اثر محیطهای کشت مختلف بر جنین زائی و تشکیل گیاهان هاپلوئید ازمیکروسپورهای گیاه جو

(Hordeum vulgare L.).

رحیم هنرنژاد

استادیار دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

تاریخ وصول دوم شهریورماه ۱۳۷۱

چکیده

دراین بررسی ها اثر چهار گروه محیط کشت (مراجعه شود به جدول ۱) بر چگونگی تشکیل جنین و تولید گیاهان هاپلوئید و دی هاپلوئید از میکروسپورهای سه هیبرید نسل اول جو مورد مطالعه قرار گرفت. بین محیطهای کشت از نظر تاثیر بر میزان جنین زائی و تشکیل گیاهان سبز تفاوتهای معنی داری ملاحظه گردید. بیشترین تفاوت معنی دار از نظر واکنش به محیطهای مختلف کشت بین ژنوتیپ ها مشاهده شد. اثرات متقابل بین ژنوتیپ ها و محیطهای کشت نیز از نظر آماری قابل ملاحظه بود. در گروه اول (جدول ۱) بیشترین گیاهان تشکیل شده توسط میکروسپورهای ژنوتیپ b_2 (TR 484/FR 926) و در محیط کشت حاوی یك میلی گرم سیتوکنین و ۳۰۰ گرم فیکول در لیتر مشاهده شد. در گروه دوم بیشترین گیاهان توسط ژنوتیپ فوق الذکر و در محیط کشت حاوی ۶۰ گرم قندمالتوز و ۳۰۰ گرم فیکول در لیتر و همچنین ۳۰ گرم قند مالتوز و ۴۰۰ گرم فیکول در لیتر بدست آمد. واکنش ژنوتیپها نسبت به محیط کشت گروه سوم (۲ میلی گرم در لیتر سیتو کنین و مقادیر مختلف ساکارز، ۲۰۰ تا ۴۰۰ گرم در لیتر فیکول) چندان مناسب نبود و در گروه چهارم محیطهای کشت (۱۰ گرم درلیتر نشاسته و ۲/۵ تا ۵/۰ میلی گرم در لیتر AOA که یك ترکیب ممانعت کننده از تشکیل اتیلن توسط کالوسها میباشد) گیاهی تشکیل نگردید.

مقدمه

تفکیك ژنتیکی در نتاج گیاهان ناخالص را میتوان از طریق تهیه نتاج هاپلوئید و دو برابر کردن تعداد کروموزومهای آنها متوقف و بلافاصله گیاهان ۱۰۰ درصد خالص بدست آورد (۲۱و۲۳). این تکنیك با کشت بساك [1] حاوی دانه های گرده نارس در یك محیط کشت مصنوعی امکان پذیر میباشد. گیاهان هاپلوئید را که حاوی فقط نیمی از مجموعه کروموزومی میباشند میتوان از طریق کشت بساك ها و ریزهاگها [2] که در وضعیت رسیدگی خاصی هستند بدست آورد. از این طریق میتوان در اصلاح نباتات کاربردی درگیاهان خود بارور زمان تهیه یك واریته را به میزان زیادی کوتاه نمود (۷ و۹). علاوه برآن با این روش درتحقیقات بنیادی اصلاح نباتات بررسی چگونگی وابستگی ژنها [3]

1- Anther culture 2- Microspore 3- Linkage

اثرات پلایوتروپی[1] و نحوه وراثت صفات کمی فراهم گردیده (۱و۲) و یافتن گیاهان مقاوم به بیماریها و متحمل به شرایط نامساعد محیطی تسهیل می‌گردد (۸، ۲۵ و۲۸).

چنین روشی در مورد بعضی از گیاهان از جمله جو (۳ و۱۰)، گندم (۴و۱۳)، منداب (۱۱)، برنج (۱۴)، کلم (۲۰)، توتون (۲۶)، سیب زمینی (۲۷) و باقلا(۱۶) با موفقیت بکارگرفته شده است.

هم اکنون با کشف این واقعیت که از تلاقی بین گونه‌ای جو وحشی (Hordeum bulbosum) و جو زراعی (Hordeum vulgare) می‌توان به میزان زیادی نتاج هاپلوئید تهیه نمود (۱۲، ۱۵، ۱۹ و ۲۲) روشی بنام "بولبوزوم"[2] برای اصلاح جو بوجود آمده است. اعمال این روش به این اصل استوار است که پس از تلقیح تخمکهای جو زراعی با دانه های گرده جو وحشی از جنین های تشکیل شده کروموزومهای جوی وحشی حذف می‌گردند.

با لاترین موفقیتی که تا سال ۱۹۷۶ حاصل گردیده بود، حدود ۲۳ گیاه دیپلوئید از ۱۰۰ گلچه بوده است (۱۲).

امکان بدست آوردن گیاهان هاپلوئید جواز کشت بساك برای اولین بار توسط فروغی ور و همکاران (۶)، گزارش گردید. پس از آن آزمایشات متعددی نشان دادندکه همچون سایر گیاهان خانواده غلات بطورمتوسط از ۱۰۰ بساك کشت شده حدود ۲ گیاه جو قابل تهیه می‌باشد که آنها نیز به علت فقدان کلروفیل قابلیت حیات ندارند. به طوری که نهایتا " تعداد گیاهان جوی حاوی سبزینه به ۲ تا ۴ گیاه بازاء ۱۰۰۰ بساك تقلیل می‌یابد. درمقابل معدود بودن تعداد گیاهانی که علیرغم تلاش زیاد درکشت بساك جو بدست می‌آید امتیاز بزرگ گیاه جو تمایل زیاد این گیاه به دو برابر نمودن خودبخودی کروموزومهایش می‌باشد به طوری که معمولا " ۶۰ تا ۷۰ درصد گیاهان حاصله دیپلوئید و خالص می‌باشند. در صورتی که بتوان برای کشت بساك گیاه جو شرایط مناسبتری را فراهم نمود و همچنین روش موثری برای افزایش آمادگی بساکها برای کشت ابداع کرد، می‌توان امیدوار بود که نتیجه نهائی بهتر از اعمال روش بولبوزوم بوده باشد.

ازتحقیقات انجام شده در کانادا که بر روی گیاهان دیپلوئید حاصله از روش بولبوزوم در مقایسه با لاین های خالص حاصله از روشهای معمول اصلاح نباتات صورت گرفته چنین برمی‌آید که هیچگونه تفاوتی از نظر عوامل ایجاد کننده عملکرد و همچنین ثبات در مقابل تغییرات شرایط محیطی بین آنها وجود ندارد (۱۲). گرچه گیاه جو برای تولید گیاهان هاپلوئید از طریق کشت بساك گیاه دشواری بشمار می‌رود، معذالك بررسیهای انجام شده (۱۸) نشان می‌دهد که عوامل متعددی برای شکل گیری پیش جنین[3] و کالوس[4] ازبساك جو حائز اهمیت می‌باشند. براساس این مشاهدات تفاوتهای زیادی از نظر تعداد گیاهان تشکیل شده‌از میکروسپورهای یك خوشه‌جو وجود دارد.

از سوی دیگر با لاترین تعداد تشکیل پیش جنین یا کالوس از میکروسپورهای جو در شرایط تاریکی و با وجود ماده فیکول[5] زیاد در محیط کشت حاوی 2,4-D[6] و کینتین[7] صورت گرفته است. بدین ترتیب حداکثر ۱۳ گیاه سبز از میکروسپورهای یك بساك بدست آمده

1- Pleiotropy 2- H.bulbosum method 3- Proembryo 4- Callus
5- Ficoll 6- 2,4-dichlorophenoxyacetic 7- Kinetin

است. به نظرمی‌رسد برای تشکیل جنین از بساکها و همچنین تحصیل گیاهان سبز جو وجود محیط کشت با فیکول وقند زیاد وهمچنین دسترسی جنین به هوا بترتیبی که درمحیط کشت غوطه ورنگردد حائزاهمیت می‌باشد (۱۸). دیگر بررسیها حاکی از آن است که در شکل گیری جنین گیاه جو از بساکهای کشت شده جایگزینی قند مالتوز بجای ساکارز درمحیط کشت بسیار موفقیت آمیز می‌باشد (۱۷و۱۸).

تا کنون ظهور گیاهان فاقد کلروفیل در کشت بساك گیاه جو به عنوان یك مشکل جدی تلقی گردیده است (۶)، معذالك بهبود شرایط و محیط کشت امیدواریهائی را در رابطه با افزایش تعداد گیاهان حاصله از بساك فراهم نموده است. مثلا" گزارشات(۲۴) مبنی براینکه کشت بساك جو برروی قطعه‌ای از پارچه پلی استر و با وجود نشاسته باعث تحصیل ۴۳ گیاه سبز از یکصد بساك جو گردیده به عنوان نقطه عطفی در تکنیك کشت بساك جو بشمار می‌رود. و با لاخره استفاده از فیکول که باعث افزایش غلظت محیط کشت می‌گردد ،تعداد گیاهان حاصله را به ۱۰۰ گیاه سبز از ۱۰۰ بساك کشت شده می‌رساند (۱۷).

دربررسیهای حاضر به منظور شناخت اثرات محیطهای مختلف کشت‌برمیزان جنین زائی بساکهای استحصال شده از هیبریدها و همچنین واکنش ژنوتیپی هیبریدها به محیطهای کشت مختلف مورد توجه بود تا با انتخاب بهترین محیط کشت و مناسبترین ژنوتیپ بتوان درصد تولید جنین و گیاهان هاپلوئید ودی هاپلوئید را ازبساك هیبرید نسل F_1 افزایش داد. از سوی دیگر با توجه به اینکه احتمال تاثیراتی‌از جانب محیطهای کشت برچگونگی تفکیك ۱ : ۱ جوهای دو ردیفه و شش ردیفه وهمچنین نسبت گیاهان هاپلوئید بهدی هاپلوئید می‌رفت، سعی گردید این موارد عملا" تجربه گردد، زیرا مورد اول می‌تواند برچگونگی گزینش لاینهای دی هاپلوئید درمحیطهای کشت مصنوعی تاثیرگذاشته و مورد دوم محقق را از کاربرد کولشیسین برای دو برابر کردن تعداد کروموزومهای گیاهان هاپلوئید بی نیازسازد.

مواد و روشها

با توجه به اینکه سلولها و بافتهای گیاهی بر حسب نوع و ترکیبات موجود درمحیط کشت واکنشهای متفاوتی از خود نشان می‌دهند، لذا دراین بررسیها اثرات هورمونهای رشد، موادی از قبیل قند مالتوز، فیکول و نشاسته به شرح جدول ۱ برچگونگی تشکیل کالوس و پیش جنین از میکروسپورهای جو وهمچنین تفکیك و تفرق صفات هیبریدهای نسل اول (F_1) مورد مطالعه قرارگرفت.

بساکها ازهیبریدهای نسل اول گیاه جو[1] به شرح زیرتحصیل گردیدند که حاصل تلاقی بین جوهای دوردیفه و مقاوم به بیماری قارچی زنگ قهوه‌ای[2] و چند ردیفه و حساس ولی با خصوصیات زراعی مطلوب بودند:

۱: TR 473/ FR 926 (b_1)

۲: TR 484/ FR 926 (b_2)

۳: TR 490/ FR 926 (b_3)

برای کشت بساك گیاه جو به منظور تولیدگیاهان هاپلوئید به ترتیب زیرعمل گردید:

- انتقال حدود ۲۴ بساك از هر خوشه به ظروف پتری حاوی محیطهای کشت مختلف (جدول ۲) و نگهداری

1- Hordeum vulgare

2- Puccinia hordei

نمونه‌ها به مدت ۳۰ تا ۴۰ روز در حرارت ۲۰ درجه سانتیگراد و در تاریکی.

- انتقال کالوس و پیش جنینهای تشکیل شده به‌محیط کشت حاوی نشاسته (جدول ۲، a_{10} ، a_{12}) و نگهداری آنها در شرایط ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ لوکس به‌مدت تقریبا" ۳۰ روز.
- انتقال گیاهان باززائی شده به محیط حاوی آگار (۱۸) و نگهداری آنها در حرارت ۲۰ درجه سانتیگرادودر ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ لوکس به مدت حدودا" ۱۵ روز.
- انتقال گیاهان قوی و دارای ریشه و ساقه به گلدان و نگهداری آنها در گلخانه با شرایط محیطی کنترل شده[1] با ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ساعت در روشنائی و ۱۶ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت در تاریکی، رطوبت نسبی ۷۰٪ و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس.

این گیاهان در پایان دوره رشد از نظر دو ردیفه یا چندردیفه بودن و همچنین دیپلوئید (تشکیل بذر) و یا هاپلوئید بودن (عدم تشکیل بذر) مورد ارزیابی قرار گرفته و نسبت آنها به یکدیگر محاسبه گردید.

این آزمایشات با ۴ گروه مختلف محیط کشت هریك مشتمل بر ۳ سطح (جدول ۱)، جمعا" با ۱۲ تیمار و در دو تکرار متوالی و با نمونه های مساوی در هرتیمار صورت گرفت. تکرار آزمایشات بدین ترتیب صورتگرفت که پس ازکشت بساکها و انتقال گیاهان حاصله از ۱۲ تیمار فوق الذکر به گلدانها، این آزمایشات به ترتیبی که در موردتکرار اول عمل گردیده بود، مجددا "تکرار شد.

با توجه به‌اینکه درتیمارهای a_{10} تا a_{12} (جدول ۱) گیاهی تشکیل نگردیده بود، لذا از نتایج موجود محاسبات آماری به صورت یك طرح چند عاملی[2] مشتمل بر ۹ تیمار محیط کشت (a_1 تا a_9) و ۳ ژنوتیپ (b_1 تا b_3) و با ۲ تکرار بعمل آمد تا علاوه برارزیابی اثرات محیطهای کشت و ژنوتیپهای مربوطه، امکان بررسی اثرات متقابل این عوامل بر روی یکدیگر و همچنین اثرات احتمالی تکرار آزمایشات که به صورت متوالی صورت گرفته بود، فراهم گردد. برای مقایسات میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه دانکن[3] استفاده شد.

نتایج

درجدول ۳ اثرات محیطهای‌کشت و همچنین ژنوتیپهای مختلف برچگونگی تشکیل جنین و گیاهان هاپلوئید و دی هاپلوئید از میکروسپورهای گیاه جو مندرج می‌باشد. دراین جدول گروه یك محیطهای کشت حاوی مقادیر مختلف سیتوکنین، گروه دوم حاوی مقادیر مختلف قند مالتوز و فیکول و با لاخره گروه سوم حاوی مقادیر مختلف قند مالتوز، گلوکز، ساکارز و فیکول می‌باشد (جدول ۱).

همانطورکه از جدول ۳ مشهوداست، درتکرار اول تا پایان آزمایشات فقط ۳۱ گیاه هاپلوئید و دی هاپلوئید بدست آمده، در حالیکه در تکراردوم تعداد ۱۰۰ عدد گیاه به گلدان منتقل و به رشد خود ادامه داده‌اند. بدین ترتیب تکرار دوم نسبت به تکرار اول افزایشی به میزان ۳/۲ برابر را نشان می‌دهد. این امر می‌تواند به علت تفاوتهائی بوده باشد که بساکهای تحصیل شده از خوشه‌های یك ژنوتیپ، دروضعیتهای مختلف رسیدگی نسبت به محیطهای کشت نشان می‌دهند (۱۸).

1- Phytotron 2- Factorial design 3-Duncan multiple range test

جدول ۱ـ محیطهای کشت حاوی مواد مختلف جهت جنین زائی و تشکیل گیاهان هاپلوئید

گروه	تیمار	مواد	مقدار
یك	a_1	زاتین	۰/۲۵ میلی گرم / لیتر
		فیکول ۳۰۰	۳۰۰ گرم / لیتر
	a_2	زاتین	۱ میلی گرم / لیتر
		فیکول ۳۰۰	۳۰۰ گرم / لیتر
	a_3	زاتین	۲/۵ میلی گرم / لیتر
		فیکول ۳۰۰	۳۰۰ گرم / لیتر
دو	a_4	مالتوز	۹۰ گرم / لیتر
		فیکول ۳۰۰	۲۰۰ گرم / لیتر
	a_5	مالتوز	۶۰ " "
		فیکول ۳۰۰	۳۰۰ " "
	a_6	مالتوز	۳۰ " "
		فیکول ۳۰۰	۴۰۰ " "
	a_7	گلوکز	۳/۷۵ " "
		ساکارز	۴۲/۵ " "
		فیکول ۳۰۰	۴۰۰ " "
سه	a_8	مالتوز	۹۰ " "
		فیکول ۳۰۰	۲۰۰ " "
	a_9	ساکارز	۹۰ " "
		فیکول ۳۰۰	۲۰۰ " "
چهار	a_{10}	نشاسته محلول	۱۰ " "
		اسید امینوکسیاستیك[1] (AOA)	۰ میلی گرم / لیتر
	a_{11}	نشاسته محلول	۱۰ گرم / لیتر
		اسید امینوکسیاستیك (AOA)	۲/۵ میلی گرم / لیتر
	a_{12}	نشاسته محلول	۱۰ گرم / لیتر
		اسیدامینوکسیاستیك (AOA)	۵ میلی گرم / لیتر

۱ـ این ترکیب از تولید اتیلن توسط کالوسها ممانعت بعمل آورده ودر نتیجه از کهنه شدن و پیری زودرس آنها جلوگیری می‌نماید.

جدول ۲ـ محیط غذائی برای بساکهای جو

الف : مواد عمومی برای کلیه محیطهای کشت(۱۸) (نمکهای معدنی، ویتامینها واسیدهای آلی)

ب : ترکیب محیطهای کشت مختلف

مواد	مقدار	محیطهای کشت											
		a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	a_6	a_7	a_8	a_9	a_{10}	a_{11}	a_{12}
IBA	mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱/۰	۱/۰	۱/۰
کینتین	"	-	-	-	۰/۵	۰/۵	۰/۵	-	-	-	-	-	-
NAA	"	-	-	-	۰/۵	۰/۵	۰/۵	-	-	-	—	-	-
زاتین	"	۰/۲۵	۱/۰	۲/۵	-	-	-	۲/۰	۲/۰	۲/۰	۱/۰	۱/۰	۱/۰
2,4-D	"	۰/۵۰	۰/۵	۰/۵	-	-	-	۰/۵	۰/۵	۰/۵	-	-	-
$KHCo_3$	"	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰
$Ca\ H_4(PO_4)_2.H_2O$	g/l	۰/۱	۰/۱	۰/۱	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginin	"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵
گلوتامین	"	۰/۱	۰/۱	۰/۱	-	-	-	-	-	-	۰/۱	۰/۱	۰/۱
KNO_3	"	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۲	۲/۲	۲/۲	۲/۲	۲/۲	۲/۲	۲/۵	۲/۵	۲/۵
گلوکز	"	۱	۱	۱	-	-	-	۳/۷۵	-	-	۱	۱	۱
مالتوز	"	۶۰	۶۰	۶۰	۹۰	۶۰	۳۰	-	۹۰	-	-	-	-
اکسی‌لوز	"	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ساکارز	"	-	-	-	-	-	-	۴۲/۵	-	۹۰	۳۰	۳۰	۳۰
فیکول ۳۰۰	"	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۴۰۰	۲۰۰	۲۰۰	-	-	-
نشاسته محلول	"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱۰	۱۰	۱۰
امینوکسیاستیک (AOA)	mg/l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۰	۲/۵	۵/۰

جدول ۳- تعداد گیاهان هاپلوئید و دی هاپلوئید حاصله از کشت بساکهای جو درمحیطهای کشت مختلف.

ژنوتیپ / گروه		b_1 TR 473/FR 926		b_2 Tr 484/FR 926		b_3 TR 490/FR 926	
		اول	دوم	اول	دوم	اول	دوم
	a_1	۰	۰	۲	۱۰	۱	۲
یک	a_2	۱	۰	۶	۱۶	۰	۵
	a_3	۰	۰	۲	۸	۰	۱
	a_4	۲	۰	۱	۳	۱	۱
دو	a_5	۱	۲	۴	۱۶	۱	۵
	a_6	۱	۲	۳	۱۹	۳	۱
	a_7	۰	۰	۰	۲	۰	۱
سه	a_8	۰	۰	۱	۶	۱	۰
	a_9	۰	۰	۰	۰	۰	۰

علاوه بر این گیاهان تعداد ۲۰ عدد گیاه فاقد کلروفیل نیز تشکیل شدند که فاقد قابلیت حیات بودند. چهارعدد از این گیاهان از ژنوتیپ b_1، ۱۳عدد از ژنوتیپ b_2 و ۳ عدد متعلق به ژنوتیپ b_3 بودند. تعداد نسبتا" کم این گیاهان آلبینوحاکی از بهبود نتایج این بررسیها درمقایسه با نتایج فروغی ور و همکاران (۶) بوده و استفاده از فیکول (۱۸) وپارچه پلی استر (۲۴) در محیط کشت می‌تواند درتحصیل گیاهان سبز بیشتر موثر بوده باشد.

نتایج تجزیه و تحلیل آماری ارقام مندرج درجدول ۳ نشان می‌دهد که بین تکرار اول و دوم آزمایشات تفاوتهای معنی داری وجود دارد که درسطح ۱٪ معنی‌داراست (جدول ۴) که به دلیل آن قبلا" پرداخته شد (۱۸).

بین محیطهای کشت مورد استفاده از نظر تاثیر بر جنین زائی میکروسپورهای جو نیز تفاوتهائی موجود است که درسطح ۵٪ معنی دار می‌باشد. بیشترین تفاوت معنی دار بین ژنوتیپها مشاهده می‌گردد که در سطح ۰/۱٪ قابل اعتمادبوده‌و با لاخره اثرات متقابل بین ژنوتیپها و محیطهای کشت مورد استفاده نیز در سطح ۵٪ معنی دار می‌باشد. با توجه به معنی دار بودن‌کلیه موارد جدول ۴ مبادرت به مقایسات میانگین تیمارها گردید که نتایج آن در جدول ۵ مندرج گردیده است.

آزمون معنی برای محیطهای کشت مختلف نشان می‌دهد که بیشترین تعداد گیاهان سبز (۴/۸۳) درتیمار-های a_5 و a_6 (۳۰ و ۶۰ گرم قند مالتوز، ۳۰۰ تا ۴۰۰

جدول ۴ـ نتایج تجزیه واریانس اثرات محیطهای کشت و ژنوتیپهای مختلف بر جنین زائی و تشکیل گیاهان هاپلوئید از میکروسپورهای جو.

منابع تغییرات	مجموع مربعات	درجات آزادی	میانگین مربعات	آزمون F
کل	۹۲۵/۲۱	۵۳	-	-
تکرار	۸۸/۱۷	۱	۸۸/۱۷	۳/۳۱**
محیط کشت	۱۷۳/۷۱	۸	۲۱/۷۱	۳/۲۷*
ژنوتیپ	۲۶۰/۵۹	۲	۱۳۰/۲۹	۱۹/۶۸***
اثرات متقابل	۳۲۰/۴۵	۱۶	۱۴/۴۰	۲/۱۷*
خطا	۱۷۲/۲۹	۲۶	۶/۶۲	-

*، ** و *** : بترتیب معنی دار در سطح ۵٪ ، ۱٪ و ۰/۱٪ .

جدول ۵ ـ میانگین تعداد گیاهان تشکیل شده در محیطهای کشت و با ژنوتیپ های مختلف

ژنوتیپ \ محیط کشت	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	a_6	a_7	a_8	a_9	میانگین ژنوتیپها
b_1	۰	۰/۵	۰	۱	۱/۵	۱/۵	۰	۰	۰	۰/۵۰
b_2	۶	۱۱	۵	۲	۱۰	۱۱	۱	۳/۵	۰	۵/۵۰
b_3	۱/۵	۲/۵	۰/۵	۱	۳	۲	۰/۵	۰/۵	۰	۱/۲۷
میانگین محیط کشت	۲/۵	۴/۶۶	۱/۸۳	۱/۳۳	۴/۸۳	۴/۸۳	۰/۵	۱/۲۳	۰	۱/۴۲

گرم درلیتر فیکول) بدست آمده که نسبت به تیمار a_4 (۹۰ گرم قندمالتوز، ۲۰۰ گرم درلیترفیکول) ارجحیت دارند. لذا دراینجا اثرات مثبت مقادیر نسبتا" زیاد فیکول به همراه قندمالتوز مشهودمی‌باشد (۱۸).

تعداد گیاهان درتیمارهای a_1 ، a_2 و a_3(۰/۲۵ تا ۲/۵ میلی‌گرم سیتوکنین و همچنین ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2, 4-D) که به ترتیب ۴/۶۶، ۲/۵ و ۱/۸۳ بود، ازنظرآماری با یکدیگر تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشته و در یك گروه قرارمی‌گیرند. بدین ترتیب اثرات افزایش مقدار سیتوکنین از ۰/۲۵ به ۲/۵ میلی گرم درلیتر بر

تشکیل جنین از میکروسپورهای جویکسان می‌باشد، ولی درمجموع اثرات مثبت این هورمونها درجنین زائی بساکهای جو با نتایج منبع شماره(۱۸) دریك راستا قرار دارد. همچنین استفاده از فیکول زیاد در محیط کشت (۱۸) و پارچه پلی استر(۲۴) به عنوان زیربستر کالوسها و جنین های تشکیل شده می‌تواند عامل مساعد-کننده شرایط محیطی تلقی گردد.

بین تیمارهای a_7، a_8 و a_9 (مقادیر مختلف قند ساکارز، مالتوز، گلوکز و فیکول) که بترتیب ۱/۳، ۰/۱ و صفر گیاه تشکیل گردیده، تفاوت معنی داری ملاحظه نمی‌گردد؛ معذالك کمترین تعداد گیاهان تشکیل شده دراین گروه از محیطهای کشت ملاحظه گردیده است. بین گروههای محیط کشت اعمال شده از نظر تاثیر بر تشکیل جنین از میکروسپورهای جو تفاوتهای قابل ملاحظه‌ای وجود دارد، بطوریکه آنها را می‌توان به شرح زیر نشان داد:

$[a_5=a_6]=[a_1=a_2=a_3] > a_4=[a_7=a_8=a_9]$

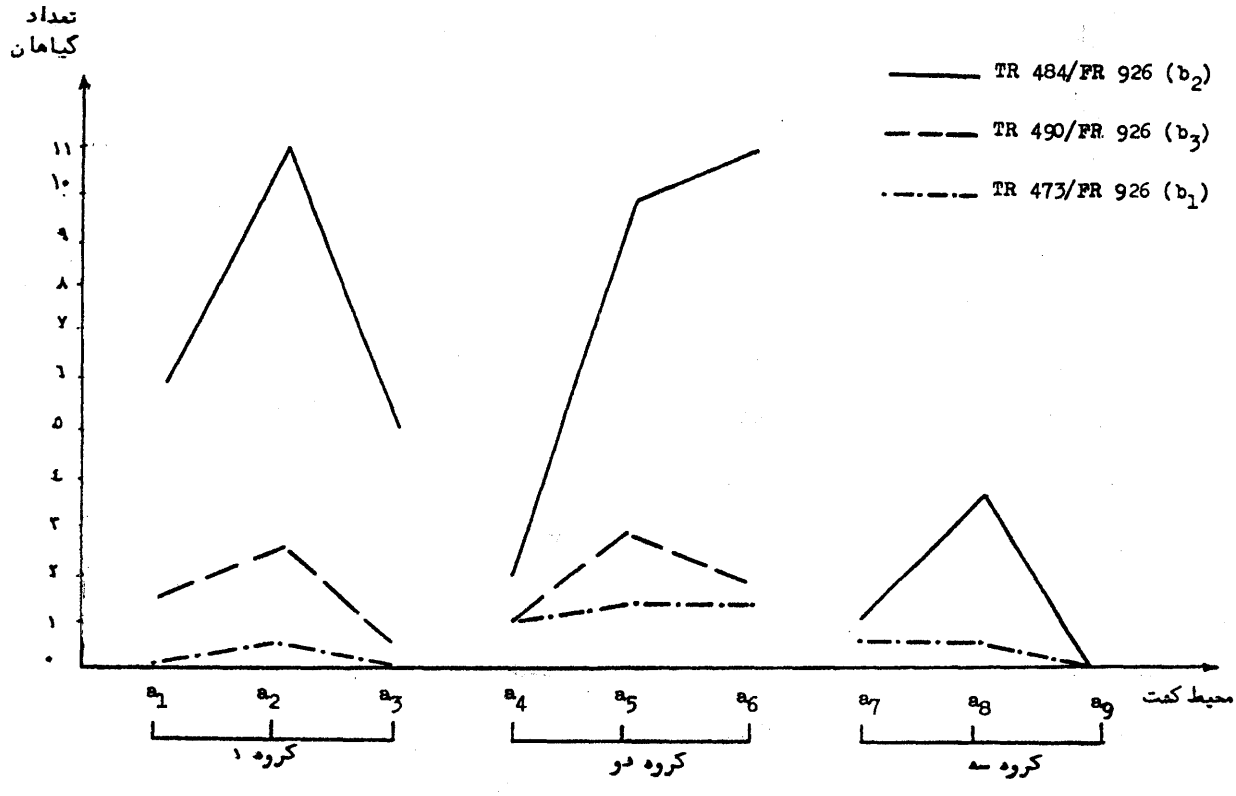
مقایسات میانگین ژنوتیپها نشان می‌دهد که b_2 با ۵/۵ گیاه در معدل بیشترین تعداد گیاهان را به خوداختصاص می‌دهد، به طوریکه تفاوت معنی داری نسبت به b_3 و b_1 مشاهده می‌گردد ولی بین b_3 و b_1 تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود ندارد که با نتایج منبع شماره(۱۸) مبنی برتفاوت بین ژنوتیپهای مختلف دریك راستا قرار دارد.

[TR 484/FR 926] > [TR 490 /FR 926= TR 473/FR 926]

درشکل ۱ اثرات متقابل ژنوتیپها ومحیطهای کشت مختلف نشان داده شده است. درگروه اول محیطهای کشت بیشترین تعداد گیاهان توسط ژنوتیپ TR 484/FR 926 ودرتیمار a_2 (۱/۰ میلی‌گرم سیتوکنین و ۳۰۰ گرم فیکول درلیتر) حاصل گردیده است، درحالیکه درگروه دوم محیطهای کشت بیشترین تعداد گیاه توسط همان ژنوتیپ ولی در تیمارهای a_5 (۶۰ گرم قند مالتوزو ۳۰۰ گرم فیکول درلیتر) و a_6 (۳۰ گرم قند مالتوز و ۴۰۰ گرم فیکول درلیتر) بدست آمده است. واکنش هیچیك از ژنوتیپها نسبت به محیطهای کشت گروم سوم چندان مساعد نبود. معذالك دراینجا نیز واکنش ژنوتیپ فوق الذکرنسبت به محیط کشت a_8 (۹۰ گرم قند مالتوز و ۲۰۰ گرم فیکول درلیتر) درمقایسه با ۲ ژنوتیپ b_1 و b_2 بهتر است.

از ۱۳۱ گیاه تولید شده از میکروسپور هیبریدهای F_1 جو تعداد ۹۰ عدد شش ردیفه و ۴۱ عدد دو ردیفه بودند که نسبت آنها معادل ۲/۲:۱/۰ می‌باشد. آزمون X_2 انجام شده نشان داد که نسبت مذکور با نسبت مورد انتظار ۱:۱ تفاوت آماری معنی‌داری دارد. این نتیجه از آن جهت می‌تواند حائزاهمیت بوده باشد، که نشان می‌دهد ظاهرا" درشرایط محیطهای کشت مصنوعی قدرت پایداری و بقاء بافتهای کالوس‌حاصله‌از میکروسپور جوهای شش ردیفه و شانس تبدیل آنها به گیاهان سبز بیش از جوهای دو ردیفه بوده و این امر موجب مغایرتهائی درنتایج مورد انتظار از ژنتیك مندلی می‌گردد. لذا کاربرد تکنیك کشت بساك دراصلاح نباتات را می‌تواند برحسب اهداف تعیین شده دچار اشکال نموده و یا تسهیلاتی را فراهم‌نماید. مثلا" نتیجه فوق الذکر، در صورتیکه اصلاحگر گزینش جوهای شش ردیفه را مدنظر داشته باشد، می‌تواند به عنوان عامل مثبتی تلقی گردد.

نسبت گیاهان دیپلوئید (دی هاپلوئید) به گیاهان هاپلوئید نیز ۱۷:۱۱۴ می‌باشد که معادل ۶/۷: ۱/۰ است. بدین ترتیب در ۸۷٪ پیش جنین ها و کالوسهای



شکل ۱ ـ اثرات متقابل ژنوتیپها و محیطهای کشت مختلف

تولیدشده ازمیکروسپورهای جو می‌بایست دو برابر شدن ناگهانی کروموزومها صورت گرفته باشد و یا حداقل جنین ها و کالوسهای دیپلوئید درمقایسه با هاپلوئیدها شانس بقای بیشتری داشته باشند. این نتیجه که با یافته‌های منبع (۵) نیز دریك راستا قرار دارد، به میزان زیادی محقق را از کاربرد کلشیسین برای تولید گیاهان دی هاپلوئید بی‌نیاز خواهد نمود.

بحث

برای تولید کالوس و پیش جنین و همچنین شکل ـ گیری گیاهان هاپلوئید و دی هاپلوئیدازمیکروسپورهای جو به نظر می‌رسد عوامل مختلفی نقش داشته باشند. همچنانکه منبع شماره (۱۸) اشاره دارد، بین میکروسپورهای یك خوشه از نظر تولید پیش جنین و گیاهان هاپلوئید تفاوت بسیاری مشاهده می‌گردد. برای مثال از بساکهای انتقال یافته یك خوشه به محیط کشت فقط آنهائی واکنش مثبت نشان می‌دهند که در یك شرایط خاص تکاملی بوده باشند. یك بساك جوان و یا یك بساك خیلی مسن به‌محیط کشت واکنشی نشان نداده‌و پس از چند هفته از بین می‌رود. بدین ترتیب به نظر می‌رسد آمادگی فیزیولوژیکی میکروسپورها برای تولید کالوس و جنین عامل بسیار مهمی درکشت بساك جو بوده باشد. معذالك با توجه به اینکه برای شناسائی این مرحله خاص علامت ظاهری قابل رویتی در خوشه وجود ندارد، می‌بایست به منظور افزایش شانس تولید گیاهان هاپلوئید تعداد نمونه ها را زیاد انتخاب نمود. تفاوتهای معنی دار بین ژنوتیپها نشان می‌دهد که آمادگی ژنوتیپها برای تولید کالوس و پیش جنین در

روی یك محیط کشت مشخص، همچنانکه منبع شماره(۱۸) نیز ذکر می‌نماید، از نظر ژنتیکی می‌تواند بسیار متفاوت باشد. با اینکه جو برای تکنیك کشت بساك گیاه نسبتا" مشکلی تلقی می‌گردد(۱۲)، معذالك می‌توان ژنوتیپهائی را یافت که به این روش بهتر واکنش نشان داده و نتایج بهتری را بدست دهند. برای مثال دراین بررسیها ژنوتیپ b_2 (TR 484/ FR 926) چنین وضعیتی را داشت.

موفقیت در کشت بساك جو به میزان زیادی به محیط کشت مورد استفاده نیز بستگی دارد. استفاده از فیکول که غلظت محیط کشت را افزایش داده و از غوطه ور شدن بساکها درمحیط کشت جلوگیری می‌نماید، برای میکروسپورها شرایط رشد بهتری‌را فراهم می‌کند. بدین ترتیب انتظار می‌رود بااستفاده از ۳۰۰ تا ۴۰۰ گرم در لیتر فیکول در یك محیط کشت حاوی سیتوکنین و یا قند مالتوز، همچنانکه منبع شماره (۱۸) نیز اشاره دارد، تولید کالوس و پیش-جنینهای جو بهتر صورت گیرد. به همین ترتیب شکل گیری گیاهان جو بر روی قطعه‌ای از پارچه پلی استر (۲۴) و درمحیط کشت جاوی نشاسته(جدول۲) که از غوطه ور شدن کالوسها و پیش جنینها در محیط غذائی وایجاد شرایط بی‌هوازی جلوگیری می‌نماید، بهتر صورت گیرد. معذالك اضافه کردن AOA به محیط کشت حاوی نشاسته (جدول ۲، a_{12}) که از تولید اتیلن توسط کالوسها و پیری و کهنه شدن زودرس آنها ممانعت می‌نماید، اثرات قابل ملاحظه‌ای نشان نمی‌دهد.

به نظر می‌رسد محیط کشت مورد استفاده بر چگونگی تفکیك (تفرق صفات) گیاهان حاصله از میکروسپورهیبریدهای نسل F_1 جو اثرات زیادی داشته باشد، که این امر از دیدگاه اصلاح نباتی و کاربردکشت بساك به منظور تسهیل در پروژه های اصلاح نباتی حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به‌اینکه دورگه‌های نسل F_1 گیاه جو برای صفاتی مانند دو ردیفه یا شش ردیفه بودن ناخالص (Aa) می‌باشند و با نسبت۱:۱ گامتهای هاپلوئید A و a تولید می‌نمایند و این گامتها دارای یك مجموعه کروموزومی می‌باشند، لذا مسئله غالبیت و مغلوبیت ژنها درچنین شرایطی مطرح نبوده‌وانتظار می‌رود که جوهای شش ردیفه و دوردیفه حاصله از میکروسپورها به نسبت ۱:۱ ظاهر شوند. معذالك عملا" این نسبت ۲/۲:۰/۱بوده و جوهای شش ردیفه با تعداد بیشتری ظاهر گردیده بودند. بنابراین چنین می‌توان نتیجه گرفت که کالوسها و پیش جنینهای حاصله‌از جوهای شش ردیفه بر روی محیط کشت مشخص شانس بقای بیشتری از کالوسها و پیش جنین‌های حاصله از جوهای دو ردیفه دارند. بدین ترتیب می‌بایست برای محیطهای کشت، از نظر نوع گیاهان حاصله‌از میکروسپورها اثرات انتخابی قائل گردید.

از ۱۳۱ گیاه جوی حاصله تعداد ۱۱۴ عدد دیپلوئید و ۱۷ عدد هاپلوئید بودند که این نسبت معادل۶/۷:۰/۱ می‌باشد. خوشبختانه به نظر می‌رسدکه میزان دو برابر شدن ناگهانی کروموزومهای گیاهان هاپلوئید حاصله از میکروسپورهای جو، زیاد بوده باشد(۵). این دیپلوئید شدن خودبخودی گیاهان نیاز به دو برابر کردن مصنوعی کروموزومهای گیاهان هاپلوئید بوسیله کولشیسین را از بین می‌برد که این امر خود به معنی صرفه جوئی دروقت و هزینه ها می‌تواند تلقی گردد. دراین بررسیها میزان دیپلوئید شدن خودبخودی گیاهان هاپلوئید جو ۸۷٪ بوده است. معذالك چنین نیز میتوان نتیجه

گرفت که کالوسها و پیش جنینهای دیپلوئید درمقایسه با هاپلوئیدها شانس بقای بیشتری دارند، بطوریکه نهایتا" تعداد دیهاپلوئیدها بیشتر می‌باشد.

اهمیت روش کشت بساکهای جو برای اصلاح نباتات کاربردی کماکان قطعی است. معذالك برای بکارگیری عملی آن در اصلاح جو می‌بایست تعداد گیاهان حاصله افزایش یابد.

REFERENCES:

1- Choo, T.M., B.R. Christie, & E.Reinbergs, 1979. Doubled haploids for estimating genetic variances and a scheme for population improvement in selfpollinating crops. Theor. Appl. Gen. 54, 267-271.

2- Choo, T.M. 1981. Doubled haploids for studying the inheritance of quanitative characters. Genetics 99, 525-540.

3- Choo, T.M., E. Reinbergs, & S.J. Park. 1982. Comparison of frequency distributions of doubled haploid and single seed descent lines in barley. Theor. Appl. Gen. 61, 215-218.

4- De Buyser, J., Y.Heng. P.Lonnet, R. Herzog, & A. Hespel. 1987. "Florin" A Dubled haploid wheat variety developed by the anther culture method. Plant Breeding 98, 53-56.

5- Fischbeck, G. 1985. Gerste. In: Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Hoffmann, W., A.Mudra und W. Plarre, Paul Parey Verlag, Berlin.

6 - Foroughi-Wehr, B., G.Mix, H.Gaul, & H.M. Wilson, 1976. Plant production from cultured anthers of Hordeum vulgare L.Z. f.Pflanzenzüchtung. 77, 198-204.

7 - Foroughi-Wehr, B.u& W. Friedt, 1984. Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant Hordeum vulgare lines by anther culture. Theor. Appl. Gen. 67, 377-382.

8-- Foroughi-Wehr, B., W.Friedt, R.Schuchmann, F.Köhler & G.Wenzel, 1986. In Vitro screening for resistance. In: Somaclonal variation and crop improvement. J.Semal, ed., Martinus Nijhoff Publ., dordrecht, pp 35-44.

9 - Foroughi-Wehr, B. & G.Wenzel, 1989. Androgenetic haploid production. IAPTC Newsletter 58, 11-18.

10- Hagberg, A. & G. Hagberg, 1980. High frequency of spontaneous haploids in the progeny of an induced mutation in barley. Hereditas 93, 341-343.

11- Hoffmann, F., E. Thomas & G.Wenzel, 1982. Anther culture as breeding tool in rape. II. Progeny analysis of androgenetic lines and of inuced mutants from haploid cultures. Theor. Appl. Gen. 61, 225-232.

12- Hoffmann, W., A. Mudra, & W.Plarre, 1985. Lehrbuch der züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen. Band 2. Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg.

13- Hu, D., Y.Tang, Z.Yuang & J.Wang, 1983. 1983. The induction of pollen sporophytes of winter wheat and the development of the new variety Jinghua#1. Scientia Agricultura Sinica 1, 29-35.

14- Huang, C.S., H.S.Tsay, C.G. Chern, C.C.Chen, C.C. Yeh & T.H. Tseng, 1988. Japonica rice breeding using anter culture. J. Agric. Res. China 37, 1-8.

15- Kao, K.N. & K.J. Kasha, 1971. Haploidy from interspecific crosses with tetraploid barley. In: Barley Genetics II. Washington State University Press, Pullman/WA, PP 82-88.

16- Kao, K.N. & M.R. Michayluk, 1975. Nutritional requirements for growth of Vicia hajastana cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta (Berlin) 126, 105-110.

17- Kao, K.N. & D.C.Horn, 1984. Induction of pollen plant formation in barley anther culture. In: International symosium on genetic manipulation in crops. Beijing/China, Oct. 22-25.

18- Kao, K.N., M. Saleem, S.Abrams, M.Pedras, D.Horn & C. Mallard, 1991. Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods. Plant Cell Rep. 9, 595-601.

19- Kasha, K.J. & E. Reinbergs. 1981. Recent development in the production and utilization of haploids in barley. Barley Genetics IV, 655-665, Edinburgh.

20- Keller, W.A., 1984. Anther culture of Brassica. In Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1. Vasil, I.K., ed., Academic Press, Orlando, PP. 302-310.

21- Nitzsche, W. & G. Wenzel. 1977. Haploids in plant breeding. Fortschr. Pflanzenzüchtg. Band 8, Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg.

22- Poehlmann,J.M. 1979. Breeding field crops.2nd ed., AVI Publ.Comp.Westport, CT.

23- Snape, J.P. & E.Simpson, 1981. The genetical expectations of doubled haploid lines derived from different filial generations. Theor. Appl. Gen. 60,123-128.

24- Sorvari, S. & O. Schieder. 1989. Influence of sucrose and melobiose on barley anther cultures in starch media. Plant Breeding 99, 164-171.

25- Uhrig, H. & G. Wenzel. 1987. Breeding for virus and nematode resistance in potato through microspore culture. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 3, Bajaj. Y.P.S., ed., Springer Verlag Berlin., pp. 346-357.

26- Wark, D.C., 1977. Doubled haploids in Australian tobacco breeding. SABRO j. 2, 19-23.

27- Wenzel, G., O.Schieder, T. Przewozny, S.K.Soplry & G. Melchers, 1979. Comparison of single cell culture derived Solanum tuberosum L. Plant and a model for their application in breeding programs. Theor. Appl. Gen. 55,49-55 .

28- Ye, J.M., K.N.Kao, B.L. Harvey & B.G.Rossnagel. 1987. Screening salttolerant barley genotypes via F1 anther culture in salt stress media. Theor. Appl. Gen. 74,426-429.

The Effect of Culture Conditions on Embryogenesis of Barley Microspores (Hordeum vulgare L.).

R. HONAR NEJAD
Assistant Professor, College of Agricultural Sciences, University of Gillan, Iran.
Received for Publication 24 August, 1992.

SUAMMARY

The application of four groups of culture media, each with three variations (Tab.1), for embryogenesis and formation of green plants from microspores of F_1 hybrid of barley (Hordeum vulgare L.) led to significant differences in plant response, in particular among genotypes. In the first group of media (high levels of Zeatin-riboside and Ficoll) highest frequency of embryo formation from microspores was observed by 1 mg/l cytokinine and 300 g/l Ficoll with genotype b_2 (TR 484/FR 926). Using the second group of media (60 g/l maltose and 300 g/l Ficoll or 30 g/l maltose and 400 g/l ficoll) resulted in the highest frequency of green plants with the same genotype. The response of genotypes to third group of culture media (2 mg/l cytokinine, different amount of maltose and sucrose, 200-400 g/l Ficoll) was not favorable and in the fourth group of media (10 g/l starch, 2.5-5.0 mg/l Aminooxyacetic*) which is an inhabitor of ethylene production by callus was no plant formation observed.

* : Acid