

بررسی پاسخ به جنین‌زایی در کشت بساک ژنوتیپ‌های ذرت

Study on Embryogenesis Response of Maize (*Zea mays* L.) Genotypes to Anther Culture

سعید خاوری خراسانی^۱، احمد معینی^۲، امیر موسوی^۳ و محمد گلباشی^{۴*}

چکیده

تولید گیاهان هاپلوئید با استفاده از کشت بساک در برنامه‌های به‌نژادی و پژوهش‌های بنیادی گیاهان عالی از اهمیت زیادی برخوردار است. در این پژوهش قابلیت آندروژنز در پاسخ به کشت بساک ۴۴ ژنوتیپ ذرت و نیز اثر پیش‌تیمار سرمایی، نوع محیط کشت و جهت قرار دادن بساک‌ها روی محیط کشت بر میزان جنین‌زایی بررسی شد. نتایج اولیه کشت بساک‌ها نشان دهنده پاسخ مثبت فقط ۸ ژنوتیپ شامل ETH-M82 و LA12، A188، DH5×DH7، SC709، K74/1 TWC605، S61 در پاسخ به جنین‌زایی بود. به دلیل پاسخ ضعیف جنین‌زایی در اغلب ژنوتیپ‌های ذرت مورد بررسی در این پژوهش، برای انجام آزمایش‌های بعدی از دو ژنوتیپ برتر ETH-M82 و DH5×DH7 استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌ها در آزمایش اول نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها و محیط‌های کشت مورد بررسی از نظر تعداد ساختارهای شبه جنینی تشکیل شده، تفاوت معنی‌داری وجود داشت، ولی بین پیش‌تیمارهای سرمایی ۱۴ و ۲۱ روزه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. مقایسه میانگین‌ها در آزمایش دوم نشان داد که محیط کشت Yu-pei حاوی 90 mg l^{-1} ساکارز با تولید ۲۱/۸۲ ساختار شبه جنینی در ۱۰۰ بساک کشت شده، بهترین محیط کشت القای جنین‌زایی می‌باشد. در آزمایش سوم نیز معلوم شد که بهترین نحوه قرارگیری بساک‌ها روی محیط کشت از جهت لبه بساک می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کشت بساک، ساختار شبه جنینی، ذرت، گیاه هاپلوئید

۱. عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی

۲. دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳. عضو هیئت علمی پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک، تهران

۴. دانشجوی دکتری تخصصی نانوبیوتکنولوژی دانشگاه تهران

*: نویسنده مسوول

روش تولید درون شیشه‌ای گیاهان هاپلوئید مضاعف شده، اجازه‌ی دستیابی سریع به لینه‌های هموزیگوت را مهیا می‌کند و از این‌رو به‌طور قابل ملاحظه‌ای زمان لازم برای اصلاح هیبریدها را کاهش می‌دهد. در روش‌های کلاسیک به‌نژادی، حداقل ۶ نسل خویش‌آمیزی برای رسیدن به حد نساب هموزیگوتی زمان لازم است، ولی در روش تولید هاپلوئیدهای مضاعف شده طی یک نسل به هموزیگوتی کامل و صد در صد حاصل می‌شود (Pohelman, 1995; Buter et al., 1997; Shugar, 1998). به‌علاوه هاپلوئیدهای مضاعف تفرق نمی‌یابند و چون گیاهان هموزیگوت تفرق ندارند، کاربرد آن‌ها نیز راحت‌تر است و از خطرات مرتبط با زودآمیزی در طی خویش‌آمیزی کاسته می‌شود (Buter, 1997). استفاده از هاپلوئیدها، در برنامه‌های به‌نژادی به منظور تولید گیاهان کاملاً هموزیگوت در تعداد کمی از گونه‌های زراعی میسر شده است. البته تاکنون پژوهش‌گران از طریق هاپلوئیدهای مضاعف شده توانسته‌اند ارقام جدیدی از غلات به‌ویژه جو، ذرت، برنج و گندم را اصلاح و معرفی نمایند (Shugar, 1998). مثال‌هایی از کاربردهای متعدد هاپلوئیدها در تحقیقات بنیادی شامل تهیه نقشه و تجزیه‌های ژنتیکی، القای موتاسیون‌ها، تراریختی، کشت پروتوپلاست و دورگ‌گیری سوماتیکی، مطالعات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، تولید بذر مصنوعی و حفظ ژرم‌پلاسما می‌باشد (Aulinger, 2002). شایان ذکر است که در ذرت خصوصیات منحصر به فرد ژنتیکی لینه‌های هاپلوئید مضاعف نه تنها برای اصلاح هیبریدها مفید به‌نظر می‌رسد، بلکه برای کاربردهایی نظیر گزینش درون شیشه‌ای در جهت ایجاد مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، تهیه نقشه ژنی و تراریختی ژنتیکی حائز اهمیت می‌باشند (Aulinger, 2002).

کشت بساک یکی از ساده‌ترین و متداول‌ترین روش‌های تولید گیاهان هاپلوئید محسوب می‌شود و در بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی گزارش شده است (Buter, 1997). آندروژنز به‌وسیله کشت بساک ذرت اولین بار در اواخر دهه ۱۹۷۰ به‌ترتیب به‌وسیله Nitsch (1977) و گروه تحقیقاتی ۴۰۱ در چین گزارش شد و از آن به بعد این روش به‌طور قابل ملاحظه‌ای بهبود یافته است (Kuo et al., 1978). تولید ساختارهای شبه جنینی در ذرت از طریق کشت بساک برای اولین بار در سال ۱۹۷۴ توسط چینی‌ها گزارش شد (Genovesi and Collins, 1982)، ولی پیشرفت در کشت بساک ذرت به دلایل تعداد محدود ژنوتیپ‌های

بررسی پاسخ به جنین‌زایی در کشت بساک ژنوتیپ‌های ذرت

مستعد نر زایی، نیاز به یک محیط کشت غیر معمول (Genovesi and Collins, 1982; Barloy and Beckert, 1993)، فراوانی کم شبه جنین‌های تولید شده، راندمان پایین باززایی گیاه و خودگشتی ناموفق به‌منظور تولید بذر، روند آهسته‌ای داشته است (Barloy and Beckert, 1993). پیشرفت‌های اخیر در روش کشت بساک همچون جایگزینی مالتوز با ساکارز، آگارز با آگار، پیش تیمار، مانیتول، سرما و غیره گام‌های مثبتی در بهینه‌سازی این روش به شمار می‌آیند (Buter, 1997). عوامل مختلفی از قبیل ژنوتیپ، شرایط رشد گیاه مادری، مرحله نمو میکروسپورها (مرحله تک-هسته‌ای انتهایی تا اوایل دو هسته‌ای)، رژیم نوری، محیط کشت القای ساختارهای جنینی و شبه جنینی را در کشت بساک و سوسپانسیون میکروسپورهای ذرت تحت تاثیر قرار می‌دهند (Jahne and Lorz, 1995). ژنوتیپ گیاه شاید مهم-ترین عامل موثر بر نر زایی درون شیشه‌ای باشد. تولید هاپلوئیدها از طریق کشت بساک و میکروسپورهای ذرت و کاربرد آن‌ها به دلیل وابستگی شدید آن به ژنوتیپ (Dieu and Beckert, 1986; Baroy and Beckert, 1989) و میزان پاسخ پایین آن (Jahne and Pretova et al., 1993; Lorz, 1995; Genovesi and Collins, 1989) محدود شده است.

در بررسی واکنش ۱۵۹ ژنوتیپ ذرت به نر زایی، فقط ۹ ژنوتیپ واکنش مثبت به جنین‌زایی نشان دادند. به‌علاوه با استفاده از ژنوتیپ‌های برگزیده و بهبود محیط کشت، بیش-ترین پاسخ به نر زایی در بساک‌ها فقط ۷٪ بوده است (Genovesi and Collins 1982). در مطالعه دیگری ۸۰۰۰-۶۰۰۰ بساک در هر ژنوتیپ کشت شدند و پاسخ متفاوتی دیده شد، به‌نحوی که در بررسی ۱۰۰ لاین تجاری ژنتیکی غیر خویشاوند، ۵۰٪ ژنوتیپ‌ها توانستند ساختارهای شبه جنینی تولید نمایند. به‌علاوه فقط از ۳۰٪ از ژنوتیپ‌های مورد آزمون گیاهان سبز باززایی شدند (Barloy and Beckert, 1993).

کشت بساک ذرت در ایران، ابتدا توسط صولتی و همکاران در سال ۱۳۷۵ دانشگاه صنعتی اصفهان انجام گردید که به‌دلیل عدم واکنش ژنوتیپ‌های مورد بررسی به جنین‌زایی گزارشی در این‌باره منتشر نشده است. این پژوهش اولین گزارش موفقیت آمیز کشت بساک ذرت در ایران می‌باشد.

هدف از این پژوهش، مطالعه نر زایی در ژنوتیپ‌های ذرت و بررسی پاسخ به جنین‌زایی و باززایی گیاهی در کشت

بساک به‌منظور تولید گیاهان هاپلوئید می‌باشد تا به‌عنوان یک روش مکمل به‌توان روند برنامه اصلاح و معرفی هیبریدهای ذرت با عملکرد بالا و صفات برتر را تسریع نمود و از این ویژگی در مطالعات بنیادی به‌ویژه در تهیه نقشه‌های ژنتیکی و مکان‌یابی صفات استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، در بررسی اولیه ۴۴ ژنوتیپ به‌عنوان ماده گیاهی در طی ۳ سال زراعی ۱۳۸۲، ۱۳۸۳ و ۱۳۸۴ از نظر پاسخ به نر زایی درون شیشه‌ای در کشت بساک و تولید ساختارهای شبه جنینی مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱). بذرهای ژنوتیپ‌های مورد بررسی در برگ‌برنده طیف وسیعی از ژرم‌پلاسما ذرت موجود در بخش تحقیقات ذرت و گیاهان علوفه‌ای موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کشور بودند که شامل ۱۶ اینبردلاین ذرت، ۲۴ هیبرید سینگل

کراس و ۴ هیبرید تری وی کراس می‌باشند. بذرهای هیبرید سینگل کراس DH5×DH7 از موسسه تحقیقات INRA فرانسه و هیبرید ETH-M82 از موسسه تحقیقات ETH زوریخ کشور سوئیس دریافت گردید.

منشا اصلاحی بسیاری از لاین‌ها و هیبریدهای ذرت مورد استفاده در این پژوهش از جمعیت‌ها و توده‌های بومی مواد ژنتیکی دریافتی از سیمیت مکزیکی (مرکز تحقیقات بین‌المللی گندم و ذرت) و لاین‌های اصلاحی مکزیکی و آمریکای لاتین می‌باشد.

بذرهای ژنوتیپ‌ها در طی ۳ سال زراعی ۱۳۸۲، ۱۳۸۳ و ۱۳۸۴ در دو محیط مزرعه و اتاق رشد کنترل شده کشت گردیدند. در گلخانه بذر هر ژنوتیپ در گلدان‌های نایلونی به قطر ۲۰ cm و عمق ۲۸ cm و در مزرعه نیز به‌طور مداوم و هر دو هفته یک بار کشت شدند تا همواره دسترسی به گل آذین‌های نر برای کشت بساک باشد.

جدول ۱: اسامی ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی در کشت بساک ذرت

Table 1: List of maize genotypes used for anther culture

هیبرید Hybrid	هیبرید Hybrid	اینبرد لاین (والدین) Inbred line
KSC108 (S61 X TVA926)	TWC600	K9653/2
KSC301 (S61 X K722)	TWC603	K1263/1
KSC302 (K2331 X K1264/5-1)	TWC605	K3640/8
KSC340 (K2816 X K1263/1)	TWC647	K74/1
KSC403 (K'13 X K82/1)	S61×MO17	S61
KSC500 (R59 X OH43/1-42)	K19×S61	B73
KSC604 (B73 X K722)	BC182 *	K2331
KS647 (B73 X K1264/5-1)	BC288 *	K2816
KSC700 (K74/1 X K18)	BC385 *	LA12
SC701 (unknown)	OSSK444*	MO17
SC703 (unknown)	OSSK499 *	A188
KSC704 (B73 X MO17)	DH5 × DH7 (Doubled haploid)	K19
SC709 (unknown)	ETH-M24 (Doubled haploid)	OH43/42-1
SC720 (unknown)	ETH-M72 (Doubled haploid)	KE72012/12
	ETH-M82 (Doubled haploid)	TVA926

*= Commercial hybrids (unknown parents)

محیط جنین‌زایی

در این پژوهش از ۵ محیط کشت برای جنین‌زایی بساک‌ها شامل محیط‌های کشت (YP)، (Yp) Yu-Pei، (یا YP تغییر یافته N6 IMSS) و محیط کشت القای کالوس (CI) استفاده شد. شایان ذکر است که محیط‌های کشت Yu-Pei با پروتکل (Ku et al., 1981)، محیط کشت N6 (Chu et al., 1975) و IMSS (Saisintong et al., 1996) و محیط کشت CI طبق پروتکل (Nageli, 1998) تهیه شدند. محیط‌های YP، Yp، N6، جامد، محیط IMSS نیمه جامد و (CI) مایع بود. ترکیب محیط کشت IML مشابه با محیط کشت IMSS می‌باشد، با این تفاوت که کلشیسین در این محیط حذف شده و 1500 mg l^{-1} فیتاژل به آن اضافه گردیده است. بساک‌ها قبل از کشت در محیط نیمه جامد IMSS به مدت یک هفته در محیط کشت مایع IML و در دمای 10°C پیش تیمار شدند (Saisintong et al., 1996). میزان پاسخ ژنوتیپ‌ها به نر زایی از طریق شمارش تعداد ساختارهای شبه جنینی در ۱۰۰ بساک کشت شده در هر ژنوتیپ تعیین گردید.

باززایی گیاه

در این پژوهش از ۳ محیط کشت باززایی YPnase (Gaillard et al., 1991) و (Murashige and Skoog, 1962) و MS (Saisintong et al., 1996) استفاده شد. pH محیط در محدوده ۵/۷ تا ۵/۹ تنظیم گردید. پس از این که تعداد ساختارهای شبه جنینی (اعم از کالوس یا جنین) در هر پتری‌دیش شمارش شدند، شبه جنین‌ها به محیط کشت باززایی گیاه منتقل گردیدند. محیط‌های کشت باززایی گیاه شامل سه محیط کشت جامد YPnase (Gaillard et al., 1991)، MS (Murashige and Skoog, 1962) و RM (Saisintong et al., 1996) بود. در حدود ۴ الی ۶ هفته پس از کشت ساختارهای شبه جنینی روی محیط کشت باززایی، گیاهچه‌ها ظاهر گردیدند. گیاهچه‌های حاصله پس از تشکیل ریشه کافی به بستر کشت مناسب منتقل و در شرایط نوری با دوره ۱۶/۸ ساعت تاریکی/نور و شدت نور $150-100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ و دمای 25°C در اتاق رشد کنترل شده قرار گرفتند. یک الی ۲ هفته بعد، گیاهان به گلدان‌های بزرگ‌تر به ابعاد $22 \times 15 \text{ cm}$ حاوی خاک، ماسه و کود دامی به نسبت ۱:۱:۲ منتقل شدند. بعد گیاهچه‌های حاصل به اتاق رشد گیاهان مادری یعنی شرایط نور بیش‌تر $350-300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ و دوره نوری ۱۶/۸ ساعت و دمای

تعیین مرحله نمو دانه گرده

در هر دو محیط اتاق رشد کنترل شده و مزرعه، گل‌های نر در مرحله نمو مناسب میکروسپورها، مرحله تک-هسته‌ای میانی تا تک-هسته‌ای انتهایی (Nageli, 1998; Buter, 1997; Jahne and Lorz, 1995; pretova et al., 1993) یا مرحله نمو تک-هسته‌ای میانی تا اوایل دو هسته‌ای میکروسپورها (Aulinger, 2002; Mac Donald, 1992) برداشت شدند. مرحله نمو میکروسپورها به وسیله رنگ‌آمیزی با استوکارمن ۲٪ (Nageli, 1998) و سپس مشاهده با میکروسکوپ معکوس Olympus مدل IX71 (TH4-200) تعیین گردید. اغلب پژوهش‌گران زمان مناسب برداشت گل-های نر از نظر مورفولوژیکی، مرحله پیش از خروج گل نر از داخل غلاف برگ پرچمی دانسته‌اند (Aulinger, 2002; Nageli, 1998; Buter, 1997; Jardinaud et al., 1995).

پیش تیمار بساک‌ها

پس از برداشت گل آذین نر در مرحله مناسب از نظر نمو، آن‌ها در داخل دستمال کاغذی مرطوب و سپس فویل آلومینیومی قرار داده و برای اعمال شوک سرمایی به مدت ۱۴ روز دمای 8°C به یخچال منتقل شدند (Buter, 1997). پس از اعمال پیش تیمار سرمایی، ضدعفونی سنبلیچه‌ها با استفاده از محلول سدیم هیپوکلریت ۲-۱٪ (V/V) انجام گردید. به منظور افزایش راندمان جنین‌زایی بساک‌ها، سنبلیچه‌ها در محیط مایع پیش‌کشت (که ترکیبات آن شامل 1 mg l^{-1} $10/9/3$ مانیتول، 50 mg l^{-1} آل-اسکوربیک اسید، 1 mg l^{-1} $10/5$ نیکوتینیک اسید، 1 mg l^{-1} $0/1$ بیوتین، 1 mg l^{-1} $0/5$ نیترات نقره و 125 mg l^{-1} آل-پرولین با pH ۵/۸ می‌باشد) قرار گرفتند و در دمای 8°C در یخچال به مدت ۳ روز دیگر پیش-تیمار شدند (Nageli, 1998; Buter, 1997; Jahne and lorz, 1995; Genovesi and Yingling, 1990; Pretova, 1993).

کشت بساک‌ها

پس از انجام مراحل ضدعفونی سنبلیچه‌ها، بساک‌ها توسط پنس از گلچه‌ها خارج و برای کشت آن‌ها از پتری‌های یکبار مصرف به ابعاد $15 \times 60 \text{ mm}$ که حاوی ۸ ml محیط کشت مایع یا جامد می‌باشد، استفاده گردید. در هر پتری دیش ۲۵ بساک کشت شدند و سپس پتری‌ها پس از درز گیری با ۲ دور پارافیلیم در دمای 27°C و در تاریکی قرار داده شدند.

۲۵/۱۸ (شب/روز) منتقل گردیدند تا گیاهان حاصله بالغ شده و اندام‌های زایشی و احتمالاً بذر در آن‌ها تشکیل گردد.

تعیین سطح پلویدی گیاهان باززایی شده

به‌منظور تعیین سطح پلویدی گیاهان باززایی شده ذرت، ابتدا از روش شمارش کروموزوم‌های مریستم نوک ریشه گیاهان باززایی شده استفاده شد. نظر به این‌که تعیین سطح پلویدی ذرت با استفاده از روش شمارش کروموزوم-های مریستم نوک ریشه، روشی وقت‌گیر می‌باشد، در این پژوهش فقط سطح پلویدی تعداد معدودی از نمونه‌ها با این روش تعیین شد و کلیه ارزیابی‌های سطح پلویدی گیاهان باززایی شده در این پژوهش، با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر مدل Partec I در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی انجام گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصله از بررسی پاسخ آندروژنیک ژنوتیپ‌های مختلف ذرت به کشت بساک در جدول (۲) آمده است. در این بررسی از بین ۴۴ ژنوتیپ مورد بررسی، تنها ۸ ژنوتیپ (۱۸/۶٪ از ژنوتیپ‌ها) شامل DH5×DH7، ETH-M82، A188، S61، LA12، K74/1 (ذرت شیرین)، TWC605 و SC709 پاسخ مثبت نشان دادند. از طرفی فقط هیبرید DH5×DH7 یعنی ۲/۶٪ از ژنوتیپ‌ها پاسخ خوب نشان دادند. در مقایسه واکنش آندروژنیک گیاهان جو، گندم و ذرت معلوم شد که در ذرت از بین ۴۰ و ۵۵ ژنوتیپ مورد بررسی به ترتیب فقط ۳ و ۴ ژنوتیپ پاسخ خوبی به کشت بساک و میکروسپور نشان دادند. منظور از عکس‌العمل خوب تشکیل حداقل ۱۰ ساختار شبه جنینی در کشت ۱۰۰ بساک می-باشد، در صورتی‌که در جو ۱۰۰٪ و در گندم بیش از ۷۷٪ ژنوتیپ‌های مورد بررسی به کشت بساک عکس‌العمل مناسب نشان دادند (Buter, 1997). در بررسی کشت بساک ۲۷ ژنوتیپ ذرت، ۱۷ ژنوتیپ مورد بررسی به کشت بساک پاسخ مثبت دادند، به‌طوری‌که فراوانی تولید جنین فقط در ۹ ژنوتیپ مورد بررسی حدود ۱٪ بود و لاین‌های R16، Pa91، H99 و نیز هیبرید H99×FR16 (H99×Pa91) به‌عنوان بهترین ژنوتیپ‌ها معرفی شدند (Petolino and Jones, 1986). میانگین تولید ساختارهای شبه جنینی در هیبرید DH5×DH7، در این پژوهش، ۱۷/۶٪ بود (جدول ۲). میانگین

تولید ساختارهای شبه جنینی در ژنوتیپ مذکور در آزمایشات پژوهش‌گران قبلی از ۱/۶٪ تا ۳۶٪ (۲) و ۴۹٪ (۳) متغیر می‌باشد در این پژوهش میانگین بالاتر تولید ساختارهای شبه جنینی در ژنوتیپ DH5×DH7 با استفاده از محیط کشت مایع IML و سپس محیط کشت نیمه جامد IMSS، (۱۷/۶٪) نسبت به محیط کشت جامد YPm (۸٪)، می‌تواند متاثر از ترکیب متفاوت محیط کشت آن‌ها باشد. وجود کلشیسین در محیط کشت مایع IML (به میزان mgL^{-1} ۲۵۰^۱ به مدت یک هفته) طبق نظر برخی پژوهش‌گران می-تواند تاثیر مثبت و قابل توجهی در بهبود جنین‌زایی و باززایی گیاه داشته باشد (Wan and Widholm, 1993). برخی پژوهش‌گران معتقدند که کلشیسین به تنهایی می‌تواند عاملی باشد که جنین‌زایی را در کشت بساک ذرت تحریک یا آغاز نماید (Obert and Barnábas, 2004). در این پژوهش، میانگین ساختارهای شبه‌جنینی حاصل از کشت بساک ژنوتیپ ETH-M82، ۸٪ برآورد گردید (جدول ۲).

آلینگر (Aulinger, 2002) فراوانی تولید ساختارهای شبه جنینی در ژنوتیپ ETH-M82 را بین ۵/۸٪ تا ۱۵/۵٪ گزارش نمود. در این پژوهش تنها ژنوتیپ ETH-M82 توانست در ۳ محیط کشت متفاوت IMSS، YPm و CI پاسخ مثبت نشان دهد. مهم‌ترین خصوصیت محیط کشت YP سطح بالای ساکارز، وجود ذغال فعال و ازت معدنی به شکل کازبین هیدرولیزات بیان کرده‌اند (Genovesi and Collins, 1982). محیط کشت CI برای کال‌زایی در کشت بساک‌ها مناسب است، زیرا در ترکیب این محیط کشت هورمون اکسین 2,4,D به میزان mgL^{-1} ۲ به کار رفته است، در صورتی‌که در محیط‌های دیگر کشت بساک ذرت نه تنها از هورمون اکسین استفاده نشده است، بلکه آنتی‌اکسین TIBA نیز به کار رفته است (جدول ۲).

به‌نظر می‌رسد مصرف آنتی‌اکسین در کشت بساک ذرت احتمالاً به‌دلیل میزان بالای هورمون‌های داخلی بافت کشت شده باشد (Aulinger, 2002). هیبریدهای تری‌وی-کراس TWC605 و سینگل کراس SC709 به ترتیب با فراوانی‌های ۱/۵٪ و ۵/۵٪، فقط در محیط کشت IMSS عکس‌العمل نشان دادند. همان‌طوری‌که قبلاً ذکر شد بساک-های این ژنوتیپ‌ها ابتدا در محیط کشت مایع IML حاوی mgL^{-1} ۲۵۰ کلشیسین پیش‌تیمار شدند و سپس به محیط کشت نیمه جامد IMSS بدون کلشیسین انتقال یافتند.

جدول ۲: عکس‌العمل آندروژنز در ژنوتیپ‌های پاسخ‌دهنده ذرت در محیط‌های کشت استفاده شده

Table 2: Response of responsive genotypes to androgenesis at various anther culture media

ژنوتیپ Genotype	محیط کشت Culture media				
	IMSS	N6	YPm	YP	CI
DH5×DH7	17/6%		8%		-
ETH-M82	8/5%	-	2%	-	2%
TWC 605	1/5%	-	-	-	-
SC 709	0/5%	-	-	-	-
S61	2%	-	-	-	-
A188	-	0/75%	-	-	-
K74/1	-	-	1%	-	-
LA12	-	1/5%	1/5%	-	-

IMSS: Induction Medium Semi Solid

CI: Callus Induction

YPm: Modified YP Medium

ETH-M82 که در این آزمایش عکس‌العمل خوبی داشته‌اند به سایر ژنوتیپ‌های برگزیده نظیر لاین‌های تجاری MO17، B73 و S61 قابل انتقال باشد.

نتایج آزمایشات پاسخ به جنین‌زایی در کشت بساک ذرت:

آزمایش اول: بررسی اثر محیط کشت و پیش‌تیمار سرمایی بر القای جنین‌زایی در کشت بساک ژنوتیپ‌های ذرت

در این آزمایش اثر ۵ محیط کشت بساک مختلف (شامل محیط‌های کشت IMSS, Ypm, N6, Yu-Pei IMS و دو پیش‌تیمار سرمایی (۱۴ و ۲۱ روز نگهداری بساک‌ها در دمای ۸°C در یخچال) بر القای جنین‌زایی در دو هیبرید ETH-M82 و DH5×DH7 بررسی شد. این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام گردید. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها و نیز بین محیط‌های کشت مورد بررسی از نظر تعداد ساختارهای شبه‌جنینی تشکیل شده، تفاوت معنی‌دار وجود داشت، ولی بین پیش‌تیمار سرمایی ۱۴ و ۲۱ روزه تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد (جدول ۳). در رابطه با تاثیر پیش‌تیمار سرمایی، Tsay و همکاران (۱۹۸۶) تیمار سرمایی ۹-۶ روزه را در دمای ۹°C به همراه ۹٪ ساکارز در محیط کشت را نسبت به تیمار سرمایی ۱۲ روزه برتر دانسته‌اند (Tsay et al., 1986)، در صورتی‌که دیگر پژوهش‌گران (Aulinger, 2002; Nageli, 1998)، تیمار سرمایی ۱۴ روزه را مناسب دانسته‌اند. برخی از پژوهش‌گران نیز تیمار سرمایی ۲۸-۲۱ روز در دماهای مختلف را بررسی کرده‌اند، لیکن به-

میزان عکس‌العمل ژنوتیپ A188 در محیط N6، ۷۵٪ بود که حاکی از عکس‌العمل ضعیف آندروژنیک آن می‌باشد. ویژگی محیط کشت N6 در این پژوهش، تنها میزان بالای ساکارز (۱۲۰ gL⁻¹) آن می‌باشد که می‌تواند تا حدی توجیه‌کننده عکس‌العمل این ژنوتیپ در محیط مذکور باشد. اینبرد لاین A188 به‌عنوان یک لاین غیر پاسخ‌دهنده از نظر کشت بساک معرفی شده است. (Genovesi and Collins, 1982) اینبرد لاین A188 همراه با اینبرد لاین‌های B73 و MO17 به‌عنوان ژنوتیپ‌هایی طبقه‌بندی گردید که یا به آندروژنز پاسخ نداده‌اند یا این‌که پاسخ بسیار ضعیفی داشته‌اند. در این پژوهش، هم اینبرد لاین‌های B73 و MO17 و نیز هیبرید آن‌ها، یعنی KSC704 هیچ‌گونه عکس‌العملی نشان ندادند و این یافته‌ها با نتایج (Genovesi and Collins, 1982) و (Petolino and Jones, 1986) مطابقت دارد.

واکنش ژنوتیپ‌های K74/1 در محیط کشت YPm حدود ۱٪ بود، در صورتی‌که لاین ذرت سفید شیرین (LA12) با متوسط فراوانی ۱/۵٪ توانست در دو محیط کشت N6 و YPm ساختارهای شبه‌جنینی تشکیل دهد. دیگر ژنوتیپ‌های مورد بررسی پاسخ مثبتی نشان ندادند. نبود پاسخ آندروژنیک در سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این پژوهش می‌تواند نقش ژن‌ها در کنترل صفت آندروژنز را به وضوح نشان داد. اکثر پژوهش‌گران معتقدند که خصوصیات آندروژنیک به‌صورت ژنتیکی کنترل می‌شود و این خصوصیت مطمئناً مغلوب نیست (Barloy and Beckert, 1993). بنابراین می‌توان انتظار داشت خصوصیات آندروژنیک از ژنوتیپ‌های بسیار پاسخ‌دهنده نظیر DH5×DH7 و

را داشت. محیط کشت IMS به صورت مایع می‌باشد و مشاهدات این پژوهش نشان می‌دهد که فراوانی القای جنین‌زایی در محیط‌های کشت مایع به دلیل امکان دسترسی بهتر به مواد غذایی موجود در محیط کشت نسبت به محیط‌های کشت جامد برای بساک ذرت بیشتر می‌باشد (شکل ۱).

دلیل متفاوت بودن مواد گیاهی و شرایط محیطی کشت، نتایج حاصله با هم تفاوت زیادی داشته و بعضاً متناقض‌اند. محیط کشت مایع IMS با میانگین ۱۵/۰۵ ساختار شبه-جنینی در ۱۰۰ بساک کشت شده، بیش‌ترین میزان را به خود اختصاص داد، در صورتی‌که محیط کشت N6، با ۳/۷۲۶ ساختار شبه-جنینی در ۱۰۰ بساک کشت شده کم‌ترین مقدار

جدول ۳: تجزیه واریانس محیط‌های کشت بساک مورد بررسی از نظر تعداد ساختارهای شبه جنینی تشکیل شده در ژنوتیپ‌های ذرت

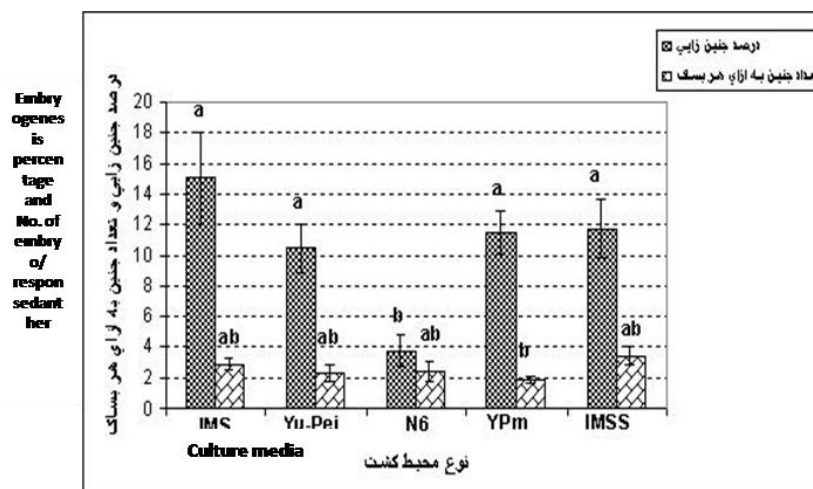
Table 3. Analysis of variance for embryo-like structures (ELs) of maize genotypes on different anther culture media

منبع تغییرات Source of Variation	درجه آزادی Degree of Freedom	میانگین مربعات Mean of square	تعداد ELS در هر بساک پاسخ داده No. of ELs / Responed Anthers
رقم Variety	1	938/012**	2/013**
محیط کشت Culture media	4	345/667**	0/011*
پیش تیمار سرمایی Cold Pre- Treatment	1	122/044 ^{n.s}	0/004 ^{n.s}
رقم × محیط کشت Variety × Culture media	4	179/563*	0/004 ^{n.s}
رقم × سرما Variety × Culture media	1	12/355 ^{n.s}	0/001 ^{n.s}
محیط کشت × سرما Variety × Culture media	4	6/044 ^{n.s}	0/007 ^{n.s}
رقم × محیط کشت × سرما Variety × Culture media × Cold Pre-Treatment	4	92/925 ^{n.s}	0/006 ^{n.s}
خطا Error	80	59/630	0/004
کل Total	99		
CV (%)		20/61	2/44

res ELs: Embryo

ELS: ساختارهای شبه جنینی

** و *: اختلاف آماری معنی‌دار به ترتیب در سطح احتمال آماری ۱٪ و ۵٪. n.s: اختلاف آماری غیر معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪. ns, * and **: not significant, significant at 5% and 1% level of probability, respectively.



شکل ۱: اثر نوع محیط کشت بر درصد جنین‌زایی و تعداد جنین به ازای هر بساک پاسخ داده ذرت
Fig1: Effect of culture media on embryogenesis percent and number of embryos / responded anthers of maize

بررسی پاسخ به جنین‌زایی در کشت بساک ژنوتیپ‌های ذرت

بازدارنده‌ی محیط است که در طی فرآیند اتوکلاو شدن تولید گردیده است.

آزمایش دوم: بررسی اثر کربوهیدرات‌ها بر پاسخ به جنین‌زایی در کشت بساک ذرت

در این آزمایش اثر، نوع و میزان کربوهیدرات‌ها شامل ۵ تیمار کربوهیدرات 45 g l^{-1} ساکارز + 45 g l^{-1} مالتوز، 60 g l^{-1} ساکارز، 90 g l^{-1} ساکارز، 90 g l^{-1} مالتوز و 120 g l^{-1} ساکارز در محیط کشت مایع Yu-pei بر پاسخ به جنین‌زایی ژنوتیپ DH5×DH7 ذرت در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۸ تکرار بررسی شد. شایان ذکر است که معیار انتخاب مقادیر کربوهیدرات مورد استفاده در این آزمایش، بر اساس محیط کشت‌های متداول مورد استفاده در کشت بساک ذرت بوده است. نتایج تجزیه واریانس حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین نوع و غلظت کربوهیدرات‌ها بر پاسخ به جنین‌زایی بساک‌ها می‌باشد (جدول ۴).

مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که محیط کشت Yu-pei حاوی 90 g l^{-1} ساکارز با تولید ۲۱/۸۲ ساختار شبه‌جنینی در ۱۰۰ بساک کشت شده، بهترین محیط کشت القای جنین‌زایی برای ژنوتیپ DH5×DH7 می‌باشد. ضمناً محیط کشت Yu-pei که حاوی 60 g l^{-1} ساکارز، می‌باشد با تولید ۱۸/۰۹ شبه‌جنین در ۱۰۰ بساک کشت شده، تفاوت معنی‌داری با محیط کشت حاوی 90 g l^{-1} ساکارز نداشت. بساک‌های کشت شده در محیط کشت‌های حاوی 45 g l^{-1} ساکارز + 45 g l^{-1} مالتوز و نیز محیط کشت حاوی 120 g l^{-1} ساکارز به‌ترتیب با ۷/۶۱ و ۸/۱۴ ساختار شبه‌جنینی در ۱۰۰ بساک کشت شده، ضعیف‌ترین پاسخ را نشان دادند (شکل ۲).

در خصوص پاسخ ضعیف محیط کشت N6 در القای جنین‌زایی، به‌نظر می‌رسد میزان بالای ساکارز یعنی 120 g l^{-1} در محیط کشت می‌تواند عامل محدود کننده‌ای باشد، با توجه به این که مصرف 60 g l^{-1} تا 90 g l^{-1} ساکارز در محیط‌های کشت القای جنین‌زایی متداول بوده و توصیه شده است (Aulinger, 2002; Nageli, 1998). شایان ذکر است که اصولاً محیط کشت مبتنی بر فرمولاسیون محیط کشت N6 (Chu, 1981) و یا محیط کشت Ypm (Ku et al., 1981) با 10^{-4} M FeEDTA تقویت شده باشد، به‌طور معمول برای کشت بساک ذرت مورد استفاده قرار گرفته است (Buter, 1997).

در این پژوهش نیز از محیط‌های کشت N6 و Yu-Pei (YP) و یا تغییر یافته آن‌ها استفاده گردید. نکته حایز اهمیت دیگر آن است که محیط‌های IMS، IMSS و YP توسط فیلتر استریل و محیط‌های N6، Ypm با اتوکلاو کردن استریل شدند. به‌علاوه محیط‌های کشت IMS، IMSS حاوی زغال فعال نیز هستند. فیلتر استریل کردن محیط کشت که برای ضد عفونی محیط‌های کشت مایع انجام می‌شود توانسته است فراوانی ساختارهای شبه جنینی را در مقایسه با اتوکلاو کردن محیط کشت القا افزایش دهد (Buter et al. 1993; MacDonald, 1992).

این تفاوت به‌دلیل تشکیل مواد بازدارنده در طی هیدرولیز ساکارز یا کربوهیدرات‌های دیگر در زمان اتوکلاو کردن است، زیرا محیط کشت در معرض درجه حرارت‌های بالا قرار می‌گیرد (Buter et al. 1993). در این پژوهش محیط کشت IMS نسبت به محیط کشت‌های دیگر یعنی Ypm و N6 که تنها اتوکلاو شده اند، برتری داشت. به‌نظر می‌رسد مزیت اولیه زغال فعال در محیط کشت جذب مواد

جدول ۴: تجزیه واریانس بررسی اثرات کربوهیدرات‌ها بر القای جنین‌زایی در کشت بساک ذرت ژنوتیپ DH5×DH7
Table 4: Analysis of variance for carbohydrates effects on embryogenesis induction of DH5 ×DH7 maize genotype anther culture

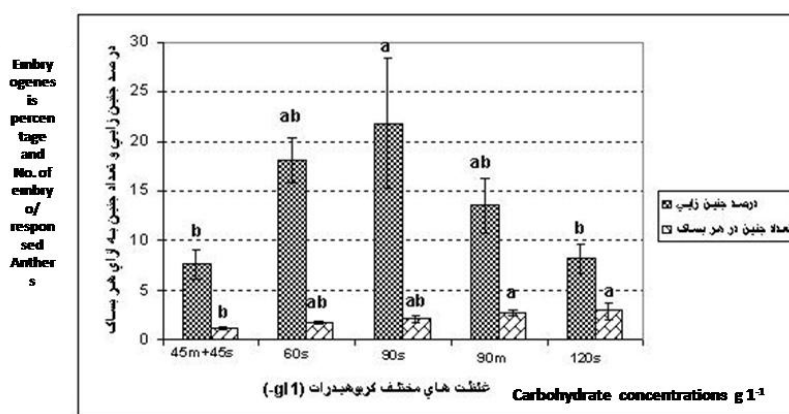
منبع تغییرات Source of Variation	درجه آزادی Degree of Freedom	میانگین مربعات Mean of Squire	تعداد ELS در هر بساک پاسخ داده No. of ELSs/ Resonsed Anthers
کربوهیدرات Carbohydrate	4	306/307*	40/04 *
خطا Error	35	97/955	1/512
کل Total CV (%)	39	25/56	5/8

** و *: اختلاف آماری معنی‌دار به‌ترتیب در سطح احتمال آماری ۱٪ و ۵٪. ns: اختلاف آماری غیر معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪.

ELS: ebryo like structures

ELS: ساختارهای شبه جنینی

ns, * and **: not significant, significant at 5% and 1% level of probability, respectively.



شکل ۲: اثرات کربوهیدرات بر درصد جنین‌زایی و تعداد جنین در هر بساک پاسخ داده ذرت

Fig 2: The effects of carbohydrate on embryoogenesis percent and number of embryos /responded anthers of maize

بررسی اثر غلظت‌های مختلف ساکارز در محیط کشت N6 بساک ذرت نشان داد که در غلظت ۳٪ ساکارز هیچ یک از بساک‌های کشت شده شبه‌جنین تولید نکردند، ولی در غلظت ۶٪ و ۹٪ ساکارز به ترتیب ۹٪ و ۱۲٪ از بساک‌ها تولید ساختارهای شبه‌جنینی نمودند. با افزایش غلظت ساکارز به ۱۲٪ و ۱۵٪، پاسخ تا حد تولید ۵٪/۰ ساختار شبه جنینی در ۱۰۰ بساک کشت شده کاهش یافت (Tsay et al. 1986). نتایج حاصله از این پژوهش با نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های (1998; Tsay, et al. 1986 Buter et al. 1993; Nageli,) مطابقت دارد، اما غلظت ۱۲٪ ساکارز که توسط (Genovesi and collines, 1982) و نیز (Obert and Barnábas, 2004)، برای کشت بساک برخی ژنوتیپ‌های ذرت توصیه شده است، در ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این آزمایش مطلوب نمی‌باشد.

آزمایش سوم: بررسی تاثیر نحوه قرارگیری بساک‌ها بر روی محیط کشت القای جنین‌زایی

در این آزمایش اثر سه نحوه قرارگیری بساک‌ها روی محیط کشت (شامل کشت بساک‌ها از جهت لبه بر روی محیط کشت، کشت از پهنای بساک و کشت به صورت تصادفی (معمولی) بر میزان القای جنین‌زایی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۵ تکرار بررسی شد. محیط کشت مورد استفاده (Jardinaud et al. 1995a) حاوی ۶۰ g l⁻¹ Ypm (تجزیه واریانس نشان داد که با وجود برتری تیمار نحوه قرارگیری بساک‌ها از جهت لبه بر روی محیط کشت، بین تیارهای اعمال شده تفاوت معنی‌داری از نظر میزان القای جنین‌زایی وجود ندارد (جدول ۵).

Tsay و همکاران (1986) در بررسی تاثیر عوامل موثر بر باززایی گیاهان هاپلوپدید از طریق کشت بساک ذرت دریافتند که ۹٪ ساکارز در محیط کشت N6 می‌تواند نسبت به ۳، ۶، ۱۲ و یا ۱۵ درصد ساکارز بهتر باشد. نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نیز با نتایج (Tsay et al. 1986; Buter,) (1993; Nageli, 1998; Aulinger, 2002) مطابقت دارد.

هم‌چنین پژوهش‌ها نشان داده است که کربوهیدرات ساکارز بهترین نتیجه را در القای جنین‌زایی ذرت دارد، گرچه غلظت‌های ۶٪ تا ۱۵٪ توصیه شده‌اند، اما در اکثر آزمایش‌ها معلوم شده که غلظت ۹٪ ساکارز مطلوب می‌باشد، با این وجود برای برخی از ژنوتیپ‌ها غلظت ۱۲٪ ساکارز علی‌رغم اختلاف غیر معنی‌دار آماری بهتر به نظر می‌رسد (Genovesi and Collins, 1982).

بررسی نتیجه تاثیر کربوهیدرات بر صفت تعداد ELS در هر بساک نشان داد که محیط کشت حاوی ۱۲۰ g l⁻¹ ساکارز، با میانگین ۲/۹۱ ساختار شبه‌جنینی در هر بساک کشت شده، بیش‌ترین میزان را داشت، البته محیط کشت حاوی ۹۰ g l⁻¹ ساکارز یا مالتوز و نیز محیط کشت دارای ۶۰ g l⁻¹ ساکارز هم از نظر تعداد ELS تولید شده در هر بساک، تفاوت معنی‌داری را با محیط کشت حاوی ۱۲۰ g l⁻¹ ساکارز نشان ندادند. با توجه به نتایج متفاوت به‌دست آمده در این بخش نسبت به بخش قبلی، به نظر می‌رسد صفت درصد بساک‌های القا شده برای جنین‌زایی با تعداد ELS در هر بساک رابطه مثبتی ندارد، بلکه حتی احتمال می‌رود در شرایطی که تعداد بساک کم‌تری برای جنین‌زایی القا شده باشند، به دلیل رقابت کم‌تر، ساختارهای شبه‌جنینی حاصله به تعداد بیش‌تری ظاهر شوند و یا از اندازه بزرگ‌تری در مقایسه با زمانی که تعداد بساک بیش‌تری پاسخ نشان داده اند، برخوردار می‌باشند.

جدول ۵: تجزیه واریانس تاثیر نحوه قرارگیری بساک‌های ذرت بر روی محیط القای جنین‌زایی

Table 5: Analysis of variance for the effects of maize anthers position on induction medium

میانگین مربعات Means of Squires		درجه آزادی Degree of Freedom	منبع تغییر Source of Variation
تعداد ELS در هر بساک پاسخ داده No. of ELSs / Responed Anthers	بساکهای پاسخ داده (%) Responed Anthers (%)		
^{ns} 0/284	^{ns} 5/056	2	نحوه کشت بساک kind of Anther Culture
1/470	4/944	15	خطا Error
12/52	22/20	17	کل Total CV (%)

ns: اختلاف آماری غیر معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

ns: not significant.

ELS: embryo like structures

ELS: ساختارهای شبه جنینی

معمولی و کشت از جهت پهنا به ترتیب ۶/۰ و ۵/۱ ساختار شبه جنینی تولید گردید. به علاوه میانگین تعداد ساختار شبه جنینی در هر بساک در تیمارهای نحوه قرارگیری بساک‌ها بر روی محیط کشت تفاوت غیر معنی‌دار داشتند، به طوری که تیمار کشت بساک از لبه با ۲/۲۸۶ بیش‌ترین و تیمار کشت تصادفی با ۱/۸۵۳ ساختار شبه جنینی در هر بساک کم‌ترین تعداد ساختار شبه جنینی را داشتند.

از آن‌جایی که درون هر بساک تعدادی بسیار زیادی میکروسپور وجود دارد، بنابراین به‌منظور تولید جنین یا ساختارهای شبه جنینی در کشت بساک‌ها، انتظار می‌رود که رقابت شدیدی بین میکروسپورهای درون هر بساک به‌وجود آید. پس در روش کشت بساک از جهت لبه بر روی محیط کشت، با توجه به این‌که میکروسپورهای کمتری در تماس با محیط کشت قرار می‌گیرند، انتظار می‌رود بتوانند به خوبی رشد و نمو یافته و به سوی تشکیل ساختارهای شبه جنینی پیش روند. ضمناً جذب و توزیع مواد غذایی ممکن است که با نحوه قرار گرفتن بساک‌ها بر روی محیط کشت مرتبط باشد.

ارزیابی باززایی گیاه از کشت بساک ذرت: باززایی گیاه از کشت بساک دو ژنو تیپ DH5 × DH7 و ETH – M82 با موفقیت و با فراوانی مطلوبی صورت پذیرفت. شایان ذکر است که فراوانی القای ساختارهای شبه جنینی در سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این پژوهش بسیار کم بود و هیچ‌یک از جنین‌های حاصله نیز باززایی نشدند. محیط باززایی گیاهی برای جنین‌های هاپلوئید در این پژوهش در سه محیط (Jardinaud, 1995) Ypnase (Murashige and Skoog, 1962) MS و (Saisingdong, 1996) RM بود. نتایج بررسی‌ها

بر اساس نتایج به‌دست آمده در هر دو صفت مورد بررسی، یعنی درصد بساک‌های پاسخ نشان داده و نیز تعداد ELS در هر بساک پاسخ داده، معلوم گردید که بهترین وضعیت قرارگیری بساک‌ها بر روی محیط کشت، از جهت لبه بساک می‌باشد و در درجه بعدی کشت بساک‌ها به‌طور تصادفی (معمولی) مطلوب می‌باشد، به طوری که درصد بساک‌های پاسخ نشان داده در کشت از جهت لبه ۴/۳۲ و در کشت معمولی ۳/۳۳ بود، لیکن در نحوه کشت از طرف پهنا، فقط ۲/۵٪ از بساک‌ها به جنین‌زایی پاسخ مثبت نشان دادند.

در بررسی عوامل مؤثر بر باززایی گیاهان هاپلوئید از طریق کشت بساک ذرت گزارش شد که جهت قرارگیری بساک‌ها از جهت لبه یا پهنا بر روی محیط کشت جنین‌زایی، تشکیل بیشتر ساختارهای شبه جنینی را تحریک می‌کند. به‌علاوه در پیش تیمارهای مطلوب دمایی و شرایط مناسب محیط کشت، بیش از ۱۲٪ از بساک‌های کشت شده توانستند شبه جنین تولید نمایند (Tsay et al. 1986). نتایج حاصله از این پژوهش با پژوهش‌ها (Tsay et al. 1986) مطابقت و هماهنگی دارد. البته شایان ذکر است که تفاوت موجود بین تیمارهای این آزمایش از نظر آماری غیر معنی‌دار می‌باشد، لیکن روند برتری تیمارها نسبت به هم کاملاً مشابه با نتایج Tsay و همکاران می‌باشد. لازم به توضیح است که در رابطه با نحوه قرارگیری بساک‌ها بر روی محیط کشت گزارش دیگری ارائه نشده است. در رابطه با صفت تعداد ELS در هر بساک نیز تفاوت‌های موجود بین تیمارهای اعمال شده در این تحقیق غیر معنی‌دار برآورد گردید، به طوری که در تیمار کشت بساک از جهت لبه، بساک‌ها توانستند ۸/۸۳ ساختار شبه جنینی تولید نمایند، در صورتی که در تیمار کشت

حاکمی از عدم مطلوبیت محیط RM توصیه شده توسط (Saisintong *et al.* 1996) جهت باززایی گیاه در ژنوتیپ های مورد بررسی در این پژوهش بود، به نحوی که رشد ساختارهای شبه جنینی حاصله از کشت بساک در این محیط پس از مدت زمان ۴ الی ۸ هفته متوقف شد و سپس ساختارهای شبه جنینی نکروزه شده و از بین رفتند. از سویی با ارزیابی مشاهده ای پاسخ بساک ها در محیط های کشت باززایی گیاه، معلوم شد که محیط Ypnase جهت باززایی از مطلوبیت بیشتری نسبت به محیط های کشت MS و RM برخوردار است. برخی پژوهشگران نظیر (Hassan *et al.* 2001)، با استفاده از محیط های کشت رایج برای بساک ذرت نظیر N6 و Yu-Pei و تغییر در ترکیب هورمونی محیط های کشت جنین زایی، باززایی مستقیم گیاهچه را در کشت بساک ذرت گزارش نموده اند. در این پژوهش ژنوتیپ های DH5×DH7 و ETH-M82 توانستند در مواردی در محیط کشت IMS یا Yu-Pei به طور مستقیم تولید ریشچه و ساقچه و متعاقب آن گیاهچه نرمال نمایند. بنابر این، قابلیت باززایی مستقیم در محیط کشت القای جنین وجود دارد.

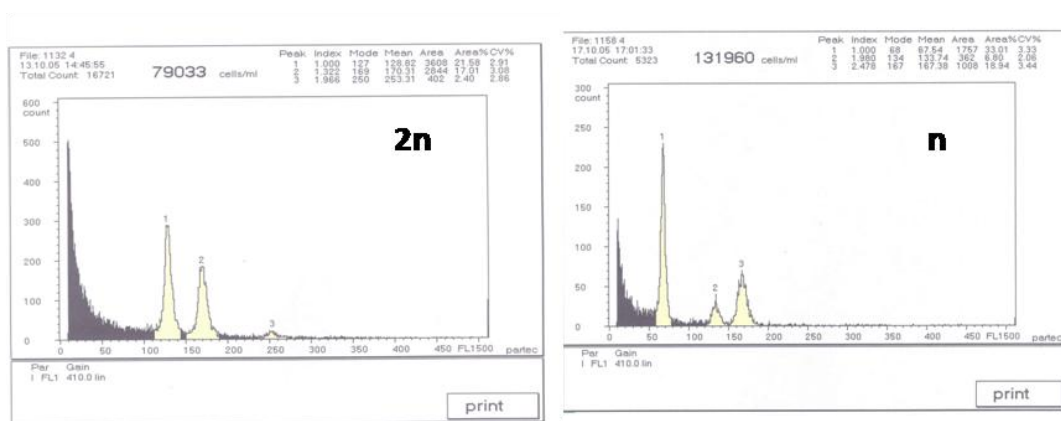
تعیین سطح پلوییدی گیاهان باززایی شده از طریق

کشت بساک: بر طبق نتایج پژوهش ها انجام شده (Aulinger, 2002)، میزان Fl_1 Gain Par (فلورسانس نسبی) مناسب دستگاه فلوسایتومتر، برای نمونه های ذرت حدود ۴۰۰ می باشد، و نقطه Fl_1 Peak و Fl_1 ۲۰۰ به ترتیب مراحل G1 و G2 یا M (تقسیم میتوز) می باشند، به طوری که این نقاط به عنوان ماده گیاهی دیپلوئید یا هاپلوئید مضاعف شده تفسیر می شود، در صورتی که نقطه های Peak بین Fl_1 ۵۰ و Fl_1 ۱۰۰ به عنوان مواد گیاهی هاپلوئید شناخته می شود. شایان ذکر است که در این پژوهش Fl_1 Gain Par مناسب به طور تجربی حدود ۳۹۰ برآورد شد، بنابراین تمامی نمونه ها به صورت یک نواخت بر اساس همین معیار با دستگاه بررسی شدند. شکل ۳ نمونه ای از شکل های فلوسایتومتری مربوط به دو نمونه گیاه هاپلوئید و دیپلوئید ذرت را نشان می دهد. از گیاه جعفری به عنوان استاندارد در کنار نمونه های ذرت استفاده شد. از طرفی با توجه به این که گیاه ذرت، نظیر سیب زمینی دارای دو نقطه پیک (اوج) می باشد که یکی مربوط به G1 یعنی قبل از سنتز DNA و دیگری مربوط به مرحله G2 (پس از سنتز DNA) است، لذا استفاده از گیاه دیپلوئید ذرت به عنوان شاهد در کنار نمونه های باززایی شده منطقی به نظر نمی رسد، چون پیک مربوط به G2 گیاه هاپلوئید می تواند بر روی پیک

G1 گیاه دیپلوئید منطبق گردد و لذا ارزیابی مطلوبی انجام نخواهد شد. از طرفی اگر گیاه مورد بررسی دارای سلول های با سطوح مختلف پلوییدی (پلی سوماتی) باشد، نتایج منحنی های به دست آمده می تواند منحرف کننده باشد.

نتایج فلوسایتومتری نشان داد که از ۴۰ گیاه ارزیابی شده که با شاهد جعفری مقایسه گردیده اند، ۱۰ گیاه (یعنی ۲۵٪ گیاهان) دیپلوئید و ۳۰ گیاه (۷۵٪ گیاهان) هاپلوئید می باشند. (Aulinger, 2002) در ارزیابی سطح پلوییدی گیاهان باززایی شده از کشت بساک به روش فلوسایتومتری، گزارش کرد که پیک نمونه بین اعداد ۵۰ تا ۱۰۰ نشان دهنده طبیعت هاپلوئیدی ($n=x=10$) گیاه مورد بررسی است، در صورتی که اعداد ۱۰۰ تا ۲۰۰ دیپلوئید بودن ($2N=2X=20$) را اثبات می کند (Aulinger, 2002).

پژوهشگران در ارزیابی سطح پلوییدی ۵۳ گیاه باززایی شده از کشت بساک به روش شمارش کروموزوم های نوک ریشه ذرت دریافتند که ۵۱ گیاه هاپلوئید (۹۶/۳۰٪) و فقط ۲ گیاه دیپلوئید ۳/۷٪ می باشد. به علاوه از کل ۴۳ گیاه نرمال باززایی شده، ۲ گیاه آلبنوز و ۴۱ گیاه سبز بودند (Tsay *et al.*, 1986). نکته حائز اهمیت در این پژوهش آن است که چون در بخشی از محیط های کشت مورد استفاده در جنین زایی بساک ها از کلشیسین به میزان 250 mg l^{-1} در محیط IML استفاده گردید، لذا این ترکیب می تواند حدودی فراوانی گیاهان دیپلوئید را در بین گیاهان ارزیابی شده افزایش دهد. چون نمونه های بساک ذرت ابتدا به مدت ۳ الی ۷ روز در محیط IML حاوی کلشیسین مایع کشت شدند و بعد به محیط کشت نیمه جامد IMSS بدون کلشیسین منتقل گردیدند، بنابر این یکی از دلایل فراوانی بیشتر گیاهان دیپلوئید در این پژوهش نسبت به نتایج پژوهشگران قبلی (Obert and Barnábas, 2004) می تواند مصرف کلشیسین در محیط القای جنین زایی (IML) در مراحل اولیه کشت بساک ذرت باشد. از طرفی مطالعات نشان داده است که فاکتورهای ژنتیکی کنترل کننده تولید جنین های آندروژنیک بسیار حائز اهمیت هستند (Fennel and Hauptman, 1992). بالطبع شناخت و انتقال خصوصیات آندروژنیک برگزیده می تواند در اصلاح کشت بساک و میکروسپور ذرت کار آمد و سودمند باشد. بهبود ژنتیکی آندروژن درون شیشه ای به وسیله نو ترکیبی افراد حاصل از کشت میکروسپور امکان پذیر است (Petolino and Jones, 1986).



شکل ۳: نمونه‌ای از فلوسایتومتری مربوط به دو نمونه گیاه هاپلوئید (شکل راست) و دیپلوئید ذرت (شکل چپ). گیاه جعفری به عنوان استاندارد در نظر گرفته شده است

Fig 3: Samples of flowcytometry on haploid (abow) and diploid (below) plants of maize (standard plant is jafari)

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۹-۱۰ متن انگلیسی مراجعه شود.

Study on Embryogenesis Response of Maize (*Zea mays* L.) Genotypes to Anther Culture

Khavari khorasani^{1*}, S., Moieni², A., Mousavi³, A. and Golbashi⁴, M.

Abstract

Haploid plants have an important role in plant breeding programmes and basic researches. In this study, 44 *Zea mays* L.) genotypes were evaluated for their response to embryogenesis via anther culture. Three experiments were conducted for understanding the effects of cold pre-treatments, kind of culture media, and the orientation of anthers on culture media for response to embryogenesis. The results of anther culture showed that embryo-like structures (ELs) were obtained from genotypes DH5×DH7, ETH-M82, TWC605, SC709, A188, S61, K74/1 and LA12 (sweet corn). Plant regeneration was performed successfully. Analysis of variance for the first experiment showed significant differences between anther culture media and genotypes, but there was no significant difference between two cold pre-treatments (14 and 21 days). In the second experiment, the Yu-pei medium containing 90 g l⁻¹ was the best media for embryogenesis with 21.82 ELs /100 cultured anthers. Cultivation of anthers by edges on medium in the third experiment was the best orientation for anther culture.

Keywords: Anther culture, Embryo-like structures (ELS), *Zea mays* L., Haploid plant

- 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 (ETH), 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.
- Barnábas, B., Obert B., Kovacs G. 1999. Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores in anthero. *Plant Cell Reports*, 18:858-862.
- Buter, B., Pescitelli, S. M., Berger, K., Schmid, J. E., Stamp, P. 1993. Autoclaved and filter sterilized liquid media in Maize anther culture: significance of activated charcoal. *Plant Cell Reports*, 13:79-82.
- Buter, B. 1997. In vitro haploid production in higher plants. Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 4: 37-71.
- Dieu, P., and Beckert, M. 1986. Further studies of androgenetic embryo production and plant regeneration from in vitro cultured anthers in Maize (*Zea mays* L.). *Maydica XXXI*. pp: 245-259.
- Fennel, A., and Hauptman, P. 1992. Selection of microspore derived embryogenic structure in Maize related to transformation by microinjection. *Botanica- Acta*, 105: 313-318.
- 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.
- Genovesi, A. D., and Collins, G. B. 1982. In vitro production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Science*, 22: 37-44.
- Hallauer, A. R., and Miranda, B. 1988. *Quantitative Genetics in Maize Breeding*. Iowa State Univ. Press.
- Hassan, L., Ahmad, S. D. and Okumus, A. 2001. The direct regeneration of Maize haploids through anther culture. *Journal of Biological Sciences*, 1: 900-901.
- Jahne, A. and Lorz, H. 1995. Cereal microspore culture. Review Article. *Plant Science*, 109: 1-12.
- Jardinaud, M. F. Souvire, A., Alibert, G. and Beckert, M. 1995a. UidA gene transfer and expression in maize microspores using the biolistic method. *Protoplasma*, 187: 138-143.
- Khavari Khorasani, S., Mansouri, N., Moieni, A., Mousavi, A., Karimzadeh, Gh. and Jalali, M. 2006. Study of callus induction and plant regeneration of maize genotypes (*Zea mays* L.) using immature embryo culture. *Pajouhesh & Sazandegi* No:73 pp: 43-49.
- Kuo, C. S., Sun, A. C., Wang, Y. Y., Gui, Y. L., Gu, S. R. and Miao, S. H. 1978. Studies on induction of pollen plants and androgenesis in maize. *Adaptive Botany Sinence* 20: 204-209.
- MacDonald, M. V. 1992. Donor plants growth factors affecting anther culture of maize and sweet corn (*Zea mays* L.). *Annals of Botany*, 70: 357 -363.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.

1. Scientific Membrane of khorasan Razavi Agricultural Research and Natural Resources Institute Mashhad, Mashhad.
 2. Associate Professor, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran.
 3. Scientific Membrane of National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology- Iran, Tehran.
 4. Ph.D. Student of NanoBioTechnology, University of Tehran, Tehran.
- *: Corresponding author

- Phisiol Plant, 15: 473-497.
- 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.
- Obert, B. and Barnábas, B. 2004. Colchicine induced embryogenesis in Maize. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77: 283-285.
- Petolino, J. F. and Jones, A. M. 1986. Anther culture of elite genotypes of Maize. *Crop Science* , 26: 1072-1074.
- Pohelman, J. M. , and Sleper, D. A. 1995. *Breeding Field Crops*. Chapter 17. Corn Breeding , pp: 317- 356. Iowa State University Press, U.S.A.
- Pretova, A., Ruijter, N. De., Van. Lammeren, A. and Schel, J. H. 1993. Structural observation during androgenesis of microspore culture of the 4C1 genotype of (*Zea mays* L.). *Euphytica*, 65: 61-69.
- Sainsington, S., Schmid, J. E., Stamp, P. and Buter, B. 1996. Colchicine mediated chromosome doubling during anther culture of Maize (*Zea mays* L.). *Theoretical . Applied. Genetics*. 92: 1017-1023.
- Shugar, L. 1998. Application of doubled-haploid systems. Hyland Seeds, W.G. Thomson and Sons Limited. Narin, Ontario, Canada.
- Ting, Y. C., Yu, M., and Wan, Z. Z. 1981. Improved anther culture of maize (*Zea mays* L.). *Plant Science Letter*, 23: 139-145.
- Tsay, H. S., Miao, S. H. and Widholm, J. M. 1986. Factors affecting haploid plants regeneration from maize anther culture. *J. Plant Phsiology*, 126: 33-40.
- Wan, Y., and Widholm, J. M. 1993. Anther culture of maize. *Plant Breeding Review*, 11: 199-224.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 35-46= ۳۵-۴۶).