Archive of SID

" نهال و بذر"
جلد ۲۰ ، شماره ۲ ، سال ۱۳۸۳

بررسی قابلیت آندروژنز جمعیت‌های F۳ حاصل از آمیزش بین ارقام متحمل به تنش‌ها در جو (*Hordeum vulgare* L.)

Study of Androgenic Ability of F3 Populations of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Obtained from Crosses Between Different Stress Tolerant Cultivars

محمود خسروشاهلی، محمدحسین نقیلو، احمد یوسفی، فرشاد بختیار و رضا بزرگی‌پور

مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

تاریخ دریافت: ۸۱/۱۲/۲۶

چکیده

خسرو شاهلی، م.، نقیلو، م. ح.، یوسفی، ا.، بختیار، ف.، و بزرگی‌پور، ر. ۱۳۸۳. بررسی قابلیت آندروژنز جمعیت‌های F_3 حاصل از آمیزش بین ارقام متحمل به تنش‌ها در جو (*Hordeum vulgare* L.). نهال و بذر ۲۰: ۲۱۴-۱۹۹.

قابلیت آندروژنز میکروسپورهای جمعیت‌های F_3 حاصل از آمیزش‌های ارقام متحمل به سرما × گرما (Boyer/ Rojo) ، شوری × گرما (Afzal / Torkman//Kavir) ، شوری × بیماری (Ashar/Hebe) ، شوری × گرما (Arigashar/Matico) و رقم ایگری به عنوان شاهد پس از تیمار با مانیتول ۰/۳ مولار با استفاده از محیط کشت مایع القاء L_1 تغییر یافته به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر فنیل استیک اسید (PAA) و یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BAP) و یک گرم در لیتر کازئین نیدرولیزه و ٦٥ گرم در لیتر مالتوز و محیط کشت تمایز یابی موراشیگ و اسکوگ (MS) به همراه یک میلی‌گرم در لیتر (BAP) و ۰/۵ میلی گرم در لیتر نفتالن استیک اسید (NAA) مورد مطالعه قرار گرفت. تجزیه‌های آماری نشان داد که قابلیت آندروژنز نتاج جمعیت‌های F_3 بین خود و در مقایسه با رقم ایگری تفاوت معنی‌داری دارند. رقم ایگری به طور متوسط با ٥٦٦/٧٥ جنین به ازای میکروسپورهای یک صد بساک بیشترین جنین را تولید کرد و نتاج F_3 های Afzal/Torkman//Kavir به طور متوسط با ١٤١/٥ جنین به ازای میکروسپورهای یک صد بساک بیشترین جنین را در بین جمعیت‌های F ۳ تولید کردند. از نظر تولید گیاه سبز نیز تفاوت معنی‌داری بین نتاج جمعیت‌های F_3 و رقم ایگری مشاهده شد، در این مورد نیز رقم ایگری به طور متوسط با ٦٥/٥ گیاه سبز به ازای میکروسپورهای یک صد بساک بیشترین گیاه سبز را تولید کرد ولی نتاج جمعیت‌های F۳ حاصل از تلاقی‌های شوری × بیماری و سرما × گرما به ترتیب به طور متوسط با ۱۸/۵ و ۱۷/۵ گیاه سبز به ازای میکروسپورهای یک صد بساک بالاتر از نتاج F_3 های Afzal/Torkman//Kavir قرار گرفتند که این احتمالاً به مفهوم متفاوت بودن مکانیسم های کنترل القای جنین و گیاه سبز می‌باشد. در این پژوهش رقم ایگری کمترین گیاه زال (Albino Plantlet) را در مقایسه با نتاج سایر جمعیت‌ها تولید کرد.

واژه‌های کلیدی: جو، آندروژنز، کشت میکروسپور، القای جنین، باززایی.

این مقاله بر اساس نتایج به دست آمده از اجرای طرح تحقیقاتی شماره ۷٦٤۱۲-۱۲-۱۰۷ مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه گردیده است.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

از آغاز کشت بساک برای تولید گیاهان هاپلوئید در تاتوره *Datura innoxia* (Ghuha and Maheshwari, 1966) سعی در بهینه کردن شرایط برای تولید بیشترین تعداد گیاه سبز ادامه دارد. طی دهه گذشته کشت مستقیم میکروسپور آزاد شده در تعداد محدودی گیاه به خصوص کلزا و جو نتایج خوبی در بر داشته است (Lichter, 1982; Swanson, 1990). در جو با استفاده از رقم ایگری (Igri) و سابارلیس (Sabarlis) با جدا کردن مکانیکی میکروسپورها توانسته‌اند تولید جنین و گیاه سبز را نسبت به کشت بساک افزایش دهند (Forster and Powell, 1996). روش‌های مختلف جدا سازی مثل روش‌های مکانیکی، ریزشی و غیره و پیش تیمار سرمائی، گرمائی، مانیتول و غیره (Cistué *et al.*, 1994) و استفاده از محیط‌های کشت مختلف مانند MS (Murashige and Skoog, 1962) و FHG (Hunter, 1988) برای بهینه‌کردن شرایط کشت در جهت افزایش تعداد جنین و گیاه سبز به کار گرفته شده است (Ziauddin *et al.*, 1992) . از نقطه نظر نیاز به قند نیز مشخص شده است که جایگزینی ساکارز با مالتوز (Hoekstra *et al.*, 1993; Hunter, 1988) توانسته است تعداد گیاه سبز را افزایش دهد. در ضمن نشان داده شده است که کاهش NH_4NO_3 روی تعداد گیاه سبز تأثیر داشته و جایگزینی آن با گلوتامین در تولید گیاه سبز اثر مثبتی داشته است (Olsen, 1991؛ Hunter, 1988). هم‌چنین کشت میکروسپور آزاد شده در مقایسه با کشت بساک به علت حذف دیواره بساک و قرار دادن تمامی میکروسپورها به طور هم زمان در مجاورت محیط کشت مایع توانسته است در صد جنین و گیاه سبزبیشتری نسبت به‌کشت بساک‌تولید کند (Liu *et al.*, 2002; Hoekstra *et al.*,1992).

در این پژوهش قابلیت آندروژنز جمعیت‌های F_3 آمیزش‌های مختلف و رقم ایگری با استفاده از محیط کشت L1 (Johne *et al.*, 1991) تغییر یافته به همراه فنیل استیک اسید (PAA) و بنزیل امینو پورین (BAP) برای القاء و محیط کشت MS به همراه نفتالن استیک اسید (NAA) و BAP برای تمایز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش نسل سوم دو رگ‌های حاصل از آمیزش بین ارقام شش ردیفه جو به شرح زیر بود که از بخش تحقیقات غلات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج دریافت شده بود:

(بهاره و متحمل به گرما) Rojo / (پائیزه متحمل به سرما) Boyer

(بهاره پائیزه و متحمل به گرما) Matico / (بهاره متحمل به شوری) Arigashar

www.SID.ir

Archive of SID

(بهاره پائیزه تجارتی)Kavir// (بهاره تجارتی) Torkman (بهاره پائیزه متحمل به شوری) Afzal

(بهاره پائیزه متحمل به بیماری) Hebe / (بهاره متحمل به شوری) Ashar

رقم ایگری نیز به علت پاسخ خوب به کشت میکروسپور و استفاده وسیع از آن در تعداد زیادی از پژوهش‌ها به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت (Wojnarowiez *et al.*, 2002؛ Ramirez *et al.*, 2001).

شرایط رشد گیاه بخشنده میکروسپور

بذرهای مواد گیاهی فوق پس از ضد عفونی با وایتکس تجارتی و شستشو با آب مقطر استریل درون تشتک‌های پتری حاوی کاغذ استریل مرطوب در شرایط دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و شدت نور $12\ \mu Em^{2}s^{-2}$ قرار داده شدند. بذرها پس از ۵ الی ۷ روز جوانه زدند. بذرهای جوانه زده پس از چند روز به یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد به دور از نور به مدت هشت هفته منتقل و بهاره سازی (Vernalization) شدند. پس از این مدت گیاهچه‌ها در گلدان‌های حاوی مخلوطی از خاک برگ، خاک لوم و پیت ماس به ترتیب به نسبت‌های ۳-۲-۱ کاشته شده و به گلخانه‌ای در بخش تحقیقات غلات در مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج منتقل گردیدند. پس از گذشت یک تا دو هفته گیاهان با محلول کودی NPK به ترتیب به نسبت‌های ۲۰-۲۰-۲۰ هر هفته یک بار تغذیه شدند. شرایط رشد گیاهان در گلخانه با شدت نور $420\ \mu Em^{2}s^{-2}$ با فتوپریود ۱۲-۹ ساعت روز و ۱۵-۱۲ ساعت شب بسته به ماه و دمای گلخانه بین ۲۲-۱۸ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۸-۱۲ درجه سانتی‌گراد در شب و رطوبت ۳۵ تا ۴۵ درصد تنظیم شد. مواد گیاهی فوق در پائیز ۱۳۷۷ در مزرعه بخش تحقیقات غلات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر نیز کاشته شدند.

مرحله مناسب میکروسپور

سنبله‌های حاوی میکروسپور در مرحله میانی تا انتهائی تک هسته‌ای برای مطالعات انتخاب شدند، مرحله تک هسته‌ای در ارقام بهاره، زمانی که فاصله لیگول برگ پرچم با لیگول برگ زیرین آن پنج الی ده سانتی‌متر و در ارقام پائیزه دوتا پنج سانتی‌متر بود مطابقت داشت. البته این خصوصیت به شرایط رشد و ژنوتیپ گیاه بخشنده میکروسپور نیز می‌تواند وابسته باشد. تعیین مرحله تک هسته‌ای با استفاده از له کردن بساک‌ها در استوکارمن ۴٪ و بررسی در زیر میکروسپور عملی شد.

برای استریل کردن سنبله‌ها که درون غلاف برگ پرچم قرار داشتند از آب ژاول (گلرنگ با ۵٪ کلر فعال) ده در صد به مدت هفت دقیقه استفاده شد. پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل سنبله‌ها که هنوز درون غلاف برگ پرچم بودند با الکل ۷۰ درجه محلول‌پاشی شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

پیش تیمار بساک‌ها

بساک‌های سنبلچه‌های وسطی از سنبله‌های استریل با پنس ظریف جدا و در مانیتول ۰/۳ مولار فیلتر استریل شده قرار داده شدند، به ازای هر ۲۰ بساک یک میلی‌لیتر مانیتول ۰/۳ مولار استفاده شد. در هر تیمار حدود یک صد بساک برای هر یک از مواد گیاهی، جداسازی شد و در تشتک‌های پتری (به قطر ٦ سانتی‌متر)حاوی ۵ میلی‌لیتر مانیتول ۰/۳ مولار فیلتر استریل شده قرار داده شد و پس از درزگیری با پارافیلم، قوطی‌ها در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت چهار روز قرار داده شدند.

در این پژوهش از روش جداسازی ریزشی میکروسپور استفاده شد. پس از چهار روز پیش تیمار، بساک‌ها جهت آزادسازی میکروسپورها به محیط کشت القا L_1 تغییر یافته (Johne *et al.*, 1991) مطابق جدول ۱ و ضمائم انتقال داده شد.

جدول ۱- ترکیب مواد پر نیاز و کم نیاز محیط کشت L_1 تغییر یافته

Table 1. Macro and micro elements of L1 modified medium

Macro elements (mgl^{-1})		Micro elements (mgl^{-1})	
NH_4No_3	165.0	$MnSO_4, H_2O$	15.000
KNO_3	1750.0	$ZnSO_4, 7H_2O$	13.400
$MgSO_4$	350.0	H_3BO_3	5.000
KH_2PO_4	200.0	KI	0.750
$CaCl_2, 2H_2O$	450.0	$Na_2MoO_4, 2H_2O$	0.250
Na_2, EDTA	33.6	$CaSO_4, 5H_2O$	0.025
$FeSO_4, 7H_2O$	27.8	$CoCl_2, 6H_2O$	0.025

به مواد فوق آسید نیکوتینیک، تیامین HCl، پیریدوکسین HCl، D کلسیم پنتوتنات، کلروکولین به مقدار یک میلی گرم در لیتر، اسید اسکوربیک ۲ میلی گرم در لیتر، ریبوفلاوین ۰/۲ میلی گرم در لیتر، اسید فولیک ۰/٤ میلی گرم در لیتر، میواینوزیتول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر، گلوتامین ۷۵۰ میلی گرم در لیتر، کازئین ئیدرولیزه ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر و مالتوز ٦۵ گرم در لیتر اضافه شد. به محیط فوق یک میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین و ۳ میلی گرم در لیتر فنیل استیک اسید به عنوان سیتوکینین و اکسین نیز اضافه گردید. pH محیط بین ۵/٦ تا ۵/۸ تنظیم شد و محیط کشت با فیلتر ۰/۲۲ میکرن استریل گردید. بساک‌ها و میکروسپورهای آزاد شده در محیط پیش تیمار پس از سانتریفوژ با ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه و حذف بخش شناور در یک میلی‌لیتر محیط القا شناور شدند و سپس در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت القا درچهار ارلن ۵۰ میلی‌لیتری برای هر ژنوتیپ توزیع شدند بدین ترتیب میکروسپورهای یک صد بساک هر ژنوتیپ در چهار تشتک پتری کشت شدند. ارلن‌ها پس از پوشش با کاغذ آلومینیومی و پارافیلم بر روی شیکر با ۲۵ دور در دقیقه در تاریکی و دمای ۲۷

www.SID.ir

Archive of SID

درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از پنج روز کلیه بساک‌ها از محیط کشت حذف شدند و به‌ظرف حاوی محیط کشت و میکروسپورهای آزاد شده ۲ میلی‌لیتر محیط تازه اضافه شد. این کار روز دهم نیز با اضافه کردن ۳ میلی‌لیتر محیط تازه تکرار شد.

جنین‌های القا شده در محیط کشت L_1 تغییر یافته به محیط کشت تمایز انتقال و مدت دو روز در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. جنین‌ها پس از این دو روز به روشنائی $96\ \mu Em^{-2}s^{-2}$ و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ MS (Murashige and Skoog, 1962) به همراه ۳۰ گرم در لیتر مالتوز، ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر میو اینوزیتول، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین ئیدرولیز شده، ۶۹۰ میلی‌گرم در لیتر تیامین HCl یک میلی‌گرم در لیتر پیروکسیدین HCl. ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اسید نیکوتینیک و بالاخره یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید به عنوان محیط کشت تمایز استفاده شد. برای جامد کردن محیط کشت از ۳ گرم در لیتر فیتاژل استفاده گردید. pH محیط کشت در ۵/۸ تنظیم و محیط کشت با فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل شد. فیتاژل اتوکلاو شده در زیر هود لامینار به محیط کشت اضافه شد.

گیاهچه‌های سه الی شش سانتی‌متری برای رشد بهتر به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ بدون هورمون به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول، ۱۴۶ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تیامین HCl، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر پیریدوکسین HCl و اسید نیکوتینیک منتقل شدند. برای جامد کردن محیط کشت از ۳ گرم در لیتر فیتاژل استفاده گردید و pH محیط کشت در ۵/۸ تنظیم شد. این گیاهچه‌ها به منظور ریشه‌زائی و شاخه‌زائی مناسب در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

گیاهچه‌های با ریشه‌زائی مناسب به گلدان‌های حاوی پیت ماس و ماسه استریل به نسبت ۱:۱ انتقال داده شدند و برای حفظ رطوبت از حباب‌های شفاف سوراخدار استفاده شد البته سوراخ‌ها به تدریج در طول روزهای بعد باز شد و گیاهچه‌ها به محیط اطاقک رشد عادت داده شدند. گیاهان عادت داده شده به شرایط اطاقک رشد به مدت چهار هفته به اطاقک با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با فتوپریود ۸ ساعت روز و ۱۶ ساعت شب با نور $12\ \mu Em^{-2}s^{-2}$ انتقال و پس از چهار هفته به گلخانه انتقال داده شدند.

در این مطالعه تحول میکروسپورها در طی کشت، تعداد جنین، تعداد گیاه سبز و تعداد گیاه زال (Albino Plantlet) حاصل از کشت میکروسپورهای یک صد بساک مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های مربوط به هر یک از متغیرها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی مورد

www.SID.ir

Archive of SID

تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

تحول میکروسپورهای حاصل از گیاهان کشت شده در گلخانه و مزرعه در طول کشت هر روز با میکروسکپ اینورت (Inversion microscope) مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که از میکروسپورهای حاصل از مواد گیاهی کشت شده در شرایط گلخانه به جز رقم ایگری جنینی حاصل نشده است و در مورد این رقم نیز میزان جنین حاصل خیلی پائین بود. بالا بودن دمای گلخانه که گاهی تا ۲۳ درجه سانتی گراد نیز می‌رسید اصولاً قابل کنترل نبود.

پائین بودن شدت نور، کوتاه بودن طول دوره روشنائی و احتمالاً تنش وارده به گیاهان در طی دوره ورنالیزاسیون به مدت هشت هفته در یخچال که باعث کاهش شدید میزان سبزینه گیاهان شده بود شاید علت اصلی عدم جواب میکروسپورهای حاصل از گیاهان گلخانه‌ای باشد. در شرایط کاری ذکر شده تنها میکروسپورهای حاصل از گیاهان کشت شده در مزرعه جواب مناسبی به کشت دادند که علت اصلی آن شاید شرایط مناسب مزرعه شامل درجه حرارت (متوسط ۱۲ درجه سانتی گراد) شدت نور مناسب (μEm^2s^{-2} ۶۰۰-۴۸۰) و فتوپریود لازم (۱۲ ساعت روز) و رطوبت مورد لزوم باشد. نتایج مربوط به مواد گیاهی حاصل از مزرعه به شرح زیر بود:

بررسی شاخص‌های مورفولوژیکی منطبق با مرحله تک هسته‌ای میکروسپور در رقم ایگری فاصله بین لیگول برگ پرچم با لیگول زیرین آن می‌باشد که در این رقم ۲ سانتی‌متر گزارش شده است. در کشت‌های این بررسی نیز این اندازه مشاهده شد ولی برای مواد گیاهی دیگر بهترین زمان برداشت میکروسپور زمانی بود که فاصله بین لیگول برگ پرچم و لیگول برگ زیرین آن بین ۵ تا ۷ سانتی متر بود. این فاصله در بین مواد گیاهی مورد مطالعه متغیر بود و در گیاهان مزرعه‌ای در مقایسه با گیاهان گلخانه‌ای نیز تفاوت‌هائی مشاهده شد. به عنوان یک قاعده کلی این فاصله در ارقام پائیزه کمتر از ارقام بهاره بود.

بررسی‌های میکروسکپی، سه گروه میکروسپور را نشان داد:

گروه اول میکروسپورهائی که اندازه آن‌ها بین ۳۵ الی ۴۵ میکرون متغیر بود و پس از مدتی در محیط کشت به علت پلاسمولیز شدن از بین رفتند . تعداد آن‌ها در جمعیت‌های گیاهی مختلف متغیر بود (شکل ۱) .

گروه دوم میکروسپورهائی بودند که اندازه آن‌ها بین ۵۰ تا ۶۵ میکرون متغیر بود، این میکروسپورها در زیر میکروسکپ اینورت دارای هاله آبی رنگ در اطراف اگزین و دارای یک واکوئل بزرگ بودند. در این گروه معمولاً تقسیمات سلولی اتفاق افتاد که منجر به تولید

www.SID.ir

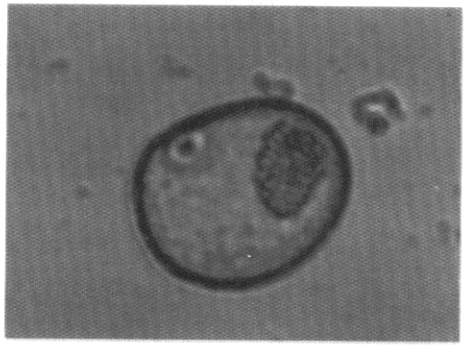
Archive of SID

جنین شد این‌ها در واقع میکروسپورهای جنین‌زا بودند (شکل ۲).

گروه سوم میکروسپورهائی بودند که هم اندازه میکروسپورهای گروه دوم بوده ولی دارای رنگ تیره بودند. در این گروه نیز واکوئل بزرگی مشاهده می‌شد ولی هیچ تقسیمی در آن‌ها ملاحظه نگردید و بلاخره پس از مدتی پلاسمولیز شدند (شکل ۳).

بررسی تکوین جنین نشان داد که دو تا سه روز پس از کشت در میکروسپورهای جنین‌زا قطر میکروسپور از ۵۰ تا ٦۰ میکرون به ۸۰ تا ۹۰ میکرون رسید (شکل ٤). در روزهای پنجم و ششم پس از کشت در تعدادی از میکروسپورهای بزرگ شده اولین تقسیمات شروع و در نتیجه اندازه میکروسپور به حدود ۱۰۰ میکرون رسید (شکل ٥). در روزهای هفتم و هشتم ساختارهای چند سلولی شکل گرفت بدون این که اندازه میکروسپورها تغییر زیادی نشان دهد. پس از گذشت سه روز از اولین تقسیمات میانگین تعداد سلول ها تقریباً شش برابر شد (شکل ٦). در روزهای هشتم تا دهم در تعدادی از ساختارهای چند سلولی دیواره دانه گرده معمولاً در محل منفذ دانه گرده پاره و سلول‌ها از اگزین خارج شدند (شکل ۷). در روز دوازدهم کشت نخستین جنین‌های کروی شکل قابل رویت بودند. در ادامه تقسیمات سلولی به تدریج جنین‌های قلبی شکل و در نهایت جنین‌های اژدری شکل مشاهده شد (شکل ۸). در این جنین‌ها بندالله مشاهده نشد. تقریباً پس از بیست و یک روز محیط کشت حاوی مقادیر متنابهی جنین در مراحل مختلف تکوین بود (شکل ۹). باززائی گیاه سبز از جنین‌های اژدری پس از انتقال به نور دو تا سه روز به طول انجامید و تقریباً یک روند شبیه روند شکل‌گیری گیاه از جنین جنسی را نشان داد (شکل‌های ۱۰ و ۱۱).

اصولاً تولید جنین بسته به ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت است و ژنوتیپ‌های مختلف جو نیز جواب متفاوتی نسبت به کشت می‌دهند (Jeremy, 1998). در این پژوهش نیز مشخص شد که بین ایگری و جمعیت‌های F_3 مورد مطالعه و همچنین بین خود جمعیت‌های F_3 از

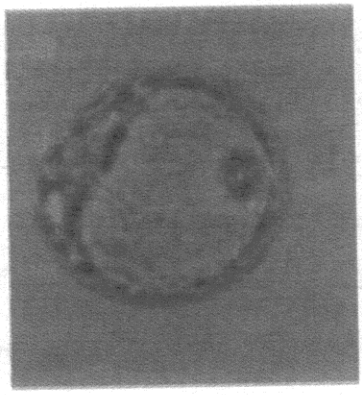


شکل ۱- میکروسپور کوچک غیر-جنین‌زا (اندازه ۳۵-٤۵ میکرون)

Fig. 1. Non embryogenic small microspore (size: 35-45 µ)

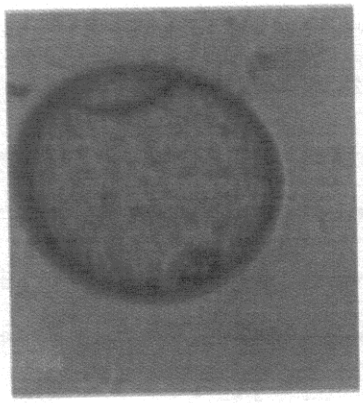
www.SID.ir

Archive of SID



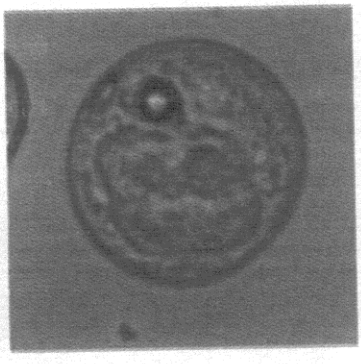
شکل ۲- میکروسپور بزرگ غیرجنین‌زا (اندازه ۵۰-۶۰ میکرون)

Fig. 2. Embryogenic large microspore (size: 50-60 µ)



شکل ۳- میکروسپور بزرگ فاقد قدرت جنین‌زایی

Fig. 3. Non embryogenic large microspore

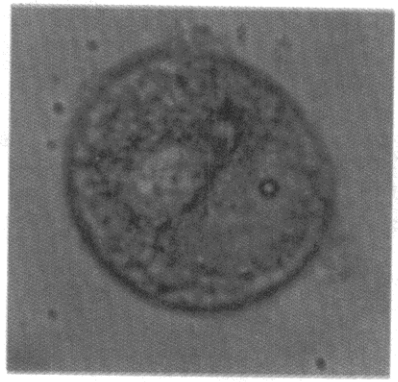


شکل ٤- میکروسپور جو ۲ تا ۳ روز پس از کشت

Fig. 4. Microspore of barley 2-3 days after culture

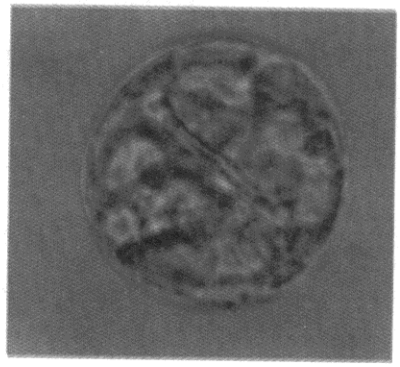
www.SID.ir

Archive of SID



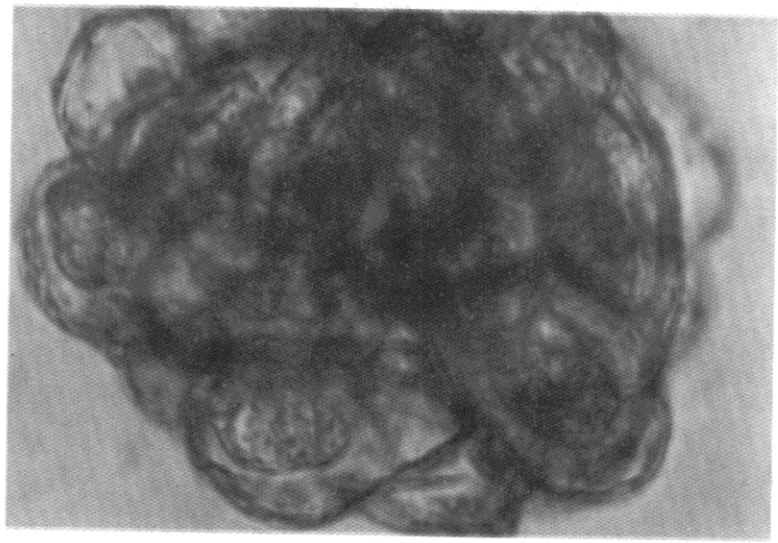
شکل ۵- میکروسپور جو ۵ تا ٦ روز پس از کشت

Fig. 5. Microspore of barley 5-6 days after culture



شکل ٦- شروع شکل گیری ساختارهای چندسلولی

Fig. 6. Multicellular structure formation

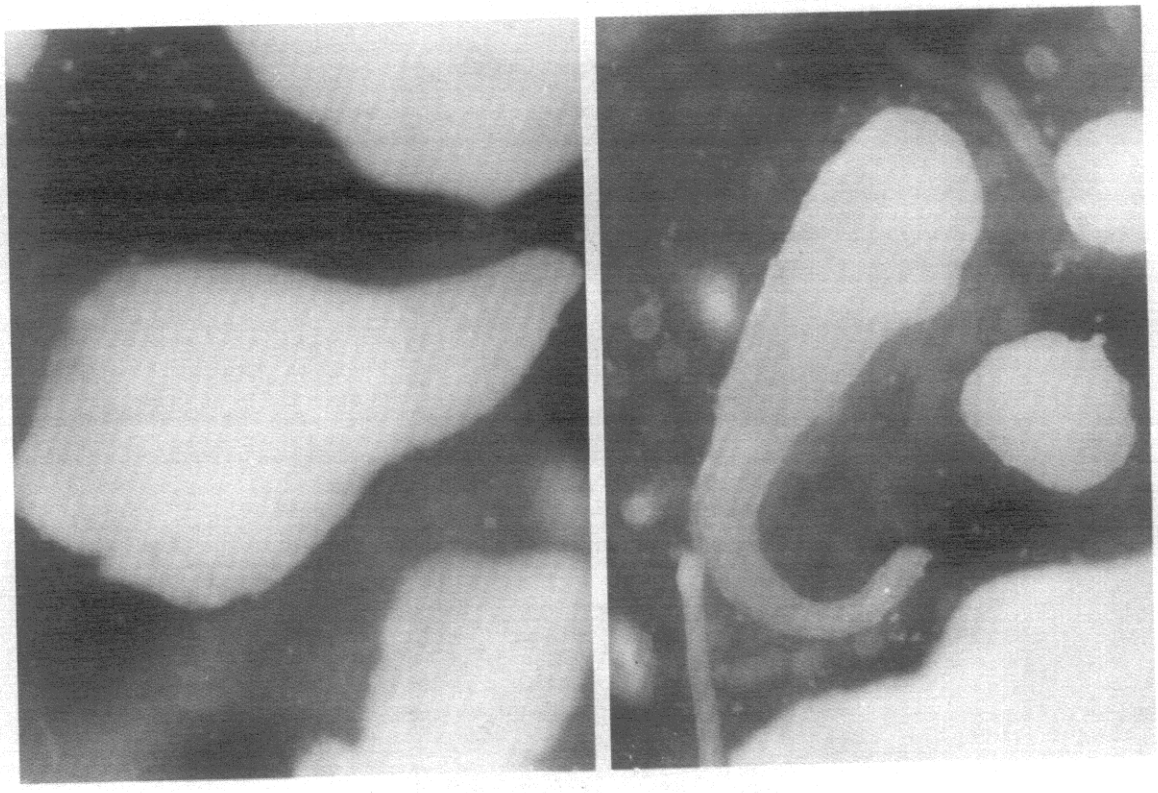


شکل ۷- پاره شدن اگزین در طی روزهای ۸ تا ۱۰ و شروع شکل گیری جنین کروی

Fig. 7. Exine dehiscence during the days 8-10, and beginning of globular embryo formation

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۸- شکل گیری جنین‌های گلابی شکل و اژدری شکل

Fig. 8. Heart shape and torpedo shape embryo formation

شکل ۹- جنین‌های جو در مراحل مختلف

Fig. 9. Barley embryos in different stages

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱۰- باززایی گیاه سبز و شکل‌گیری ریشه

Fig. 10. Green plantlet regeneration and its rhizogenesis

شکل ۱۱- گیاهان سبز حاصل از کشت میکروسپور در گلخانه

Fig. 11. Green plants regenerated from barley microspore culture in green house

نظر تولید جنین تفاوت زیادی وجود دارد (جدول ۲). در این پژوهش در رقم ایگری به طور متوسط ۵٦٦/۷۵ جنین به ازای میکروسپورهای یک صد بساک و در جمعیت F_3 های Afzal/Torkman//Kavir به طور متوسط ۱٤۱/۵ جنین به ازای میکروسپورهای یک صد بساک بیشترین جنین حاصل شد (جدول ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- تجزیه واریانس تعداد جنین به ازای میکروسپورهای یک صد بساک

Table 2. Analysis of variance for number of embryo/ microspores of one hundred anthers

S. O. V.	منبع تغییرات	df.	درجه آزادی	MS	میانگین مربعات
Treatment	تیمار	4		170207.8**	
Error	اشتباه	15		101.6	
Total	کل	19			

** : Significant at 1% probability level. ** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های تعداد جنین به ازای میکروسپورهای یک صد بساک

Table 3. Means comparison for number of embryo/microspores of one hundred anthers

Plant materials	Means
Igri	566.75 a
Afzal / Torkman / Kavir	141.50 b
Boyer / Rojo	102.50 c
Ashar / Hebe	97.50 c
Arigashar / Matico	89.50 c

میانگین‌های دارای حروف یکسان، اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵٪ با هم ندارند (آزمون دانکن).

Means with similar letters are not significantly different at 5% level (Duncan's Multiple Range Test).

از نظر تعداد گیاه سبز به ازای میکروسپورهای یک صد بساک نیز تفاوت معنی‌داری بین مواد گیاهی مورد مطالعه مشاهده شد (جدول ٤)، در نتیجه تولید گیاه سبز نیز به شدت تحت تأثیر ژنوتیپ می‌باشد. در این مورد هم رقم ایگری با میانگین ٦٥/٥ گیاه سبز به ازای میکروسپورهای یک صد بساک بیشترین میزان تولید گیاه سبز را نشان داد. در بین جمعیت‌های F_3 ، Ashar/Hebe و Boyer/Rojo به ترتیب با میانگین‌های ۱۸/۵ و ۱۷/۵ گیاه سبز به ازای میکروسپورهای یک صد بساک بالاتر از دو جمعیت F_3 دیگر قرار گرفتند (جدول ۵).

جدول ٤- تجزیه واریانس تعداد گیاه سبز به ازای میکروسپورهای یک صد بساک

Table 4. Analysis of variance for number of green plantlets/microspores of one hundred anthers

S. O. V.	منبع تغییرات	df.	درجه آزادی	MS	میانگین مربعات
Treatment	تیمار	4		2138**	
Error	اشتباه	15		11.330	
Total	کل	19			

** : Significant at 1% probability level. ** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- مقایسه میانگین‌های تعداد گیاه سبز به ازای میکروسپورهای یک صد بساک

Table 5. Mean comparison of number of green plantlets/microspores of one hundred anthers

Plant materials	Means
Igri	65.50 a
Boyer / Rojo	18.50 b
Ashar / Hebe	17.50 b
Arigashar / Matico	11.75 c
Afzal / Torkman / Kavir	10.00 c

میانگین‌های دارای حروف یکسان، اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵٪ با هم ندارند (آزمون دانکن).

Means with similar letters are not significantly different at 5% level (Duncan's Multiple Range Test).

از نظر تعداد گیاه زال نیز تفاوت معنی‌داری بین مواد گیاهی مورد مطالعه مشاهده شد (جدول ٦) مقایسه میانگین‌ها نیز نشان داد که رقم ایگری کمترین گیاه زال را تولید کرده است و پس از آن به ترتیب جمعیت‌های گیاهی Arigashar/Matico و Ashar/Hebe قرار داشتند. جمعیت F_3 های Afzal/Torkman//Kavir و Boyer/Rojo بیشترین گیاه زال را تولید کردند (جدول ۷).

جدول ٦- تجزیه واریانس در صد گیاه زال به ازای میکروسپورهای یک صد بساک

Table 6. Analysis of variance for percentge of albino plantlets/microspores of one hundred anthers

S. O. V.	منبع تغییرات	df.	درجه آزادی	MS	میانگین مربعات
Treatment	تیمار	4			0.0350**
Error	اشتباه	15			0.0022
Total	کل	19			

** : Significant at 1% probability level.

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ .

جدول ۷- جدول مقایسه میانگین‌های در صد گیاه زال به ازای میکروسپورهای یک صد بساک

Table 7. Means comparison of % albino plantlets/microspores of 100 anthers

Plant materials	Means
Afzal / Torkman / Kavir Lgri	41 a
Boyer / Rojo	31 b
Ashar / Hebe	22 c
Arigashar / Matico	21 c
Igri	19 c

میانگین‌های دارای حروف یکسان، اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵٪ با هم ندارند (آزمون دانکن).

Means with similar letters are not significantly different at 5% level (Duncan's Multiple Range Test).

www.SID.ir

Archive of SID

به نظر می‌رسد که میکروسپورهائی که پس از تقسیم میوز نمی‌توانند به دیواره بساک اتصال پیدا کرده و تغذیه مناسب داشته باشند، اندازه کوچک‌داشته و به‌کشت‌جواب مناسب‌نمی‌دهند (Roberts-Oehlschlager and Dunwell, 1990) نتایج این مطالعه نیز نشان داد که میکروسپورهای اندازه کوچک ۳۰ تا ۴۰ میکرون قابلیت جنین‌زائی ندارند. این مساله با داده‌های دیگر نیز مطابقت دارد (Heberie-Bross, 1985). معمولاً میکروسپورهای زنده دارای اندازه بزرگ بوده و دایره‌ای شکل هستند و این نوع میکروسپورها روند تکوینی مناسب در کشت نشان می‌دهند (Olsen, 1991) در پژوهش اخیر نیز چنین میکروسپورهائی به وفور قابل تشخیص بودند که بیشترین فعالیت جنین زائی را نشان دادند (شکل ۲).

ژنوتیپ یکی از عوامل اصلی تأثیرگذار در تکوین مناسب میکروسپور جو و تولید جنین و گیاه سبز است.

گزارش‌های موجود نشان می‌دهد که برای سه صفت جنین زائی، تولید گیاه سبز و گیاه زال در جو، اثر ژنوتیپی به شدت معنی‌دار بوده است (هو و همکاران به نقل از Jeremy, 1998). در کشت بساک جو نیز ۸۳ درصد تفاوت‌ها در تولید گیاه سبز وابسته به اثر ژنوتیپی بوده و فقط ۱۱ درصد به عوامل محیطی وابسته می‌باشد (Xu, 1990). این داده‌ها با نتایج این پژوهش مطابقت کامل دارند چرا که تفاوت معنی‌داری در مورد تولید گیاه سبز، گیاه زال و تولید جنین بین مواد گیاهی مورد مطالعه مشاهده شد. در ضمن ملاحظه شد که رابطه نزدیکی بین تعداد جنین تولید شده و تعداد گیاه باززائی شده وجود دارد ولی این ارتباط بین تعداد جنین و تولید گیاه سبز باززائی شده قابل پیش‌بینی نیست، ژنوتیپی با در صد جنین‌زائی بالا مانند F_3 های Afzal/Torkman//Kavir با تولید متوسط ۱۴۱/۵ جنین به ازای میکروسپورهای یک صد بساک فقط ده گیاه سبز تولید کرد. اثر تنش‌های محیطی از جمله تنش حرارتی در زمان رشد گیاه بخشنده میکروسپور جو (Kasha and Cho, 1990) و سلامت و قدرت گیاه بخشنده میکروسپور نیز یکی دیگر از عوامل مهم در کسب موفقیت در کشت میکروسپور گزارش شده است (Xu, 1990). در این پژوهش به علت عدم امکان تأمین نیازهای گیاه بخشنده میکروسپور در شرایط گلخانه‌ای به خصوص درجه حرارت مناسب (۱۲ درجه سانتی‌گراد در شب و ۱۵ درجه در روز) و شدت نور مناسب (۲۰۰۰۰ لوکس) امکان القای جنین و تولید گیاه سبز فراهم نشد و تنها از گیاهان پرورش یافته در مزرعه القای جنین و گیاه سبز به دست آمد.

References

Cistué, L., Ramos, A., Castillo, A. M., and Romagosa, I. 1994. Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. Plant Cell Report 13: 709-712.

www.SID.ir

Archive of SID

Forster, B.P., and Powell, W. 1996. Haploidy in barley. pp. 99-115. In: Jain, S. M., Sopory, S. K., and Veilleux, R. E. (eds.) *In vitro* Haploid Production in Higher Plants. Vol. 4. Kluwer Academic Publishers, printed in the Netherlands.

Ghuha, S., and Maheshwari, S. C. 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of Datura *in vitro*. Nature 212: 97-98.

Heberie-Bross, E. 1985. *In vitro* haploid production from pollen: A critical review. Theoretical and Applied Genetics 71: 361-374.

Hoekstra, S., Zijderveld, M. H., and Louwerse, J. D. 1992. Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. Plant Science 86: 89-96.

Hoekstra, S., Zijderveld, M. H., Louwerse, J. D., Heidecamp, F., and Van der Mark 1993. Microspore culture of *Hordeum vulgare* L.: The influence of density and osmolarity. Plant Cell Report 12: 661-665.

Hunter, C.P. 1988. Plant regeneration from microspores of barley, *Hordeum vulgare* L. Ph.D. Thesis. Wye College. University of London.

Jeremy, T. O. 1998. Effect of amino acid, growth regulators and genotype on androgenesis in barley. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 53: 59-66.

Johne, A., Lazzeri, P. A., And Lorz, H. 1991. Plant regeneration from embryogenic cell suspensions derived from anther cultures of barley. Theoretical and Applied Genetics 82: 74-80.

Kasha, K. J., and Cho, V. H. 1990. Haploids in cereal improvement, anther and microspore culture. pp. 213-255. In: Gustafson, T. P. (ed.).Gene Manipulation in Plant Improvement. Plenum Press, New York.

Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol. 105: 427-434.

Liu, W., Zheng, M. Y., Polle, A.P., and Konzak, C.F. 2002. Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. Crop Science 42: 686-692.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Olsen, F. L. 1991. Isolation and cultivation of embryogenic microspores from barley (*Hordeum vulgare* L.). Hereditas 115: 255-266.

www.SID.ir

Archive of SID

Ramirez, C., Testillano, P. S., Castillo, A-M., Vallés, M-P., Coronado, M-J., Cistué, L., and Risueno, M. C. 2001. The early microspore embryogenesis pathway in barley is accompanied by concrete ultrastructural and expression changes. Int. J. Dev. Biol. 45 (S1): 57-58.

Roberts-Oehlschlager, S., and Dunwell, J. 1990. Barley anther culture: Pretreatment onmannitol stimulates production of microspore derived embryos. Plant Cell, Tissue and Organ culture 20: 235-240.

Swanson, E. B. 1990. Microspore culture in Brassica. pp. 159-169. In: Pollard, J. W. and Walker, J. M. (eds.). Methods in Molecular Biology Vol. 6, Plant Cell and Tissue Culture, The Humana Press, Clifton, N.Y., U.S.A.

Wojnarowiez, G., Jacquard, C., Devaux, P., Sangwan, R. S., and Clément, C. 2002. Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Science 162: 843-847.

Xu, Z.H. 1990. Barley anther culture and production of haploids. pp. 125-175. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 12. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Ziauddin, A., Simion, E., And Kasha, K. J. 1992. Improved plant regeneration from wheat anther and barley microspore culture using phenylacetic acid (PAA). Plant Cell Report 11: 489-499.

آدرس نگارندگان:

مهدی خسروشاهلی- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه تبریز.

محمدحسین نقیلو- دانشگاه پیام نور، تاکستان.

احمد یوسفی، فرشاد بختیار و رضا بزرگی‌پور- بخش تحقیقات غلات، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، صندوق پستی ۴۱۱۹، کرج ۳۱۵۸۵.

www.SID.ir