واکنش جو وحشی *Hordeum murinum* و زراعی *H. vulgare* به کشت درون‌شیشه‌ای (*In vitro*) و عوامل مؤثر بر تشکیل و رشد کالوس در آنها

سیدرضا طبایی عقدایی[1]

خلاصه

انجام تحقیقات کشت بافت و کاربرد عملی آن در علوم گیاهی بویژه اصلاح نباتات به روش کشت مناسب و قابل اتکا نیازمند می‌باشد. در این مطالعه ضمن انجام کشت بافت، اثرات ژنوتیپ گیاهی، ترکیب محیط کشت و غلظت هورمون تنظیم کننده رشد (2,4-D) بر تشکیل و رشد کالوس مورد بررسی قرار گرفتند. گونه جو وحشی *Hordeum murinum* همراه با گونه زراعی جو *H. vulgare* به منظور مطالعه تنوع ژنوتیپی موجود در واکنش به کشت بافت و کال‌زایی مورد آزمون واقع شدند. بذرهای رسیده (حاوی جنین کامل و رسیده) و جنین‌های نارس از هر دو گونه مورد مطالعه به عنوان ریزنمونه استفاده گردیدند. محیط‌های کشت حاوی عناصر پرمصرف و کم‌مصرف MS، و MS تغییر یافته (MSm) مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین ازهورمون 2,4-D به میزان ۱ و یا ۳ میلی‌گرم محیط کشت استفاده شد. گیاهچه‌های روییده از بذور هر دو گونه مورد بررسی روی هر دو محیط کشت، کالوس تولید نمودند. مقایسه بین دو ژنوتیپ نشان‌دهنده قدرت بیشتر جو زراعی در تولید کالوس نسبت به جو وحشی می‌باشد. ترکیبهای محیط کشت بر میزان تولید کالوس در هیچیک از گونه‌های مورد نظر تأثیر قابل ملاحظه‌ای نداشتند، اما محیط کشت MS نسبت به محیط MSm تشکیل و رشد کالوس‌ها را سرعت بخشید. همچنین رشد کالوس‌های بدست آمده از جو زراعی

۱- عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع - بخش تحقیقات ژنتیک و فیزیولوژی

بر روی محیط کشت MS بیشتر از رشد آنها روی محیط MSm بود. غلظت‌های بکار رفته 2,4-D نیز اختلاف کمی را در تأثیر بر تولید کالوس در دو گونه جو نشان دادند، اما کالوسهای تولید شده از جو زراعی رشد سریعتری را در واکنش به غلظت بالاتر (۳mg/l) هورمون در هر دو محیط کشت از خود نشان دادند. همچنین کالوس از جنین‌های نارس گونه‌های مورد بررسی بر روی محیط کشت حاوی نمکهای پایه MS حاوی ۳mg/l هورمون 2,4-D تشکیل گردید. جو زراعی توانایی بیشتری (۸۴/۵٪) را در تولید کالوس نسبت به جو وحشی (۷۷/۷٪) از خود نشان داد. کالوسهای بدست آمده از جنین‌های بالغ (بذر رسیده) و جنین‌های نارس جو زراعی به رشد خود ادامه دادند، اما، رشد کالوسهای بدست آمده از جو وحشی پس از مدتی متوقف، رنگ آنها قهوه‌ای شده و پس از ۵ تا ۶ هفته از بین رفتند.

واژه‌های کلیدی: جو وحشی، جو رزاعی، کشت درون شیشه‌ای، کالوس، محیط کشت، تنظیم کننده‌های رشد گیاه، جنین رسیده و نارس

مقدمه

کشت بافت و سلول ابزار قدرتمند بیوتکنولوژی در مطالعات بنیادی و کاربردی بویژه در علوم گیاهی به شمار می‌آید. روشهای کشت بافت نه تنها در تکثیر رویشی گونه‌های مهم اقتصادی از کارآیی بالایی برخوردار می‌باشند، بلکه در کنار روشهای سنتی اصلاح نباتات، مطالعات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی، به منظور دستیابی به صفات مطلوب در گیاهان را امکانپذیر می‌سازند. اگرچه تولید کالوس گونه‌هایی از گندمیان با موفقیت انجام گرفته است، همچنان مشکلات متعددی در کشت بافت گیاهان این خانواده وجود دارد که مطالعات بیشتری بر روی عوامل موثر و شرایط لازم را می‌طلبد. برای انجام کشت بافت و تولید کالوس آشنایی با سیستم کشت بافت ضروری می‌باشد و

توجه به نوع ریزنمونه[۱] فرمول محیط کشت[۲]، نگهداری کشت و باززایی گیاه از نکات اساسی در کشت بافت و سلول می‌باشد.

تنوع زیادی در قدرت کالوس‌زایی بین ژنوتیپهای مختلف بیشتر گونه‌های گندمیان گزارش شده است (Duncan و همکاران، ۱۹۸۵؛ Vasil، ۱۹۸۷). از این نظر اختلافات در بین واریته‌های مختلف جو مشاهده گردیده (Ohkoshi و همکاران، ۱۹۹۱) و واریته‌های دو ردیفه جو واکنش بهتری را به کشت بافت نسبت به واریته‌های شش ردیفه نشان داده‌اند (Hanzel و همکاران، ۱۹۸۵). همچنین ژنوتیپهای مختلف جو بهاره از نظر توانایی تولید کالوس با رشد مطلوب، با هم اختلاف داشته‌اند (Golstein و Krontad، ۱۹۸۶). از ژنوتیپ به عنوان یک فاکتور مهم مؤثر بر باززایی نیز در جو گزارش شده است (Dale و Deambrogio، ۱۹۷۹).

کالوس ازقسمت های مختلف گیاه تولید شده است. اولین کشت بافت در گندمیان از آندوسپرم[۳] ذرت با موفقیت انجام گرفته است (Larue، ۱۹۴۹) و منجر به تشکیل توده غده مانند نرمی گردید که تا حدی قدرت تمایز[۴] نیز در آن مشاهده گردید (Yamada، ۱۹۷۶). از جنین‌های نارس نیز به عنوان ریزنمونه در کشت بافت استفاده شده است (Luhrs و Lorz، ۱۹۸۸): Huang و همکاران، ۱۹۹۳؛ Bregitzer، ۱۹۹۲؛ Bregitzer و همکاران، ۱۹۹۵؛ Shayakhmetov و Shakirova، ۱۹۹۶). بافتهای دیگر گیاهی نیز در تولید کالوس مورد استفاده قرار گرفته‌اند که از جمله آنها مریستم انتهایی[۵] می‌باشد (Cheng و Smith، ۱۹۷۵). در ارزیابی ریزنمونه‌های مختلف Dale و Deambrogio (۱۹۷۹) کمترین میزان تولید کالوس را در مریستم انتهایی شاخه، مزوکوتیل[۶] و غلاف برگ جو، و بیشترین مقدار تشکیل کالوس را در

1- Explant
2- Medium formulation
3- Endosperm
4- Differentiation
5- Apical meristem
6- Mesocotyl

جنین و ریشه گزارش کرده‌اند. بنابراین علیرغم دسترسی محدود به جنین‌های نارس در کشت بافت از آنها استفاده می‌شود.

پس از انتخاب و ضدعفونی ریزنمونه‌ها باید آنها را روی محیط کشت القاکننده تشکیل کالوس[۱] قرار داد. محیط‌های کشت بافت معمولا از مواد آلی و معدنی همراه با یک قند (منبع تأمین کننده انرژی) و هورمون‌های تنظیم کننده رشد تشکیل می‌یابند. بیشتر محیط کشت‌های مورد استفاده در گندمیان از تغییر محیط کشت‌هایی حاصل شده‌اند که ابتدا برای کشت بافت دولپه‌ایها تهیه شده‌اند (Scott و همکاران، ۱۹۹۰). برای مثال MS (Murashige و Skoog، ۱۹۶۲) به عنوان عمومی‌ترین محیط کشت اولین بار به منظور به حداکثر رسانیدن رشد در سلولهای توتون طراحی و تهیه شده است. همچنین با ایجاد تغییرات در MS، محیط کشت‌های متفاوتی برای کشت جنین و رشد کالوسهای تشکیل شده در آن تولید شده‌اند (Sears و Deckard، ۱۹۸۲؛ Galiba و همکاران، ۱۹۸۶). پس از ارزیابی انجام گرفته توسط Hanzel و همکاران (۱۹۸۵) بر روی محیط کشت‌های MS و B5 (Gamborg، ۱۹۶۸) در جو میزان تشکیل کالوس به ترتیب ۳۸ و صفر درصد گزارش شده است.

هورمونهای گیاهی[۲] یا تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه[۳] در کشت بافت و سلول از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار می‌باشند و می‌توانند بر تشکیل و رشد کالوس و باززایی گیاه از آن اثر نمایند. استفاده از هورمون 2,4-D[۴] برای تشکیل و نگهداری کالوس در گندمیان ضروری می‌باشد (Bregitzer و همکاران، ۱۹۹۵) که معمولترین اکسین[۵] مورد استفاده در کشت بافت گیاهان این خانواده می‌باشد. (Ozias-Akins و Vasil، ۱۹۸۲؛ Maddock و همکاران، ۱۹۸۳؛ He و همکاران، ۱۹۸۶). مقادیر متفاوتی از

1- Callus inducing medium
2- Phytohormones
3- Plant Growth Regulators
4- 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
5- Auxin

2,4-D برای دستیابی به رشد حداکثر در کالوسهای جو گزارش شده است که به ترتیب عبارتند از ۰/۵ میلیگرم در لیتر (Hanzel و همکاران، ۱۹۸۵)، یک میلی گرم در لیتر (Dale و Deambrogio، ۱۹۷۹؛ Golstein و Kronstad، ۱۹۸۶)، دو میلی گرم در لیتر (Lührs و Lörz، ۱۹۸۸؛ Ziauddin، ۱۹۸۶) و ۲/۵ میلیگرم در لیتر (Sharma و همکاران، ۱۹۹۵). حذف 2,4-D از محیط کشت باعث اندام‌زایی[1] و تشکیل ریشه و ساقه و عدم ادامه رشد کالوس می‌گردد. از طرف دیگر غلظتهای بسیار بالای اکسین نیز می‌تواند مانع رشد کالوس شده و در کشت‌های طولانی مدت بر تقسیم سلولی اثر نموده و باعث نارسایی‌های کروموزومی گردند (Ziauddin، ۱۹۸۶). در این مطالعه با انجام کشت بافت در گونه‌های وحشی و زراعی جو تأثیر ریزنمونه‌ها، ترکیبات محیط کشت و غلظت هورمون 2,4-D بر ایجاد کالوس و میزان رشد آن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

مواد و روشها

جنین‌های بالغ و نارس جو وحشی *(H. murinum)* و جو زراعی *(H. vulgare)* به عنوان ریزنمونه[2] مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور تأمین جنین نارس، بذور جو در گلدانهای پلاستیکی به قطر ۱۰ سانتیمتر و در خاک (John Innes No. 2 Compost) کاشته و گیاهان حاصل به مدت ۱۰ هفته در یک اتاق رشد با درجه حرارت ۱۸/۱۰°C (شب / روز) تحت ۱۰ ساعت نور با شدت تقریبی ۱۷۰ میکرومول بر متر مربع ‘در ثانیه رشد نمودند. پس از آن برای رشد بیشتر گیاهان به گلدانهای با قطر ۱۵ سانتیمتر انتقال داده و سپس برای تولید گل و خوشه تحت دورهٔ ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفتند.

1- Organogenesis 2- Explant

دو محیط کشت در انجام کشت بافت بکار گرفته شدند (جدولهای ۱ و ۲)، که در یکی از آنها نمکهای میکرو و ماکرو MS (Muraslige و Skoog، ۱۹۶۲) و در دیگری MSm (نمکهای پایه MS تغییر یافته) استفاده شده است. به هر دو محیط کشت هورمون 2,4-D به میزانهای ۱ و ۳ میلیگرم در لیتر اضافه گردید. همچنین قند ساکارز به میزان ۳۰ گرم در لیتر، اسید آمینه‌های آسپاراژین[۱] به میزان ۱۵۰ میلیگرم در لیتر، گلوتامین[۲] به میزان ۷۵۰ میلیگرم در لیتر به محیطهای کشت اضافه گردیدند. از ویتامینهای میوایتوزیتول[۳] به میزان ۱۰۰ میلیگرم در لیتر، اسیدنیکوتینیک[۴] به میزان ۱ میلیگرم در لیتر، پیریدوکسین[۵] به میزان ۱ میلیگرم در لیتر و تیامین[۶] به میزان ۱۰۰ میلیگر در لیتر نیز طبق توصیه Gamborg و همکاران (۱۹۶۸) استفاده گردید. مقدار ۸ گرم در لیتر نیز آگار (Agar type A,. Sigma) جهت جامد نمودن محیط‌های کشت به آنها اضافه شد و pH مخلوط روی ۵/۷ تنظیم و در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد و فشار ۱/۲-۱ بار (کیلوگرم بر سانتیمتر مربع) بمدت ۲۰-۱۵ دقیقه اتوکلاو گردیدند.

1- L-asparagine
2- Glutamine
3- Myo-inositol
4- Nicotinic acid
5- Pyridoxine. HCl
6- Thiamine. HCl

جدول ۱ - محیط کشت حاوی نمکهای پایه شامل نمکهای پرمصرف (Macronutrients) و کم‌مصرف (Micronutrients) محیط MS (Skoog, Murashige، ۱۹۶۲)

ترکیبات مختلف محیط کشت	غلظت برحسب میلیگرم در لیتر
Ammonium Nitrate	1650.0
Boric Acid	6.2
Calcium Chloride Anhydrous	332.2
Cobalt Chloride. 6H2O	0.025
Cupric Chloride.5H2O	0.025
Na2-EDTA	37.26
Ferrous Sulfate.7H2O	27.8
Magnesium Sulfate	180.7
Manganese Sulfate.H2O	16.9
Molybdic Acid (Sodium Salt). H2O	0.25
Potassium Iodide	0.83
Potassium Nitrate	1900.0
Potassium Phosphate Monobasic	170.0
Zinc Sulfate.7H2O	8.6
L.asparagine	150.0
Glutamine	750.0
Myo-inositol	100.0
Nicotinic acid	1.0
Pyridoxine.HCl	1.0
Thiamine.HCl	100.0
Sucrose	30000.0

جدول ۲- محیط کشت حاوی نمکهای پایه MS تغییر یافته (MSm)

ترکیبات مختلف محیط کشت	غلظت برحسب میلیگرم در لیتر
Boric Acid	6.2
Calcium Chloride Anhydrous	332.2
Cobalt Chloride. 6H2O	0.025
Cupric Chloride. 5H2O	0.025
Na2-EDTA	37.26
Ferrous Sulfate. 7H2O	27.8
Magnesium Sulfate	180.7
Manganese Sulfate. H2O	16.9
Molybdic Acid (Sodium Salt). H2O	0.25
Potassium Iodide	0.83
Potassium Nitrate	1900.0
Poassium Phosphate Monobasic	170.0
Sodium Nitrate	1751.0
Zinc Sulfate. 7H2O	8.6
L-asparagine	150.0
Glutamine	750.0
Myo-inositol	100.0
Nicotinic acid	1.0
Pyridoxine.HCl	1.0
Thiamine. HCl	100.0
Sucrose	30000.0

کشت ریزنمونه‌ها و تولید کالوس

برای کشت جنین بالغ، بذرهای کاملاً رسیده و خشک جوهای وحشی و زراعی مورد استفاده قرار گرفتند. ضدعفونی بذور در الکل ۷۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۵ دقیقه و محلول ۰/۱ درصد کلرور مرکوریک (HgCl2) به

مدت ۳ دقیقه انجام گرفت و پس از استفاده از هریک از محلولهای فوق شستشوی بذور ۴-۲ مرتبه و هر بار به مدت ۳ دقیقه با آب مقطر ضدعفونی شده انجام گرفت. بذور ضدعفونی شده بر روی محیط کشتهای مذکور قرار داده شدند و پس از مسدود شدن پتری دیش با پارافیلم در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

برای کشت جنینهای نارس، از بذور در مرحله شیری تا خمیری (حدود ۱۴-۱۰ روز پس از باروری گلها) استفاده گردید. سنبله‌های حاوی بذور مذکور با همان روش بکار رفته در مورد بذور رسیده ضدعفونی شدند. جنین‌های با طول ۱-۰/۸ میلیمتر در جو وحشی و ۲-۱ میلیمتر در جو زراعی در شرایط استریل از سنبله جدا شده و بر روی محیط کشت با نمکهای پایه MS حاوی ۳ میلیگرم در لیتر 2,4-D به عنوان محیط کشت تولید کالوس و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

کشت و تکثیر کالوس و ارزیابی تولید و رشد کالوس

سه تا چهار هفته پس از شروع تشکیل کالوس، کشتها به محیط کشت تازه منتقل گردیدند و در این بازکشت هرگونه برگ و ساقه[1] مستقیماً روییده از بذور کشت شده روی محیط کشت حذف گردید. کالوسها در داخل پتری دیش و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری و برای هر تیمار تعداد ۵ تکرار منظور گردید. میزان تشکیل کالوس با محاسبه درصد ریزنمونه‌های تولید کننده کالوس سه هفته بعد از کشت ریزنمونه‌ها تعیین گردید. همچنین ۴ هفته پس از شروع تشکیل کالوس، تحت شرایط استریل کالوسها وزن شدند. یک ماه بعد نیز مجدداً توزین انجام گرفت و و درصد رشد کالوسها از روی نسبت اضافه وزن آنها به وزن اولیه تعیین گردید.

محاسبه درصد تشکیل کالوس از جنین‌های بالغ و نارس جو وحشی و زراعی در

1- Shoot

مورد تمام تیمارها انجام گرفت و درصد رشد کالوسهای بدست آمده از بذرهای بالغ جو نیز محاسبه گردید. درصدهای محاسبه شده در مورد کالوسهای ایجاد شده بالاتر از ۷۰ بودند و بنابراین قبل از تجزیه آماری تبدیل داده‌های فوق با محاسبه ریشه دوم انجام شد و تجزیه واریانس با استفاده از روش GLM[1] برای تعیین اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف بعمل آمد.

نتایج

ایجاد کالوس از جنین‌های بالغ جوهای وحشی و زراعی

اثرات ژنوتیپ، ترکیب محیط کشت و غلظت هورمون 2,4-D بر تشکیل کالوس در دو گونه مختلف جنس *Hordeum* و همچنین تأثیر عوامل مذکور بر میزان رشد کالوسهای بدست آمده از جو زراعی مورد بررسی قرار گرفت.

از جنین‌های رسیده هر دو گونه جو وحشی و زراعی بر روی هر دو محیط کشت مورد استفاده، کالوس تولید شد. مقایسات انجام گرفته اختلاف معنی‌داری ($P<0.001$) را بین دو گونه مورد مطالعه از نظر تولید کالوس نشان دادند و جو زراعی نسبت به گونه وحشی تعداد بیشتری کالوس تولید نمود (جدول ۳). نمکهای پایه MS و MSm نیز از نظر تأثیر بر تشکیل کالوس اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P>0.05$)، اما سرعت تشکیل کالوس نیز بر روی محیط کشت حاوی نمکهای MS در هر دو گونه بیشتر بود. از مقایسه بین اثرات دو محیط کشت مورد استفاده بر رشد کالوس تفاوت معنی‌داری ($P<0.05$) بین محیط کشتهای MS و MSm بدست آمد که نشان دهنده رشد بیشتر کالوس بر روی محیط کشت MS بود (جدول ۴). در مورد تاثیر 2,4-D بر تشکیل کالوس نیز اگرچه اختلاف کمی میان غلظتهای استفاده شده آن وجود داشت اما

1- Generalized Linear Model

۳ میلیگرم در لیتر 2,4-D در مقایسه با غلظت یک میلیگرم در لیتر این هورمون به‌طور معنی‌داری ($P<0.05$) رشد کالوسهای جو را بر روی هر دو محیط کشت مورد استفاده افزایش داد تفاوتهای بین تیمارها اگرچه معنی‌دار می‌باشند اما اختلافات بین داده‌های مربوطه زیاد نبوده و در عمل قابل ملاحظه نیستند.

جدول ۳- اثر ژنوتیپ گیاهی، ترکیب محیط کشت، و غلظت هورمون 2,4-D بر میزان تشکیل کالوس در بذر (جنین)های رسیده جوهای وحشی و زراعی که سه هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت تعیین گردیدند. هریک از داده‌ها نمایانگر میانگین ۵ پتری دیش به عنوان تکرار است. در هر پتری دیش ۲۰ بذر رسیده کشت گردید.

فاکتورهای مورد بررسی		درصد تشکیل کالوس	خطای معیار (SE)	P
H. vulgare	گونه‌های گیاهی	۷۸/۴۵	۰/۷۱	***
H. murinum		۷۴/۴۵	۰/۴۷	
MS	ترکیب محیط کشت	۷۶/۷۰	۰/۹۲	ns
MSm		۷۶/۲۰	۰/۵۶	
1.0 mg/l	غلظت هورمون 2,4-D	۷۵/۷۰	۰/۶۰	ns
3.0 mg/l		۷۷/۲۰	۰/۸۶	

ns: عدم اختلاف معنی‌دار ($P>0.05$)

***: اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱ ($P<0.001$)

جدول ۴- اثر ترکیب محیط کشت و غلظت 2,4-D بر رشد کالوسهای ایجاد شده از بذور (جنین‌های) رسیده جو (رشد بر حسب وزن تازه تعیین گردید). هریک از داده‌ها میانگین ۵ پتری دیش (تکرار) و هر پتری دیش حاوی ۱۰ قطعه کالوس بود.

فاکتورهای مورد بررسی		درصد تشکیل کالوس	خطای معیار (SE)	P
MS	ترکیب محیط کشت	۸۱/۴۰	۰/۶۳	*
MSm		۷۹/۵۰	۰/۷۰	
1.0 mg/l	غلظت هورمون 2,4-D	۷۹/۴۰	۰/۶۱	*
3.0 mg/l		۸۱/۵۰	۰/۶۸	
		۷۶/۲۰		

* اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد ($P<0.05$)

ایجاد کالوس از جنینهای نارس جوهای وحشی و زراعی

تشکیل کالوس در هر دو گونه مورد بررسی و بر روی محیط کشت حاوی نمکهای پایه MS حاوی ۳ میلیگرم در لیتر 2,4-D انجام گرفت. در طول چند روز جنینهای کاشته شده متورم شده و ۵ تا ۱۴ روز پس از کشت در اسکوتلوم[۱] ۸۴/۵ درصد از جنینهای نارس جو زراعی و ۷۷/۷ درصد از جنینهای نارس جو وحشی کالوس ایجاد گردید. تجزیه داده‌های مربوط به ۱۰ تکرار نشان داد که توانایی تولید کالوس در جو زراعی بر روی محیط کشت فوق بیشتر از جو وحشی می‌باشد (جدول ۵). در تعداد زیادی از جنینها قبل از تولید کالوس و یا همزمان با تشکیل کالوس بر روی محیط کشت مورد استفاده تولید برگ[۲] صورت گرفت. کالوسهای تولید شده از جو زراعی بر روی محیط کشت مذکور قابل تکثیر بوده (شکل ۱) و توانایی خود را در ادامه رشد در طول چندین ماه نشان دادند، اما کالوسهای بدست آمده از جو وحشی پس از مدتی زرد تیره شده و بعد به رنگ قهوه‌ای درآمده و ۶ هفته پس از تشکیل کالوس نکروزه شده و رشد آنها متوقف گردید.

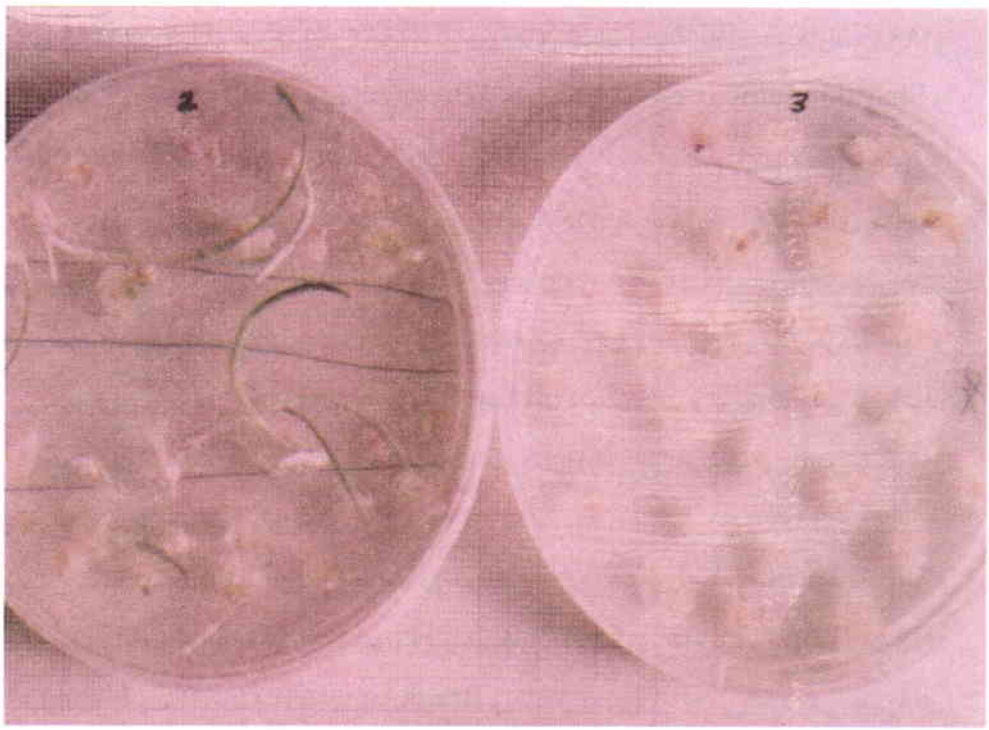
1- Scutellum

2- Precocious shoot germination

جدول ۵- درصد کال‌زایی در جنینهای نارس جوهای وحشی و زراعی کشت شده بر محیط کشت حاوی نمکهای پایه MS و دارای ۳ میلیگرم 2,4-D در لیتر. هریک از داده‌ها میانگین ۱۰ پتری دیش (تکرار) بوده و در هر پتری دیش ۲۰ جنین نارس کشت شده است.

گونه‌های Hordeum	درصد کال‌زایی	خطای معیار (SE)	P
H. vulgare	۸۴/۵	۱/۵۴	**
H. murinum	۷۷/۷	۱/۶	

** اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد ($P<0.01$)



شکل ۱ -کالوس‌های ایجاد شده از جنین های جو و رشد نموده بر روی محیط کشت حاوی نمکهای پایه MS و دارای ۳ میلیگرم در لیتر هورمون 2,4-D

بحث

تشکیل کالوس و رشد آن از مراحل اساسی در اغلب روشهای کشت بافت می‌باشند. عوامل متعددی در راندمان کشت بافت موثرند که ذیلا مورد بحث قرار می‌گیرند:

ریزنمونه

انتخاب ریزنمونه مناسب از عوامل مهم موفقیت در کشت بافت می‌باشد. قسمتهای مختلف گیاه در تولید کالوس با درصدهای متفاوتی از موفقیت بکار رفته‌اند که شامل بذور رسیده و یا جنینهای بالغ (Bajaj و Rajam، ۱۹۹۵؛ Taniguchi و همکاران، ۱۹۹۱؛ Huang و همکاران، ۱۹۹۳)، گیاهچه‌های جوان (Becher و همکاران، ۱۹۹۲) و جنین‌های نارس (Bregitzer و همکاران، ۱۹۹۵؛ Shayakhmetov و Shakirova، ۱۹۹۶) می‌باشند. در این مطالعه نیز از بذرهای کشت شده جو وحشی و زراعی بر روی محیط‌های کشت، کالوس تولید گردید. هرچند رشد کالوسهای بوجود آمده از جنین بالغ در این مطالعه بسیار کند بود، اما مزیت استفاده از بذور و یا جنین‌های رسیده در دسترس بودن همیشگی آنها و عدم محدودیت فصلی در بکار بردن آنها و نگهداری راحت‌تر بذر برای ادامه و تکرار عملیات کشت بافت و تولید کالوس می‌باشد. جنین‌های زیگوتی[1] نارس از هر دو گونه مورد آزمایش توانایی خوبی را در تشکیل و رشد کالوس نشان دادند.

نتایج بدست آمده از این مطالعه در موافقت با گزارشهای انجام گرفته توسط Dale و Deambrogio (۱۹۷۹): Hanzel و همکاران (۱۹۸۵): Lührs و Lörz (۱۹۸۸): Huang و همکاران (۱۹۹۳): Bregitzer و همکاران (۱۹۹۵)، می‌باشد. در جنین‌های نارس با سن بیشتر و یا اندازه بزرگتر، قبل از تولید کالوس تولید برگ گردید، که این پدیده

1- Zygotic

توسط He و همکاران (۱۹۸۸) نیز گزارش گردیده است. طویل شدن برگهای مذکور ممکن است جنینهای مربوطه را از روی محیط کشت جدا نموده و از ادامه رشد کالوس جلوگیری نماید. از طرف دیگر کالوس از جنینهای بسیار ریز تولید نگردید که موافق با مشاهدات Sears و Deckard (۱۹۸۲) می‌باشد و علیرغم توجه کافی به انتخاب جنین‌های با اندازه مناسب، در تعداد قابل ملاحظه‌ای از جنینهای برگ تشکیل گردید، ولی با قطع برگها، کالوسهای ایجاد شده به رشد ادامه دادند. بنابراین علیرغم محدودیت دسترسی به جنینهای نارس برای تولید کالوس، از آنها به عنوان ریزنمونه استفاده می‌گردد.

ترکیب محیط کشت و غلظت هورمونهای تنظیم کننده رشد

محیط کشت نیز از عوامل مهم موثر بر تولید کالوس در گیاه می‌باشد. در این مطالعه دو محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت. همانطور که در جدول‌های ۱ و ۲ دیده می‌شود جایگزینی نیترات آمونیوم با نیترات سدیم محیط کشت MSm را از محیط کشت MS متمایز ساخته است. نتایج بدست آمده اختلاف معنی‌داری را بین این دو محیط کشت در ایجاد کالوس نشان ندادند ($P<0.05$). در ایجاد کالوس از غلاف گل‌آذین جو توسط Barcelo و همکاران (۱۹۹۲) نیز غلظت نیترات آمونیوم بر تکثیر کالوس اثری نداشته است. با این وجود در هر دو گونه تحت بررسی در این مطالعه، کالوس برروی محیط کشت با نمکهای پایه MS زودتر تشکیل گردید. همچنین، کالوسهای ایجاد شده از جنین (بذر)های رسیده جو بر روی محیط کشت فوق افزایش معنی‌داری ($P<0.05$) را در رشد نشان دادند (جدول ۴). گزارش‌هایی نیز وجود دارد که ترکیبات مغذی محیط کشت را عامل تنوع در کشت بافت قلمداد نموده‌اند (Dale و Deambrogio، ۱۹۷۹؛ Lührs و Lurz، ۱۹۸۸؛ Brisibe و همکاران، ۱۹۹۴؛ Fellers و همکاران، ۱۹۹۵).

نظر به اینکه از معیارهای مهم انتخاب ترکیب محیط کشت تشکیل و رشد سریعتر

کالوس می‌باشد بنابراین MS محیط کشت نسبتا مناسب‌تری برای ایجاد و تکثیر کالوس بویژه در جو پیشنهاد می گردد.

استفاده از اکسین مصنوعی 2,4-D برای تولید و نگهداری کالوس در گندمیان و بویژه غلات ضروری می‌باشد (Bregitzer، ۱۹۹۵؛ Vasil، ۱۹۸۷). تشکیل کالوس بر روی محیط کشت حاوی ۱ تا ۸ میلیگرم در لیتر 2,4-D امکانپذیر می‌باشد. مقدار قابل ملاحظه‌ای از این هورمون برای تولید کالوس از جنین جو مورد نیاز می‌باشد (Dunn و Bayliss، ۱۹۷۷؛ Lupotto، ۱۹۸۴). پس از استفاده از غلظت‌های ۰/۵، ۲/۵ و ۵ میلیگرم در لیتر از 2,4-D در محیط کشت، بهترین میزان تشکیل کالوس در غلظت ۲/۵ میلیگرم در لیتر و در گل‌آذین گندم بود. غلظت پایین‌تر یعنی ۰/۵ میلیگرم در لیتر هورمون مورد بحث تشکیل ریشه را افزایش داد ولی افزایش غلظت این هورمون (۵ میلیگرم در لیتر) میزان کال‌زایی را افزایش نداد (Sharma و همکاران، ۱۹۹۵).

در این مطالعه اثر غلظتهای ۱ و ۳ میلیگرم در لیتر 2,4-D بر تشکیل و رشد کالوس مورد بررسی قرار گرفت (جدولهای ۳ و ۴). اگرچه افزایش هورمون از ۱ به ۳ میلیگرم در لیتر تغییر کمی را در ایجاد کالوس باعث شد، اما در غلظت بالاتر هورمون (۳ میلیگرم در لیتر) رشد کالوس به طور معنی‌داری ($P<0.05$) افزایش یافت. این ماده شیمیایی در غلظتهای پایین یک هورمون تنظیم‌کننده رشد است، درحالیکه در غلظتهای بالا به عنوان یک علف‌کش عمل نموده و رشد را مختل می‌سازد و می‌تواند برای سلولها سمی بوده و به آنها آسیب برساند (Balke، ۱۹۸۵). لذا در این مطالعه بالاترین غلظت استفاده شده 2,4-D برابر با ۳ میلیگرم در لیتر بود.

ژنوتیپ (گونه گیاهی)

علاوه بر عوامل فوق‌الذکر، ژنوتیپ گیاه نیز در تشکیل و رشد کالوس و کشت‌های درون شیشه‌ای مؤثر می‌باشد. در این مطالعه توانایی گونه‌های زراعی و وحشی جو در

کال‌زایی و ادامه رشد کالوسها را پس از تشکیل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده اختلافات بین گونه‌ای را برای تشیکل و رشد کالوس نشان دادند. بذرهای حاوی جنین‌های رسیده و جنین‌های نارس هر دو گونه مورد بررسی توانایی تولید کالوس را نشان دادند، اما نتایج مربوطه بر اختلاف معنی‌دار در تشکیل کالوس و عملکرد بالاتر کالوس در جو زراعی دلالت دارد. کالوسهای ایجاد شده از هر دو گونه وحشی و زراعی جو پس از تشکیل به رشد ادامه دادند، لیکن رشد در کالوسهای بدست آمده از هر دو ریزنمونه جو وحشی متوقف گردید، رنگ آنها زرد متمایل به قهوه‌ای شده و ۵ تا ۶ هفته پس از تشکیل، سلولهای آنها از بین رفتند، اما در شرایط مشابه کالوسهای ایجاد شده از جو رزاعی وضعیت ظاهری عادی برخوردار بوده و قابلیت نگهداری بیش از سه سال را از خود نشان دادند. همچنین تنوع از نظر کال‌زایی در ژنوتیپهای مختلف در گونه‌های گندمیان گزارش شده است (Duncan و همکاران، ۱۹۸۵، Vasil، ۱۹۸۷). از این نظر حتی بین واریته‌های مختلف جو نیز اختلافاتی دیده شده است (Ohkoshi و همکاران، ۱۹۹۱). تولید کمتر، عدم تداوم رشد و عمر کوتاه کالوس‌ها در جو وحشی اختلافات ژنوتیپی را در واکنش به کشت درون‌شیشه‌ای (*In vitro*) را نشان داد، اما نمی‌توان قطعاً گفت که این گونه واکنش مثبتی به کشت بافت نشان نمی‌دهد. دلیل این امر امکان وجود اثر متقابل بین ژنوتیپ و محیط کشت می‌باشد، بدین معنی که یک گونه با واریته بخصوص بر روی یک نوع محیط کشت تولید کالوس نماید ولی به محیط کشت دیگر واکنش خوبی نشان ندهد (Hanzel و همکاران، ۱۹۸۵). بنابراین، چون احتمالاً یک روش کشت بافت نمی‌تواند برای تمام گونه‌های *Hordeum* مناسب باشد، تنظیم و فراهم نمودن شرایط مطلوب کشت بافت برای *H. murinum* می‌تواند به تولید و تکثیر موفق و مورد نظر کالوس در این گونه بیانجامد. برای ایجاد و ازدیاد موفقیت‌آمیز کالوس بایستی با تغییر ترکیب نمکهای پایه، نوع و غلظت هورمونهای تنظیم‌کننده رشد و یا سایر اجزاء محیط کشت مورد استفاده شرایط مطلوب را برای کشت بافت مهیا نمود.

منابع

Bajaj, S. and M.V. Rajam, 1995. Efficient plant regeneration from long-term callus cultures of rice by spermidine. Plant Cell Reports, 14: 717-720.

Balke, N.E. 1985. Herbicide effects on membrane functions. In: Duke, S.O.(ed.), Weed physiology, vol. II: Herbicide physiology. Boca Raton: CRC Press, pp 113-140.

Barcelo, P., P.A. Lazzeri, A. Martin and H. Loehrz, 1992. Competence of cereal leaf cells. II. Influence of auxin, ammonium and explant age on regeneration. Journal of Plant Physiology, 139: 448-454.

Bayliss, M.W. and S.D.M. Dunn, 1979. Factors affecting callus formation from embryos of barley *(Hordeum vulgare)*. Plant Science Letters, 14: 311-316.

Becher, T., G. Haberland, and H.U. Koop, 1992. Callus formation and plant regeneration in standard and microexplants from seedlings of barley *(Hordeum vulgare L.)*. Plant Cell Reports, 11: 39-43.

Bregitzer, P. 1992. Plant regeneration and callus type in barley: Effects of genotype and culture medium. Crop Science, 32: 1108-1112.

Bregitzer, P., R.D., Campbell, and Y. Wu, 1995. Plant regeneration from barley callus: Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and phenylacetic acid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 43: 229-235.

Brisibe, E.A., H. Miyake, T. Taniguchi, and E. Maeda, 1994. Regulation of somatic embryogenesis in long-term callus cultures of sugarcane *(Sacharum officinarum* L.). New Phytologist, 126: 301-307.

Cheng, T. and H.H. Smith, 1975. Organogenesis from callus

culture of *Hordeum vulgare*. Planta, 123: 307-310.

Dale, P.J. and E. Deambrogio, 1979. A comparison of callus induction and plant regeneration from different explants of *Hordeum vulgare*. Zeitschrift Pflanzenphysiologie, 94: 65-77.

Duncan, D.R., M.E., Williams, B.E., Zehr and J.M. Widholm, 1985. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. Planta, 165: 322-332.

Fellers, J.P., A.C. Guenzi, and C.M. Taliafero, 1995. Factors affecting the establishment and maintenance of embryogenic callus and suspension cultures of wheat *(Triticum aestivum L.)*. Plant Cell Reports, 15: 232-237.

Galiba, G. and L. Erdei, 1986. Dependence of wheat callus growth, differentiations and mineral content on carbohydrate supply. Plant Science, 45: 65-70.

Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K Ojima, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158.

Golstein, C.S. and W.E Kronstad, 1986. Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley, *Hordeum vulgare*. Theoretical and applied Genetics, 71: 631-636.

Hanzel, J.J., J.P. Miller, Brinkman, M.A. and E. Fendos, 1985. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. Crop Science, 25: 27-31.

He, D.G., Y.M. Yang, G., Dahler, K.J. Scott, 1988. A comparison of epiblast callus and scutellum callus induction in wheat: The effect of embryo age, genotype and medium. Plant Science, 57: 225-233.

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.

Luhrs, R. and H. Lorz, 1988. Initiation of morphogenic cell-suspension and protoplast cultures of barley *(Hordeum vulgare)*. Planta, 175: 71-81.

Larue, C.D. 1949. Cultures on the endosperm of maize. American Journal of Botany, 34: 585-586.

Lupotto, E. 1984. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos. Annals of Botany, 54: 523-529.

Maddock, S.E., V.A., Lancester, R. Risiott, and J. Franklin, 1983. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences in 25 cultivars of wheat *(Triticum aestivum)*. Journal of Experimental Botany, 34: 915-926.

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

Ohkoshi, S., S. Komatsuda, M., Enomoto, M. Taniguchi, and K. Ohyama. 1991. Variations between varieties in callus formation and plant regeneration from immature embryos of barley. Bulletin. National Institute of Agrobiological Resources, 6: 189-207.

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.

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

Sharma, V.K., A., Rao, A. Varsheng, and S.L. Kothari, 1995. Comparison of development stages of inflorescence for high frequency plant regeneration in *Triticum aestivum* L. and *T. durum* Dest. Plant Cell Reports, 15: 227-231.

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(1): 88-90.

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.

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, V. and I.K. Vasil, 1982. The ontogeny of somatic embryos of Pennisetum americanum (L.) K. Schum I in cultured immature embryos. Botanical Gazette, 143: 454-465.

Yamada, Y. 1977. Tissue culture studies on cereals. In: Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj, (eds), Applied and fundamental aspects of plant cell, Tissue and organ culture. New Delhi: Narosa Publishing House, pp 144-159.

Ziauddin, A. 1986. tissue culture studies in barley (*Hordeum vulgare* L.) with emphasis on chromosomal variability (Abstract). University of Guelph Dissertation abstracts International, B (Sciences and Engineering), 47(2): 455B.

In vitro culture responses of *Hordeum murinum* and *H. vulgare*, and factors affecting on callus formation and growth

Seyed R. Tabaei-Aghdaei

Research Institute of Forests and Rangelands

Abstract

Successful tissue culture research and its practical application require a reliable culture procedure. During the tissue culture practices, the effects of genotype, medium composition and growth regulator (2,4-D) concentration on callus induction and growth were tested. A wild species of the genus *Hordeum* (*Hordeum murinum*), was tested beside the cultivated barley (*Hordeum vulgare*), for the study of genotypic variation in response to tissue culture. Matue seeds or immature embryos of both wild and cultivated barley species were used as explants. Culture media contained MS macro- and micronutrients, or MSm (modified MS based salt), supplemented with 1.0 or 3.0 mg/l dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as a growth regulator.

On both of the test media, seedlings grown from seeds of both wild and cultivated barley produced callus. Averaging across genotype, the number of calli induced was greater in cultivated than wild barley. MS based medium gave faster callus induction than MSm based medium, although the medium formulations showed no difference for callus induction in tested genotypes.

Comparisons across media revealed that callus growth in cultivated barley was greater on MS than MSm based medium. Furthermore, although little difference was observed in callus induction between the test concentrations of 2,4-D between two genotypes, calli obtained from cultivated barley grew faster in response to 3.0 than 1.0 mg/l 2,4-D on both media. Callus was also initiated from immature embryos of both test species on the medium containing MS based salts and 3 mg/l 2,4-D. Cultivated barley showed a higher efficiency of callus production (84.5%) than wild barley (77.7%). Also, calli derived from both mature and immature embryos of cultivated barley showed prolonged growth, but the induced calli in wild barley ceased growth, turned brown and died after a few weeks.

Keywords: *Hordeum vulgare, Hordeum murinum, In vitro culture,* Callus, Medium, Plant growth regulators, Mature and immature embryos.