دانشگاه گیلان
دانشکده علوم کشاورزی

تحقیقات غلات

دوره هفتم/ شماره سوم/ پاییز ۱۳۹۶ (۴۳۵-۴۲۱)

ارزیابی ارتباط بین صفات مرتبط با کالوس‌زایی جنین بالغ و صفات زراعی در ژنوتیپ‌های مختلف جو (*Hordeum vulgare* L.)

رقیه ناصری میانکلی[۱]، کیانوش چقامیرزا[۲*]، لیلا زارعی[۳] و الهه سارویی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۳

چکیده

تولید کالوس از طریق کشت جنین بالغ امکان باززایی مؤثری را برای بسیاری از گیاهان در شرایط کشت بافت فراهم می کند. انتخاب براساس یک صفت زراعی می‌تواند بعنوان روشی مناسب برای پیش گویی نتایج کشت بافت که یک روش پر هزینه و زمان بر است مورد استفاده قرار گیرد. در تحقیق حاضر واکنش ۴۲ رقم جو ایرانی و اروپایی به کشت جنین بالغ و ارتباط صفات کشت جنین با صفات زراعی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که اثر ژنوتیپ برای صفات سرعت رشد کالوس، قطر کالوس، محتوای آب نسبی کالوس و سرعت رشد نسبی کالوس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. میزان القاء کالوس از جنین‌های بالغ ارقام مورد بررسی ۱۰۰ درصد بود. ارقام ASTARTIS و افضل از نظر صفات سرعت رشد کالوس و درصد تولید گیاهچه‌های کامل به‌عنوان برترین ارقام شناخته شدند. تجزیه خوشه‌ای به روش "حداقل واریانس وارد" ارقام را در چهار گروه قرار داد که ارقام گروه چهارم دارای بالاترین مقادیر سرعت رشد کالوس، قطر کالوس و سرعت رشد نسبی بودند. نتایج تجزیه همبستگی نشان داد که بین صفت قطر کالوس با صفات سرعت رشد کالوس، سرعت رشد نسبی کالوس، طول برگ پرچم و ارتفاع گیاه همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت. نتایج تجزیه علیت نشان داد که پس از صفت روز تا گرده‌افشانی، صفت روز تا سنبله‌دهی و طول برگ پرچم به‌ترتیب بیشترین تأثیر مستقیم را بر صفات مورد بررسی در کشت جنین داشتند. مقایسه پاسخ دو نوع ریزنمونه (جنین بالغ و نابالغ) به کشت بافت نشان داد که جنین‌های بالغ با وجود پاسخ کمتر به کشت بافت در مرحله القاء کالوس، از پاسخ مناسب‌تر و بالاتری در مرحله باززایی برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: القاء کالوس، باززایی، تجزیه علیت، سرعت رشد کالوس

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
* نویسنده مسئول: cheghamirza@yandex.ru

مقدمه

جو (*Hordeum vulgare*) در کنار گندم، برنج و ذرت یکی از چهار غله مهم در دنیا بوده و سالیانه با تولید ۱۴۱/۸ میلیون تن در سال و با سطح زیر کشت ۵۷/۸ میلیون هکتار جزء یکی از مهم‌ترین غلات دنیا می‌باشد. طبق آمار فائو (Food and Agriculture Organization, 2012) ایران با تولید سالیانه ۲/۸ میلیون تن و سطح زیر کشت سالانه ۱/۶۴ میلیون هکتار در رده چهاردهم طبقه‌بندی کشورهای تولید کننده این محصول قرار می‌گیرد. به‌علت محدودیت سطح زیر کشت محصولات زراعی و نیز وجود تنش‌های زنده (آفات و بیماری‌ها) و غیرزنده (خشکی، شوری و سرما) از یک‌سو و افزایش جمعیت از سوی دیگر، تقاضا برای بهبود کمیت و کیفیت این محصول مهم زراعی افزایش یافته و بنابراین دستیابی به روش‌های سریع اصلاح ژنتیکی امری اجتناب‌ناپذیر است (Nourmohammadi *et al*., 2001).

کشت جنین گیاهی یکی از روش‌های کشت بافت گیاهی است که برای حل مشکلات کاربردی و پژوهشی در علوم گیاهی و کشاورزی به‌کار می‌رود. این روش بر مبنای جداسازی جنین استریل و انتقال آن به یک محیط کشت مناسب و مطلوب جهت ادامه رشد و نمو تحت شرایط بهینه پایه‌گذاری شده است. این روش مدت‌ها پیش در اصلاح نباتات برای تولید گیاهان دورگ بین‌گونه‌ای یا بین‌جنسی به کار برده شده است، زیرا در اغلب این نوع تلاقی‌ها جنین سقط می‌شود (Mark, 1994; Swati and Abdel-Hady, 2007). در غلات تولید کالوس‌های جنین‌زا از جنین نابالغ، جنین بالغ، برگ‌های جوان و دانه گرده گزارش شده است (Komatesuda *et al*., 1989). در کشت جنین بالغ، جنین‌های بالغ جدا شده از بذرهای رسیده کشت می‌شوند. از تولید کالوس و باززایی آن برای تکثیر کلونی، گزینش درون شیشه‌ای، ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده با استفاده از تنوع سوماکلونی ناشی از محیط کشت و در مهندسی ژنتیک به‌منظور انتقال ژن موردنظر از منبعی بیگانه به گیاه زراعی استفاده شده است. بهبود باززایی از کالوس و تولید گیاه کامل تحت تأثیر عوامل مختلف نظیر ژنوتیپ گیاه دهنده جنین و تنظیم کننده‌های رشد می‌باشد (Satyvathi *et al*., 2004).

اوزگن و همکاران (Ozgen *et al*., 1996) جنین‌های بالغ و نابالغ هفت ژنوتیپ گندم دوروم زمستانه را روی محیط کشت MS حاوی 2, 4- D بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که جنین‌های بالغ فراوانی کمتری در تشکیل کالوس دارند، اما ظرفیت باززایی بالاتری در مقایسه با جنین‌های نابالغ دارند. بارون و کوبنپویازگلو (Burun and Cobanpoyazoglu, 2002) کالوس‌زایی و باززایی از جنین‌های بالغ و نابالغ جو را بررسی و دریافتند که ظرفیت باززایی وابسته به ژنوتیپ بوده و توانایی القای کالوس و باززایی در جنین‌های بالغ بیشتر از نابالغ است. سنارات و همکاران (Senarath *et al*., 2004) اثر سه نوع از تنظیم کننده‌های رشد اکسین شامل 2, 4- D، پیکلورام (Picloram) و دای‌کامبا (Dicamba) را روی جنین‌های نابالغ چند رقم جو بهاره مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که بیشترین درصد باززایی و تشکیل کالوس در محیط کشت حاوی 2, 4-D صورت می‌گیرد. ابومهادی و همکاران (Abumhadi *et al*., 2005) چهار رقم جو بلغار را به‌عنوان منابع جنین‌های بالغ و نابالغ جهت کشت در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار دادند و تفاوت زیادی بین ژنوتیپ‌ها در پاسخ به کشت در شرایط آزمایشگاهی برای هر دو ریزنمونه مشاهده نشد. مقایسه پاسخ به دو نوع کشت جنین (بالغ و نابالغ) نشان داد که استفاده از جنین‌های بالغ روش مفیدتری برای باززایی گیاه بود. در نتیجه با در دسترس بودن آن در تمام طول سال، می‌تواند به‌عنوان یک منبع ریزنمونه مؤثر در مطالعات جو مورد استفاده قرار گیرد. گارل و همکاران (Gurel *et al*., 2009) در بررسی ظرفیت القاءکالوس و باززایی کالوس‌های حاصل از جنین‌های بالغ هشت واریته جو ترکیه تحت تأثیر هورمون‌های مختلف رشد گیاهی (2, 4- D، دای‌کامبا، TDZ و ZR)، محیط کشت حاوی چهار میلی‌گرم در لیتر دای‌کامبا را برتر تشخیص دادند. در پژوهشی که توسط آجلونی و همکاران (AL-Ajlouni *et al*., 2012) به‌منظور بررسی کالوس‌زایی جنین شش ژنوتیپ جو در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D انجام شد، تنوع معنی‌داری میان ژنوتیپ‌ها از نظر کالوس‌زایی مشاهده شد. همچنین امره و همکاران (Emre *et al*., 2012) با کشت جنین‌های بالغ جو در در محیط کشت MS حاوی سه میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D موفق به تولید کالوس شدند. طی آزمایشی توسط گوبیسوا و همکاران (Gubisova *et al*., 2012) نه رقم جو بهاره اسلواکی جهت باززایی در غلظت‌های مختلف (۰/۱ و ۱ میلی گرم در لیتر) TDZ و BAP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان باززایی در جنین‌های بالغ کمتر از جنین‌های نابالغ است و کالوس به‌دست آمده از جنین‌های نابالغ بیشترین موفقیت

را در باززایی گیاه جو نشان داد. هوآ و همکاران (Hua *et al.*, 2013) با ارزیابی القاء کالوس و باززایی کشت جنین‌های بالغ در ۲۱۵ رقم جو چینی نشان دادند که بیشترین بهره‌وری و نرخ رشد کالوس در محیط حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D به‌دست آمد و همچنین تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر القاء کالوس و باززایی معنی‌دار شد.

جنین‌های نابالغ به‌عنوان یکی از بهترین ریزنمونه‌ها برای باززایی گیاه جو هستند، اما در دسترس نبودن آن‌ها در طول سال و حساس بودن آن‌ها در برداشت در مرحله خاصی جهت کشت از عوامل محدود کننده این روش محسوب می‌شوند. در غلات، جنین بالغ علی‌رغم عدم محدودیت در زمان و دسترسی آسان، به‌دلیل پاسخ ضعیف‌تر به کشت بافت نسبت به جنین نابالغ کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (Oka *et al.*, 1995). متأسفانه ژنوتیپ‌های گیاهی با واکنش مطلوب به کشت بافت در مراحل اولیه پروژه‌های به‌نژادی به‌دلیل شناخت اندک مکانیسم‌های مرتبط قابل تشخیص نیستند. همچنین ارزیابی تعداد زیاد ژنوتیپ‌ها از طریق کشت بافت بسیار پرهزینه و زمان‌بر می‌باشد (Li *et al.*, 2003). بنابراین انتخاب بر اساس یک صفت زراعی که اندازه‌گیری آن ساده‌تر و در عین حال با صفات کشت بافتی نیز همبستگی داشته باشد، می‌تواند به‌عنوان روشی مناسب برای پیش‌گویی نتایج کشت بافت باشد. هالیلوگلو و همکاران (Haliloglu *et al.*, 2005) در بررسی ارتباط بین صفات کشت بافتی و صفات زراعی نشان دادند که رطوبت کالوس با سرعت پر شدن دانه و عملکرد دانه و درصد القاء کالوس با تعداد سنبله در متر مربع و تعداد دانه در سنبله رابطه داشت، اما صفات مرحله القاء کالوس با دیگر صفات زراعی ارتباط معنی‌داری نداشتند. لی و همکاران (Li *et al.*, 2003) طی پژوهشی رابطه بین صفات کشت بافت و صفات زراعی گندم بهاره را بررسی و دریافتند که بین درصد القاء کالوس با تعداد دانه در سنبله، و بین وزن کالوس با تعداد پنجه در بوته و تعداد دانه در سنبلچه ارتباط معنی‌دار وجود دارد. ارتباط بین صفات زارعی و صفات کشت بافتی شاید این مفهوم را می‌رساند که ژن‌های کنترل کننده صفات زراعی و کشت بافت با یکدیگر در سطح مولکولی تداخل و یا تعامل دارند. از این‌رو تحقیق حاضر به‌منظور ارزیابی واکنش به کشت جنین بالغ ارقام جو ایرانی و اروپایی و بررسی ارتباط بین صفات کشت جنین و صفات زراعی در این گیاه انجام شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور اجرای آزمایش، بذر ۴۲ رقم جو بهاره و پاییزه دریافت‌شده از مرکز تحقیقات کشاورزی کرمانشاه و مرکز تحقیقات ژنومیکس و پست ژنومیکس گیاهی و جانوری کشور ایتالیا (CRA-GPG) (جدول ۱) بر اساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی در آبان‌ماه سال ۱۳۹۲ کشت و از ۱۱ صفت مرتبط با عملکرد جو در مراحل مختلف رشد یادداشت‌برداری شد. صفات اندازه‌گیری شده در مزرعه شامل طول برگ پرچم، تعداد دانه در سنبله، ارتفاع گیاه، طول ریشک، طول دانه، عرض دانه، روز تا سنبله‌دهی، روز تا گرده‌افشانی، دوره پر شدن دانه، عملکرد دانه و وزن هزار دانه بودند.

به‌منظور بررسی پاسخ به کشت جنین بالغ، آزمایش در مرحله القاء کالوس در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار و هر تکرار (پتری دیش) شامل ده جنین بالغ گیاه جو انجام شد. بذرهای رسیده به‌منظور جداسازی جنین‌های بالغ به مدت ۴-۳ ساعت قبل از کشت در آب مقطر خیسانده شدند و سپس جنین‌های جدا شده تحت شرایط استریل در محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D کشت شدند. اندازه‌گیری کالوس‌های حاصل به صورت هفتگی و به مدت چهار هفته انجام شد. باززایی کالوس‌های حاصل در محیط کشت MS با تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در ژرمیناتور با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۶ درجه سلسیوس به مدت چهار هفته انجام شد. صفات درصد القاء کالوس، قطر کالوس، سرعت رشد کالوس، سرعت رشد نسبی کالوس، رشد نسبی کالوس، درصد محتوای آب کالوس، وزن تازه روز هفتم و وزن تر کالوس در مرحله القاء کالوس و صفات درصد باززایی کل، درصد ریشه‌زایی، درصد ساقه‌زایی و درصد تولید گیاهچه کامل در مرحله باززایی اندازه‌گیری شدند. داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SAS و SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و برای مقایسه میانگین تیمارها نیز از روش چنددامنه‌ای دانکن استفاده شد.

جدول ۱- نام و مشخصات ۴۲ رقم جو مورد استفاده در مطالعه حاضر

Table 1. Name and characteristics of 42 barley cultivars used in present study

شماره No.	رقم Cultivar	محل جغرافیایی Geographic location	شجره Pedigree	تیپ رشد Growth type	تعداد ردیف No. of row	تیپ دانه Grain type	زمان کشت Sowing time
1	KAROON کارون	Iran ایران	Strain- 205	F	6	H	W
2	AFZAL افضل	Iran ایران	Chahafzal	F	6	H	W
3	SAHRA صحرا	Iran ایران	L. B. LRAN/ Una8271// Giorias"s" Com	F	6	H	W
4	NOSRAT نصرت	Iran ایران	Karoon/Kavir	F	6	H	W
5	MAKOOEI ماکویی	Iran ایران	Star	F	6	H	W
6	MAHOR ماهور	Iran ایران	Wi2291/Wi2269//Er/Amp	W	2	H	W
7	FAJR30 فجر۳۰	Iran ایران	Lignee131/ Gerbet//Alger- Ceres/ jonoob	F	6	H	W
8	YOOSEF یوسف	Iran ایران	Lignee527/chn-01//Gustoe/4/Rhn-08/3/Deir Alla 106//DI71/strain 205	S	6	H	W
9	ZARJO زرجو	Iran ایران	1-28-9963	F	6	H	W
10	ARAS ارس	Iran ایران	Arumir	F	2	H	W
11	NIMROOZ نیمروز	Iran ایران	Trompillo, CMB74A-432-25B-1Y-IB-IY-OB	F	2	H	W
12	GORGAN4 گرگان۴	Iran ایران	Herta	F	2	H	W
13	SARAROOD سرارود	Iran ایران	Chicm/An57//Albert	W	2	H	W
14	JO DANMARK	Iran ایران	Denmark55	W	2	H	W
15	JONOOB جنوب	Iran ایران	Gloria" s"/ Copal"s"	F	6	H	W
16	REYHAN ریحان	Iran ایران	Rihane-03/4Alanda/lLignee5 27/Arar/3/Centinela/2*	S	6	H	W
17	AIRONE	Europe اروپا	Gitane x FIOR 763	W	2	N	W
18	AQVIRONE	Europe اروپا	FIOR 5186 x Naturel	W	2	H	W
19	SIRIO	Europe اروپا	FIOR 2136 x Arco	W	2	H	W
20	ASTARTIS	Europe اروپا	(IABO x Arda3) x Amillis	W	2	N	S
21	ZACINTO	Europe اروپا	IABO 329 x Arda	W	2	N	S
22	SCIROCCO	Europe اروپا	FIOR 1000 x Express	S	6	H	W
23	TIDONE	Europe اروپا	(Okos x 273 cat.) x Igri	S	2	H	W
24	DORIA	Europe اروپا	(Nure x Zita)x(Nure x PO 202.169)	W	2	H	W
25	MARTINO	Europe اروپا	FIOR 3007 x Federal	W	6	H	W
26	SFERA	Europe اروپا	((Katy x HJ54/30) x Igri x Arda) x (Tipper x Sonja)) x Amillis	W	2	H	W
27	PARAGELIA	Europe اروپا	Airone x Arco	W	2	H	W
28	ARDA	Europe اروپا	Igri x HJ 51-15-3	W	2	H	W
29	ALCE	Europe اروپا	(Tipper x Igri3) x [(Tipper x Alpha)x(Sonja x Wb117/18)]	W	2	H	W
30	TREBBIA	Europe اروپا	selection from Fior Synt 3	W	6	H	W
31	COMETA	Europe اروپا	PO202.169 x FO 3358	W	2	H	W
32	PONENTE	Europe اروپا	(Vetulio x Arma) x Express	W	6	H	W
33	RODOROZ	Europe اروپا	Baraka x Gotic	W	2	H	W
34	ALFEO	Europe اروپا	Tipper x Igri	W	2	H	W
35	ALISEO	Europe اروپا	(Plaisant x Gerbel) x Express	W	6	H	W
36	VEGA	Europe اروپا	Rebelle x FIOR 1341	W	6	H	W
37	PANAKA	Europe اروپا	Amillis x Diadem	W	2	H	W
38	ALIMINI	Europe اروپا	FIOR 2551 x Federal	W	6	H	W
39	EXPLORA	Europe اروپا	[(Onice\Arma\\Onice\Mirco\\\Jaidor) x (Plaisant\Jaidor\Express)] x Gotic	W	6	H	W
40	AIACE	Europe اروپا	FO 1078 x FO 1638	W	2	H	W
41	NURE	Europe اروپا	(FIOR 40 x Alpha2) x Baraka	W	2	H	W
42	ALDEBARAN	Europe اروپا	Rebelle x Jaidor	W	6	H	W

F, facultative; S, spring; W, winter; H, hulled; N, naked. F دائمی، S بهار، W زمستان، H پوشینه‌دار، N بدون پوشینه.

نتایج و بحث

القاء کالوس و باززایی کالوس‌های حاصل از کشت جنین بالغ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها در مرحله القاء کالوس (جدول ۲) نشان داد که اثر ژنوتیپ روی صفات سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطر در روز)، قطر کالوس (میلی‌متر)، درصد محتوای آب نسبی کالوس و سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر) معنی‌دار بود. ابومهادی و همکاران (Abumhadi *et al.*, 2005)، سیکاندار و همکاران (Sikandar *et al.*, 2007)، آجلونی و همکاران (AL-Ajlouni *et al.*, 2012)، امره و همکاران (Emre *et al.*, 2012)، گوبیسوا و همکاران (Gubisova *et al.*, 2012) و رستمی و همکاران (Rostami *et al.*, 2013) نیز در بررسی القاء کالوس در جنین بالغ جو اثر ژنوتیپ را بر صفات مورد بررسی معنی‌دار گزارش کردند. در بین ارقام مورد آزمایش از نظر وزن تر کالوس، رشد نسبی کالوس و وزن تازه روز هفتم تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. درصد القاء کالوس مشاهده شده برای کلیه ژنوتیپ‌ها ۱۰۰ درصد بود. کالوس‌دهی ۹-۶ روز پس از کشت در جنین‌های کشت شده آغاز شد و پس از ۱۴-۱۰ روز از کشت، کالوس در کلیه جنین‌ها تشکیل شد (شکل ۱-A). باززایی کالوس‌های حاصل بعد از چهار هفته در محیط کشت باززایی انجام شد (شکل ۱- B).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها در مرحله باززایی (جدول ۳) نشان داد که در میان صفات مورد بررسی، اثر ژنوتیپ فقط بر درصد تولید گیاهچه کامل از کالوس معنی‌دار بود. اثر معنی‌دار رقم در مرحله باززایی کالوس حاصل از جنین بالغ جو توسط امر و همکاران (Emre *et al.*, 2012)؛ آجلونی و همکاران (AL-Ajlouni *et al.*, 2012) و رستمی و همکاران (Rostami *et al.*, 2013) نیز گزارش شده است. بر اساس نظر برخی محققان اثر رقم بر صفات ممکن است به تغییرات در سطوح هورمون‌های درون‌زا مربوط شود (Norstog, 1970; Hess and Carman, 1998). علاوه بر عوامل فیزیولوژیک مؤثر بر باززایی، نتایج برخی آزمایش‌ها بیانگر کنترل ژنتیکی صفات مؤثر در کشت بافت است، به‌طوری که تعدادی از ژن‌های کنترل کننده صفات باززایی در گندم، برنج، جو و دیگر گونه‌های گیاهی مورد شناسایی قرار گرفته‌اند (Ben Amer *et al.*, 1997).

نتایج مقایسه میانگین صفات (جدول ۴) نشان داد که ارقام ایرانی افضل، نیمروز و رقم اروپایی ASTARTIS از نظر صفات سرعت رشد کالوس، قطر کالوس، درصد محتوای آب کالوس و سرعت رشد نسبی کالوس بیشترین میزان و رقم ایرانی ماکویی و ارقام اروپایی VEGA، AIRONE و ALFEO کمترین میزان را به خود اختصاص دادند. بیشترین درصد تولید گیاهچه کامل در رقم‌های افضل و نیمروز و کمترین میزان آن در رقم‌های ماکویی و ALISEO حاصل شد (جدول ۴). بر اساس نتایج آزمایش ابومهادی و همکاران (Abumhadi *et al.*, 2005) القاء کالوس و به‌ویژه باززایی گیاه از کالوس مهم‌ترین و مؤثرترین شاخص در کشت‌های درون شیشه‌ای هستند که تحت تأثیر ژنوتیپ و ریزنمونه اولیه قرار می‌گیرند. نتایج تحقیق حاضر با نتایج آن‌ها در دو مرحله القاء کالوس و باززایی مبنی بر معنی‌دار بودن اثر ژنوتیپ مطابقت داشت.

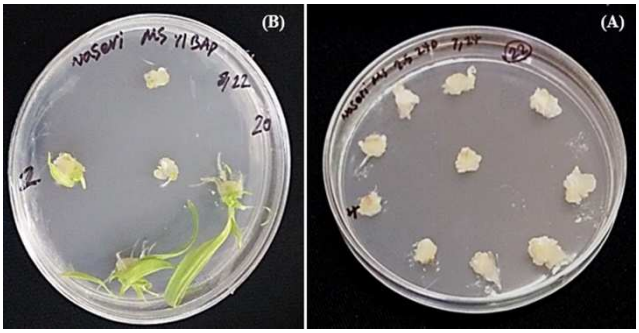
جدول ۲- تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در مرحله کالوس‌زایی جنین بالغ ۴۲ رقم جو

Table 2. Analysis of variance for the measured traits in callus stage of mature embryo of 42 barley cultivars

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares						
		سرعت رشد کالوس Callus growth rate	قطر کالوس Callus primary diameter	رشد نسبی کالوس Relative fresh weight growth	درصد آب نسبی کالوس Relative water content	وزن تازه روز هفتم Fresh weight in 7th day	وزن تر کالوس Callus fresh weight	سرعت رشد نسبی کالوس Callus relative growth rate
رقم Cultivar	41	0.136**	0.067**	0.006ns	0.0008**	0.002ns	0.00005ns	0.035**
خطای آزمایش Error	168	0.032	0.024	0.005	0.0002	0.002	0.00007	0.014
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	16.9	14.7	11.8	3.13	10.10	14.7	11.9

ns و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ ٪.

ns and **: Not-significant and significant at 1% probability level, respectively.



شکل ۱- کالوس‌زایی (A) و باززایی کالوس‌ها (B) از کشت جنین بالغ جو
Figure 1. Callus induction (A) and plant regeneration from mature embryo culture of barley

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در مرحله باززایی کالوس‌های حاصل از کشت جنین بالغ جو
Table 3. Analysis of variance for the measured traits in regeneration stages of the callus derived from mature embryo culture of barley

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares			
		درصد ساقه‌زایی Shooting (%)	درصد ریشه‌زایی Rooting (%)	درصد گیاهچه کامل Complete plantlet (%)	درصد باززایی کل Total regeneration (%)
رقم Cultivar	41	0.0014^{ns}	0.0015^{ns}	0.0081**	0.0047^{ns}
خطای آزمایش Error	84	0.0014	0.0017	0.0016	0.0036
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	14.46	18.13	16.5	15.8

^{ns} و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.
^{ns} and **: Not-significant and significant at 1% probability level, respectively.

نتایج مقایسات گروهی نشان داد که بین ارقام ایرانی با ارقام اروپایی، ارقام دو ردیفه ایرانی با دو ردیفه اروپایی و ارقام شش ردیفه ایرانی با شش ردیفه اروپایی از نظر صفات سرعت رشد کالوس، قطر کالوس و سرعت رشد نسبی کالوس اختلاف معنی‌دار وجود داشت. بین کل ارقام دو ردیفه با ارقام شش ردیفه در این تحقیق از نظر صفت سرعت رشد کالوس تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (جدول ۵). که در این نوع مقایسات ارقام ایرانی در مقابل ارقام اروپایی، ارقام دو ردیفه در مقایسه با ارقام شش ردیفه و شش ردیفه ایرانی در مقابل ارقام دو ردیفه ایرانی بیشترین میانگین را به خود اختصاص دادند. بین ارقام بدون پوشینه و ارقام پوشینه‌دار از نظر صفات درصد محتوای آب نسبی کالوس، سرعت رشد نسبی کالوس و درصد تولید گیاهچه کامل تفاوت معنی‌دار مشاهده شد که نتایج حاکی از برتری ارقام بدون پوشینه نسبت به ارقام پوشینه‌دار بود.

ارتباط بین صفات زراعی و صفات مورد مطالعه در کشت جنین

نتایج تجزیه همبستگی بین صفات زراعی و صفات مورد مطالعه در کشت جنین در جدول ۶ ارایه شده است. نتایج نشان داد که صفت قطر کالوس با صفات سرعت رشد کالوس، سرعت رشد نسبی کالوس، طول برگ پرچم و ارتفاع گیاه همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت. همبستگی بین سرعت رشد کالوس نیز با صفات سرعت رشد نسبی کالوس و طول برگ پرچم مثبت و معنی‌دار بود. همبستگی بین صفت رشد نسبی کالوس با صفات تعداد دانه در سنبله، طول دانه و دوره پر شدن دانه مثبت و با صفت وزن تازه روز هفتم

منفی و معنی‌دار بود. صفت وزن تازه روز هفتم نیز با صفت طول دانه همبستگی منفی و معنی‌داری داشت. همبستگی بین محتوای آب نسبی کالوس با وزن تر کالوس مثبت و با طول دانه منفی و معنی‌دار بود و صفت وزن تر کالوس با عرض دانه همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد. صفت درصد باززایی کل با صفت عرض دانه همبستگی مثبت و با تعداد دانه در سنبله منفی و معنی‌داری مشاهده شد.

جدول ۴- مقایسه میانگین ارقام ایرانی و اروپایی از نظر صفات مورد مطالعه حاصل از کشت جنین بالغ در مرحله القاء کالوس و باززایی

Table 4. Mean comparison of Iranian and European barley cultivars for the measured traits in mature embryo culture in callus induction and regeneration stages

شماره رقم Cultivars No.	سرعت رشد کالوس Callus growth rate (mm)	قطر کالوس Callus primary diameter (mm)	محتوای آب نسبی کالوس Relative water content of callus (%)	سرعت رشد نسبی کالوس Callus relative growth rate (gr/d)	درصد گیاهچه کامل Complete plantlet (%)
1	1.260 a-e	1.144 b-f	0.454 fgh	1.036b-f	0.264 b
2	1.433 ab	1.299 abc	0.472 b-e	1.434 a	0.394 a
3	1.008 g-j	1.022d-i	0.466 c-g	1.066b-f	0.229bc
4	1.018 g-j	1.034 d-i	0.457 e-h	1.214b	0.231 bc
5	1.036 e-j	1.048d-i	0.456 e-h	1.030b-f	0.176 c
6	0.918 j	0.943 g-j	0.464 c-h	1.044b-f	0.231 bc
7	1.310 a-d	1.156b-f	0.490 ab	0.995c-f	0.347 a
8	1.103 c-j	1.084d-h	0.456 e-h	0.948ef	0.231 bc
9	0.901j	0.893hij	0.454fgh	0.959 def	0.212 bc
10	0.900 j	0.887 j	0.450 gh	0.949def	0.229 bc
11	1.360ab	1.216bcd	0.462 c-h	1.104 b-f	0.383 a
12	0.930 ij	0.996 f-j	0.453 fgh	0.987def	0.194 bc
13	1.319abc	1.195b-e	0.462d-h	1.120 b-e	0.231 bc
14	0.923 j	0.975 f-j	0.463 c-h	0.901 ef	0.194 bc
15	0.931 ij	0.999 e-j	0.462 d-h	0.913 ef	0.264 b
16	1.175 b-h	1.093 d-g	0.458 e-h	1.013b-f	0.264b
17	1.025f-g	1.040 d-i	0.460 e-h	0.895 e	0.227 bc
18	1.149 b-i	1.088 d-g	0.472 b-e	1.080 b-f	0.212 bc
19	0.952 hij	1.013e-i	0.480 bcd	0.975 def	0.212 bc
20	1.456 a	1.460a	0.507 a	1.208 bcd	0.349a
21	1.005g-j	1.021 e-i	0.507 a	0.988 def	0.229 bc
22	0.924 j	0.992f-j	0.464 c-h	0.972def	0.229bc
23	1.363ab	1.139 b-f	0.462 c-h	1.041 b-f	0.349 a
24	0.928 ij	0.995 f-j	0.465c-g	0.958 def	0.194bc
25	0.935 ij	1.006e-i	0.470c-f	0.967 def	0.231 bc
26	0.931 ij	0.998 f-j	0.457e-h	0.954def	0.229 bc
27	1.009 g-j	1.030d-i	0.463 c-h	0.932ef	0.365 a
28	0.936ij	1.011 e-i	0.456e-h	0.951def	0.229 bc
29	0.932 ij	1.006e-i	0.453 fgh	0.931 ef	0.212 bc
30	0.930 j	0.974 f-j	0.463 c-h	0.957 def	0.211 bc
31	0.953 hij	1.016 e-i	0.460 e-h	0.957 def	0.247 bc
32	1.003g-j	1.017e-i	0.460 e-h	1.042 b-f	0.231 bc
33	1.187 b-g	1.094 d-g	0.463 c-h	1.170 bcd	0.211 bc
34	1.245 a-f	1.109 c-g	0.452 gh	0.976def	0.194 bc
35	0.927 ij	0.993 f-j	0.455e-h	1.035 b-f	0.176c
36	0.889 j	0.807 j	0.447h	1.013 b-f	0.229 bc
37	0.941 ij	1.012 e-i	0.463 c-h	0.969 def	0.247 bc
38	1.105 c-j	1.087d-g	0.480 bc	0.955 def	0.229 bc
39	0.901 j	0.990 f-g	0.453 fgh	1.020 b-f	0.229 bc
40	0.900 j	0.870 ij	0.453 fgh	0.944 ef	0.194 bc
41	1.191 b-g	1.094 d-g	0.448 gh	1.081 b-f	0.247 bc
42	1.094 d-j	1.053 d-i	0.455 e-h	1.039 b-f	0.211 bc

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ ٪ ندارند.

Means followed by the similar letters in each column are not significantly different at the 5% probability level.

صفات زراعی مانند عملکرد دانه و اجزای آن صفات کمی شناخته شده هستند که توسط تعداد زیادی ژن با آثار کوچک کنترل می‌شوند. گزارشات متعددی مبنی بر اینکه صفات کشت بافتی نیز از نظر ژنتیکی کمی هستند و توسط چند ژن کنترل می‌شوند، وجود دارد (Bhaskaran and Smith, 1990; Henry *et al*., 1994; Bregitzer and Campbell, 2001). هنری و همکاران (Henry *et al*., 1994) گزارش کردند که بازوی کوتاه کروموزوم شماره سه گندم (3AL) در القاء کالوس از جنین نقش مؤثری دارد. کمپل و همکاران (Campbell *et al*., 2004) نیز تعداد زیادی QTL برای عملکرد دانه، تعداد دانه در سنبله و تعداد سنبله در بوته روی کروموزوم 3A گندم شناسایی کردند. این امر شاید بتواند روابط بین صفات کشت بافتی و زراعی را نشان دهد. از آنجا که ژنوتیپ از طریق سطح هورمون‌های داخلی می‌تواند پاسخ ریزنمونه را تحت تأثیر قرار دهد و هورمون نیز می‌تواند بر صفات زراعی موثر باشد، بنابراین می‌توان نقش هورمون را در پیوند صفات کشت بافتی و زراعی مرتبط دانست (Hess and Carman, 1998). از این‌رو، بررسی روابط علت و معلولی بین صفات کشت بافتی و صفات زراعی جو از طریق تجزیه علیت ضروری به‌نظر می‌رسد. در این تحقیق، میزان آثار مستقیم و غیرمستقیم صفات زراعی به‌عنوان متغیرهای مستقل بر صفات کشت بافتی شامل قطر کالوس، محتوای آب کالوس و درصد باززایی کل به‌عنوان متغیرهای وابسته ارزیابی شد (جدول ۷). همان‌طور که مشاهده می‌شود، به‌ترتیب صفات روز تا سنبله‌دهی و طول برگ پرچم بیشترین اثر مستقیم مثبت، روز تا گرده‌افشانی و دوره پر شدن دانه بیشترین اثر مستقیم منفی و عرض دانه و طول ریشک کمترین اثر مستقیم را بر قطر کالوس داشتند. روز تا گرده‌افشانی نیز بیشترین اثر مستقیم مثبت را بر دو صفت محتوای آب کالوس و درصد باززایی کل نشان داد، اما روز تا سنبله‌دهی بیشترین اثر مستقیم منفی را بر این‌دو صفت داشت. نتایج همبستگی (جدول ۶) نیز نشان داد که این متغیرها دارای بیشترین همبستگی با صفات کشت بافت بودند. پس از روز تا گرده‌افشانی، روز تا سنبله‌دهی و سپس طول برگ پرچم بیشترین اثر مستقیم را بر صفات کشت بافت داشتند. نتایج دودیگ و همکاران (Dodig *et al*., 2008) در بررسی ارتباط بین صفات کشت بافتی و زراعی در ۹۶ ژنوتیپ گندم نشان داد که صفت القاء کالوس بیشترین اثر مستقیم را بر عملکرد دانه و تعداد دانه در سنبله بیشترین اثر مستقیم را بر صفات القاء کالوس و تعداد گیاه تولید شده از جنین داشت. لی و همکاران (Li *et al*., 2003) نیز ارتباط بین صفات زراعی و کشت بافتی را معنی‌دار اعلام کردند، اما بین صفات مرحله القاء کالوس با برخی از صفات زراعی ارتباط معنی‌داری مشاهده نکردند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت.

جدول ۵- مقایسات گروهی ارقام جو از نظر صفات اندازه‌گیری شده در مرحله کالوس‌زایی و باززایی در کشت جنین بالغ

Table 5. The group comparisons of barley cultivars for the traits measured in callus induction and regeneration stages in mature embryo culture

صفت Trait	رقم Cultivar	رقم Cultivar	ارقام شش‌ردیفه 6 rows cultivars	ارقام دوردیفه 2 rows cultivars	رقم Cultivar
	ایرانی- اروپایی European - Iranian	دوردیفه- شش‌ردیفه 6 rows - 2 rows	ایرانی- اروپایی European - Iranian	ایرانی- اروپایی European - Iranian	بدون پوشینه- پوشینه‌دار Hulled - Naked
سرعت رشد کالوس Callus growth rate	6.29 - 7.68**	6.42 – 6.68 **	5.24 – 6.69 **	6.95 – 7.10 **	5.10 – 5.05 ns
قطر کالوس Callus primary diameter	9.43 - 10.51**	10.06 – 10.07 ns	9.54 – 10.04 **	9.95 – 10.24 **	10.06 – 10.04 ns
درصد محتوای آب نسبی کالوس Relative water content of callus	10.2 - 10.19 ns	9.96 – 9.98 ns	9.98 – 10.01 ns	10.65 – 10.46 ns	10.09 – 10.18 **
سرعت رشد نسبی کالوس Callus relative growth rate (g/d)	0.98 – 1.06 **	1.35 – 1.31 ns	0.95 – 1.04 *	0.99 – 1.10 **	1.01 – 1.12 **
درصد گیاهچه کامل Complete plantlet (%)	0.23 – 0.24 ns	0.23 – 0.23 ns	0.23 – 0.23 ns	0.23 – 0.23 ns	0.23 – 0.36 **

ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ ٪ و ۱ ٪.

ns, * and **: Not-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

جدول ۶- ضرایب همبستگی بین صفات زراعی و صفات مورد مطالعه در کشت جنین بالغ ۴۲ رقم جو

Table 6. Correlation coefficients among the agronomic traits and the studied traits in mature embryo culture of the 42 barley cultivars

صفت† Trait†	CPD	CGR	CRGR	RFWG	CPFW	RWC	CFW	TR	FLL	NKPS	PH	AL	GL	GW	DTH	DTA	KFP	GY
CGR	0.44**	1																
CRGR	0.42**	0.42**	1															
RFWG	-0.08	0.29	-0.06	1														
CPFW	0.17	-0.15	0.13	-0.64**	1													
RWC	0.17	0.00	0.17	-0.18	0.12	1												
CFW	0.29	-0.03	-0.01	-0.06	0.04	0.48**	1											
TR	0.27	0.18	0.22	-0.02	0.03	0.16	0.22	1										
FLL	0.44**	0.43**	-0.05	0.26	-0.17	-0.13	0.06	-0.0	1									
NKPS	-0.05	-0.02	-0.08	0.38*	-0.05	-0.04	-0.15	-0.3*	0.33*	1								
Phe	0.31*	0.12	0.07	0.29	0.07	-0.14	0.06	0.06	0.5**	0.36*	1							
AL	0.00	-0.20	-0.17	-0.17	0.00	-0.09	0.20	0.14	-0.11	-0.6**	0.03	1						
GL	-0.07	0.19	-0.06	0.5**	-0.36*	-0.30*	-0.14	0.03	0.33*	0.37*	0.35*	-0.08	1					
GW	0.15	0.16	-0.08	-0.08	-0.09	0.02	0.31*	0.32*	0.09	-0.63**	-0.02	0.38*	-0.04	1				
DTH	0.26	0.06	0.03	0.25	-0.05	0.01	0.09	0.07	0.5**	0.33*	0.78**	0.09	0.20	0.00	1			
DTA	0.26	0.06	0.03	0.24	-0.060	0.03	0.10	0.08	0.5**	0.31*	0.76**	0.10	0.18	0.03	0.99**			
KFP	-0.23	-0.08	-0.08	0.34*	-0.18	-0.08	-0.02	-0.11	0.11	0.31*	0.36*	0.12	0.39**	-0.13	0.35*	0.3*	1	
GY	0.03	0.24	0.08	0.18	-0.13	-0.00	-0.00	0.02	0.29	0.02	0.32*	0.18	0.10	0.20	0.51**	0.5**	0.17	1
TKW	0.00	0.23	0.07	-0.04	-0.20	-0.01	0.16	0.29	0.10	-0.5**	-0.12	0.21	0.09	0.75**	-0.01	0.00	0.01	0.36*

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ ٪ و ۱ ٪.

†: صفات مطالعه شده عبارت‌اند از: CPD قطر کالوس، CGR سرعت رشد کالوس، CRGR سرعت رشد نسبی کالوس، RFWG رشد نسبی کالوس، CPFW وزن تازه روز هفتم، RWC درصد محتوای آب کالوس، CFW وزن تر کالوس، TR درصد باززایی کل، FLL طول برگ پرچم، NKPS تعداد دانه در سنبله، PH ارتفاع گیاه، AL طول ریشک، GL طول دانه، GW عرض دانه، DTH روز تا سنبله دهی، DTA روز تا گرده افشانی، KFP دوره پر شدن دانه، GY عملکرد دانه، TKW وزن هزار دانه.

†: The traits abbreviations are including: CPD, callus primary diameter; CGR, callus growth rate; CRGR, callus relative growth rate; RFWG, relative fresh weight growth; CPFW, callus primary fresh weight; RWC, relative water content of callus; CFW, callus fresh weight; TR, total regeneration; FLL, flag leaf length; NKPS, number of kernel per spike; PH, plant height; AL, awn length; GL, grain length; GW, grain width; DTH, days to heading; DTA, days to anthesis; KFP, kernel filling period; GY, grain yield; TKW, 1000-kernel weight.

جدول ۷- ضرایب مسیر (آثار مستقیم) و غیرمستقیم صفات زراعی بر صفات کشت جنین در ۴۲ رقم جو

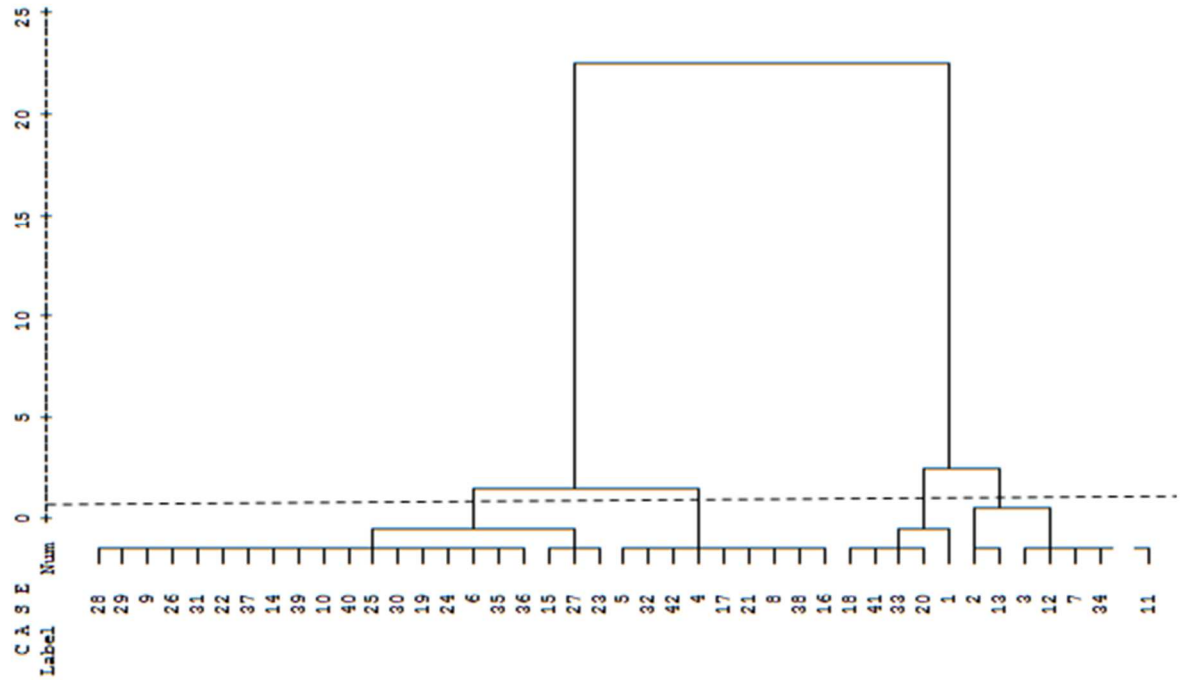
Table 7. Path coefficients (direct) and indirect effects of the agronomic traits on the embryo culture traits in 42 barley cultivars

صفات Traits	قطر کالوس (میلی متر) Callus primary diameter (mm)		درصد محتوای آب کالوس Relative water content of callus (%)		درصد باززایی کل Total regeneration (%)	
	Direct	Indirect	Direct	Indirec	Direct	Indirect
طول برگ پرچم Flag Leaf Length	0.465**	-0.02	-0.143	0.004	-0.117	0.111
تعداد دانه در سنبله Number of Kernel Per Spike	-0.316	0.259	-0.055	0.005	-0.594**	0.252
ارتفاع گیاه Plant Height	0.256	0.064	-0.195	0.051	0.214	-0.145
طول ریشک Awn Length	-0.096	0.096	-0.253	0.164	-0.236	0.383
طول دانه Grain Length	-0.133	0.060	-0.228	-0.08	0.222	-0.190
عرض دانه Grain Width	0.048	0.108	0.135	-0.108	-0.074	0.401
روز تا سنبله دهی Days to Heading	1.328**	-1.066	-2.445**	2.461	-2.248**	2.323
روز تا گرده افشانی Days to Anthesis	-1.224**	1.492	2.737**	-2.705	2.498**	-2.413
دوره پر شدن دانه Kernel Filling Period	-0.254**	0.021	0.125	-0.209	-0.062	-0.053
عملکرد دانه Grain Yield	-0.121	0.156	0.002	-0.008	-0.148	0.171
وزن هزار دانه Thousand Kernel Weight	-0.103	0.108	-0.13	0.112	0.136	0.160

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

تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها بر اساس صفات مورد مطالعه در مرحله القاء کالوس و باززایی

به‌منظور تفکیک و گروه‌بندی ارقام مورد مطالعه بر اساس صفات کشت بافتی اقدام به تجزیه خوشه‌ای به روش Ward شد. حاصل این تجزیه دسته‌بندی ارقام در چهار گروه بود (شکل ۲). دسته‌بندی ارقام در یک گروه بیان‌گر شباهت بیشتر آن‌ها از نظر صفات مورد نظر می‌باشد. بر اساس این تجزیه، ارقام شماره ۶، ۹، ۱۰، ۱۴، ۱۵، ۱۹، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۵، ۳۶، ۳۷، ۳۹ و ۴۰ (عمدتاً ارقام اروپایی) در گروه اول، ارقام شماره ۴، ۵، ۸، ۱۶، ۱۷، ۲۱، ۳۲، ۳۸ و ۴۲ در گروه دوم، ارقام شماره ۱، ۱۸، ۳۳، ۲۰ و ۴۱ در گروه سوم و ارقام شماره ۲، ۳، ۷، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۳۴ در گروه چهارم قرار داشتند. در دندروگرام حاصل گروه اول عمدتاً ارقام دو ردیفه‌ای که سرعت رشد کالوس پایین و قطر کالوس کمتری داشتند را شامل شد. رقم‌های راه‌یافته به گروه دوم بیشتر دارای تیپ رویشی شش ردیفه بودند. گروه سوم از نظر سرعت رشد نسبی دارای مقادیر متوسط بود. رقم ASTARTIS که از ارقام برتر در این آزمایش بود در این گروه قرار داشت. ارقام گروه چهارم دارای بالاترین سرعت رشد کالوس، قطر کالوس و سرعت رشد نسبی بودند و بنابراین می‌توان آن‌ها را از سه گروه دیگر متمایز کرد. این گروه عمدتاً شامل ارقام ایرانی به‌همراه رقم ALFEO اروپایی بود. از آنجایی که دسته‌بندی ارقام به‌کمک تجزیه خوشه‌ای با گروه‌بندی جغرافیایی آن‌ها مطابقت نداشت، بنابراین می‌توان این فرض را مطرح کرد که منشأ برخی از ارقام اروپایی با ارقام ایرانی مشترک است، زیرا ایران یکی از منابع غنی ژرم‌پلاسم گونه‌های مختلف غلات است و می‌توان آن‌را از مهم‌ترین خاستگاه‌های جو دانست. البته برای اظهار نظر دقیق‌تر لازم است نمونه‌های بیشتری از مناطق مختلف با استفاده از روش‌های مولکولی و زراعی بررسی شوند.



شکل ۲- گروه‌بندی ۴۲ رقم جو بر اساس صفات مورد مطالعه در کشت جنین بالغ به روش "حداقل واریانس وارد"

Figure 2. Clustering the 42 barley cultivars based on the measured traits in mature embryo culture using Ward's minimum variance method

مقایسه نتایج حاصل از کشت جنین بالغ و نابالغ

واکنش جنین‌های بالغ و نابالغ (داده‌ها گزارش نشده) از نظر صفات مورد مطالعه در مرحله القاء کالوس و باززایی با استفاده از آزمون t- استیودنت مقایسه شد. توانایی القاء کالوس و باززایی در ارقام مورد آزمایش بسته به نوع ریزنمونه (بالغ- نابالغ) متغیر بود. بین جنین‌های بالغ و نابالغ از نظر کلیه صفات مورد بررسی به غیر از وزن تر کالوس و درصد محتوای آب کالوس تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۸). نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که جنین‌های نابالغ نسبت به جنین‌های بالغ از نظر صفات سرعت رشد کالوس و قطر کالوس به‌طور معنی‌داری برتر بودند. بین جنین‌های بالغ و نابالغ از نظر صفات مورد مطالعه در مرحله باززایی نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت و نتایج حاکی از برتری جنین‌های بالغ نسبت به جنین‌های نابالغ بود. به عبارت بهتر القاء کالوس و باززایی در جو تا حد زیادی می‌تواند تحت تأثیر انواع کشت جنین قرار گیرد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج ابومهادی و همکاران (Abumhadi *et al*., 2005) و اوزگن و همکاران (Ozgen *et al*., 1996) مطابقت داشت. اوزگن و همکاران (Ozgen *et al*., 1996) به این نتیجه رسیدند که جنین‌های بالغ فراوانی کمتری در تشکیل کالوس دارند، اما ظرفیت باززایی آن‌ها در مقایسه با جنین‌های نابالغ بیشتر است. اثر ژنوتیپ بر باززایی گیاه در کشت جنین جو توسط آجلونی و همکاران (AL-Ajlouni *et al*., 2012) و رستمی و همکاران (Rostami *et al*., 2013) نیز گزارش شده است.

نتیجه‌گیری کلی

به‌نظر می‌رسد ویژگی‌های ژنتیکی رقم مورد مطالعه و نیز ویژگی‌های فیزیولوژیک ریزنمونه اولیه در موفقیت‌آمیز بودن کشت بافت گیاه مؤثر باشد (Bregitzer, 1992; Sharma *et al*., 2005). برتری معنی‌دار ارقام ایرانی در مقابل ارقام اروپایی و ارقام دو ردیفه در مقایسه با ارقام شش ردیفه با استفاده از مقایسات گروهی می‌تواند نشان‌دهنده پتانسیل بالای این گروه از ارقام در واکنش به کشت جنین بالغ جو باشد. البته با توجه به عدم تطابق دسته‌بندی ارقام به‌کمک تجزیه خوشه‌ای با گروه‌بندی جغرافیایی آن‌ها می‌توان این فرض را مطرح کرد که احتمالاً منشأ برخی از ارقام اروپایی با ارقام ایرانی مشترک است. پاسخ متفاوت ارقام جو به القاء کالوس و باززایی گیاهچه می‌تواند حاکی از متفاوت بودن ظرفیت ژنوتیپ‌ها در استفاده از آن‌ها در

برنامه‌های به‌نژادی از طریق کشت جنین باشد. بر اساس نتایج تجزیه علیت، صفات روز تا گرده افشانی، روز تا سنبله‌دهی و طول برگ پرچم به‌ترتیب بیشترین اثر مستقیم را بر صفات کشت بافتی نشان دادند. این نتایج می‌تواند بر کنترل ژنتیکی مشترک این دو گروه از صفات و امکان غربال مستقیم ارقام دارای صفات کشت بافتی مناسب از طریق صفات زراعی که انتخاب آن‌ها ساده و سریع است، دلالت داشته باشد. بر اساس نتایج این آزمایش، کشت جنین‌های بالغ روش مناسبی برای کشت بافت در گیاه جو تشخیص داده شد و در نتیجه جنین بالغ می‌تواند به‌عنوان یک منبع ریزنمونه مؤثر در برنامه‌های به‌نژادی و مطالعات جو مورد استفاده قرار گیرد. جو گیاهی تقریباً متحمل به تنش‌های غیرزیستی است. توانایی تحمل و بقای این گیاه تحت شرایط نامساعد محیطی آن‌را برای بررسی‌های فیزیولوژیک و مولکولی پاسخ گیاهان در برابر تنش‌ها مناسب ساخته است. از این‌رو، کشت جنین می‌تواند به‌عنوان روشی مناسب جهت این‌گونه مطالعات در گیاه جو مورد استفاده قرار گیرد. اگرچه باززایی کم گیاهان از کشت‌های کالوس یک مشکل عمده و محدودکننده برای تولید گیاهان تراریخت است، اما نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کشت جنین بالغ جو به سبب میزان باززایی بیشتر می‌تواند در پروژه‌های تولید گیاهان تراریخت مناسب‌تر باشد. البته در مقابل کشت جنین نابالغ جو به سبب واکنش بهتر در مرحله القاء کالوس می‌تواند در روش‌های گزینش In Vitro جهت افزایش مقاومت به انواع تنش‌های زنده و غیرزنده مناسب‌تر و مطلوب‌تر باشد.

جدول ۸- مقایسه واکنش به کشت جنین بالغ و نابالغ ۴۲ رقم جو با استفاده از آزمون t- استیودنت

Table 8. Comparison of response to mature and immature embryo culture of 42 barley cultivars using t-test

صفت Trait	Trait mean / میانگین صفت		مقدار t t-value
	جنین بالغ Mature embryo	جنین نابالغ Immature embryo	
سرعت رشد کالوس (میلی‌متر در روز) Callus growth rate (mm/day)	7.132	11.819	13.887**
قطر کالوس (میلی‌متر) Callus primary diameter (mm)	8.361	10.918	7.619**
وزن تر کالوس (گرم) Callus fresh weight (g)	4.183	4.384	1.180ns
محتوای آب نسبی کالوس (درصد) Relative water content of callus (%)	11.256	11.794	2.149ns
درصد ساقه‌زایی Shooting (%)	0.539	0.259	26.535**
درصد ریشه‌زایی Rooting (%)	0.538	0.232	31.912**
درصد گیاهچه کامل Complete plantlet (%)	0.390	0.242	7.840**
درصد باززایی کل Total regeneration (%)	0.379	0.132	29.720**

ns و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ ٪.

ns and **: Not-significant and significant at 1% probability level.

References

Abumhadi, N., Kamenarova, K., Todorovska, E., Dimov, G., Trifonova, A., Gecheff, K. and Atanassov, A. 2005. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos (*Hordeum vulgare* L.). **Biotechnology and Biotechnology Equipment** 19 (3): 32-38.

AL-Ajlouni, Z., Ajlouni, M., Shatnawi, M., Shibli, R., Makhdmeh, I., Abu-Romman, S. and AL-Ghazawi A. L. 2012. Callus induction, plant regeneration and growth on barley (*Hordeum vulgare* L.). **South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment** 3 (1): 25-39.

Ben Amer, L. M., Worland, A. J. Korzum, V., and Borber, A. 1997. Genetic mapping of QTL controlling tissue-culture response on chromosome 2B of wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to major genes and RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics** 94: 1047-1052.

Bhaskaran, S. and Smith, R. H. 1990. Regeneration in cereal tissue culture: a review. **Crop Science** 30: 1328-1336. birsin

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

Bregitzer, P. and Campbell. R. D. 2001. Genetic markers associated with green and albino plant regeneration from embryogenic barley. **Crop Science** 41: 173-179.

Burun, B. and Cobanpoyazoglu, E. 2002. Embryo culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Turkish Journal of Biology** 26: 175-180.

Campbell, B. T., Baenziger, P. S., Eskridge, K. M., Budak, H., Streck, N. A., Weiss, A., Gill, K. S. and Erayman, M. 2004. Using environmental covariates to explain genotype x environment and QTL x environment interactions for agronomic traits on chromosome 3A of wheat. **Crop Science** 44: 620-627.

Dodig, D., Zorić, M., Mitić, N., Nikolić, R. and Šurlan-Momirović, G. 2008. Tissue culture and agronomic traits relationship in wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 95 (1): 107-114.

Emre, B., Sibel, Y., Halide, H., Gonul, K. and Nermin, G. 2012. Nikita retrotransposon movements in callus cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Omics Journal** 5 (3): 211-215.

Food and Agriculture Organization. 2012. Statistics: FAOSTAT agriculture. Retrieved June 10, 2013, from http://fao.org/crop/statistics. FAO Statistical Database (FAOSTAT).

Gubisova, M., Mihalik, D. and Gubis, J. 2012. Optimization of barley mature embryo regeneration and comparison with immature embryos of local cultivars. **Nova Biotechnologica et Chimica** 11 (1): 57- 62.

Gurel, F., Karakas, O., Albayrak, G. and Ari, S. 2009. Regeneration capacity of mature embryo-derived callus in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Acta Biological Hungarica** 60 (3): 309-319.

Haliloglu, K., Ozturk, A., Tosun, M. and Bulut, S. 2005. Relationship between tissue culture and agronomic traits of winter wheat. **Cereal Research Communications** 33 (2-3): 469-476.

Henry, Y., Marcotte, J. L. and De Buyser, J. 1994. Chromosomal location of genes controlling short-term and long-term somatic embryogenesis in wheat revealed by immature embryo culture of aneuploid lines. **Theoretical and Applied Genetics** 89: 344-350.

Hess, J. R. and Carman, J. G. 1998. Embryogenic competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant, environment and endogenous hormones levels. **Crop Science** 38: 249-253.

Hua, W., Zhu, J., Shang, Y., Wang, J., Jia, Q., Lin, F. and Yang, J. 2013. Establishment of a highly efficient regeneration method from the scraped broken embryo of mature barley seed. **Canadian Journal of Plant Science** 93: 1029-1035.

Komatsuda, T., Enomoto, S. and Nakajima, K. 1989. Genetic of callus proliferation and shoot differentiation in barley. **The Journal of Heredity** 80: 345-350.

Li, W., Ding, C. H., Hu, Z., Lu, W. and Guo, G. Q. 2003. Relationship between tissue culture and agronomic traits of spring wheat. **Plant Science** 164: 1079-1085.

Mark, P. B. 1994. A review of plant embryo culture. **HortScience** 29 (11): 1243-1246.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **The Journal of Plant Physiology** 15: 473-497.

Norstog, K. 1970. Induction of embryolike structures by kinetin in cultures barley embryos. **Developmental Biology** 23: 665-670.

Nourmohammadi, G., Siyadat, E. and Kashani, E. 2001. Agriculture: Cereals crops. Shahid Chamran University Press. 446 p.

Oka, S., Saito, N. and Kawaguchi, H. 1995. Histological observations on initiation and morphogenesis in immature and mature embryo derived callus of barley (*Hordeum vulgare*). **Annals of Botany** 76: 487-492.

Ozgen, M., Turet, M., Ozcan, S. and Sancak, C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryo of winter durum wheat genotypes. **Plant Breeding** 15: 455-458.

Rostami, H., Giri, A., Mozaffari Nejad, A. S. and Moslem, A. 2013. Optimization of multiple shoot induction and plant regeneration in Indian barley (*Hordeum vulgare*) cultivars using mature embryos. **Saudi Journal of Biological Sciences** 20: 251-255.

Satyvathi, V. V., Jauhar, P. P., Elias, E. M. and Rao, M. B. 2004. Effects of growth regulators on in vitro plant regeneration in durum wheat. **Crop Science** 44: 1839-1846.

Šerhantová, V., Ehrenbergerová, J. and Ohnoutková, L. 2004. Callus induction and regeneration efficiency of spring barley cultivars registered in the Czech Republic. **Plant, Soil and Environment** 50 (10): 456-462.

Sharma, V. K., Hänsch, R., Mendel, R. R. and Schulze, J. 2005. A highly efficient plant regeneration system through multiple shoot differentiation from commercial cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) using meristematic shoot segments excised from germinated mature embryos. **Plant Cell Reports** 23: 9-16.

Sikandar, A., Waqar, K. I. and Munir, I. 2007. Optimization of in vitro conditions for callus induction, proliferation and regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Biotechnology** 6 (3): 420-425.

Swati, M. and Abdel-Hady, B. 2007. *In vivo* and *in vitro* selection of superior durum wheat (*Triticum durum*, Desf) genotypes. **International Journal of Natural and Engineering Sciences** 1 (3): 69-74.

University of Guilan
Faculty of Agricultural Sciences

Cereal Research
Vol. 7, No. 3, Automn 2017 (421-435)

Evaluation of relationship between the associated traits with callus induction of mature embryo and agronomic traits in different barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.)

Roghayeh Naseri Myankali[1], Kianoosh Cheghamirza[2*], Leila Zarei[3] and Elahe Saroei[4]

Received: February 23, 2016 Accepted: October 24, 2016

Abstract

Callus production via mature embryo culture provides the possibility to regenerate plant genotypes effectively under tissue culture conditions. Screening based on an agronomic trait is a procedure to predict the outcome of tissue culture which is very expensive and time consuming. The present research was carried out to investigate the response of 42 Iranian and European barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars to mature embryo culture and to evaluate relationship between embryo culture traits with agronomic characters. The results showed that there were highly significant differences ($P \leq 0.01$) among the genotypes for callus growth rate (CGR), callus primary diameter (CPD), relative water content of callus (RWC) and callus relative growth rate (CRGR) . The cultivars AFZAL and ASTARTIS had the highest amounts of callus growth rate and complete plantlet, therefore were identified as superior cultivars. Cluster analysis using Ward's minimum variance divided the cultivars into four groups, so that the cultivars of fourth group had the highest amounts of callus growth rate, callus primary diameter and relative growth rate. The results of correlation coefficients of agronomic and embryo culture traits showed that callus primary diameter had significant correlation coeficients with callus growth rate, relative growth rate, flag leaf length and plant height. Path analysis revealed that days to heading, days to anthesis and flag leaf length had the highest positive direct effects on embryo culture traits, respectively. Comparison of the response of two types of explants (mature and immature embryos) to tissue culture indicated that the mature embryos with a lower response to tissue culture at the callus induction stage had a more appropriate and higher response at callus regeneration stage.

Keywords: Callus growth rate Callus induction, Path analysis, Regeneration

1. Graduated M. Sc., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Agriculture and Natural Resources Campus, Razi University, Kermanshah, Iran
2. Assoc. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Agriculture and Natural Resources Campus, Razi University, Kermanshah, Iran
3. Assist. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Agriculture and Natural Resources Campus, Razi University, Kermanshah, Iran
4. Graduated M. Sc., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Agriculture and Natural Resources Campus, Razi University, Kermanshah, Iran
* Corresponding author: cheghamirza@yandex.ru