

القاء ساختارهای شبه جنینی در کشت بساک ژنوتیپ‌های ذرت (*Zea mays L.*)

- سعید خاوری خراسانی، دانشجوی دکتری اصلاح نباتات دانشگاه تربیت مدرس
- پیام پورمحمدی، دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه تربیت مدرس
- احمد معینی، استادیار گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
- امیر موسوی، استادیار پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
- قاسم کریم زاده، استادیار گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
- مختار جلالی، استادیار گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: خرداد ماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: مهرماه ۱۳۸۴

E. mail: khavaris80@yahoo.com

چکیده

تولید گیاهان هاپلوئید برای استفاده در برنامه‌های به نژادی و تحقیقات بنیادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بدین منظور در این پژوهش تعداد ۴۳ ژنوتیپ ذرت از ژرم پلاسما موجود در مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر، شامل لاین‌های اینبرد، هیبریدهای سینگل کراس و تری وی کراس از گروه‌های مختلف رسیدگی از نظر پاسخ به کشت بساک مورد ارزیابی قرار گرفتند. کشت بساک، در مرحله تک هسته‌ای انتهایی میکروسپیورها و در محیط کشت‌های CI، YP، YPM، N۶، IMSS، SCY۰۹ و TWC۶۰۵، LA۱۲، KY۴/۱، S۶۱، A۱۸۸، DH۵×DH۷، TH-MA۲ از ژنوتیپ‌های ۴ تا ۶ هفته پس از کشت، آغاز گردید. همچنین در برخی ژنوتیپ‌ها کالوس زایی مشاهده گردید. میزان فراوانی تولید ساختارهای شبه جنینی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی از صفر تا ۱۷/۶٪ متغیر بود که ژنوتیپ‌های DH۵×DH۷، ETH-MA۲ و S۶۱ به ترتیب با میانگین ۱۷/۶، ۸/۵ و ۲ بیشترین ساختارهای شبه جنینی را در ۱۰۰ بساک کشت شده به خود اختصاص دادند. با توجه به شناسایی قابلیت نرزاری در برخی از ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌توان با تلاقی بین ژنوتیپ‌های دارای قابلیت نرزاری و ژنوتیپ‌های غیر پاسخ دهنده صفت نرزاری را منتقل نمود و از این طریق روند اصلاح و معرفی هیبریدهای جدید ذرت را تسریع نمود.

کلمات کلیدی: آندروژنز، کشت بساک، جنین زایی، ذرت (*Zea mays L.*)

Pajouhesh & Sazandegi No:67 pp: 17-24

Induction of embryo-like structures in maize (*Zea mays L.*) genotypes via anther culture

By: Khavari Khorasani, S., Poormohamadi, P., Moieni, Ph.D. and M.Sc. Student and Assistant Prof., respectively of Plant Breeding, Tarbiat Modares University. A., Mousavi, A., Karimzadeh, G., an Professor and Researcher of national Research of Genetic Engineering and Biotechnology.

In this study, in order to produce haploid plants for using in breeding programs and basic researches, 43 genotypes of maize (*Zea mays L.*) collected from the Iranian Maize Germplasm of Plant and Seed Research Improvement Institute,

consisting of inbred lines, single and three-way cross hybrids were evaluated for their androgenetic response, using anther culture technique. Anthers having microspores at late-uninucleate of developmental stage were inoculated on different solid, semi-solid and liquid media of IMSS, N6, YP, YPm and CI and were incubated in darkness for 4-6 weeks at 27°C. Embryo-Like Structures (ELs) were obtained from genotypes DH5×DH7, ETH-M82, TWC605, SC709, A188, S61, K74/1 and LA12 (sweet corn). Some of which produced calli. The frequency of ELs in the responsive genotypes varied from 0 to 12.6% ; the genotypes DH5×DH7, ETH-M82 and S61 showed the highest response with 12.6, 4.5 and 2 ELs respectively at 100 cultured anthers. Potential of androgenic responses that identified in some of genotypes in this research is useful for breeding maize programmes .

Key words: Androgenesis, Anther culture, Embryogenesis, Maize (*Zea mays* L.)

مقدمه

امروزه، تلفیق روش‌های کلاسیک به نژادی با بیوتکنولوژی گیاهی موجب کوتاه تر شدن دوره اصلاحی، کاهش هزینه‌ها، حجم کار و نیز افزایش راندمان گردیده است. در این راستا تولید گیاهان هاپلوئید از طریق کشت بافت برای استفاده در برنامه‌های به نژادی و تحقیقات ژنتیکی بنیادی در گیاهان عالی از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (۱۹). همچنین، تولید گیاهان تراریخت از طریق بافت‌های هاپلوئید یکی از اهداف با ارزش در مهندسی ژنتیک به‌شمار می‌آید، زیرا پس از انتقال ژن به بافت هاپلوئید و مضاعف کردن کروموزوم‌های آن، می‌توان گیاهان تراریخت کاملاً هموزیگوت برای ژن انتقال یافته را بازرایی کرد و در صورت استفاده از میکروسپورها به‌عنوان بافت هدف، می‌توان به گیاهان تراریخت غیر شایع دست یافت (۷، ۹). روش‌های متعددی جهت تولید گیاهان هاپلوئید و به دنبال آن گیاهان هاپلوئید مضاعف وجود دارد که یکی از این روش‌ها نرزاری^۱ می‌باشد که به دو روش، کشت بساک^۲ و کشت میکروسپور^۳ انجام می‌شود. تاکنون محققین از طریق هاپلوئیدهای مضاعف شده توانسته‌اند ارقام جدیدی از غلات به‌ویژه گندم، جو، ذرت و برنج را اصلاح و معرفی کنند (۲۲).

برای اولین بار تولید ساختارهای شبه جنینی^۴ از طریق کشت بساک ذرت در سال ۱۹۷۴ توسط چینی‌ها گزارش شد (۱۱)، لیکن پیشرفت در کشت بساک ذرت به دلایل وابستگی شدید به ژنوتیپ، فراوانی کم شبه جنین‌های تولید شده، راندمان پایین بازرایی گیاه و خودگشتی ناموفق به منظور تولید بذر، روند کندی داشته است (۲). شایان ذکر است که شبه جنین‌ها ساختارهایی با سطح صاف، هموار و براق هستند، در حالی که کالوس‌ها توده‌های سلولی سازمان نیافته با سطح ناهموار و معمولاً کدر هستند (۲۳). عوامل مختلفی از قبیل ژنوتیپ، شرایط رشد گیاه مادری، مرحله نمو میکروسپورها (مرحله تک هسته‌ای انتهایی تا اوایل دو هسته‌ای در ذرت)، رژیم نوری، روش جداسازی میکروسپورها و محیط کشت القای ساختارهای جنینی و شبه جنینی را در کشت بساک و میکروسپورهای ایزوله شده ذرت تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۲). با اینکه تولید درون شیشه‌ای هاپلوئیدها و هاپلوئیدهای مضاعف شده در بسیاری از گیاهان زراعی انجام شده است، ولی تولید هاپلوئیدها از طریق کشت بساک و میکروسپورهای ذرت و کاربرد آنها به دلیل وابستگی شدید آن به ژنوتیپ (۲، ۶، ۸) و میزان عکس العمل پایین آن (۱۱، ۱۲، ۲۰) محدود شده است. به عنوان مثال در تحقیقی از ۱۵۹ ژنوتیپ کشت شده فقط ۹ ژنوتیپ به کشت بساک پاسخ دادند. به علاوه، با استفاده از ژنوتیپ‌های برگزیده و بهبود محیط کشت بساک‌ها، بیشترین پاسخ به جنین زایی فقط ۷٪ بوده است (۱۱).

هدف این تحقیق، تعیین پاسخ به جنین زایی در کشت بساک برخی از ژنوتیپ‌های ذرت موجود در کشور به منظور تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف شده می‌باشد تا به عنوان یک روش مکمل بتوان از طریق تولید لاین‌های اینبرد کاملاً هموزیگوس برنامه اصلاح و معرفی هیبریدهای ذرت با عملکرد بالا و صفات برتر را تسریع نمود و همچنین از این ویژگی در مطالعات بنیادی و نیز تولید گیاهان تراریخت بهره گرفت. این گزارش اولین تحقیق انجام شده بر روی کشت بساک ژنوتیپ‌های ذرت در ایران می‌باشد که با موفقیت همراه بوده است.

گردیدند (۲۰، ۲۳). گل‌های تاجی برداشت شده در داخل دستمال کاغذی مرطوب و سپس ورق آلومینیومی قرار گرفته و جهت شوک سرمایی به مدت ۱۴ روز در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مرحله نموی دقیق میکروسپورها قبل از کشت بساک، به روش اسکواش^۵ و از طریق رنگ آمیزی با استوکارمن^۶ ۲٪ تعیین گردید. نمو میکروسپورها در داخل گل تاجی ذرت یکنواخت نمی‌باشد، لذا تعیین مرحله نموی جهت کشت بساک‌های (۱۰، ۱۴) جدا شده حائز اهمیت فراوانی است، شکل ۱ مرحله نموی تک‌هسته‌ای انتهایی، که طبق نظر اکثر محققین برای کشت بساک‌های جدا شده ذرت مناسب می‌باشد را نشان می‌دهد. ضد عفونی سنبله‌ها، با استفاده از محلول سدیم هیپوکلریت ۱/۵٪ (v/v) به مدت ۱۵

مواد و روش‌ها

در این آزمایش، ۴۳ ژنوتیپ ذرت (جدول شماره ۱) به عنوان مواد گیاهی در طی سال زراعی ۱۳۸۲ و ۱۳۸۳ از نظر عکس العمل به کشت بساک و تولید ساختارهای شبه جنینی بررسی شدند ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این تحقیق شامل طیف وسیعی از ژرم پلاسما مورد استفاده از نظر تجاری بودند. شایان ذکر است که ژنوتیپ‌های BC۲۸۸، BC۱۸۲، BC۳۸۵، OSSK۴۴۴ و OSSK۴۹۹ هیبریدهای تجاری زودرس و میان رس از ژرم پلاسما کشور مجارستان می‌باشند. بذور ETH-MY۲، ETH-MA۲، ETH-M۲۴ از طریق Aulinger در موسسه ETH زوریخ سوئیس و DH۵×DH۷ از طریق Beckert در موسسه

جدول شماره ۱: اسامی ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی در کشت بساک ذرت

A۱۸۸	LA۱۲	OSSK۴۹۹	OH۴۳/۱-۴۲	SC۷۰۱	S۶۱	K۹۶۵۳/۲	TWC۶۰۳
K۱۹	KSC۳۰۱	KE۷۲۰۱۲/۱۲	KSC۷۰۴	KSC۳۰۲	SC۷۰۹	K۱۲۶۳/۱	TWC۶۰۵
KSC۶۴۷	K۲۳۳۱	K۱۹×S۶۱	ETH-M۸۲	SC۷۰۳	BC۳۸۵	K۳۶۴۰/۸	TWC۶۴۷
BC۱۸۲	K۲۸۱۶	DH۵×DH۷	ETH-M۷۲	KSC۵۰۰	B۷۳	K۷۴/۱	TWC۹۲۶
ETH-M۲۴	BC۲۸۸	OSSK۴۴۴	KSC۶۰۴	KSC۱۰۸	S۶۱×MO۱۷	KSC۷۰۰	TWC۶۰۰
KSC۴۰۳	KSC۷۲۰	MO۱۷					



شکل ۱: مرحله تک هسته ای انتهایی میکروسپور ذرت (رنگ آمیزی با استوکارمن ۲٪)
طول خط ۵۰ μm است .

INRA فرانسه دریافت گردید. همچنین اینبرد لاین A۱۸۸ از طریق Van Lammerene در کشور هلند تهیه شد (لازم به توضیح است که اینبرد لاین مذکور یک لاین غیر تجاری با آندوسپرم سفید بوده و معمولاً در تحقیقات کشت بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد). منشأ لاین‌های MO۱۷، B۷۳ و هیبرید KSC۷۰۴ از کشور یوگوسلاوی و بقیه لاین‌های مورد استفاده در این پژوهش (جدول ۱) مواد ژنتیکی ارسالی از مرکز تحقیقات بین‌المللی گندم و ذرت (سیمیت مکزیک) می‌باشند که از طریق برنامه‌های اصلاحی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کشور استخراج و برخی از آنها در ترکیب هیبریدهای سینگل کراس و تری وی کراس مورد استفاده قرار گرفته است.

گیاهان مادری در دو شرایط مزرعه و اتاق رشد کشت شدند. در اتاق رشد شرایط دمای $1 \pm 25/18^{\circ}\text{C}$ (شب/روز) با دوره نوری ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/نور) (۱۵، ۱۶) برای رشد گیاهان مادری فراهم گردید. نور اتاق رشد توسط لامپ‌های ۴۰۰ وات بخار سدیم ($400 - 350 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) تامین شد و رطوبت نسبی اتاق رشد ۷۰٪ بود. بذور هر ژنوتیپ در اتاق رشد، حداقل در ۵ گلدان به قطر ۲۰ و عمق ۲۸ سانتی‌متر کشت شدند. ترکیب بستر بذور شامل خاک، ماسه و کود دامی پوسیده با نسبت ۱:۱:۱ بود. گل‌های تاجی در مرحله قبل از خروج از غلاف برگ پرچم برداشت

۲-ج و ۲-د). در شرایطی که این ساختارهای شبه جنینی از یک میکروسیور منشأ گرفته باشند اغلب نمی‌توانند به خوبی رشد و نمو نمایند و رشد آنها در مرحله کروی شکل^۱ و یا حتی در مرحله تولید کالوس متوقف شد (شکل ۲-ه). Barloy و همکاران معتقدند که عدم امکان رشد جنین‌های چند تایی می‌تواند به عنوان نتیجه اثرات رقابتی برای مواد درون بساک تفسیر و توجیه شود (۳). به علاوه، در تحقیقی که Wan و Widholm (۲۳) بر روی تشکیل ساختارهای شبه جنینی چندگانه از یک میکروسیور در کشت بساک ذرت انجام دادند، نتیجه گرفتند که در حالات معینی، یک میکروسیور می‌تواند استعداد تشکیل بیش از یک ساختار شبه جنینی را داشته باشد. در این تحقیق، نیز تشکیل دو ساختار شبه جنینی که از ناحیه قاعده به هم چسبیده بودند در کشت بساک ژنوتیپ DH5 × DHV مشاهده گردید (شکل ۲-ه).

نتایج تحقیقات قبلی نشان داده که بساک‌هایی با عکس‌العمل ضعیف‌تر (تشکیل یک ساختار شبه جنینی در هر بساک) اندام زایی بیشتری دارند. این شبه جنین‌ها تولید ریشه نموده و اغلب دو قطبی^۱ (دارای مریستم ریشه و ساقه) هستند (۲). اگرچه هدف نهایی کشت بساک، باززایی گیاه است، اما ترجیح داده می‌شود که روش‌هایی برای افزایش تعداد بساک‌های جنین زا جستجو شود تا اینکه تعداد جنین بیشتری از هر بساک تولید شود (۳). در این رابطه، ون و ویدلهم (۱۹۹۲) گزارش نمودند که یک میکروسیور قابلیت دارد تا ۴ ساختار شبه جنینی تولید نماید. بالطبع دو عنصر کمیت و کیفیت معمولاً در تضاد با هم هستند. تولید زیاد ساختارهای شبه جنینی به نظر نمی‌رسد که با عملکرد خوب باززایی گیاه همبستگی داشته باشد (۳). به علاوه Barloy و Beckert تعادل بین مواد غذایی، تبادل گازی بین ساختارهای آندروژنیک و محیط کشت را عامل بسیار تعیین‌کننده‌ای می‌دانند (۲). در این پژوهش میانگین بالاتر تولید ساختارهای شبه جنینی در ژنوتیپ DH5 × DHV با استفاده از محیط کشت مایع IML و سپس محیط کشت نیمه جامد IMSs (۱۷/۶٪) نسبت به محیط کشت جامد YPm (۸٪)، می‌تواند متأثر از ترکیب متفاوت محیط کشت آنها باشد. وجود کلشیسین در محیط کشت مایع IML (به میزان ۲۵۰ mgL⁻¹ به مدت یک هفته) طبق نظر برخی محققین می‌تواند تأثیر مثبت و قابل توجهی در بهبود جنین زایی و باززایی گیاه داشته باشد (۲۳، ۲۲). Barnabas و obert معتقدند که کلشیسین به تنهایی می‌تواند عاملی باشد که جنین‌زایی را در کشت بساک ذرت تحریک یا آغاز نماید (۱۷).

شکل ۲-الف، تولید ساختار شبه جنینی از بساک این برد لاین S61 را که یک لاین تجاری زودرس ذرت در کشور می‌باشد، ۴ هفته بعد از کشت بساک‌ها بر روی محیط‌های کشت IML و سپس IMSs نشان می‌دهد. تولید ساختار شبه جنینی از بساک ژنوتیپ ETH-M82 را سه هفته بعد از کشت بساک‌ها بر روی محیط‌های کشت IML و سپس IMSs در شکل ۲-ب نشان داده شده است و شکل ۲-ز باززایی همان ساختار شبه جنینی را ۶ هفته بعد از کشت در محیط RM نشان می‌دهد. شایان ذکر است که برخی از ساختارهای شبه جنینی پس از انتقال به محیط باززایی تنها تولید ریشه می‌کنند (شکل ۲-ز) که بالطبع امکان باززایی گیاه از آنها وجود ندارد. همچنین تولید چند نمونه گیاهچه در محیط باززایی در شکل ۲-ح نشان داده شده است. شایان ذکر است با اینکه در این تحقیق هدف اصلی بیشتر تولید جنین‌های گامتی با فراوانی بالا از طریق کشت بساک ذرت بوده است،

دقیقه و سپس سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. پس از انجام ضدعفونی، بساک‌ها از گلچه‌ها جدا شده و ۲۵ بساک در هر پتری دیش یک‌بار مصرف با قطر ۵۵ میلی‌متر و حاوی ۸ میلی‌لیتر محیط، کشت شدند و سپس در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار داده شدند. در این پژوهش از ۵ محیط کشت بساک شامل (IMSS، YP، YPm تغییر یافته)، N6 و CI استفاده شد. محیط‌های کشت YP، N6 و YPm جامد، محیط کشت IMSs نیمه جامد و محیط کشت CI^۲ مایع بود. لازم به ذکر است که بساک‌ها قبل از کشت در محیط نیمه جامد IMSs به مدت یک هفته در محیط کشت IML در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد پیش‌تیمار شدند (۲۱). محیط کشت IMSs شامل ترکیبات محیط کشت IML می‌باشد، با این تفاوت که کلشیسین در این محیط حذف و ۱۵۰۰ mgL⁻¹ فیتاژل به آن اضافه شده است. محیط کشت RM (۱۳، ۲۱) برای باززایی گیاهان هاپلوئید مورد استفاده قرار گرفت. ترکیبات محیط‌های کشت استفاده شده، در جدول شماره ۲ آورده شده است. pH کلیه محیط‌های کشت با استفاده از KOH یک نرمال روی ۵/۸ تنظیم شد. میزان عکس‌العمل ژنوتیپ‌ها از طریق شمارش تعداد ساختارهای شبه جنینی در ۱۰۰ بساک کشت شده از هر ژنوتیپ، تعیین گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصله از بررسی عکس‌العمل آندروژنیک ژنوتیپ‌های مختلف ذرت به کشت بساک در جدول (۳) آمده است. در این بررسی از بین ۴۳ ژنوتیپ مورد بررسی، تنها ۸ ژنوتیپ (۱۸/۶٪ از ژنوتیپ‌ها) شامل ETH-M82، DH5 × DHV، A188، S61، KY4/1، LA12 (ذرت شیرین)، SCV09 و TWC605، عکس‌العمل مثبت نشان دادند. از طرفی فقط ژنوتیپ DH5 × DHV یعنی ۲/۶٪ از ژنوتیپ‌ها عکس‌العمل خوب نشان دادند. Buter در مقایسه واکنش آندروژنیک گیاهان جو، گندم و ذرت نشان داد که در ذرت از بین ۴۰ و ۵۵ ژنوتیپ مورد بررسی به ترتیب فقط ۳ و ۴ ژنوتیپ عکس‌العمل خوبی را به کشت بساک و میکروسیور نشان دادند. منظور از عکس‌العمل خوب تشکیل حداقل ۱۰ ساختار شبه جنینی در کشت ۱۰۰ بساک می‌باشد، در صورتی که در جو ۱۰۰٪ و در گندم بیش از ۷۷٪ ژنوتیپ‌های مورد بررسی به کشت بساک عکس‌العمل مناسب نشان دادند (۴).

در تحقیق Jones و Petolino بر روی کشت بساک ۲۷ ژنوتیپ ذرت، ۱۷ ژنوتیپ مورد بررسی به کشت بساک پاسخ مثبت دادند، به طوری که فراوانی تولید جنین فقط در ۹ ژنوتیپ مورد بررسی حدود ۱٪ بود و لاین‌های Pa91، FR16، H99، و نیز هیبرید Pa91 × (FR16 × H99) به‌عنوان بهترین ژنوتیپ‌ها معرفی شدند (۱۸).

میانگین تولید ساختارهای شبه جنینی در هیبرید DH5 × DHV، در این تحقیق، ۱۷/۶٪ بود (جدول ۳). میانگین تولید ساختارهای شبه جنینی در ژنوتیپ مذکور در آزمایشات محققین قبلی از ۱/۶٪ تا ۳/۶٪ (۲) و ۴/۹٪ (۳) متغیر می‌باشد. شکل‌های ۲-الف، ۲-ب، ۲-ج و ۲-د نمونه‌هایی از تولید ساختارهای شبه جنینی را در کشت بساک ژنوتیپ‌های ذرت در این تحقیق نشان می‌دهد. شایان ذکر است که برخی از بساک‌های پاسخ دهنده در این ژنوتیپ بیش از یک ساختار شبه جنینی تشکیل دادند (شکل

جدول شماره ۲: ترکیب محیط‌های کشت مورد استفاده در بررسی کشت بساک ژنوتیپ‌های ذرت

Components	IML	IMSS	YP	YPM	N ^۶	CI	RM	
Kno _۳	۲۵۰۰	۲۵۰۰	۲۵۰۰	۲۵۰۰	۲۸۳۰	۲۸۳۰	۲۵۰۰	mgL ^{-۱}
(NH _۴) _۲ SO _۴	-	-	-	-	۴۶۳	۴۶۳	-	
CaCl _۲ ·۶H _۲ O	۱۷۶	۱۷۶	۱۷۶	۱۷۶	۱۶۶	۱۶۶	۱۷۶	
KH _۲ PO _۴	۵۱۰	۵۱۰	۵۱۰	۵۱۰	۴۰۰	۴۰۰	۵۱۰	
MgSO _۴ ·۷H _۲ O	۳۷۰	۳۷۰	۳۷۰	۳۷۰	۱۸۵	۱۸۵	۳۷۰	
NH _۴ NO _۳	۱۶۵	۱۶۵	۱۶۵	۱۶۵	-	-	۱۶۵	
Mnso _۴ ·۴H _۲ O	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	
ZnSo _۴ ·۷H _۲ O	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	
H _۲ Bo _۳	۱/۶	۱/۶	۱/۶	۱/۶	۱/۶	۱/۶	۱/۶	
KI	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	
NA,EDTA	۴۱/۰۰	۴۱/۰۰	۲۷/۸	۲۷/۸	۲۷/۸	۸/۲	۲۷/۸	
FeSo _۴ ·۷H _۲ O	۲۷/۸۰	۲۷/۸۰	۴۱	۳۷/۳	۳۷/۳	۵/۵۷	۴۱	
Tiamin HCl	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۱	۰/۲۵	۱۰	۰/۵	
Nicotinic acid	۱/۳۰	۱/۳۰	۱/۳	۰/۵	۱/۳	۱	۱/۵	
L-proline	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵	۱۰۰	-	۲۸۸۰	-	
L-glutamine	۱۵۰	۱۵۰	۱۵	-	-	-	۲۵۰	
L-asparagine	۱۵	۱۵	۱۲۵	-	-	-	-	
Glycine	-	-	-	۲	۷/۷	-	-	
Pyridoxine HCL	-	-	-	۰/۵	-	۱	-	
TIBA(Triiodobenzoic acid)	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱	۰/۱۰	۰/۱۰	-	-	
۲,۴D	-	-	-	-	-	۲	-	
kinetin	-	-	-	-	-	-	۲/۵	
Casein hydrolysate	-	-	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰	-	
Colchicine	۲۵۰	-	-	-	-	-	-	
Myo-inositol	-	-	-	-	-	۱۰۰	۱۰۰	
Succinic acid	-	-	-	-	-	-	۲۵	
Activated charcoal	-	۵	۵	۵	۵	-	-	gl ^{-۱}
Phytigel	-	۱/۵۰	-	-	-	-	۲	
Agar noble	-	-	۸	۶	۶	-	-	
Sucrose	۹۰	۹۰	۹۰	۶۰	۱۲۰	۲۵	۳۰	

{ IML and IMSS medium (saisingtong et al., ۱۹۹۶), Yu-Pei medium (ku et al., ۱۹۸۱), N^۶ medium (Chu et al., ۱۹۸۱), CI media (Nageli et al., ۱۹۹۸), RM medium (Saisingtong et al., ۱۹۹۶).

ETH-MA۲ توانست در ۳ محیط کشت متفاوت YPM، IMSS و CI پاسخ مثبت نشان دهد. Collins و Genovesi، مهمترین خصوصیت محیط کشت YP را سطح بالای ساکارز، وجود ذغال فعال و ازت معدنی به شکل کازئین هیدرولیزات بیان کرده‌اند (۱۱). محیط کشت CI برای کالزایی در کشت بساک‌ها مناسب است (شکل ۲- و)، زیرا در ترکیب این محیط کشت هورمون اکسین ۲.۴D به میزان ۲ mgL^{-۱} بکار رفته است، در صورتی که در محیط‌های دیگر کشت بساک ذرت نه تنها از هورمون اکسین استفاده نشده است، بلکه آنتی اکسین TIBA نیز به کار رفته است (جدول ۲). به نظر می‌رسد مصرف آنتی اکسین در کشت بساک ذرت احتمالاً به دلیل

لیکن با این وجود باززایی گیاهی موفقیت زیادی را به همراه داشت (شکل ۲- ح). تعویض محیط کشت و تأمین هورمون مطلوب، کمیت ساکارز و یا تأثیر فشار اسمزی نقش به‌سزایی در کشت بساک دارند. جنین‌های گامتوفیتی مثل جنین‌های حاصل از کشت بساک نیاز به تأمین مجدد برخی از ترکیبات در محیط کشت دارند (۳).

در این تحقیق، میانگین ساختارهای شبه جنینی حاصل از کشت بساک ژنوتیپ ۸٪، ETH-MA۲ برآورد گردید (جدول ۳). شایان ذکر است که Aulinger و همکاران (۲۰۰۲)، فراوانی تولید ساختارهای شبه جنینی را در این ژنوتیپ بین ۵/۸٪ تا ۱۵/۵٪ گزارش نمودند (۱). در این پژوهش تنها ژنوتیپ

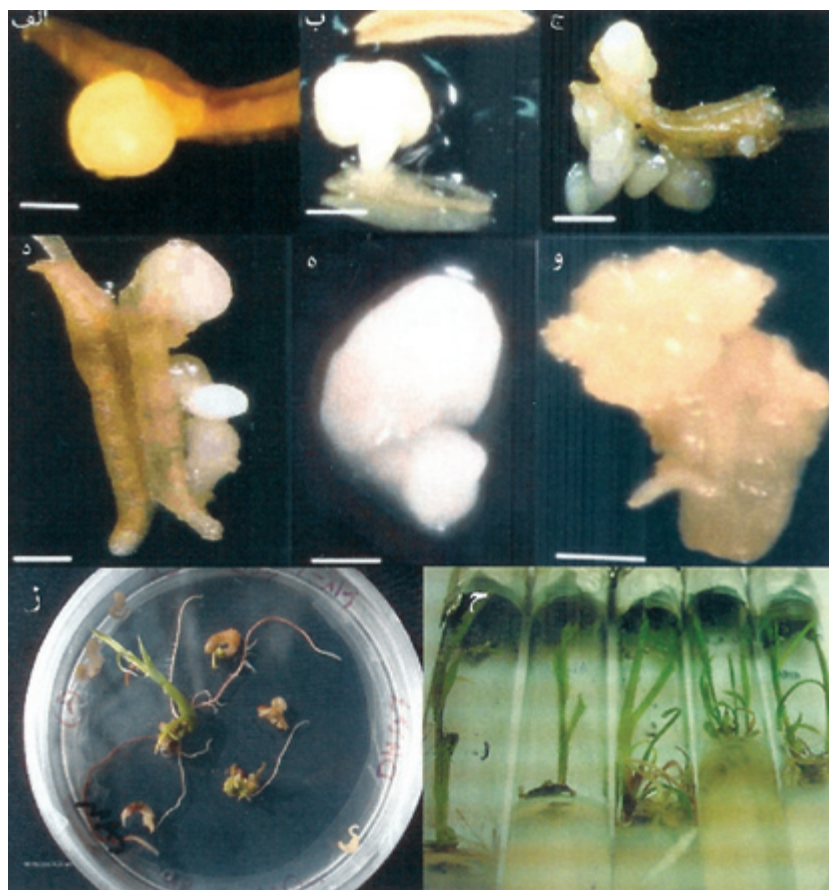
۰/۱۵٪ و ۰/۵٪، فقط در محیط کشت IMSSs توانستند عکس العمل نشان دهند. همانطوری که قبلاً ذکر شد بساک‌های این ژنوتیپ‌ها ابتدا در محیط کشت مایع IML حاوی 250 mgL^{-1} کلشی سین پیش تیمار شدند و سپس به محیط کشت نیمه جامد IMSS بدون کلشیسین انتقال یافتند.

Wan و Widholm چهار مسیر متفاوت را برای تشکیل ساختارهای شبه جنینی مشخص کرده‌اند که با تقسیمات مکرر در سلول رویشی، سلول زایشی و یا هر دوی این‌ها و یا از طریق دو سلول خوهری حاصله از تقسیم متقارن میکروسپورها انجام می‌شود (۲۰). گرچه برخی محققین معتقدند اساساً سلول‌های رویشی مسئول تشکیل ساختارهای شبه جنینی هستند (۱۶).

در این پژوهش، در محیط کشت CI برخی از میکروسپورها از داخل بساک‌ها آزاد گردیده و ساختارهای چند سلولی را تشکیل داده بودند که پس از مدتی از بین رفتند. در تحقیقات سایر محققین نیز خروج میکروسپورها از بساک و رها شدن آنها در محیط کشت بساک و تشکیل ساختارهای چند سلولی گزارش گردیده لیکن رشد آنها متوقف شده و تشکیل ساختارهای شبه جنینی تا کنون در سایر تحقیقات دیده نشده است (۱۸).

میزان عکس‌العمل ژنوتیپ A188 در محیط N6، ۷۵٪ بود که حاکی از عکس‌العمل ضعیف آندروژنیک آن می‌باشد. ویژگی محیط کشت N6 در این تحقیق، تنها میزان بالای ساکارز (120 gL^{-1}) آن می‌باشد که می‌تواند تا حدی توجیه کننده عکس‌العمل این ژنوتیپ در محیط مذکور باشد. Buter اینبرد لاین A188 را به عنوان یک لاین غیر پاسخ دهنده^{۱۱} از نظر کشت بساک معرفی کرد، اما گزارش کرد که از تلاقی بین یک لاین پاسخ دهنده (DHV) با این ژنوتیپ، هیبریدهایی به دست آمدند که پدیده تفکیک متجاوز^{۱۱} یعنی عکس‌العمل برتر نسبت به والد پاسخ دهنده (DHV) را نشان دادند. بنابراین فرض شد که نواحی با آل‌های مثبت آندروژنیک ممکن است که حتی در ژنوتیپ‌های غیر پاسخ دهنده هم وجود داشته باشد (۴). به علاوه گزارش شد که آندروژنز درون شیشه‌ای در ذرت به نظر می‌رسد با یک سیستم ژنتیکی پیچیده با QTLهای مختلف تعیین می‌شود که مراحل خاصی را در طی پروسه آندروژنز کنترل می‌نمایند (۵).

Collins و Genovesi این‌برد لاین A188 را همراه با این‌برد لاین‌های MO17 BY3 به عنوان ژنوتیپ‌هایی طبقه‌بندی کردند که یا به



شکل ۲: تشکیل ساختارهای شبه جنینی در کشت بساک برخی از ژنوتیپ‌های ذرت

الف) ساختار شبه جنینی در کشت بساک ژنوتیپ S61 در محیط IMSS (ب) ساختار شبه جنینی در ژنوتیپ ETH-MA2 در محیط کشت IMSS (ج) تولید چند ساختار شبه جنینی در کشت بساک ژنوتیپ LA12 در محیط N6 (د) ساختار شبه جنینی در ژنوتیپ DH5×DHV در محیط کشت YPM (ه) ساختارهای شبه جنینی به هم چسبیده در کشت بساک ژنوتیپ ETH-MA2 در محیط کشت YPm (و) تولید کالوس در کشت بساک ژنوتیپ ETH-MA2 در محیط کشت القای کالوس CI (ز) تولید گیاهچه از ساختار شبه جنینی در کشت بساک ژنوتیپ ETH-MA2 در محیط کشت باززایی RM (ر) تولید گیاهان هاپلوئید حاصل از کشت بساک ژنوتیپ DH5×DHV در محیط باززایی RM. طول خط روی عکس‌ها ۵۰۰ μm است

میزان بالای هورمون‌های داخلی بافت کشت شده باشد (۲). شکل-۲ و نمونه‌ای از کال زایی را پس از ۳ هفته از کشت بساک ژنوتیپ ETH-MA2 در محیط کشت مایع CI نشان می‌دهد. کال‌های حاصله پس از رشد کافی به محیط کشت جامد CI (حاوی 17 gL^{-1} آگار) منتقل شدند و سپس به محیط باززایی منتقل شدند. بعد از گذشت حدود ۸ تا ۱۰ هفته رشد بیشتری مشاهده نشد و کال‌ها قهوه‌ای شدند. Wan و Widholm گزارش کردند که در کشت بساک ذرت، عمدتاً ساختارهای شبه جنینی از کشت بساک‌ها به وجود می‌آیند و فراوانی تشکیل کالوس در کشت بساک‌ها کم است. پس ساختارهای شبه جنینی می‌تواند پس از انتقال به محیط کشت باززایی به طور مستقیم گیاه تولید نمایند و یا اینکه به طور غیر مستقیم از طریق تولید کالوس‌های جنین ز، گیاه تولید نمایند (۲۳).

هیبریدهای تری وی کراس TWC605 و سینگل کراس SCV09 به ترتیب با فراوانی‌های

جدول شماره ۳: عکس العمل ژنوتیپ های پاسخ دهنده ذرت در محیط های کشت استفاده شده

ژنوتیپ	محیط کشت				
	IMSS	N۶	YPm	YP	CI
DH۵×DH۷	٪ ۱۷/۶	-	٪ ۸	-	-
ETH-M۸۲	٪ ۸/۵	-	٪ ۲	-	٪ ۲
TWC ۶۰۵	٪ ۱/۵	-	-	-	-
sc ۷۰۹	٪ ۱/۵	-	-	-	-
S۶۱	٪ ۲	-	-	-	-
A۱۸۸	-	٪ ۱/۵	-	-	-
K۷۴/۱	-	-	٪ ۱	-	-
LA۱۲	-	٪ ۱/۵	٪ ۱/۵	-	-

بهره گرفت. از سویی با توجه به اینکه گیاهان هاپلوئید فقط یکسری کروموزومی دارند، بنابراین با انتقال ژن به بافت های هاپلوئید می توان انتظار داشت که پس از دو برابر کردن کروموزوم های گیاه هاپلوئید بتوان گیاهان تراریخت مطلوب تر و با ثبات بیشتری را بدست آورد.

پاورقی ها

- 1-Androgenesis
- 2-Anther culture
- 3-Microspore culture
- 4- Embryo like structures
- 5- Squash
- 6- Acetocarmine
- 7- Callus induction
- 8- Globular
- 9- Bipolar
- 10- Non-responsive
- 11- Transgressive segregation

منابع مورد استفاده

- 1- 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. Zurich (Switzerland).
- 2- Baroly, D. and Beckert, M.1993; Improvement of regeneration ability of androgenic embryos by early anther transfer in maize. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 33: 45-50.
- 3- Barloy,D., Denis, L. and Beckert, M.1989; Comparison of the aptitude for anther culture in some androgenetic doubled haploid maize lines. *Maydica*. 34:303-308.
- 4- Buter, B. 1997; In vitro haploid production in higher plants. Kluwer Academic Publisher, Netherlands. 4: 37-71.
- 5- Dieu, P. and Beckert, M. 1986; Further studies of androgenetic embryo production

آندروژنز پاسخ نداده اند یا اینکه پاسخ بسیار ضعیفی داشته اند. در این تحقیق، هم اینبرد لاین های BY۳ و MO۱۷ و نیز هیبرید آنها، یعنی KSCV۰۴ هیچ گونه عکس العملی نشان ندادند و این یافته ها با نتایج Collins و Genovesi (۱۱) و Potolino و Jones (۱۸) مطابقت دارد. واکنش ژنوتیپ های K۷۴/۱ در محیط کشت YPM حدود ۱٪ بود، در صورتی که لاین ذرت سفید شیرین (LA۱۲) با متوسط فراوانی ۱/۵٪ توانست در دو محیط کشت N۶ و YPM ساختارهای شبه جنینی تشکیل دهد. دیگر ژنوتیپ های مورد بررسی پاسخ مثبتی نشان ندادند. فقدان عکس العمل آندروژنیک در سایر ژنوتیپ ها، در این تحقیق می تواند نقش ژن ها در کنترل صفت آندروژنز را به وضوح نشان داد. همچنین فرضیه ای که توسط برخی از محققین (۵) ابراز گردیده، نقش دیواره بساک را در تعیین فیزیولوژیکی القا یا نمو اولیه جنینی میکروسپورها دخیل می داند. با این وجود اکثر محققین معتقدند که خصوصیات آندروژنیک به صورت ژنتیکی کنترل می شود و این خصوصیت مطمئناً مغلوب نیست، زیرا معرفی این خصوصیت آندروژنیک به درون لاین های برگزیده ذرت با تلاقی های برگشتی مکرر یا اصلاح برخی جمعیت های سنتتیک سازگار که با این نوع ژرم پلاسما شروع شوند ساده است (۳). بنابراین می توان انتظار داشت خصوصیات آندروژنیک از ژنوتیپ های بسیار پاسخ دهنده نظیر DH۵ × DH۷ و ETH-M۸۲ که در این آزمایش عکس العمل خوبی داشته اند به سایر ژنوتیپ های برگزیده نظیر لاین های تجاری BY۳، MO۱۷ و S۶۱ قابل انتقال باشد. همچنین این واقعیت که بیان ژن های کنترل کننده صفت آندروژنز ظاهراً تحت تأثیر شرایط رشد گیاه مادری نمی باشد (۳)، به انتقال راحت این صفت و کاربرد آن در نیل به اهداف به نژادی ذرت کمک شایانی می نماید.

با توجه به شناسایی قابلیت نرزیایی در ژنوتیپ های DH۵×DH۷، A۱۸۸، S۶۱، K۷۴/۱ و LA۱۲، TWC۶۰۵ و SCV۰۹ مورد بررسی در این تحقیق می توان با تلاقی بین ژنوتیپ های دارای قابلیت نرزیایی و ژنوتیپ های غیر پاسخ دهنده صفت نرزیایی را به سایر این برد لاین های تجاری منتقل نمود. بالطبع با تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف شده کاملاً هموزیگوس می توان برنامه اصلاح و معرفی هیبریدهای ذرت با عملکرد بالا و صفات برتر را تسریع نمود و همچنین از این ویژگی در مطالعات بنیادی و نیز تولید گیاهان تراریخت

- and plant regeneration from in vitro cultured anthers in maize (*Zea mays* L.). *Maydica* xxxi .pp: 245-259.
- 6- D'Halluin, K., Bonue E., Bossut M. Beukeleer M., and Leemans J. 1992; Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell*. 4:1495 - 1505.
- 7- Dormann, M.1999; Genetic transformation of embryogenic microspores. *Agro Evo Oilseed Research Center*. Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
- 8- Dupuis, I. and Pace, G.M. 1993; Factors affecting in vitro maturation of isolated maize microspores. *Plant Cell Reports*, 12: 564-568.
- 9- Fennel, A., and Hauptman, P.1992; Selection of microspore derived embryogenic structure in maize related to transformation by microinjection. *Botanica- Acta*, 105: 313-318.
- 10- Gaillard, A. Vergne, P. and Beckert, M.1991; Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration, *Plant Cell Reports*, 10:55-58.
- 11- Genovesi, A. D. and Collins, G.B.1982; In vitro production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Sci.*, 22:37-44.
- 12- Jahne, A. and Lorz, H.1995; Cereal microspore culture. Review Article. *Plant Science*, 109:1-12.
- 13- Hassan, L., Ahmad S.D and Okumus A. 2001; The direct regeneration of maize haploids through anther culture. *Online Journal of Biological Sciences*.1(10): 900-901.
- 14- Krautwing, B. and Lorz, H. 1995; Single androgenetic structures maize (*Zea mays* L.) for the initiation of homogenous cell suspension and protoplast culture . *Plant Cell Reports*. 14: 477- 481.
- 15- Nageli, M. Schmid, J.E. Stamp, P. and Buter, B.1999; Improved formation of regenerable callus in isolated microspore culture of Maize: Impact of carbohydrate, plating density and time of transfer. *Plant Cell Report*, 19:177-184.
- 16- Nageli, M., Stamp, P. and Potrykus, I. 1998; Isolated microspore culture of maize (*Zea mays* L.). Ph.D. Thesis. Zurich (Switzerland).
- 17- Obert, B and Barnabas, B.2004; Colchicine induced embryogenesis in maize. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.77: 283-285
- 18- Petolino J. F. and Jones A. M. 1986; Anther culture of elite genotypes of maize . *Crop Sci* , 26:1072-1074.
- 19- Pickering, R. A. and Devaux, P. 1992; Haploid production approaches and use in plant breeding. In: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and U.K. CAB International, ed., Shewry, P.R. Barley, pp. 519-547.
- 20- Pretova, A. Ruijter, N.C.A.De. Lammernad, A.M.Van. and Schel, H.N. 1993; Structural observation during androgenesis of microspore culture of the 4C1 genotype of (*Zea mays* L.). *Euphytica*. 65:61-69.
- 21- Sainsingtong, S., Schmid, J.E., Stamp,P. and Buter, B.1996; Colchicine mediated chromosome doubling during anther culture of Maize (*Zea mays* L.). *theor. Appl. Genet*. 92:1017-1023.
- 22- Shugar, L. 1998; Application of doubled-haploid systems. Hyland seeds, W.G. Thomson and Sons Limited-Narin, Ontario, Canada.
- 23- Wan, Y and Widholm, J.M. 1992; Formation of multiple embryo-like structures from single microspores during Maize anther culture. *Plant Cell Reports*.11:529-531

