پژوهش و سازندگی
در زراعت و باغبانی
شماره ۶۷، تابستان ۱۳۸۴

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 هاپلوییدبرای اســتفاده در برنامه‌های به نژادی و تحقیقات بنیادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار اســت. بدین منظور در این پژوهش تعداد ۴۳ ژنوتیپ ذرت از ژرم پلاسم 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 هســته‌ای انتهایی میکروســپورها و در محیط کشت‌های N۶، IMSS، YPM، YP و CI انجام گردید. تولید ساختارهای شــبه جنینی ۴ تا ۶ هفته پس از کشــت، از ژنوتیپ‌های TH-M۸۲ ، DH۵×DH۷، A۱۸۸، S۶۱، K۷۴/۱، LA۱۲، TWC۶۰۵ و SC۷۰۹ آغاز گردید. همچنین در برخی ژنوتیپ‌ها کالوس زایی مشاهده گردید. میزان فراوانی تولید ساختارهای شبه جنینی در ژنوتیپ‌های مــورد بررســی از صفر تا ۱۷/۶٪ متغیر بود کــه ژنوتیپ‌های DH۵×DH۷، ETH-M۸۲ و S۶۱ به ترتیب بــا 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 نرزایی در برخی از ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌توان با تلاقی بین ژنوتیپ‌های دارای قابلیت نرزایی و ژنوتیپ‌های غیر پاسخ دهنده صفت نرزایی 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,

Archive of SID
Pajouhesh & Sazandegi
www.SID.ir

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 (ELSs) 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 ELSs 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 ELSs respectively at 100 cultured anthers. Potential of androgenic responses that identified in some of genotypes in this research is useful for breeding maize programes .

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

SID

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 هاپلویید 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 هاپلویید یکی از اهداف با ارزش در مهندسی ژنتیک به‌شمار می‌آید، زیرا پس از انتقال ژن به بافت هاپلویید و مضاعف کردن کروموزوم‌های آن، می‌توان گیاهان تراریخت کاملاً هموزیگوت برای ژن انتقال یافته را باززایی کرد و در صورت استفاده از میکروسپورها به‌عنوان بافت هدف، می‌توان به گیاهان تراریخت غیر شیمر دست یافت(۷، ۹). روش های متعددی جهت تولید گیاهان هاپلوئید و به دنبال آن گیاهان هاپلوئید مضاعف وجود دارد که یکی از این روش‌ها نرزایی[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 باززایی گیاه و خودگشنی 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 نموی میکروسپورها (مرحله تک هسته‌ای انتهایی تا اوایل دو هسته ای 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.

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

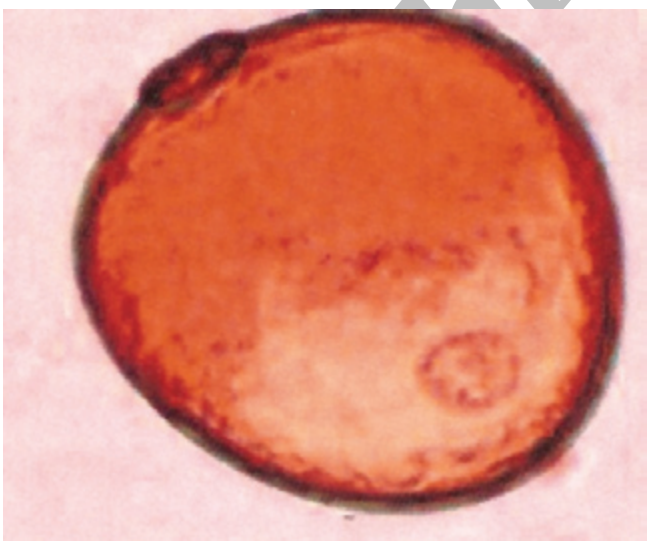
در ایـن آزمایش، ۴۳ ژنوتیپ ذرت (جدول شـماره۱) بـه عنوان مواد گیاهی در طی سـال زراعی ۱۳۸۲ و ۱۳۸۳ از نظر عکس العمل به کشـت بسـاک و تولید سـاختارهای شبه جنینی بررسی شـدند ژنوتیپ‌های مورد بررسـی در این تحقیق شامل طیف وسـیعی از ژرم پلاسم مورد استفاده از نظر تجاری بودند. شـایان ذکر اسـت که ژنوتیپ‌هـای,BC۲۸۸, BC۱۸۲ OSSK۴۴۴ , BC۳۸۵ و OSSK۴۹۹ هیبریدهـای تجاری زودرس و میان رس از ژرم پلاسم کشور مجارستان می‌باشند.

بذور ETH-M۷۲ ETH-M۸۲ ، ETH-M۲۴ از طریق Aulinger در موسسه ETH زوریخ سوئیس و DH۵×DH۷ از طریق Beckert در موسسه INRA فرانسه دریافت گردید. همچنین اینبرد لاین A۱۸۸ از طریق Van Lammerene درکشور هلند تهیه شد (لازم به توضیح است که اینبرد لاین مذکور یک لاین غیر تجاری با آندوسـپرم سفید بوده و معمولاً در تحقیقات کشـت بافت مورد اسـتفاده قرار می‌گیرد). منشأ لاین‌های MO۱۷, B۷۳ و هیبرید KSC۷۰۴ از کشـور یوگوسلاوی و بقیه لاین‌های مورد استفاده در این پژوهش (جدول ۱) مواد ژنتیکی ارسـالی از مرکز تحقیقات بین المللی گندم و ذرت (سـیمیت مکزیک) می‌باشند که از طریق برنامه‌های اصلاحی مؤسسـه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کشور استخراج و برخی از آنها در ترکیب هیبریدهای سـینگل کراس و تری وی کراس مورد استفاده قرار گرفته است.

گیاهان مادری در دو شـرایط مزرعه و اتاق رشـد کشت شدند. در اتاق رشـد شـرایط دمای ۱ ± ۲۵/۱۸ °C (شـب/ روز) با دوره نوری ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/ نور) (۱۵، ۱۶) برای رشـد گیاهان مـادری فراهم گردید. نور اتاق رشد توسـط لامپ های ۴۰۰ وات بخار سدیم ($\mu molm^{-2}s^{-1}$ ۳۵۰ - ۴۰۰) تامین شـد و رطوبت نسـبی اتاق رشـد ۷۰ ٪ بود. بذور هر ژنوتیپ در اتاق رشـد، حداقل در ۵ گلدان به قطر ۲۰ و عمق ۲۸ سـانتی متر کشت شدند. ترکیب بسـتر بذور شامل خاک، ماسـه و کود دامی پوسیده با نسبت ۱:۱:۲ بود. گل‌های تاجی در مرحله قبل از خروج از غلاف برگ پرچم برداشـت گردیدند (۲۰، ۲۳). گل‌های تاجی برداشت شده در داخل دستمال کاغذی مرطوب و سـپس ورق آلومینیومی قرار گرفته و جهت شـوک سـرمایی به مدت ۱۴ روز در دمای ۸ درجه سـانتی‌گراد نگهداری شـدند. مرحله نموی دقیق میکروسـپورها قبل از کشـت بساک، به روش اسـکواش[5] و از طریق رنگ آمیزی با اسـتوکارمن[6] ۲٪ تعیین گردید. نمو میکروسپورها در داخل گل تاجی ذرت یکنواخت نمی‌باشـد، لذا تعیین مرحله نموی جهت کشـت بسـاک‌های (۱۰، ۱۴) جدا شده حائز اهمیت فراوانی است، شکل ۱ مرحله نمـوی تک‌هسـته‌ای انتهایی، کـه طبق نظر اکثـر محققین برای کشـت بساک‌های جدا شـده ذرت مناسب می‌باشد را نشـان می‌دهد. ضد عفونی سنبلچه‌ها، با استفاده از محلول سدیم هیپوکلریت ۱/۵ ٪ (v/v) به مدت ۱۵

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 μm ۵۰ است .

Archive of SID
www.SID.ir

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 میلی متر و حاوی ۸ میلی لیتر 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، YP YPm تغییر یافته)، N۶ و CI استفاده شد.

محیط‌های کشت YP، N۶ و YPm جامد، محیط کشت IMSs نیمه جامد و محیط کشت[۷] CI 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 سانتی گراد پیش تیمار شدند (۲۱). محیط کشت IMSs شامل ترکیبات محیط کشت IML می‌باشد، با این تفاوت که کلشی‌سین در این محیط حذف و ۱۵۰۰mgl^{-1} فیتازل به آن اضافه شده است. محیط کشت RM (۱۳، ۲۱) برای باززایی گیاهان هاپلویید 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 درجدول (۳) آمده است. در این بررسی از بین ۴۳ ژنوتیپ مورد بررسی، تنها ۸ ژنوتیپ (۱۸/۶ ٪ از ژنوتیپ‌ها) شامل ETH-M۸۲، DH۵×DH۷، A۱۸۸، S۶۱، K۷۴/۱، LA۱۲ (ذرت شیرین)، TWC۶۰۵ و SC۷۰۹ عکس‌العمل مثبت نشان دادند. از طرفی فقط ژنوتیپ DH۵×DH۷ 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 عکس العمل خوبی را به کشت بساک و میکروسپور نشان دادند. منظور از عکس العمل خوب تشکیل حداقل ۱۰ ساختار شبه جنینی در کشت ۱۰۰ بساک می‌باشد، در صورتی‌که 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 طوری‌که فراوانی تولید جنین فقط در ۹ ژنوتیپ مورد بررسی حدود۱٪ بود و لاین‌های Pa۹۱، FR۱۶، H۹۹ و نیز هیبرید Pa۹۱ × (H۹۹×FR۱۶) به‌عنوان بهترین ژنوتیپ‌ها معرفی شدند (۱۸).

میانگین تولید ساختارهای شبه جنینی در هیبرید DH۵ × DH۷ ، در این تحقیق، ۱۷/۶٪ بود(جدول ۳). میانگین تولید ساختارهای شبه جنینی در ژنوتیپ مذکور در آزمایشات محققین قبلی از ۱/۶٪ تا ۳۶٪ (۲) و ۴۹٪ (۳) متغیر می‌باشد. شکل های 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 بساک های پاسخ دهنده در این ژنوتیپ بیش از یک ساختار شبه جنینی تشکیل دادند(شکل ۲-ج و ۲-د). در شرایطی که این ساختارهای شبه جنینی از یک میکروسپور منشأ گرفته باشند اغلب نمی‌توانند به خوبی رشد و نمو نمایند و رشد آنها در مرحله کروی شکل[۸] 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 وWidholm (۲۳) بر روی تشکیل ساختارهای شبه جنینی چندگانه از یک میکروسپور در کشت بساک ذرت انجام دادند، نتیجه گرفتند که در حالات معینی، یک میکروسپور 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 DH۵ ×DH۷ مشاهده گردید (شکل۲- 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[۹] (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 ویدهلم (۱۹۹۲) گزارش نمودند که یک میکروسپور 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)، به‌علاوه Barloy و Beckert تعادل بین مواد غذایی، تبادل گازی بین ساختارهای آندوژنیک و محیط کشت را عامل بسیار تعیین‌کننده‌ای می‌دانند (۲). در این پژوهش میانگین بالاتر تولید ساختارهای شبه جنینی در ژنوتیپ DH۵ × DH۷ 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 ۲۵۰mgL^{-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 این‌برد لاین S۶۱ 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-M۸۲ 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 جنین های گامتی با فراوانی بالا از طریق کشت بساک ذرت بوده است،

Archive of SID
www.SID.ir

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

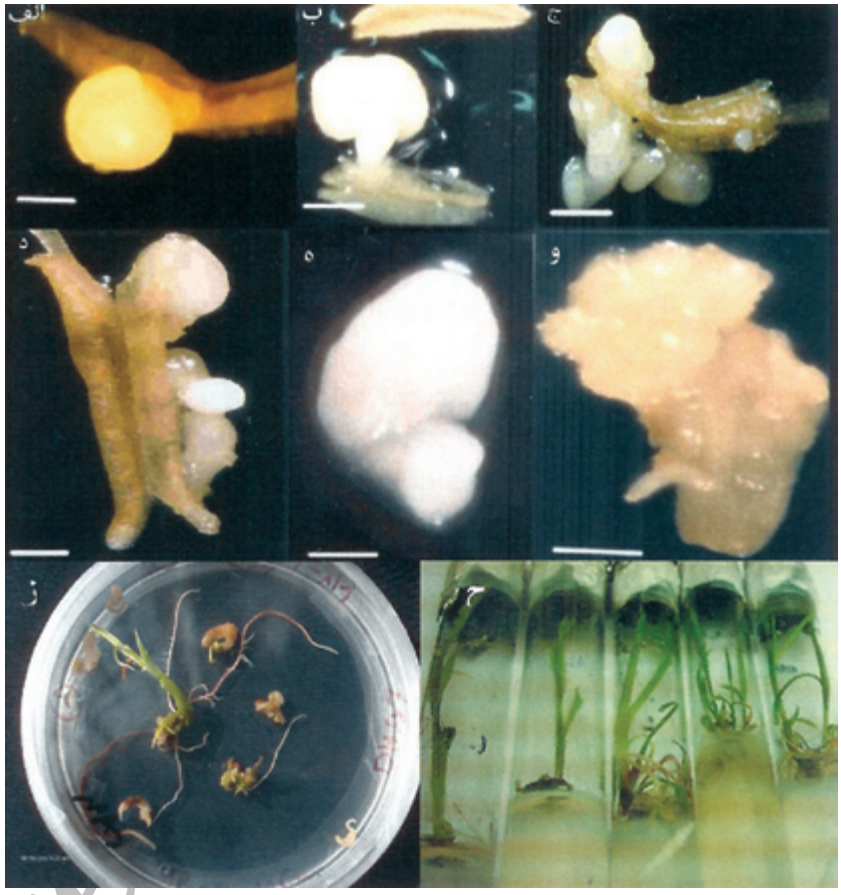
Components	IML	IMSS	YP	YPm	N۶	CI	RM	
KNO_3	۲۵۰۰	۲۵۰۰	۲۵۰۰	۲۵۰۰	۲۸۳۰	۲۸۳۰	۲۵۰۰	mgl^{-1}
$(NH_4)_2SO_4$	–	–	–	–	۴۶۳	۴۶۳	–	
$CaCl_2.2H_2O$	۱۷۶	۱۷۶	۱۷۶	۱۷۶	۱۶۶	۱۶۶	۱۷۶	
KH_2PO_4	۵۱۰	۵۱۰	۵۱۰	۵۱۰	۴۰۰	۴۰۰	۵۱۰	
$MgSO_4*7H_2O$	۳۷۰	۳۷۰	۳۷۰	۳۷۰	۱۸۵	۱۸۵	۳۷۰	
NH_4NO_3	۱۶۵	۱۶۵	۱۶۵	۱۶۵	–	–	۱۶۵	
$MnSO_4.4H_2O$	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴/۴	
$ZnSO_4.7H_2O$	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	
H_3BO_3	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	
NA2EDTA	۴۱/۰۰	۴۱/۰۰	۲۷/۸	۲۷/۸	۲۷/۸	۸/۲	۲۷/۸	
$FeSO_4.7H_2O$	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	–	–	
2,4D	–	–	–	–	–	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^{-1}
Phytagel	–	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), N۶ medium (Chu et al., ۱۹۸۱), CI media (Nageli et al.,۱۹۹۸), RM medium (Saisingtong et al., ۱۹۹۶).

لیکن با این وجود باززایی گیاهی موفقیت زیادی را بهمراه 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 ازکشت بساک نیاز به تأمین مجدد برخی ازترکیبات در محیط کشت‌دارند(۳).

در این تحقیق، میانگین ساختارهای شبه جنینی حاصل از کشت بساک ژنوتیپ ETH-M۸۲ ،۸٪ 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 ETH-M۸۲ توانست در ۳ محیط کشت متفاوت YPM، IMSS و CI پاسخ مثبت نشان دهد. Genovesi و Collins ، 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 mgL^{-1} ۲ بکار رفته است ، در صورتی‌که در محیط‌های دیگر کشت بساک ذرت نه تنها از هورمون اکسین استفاده نشده است، بلکه آنتی اکسین TIBA نیز به‌کار رفته است (جدول ۲). به‌نظر می‌رسد مصرف آنتی اکسین در کشت بساک ذرت احتمالاً به‌دلیل

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۲: تشکیل ساختارهای شبه جنینی در کشت بساک برخی از ژنوتیپ های ذرت
الف) ساختار شبه جنینی درکشت بساک ژنوتیپ S۶۱ در محیط IMSS ب) ساختار شبه جنینی در ژنوتیپ ETH-M۸۲ در محیط کشت IMSS ج) تولید چند ساختار شبه جنینی درکشت بساک ژنوتیپ LA۱۲ در محیط N۶ د) ساختار شبه جنینی در ژنوتیپ DH۵×DH۷ در محیط کشت YPM ه) ساختارهای شبه جنینی به هم چسبیده درکشت بساک ژنوتیپ ETH-M۸۲ در محیط کشت YPm و) تولید کالوس در کشت بساک ژنوتیپ ETH-M۸۲ در محیط کشت القای کالوس CI ز) تولید گیاهچه از ساختار شبه جنینی در کشت بساک ژنوتیپ ETH-M۸۲ در محیط کشت باززاییRM ر) تولید گیاهان هاپلوییید حاصل از کشت بساک ژنوتیپ DH۵×DH۷ 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-M۸۲ در محیط کشت مایع CI نشان می‌دهد. کال‌های حاصله پس از رشد کافی به محیط کشت جامد CI (حاوی ۱۷ gL-۱ 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 به‌وجود 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 زا ، گیاه تولید نمایند (۲۳).

هیبریدهای تری وی کراس TWC۶۰۵ و سینگل کراس SC۷۰۹ به ترتیب با فراوانی های ۱/۵٪ و ۰/۵٪ ، فقط در محیط کشت IMSs توانستند عکس العمل نشان دهند. همانطوری که قبلاً ذکر شد بساک‌های این ژنوتیپ‌ها ابتدا در محیط کشت مایع IML حاوی ۲۵۰ mgL-۱ کلشی‌سین 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 خواهری 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 ژنوتپ A۱۸۸ در محیط N۶، ۷۵/۰٪ بود که حاکی از عکس‌العمل ضعیف آندروژنیک آن می‌باشد. ویژگی محیط کشتN۶ در این تحقیق، تنها میزان بالای ساکارز (۱۲۰ gL-۱) آن می‌باشد که می‌تواند تا حدی توجیه کننده عکس‌العمل این ژنوتیپ در محیط مذکور باشد. Buter اینبرد لاین A۱۸۸ را به عنوان یک لاین غیر پاسخ دهنده[۱۰] از نظر کشت بساک معرفی کرد ، اما گزارش کرد که از تلاقی بین یک لاین پاسخ دهنده (DH۷) با این ژنوتیپ، هیبریدهایی به دست آمدند که پدیده تفکیک متجاوز[۱۱] یعنی عکس‌العمل برتر نسبت به والد پاسخ دهنده (DH۷) را نشان دادند. بنابراین فرض شد که نواحی با آلل‌های مثبت آندروژنیک ممکن است که حتی در ژنوتیپ های 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).

Genovesi و Collins اینبرد لاین A۱۸۸ را همراه با اینبرد لاین های MO۱۷ و B۷۳ به عنوان ژنوتیپ‌هایی طبقه‌بندی کردند که یا به

Archive
www.SID.ir

آندروژنز پاسخ نداده‌اند یا اینکه پاسخ بسیار ضعیفی داشته‌اند. در این تحقیق، هم اینبرد لاین های B۷۳ و MO۱۷ و نیز هیبرید آنها، یعنی KSC۷۰۴ هیچ گونه عکس‌العملی نشان ندادند و این یافته‌ها با نتایج Genovesi و Collins(۱۱) و Potolino و Jones (۱۸) مطابقت دارد. واکنش ژنوتیپ‌های 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 ژنوتیپ‌های مورد بررسی پاسخ مثبتی نشان ندادند. فقدان عکس‌العمل آندروژنیک در سایر ژنوتیپ‌ها ، در این تحقیق می‌تواند نقش ژن‌ها در کنترل صفت آندروژنز را به وضوح نشان داد. همچنین فرضیه‌ای که توسط برخی از محققین (۵) ابراز گردیده ، نقش دیواره بساک را در تعیین فیزیولوژیکی القا یا نمو اولیه جنینی میکروسپورها دخیل می‌داند. با این وجود اکثر محققین معتقدند که خصوصیات آندروژنیک به صورت ژنتیکی کنترل می‌شود و این خصوصیت مطمئناً مغلوب نیست، زیرا معرفی این خصوصیت آندروژنیک به درون لاین‌های برگزیده ذرت با تلاقی‌های برگشتی مکرر یا اصلاح برخی جمعیت‌های سنتتیک سازگار که با این نوع ژرم پلاسم شروع شوند ساده است (۳). بنابراین می‌توان انتظار داشت خصوصیات آندروژنیک از ژنوتیپ‌های بسیار پاسخ دهنده نظیر DH۵ × DH۷ و ETH-M۸۲ که در این آزمایش عکس العمل خوبی داشته‌اند به سایر ژنوتیپ‌های برگزیده نظیر لاین‌های تجاری B۷۳، MO۱۷ و S۶۱ قابل انتقال باشد. همچنین این واقعیت که بیان ژن‌های کنترل کننده صفت آندروژنز ظاهراً تحت تأثیر شرایط رشد گیاه مادری نمی‌باشند (۳)، به انتقال راحت این صفت و کاربرد آن در نیل به اهداف به نژادی ذرت کمک شایانی می‌نماید.

با توجه به شناسایی قابلیت نرزایی در ژنوتیپ‌های DH۵×DH۷، A۱۸۸، S۶۱، K۷۴/۱، TWC۶۰۵ ، LA۱۲ و SC۷۰۹ مورد بررسی در این تحقیق می‌توان با تلاقی بین ژنوتیپ‌های دارای قابلیت نرزایی و ژنوتیپ‌های غیر پاسخ دهنده صفت نرزایی را به سایر اینبرد لاین‌های تجاری منتقل نمود. بالطبع با تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف شده کاملاً هموزیگوس می‌توان 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. از سویی با توجه به اینکه گیاهان هاپلوئید فقط یکسری کروموزومی‌دارند، بنابراین با انتقال ژن به بافت‌های هاپلوئید می‌توان انتظار داشت که پس از دو برابر کردن کروموزم‌های گیاه هاپلوئید بتوان گیاهان تراریخت مطلوب‌تر و با ثبات بیشتری را بدست آورد.

جدول شماره ۳: عکس العمل ژنوتیپ های پاسخ دهنده ذرت در محیط‌های 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	٪ ./۵	-	-	-	
S۶۱	٪ ۲	-	-	-	-
A۱۸۸	-	٪ ./۷۵	-	-	-
K۷۴/۱	-	-	٪ ۱	-	-
LA۱۲	-	٪ ۱/۵	٪ ۱/۵	-	-

پاورقی‌ها

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- Trangressive 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

Archive of SID
www.SID.ir

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 embyogenic 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

Archive of SID

www.SID.ir