بررسی دورگ‌گیری بین‌گونه‌ای (*Hordeum vulgare* L. ×*H. bulbosum* L.) به منظور تولید هاپلوئید و هیبرید[1]

مهران عنایتی شریعت‌پناهی و رضا بزرگی‌پور

به ترتیب محقق و پژوهنده مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج

تاریخ پذیرش مقاله ۷۷/۱۰/۲

خلاصه

این تحقیق به منظور ارزیابی پتانسیل ژنوتیپ‌های جووحشی گونه بلبوسوم (*Hordeum bulbosum*) ایرانی در تولید هاپلوئید در جو در مقایسه با بلبوسوم ژنوتیپ شاهد PB1 و همچنین تولید هیبریدهای بین‌گونه‌ای انجام گردید. مواد گیاهی والدینی شامل دو ژنوتیپ جو بهاره نسل F_3 به شماره‌های 23216(C.C.89 Trompilox) و 23176(C.C.89x Eneldo"s") و چهار ژنوتیپ *H. bulbosum* به شماره‌های 1180، 76063، TN-2-173 و PB1 بودند. در ارتباط با هر تلاقی صفاتی شامل درصد تشکیل بذر، درصد تشکیل جنین، درصد جوانه‌زنی جنین و درصد تولید گیاهچه مورد مطالعه قرار گرفت و از آزمون مربع کای (χ^2) جهت مقایسه‌های آماری استفاده گردید. نتایج بررسی‌های سیتولوژیکی نشان داد که ژنوتیپ‌های بلبوسوم 1180، 76063 و TN-2-173 تتراپلوئید (۲n =۴x =۲۸) بوده و نتاج حاصله از تلاقی آنها با ژنوتیپ‌های جو زراعی هیبرید تریپلوئید (۳x =۲۱) می‌باشند. در حالی که نتاج حاصله از تلاقی بلبوسوم دیپلوئید با ژنوتیپ‌های جو زراعی هاپلوئید (x = ۷) بودند. مقایسات آماری نشان داد که بین ژنوتیپ‌های بلبوسوم تتراپلوئید 1180، 76063 و TN-2-173 (به عنوان پایه پدری) در تلاقی با جو زراعی فقط از نظر درصد تشکیل بذر تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بین ژنوتیپ‌های جو زراعی 23216 و 23176 (به عنوان پایه مادری) در تلاقی با بلبوسوم‌های تتراپلوئید تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید امّا در تلاقی با بلبوسوم دیپلوئید PB1 از نظر درصد تشکیل بذر، درصد تشکیل جنین تفاوت معنی‌داری وجود داشت. با توجه به نتایج حاضر به نظر می‌رسد ژنوتیپ‌های *H. bulbosum* ایرانی مورد بررسی، برای تولید هاپلوئید در جو زراعی مناسب نمی‌باشند در حالی که بلبوسوم PB1 به خوبی می‌تواند برای تولید هاپلوئید در برنامه‌های به‌نژادی جو در داخل کشور مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی : دورگ‌گیری بین‌گونه ای ، هاپلوئید و هیبرید

مقدمه

جو یکی از محصولات زراعی اصلی ایران است و از آنجایی که تغذیه جمعیت جهان با رشدی روزافزون مهم‌ترین مسأله بشر است جو می‌تواند بطور مستقیم و غیرمستقیم به این مهم کمک نماید(۳ و ۴). مصارف غذایی جو شامل خوراک دام، مالت‌سازی، آردسازی و الکل‌سازی می‌باشد(۱).

تولید گیاه هاپلوئید و سپس دابلدهاپلوئید[2] باعث دستیابی به هموزیگوسیتی مطلق از گیاهان هتروزیگوت (F_1 یا F_n) در حداقل زمان ممکن می‌گردد. از نقطه نظر به‌نژادی، در گیاهان خودگشن مثل غلات، روش دابلدهاپلوئیدی می‌تواند مستقیماً جهت تهیه ارقام

۱.قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول

2.Doubled haploids

جدید مورد استفاده واقع شود، زیرا هر لاین دابلدهاپلوئید پتانسیل تبدیل شدن به یک رقم جدید را دارا می‌باشد. مزایای اصلی روش دابلدهاپلوئیدی در مقایسه با روش‌های کلاسیک به‌نژادی شامل سرعت بخشیدن به دوره برنامه به‌نژادی و افزایش کارآئی انتخاب در طول برنامه می‌باشد(۲).

یک به‌نژادگر همواره در جستجوی منابع جدید ژرم‌پلاسم می‌باشد. جایگزینی توده‌های بومی توسط واریته‌های اصلاح شده یکنواخت و پُرمحصول، منجر به‌فرسایش ژنتیکی و کاهش تنوع در بسیاری از محصولات‌زراعی شده است. نتیجتاً گونه‌های زراعی، اغلب فاقد ژن‌های مورد نیاز به‌نژادگر خصوصاً ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها می‌باشند. یکی از راههای گسترش تنوع ژنتیکی در جوامع گیاهان زراعی، تلاقی آنها با گونه‌های دیگر به ویژه خویشاوندان وحشی نزدیک به آنها است. با این تلاقی‌ها امکان انتقال ژن‌های مطلوب به گونه زراعی فراهم می‌شود و صفات مطلوب موجود در گونه زراعی تقویت می‌گردند(۵).

گونه جو وحشی *Hordeum bulbosum* که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته، بطورکلی برای محققین ژنتیک و به‌نژادگران گیاهی به دو دلیل جالب توجه است: ۱ - کروموزوم‌های *H. bulbosum* در تلاقی با گندم و یا *H. vulgare* گرایش به حذف شدن دارند که نتیجتاً باعث تولید نتاج هاپلوئید می‌شود و این هاپلوئیدها برای اهداف به‌نژادی و تجزیه ژنتیکی بسیار مفید می‌باشند (۴، ۲۰ و ۲۱)، ۲ - *H. bulbosum* دارای صفات مطلوبی از قبیل مقاومت به سرما، مقاومت به بیماری و غیره می‌باشد که این صفات می‌توانند دراصلاح کولتیوارهای جوزراعی مفیدواقع شوند(۴و۱۷).

تولید جوهای زراعی هاپلوئید از طریق حذف کروموزومی[1] ،پس از تلاقی بین گونه‌ای *H. vulgare* به عنوان والد مادری و *H. bulbosum* به عنوان والد پدری و متعاقب آن حذف کروموزوم‌های بلبوسوم انجام می‌گیرد (۴). روش حذف کروموزمی پیشرفت قابل توجهی در تولید هاپلوئیدهای جو به شمار می‌آید و نسبت به روش کشت بساک مزیت‌هایی دارد، بطوری که در این روش فراوانی هاپلوئیدها یقیناً بالا بوده و هاپلوئیدهای حاصل عموماً سبز و پایدار هستند در حالی که در روش کشت بساک میزان موفقیت به ژنوتیپ بستگی دارد. ضمناً اغلب ژنوتیپهای جو در روش بلبوسوم با میزان متفاوتی تولید هاپلوئید می‌نمایند(۴ و ۷).

کوکوک (۱۵) اولین تلاقی بین گونه‌ای را بین *H. vulgare* (2x) و *H. bulbosum* (4x) انجام داد و هیبریدهای تریپلوئید بدست آورد که همگی عقیم بودند. دیویس (۹) از تلاقی بین انواع اوتوتراپلوئید *H. vulgare* و *H. bulbosum* گیاهان شبیه *H. vulgare* بدست آورد و چون *H. bulbosum* به عنوان والد مادری بکار رفته بود لذا تولید این گیاهان شبیه *H. vulgare* را به پارتنوجنسیس نر[2] نسبت داد. کائو و کاشا (۱۱) گیاهان هاپلوئید جو زراعی را از طریق تلاقی بین گونه‌ای *H. vulgare* (4x) x *H. bulbosum* (4x) بدست آوردند. کاشا و کائو (۱۲) گیاهان هاپلوئید جو زراعی را با فراوانی زیاد از طریق تلاقی *H. vulgare*(2x) x *H. bulbosum*(2x) تولید کردند، آنها نظریه پارتنوجنسیس را رد کردند و نظریه حذف کروموزومی را معرفی نمودند. طبق گزارش پیکرینگ (۱۸) برای بدست آوردن موفقیت‌های بیشتر در زمینه تولید گیاهان دابلدهاپلوئید جو باید شماره‌های بیشتری از *H. bulbosum* مورد ارزیابی قرار گیرند. بزرگی‌پور و اسنیپ (۸) یکسری از اختصاصات In vitro از قبیل اندازه جنین، مرحله تمایز و زمان جوانه‌زنی جنین‌های هاپلوئید را به منظور ایجاد روشی انتخابی برای افزایش کارآیی تولید دابلدهاپلوئید با استفاده از روش بلبوسوم مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که مرحلهٔ تمایز جنین‌های هاپلوئید در زمان جدا شدن از بذر، نویدبخش‌ترین خصوصیت برای انتخاب می‌باشد. اربی و همکاران (۶) تأثیر دو فاکتور دوره گرده‌افشانی و ژنوتیپ والدینی را در تولید هاپلوئید جو به روش بلبوسوم در گلخانه گزارش کردند. فوروشو و یوشیدا (۱۰) در سوکوبای ژاپن چهار لاین جو که از نظر کیفیت مالت، عملکرد زراعی و مقاومت به سفیدک سطحی و ویروس موزائیک زرد نسبت به ارقام سازگار و مطلوب منطقه‌برتر بودند را با استفاده از روش بلبوسوم معرفی کردند. مهمترین هدف تحقیق حاضر بررسی‌بلبوسوم‌های ایرانی جهت استفاده از روش به‌نژادی هاپلوئیدی در جو و همچنین تولید هیبریدهای بین گونه‌ای جو زراعی و بلبوسوم بود.

مواد و روشها

آزمایش در بخش تحقیقات بیوتکنولوژی گیاهی مؤسسه

1- Chromosome elimination

2- Male Parthenogenesis

تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج انجام گردید.

برای انجام این تحقیق از دو ژنوتیپ جو بهاره نسل F_3 باشماره‌های 23216 (Trompilo × C.C.89) و 23176 ("Eneldo"s × C.C.89) که در برنامه‌های به‌نژادی بخش غلات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج قرار داشتند به عنوان والد مادری و از چهار ژنوتیپ *H. bulbosum* به نامهای 76063 و TN-2-173 (از بخش ژنتیک و آمار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج)، 1180 (از بخش بانک ژن مرکز تحقیقات البرز مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع) و PB1 (از مرکز تحقیقات علوم گیاهی جان اینیز انگلستان) به عنوان والد پدری استفاده گردید.

به منظور جوانه‌زنی، بذور ژنوتیپ‌های مختلف جو زراعی و بلبوسوم بطور جداگانه در روی کاغذ صافی مرطوب در داخل پتری‌دیش قرار داده شده و پتری‌دیش‌ها در داخل فیتوترون (در تاریکی) در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد 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 (روشنایی) با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا ظهور ساقه‌چه‌های ۲ سانتی‌متری برگردانده شدند. بذور جوانه زده به گلخانه منتقل و در گلدان (با مخلوط خاکی: $\frac{1}{3}$ خاک رُس + $\frac{1}{3}$ خاک برگ + $\frac{1}{3}$ ماسه بادی) کشت گردیدند. با توجه به اینکه *H. bulbosum* برای گلدهی نیاز به یک دوره سرمادهی دارد لذا ژنوتیپ‌های مختلف بلبوسوم حدوداً یک ماه پس از کاشت، به فیتوترون سرما با حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ هفته منتقل شدند و پس از طی مدت فوق‌الذکر مجدداً به گلخانه با حرارت ۲ ± ۲۰ درجه سانتی‌گراد و طول روز ۱۶ ساعت انتقال یافتند.

جوهای زراعی که به عنوان والد مادری بکار رفتند اخته شدند. برای اخته کردن گلچه‌های جانبی و تمامی گلچه‌های رشد نکرده از بالا و پائین سنبله حذف گردیده و فقط گلچه‌های میانی باقی ماندند که با برش بالای گلچه‌ها، بساک‌ها با پنس خارج شدند و سپس سنبله اخته شده با پاکت سلوفان پوشانده شد. حدوداً ۲ الی ۳ روز پس از اخته کردن، با دانه‌های گردهٔ تازه بلبوسوم گرده‌افشانی گردید. برای جمع آوری گرده در صبح زود که سنبله‌های بلبوسوم بیشترین گرده را دارا هستند با استفاده از کاغذ آلومینیومی، دانه‌های گردهٔ تازه جمع آوری و توسط قلم‌مو سریعاً به گلچه‌های اخته شده منتقل گردیدند. ۲۴ ساعت پس از گرده‌افشانی، تمام سنبله‌ها با اسیدجیبرلیک (GA_3 با غلظت 75 p.p.m.) محلول‌پاشی شده و سپس به وسیله پاکت‌های کاغذی قهوه‌ای پوشانده شدند.

برای کشت جنین از محیط پایه B_5 تغییر یافته فاقد 2,4-D و حاوی ساکاروز به میزان ۲۰ گرم در لیتر و آگار به میزان ۸ گرم در لیتر استفاده گردید. حدوداً ۱۴ الی ۱۶ روز (بسته به میزان رشد و نمو جنین) ساقه‌های حامل سنبله از گیاه جدا شده، به آزمایشگاه انتقال یافته و سپس بذور هیبرید از سنبله‌هایی که در آنها تلاقی انجام گرفته، جدا و در داخل پتری‌دیش قرار داده شدند. بذور هر پتری‌دیش در زیر لامینار 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، شستشو گردیدند. سپس در زیر بینی کولر جنین‌ها از داخل بذور خارج گردیده و برروی محیط کشت قرار داده شدند. جنین‌های کشت شده به فیتوترون با دمای ۱ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی به منظور جوانه‌زنی و رشد و سپس به فیتوترون روشنایی با طول روز ۱۶ ساعت منتقل گردیدند. به تدریج ساقه‌چه‌ها شروع به تولید کلروفیل و سبز شدن نمودند و ریشه‌زایی نیز انجام گرفت.

معمولاً پس از حدود ۳ الی ۴ هفته که سیستم ریشه و ساقه به حد کافی توسعه پیدا کرد گیاهچه‌ها از لوله آزمایش به گلدان (با مخلوط خاکی $\frac{3}{4}$ پیت + $\frac{1}{4}$ ماسه) منتقل و به منظور جلوگیری از تنش رطوبتی توسط درپوش پلاستیکی شفاف پوشیده شدند سپس گلدان‌ها به فیتوترون با دمای ۱ ± ۲۰ 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.

به منظور بررسی سیتولوژیکی گیاهچه‌های حاصل از کشت جنین و همچنین تعیین سطح پلوئیدی بلبوسوم‌های ایرانی به منظور انتخاب دیپلوئیدها از دو روش استفاده گردید که در روش اول از پیش تیمار کلشیسین (با غلظت ۲ گرم در لیتر)، تثبیت کننده ۳:۱ (۳ واحد الکل اتیلیک و یک واحد اسید استیک)، هیدرولیز در اسید کلریدریک (یک نرمال) و رنگ آمیزی با اورسئین (۱٪) و در روش دوم از پیش تیمار آلفابرومونفتالین اشباع و تثبیت کننده با حجم مساوی از اکسیدکرومیک و فرمالدئید ۴٪، هیدرولیز در هیدروکسیدسدیم

یک نرمال و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین ۴٪ استفاده گردید. پس از تعیین سطح پلوئیدی، گیاهچه‌های هاپلوئید انتخاب شدند و در مرحله سه برگی، وقتی که ارتفاع آنها حدوداً ۲۵ - ۲۰ سانتی‌متر بود جهت دو برابر کردن کروموزوم‌ها از خاک خارج گردیدند. بلافاصله پس از خروج از خاک ریشه‌های آنها ابتدا با آب شسته شده و سپس ۳ - ۲ سانتی‌متر از ریشه گیاهان انتخابی نگهداری شده و بقیه قطع گردیدند. گیاهان فوق‌الذکر از قسمت ریشه و طوقه در محلولی متشکل از کلشیسین ۰/۰۵٪، دای‌متیل سولفوکساید[1] ۱/۵٪ و Tween 20 (یک قطره) به مدت ۵/۵ - ۵ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. پس از تیمار، ریشه‌ها از محلول خارج گردیده و به دقت با آب شسته شده و سپس به گلدان منتقل گردیدند و در فیتوترون ۱ ± ۲۰ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶/۸ (شب / روز) قرار گرفتند و پس از حدود ۱۰ الی ۱۵ روز گیاهان به گلخانه با درجه حرارت ۲۵ - ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. در طی اجرای تحقیق فاکتورهای: درصد تشکیل بذر (نسبت تعداد بذر تشکیل شده به تعداد گلچه گرده‌افشانی شده)، درصد تشکیل جنین (نسبت تعداد بذر دارای جنین به تعداد بذر تشکیل شده)، درصد جوانه‌زنی جنین (نسبت تعداد جنین جوانه‌زده به تعداد جنین‌کشت شده) و درصد تولید گیاهچه (نسبت تعداد گیاهچه تولید شده قبل از تیمار با کلشیسین به تعداد جنین‌جوانه زده) یادداشت‌برداری گردیدند و از آزمون مربع کای (χ^2) به منظور مقایسه ژنوتیپ‌ها از نظر فراوانی صفات فوق استفاده شد.

نتایج و بحث

بلبوسوم ژنوتیپ شاهد PB1 که به عنوان یک ژنوتیپ استاندارد جهانی جهت تولید هاپلوئید در جو استفاده می‌گردد دیپلوئید (2n=2x=14) می‌باشد و ژنوتیپ‌های بلبوسوم ایرانی مورد استفاده با توجه به نتایج بررسی‌های سیتولوژیکی انجام شده تتراپلوئید (2n=4x=28) بودند. اثر ژنوتیپ پایه پدری تتراپلوئید در جدول ۱ نشان داده شده است. بطوری که ملاحظه می‌شود درصد تشکیل بذر در ژنوتیپ‌های بلبوسوم تتراپلوئید1180، 76063 و TN-2-173 در تلاقی با ژنوتیپ‌های جو زراعی به ترتیب برابر با ۵۹/۵٪، ۶۲/۲٪ و ۴۳/۳٪ بود که تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ نشان دادند بنابراین بین ژنوتیپ‌های بلبوسوم تتراپلوئید، عکس‌العمل‌های متفاوتی از نظر درصد تشکیل بذر دیده می‌شود که این مسأله توسط ژو و اسنیپ (۲۲) نیز گزارش شده است. بطوری که آنها ژنوتیپ بلبوسوم تتراپلوئید PB168 را بطور معنی‌داری برتر از PB179 دانستند. درصد تشکیل جنین در ژنوتیپ‌های بلبوسوم تتراپلوئید 1180، 76063 و TN-2-173 در تلاقی با جو زراعی به ترتیب برابر با ۷۲/۴٪، ۶۵/۲٪ و ۶۹/۲٪ بود که تفاوت معنی‌داری نداشتند به عبارتی درصد تشکیل جنین تحت تأثیر پایه پدری قرار نمی‌گیرد. از نظر درصد جوانه‌زنی جنین و درصد تولید گیاهچه نیز بین ژنوتیپ‌های بلبوسوم تتراپلوئید تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. اثر ژنوتیپ پایه مادری در تلاقی با بلبوسوم‌های تتراپلوئید در جدول ۲ نشان داده شده است. بطوری که ملاحظه می‌شود درصد تشکیل بذر در دو ژنوتیپ جو زراعی 23216 و 23176 در تلاقی با بلبوسوم‌های تترایلوئید تفاوت معنی‌داری نداشت به عبارتی درصد تشکیل بذر تحت تأثیر ژنوتیپ مادری نمی‌باشد و احتمالاً در غیرمعنی‌دار شدن این اختلاف وجود تنوع ژنوتیپی در نسل F_3 و نیز عوامل محیطی نظیر عدم یکنواختی در شرایط نوری و حرارتی گلخانه، یکسان نبودن وضعیت سنبله‌ها در زمان اخته کردن و نیز عدم تولید یکسان دانه‌های گرده توسط سنبله‌های بلبوسوم در زمان گرده‌افشانی مؤثر بوده است. ژو و اسنیپ (۲۲) درصد تشکیل بذر را در چهار ژنوتیپ جو زراعی در تلاقی با بلبوسوم‌های تتراپلوئید معنی‌دار تشخیص دادند.

از نظر درصد تشکیل جنین بین دو ژنوتیپ جوزراعی 23216 و 23176 تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید در حالی که ژو و اسنیپ (۲۲) اثر پایه مادری را برروی درصد جوانه‌زنی مؤثر دانستند، لذا به نظر می‌رسد ژنوتیپ‌های مختلف نسل F_3 اثرات متفاوتی داشته باشند و ضمناً تعداد تلاقی‌ها نیز در این رابطه مؤثر می‌باشد. از نظر درصد جوانه‌زنی جنین و درصد تولید گیاهچه همانند پایه پدری، پایه مادری نیز مؤثر نمی‌باشد به عبارتی این دو فاکتور تحت تأثیر ژنوتیپ قرار ندارند.

اثر ژنوتیپ پایه مادری در تلاقی با بلبوسوم دیپلوئید PB1 (شاهد) در جدول ۳ نشان داده شده است بطوری که ملاحظه می‌شود درصد تشکیل بذر در دو ژنوتیپ جو زراعی 23216 و 23176 در تلاقی با

1-Dimethyle sulfoxide

جدول ۱ - مقایسه ژنوتیپ‌های بلبوسوم 1180 ، 76063 و TN-2-173 در تلاقی با جو زراعی از نظر درصد تشکیل بذر، درصد تشکیل جنین، درصد جوانه‌زنی جنین و درصد تولید گیاهچه

مراحل تولید گیاهچه	تعداد				درصد			آزمون مربع کای
	1180	76063	TN-2-173		1180	76063	TN-2-173	(χ^2)
گلچه گرده‌افشانی شده .A	۶۸۷	۳۷	۶۰		-	-	-	
بذر تشکیل شده .B	۴۰۹	۲۳	۲۶	B/A	۵۹/۵	۶۲/۲	۴۳/۳	۶/۱۹*
بذر دارای جنین .C	۲۹۶	۱۵	۱۸	C/B	۷۲/۴	۶۵/۲	۶۹/۲	۰/۶۴n.s
جنین جوانه‌زده .D	۱۹۹	۱۱	۱۲	D/C	۶۷/۲	۷۳/۳	۶۶/۷	۰/۲۵n.s
گیاهچه تولید شده .E	۱۲۶	۷	۹	E/D	۶۳/۳	۶۳/۶	۷۵	۰/۶۷n.s

معنی‌دار در سطح ۵٪ * عدم وجود تفاوت معنی‌دار n.s

بلبوسوم دیپلوئید PB1 به ترتیب ۴۷/۵٪ و ۶۷/۶٪ بود که تفاوت بسیار معنی‌داری نشان داد به عبارتی ژنوتیپ جو زراعی 23176 تلاقی‌پذیری بهتری با PB1 دارد. ژو و اسنیپ (۲۲) درصد تشکیل بذر را در چهار ژنوتیپ جو زراعی در تلاقی با PB1 بین ۲۰/۳٪ الی ۵۳/۴٪ و در تلاقی با PB8 بین ۱/۹٪ الی ۵۱/۱٪ و در تلاقی با PB11 بین ۱/۹٪ الی ۴۷/۹٪ گزارش کردند و اثر پایه مادری را برروی درصد تشکیل بذر معنی‌دار تشخیص دادند. بزرگی‌پور و اسنیپ (۸) درصد تشکیل بذر را در دو ژنوتیپ جو زراعی در تلاقی با PB1 به ترتیب ۷۳/۱٪ و ۸۷/۶٪ گزارش کردند و تأثیر پایه مادری را برروی درصد تشکیل بذر معنی‌دار تشخیص دادند. پیکرینگ (۱۹) نیز درصد تشکیل بذر را در پنج رقم جو زراعی در تلاقی با بلبوسوم دیپلوئید بین ۳۹/۶٪ الی ۸۸/۵٪ گزارش کرد و پایه مادری را برروی درصد تشکیل بذر مؤثر تشخیص داد. درصد تشکیل جنین در دو ژنوتیپ جو زراعی 23216 و 23176 در تلاقی با بلبوسوم دیپلوئید PB1 تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ نشان داد. پیکرینگ (۱۹) درصد تشکیل جنین را در پنج رقم جو زراعی در تلاقی با بلبوسوم‌های دیپلوئید بین ۲۲/۶٪ الی ۵۰/۶٪ گزارش کرد و والد مادری را در این رابطه مؤثر دانست. اربی و همکاران (۶) درصد تشکیل جنین را در سه ژنوتیپ جو زراعی در تلاقی با بلبوسوم دیپلوئید ۲۴/۴٪، ۳۴/۲٪ و ۴۸/۱٪ گزارش کردند که تفاوت معنی‌داری داشتند به عبارتی والد مادری را برروی درصد تشکیل جنین مؤثر تشخیص دادند. بزرگی‌پور و اسنیپ (۸) درصد تشکیل جنین را در دو ژنوتیپ جو بهاره در تلاقی با PB1 به ترتیب ۲۰/۳٪ و ۲۸/۱٪ مشاهده نمودند و تأثیر والد مادری‌را برروی درصد تشکیل جنین گزارش کردند. کریک (۱۴) و فوروشو و همکاران (۱۰) نیز تأثیر والد مادری را برروی درصد تشکیل جنین گزارش کردند. درصد جوانه‌زنی جنین در دو ژنوتیپ جو زراعی 23216 و 23176 تفاوت معنی‌داری نشان نداد به عبارتی پایه مادری بر روی درصد جوانه‌زنی جنین مؤثر نبود که قبلاً نیز توسط بزرگی‌پور و اسنیپ (۸) عدم تأثیر والد مادری برروی درصد جوانه‌زنی جنین گزارش گردیده بود. ضمناً درصد تولید گیاهچه نیز در دو ژنوتیپ جو زراعی 23216 و 23176 تفاوت معنی‌داری نشان نداد که این مسأله قبلاً نیز توسط پیکرینگ (۱۹) گزارش گردیده بود.

همانطوری که در جداول ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده عدم تأثیر ژنوتیپ پایه مادری و پدری برروی دو فاکتور درصد جوانه‌زنی جنین و درصد تولید گیاهچه هم در تلاقی با بلبوسوم PB1 و هم در تلاقی با بلبوسوم‌های ایرانی مشهود می‌باشد لذا به نظر می‌رسد ژنوتیپ برروی درصد جوانه‌زنی جنین مؤثر نبوده بلکه عوامل غیرژنتیکی نظیر رسیدگی فیزیولوژیکی جنین در زمان برش دادن بذر، شرایط کشت جنین و عدم آسیب‌رسانی به جنین در زمان کشت مؤثر می‌باشند. در مورد درصد تولید گیاهچه نیز به نظر می‌رسد عوامل غیرژنتیکی نظیر سرعت رشد گیاهچه در لوله آزمایش، شرایط نوری و حرارتی اتاقک رشد و انتقال به موقع گیاهچه‌ها از لوله آزمایش به گلدان مؤثر می‌باشند.

جدول ۲ - مقایسه ژنوتیپ‌های جو زراعی 23216 و 23176 در تلاقی با بلبوسوم‌های تتراپلوئید از نظر درصد تشکیل بذر، درصد تشکیل جنین، درصد جوانه‌زنی جنین و درصد تولید گیاهچه

مراحل تولید گیاهچه	تعداد		درصد		آزمون مربع‌کای (χ^2)
	23216	23176	23216	23176	
A. گلچه گرده‌افشانی شده	۵۰۸	۲۷۶	-	-	
B. بذر تشکیل شده	۳۰۷	۱۵۱	B/A ۶۰/۴	۵۴/۷	۲/۴ n.s
C. بذر دارای جنین	۲۲۳	۱۰۶	C/B ۷۲/۶	۷۰/۲	۰/۳۱ n.s
D. جنین جوانه‌زده	۱۴۵	۷۷	D/C ۶۵/۰	۷۲/۶	۱/۹۲ n.s
E. گیاهچه تولید شده	۸۹	۵۳	E/D ۶۱/۴	۶۸/۸	۱/۱۸ n.s

عدم وجود تفاوت معنی‌دار n.s

جدول ۳ - مقایسه ژنوتیپ‌های جوزراعی 23216 و 23176 در تلاقی با بلبوسوم ژنوتیپ PB1 از نظر درصد تشکیل بذر، درصد تشکیل جنین، درصد جوانه‌زنی جنین و درصد تولید گیاهچه

مراحل تولیدگیاهچه	تعداد		درصد		آزمون مربع‌کای (χ^2)
	23216xPB1	23176xPB1	23216xBP1	23176xPB1	
A. گلچه گرده‌افشانی شده	۸۰	۱۰۲	-	-	-
B. بذر تشکیل شده	۳۸	۶۹	B/A ۴۷/۵	۶۷/۶	۷/۵۱**
C. بذر دارای جنین	۸	۳۰	C/B ۲۱/۱	۳۴/۵	۵/۳۹*
D. جنین جوانه‌زده	۲	۸	D/C ۲۵	۲۶/۷	۰/۰۱ n.s
E. گیاهچه تولیدشده	۱	۵	E/D ۵۰	۶۲/۵	۰/۱ n.s

معنی‌دار در سطح ۱٪** معنی‌دار در سطح ۵٪* عدم وجود تفاوت معنی‌دار n.s

مقایسه ژنوتیپ‌های بلبوسوم دیپلوئید و تتراپلوئید در تلاقی با جو زراعی در جدول ۴ نشان داده شده است. بطوری که ملاحظه می‌شود درصد تشکیل بذر در ژنوتیپ‌های بلبوسوم دیپلوئید و تتراپلوئید در تلاقی با جو زراعی به ترتیب ۵۸/۸٪ و ۵۸/۴٪ می‌باشد که از نظر آماری تفاوت معنی‌دار نیست و قبلاً نیز توسط کاشا و کائو (۱۲) مشابه بودن درصد تشکیل بذر در تلاقی جو زراعی دیپلوئید و بلبوسوم تتراپلوئید با تلاقی جو زراعی دیپلوئید و بلبوسوم دیپلوئید به عنوان یکی از دلایل رد نظریه پارتنوجنسیس و ارائه نظریه حذف کروموزومی مطرح شده بود. درصد تشکیل جنین در ژنوتیپ‌های بلبوسوم دیپلوئید و تتراپلوئید در تلاقی با جو زراعی به ترتیب ۳۵/۵٪ و ۷۱/۸٪ بود که از نظر آماری تفاوت بسیار معنی‌داری در سطح ۰/۱٪ نشان دادند و بطور وضوح بلبوسوم‌های تتراپلوئید درصد تشکیل جنین بیشتری نسبت به بلبوسوم دیپلوئید دارا بودند که دلیل آن را می‌توان وجود سطح بالای پلوئیدی و جنین‌های نسبتاً

جدول ۴ - مقایسه ژنوتیپ‌های *H. bulbosum* دیپلوئید (۲x) و تتراپلوئید (۴x) در تلاقی با جو زراعی از نظر درصد تشکیل بذر، درصد تشکیل جنین، درصد جوانه‌زنی جنین و درصد تولید گیاهچه

مراحل تولید گیاهچه	تعداد		درصد		آزمون مربع‌کای ($\chi 2$)
	H.bulbosum(2x)	*H.bulbosum*(4x)	*H.bulbosum*(2x)	*H.bulbosum*(4x)	
A. گلچه گرده‌افشانی شده	۱۸۲	۷۸۴			
B. بذر تشکیل شده	۱۰۷	۴۵۸	$^{B}/A$ ۵۸/۸	۵۸/۴	۰/۰۰۸$^{n.s}$
C. بذر دارای جنین	۳۸	۳۲۹	$^{C}/B$ ۳۵/۵	۷۱/۸	۵۰/۲۶***
D. جنین جوانه‌زده	۱۰	۲۲۲	$^{D}/C$ ۲۶/۳	۶۷/۵	۲۴/۸***

*** معنی‌دار در سطح ۰/۱٪ n.s عدم وجود تفاوت معنی‌دار

تکامل یافته در تلاقی جو زراعی با بلبوسوم‌های تتراپلوئید دانست در حالی که جنین‌های حاصل از تلاقی جو زراعی بابلبوسوم دیپلوئید، هاپلوئید و اغلب تکامل نیافته بودند. درصد جوانه‌زنی جنین در بلبوسوم‌های دیپلوئید و تتراپلوئید در تلاقی با جو زراعی به ترتیب ۲۶/۳٪ و ۶۷/۵٪ مشاهده گردید که تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۱٪ نشان دادند که علت آن را نیز می‌توان همان تکامل یافته‌تر بودن جنین‌ها در تلاقی با بلبوسوم‌های تتراپلوئید دانست.

نتایج حاصل از بررسی‌های سیتولوژیکی نشان داد که نتاج حاصل از تلاقی *H.vulgare*(2x) × *H.bulbosum*(4x) هیبرید تریپلوئید بوده و دارای ۳x=۲۱ کروموزوم بودند در حالی که نتاج حاصل از تلاقی *H.vulgare*(2x)×*H.bulbosum*(2x) در گیاهچه‌های بررسی شده هاپلوئید بوده و دارای x=۷ کروموزوم بودند که نتایج حاصل با گزارشات قبلی توسط کائو و کاشا (۱۱)، کاشا و کائو (۱۲)، کاشا و ساداسی‌وایا (۱۳) و لانگ (۱۶) مطابقت دارد.

با توجه به نتایج حاضر بلبوسوم PB1 بخوبی می‌تواند برای تولید هاپلوئید در برنامه‌های به‌نژادی جو در داخل کشور مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات آقایان دکتر سیدیعقوب صادقیان مطهر، دکتر ناصر خدابنده، دکتر محمدرضا قنادها، دکتر اسلام مجیدی، مهندس فرشاد بختیار، مهندس محسن آقایی‌زاده، احمد ادیبیان، مهندس داریوش داودی و کلیه عزیزانی که در انجام این تحقیق ما را یاری فرموده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

مراجع مورد استفاده REFERENCES

۱ - آراسته، ن. ۱۳۷۰. تکنولوژی غلات، انتشارات آستان قدس رضوی.

۲ - بزرگی‌پور، ر. ۱۳۷۳. استفاده از روش اصلاحی هاپلوئیدی در غلات، مقاله کلیدی، سومین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات، تبریز، شهریور.

۳ - خدابنده، ن. ۱۳۷۴. غلات، انتشارات دانشگاه تهران.

۴ - عنایتی شریعت‌پناهی، م. ۱۳۷۶. بررسی دورگ‌گیری بین گونه‌ای (*Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L.) به منظور تولید

هاپلوئید و هیبرید، پایان‌نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

۵- مامقانی، ر. ۱۳۷۵. تلاقی بین گونه‌ای در گیاهان زراعی، چکیده مقالات چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان، شهریور ۱۳۷۵.

6- Arabi, M. L., A. Sarrafi, J. Barrault & L. Albertini. 1991. The influence of parental genotype and period of pollination on haploid barley production in *Hordeum vulgare* L. x *H. bulbosum* L. crosses. Cereal, Research, Communications. 19(4): 405-412.

7- Bozorgipour, R.. 1990. The use of *in vitro* techniques for crop improvement in cereal. Ph.D. Thesis. The University of Cambridge.

8- Bozorgipour, R. & J. W. Snape, 1991. The assessment of *in vitro* characters and their influence on the success rates of doubled haploid production in barley. Euphytica. 58: 137-144.

9- Davies, D. R., 1958. Male parthenogenesis in barley. Heredity. 12: 493-498.

10- Furusho, M. & T. Yoshida, 1992. Agronomic performance and malting quality of doubled haploid barley lines developed by the bulbosum method. Japanese-Journal- of-Breeding. 42(3): 631-639.

11- Kao, K.N. & K.J. Kasha, 1969. Haploidy from interspecific crosses with tetraploid barley. In: Barley Genetic II (Ed: R.A. Nilan) Proc. 2th. Inter. Barley Gent. Symp. Washington State University Press: 82-89.

12- Kasha, K.J. & K.N. Kao, 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) Nature. 225: 874-876.

13- Kasha, K.J. & R.S. Sadasivaiah, 1971. Genome relationships between *Hordeum vulgare* L. and *Hordeum bulbosum* L. Chromosoma. 35: 264-287.

14- Kraic, J., 1991. The influence of maternal genotype on haploid barley production by *Hordeum bulbosum* method. Sbornik-Uvtiz-Genetika-A-Slechteni. 27(2-3): 81-86.

15- Kuckuck, H., 1934. Artkreuzungen bei gerste. Derzüchter 6: 270-273.

16- Lange, W., 1971. Crosses between *Hordeum vulgare* L. and *H. bulbosum*. 1. Production, morphology and meiosis of hybrids, haploids and dihaploid. Euphytica. 20: 14-29.

17- Lange, W. & G. Jochemsen, 1975. The offspring of diploid, triploid and tetraploid hybrids between *Hordeum vulgare* and *H. bulbosum*. In: Barley Genetics III Proc. Third Int. Barley Gent. Symp. Garching, 1975: 252-259.

18- Pickering, R.A., 1983. The assessment of variation in two populations of *Hordeum bulbosum* L. for improving success rates in a doubled haploid barley programme. Euphytica. 32(3): 903-910.

19- Pickering, R.A., 1983. The influence of genotype on doubled haploid barley production. Euphytica. 32: 863-876.

20- Snape, J.W., 1982. The uses of doubled haploids in plant breeding. In: Induced variability in plant breeding. Center for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen, The Netherlands, 52-58.

21- Snape, J.W., 1987. The utilization of doubled haploid lines in quantitative genetics. Bull. Soc. bot. Fr. 133, Actualites Bot. 59-66.

22- Xu, Jie & J.W. Snape, 1988. Crossabilities of barley varieties with diploid and tetraploid clones of *Hordeum bulbosum*. Barley- Genetics- Newsletter. Vol. 17: 40-43.

Evaluation of Interspecific Hybridization (*Hordeum vulgare* L. × *H. bulbosum* L.) for Production of Haploids and Hybrids

M. ENAYATI SHARIAT-PANAHEI AND R. BOZORGIPOUR

Researcher of Seed and Plant Improvement Institute Karaj Iran.

Accepted 23 Dec. 1998

SUMMARY

This research was carried out to evaluate Iranian Hordeum bulbosum genotypes for haploid production in barley in comparison with PB1 genotype (as control). F3 plants from crosses between the spring barley cultivars Trompilo × C.C.89 (23216) and C.C. 89× Eneldo"s" (23176) were used as female parents and four H. bulbosum genotypes: 1180, 76063, TN-2-173 and PB1 were used as male parents. During the experiment the following four parameters were studied. These include percentage of seed setting, embryos excised, embryos germinated and plantlets produced. Comparisons among the bulbosum genotypes and the barley genotypes for above parameters were made using chi-square test. Cytological studies showed that the bulblosum genotypes 1180, 76063 and TN-2-173 were all tetraploid (2n=4x=28). The progenies of interspecific hybridization between diploid Hordeum vulgare and tetraploid H. bulbosum were all triploid (3x=21) while the progenies of interspecific hybridization between diploid H. vulgare and diploid H. bulbosum were haploids (n=x=7). Statistical studies showed that tetraploid H. bulbosum genotypes 1180, 76063 and TN-2-173 differed significantly in seed setting (%) in crosses with barley. There was not any significant difference between the two barley genotypes 23216 and 23176 in crosses with tetraploid bulbosum but there was significant difference between the barley genotypes in seed setting (%) and embryos excised (%) in crosses with diploid H. bulbosum genotype PB1. Therefore it is concluded that the studied Iranian H. bulbosum genotypes are not suitable for haploid production in barley. Meanwhile, H. bulbosum genotype PB1 can be successfully used for barley haploid breeding programs in our country.

Keywords: Interspecific Hybridization , Haploid & Hybrid.