

بررسی اثر ۵-آزاسیتیدین به عنوان ماده ضد متیلاسیون DNA بر روی صفات زراعی، القای آندروژنز از طریق کشت بساک و بیان ژن DNA متیل ترانسفراز در بافت برگ‌گی ذرت (*Zea mays* L.)

راضیه عزیزیان مصلح^۱، محمدرضا عبداللهی^{۲*}، پیام پورمحمدی^۳، حسن ساریخانی^۴ و اصغر میرزایی اصل^۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۳- استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز

۴- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۵- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۷)

چکیده

بهینه‌سازی روش‌های درون شیشه‌ای برای تولید گیاهان دابل هاپلوئید ذرت نقش مهمی در برنامه‌های اصلاحی این گیاه دارد. در این مطالعه اثرات ماده ۵-آزاسیتیدین بر روی صفات زراعی، کارایی القای آندروژنز و همچنین بیان ژن DNA متیل ترانسفراز (AF229183.1) در دو مرحله رشدی ذرت شامل مرحله ۷ تا ۸ برگ و مرحله گلدهی مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. دو ژنوتیپ ذرت (DH5 × DH7 و ETMH-82) به عنوان عامل اول و تیمار بذور ذرت با ۵-آزاسیتیدین (۰، ۵، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به عنوان عامل دوم در نظر گرفته شدند. بذور تیمار شده در مزرعه کشت گردیده و در طول مراحل رشد، صفات مختلف مورفولوژیکی و زراعی اندازه‌گیری شدند. در آزمایش کشت بساک، بساک‌های حاوی میکروسپورهایی در مراحل تک‌هسته‌ای میانی تا تک‌هسته‌ای انتهایی انتخاب و در محیط کشت پایه YPm حاوی ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم در لیتر BAP کشت گردیدند. اثرات متقابل ژنوتیپ × سطوح ۵-آزاسیتیدین برای همه صفات مورد مطالعه به جز تعداد دانه در ردیف بلال، عمق دانه، قطر بوته، تعداد برگ در بوته و تعداد بلال اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. بیشترین میزان وزن هزار دانه در تیمارهای ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار و همچنین بیشترین عملکرد دانه و عملکرد بیولوژیک در تیمار ۱۰۰ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین برای هر دو ژنوتیپ مشاهده شد. بذور ژنوتیپ DH5 × DH7 تیمار شده با غلظت ۵ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین بیشترین میانگین تعداد ساختارهای رویان مانند (۰/۱۸۳۳) و گیاهچه باززایی شده (۰/۰۶۷) به ازای هر بساک را ایجاد کردند. بیان نسبی ژن DNA متیل ترانسفراز در گیاهان حاصل از بذور تیمار شده با غلظت‌های مختلف ۵-آزاسیتیدین در هر دو ژنوتیپ و هر دو مرحله رشدی مورد مطالعه نسبت به گیاهان شاهد (غلظت صفر میکرومولار ۵-آزاسیتیدین) کاهش معنی‌داری نشان داد که این کاهش بیان ژن می‌تواند منجر به بهبود القای آندروژنز در کشت بساک ژنوتیپ DH5 × DH7 شده باشد. به هر حال، علی‌رغم کاهش بیان این ژن در دو مرحله رشدی ژنوتیپ ETMH-82، القای آندروژنز در این ژنوتیپ مشاهده نگردید. نتایج تحقیق حاضر می‌تواند به تعیین نقش عوامل اپی‌ژنتیکی در القاء آندروژنز و بهبود تولید گیاهان هاپلوئید در ذرت کمک کند.

واژگان کلیدی: آندروژنز، ۵-آزاسیتیدین، DNA متیل ترانسفراز، ذرت، کشت بساک، گیاه هاپلوئید

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: m.abdollahi@basu.ac.ir

مقدمه

با توجه به جمعیت بالغ بر هفت میلیارد نفری جهان، نیاز به غذا و انرژی به یک مشکل اساسی تبدیل شده است. جمعیت جهان به مواد غذایی سالم تر و ایمن تر نیاز دارد و یکی از راه کارهای نیل به این هدف، بهبود عملکرد و کیفیت محصولات زراعی می باشد. کشت بافت گیاهی مجموعه ای از روش های بیوتکنولوژی برای ایجاد، نگهداری و تکثیر سلول ها، بافت ها، اندام ها و حتی گیاهان کامل در شرایط کنترل شده است تا در مدت زمان کوتاه تر از روش های معمول، گیاهان بیشتری با صفات بهبود یافته تولید کنند. یکی از این روش های کشت بافتی که اجازه دسترسی سریع به لاین های خالص در گیاهان را می دهد و منجر به کاهش چشمگیر مدت زمان برنامه های اصلاحی تولید بذر هیبرید در گیاهان دگرگشن می گردد، تولید درون شیشه ای گیاهان هاپلوئید می باشد. روش های متعددی جهت تولید گیاهان هاپلوئید و به دنبال آن تولید گیاهان دابل هاپلوئید وجود دارد. یکی از این روش ها آندروژنر می باشد که خود شامل دو روش کشت بساک و کشت میکروسپور می باشد (Shugar, 1998). کشت بساک در گیاهان مختلف استفاده شده است. در این روش بساک های دارای میکروسپورهای نابالغ روی محیط غذایی مصنوعی کشت می شوند و در نهایت منجر به کالوس زایی یا جنین زایی می گردد که با باززایی گیاه از آن ها می توان به گیاه هاپلوئید دست یافت (Touraev et al., 2009). پتانسیل گیاهان دابل هاپلوئید (DH) در تولید ارقام هیبرید ذرت از مدت ها قبل شناخته شده است. با استفاده از تکنیک های تولید گیاهان دابل هاپلوئید می توان ترکیب های مختلف ژن را در مدت زمان کوتاهی به صورت هموزیگوت تثبیت کرد. علاوه بر این، لاین های دابل هاپلوئید دارای باروری بالا و صفات زراعی مطلوب می باشند که می توانند به طور مستقیم در اصلاح هیبریدها در ذرت و یا سایر گیاهان دگرگشن استفاده شوند تا هیبریدهای جدیدی را تولید کنند که تقاضای بازار را برآورده می کنند (Munsamy et al., 2013). با این حال، موفقیت تکنیک های کشت بساک در

ذرت تا حد زیادی به پاسخ آندروژنی ژنوتیپ ها بستگی دارد و تولید هاپلوئیدها از طریق کشت بساک و میکروسپورهای ایزوله به دلیل وابستگی شدید آن به ژنوتیپ و میزان پاسخ پایین آن، محدود شده است (Barloy and Beckert, 1993; Ismaili and Pour Mohammadi, 2016). برنامه ریزی مجدد سلول های گیاهی القاء شده توسط تنش های مختلف جهت کسب خاصیت توتی پوتنسی، به سرکوب یا فعال شدن تعداد زیادی از ژن های مرتبط با برنامه جدید رشد و نمو و همچنین تغییراتی در سازمان دهی کل ژنوم بستگی دارد (Finnegan et al., 2000). یکی از عواملی که در تنظیم برنامه های بیان ژن در ژنوم نقش دارند، عوامل اپی ژنتیکی می باشند (Kohler and Villar, 2008). اپی ژنتیک، تغییرات برگشت پذیر ارثی در بیان ژن می باشند که توسط محرک های محیطی القای می شوند. در گیاهان، وجود عوامل اپی ژنتیکی بر بیان ژن های مختلف تأثیر می گذارد و گاهی می تواند موجب سازگاری به شرایط محیطی مختلف گردد. از جمله مکانیسم های مؤثر در تغییرات اپی ژنتیک، متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی و RNA های غیرکدکننده می باشند (Chuang and Jones, 2007; Heo et al., 2013; Baulcombe and Dean, 2014). متیلاسیون DNA که توسط DNA متیل ترانسفراز انجام می گردد، یک تغییر غالب اپی ژنتیکی در کروماتین است که با خاموش کردن ژن همراه است. این علامت اپی ژنتیکی در طی فرآیندهای تمایز و تکثیر سلول های گیاهی تغییر می کند و بیان ژن را تنظیم می کند (Meijón et al., 2010). تغییر الگوی متیلاسیون DNA و به دنبال آن تغییر بیان ژن ها، می تواند منجر به تولید گیاهانی با خصوصیات زراعی بهبود یافته گردد (Meijón et al., 2010). در سال های اخیر، تحقیقات زیادی نشان داده اند که فرآیندهای کشت بافتی مانند باززایی گیاهان در شرایط درون شیشه ای و رویان زایی سوماتیکی به شدت توسط مکانیسم های اپی ژنتیکی تنظیم می گردند (Osorio-Montalvo et al., 2018). همچنین محققین در گونه های گیاهی مختلف مانند کلزا (El-Tantawy et al., 2013) و جو (Testillano et al., 2013)

عملیات آماده‌سازی زمین شامل شخم سطحی، دیسک و لولر انجام شد و به مقدار ۷۰ کیلوگرم کود فسفر و ۵۰ کیلوگرم کود پتاسیم قبل از کشت مورد استفاده قرار گرفت. هر کرت شامل ۳ خط به طول ۶ متر، با فاصله ردیف ۷۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. همچنین بین بلوک‌ها ۱/۵ متر فاصله در نظر گرفته شد.

روش پیش‌تیمار بذور با ۵-آزاسیتیدین: به‌منظور پیش‌تیمار بذور، دو ژنوتیپ ذرت با ماده ۵-آزاسیتیدین (شرکت سیگما)، ابتدا ۲/۴۴ میلی‌گرم از ماده مذکور در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و با رساندن حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر، محلول مادری با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به‌دست آمد. برای مرحله پیش‌تیمار، بذور دو ژنوتیپ ذرت پس از شستشوی سطحی با آب مقطر، در ظروف پتری‌دیش حاوی غلظت‌های مختلف ماده ۵-آزاسیتیدین در داخل یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و تاریکی به‌مدت ۷۲ ساعت قرارگرفتند و سپس جهت کشت به زمین زراعی منتقل شدند. بذور شاهد به‌مدت ۷۲ ساعت با آب مقطر پیش‌تیمار شدند.

صفات مطالعه شده در آزمایش مزرعه‌ای: به‌منظور بررسی اثر پیش‌تیمار بذور با غلظت‌های مختلف ۵-آزاسیتیدین بر روی رشد و عملکرد دو ژنوتیپ ذرت مورد مطالعه، صفات مختلف زراعی و مورفولوژیک (شامل: ارتفاع بوته، ارتفاع از سطح خاک تا اولین بلال، قطر بوته، تعداد برگ در بوته، تعداد پنجه، تعداد بلال، تعداد ردیف دانه در بلال، تعداد دانه در هر ردیف بلال، قطر بلال، قطر چوب بلال، عمق دانه، وزن هزار دانه، عملکرد بیولوژیک، عملکرد دانه، شاخص برداشت دانه بلال در بوته و درصد چوب بلال) اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری صفات مذکور، در هر واحد آزمایشی ۴ بوته ذرت به‌صورت تصادفی انتخاب گردید. پس از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه‌های آماری لازم با استفاده از نرم‌افزارهای SAS و SPSS انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

(2013) نشان داده‌اند که تغییرات در متیلاسیون DNA کل ژنوم، با تغییر در برنامه رشد و نمو میکروسپور یا سلول سوماتیکی به سمت جنین‌زایی همراه بوده است که این یافته‌ها نشان می‌دهد که یک برنامه‌ریزی مجدد اپی‌ژنتیکی پس از القای میکروسپور به یک حالت توتی‌پوتنت و شروع جنین‌زایی وجود دارد. این برنامه‌ریزی مجدد اپی‌ژنتیکی شامل کاهش متیلاسیون DNA در کل ژنوم است که با فعال شدن تکثیر سلولی همراه است در حالی‌که افزایش الگوی متیلاسیون DNA بعدی با تمایز جنین همراه بوده است (Testillano et al., 2013). ۵-آزاسیتیدین (5-Azacytidine) به‌عنوان آنالوگ ۵-سیتوزین، فعالیت DNA متیل‌ترانسفراز و فعالیت آنزیم هیستون متیل‌ترانسفراز را در سلول‌های یوکاریوتی مهار کرده و منجر به هیپومتیلاسیون DNA ژنومی و هیستون می‌شود (Friedman, 1981; Berenguer et al., 2017). ۵-آزاسیتیدین به‌عنوان ماده دمتیله‌کننده در چندین گیاه استفاده شده و محدوده وسیعی از اثرات روی رشد و نمو را بسته به غلظت و زمان مورد استفاده نشان داده است (Pecinka and Liu, 2014; Teyssier et al., 2014)؛ بنابراین در تحقیق حاضر اثر پیش‌تیمار بذور دو رقم ذرت با غلظت‌های مختلف ۵-آزاسیتیدین روی صفات رشدی، القای آندروژنز از طریق کشت بساک و همچنین بیان ژن DNA متیل‌ترانسفراز در دو مرحله رشدی مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط آزمایش: این آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۷-۱۳۹۸ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا اجرا شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد که در آن فاکتور اول دو ژنوتیپ ذرت DH5 × DH7 و ETMH-82 بود و تیمار بذور ذرت با غلظت‌های مختلف ماده ضد‌متیلاسیون ۵-آزاسیتیدین (۰، ۵، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به‌عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که دو ژنوتیپ انتخاب شده، پاسخ مطلوبی به القاء آندروژنز از طریق کشت بساک در مطالعات قبلی نشان داده اند (Ismaili and Pour Mohammadi, 2016).

آزمایش کشت بساک ذرت در شرایط درون شیشه‌ای: به‌منظور بررسی اثر ماده ضد متیلاسیون ۵-آزاسیتیدین بر میزان القای آندروژن از طریق کشت بساک، گل‌های نر ذرت در مرحله‌ای که بساک‌های آن‌ها حاوی میکروسپورهایی در مرحله تک‌هسته‌ای میانی تا تک‌هسته‌ای انتهایی بودند، انتخاب شدند (Aulinger, 2002; Nageli *et al.*, 1999) و از گیاهان شاهد و گیاهان حاصل از بذور پیش‌تیمار شده با غلظت‌های مختلف ۵-آزاسیتیدین در شرایط مزرعه برداشت شدند. در این تحقیق، تعیین مرحله رشد و نمو مناسب میکروسپورها (مرحله تک‌هسته‌ای میانی تا تک‌هسته‌ای انتهایی) در دو ژنوتیپ ذرت توسط رنگ‌آمیزی به روش استوکارمن ۲ درصد و سپس استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر انجام شد. به‌منظور اعمال پیش‌تیمار سرمایی روی بساک‌ها قبل از کشت، گل‌آذین‌های نر در داخل دستمال کاغذی مرطوب قرار گرفتند و سپس در داخل فویل آلومینیومی پیچیده شدند و به مدت ۲ هفته به یخچال با دمای ۸ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند (Biter, 1997). پس از اعمال پیش‌تیمار سرمایی، گل‌های نر با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۳ مرتبه ۵ دقیقه‌ای شست و شو با آب مقطر استریل شدند. پس از انجام ضدعفونی گل‌های نر، ریزنمونه‌های بساک، در شرایط استریل از گلچه‌ها جدا شدند و در پتری‌دیش‌های ۸ سانتی‌متری حاوی محیط کشت پایه YPm حاوی مقادیر ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP^۱ قرار داده شدند و سپس به اتاق رشد با دمای ۲۷ سانتی‌گراد و تاریکی مطلق به مدت یک ماه منتقل شدند. شبه جنین‌های ایجاد شده جهت تولید گیاهچه به محیط باززایی MS بدون هورمون با pH برابر ۵/۸ منتقل شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: جهت بررسی میزان بیان ژن DNA متیل‌ترانسفراز تحت تیمارهای ماده ۵-آزاسیتیدین، ابتدا نمونه‌های برگ‌ی از هر تیمار آزمایشی در دو مرحله رشدی مختلف (مرحله ۷ الی ۸ برگی و مرحله برداشت گل‌های نر برای آزمایش کشت بساک) از گیاهان ذرت کشت

شده در مزرعه برداشت شده و بلافاصله در ازت مایع قرار گرفتند. سپس، نمونه‌ها به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. استخراج RNA به‌وسیله کیت RNX-plus از نمونه‌های پودر شده برگ در ازت مایع طبق دستورالعمل شرکت سیناکلون صورت گرفت. تعیین غلظت و کیفیت نمونه‌های RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر Nano Drop 2000 (Nano Drop, Thermo Scientific) تعیین شد و در نهایت نمونه‌های RNA با نسبت A260/A280 بین ۱/۹-۲/۱ و نسبت A260/A230 بیشتر از ۲ برای تحلیل‌های بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند. به‌منظور خالص‌سازی RNA، RNAهای استخراج شده با استفاده از آنزیم DNase I طبق دستورالعمل شرکت سازنده (GeneAil) مورد تیمار قرار گرفتند. ساخت cDNA با کیت سنتز cDNA (شرکت سیناکلون) انجام شد و سپس کمیت و کیفیت آن‌ها با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) برای ژن DNA متیل‌ترانسفراز (AF229183.1) با دستگاه ترموسایکلر (شرکت اپندروف، آلمان)، محصولات واکنش PCR روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری گردیدند و با استفاده از دستگاه الکتروفورز شرکت بایورد (BioRAD) الکتروفورز شدند.

طراحی آغازگر و واکنش Real-time PCR: طراحی آغازگر از توالی mRNA مربوط به یک ژن DNA متیل‌ترانسفراز ذرت با شماره دستیابی AF229183.1 (NCBI) انجام گردید. آغازگرها از نظر محل اتصال و ویژگی‌های مطلوب توسط نرم‌افزارهای AlleID v.7 و Primer3 آنالیز شدند. سپس از اختصاصی بودن محل جفت شدن آغازگرها توسط سرویس BLAST در سایت NCBI اطمینان حاصل شد (جدول ۱). برای آزمایش Real-time PCR، مخلوط ۱۰ میکرولیتری واکنش شامل ۰/۳ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۵ میکرولیتر Master mix (شرکت سیناکلون) و ۲ میکرولیتر نمونه cDNA (با غلظت ۵۰ نانوگرم

1- 6-Benzylaminopurine

در میکرولیتر) بود. پس از آماده نمودن مخلوط واکنش، میکروتیوپ‌های حاوی هر واکنش به دستگاه ترموسایکلر منتقل شدند. این واکنش طبق دستورالعمل دمایی: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه، ۴۰ چرخه (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه (واسرشت‌سازی)، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه (دمای Tm آغازگر)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه) و تکثیر نهایی به مدت ۷ دقیقه انجام شد. در این پژوهش، برای بررسی بیان نسبی ژن‌ها از سه تکرار تکنیکی و سه تکرار بیولوژیکی استفاده گردید و بیان نسبی ژن‌ها با روش pfaffl محاسبه شد (Pfaffl et al., 2002). از ژن خانه دار اکین (Qian et al., 2014) ذرت به عنوان استاندارد داخلی، جهت نرمال کردن Ct‌ها و سنجش بیان ژن استفاده شد. مشخصات آغازگرهای مورد بررسی در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتایج و بحث

نتایج بررسی صفات مورفولوژیک در آزمایش مزرعه‌ای: نتایج تجزیه واریانس مربوط به صفت ارتفاع بوته (جدول ۲) نشان داد که غلظت‌های مختلف ۵-آزاسیتیدین، دو ژنوتیپ مورد استفاده و اثر متقابل آن‌ها در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری داشتند. در ژنوتیپ DH5 × DH7 با افزایش غلظت ۵-آزاسیتیدین، ارتفاع گیاه افزایش یافت در حالی که در ژنوتیپ ETMH-82 این روند معکوس بود. بیشترین ارتفاع بوته در غلظت ۱۰۰ میکرومولار برای ژنوتیپ DH5 × DH7 و در غلظت ۵ میکرومولار و گیاهان شاهد برای ژنوتیپ

ETMH-82 مشاهده گردید (جدول ۳). برای صفت ارتفاع تشکیل بلال از سطح زمین دو ژنوتیپ ذرت و اثرات متقابل ژنوتیپ در غلظت ۵-آزاسیتیدین اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان دادند (جدول ۲). در ژنوتیپ DH5 × DH7 بیشترین مقدار ارتفاع تشکیل بلال از سطح زمین در غلظت ۵ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین مشاهده گردید در حالی که در ژنوتیپ ETMH-82 بیشترین ارتفاع تشکیل بلال از سطح زمین مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین بود (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس دو صفت قطر بلال و قطر چوب بلال نشان داد که اثر غلظت ۵-آزاسیتیدین و اثر متقابل ژنوتیپ × غلظت ۵-آزاسیتیدین در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بودند. مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل ژنوتیپ × غلظت ۵-آزاسیتیدین (جدول ۳) نشان داد که با افزایش سطح ۵-آزاسیتیدین، قطر بلال و قطر چوب بلال در ژنوتیپ DH5 × DH7 در غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار افزایش پیدا کرد در حالی که در ژنوتیپ ETMH-82 در سطح ۵ میکرومولار، این دو صفت کمترین میزان را نشان دادند. در حالی که غلظت‌های دیگر ۵-آزاسیتیدین اختلاف چندانی با شاهد برای این دو صفت نشان ندادند (جدول ۳). برای صفت تعداد ردیف دانه در بلال، نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ژنوتیپ در سطح ۵ درصد و اثر غلظت ۵-آزاسیتیدین و اثرات متقابل ژنوتیپ × غلظت ۵-آزاسیتیدین بر این صفت در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند (جدول ۲).

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Real time PCR

Table 1. Basic information of Real time PCR primers

ژن Gene	دمای اتصال (سانتی‌گراد) Annealing temperature (°C)	اندازه محصول (جفت‌باز) Product size (bp)	توالی آغازگر (۵'-۳') Primer sequence (5'-3')	شماره دستیابی Accession number
DNA methyltransferase gene	56	154bp	F: 5'CAGGGATTCTCTGGGATGAA3' R: 5'GCCCTTTGTTGAAGGAAACA3'	AF229183.1
Actin	57	128bp	F: 5'CCACACCGTCCCTATCTAC3' R: 5'TCGTAGTGAAGGAGTAACCC3'	XM_020542124.3

جدول ۲- تجزیه واریانس مربوط به صفات مورفولوژیک و عملکردی دو ژنوتیپ ذرت پیش تیمار شده با غلظت‌های مختلف ۵-آزاسیتیدین

Table 2. Analysis of variance for morphological and yield traits of two Maize genotypes pretreated with different concentrations of 5-azacytidine

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Means of square															
		PH	EH	RN/E	KN/R	ED	CD	KD	1000-KW	BY	GY	HI	ECP	PD	LN	TN	EN
بلوک Block	2	95.54	2.59	12.6	2.81	0.248	0.86	0.182	20.58	117.5	34.94	25.38	51.52	0.019	1.54	0.015	0.074
ژنوتیپ Genotype	1	3290**	882.29**	320.4*	869.21**	0.049	0.15	0.028	2001.81**	1043.46	445.96**	92.55*	146.02*	1.55	0.37	0.286*	0.4
0-آزاسیتیدین 5-azacytidine	3	3305**	10.11	343.6**	61.05**	0.493*	0.555*	0.026	1022.65**	56636.30**	590.1**	93.59**	546.95**	1.90*	4.15*	0.154	0.28
ژنوتیپ × 0-آزاسیتیدین Genotype × 5-azacytidine	3	230**	497.41**	273.4**	11.66	0.475*	0.504*	0.11	280.57**	2278.21*	1147.44**	236.24**	911.13**	0.64	0.49	0.34**	0.097
خطای آزمایشی Error	14	23.03	17.62	9.37	9.54	0.135	0.099	0.079	8.61	596.96	30.98	11.42	21.21	0.51	1.11	0.052	0.154
ضرب تغییرات (درصد) Coefficient of Variation (%)		4.34	23.5	9.18	10.9	12.95	16	32	10	10.8	14.9	19.7	19.2	17.4	9.9	24.3	27.2

* و **: به ترتیب معنی دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

* and **: Significant at 5% and 1% levels of probability, respectively

PH: ارتفاع گیاه؛ EH: ارتفاع اولین بلال؛ RN/E: تعداد ردیف در بلال؛ KN/R: تعداد دانه در ردیف بلال؛ ED: قطر بلال؛ CD: قطر چوب بلال؛ KD: عمق دانه؛ 1000-KW: وزن هزار دانه؛ BY: عملکرد بیولوژیک؛ GY: عملکرد دانه؛ HI: شاخص برداشت بوته؛ ECP: درصد چوب بلال؛ PD: قطر بوته؛ LN: تعداد برگ؛ TN: تعداد پنجه؛ EN: تعداد بلال

PH: Plant height; EH: Ear height; RN/E: Row number/ear; KN/R: Kernel number/row; ED: Ear diameter; CD: Cob diameter; KD: Kernel depth; 1000-KW: 1000 Kernel weight; BY: Biological yield; GY: Grain yield; HI: Harvest index; ECP: Ear Cop percentage; PD: Plant diameter; LN: Leave number; TN: Tillage number; EN: Ear Number.

Table 3. Mean comparison of genotype and 5-azacytidine interactions for agronomic traits in maize

میانگین های دارای حروف مشابه در آزمون دانکن اختلاف معنی داری یا هم ندارند.

Means followed by similar letter(s) are not significantly different by Duncan test

PH: Plant height; EH: Ear height; RN/E: Row number/ear; KN/R: Kernel number/row; ED: Ear diameter; CD: Cob diameter; 1000-KW: 1000 Kernel weight; BY: Biological yield; GY: Grain yield; HI: Harvest index; ECP: Ear Cop percentage; PD: Plant diameter; LN: Leave number; TN: Tillage number

مقایسه میانگین اثرات متقابل (جدول ۳) نشان داد که در ژنوتیپ $DH7 \times DH5$ ، سطح ۱۰۰ میکرومولار بیشترین تعداد ردیف دانه در بلال را تولید کرد در حالی که در ژنوتیپ ETMH-82 روند تغییرات متفاوت بود. به طوری که بیشترین تعداد ردیف دانه در بلال در غلظت ۱۰ میکرومولار مشاهده شد. اثر ژنوتیپ و اثر غلظت ۵-آزاسیتیدین در سطح ۱ درصد برای صفت تعداد دانه در هر ردیف بلال معنی دار گردید ولی اثرات متقابل ژنوتیپ $\times$ غلظت ۵-آزاسیتیدین اختلاف معنی داری برای این صفت نشان ندادند (جدول ۲). به هر جهت در مقایسه میانگین اثرات متقابل برای این صفت با روش دانکن گروه بندی متفاوتی مشاهده شد و غلظت ۱۰۰ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین در ژنوتیپ ETMH-82 بیشترین تعداد دانه در ردیف بلال را در مقایسه با سایر تیمارها ایجاد کرد (جدول ۳). دو ژنوتیپ مورد استفاده، سطوح مختلف ۵-آزاسیتیدین و اثرات متقابل ژنوتیپ $\times$ ۵-آزاسیتیدین برای صفت وزن هزار دانه اختلاف معنی دار آماری در سطح ۱ درصد نشان دادند (جدول ۲). استفاده از سطوح ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین در ژنوتیپ $DH7 \times DH5$ و غلظت ۱۰۰ میکرومولار در ژنوتیپ ETMH-82 منجر به تولید بیشترین میزان وزن هزار دانه گردیدند (جدول ۳). دو ژنوتیپ مورد استفاده اختلاف معنی داری از نظر عملکرد بیولوژیک نشان ندادند ولی سطوح مختلف ۵-آزاسیتیدین در سطح ۱ درصد و اثرات متقابل ژنوتیپ $\times$ ۵-آزاسیتیدین در سطح ۵ درصد اختلاف آماری معنی داری نشان دادند (جدول ۲). استفاده از غلظت ۱۰۰ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین منجر به تولید بیشترین عملکرد بیولوژیک در هر دو ژنوتیپ گردید (جدول ۳). دو ژنوتیپ مورد استفاده ذرت برای صفت عملکرد دانه در سطح ۱ درصد و برای صفات شاخص برداشت بوته و درصد چوب بلال در سطح ۵ درصد اختلاف معنی دار آماری نشان دادند (جدول ۲). همچنین سطوح مختلف ۵-آزاسیتیدین و اثرات متقابل ژنوتیپ $\times$ غلظت ماده ۵-آزاسیتیدین اختلاف معنی داری از نظر صفات عملکرد دانه، شاخص برداشت و درصد چوب بلال در سطح ۱ درصد نشان دادند (جدول ۲). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که استفاده از سطوح ۵ و ۱۰۰ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین در ژنوتیپ $DH7 \times DH5$ و همچنین غلظت ۱۰۰ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین در ژنوتیپ ETMH-82 بیشترین میزان عملکرد دانه را ایجاد کرده

است (جدول ۳). همچنین بیشترین شاخص برداشت بوته و درصد چوب بلال از غلظت ۵ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین در ژنوتیپ $DH7 \times DH5$ و شاهد در ژنوتیپ ETMH-82 به دست آمد (جدول ۳). برای صفت قطر بوته، دو ژنوتیپ ذرت و اثرات متقابل ژنوتیپ در غلظت ۵-آزاسیتیدین اختلاف معنی دار آماری نشان ندادند و فقط غلظت های مختلف ۵-آزاسیتیدین اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد نشان دادند. علی رغم عدم اختلاف معنی دار آماری بین اثرات متقابل، مقایسه میانگین آن ها با روش دانکن گروه بندی متفاوتی را بین میانگین ها نشان داد به طوری که به غیر از غلظت ۱۰۰ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین در ژنوتیپ ETMH-82 که کمترین میزان قطر بوته را ایجاد کرد، سایر تیمارها بدون اختلاف معنی دار آماری بیشترین مقدار قطر بوته را ایجاد کردند (جدول ۳). برای صفت تعداد برگ در بوته، دو ژنوتیپ ذرت و اثرات متقابل ژنوتیپ در غلظت ۵-آزاسیتیدین اختلاف معنی دار آماری نشان ندادند (جدول ۲). در حالی که غلظت های مختلف ۵-آزاسیتیدین اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد برای این صفت نشان دادند (جدول ۲). مقایسه میانگین اثرات متقابل برای صفت تعداد برگ در بوته نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین در رقم ETMH-82 منجر به ایجاد بیشترین تعداد برگ در مقایسه با سایر تیمارها گردیده است (جدول ۳). برای صفت تعداد پنجه، دو ژنوتیپ مورد استفاده در سطح ۵ درصد و اثرات متقابل ژنوتیپ و غلظت ۵-آزاسیتیدین در سطح ۱ درصد اختلاف معنی داری نشان دادند ولی غلظت های مختلف ۵-آزاسیتیدین تفاوت معنی داری برای صفت تعداد پنجه نشان ندادند (جدول ۲). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که استفاده از غلظت های ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین در ژنوتیپ $DH7 \times DH5$ و ۵ میکرومولار در ژنوتیپ ETMH-82 بیشترین تعداد پنجه را در مقایسه با شاهد ایجاد کردند (جدول ۳). دو ژنوتیپ مورد استفاده ذرت، غلظت های مختلف ۵-آزاسیتیدین و اثرات متقابل آن ها اختلاف معنی دار آماری برای صفات عمق دانه و تعداد بلال نشان ندادند (جدول ۲).

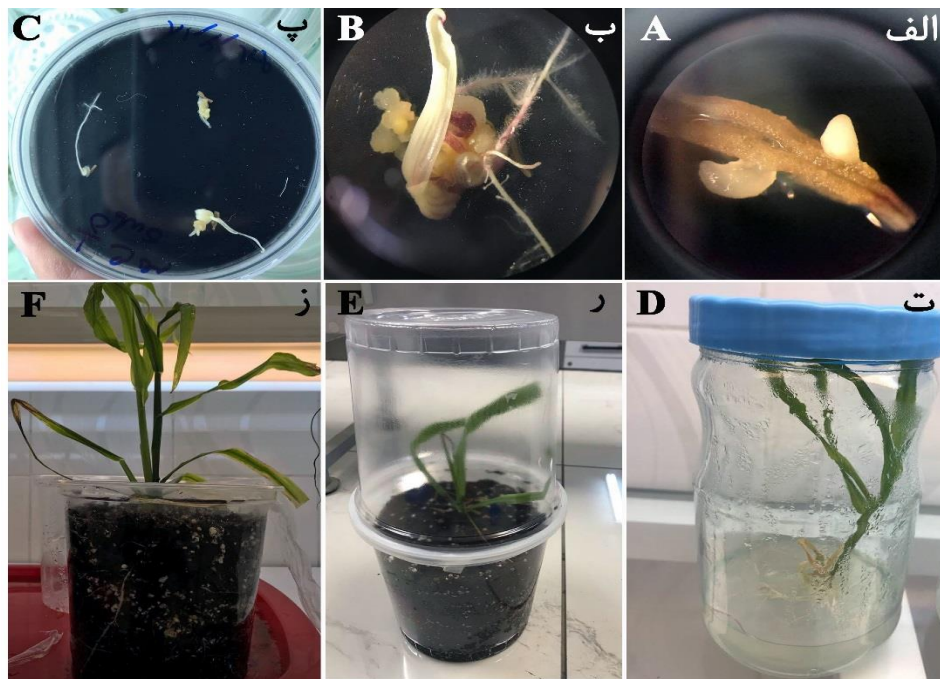
برنامه های اصلاحی در محصولات زراعی در ابتدا مرتبط با تنوع ژنتیکی بود. ولی واریانت های اپی ژنتیکی در محصولات زراعی ممکن است منبع دیگری برای اصلاح این محصولات فراهم کند. دستیابی به واریانت های اپی ژنتیکی دارای خصوصیات زراعی

بالقوه در چندین گونه گیاهی شامل سیب، برنج، هندوانه و گوجه‌فرنگی گزارش شده است. واریانتهای اپی ژنتیکی دارای خصوصیات مطلوب زراعی می‌توانند از طریق تیمارهای شیمیایی از جمله در معرض قرارگیری با ۵-آزاسیتیدین (مهارکننده متیلاسیون)، نیز حاصل شوند (Munsamy et al., 2013; Latutrie et al., 2019). در تطابق با نتایج تحقیق حاضر، بسیاری از محققین از بازدارنده‌های DNA متیل‌ترانسفراز جهت تیمار گیاهان با هدف به‌دست آوردن فنوتیپ‌های مختلف استفاده کرده‌اند (Fieldes and Amyot, 1999; Kondo et al., 2006; Kumpatla and Hall, 1998; Li et al., 2015; Tyunin et al., 2012; Wang et al., 2009). در پژوهشی، محققین نشان دادند که پیش‌تیمار بذور آراییدوبسیس با ۵۰ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین منجر به افزایش معنی‌داری در زمان گل‌دهی گیاهان و همچنین کاهش معنی‌دار صفاتی مانند ارتفاع گیاه، تعداد انشعابات (شاخه‌ها)، میزان زیست توده و تعداد میوه می‌گردد (Bossdorf et al., 2010). همچنین، در گندم استفاده از غلظت‌های پایین ۵-آزاسیتیدین، توانایی پنجه‌دهی را افزایش داد و صفات سنبه‌دهی، زمان گلدهی، وزن هزار دانه و شاخص‌های دیگر را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد (Chen and Wang, 2011). در تحقیق اخیر، غلظت‌های بالای ۵-آزاسیتیدین از رشد ریشه‌ها و گیاهچه‌های گندم جلوگیری کرد (Chen and Wang, 2011). در سال ۱۹۹۳ برن و همکاران (Burn et al., 1993) تیمارهای ۵-آزاسیتیدین را روی گیاه آراییدوبسیس اعمال کردند و به این نتیجه رسیدند که ۵-آزاسیتیدین می‌تواند جایگزین اثر درجه حرارت‌های پایین گردد و گلدهی زودهنگام را در گیاهان آراییدوبسیسی که نیاز به سرمادهی دارند، تحریک کند. به هر جهت، گیاهان آراییدوبسیس غیرحساس به سرمادهی به ماده ۵-آزاسیتیدین پاسخ ندادند که این نشان می‌دهد که سطوح کاهش یافته متیلاسیون می‌تواند به‌جای دمای پایین گلدهی گیاه را تحریک نماید. این اثر همچنین توسط روش‌های مشابهی در گونه‌های دیگر اثبات گردید (Kondo et al., 2006, 2007). در گیاه گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*)، نیز تیمار ۵-آزاسیتیدین منجر به تغییراتی در زمان گلدهی گردید (Li et al., 2016).

اثر پیش‌تیمار بذور ذرت با ۵-آزاسیتیدین روی میزان تولید رویان و گیاهچه در کشت بساک دو ژنوتیپ ذرت: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف ۵-آزاسیتیدین بر روی صفات میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بساک و همچنین میانگین تعداد گیاهچه باززایی شده به‌ازای هر بساک نشان داد که بین غلظت‌های مختلف ۵-آزاسیتیدین اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۱ درصد برای این دو صفت وجود دارد (جدول ۵). مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف ۵-آزاسیتیدین نشان داد که تیمار بذور ذرت با ۵ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین منجر به تشکیل بیشترین میانگین تعداد رویان (۰/۱۸۳۳) و گیاهچه به‌ازای هر بساک (۰/۰۶۷) در ژنوتیپ DH5 × DH7 در مقایسه با شاهد گردید (شکل ۲). در ژنوتیپ ETMH-82 چه در تیمارهای ۵-آزاسیتیدین و چه در تیمار شاهد هیچ‌گونه رویان و گیاهچه‌ای تشکیل نگردید که نشان می‌دهد القای آندروژنز در گیاه ذرت قبل از هر عاملی به‌شدت وابسته به ژنوتیپ است (Ismaili and Pour Mohammadi, 2016).

همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شد، تیمار با ۵ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین منجر به تشکیل بیشترین تعداد رویان و گیاهچه گردید در حالی که با افزایش غلظت ۵-آزاسیتیدین میزان تشکیل رویان و باززایی گیاهچه به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد (شکل ۲).

بالقوه در چندین گونه گیاهی شامل سیب، برنج، هندوانه و گوجه‌فرنگی گزارش شده است. واریانتهای اپی ژنتیکی دارای خصوصیات مطلوب زراعی می‌توانند از طریق تیمارهای شیمیایی از جمله در معرض قرارگیری با ۵-آزاسیتیدین (مهارکننده متیلاسیون)، نیز حاصل شوند (Munsamy et al., 2013; Latutrie et al., 2019). در تطابق با نتایج تحقیق حاضر، بسیاری از محققین از بازدارنده‌های DNA متیل‌ترانسفراز جهت تیمار گیاهان با هدف به‌دست آوردن فنوتیپ‌های مختلف استفاده کرده‌اند (Fieldes and Amyot, 1999; Kondo et al., 2006; Kumpatla and Hall, 1998; Li et al., 2015; Tyunin et al., 2012; Wang et al., 2009). در پژوهشی، محققین نشان دادند که پیش‌تیمار بذور آراییدوبسیس با ۵۰ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین منجر به افزایش معنی‌داری در زمان گل‌دهی گیاهان و همچنین کاهش معنی‌دار صفاتی مانند ارتفاع گیاه، تعداد انشعابات (شاخه‌ها)، میزان زیست توده و تعداد میوه می‌گردد (Bossdorf et al., 2010). همچنین، در گندم استفاده از غلظت‌های پایین ۵-آزاسیتیدین، توانایی پنجه‌دهی را افزایش داد و صفات سنبه‌دهی، زمان گلدهی، وزن هزار دانه و شاخص‌های دیگر را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد (Chen and Wang, 2011). در تحقیق اخیر، غلظت‌های بالای ۵-آزاسیتیدین از رشد ریشه‌ها و گیاهچه‌های گندم جلوگیری کرد (Chen and Wang, 2011). در سال ۱۹۹۳ برن و همکاران (Burn et al., 1993) تیمارهای ۵-آزاسیتیدین را روی گیاه آراییدوبسیس اعمال کردند و به این نتیجه رسیدند که ۵-آزاسیتیدین می‌تواند جایگزین اثر درجه حرارت‌های پایین گردد و گلدهی زودهنگام را در گیاهان آراییدوبسیسی که نیاز به سرمادهی دارند، تحریک کند. به هر جهت، گیاهان آراییدوبسیس غیرحساس به سرمادهی به ماده ۵-آزاسیتیدین پاسخ ندادند که این نشان می‌دهد که سطوح کاهش یافته متیلاسیون می‌تواند به‌جای دمای پایین گلدهی گیاه را تحریک نماید. این اثر همچنین توسط روش‌های مشابهی در گونه‌های دیگر اثبات گردید (Kondo et al., 2006, 2007). در گیاه گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*)، نیز تیمار ۵-آزاسیتیدین منجر به تغییراتی در زمان گلدهی گردید (Li et al., 2016).



شکل ۱- الف: تشکیل ساختار شبه جنینی در کشت بساک ذرت در محیط کشت YPm؛ ب و پ: تشکیل ریشه‌چه و کالوس؛ ت: باززایی گیاهچه از ساختارهای شبه جنینی در محیط MS بدون هورمون؛ ز: انتقال گیاهچه‌ها به گلدان‌های حاوی کوکوپیت و پرلیت در مرحله سازگاری؛ ز: گیاه هاپلوئید سازگار شده حاصل از کشت بساک ذرت

Figure 1. A: Formation of embryo-like structure in anther culture of maize in YPm culture medium; B and C: Root and callus formation; D: Plantlet regeneration from Embryo-Like Structures (ELs) in hormone-free MS medium; R: Transfer of plantlets to pots containing coco peat and perlite in the stage of adaptation and reduction of moisture; G: An acclimated haploid plant obtained from maize anther culture

2,4-D، باعث افزایش سطح متیلاسیون در کالوس‌ها گردید. با توجه به تحقیق سولیس و همکاران (Solís et al., 2015)، استفاده از غلظت‌های کم و کوتاه‌مدت تیمار ۵-آزاسیتیدین در مراحل اولیه کشت، عامل مهمی برای دستیابی به اثرات مثبت این ماده از نظر راندمان جنین‌زایی میکروسپور است. این محققین نشان دادند که استفاده از غلظت ۲/۵ میکرومول ۵-آزاسیتیدین به مدت چهار روز از زمان شروع کشت، یک تیمار مناسب برای القای فرآیند جنین‌زایی در کشت‌های میکروسپور دو گونه کلزا و جو می‌باشد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که با درک چگونگی تأثیر تغییرات متیلاسیون DNA بر سرنوشت رشد و نمو سلول‌ها در طول کشت‌های درون‌شیشه‌ای، می‌توان استراتژی‌های جدیدی را برای افزایش پتانسیل جنین‌زایی و افزایش خاصیت توتی‌پوتنسی در گونه‌های گیاهی و ژنوتیپ‌هایی با پاسخ سخت به فرایندهای کشت‌بافتی ایجاد کرد (Osorio-Montalvo et al., 2018).

افزایش اثرات سمی ۵-آزاسیتیدین با افزایش غلظت آن توسط بلچف و همکاران (Belchev et al., 2004) نیز گزارش شده است. این محققین نشان دادند که ۵-آزاسیتیدین باعث هیپومتیلاسیون DNA و مهار فعالیت آنزیم متیل‌ترانسفراز می‌شود و آن‌ها افزایش القای کالوس (بیش از ۳۸ درصد) و باززایی گیاه (بیش از ۵۰ درصد) از کشت بساک‌های گندم را در غلظت‌های خاص در محدوده پیکومولار و نانومولار گزارش کردند. در مطالعه دیگری، لی و همکاران (Li et al., 2001) اثرات ۵-آزاسیتیدین و اتینین را بر القای کالوس از کشت میکروسپورهای جو مورد مطالعه قرار داده و نشان دادند که تولید کالوس و جنین از میکروسپورهای پیش‌تیمار شده با غلظت‌های مختلف ۵-آزاسیتیدین به مدت ۳ روز نسبت به شاهد چندین برابر بیشتر بوده است. در مطالعه مونسامی و همکاران (Munsamy et al., 2013) مشخص گردید که ۵-آزاسیتیدین زنده‌مانی کالوس‌ها را در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کاهش داد ولی استفاده از هورمون 2,4-D در محیط تیمار منجر به کاهش اثرات سمی ۵-آزاسیتیدین گردید. همچنین وجود

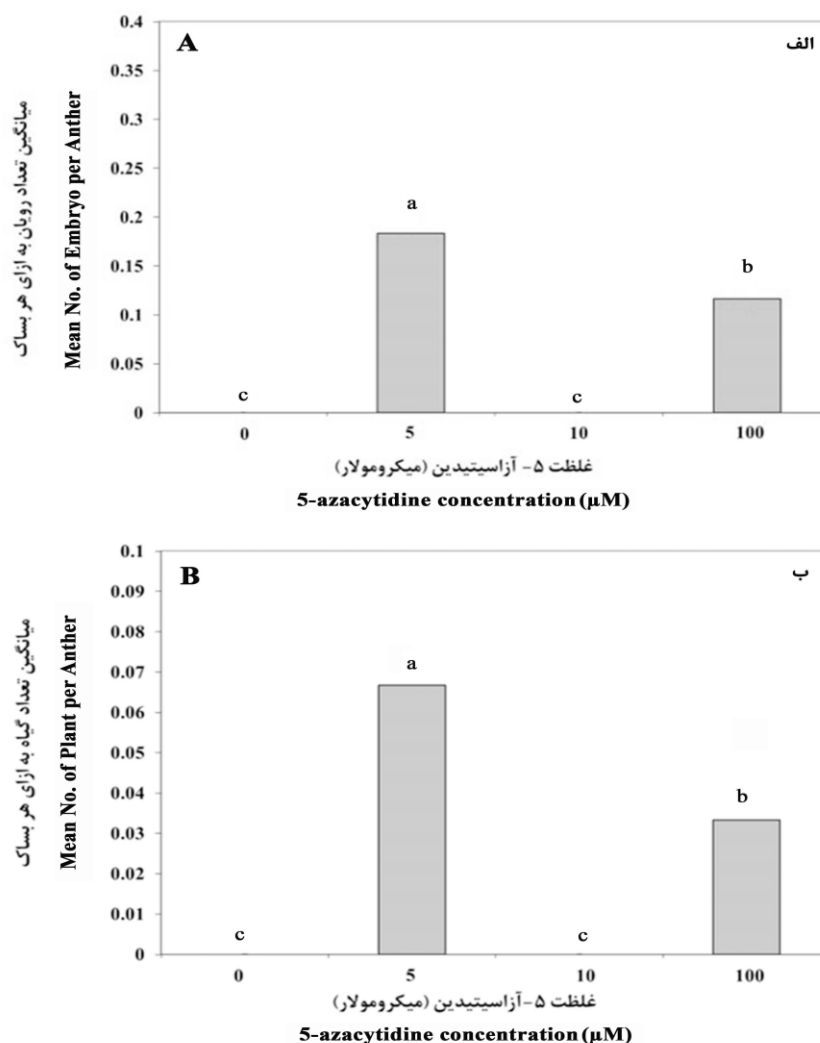
جدول ۵- تجزیه واریانس برای اثر ژنوتیپ و غلظت‌های مختلف ۵-آزاسیتیدین بر روی صفات میانگین تعداد رویان و میانگین تعداد گاه به‌ازای هر بوساک و بیان ژن DNA متیل ترانسفراز در دو مرحله رشدی ذرت

Table 5. Analysis of variance for effect of genotype and different concentrations of 5-azacytidine on mean number of embryos and mean number of plants per anther and expression of DNA methyltransferase gene in two growth stages of maize

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean of squares			
		ژنوتیپ DH5 × DH7 DH5 × DH7 genotype		ژنوتیپ ETMH-82 ETMH-82 genotype	
		میانگین تعداد رویان به‌ازای هر بوساک Mean no. of embryo per anther	میانگین تعداد گاه به بوساک Mean no. of plant per anther	مرحله کشت بوساک DNA methyltransferase gene expression at anther stage	مرحله ۷ تا ۸ برگ DNA methyltransferase gene expression at 7-8 leave stage
غلظت ۵-آزاسیتیدین 5-azacytidine concentration	3	0.024722 ^{**}	0.001398 ^{**}	149.43 ^{**}	388.32 ^{**}
خطای آزمایشی Error	8	0.000417	0.000479	4.81	1.50
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation (%)		27.22	3.02	14.58	8.87
					11.3
					408.5 ^{**}
					12.90

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

* and **: Significant at 5% and 1% levels of probability, respectively



شکل ۲- اثر غلظت‌های متفاوت ۵-آزاسیتیدین بر روی صفات آندروژنز در کشت بساک ذرت، ژنوتیپ DH5 × DH7

Figure 2. Effect of different concentration of 5- azacytidine on the androgenesis traits in anther culture of maize, genotype of DH5 × DH7

الف: میانگین تعداد رویان به ازای هر بساک؛ ب: میانگین تعداد گیاه باززایی شده به ازای هر بساک

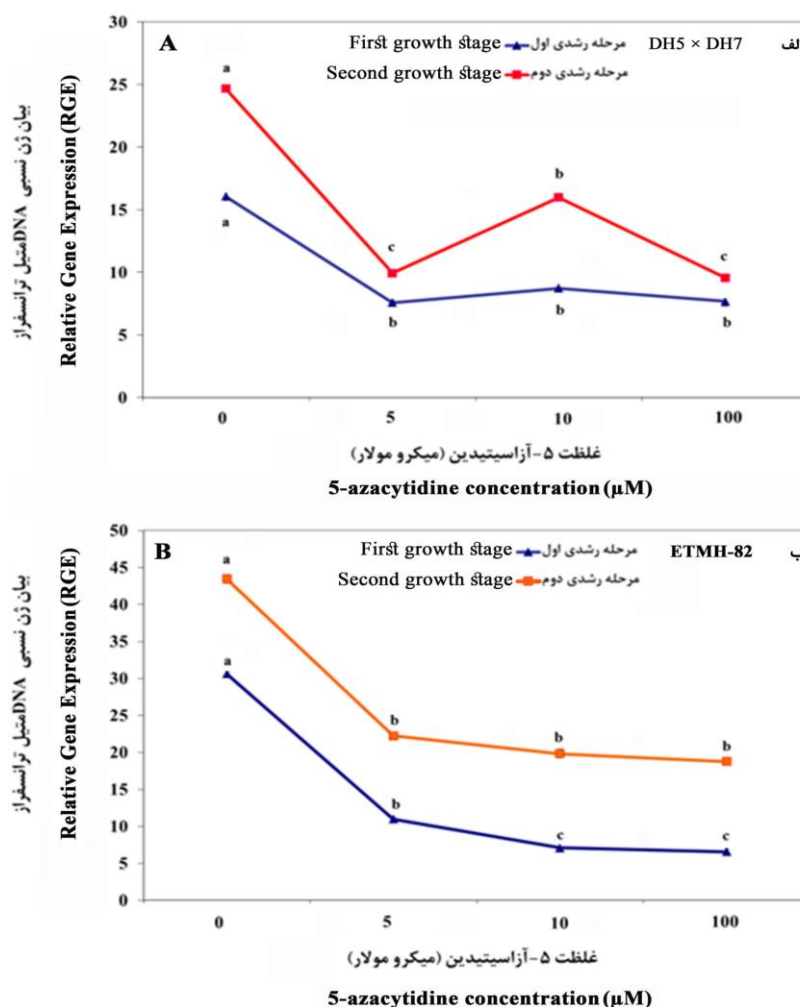
A: Mean number of embryos per anther; B: Mean number of regenerated plants per anther

DNA متیل ترانسفراز در هر دو ژنوتیپ تا حدود بسیار زیادی مشابه و به صورت کاهشی بود. میزان بیان نسبی ژن در تمامی غلظت‌های ۵-آزاسیتیدین در مرحله اول رشدی (۷ تا ۸ برگی) کمتر از مرحله دوم بود (شکل ۳ الف و ب). بیشترین میزان بیان ژن در تیمار شاهد مشاهده گردید و غلظت‌های مختلف ۵-آزاسیتیدین به طور مشابهی در هر دو ژنوتیپ کمترین بیان نسبی ژن را نشان دادند (شکل ۳ الف و ب)؛ بنابراین کاربرد ماده ۵-آزاسیتیدین به عنوان پیش تیمار بذور ذرت باعث کاهش معنی دار بیان نسبی ژن DNA متیل ترانسفراز گردید؛ که این کاهش بیان ژن DNA متیل ترانسفراز در ژنوتیپ DH5 × DH7 ممکن است منجر به بهبود القای آندروژنز به ویژه در غلظت ۵ میکرومولار شده

اثر پیش تیمار بذور دو ژنوتیپ ذرت با ۵-آزاسیتیدین روی میزان بیان ژن DNA متیل ترانسفراز در دو مرحله رشدی: تجزیه واریانس اثر پیش تیمار بذور ذرت با غلظت‌های مختلف ۵-آزاسیتیدین روی صفت بیان ژن DNA متیل ترانسفراز در دو مرحله رشدی ذرت (۷ تا ۸ برگی و مرحله برداشت گل‌های نر برای کشت بساک) برای دو ژنوتیپ ذرت مورد استفاده در این آزمایش به طور جداگانه انجام گردید. استفاده از غلظت‌های مختلف ۵-آزاسیتیدین در هر دو ژنوتیپ ذرت، اختلاف معنی داری در سطح ۱ درصد برای میزان بیان ژن DNA متیل ترانسفراز در هر دو مرحله رشدی نشان دادند (جدول ۵). همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود، روند تغییرات بیان ژن

همچنین محققین دیگر نشان دادند که تیمار کشت‌های میکروسپور کلزا با ماده ضد متیلاسیون هیستون (Bix 01294) باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن هیستون متیل ترانسفراز در میکروسپورهای جنین‌زا در مقایسه با میکروسپورهای غیرجنین‌زا گردید (Berenguer et al., 2017). همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که علی‌رغم کاهش معنی‌دار بیان ژن DNA متیل ترانسفراز در غلظت‌های مختلف ۵-آزاسیتیدین در مقایسه با شاهد، این کاهش بیان ژن در مراحل اولیه رشدی بیشتر بوده و با ادامه رشد گیاه این تغییر کاهشی در میزان متیلاسیون DNA کمی تعدیل شده است که نشانی از تغییر تنظیمات اپی‌ژنتیکی در طول رشد و نمو گیاه می‌باشد.

باشد در حالی‌که این کاهش بیان ژن DNA متیل ترانسفراز در ژنوتیپ ETHM-82 تأثیری بر القای آندروژنز نداشت که این نتایج نشان می‌دهند که علاوه بر عوامل اپی‌ژنتیکی، عوامل ژنتیکی و نوع ژنوتیپ در القای آندروژنز در کشت‌های بساک ذرت نقش مهمی دارند. در تطابق با نتایج تحقیق حاضر، کاربرد ۲/۵ میکرومولار ۵-آزاسیتیدین در کشت‌های میکروسپور کلزا و جو به‌طور معنی‌داری باعث افزایش القاء آندروژنز در میکروسپورهای کشت شده گردید که این بهبود در القای آندروژنز با کاهش معنی‌دار سطح متیلاسیون در این کشت‌ها همراه بود (Solís et al., 2015).



شکل ۳- اثر غلظت‌های متفاوت ۵-آزاسیتیدین بر روی بیان ژن DNA متیل ترانسفراز در دو ژنوتیپ ذرت در دو مرحله رشدی گیاه
Figure 3. Effect of different concentration of 5-azacytidine on DNA methyltransferase gene expression in two genotypes of maize, at two plant growth stages

مرحله رشدی اول: مرحله ۷-۸ برگ؛ مرحله رشدی دوم: مرحله ظهور تاسل‌ها؛ ژنوتیپ DH5 × DH7؛ ب: ژنوتیپ ETHM-82
First growth stage: 7-8 leaves; Second growth stage: emergence of tassels; A: DH5 × DH7 genotype; B: ETHM-82 genotype

به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تغییر در الگوی متیلاسیون DNA در گیاه ذرت با استفاده از ماده ۵-آزاسیتیدین می‌تواند نقش مهمی در کنترل صفات رشد و نمو و همچنین بهبود القاء آندروژنز در این گیاه داشته باشد که با مطالعات بیشتر روی این عوامل اپی‌ژنتیک و تغییر در سطوح این عوامل به‌طور مصنوعی می‌توان اقدام به تولید واریته‌های جدید ذرت با صفات بهبود یافته و همچنین بهبود فرآورده‌های کشت‌بافتی مورد استفاده در برنامه‌های به‌نژادی این گیاه از قبیل القاء آندروژنز و رویان‌زایی گامتی نمود.

References

- Aulinger, I.E.** (2002). Combination of in vitro androgenesis and biolistic transformation: an approach for breeding transgenic maize (*Zea mays* L.) lines. Ph.D.Thesis, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, Switzerland.
- Barloy, D. and Beckert, M.** (1993). Improvement of regeneration ability of androgenetic embryos by early anther transfer in maize. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **33**: 45-50.
- Baulcombe, D.C. and Dean, C.** (2014). Epigenetic regulation in plant responses to the environment. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **6**(9): a019471.
- Belchev, I., Tchorbadjieva, M. and Pantchev, I.** (2004). Effect of 5-azacytidine on callus induction and plant regeneration potential in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Bulgarian Journal Plant Physiology*, **30**(1-2): 45-50.
- Berenguer, E., Bárány, I., Solís, M.T., Pérez-Pérez, Y., Risueño, M.C. and Testillano, P.S.** (2017). Inhibition of histone H3K9 methylation by BIX-01294 promotes stress-induced microspore totipotency and enhances embryogenesis initiation. *Frontiers in Plant Science*, **8**: 1161.
- Biter, B.** (1997). *In vitro* haploid production in maize. Springer, Dordrecht, NT.
- Bossdorf, O., Arcuri, D., Richards, C.L. and Pigliucci, M.** (2010). Experimental alteration of DNA methylation affects the phenotypic plasticity of ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*. *Evolutionary Ecology*, **24**: 541-553.
- Burn, J.E., Bagnall, D.J., Metzger, J.D., Dennis, E.S. and Peacock, W.J.** (1993). DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**(1): 287-291.
- Chen, F. and Wang, Z.C.** (2011). Effects of 5-azaC on development and DNA methylation in wheat. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science)*, **41**(1): 61-66.
- Chuang, J.C. and Jones, P.A.** (2007). Epigenetics and microRNAs. *Pediatric Research*, **61**(7): 24-29.
- El-Tantawy, A.A., Solís, M.T., Costa, M.L., Coimbra, S., Risueño, M.C. and Testillano, P.S.** (2013). Arabinogalactan protein profiles and distribution patterns during microspore embryogenesis and pollen development in *Brassica napus*. *Plant Reproduction*, **26**(3): 231-243.
- Fieldes, M.A. and Amyot, L.M.** (1999). Epigenetic control of early flowering in flax lines induced by 5-azacytidine applied to germinating seed. *Journal of Heredity*, **90**(1): 199-206.
- Finnegan, E.J., Peacock, W.J. and Dennis, E.S.** (2000). DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Current Opinion in Genetics and Development*, **10**(2): 217-223.
- Friedman, S.** (1981). The inhibition of DNA (Cytosine-5) methylases by 5-azacytidine: the effect of azacytosine-containing DNA. *Molecular Pharmaceutics*, **19**: 314-20.
- Heo, J.B., Lee, Y.S. and Sung, S.** (2013). Epigenetic regulation by long noncoding RNAs in plants. *Chromosome Research*, **21**(6-7): 685-693.
- Ismaili, A. and Pour Mohammadi, P.** (2016). Effect of genotype, induction medium, carbohydrate source, and polyethylene glycol on embryogenesis in maize (*Zea mays* L.) anther culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, **38**(3): 1-8.
- Kawakatsu, T., Nery, J.R., Castanon, R. and Ecker, J.R.** (2017). Dynamic DNA methylation reconfiguration during seed development and germination. *Genome Biology*, **18**: 171.
- Kohler, C. and Villar, C.B.** (2008). Programming of gene expression by Polycomb group proteins. *Trends in Cell Biology*, **18**(5): 236-243.
- Kondo, H., Miura, T., Wada, K.C. and Takeno, K.** (2007). Induction of flowering by 5-azacytidine in some plant species: Relationship between the stability of photoperiodically induced flowering and flower-inducing effect of DNAdemethylation. *Physiologia Plantarum*, **131**(3): 462-469.

- Kondo, H., Ozaki, H., Itoh, K., Kato, A. and Takeno, K.** (2006). Flowering induced by 5-azacytidine, a DNA demethylating reagent in a short-day plant, *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Physiologia Plantarum*, **127**(1): 130-137.
- Kumapatla, S.P. and Hall, T.C.** (1998). Longevity of 5-azacytidine-mediated gene expression and re-establishment of silencing in transgenic rice. *Plant Molecular Biology*, **38**(6): 1113-1122.
- Latutrie, M., Gourcilleau, D. and Pujol, B.** (2019). Epigenetic variation for agronomic improvement: an opportunity for vegetatively propagated crops. *American Journal of Botany*, **106**(10): 1281.
- Li, S.F., Zhang, G.J., Yuan, J.H., Deng, C.L., Lu, L.D. and Gao, W.J.** (2015). Effect of 5-azaC on the growth, flowering time and sexual phenotype of spinach. *Russian Journal of Plant Physiology*, **62**(5): 670-675.
- Li, W.Z., Song, Z.H., Guo, B.T. and Xu, L.J.** (2001). The effects of DNA hypomethylating drugs on androgenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **37**(5): 605-608.
- Li, Z.A., Li, J., Zhu, Q.Q., Liu, Y.H. and Wang, Z.C.** (2017). Effect of extremal 5-azaC on physiology and DNA methylation and gene-expression of Chrysanthemum. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science)*, **47**(2): 162-169.
- Meijón, M., Feito, I., Valledor, L., Rodríguez, R. and Cañal, M.J.** (2010). Dynamics of DNA methylation and histone H4 acetylation during floral bud differentiation in azalea. *BMC Plant Biology*, **10**(1): 1-14.
- Munsamy, A., Rutherford, R.S., Snyman, S. and Watt, M.P.** (2013). 5-Azacytidine as a tool to induce somaclonal variants with useful traits in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plant Biotechnology Reports*, **7**(4): 489-502.
- Nageli, M., Schmid, J.E., Stamp, P. and Biter, B.** (1999). Improved formation of regenerable callus in isolated microspore culture of maize: impact of carbohydrates, plating density and time of transfer. *Plant Cell Reports*, **19**(2): 177-184.
- Qian, Y., Xi, Y., Cheng, B. and Zhu, S.** (2014). Genome-wide identification and expression profiling of DNA methyltransferase gene family in maize. *Plant Cell Reports*, **33**(10): 1661-1672.
- Osorio-Montalvo, P., Sáenz-Carbonell, L. and De-la-Peña, C.** (2018). 5-azacytidine: a promoter of epigenetic changes in the quest to improve plant somatic embryogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**(10): 3182.
- Pecinka, A. and Liu, C.H.** (2014). Drugs for plant chromosome and chromatin research. *Cytogenetic and Genome Research*, **143**(1-3): 51-59.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L.** (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, **30**(9): e36.
- Shugar, L.** (1998). *Application of Doubled-Haploid Systems*. Hyland seeds, W.G. Thomson and Sons Limited-Narin, Ontario, CA.
- Solís, M.T., El-Tantawy, A.A., Cano, V., Risueño, M.C. and Testillano, P.S.** (2015). 5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley. *Frontiers in Plant Science*, **6**: 472.
- Tatra, G.S., Miranda, J., Chinnappa, C.C. and Reid, D.M.** (2000). Effect of light quality and 5-azacytidine on genomic methylation and stem elongation in two ecotypes of *Stellaria longipes*. *Physiologia Plantarum*, **109**(3): 313-321.
- Testillano, P.S., Solís, M.T. and Risueño, M.C.** (2013). The 5-Methyl-Deoxy-Cytidine (5mdc) localization to reveal in situ the dynamics of DNA methylation chromatin pattern in a variety of plant organ and tissue cells during development. *Physiologia Plantarum*, **149**: 104-113.
- Teyssier, C., Maury, S., Beaufour, M., Grondin, C., Delaunay, A. and Le Mette, C.** (2014). In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix X Eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analyses. *Physiologia Plantarum*, **150**: 271-291.
- Touraev, A., Brian, P. and Mohan, S.** (2009). *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer Science, Dordrecht, NT.
- Tyunin, A.P., Kiselev, K.V. and Zhuravlev, Y.N.** (2012). Effects of 5-azacytidine induced DNA demethylation on methyltransferase gene expression and resveratrol production in cell cultures of *Vitis amurensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **111**(1): 91-100.
- Wang, Z.C., Nie, L.J. and He, Y.X.** (2009). The effect of 5-azacytidine to the DNA methylation and morphogenesis character of Chrysanthemum during In vitro growth. *Acta Horticulturae Sinica*, **36**(12): 1783-1790.
- Zhu, Q.Q.** (2014). Effect of 5-azaC on DNA methylation and gene-expression of chrysanthemum. Master Thesis. Henan University, Kaifeng, Henan, China.

Study of the Effect of 5-Azacytidine as a DNA Demethylating Agent on Agronomic Traits, Androgenesis Induction via Anther Culture and DNA-Methyltransferase Gene Expression in Maize (*Zea mays* L.) Leaf Tissue

Razieh Azizian Mosleh¹, Mohammad Reza Abdollahi^{2,*}, Payam Pour Mohammadi³, Hassan Sarikhani⁴ and Asghar Mirzaie-Asl⁵

1-Ph.D. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

2-Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetic, Faculty of Agriculture, University of Agriculture and Natural Resources, Ahvaz, Iran

4- Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

5-Associate Professor, Department of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

(Received: December 22, 2020 – Accepted: March 7, 2021)

Abstract

Optimization of *in vitro* methods for the production of maize double haploids plays an important role in the breeding programs of this plant. In this study, the effects of 5-azacytidine on agronomic traits, androgenesis induction efficiency and also, DNA methyltransferase gene expression (AF229183.1) in two growth stages of maize were investigated. This experiment was performed as factorial based on a completely randomized block design with three replications. Two maize genotypes (DH5 × DH7 and ETMH-82) were considered as the first factor and treatment of maize seeds with 5-azacytidine (0, 5, 10, and 100 µM) was considered as the second factor. The maize seeds were sowed in the field and during the growth stages, various morphological and agronomic traits were recorded. In the anther culture experiment, the suitable anthers containing microspores at mid to late-uninucleate stages were selected and cultured in an YPm culture medium containing 1 mg/l 2, 4-D, and 2 mg/l BAP. Interaction effects of genotype and 5-azacytidine concentrations showed significant differences for the majority of studied traits except for number of kernel per ear row, kernel depth, plant diameter, number of leaves and number of ears. The highest amounts of 1000-kernel weight were obtained with treatments of 10 and 100 µM and the highest ones for grain yield and biological yield traits were obtained with 100 µM 5-azacytidine treatment for both genotypes. Seeds of DH5 × DH7 genotype treated with 5 µM 5-azacytidine produced the highest mean number of embryo-like structures (0.1833) and regenerated plantlets (0.067) per each anther. Relative expression of DNA methyltransferase gene in maize seeds treated with different concentrations of 5-azacytidine showed a significant decrease in both genotypes and both growth stages compared to control plants (treated with 0 µM 5-azacytidine), that this decrease in gene expression could lead to improved androgenesis induction in anther culture of DH5 × DH7 genotype. However, despite the decrease in expression of this gene in two growth stages of ETMH-82 genotype, androgenesis induction was not observed in this genotype. The results of the present study can help to determine the role of epigenetic factors in androgenesis induction and improving the production of haploid plants in maize.

Keywords: Androgenesis, 5-Azacytidine, DNA methyltransferase, Maize, Anther culture, Haploid plant

* Corresponding Author, E-mail: m.abdollahi@basu.ac.ir