انواع کالوس و باززایی گیاه از آنها در گونه‌های جو (*Hordeum* sp.)

سید رضا طبایی عقدایی

عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، بخش تحقیقات ژنتیک و فیزیولوژی

چکیده

در این مطالعه کالوس از رویانهای رسیده و کامل و رویانهای نارس (Immature embryos) یک گونه جو وحشی (*Hordoum murinum*) و جو زراعی (*H. vulgare*) تولید گردید. در رویانهای بالغ کشتهایی با بافت نرم، آبکی و شفاف و با مشخصات کالوسهای غیر رویان‌زا (Non-embryogenic calli) تشکیل شد. رشد چنین کشتهایی بسیار کند بود و بدون ایجاد گیاه تنها تعدادی ریشه در آنها تولید گردید. کشتهای به دست آمده از رویانهای نارس ابتدا خصوصیات کالوسهای غیر رویان‌زا را نشان دادند که بسیاری از آنها از رشد کندی برخوردار بودند. بر روی این کالوسها در جو زراعی کالوسهایی با رشد سریع بوجود آمد که بافتی به نسبت سخت، خشک و دانه دانه و یا با قطعات کوچک داشته و به رنگ زرد روشن تا سفید بودند. بر روی این کشتها اندامهای برگ مانندی ظاهر شده و قسمت هوایی و ریشه بر روی محیط کشت باززایی گردید. گیاهچه‌های بوجود آمده پس از انتقال به خاک نیز به رشد خود ادامه دادند و به مرحله بلوغ رسیده و بذر در آنها تولید گردید.

واژه‌های کلیدی: کالوس، باززایی، رویان بالغ، رویان نارس، کالوس غیر رویان‌زا، جو زراعی (*Hordoum murinum*) و جو وحشی (*H. murinum*).

مقدمه

استفاده از بیوتکنولوژی در مطالعات فیزیولوژیکی، ژنتیکی-اصلاحی و سایر حوزه‌های علوم گیاهی در بیشتر موارد به باززایی گیاه[۱] یعنی تولید گیاه کامل[۲] از یک سلول و یا بافت کشت شده با روش درون شیشه‌ای[۳] بستگی دارد. پی بردن به قابلیت ایجاد گیاه از یک سلول[۴] تحول عظیمی در زیست شناسی و کاربرد بیوتکنولوژی در این حوزه از علم به وجود آورده است، به طوری که باززایی موفقیت‌آمیز گیاه از سلولهای منفرد و پروتوپلاست[۵]، استفاده تلفیقی کشت بافت و بیولوژی مولکولی را به عنوان اجزاء مهم بیوتکنولوژی در اصلاح نباتات امکانپذیر ساخته است. متاسفانه مشکلات زیادی نیز در استفاده از کشت بافت سلول در گونه‌های مهم اقتصادی وجود دارند. موانع موجود می‌بایست برطرف گردند تا روشهای مهندسی ژنتیک نیز به راحتی و با کارایی مورد قبول برای گونه‌های مهم گیاهی قابل استفاده واقع شوند. اگرچه کشت کالوس و سوسپانسیونهای سلولی با قابلیت باززایی در تعدادی از گونه‌های گندمیان انجام گرفته است (Vasil، ۱۹۸۸؛ Shatters و همکاران، ۱۹۹۴؛ Shayakhmetov و Shakirova، ۱۹۹۶)، اما همچنان مشکلاتی در باززایی گیاهان این خانواده وجود دارند. در کشت بافت گندمیان حداقل دو نوع کالوس مشاهده می‌گردد که عبارتند از کالوسهای رویان‌زا و غیر رویان‌زا (Heyser و Nobors، ۱۹۸۲؛ Nabors و همکاران، ۱۹۸۳). کالوسهای رویان‌زا می‌توانند گیاه کامل تولید نموده که پس از انتقال آنها به محیط کشت باززایی، سلولهای آنها متمایز شده و یک یا چند گیاه از هر کالوس بوجود می‌آید (Vasil، ۱۹۸۷؛ Denchev و Conger، ۱۹۹۴؛ Bajaj و Rajam، ۱۹۹۵؛ Kharinarian و همکاران، ۱۹۹۶). قابلیت باززایی گیاه از کالوس رویان‌زا را می‌توان از طریق انتقال منظم و به موقع

1- Plant regeneration
2- Whole plant
3- *In vitro*
4- Cellular totipotency
5- Protoplast

کالوس به محیط کشت تازه و انتخاب مستمر آنها را قبل از انجام هر بازکشت حفظ نمود (Ozias-Akins و Vasil، ۱۹۸۲؛ Sears و Deckard، ۱۹۸۲؛ He و همکاران، ۱۹۸۶؛ Wernicke و Malkovits، ۱۹۸۶). با افزایش سن کالوسها امکان تمایز آنها کاهش یافته و حفظ قابلیت رویان‌زایی در سیستمهای کشت بافت برای مدت زمان طولانی بسیار دشوار است (Vasil، ۱۹۸۷). برای مثال، توانایی باززایی در کالوسهای بدست آمده از اسکوتلوم[۱] گندم پس از ۵ ماه بازکشت کاهش یافت (Ozias-Akins و Vasil، ۱۹۸۲). غلظت هورمون تنظیم کننده رشد در محیط کشت مهمترین عامل کنترل کننده رشد و باززایی در کالوس به شمار می‌رود و اولین بار Skoog و Miller (۱۹۵۷) با پی بردن به آن توانستند باززایی را در کشتهای درون شیشه‌ای القاء نمایند. بنابراین، محیط باززایی ممکن است عاری از هورمون، یا محیط کشت حاوی سیتوکنین[۲] و حاوی غلظت کمی از اکسین[۳] باشد (Scott و همکاران، ۱۹۹۰). به نظر می‌رسد که برای باززایی در کالوس گندمیان در مقایسه با سایر گیاهان میزان کمتری هورمون سیتوکینین در محیط باززایی لازم باشد (Thorpe، ۱۹۸۲). باززایی گیاه از کالوس می‌تواند طی فرایند رویان‌زایی[۴] صورت گیرد که در آن رویان غیر زیگوتی[۵] با تشکیل همزمان قسمت هوایی[۶] و ریشه بوجود می‌آید. پس از تشکیل برگ و ریشه، گیاهان باززایی شده به گلدانهای حاوی ورمیکولایت منتقل می‌گردند. گیاهان بدست آمده از کشتها به یک محیط با رطوبت کافی نیاز دارند تا پس از انتقال از محیط کشت، فرصت سازگاری[۷] را با شرایط جدید داشته باشند (Sears و Deckard، ۱۹۸۲).

1- Scutellum
2- Cytokinin
3- Auxin
4- Embryogenesis
5- Embryoid
6- Shoot
7- Acclimatization

مواد و روشها

از رویانهای رسیده و نارس جو وحشی و جو زراعی به عنوان جداکشت[1] برای تولید کالوس استفاده گردید. کشت بافت در محیط کشت MS (Murashigo و Skoog، ۱۹۶۲) و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انجام گرفت. در محیط کشت مقدار ۳ میلیگرم در لیتر هورمون 2,4-D بکار برده شد. همچنین از ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۱۵۰ میلیگرم در لیتر آسپاراژین[2]، ۷۵۰ میلیگرم در لیتر گلوتامین[3] (Lazzerie و همکاران، ۱۹۹۱) و ویتامینهای B5 Gamborg's براساس توصیه Gamborg و همکاران (۱۹۶۸) در محیط کشت فوق استفاده گردید. سپس به منظور جامد نمودن محیط کشت به میزان ۸ گرم در لیتر آگار (آگار نوع A، Sigma) به آن افزوده و pH محیط کشت را به ۵/۸ رسانیده و در درجه حرارت ۱۲۰ درجه سانتیگراد و فشار ۱/۲-۱ بار به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه اتوکلاو نموده و مورد استفاده قرار گرفت.

چهار هفته پس از تشکیل کالوس، و تحت شرایط سترون، وزن تر آنها تعیین گردید. یک ماه بعد نیز وزن و درصد رشد آنها به صورت زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد رشد کالوس} = \frac{\text{تغییر وزن تر کالوس}}{\text{وزن تر اولیه کالوس}} \times ۱۰۰$$

در کشتهای بدست آمده از رویانهای نارس جو زراعی، کالوسهای با بافت به نسبت سخت فشرده زرد تا سفید رنگ را از کالوسهای با بافت نرم و آبدار جدا نموده و بازکشت انجام شد. تعداد رویانهای نارس تشکیل دهندهٔ کالوسهای نوع اول (با مشخصات کالوسهای رویانزا (E)) یادداشت گردید. بازکشتها در فاصله‌های ۴ هفته‌ای انجام گرفت. میزان رشد هر دو نوع کالوس مذکور در ۱۰ تکرار به روش فوق تعیین گردید. همچنین

1- Explant
2- Asparagine
3- Glutamine

درصد وزن خشک هر نوع از کالوسها در ۱۰ تکرار و به صورت زیر تعیین شد:

$$\text{درصد ماده خشک} = \frac{\text{وزن خشک کالوس}}{\text{وزن تر}} \times ۱۰۰$$

پس از ظهور آثار شاخ و برگ (Shoot) بر روی کالوسهای بدست آمده از رویانهای نارس جو، کالوسها به محیط کشت حاوی غلظت پایین‌تر اکسین (محیط کشت MS + ۰/۵ میلیگرم در لیتر 2,4-D) منتقل گردید. پس از آنکه ریشه و برگها شروع به تشکیل نمودند، کالوسها در محیط کشت بدون 2,4-D بازکشت شدند. سپس گیاهچه‌های دارای ریشه و بخش هوایی به خاک منتقل شدند. گلدانهای حاوی گیاهچه‌ها با ورقه‌های نازک پلاستیکی به منظور حفظ رطوبت بالا پوشانده شد. همچنین عمل سازگار نمودن تدریجی گیاهان باززایی شده از کالوس با محیط جدید با ایجاد منافذی در ورقه‌های پلاستیکی فوق و افزایش منافذ و سپس برداشتن ورقه مذکور پس از ۳-۲ هفته، انجام گرفت. با توجه به اینکه داده‌های مربوط به میزان رشد، و ماده خشک کالوسها به ترتیب بیش از ۷۰ درصد و کمتر از ۳۰ درصد بودند، تبدیل داده‌ها [1] انجام و تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین بعمل آمد.

نتایج

کالوسهای ایجاد شده از رویانهای بالغ و رسیده جو از هر دو جو وحشی و زراعی بافتی نرم و ظاهری شفاف و آبدار داشته و توانایی تولید گیاه و حتی برگ نیز ندارند و مشخصات کالوسهای غیر رویانزا (NE) را از خود نشان دادند (شکل شمارهٔ ۱).

رویانهای نارس جو وحشی و جو زراعی در محیط کشت بکار برده شده کالوس تولید نمودند. حدود ۵۰/۶ درصد از کالوسهای ایجاد شده در جو زراعی بافتی فشرده داشته و

1- Data transformation

در بعضی از قسمتها دانه دانه و به رنگ سفید یا زرد تا زرد روشن بودند (شکل شمارهٔ ۲). در بعضی از رویان‌ها نیز نخست کالوسهایی با بافت نرم و آبدار تشکیل شدند (شکل شمارهٔ ۳). این نوع کالوسها به کندی رشد نموده و سلوهای طویل و حجیم با واکوئولهای بزرگ داشتند. پس از ۲ تا ۳ بار بازکشت، کالوسهایی با بافت فشرده و یا دانه دانه و سفیدرنگ بر روی کشتهای فوق ظاهر گردیدند (شکل شمارهٔ ۳). ادامه رشد و گزینش کالوسهای با مشخصات رویانزا (E) به دستیابی و تکثیر کشتهایی منجر گردید که از توده‌های کوچک با بافت به نسبت سخت و دانه دانه تشکیل یافته بودند (شکل شمارهٔ ۴).

مقایسه بین مشخصات دو نوع کالوس فوق نشان دهندهٔ رشد سریعتر و ماده خشک بیشتر کالوسهای سخت و دانه دانه نسبت به کشت‌های نرم و آبدار بود (جدول شمارهٔ ۱).

بر روی کشتهای با مشخصات کالوسهای رویانزا اندامهای برگ مانند تشکیل گردید (شکل شمارهٔ ۵). پس از انتقال این کشتها به محیط کشت حاوی غلظت پایین هورمون (۰/۵ میلیگرم در لیتر 2,4-D)، اندامها شروع به تشکیل نموده و بعد در محیط کشت فاقد هورمون فوق ریشه و اندام‌های هوایی بطور کامل تشکیل شدند. در حدود ۳۱ درصد از کل کالوسهای تولید شده از رویانهای نارس قادر به باززایی و تولید گیاه بودند که در میان گیاهان باززایی شده تعدادی گیاهچه‌های بدون کلروفیل[1] نیز مشاهده گردید (شکل شمارهٔ ۶). گیاهچه‌های باززایی شده در ظرفهای بزرگتر با سرعت بیشتری در محیط کشت عاری از هورمون ادامه رشد داده (شکل شمارهٔ ۷)، و پس از انتقال به خاک، گیاهچه‌های سبز بدون هیچ وقفه‌ای به رشد خود ادامه داده (شکل شمارهٔ ۸) و به مرحله بلوغ و تولید بذر رسیدند (شکل شمارهٔ ۹). کالوسهای ایجاد شده از رویانهای بالغ و

1- Albino

رویانهای نارس جو وحشی قادر به ادامه رشد به مدت طولانی در محیط کشت نبودند و ۶-۵ هفته پس از تشکیل، قهوه‌ای شده و از بین رفتند. در جو زراعی اگرچه با افزایش سن کالوسها قدرت رویانزایی در آنها کاهش یافت، اما کالوسهای بدست آمده از این گیاه توانستند بیش از ۳ سال در محیط کشت تازه (حاوی ۳ میلیگرم در لیتر 2,4-D) به رشد عادی ادامه دهند.

بحث

انتخاب کالوس با خصوصیات مطلوب و مورد نظر یکی از عوامل مهم در ایجاد و برخورداری از یک سیستم کشت بافت با کارآیی کافی و کاربرد مناسب به شمار می‌رود. کشتهای حاصل گندمیان بطور معمول از دو نوع کالوس یعنی کالوس رویانزا و غیر رویانزا برخوردارند (Nabors و همکاران، ۱۹۸۳؛ Heyser و Nabors، ۱۹۸۲). مهمترین هدف این مطالعه تولید کالوس رویانزا با قابلیت نگهداری و تکثیر کافی می‌باشد. کالوسهایی از این نوع در باززایی گیاه که از ضروریات کاربرد بیوتکنولوژی به حساب می‌آید، اهمیت فوق العاده‌ای دارند. به علاوه کالوسهای با کیفیت مورد نظر اغلب به عنوان ابزار تحقیقات و مواد آزمایشی ارزشمند در مطالعات فیزیولوژیکی و مولکولی در مورد گیاهان بکار گرفته می‌شوند.

در این مطالعه از رویان‌های بالغ جو کشتهای نرم، آبدار و شفاف تولید شد، که خصوصیات کالوس غیر رویانزا را داشتند. این کشتها رشد کندی را از خود نشان داده و پس از ماهها نگهداری تنها تعدادی ریشه در آنها مشاهده گردید، بدون اینکه با شاخ و برگ همراه باشد. این کشتها به کشتهای ریشه زایی[1] بدست آمده از جو پس از کشت طولانی مدت در محیط کشت MS شباهت داشتند، که فقط تولید ریشه در آنها گزارش

1- Rhizogenic

گردیده است (Jelaska و همکاران، ۱۹۸۴). از این کشتها کالوس رویانزاتولید نگردید، در صورتی که کشتهای بدست آمده از بذرهای رسیده برنج (Bajaj و Rajam، ۱۹۹۵) و از رویانهای بالغ جو زراعی Taniguchi و همکاران، ۱۹۹۱؛ Huang و همکاران، ۱۹۹۳) علاوه بر کالوس غیر رویانزا کالوسهای رویانزا را نیز تولید نمودند. در مشاهدات مذکور علاوه بر اختلاف در کولتیوار و جنس گیاهان مورد مطالعه عاملهای دیگری چون ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی نیز مختلف بودند که در حصول نتیجه برای ایجاد و رشد کشتها مؤثر می‌باشند. این عدم تطابق نتایج ممکن است همچنین به دلیل قسمتی از جداکشت باشد که در تماس با محیط کشت برای ایجاد کالوس قرار می‌گیرد، و یا به آن نقطه‌ای از جداکشت مربوط باشد که در واقع کالوس بر روی آن تشکیل می‌گردد. در این مطالعه کالوس بر روی ریشه گیاهچه‌های روییده از رویان بالغ، تشکیل گردید، اما محل تشکیل کالوس در جداکشت به طور مشخص توسط محققان فوق ذکر نگردیده و فقط از ریز جداکشت‌های مورد استفاده از قبیل بذر کامل و یا رویان بالغ نام برده شده است.

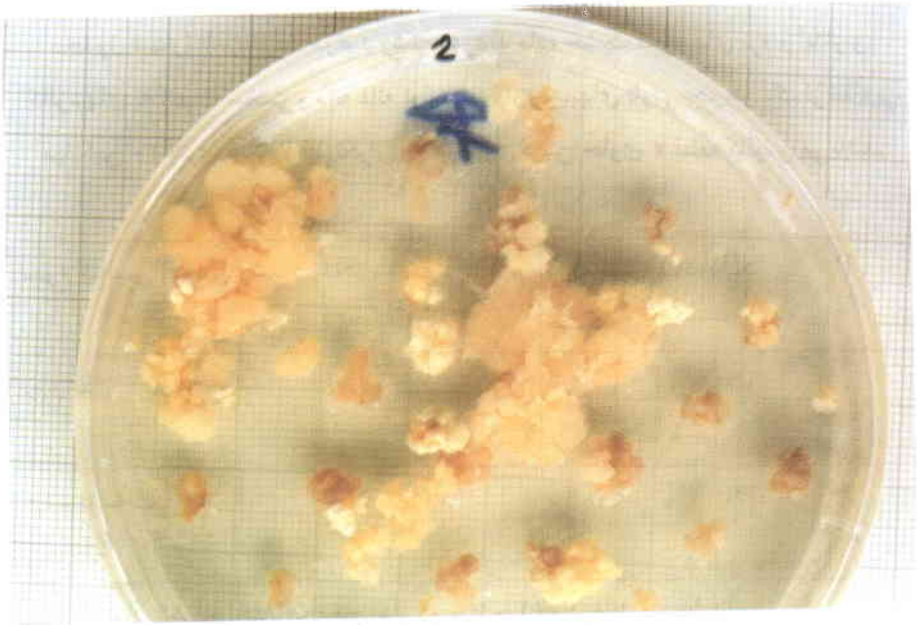
کالوسهای تولید شده از رویان‌های نارس جو مشخصات کشتهای رویانزا را نشان دادند که بافتی فشرده و زرد زنگ تا زرد روشن یا سفید داشتند. این نتایج با مشاهدات گزارش شده توسط Huang و همکاران (۱۹۹۳)؛ Taniguchi و همکاران (۱۹۹۱) و Goldstein و Kronstad (۱۹۸۶) شباهت دارند. در میان کالوسهای رویانزا کالوسهایی با رشد سریع با بافت به نسبت سخت و دانه دانه یا با توده‌های فشرده کوچک و رنگ متمایل به زرد تا سفید مشاهده گردید که با مشاهدات Huang و همکاران (۱۹۹۳) شباهت دارد.

کشتهای رویانزا درصد ماده خشک بیشتری را نشان داد. بنابراین، این کشتهای سریع‌الرشد رویانزا به عنوان مواد آزمایشی مناسب در انجام آزمایشهای مختلف قابل استفاده است. به منظور باززایی گیاه، کالوسهای رویانزای تولید شده از رویان‌های نارس

جو با اندامهای شبیه به برگ و ساقه در ابتدا به محیط کشت حاوی میزان پایین 2,4-D و پس از شروع رشد برگ و ساقه، و ریشه‌ها کالوسها به محیط کشت عاری از هورمون منتقل گردیدند. گیاهچه‌ها ۴ هفته پس از انتقال کالوسها به محیط باززایی از آنها بوجود آمدند. نتایج بدست آمده در این مطالعه با گزارشهای Bregitzer و همکاران (۱۹۹۵)، و Shayakhmetov و Shakirova (۱۹۹۶) انطباق دارند. محیط کشت باززایی ممکن است بدون هورمون، یا با هورمون سیتوکینین[۱] و غلظت پایینی از هورمون اکسین[۲] باشد (Scott و همکاران، ۱۹۹۰). برای تولید گیاه از کالوس جو در این مطالعه از سیتوکینین در محیط کشت باززایی استفاده نگردید. در این مورد به نظر می‌رسد که برای تشکیل قسمت هوایی در گندمیان به مقدار کمتری سیتوکینین نسبت به گیاهان دیگر نیاز می‌باشد (Thorpe، ۱۹۸۲). انتقال مستقیم کالوسها به محیط کشت عاری از 2,4-D قبل از شروع تشکیل بخش هوایی به اندازه کافی، ممکن است به تشکیل سریع ریشه منجر شود و این پدیده ممکن است از تشکیل قسمت هوایی و باززایی گیاه کامل جلوگیری نماید. (Sears و Deckard، ۱۹۸۲؛ Wofford و همکاران، ۱۹۹۲). در مواردی نیز باززایی خود به خود[۳] بدون انتقال کالوسها به محیط کشت عاری از 2,4-D صورت گرفت. این پدیده می‌تواند به دلیل کم شدن غلظت 2,4-D پس از یک دوره طولانی رشد کالوس در محیط کشت (بدون بازکشت) باشد که در نتیجه، غلظت اکسین به حدی پایین بیاید که باززایی امکان پذیر گردد. در میان گیاهان باززایی شده تعداد کمی گیاهان بدون کلروفیل نیز مشاهده گردید. پدیده آلبینیسم در جو توسط Thomas و Scott (۱۹۸۵) نیز گزارش شده است که ممکن است نشان دهنده وقوع تنوع سوماکلونی[۴] در حین انجام کشت بافت باشد.

1-Cytokinin
2- Oxin
3- Spontaneous regeneration
4- Somaclonal variation

شکل شمارهٔ ۱ - کالوسهای نرم، آبدار و شفاف بدست آمده از رویانهای بالغ جو در محیط کشت MS و حاوی ۳ میلیگرم در لیتر 2,4-D و بازکشت شده در فواصل ۴ هفته‌ای در محیط کشت مذکور.



شکل شمارهٔ ۲-کالوسهای با بافت فشرده و اندکی دانه دانه و زرد روشن تا سفید که از رویانهای نارس جو زراعی در محیط کشت MS حاوی ۳ میلیگرم 2,4-D بدست آمده‌اند.

شکل شمارهٔ ۳- ایجاد کشتهای رویانزا (E) از رویانهای نارس کشت شده در محیط کشت MS حاوی ۳ میلیگرم در لیتر 2,4-D: کالوسهای با بافت نرم، آبدار و شفاف (۱) و همچنین کالوسهای با بافت فشرده به نسبت سخت و دانه دانه و سفید رنگ که پس از بازکشت کالوسهای فوق از آنها بوجود آمده‌اند (۲).

جدول شمارهٔ ۱- مقایسه درصد رشد و درصد ماده خشک کالوسهای نرم و آبدار و کالوسهای به نسبت سخت و دانه دانه تولید شده از رویانهای نارس جو هر یک از مقادیر، میانگین ۱۰ پتری دیش (۱۰ تکرار)، و هر پتری دیش حاوی ۷ قطعه کالوس می‌باشد.

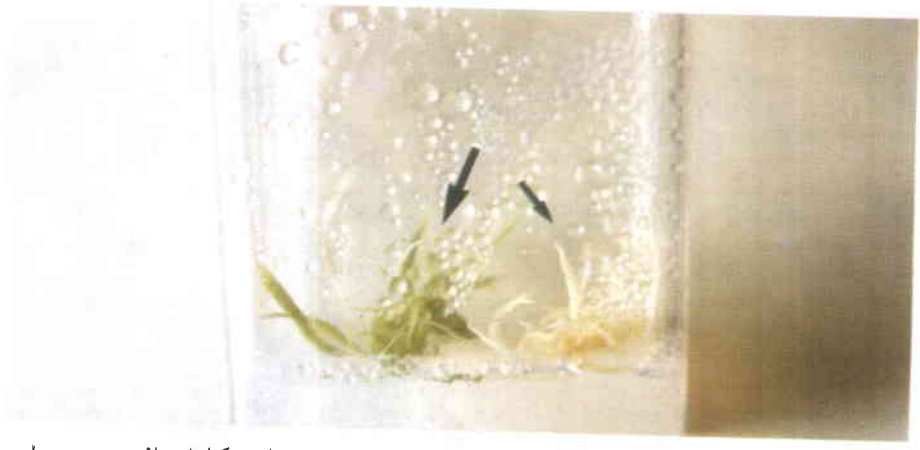
نوع کالوس	درصد رشد	SE	P	درصد ماده خشک	SE	P
نرم و آبدار	۹۲/۶	۱/۰۶		۴/۷	۰/۱	
به نسبت سخت و دانه دانه	۱۵۳/۲	۵/۰۷		۸/۰۵	۰/۳۱	

** نشان دهندهٔ اختلاف معنی دار در سطح ۰/۱ درصد می‌باشد.

شکل شمارهٔ ۴-کالوسهای حاصل از رشد و گزینش کالوسهای ایجاد شده از رویانهای نارس جو، این کشتها رشدی به نسبت سریع و بافتی به نسبت سخت و دانه دانه داشته و یا از توده‌های فشرده ریز و به نسبت شکننده تشکیل یافته‌اند.

شکل شمارهٔ ۵ - تشکیل قسمت هوایی گیاه در کالوسهای رویانزا، ایجاد شده از رویانهای نارس جو زراعی در محیط کشت MS حاوی ۳ میلیگرم در لیتر 2,4-D.

شکل شمارهٔ ۶-کالوسهای بازکشت شده در محیط کشت MS فاقد 2,4-D پس از شروع رشد بخش هوایی و ریشه گیاه در آنها، فلشها گیاهچه‌های باززایی شده از کالوسهای رویانزا را نشان می‌دهند: گیاهچه‌ها با برگهای سبز (فلشهای بزرگ)، گیاهچه‌های بدون کلروفیل (فلشهای کوچک).



شکل شمارهٔ ۷-گیاههای باززایی شده با قسمت هوایی و ریشه‌های تکامل یافته در محیط کشت عاری از هورمون؛ فلشها گیاهچه‌های باززایی شده را نشان می‌دهند: گیاهچه سبز (فلش بزرگ)؛ گیاهچه بدون کلروفیل (فلش کوچک).

شکل شمارهٔ ۸-گیاهچه باززایی شده از کالوس جو پس از انتقال به گلدان حاوی خاک در اتاقک رشد.

شکل شمارهٔ ۹-گیاه باززایی شده از کالوس جو پس از ۴ ماه رشد و تولید خوشه، گل و بذر در اتاقک کشت.

Callus types and plant regeneration in *Hordeum* species

***Seyed Reza Tabaei-Aghdaei*[1]**

Abstract

Calli were induced from both mature and immature embryos of a wild barley species (*Hordeum murinum*) and of cultivated barley (*H. vulgare*). Mature embryos produced soft watery and translucent cultures with the characteristics of non-embryogenic (NE) callus. Such cultures grew slowly and presented merely some root formation. Cultures derived from immature embryos showed the characteristics of NE calli primarily, most of which grew slowly. From these calli rapidly growing calli were produced in cultivated barley, characterized as being dry firm and granular or with small clumps and yellowish to white in color. Shoot-like structures emerged on these cultures and the shoot and root development occurred on regeneration medium.

The well-developed planletes grew normally after transfering to soil and reached to maturity and seed production phase.

Key words: Callus, Regeneration, Immature embryos, Embryogenic, Non-embryogenic, *Hordeum murinum, H. vulgare.*

1-Department of Genetics and Plant Physiology, Research Institute of Forests and Rangelands, P.O. Box 13185-116, Tehran, Iran

منابع

Bajaj, S. and M.V Rajam, 1995. Efficient plant regeneration from long-term callus cultures of rice by spermidine. Plant Cell reports, 14: 71-720.

Denchev, P.D. and , B.V Conger. 1994. Cell biology and molecular genetics. Crop Science, 34: 1623-1627.

He, D.G., G. Tanner, and K.J. Scott, 1986. Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum*). Plant Science, 45: 119-124.

Heyser, J.W. and M.W. Nabors, 1982 The regeneration of prosomillet from embryogenic calli derived from various plant parts. Crop Science, 22: 1070-1074.

Huang, C., H. Yan, Q. Yan, M. Zhu, M. Yuan, and A. Xu, 1993. Establishment and characterization of embryogenic cell suspension cultures from immature and mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 32: 19-25.

Jelaska, S., Z. Rengel, and V. Cesar, 1984. Plant regeneration from mesocotyl callus of *Hordeum vulgare* L. Plant Cell Reports, 3: 125-129.

Kharinarian, R.P., Yu. Dolgikh, and Yu. Guzhov, I. 1996. Selection of media for mass regeneration of sugarcane plants from callus culture. Russian Journal of Plant Physiology, 43: 97-100.

Lazzeri, P.A., R. Brettschneider, L(hrs,. and H. L(rz, 1991. Stable transformation of barley via PEG-induced direct DNA uptake into protoplasts. Theoretical and Applied Genetics,81: 437-444.

Murashige, T., and F. Skoog,. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia

Plantarum, 15: 473-497.

Nabors, M.W., J.W. Heyser, T.A. Dykes, and K.J. DeMott,. 1983. Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. Planta, 157: 385-391.

Ozias-Akins, P. and I.K. Vasil, 1982. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescenes of *Triticum aestivum* L. (wheat), evidence for somatic embryogenesis. Protoplasma, 110: 95-105.

Scott, K.J., D.G. He, and Y.M. Yang, 1990. Somatic embryogenesis in wheat. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.), Biotechnology in agriculture and forestry, wheat. vol. 13, Berlin: Springer-Verlag, pp 46-67.

Sears, R.G. and E.L. Deckard, 1982. Tissue culture variability in wheat callus induction and plant regeneration. Crop Science, 22: 546-550.

Shatters, R.G., Jr. Richard, A. Wheeler, and S.H. West, 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of 'Tifton 9' bahiagrass. Crop Science, 34: 1378-1384.

Shayakhmetov, I.F. and F.M. Shakirova, 1996. Somatic embryogenesis in wheat cell suspension cultures in the presence of abscisic acid. Russian Journal of Plant Physiology, 43: 88-90.

Skoog, F. and C.O. Miller, 1957. Chemical regulation of growth formation in plant tissues cultured in vitro. Symposium. Society for Experimental Biology, 11: 118-130.

Taniguchi, M., S. Enomoto, T. Komatsuda, K. Nakajima, and K. Ohyama, 1991. Varietal differences in the ability of callus formation and plant regeneration from mature embryo in barley (*Hordeum vulgare* L.) Japanese Journal of Breeding, 41: 571-579.

Thorpe, T.A. 1982. Callus organisation and de novo formation of shoots, roots and embryos *in vitro*. In: Tomes, D.T., B.E. Ellis, P.M. Hanrey, K.J. Kasha, and R.L. Peterson, eds., Application of plant cell and tissue culture to agriculture and industry. Guelph: University of Guelph, pp 115-138.

Vasil, I.K. 1987. Developing cell and tissue culture system for the improvement of cereal and grass crops. Journal of Plant Physiology, 128: 193-218.

Vasil, I.K. 1988. progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. Biotechnology, 6: 397-402.

Wernicke, W. and L. Malkovits, L. 1986. The regeneration potential of wheat shoot meristem in the presence and absence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Protoplasma, 131: 131-141.