

تولید لاین‌های متحمل به سطوح بالای شوری در جو با استفاده از تنوع سوماکلونی

مهران عنایتی شریعت‌پناهی^۱، امید دبیراشرافی^۲
۱، ۲، پژوهشگر و کارشناس مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج
تاریخ پذیرش مقاله ۸۱/۱۰/۴

خلاصه

این تحقیق به منظور ایجاد لاین‌های پرمحصول و متحمل به شوری از رقم با عملکرد بالا ولی حساس به شوری (والفجر) همچنین ایجاد لاین‌های با تحمل گسترده و بالا به شوری از ارقام با تحمل نسبی به شوری (افضل، آشار و آریگاشار) با استفاده از تنوع سوماکلونی انجام گردید. در این بررسی غلظت‌های مختلفی از نمک کلوروسدیم (۳، ۴، ۵، ۶، ۸ و ۱۰ گرم در لیتر) و ترکیبی از املاح کلوروسدیم و کلرید کلسیم (به ترتیب ۶/۵ و ۳/۵ گرم در لیتر) در محیط‌های کشت حاوی کالوس ارقام مختلف جو مورد استفاده قرار گرفت. جنین‌های نارس و رسیده چهار رقم جو ذکر شده با سنین مختلف (۱۶، ۱۸، ۲۰ روزه و رسیده کامل) روی محیط کشت کالوس‌زایی (محیط تغییر یافته MS^۱ حاوی مقادیر مختلف ۲، ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمون 2,4-D) کشت شدند. به منظور تکثیر کالوس‌ها و القای بیشتر تنوع سوماکلونی، تعداد حداقل ۳ واکشت روی محیط تغییر یافته MS حاوی مقادیر مختلف 2,4-D و BA و کایتین انجام گردید. از کالوس جنین‌زا پس از تکثیر (حداقل ۳ بار واکشت) جهت انتقال به محیط‌های شوری استفاده گردید. کالوس‌های متحمل در سطوح بالای شوری (۸ و ۱۰ گرم در لیتر NaCl) به محیط‌های مختلف باززایی (شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر MS + 2,4-D، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + 2,4-D + MS) منتقل گردیدند. در طی اجرای تحقیق فاکتورهای مختلفی از قبیل درصد کالوس‌زایی و باززایی با استفاده از روش تجزیه واریانس در قالب طرح‌های کاملاً تصادفی و آزمایش‌های فاکتوریل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد: ۱- اثر ژنوتیپ در تشکیل کالوس معنی‌دار است. ۲- جنین نارس ۱۸ روزه بیشترین کالوس‌زایی و جنین رسیده کمترین کالوس‌زایی را داشت. ۳- اثر متقابل ژنوتیپ و سن جنین معنی‌دار بود. ۴- محیط: ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر MS + 2,4-D بیشترین کالوس‌زایی از جنین را نشان داد. ۵- محیط: ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر MS + 2,4-D بیشترین ریشه‌زایی و محیط: ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA + MS بیشترین شاخه‌زایی را دارا بود. ۶- تعداد ۲۷ گیاه کامل متحمل به سطح بالای شوری با ۸ گرم در لیتر NaCl (سانتی‌متر/میلی‌موس = ۱۶/۶ EC^۲) از چهار رقم جو مورد بررسی باززایی گردیدند. با توجه به نتایج بدست آمده، در برنامه تحقیقات آتی وضعیت تحمل به شوری لاین‌های سوماکلونی ایجاد شده در سطح مزرعه مورد ارزیابی قرار خواهند گرفت.

واژه‌های کلیدی: تنوع سوماکلونی، انتخاب درون شیشه‌ای، تحمل به شوری (NaCl, CaCl₂)، ارقام

جو، 2,4-D، BAP، IAA

مقدمه

جو یکی از محصولات زراعی اصلی ایران و جهان است و می‌تواند بطور مستقیم و غیر مستقیم به تغذیه جمعیت کمک نماید (۶). مصارف غذایی جو شامل خوراک دام، تهیه مالت و الکل می‌باشد (۱). دومین "انقلاب سبز" که از اواسط سالهای ۱۹۷۰ مطرح شد منتهی به تحقیقاتی گردید که در آنها در عین پابرجا بودن موضوع اصلی (تولید گیاهان با راندمان بالا و مقاوم به بیماریها و غیره)، به کمک کشت سلول و بافت‌های گیاهی به سرعت ارقام مورد نظر ایجاد و تکثیر شوند. در طول دهه گذشته، مطالعات بی‌شماری نشان دادند که تنوع سوماکلونال و گامتوکلونال ایجاد شده به وسیله کشت درون‌شیشه‌ای^۱ سلول‌های گیاهی نیز می‌تواند منشاء تنوع ژنتیکی قابل بهره‌برداری در برنامه‌های اصلاح گیاهان مقاوم به عوامل مختلف گزینش (بیماریها، تنش‌های محیطی و غیره) باشند. کاربرد این تکنیک‌ها در حال حاضر منجر به تولید گیاهانی مقاوم به تنش‌های محیطی مثل شوری، خشکی و سایر عوامل از قبیل پاتوژن‌ها و علف‌کشها گردیده است. هدف درازمدت بکارگیری تنوع سوماکلونال یا گامتوکلونال بر استفاده از بهترین ارقام مورد دسترس استوار است که در آن ژنوتیپ‌های جدید نه تنها واجد صفات واریته‌های مادری هستند بلکه یک صفت متناسب زراعی علاوه بر صفات قبلی از قبیل مقاومت به یک نوع بیماری یا شوری و غیره را نیز دارا هستند. با کاربرد این تکنیک محدودیت‌های روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات از قبیل کاهش باروری در دورگ‌گیری‌های دور، کمبود تنوع ژنتیکی و یا طولانی شدن فرآیندهای دورگ‌گیری و گزینش بر طرف خواهند شد (۳). تحقیقات زیادی نشان داده است که بعضی از مکانیسم‌های مقاومت به عوامل گزینش در گیاه کامل، در کالوس‌ها نیز مشاهده شده است که قابل انتقال به نسل‌های بعد می‌باشد و تنوع مناسبی را بوجود می‌آورد (۳).

از طریق انتخاب در جمعیت‌های سلولی سوماتیکی حاصل از کشت درون شیشه‌ای لاین‌های مقاوم به تنش‌های مختلف (شوری، خشکی، سرما و علفکش) انتخاب گردیده‌اند (۱۳، ۳۶). انتخاب لاین‌های سلولی مقاوم به تنش شوری در گزارشات مختلفی ارائه گردیده است (۱۷، ۱۸، ۲۲، ۳۲، ۳۳).

تحقیقات متعدد نشان دادند که بکارگیری تکنیک کشت درون‌شیشه‌ای منجر به تولید لاین‌های مقاوم به شوری شد و ضمن باززایی گیاهان کامل از سلول‌های مقاوم جدا شده، انتقال صفت مقاومت به شوری در نسل‌های بعدی نیز صورت گرفته است (۱۶، ۱۹، ۲۳، ۲۴، ۲۷، ۳۳).

کیم و همکاران (۱۹۸۸) کالوس‌های متحمل به شوری از دو رقم جاپونیکا و دو رقم ایندیکا در برنج (*Oryza sativa*) بر روی محیط‌های کشت حاوی ۶۰۰۰، ۹۰۰۰، ۱۲۰۰۰ و ۱۵۰۰۰ (قسمت در میلیون) نمک (NaCl) انتخاب کردند و ضمناً در ارقام جاپونیکا، گیاهان متحمل را از کالوس‌های انتخابی در تمامی غلظت‌های نمک (NaCl)، باززایی نمودند. ونگ و همکاران (۱۹۸۶) پس از بررسی تا نسل سوم لاین‌های سوماکلونی (SC_3) و دو و همکاران (۱۹۸۸) تا نسل دوم لاین‌های سوماکلونی (SC_2) در برنج تولید لاین‌های امید بخش متحمل به شوری نمودند. لوبوتو و همکاران (۱۹۸۹) از طریق کشت جنین نارس در ذرت سوماکلون‌های متحمل به شوری ایجاد و متعاقباً تعداد ۷۸ گیاه از این سوماکلون‌ها را باززایی کردند که ۴ گیاه تولید بذر نرمال داشت و تحمل به شوری این گیاهان نیز پایدار بود. سابهاشینی و ردی (۱۹۸۹) گیاهان باززایی شده از کالوس‌های متحمل به NaCl (در سطح ۱٪) یا آب دریا (۵۰٪) را در برنج مورد ارزیابی مزرعه‌ای قرار دادند و گزارش کردند تعدادی از نتایج این گیاهان در خاک‌های شور از نظر خصوصیات زراعی مورد بررسی در مقایسه با شاهد‌ها برتر بودند. تال و همکاران (۱۹۹۰) تولید گیاهان متحمل به نمک (در سطح ۷۵ میلی‌مول) را در گوجه‌فرنگی از طریق انتخاب لاین‌های سوماکلونال گزارش کردند. جین و همکاران (۱۹۹۰) در *Brassica Juncea L.* از طریق تنوع سوماکلونال، دو لاین سوماکلونی متحمل به شوری را گزارش کردند که در ارزیابی‌های مزرعه‌ای و گلخانه‌ای ارتفاع کمتر، فاز زایشی طولانی‌تر و وزن هزار دانه بیشتر از شاهد‌ها داشتند. تیم و همکاران (۱۹۹۱) تعداد ۱۷۹ لاین گندم حاصل از انتخاب درون شیشه‌ای با ۴ و ۸ گرم در لیتر NaCl را مورد ارزیابی گلخانه‌ای برای تحمل به شوری و صفات زراعی قرار دادند و یک لاین متحمل به شوری شناسایی کردند که بطور معنی‌داری عملکرد دانه و زیست‌توده (بیوماس) بالاتری در شرایط تنش و غیر تنش نسبت به والد خود داشت. بوهارمونت و

سدیم بالا را در کاهش عملکرد ماده خشک تولیدی ارقام گندم گزارش کردند.

هدف تحقیق حاضر ایجاد لاینهای پرمحصول و متحمل به شوری در جو از رقم با عملکرد بالا ولی حساس به شوری (رقم والفجر) همچنین ایجاد لاینهای با تحمل گسترده و بالا به شوری از ارقام با تحمل نسبی به شوری (افضل، آریگاشار و آشار) با استفاده از تنوع سوماکلونی می‌باشد.

مواد و روشها

برای انجام این تحقیق از چهار رقم جو زراعی والفجر (رقم با عملکرد بالا ولی حساس به شوری)، افضل، آریگاشار و آشار (ارقام با عملکرد متوسط و تحمل نسبی به شوری) استفاده گردید. در این بررسی غلظتهای مختلفی از نمک کلرورسدیم (۳، ۴، ۵، ۶، ۸ و ۱۰ گرم در لیتر) و ترکیبی از املاح کلرورسدیم و کلرید کلسیم (به ترتیب ۶/۵ و ۳/۵ گرم در لیتر) بعنوان عامل تنش شوری در محیطهای کشت حاوی کالوس ارقام مورد اشاره به منظور ایجاد لاینهای پرمحصول و متحمل به شوری مورد مطالعه قرار گرفت.

در کشت گلخانه‌ای به منظور جوانه‌زنی، بذور ارقام مورد نظر بطور جداگانه در روی کاغذ صافی مرطوب در داخل پتری‌دیش قرار داده شده و پتری‌دیش‌ها در داخل فیتوترون در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد تاریکی به مدت ۲۴ ساعت و سپس در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت (به منظور شکستن خواب بذر و جوانه‌زنی یکنواخت) قرار داده شده و مجدداً به فیتوترون با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و روشنایی تا ظهور ساقه‌چه‌های ۲ سانتی‌متری قرار داده شدند. بذور جوانه زده به گلخانه با درجه حرارت 20 ± 2 درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱۶ ساعت منتقل و در گلدان (با مخلوط خاکی شامل رس، خاک برگ و ماسه بادی به نسبت مساوی) کشت گردیدند و تا مرحله تولید سنبله تحت مراقبت قرار گرفتند. به موازات کشت گلخانه‌ای، کشت مزرعه‌ای نیز در چند تاریخ انجام گرفت. جنین‌های نارس و رسیده چهار رقم جو مورد اشاره با فواصل زمانی مختلف پس از شروع گلدهی (۱۶، ۱۸، ۲۰ روزه و رسیده کامل) روی محیط کشت کالوس‌زایی کشت شدند. برای این منظور در فواصل زمانی اشاره شده پس از شروع گلدهی،

همکاران (۱۹۹۱) کاربردهای تنوع سوماکلونال و انتخاب درون شیشه‌ای را برای اصلاح برنج گزارش کردند. عباس و همکاران (۱۹۹۱) با بررسی سیتوژنتیکی بر روی سلولهای مادری گرده گیاهان متحمل به شوری حاصل از انتخاب کالوس در برنج، و گزارش کردند ۴۳٪ گیاهان دارای تعداد کروموزوم طبیعی (۲ بیوالنت)، ۳۳٪ دارای ۱۱ بیوالنت و ۲۳٪ دارای ۱۰ بیوالنت بودند و ضمناً تریوالنت، کوآدری‌والنت در آنها مشاهده نگردید. تال (۱۹۹۳) ۳ روش بالقوه ژنتیکی برای اصلاح گیاهان متحمل به تنش‌های محیطی شامل: تکنیکهای کشت بافت و سلول، روشهای اصلاحی کلاسیک و مهندسی ژنتیک، را ذکر کرد و ضمناً روش کشت بافت و سلول را در بدست آوردن گیاهان متحمل به شوری مؤثر معرفی کرد. چاده‌ری و همکاران (۱۹۹۴) در یونجه تولید گیاهان متحمل به شوری از طریق انتخاب درون شیشه‌ای را گزارش کردند. کینتزیوس و همکاران (۱۹۹۷) پاسخ‌های مورفولوژیکی کشت درون شیشه‌ای جنین‌های رسیده گندم را به غلظتهای مختلف NaCl و تیمارهای تنظیم کننده‌های رشدی مورد بررسی قرار دادند. پاتنایک و همکاران (۱۹۹۹) در *Cymbopogon martinii* (Roxb) با استفاده از تنوع سوماکلونال، ۸ لاین سوماکلونی تولید نموده و در مزرعه از نظر صفات کمی شامل عملکرد، ارتفاع و حجم روغن با ارقام شاهد مورد مقایسه قرار داده و نهایتاً ۳ لاین سوماکلونی برتر را انتخاب کردند که این لاینها در آزمایش‌های پایداری نیز پایداری نشان دادند.

تقوایی و همکاران (۱۳۷۶) گزارش کردند که گندم توانایی لازم برای کشت بافت را دارد و بیشترین حجم کالوس در تمام ارقام به ترتیب به گل آذین نارس و جنین اختصاص داشت، ولی بهترین نوع کالوس از نظر تولید جنین‌های رویشی و باززایی گیاه به ترتیب در جنین نارس و سپس در گل آذین نارس به دست آمد.

جلالی جوران (۱۳۷۰) اقدام به انتخاب لاین‌های متحمل به شوری در برنج کرد. شکیب (۱۳۷۰) تحمل کالوس‌های گندم به شوری را مورد مطالعه قرار داد. مالمیر (۱۳۷۳) افزایش عناصر سدیم، کلر، کلسیم و روی در اندام هوایی و ریشه در شرایط شور، تقوایی (۱۳۷۳) کاهش ماده خشک تولیدی ارقام گندم ایرانی را در شرایط شور و آستارایی (۱۳۷۳) اثرات سوء حذف

ساقه‌های حامل سنبله از گیاه جدا و پس از انتقال به آزمایشگاه بذور از سنبله‌ها جدا و به تفکیک رقم در داخل پتری‌دیش قرار داده شدند.

بذور هر پتری‌دیش در زیر هود استریل ابتدا در الکل اتیلیک ۹۶ درجه به مدت ۲ الی ۳ ثانیه و سپس در محلول هیپوکلریت کلسیم ۸٪ به مدت ۳ الی ۵ دقیقه غوطه‌ور شده و پس از این مرحله در داخل آب دوبار تقطیر شده استریل و به تعداد ۳ مرتبه شستشو گردیدند. سپس در زیر بینی کولروتحت شرایط استریل جنین‌ها از داخل بذور خارج و بر روی محیط کشت قرار داده شدند. جنین‌های کشت شده به فیتوترون با دمای 1 ± 23 درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی به منظور کالوس‌دهی منتقل گردیدند.

از محیط کشت پایه MS (۳۱) همراه با غلظتهای مختلف 2,4-D (۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بعنوان محیط کشت کالوس‌زایی استفاده گردید.

به منظور تکثیر کالوس‌ها و القاء بیشتر تنوع سوماکلونی، حداقل ۳ واگشت روی محیط تغییر یافته MS حاوی مقادیر مختلف 2,4-D انجام گردید. از کالوس جنین‌زا پس از تکثیر (حداقل ۳ بار واگشت)، جهت انتقال به محیط‌های شوری استفاده گردید. قطعات کالوس روی محیط‌های غذایی شامل محیط تغییر یافته MS حاوی مقادیر مختلف 2,4-D و غلظتهای متفاوت از شوری کشت شدند. کشت‌ها در شرایط تاریکی و دمای 1 ± 22 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و هر ماه واگشت گردیدند. ارزیابی رشد نسبی کالوس‌ها با استفاده از فرمول زیر انجام گردید:

$$\text{رشد نسبی کالوس} = \frac{\text{کالوس}}{\text{کالوس}} \times 100$$

کالوس‌های متحمل در سطوح بالای شوری (۸ و ۱۰ گرم در لیتر NaCl) در محیط‌های مختلف باززایی (شامل MS تکمیل شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA) منتقل گردیدند.

گیاهچه‌های تولید شده از باززایی کالوس‌های متحمل، از لوله آزمایش به گلدان (با مخلوطی از پیت و ماسه به نسبت ۳ به ۱) منتقل و به منظور جلوگیری از تنش رطوبتی توسط درپوش پلاستیکی شفاف پوشیده شدند. سپس گلدان‌ها به

فیتوترون با دمای 1 ± 20 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶/۸ (شب/روز) و رطوبت نسبی ۶۰٪ منتقل و میزان آب گلدان‌ها هر روز کنترل گردید. درپوش گلدان‌ها پس از ۲ الی ۳ هفته بطور کامل برداشته شدند و پس از حدود ۱۰ الی ۱۵ روز گیاهان به گلخانه با درجه حرارت ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند.

در طی اجرای تحقیق اثرات فاکتورهای مختلف ژنوتیپ، نوع و زمان رسیدگی جنین و نوع محیط کشت بر روی درصد کالوس‌زایی و باززایی با استفاده از روش تجزیه واریانس در قالب طرح‌های کاملاً تصادفی و فاکتوریل (با پایه کاملاً تصادفی) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

داده‌های جداول ۱ و ۲، نشان می‌دهد درصد تشکیل کالوس در ارقام جو زراعی مورد بررسی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان دادند به طوری که رقم افضل بیشترین کالوس‌زایی را داشت بعبارتی اثر ژنوتیپ در تشکیل کالوس معنی‌دار بود که با آزمایش‌های هنزل و همکاران (۱۹۸۵) در جو (از کشت جنین نارس)، کیم و همکاران (۱۹۸۸) در برنج (از کشت بافت اسکوتلومی بذری) و ماچی و همکاران (۱۹۹۸) در گندم (از کشت جنین نارس و کشت بساک) مطابقت دارد.

با توجه به جدول ۳، کمترین درصد تشکیل کالوس از ریزنمونه جنین رسیده بود که با آزمایش‌های هنزل و همکاران (۱۹۸۵) در جو، ماچی و همکاران (۱۹۹۸) در گندم، زاجینی و همکاران (۱۹۹۷) در ذرت بزرگی‌پور و اسنپ (۱۹۹۷) در گندم مطابقت دارد.

جدول ۱- تجزیه واریانس ژنوتیپ‌های مختلف جو زراعی و سنین مختلف جنین از نظر درصد کالوس‌زایی

F	درجه		منبع تغییرات
	مجموع	میانگین	
	مربعات	مربعات	آزادی
۱۲/۰۴۱۱***	۳/۱۶۳	۹/۴۹۰	۳ ژنوتیپ
۲۰۷۸/۵۷۷۲***	۵۴۶/۰۸۹	۱۶۳۸/۲۶۸	۳ سن جنین
۷/۰۲۲۲***	۱/۸۴۵	۱۶/۶۰۴	ژنوتیپ × سن جنین
-	۰/۲۶۳	۸/۴۰۷	۳۲ اشتباه
CV = ۰/۱۷۶	۱۶۷۲/۷۷۰	۴۷	کل

***: معنی‌دار در سطح ۰/۰۱٪

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد کالوس زایی ژنوتیپ‌های

مختلف جو زراعی	
ژنوتیپ	میانگین درصد کالوس زایی
افضل	٪۸۶/۴۶ a
آریگاشار	٪۸۵/۳۷b*
آشار	٪۸۴/۹۵b
ولفجر	٪۸۵/۲۸b

*میانگین‌های با حروف مشترک در هر ستون تفاوت معنی داری در سطح ٪۱ ندارند ($\alpha=٪۱$)

میلی‌گرم‌درلیتر $MS + 2,4-D$ و توسط تقوایی و همکاران (۱۳۷۶) در گندم، محیط: ۱ میلی‌گرم‌درلیتر $MS + 2,4-D$ گزارش گردیده است. ضمناً تولید کالوس جنین‌زا در جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.) با استفاده از 2,4-D توسط شیامالا واسمیت (۱۹۹۰)، چو و همکاران (۱۹۸۴)، گلدستین و کرونستاد (۱۹۸۶)، هنزل و همکاران (۱۹۸۵)، لوپوتو (۱۹۸۹) پاول و کالیگاری (۱۹۸۷) و توماس و اسکات (۱۹۸۵) گزارش گردیده است.

جدول ۴- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی اثرات متقابل

ژنوتیپ × سن جنین	
ژنوتیپ (G) × سن جنین (A)	میانگین درصد کالوس زایی
g1 × a1	٪۸۵/۳۴d
g1 × a2	٪۹۶/۵۱a
g1 × a3	٪۸۲/۱۷f
g1 × a4	٪۷۷/۴۹g
g2 × a1	٪۸۳/۱۳ef*
g2 × a2	٪۹۵/۰۱b
g2 × a3	٪۸۲/۵ef
g2 × a4	٪۷۷/۸۳g
g3 × a1	٪۸۳/۶۶e
g3 × a2	٪۹۴/۱۶c
g3 × a3	٪۸۲/۵ef
g3 × a4	٪۷۶/۸۴g
g4 × a1	٪۸۵d
g4 × a2	٪۹۴/۵bc
g4 × a3	٪۸۲/۱۷f
g4 × a4	٪۷۶/۶g

*میانگین‌های با حروف مشترک در هر ستون تفاوت معنی داری در سطح ٪۱ ندارند ($\alpha=٪۱$)

والفجر = g₄ آشار = g₃ آریگاشار = g₂ افضل = g₁

جنین ۲۰ روزه = a₃ جنین ۱۸ روزه = a₂ جنین ۱۶ روزه = a₁

جنین رسیده = a₄

جدول ۵ - تجزیه واریانس محیط‌های کشت مورد استفاده

کالوس‌زایی			
منبع تغییرات درجه آزادی مجموع مربعات میانگین مربعات F			
محیط کشت	۲	۳۷۳/۷۸۱	۱۸۶/۸۹۰
اشتباه	۶	۱/۸۵۶	۰/۳۰۹
کل	۸	۳۷۵/۶۳۶	-
CV =	٪۰/۸۱	-	-

*** = معنی دار در سطح ٪۰/۱

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی سنین مختلف جنین

سن جنین (روز)	
سن جنین (روز)	میانگین درصد کالوس زایی
نارس ۱۶	٪۸۴/۰۳ b
۱۸	٪۹۵/۰۹ a
۲۰	٪۸۲/۳۳ c
رسیده	٪۷۷/۱۹ d

*میانگین‌های با حروف مشترک در هر ستون تفاوت معنی داری در سطح ٪۱ ندارند ($\alpha=٪۱$)

جنین ۱۸ روزه بیشترین کالوس‌زایی را داشت حال آنکه هنزل و همکاران (۱۹۸۵) در جو تولید کالوس از جنین نارس در بذور مرحله انتهایی شیری الی ابتدای خمیری، بزرگی پور و اسنیپ (۱۹۹۷) در گندم تولید کالوس از جنین نارس ۱۵ الی ۱۸ روزه، تقوایی و همکاران (۱۳۷۶) در گندم تولید کالوس از جنین نارس ۱۱ الی ۱۴ روزه و ماچی و همکاران (۱۹۹۸) نیز در گندم تولید کالوس از جنین نارس ۱۴ روزه را گزارش کردند. با توجه به جدول ۴، اثر متقابل ژنوتیپ و سن جنین معنی دار بود به طوریکه رقم افضل با جنین ۱۸ روزه بیشترین کالوس‌زایی را دارا بود.

با توجه به جداول ۶ و ۵، محیط: ۱/۵ میلی‌گرم‌درلیتر $2,4-D$ + MS بیشترین کالوس‌زایی را از جنین داشت. حال آنکه بهترین محیط کالوس‌زایی از جنین توسط هنزل و همکاران (۱۹۸۵) در جو، محیط: ۲ میلی‌گرم‌درلیتر $2,4-D$ + MS ، توسط کینتریوس و همکاران (۱۹۹۷) و ماچی و همکاران (۱۹۹۸) در گندم، محیط: ۲ میلی‌گرم‌درلیتر $2,4-D$ + MS ، توسط زاچینی و همکاران (۱۹۹۷) در ذرت، محیط: ۳ میلی‌گرم‌درلیتر $2,4-D$ + N_6 ، توسط بنگ و همکاران (۱۹۹۶) در برنج، محیط: ۲

جدول ۶ - مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی محیط‌های کشت مورد استفاده

محیط کشت	محیط‌های کشت باززایی
MS + 1mg/l 2,4-D	٪۷۷/۹c
MS + 1/5mg/l 2,4-D	٪۹۵/۳a
MS + 2mg/l 2,4-D	٪۸۵/۰۷b

* میانگین‌های با حروف مشترک در هر ستون تفاوت معنی داری در سطح ٪۱ ندارند ($\alpha=٪۱$)

متوسط رشد نسبی یکماهه کالوس‌ها در محیط بدون نمک در رقم والفجر ٪۶/۰۵+، در رقم آریگاشار ٪۷/۶۸+، در رقم آشار ٪۴/۰۳+ و در رقم افضل ٪۱۸/۰۴+ بود. پس از انتقال کالوس‌ها به سطوح پائین نمک (۳ الی ۶ گرم در لیتر NaCl)، رشد نسبی آنها نسبت به محیط بدون نمک کاهش یافت اما منفی نبود، در حالیکه از سطح شوری ۸ گرم‌درلیتر NaCl، رشد نسبی کالوس‌ها در اکثر ارقام منفی شد عبارتی کالوس‌ها کاهش وزن پیدا کردند بطوریکه متوسط رشد نسبی یکماهه کالوس‌ها در محیط شوری حاوی ۸ گرم‌درلیتر NaCl، در رقم آریگاشار ٪۴/۱۳-، در رقم آشار ٪۰/۶۹-، در رقم افضل ٪۳/۸۵+ و در رقم والفجر ٪۵/۲- بود. که این گزارش قبلا نیز توسط کینتزیوس و همکاران (۱۹۹۷) و شکیب (۱۳۷۰) در گندم ارائه گردیده بود.

کالوس‌های متحمل در سطوح ۸ و ۱۰ گرم‌درلیتر NaCl انتخاب و به محیط باززایی انتقال یافتند. باتوجه به جداول ۷، ۸، ۹ و ۱۰: محیط: ۲ میلی‌گرم‌در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم‌درلیتر MS + NAA بیشترین شاخه‌زایی و محیط: ۲ میلی‌گرم‌درلیتر BAP + ۱ میلی‌گرم‌درلیتر MS + 2,4-D بیشترین ریشه‌زایی را داشته است. حال آنکه بهترین محیط باززایی توسط هنزل و همکاران (۱۹۸۵) در جو محیط MS بدون 2,4-D، توسط بنگ و همکاران (۱۹۹۶) در برنج محیط «۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر NAA + ۲ میلی‌گرم‌درلیتر MS + Kinetin»، توسط ماچی و همکاران (۱۹۹۸) در گندم محیط «۰/۱ میلی‌گرم‌درلیتر MS + BAP» و توسط کینتزیوس و همکاران (۱۹۹۷) در گندم محیط «۱ میلی‌گرم‌درلیتر MS + NAA» گزارش گردیده است.

جدول ۷ - تجزیه واریانس محیط‌های کشت مختلف باززایی از نظر درصد شاخه‌زایی

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
محیط کشت	۲	۲۱۳/۸۱۲	۱۰۶/۹۰۶	۴۲۶/۹۸۲ ***
اشتباه	۶	۱/۵۰۲	۰/۲۵۰	-
کل	۸	۲۱۵/۳۱۴		CV = ٪۱/۷۶

*** = معنی‌دار در سطح ٪۰/۱

جدول ۸ - مقایسه میانگین درصد شاخه‌زایی محیط‌های کشت مختلف باززایی

محیط کشت	میانگین در صد شاخه‌زایی
MS + 1mg/l 2,4-D	٪۲۲/۳۳ b
MS + 1mg/l 2,4-D + 2mg/l BAP	٪۱۴/۶۴ c
MS + 1mg/l NAA + 2mg/l BAP	٪۳۲ a

* میانگین‌های با حروف مشترک در هر ستون تفاوت معنی داری در سطح ٪۱ ندارند ($\alpha=٪۱$)

جدول ۹ - تجزیه واریانس محیط‌های کشت مختلف باززایی از نظر درصد ریشه‌زایی

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
محیط کشت	۲	۱۵۲/۷۳۸	۷۶/۳۶۹	۳۲۹/۰۷۵ ***
اشتباه	۶	۱/۳۹۲	۰/۲۳۲	-
کل	۸	۱۵۴/۱۳۰		CV = ٪۱/۴۳

*** = معنی‌دار در سطح ٪۰/۱

جدول ۱۰ - مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی محیط‌های کشت مختلف باززایی

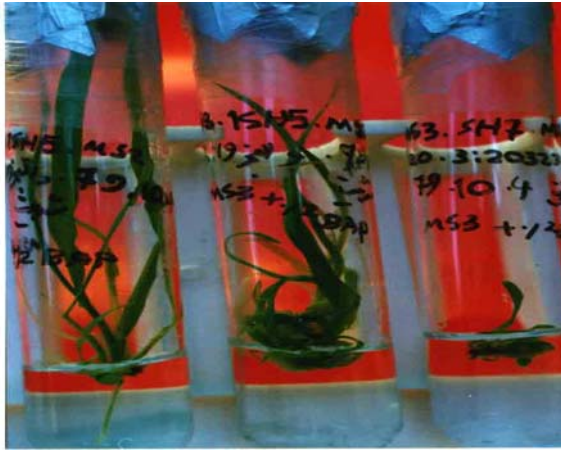
محیط کشت	میانگین در صد شاخه‌زایی
MS + 1mg/l 2,4-D	٪۲۴/۶۷ c
MS + 1mg/l 2,4-D + 2mg/l BAP	٪۴۰/۱۷ a
MS + 1mg/l NAA + 2mg/l BAP	٪۲۷/۶۶ b

* میانگین‌های با حروف مشترک در هر ستون تفاوت معنی داری در سطح ٪۱ ندارند ($\alpha=٪۱$)

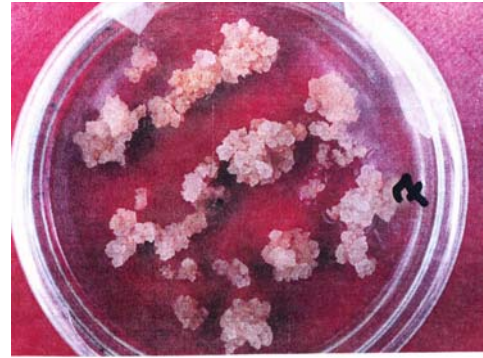
تصاویر مربوط به القای کالوس (شکل ۱)، تکثیر کالوس (شکل ۲)، کالوس‌های حساس (شکل ۳)، کالوس‌های متحمل (شکل ۴)، باززایی کالوس‌ها (شکل ۶)، گیاهچه‌های متحمل (شکل ۷) ارائه گردیده است.



شکل ۱ - القاء کالوس از جنین نارس ۱۸ روزه



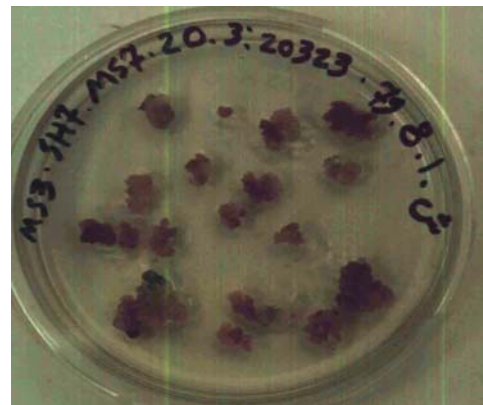
شکل ۶- باززایی کالوس‌های متحمل



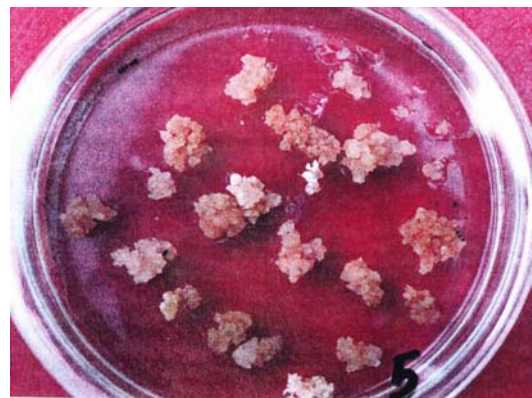
شکل ۲- تکثیر کالوس



شکل ۷- انتقال گیاه متحمل به خاک



شکل ۳- کالوس‌های حساس در سطح شوری ۸ gr/l NaCl



شکل ۴- کالوس‌های متحمل در سطح شوری ۸ gr/l NaCl

در این طرح تعداد ۲۷ گیاه کامل متحمل به سطح بالای شوری با ۸ gr/l NaCl (۸ گرم در لیتر) (سانتی‌متر/میلی موس = ۱۶/۶ EC) از چهار رقم جو مورد بررسی (والفجر، آشار، آریگاشار و افضل) باززایی گردیدند. با توجه به نتایج بدست آمده، در برنامه تحقیقات آتی وضعیت تحمل به شوری لاینهای سوماکلونی ایجاد شده در سطح مزرعه مورد ارزیابی قرار خواهند گرفت و به نظر می‌رسد بتوانیم از این طریق رقم متحمل به سطوح بالا و گسترده به شوری ایجاد نماییم.

سپاسگزاری

از شورای پژوهش‌های علمی کشور که تامین کننده اعتبار این پژوهش بوده است سپاسگزاری می‌شود. از مسئولین محترم سابق و حاضر موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی بویژه آقایان دکتر اسلام مجیدی، دکتر رضا بزرگی‌پور، دکتر بهزاد قره‌یاضی، دکتر



شکل ۵- نمایی از کالوس‌ها در فیتوترون

صغری خوشکام و آقایان مهندس احمد یوسفی و علیمردان رستمی و کلیه عزیزانی که در انجام این تحقیق ما را یاری فرموده‌اند صمیمانه قدردانی می‌نماییم.

نیر اعظم خوش خلق سیما و دکتر علی اکبر حبشی که امکان استفاده از تجهیزات و آزمایشگاهها و اجرای این تحقیق فراهم نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از خانم مهندس

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

۱. آراسته، ن. ۱۳۷۰. تکنولوژی غلات، انتشارات آستان قدس رضوی. مشهد.
۲. آستارائی، ع.ر. ۱۳۷۳. اثرات سوء نسبت جذب سدیم در آب آبیاری بر رشد گندم. خلاصه مقالات سومین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشگاه تبریز.
۳. پیری، خ. ۱۳۷۳. کاربرد تنوع سوماکلونال، گامتوکلونال و سلکسیون In Vitro در اصلاح گیاهان زراعی. مقالات کلیدی سومین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشگاه تبریز.
۴. تقوایی، م.، مجیدی هروان.،، سردمدنیا، غ.، مظاهری. د. و ع. م. شکیب. ۱۳۷۶. بررسی تحمل به شوری کالوس‌های حاصل از کشت شش رقم گندم در محیط‌های مصنوعی. مجله نهال و بذر. جلد ۱۳، شماره ۴، صفحات ۶۰ الی ۶۸.
۵. جلالی‌جوران، م. ۱۳۷۰. استفاده از تکنیک کشت بافت گیاهی به منظور تولید لاین مقاوم به شوری در برنج. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشگاه تربیت مدرس.
۶. خدابنده، ن. ۱۳۷۴. غلات، انتشارات دانشگاه تهران.
۷. شکیب، ع.م. ۱۳۷۰. بررسی قابلیت تولید کالوس و باززائی در گندم در جهت انتخاب لاین‌های متحمل به شوری یا خشکی. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز.
۸. مالمیر، ح.ع. ۱۳۷۳. بررسی نقش فسفات در تحمل ارقام گندم نسبت به شوری. خلاصه مقالات سومین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشگاه تبریز.
9. Abbas, ST; MY, Mirza & MID, Chughtai, 1991. Cytogenetical studies on a tissue culture selected salt tolerant IR-6 rice (*Oryza Sativa* L.) mutant. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research. 34: 2-3, 88-90.
10. Bong, BB; S. Tobita & T. Senboku, 1996. Variation in salt tolerance of rice plants regenerated from salt-selected calli of a susceptible variety. International Rice Research Notes. 21: 1,38.
11. Bouharmont, J; A. Dekeyser; V. Sint-Jan; YS, Dogbe & V, Van- Sint – Jan, 1991. Application of somaclonal variation and *in vitro* selection to rice improvement. Rice genetics II: Proceedings of the second International Rice Genetics Symposium, 14-18 May. 271-277.
12. Bozorgipour, R & J.W, Snape, 1997. An assessment of somaclonal variation as a breeding tool for generating herbicide tolerant genotypes in wheat (*Triticum aestivum* L.). Euphytica. 94: 335-340.
13. Chaleff, RS. & PS. Carlson, 1974. Somatic cell genetics of higher plants. Annu Rev Genet. 8: 267-278.
14. Chaudhary, MT; SJ, Wainwright; MJ, Merrett & M,shah-E-Alam, 1994. Salt tolerant plants of lucerne (*Medicago media* Pers.) regenerated from salt-selected suspension cultures. Plant Science Limerick. 98: 1, 97-102.
15. Chu, C.C., C.S. Sun, X. Chen, W.X. Zhang, & Z.H. Du. 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration in callus from inflorescences of *Hordeum vulgare* L. × *Triticum aestivum* L. hybrids. Theor. Appl. Genet. 68: 375-379.
16. Collin H.A., F.M. Burton K.M. Ibrahim. & J.C. Collins. 1990. In: H. Kijkampa, L. Nanderplas and J. Artrijk (eds) Progress in plant cellular and molecular biology. Abstract of the VII th. International congress on plant tissue and cell culture. Amsterdam, 151.
17. Croughan, TP; SJ, Stavarek & DW, Rains, 1979. Selection of a NaCl tolerant line of cultured alfalfa cells. Crop Sci. 18: 959-963.

18. Dix, PJ & HE, Street, 1975. Sodium chloride – resistant cultured cell lines from *Nicotiana sylvestris* and *Capsicum annum*. Plant Sci Lett. 5: 231-237.
19. Dix, P.J., 1980. In: Isala, b. Parisi, R. Cella and O. Ciferri (eds.) plant cell cultures: results and perspectives. Eisevier. North Holland Biomedical Press. Amsterdam, 183-186.
20. Goldstein, C.S., & W.E. Kronstad. 1986. Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley, *Hordeum vulgare* L. Theor. Appl. Genet. 71: 631-636.
21. Hanzel, J.J., J.P. Miller, M.A. Brinkman, & E. Fendos. 1985. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. Crop Sci. 25: 27-31.
22. Hasegawa, PM; RA, Bressan & A, Handa, 1980. Growth characteristics of NaCl selected and non-selected cells of *Nicotiana tabacum* L. Plant Cell Physiol. 21: 1347-1355.
23. Jain R.K., J.B., Chowdhory & S. Jain. 1990. In: H.Nijrampa, L.Nanderplas and J. Artrijk (eds). Progress in plant cellular and molecular biology. VII th. International congress on plant tissue and cell culture. Kluwer academic publishers, Amsterdam, 151.
24. Jain, RK; S, Jain; Hs, Nainawatee & JB, Chowdhury, 1990. Salt- tolerance in *Brassica Juncea* L. *In vitro* selection, agronomic evaluation and genetic stability. 48: 141-152.
25. Kim, H; TY, Chung & WY, Choi, 1988. Increased regeneration from NaCl-tolerant callus in rice. Euphytica. 39: 207-212.
26. Kintzios, SE; M, Barberaki; G, Aivalakis; J, Drossopoulos & CD, Holevas, 1997. *In vitro* morphogenetic responses of mature wheat embryos to different NaCl concentrations and growth regulator treatments. Plant Breeding. 116: 113-118.
27. Kochba 1982. In: Citrus sinensis, L., osbec & C. aurantium L.Z. pflazenphysiol 106: 111-118.
28. Lupotto, E. 1984. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos. Ann. Bot. (London). 54: 523-529.
29. Lupotto, E; Mc, Lusardi & M, Mongodi, 1989. *In vitro* selection of maize (*Zea mays* L.) salt tolerant somaclones and plant regeneration. Journal of Genetics and Breeding. 43: 4, 215-222.
30. Machii, H; H, Mizuno; T.Hirabayashi; H, Li & T, Hagio, 1998. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 53: 67-74.
31. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.
32. Nabors, MW; A, Daniels; L, Nadolny & C, Brown, 1975. Sodium chloride tolerant lines of tobacco cells. Plant Sci Lett. 4: 155-159.
33. Nabors, MW; SE, Gibbs; CS, Bernstein & ME, Meis, 1980. NaCl tolerant tobacco plants from cultured cells. Z pflanzenphysiol. 97: 13-17.
34. Patnaik, I; S, sahu & BK, Debata, 1999. Somaclonal variation in cell suspension culture-derived regenerants of *cymbopogon martinii* (Roxb) wats Var. motia. Plant Breeding. 118: 351-354
35. Powell, W., & P.D.S. Caligari. 1987. The *in vitro* genetics of barley (*Hordeum vulgare* L.) detection and analysis of reciprocal differences for culture response to 2,4-dichlorophenoxyacetic. Heredity. 59: 293-299.
36. Scowcroft, WR; 1977. Somatic cell genetics and plant improvement. Adv. Agron. 29: 39-82.
37. Shyamala, B. & R, Smith, 1990. Regeneration in cereal tissue culture: A Review. Crop Science. 30: 1328-1336.
38. Subhashini, K & GM, Reddy, 1989. Evaluation of the progeny under stress of regenerated salt tolerant rice. Journal of Genetics and Breeding. 43:3, 125-129.
39. Tal, M; D, Rosario; D, Del-Rosario; J, Cuartero; ML, Gomez-Guillamon & R, Fernandez – Munoz, 1990. Improvement of salt tolerance in tomato by conventional breeding and selection in cell culture. Proceedings of the XI th Eucarpia meeting on tomato genetics and breeding. 87-92.
40. Tal, M, 1993. *In vitro* methodology for increasing salt tolerance in crop plants. Acta Horticulturae. 336: 69-78.

41. Thomas, M.R., and K.J. Scott. 1985. Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus initiated from immature embryos and immature inflorescence of *Hordeum vulgare* L. J. Plant Physiol. 121: 159-169.
42. Timm, DA; RM, Waskom; DR, Miller & MW, Nabors, 1991. Greenhouse evaluation of regenerated spring wheat for enhanced salt tolerance. Cereal-Research- Communications. 19:4, 451-457.
43. Vu, D; D-Q, Tran & P. phan, 1988. Mutagenesis and screening method for salt tolerance in rice by anther culture. Genome. 30(suppl 1): 459.
44. Wong, C-K, S-C, Woo & S-W, Ko, 1986. Production of rice plantlets on NaCl-stressed medium and evaluation of their progenies. Bot Bull Acad Sin. 27: 11-23.
45. Zacchini, M; A, Marotta & M, de Agazio, 1997. Tolerance to salt stress in maize callus lines with different polyamine content. Plant Cell Reports. 17: 119-122.
46. Zenk. 1974. In: K.J. Kasha (ed.) Haploids in higher plants: Advances and potential. Univ. Guelph press, Ontario, Canada, 339-345.

Production of High Salt Tolerant Barley (*Hordeum vulgare* L.) Lines Using Somaclonal Variation

M.MENAYATI SHARIATPANAH¹ AND O.DABIRASHRAFI²

1,2, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran

Accepted Dec., 25, 2002

SUMMARY

This research was carried out to produce high yielding high salt tolerant barley lines from either salt susceptible, high yielding varieties or low salt tolerant low yielding varieties using somaclonal variation. In the research, different concentrations of sodium chloride (3,4,5,6,8 and 10 gr/l NaCl) and a mixture of sodium chloride and calcium chloride (3.5 gr/l CaCl₂ + 6.5 gr/l NaCl) were used in the media that included different cultivar (Val-phagre, Ashar, Arigashar and Afzal) calli. Embryos of both mature and immature seeds (16, 18, 20 days after anthesis) were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with different concentrations of 2,4-D (1.0, 1.5 and 2 mg/l 2,4-D). Embryo-derived calli were cultured on MS medium (supplemented with different concentrations of 2,4-D, BA and Kinetin) for callus proliferation. After 3 subcultures, calli were transferred to NaCl containing medium. Calli which had grown normally at high NaCl (8 and 10 gr/l) concentrations, were transferred to regeneration medium (MS + 1 mg/l 2,4-D, MS + 1mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP and MS + 1mg/l NAA + 2mg/l BAP). During the research, different factors such as the percentage of callus, root and shoot induction were analyzed using chi-square test. The results showed that: 1-the genotype effect on callus induction was significant. 2-the immature 18 day embryos exhibited the highest callus induction while the mature embryos had the lowest callus induction. 3- the genotype and embryo age interaction was significant. 4- the best callus induction rates were obtained when embryos were cultured on MS medium (supplemented with 1.5 mg/l 2,4-D). 5- the best root induction was achieved when calli were subcultured on MS medium (supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 2 mg/l BAP). 6- the best shoots induced were observed when calli were subcultured on MS medium (supplemented with 1 mg/l NAA and 2 mg/l BAP). 7- 27 plants tolerant to high NaCl (8 gr/l) concentration were regenerated. In future studies, according to these results, the regenerated plants will have to be transferred to field for further salt tolerance evaluations.

Key words: Somaclonal variation, In vitro selection, Salt tolerance (CaCl₂, NaCl), *Hordeum vulgare* (Barley), 2, 4-D, BAP & IAA