

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

منصور امیدی^۱، پریچهره احمدیان تهرانی^۲ و بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی^۳

الی ۳ - به ترتیب استاد یار، استاد و استاد یار گروه زراعت و اصلاح نباتات

دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش ۷۹/۸/۱۱

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 اسکوک با ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D کشت گردید. کالوس ها تقریباً هر یک ماه در تاریکی و دمای 1 ± 25 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 کالوس های 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 ۷-۹ ماهه، ۱۰-۱۲ ماهه، ۱۳-۱۵ ماهه صورت گرفت که در بین ژنوتیپ های مورد مطالعه تفاوت چندانی مشاهده نگردید. ولی با افزایش طول زمان کشت در پتری، یوپلوئیدی و آنیوپلوئیدی افزایش یافت. ضمن اینکه بیش از ۸۰٪ سلول های دیپلوئید بودند.

واژه های 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 می شود. تنوع سوماکلونی^۱ نامیده می شود 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

آنها مشاهده شد (۱۹). بر 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 نوتریبی های کروموزومی فقط در کشت کالوس مشاهده شد (۲۳٪) و ۱۷/۷٪ نیز آنیوپلوئید نشان دادند (۱۶). در صورتیکه هور دنوم 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 باثبات ترین گیاهان را تولید کردند در صورتیکه کشت های 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 می گردد. تولید ارقام جو مقاوم به پاتوزن های گیاهی ویروس موزائیک زرد و قارچ هلمین توسپوریوم ساتیوم^{۱۰} باعث ایجاد انگیزه برای دنبال کردن تحقیقات در زمینه های تنوع سوماکلونی و انتخاب درون شیشه ای برای حل اهداف اصلاحی خاص شده اند (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 می شود، 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).

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^۱ 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^۲، جهش زایی خود به خودی^۳ 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 آنیوپلوئیدی تا شکستگی های کروموزومی، نو ترتیبی ژن^۴، از دست رفتن ژن، تحرک ترانسپوزونی، و جهش های نقطه ای را شامل می شود که به تنهایی یا با همدیگر عمل می کنند (۶ و ۱۵). پلی پلوئیدها ممکن است بطور طبیعی در سلول های مضاعف شده داخلی^۵ از قبل وجود داشته باشند ولی اکثراً از طریق دو مکانیسم مختلف یعنی مضاعف شدن داخلی^۶ و عدم تشکیل دوک مشاهده می شود. معمولاً آنیوپلوئیدی در شرایط آزمایشگاهی یا از طریق قطعه قطعه شدن هسته ای^۷ (غیر میتوزی) صورت می گیرد 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 کالوس های بدست آمده از جنین نارس اغلب دیپلوئید بوده اند (۳ و ۹) و جو زراعی هور دنوم ولگار^۸ و هور دنوم جابتوم^۹ 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

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

آمد که با تیمار ۵ تا ۱۵ روز سرما بازرزایی 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 بازرزایی گردد (۱۸). به نظر می‌رسد که کاهش توان بازرزایی در کشت‌های 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 کالوس‌ها و بازگرداندن توان جنین‌زایی در جوهای ایرانی و ژاپنی در کالوس‌های کاملاً غیر فعال و غیر جنین‌زا و نیز مطالعه تنوع سوماکلونی از نظر تعداد کروموزوم در طی زمان در این ارقام بود.

مواد و روشها

چهار ژنوتیپ جو دو ردیفه بنام‌های 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 گرده‌افشانی خوشه‌ها به آزمایشگاه منتقل و در آنجا سترون شدند و با استفاده از میکروسکوپ دو چشمی و در زیر لامینار فلو جنین‌های نارس با ابعاد ۰/۳ تا ۲/۵ میلی‌متر در روی محیط کشت جامد MS با ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ظروف پتری ۱۰ سانتی‌متری بصورتی که اسکتلوم در بالا باشد کشت شدند. واکشت هر ۴-۵ هفته یکبار صورت گرفت و پتری‌ها در تاریکی و در دمای 1 ± 25 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. کالوس‌ها بعد از واکشت‌های لازم در محیط و در شرایط مذکور، جهت القای رشد مجدد کالوس‌های جنین‌زا و بررسی تنوع سوماکلونی، به محیط و شرایط زیر منتقل گردیدند (چون طی مدت مذکور کالوس‌ها عمدتاً به کالوس‌های غیر جنین‌زا و آبکی تبدیل شدند و رشد آنها کاملاً متوقف گردید):

در گونه‌های مختلف جو مانند هوردئوم ولگار، هوردئوم اسپانتانئوم^۱، هوردئوم بلبوزوم^۲ و هوردئوم جابتوم بازرزایی گیاه از کالوس‌های حاصل از جنین‌های 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 میلی‌متر در محیط MS کشت گردید. نمونه‌ها ۱۰-۱۲ روز بعد از واکشت تهیه و برای مطالعه سیتوژنتیکی آماده شدند. که فراوانی نسبی سلول‌های دیپلوئید را از کالوس‌های جو نشان می‌داد. فراوانی سلول‌های دیپلوئید و تتراپلوئید در ریزنمونه‌های مختلف و در بعضی مواقع در بین ارقام متفاوت بود. فراوانی آنیوپلوئیدها و یوپلوئیدها در تمام حالات کم یا خیلی کم بود. فقط در کالوس‌های بدست آمده از برگ جوان فراوانی تتراپلوئیدها افزایش معنی‌داری با افزایش سن کشت داشت (۱۱). در مطالعه دیگری در کشت جنین نارس جو در محیط MS، در تمام کالوس‌های جنین‌زا سلول‌های دیپلوئید به فراوانی مشاهده شدند. سلول‌های هاپلوئید، تتراپلوئید، اکتاپلوئید و تری‌پلوئید 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 می‌گیرد. حدس زده می‌شود که تعادل در تعداد کروموزوم‌های سلول‌های یک کالوس یک پیش نیاز برای بدست آوردن گیاهان بازرزایی شده است (۲۲). در مطالعه تعداد کروموزوم در کشت‌های طولانی مدت جو، جوانه‌های ساقه (در حال تقسیم میوز) در محیط LS^۳ کشت شدند. در دو ماهگی همه سلول‌ها دیپلوئید بودند. در کشت‌های ۵ ماهه سلول‌های تتراپلوئید مشاهده شدند. در کشت‌های ۳۶ ماهه فراوانی سلول‌های یوپلوئید و آنیوپلوئید افزایش یافت (۲۱).

برای بررسی آثار سرما روی رشد و بازرزایی کالوس‌های گندم، در کشت خوشه نارس ۳ لاین گندم در محیط MS، دمای پایین باعث کاهش کالوس‌دهی شد و با افزایش طول دوره سرمادهی میزان کالوس‌دهی و میزان رشد کالوس کاهش بیشتری داشت. بازرزایی در هر ۳ رقم بعد از ۶ ماه بشدت پایین

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 هفته ای) 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^۱ و ۱ میلی گرم در لیتر BAP^۲

- 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 1 ± 25 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 $5 \pm 7/5$ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ روز در تاریکی بود.

د- واکشت زود هنگام

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٪ استوارسین به مدت ۴-۵ 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 ۴۰-۵۰ 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 سانتی متری که هنوز تارهای کشنده آنها ظاهر نشده بود جدا گردید و تیمار و مشاهدات لازم بر روی آنها صورت گرفت. در کالوس هایی که رشد مجدد آنها شروع شد ۷-۵ روز و ۱۲-۱۰ روز بعد از واکشت نمونه برداری از اندام باززایی شده، کالوس های جنین زا، و کالوس های غیر جنین زا 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 ۱۱-۱۲ ظهر (۴-۳ ساعت بعد از شروع نوردهی)، ۱۶-۱۷ 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 1 ± 25 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

بررسی آماری تیمارهای مختلف سرما از طرح بلوک‌های کامل تصادفی استفاده گردید بدین صورت که ۸ ژنوتیپ به عنوان ۸ بلوک و ۶ تیمار سرما به عنوان تیمارهای آزمایش به کار برده شدند. نتایج تجزیه واریانس در جدول ۳ و مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها در جدول ۴ و مقایسه میانگین‌های تیمارهای مختلف سرما در جدول ۵ آورده شده است. همانگونه که در جدول ۳ آمده است ژنوتیپ‌های مختلف تفاوت‌های کاملاً معنی داری با همدیگر داشتند و با استفاده از جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴) مشخص گردید ژنوتیپ شش ردیفه شماره ۱ ژاپنی بیشترین رشد مجدد را در کالوس‌ها داشته است و ژنوتیپ‌های دو ردیفه شماره ۱۷ کلکسیون و گرگان ۴ که باززایی بالایی داشتند در اینجا نیز در رشد مجدد کالوس‌ها جزو گروه‌های بالا بوده‌اند و ژنوتیپ شش ردیفه زرچو که کمترین میزان باززایی اولیه را داشته است به همراه ژنوتیپ شش ردیفه شماره ۵ کلکسیون کمترین میزان رشد مجدد کالوس را داشته‌اند. بنابراین بین میزان رشد مجدد کالوس‌ها با استفاده از تیمار سرمای ۵ درجه سانتی‌گراد و باززایی اولیه مشابهه گردید بدین صورت که ژنوتیپ‌هایی که باززایی اولیه بالایی داشته‌اند در تیمار سرما نیز رشد مجدد کالوس‌های جنین‌زا در آنها بالا بود. بعکس ژنوتیپ‌هایی که باززایی اولیه 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 (جدول ۳) ولی در مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در گروه‌های مختلفی قرار گرفته‌اند که بالاترین میزان رشد مجدد با استفاده از ۱۵ روز سرمای ۵ درجه سانتی‌گراد و کمترین میزان رشد با تیمار ۳۰ روز سرمای ۵ درجه سانتی‌گراد با اضافه ۵ روز سرمای صفر درجه سانتی‌گراد حاصل شد و چهار تیمار دیگر سرما در یک گروه قرار گرفته‌اند (جدول ۵). لذا می‌توان تیمار ۱۵ روز سرمای ۵ درجه سانتی‌گراد را به عنوان بهترین تیمار سرما دهی برای رشد مجدد کالوس‌ها ذکر کرد و با توجه به استفاده‌های بهینه از دستگاه‌های سرماده، تیمار حد اقل تعداد روز سرما دهی (۵ روز سرمای ۵ درجه سانتی‌گراد) تیمار قابل توصیه و مناسب می‌باشد. 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

محیط و شرایط متفاوتی اعمال گردید. لازم به یادآوری است که در هر بار واکشت نیز اندام باز زاشده آنها قطع و فقط کالوس‌ها 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 کالوس‌ها نشدند و فقط تیمار ۴۵ میلی گرم در لیتر 4D و 2 باعث شروع رشد محدود و اندکی در کالوس‌های ژنوتیپ شش ردیفه شماره ۱ کلکسیون و دو ردیفه شماره ۱۷ کلکسیون گردید.

تیمارهای سرما

بعد از اینکه تیمارهای مختلف هورمونی و نوری و نیز واکشت زودهنگام در شروع رشد مجدد کالوس‌ها تأثیری نگذاشت از تیمارهای سرما استفاده گردید. تیمار سرما $5/2 \pm 7/5$ درجه سانتی‌گراد چون تعداد نمونه‌ها کافی نبود از بررسی‌ها حذف گردید. تیمارهای سرما همگی باعث شروع رشد مجدد کالوس‌ها و ایجاد کالوس‌های جنین‌زا و فشرده شدند و متعاقب آن جوانه زنی و باززایی ریشه و میزان کمتری باززایی ساقه در آنها شروع گردید. درصد کامل کالوس‌های جنین‌زا شده و احتمالاً اندام‌زایی کرده در جدول ۱ ذکر شده است. ضمناً دو تیمار مختلف شدت نور تأثیری در شروع رشد مجدد کالوس‌ها نداشت. همانگونه که در جدول ۱ آمده است بالاترین میانگین رشد مجدد کالوس‌های جنین‌زا در ارقام شماره ۱ ژاپنی، شماره ۱۷ کلکسیون، گرگان ۴، و ارس مشاهده گردید که با میزان باززایی اولیه این ارقام نیز مطابقت دارد چون بالاترین میزان باززایی اولیه را نیز همین ارقام داشته‌اند. از طرفی رقم شش ردیفه زرچو که کمترین میزان باززایی اولیه را داشت، در اینجا جزو ارقامی است که رشد مجدد کالوس‌های جنین‌زا در آن کم بود. بنابراین این تیمارهای سرمای ۵ درجه سانتی‌گراد در بازگرداندن درصد بالایی از رشد مجدد کالوس‌های جنین‌زا مؤثر بود. بالاترین میانگین رشد مجدد کالوس‌های جنین‌زا در تیمار ۱۵ روز سرما و بعد از آن ۲۰ روز سرما مشاهده گردید و کمترین میزان رشد مجدد در تیمار ۳۰ روز سرمای ۵ درجه به اضافه ۵ روز سرمای صفر درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید (جدول ۱). جهت

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 کالوس ها نمونه برداری صورت گرفت. در این زمان در بسیاری از مناطق کالوس ها مراکز رشدی مریستمی ایجاد شده بود که سلول های آن دارای هسته های بزرگ و رنگ پذیر بودند. سلول ها شکل طبیعی گرفته واکوئل آنها کوچک و هسته کاملاً فعال بود این مناطق مریستمی و در حال رشد در قسمت های کالوس ها و در کنار سلول های غیر فعال مشاهده می شدند. در این مراکز رشدی هسته ها در مراحل مختلف تقسیم مشاهده می شدند. (شکل ۱). 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 جدول ۲ ذکر شده است. بصورتی که بیش از ۸۰٪ سلولهای مورد مطالعه دارای ۱۴ کروموزوم بودند و در ژنوتیپ های مختلف نیز تفاوت چندانی به نظر نمی رسد. از طرفی با افزایش طول دوره کشت در صد سلولی هایی که دارای تعداد کروموزومی غیر از ۱۴ بودند بیشتر بود و در تمام ژنوتیپ ها افزایش طول دوره کشت باعث افزایش در تغییر تعداد کروموزوم گردید (شکل ۲). جهت بررسی آماری تغییر در تعداد کروموزوم نتایج در طرح کاملاً تصادفی بررسی گردید و ۸ ژنوتیپ و سه طول مختلف دوره کشت تفاوت معنی داری نشان ندادند (جدول ۶). در بررسی میانگینهای ۸ ژنوتیپ (جدول ۷) و بررسی میانگین های سه طول دوره کشت (جدول ۸) تفاوتی مشاهده نگردید و با میانگین حدود ۲۰ در 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.

و شش ردیفه تیمارهای هورمونی و نوری تأثیری در القای رشد مجدد کالوسهای جنین زا ندارد در صورتی که با استفاده از تیمار سرمای ۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۲۰ تا ۲۵ 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 تیمار ۵ روز سرمای ۵ درجه سانتی گراد استفاده شد که کاملاً مؤثر بود و تمام گیاهچه هایی که فاقد ریشه بودند در این تیمار ریشه دار شدند لذا می توان 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 سرما داده 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 ۷-۵ روز و ۱۲-۱۰ روز بعد از واکشت، نمونه برداری از کالوسها صورت گرفت که زمان نمونه برداری ۱۲-۱۰ روز بعد از 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 رویز و واسکوئز^۱ در سال ۱۹۸۲ بر روی جو کاملاً مطابقت دارد. زمان نمونه برداری ۷-۵ روز بعد از واکشت نیز زمان نسبتاً مناسبی بود این زمان توسط فلومینهان و کامیا^۲ 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 والفجر	۲۵/۸۲d
زر جو	۵۶/۳۳c
شماره ۱۱ ژاپنی	۲۸/۵۰d
شماره ۱۷ کلکسیون	۷۴/۸۳bc
گرگان ۴	۸۴/۰۰ab
ارس	۹۱/۱۷ab
	۹۱/۱۷ab

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

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

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

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

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 والفجر	۲۰/۰۰۰a
زر جو	۲۰/۰۰۰a
شماره ۱۱ ژاپنی	۲۰/۰۰۰a
شماره ۱۷ کلکسیون	۲۰/۰۰۰a
گرگان ۴	۲۰/۰۰۰a
ارس	۲۰/۶۷۰a

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

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 embryo-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 anaphase 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. Pflanzenzuchtg* 20: 154-156.
11. 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.
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. Cult.* 49:35-38.
14. Katoh Y., T. Hasegawa, T. Suzuki, and T. Fujii. 1986. Plant regeneration from the callus derived from mature embryos of hexaploid 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 trifol. *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. Vazquez. 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. Vazquez, 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 Heidelberg.

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

**M.OMIDI¹, P.AHMADIAN-TEHRANI² AND
B. E. SAYED TABATABAEI³**

**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 5⁰C was suitbale. Cold for 15 days and 5⁰C 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.