP: 1-10.

29. Touchell, D., Smith, J., and Ranney, T. G., 2008. Novel applications of plant tissue culture. Combined Proceedings International Plant Propagators, 58, PP: 22-25.

30. Vatandoost, SH., and Zebarjadi, A. R., 2020. Effect of explant types and different levels of plant growth regulators on callogenesis and regeneration in medicinal plant, *Matricaria aurea*, 33(1), PP: 86-94

31. Yan, M. M., Xu, C., Kim, C. H., Um, Y. C., Bah, A. A., and Guo, D. P., 2009. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). Scientia Horticulturae, 123(1), PP: 124-128.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.8.6

Production of friable callus of maize (*Zea mays* L.) and using the analytic hierarchy process to select an optimum culture medium

Jafari S.[1], Davoodi D.[2], Alizadeh H.[3] and Jonoubi P.[1]

[1] Dept. of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Dept. of Nanotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, I.R. of Iran.

[3] Dept. of Agronomy and Plant breeding, Faculty of Agricultural Science and Engineering, University of Tehran, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

Preparation of cell suspension is an important step in the study of plant cells which is often done by the culture of friable embryogenic callus. The primary objective of this research was to produce friable callus and to determine an optimum culture medium for the induction of friable callus in maize plant. Using two basic media, Murashige-Skoog and Chu, with different concentrations of 2, 4 Dichlorophenoxyacetic acid and Benzyl adenine hormones (overall 16 different culture media), callus induction was performed on maize mature embryo explants. Selection criteria including high friable callus induction index, high callus size index, high callus fresh weight index, and low regeneration index were measured, and the mean values were compared using analysis of variance. Considering each of these selection criteria alone, different optimum media for callus induction were introduced. In order to determine one optimum medium considering all the criteria, the analytical hierarchy method was utilized. The optimum medium in this study was MS supplemented with 1 mg/L 2, 4-D wherein the induction, weight, and size indices were high, and the regeneration index was low. In order to evaluate and verify the selected medium, the explants were cultivated in *in silico-selected* medium and the growth curves were plotted for callus fresh and dry weights. Several successive subculturing of the callus was performed on the selected medium wherein no regeneration was observed. The results suggested the analytical hierarchy approach can be used as a reliable decision-making method for optimum-medium selection for inducing maize friable callus.

Key words: Sweet maize, Friable callus, Analytical hierarchy method, Regeneration index