مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۲، شماره ۲، سال ۱۳۸۰(۳۷۶-۳۶۷)

القای رشد مجدد کالوس های غیر فعال شده و بررسی تنوع سوماکلونی در ارقام جو

منصور امیدی[1]، پریچهره احمدیان تهرانی[2] و بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی[3]
۱الی ۳ – به ترتیب استاد یار، استاد و استاد یار گروه زراعت و اصلاح نباتات
دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش۷۹/۸/۱۱

خلاصه

جهت القای رشد مجدد کالوس های غیر فعال شده و بررسی تنوع سوماکلونی در جو، ۴ ژنوتیپ دو ردیفه و ۴ ژنوتیپ شش ردیفه با مبدأ ایرانی و ژاپنی از کلکسیون غلات گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران انتخاب گردید. دو هفته بعد از گرده افشانی جنین نارس آنها در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ با ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D کشت گردید. کالوس ها تقریباً هر یک ماه در تاریکی و دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی گراد واکشت شدند. بعد از اینکه کالوس ها برای مدت لازم در محیط کالوس دهی واکشت شدند رشد آنها متوقف و آبکی و غیر جنین زا شدند. جهت بازگرداندن رشد مجدد کالوس‌های جنین زا و باززایی، تیمارهای مختلف هورمونی، نوری (شدت، مدت) و سرما دهی بکار برده شد. که فقط تیمار سرمای ۵ درجه سانتی گراد پاسخ مناسبی داد و در بین تیمارهای سرما، ۱۵ روز سرمای ۵ درجه سانتی گراد بیشترین میزان رشد مجدد کالوس های جنین زایی و باززایی را باعث گردید و با استفاده از این تیمار تقریباً تمام توان جنین زایی در تمام ژنوتیپ های مورد مطالعه القا شد. برای بررسی تنوع سوماکلونی شمارش کروموزومی در کالوس های ۹-۷ ماهه، ۱۲-۱۰ ماهه، ۱۵-۱۳ ماهه صورت گرفت که در بین ژنوتیپ های مورد مطالعه تفاوت چندانی مشاهده نگردید. ولی با افزایش طول زمان کشت در پتری، پوپلوئیدی و آنیوپلوئیدی افزایش یافت. ضمن اینکه بیش از ۸۰٪ سلول‌های دیپلوئید بودند.

واژه‌های کلیدی: جو، کالوس، تنوع سوماکلونی، سرمادهی، جنین نارس، محیط MS، شمارش کروموزومی ، القای رشد .

مقدمه

بزرگترین مشکل برخی روش های کشت بافت احتمال وقوع تنوع ژنتیکی و موتاسیون در آن است. تنوع ژنتیکی که در گیاهان تولید شده در شرایط آزمایشگاهی مشاهده می‌شود. تنوع سوماکلونی[1] نامیده می‌شود که غالباً نتیجه ناپایداری ژنتیکی است. تنوع اپی ژنتیکی نیز همانند تنوع سوماکلونی ممکن است در نتیجه تغییر در بروز ژن اتفاق افتد که این تنوع برگشت پذیر بوده و موروثی نیست (۱). تکرار و کشت در شرایط آزمایشگاهی احتمال وقوع موتاسیون و تنوع سوماکلونی را افزایش می دهد. این مسئله مخصوصاً در کشت کالوس، تعلیقی، سلول و پروتوپلاست بیشتر است (۲۰). به نظر می رسد تنوع سوماکلونی مختص گونه و یا اندام خاصی نیست ولی در همه گیاهان باززایی شده مشاهده نمی گردد و طیف گسترده ای از خصوصیات ظاهری، فیزیولوژیکی، و بیوشیمیایی را در بر

مکاتبه کننده : منصور امیدی
1- Somaclonal Variation

می گیرد که بعضی از آنها ممکن است در اصلاح گیاهان مهم باشد (۲). اطلاع از تغییرات ژنتیکی سوماکلون ها از نظر افزایش تنوع ژنتیکی یا کنترل و متوقف کردن آن اهمیت دارد. منشا تغییرات ژنتیکی هم می تواند از تغییرات موجود قبلی در ریزنمونه باشد که بعداً در شرایط آزمایشگاهی تکثیر می شود و یا اینکه در کشت آزمایشگاهی القا گردد. شواهدی بر هر دو مورد توسط داماتو[1] در سال ۱۹۸۶ بیان شده است. عوامل احتمالی زیادی در تغییرات ژنتیکی در شرایط آزمایشگاهی دخالت دارند. ترکیب محیط های کشت از نظر مواد تنظیم کننده رشد (بخصوص 2,4-D)، کمبود عناصر اساسی (مثل کلسیم)، کمبود اکسیژن[2]، جهش زایی خود به خودی[3] و تنش در شرایط آزمایشگاهی همگی ممکن است عوامل بالقوه موتاسیون زایی باشند (۴). این تغییرات طیف کاملی از تغییرات ژنتیکی از سطح پلی پلوئیدی و آنیو پلوئیدی تا شکستگی های کروموزومی، نو ترتیبی ژن[4]، از دست رفتن ژن، تحرک ترانسپوزونی، و جهش های نقطه ای را شامل می‌شود که به تنهایی یا با همدیگر عمل می کنند (۶ و ۱۵). پلی پلوئیدها ممکن است بطور طبیعی در سلول های مضاعف شده داخلی[5] از قبل وجود داشته باشند ولی اکثراً از طریق دو مکانیسم مختلف یعنی مضاعف شدن داخلی[6] و عدم تشکیل دوک مشاهده می شود. معمولاً آنیوپلوئیدی در شرایط آزمایشگاهی یا از طریق قطعه قطعه شدن هسته ای[7] (غیر میتوزی) صورت می‌گیرد که بعداً از طریق میتوز دنبال می شود و یا رفتارهای غیر عادی کروموزومی در خلال میتوز باعث ایجاد آن می شود (۴).

تحقیقات نشان داده است جو زراعی حاصل از کالوس‌های بدست آمده از جنین نارس اغلب دیپلوئید بوده اند (۳ و ۹) و جو زراعی هوردئوم ولگار[8] و هوردئوم جابتوم[9] و هیبریدهای بین گونه ای بدست آمده از کالوس های حاصل از جنین نارس نیز اکثراً دیپلوئید بوده اند در حالیکه تعدادی گیاه آنیوپلوئید در بین آنها مشاهده شد (۱۹). در این مطالعه نتیجه گرفته شد که سلول های پلی پلوئید بطور کامل و تا اندازه ای سلول های آنیوپلوئیدی مانع باززا شدن گیاهان گردیدند و گیاهان باززایی شده عمدتاً از این سلول ها (پلی پلوئیدها بطور کامل و آنیوپلوئیدها تا حدی) نبودند. در مطالعه دیگری نوترتیبی های کروموزومی فقط در کشت کالوس مشاهده شد (۲۳٪) و ۱۷/۷٪ نیز آنیوپلوئید نشان دادند (۱۶). در صورتیکه هوردئوم دیستیکوم باززایی شده از همان ریزنمونه ها همگی دیپلوئید بودند (۱۴).

حداقل دو عامل نوع ریزنمونه و سن کشت را می توان بعنوان تأثیر گذار بر میزان تنوع سوماکلونی بیان کرد. کشت های کوتاه مدت (۲-۳ ماهه) بدست آمده از ریزنمونه های حاصل از جنین نارس باثبات‌ترین گیاهان را تولید کردند در صورتیکه کشت‌های طولانی مدت حاصل از جنین رسیده بالاترین میزان گاهچه های آلبینو و نابسامانی کروموزومی را داشتند. ولی گونه بر روی تنوع سوماکلونی اثری نداشته است (۴). اکثر تنوع به صورتی که در کشت سلولی وجود دارد در خلال فرآیند باززایی حذف می شود و منجر به کاهش تنوع سوماکلونی قابل توارث در جو می‌گردد. تولید ارقام جو مقاوم به پاتوژن های گیاهی ویروس موزائیک زرد و قارچ هلمین توسپوریوم ساتیوم[10] باعث ایجاد انگیزه برای دنبال کردن تحقیقات در زمینه های تنوع سوماکلونی و انتخاب درون شیشه ای برای حل اهداف اصلاحی خاص شده‌اند (۴). تنوع ژنتیکی خودبخودی و القایی در جو بطور گسترده ای دیده شده است (۱۲). این مواد گیاهی کاربرد وسیعی در تهیه ارقام و بالا بردن اطلاعات در زمینه توارث پذیری و کنترل ژنتیکی یک صفت دارند (۴). تنوع خود به خودی مدت های مدیدی است که برای تهیه ارقام جدید اصلاح شده استفاده می‌شود، ولی جهش یافته های القایی نیز نقش افزاینده و مهمی در تهیه ارقام داشتند (۱۷). علاوه بر تنوع خودبخودی و القایی با استفاده از تکنولوژی های سوماکلون و گامتوکلون، امکان رسیدن به اهداف کوتاه مدت اصلاحی فراهم می گردد. لازم به ذکر است که این تکنولوژی ها جایگزین اصلاح نباتات سنتی نمی گردد بلکه باعث تسریع در فرآیندهای اصلاحی مذکور می شوند (۷).

1. Damato
2. Anoxia
3. Automutagenesis
4. Rearrangement
5. Endoreduplicated
6. Endoredupliation
7. Nuclear fragmentation
8. Hordeum volgar
9- Hordeum Jumbtum
10. Helmintosprium sativum

در کونه های مختلف جو مانند هوردئوم ولگار، هوردئوم اسپانتانئوم[1]، هوردئوم بلبوزوم[2] و هوردئوم جابتوم باززایی گیاه از کالوس های حاصل از جنین های نارس گزارش شده است (۵، ۲۳). با این حال مشخص شده است توان مورفولوژی (ریخت زائی) در هوردئوم ولگار وابسته به ژنوتیپ است.

در آزمایشی بر روی ۳ رقم جو، برگ جوان و جنین نارس با اندازه ۰/۱ تا ۱/۵ میلی متر در محیط MS کشت گردید. نمونه ها ۱۲-۱۰ روز بعد از واکشت تهیه و برای مطالعه سیتوژنتیکی آماده شدند. که فراوانی نسبی سلول های دیپلوئید را از کالوس های جو نشان می داد. فراوانی سلول های دیپلوئید و تتراپلوئید در ریزنمونه های مختلف و در بعضی مواقع در بین ارقام متفاوت بود. فراوانی آنیوپلوئیدها و یوپلوئیدها در تمام حالات کم یا خیلی کم بود. فقط در کالوس های بدست آمده از برگ جوان فراوانی تتراپلوئیدها افزایش معنی داری با افزایش سن کشت داشت(۱۱). در مطالعه دیگری در کشت جنین نارس جو در محیط MS، در تمام کالوس های جنین زا سلول های دیپلوئید به فراوانی مشاهده شدند. سلول‌های هاپلوئید، تتراپلوئید، اکتاپلوئید و تری پلوئید نیز با فراوانی کم وجود داشتند. با مطالعه شمارش کروموزومی در ۵ کالوس طی ۱ تا ۱۵ روز بعد از کشت مشخص گردید که تغییرات کروموزومی در طی دوران کشت صورت می گیرد. حدس زده می شود که تعادل در تعداد کروموزوم های سلول های یک کالوس یک پیش نیاز برای بدست آوردن گیاهان باززایی شده است (۲۲). در مطالعه تعداد کروموزوم در کشت های طولانی مدت جو، جوانه های ساقه (در حال تقسیم میوز) در محیط LS [3] کشت شدند. در دو ماهگی همه سلولها دیپلوئید بودند. در کشت‌های ۵ ماهه سلول های تتراپلوئید مشاهده شدند. در کشت‌های ۳۶ ماهه فراوانی سلول‌های یوپلوئید و آنیوپلوئید افزایش یافت (۲۱).

برای بررسی آثار سرما روی رشد و باززایی کالوس های گندم، در کشت خوشه نارس ۳ لاین گندم در محیطMS، دمای پایین باعث کاهش کالوس دهی شد و با افزایش طول دوره سرمادهی میزان کالوس دهی و میزان رشد کالوس کاهش بیشتری داشت. باززایی در هر ۳ رقم بعد از ۶ ماه بشدت پایین آمد که با تیمار ۵ تا ۱۵ روز سرما باززایی به نسبت متفاوت در ۳ رقم بازگردانده شد. تیمار ۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ روز بهترین نتیجه را برای هر سه رقم نشان داد (۱۳). در آزمایشی روی یک نوع شبدر درجه حرارت پایین نتوانست باعث بازگرداندن توان باززایی گردد (۱۸). به نظر می رسد که کاهش توان باززایی در کشت های طولانی حداقل در بعضی موارد به دلیل تغییرات ژنتیکی نبوده بلکه به علت شرایط خاص کشت بوده است (۱۳). در تحقیق دیگری در کشت جنین نارس، برگ جوان و گل آذین نارس جو در محیط MS مشخص شد میزان آنیوپلوئیدی و یوپلوئیدی در طی زمان افزایش می‌یابد (۱۰).

هدف از انجام این تحقیق القای رشد مجدد به کالوس ها و بازگرداندن توان جنین زایی در جوهای ایرانی و ژاپنی در کالوس های کاملاً غیر فعال و غیر جنین زا و نیز مطالعه تنوع سوماکلونی از نظر تعداد کروموزوم در طی زمان در این ارقام بود.

مواد و روشها

چهار ژنوتیپ جو دو ردیفه بنام های شماره ۱۱ ژاپنی، شماره ۱۷ کلکسیون، گرگان ۴ ، و ارس و چهار ژنوتیپ شش ردیفه به نام‌های شماره ۱ ژاپنی، شماره ۵ کلکسیون، والفجر، و زرجو با مبداهای ایرانی و ژاپنی از کلکسیون غلات دانشکده کشاورزی کرج در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند.

ارقام در سال ۱۳۷۶ در ۳ تاریخ در مزرعه و در ۳ تاریخ در گلخانه دانشکده کشاورزی کرج کشت شدند. حدود ۲ هفته بعد از گرده افشانی خوشه ها به آزمایشگاه منتقل و در آنجا سترون شدند و با استفاده از میکروسکوپ دو چشمی و در زیر لامینار فلو جنین های نارس با ابعاد ۰/۳ تا ۲/۵ میلی متر در روی محیط کشت جامد MS با ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D در ظروف پتری ۱۰ سانتی متری بصورتی که اسکتلوم در بالا باشد کشت شدند. واکشت هر ۵-۴ هفته یکبار صورت گرفت و پتری ها در تاریکی و در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. کالوس ها بعد از واکشت های لازم در محیط و در شرایط مذکور، جهت القای رشد مجدد کالوس های جنین زا و بررسی تنوع سوماکلونی، به محیط و شرایط زیر منتقل گردیدند (چون طی مدت مذکور کالوس ها عمدتاً به کالوس های غیر جنین زا و آبکی تبدیل شدند و رشد آنها کاملاً متوقف گردید):

1. Hordeum spontaneum
2. Hordeum bulbosum
3. Linsmaier & skoog (1965)

الف-تیمارهای هورمونی

کالوس ها به محیط های مختلف از نظر نوع و میزان هورمون طی ۴-۳ واکشت (۵-۴ هفته‌ای) منتقل شدند این محیط ها عبارت بودند از:

-محیط های شوک 2,4-D. شامل ۱۵، ۳۰ و ۴۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D .

-محیط با ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D

-محیط بدون هورمون

-محیط شامل ۱ میلی گرم در لیتر IAA [1] و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP [2]

-محیط شامل ۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D، و ۰/۲ میلی گرم در لیتر BAP

-محیط شکر مضاعف: شامل ۶۰ گرم ساکارز در لیتر

طی هر واکشت یکی از تیمارهای فوق بررسی شد و در واکشت های مختلف نیز تلفیقی از این تیمارها مطالعه گردید.

ب- تیمارهای نوری

تیمارهای ۱۲ و ۱۶ ساعت نور با شدت ۱۵۰۰-۱۰۰۰ لوکس، ۳۰۰۰-۲۵۰۰ لوکس، و ۴۵۰۰-۴۰۰۰ لوکس برای محیط های مختلف کشت بکار برده شد.

ج-تیمارهای سرما

بعد از اعمال شرایط فوق در دمای ۱ ±۲۵ درجه سانتی گراد، کالوس ها به شرایط سرما منتقل شدند. تیمارهای سرما شامل دمای ۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ روز و سرمای ۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ روز همراه با ۵ روز سرمای صفر درجه سانتی گراد تحت شرایط ۱۶ ساعت نور با شدت ۱۵۰۰-۱۰۰۰ و ۲۵۰۰-۲۰۰۰ لوکس و نیز سرمای ۲/۵±۷/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز در تاریکی بود.

د- واکشت زودهنگام

در این تیمار پتری ها هر دو هفته یکبار به همان محیط و تحت همان شرایط واکشت شدند.

تیمار سرما برای ریشه دار شدن

گیاهچه های باززایی شده که فقط قسمت هوایی را تولید نمودند و فاقد ریشه بودند جهت ریشه دار شدن مدت ۵ روز در سرمای ۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

روش آماده کردن نمونه

بعد از جدا کردن نمونه های ریشه و کالوس از بافت اصلی، نمونه ها برای مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر صفر درجه و بعد از آن جهت تثبیت به مدت ۲۴ ساعت در محلول ۳:۱ در یخچال قرار داده شدند. برای رنگ آمیزی از محلول ۱٪ استواورسیئن به مدت ۵-۴ ساعت در دمای اتاق استفاده شد.

مشاهده نمونه

بعد از خارج کردن نمونه ها از محلول رنگ آمیزی و سه بار شستشو با آب مقطر و گرفتن آب اضافی آن، نمونه ها برای مدت ۵۰-۴۰ دقیقه در محلول پکتیناز ۴٪ در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

بعد از خارج کردن از پکتیناز، شستشو و گرفتن آب اضافی، نمونه ها روی لام در یک قطره اسید استیک ۴۵٪ اسکواش و مشاهده گردیدند.

برای بررسی سیتوژنتیکی انتهای ریشه های ۲-۱ سانتی‌متری که هنوز تارهای کشنده آنها ظاهر نشده بود جدا گردید و تیمار و مشاهدات لازم بر روی آنها صورت گرفت. در کالوس‌هایی که رشد مجدد آنها شروع شد ۷-۵ روز و ۱۲-۱۰ روز بعد از واکشت نمونه برداری از اندام باززایی شده، کالوس‌های جنین زا، و کالوس‌های غیر جنین‌زا انجام و تیمار و مشاهدات لازم در آنها صورت گرفت. ساعت برداشت در طول روز نیز در سه زمان صبح (بلافاصله بعد از شروع نوردهی)، ساعت ۱۲-۱۱ ظهر (۴-۳ ساعت بعد از شروع نوردهی)، ۱۷-۱۶ عصر (۹-۸ ساعت بعد از شروع نوردهی) بود.

شمارش کروموزومی

شمارش کروموزومی در مراکز رشدی با سلول های مریستمی در کالوس های ۹-۷ ماهه و ۱۲-۱۰ ماهه و ۱۵-۱۳ ماهه صورت گرفت. شمارش کروموزومی بر اساس درصد نمونه دارای کمتر از ۱۴ کروموزوم، دارای ۱۴ کروموزوم، بین ۱۴ تا ۲۸ کروموزوم، ۲۸ کروموزوم، دارای بیشتر از ۲۸ کروموزوم تعیین گردید.

نتایج و بحث

پس از اینکه کالوس ها برای مدت لازم در محیط MS و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی گراد در تاریکی واکشت شدند بتدریج به کالوس های غیر جنین زا و آبکی تبدیل شدند و رشد آنها کاملاً متوقف گردید. لذا جهت القای رشد مجدد و جنین زایی،

1. 1H-indole-3-acetic acid
2. 6- benzylamino purine

محیط و شرایط متفاوتی اعمال گردید. لازم به یادآوری است که در هر بار واکشت نیز اندام باز زا شده آنها قطع و فقط کالوس ها واکشت گردیدند.

تیمارهای مختلف هورمونی و نوری

شرایط نوری متفاوت از نظر طول مدت نور و شدت آن و نیز واکشت زودهنگام هیچگونه تأثیری در شروع رشد مجدد کالوس‌ها نداشت. تیمارهای مختلف هورمونی و شکر دو برابر نیز باعث القای رشد مجدد کالوس ها نشدند و فقط تیمار ۴۵ میلی گرم در لیتر 4D و 2 باعث شروع رشد محدود و اندکی در کالوس های ژنوتیپ شش ردیفه شماره ۱ کلکسیون و دو ردیفه شماره ۱۷ کلکسیون گردید.

تیمارهای سرما

بعد از اینکه تیمار های مختلف هورمونی و نوری و نیز وا کشت زود هنگام در شروع رشد مجدد کالوسها تأثیری نگذاشت از تیمارهای سرما استفاده گردید.تیمار سرما۲/۵± ۷/۵ درجه‌سانتی گراد چون تعداد نمونه ها کافی نبود از بررسی ها حذف گردید.تیمارهای سرما همگی باعث شروع رشد مجدد کالوسها وایجاد کالوس های جنین زا و فشرده شدند و متعاقب آن جوانه زنی و باززایی ریشه و میزان کمتری باززایی ساقه در آنها شروع گردید . درصد کامل کالوس‌های جنین زا شده واحتمالاً اندام زایی کرده در جدول۱ ذکر شده است . ضمناً دو تیمار مختلف شدت نور تأثیری در شروع رشد مجدد کالوس ها نداشت.همانگونه که در جدول۱ آمده است بالاترین میانگین رشد مجدد کالوس های جنین زا در ارقام شماره ۱ژاپنی، شماره ۱۷ کلکسیون ، گرگان۴، و ارس مشاهده گردید که با میزان باززایی اولیه این ارقام نیز مطابقت دارد چون بالاترین میزان باززایی اولیه را نیز همین ارقام داشته اند.از طرفی رقم شش ردیفه زرجو که کمترین میزان باززایی اولیه را داشت،در اینجا جزو ارقامی است که رشد مجدد کالوس جنین زا در آن کم بود.بنابر این تیمارهای سرمای۵درجه سانتی گراد در بازگرداندن درصد بالایی از رشد مجدد کالوس های جنین زا مؤثر بود.بالاترین میانگین رشد مجدد کالوس های جنین زا در تیمار ۱۵روز سرما و بعد از آن۲۰روز سرما مشاهده گردید و کمترین میزان رشد مجدد در تیمار۳۰روز سرمای ۵درجه به اضافه ۵روز سرمای صفردرجه سانتی گراد مشاهده گردید(جدول۱).جهت بررسی آماری تیمارهای مختلف سرما از طرح بلوک‌های کامل تصادفی استفاده گردید بدین صورت که۸ژنوتیپ به عنوان۸ بلوک و۶تیمار سرما به عنوان تیمارهای آزمایش به کار برده شدند.نتایج تجزیه واریانس در جدول۳و مقایسه میانگین ژنوتیپ ها در جدول۴و مقایسه میانگین‌های تیمار های مختلف سرما در جدول۵آورده شده است.همانگونه که در جدول۳ آمده است ژنوتیپ های مختلف تفاوت های کاملاً معنی داری با همدیگر داشتند و با استفاده ازجدول مقایسه میانگین ها (جدول۴)مشخص گردید ژنوتیپ شش ردیفه شماره۱ ژاپنی بیشترین رشد مجدد را در کالوسها داشته است و ژنوتیپ های دو ردیفه شماره۱۷ کلکسیون و گرگان ۴که باززایی بالایی داشتند در اینجا نیز در رشد مجدد کالوس ها جزو گروه های بالا بوده اند و ژنوتیپ شش ردیفه زرجو که کمترین میزان باززایی اولیه را داشته است به همراه ژنوتیپ شش ردیفه شماره ۵ کلکسیون کمترین میزان رشد مجدد کالوس را داشته اند.بنابراین بین میزان رشد مجدد کالوس ها با استفاده از تیمار سرمای۵ درجه سانتی گراد و باززایی اولیه تشابه کاملی مشاهده گردید بدین صورت که ژنوتیپ هایی که باززایی اولیه بالایی داشته اند در تیمار سرما نیز رشد مجدد کالوس های جنین زا در آنها بالا بود.بعکس ژنوتیپ هایی که باززایی اولیه آنها کم بود در اینجا نیز رشد مجدد کالوس در آنها پایین بود.تیمارهای مختلف سرمای اعمال شده در تجزیه واریانس تفاوت معنی داری با همدیگر نداشتند(جدول۳)ولی در مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در گروه‌های مختلفی قرارگرفته‌اند که بالاترین میزان رشد مجدد با استفاده از۱۵روز سرمای۵درجه سانتی‌گراد و کمترین میزان رشد با تیمار ۳۰ روز سرمای۵درجه سانتی‌گراد باضافه۵روز سرمای صفر درجه سانتی‌گراد حاصل شد و چهار تیمار دیگر سرما در یک گروه قرارگرفته اند(جدول۵).لذا می توان تیمار۱۵ روز سرمای۵ درجه سانتی گراد را به عنوان بهترین تیمار سرما دهی برای رشد مجدد کالوس ها ذکر کرد و با توجه به استفاده های بهینه از دستگاه های سرماده، تیمار حد اقل تعداد روز سرما دهی(۵روز سرمای۵درجه سانتی‌گراد) تیمار قابل توصیه و مناسب می باشد.با توجه به اینکه ارقام مورد مطالعه در بسیاری از صفات از جمله میزان باززایی اولیه تنوع خوبی داشتند می‌توان بیان داشت در ارقام مختلف جو دو ردیفه

و شش ردیفه تیمارهای هورمونی و نوری تأثیری در القای رشد مجدد کالوسهای جنین زا ندارد در صورتی که با استفاده از تیمار سرمای۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت۵تا۲۰ روز می توان تمام توان جنین زایی را باز گردانید.

تیمار سرما برای ریشه دار شدن

جهت ریشه دار شدن کالوس هایی که در باززایی فقط ساقه دادند از تیمار۵ روز سرمای۵درجه سانتی‌گراد استفاده شد که کاملاً مؤثر بود و تمام گیاهچه هایی که فاقد ریشه بودند در این تیمار ریشه دار شدند لذا می‌توان آنرا تیمار بسیار مناسبی برای ریشه زایی در ارقام مختلف جو ذکر نمود.این تیمار در مقایسه با تیمارهای دیگر سرما دهی که تعداد روز بیشتری از دستگاه استفاده گردید نیز مناسب ترین می باشد چون حداقل زمان از دستگاه های سرماده استفاده شده است.گیاهچه های ریشه دار در مخلوطی از خاک برگ پوسیده،سبوس برنج،و ورمیکولیت به نسبت مساوی منتقل شدند.

زمان نمونه برداری از کالوس

بین سه زمان نمونه برداری در طول روز تفاوت مشخصی مشاهده نگردید.بنابراین احتمالاً زمان نمونه برداری از کالوس در طول شبانه روز در تعداد سلول های در حال تقسیم تأثیر بسزایی نداشته است.در دو زمان ۷-۵روز و ۱۲-۱۰روز بعد از واکشت، نمونه برداری از کالوسها صورت گرفت که زمان نمونه برداری۱۲-۱۰روز بعداز واکشت بنظر مناسب تر بود و در این زمان نمونه برداری احتمالاً تعداد سلول های در حال تقسیم بیشتر بودند که این با نتایج آزمایش های رویزو و واسکوئز[1] در سال ۱۹۸۲بر روی جو کاملاً مطابقت دارد.زمان نمونه برداری ۷-۵روزبعدازواکشت نیز زمان نسبتاً مناسبی بود این زمان توسط فلومینهان و کامیا[2] برای کالوس های ذرت توصیه شده است.

مشاهده سلولی و شمارش کروموزومی

کالوس هایی که رشد آنها متوقف و آبکی شده بودند همگی دارای سلولهایی بودند که عمدتاً فرم کشیده و غیر گرد پیدا کرده، هسته آنها تحلیل رفته و غیر فعال شده بود و در بسیاری از آنها بعد از رنگ آمیزی نقاطی کاملاً گرد و رنگ پذیر که عمدتاً خارج هسته بودند مشاهده گردید.این سلول ها کاملاً غیر فعال بوده و دارای واکوئل های بزرگی بودند.بعد از اینکه با اعمال تیمار سرما رشد مجدد کالوس ها شروع گردید.از مراکز در حال رشد کالوس‌ها نمونه برداری صورت گرفت.در این زمان در بسیاری از مناطق کالوس ها مراکز رشدی مریستمی ایجاد شده بود که سلول‌های آن دارای هسته های بزرگ و رنگ پذیر بودند.سلول‌ها شکل طبیعی گرفته واکوئل آنها کوچک و هسته کاملاً فعال بود این مناطق مریستمی و در حال رشد در قسمت های کالوس‌ها و در کنار سلول های غیر فعال مشاهده می‌شدند. در این مراکز رشدی هسته ها در مراحل مختلف تقسیم مشاهده می‌شدند.(شکل۱). بعد از اینکه کالوس ها مجدداً شروع به رشد کردند و کالوس های جنین زا و اندام زا تولید شد از مراکز مریستمی کالوس ها و اندام باززا شده جهت شمارش کروموزومی نمونه برداری گردید که خلاصه نتایج حاصل در جدول۲ذکر شده است . بصورتی که بیش از ۸۰٪ سلولهای مورد مطالعه دارای۱۴ کروموزوم بودند و در ژنوتیپ های مختلف نیز تفاوت چندانی به نظر نمی رسد.از طرفی با افزایش طول دوره کشت در صد سلولی‌هایی که دارای تعداد کروموزومی غیر از۱۴بودند بیشتر بود و در تمام ژنوتیپ ها افزایش طول دوره کشت باعث افزایش در تغییر تعداد کروموزوم گردید(شکل۲).جهت بررسی آماری تغییر در تعداد کروموزوم نتایج در طرح کاملاً تصادفی بررسی گردید و۸ژنوتیپ و سه طول مختلف دوره کشت تفاوت معنی داری نشان ندادند(جدول ۶) .در بررسی میانگینهای ۸ژنوتیپ(جدول۷) و بررسی میانگین های سه طول دوره کشت(جدول۸)تفاوتی مشاهده نگردید وبا میانگین حدود۲۰در یک گروه قرار گرفتند. بنابراین تغییر در تعداد کروموزوم در جو به ارقام مربوط نمی شود و حداقل طول دوره رشد در این تغییرات مؤثر است که با نظرات با جاج (۱۹۹۰) مطابقت دارد.

1. Ruiz and Vazques
2. Fluminhan and Kameya

جدول ۱-درصد کالوس‌های جنین‌زا شده (یا باززایی شده) در تیمارهای مختلف سرما در ژنوتیپ‌های جو ایرانی و ژاپنی

ژنوتیپ	تیمارهای سرما						
	۵ روز 5^0C	۱۰ روز 5^0C	۱۵ روز 5^0C	۲۰ روز 5^0C	۲۵ روز 5^0C	۳۰ روز 5^0C+ ۵ روز 0^0C	میانگین
شماره ۱ ژاپنی	۱۰۰	۹۲	۹۶	۹۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۶
شماره ۵ کلکسیون	۱۹	۱۵	۶۷	۰	۳۷	۱۷	۲۶
والفجر	۴۰	۶۱	۵۶	۹۴	۵۹	۲۸	۵۶
زرجو	۱۳	۲۷	۳۰	۳۳	۳۱	۳۷	۲۹
شماره ۱۱ ژاپنی	۹۳	۵۸	۱۰۰	۸۴	۶۶	۴۸	۷۵
شماره ۱۷ کلکسیون	۱۰۰	۶۰	۹۶	۹۴	۱۰۰	۵۴	۸۴
گرگان ۴	۱۰۰	۱۰۰	۸۸	۱۰۰	۶۹	۹۰	۹۱
ارس	۷۵	۸۲	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۰	۹۱
کل	۵۴۰	۴۹۵	۶۳۳	۵۹۵	۵۶۲	۶۴۶	۶۹
میانگین	۶۸	۶۲	۷۹	۷۴	۷۰	۵۸	۶۹

جدول ۲- درصد فراوانی سلول های با تعداد کروموزوم متفاوت در کالوس و گیاهان باززایی شده حاصل از جنین نارس در طول دوره های متفاوت

ژنوتیپ	طول دوره کشت (ماه)	تعداد کروموزوم				
		<۱۴	۱۴	>۱۴و<۲۸	۲۸	>۲۸
شماره ۱ ژاپنی	۷-۹	۳/۲	۹۰/۴	۳/۲	۳/۲	۰/۰
	۱۰-۱۲	۵/۰	۸۷/۵	۲/۵	۵/۰	۰/۰
	۱۳-۱۵	۶/۰	۸۸/۰	۳/۰	۳/۰	۰/۰
شماره ۵ کلکسیون	۷-۹	۳/۳	۹۳/۴	۳/۳	۰/۰	۰/۰
	۱۰-۱۲	۳/۲	۸۴/۳	۶/۴	۳/۲	۳/۲
	۱۳-۱۵	۵/۶	۸۶/۰	۲/۸	۲/۸	۲/۸
والفجر	۷-۹	۴/۵	۹۰/۹	۲/۳	۲/۳	۰/۰
	۱۰-۱۲	۴/۲	۹۱/۶	۲/۱	۲/۱	۰/۰
	۱۳-۱۵	۷/۵	۸۲/۵	۵/۰	۵/۰	۰/۰
زرجو	۷-۹	۳/۱	۸۷/۶	۱۰/۳	۳/۱	۳/۱
	۱۰-۱۲	۸/۰	۸۰/۰	۴/۰	۸/۰	۰/۰
	۱۳-۱۵	۱۰/۳	۷۲/۵	۳/۴	۶/۹	۶/۹
شماره ۱۱ ژاپنی	۷-۹	۳/۷	۹۲/۶	۳/۷	۰/۰	۰/۰
	۱۰-۱۲	۰/۰	۹۴/۲	۲/۹	۰/۰	۲/۹
	۱۳-۱۵	۳/۳	۸۶/۸	۳/۳	۳/۳	۳/۳
شماره ۱۷ کلکسیون	۷-۹	۳/۹	۸۴/۳	۳/۹	۵/۹	۲/۰
	۱۰-۱۲	۶/۵	۸۲/۶	۲/۲	۶/۵	۲/۲
	۱۳-۱۵	۷/۰	۷۶/۷	۲/۳	۹/۳	۴/۷
گرگان ۴	۷-۹	۲/۵	۹۲/۵	۵/۰	۰/۰	۰/۰
	۱۰-۱۲	۵/۱	۸۴/۶	۲/۶	۲/۶	۵/۱
	۱۳-۱۵	۶/۲	۷۵/۲	۶/۲	۶/۲	۶/۲
ارس	۷-۹	۶/۷	۸۶/۷	۳/۳	۳/۳	۰/۰
	۱۰-۱۲	۳/۰	۹۴/۳	۳/۰	۰/۰	۰/۰
	۱۳-۱۵	۶/۰	۸۹/۰	۳/۰	۶/۰	۶/۰

جدول ۳- تجزیه واریانس تیمارهای سرما در بازگرداندن رشد مجدد کالوس ها در طرح بلوک های کامل تصادفی

منابع تغییر	درجات آزادی	SS	MS	F
ژنوتیپ	۷	۳۳۹۰۶/۴۷	۴۸۴۳/۷۸	۱۹/۰۰**
تیمار سرما	۵	۲۴۴۴/۸۵	۴۸۸/۹۷	۱/۹۲
خطا	۳۵	۸۹۲۲/۶۴	۲۵۴/۹۳	
کل	۴۷	۴۵۲۷۳/۹۷		

جدول ۴- میانگین رشد مجدد کالوس ژنوتیپ های مختلف در تیمارهای سرما با روش دانکن (۵٪)

ژنوتیپ	میانگین
شماره ۱ ژاپنی	۹۶/۳۳a
شماره ۵ کلکسیون	۲۵/۸۳d
والفجر	۵۶/۳۳c
زرجو	۲۸/۵۰d
شماره ۱۱ ژاپنی	۷۴/۸۳bc
شماره ۱۷ کلکسیون	۸۴/۰۰ab
گرگان ۴	۹۱/۱۷ab
ارس	۹۱/۱۷ab

جدول ۵- میانگین تیمارهای سرما در رشد مجدد کالوس ها با روش دانکن (۵٪)

تیمار سرما (روز)	میانگین
۵	۶۷/۵۰ab
۱۰	۶۱/۸۸ab
۱۵	۷۹/۱۳a
۲۰	۷۴/۳۸ab
۲۵	۷۰/۲۵ab
۳۰+۵	۵۸/۰۰b

جدول ۶- تجزیه واریانس تغییرات تعداد کروموزوم در ژنوتیپ های جو طی سه دوره مختلف کشت در طرح کاملاً تصادفی

منابع تغییر	درجات آزادی	SS	MS	F
ژنوتیپ	۷	۵/۸۳	۰/۸۳	۰/۰۰
طول دوره کشت	۲	۱/۶۷	۰/۸۳	۰/۰۰
ژنوتیپ×طول دوره	۱۴	۱۱/۶۷	۰/۸۳	۰/۰۰
خطا	۹۶	۱۳۳۲۶۹/۱۴	۱۳۸۸/۲۲	
کل	۱۱۹	۱۳۳۲۸۸/۳۱		

جدول ۷- میانگین های ژنوتیپ های جو از نظر تغییر در تعداد کروموزوم با روش دانکن (۵٪)

ژنوتیپ	میانگین
شماره ۱ ژاپنی	۲۰/۰۰۰a
شماره ۵ کلکسیون	۲۰/۰۰۰a
والفجر	۲۰/۰۰۰a
زرجو	۲۰/۰۰۰a
شماره ۱۱ ژاپنی	۲۰/۰۰۰a
شماره ۱۷ کلکسیون	۲۰/۰۰۰a
گرگان ۴	۲۰/۰۰۰a
ارس	۲۰/۶۷۰a

جدول ۸- میانگین های سه طول دوره کشت از نظر تغییر در تعداد کروموزوم با روش دانکن (۵٪)

طول دوره کشت (ماه)	میانگین
۷-۹	۲۰/۰۰۰a
۱۰-۱۲	۲۰/۰۰۰a
۱۳-۱۵	۲۰/۲۵a

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱. باقری، ع. ۱۳۷۶. مبانی کشت بافتهای گیاهی. (ترجمه). دانشگاه فردوسی مشهد ۴۰۶ صفحه.

2.Ahloowalia B. S. 1986. Limitation to the use of somaclonal variation in crop improvement. In: Semal J. (ed) Somaclonal variations and crop improvement. Nijhoff. Dordrecht. Pp 14-27.

3. Ahloowalia b. S. 1987. plant generation from embroy-culture cullus in barley. Euphytica 36: 659-665.

4.Bajaj, y.P.S. 1990. Somaclonal variation in crop improvement. I. Springer-verlag Belin Heidelberg. Pp: 685.

5.Breiman A. 1985. Plant regeneration from *Hordeum Spontaneum* and *Hordeum bulbosum* immature embryo derived calli. Plant Cell Rep 4:70-73.
6.D'Amato. F. 1985. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. CRC Crit. Rev. plant Sci. 3:73-112.
7.Evans, D. A., W. R. Sharp, and H. P. Medium-Filho. 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. Am. J. Bot. 71:759-774.
8.Fluminham, A., and T. Kameya. 1996. Behaviour of chromosomes in anaphas cells in embryogenic callus cultures of maize *(Zea mays L.)* Theor. Appl. Genet. 92:982-990.
9.Goldstein, C. S., and W. E. Kronstad 1986. Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley, *Hordeum vulgare*. Theor. Appl. Genet. 71:631-639.
10.Gonzalez, A., M. I. Pelaez, and M. L. Ruiz. 1991. Somatic embryogenesis and cytogenetical studies in barley tissue culture. Vortr. Pflanzenzochtg 20: 154-156.
11.Gonzalez, A. I., M. I. Pelaez and M. L. Ruiz. 1996. Cytogentic Variation in somatic tissue cultures and regenerated plants of barley *(Hordeum vulgare L.)* Euphytica 91:37-43.
12.Hockett E. A., and R. A. Nilan. 1985. Genetics. In:Rasmusson DC (ed) Barley. Am. Soc. Agric. Crop Sci. Soc. Am. Soil Sci. Soc. Am. Madison. pp. 187-229.
13.Hou, B.,H. Yu, and S. Teng 1997. Effects of low temperature on induction and differentiation of wheat calluses. Plant cell Tiss. Org. Gult. 49:35-38.
14.Katoh Y., T. Hasegawa, T. Suzuki, and T. Fujii. 1986. Plant regeneration from the callus derived from mature embryos of hiproly Barley *Hordeum distichum* L. Agric. Biol. Chem. 50:761-762.
15.Larkin P. J. S., A. Ryan., R. I. S. Brettel, and W. R. Scowcroft. 1984. Heritable somaclonal variation in wheat. Theor. Appl. Genet. 67:433-455.
16.Lupotto, E. 1984. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos. Ann Bot 54:523-529.
17.Nilan, R. A. 1981b. Recent advances in barley mutagenesis. In: Asher M (ed) Barley genetics. Vol 4. Proc. 4th Int. Barley Genet. Symp. Univ. Press. Edinburgh.
18.Orshinsky, B. R., and D. T. Tomes. 1985. Effect of long term culture and low-temperature on plant regeneration from a callus line of Birdsfoot trifil. J. Plant Physiol. 119:389-397.
19.Orton. T. J. 1980. Chromosomal variability in tissue cultures and regenerated plant of *Hordeum.* Theor. Appl. Genet. 56:101-112.
20.Pierik, R. L. M. 1987. In vitro culture of higher plants. Martinus nijhoff publishers. pp. 342.
21.Ruize, M. L., and A. M. Vazzques. 1982. Chromosome number evolution in stem derived Calluses of *Hordeum vulgare* L. cultured in vitro. Protoplasma 111: 83-86.
22.Singh, R. J. 1986. Chromosomal variation in immature embryo derived calluses of barley *(Hordeum vulgare L.).* Theor. Appl. Genet. 72:710-716.
23.Vazuez, A. M., and M. L. Ruize, 1986. Barley: Induction of genetic variability through callus cultures. In: Y. P. S. Bajaj (Ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 2: Cropst I. pp. 204-219. Springer-Verlag, Berlin Heldelberg.

Growth Induction of Inactivated Calli and Studying of Somaclonal Variation in Barley Cultivars

M.OMIDI[1], P.AHMADIAN-TEHRANI[2] AND B. E. SAYED TABATABAEI[3]

1,3- Assistant Professor , Professor and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.

Accepted. Nov.1,2000

SUMMARY

This study was conducted to determine the growth induction of inactivated calli and somaclonal variation in barley using 4 two-row and 4 six-row Japanese and Iranian barley selected from cereal collection of the Department of Agronomy, College of Agriculture, University of Tehran. Two weeks after polination, immature embryos were dissected and planted in petri dishes using a soild MS medium with 2 mg/l 2, 4-D. Calli were sub-cultured on the same medium after about one-month. After enough time keeping planting calli in darkness, for growth induction of inactivated calli different treatments of hormone, light (time, intensity), and cold were used. Only cold treatment of 5^0C was suitbale. Cold for 15 days and 5^0C was caused the most growth induction in inactivated calli. In studying somaclonal variation, genotypes didn't show significant differences, but with increase of length of planting period, aneuploidy and euploidy increased.

Key words: Barley, calli, Somaclonal Variation, Cold Treatment, Immature Embryo, MS Medium, Chromosome number, Growth induction.