بررسی کال‌زایی در ارقام مختلف جو

منصور امیدی، پریچهره احمدیان تهرانی، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی و محمد علی رستمی

بترتیب دانشجوی دکترا، استاد و استادیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات

دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۸/۴/۹

خلاصه

جهت بررسی کال‌زایی 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 کشت گردید. کالوس‌های حاصل تقریباً بعد از یک ماه در همان محیط واکشت شدند. در این مطالعه تنوع بین ژنوتیپ‌ها، درون ژنوتیپ‌ها (گیاه) درون گیاه (خوشه) و تاریخ کشت گیاه دهنده جنین در مزرعه و گلخانه برای صفات نسبت کالوس دهی، نسبت رشدی کالوس و اندازه کالوس طی واکشتهای اول و دوم بررسی گردید. در تمام آزمایشات بالاترین نسبت کالوس‌دهی را رقم شش ردیفه زرجو و کمترین نسبت را رقم دو ردیفه گرکان ۴ دارا بودند ژنوتیپ دو ردیفه شماره ۱۷ کلکسیون بالاترین اندازه کالوس و رقم زرجو کمترین اندازه را دارا بودند. ضمنا کالوس‌های تولیدی ژنوتیپ شماره ۱۷ کلکسیون عمدتا جنین‌زا و کالوس‌های تولیدی زرجو عمدتا غیر جنین‌زا بودند. خوشه اثر معنی‌داری در هیچکدام از صفات نشان نداد ولی گیاهان یک ژنوتیپ در بعضی از صفات اثر معنی‌داری داشتند. تاریخ کشت در مزرعه نیز در صفات مطالعه شده تأثیر معنی‌داری نشان داد. بین صفات طی دو واکشت همبستگی کاملا معنی‌داری مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: جو، کالوس، دو ردیفه، شش ردیفه، واکشت، جنین نارس، محیط MS

مقدمه

کشت بافتهای گیاهی با هدف تولید کالوس، گیاه کامل، اندام خاصی از گیاه، نگهداری ژنوتیپ خاص، فراهم آوردن امکان مطالعات سیتوژنتیک، استفاده در بیوتکنولوژی و ایجاد گیاهان ترانس ژنیک و همچنین تولید و انتخاب سوماکلونهای خاص مقبولیت روزافزونی یافته است. مطالعات بسیاری روی شرایط محیطی و ریزنمونه جهت بهبود سیستم‌های باززائی در گیاهان صورت گرفته است(۱۵). ایجاد کالوس‌های جنین‌زا و باززایی با فراوانی بالا در کشت بافت برای فن‌آوری کشت بافت و گیاهان ترانس ژنیک الزامی است(۱۲). کشت کالوس این امکان را فراهم می‌آورد که سیستم‌های باززایی مؤثرتری برای بسیاری از ژنوتیپ‌ها در شرایط مناسب محیطی و نیز محیط کشت مناسب بوجود آید(۱۵). ایجاد کالوس و توان باززایی عمدتاً تحت تأثیر ژنوتیپ و شرایط فیزیولوژیکی ریزنمونه قرار می‌گیرد که در بیشتر گیاهان ژنوتیپ از اهمیت اصلی برخوردار است(۱۲).

در غلات تولید کالوس‌های جنین‌زا از جنین نارس، جنین رسیده، برگهای جوان، و دانه گرده گزارش شده است. در جو تولید کالوس از جنین نارس به مراتب بهتر از اندامهای دیگر می‌باشد. ژنوتیپ‌های مختلف جو میزان متفاوتی کالوس از جنین نارس خود تولید می‌کنند که این به عنوان فاکتوری در مطالعات برای انتخاب

استفاده شده است(۹). گیاهان باززا شده از کشت کالوس ممکن است به عنوان ژرم پلاسم در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرند. اگرچه انتخاب در سطح کالوس به یک سیستم مؤثر جهت شروع کالوس‌دهی، نگهداری کالوس و متعاقباً باززایی گیاه از کالوس نیاز دارد(۸).

ایجاد فنون کارآمد برای کشت بافت و سلول در گونه‌های تک لپه‌ای و مخصوصاً تیره گرامینه نسبت به دولپه‌ایها مشکل‌تر است، باوجود این تشکیل کالوس و باززایی در بسیاری از غلات گزارش شده است(۸). عکس‌العمل جو به کشت بافت بستگی به نوع محیط کشت در مراحل مختلف تشکیل کالوس، نگهداری کالوس، و باززایی دارد(۸). بایلیس و دون (۴) گزارش کردند که تشکیل کالوس در جو با تغییر محیط کشت در شروع کالوس‌دهی تغییر می‌کند و مخصوصاً به میزان ۲و ۴ - دی‌کلرو - فنوکسی استیک اسید (2,4-D) بستگی دارد(۸).

دایل و دیمبروجیو(۶) بیان داشتند که تولید کالوس جو و کیفیت آن با توجه به نوع بافت استفاده شده متغیر است. در مطالعات آنها بهترین میزان و کیفیت کالوس از جنین نارس حاصل شد. جنین نارس در غلات دیگر نیز به فراوانی مورد استفاده قرار گرفته است(۸). گرچه ژنوتیپ به عنوان فاکتور اصلی در کشت بافت جو محسوب می‌شود(۵). اما بسیاری از گزارشات نیز بیانگر آثار مواد موجود در محیط کشت می‌باشد. هیچگونه محیط کشت ایده‌آلی برای جو وجود ندارد و در محیط‌های مختلف کشت، ژنوتیپ‌های مختلف آثار متفاوتی را بروز می‌دهند. بعنوان مثال هانزل و همکاران (۸) آثار معنی‌داری بین ژنوتیپ و محیط کشت در تشکیل کالوس در ۹۶ ژنوتیپ بدست آوردند(۵).

مطالعات ژنتیکی برای کال‌زایی در گونه‌های مختلف غلات مثل برنج، گندم، ذرت و جو گزارش شده است. با استفاده از مارکرهای RFLP نحوه کنترل ژنتیکی توان کال‌زایی و باززایی در ذرت توسط آرمسترانگ و همکاران (۲)، در گوجه‌فرنگی توسط کورنیف و همکاران (۱۱) و در یونجه توسط یاوپالس (۱۶) گزارش شده است.

در جو باززایی ساقه عمدتاً توسط سیستم چند ژنی[1] یا پلی‌ژنی[2] کنترل می‌شود. کوماتسودا و همکاران (۱۰) مشاهده کردند که ژن Shdl که روی بازوی بلند کروموزم شماره ۲ قرار دارد، بر روی ساقه‌دهی مؤثر است. راجع به ژنهای دیگر کنترل کننده باززایی اطلاعات کمتری در اختیار است. مانو و همکاران مشخص نمودند که رشد کالوس و توان باززایی بوسیله سیستم‌های چند ژنی و تک‌ژنی که متفاوت از همدیگرند کنترل می‌شود(۱۲). مطالعات اساسی در مورد ژنهای کنترل کننده خصوصیات کشت بافت یعنی مکانهای ژنی مؤثر در رشد کالوس و باززایی با استفاده از هاپلوئیدهای مضاعف[3] (DH) بدست آمده از تلاقی بین ارقام "Steptoe" و "Mores" در برنامه تهیه نقشه ژنتیکی جو در امریکای شمالی در دست انجام است(۱۲). کوماتسودا و همکاران هفت رقم جو را برای بررسی وضعیت ژنتیکی کال‌زایی و باززایی مطالعه نمودند و برای این دو صفت نتیجه گرفتند که این صفات تحت کنترل تعدادی ژن می‌باشد که دارای وراثت‌پذیری بالایی هستند ضمناً این دو صفت توسط دو مکانیسم ژنتیکی متفاوت کنترل می‌شوند(۹). هانزل و همکاران مطالعه‌ای در ۹۱ ژنوتیپ جو با استفاده از کشت جنین نارس انجام دادند که ۴۵ ژنوتیپ کالوس تولید نمود و ۴۶ ژنوتیپ تولید کالوس نداشت. آنها نتیجه گرفتند که اثر معنی‌داری بین ژنوتیپ و محیط کشت برای تولید کالوس وجود دارد(۸). برکیتزر از طریق کشت جنین نارس در همه ۱۵ ژنوتیپ جو مورد مطالعه کالوس جنین‌زا بدست آورد ولی فراوانی میزان کالوس، مورفولوژی و شکنندگی کالوس‌ها، نسبت رشد کالوس‌ها و قدرت باززایی آنها نسبت به ژنوتیپ، محیط کشت و اثر متقابل ژنوتیپ و محیط کشت متفاوت بود(۱۳).

در مطالعه حاضر سعی شده است که با ثابت نگه داشتن ریزنمونه، محیط کشت و شرایط محیطی کشت، آثار بین ژنوتیپ‌ها و آثار درون ژنوتیپ‌ها و نیز تفاوتهای داخل هر گیاه در ارقام دو ردیفه و شش ردیفه مطالعه گردد و همچنین آثار گلخانه، مزرعه و تاریخ کشت در خاک گیاه دهنده ریز نمونه برای نسبت کالوس‌دهی، نسبت رشدی کالوس و اندازه کالوس بررسی گردد.

مواد و روشها

چهار ژنوتیپ جو دو ردیفه و چهار ژنوتیپ شش ردیفه با مبدأهای ایرانی و ژاپنی از کلکسیون غلات دانشکده کشاورزی کرج

1 - Multipic genes
2- Polygenes
3- Doubled haploid lines

جدول ۱ـ مشخصات ژنوتیپ‌های جو انتخاب شده در آزمایش

شماره‌بکار برده شده در آزمایش	نام ژنوتیپ	مشخصه	مبدأ
۱	شماره۱ژاپنی	شش ردیفه	ژاپن
۲	شماره۵کلکسیون*	شش ردیفه	لاین‌های‌اصلاحی کلکسیون
۳	والفجر	شش ردیفه	اصلاح شده
۴	زرجو	شش ردیفه	اصلاح شده
۵	شماره ۱۱ ژاپنی	دو ردیفه	ژاپن
۶	شماره ۱۷کلکسیون	دو ردیفه	لاین اصلاحی کلکسیون
۷	گرگان ۴	دو ردیفه	اصلاح شده
۸	ارس	دو ردیفه	اصلاح شده

* کلکسیون غلات گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

انتخاب شدند (جدول ۱). در انتخاب ارقام سعی بر این بود تنوع مورفولوژیکی بیشتری بین ارقام وجود داشته باشد.

ارقام در سال ۱۳۷۶ در ۳ تاریخ کاشت ۷۶/۷/۲۰، ۷۶/۸/۱۱ و ۷۶/۹/۴ در مزرعه و در ۳ تاریخ کاشت ۷۶/۷/۱۵، ۷۶/۸/۱۱ و ۷۶/۹/۲۸ در گلخانه دانشکده کشاورزی کرج کشت شدند. در مزرعه بذور روی خطوط ۳ متری با فاصله بین خطوط ۲۵ سانتیمتر کشت شدند. برای هر رقم در هر تاریخ کشت یک کرت ۴ ردیفه کشت شد. شرایط کشت و داشت طبق عرف محل انجام شد. در گلخانه در هر گلدان سفالی با قطر ۲۵ سانتیمتر ۱۰ گیاه کشت که ۴ گیاه باقی ماند و برای هر تاریخ کشت از هر رقم ۴ گلدان کشت گردید.

حدود ۲ هفته بعد از گرده افشانی زمانی که دانه‌ها در اواخر مرحله شیری بودند خوشه‌ها برداشت و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه جهت سترون کردن، ریشک‌ها قطع شده، دانه‌های هر خوشه جداو در پارچه آستری نازک که برای مشخص شدن، شماره دوزی شده بود ریخته و منگنه شدند بعد در زیر لامینارفلو به مدت ۱ دقیقه در الکل ۷۰٪ قرار داده شدند و بلافاصله به مدت ۱۷ دقیقه در محلول تجاری سدیم هیپوکلراید (به غلظت ۲/۵٪ Naocl) قرار داده شدند بعد ۳ بار با آب مقطر سترون شستشو داده شد. با استفاده از بینی‌کولر و در زیر لامینارفلو جنین‌های نارس با ابعاد حدود ۱ میلی‌متر از دانه جدا شدند و در روی محیط کشت جامد در پتری دیش‌های ۱۰ سانتیمتری بصورتی که اسکوتلوم در بالا باشد کشت شدند. در هر پتری ۱۵ عدد جنین کشت گردید.

محیط کشت شامل محیط پایه[1] MS بود که ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D[2]، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر پیریدوکسین اسید[3]، ۱ میلی‌گرم در لیتر تیامین اسید[4]، ۲ میلی‌گرم در لیتر گلایسین[5]، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نیکوتینیک اسید[6]، ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز، و ۷ گرم در لیتر آگار به آن اضافه گردید. pH محیط ۵/۸ با استفاده از NaOH تنظیم گردید. محیط کشت در اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار یک بار سترون شد و در پتری دیش‌های سترون شده تقسیم گردید. در هر پتری حدود ۲۵ میلی‌گرم محیط کشت توزیع گردید.

در مزرعه از هر ژنوتیپ ۱۰ گیاه و از هر گیاه ۳ خوشه و از هر خوشه ۱۵ جنین نارس بعد از سترون شدن در یک پتری کشت گردید. در گلخانه با توجه به شرایط محدود کننده گلخانه که تعداد خوشه‌های یک گیاه و نیز تعداد دانه در هر خوشه کافی نبود ۱۰ گیاه از تاریخهای مختلف کشت انتخاب و جنین‌های نارس آنها کشت گردید.

پتری دیش‌های کشت شده تحت شرایط سترون و در دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد و در تاریکی در اتاقک رشد قرار داده شدند و بعد از ۴ تا ۵ هفته به همان محیط واکشت شدند. در واکشت اول در هر پتری تعداد جنین‌های کالوس داده، نسبت رشد کالوس، و اندازه هر کالوس تعیین شد و ۴ تا ۵ هفته بعد واکشت دوم صورت گرفت که در واکشت دوم نیز تمام مشخصات هر کالوس مانند واکشت اول یادداشت گردید. ضمناً در هر واکشت اندامهای تمایز یافته قطع گردید.

داده‌های حاصل به صورت طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS و EXCEL مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و با توجه به پراکنش نرمال داده‌ها بدون هیچگونه تغییر در

1 - Murashige & Skoog
2- 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid
3 - Pyridoxine HCl
4- Thiamin HCl
5- Glycine
6- Nicotinic acid

مقایسه‌ها بکار برده شدند.

مطالعات آماری برای صفات تعداد کل جنین‌های کالوس داده [1](TNC)، نسبت رشدی کالوس (تعداد کالوس‌های با یک اندازه [2](NC)) و اندازه کالوس [3](SC) صورت گرفت که این صفات برای واکشت اول و واکشت دوم تجزیه و تحلیل گردید. بدین صورت که اثر محیط، اثر ژنوتیپ، اثر گیاه، و اثر خوشه در این صفات بررسی گردید(جدول ۲). مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها و تاریخ کاشت در مزرعه نیز برای صفات مذکور بررسی شد (جدولهای ۳ و ۴). همچنین همبستگی بین صفات مطالعه شده در واکشت اول و واکشت دوم بررسی گردید.

نتایج و بحث

ژنوتیپ‌های مطالعه شده از نظر تمام صفات بررسی شده در سطح مزرعه و گلخانه تفاوت کاملاً معنی‌داری نشان دادند(جدولهای ۲، ۳ و ۴) که این نتایج با مطالعات برگیتزر(۵) مطابقت دارد. در مورد ژنوتیپ‌ها بدون توجه به محل کشت، رقم شش ردیفه زرجو در واکشت اول بالاترین نسبت کالوس‌دهی (TNC1) را در بین ارقام مورد مطالعه داشت و ارقام دو ردیفه ارس و گرگان ۴ هم بترتیب کمترین نسبت کالوس دهی را داشتند. در واکشت دوم نیز برای (TNC2) همین وضعیت مشاهده شد(جدول ۵). در مورد صفت نسبت رشدی کالوس در واکشت اول و دوم (NC2, NC1) نیز همین وضعیت صادق بوده است. البته لازم به ذکر است که این صفت ناشی از صفت اول است که تنوع موجود در اندازه کال‌های داده شده را نیز در بردارد(جدول ۳). در مورد اندازه کالوس در واکشت اول (SC1) رقم دو ردیفه شماره ۱۷ کلکسیون، بالاترین اندازه‌های کالوس را داشته است و بعد از آن رقم دو ردیفه گرگان ۴ بوده است و رقم شش ردیفه زرجو کمترین اندازه کالوس را در بین ارقام داشته است. اندازه کالوس در واکشت دوم (SC2) بترتیب در ارقام شش ردیفه شماره ۱ ژاپنی و دو ردیفه شماره ۱۷ کلکسیون بالاترین مقدار و شش ردیفه زرجو و دو ردیفه گرگان ۴ کمترین مقدار کالوس‌دهی را داشته است(جدول ۳).

در ریزنمونه‌های تهیه شده از مزرعه برای صفت TNC در واکشت اول و دوم ژنوتیپ‌های دو ردیفه شماره ۱۷ کلکسیون و شش ردیفه زرجو بترتیب بالاترین نسبت کالوس دهی در واکشت اول و ژنوتیپ‌های شش ردیفه شماره ۱ ژاپنی و دو ردیفه ارس بترتیب کمترین نسبت کالوس‌دهی در واکشت دوم و دو ردیفه گرگان ۴ و شش ردیفه شماره ۱ ژاپنی بترتیب کمترین نسبت کالوس‌دهی را داشته‌اند. برای صفت NC نیز تمام موارد فوق صادق بوده فقط در واکشت دوم زرجو بهترین بوده است(جدول ٦). در واکشت اول و دوم دو ردیفه شماره ۱۷ کلکسیون بهترین و در واکشت اول ژنوتیپ شش ردیفه زرجو بدترین و در واکشت دوم بترتیب زرجو و گرگان ۴ کمترین میزان کالوس‌دهی را داشته‌اند(جدول ٦).

در مطالعات در سطح گلخانه برای صفت TNC در واکشت اول زرجو بالاترین و در واکشت دوم بترتیب شماره ۱ ژاپنی و زرجو بالاترین نسبت کالوس‌دهی را داشته‌اند در صورتیکه گرگان ۴ در واکشت اول و دوم کمترین نسبت کالوس‌دهی را داشته است. در مورد صفت NC در واکشت اول بترتیب شماره ۱۱ ژاپنی و زرجو و در واکشت دوم زرجو بالاترین مقدار را داشته‌اند و در واکشت اول بترتیب گرگان ۴ و ارس و در واکشت دوم بترتیب والفجر و گرگان ۴ کمترین مقدار تولید صفت را نشان داده‌اند (جدول ۷). در مورد کالوس‌دهی، هانزل و همکاران نیز تفاوتهای کاملاً معنی‌داری در ژنوتیپ‌های مختلف مشاهده نمودند.

بطورکلی می‌توان رقم شش ردیفه زرجو را از نظر تعدد جنین‌های کالوس داده به تعداد کل جنین‌های کشت شده (نسبت کالوس‌دهی) بهترین رقم دانست و ارقام گرگان ۴ و ارس بترتیب دارای کمترین توان تولید کالوس هستند. از نظر اندازه کالوس شماره ۱۷ کلکسیون بهترین ژنوتیپ بوده است و زرجو کمترین اندازه‌های کالوس را داشته است. یعنی رقم زرجو که بالاترین نسبت کال‌دهی را داراست از نظر رشد کالوس طی اولین و دومین واکشت کمترین مقدار رشد را داشته است. ضمناً کالوس‌های تولید شده این ژنوتیپ نیز عمدتاً غیر جنین‌زا بوده‌اند(شکل ۱). در صورتیکه کالوس‌های ژنوتیپ شماره ۱۷ کلکسیون از نظر نسبت کالوس‌های جنین‌زا بهترین وضعیت را داراست (شکل ۲).

1 - Total number of callus 2- Number of callus having Same Size 3- Size of callus

جدول ۲ـ نتایج تجزیه واریانس شامل درجات آزادی (df) و میانگین مربعات (MS) ژنوتیپ‌ها، گیاه، خوشه و تاریخ کشت گیاه دهنده جنین نارس در مزرعه برای واکشت اول و دوم

S.O.V	df	واکشت اول			واکشت دوم		
		TNC1	NC1	SC1	TNC2	NC2	SC2
ژنوتیپ	۷	۲۸۸/۱۱**	۳۱/۷۱**	۱۱۲/۸۲**	۳۹۳/۹۴**	۵۱/۳۰**	۲۱۶/۲۲**
گیاه (در رقم)	۹	۱۳/۹۲	۲/۵۹	۱۷/۴۳**	۷۴/۲۵**	۱/۴۵	۵۲/۲۵**
خوشه (در گیاه)	۲	۰/۱۰	۳/۷۵	۱۷/۸۱*	۳۵/۶۶	۲/۱۱	۶/۶۹
تاریخ کشت (درخاک)	۲	۴۱/۲۵	۳۹/۷۳**	۲۸۸/۱۵**	۱۵۰/۳۵**	۸۲/۳۳**	۲۳۷/۶۹**
خطا		۶/۲۴	۲/۴۳	۴/۲۳	۱۰/۱۶	۱/۹۶	۸/۷۴
		(df=۲۱۲)	(df=۱۰۸۷)	(df=۱۰۸۷)	(df=۲۱۲)	(df=۱۲۱۶)	(df=۱۲/۷)

* و ** : بترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۳ـ نتایج تجزیه واریانس شامل درجات آزادی (df) و میانگین مربعات (MS) ژنوتیپ‌ها، و تاریخ کشت گیاه دهنده جنین نارس در گلخانه در واکشت اول و دوم

S.O.V	df	واکشت اول			واکشت دوم		
		TNC1	NC1	SC1	TNC2	NC2	SC2
ژنوتیپ	۷	۶۶/۴۶**	۳۳/۸۱**	۴۶/۸۵**	۳۲/۰۷	۱۷/۱۸**	۴۷/۵۴**
گیاه (در رقم)	۹	۲۱/۱۳	۴۱/۷۶**	۳۸/۹۹**	۲۲/۹۳	۱۹/۹۲**	۶۰/۸۹**
تاریخ کشت (درخاک)	۲	۳۶/۵۱	۱۵/۸۶	۳۸/۳۳	۴/۳۰	۱۱/۶۱	۲۰/۲۸
خطا		۱۶/۰۵	۶/۶۷	۱۱/۶۲	۱۳/۶۹	۵/۰۶	۱۳/۹۵
		(df=۶۸)	(df=۲۷۳)	(df=۲۷۴)	(df=۲۷)	(df=۲۸۴)	(df=۲۸۵)

* و ** : بترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس شامل درجات آزادی (df) و میانگین مربعات (MS) ژنوتیپ‌ها، گیاه، خوشه و تاریخ کشت گیاه دهنده جنین نارس در خاک

S.O.V	df	واکشت اول			واکشت دوم		
		TNC1	NC1	SC1	TNC2	NC2	SC2
ژنوتیپ	۷	۲۴۵/۶۴**	۳۷/۵۴**	۶۳/۳۲**	۳۳۳/۳۸**	۴۳/۸۳**	۱۵۲/۷۷**
گیاه (در رقم)	۹	۲۱/۹۶	۹/۹۹**	۶/۹۳	۶۲/۱۶**	۲/۷۱	۳۴/۶۳**
خوشه (در گیاه)	۲	۰/۱۰	۳/۷۵	۱۷/۸۱*	۳۵/۶۶	۲/۱۱	۶/۴۹
تاریخ کشت (درخاک)	۲	۳۰/۹۹	۶۰/۱۲**	۲۹۲/۸۱**	۱۱۲/۳۷**	۶۰/۹۶**	۲۳۲/۲۲**
خطا		۱۱/۴۶	۳/۸۱	۶/۸۴	۱۳/۴۳	۲/۸۰	۱۰/۶۰
		(df=۳۰۱)	(df=۱۳۸۱)	(df=۱۳۸۲)	(df=۲۵۹)	(df=۱۵۲۰)	(df=۱۵۲۲)

* و ** : بترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۵- مقایسه میانگین‌های ۸ ژنوتیپ در واکشت‌های اول و دوم با روش دانکن

ژنوتیپها	واکشت اول						واکشت دوم					
	TNC1		NC1		SC1		TNC2		NC2		SC2	
	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین
۱	۴۲	۸/۶۶ c	۱۷۱	۲/۱۲ d	۱۷۱	۹/۴۴ c	۳۳	۸/۱۸ b	۱۷۶	۱/۸۵ b	۱۷۷	۱۲/۵۹ a
۲	۳۴	۱۲/۵۲ b	۱۶۷	۲/۶۰ bc	۱۶۷	۹/۴۳ c	۳۳	۱۲/۶۰ a	۱۵۳	۲/۷۱ a	۱۵۳	۱۰/۵۳ c
۳	۳۷	۱۲/۷۵ b	۱۸۶	۲/۶۰ bc	۱۸۶	۱۰/۳۲ ab	۳۶	۱۲/۹۱ a	۲۱۳	۲/۲۰ b	۲۱۳	۱۱/۳۰ b
۴	۳۶	۱۴/۹۱ a	۱۵۵	۳/۴۴ a	۱۵۵	۹/۲۱ c	۳۳	۱۴/۳۶ a	۱۶۹	۳/۰۲ a	۱۶۹	۱۰/۰۹ c
۵	۳۶	۹/۹۴ c	۱۳۱	۲/۶۹ bc	۱۳۱	۹/۶۴ c	۳۰	۹/۵۶ b	۱۵۵	۲/۰۳ b	۱۵۵	۱۰/۷۴ bc
۶	۵۳	۱۳/۵۸ ab	۲۴۷	۲/۹۷ b	۲۴۸	۱۰/۸۱ a	۳۵	۱۳/۶۹ a	۳۰۶	۲/۰۷ b	۳۰۷	۱۲/۰۲ a
۷	۳۶	۹/۷۲ c	۱۷۶	۲/۰۱ d	۱۷۶	۱۰/۴۶ a	۴۲	۶/۱۹ c	۱۸۴	۱/۴۱ c	۱۸۴	۱۰/۳۴ c
۸	۴۶	۸/۳۶ c	۱۶۷	۲/۲۸ d	۱۶۷	۹/۸۳ bc	۳۶	۸/۴۱ b	۱۸۳	۱/۹۵ b	۱۸۳	۱۰/۵۴ c

جدول ٦ـ مقایسه میانگین‌های ۸ ژنوتیپ حاصل از جنین نارس گیاهان کشت شده در گلخانه درواکشت اول و دوم با روش دانکن

ژنوتیپها	واکشت اول						واکشت دوم					
	TNC1		NC1		SC1		TNC2		NC2		SC2	
	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین
۱	۳۱	۷/۲۲ e	۱۲۹	۱/۷۳ d	۱۲۹	۱۰/۱۳ c	۳۰	۷/۴۶ cd	۱۴۶	۱/۵۲ cd	۱۴۶	۱۲/۸۷ a
۲	۲۹	۱۲/۶۸ b	۱۴۴	۲/۵۴ b	۱۴۴	۹/۳۸ d	۲۸	۱۲/۶۰ b	۱۲۴	۲/۸۴ a	۱۲۴	۱۰/۴۱ bc
۳	۲۹	۱۳/۸۲ ab	۱۵۳	۲/۶۰ b	۱۵۳	۱۰/۲۰ c	۲۹	۱۳/۷۵ ab	۱۷۲	۲/۳۱ b	۱۷۲	۱۱/۱۲ b
۴	۲۹	۱۴/۶۲ a	۱۳۴	۳/۱۴ a	۱۳۴	۹/۳۵ d	۲۹	۱۴/۴۱ a	۱۴۳	۲/۹۲ a	۱۴۳	۱۰/۲۳ c
۵	۲۸	۹/۲۵ d	۱۱۲	۲/۱۶ c	۱۱۲	۹/۹۴ c	۲۴	۸/۹۵ c	۱۲۶	۱/۷۰ cd	۱۲۶	۱۰/۸۷ bc
۶	۳۰	۱۵/۰۳ a	۱۶۹	۲/۶۶ b	۱۶۹	۱۱/۹۸ a	۲۷	۱۵/۰۷ a	۲۳۱	۱/۸۲ c	۲۳۲	۱۲/۹۹ a
۷	۲۸	۱۰/۶۰ c	۱۵۱	۱/۹۲ cd	۱۵۱	۱۰/۷۸ b	۳۷	۶/۰۰ d	۱۶۳	۱/۳۶ d	۱۶۳	۱۰/۴۱ bc
۸	۲۹	۷/۶۲ e	۱۱۶	۱/۸۸ cd	۱۱۶	۹/۹۶ c	۲۹	۷/۶۵ cd	۱۳۲	۱/۶۷ cd	۱۳۲	۱۰/۵۸ bc

جدول ۷ـ مقایسه میانگین‌های ۸ ژنوتیپ حاصل از جنین نارس گیاهان کشت شده در مزرعه درواکشت اول و دوم با روش دانکن

ژنوتیپها	واکشت اول						واکشت دوم					
	TNC1		NC1		SC1		TNC2		NC2		SC2	
	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین
۱	۱۱	۱۲/۷۲ ab	۴۲	۳/۳۳ b	۴۲	۷/۳۳ c	۳	۱۵/۳۳ a	۳۰	۳/۴۶ a	۳۱	۱۱/۲۹ ab
۲	۵	۱۱/۶۰ b	۲۳	۳/۰۰ b	۳۳	۹/۶۹ ab	۵	۱۲/۶۰ abc	۲۹	۲/۱۷ b	۲۹	۱۱/۰۶ abc
۳	۸	۸/۸۷ bc	۳۳	۲/۶۳ b	۳۳	۱۰/۹۰ a	۷	۹/۴۲ bc	۴۱	۱/۷۳ b	۴۱	۱۲/۰۹ a
۴	۷	۱۶/۱۴ a	۲۱	۵/۳۳ a	۲۱	۸/۳۳ bc	۴	۱۴/۰۰ ab	۲۶	۳/۶۱ a	۲۶	۹/۳۴ bc
۵	۸	۱۲/۳۷ ab	۱۹	۵/۸۴ a	۱۹	۷/۸۹ bc	۶	۱۲/۰۰ abc	۲۹	۳/۴۴ a	۲۹	۱۰/۲۰ abc
۶	۲۳	۱۱/۹۶ b	۷۸	۳/۶۵ b	۷۹	۸/۲۹ bc	۸	۸/۸۷ bc	۷۵	۲/۸۴ ab	۷۵	۹/۰۲ c
۷	۸	۶/۶۲ c	۲۵	۲/۵۲ b	۲۵	۸/۵۲ bc	۵	۷/۶۰ c	۲۱	۱/۸۰ b	۲۱	۹/۷۶ bc
۸	۱۷	۹/۶۴ bc	۵۱	۳/۱۹ b	۵۱	۹/۵۴ ab	۷	۱۱/۵۷ abc	۵۱	۲/۶۶ ab	۵۱	۱۰/۴۵ abc

جدول ۸ـ مقایسه میانگین‌های تاریخ های مختلف کشت گیاهان دهنده جنین نارس در مزرعه در واکشت اول و دوم با روش دانکن

تاریخ‌کشت	واکشت اول						واکشت دوم					
	TNC1		NC1		SC1		TNC2		NC2		SC2	
	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین	تعدادمشاهده	میانگین
۱	۱۴۲	۱۰/۸۸ a	۶۹۸	۲/۱۷ b	۶۹۸	۱۰/۸۳ a	۱۴۴	۹/۶۶ b	۸۰۳	۱/۷۳ b	۸۰۴	۱۱/۸۱ a
۲	۵۹	۱۲/۱۴ a	۲۵۳	۲/۸۲ a	۲۵۳	۹/۲۵ b	۵۸	۱۲/۰۸ a	۲۸۶	۲/۵۰ a	۲۸۶	۱۰/۳۰ b
۳	۳۲	۱۱/۹۰ a	۱۵۷	۲/۴۲ b	۱۵۷	۹/۵۰ b	۳۱	۱۱/۸۳ a	۱۴۸	۲/۴۷ a	۱۴۸	۱۰/۶۹ b

جدول ۹ـ ضرایب همبستگی بین صفات مورد مطالعه

	NC1	SC1	TNC1	NC2	SC2
TNC1	۰/۳۰**	-۰/۰۱	۰/۹۵**	۰/۳۱**	-۰/۰۲
	۳۱۷	۳۱۸	۲۶۳	۲۹۱	۲۹۲
NC1		-۰/۳۲**	۰/۱۸**	۰/۳۷**	-۰/۲۹**
		۱۴۰۰	۲۶۶	۱۰۲۰	۱۰۲۲
SC1			۰/۱۶**	-۰/۳۷**	۰/۶۶**
			۲۶۷	۱۰۲۱	۱۰۲۳
TNC2				۰/۳۲**	۰/۴۶**
				۲۷۸	۲۷۸
NC2					۰/۳۲**
					۱۵۳۹

تذکر : در هر صفت عدد بالا ضریب همبستگی و عدد زیر تعداد مشاهده است.

* و ** : به ترتیب معنی‌دار در سطوح آماری ۵ و ۱ درصد

در مورد تنوع گیاهان مختلف در یک ژنوتیپ، صفت TNC1 و TNC2 معنی‌دار نشده است پس برای نسبت کالوس‌دهی در بین گیاهان مختلف یک ژنوتیپ تنوع مشاهده نمی‌شود ولی با توجه به معنی‌دار شدن NC و SC می‌توان چنین بیان داشت که گیاهان مختلف یک ژنوتیپ از نظر این صفت تنوع نشان می‌دهند (جداول ۲، ۳ و ۴). در مورد تنوع در خوشه‌های موجود در یک گیاه در صفات مطالعه شده این صفت فقط در سطح مزرعه بررسی گردید چون در گلخانه امکان داشتن ۳ خوشه برای یک گیاه و ۱۵ بذر در هر خوشه وجود نداشت که در سطح مزرعه نیز این صفت هیچگونه اثر معنی‌داری نشان نداد(جدول ۲). لذا می‌توان چنین بیان داشت که در خوشه‌های یک گیاه برای صفات مطالعه شده تنوعی وجود ندارد.

فاکتور تاریخ کشت در گلخانه معنی‌دار نشد(جدول ۳) و میانگین‌های آنها نیز همه در یک گروه قرار گرفتند در صورتیکه در مزرعه این فاکتور کاملاً معنی‌دار شده است(جدول ۲). لذا می‌توان گفت شرایط محیطی طی دوران رشد گیاه دهنده جنین در خاک در این صفات مؤثر است ولی در گلخانه چون شرایط کنترل شده و یکسان است تنوعی مشاهده نشده است. بطورکلی تاریخ کشت

شکل ۱ - کالوس های غیرجنین زا ژنوتیپ زرجو

شکل ۲ - کالوس جنین زا ژنوتیپ شماره ۱۷ کلکسیون

دوم (۷۶/۸/۱۱) از نظر نسبت جنین‌های کالوس داده بهترین‌زمان بوده است (جدول ۸) و برای اندازه کالوس‌ها تاریخ کشت اول (۷۶/۷/۲۰) بهترین بوده است (جدول ۸). بنابراین با توجه به مطالب فوق و توجه به میانگین تاریخ کشت سوم (۷۶/۹/۴) می‌توان بیان داشت که کشت دیر هنگام در پائیز برای نسبت کالوس‌دهی مناسب نیست.

از نظر روند صفات مورد مطالعه، طی واکشت اول و دوم نسبت کالوس‌دهی همبستگی بسیار بالا و نزدیک به ۱ داشته است یعنی اگر جنینی تولید کالوس نمود کالوس طی واکشت‌های بعدی حفظ می‌شود(جدول ۹). صفت تعداد کالوس با اندازه معین کمترین همبستگی معنی‌دار را طی دو واکشت داشته است یعنی رشد ابتدائی کالوس اگرچه بر رشد مراحل بعدی آن مؤثر است ولی عوامل دیگری نیز دخالت دارد که این مطلب باتوجه به صفت اندازه کالوس نیز به نسبت کمتری مشاهده می‌گردد بنابراین میزان رشد اولیه درمقدار رشد بعدی اثر دارد ولی این اثر یکسان نیست (جدول ۹).

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱- امیدی، م.، ب. گرامی و الف، مشاوری، ۱۳۷۱. کشت مریستم در اسپرس. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۲۳، شماره‌های ۳ و ۴.

2. Armstrong, C, L., J. Romero-Severson and T. R. Hodges. 1992. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis theor. Appl. Genet. 84: 755-762.
3. Bai, D., and D. R. Knott. 1993. The effects of level of 2,4-D and time in culture on regeneration rate and chromosome numbers of regenerants from calli of the hybrid Triticum aestivum CV. Chinese Spring Ph1b X Thinopyrum ponticum (2n=10X=70). Genome. 36: 166-172.
4. Bayliss, M. W., and S. Dunn. 1979. Factors affecting callus formation from embryos of barely (Hordeum vulgare). Plant Sci. Lett. 14: 311-316.
5. Bregitzer, P. 1992. Plant regeneration and callus type in barley: Effects of genotype and culture medium. Crop Sci. 32: 1108-1112.
6. Dale, P. J., and E. Deambrogio. 1979. A comparison of callus induction and plant regeneration from different explants of Hordeum vulgare. Z. Pflanzenzuecht. 94: 95-77.
7. Gonzalez, A. I., M. I. Pelaez and M. L. Ruiz. 1996. Cytogenetic variation in somatic tissue cultures and regenerated plants of barley (Hordeum vulgare L.). Euphytica 91: 37-43.
8. Hanzel, J. J., J. P. Miller, M. A. Brinkman, and E. Fendos. 1985. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. Crop Sci. 25: 27-31.
9. Komatsuda, T., S. Enomoto, and K. Nakajima. 1989. Genetic of callus proliferation and shoot differetiation in barley. The journal of Heredity. 80: 345-35.
10. Komatsuda, T., T. Annaka and S. Oka. 1993. Genetic mapping of a quantitative trait locus (QTL) that enhances the shoot differentiation rate in Hordeum vulgare L. Theor. Appl. Gene. 86: 713-720.
11. Koornneef, M., J. Bade, C. Hanhart, K. Horsman, J. Schel, W. Soppe, R. Verkerk and P. Zabel. 1993. Characterization and mapping on a gene controlling of shoot regeneration in tomato. The Plant Journal. 3: 131-141.
12. Mano, Y., H. Takahashi, K. Sato and K. Takeda. 1996. Mapping genes for callus growth and shoot regeneration in barley (Hordum vulgare L.). Breeding Sci. 46: 137-142.
13. Ruiz, M. L. and A. M. Vazquez. 1982. Chromosome number evaluation in stem derived callus of Hordeum vulgare L. Cultured in vitro. Protoplasma. 111: 83-86.
14. Ruiz, M. L., J. Rueda, M. I. Pelaez, F. J. Espino, M. Candela, A. M. Sendino and A. M. Vazquez. 1992. Somatic embryogenesis, Plant regeneration and somaclonal variation in barley. Plant cell Tiss. Org. Cult. 28: 97-101.
15. Taguchi-Shiobara, F., S. Y. Lin, K. Tanno, T. Komatsuda, M. Yano, T. Sasaki and S. Oka. 1997. Mapping quantitative trait loci associated with regeneration ability of seed callus in rice, Oryza sativa L. Theor. Appl. Genet. 95: 828-833.
16. Yu, K. and K. P. Pauls. 1993. Identification of a RAPD marker associated with somatic embryogenesis in alfalfa. Plant Mol. Biol. 22: 269-277.

Study on Callus Induction in Barley

M. OMIDI, P. AHMADIAN TEHRANI, B. A. SAIED TABATABAEI AND M. A. ROSTAMI

Respectively, Ph.D Student , Professor and Assistant Professors, Department of Agronomy Faculty of Agriculture , University of Tehran. Karaj, Iran.

Accepted June 25, 1999.

SUMMARY

This study was conducted to determine the genotypic effect on callus induction 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 pollination, immature embryos were dissected and planted in petri dishes using a solid MS medium. The petri dishes were incubated at 25±1 C°. The induced calli were sub-cultured on the same medium after about one month. In this study, the following variables were analyzed: 1) number of responding embryos; 2) growth rate of calli and 3) size of calli. The analysis of variance indicated a significant effect of genotype on the variables. The number of responding embryos was highest for Zarjo (a six-row genotype) however, most of its calli were nonembryogenic. Barley No. 17(a two-row genotype) from the collection showed the highest size of calli most of which were embryogenic. While there was no significant effect of spike per plant, a significant effect was observed on plants within genotypes. Significant differences were observed among planting dates for all of the variables. A highly significant interaction was also observed between two sub-cultures.

Keywords: Barley, Callus, Two-row, Six-row, Subculture immature embryo, MS medium