زیست‌شناسی گیاهی، سال چهارم، شماره سیزدهم، پاییز ۱۳۹۱، صفحه ۷۱-۸۴
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۹/۲۲
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۱۲/۲۴
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۲/۰۵

باززایی گیاه از کالوس‌های حاصل از جنین رسیده ذرت (*Zea mays* L.)

حسن رهنما * و سهیلا تکاور
بخش کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

چکیده

استفاده از جنین رسیده حاصل از بذرهای خشک ذرت برای کشت بافت مزایای متعددی دارد که از آن جمله به سهولت دسترسی و کار با آن در طول سال می‌توان اشاره کرد. در این پژوهش، از بذرهای خشک ۵ لاین ذرت (K126، L105، B73، Mo17 و S61) استفاده شد. جنین‌ها از بذرهای رسیده و ضدعفونی شده ذرت جدا و برای تشکیل کالوس روی محیط کالوس‌زایی حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر ۲، ۴- دی کلروفتوکسی استیک اسید (2,4-D) کشت داده شدند. میزان کالوس‌زایی برای همه لاین‌ها بیشتر از ۹۰ درصد بود. کالوس‌های اولیه به محیط جنین‌زایی حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۰/۲ یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ۶- بنزیل آمینو پورین (BAP) یا تیدیازورون (TDZ) و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره ($AgNO_3$) منتقل شدند. کالوس‌های جنین‌زا در محیط باززایی حاوی ۰/۲ یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP یا TDZ به گیاه کامل تبدیل و سپس برای ریشه‌زایی به محیط موراشیگ و اسکوگ (1/2 MS) حاوی ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید (IBA) منتقل شدند. میزان تشکیل ساقه‌های سبز بین ۱۸/۳ تا ۴۰/۲۵ درصد در لاین‌های مختلف متغیر بود. بیشترین میزان باززایی (۴۰/۲۵ درصد) در ژنوتیپ S61 در محیط حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر $AgNO_3$ به دست آمد. سیستم باززایی ارایه شده در این پژوهش می‌تواند برای تراریختی گیاه ذرت استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: باززایی، جنین رسیده، جنین‌زایی، ذرت

مقدمه

ذرت (*Zea mays* L.)، یکی از مهم‌ترین منابع غذایی انسان و دام در جهان محسوب می‌شود و سطح زیر کشت بالایی از مزارع دنیا را به خود اختصاص داده است. به علت افزایش جمعیت و محدودیت سطح زیر کشت محصولات زراعی وهمچنین، تنش‌های زنده (آفات و بیماری‌ها) و غیر زنده (خشکی، شوری و سرما) تقاضا برای بهبود کیفیت و کمیّت این محصول مهم زراعی افزایش یافته، بنابراین، دستیابی به روش‌های سریع اصلاح ژنتیکی امری اجتناب ناپذیر است. گیاهان

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: hrahnama@abrii.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۶۳۲۷۰۳۵۳۶

ذرت تراریخته مقاوم به آفات و بیماری‌ها سال‌هاست که به مرحله تجاری رسیده و بخش وسیعی از مزارع دنیا را به خود اختصاص داده‌اند (James, 2010). تولید گیاهان تراریخته ذرت معمولاً با استفاده از دو روش تفنگ ژنی (بمباران ذرّه‌ای) و اگروباکتریوم صورت می‌گیرد، اما پیش‌نیاز دستیابی به تراریختی ذرت تهیه روش باززایی و ریز نمونه مناسب آن است.

باززایی گیاهان از کشت بافت ذرت نخستین بار توسط Green و Philips (۱۹۷۴) با استفاده از جنین نارس گزارش شد. باززایی موفق گیاه از کالوس‌های حاصل از پرچم (Ting *et al.*, 1981)، پوشه (Suprasanna *et al.*, 1986)، گل‌آذین نارس (Pareddy and Petolino, 1990)، کاکُل نارس (Songsted *et al.*, 1992)، قطعات برگی (Santos *et al.*, 1984; Ahmadabadi *et al.*, 2007)، نوک ساقه (O'Connor-Sanchez *et al.*, 2002) و مریستم نوک ساقه (Zhang and Lemaux, 2002) گزارش شده است. کالوس‌های حاصل از جنین‌های نارس نسبت به سایر ریز نمونه‌ها کارآیی بیشتری در باززایی دارند.

در این تحقیق، سیستم باززایی دیگری مبتنی بر تشکیل کالوس‌های جنین‌زا، از جنین رسیده ذرت بررسی شده است. باززایی گیاهان از جنین رسیده، پیش از این در غلات مختلف مانند برنج (Rueb *et al.*, 1994)، جو (Akula *et al.*, 1999) و چاودار (Ward and Jordan, 2001) انجام شده است. استفاده از جنین رسیده حاصل از بذرهای خشک مزایای متعددی دارد که از جمله می‌توان به سهولت کار و قابل دسترس بودن آن در طول سال اشاره کرد. نخستین بار Green و همکاران (۱۹۷۴) گزارش کردند که جنین‌های رسیده ذرت را می‌توان برای تشکیل کالوس به کار برد، اما موفق به باززایی آن نشدند. از آن پس، پیشرفت‌های زیادی در زمینه کشت بافت گیاه ذرت صورت گرفته است. با این وجود، کارآیی باززایی کالوس‌های حاصل از جنین رسیده تا حدودی نسبتاً پایین است و جنین‌های رسیده نسبت به جنین‌های نارس در کشت بافت بسیار سرسخت هستند. این موضوع را می‌توان در گزارش‌های ارایه شده توسط محققان مشاهده کرد. Wang (۱۹۸۷) موفق شد تا از جنین رسیده دو لاین B73 و Mo17 به طور موفقیت‌آمیزی گیاه باززایی نماید، اما روش استفاده شده توسط آنها وابسته به ژنوتیپ بوده، فرکانس باززایی ۴ تا ۵ درصد گزارش شد. Huang و Wei (۲۰۰۴) موفق شدند که در ۷ لاین ذرت مورد آزمایش، میزان باززایی بین ۱۹/۸ تا ۳۲/۴ درصد به دست آورند. در گزارشی دیگر، Wu و Wang (۲۰۰۶) میزان باززایی مشابهی (۲۵/۷ تا ۳۳/۱ درصد) را برای لاین‌های A188 و B73 به دست آوردند. Zhao و همکاران (۲۰۰۸) موفق شدند میزان باززایی حدود ۳۷/۵ درصد را با استفاده از جنین رسیده ذرت رقم Dan به دست آورند. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیقات مشخص شد که میزان باززایی جنین‌های رسیده در گیاه ذرت به عوامل مختلفی از جمله ژنوتیپ و شرایط مزرعه (مانند خاک، حاصل‌خیزی، بارش و دما که رشد گیاهِ دهنده و در نهایت کارآیی باززایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد) بستگی دارد. بنابراین، با توجه به مشکلات مربوط به استفاده از جنین نارس (مانند محدودیت دسترسی به فصل کشت ذرت یا شرایط گلخانه‌ای مناسب برای رشد ذرت در طول سال) دستیابی به قطعات جداکشت جایگزین که محدودیت زمانی و مکانی نداشته باشد، می‌تواند گام مهمی برای موفقیت در انتقال ژن به ذرت

محسوب شود. به همین دلیل، در پژوهش حاضر تلاش شد روش کارا و مؤثری برای کشت بافت و باززایی گیاه ذرت با استفاده از جنین رسیده ارایه شود. با استفاده از این روش می‌توان ار بذرهای خشک شده ذرت در طول سال به عنوان قطعه جداکشت در فرآیندهای وابسته به کشت بافت این گیاه استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

کشت بافت جنین رسیده

به منظور بهینه‌سازی کشت بافت جنین رسیده ذرت از ۵ لاین اینبرد K126، L105، B73، Mo17 و S61 تهیه شده از بخش ذرت مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر استفاده شد. بذرهای رسیده ذرت با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و پس از آن با هیپوکلریت سدیم (NaClO) ۵ درصد و توین ۲۰ به میزان ۱ میلی‌لیتر در لیتر، به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی گردید. پس از ۶ بار آبشویی با آب مقطر استریل، بذرهای ضدعفونی شده در یک ارلن استریل حاوی ۴ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D به مدت ۴۸ ساعت نگهداری (تیمار) شدند. پس از آن، جنین از بذر تورم یافته با کمک تیغ اسکالپل از ناحیه محور جنینی در راستای طولی بذر دو نیم شده خارج گردید. سپس در ناحیه گره اسکوتلار، قسمت ریشه‌چه از جنین دو نیم شده حذف شد. هر یک از نیمه‌ها (از گره اسکوتلار به بالا) به محیط کالوس‌زایی انتقال داده شد.

کالوس‌زایی

برای القای کالوس اولیه، ریز نمونه‌ها (جنین‌های رسیده) به محیط کالوس‌زایی منتقل شدند. محیط‌های کشت در اتاق کشت تاریک در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. پس از سه هفته، کالوس‌های تشکیل شده شمارش گردید.

محیط کالوس‌زایی حاوی نمک‌های N_6، ویتامین‌های B_5، ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۲ میلی‌گرم در لیتر گلایسین، ۶۹۰ میلی‌گرم در لیتر L پرولین، ۱ میلی‌گرم در لیتر کازوئین، ۳۰ گرم در لیتر سوکروز با اسیدیته ۵/۸ و ۸ گرم در لیتر آگار بود (Armstrong and Green, 1985).

القای جنین‌زایی

کالوس‌های تشکیل شده به محیط کشت القای جنین منتقل شدند. کشت‌ها در تاریکی در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Armstrong and Green, 1985). واکشت نمونه‌ها به فاصله دو هفته در محیط یاد شده صورت گرفت. کالوس‌های جنین‌زا پس از ۴ هفته شمارش شد.

محیط‌کشت القای جنین، مشابه محیط کشت کالوس‌زایی بود، با این تفاوت که مواد تنظیم‌کننده دیگری علاوه بر 2,4-D نیز به آن اضافه شد. در این مرحله، ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و تیمارهای مختلفی از بنزیل آدنین (BA) و تیدیازرون (TDZ) با غلظت‌های صفر، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و نیترات نقره نیز به غلظت‌های صفر و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. تنظیم‌کننده‌های BA و TDZ، همچنین، نیترات نقره پس از اتوکلاو به وسیله فیلتر ۰/۲ میکرومتری استریل شده به محیط‌کشت اضافه شدند (Duncan and Widholm, 1988؛ Lair *et al.*, 2001).

باززایی

پس از گذشت ۴ هفته، کالوس‌های جنین‌زا به محیط کشت باززایی منتقل شدند. کالوس‌های جنین‌زا

در این مرحله، از محیط تاریکی به نور با شدت ۷۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال داده شدند. در این محیط‌کشت، واکشت به فاصله دو هفته انجام گرفت. پس از ۴ هفته کالوس‌های باززا شده شمارش گردید (Huang and Wei, 2004).

محیط باززایی شامل نمک‌های N_6 و ویتامین‌های B_5، گلایسین ۲ میلی‌گرم در لیتر، سوکروز ۳۰ گرم در لیتر با اسیدیته ۵/۸ و آگار ۸ گرم در لیتر اتوکلاو شده، سپس غلظت‌های صفر، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و TDZ با فیلتر استریل شده به محیط‌کشت اضافه شد (Zhao *et al*., 2008).

القای ریشه‌زایی

پس از رشد اندام‌های هوایی در محیط‌کشت باززایی در حد ۲ سانتی‌متر، به منظور القای ریشه‌زایی، کالوس‌های باززایی شده به محیط ریشه‌زایی تحت شرایط نور با شدت ۷۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال داده شدند.

محیط ریشه‌زایی حاوی MS رقیق (نصف غلظت معمول) و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر ایندول ۳ بوتیریک اسید (IBA)، ۱۵ گرم در لیتر سوکروز با اسیدیته ۵/۸ و ۶ گرم در لیتر آگار بود (Huang and Wei, 2004).

انتقال ریز نمونه‌های باززا شده ریشه‌دار به خاک

پس از باززایی کامل کالوس‌ها، گیاهچه‌ها به خاک سبک استریل (حاوی نسبت‌های مساوی خاک برگ و خاک زراعی) انتقال داده شد. برای ایجاد سازگاری گیاه در گلدان، کیسه نایلونی روی هر گلدان کشیده شد و گیاه به نخستین مراحل سازگاری به محیط طبیعی وارد شد. به منظور تغذیه و آبیاری از محلول دو در هزار فوسامکو ۴ (Fusamco 4) استفاده شد. پس از گذشت سه هفته که به تدریج هر هفته به اندازه روزنه‌های پوشش نایلونی افزوده شد، پوشش برداشته شد.

طرح آزمایش

به منظور بررسی بهینه‌سازی و افزایش میزان باززایی جنین‌های رسیده، آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی فاکتوریل ۴ فاکتوره (لاین‌های ذرت، ترکیبات و غلظت‌های هورمونی و نیترات نقره) با سه تکرار، هر تکرار حدود ۶۰۰ ریز نمونه انجام شد. سه هفته پس از استخراج جنین، تعداد کالوس‌ها، ۴ هفته پس از انتقال به محیط جنین‌زایی، تعداد کالوس‌های جنین‌زا و ۴ هفته پس از انتقال به محیط باززایی، تعداد کالوس‌های باززا بررسی شد. برای انجام تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزارهای MSTATC و Excel استفاده شد. مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و برخی از موارد ۰/۱ صورت گرفت.

نتایج

کالوس‌زایی

با انتخاب بذرهای سالم و دارای قوه نامیه بالا از ۵ لاین اینبرد K126، L105، B73، Mo17 و S61 بیش از ۹۳ درصد ریز نمونه‌های تمام لاین‌ها کالوس تولید کردند (جدول ۱). تورم اسکوتلوم پس از ۲ تا ۵ روز و ظهور کالوس‌های اولیه سُست و به رنگ سفید مایل به زرد (۲ تا ۳ میلی‌متر مربع)، در دو تا سه هفته پس از استخراج جنین مشاهده شد (شکل ۱).

جنین‌زایی

با انتقال کالوس‌های اولیه به محیط جنین‌زایی با حضور غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد ۶- بنزیل آمینو پورین و تیدیازورون همراه با 2,4-D و

جنین‌زایی در آنها به دو شکل متفاوت بود، بعضی از آنها شکل سُست، شیشه‌ای با طیفی از رنگ‌های زرد تا قهوه‌ای (غیر جنین‌زا) (شکل ۱) و بعضی به صورت فشرده، نامرتب و کروی به رنگ زرد روشن (جنین‌زای تیپ I) تا سفید مات، گرزی شکل و فشرده (جنین‌زای تیپ II) (شکل ۲) بودند. در جدول ۲ میانگین درصد جنین‌زایی در لاین‌های ذرت به تفکیک در ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده مقایسه شده است. تعداد و درصد ریز نمونه‌های اولیه، کالوس‌های اولیه، کالوس‌های جنین‌زا از جنین رسیده ۵ لاین مورد آزمایش در تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر $AgNO_3$ در جدول ۱ آورده شده است. نتایج تجزیه واریانس، بیانگر معنی‌دار بودن اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد، $AgNO_3$، اثرات متقابل لاین و نوع تنظیم‌کننده رشد، لاین و غلظت تنظیم‌کننده رشد، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد در سطح ۱ درصد بود. آثار متقابل غلظت تنظیم‌کننده رشد و $AgNO_3$، لاین و نوع تنظیم‌کننده رشد و $AgNO_3$ در سطح ۵ درصد و آثار متقابل لاین و غلظت تنظیم‌کننده رشد و $AgNO_3$ در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. آثار متقابل لاین و $AgNO_3$، نوع تنظیم‌کننده رشد و $AgNO_3$، لاین و نوع تنظیم‌کننده رشد و $AgNO_3$، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد، و آثار متقابل ۴ عامل مورد بررسی معنی‌دار نبود. اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در سطح ۱ درصد معنی‌دار است.

بازرایی

قابلیت بازرایی به موازات جنین‌زایی در کالوس‌ها پیش رفت، اگرچه درصدی از جنین‌ها به بازرایی نرسیدند. ترکیب محیط‌کشت بازرایی با محیط‌کشت جنین‌زایی تفاوتی نداشت که این از مزایای تحقیق حاضر است. اندام‌های هوایی پس از دو هفته ظاهر شدند. شکل ۲ القای بازرایی را در کالوس را نشان می‌دهد.

بهترین نتایج در تیمار حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر $AgNO_3$ بود و در دامنه ۱۸-۴۰ درصد بیشترین و کمترین بازرایی به ترتیب در S61 و L105 دیده شد. در جدول‌های ۲ و ۳ مقایسه میانگین درصد جنین‌زایی همراه با بازرایی لاین‌ها به تفکیک در ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد آورده شده است. تعداد و درصد ریز نمونه‌های اولیه، کالوس‌های اولیه، کالوس‌های بازرا شده از جنین رسیده ۵ لاین مورد آزمایش در تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر $AgNO_3$ در جدول ۱ آورده شده است. نتایج تجزیه واریانس حاکی از معنی‌دار بودن اثر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد، $AgNO_3$، آثار متقابل لاین و غلظت تنظیم‌کننده رشد، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد در سطح ۱ درصد بود. آثار متقابل غلظت تنظیم‌کننده رشد و $AgNO_3$، لاین و نوع تنظیم‌کننده رشد، لاین و نوع تنظیم‌کننده رشد و $AgNO_3$ در سطح ۵ درصد و آثار متقابل لاین و غلظت تنظیم‌کننده رشد و $AgNO_3$، لاین و $AgNO_3$، نوع تنظیم‌کننده رشد و $AgNO_3$، لاین و نوع تنظیم‌کننده رشد و $AgNO_3$، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد، و آثار متقابل ۴ عامل مورد بررسی معنی‌دار نبود.

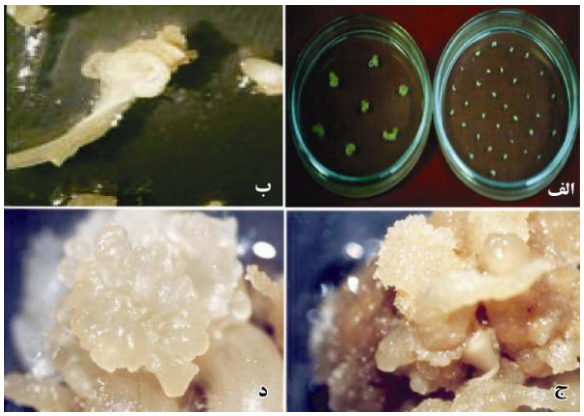
اثر $AgNO_3$ (نیترات نقره) بر جنین‌زایی و بازرایی

$AgNO_3$، به عنوان ممانعت‌کننده اثر اتیلن، بر تقسیم و تمایز سلولی مؤثر است. در این بررسی، حضور مؤثر

$AgNO_3$ بر جنین‌زایی و باززایی تأیید شد، اگرچه در بررسی آثار متقابل $AgNO_3$ با سایر عوامل اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. در جدول‌های ۲ و ۳ مقایسه عملکرد (تولید کالوس‌های باززا) در تیمارهای مختلف TDZ، BA و $AgNO_3$ در لاین‌های MO17، L105 و S61 گویای اثر حضور $AgNO_3$ است.

ریشه‌زایی

فرآیند ریشه‌زایی در تعدادی از ریز نمونه‌ها در طی مراحل جنین‌زایی و باززایی شکل گرفته بود. به منظور تقویت ریشه‌زایی و طی مراحل سازگاری و انتقال به خاک، از محیط رقیق (نصف غلظت معمول محیط MS) استفاده شد (شکل ۲).



شکل ۱- کالوس‌زایی و جنین‌زایی در کشت بافت جنین رسیده ذرت. الف) مراحل اولیه کشت جنین رسیده ذرت (راست) ۴۸ ساعت پس از کشت (چپ) ۲۰ روز پس از کشت در محیط کالوس‌زایی. ب) کالوس‌های اولیه حاصل از رشد جنین رسیده ذرت که با رشد محور جنینی همراه است (در تیمار حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر $AgNO_3$). ج) کالوس غیر جنین‌زا در محیط جنین‌زایی (۴۵ روزه). د) کالوس جنین‌زا تیپ II در محیط جنین‌زایی (۴۵ روزه) در تیمار حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر $AgNO_3$).

شکل ۲- مراحل باززایی جنین‌های ذرت. الف) باززایی در کالوس‌های حاصل از جنین رسیده در محیط باززایی در تیمار حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر $AgNO_3$. ب) انتقال کالوس‌های باززا شده ذرت به محیط ریشه‌زایی. ج) انتقال گیاهان باززا شده و ریشه‌دار به گلدان و ظهور اندام‌های گل.

داده‌های جدول‌های ۲ و ۳ بر اساس طرح آزمایشی کاملاً تصادفی، با فاکتوریل ۴ فاکتوری (لاین‌های ذرت، ترکیبات و غلظت‌های تنظیم‌کننده‌ها و نیترات نقره) با سه تکرار، در هر تکرار حدود ۵۰ ریز نمونه انجام گرفت. درصد کالوس‌های جنین‌زا و بازززا بر اساس درصد تعداد کالوس‌های یاد شده در هر تیمار بر تعداد کالوس‌های اولیه در آن تیمار محاسبه شده است.

انتقال گیاهچه‌ها به خاک

گیاهان بازززاشده از ریز نمونه‌ها در محیط کشت به خاک استریل انتقال داده شدند و برای سازگاری در زیر پوشش سلوفانی شفاف در اتاقک رشد (فیتوترون) به مدت سه هفته قرار گرفتند. پس از این مدت، پوشش سلفونی برداشته شد و گیاهان به رشد در اتاقک رشد ادامه دادند و اندام‌های گل در آنها شکل گرفت (شکل ۲).

جدول ۱- تعداد و درصد ریز نمونه‌های اولیه، کالوس‌های اولیه، کالوس‌های جنین‌زا و بازززاشده از جنین رسیده ۵ لاین ذرت مورد آزمایش در تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر تیدیازرون و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره.

لاین‌ها	تعداد ریز نمونه‌های اولیه مورد آزمایش	تعداد کالوس‌های اولیه	تعداد کالوس‌های جنین‌زا	تعداد کالوس‌های بازززا شده
S61	۱۵۴	۱۵۰ (٪۹۷/۴)[a]	۷۷ (٪۵۰)[a]	۶۲ (٪۴۰/۲۵)[a]
B73	۱۵۵	۱۴۸ (٪۹۵/۴۸)[a]	۷۲ (٪۴۶/۴۵)[a]	۶۰ (٪۳۸/۷)[a]
Mo17	۱۵۴	۱۴۶ (٪۹۴/۸)[a]	۵۵ (٪۳۵/۷۱)[b]	۴۱ (٪۲۶/۶۲)[b]
K1264	۱۵۵	۱۴۵ (٪۹۳/۵۴)[a]	۵۳ (٪۳۴/۱۹)[b]	۴۲ (٪۲۷/۰۹)[b]
L105	۱۵۳	۱۴۵ (٪۹۴/۷۷)[a]	۳۶ (٪۲۳/۵۳)[c]	۲۸ (٪۱۸/۳)[c]

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد جنین‌زایی لاین‌های ذرت در ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد. رده‌بندی (A-E) مقایسه درصدهای مزبور با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

تیمارها (mg/l)			درصد جنین‌زایی				
BA	TDZ	$AgNO_3$	S61	Mo17	L105	B73	K1264
۰	۰	۰	۵/۸۸ [E]	۳/۲۵۳ [D]	۰ [E]	۵/۸۸ [D]	۳/۹۸۷ [C]
۰	۰	۱۰	۷/۸۷ [E]	۳/۹۲ [D]	۵/۲۶۷ [D]	۶ [D]	۵/۲۸ [C]
۰	۰/۲	۰	۴۸/۵۱ [A]	۳۰/۹۶ [B]	۲۰/۸۲ [AB]	۴۱/۷۳ [B]	۳۱/۳۳ [AB]
۰	۰/۲	۱۰	۴۹/۹۸ [A]	۳۵/۷۲ [A]	۲۳/۵۳ [A]	۴۶/۴۵ [A]	۳۴/۲ [A]
۰	۰/۵	۰	۳۶/۱ [BC]	۲۷/۹۳ [BC]	۱۷/۳۷ [BC]	۳۳/۱۱ [C]	۳۱/۳۹ [AB]
۰	۰/۵	۱۰	۴۰/۱۹ [B]	۳۰/۵۵ [B]	۱۹/۳۶ [ABC]	۳۱/۵۸ [C]	۳۴/۴۹ [A]
۰/۲	۰	۰	۳۷/۸۴ [BC]	۲۷/۱۱ [BC]	۱۷/۵۶ [BC]	۳۳/۲ [C]	۳۰ [B]
۰/۲	۰	۱۰	۴۱/۱۵ [B]	۲۷/۲۷ [BC]	۲۱/۲۹ [AB]	۳۸/۷۱ [B]	۳۱/۶۷ [AB]
۰/۵	۰	۰	۲۱/۷۳ [D]	۲۵/۲۸ [C]	۱۵/۰۵ [C]	۳۱/۳۶ [C]	۲۹/۸۹ [B]
۰/۵	۰	۱۰	۳۳/۷۶ [C]	۲۸/۱۴ [BC]	۱۶/۱۷ [BC]	۳۱/۰۳ [C]	۳۲/۸۷ [AB]

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد باززایی لاین‌های ذرت در ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد. رده‌بندی (A-E) مقایسه درصدها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

تیمارها (mg/l)			درصد باززایی				
BA	TDZ	$AgNO_3$	S61	Mo17	L105	B73	K1264
۰	۰	۰	۲/۵۸۷ E	۱/۲۸ F	۰ F	۲/۶۱۳ E	۱/۱۱ F
۰	۰	۱۰	۴/۳۶ E	۳/۸۹ F	۳/۲۹ E	۳/۳۳ E	۱/۹۷۷ F
۰	۰/۲	۰	۳۶/۸۶ AB	۲۳/۰۶ B	۱۶/۸۷ AB	۳۳/۸۱ B	۲۴/۷۱ BC
۰	۰/۲	۱۰	۴۰/۲۵ A	۲۶/۶۳۰ A	۱۸/۳۰ A	۳۸/۷ A	۲۶/۵۱ AB
۰	۰/۵	۰	۲۴/۰۳ CD	۲۰/۷۷ BCD	۱۲/۹۷ C	۲۴/۶۴ D	۲۳/۵۹ CD
۰	۰/۵	۱۰	۲۶/۸۲ BCD	۲۲/۹۹ BC	۱۴/۱۹ BC	۲۵ D	۲۵/۵۲ ABC
۰/۲	۰	۰	۲۲/۱۹ CD	۱۸/۷۴ DE	۱۱/۷۱ CD	۲۷/۲۷ CD	۲۴/۳ CD
۰/۲	۰	۱۰	۳۲/۰۱ ABC	۲۰/۷۰ BCD	۱۴/۲۱۰ BC	۳۰/۶۹۰ BC	۲۷/۳۰ A
۰/۵	۰	۰	۱۹/۹۹ D	۱۶/۶۲ E	۸/۴۹ D	۲۳/۶۹ D	۲۰/۵۷ E
۰/۵	۰	۱۰	۲۴/۹۷ CD	۱۸/۹۸ CDE	۱۰/۹۸ CD	۲۳/۳۸ D	۲۲/۲ DE

بحث

در بسیاری از مطالعات کشت بافت و انتقال ژن، از جنین‌های نارس ذرت به عنوان ریز نمونه استفاده شده است (Lu *et al*., 1982; Quan *et al*., 2004; Oneto *et al*., 2010)، اما تهیه جنین نارس در طول سال و آن هم با شرایط نموی مناسب مشکل است. برعکس، جنین‌های رسیده به راحتی و به مقدار زیاد در طول سال در دسترس هستند. با این وجود، جنین‌های رسیده نسبت به جنین‌های نارس سرسختی بیشتری در کشت بافت از خود نشان داده، میزان باززایی در آنها پایین است (Zhao *et al*, 2008).

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نقش بسیار مهمی در تشکیل کالوس دارند و تأثیر آنها بر باززایی گیاهان در کشت کالوس ذرت بررسی شده است (Bhaskaran and Smith, 1990). به طور کلی، محیط القا و تکثیر کالوس نیازمند مقادیر بالای اکسین (مانند 2,4-D) است. معمولاً دامنه غلظت ۴/۵-۱۳/۶ میکرومولار برای تشکیل کالوس‌های جنین‌زا در کشت بافت غلات مناسب است. طبق گزارش‌های قبلی اکسین 2,4-D عاملی تعیین‌کننده برای القای کالوس در جنین‌های نارس ذرت است (Armstrong and Green, 1985; Bohorova *et al*., 1999). در مطالعه حاضر، غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر اکسین 2,4-D به عنوان مقدار ثابت برای همه تیمارها انتخاب شد.

معمولاً کالوس‌های جنین‌زا برای تبدیل به گیاه کامل به محیط‌های عاری از هورمون منتقل می‌شوند (Armstrong and Green, 1985)، یکی از دلایل این است که جنین‌های سوماتیک توانایی تبدیل شدن به گیاه کامل را کسب کرده، سرنوشت آنها قبلاً تعیین شده است. با این وجود، در برخی از مطالعات وجود سیتوکینین برای نمو و تبدیل جنین به گیاه کامل، عامل محرک شناخته شده است (Duncan and Widholm, 1988; Dahleen and Bregitzer, 2002). استفاده از سیتوکینین در ترکیب با اکسین برای شروع جنین‌زایی

سوماتیک در کشت کالوس غلات گزارش شده است (Gaspar *et al*., 1996; Zhao *et al*., 2008). بنزیل آدنین برای القای شاخه مؤثرتر از کینتین است. Chaudhury و Qu (۲۰۰۰) گزارش دادند که در علف برمودا (Bermuda grass) استفاده از غلظت‌های پایین سینوکینین (۰/۰۴۴ میکرومولار بنزیل آدنین) در محیط القای کالوس حاوی اکسین، تشکیل کالوس‌های جنین‌زا را افزایش می‌دهد. گزارش شده است که افزودن ۰/۴۴ میکرومولار بنزین آدنین به محیط‌کشت برای تشکیل کالوس‌های جنین‌زا ضروری است و میزان باززایی در جو را افزایش می‌دهد (Cho *et al*., 1998). Huang و Wei (۲۰۰۴) گزارش دادند که غلظت‌های پایین بنزیل آدنین (۰/۸۹ میکرومولار) در محیط واکشت کالوس که حاوی 2,4-D است، فرکانس تشکیل کالوس‌های جنین‌زا را افزایش می‌دهد. همچنین، مشخص شده است که افزودن ۲/۲۲ میکرومولار بنزیل آدنین همراه با ۴/۶۴ میکرومولار کینتین نسبت به محیط‌های فاقد هورمون رشد گیاهی برای القای شاخه در ذرت مؤثرتر است (Zhao *et al*., 2008). تمامی این مطالعات نشان داده‌اند که افزودن سیتوکینین به محیط‌کشت حاوی اکسین (2,4-D) برای تشکیل کالوس جنین‌زا ضروری است.

در مطالعه حاضر، جنین‌زایی کالوس‌ها در محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد (BA یا TDZ) بسیار پایین بود، تفاوت چشمگیر میزان القای جنین‌زایی در کالوس‌های اولیه در تیمارهای واجد و فاقد تنظیم‌کننده رشد، تأکیدی بر نقش تعیین کننده تنظیم‌کننده‌های رشد یاد شده در القای جنین‌زایی است. برای تحریک تقسیم سلولی و به دنبال آن جنین‌زایی و باززایی، از سیتوکینین‌هایی مانند BA و TDZ استفاده شد. نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) تنظیم‌کننده رشد BA بر جنین رسیده ذرت نشان داد که بهترین پاسخ کالوس‌زایی و باززایی در همه لاین‌های مورد بررسی در تیمار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA است. این نتایج با گزارش ارایه شده توسط Huang و Wei (۲۰۰۴) مطابقت دارد.

نخستین بار به تیدیازورن (TDZ) به عنوان یک تنظیم‌کننده رشد در کشت بافت و باززایی جنین‌های سوماتیک گیاهان خشبی توجه شد (Huetteman and Preece, 1993; Li *et al*., 1998). پس از آن، این هورمون به عنوان تحریک کننده رشد کالوس در سیستم‌های کشت بافت گیاهی مطرح شد (Murthy and Murch, 1998). آثار انواع سیتوکنین‌ها مورد استفاده در کشت بافت (بنزیل آدنین، کینتین، زآتین و تیدیازرون) در روند باززایی گیاهانی چون نیشکر (*Saccharum* spp.) و عدس (*Lens culinaris*) بررسی و بهترین تیمار تنظیم‌کننده رشد TDZ و BA با غلظت‌های متفاوت بوده است (Chengalrayan and Gallo-Meagher, 2001; Fratini and Ruiz, 2002). اثر TDZ در ذرت (*Zea mays* L.) تاکنون گزارش نشده است. نتایج این بررسی نشان داد که غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ در ترکیب با $AgNO_3$ بیشترین تأثیر را در میزان باززایی همه لاین‌های مورد مطالعه دارد. کارآیی تیمار TDZ و BA در جنین‌زایی و باززایی تفاوت معنی‌داری داشت. به نظر می‌رسد TDZ می‌تواند جایگزین مناسبی برای بنزیل آدنین باشد.

نیترات نقره از طریق رقابت در ایجاد پیوند با جایگاه اتصال اتیلن از عمل آن جلوگیری می‌کند

(Ezura *et al*., 2000) و بنابراین باعث تحریک تشکیل جنین‌های نوع II و افزایش باززایی می‌شود (Songstad *et al*., 1991; Caryalho *et al*., 1997). آثار مثبت $AgNO_3$ روی ژنوتیپ‌های مختلف ذرت (Vain and Dunl, 1989) و گندم (Fernandez *et al*., 1999) گزارش شده است.

در این پژوهش، اثر $AgNO_3$ بر باززایی بررسی شد. اگرچه نتایج حاصل از به کارگیری دو تیمار فاقد و حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر $AgNO_3$ در تقابل اثر دیگر عوامل مورد بررسی از نظر آماری معنی‌دار نبود (البته اثر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و $AgNO_3$ در جنین‌زایی و باززایی در سطح ۵ درصد و اثر لاین‌های مختلف و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و $AgNO_3$ در جنین‌زایی در سطح ۵ درصد معنی‌دار بودند)، به طورکلی حضور $AgNO_3$ در باززایی اثر مثبت داشت. این نتایج با نتیجه دیگران نیز مطابقت دارد (Caryalho *et al*., 1997; Huang and wei, 2004). به نظر می‌رسد شکل مصرف $AgNO_3$ در حصول نتیجه مؤثر است و کاربرد $AgNO_3$ به این صورت (ترکیب فعال یونی) اثرات نامناسبی در محیط‌کشت و به دنبال آن ریز نمونه دارد و احتمالاً همین امر، سبب بروز چنین نتیجه‌ای در آثار متقابل عوامل با عامل $AgNO_3$ شده است. به عبارت دیگر، نتیجه $AgNO_3$ در طی آزمایش حاضر به صورت برآیندی از آثار مثبت و منفی نمود یافته است (Santana-Buzzy *et al*., 2006).

همان گونه که ذکر شد، فرآیند انتقال ژن به منظور افزایش کمیّت و کیفیت محصول، نیازمند فراهم آوردن امکان باززایی گیاه با بازده بالا از طریق کشت بافت گیاهی است. در بین ریز نمونه‌هایی که به منظور کشت بافت ذرت به کار رفته‌اند، باززایی حاصل از کشت بافت جنین نارس ذرت از پتانسیل بالاتری برخوردار است. بیشتر موفقیّت‌ها در انتقال ژن ذرت در دنیا با استفاده از کشت بافت این ریز نمونه محقق شده است (Jimenez and Bangerth, 2001).

به منظور یافتن جایگزینی برای ریز نمونه جنین نارس برای حذف محدودیت زمانی قابل در دسترس بودن ریز نمونه و کاهش دوره عملیات انتقال ژن، تولید گیاهان تراریخته ذرت از طریق باززایی اندام‌های انتهایی با روش تفنگ ژنی گزارش شده است (Wang, 1987؛ Zhang and Lamaux, 2002؛ O'Connor-Sanchez *et al*., 2002؛ Huang and Wei, 2004).

در این تحقیق، با به کارگیری تیدیازورن، میزان باززایی لاین‌ها به ۲۶-۴۰ درصد در تیمار حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر $AgNO_3$ رسید. به کارگیری TDZ تاکنون به منظور باززایی در ذرت گزارش نشده بود. پاسخ قابل توجه همه لاین‌ها به باززایی از درجه اهمیّت بالایی برخوردار است. اگرچه میزان باززایی در جنین رسیده نسبت به اندام انتهایی و مریستم انتهایی بسیار پایین است، اما حُسن کاربرد جنین رسیده به اندام انتهایی، کوتاهی فرآیند باززایی است و به این علت تلاش برای افزایش میزان باززایی جنین رسیده ادامه دارد. ازآنجا که طول دوره جنین‌زایی و باززایی در جنین رسیده ذرت نسبت به جنین نارس و مریستم انتهایی کوتاه‌تر است، در نتیجه از میزان تنوع سوماتیک کمتری (به عنوان یک ضعف در به کارگیری کالوس‌ها برای انتقال ژن) برخوردار است و این به عنوان مزیت به کارگیری جنین رسیده در تولید ارقام تراریخته تلقی می‌شود (Bajaj, 1990).

از آنجا که اساس تولید گیاهان تراریخته بر مبنای انتخاب ژنوتیپ‌های ارجح و انتقال ژن به آنهاست، بروز تنوع سوماتیک به معنای به وجود آمدن جهش‌های نامطلوب و کاهش ارزش ژنتیکی انتخاب ارجح اولیه است. از این رو، با کاهش طول دوره تبدیل کالوس به گیاه از میزان تنوع سوماتیک تا حد امکان کاسته می‌شود، در نتیجه، به کارگیری جنین رسیده به عنوان ریز نمونه اولیه از اهمیّت بالایی برخوردار است. حصول نتیجه حاضر به علاوه از این نظر که در طی مراحل کالوس‌زایی، جنین‌زایی و باززایی از یک محیط پایه (N_6) استفاده شده و تنوع در به کارگیری محیط کشت وجود ندارد، از نظر کاربردی حایز اهمیّت است. علاوه بر این، پاسخ‌دهی همه ژنوتیپ‌های مورد آزمایش به عوامل مورد بررسی در طی باززایی نیز در خور توجه است (Songstad *et al.*, 1991; Shou *et al.*, 2004).

منابع

Ahmadabadi, M., Ruf, S. and Bock R. (2007) A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). Transgenic Research 16: 437-448.

Akula, C., Akula, A. and Henry, R. (1999) Improved regeneration efficiency from mature embryos of barley cultivars. Biologia Plantarum 42: 505-513.

Armstrong, C. L. and Green, C. E. (1985) Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. Planta 164: 207-214.

Bajaj, Y. P. S. (1990) Somaclonal variation in crop improvement I, biotechnology in agriculture and forestry. Springer Verlag, Berlin.

Bhaskaran, S. and Smith, R. A. (1990) Regeneration in cereal tissue culture: a review. Crop Science 30: 1328-1336.

Bohorova, N. E., Zhang, W., Julstrum, P., McLean, S., Luna, B., Briton, R. M., Diaz, L., Ramos, M. E., Estanol, P., Pacheco, M., Salgado, M. and Hoistington, D. A. (1999) Production of transgenic tropical maize with *cry*lAb and *cry*lAc genes via microprojectile bombardment of immature embryos. Theoretical and Applied Genetics 99: 437-444.

Caryalho, C. H. S., Bohorova, N., Bordallo, P. N. and Abreu, L. L. (1997) Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. Plant Cell Reports 17: 73-76.

Chaudhury, A. and Qu, R. (2000) Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type Bermuda grass: effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. Plant Cell Tissue Organ Culture 60: 113-120.

Chengalrayan, K. and Gallo-Meagher, M. (2001) Effect of various growth regulators on shoot regeneration of sugarcane. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 37: 434-439.

Cho, M. J., Jiang, W. and Lemaux, P. G. (1998) Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. Plant Science 138: 229-244.

Dahleen, L. S. and Bregitzer, P. (2002) An improved media system for high regeneration rates from barley immature embryo-derived callus cultures of commercial cultivars. Crop Science 42: 934-938.

Duncan, D. R. and Widholm, J. M. (1988) Improved plant regeneration from maize callus culture using 6-benzylaminopurine. Plant Cell Reports 7: 452-455.

Ezura, H. Yuhashi, K. I. Yasuta, T. and Minamisawa, K. (2000) Effect of ethylene

on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to melon. Plant Breeding 119: 75-79.

Fernandez, S., Michaux-Ferriere, N. and Coumans M. (1999) The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Desf): histology and improvement by $AgNO_3$. Plant Growth Regulation 28: 147-155.

Fratini, R. and Ruiz, M. L. (2002) Comparative study of different cytokinins in the induction of morphogenesis in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 38: 46-51.

Gaspar, T. Kevers, C. and Penel, C. (1996) Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 32: 272-289.

Green, C. E., Phillips, R. L. and Kleese, R. A. (1974) Tissue culture of maize (*Zea mays* L.): initiation, maintenance, and organic growth factors. Crop Science 14: 54-58.

Huang, X. Q. and Wei, Z. M. (2004) High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.). Plant Cell Reports 22: 793-800.

Huetteman, C. A. and Preece, J. E. (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture 33: 105-119.

James, C. (2010) Global status of commercialized biotech/ GM crops: 2010. Retrieved from www. isaaa. org/ resources/ publications/ briefs/ 42/ default.asp. On: 11 October 2011.

Jimenez, V. M. and Bangerth, F. (2001) Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. Plant Science 160: 247-257.

Lair, V., Tree, P. and Rezend, C. (2001) Effect of the BAP and the TDZ in the production of banana tree changes. Revista Brasileira de Fruticultura 23: 212-224.

Li, Z., Traore, A. and Maximova, S. (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 34: 293-299.

Lu, C., Vasil, I. K. and Ozias-Akins, P. (1982) Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. Theoretical and Applied Genetics 62: 109-112.

Murthy, B. N. S. and Murch, S. J. (1998) Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 34: 267-275.

O'Connor-Sanchez, A., Cabrera-Ponce, J. L., Valdez-Melara, M., Tellez-Rodriguez, P., Pons-Hernandez, J. L. and Herrera-Estrella, L. (2002) Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenic and embryogenic-like structures derived from shoot tips. Plant Cell Reports 21: 302-312.

Oneto, C. D., Gonzalez, G. and Lewi D. (2010) Biolistic maize transformation: improving and simplifying the protocol efficiency. African Journal of Agricultural Research 5: 3561-3570.

Pareddy, D. R. and Petolino J. F. (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences of several elite inbreds of maize. Plant Science 67: 211-219.

Quan, R., Shang, M., Zhang, H., Zhao, Y. and Zhang, J. (2004) Improved chilling tolerance by transformation with *betA* gene for the enhancement of glycinebetaine synthesis in maize. Plant Science 166: 141-149.

Rueb, S., Leneman, M., Schilperoort, R. A. and Hensgens, L. A. M. (1994) Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Tissue Organ Culture 36: 259-264.

Santana-Buzzy, N., Canto-Flick, A., Iglesias-Andreu, L. G., Montalvo-Peniche, M. C.,

Lo´pez-Puc, G. and Barahona-Pe´rez, F. (2006) Improvement of *in vitro* culturing of Habanero pepper by inhibition of ethylene effects. HortScience 41:405-409.

Santos, M. A., Torne, J. M. and Blanco, J. L. (1984) Methods of obtaining maize totipotent tissues I. Seedling segments culture. Plant Science Letters 33: 309-315.

Shou, H. Frame, B. and Whitham, S. (2004) Assessment of transgenic maize events producted by particle bombardent or *Agrobacterium*-mediated transformation. Molecular Breeding 13: 201-208.

Songstad, D. D., Armstrong, C. L. and Petersen, W. l. (1991) $AgNo_3$ increase type II callus production from immature embryos of maize inbred B73 and its derivatives. Plant Cell Reports 9: 699-702.

Songstad, D. D., Peterson, W. L. and Armstrong, C. L. (1992) Establishment of friable embryogenic (type II) callus from immature tassels of *Zea mays* (Poaceae). American Journal of Botany 79: 761-764.

Suprasanna, P., Rao, K. V. and Reddy, G. M. (1986) Plantlet regeneration from glume calli of maize (*Zea mays* L.). Theoretical and Applied Genetics 72: 120-122.

Ting, Y. C., Yu, M. and Zheng and W. Z. (1981) Improved anther culture of maize. Plant Science Letters 23: 139-145.

Vain, P. and Dunl, V. (1989) Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. by $AgNO_3$. Plant Cell Tissue and Organ Culture 18: 143-151.

Wang, A. S. (1987) Callus induction and plant regeneration from maize mature embryos. Plant Cell Reports 6: 360-362.

Ward, K. A. and Jordan, M. C. (2001) Callus formation and plant regeneration from immature and mature embryos of rye (*Secale cereale* L.). *In Vitro* Cell Development Biology-Plant 37: 361-368.

Wu, M. S. and Wang, X, F. (2006) Effects of plant growth regulator 2,4-D, KT and BA on callus induction and plant regeneration from mature embryos of maize. Maize Genetics Cooperation Newsletter 80: 25-26.

Zhang, S. and Lemaux, P. G. (2002) Transformation of recalcitrant maize elite inbreds using *in vitro* shoot merristematic cultures induced from germinated seeding. Plant Cell 21: 263-270.

Zhao, C. C., Zhang, L. J., GE, C. and Hu, K. (2008) Establishment and optimization of the regeneration system of mature embryos of maize (*Zea mays* L.). Agricultural Sciences in China 7: 1046-1051.

Plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea mays* L.)

Hassan Rahnama * and Soheila Takavar

Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran

Abstract

An efficient maize regeneration system was developed using mature embryos. The use of mature embryos from dry seeds possesses several advantages: mature embryos are easy to handle and available throughout the year and in bulk quantities. In this study, mature dry seeds of five maize inbred lines (K126, L105, B73, Mo17 and S61) were used. Embryos were removed from surface-sterilized mature seeds and sliced into halves. They were used as explants to initiate callus on induction medium containing 4 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Mature embryos were incubated at 27 °C in darkness. The induction frequency of primary calli was over 90% for all tested inbred lines. Then, the primary calli were transferred onto subculture medium supplemented with 2.0 mg/l 2,4-D concentrations 0.2 or 0.5 mg/l of 6-benzylaminopurine (BA) or Thidiazuron (TDZ) and 10 mg/l $AgNO_3$. Embryogenic callus readily formed plantlets on regeneration medium supplemented with 0.2 or 0.5 mg/l BA or TDZ. The regenerated plantlets were transferred to half-strength Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.6 mg/l indole-3-butyric acid (IBA) to develop roots. The frequency of green shoot formation ranged from 18.3-40.25%. The highest mean percent (40.25%) was observed for S61 genotype on medium containing 0.2 mg/l TDZ and 10 mg/l $AgNO_3$. This efficient regeneration system provided a solid basis for genetic transformation of maize.

Key words: Regeneration, Mature embryo, Embryogenesis, Maize (*Zea mays* L.)

* Corresponding Author: hrahnama@abrii.ac.ir