تأثیر ژنوتیپ و پیش تیمار سرما درکشت بساک جو

سیدقاسم حسینی‌سالکده، سیروس عبدمیشانی، پریچهره احمدیان و منصور امیدی

بترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد، استادان و مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات

دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۶/۶/۲۶

خلاصه

تأثیر پیش‌تیمار تنش حرارتی برپاسخ کشت بساک درهشت رقم جو آزمایش شد. سنبله‌ها وقتی که فاصله قاعده برگ پرچم با برگ زیر آن ۵-۲ سانتیمتر بود برداشت شدند. بامشاهده سیتولوژیکی، اکثر میکروسپورها در بساکهای گلچه‌های وسطی هرسنبله درمرحله اواسط تک هسته‌ای بودند. سنبله‌ها در ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۱ و ۲۸ روز در تاریکی پیش تیمار شدند. ۳۰ بساک از سنبلچه‌های وسطی هرسنبله بر روی یک ظرف پتری کشت شده و یک تکرار را تشکیل داد. محیط کشت کال‌زایی، LS تغییر یافته جامد شده با آگار و حاوی مالتوز وگلوتامین بود که به آن ایندول‌تری‌استیک اسید (IAA) و ۶- بنزیل آمینوپورین (BAP) هر دو به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر اضافه شدند. کالوس‌ها برای باززایی به محیط کشت مشابه با کال‌زایی منتقل گشتند. دراین محیط کشت IAA حذف شده و غلظت BAP به ۰/۴ میلی‌گرم درلیتر کاهش یافت و منبع کربن ۳۰ گرم درلیتر ساکاروز بود. اختلاف ژنوتیپ‌ها برای نسبت کالوس‌زایی، تعداد گیاه سبز و آلبینو بسیار معنی‌دار شد. اختلاف پیش تیمارهای سرما معنی‌دار نبود، اگرچه اثر متقابل بسیار معنی‌داری بین ژنوتیپ و پیش‌تیمار سرما وجود داشت. بیشترین پاسخ مربوط به رقم ایگری با میانگین ۱۴/۶۱ درصد گیاه سبز با ۲۸ روز پیش تیمار سرما بود. درحال حاضر نسبت پاسخ کشت بساک در ارقام "ایگری" و "ریحان" برای استفاده دریک برنامه اصلاحی مناسب می‌باشد.

واژه های کلیدی : جو ،کشت بساک ،کالوس و معاپلوئید

مقدمه

هم اکنون بسیاری از شرکت‌های تجاری و مؤسسه‌های دولتی درکشورهای مختلف به کار تولید و استفاده از هاپلوئیدهای مضاعف شده مشغول هستند. دوسیستم تولید هاپلوئید مضاعف شده دربرنامه‌های اصلاح جو مورد استفاده قرار می‌گیرد: سیستم هوردئوم بولبوزوم(۴) و کشت بساک(۶). از سیستم بولبوزوم درتولید چندین واریته تجارتی استفاده شده است اما کاربرد کشت بساک در اصلاح جو محدودتر است(۱۱). پاسخ و زمان لازم برای تولید هاپلوئیدهای مضاعف شده در دو روش فوق مشابه بوده اما پیشنهاد گردیده است که از هر دو سیستم استفاده شود زیرا بین ژنوتیپ و روش،اثر متقابل معنی‌داری بدست آمده است(۳). انتظار می‌رود درآینده موفقیت‌های بیشتری ازکشت بساک و یا میکروسپورهای جدا شده در مقایسه با روش بولبوزوم بدست آید. این پیش‌بینی بر پایه افزایش قابل ملاحظه‌ای است که اخیراً در تعداد گیاهان باززایی شده با تغییر در محیط کشت و شرایط کشت بدست آمده است(۱۷).

کاربرد موفقیت‌آمیز کشت بساک دراصلاح محصولات زراعی به وجود دستورالعمل قابل قبول برای کشت بستگی دارد که بتوان از آنها برای ژنوتیپ‌های مهم اقتصادی استفاده نمود. مطالعات بیوتکنولوژی بایستی با بهترین ژنوتیپ‌های موجود شروع شوند(۱). بنابراین یکی از موضوعات در بررسی‌های اخیر، پاسخ کشت بساک در انواع ژنوتیپ‌های جو و تعیین ارقامی است که توان تولید تعداد زیادی گیاه سبز از میکروسپور را دارند.

معلوم شده است که عوامل فیزیولوژیکی و محیطی همچون عوامل ژنتیکی درتولید مشتقات میکروسپور در جو مؤثر می‌باشند(۴). توصیه شده است که حتماً در برنامه‌های کشت بساک جو تنش حرارتی به صورت پیش تیماری بر روی سنبله‌ها، قبل از کشت اعمال شود(۱۰). وجود اثر متقابل بسیار معنی‌دار بین ژنوتیپ و مدت پیش تیمار سنبله‌ها با حرارت کم(۱۸) موجب ارائه نظرات متفاوتی در زمینه طول زمان پیش تیمار سرما شده است.

این آزمایش برای بررسی اثرات پیش تیمار سرما درکشت بساک ارقام مورد استفاده در برنامه‌های اصلاحی جو طرح گردید و به صورت آزمایش فاکتوریل درطرح پایه کاملاً تصادفی اجرا شده‌است.

مواد و روشها

پنجه‌های ۸ رقم جو ریحان، ایگری، کارون، والفجر، کویر، دسنادناوارو، بینام و زرجو از بلوکهای تلاقی مؤسسه اصلاح بذر کرج برداشت شدند. از هربوته ۴-۳ پنجه اول آن (پنجه اصلی) انتخاب شدند.

برای کشت بساک‌های ارقام مذکور ازمحیط کشت LS تغییر یافته(۱۲) استفاده شد. این محیط حاوی مالتوز به میزان ۶۳ گرم درلیتر به عنوان ماده اسمزی و تنها منبع قند، گلوتامین به عنوان منبعی برای نیتروژن، هورمونهای سیتوکنین BAP (۶ - بنزیل آمینوپورین) و اکسین IAA (ایندول - ۳- استیک‌اسید) هر دو به میزان ۱ میلی‌گرم درلیتر بود. دراین آزمایش برای صرفه‌جویی در هزینه به جای آگاروز از آگار به میزان ۷ گرم در لیتر به عنوان عامل ژلاتینی کننده استفاده شد(جدول ۱).

محیط کشت باززایی همان LS تغییر یافته بود با این تفاوت که IAA حذف و مقدار BAP به ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافته(۱۱) و همچنین ساکاروز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر جایگزین مالتوز شد.

وقتی که سنبله‌های درحال رشد حاوی میکروسپورهایی در مرحله اوایل تا اواسط تک هسته‌ای بودند ساقه‌ها برداشت شدند. در اکثر ژنوتیپ‌ها این مرحله زمانی است که نوک سنبله‌های درحال رشد زیر نقطه‌ای قرار گرفته که غلاف برگ پرچم به آن متصل شده است. دراین مرحله به طور معمول فاصله لیگول برگ پرچم تا لیگول برگ زیر آن ۵-۲ سانتیمتر است. مرحله دقیق مرفولوژیکی از طریق بررسی‌های میکروسکوپی تعیین شد. بدین منظور بساک‌ها از گلچه‌های وسطی سنبله انتخاب و پس از له کردن آنها روی لام با استوکارمن رنگ‌آمیزی شده و سلولهای میکروسپور در زیر میکروسکوپ نوری بررسی و مرحله دقیق تکاملی تعیین گردید. پنجه‌هایی که حاوی بساک در مرحله مناسب بودند به آرامی در اتانول ۷۰% فرو برده شدند. در محیط استریل اجازه داده شد که اتانول تبخیر گردد. سپس سنبله‌ها از پنجه‌ها بیرون آورده و ریشکها حذف شدند.سنبله‌هادریک‌نیمه از ظرف پتری قرارداده شدندودرنیمه دیگر

جدول ۱ - ترکیب محیط کشت LS تغییر یافته

اجزاء	غلظت در محیط کشت بر حسب میلی گرم در لیتر
نمک های ماکرو	
KNO3	۱۹۰۰
NH4NO3	۱۶۵
KH2PO4	۱۷۰
CaCl2,2H2O	۴۴۰
MgSO4,7H2O	۳۷۰
FeNaEDTA	۴۰
نمک های میکرو	
KI	۰/۸۳
MnSO4,4H2O	۲۲/۳
ZnSO4,7H2O	۸/۶
H3BO3	۶/۲۲
CoCL2,6H2O	۰/۰۳
CuSO4,5H2O	۰/۰۳
مواد کمکی ، ویتامینها و اسید آمینه	
میو-اینوزیتول	۱۰۰
تیامین HCL	۰/۴
گلوتامین	۷۳۰
هورمونهای رشد	
IAA	۱
BAP	۱
قند و عامل ژلاتینی کننده	
مالتوز	۶۳۰۰۰
آگار	۷۰۰۰
PH(NaOH)	۵/۶

آن یک قطعه کاغذ صافی که کاملاً با آب مقطر استریل شده مرطوب گشته بود قرار داده شد. پتری‌ها با پارافیلم بسته و با ورق آلومینیومی پیچیده شدند تا سنبله‌ها تحت تأثیر نور قرار نگیرند. سنبله‌ها به مدت ۲۱ و ۲۸ روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از پیش تیمار سرما، سنبله‌ها با کلراکس تجارتی ۲۰ درصد ضدعفونی شده و سپس با استفاده از پنس و به آرامی بساک‌هابه همراه میله بساک از سنبلچه‌های وسطی جدا شدند.

۳۰ بساک از هر سنبله بدون درنظر گرفتن جهت، در ظروف پتری (با قطر ۷۰ میلی‌متر) کشت گردیدند. سپس پتریها با پارافیلم بسته و در ۲۶ درجه سانتیگراد در تاریکی نگهداری شدند. پس از سه هفته بساک‌ها شروع به تولید کالوس و جنین نمودند(شکل ۱). پتریها به مدت ۴ هفته به فاصله هرسه روز مورد بررسی قرار گرفته و کالوس‌های تولیدشده به محیط باززایی منتقل شدند و در ۲۶ درجه سانتیگراد در شرایط ۱۶ ساعت نور نگهداری گردیدند(شکل ۲). سپس گیاهان آلبینو شمارش و حذف شده و گیاهان سبز به لوله‌های آزمایش و ارلن‌های محتوی محیط کشت باززایی انتقال یافتند. داده‌ها به صورت زیر جمع‌آوری شدند:

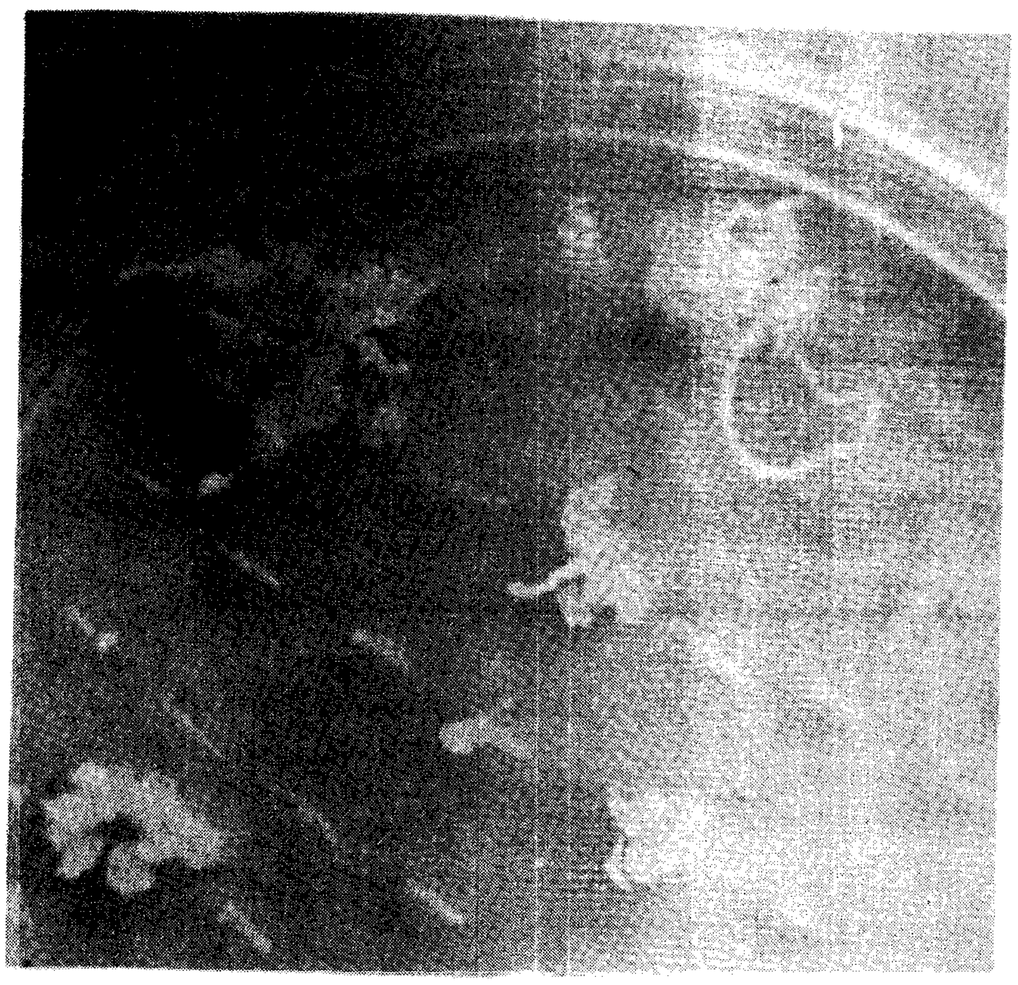
الف) درصد تولید کالوس از طریق تقسیم تعداد بساک‌هایی که تولید کالوس و جنین کرده‌اند بر تعداد بساک‌های کشت شده محاسبه گردید.

ب) درصد گیاهان سبز و آلبینو باززایی شده از طریق تقسیم تعداد گیاهان سبز و آلبینو باززایی شده به تعداد بساک‌های کشت شده محاسبه شد.

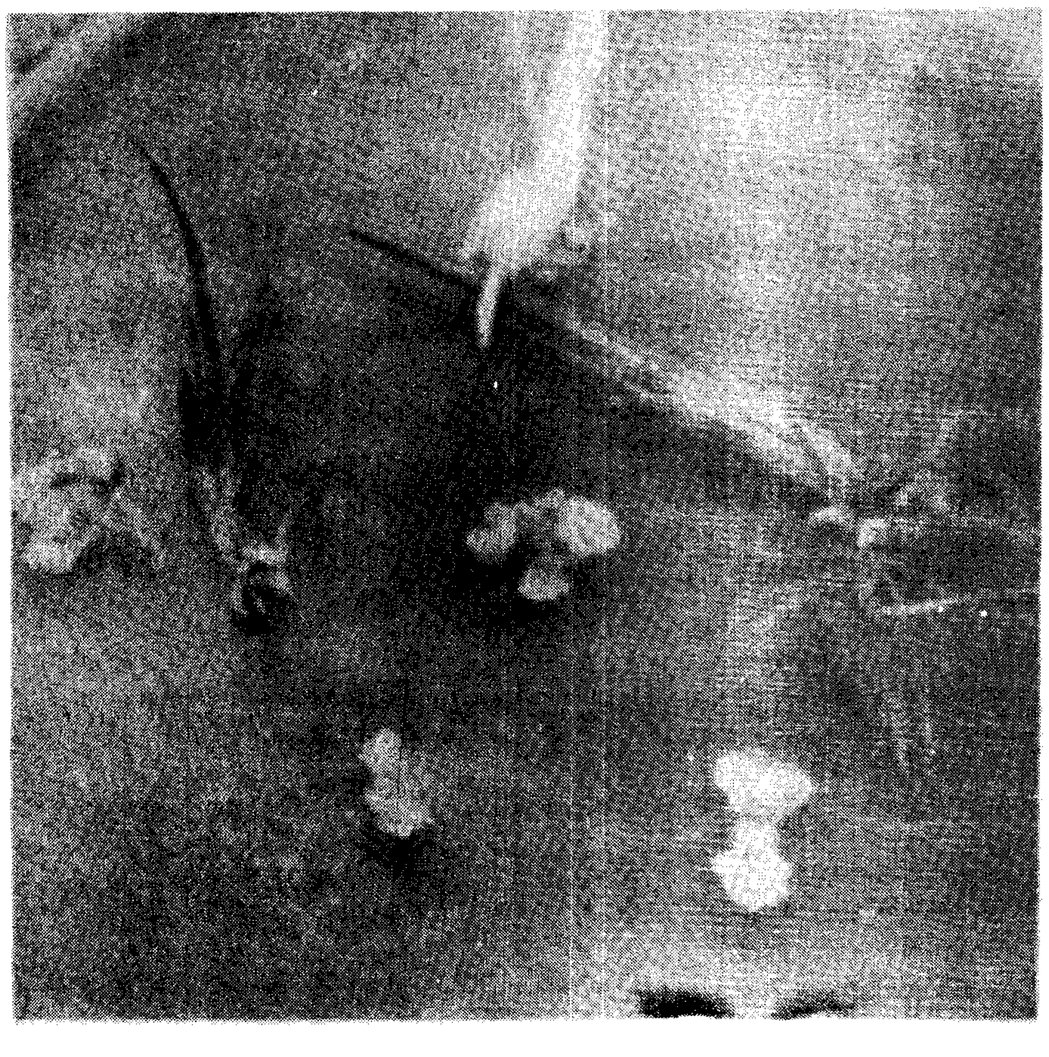
داده‌ها پس از تبدیل زاویه‌ای به صورت آزمایش فاکتوریل در طرح پایه کاملاً تصادفی تجزیه شدند(۲).

نتایج و بحث

سه هفته پس از کشت، تولید کالوس شروع شد. باتوجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) اثر ژنوتیپ بسیار معنی‌دار می‌باشد و دراین میان رقم ایگری و پس از آن رقم ریحان بیشترین درصد کالوس زایی را داشته‌اند. دراین محیط تأثیر ژنوتیپ بسیار معنی‌دار دیده شده است که باگزارشات فراوانی که در مورد تنوع در پاسخ بساک دربین واریته‌ها ارائه شده است مطابقت دارد(۶، ۹، ۱۸ و ۲۰). باتوجه به جدول تجزیه واریانس اثر پیش تیمار سرما معنی‌دار نمی‌باشد و این مورد باگزارشات ارائه شده مطابقت ندارد(۵ و ۱۸). این حالت را می‌توان به تعداد کم سطوح پیش تیمار سرما نسبت داد به نحوی که اثر متفاوت پیش تیمار سرما در ژنوتیپ‌های مختلف موجب کاهش متفاوت میانگین مجموع مربعات و در نتیجه واریانس پیش



شکل ۱ - بساک های کشت شده وکالوس های رقم ریحان در محیط کشت کالزایی پس از ۴ هفته



شکل ۲ - کالوس های انتقال یافته رقم دیگری به محیط کشت باززایی ، گیاهچه بالایی آلبینو می باشد. همچنین دو گیاهچه سبز، دوکالوس در حال باززایی ودو کالوس تمایز نیافته در تصویر دیده می شوند.

جدول ۲ ـ تجزیه واریانس درصد کالوس، گیاهچه آلبینو، و گیاهچه سبز حاصل از بساک در هشت ژنوتیپ جو و دو سطح پیش‌تیمار سرما در ۴ درجه سانتی‌گراد

منبع تغییر	درجه آزادی	صفت					
		درصد کالوس		درصد گیاهچه آلبینو		درصد گیاهچه سبز	
		میانگین مربعات	مقدار F	میانگین مربعات	مقدار F	میانگین مربعات	مقدار F
ژنوتیپ	۷	۱۴۴۷/۰۵۰	۶۵/۲۳۵***	۲۸۰/۷۹۵	۳۳/۸۱۰***	۲۱۱/۵۱۳	۵۱/۵۳۲***
پیش‌تیمار سرما	۱	۱۶/۸۸۰	۰/۷۶۱ns	۰/۰۵۶	۰/۰۰۷ns	۱/۰۰۲	۰/۲۴۴ns
ژنوتیپ×پیش‌تیمار سرما	۷	۹۳/۳۲۴	۴/۲۰۷۲***	۲۵/۹۹۶	۳/۱۳۰**	۲۳/۰۲۹	۵/۶۱۱***
اشتباه	۱۷۶	۲۲/۱۸۲		۸/۳۰۵		۴/۱۰۴	

** مقدار F در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار است.

*** مقدار F در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار است.

ns مقدار F معنی‌دار نیست.

تیمار سرما شده است و وجود اثر متقابل بسیار معنی‌دار نشاندهنده اثرات متفاوت پیش تیمار سرما در ژنوتیپ‌های متفاوت است.

رقم ایگری با ۲۸ روز پیش تیمار سرما و میانگین ۴۳/۷۷ بیشترین درصد تولید کالوس را دارد پس از آن ایگری با ۲۱ روز و میانگین ۳۲/۶۸ و سپس ریحان با ۲۱ روز و میانگین ۲۲/۴۱ بیشترین درصد کالوس را تولید کرده‌اند(جدول ۳).

برخی از کالوسها درهمان محیط کشت کال‌زایی علائم تولید ریشه و ساقه را نشان دادند. پس از ۴ هفته ازکشت بساک، کالوسهای ایجاد شده به محیط کشت باززایی منتقل گشتند. کالوس‌ها به مدت چند روز در روشنایی نگهداری شده و سپس گیاهچه‌های سبز به لوله‌های حاوی محیط کشت باززایی منتقل گشتند، گیاهچه‌های آلبینو نیز پس از شمارش حذف شدند.

باتوجه به تجزیه واریانس (جدول ۲) اثر ژنوتیپ درتولید گیاهچه‌های آلبینو معنی‌دار شده است. برطبق آزمایشات انجام شده آلبینیسم - به عنوان یک مشکل در برابر باززایی - به شدت تحت تأثیر ژنوتیپ است(۱۵ و ۱۸). البته محیط نیز به عنوان یک عامل مهم درتولید گیاهان آلبینو ذکر شده است. پیش تیمار سرما در ۴ درجه سانتیگراد و استفاده از مالتوز به جای ساکاروز در محیط کشت ازجمله‌اقدامات‌انجام شده‌دراین آزمایش بود که برطبق گزارشات ارائه شده‌موجب‌کاهش درصدآلبینیسم‌می‌شود.دراین آزمایش مشاهده شده است که درصدگیاهچه‌های آلبینو باکوتاه شدن دوره کال‌زایی کاهش می‌یابد(داده‌ها ارائه نشده‌اند). به هرحال هرچه مدت مرحله کالوس زایی بیشتر باشد معمولاً درصد موتاسیون و آلبینیسم افزایش می‌یابد. رقم ایگری با ۲۸ روز پیش تیمار سرما و میانگین ۱۷/۵۵ درصد بیشترین مقدار تولید گیاه آلبینو را دارد(جدول ۳).

در رابطه با درصد گیاهچه‌های سبز حاصل از بساک، همچون تولید کالوس و آلبینو، اثر ژنوتیپ و اثر متقابل ژنوتیپ با پیش تیمار سرما به شدت معنی‌دار می‌باشد اما اثر پیش تیمار سرما معنی‌دار نشده است(جدول ۲). همانگونه که قبلاً گفته شد باتوجه به نزدیک بودن دو سطح پیش تیمار سرما و اثرات متفاوت بین پیش تیمار سرما و ژنوتیپ، معنی‌دار نشدن اثر پیش تیمار سرما قابل توجیه می‌باشد. درمقایسه میانگین انجام شده رقم ایگری با ۲۸ روز پیش تیمار سرما و میانگین ۱۴/۶۱ و ایگری با ۲۱ روز پیش تیمار سرما و میانگین ۹/۲۴ بیشترین درصد تولید گیاهچه سبز را داشته اند و پس از آن رقم ریحان با ۲۱ روز پیش تیمار سرما و میانگین ۶/۰۴ قرار دارد(جدول ۳).

دراین تحقیق حداکثر گیاه سبز بدست آمده ۱۴/۶۱ گیاه سبز از ۱۰۰ بساک کشت شده می‌باشد که مربوط به رقم "ایگری" با ۲۸ روز پیش تیمار سرما است. میانگین کل آزمایش ۳/۲ و دامنه تغییرات از ۱۴/۶۱ تا صفر می‌باشد. اولسن (۱۶) حداکثر ۴۷۰ گیاه سبز از ۱۰۰ بساک کشت شده از رقم "ایگری" در محیط کشت مایع بدست آورد. اما میانگین کل آزمایش ۵/۷ بود. دواکس (۳) با

جدول ۳ ـ مقایسه میانگین درصد کالوس، گیاهچه آلبینو، و گیاهچه سبز حاصل از بساک در هشت ژنوتیپ جو و دو سطح پیش‌تیمار سرما در ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از آزمون جدید چند دامنه دانکن در سطح ۱٪ . داده‌ها میانگین‌های موزون می‌باشند.

	صفت					
	درصد کالوس		درصد گیاهچه آلبینو		درصد گیاهچه سبز	
ژنوتیپ	۲۱ روز پیش‌تیمار	۲۸ روز پیش‌تیمار	۲۱ روز پیش‌تیمار	۲۸ روز پیش‌تیمار	۲۱ روز پیش‌تیمار	۲۸ روز پیش‌تیمار
ایگری	۳۲/۶۸ ب	۴۳/۷۷ الف	۱۱/۹۹ ب	۱۷/۵۵ الف	۹/۲۴ ب	۱۴/۶۱ الف
ریحان	۲۲/۴۱ پ	۱۱/۳۸ تث	۹/۷۸ ب	۵/۳۹ پ	۶/۰۴ پ	۲/۴۶ تثج
کارون	۱۴/۵۹ ت	۱۰/۹۸ تث	۵/۵۲ پ	۳/۴۹ پت	۳/۵۰ پت	۳/۰۴ تث
زرجو	۸/۷۵ تث	۸/۵۴ تثج	۳/۹۱ پت	۳/۴۹ پت	۲/۴۴ تثج	۲/۴۴ تثج
کویر	۵/۵۲ ثجچح	۱/۸۱ تجچ	۲/۶۴ پت	۳/۶۷ پت	۰/۷۷ تثج	۲/۸۷ تث
بی‌نام	۶/۵۸ ثجچح	۲/۶۱ چح	۲/۴۰ پت	۱/۰۲ ت	۱/۸۲ تثج	۰/۷۸ تثج
والفجر	۲/۹۰ چح	۳/۷۹ جچح	۱/۲۲ ت	۱/۸۷ ت	۰/۷۸ تثج	۰/۵۲ ثج
دسنادناوارو	۱/۵۶ ح	۱/۵۶ ح	۰/۷۹ ت	۱/۸۲ ت	۰ ج	۰ ج

*** میانگین‌هایی که دارای حروف یکسان هستند از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند.**

استفاده از هفت هیبرید که والد دو تا از آنها رقم "ایگری" بود فقط ۱ گیاه سبز از ۱۰۰ بساک بدست آورد و دامنه تغییرات بین ۹/۷ تا ۰/۳ بود. سورواری و شیدر (۲۰) با محیط کشت جامد شده با نشاسته حداکثر ۴۳/۳ گیاه سبز و ۱۱/۸ آلبینو از ۱۰۰ بساک تولید کردند. پاول (۱۸) بالغ بر ۱۰ گیاه سبز از ۱۰۰ بساک رقمهای "ایگری" و "توید"بدست آورد و در مطالعه اثر جهت بساک روی محیط کشت با ۱۱ ژنوتیپ، در بهترین جهت کشت میانگین ۵/۹ گیاه سبز از ۱۰۰ بساک بدست آمد(۱۹).

کنادسن و همکاران(۱۵) بساک‌های ۱۷ رقم را کشت کردند. میانگین پاسخ ۱/۶ گیاه سبز از ۱۰۰ بساک بود. ایگری با ۱۸/۶ گیاه سبز بیشترین مقدار را داشت. دامنه تغییرات در سایر ارقام بین ۵/۴ تا صفر بود.

دراین تحقیق اختلافات معنی‌داری بین ارقام مختلف جو از نظر صفات مربوط به کشت بساک دیده شد. در جو تعداد کل گیاهچه‌های باززایی شده وابسته به فراوانی القاء کالوس است. این دو صفت ارتباط نزدیکی باهم دارند. از طرف دیگر، تعداد گیاهان سبز مفید، از طریق نسبت تشکیل کالوس قابل پیش‌بینی نیست. یک ژنوتیپ که کالوس زایی خوبی دارد ممکن است هیچ گیاه سبزی تولید نکرده و ژنوتیپ دیگر ممکن است تعداد زیادی گیاه سبز ایجاد کند. با این وجود، اختلافات ژنوتیپی که بر روی نسبت توانایی نرزایی جو تأثیر می‌گذارد در مقایسه با گیاهان دگرگشن و هتروزایگوس مثل چاودار از تأثیر کمتری برخوردار است. اختلافات در پاسخ‌دهی بساک دلالت بر توارث‌پذیری آنها دارد. فروغی - وهر و همکاران(۸) در مقایسه‌ای که بین رقم دیسا و والدینش انجام دادند ثابت کردند که القاء کالوس و باززایی گیاه، توارث‌پذیر بوده و تحت کنترل ژنهای هسته‌ای می‌باشد اگر چه آنها وجود یک اثر سیتوپلاسمی را روی تولید گیاهچه سبز گزارش کردند اما این موضوع اثبات نشده است(۵، ۶ و ۹).

فروغی ـ وهر و فریدت(۶) همبستگی نسبتاً بالایی بین تشکیل کالوس /جنین با میانگین والدین یا مقادیر والد برتر در ۱۹ هیبرید بدست آوردند. بنابراین دراین صفت فقط یک والد برای پاسخ‌دهی خوب کافی است. یک همبستگی کوچکتر اما معنی‌دار بین تعداد گیاهان سبز با مقادیر میانگین والدین یا والد برتر(به ترتیب ۰/۵۵ و ۰/۵۴) وجود داشت که دلیلی بر توارث‌پذیری پائین‌تر برای این صفاتی که اهمیت کاربردی دارند می‌باشد. اگر درصد گیاهان باززایی شده سبز تحت کنترل یک صفت ژنتیکی متفاوت با صفاتی که تعداد کل گیاه را کنترل می‌کنند باشد، این کاهش توارث‌پذیری تولید گیاه سبز از بساک ممکن است قابل توضیح باشد.

وقتی که یکی ژنوتیپ با پاسخ‌دهی بالا با یک ژنوتیپ با پاسخ‌دهی ضعیف تلاقی داده شد، هیبریدهای F_1 به طور معمول

درحد واسط تشکیل جنین و تعداد کل گیاه باززایی شده بود و این تأییدی براهمیت بیشتر اثرات افزایشی است(۹).

ممکن است تعداد نسبتاً زیادی ژن بر روی صفات کشت بساک اثر داشته باشد و اثر ژنتیکی حقیقی پاسخ کشت بساک می‌تواند مربوط به صفات تکاملی و رویش خاص نظیر انطباق تکامل میکروسپور، ضخامت دیواره بساک، پنجه‌دهی که بر قدرت سنبله‌ها تأثیر می‌گذارد، پاسخ گیاه به هورمونهای داخلی و اثرات متقابل آنها باشد. این عوامل می‌تواند تا حدی پیچیدگی الگوهای توارث‌پذیری صفات مربوط به کشت بساک را توضیح دهد(۹).

توانایی تولید گیاه سبز به شدت تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد. گزارشهای زیادی در ارتباط با اثرات عوامل خارجی متفاوت روی پاسخ کشت بساک ارائه شده است. برخی از این عوامل عبارت از شرایط حرارتی و نور(۷)، ترکیب محیط کشت(۱۲ و ۱۳) و جهت بساک روی محیط کشت(۹) می‌باشند.

باتوجه به مطالب فوق، پاسخ‌دهی به کشت بساک یک صفت ساده و منحصر به فرد نیست و به نظر می‌رسد که این صفت شامل چندین جزء می‌باشد که به طور مستقل و متفاوت به ارث می‌رسند. این اجزاء عبارتند از:

۱ ـ تولید کالوس: توانایی میکروسپور بساک کشت شده برای شروع تقسیم و ایجاد توده‌های سلولی درحال تکثیر.

۲ ـ تثبیت کالوس: نگهداری از سلولهای کامل و فعال کالوس.

۳ ـ تولید گیاهچه: توانایی سلولهای کالوس برای ایجاد جنین و گیاهچه.

۴ ـ تشکیل گیاه سبز: تولید گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف شده کاملاً فعال.

در هر مرحله، عوامل ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی بر روی سیستم کشت تأثیر می‌گذارند. به عبارت دیگر هر ژنوتیپ در معرض تأثیرات محیطی قرار می‌گیرد و می‌توان فرض نمود که ژنوتیپ‌ها پاسخ‌دهنده نیازی به شرایط خاص برای رشد ندارند. البته امروزه با تغییراتی که در محیط کشت داده شده است (از قبیل استفاده از مالتوز به جای ساکاروز یا آگاروز و فیکول ۴۰۰ به جای آگار) توانسته‌اند درصد تولید گیاهچه سبز را بالا ببرند. بیشتر محیط‌های کشت نیز برای ژنوتیپ‌ها برتری همچون "ایگری" کامل شده‌اند. اما این خطر نیز وجود دارد که این فن تنها محدود به چند رقم و هیبریدهای مربوط به آن شود که دراین حالت دو راه اصلی برای بهبود پاسخ کشت بساک وجود دارد: راه اول تطبیق شرایط کشت و راه دوم اصلاح ژنتیکی مواد دهنده بساک می‌باشد. وقتی که این احتمال وجود دارد که هر میکروسپور، محیط کشت خاص خودش را بخواهد، به نظر می‌رسد که انتقال پاسخ‌دهی کشت بساک به مواد گیاهی که پاسخی نشان نمی‌دهند آسانتر از آزمایشهای مختلف برای شرایط کشت باشد.

مشخص شده است که انتخاب برای باززایی گیاه سبز بیشتر مؤثراست.اصلاح پاسخ کشت بساک نیز به وسیله تلاقی و انتخاب میسر است(۹). شناسایی ژنوتیپ‌های پاسخ‌دهنده به چند دلیل اهمیت دارد:

۱ ـ امکان توسعه و اپتیمم کردن دستورالعمل‌های کشت را فراهم می‌سازد.

۲ ـ ممکن است ژنوتیپ‌های پاسخ‌دهنده با ژنوتیپ‌هایی که پاسخ نمی‌دهند تلاقی داده شده و بدین‌ترتیب توارث عوامل کنترل کننده تولید گیاهچه از میکروسپور را بررسی نمود.

۳ ـ با استفاده از تلاقی و انتخاب، می‌توان صفت پاسخ‌دهی به کشت بساک را به مواد اصلاحی که به این روش پاسخ نمی‌دهند منتقل کرد.

با توجه به بالابودن درصد پاسخ‌دهی در ارقام ایگری و ریحان، می‌توان کارهای اصلاحی را با این ارقام شروع نمود.

REFERENCES

1- Borlaug. N. E. (1986). Plant breeding goals and strategies for the $1980_{s.}$ Evans, D. A., Sharp, W. R. & Amirato, P. V.(eds), handbook of plant cell culture, vol 4. pp. 3-12.

2- Compton, M. E.(1994). Statistical methods suitable for analysis of plant tissue culture data. Plant cell, Tissue and Organ culture(37): 217-242.

3- Devaux, P.(1987) Comparison of anther culture and Hordeum bulbosum method for the production of

doubled haploids in winter barley. I. Production of green plants. Plant Breeding(98): 215-19.

4- Dunwell, J. M.(1985) Anther and ovary culture. In: Bright, S. W. J. & Jones, M. J. K.(eds), Cereal tissue and cell culture. Martinus Nijhofflor W. Junk, dordrecht, the Netherlands, pp. 1-44.

5- Dunwell, J. M., Francis, R. J. & Powell, W.(1987) Anther culture of Hordeum vulgare L. : A genetic study of microspore callus production and differentiation. Theoretical and Applied Genetics(74): 60-64.

6- Foroughi-Wehr, B. & Friedt, W. (1984) Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant Hodeum vulgare lines by anther culture. Theoretical and Applied Genetics(67): 377-82.

7- Foroughi-Wehr, B. & Mix, G. (1979) In vitro response of Hordeum vulgare L. Anthers cutured from plants grown under different environments. Environmental and Experimental Botany. (19): 303-9.

8- Foroughi-Wehr, B., Friedt, W. & Wenzel, G. (1982) On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in Hordeum vulgare L. Theoretical and Applied Genetics(62): 233-9.

9- Hou, L., Ullrich, S. E, & Kleinhofs, A. (1994) Inheritance of anther culture traits in barley. Crop Sci, (34): 1243-1247.

10- Huang, B. & Sunderland, N. (1982) Temperature-stress pretreatment in barley anther culture. Annals of Botany (49): 77-88.

11- Huang, B., Dunwell, J. M., Powell, W., Hayter, A. M. & Wood, W. (1984) The relative efficient of microspore culture and chromosome elimination as methods of haploid production in Hordeum vulgare L. Zeitschrift fur pflanzenzuchtung(92): 22-9.

12- Hunter, C. P. (1988) Plant rgeneration from microspores of barley Hordeum vulgare L. Ph. D. Thesis, Wyecollege, Univ. of London.

13- Kao, K. N. (1981) Plant formation from barley anther culture with ficoll media. Zeitschrift fur pflanzenphysiologie(103): 437-43.

14- Kasha, k.J. & kao, k.N. (1970) High frequency haploid production in barley (Hordeum vulgare L.). Nature(225): 874-6.

15- Knudsen, S., Due, I. K. & Andersen. S. B. (1989) Components of response in barley anther culture. Plant Breeding (103): 241-6.

16- Olsen, F. L. (1987). Induction of microspore embryogenesis in cultured anthers of Hordum vulgare. The effects of ammonium nitrate, glutamine and asparagine as nitrogen sources. Carlsberg research communiccations(52): 393-404.

17- Pickering, R. A & Devaux, P. (1992) Haploid production: approaches and use in plant breeding. In: shewry P. R(ed.) Barley: Genetics, Biochemistry, molecular biology and biotechnology. C. A. B. International. UK. pp. 519-47.

18- Powell, W. (1988) Diallel analysis of barley anther culture response. Genome (30): 152-7.

19- Powell, W., Borrino, E. M. & Goodall, V. (1988) The effect of anther orientation on microspore-derived plant production in barley(Hordeum vulgare L.). Euphyticca(38): 159-63.

20- Sorvari, S. & Schieder, O. (1987) Influence of sucrose and melibiose on barley anther cultures in starch media. Plant Breeding (99): 164-71.

The Influence of Genotype and Cold Pre-treatment in Barley Anther Culture

S. GH. HOSSINI-SALEKDEH AND C. ABD-MISHANI

Former Graduate Student , Professors and Instructor, Respectivly , Department of Agronomy & Plant Breeding, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.

Accepted 17 Sep. 1997

SUMMARY

The influence of tempreature stress pre-treatment on anther culture response has been examined in eight barley cultivars. Spikes were sampled when the distance from the base of the flag leaf to the penultimate leaf was 2 to 5 cm. Most microspores in the anthers of central floret of each spike were in the mid-uninucleate stage as determined by cytological observation. Spikes were pre-treated in darkness at 4°C for periods of 21 and 28 days. Thirty anthers from central part of each spike were isolated on a petri dish and constituted one replication. Agar solidified modified LS induction medium was used. Indole-3-acetic acid(IAA) and 6-benzylaminopurine(BAP) both at 1 mg L^{-1} were added to the medium. Calli were transfered for plant regeneration to the same medium as the induction medium but IAA was eliminated and BAP concentration was reduced to 0.4 mg L^{-1} and the carbon source was 30 mg L^{-1} sucrose. Genotype differences were highly significant for proportion of anther respons, the number of green and albino regenerants per 100 anthers plated. Temperature pre-treatment differences were not significant, although there were large genotype by pre-treatment interactions. The most responsive cultivar was "lgri" with a mean 14.61% green plant with 28 days pretreatment. Rates of response from varieties "lgri" and "Reihan" are now large enough to be used in a routine breeding program.

Key Words: Barley, Anther culture, Callus & Haploid