دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی اثر ژنوتیپ، پیش‌تیمارتنشی و محیط‌کشت در باززایی میکروسپورهای جو از طریق کشت بساک

سعیده شیخ‌رضایی[۱] و مهران عنایتی شریعت‌پناهی[۲]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار
۲- دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، (نویسنده مسوول: m_shariatpanahi2002@yahoo.com)
تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۴

چکیده

تولید گیاهان دابلدهاپلوئید یکی از بهترین روش‌های اصلاحی برای دستیابی به لاین خالص است. برای تولید گیاهان دابلدهاپلوئید در گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.) روش کشت بساک از کارآمدترین روش‌ها است. این پژوهش با هدف بررسی اثر ژنوتیپ، پیش‌تیمارهای تنشی و محیط‌کشت بر روی کالوس‌زایی و باززایی بساک‌های جو انجام شد. بساک‌ها از ٦ ژنوتیپ جو شامل هیبریدهای F3 (۲۱۰۷۰ ، ۲۱۰۸۲، ۲۱۰۹۵، ۲۱۰۷٦، ۲۱۰٦۳ و رقم Igri) جداسازی شدند. بساک‌ها در محیط کشت جامد FHG فاقد هورمون و دو نوع محیط‌کشت جامد FHG حاوی هورمون‌های IAA (۲ mgl-1) و BAP (۱ mgl^{-1}) یا 2.4-D (۲ mgl^{-1}) و Kin (۰/۵ mgl^{-1}) کشت داده شدند. اثر پیش‌تیمار سرمایی به تنهایی و همچنین اثر ترکیبی پیش‌تیمارهای گرسنگی و سرمایی بر میزان کالوس‌زایی و باززایی بساک‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصله بیشترین میزان کالوس‌زایی، گیاهچه سبز و آلبینو در ژنوتیپ Igri در محیط‌کشت پایه FHG حاوی IAA (۲ mgl^{-1}) و BAP (۱ mgl^{-1}) به‌دست آمد. در سایر ژنوتیپ‌های پاسخ‌ده بیشترین گیاهچه سبز در ژنوتیپ ۲۱۰۸۲ با پیش‌تیمار سرمایی به مدت ۲۸ روز در محیط‌کشت FHG حاوی هورمون‌های 2.4-D (۲ mgl^{-1}) و Kin (۰/۵ mgl^{-1}) به‌دست آمد. طبق نتایج به‌دست آمده رقم Igri کاملاً پاسخ‌ده، هیبریدهای ۲۱۰۸۲ و ۲۱۰۷٦ کم پاسخ‌ده و سایر ژنوتیپ‌ها سخت پاسخ‌ده بودند.

واژه‌های کلیدی: بساک، جو (*Hordeum vulgare* L.)، دابلدهاپلوئید، لاین خالص، میکروسپور

مقدمه

گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.) جزء اولین گیاهان اهلی و مهم‌ترین گیاهان زراعی در جهان است. با توجه به آمار ارائه شده توسط وزارت جهاد کشاورزی (۱۳۹۰-۱۳۸۹) سطح زیر کشت محصولات زراعی در ایران حدود ۱۲ میلیون هکتار بوده که بر این اساس گیاه جو در رتبه دوم قرار دارد. دابلدهاپلوئیدها برای کاهش دوره اصلاحی و افزایش کارایی انتخاب در برنامه تولید واریته‌های جدید و لاین‌های کاملاً خالص کاربرد دارند (۲۸،۲۶،۴). دابلدهاپلوئیدها می‌توانند در شرایط طبیعی یا در محیط درون شیشه‌ای ایجاد شوند. جنین‌های هاپلوئید در شرایط طبیعی از طریق بکرزایی (پارتنوژنز) و یا حذف کروموزومی پس از تلاقی دور حاصل می‌شوند. روش درون شیشه‌ای شامل کشت تخمدان و تخمک (ژینوژنز) و کشت بساک و میکروسپور (آندروژنز) می‌باشد (۲۶). آندروژنز در برنامه‌های اصلاحی بسیاری از گونه‌ها مورد استفاده قرار گرفته و این امکان را فراهم می‌کند که در کمترین زمان به ژنوتیپ مناسب رسیده و باعث تولید لاین خالص شود (۱۸). روش هاپلوییدی یکی از روش‌هایی است که به‌طور گسترده در غلات خودگرده‌افشان کاربرد دارد (۲). روش‌های تولید گیاه هاپلوئید در جو شامل روش‌های حذف کروموزومی (۸)، کشت بساک (۱۸) و کشت میکروسپور (۱۳) است. میکروسپورها یا دانه‌های گرده نابالغ می‌توانند با کشت بساک و میکروسپور به جنین‌های هاپلوئید تبدیل شوند (۲۴). هدف از کشت بساک، تولید گیاهان هاپلوئید از طریق تقسیمات مکرر میکروسپورهای هاپلوئیدی (n کروموزمی) و تولید جنین از آن‌ها می‌باشد. در فرآیند کشت بساک، تکوین و فعالیت طبیعی سلول میکروسپور برای تبدیل شدن به گامت نر متوقف شده و اجباراً به یک مسیر متابولیکی جدید برای تقسیم رویشی سلول، جهت می‌یابد. در واقع استخراج سلول‌های بی‌شماری به‌نام میکروسپور و خاصیت توت‌پوتنسی سلول گیاهی، اساس کشت بساک را برای تولید گیاهان هاپلوئید تشکیل می‌دهد (۱۷). بافت دیواره اسپروفیتی بساک در روند جنین‌زایی به صورت مفید و یا بازدارنده اثر گذار است (۱۸). دیواره اسپروفیتی بساک ممکن است موادی تولید کند که باعث هدایت کشت میکروسپور در مسیر نامطلوب و ممانعت از جنین‌زایی یا باعث تشکیل کالوس شود (۲). کالـوس‌زایی یـا به‌صورت خودبـه‌خودی و یا از راه تحریک تنظیم کننده‌های رشدی صورت می‌گیرد (۵). از جمله عوامل تاثیرگذار در موفقیت کشت بساک می توان به ژنوتیپ، مرحله برداشت سنبله، مرحله تکوینی میکروسپور، محیط‌کشت مناسب، نوع و مدت زمان پیش‌تیمار و اثرات متقابل آن ها اشاره کرد (۱۸). از جمله فواید کشت بساک ساده‌تر بودن نسبت به روش کشت میکروسپور است (۱۵). با وجود تمام مزایا، هنوز عوامل زیادی وجود دارد که مانع کاربردهای وسیع کشت بساک و میکروسپور در سطح اقتصادی می‌شود، که از جمله می‌توان به میزان پایین فراوانی جنین‌زایی، باززایی و بروز آلبینیسم و همچنین پایین بودن فراوانی مضاعف شدگی خودبه‌خودی کروموزومی در برخی از واریته‌ها اشاره کرد (۲۷). جداسازی بساک‌ها، تیمار استفاده شده برای القا و تراکم اولیه در محیط‌کشت برای رشد جنین‌ها و باززایی گیاهان سبز مهم

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.13.6]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.112]

می‌باشند. فاکتورهای فیزیکی (نظیر طول روز، تشعشع، کیفیت نور، دوره روشنایی و تاریکی، درجه حرارت شب و روز و دی اکسیدکربن) دارای نقش مهمی در آندروژنز می‌باشند (۲۲). تنش‌هایی از قبیل شوک سرمایی (۲۴)، شوک گرسنگی (۲۳) و شوک غذایی به همراه شوک سرمایی (۱۴) برای القای جنین‌زایی میکروسپور جو مورد استفاده محققین متعددی قرار گرفته است. با نظر به وجود وابستگی ژنوتیپی در آندروژنز جو و نیز لزوم افزایش راندمان باززایی، اهداف این پژوهش بررسی پاسخ‌پذیری ژنوتیپ‌های متفاوت جو به کالوس‌زایی میکروسپور در کشت بساک و همچنین مطالعه عوامل موثر بر القاء و فراوانی کالوس‌زایی و باززایی میکروسپورهای جو بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل رقم زمستانه دو ردیفه Igri (ایگری=G1) و نسل F3 ارقام بهاره شش ردیفه (G2=21082، G3=21063، G4=21070، G5=21076، G6=21095) تهیه شده از بخش غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر بود. تمام مراحل کشت در بخش کشت بافت و انتقال ژن پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران مستقر در کرج انجام شده است. بذور در پتری دیش‌های حاوی کاغذ صافی به همراه چند قطره آب مقطر استریل به مدت ۳ الی ۴ روز در دمای ۱± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از جوانه‌زنی به گلدان‌های حاوی خاک مزرعه به همراه پیت و پرلیت به نسبت ۲:۱:۱ به‌ترتیب انتقال داده شدند. بذور بهاره مستقیما به گلخانه انتقال یافتند درحالی که بذور زمستانه ابتدا بهاره سازی (ورنالیزه) شده (به مدت ۵ تا ۶ هفته در فیتوترون با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری) و سپس به گلخانه منتقل شدند. شرایط رشد گیاهچه‌ها در گلخانه به‌صورت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۱ ± ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و رطوبت نسبی ۶۰ الی ۸۰ درصد تنظیم شد. برای بررسی مرحله مناسب کشت از رنگ‌آمیزی DAPI[1] استفاده و سنبله‌هایی که میکروسپور آن‌ها در مرحله اواسط تک‌سلولی تا اواخر تک‌سلولی بودند، برای کشت بساک انتخاب شدند (۲۹). سنبله‌های انتخاب شده قبل از پیش‌تیمار سرمایی، به منظور ممانعت از آلودگی قارچی با اتانول ۷۰٪ ضدعفونی سطحی شدند. پس از اعمال پیش‌تیمار سرمایی (۴ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲۸ روز برای جداسازی بساک، ضد عفونی سنبله‌ها با اتانول ۷۰٪ به مدت ۷۵ و ۹۰ ثانیه و در ادامه شست و شو با آب مقطر استریل (۳ مرتبه به مدت ۳ و ۴ و ۵ دقیقه) انجام شد. سپس بساک‌های جداسازی شده مستقیما به محیط‌کشت انتقال و تیمار مورد نظر اعمال شد.

تیمار گرسنگی و سرمایی

سنبله‌ها برای پیش‌تیمار سرمایی، به مدت ۲۸ روز در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. با اتمام پیش‌تیمار سرمایی بساک‌ها در محیط جامد کشت گردیدند. برای تیمار گرسنگی (مانیتول ۰/۳ مولار)، بساک‌ها پس از جداسازی به محیط حاوی مانیتول ۰/۳ مولار در پتری‌دیش‌های با اندازه ۱/۵×۶ سانتی‌متری منتقل و در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز قرار داده شدند. سپس پتری‌دیش‌ها به انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انتقال داده شدند.

ترکیب محیط‌های کشت

برای تنش گرسنگی از محیط حاوی مانیتول ۰/۳ مولار استفاده شد. برای القای کالوس‌زایی در کشت بساک از محیط‌کشت FHG (۹) فاقد هورمون و دو نوع محیط‌کشت پایه جامد FHG شامل محیط‌کشت اول (M1) (FHG به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون IAA با pH برابر با ۵/۸ و محیط‌کشت دوم (M2) (FHG به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون KIN با pH برابر با ۵/۸ و ماده جامد کننده ژل‌رایت استفاده شد. محیط باززایی شامل، محیط پایه MS (۲۱) به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز با pH برابر با ۵/۸ و ماده جامد کننده فیتاژل مشاهده شد.

باززایی گیاهچه از کالوس‌های جنین‌زا

کالوس‌ها به محیط باززایی منتقل و در ۲۵ درجه سانتی‌گراد در فیتوترون با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. سپس با مشاهده گیاهچه‌های سبز و آلبینو، گیاهچه‌های (شکل ۳) سبز به لوله‌های آزمایش انتقال داده شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایشات به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و هر تکرار با ۳ پتری دیش بررسی شد. در هر پتری‌دیش ۲۰ بساک قرار داده شده و کالوس‌ها پس از حدود ۳ تا ۵ هفته، به محیط باززایی منتقل شدند و محاسبات آماری انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل میزان کالوس‌زایی، درصد گیاهچه سبز و درصد گیاهچه آلبینو بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن (α ≤۱٪) با نرم‌افزار SAS انجام گردید.

نتایج و بحث

نتایج بررسی سیتولوژیکی در شش ژنوتیپ جو مورد استفاده در این تحقیق شامل هیبریدهای F3 (۲۱۰۸۲، ۲۱۰۹۵، ۲۱۰۷۶، ۲۱۰۷۰، ۲۱۰۶۳ و رقم ایگری) پس از رنگ‌آمیزی با ماده رنگی اختصاصی هسته (DAPI) نشان داد که بهترین مرحله در کشت بساک جو از اواسط مرحله تک‌سلولی تا اواخر مرحله تک‌سلولی است که با نتایج ارائه شده از سوی لازاردو و همکاران (۱۸) کاشا و همکاران (۱۴) مطابقت داشت. مرحله مناسب از لحاظ شکل ظاهری اکثراً زمانی بود که سنبله کامل باز نشده و ریشک‌ها حدود ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر از سنبله خارج شده بود. استفاده از سنبله‌های ساقه اصلی در کشت میکروسپور و بساک پاسخ‌دهی بهتری داشت. تنش‌های محیطی از جمله آفات، بیماری‌ها و درجه حرارت گلخانه بر روی مراحل نموی میکروسپور موثر بود.

1- 4,6-diamidino-2-phenylindole

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.13.6]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.112]

جدول ۱- تجزیه واریانس سه عامله شامل محیط‌کشت (M1 و M2)، پیش‌تیمار (سنبله‌های فاقد پیش تیمار= P1، پیش تیمارگرسنگی= P2 و پیش تیمار سرمایی سنبله به مدت ۲۸ روز= P3) و ژنوتیپ (G1=Igri, G2=21082 , G3=21076) بر تعداد کالوس و درصد باززایی گیاهچه سبز و آلبینو

Table 1. Analysis of variance of three factors including culture media (M1, M2), Pre-treatment (P1= spikes without Pre-treatment, P2= starvation Pre-treatment and P3= cold pre-treatment for 28 days) and genotype (G1=Igri, G2=21082 , G3=21076) on callus number and the regeneration rate of green and albino plantlets

		کالوس زایی		گیاهچه سبز		گیاهچه آلبینو	
منابع تغییر	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)
M	۱	۳۹۲/۹۲	۳۹۲/۹۲**	۲۶۳/۲۳	۲۶۳/۲۳**	۴۵۳/۱۳	۴۵۳/۱۳**
P	۲	۱۶/۴۶	۸/۲۳ ns	۴۲/۲۸	۲۱/۱۴ns	۰/۱۷	۰/۰۸ ns
G	۲	۲۴۰۷/۰۱	۱۲۰۳/۵۱**	۶۷۸۲/۷۷	۳۳۹۱/۳۸**	۷۲۰۰/۰۷	۳۶۰۰/۰۳**
M × P	۲	۲۲۸۳/۶۸	۱۱۴۱/۸۴**	۳۸۶۴/۰۰	۱۹۳۲/۰۰**	۳۶۷۸/۷۵	۱۸۳۹/۳۷**
M × G	۲	۳۱۰/۹۰	۱۵۵/۴۵**	۹۹۰/۰۴	۴۹۵/۰۲**	۱۳۲۴/۹۶	۶۶۲/۴۸**
P × G	۴	۵۱/۰۳	۲/۷۵ ns	۸۶/۳۷	۲۱/۵۹ ns	۹۶/۷۴	۲۴/۱۸ ns
M × P × G	۴	۲۱۴۷/۱۴	۵۳۶/۷۸**	۵۸۷۹/۰۹	۱۴۶۹/۷۷**	۵۹۷۱/۸۵	۱۴۹۲/۹۶**
خطا	۹۰	۱۴۴۲/۶۶	۱۶/۰۲	۳۲۸۴/۳۷	۳۶/۴۹	۲۸۷۹/۴۸	۳۱/۹۹
کل	۱۰۷	۹۰۵۱/۸۵		۲۱۱۹۲/۱۸		۲۱۶۰۵/۱۷	

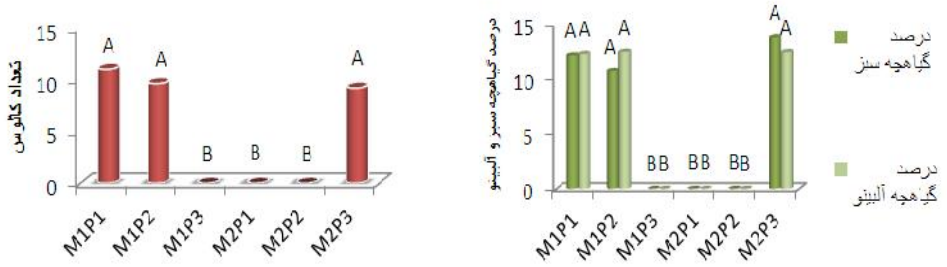
استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۹۰ ثانیه و سه مرتبه شست و شو با آب مقطر استریل به مدت ۳، ۴ و ۵ دقیقه بهترین زنده‌مانی و کمترین آلودگی را داشت که با نتایج جاکاردا و همکاران (۱۲) مطابقت داشت. در حالت طبیعی میکروسپورها پس از طی مسیر گامتوفیتی به دانه گرده تبدیل می‌شوند. از عوامل موثر در تغییر مسیر گامتوفیتی به اسپروفیتی تنش‌های سرمایی و گرسنگی هستند (۲۵). از جمله تنش گرسنگی حاوی مانیتول، ژن‌هایی را القا می‌کند که باعث تغییر مسیر گامتوفیتی به اسپروفیتی می‌شود (۱۱). نتایج مربوط به مراحل مختلف کشت بساک (کالوس‌زایی و باززایی) به شرح زیر است.

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل دوگانه پیش‌تیمار و محیط‌کشت در سطح خطای ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد. مقایسه میانگین‌ها (شکل ۱) مربوط به اثر متقابل پیش‌تیمار و محیط‌کشت نشان داد که میزان کالوس‌زایی و درصد باززایی گیاهچه سبز و آلبینو در محیط M1 فاقد پیش‌تیمار و پس از آن با پیش‌تیمار گرسنگی و در محیط‌کشت M2 با پیش‌تیمار سرمایی ۲۸ روز سنبله اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها داشت. بیشترین درصد گیاهچه سبز و کمترین درصد گیاهچه آلبینو در محیط‌کشت M2 با پیش‌تیمار سرمایی ۲۸ روز سنبله مشاهده شد.

استفاده از هورمون به همراه پیش‌تیمار گرسنگی (مانیتول ۰/۳ مولار) و سرما باعث تحریک تقسیم در میکروسپورها شده و آندروژنز را در ارقام کم‌پاسخ‌ده افزایش داد. طبق گزارش‌های گری‌باودو و همکاران (۷) در کشت بساک تولید کالوس طبیعی است. کالوس‌زایی یا به‌صورت خودبه‌خودی یا با تحریک تنظیم‌کننده‌های رشد صورت می‌گیرد (۵). از کالوس‌های باززا شده می‌توان گیاه هاپلوئید تولید کرد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت.

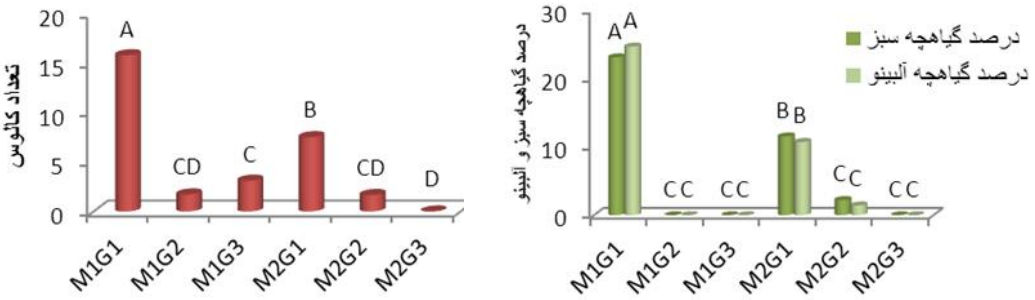
نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر متقابل دوگانه ژنوتیپ و محیط‌کشت نشان داد که دارای اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۱ درصد می‌باشد. مقایسه میانگین (شکل ۲) نشان داد که ژنوتیپ Igri در محیط‌کشت M1 اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها داشت، بیشترین میزان کالوس‌زایی و بیشترین درصد باززایی گیاهچه سبز و آلبینو مشاهده شد (شکل ۳).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.13.6]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.112]



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل محیط‌کشت (M1 و M2) و پیش‌تیمار (سنبله‌های فاقد پیش تیمار= P1، پیش تیمارگرسنگی= P2 و سرمایی سنبله به مدت ۲۸ روز= P3) بر تعداد کالوس و درصد باززایی گیاهچه سبز و آلبینو

Figure 1. Mean comparison of interaction effect of culture media (M1, M2) and Pre_treatment (P1= spikes without Pre_treatment, P2= starvation Pre-treatment and P3= cold pre-treatment for 28 days) on callus number and the regeneration rate of green and albino plantlets.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل محیط‌کشت (M_1 و M_2) و ژنوتیپ (G_1=Igri, G_2=21082, G_3=21076) بر تعداد کالوس و درصد باززایی گیاهچه سبز و آلبینو

Figure 2. Mean comparison of interaction effect of culture media (M1, M2) and and genotype (G1=Igri, G2=21082 , G3=21076)) on callus number and the regeneration rate of green and albino plantlets.

پس از آن ژنوتیپ Igri در محیط‌کشت M2 بیشترین میزان کالوس‌زایی و درصد گیاهچه سبز و آلبینو را تولید کرد. سپس ژنوتیپ ۲۱۰۷۶ در محیط‌کشتM1 و ژنوتیپ ۲۱۰۸۲ در محیط‌کشتM1 و M2 قادر به کالوس‌زایی بودند. اما باززایی گیاهچه فقط در ژنوتیپ ۲۱۰۸۲ در محیط‌کشت M2 امکان‌پذیر بود. ژنوتیپ ۲۱۰۷۶ در محیط کشت M2 قادر به کالوس‌زایی و تولید گیاهچه نبود. شریعت‌پناهی و همکاران (۲۵) در گندم بر این عقیده‌اند که وجود هورمون در محیط القای مسیر اسپوروفیتی میکروسپور ضروری می‌باشد و بیشترین میزان باززایی گیاهچه کامل و سبز زمانی به‌دست می‌آید که جنین‌ها در محیط حاوی هورمون به میزان مناسب رشد یابند که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت داشت. زیرا در محیط فاقد هورمون هیچ یک از ژنوتیپ‌ها قادر به کالوس‌زایی و باززایی نبودند.

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل ژنوتیپ و پیش‌تیمار دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند. به‌طوری که رقم Igri در تمام پیش تیمارها باززایی و کالوس زایی بهتری را نشان داد.

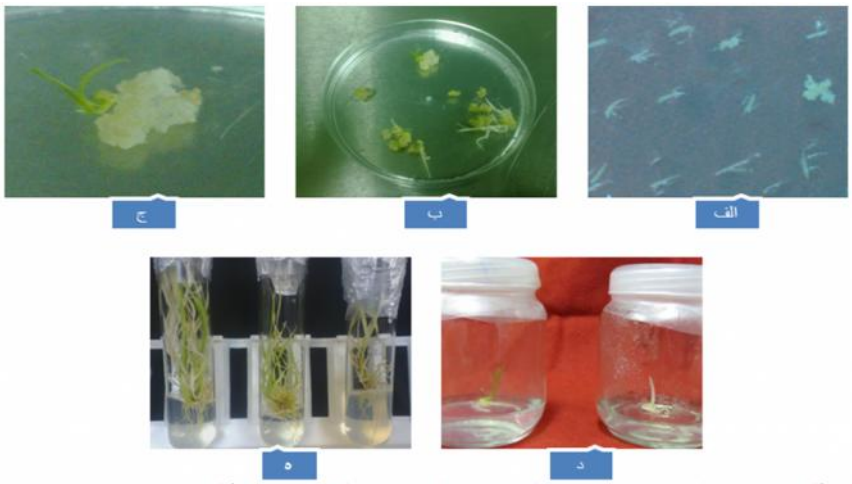
طبق نتایج به‌دست آمده رقم Igri در محیط‌کشت اول (M1) حاوی هورمون‌های IAA (mgl^{-1}[1] ۲) و BAP (mgl^{-1} ۱) کاملاً پاسخده و هیبریدهای ۲۱۰۸۲ و ۲۱۰۷۶ کم پاسخده و سایر ژنوتیپ‌ها سخت پاسخده بودند. رقم Igri دو ردیفه زمستانه و سایر ارقام شش ردیفه بهاره بودند و این مسئله بر روی پاسخ‌پذیر بودن ارقام موثر است (۱۹). زمان برداشت سنبله‌ها، تنش‌های محیطی و تیمارهای مورد استفاده در پاسخ‌پذیری ژنوتیپ‌ها موثر بوده‌است. استفاده از هورمون‌ها از جمله BAP, 2,4-D، IAA, Kin نیز با غلظت های کم و زیاد باعث افزایش جنین‌زایی و باززایی گیاهچه شده و در پاسخ‌پذیری بیشتر موثر است.

نتایج حاصل از نوع پیش‌تیمار و محیط‌کشت مورد استفاده در این آزمایش با گزارش لازاریدو و همکاران (۱۸) مطابقت داشت. یولازاریدو و همکاران (۱۹) زمان و همکاران (۳۰) دلیل کم‌پاسخده بودن گیاهان به کشت بساک و باززایی گیاهچه سبز را تفاوت در ژنوتیپ‌ها بیان کردند. آساکاوی‌سیوته (۳) گزارش داد که پیش‌تیمار بساک باعث تغییر مسیر گامتوفیتی به اسپروفیتی می‌شود. درگزارش منتشر شده از سوی کروزکوزکه و همکاران (۱۶) استفاده از پیش‌تیمار سرما به همراه گرسنگی (مانیتول۰/۳ مولار) در کالوس زایی و جنین‌های باززا شده اثر زیادی داشت و بیشترین تعداد کالوس‌زایی و جنین‌های باززا شده به گیاهچه

1- Milligrams per liter

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.13.6]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.112]

سبز از پیش‌تیمار مانیتول در کشت بساک‌های جو گزارش شد. طبق نتایج به‌دست آمده از گزارشات آیونسی و همکاران (۱) در محیط‌کشت حاوی هورمون، ساختارهای چند سلولی بهتر زنده می‌مانند و تقسیمات خود را تا رسیدن به کالوس و جنین بهتر ادامه می دهند.



شکل ۳- الف)کالوس‌های تشکیل شده از کشت بساک در محیط‌کشت القای کالوس‌زایی، ب) کالوس‌های انتقال یافته به محیط‌کشت باززایی گیاهچه، ج) شروع باززایی کالوس، د) گیاهچه سبز و آلبینو باززایی شده، ه) گیاهچه سبز باززایی شده.

Figure 3. A. Callus formation from anther culture in callus induction medium. B. Callus transferred to plant regeneration medium, C. Green and albino plantlet regeneration. D. Regenerated green plantlet.

طبق نتایج به‌دست آمده در این آزمایش محیط‌کشت‌های پاسخ‌ده حاوی هورمون اکسین و سایتوکینین هستند و محیط فاقد هورمون قادر به تولید کالوس و گیاهچه سبز و آلبینو نبود. در ارقام سخت‌پاسخ‌ده باززایی گیاهچه سبز در محیط کشت اول (M1) حاوی هورمون‌های IAA (۲ mgl^{-1}) و BAP (۱ mgl^{-1}) بهترین پاسخ‌دهی را داشت. طبق گزارش منتشر شده از سوی کریستو و همکاران (۶) دلیل استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد از جمله اکسین و سایتوکینین را به سبب اثر بر روی القا و باززایی گیاهچه مطرح کردند. لی و دواکس (۲۰) در مطالعات خود گزارش دادند که تنوع ژنوتیپی بیشتر در باززایی گیاهچه بروز می‌کند. با این حال محیط‌کشت نیز می‌تواند عامل مهم و تاثیرگذار در باززایی گیاهچه و تولید گیاهچه سبز باشد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار است که تحت حمایت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران در قالب پروژه شماره ۸۸۰۱۴-۰۵-۰۵-۲ انجام شد. بدین‌وسیله از اساتید و کارشناسان پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به‌دلیل همکاری فعال در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Aionesei, T.E., A. Touraev and E. Heberle-Bors. 2005. Pathways to microspore embryogenesis. In: Palmer, C.E., W.A. Keller and K.J. Kasha (eds.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, 56: 11-34., Springer Berlin Heidelberg.
2. Asakaviciute, R. and I. Pasakinskiene. 2006. Androgenesis in another culture of Lithuanian spring barley cultivars. Biologija, 4: 37-40.
3. Asakaviciute, R. 2008. Androgenesis in another culture of Lithuanian spring barley (*Hordeum vulgare* L.) and potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. Turkish Journal of Biology, 32: 155-160.
4. Castillo, A. M., M.P. Vallés and L. Cistué. 2000. Comparison of anther and isolated microspore cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium. Euphytica, 113: 1-8.
5. Chawla, H.S. 2002. Introduction to plant biotechnology. Science Publishers, Inc. UK.
6. Cistue, L., M. Soriano, A.M. Castillo, M.P. Valles, J.M. Sanz and B. Echavarri. 2006. Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture, Plant Cell Reports, 25: 257-264.
7. Gribaudo, I., G. Gambino and R. Vallania. 2004. Somatic embryogenesis from grapevine anthers: the optimal developmental stage for collecting explants. American Journal of Enology & Viticulture, 55: 427-430.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.13.6]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.112]

8. Hayes, P., A. Corey and J. DeNoma. 2003. Doubled haploid production in barley using the *Hordeum bulbosum* (L.) technique. In: Maluszynski, M., K.J. Kasha, B.P. Forster and I. Szarejko (eds.) Doubled haploid production in Crop Plants, 5-14 pp., A Manual. Kluwer, Dordrecht Boston London.
9. Hunter, C.P. 1988. Plant regeneration from microspores of barley (*Hordeum vulgare*). PhD Thesis, Ashford Kent University of, London, Wye College.
10. Hou, Y., A.G. Armin and X.W. Deng. 1993. A new class of Arabidopsis constitutive Photomorphogenic genes involved in regulating cotyledon development. Plant Cell, 5: 329-339.
11. Indrianto, A., E. Heberle-Bors and A. Touraev. 1999. Assessment of various stresses and carbohydrates for their effects on their induction of embryogenesis in isolated wheat microspors. Plant Science, 143: 71-79.
12. Jacquard, C., R. Asakaviciute, A.M. Hamalian, R.S. Sangwan, P. Devaux and C. Clement. 2006. Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism. Plant Cell Reports, 25: 375-381.
13. Kasha, K.J., E. Simion, R. Oro and Y.S. Shim. 2003. Barley isolated microspore culture protocol. In: Maluszynski. M., K.J. Kasha, B.P. Forster and I. Szarejko (eds.) Doubled haploid production in Crop Plants, A Manual, Dordrecht, 83-94 pp., The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
14. Kasha, K.J., E. Simion, R. Oro, Q.A. Yao, T.C. Hu and A.R. Carlson. 2001. An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley. Euphytica, 120: 379-385.
15. Kondić-Špika, A.D., B.D. Kobiljski and N.S. Hristov. 2008. Efficiency of another culture technique in the production of wheat double haploids. Matica Srpska Journal for Natural Sciences, 115: 35-40.
16. Kruczkowska, H., H. Pawlowska and B. Skucinska. 2002. Influence of anther pretreatment on the efficiency of androgenesis in barley. Journal of Applied Genetics, 43: 287-296.
17. Kumar, D. 1995. An Introduction to plant tissue culture. New central Book. Agency LTD, 185 pp.
18. Lazaridou, T., I. Sistanis, A. Lithourgidis, H. Ambrus and D. Roupakias. 2011. Response to in-vitro anther culture of F3 families originating from high and low yielding F2 barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. Australian Journal of Crop Science, 5: 265 pp.
19. Lazaridou, T.B., A.S. Lithourgidis, S.T. Kotzamanidis and D.G. Roupakias. 2005. Another culture response of barley genotypes to cold pretreatments and culture media. Russian Journal of Plant Physiology, 52: 696-699.
20. Li, H. and P. Devaux. 2001. Enhancement of microspore culture efficiency of recalcitrant barley genotypes. Plant Cell Reports, 20: 475-481.
21. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
22. Pierik, R.L.M. 1998. In vitro culture of higher plants, Department of Horticulture, Wageningen Agricultural University. The Netherland, 226: 25-40.
23. Pulido, A., A. Hernando, F. Bakos, M. Endez, M. Devic, B. Barnab and A. Olmedilla. 2006. Hordeins are expressed in microspore-derived embryos and also during male gametophytic and very early stages of seed development. Journal of Experimental Botany, 57: 2837-2846.
24. Rodriguez-Serrano, M., I. Barany, D. Prem, M.J. Coronado, J.C. Risueno and P.S. Testillano. 2011. NO, ROS, and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. Journal of Experimental Botany, 63: 2007-2024.
25. Shariatpanahi, M.E., K. Belogradova, L. Hessamvaziri, E. Heberle-Bors and A. Touraev. 2006. Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (Triticum aestivum L.) microspores without stress pretreatment. Plant Cell Reports, 25: 1294-1299.
26. Shariatpanahi, M.E., A.M. Shakib and D.E. Meybodi. 2012. Haploid and its applications in genetics and plant breeding. ABRII Publication, Iran, 276 pp (In Persian).
27. Soriano, M., L. Cistué, M.P. Vallés and A.M. Castillo. 2007. Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 91: 225-234.
28. Thomas, W.T.B., B.P. Forster and B. Gertsson. 2003. Doubled haploids in breeding. In Doubled Haploid Production. In: Crop Plants (pp: 337-349). Springer Netherlands. A manual. Dordrecht. 337-349 pp., The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
29. Vergne, P., I. Delvallee and C. Dumas. 1987. Rapid assessment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permealization Stain Technol, 62: 299-304.
30. Zamani, L., E. GouliVavdinoudi, G. Kovacs, I. Xynias, D. Roupakias and B. Barnabas. 2003. Effect of parental genotypes and colchicine treatment on the androgenic response of wheat F3 hybrids. Plant Breeding, 122: 314-317.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.13.6]

[DOI: 10.29252/jcb.8.18.112]

Effect of Genotype, Stress Pre-Treatment and Culture Medium on plant Regeneration of Barley Microspores Via Anther Culture

Saeedeh Sheikhrezaee[1] and Mehran Enayati Shariatpanahi[2]

1- Graduated M.Sc., Islamic Azad University Sabzevar Branch
2- Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)
(Corresponding author: m_shariatpanahi2002@yahoo.com)
Received: July 26, 2014 Accepted: October 26, 2014

Abstract

Doubled haploid production is one of the best breeding methods to produce homozygous (pure) lines. Microspore culture technique is the most efficient method for production of doubled haploid plants. This research was carried out to study the effect of genotypes, stress pre-treatments and culture media on the callus induction and plant regeneration from microspores of anthers in barley (*Hordeum vulgare* L.). Anthers were isolated from six barley genotypes including F3 hybrids: 21070, 21082, 21095, 21076, 21063, and cultivar Igri). Anthers were placed on the solid FHG medium without hormone or containing IAA (2 mgl^{-1}) and BAP (1 mgl^{-1}) or 2.4-D (2 mgl^{-1}) and Kin (0.5 mgl^{-1}). In addition, the effect of cold stress alone and the combination of cold and starvation treatments were investigated on callus induction and regeneration frequency. According to the results obtained, the highest number of callus formation and regeneration percentage was induced in genotype Igri when FHG medium supplemented by IAA (2 mgl^{-1}) and BAP (1 mgl^{-1}) without any pre-treatment was applied. The results showed that cultured anthers in genotype 21082 induced the highest green regenerates when pre-treated with cold stress for 28 days cultured on FHG medium supplemented by 2.4-D (2 mgl^{-1}) and Kin (0.5 mgl^{-1}). In conclusion, genotypes tested can be categorized to three groups including responsive (Igri), low–responsive (21082-21076) and recalcitrant (the rest genotypes).

Keywords: Anther, Barley (*Hordeum vulgare* L.), Doubled haploids, Homozygous line, Microspore

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.13.6]

[DOI: 10.29252/jcb.8.18.112]