مجله علمی-پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات
جلد ۱۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحات ۱۰۲-۸۹

ISSN NO: 2008-8485

کالوس‌زایی و باززایی ارقام گندم نان و جو از ریزنمونه‌های جنین بالغ

Callus induction and regeneration of bread wheat cultivars and barley from mature embryo explants

علی اکبر غلامی[1*] و علیرضا تاری‌نژاد[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۰

چکیده

در سال‌های اخیر تولید غلات به‌دلیل تشدید تنش‌های زنده و غیر زنده متعددی کاهش یافته است. از این رو اصلاح ارقام غلات سازگار به تنش‌های متعدد زنده و غیر زنده یک ضرورت در اصلاح غلات می‌باشد. اصلاح غلات از طریق دست‌ورزی ژنتیکی به‌دلیل عدم دسترسی به روش‌های کشت بافت و باززایی کارآ و مطمئن محدود شده است. در این تحقیق قابلیت کالوس‌زایی و باززایی چهار لاین گندم به نام‌های C-D-4, C-D-6, C-D-8, C-D-9 و سه رقم جو به نام‌های (افضل، والفجر و کویر) از روی ریزنمونه‌های جنین بالغ مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای کالوس‌زایی گندم از محیط کشت ML1G1 حاوی سه سطح از تنظیم‌کننده رشدی 2, 4-D و برای باززایی از محیط کشت ML1R3 حاوی سه سطح تنظیم‌کننده رشدی Kin و BAP استفاده شد. برای کالوس‌زایی جو از محیط کشت ML1G1 حاوی سه سطح تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D و برای باززایی از محیط کشت ML1R3 حاوی سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد BAP و Kin استفاده شد. ارزیابی کالوس‌زایی ارقام مختلف گندم، نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به لاین C-D-9 (۷۹/۵۵٪) و همچنین در سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به سطح ۲/٤ میلی‌گرم در لیتر (۵۸/۷۷٪) بود. ارزیابی باززایی ارقام گندم، نشان داد که بیشترین میزان باززایی مربوط به لاین C-D-9 (۲۰/٦٦٪) و همچنین در محیط‌های کشت متفاوت بیشترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin (۲۷/۲۲٪) بود. نتایج ارزیابی کالوس‌زایی ارقام مختلف جو، نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به رقم افضل (٦۵/۳۳٪) و همچنین در سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به سطح ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر (۵۰/٦٦٪) بود. بیشترین میزان باززایی مربوط به رقم افضل (۱۳/۵۵٪) و همچنین در محیط‌های کشت متفاوت بیشترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (۲۰٪) بود.

کلمات کلیدی: جو، گندم، جنین بالغ، کال زایی، باززایی.

www.iapb.kau.ac.ir

۱- دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، تبریز، ایران.

۲- دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، دانشیار گروه بیوتکنولوژی، تبریز، ایران.

*- مکاتبه کننده: Gholami.2359@gmail.com

مجله علمی- پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج

مقدمه

جو یکی از محصولات زراعی اصلی ایران و جهان است و می‌تواند به‌طور مستقیم و غیر مستقیم به تغذیه جمعیت کمک نماید. مصارف غذایی جو شامل خوراک دام، تهیه مالت و الکل می‌باشد (Kazemi Arbat, 2005). گندم مهم‌ترین محصول ایران و جهان است. بر اساس آمار منتشر شده FAO در سال ۲۰۱۲ میلادی میزان تولید جهانی گندم در سال ۲۰۱۲ به حدود ۶۷۰ میلیون تن رسید که در مقایسه با سال قبل حدود ۱/۴ درصد کاهش یافته است. در گندم از ریزنمونه‌های مختلفی نظیر گل‌آذین نارس، جنین نارس و جنین بالغ برای تولید کالوس استفاده شده است و تا به حال کشت جنین نارس گندم به‌عنوان بهترین ریزنمونه در مطالعات کشت کالوس در گندم شناخته شده است (Ren *et al*,. 2010; Erkoyuncu *et al*., 2016). Hakam *et al*., 2015 اگرچه جنین نابالغ یکی از مناسب‌ترین ریزنمونه‌ها در کشت بافت این غلات می‌باشد، اما به‌عنوان ریزنمونه دارای برخی از معایب نیز می‌باشد. ازجمله در دسترس بودن آن‌ها محدود به دوره‌ی کوتاهی از زمان رشد در سال می‌باشد، جداسازی سخت و مشخص کردن مرحله کشت مناسب آن مشکل می‌باشد (Jun ying *et al*., 2006). اما به‌دلیل سهولت استفاده از جنین رسیده پژوهشگران ترجیح می‌دهند از این نوع جنین برای مطالعه خود به‌جای جنین نارس استفاده نمایند (Hess and Carman, 1998). جنین‌های بالغ به‌دلیل در دسترس بودن در هر فصل از سال، جداسازی آسان و حداقل تغییرپذیری و وضعیت فیزیولوژیکی آن (Yu *et al*., 2008) به‌عنوان یک جایگزین مؤثر برای جنین‌های نابالغ می‌باشد. ولی وقتی جنین‌های بالغ به‌عنوان ریزنمونه استفاده می‌شوند فراوانی باززایی از کالوس در مقایسه با جنین‌های نابالغ کم می‌شود (Jun ying *et al*., 2006). امروزه از جنین‌های بالغ به همراه آندوسپرم (Filippov *et al*., 2006)، بدون حمایت آندوسپرم (Patnaik and Khurana, 2003) و تکه‌های نازک از آن (Delporte *et al*., 2001) به‌عنوان ریزنمونه در کشت بافت گندم استفاده می‌شود. در پژوهشی که در مورد باززایی گیاه جو از ریزنمونه جنین بالغ انجام گرفت، پیشنهاد شد که ۱ میلی‌گرم بر لیتر TDZ باعث افزایش تمایز یابی معکوس و افزایش شاخه‌زایی از کالوس می‌شود (Shan *et al*,. 2010). در مطالعه‌ای که بر روی تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد 2, 4-D و دیکامبا بر روی القای کالوس و باززایی انجام شد، بهترین محیط کشت برای کالوس‌زایی و باززایی محیط کشت حاوی ۴ میلی‌گرم بر لیتر دیکامبا برای جنین بالغ جو (Erkoyuncu *et al*,. 2016) و جنین نابالغ گندم ، (Ren *et al*,. 2010) گزارش شد. در مطالعه‌ای بر روی جنین بالغ و نابالغ جو انجام گرفت. بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D در جنین بالغ (۹۷/۸ ٪) و جنین نابالغ (۷۲/۲ ٪) بود. همچنین بیشترین میزان باززایی در جنین نابالغ (۹/۳٪) و جنین بالغ (۱۳/۳ ٪) در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد بود (Abumhadi *et al*,. 2005). در آزمایشی از کشت جنین رسیده برای کالوس‌زایی در گندم استفاده شد. که در این آزمایش بیشترین میزان کالوس‌زایی ۸۸/۳۳٪ در محیط کشت MS دارای 2,4-D mg/l ۴ و NAA ۱mg/l به‌دست آمد (Turhan and Baser, 2003). در پژوهشی دیگر کالوس‌زایی و باززایی ۴۷ ژنوتیپ گندم از ریزنمونه جنین رسیده مورد بررسی قرار گرفت، اختلاف معنی‌داری از نظر باززایی، کارایی کشت و ظرفیت باززایی بین ارقام وجود داشت (Zale *et al*,. 2004). در مطالعه‌ای از سه نوع اکسین مختلف (توفوردی، دیکامبا و پیکلورام) استفاده شد. بیشترین میزان القای کالوس (۹۳/۳٪) به دست آمد. همچنین آن‌ها گزارش نمودند که غلظت بالای (۱۲-۱۰ mg/l) اکسین دیکامبا تأثیر مثبتی در القای کالوس دارد (Aydin *et al*., 2015). در پژوهشی از جنین بالغ گندم به تنظیم‌کننده‌های رشد توفوردی و زآتین استفاده شد. بهترین محیط کشت برای القای کالوس‌زایی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی اعلام شد. و بهترین محیط کشت برای شاخه‌زایی و ریشه‌زایی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر زآتین اعلام شد. باززایی در این تحقیق بسته به ژنوتیپ متفاوت بود بیشترین میزان باززایی برای رقم Nebta حدود ۴۵ ٪ و برای رقم Sasareeb حدود ۴۹ ٪ و برای رقم Iman حدود ۴۲ ٪ اعلام شد (Badr Eldin *et al*., 2012). در مطالعه‌ای برای القای کالوس‌زایی و باززایی گیاه گندم از جنین بالغ به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. برای القای کالوس‌زایی از ۳ میلی‌گرم در لیتر توفوردی به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و برای باززایی از محیط کشت فاقد

www.japb.kiau.ac.ir

هورمون استفاده شد. آن‌ها گزارش کردند که ظرفیت تولید کالوس و باززایی وابسته به ژنوتیپ است. بیشترین میزان کالوس‌زایی برای رقم Pavon-76 حدود ۶۸٪ و برای رقم Kanchan ۶۴٪ و برای رقم Akbar ۲۸٪ اعلام شد. و بیشترین میزان باززایی برای رقم BARI gom 21 و BARI gom by 25 حدود ۱۹٪ و برای رقم Akbar حدود ۱۵٪ و برای رقم Pavon-76 حدود ۱۳٪ اعلام شد (Islam *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای برای القای کالوس‌زایی و باززایی گیاه گندم از جنین بالغ به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. در این آزمایش از ۴ رقم گندم و ۵ محیط کشت (M1-M2-M3-M4-M5) استفاده شد. بیشترین کالوس‌زایی مربوط به محیط کشت M1 حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی بود بیشترین میزان باززایی برای ریزنمونه جنین نابالغ در محیط کشت M1 و M4 بترتیب ۶۰/۴۴ ٪ و ۵۲/۵۵ ٪ و برای ریزنمونه جنین بالغ در محیط کشت M3 به میزان ۵۸/۲۳ ٪ بود (Hakam *et al.*, 2015). آیدین و همکاران (Aydin *et al.*, 2013) گزارش نمودند که توانسته‌اند که ۹۵ ٪ کالوس جنین‌زا، را از ریزنمونه جنین بالغ به حمایت آندوسپرم تولید کنند و ۵۰ ٪ باززایی از کالوس جنین‌زا به‌دست آورند. در آزمایش‌های اخیر گزارش شده است که توانسته‌اند باززایی از کالوس در محیط کشت MS حاوی BA و IAA به‌دست آورند (Fahmy *et al.*, 2012). کشور ایران به‌دلیل برخورداری از تنوع بالای زیستی بستر مناسب برای تهیه و تولید ارقام مختلف گندم و جو می‌باشد. و با توجه به این‌که میزان پاسخ ارقام بومی نسبت به ارقام اصلاح‌شده از لحاظ القای کالوس و باززایی و انتقال ژن بیشتر است، روی این اصل، در تحقیق حاضر واکنش چهار لاین گندم نان و سه رقم جو به کشت جنین بالغ، ازنظر القای کالوس و باززایی در سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد اکسینی و سیتوکینین مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین هدف از انجام این آزمایش، شناسایی بهترین ژنوتیپ و تعیین مناسب‌ترین ترکیب تنظیم‌کننده رشد برای کالوس‌زایی و باززایی و ارزیابی ارقام مختلف گندم و جو می‌باشد و ارائه پروتکل کارآمد برای کشت بافت و ریز ازدیادی ارقام مورد مطالعه، گندم و جو فراهم کردن ابزار کارآمد برای مطالعه انتقال ژن و دست‌کاری ژنتیکی با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت بافت در دورنمای آینده است.

مواد و روش‌ها

بذور چهار لاین گندم (C-D-4, C-D-6, C-D-8, C-D-9) و سه رقم جو (افضل، والفجر و کویر)، از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. بذوری که ظاهری سالم داشتند برای ضدعفونی و کشت انتخاب شدند. ضدعفونی با قرار دادن بذور در الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه، سپس در محلول هیپوکلریت سدیم ۴۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه و سه بار آبکشی با آب مقطر در هر مرحله انجام گرفت. سپس بذور روی کاغذ صافی استریل قرار داده شد تا آب سطحی آن‌ها کاملاً خشک شود. زمانی که بذرهای مورد نظر استریلیزاسیون سطحی شدند جنین بالغ آن‌ها توسط اسکالپل استریل در زیر هود لامینار از بذور با دقت جدا شدند. سپس جنین بالغ جدا شده از بذور جهت کالوس‌زایی به گونه‌ای که اسکوتلوم آن‌ها رو به بالا باشد به‌طور مستقیم بر روی محیط کالوس‌زایی ML1G1 با سطوح مختلف از تنظیم‌کننده رشد توفوردی قرار داده شدند. برای اطلاع بیشتر از جزئیات محیط کشت به منبع زیر رجوع شود. (Ahmadabadi *et al*,. 2007).

تیمارهای هورمونی برای کالوس‌زایی و باززایی ارقام گندم و جو

برای بررسی پاسخ به کالوس‌زایی ارقام مختلف گندم و جو، آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. در گیاه گندم، فاکتور اول، چهار لاین گندم به نام‌های (C-D-9، C-D-8، C-D-6 و C-D-4) و فاکتور دوم تنظیم‌کننده رشد 2,4-D در سه سطح (۲، ۲/۴ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) بود. برای بررسی درصد باززایی لاین‌ها نیز از آزمایش فاکتوریل با دو عامل لاین در چهار سطح و تنظیم‌کننده رشدی Kin در سطوح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP در سطوح (۰/۵، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار استفاده شد. در گیاه جو، فاکتور اول شامل ارقام (افضل، والفجر و کویر) و فاکتور دوم سه غلظت تنظیم‌کننده رشد توفوردی (۱/۵، ۲/۵ و ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر) بود. برای بررسی درصد باززایی ارقام جو نیز از آزمایش فاکتوریل با دو عامل رقم در سه سطح و تنظیم‌کننده رشدی Kin در سطوح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)

www.japb.kiau.ac.ir

و BAP در سطوح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار استفاده شد.

القاء کالوس و کالوس‌های جنین‌زا از جنین بالغ

بعد از اینکه جنبن‌های بالغ استریل سطحی شدند، برای القای کالوس‌زایی در محیط ML1G1 (Ahmadabadi *et al*,. 2007)، (حاوی ویتامین KT و نمک‌های محیط کشت N6 و ۲ میلی‌گرم در لیتر گلایسین، ۲۸۸۰ میلی‌گرم در لیترL - پرولین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازوئین، ۳۰ گرم در لیتر سوکروز با اسیدیته ۵/۸ در شرایط تاریکی و دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ هفته کشت شدند به‌نحوی که ناحیه اسکوتلوم آن‌ها رو به بالا باشد. در هر پتری‌دیش که حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت بود، تعداد ۹ ریزنمونه کشت گردید، سپس درب ظروف با پارافیلم بسته شد. نمونه‌ها جهت کالوس‌زایی در شرایط تاریکی و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ هفته قرار داده شدند. محیط کشت کالوس‌زایی حاوی سه غلظت متفاوت تنظیم‌کننده رشد توفوردی (۲، ۲/۴ و۳ میلی‌گرم در لیتر) بود. بعد از شکل‌گیری کالوس‌ها، تعداد کالوس‌های تولید شده در هر پتری‌دیش شمارش شده و درصد کالوس‌زایی برای هر رقم و هر تیمار به‌طور جداگانه محاسبه گردید در مرحله‌ی بعد کالوس‌های تولید شده جهت رشد و تکثیر و تولید کالوس‌های جنین‌زا به محیط کشت مشابه‌ای ML1C2 (Ahmadabadi *et al*,. 2007) (حاوی ویتامین KT و نمک‌های محیط کشت N6 و ۲ میلی‌گرم در لیتر گلایسین، ۲۸۸۰ میلی‌گرم در لیترL - پرولین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازوئین، ۳۰ گرم در لیتر سوکروز با اسیدیته ۵/۸ با این تفاوت که حاوی ۱۰ mg/l نیترات نقره بود) واکشت شدند (شکل ۱).

باززایی گیاهان از کالوس جنین‌زا گندم و جو

دو هفته پس از واکشت، کالوس‌های جنین‌زا برای باززایی گیاه به محیط باززایی ML1R3 (حاوی ویتامین KT و نمک‌های محیط کشت N6 و ۲ میلی‌گرم در لیتر گلایسین، ۲۸۸۰ میلی‌گرم در لیترL - پرولین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازوئین، ۳۰ گرم در لیتر سوکروز با اسیدیته ۵/۸ با این تفاوت که فاقد نیترات نقره بود) انتقال داده شدند (Ahmadabadi *et al*,. 2007). محیط کشت‌های استفاده شده برای باززایی گندم، محیط کشت ML1R3 حاوی تنظیم کننده رشد Kin در سطوح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP در سطوح (۰/۵، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و محیط کشت باززایی جو، شامل تنظیم‌کننده رشد Kin در سطوح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP در سطوح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بود. بعد از کشت کالوس‌ها در محیط باززایی، ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱ هفته در شرایط تاریکی و دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تیمارگردیدند. بعد از این مدت نمونه‌ها تحت تیمار ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از آغاز باززایی، کالوس‌های در حال باززایی به لوله‌های آزمایش با محیط کشت مشابه منتقل شدند تا فضای کافی برای رشد گیاه‌چه وجود داشته باشد.

ریشه‌زایی گیاهچه‌های حاصل از باززایی و سازگاری گیاهان به شرایط طبیعی

شاخه‌های باززا شده با ارتفاع مناسب، برش داده شده و جهت تولید و توسعه‌ی ریشه‌ها به محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده رشد حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز انتقال داده شد. پس از ریشه‌دار شدن گیاهچه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای، گیاهچه‌های حاصل پس از شستشوی کامل به خاک سبک استریل (حاوی نسبت‌های مساوی خاک‌برگ و خاک زراعی) انتقال داده شدند. برای ایجاد سازگاری گیاه در گلدان، کیسه نایلونی روی هر گلدان کشیده شد و گیاه به نخستین مراحل سازگاری به محیط طبیعی وارد شد. به منظور تغذیه و آبیاری از محلول دو در هزار فوسامکو۴ استفاده شد. پس از گذشت سه هفته که به‌تدریج هر هفته به تعداد سوراخ‌های پوشش نایلونی افزوده شد، پوشش برداشته شد (شکل ۱).

تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام شد. مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت.

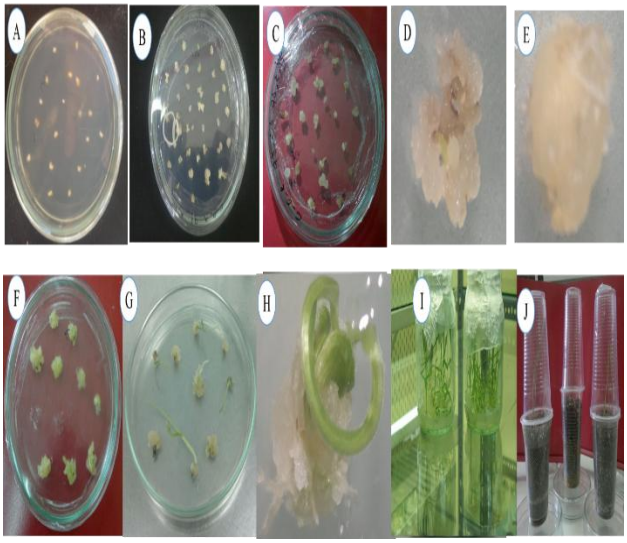
www.iapb.kiau.ac.ir

نتایج و بحث

القای کالوس و تولید کالوس‌های جنین‌زا از جنین بالغ گندم

در این تحقیق برای القای کالوس‌زایی از جنین بالغ از سه غلظت تنظیم‌کننده رشد توفوردی (۲، ۲/۴ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. چند روز بعد از این‌که ریز نمونه‌ها در محیط کشت کالوس‌زایی (ML1G1) قرار گرفتند شروع به کالوس‌زایی کردند. در دو هفته اول رشد کالوس‌ها خیلی کم بود و بعد از دو هفته کالوس‌ها رشد بیشتری از خود نشان دادند. کالوس‌های حاصله از نظر ساختار متراکم، ترد و دارای سطح ناصاف بودند و از لحاظ رنگ کرم تا کرم مایل به زرد (به‌دلیل قرارگیری در شرایط تاریکی و عدم تولید کلروفیل) بودند (شکل ۱).

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از کالوس‌زایی بر روی سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد توفوردی نشان داد که بین چهار لاین گندم، سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد توفوردی و نیز اثر متقابل لاین × سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد حداقل در سطح احتمال پنج درصد از نظر درصد کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱).



شکل ۱- مراحل مختلف القا کالوس و باززایی گیاه جو از ریزنمونه جنین بالغ. A: کشت جنین بالغ در محیط کالوس‌زایی ML1G1 . B: القا کالوس از جنین بالغ بر روی محیط ML1G1 پس از ۵ هفته کشت در تاریکی. C: تکثیر کالوس‌های جنین‌زایی به‌دست‌آمده از جنین بالغ روی محیط. D: نمایی نزدیک از یک کالوس جنین‌زا. E: نمای نزدیک از یک کالوس غیر جنین‌زا. F: ایجاد نقاط سبزرنگ بر روی کالوس بعد از انتقال کالوس به محیط باززایی. G: القا ساقه هوایی از کالوس‌های جنین‌زا به‌دست‌آمده از جنین بالغ در محیط. H: نمایی نزدیک از یک ساقه هوایی حاصل از کالوس جنین‌زا. I: انتقال گیاهچه‌های حاصل از باززایی به محیط کشت ریشه‌زایی. J: انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به خاک و سازگاری گیاهان به شرایط طبیعی.

Figure 1. Different stages of callus induction and regeneration of barley plants from adult mature embryo. A. Mature embryo culture in ML1G1 callus induction medium .B: induction of callus from mature embryos on ML1G1 medium after 5 weeks of culture in the dark . C: Duplication of embryo calluses derived from adult mature embryo on the environment. D: Close view of an embryonic callus. E: Close view of a non-embryonic callus. F: Create green points on callus after callus transfer to regeneration environment .G: Induced aerial stems of embryonic callus from adult mature embryo in the environment. H: Close view of an embryonic callus aerial stem .I: Transfer of seedlings from regeneration to rooting medium .J: Transfer of seedlings rooted to the soil and adaptation of plants to natural conditions.

جدول۱- تجزیه واریانس فاکتوریل تأثیر سطوح مختلف توفوردی و لاین های گندم بر روی کالوس‌زایی جنین بالغ گندم

Table 1. Factorial variance analysis of Effect different levels of 2,4-D and wheat lines on callus induction of adult mature embryo wheat

منابع تغییرات S. O. V	درجه آزادی Df	درصد کالوس‌زایی Callus induction percentage
2,4-D	2	6.437**
لاین lines	3	54.748**
lines ×2,4-D	6	1.678*
خطا Error	24	0.771

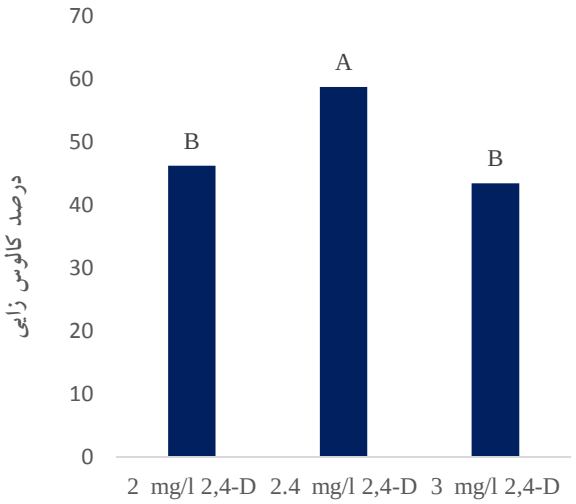
* و ** به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ است.

*,**: significant at 5% and 1% probability level, respectively.

کالوس‌زایی گندم در این تحقیق بسته به ژنوتیپ و غلظت توفوردی متفاوت بود که با نتایج سایر محققین نیز مطابقت دارد (۱۵، ۲۳ و ۲۵) (Tarinejad *et al*,. 2007; Kilinc, 2004; Wang and Wei, 2004). بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به لاین C-D-9 (۷۹/۵۵٪) بود (شکل ۳). همچنین در سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد توفوردی بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به سطح ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر (۵۸/۷۷٪) بود (شکل ۲). با توجه به معنی‌دار بودن اثرمتقابل، بالاترین میزان کالوس‌زایی را

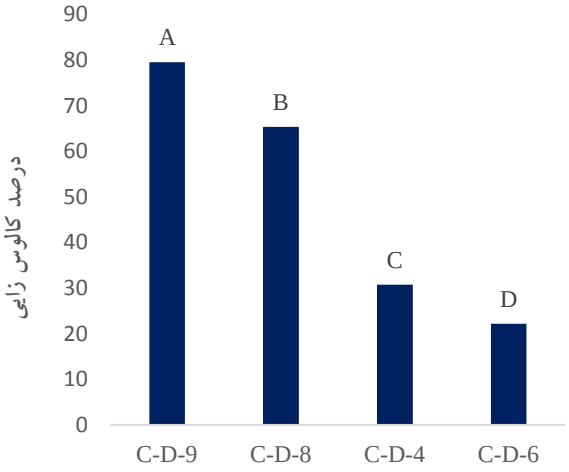
www.japb.kiau.ac.ir

لاین C-D-9 در تمامی غلظت‌های مختلف توفوردی و لاین C-D-8 در سطوح ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی به میزان تقریبی ۸۲٪ تولید کردند و کمترین میزان کالوس‌زایی به ارقام C-D-6 و C-D-4 در سطوح ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر توفوردی (۲۲٪) متعلق بود (شکل ۴).



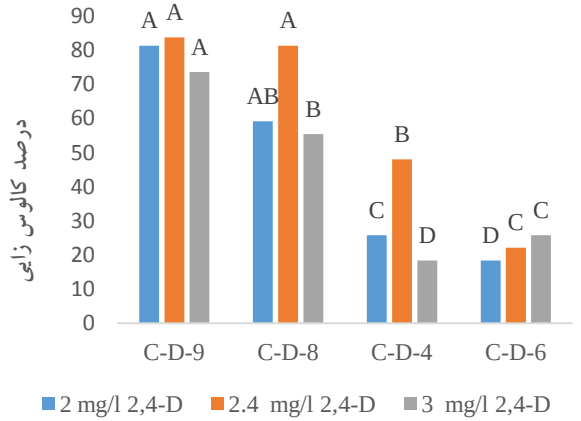
شکل ۲- مقایسه‌ی درصد کالوس‌زایی لاین های گندم در غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد توفوردی (۲، ۲/۴ و ۳ میلی‌گرم در لیتر)

Figure 2. Comparison of the percentage of callus induction of wheat lines in different concentrations of 2,4-D (2, 2.4 and 3 mg / L)



شکل ۳- مقایسه‌ی میانگین درصد کالوس‌زایی لاین های مختلف گندم

Figure 3. Comparison of the average callosity percent of wheat lines



شکل ۴- مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل لاین های گندم در سطوح مختلف غلظت تنظیم‌کننده رشد توفوردی

Figure 4. Comparison of the interactions of wheat lines at different concentrations of the 2,4-D hormone

در مطالعه‌ای که بر روی کالوس‌زایی از جنین‌های بالغ گندم صورت گرفت درصد کالوس‌زایی در محیط کشت حاوی ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی، به‌ترتیب ۸۶/۶۷٪، ۸۷/۸۶٪ و ۸۵٪ به دست آمد (Bi *et al*,. 2007). در پژوهشی برای بررسی درصد کالوس‌زایی ژنوتیپ‌های مختلف گندم در محیط کشت حاوی ۸ میلی‌گرم در لیتر توفوردی مشاهده کردند که درصد کالوس‌زایی از ۱۱/۶ تا ۸۹/۶ بین ارقام متفاوت بود (Chen *et al*,. 2006). در آزمایشی از ۲ میلی‌گرم در لیتر توفوردی برای القای کالوس استفاده کردند و مشاهده شد که درصد کالوس‌زایی در گندم زراعی بین ۸۵-۸۲٪ و در گندم دوروم بین ۷۹-۷۷٪ می‌باشد (Chauhan *et al*,. 2007). در پژوهشی دیگر اثر دیکامبا در کشت جنین بالغ هفت رقم گندم نان بررسی و مشخص شد که پاسخ کشت بافت به ژنوتیپ و غلظت dicamba بستگی دارد (Turhan and Baser, 2003). بالاترین نرخ رشد کالوس ۶۳/۱٪ در محیط کشت Linsmaier Skoog حاوی ۵mg/l dicamba مشاهده شد (Kilinc, 2004).

انتقال کالوس‌های به دست آمده از جنین بالغ گندم به محیط باززایی

پر آوری مهم‌ترین مرحله‌ی ریز افزایی است و وجود یک دستور کار موفق با ظرفیت بالا، سرعت و کیفیت ریز افزایی را بسیار تحت تأثیر قرار می‌دهد. عوامل بسیار زیادی مانند نوع کولتیوار، گونه و ژنوتیپ، محیط کشت، مواد معدنی و آلی،

www.japb.ir

کربوهیدرات‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد و فاکتورهای فیزیکی بر پرآوری و به طور کلی ریزافزایی مؤثر می‌باشند. در فرایند پرآوری، سیتوکینین‌ها به‌عنوان اصلی‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد در نظر گرفته می‌شوند، اگرچه در مواردی غلظت‌های کمی از اکسین‌ها و جیبرلیک اسید نیز به‌کاربرده می‌شود (Pati *et al*,. 2005).

بعد از انتقال کالوس به دست آمده از بهترین تیمار تنظیم‌کننده رشد (۲/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی) حاصل از جنین بالغ گندم در شرایط تاریکی و انتقال کالوس‌ها به محیط جنین‌زایی سوماتیکی حاوی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نیترات نقره، کالوس‌های جنین‌زا در محیط باززایی به مدت شش هفته قرار گرفتند و بعد از این مدت میانگین درصد شاخه‌زایی هر لاین ثبت گردید. تجزیه واریانس داده‌های باززایی نشان داد که بین ارقام، محیط‌های کشت و نیز اثرمتقابل لاین در محیط کشت از نظر درصد شاخه‌زایی حداقل در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس فاکتوریل تأثیر محیط کشت‌های مختلف و لاین‌های گندم بر روی درصد باززایی جنین بالغ گندم

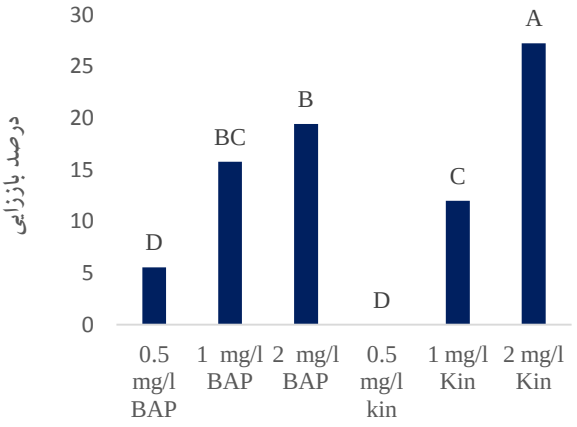
Table 2. Factorial variance analysis of media different and wheat lines levels on regeneration from mature embryo explants

منابع تغییرات S. O. V	درجه آزادی Df	درصد باززایی regeneration percentage
محیط کشت Medium	5	9.31**
لاین lines	3	6.30**
محیط کشت ×لاین lines × Medium	15	1.915**
خطا Error	48	.399

** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ است.

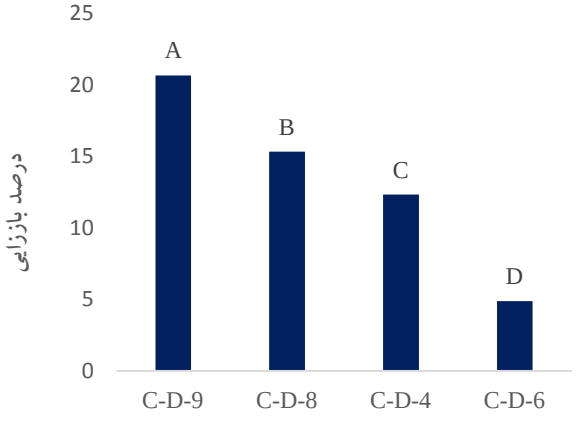
**: significant at 1% probability level,

محیط کشت باززایی شامل تنظیم‌کننده رشد Kin در سطوح ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و BAP در سطوح ۰/۵، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر بود. تقریباً کمتر از یک هفته پس از کشت کالوس‌ها در محیط باززایی در شرایط روشنایی (نور سفید)، آغاز اندام‌زایی به صورت نقاط سبزرنگ در سطح کالوس‌ها مشاهده گردید. روند تبدیل جنین‌های سوماتیکی به اندام در کالوس‌ها در هفته‌های بعد افزایش یافت. به نحوی که در هفته‌های آخر بر تعداد و رشد نوساقه‌های تشکیل شده اضافه گردید. بیشترین میزان باززایی مربوط به لاین C-D-9 (۲۰/۶۶٪) و کمترین میزان باززایی مربوط به لاین C-D-6 (۴/۸۸٪) بود (شکل۶). همچنین در محیط‌های کشت متفاوت بیشترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت ۲ mg/l Kin با میانگین ۲۷/۲۲٪ بود (شکل ۵). با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل محیط‌های کشت متفاوت با ارقام مورد مطالعه، بیشترین میزان باززایی در C-D-8 و C-D-9 در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد Kin با میانگین ۴۰٪ مشاهده شد (شکل ۷).



شکل ۵- مقایسه‌ی میانگین درصد باززایی محیط‌های کشت متفاوت لاین‌های گندم

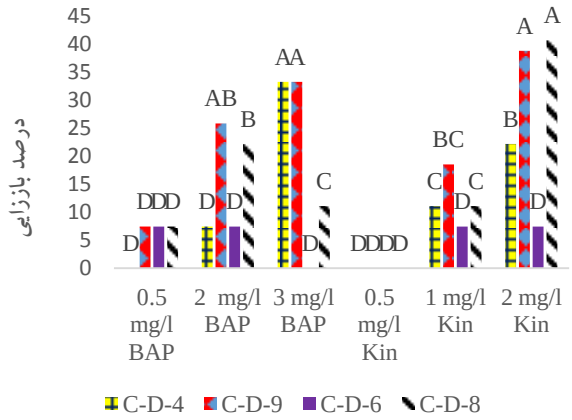
Figure 5. Comparison of mean regeneration percent of different cultivars of wheat lines



شکل ۶- مقایسه‌ی میانگین درصد باززایی لاین های گندم مورد مطالعه

Figure 6. Comparison of the average regeneration percent of wheat lines studied

www.kiau.ac.ir



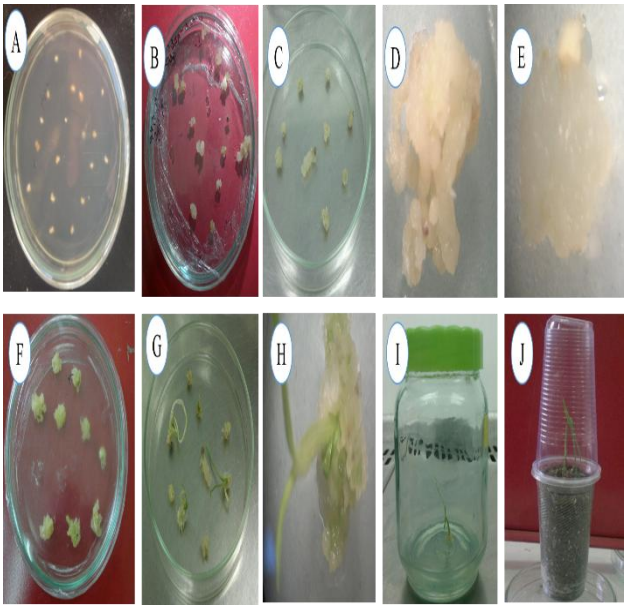
شکل ۷- مقایسه‌ی میانگین درصد باززایی محیط‌های کشت متفاوت ولاین‌های مختلف گندم

Figure 7. Comparison of average regeneration percent of different cultivating environments and different wheat lines

در آزمایشی، از ۳۹ رقم گندم زمستانه برای القای کالوس و باززایی استفاده کردند. برخی از ارقام درصد باززایی خوبی نشان دادند. آن‌ها گزارش کردند که درصد القای کالوس و درصد باززایی کاملاً به رقم وابسته است (Sears and Decard, 1982). برای باززایی از کالوس‌های به‌دست‌آمده از جنین‌های بالغ حمایت شده با آندوسپرم از تنظیم کننده رشد BAP به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA استفاده کردند، بعد از چهار هفته حداکثر تشکیل گیاهچه ۴۰-۳۵٪ بود (Rashid *et al*,. 1999).

القای کالوس و تولید کالوس‌های جنین‌زا از ریزنمونه جنین بالغ جو

در این تحقیق برای القای کالوس‌زایی از جنین بالغ از سه غلظت تنظیم‌کننده رشد توفوردی (۱/۵، ۲/۵ و ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. چند روز بعد از اینکه ریز نمونه‌ها در محیط کشت کالوس‌زایی (ML1G1) قرار گرفتند، شروع به کالوس‌زایی کردند. در دو هفته اول رشد کالوس‌ها خیلی کم بود و بعد از دو هفته کالوس‌ها رشد بیشتری از خود نشان دادند. به‌طوری که بیشترین رشد کالوس بین هفته‌های پنجم و ششم رخ داد. در هفته پنجم، کالوس‌های حاصل از تیمار تنظیم‌کننده رشد از نظر مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. کالوس‌های حاصله از نظر ساختار متراکم، ترد و دارای سطح ناصاف بودند و از لحاظ رنگ کرم تا کرم مایل به زرد (به‌دلیل قرارگیری در شرایط تاریکی و عدم تولید کلروفیل) بودند (شکل۸).



شکل ۸- مراحل مختلف القا کالوس و باززایی گیاه جو از ریزنمونه جنین بالغ. A: کشت جنین بالغ در محیط کالوس‌زایی ML1G1 .B : القا کالوس از جنین بالغ بر روی محیط ML1G1 پس از ۵ هفته کشت در تاریکی. C: تکثیر کالوس‌های جنین‌زایی به‌دست‌آمده از جنین بالغ روی محیط. D: نمایی نزدیک از یک کالوس جنین‌زا. E: نمای نزدیک از یک کالوس غیر جنین‌زا. F: ایجاد نقاط سبزرنگ بر روی کالوس بعد از انتقال کالوس به محیط باززایی. G: القا ساقه هوایی از کالوس‌های جنین‌زا به‌دست‌آمده از جنین بالغ در محیط. H: نمایی نزدیک از یک ساقه هوایی حاصل از کالوس جنین‌زا. I: انتقال گیاهچه‌های حاصل از باززایی به محیط کشت ریشه‌زایی. J: انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به خاک و سازگاری گیاهان به شرایط طبیعی.

Figure 8. Different stages of callus induction and regeneration of barley plants from adult mature embryo. A. Mature embryo culture in ML1G1 callus induction medium .B: induction of callus from mature embryos on ML1G1 medium after 5 weeks of culture in the dark . C: Duplication of embryo calluses derived from adult mature embryo on the environment. D: Close view of an embryonic callus. E: Close view of a non-embryonic callus. F: Create green points on callus after callus transfer to regeneration environment .G: Induced aerial stems of embryonic callus from adult mature embryo in the environment. . H: Close view of an embryonic callus aerial stem .I: Transfer of seedlings from regeneration to rooting medium .J: Transfer of seedlings rooted to the soil and adaptation of plants to natural conditions.

www.japb.kiau.ac.ir

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از کالوس‌زایی بر روی سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد توفوردی نشان داد که بین، سطوح مختلف تنظیم کننده رشد توفوردی، سه رقم جو، و نیز اثر متقابل رقم × سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد حداقل در سطح احتمال ۵٪ از نظر درصد کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس فاکتوریل تأثیر سطوح مختلف توفوردی و ارقام مختلف جو بر روی کالوس‌زایی

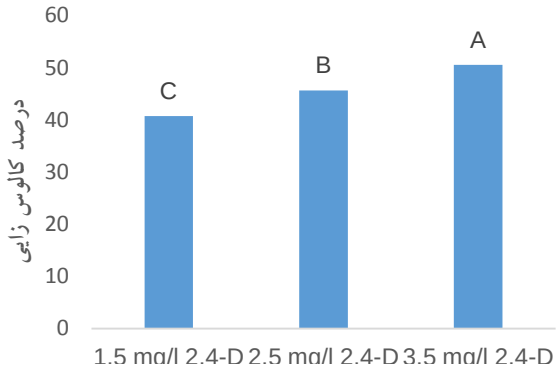
Table 3. Factorial variance analysis of Effect different levels of 2,4-D and different barley varieties on callus formation

منابع تغییرات S. O. V	درجه آزادی Df	درصد کالوس‌زایی Callus induction percentage
2,4-D	2	1.778 *
رقم cultivar	2	26.778**
رقم ×× 2,4-D cultivar× 2,4-D	4	4.389**
خطا Error	18	0.556

* و ** به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ است.

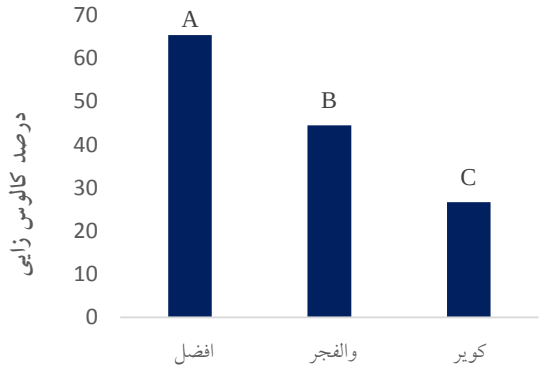
*,**: significant at 5% and 1% levels of probability, respectively.

کالوس‌زایی در این تحقیق بسته به ژنوتیپ و غلظت توفوردی متفاوت بود. بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به رقم افضل (۶۵/۳۳٪) و کمترین میزان کالوس‌زایی مربوط به رقم کویر (۲۶/۶۶٪) بود (شکل ۱۰). همچنین در سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد توفوردی بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به سطح ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر (۵۰/۶۶٪) بود (شکل ۹). بالاترین میزان کالوس‌زایی را رقم افضل و در درجه بعدی رقم والفجر در سطوح ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی تولید کردند و کمترین میزان کالوس‌زایی متعلق به رقم کویر در سطح ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی بود (شکل ۱۱).



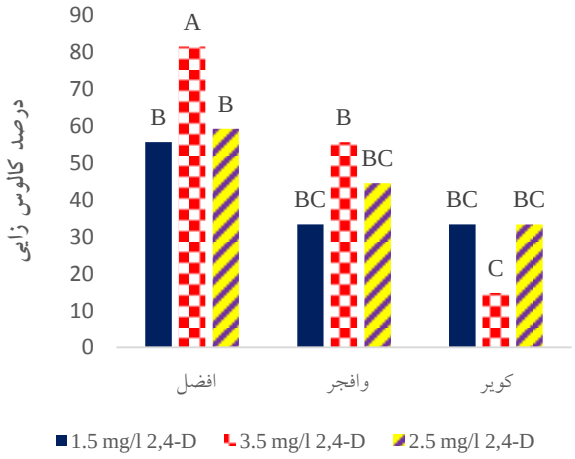
شکل ۹- مقایسه‌ی درصد کالوس‌زایی ارقام جو در غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد توفوردی (۱/۵، ۲/۵و ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر)

Figure 9. Comparison of the callosity percent of barley varieties in different concentrations of 2,4-D hormone (1.5, 2.5 and 3.5 mg / l)



شکل ۱۰- مقایسه‌ی میانگین درصد کالوس‌زایی ارقام مختلف جو

Figure 10. Comparison of the average callosity percent of different barley varieties



شکل ۱۱- مقایسه‌ی میانگین درصد کالوس‌زایی ارقام مختلف جو در سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد توفوردی

Figure 11. Comparison of the average callosity percent of different barley varieties in different levels of the 2,4-D hormone

www.jcp.kiau.ac.ir

انتقال کالوس‌های به محیط باززایی

بعد از انتقال کالوس به‌دست‌آمده از بهترین تیمار تنظیم‌کننده رشد (۳/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی) حاصل از جنین بالغ جو در شرایط تاریکی، کالوس‌ها در محیط جنین‌زایی حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره به مدت ۴ هفته کشت شدند. بعد از تهیه کالوس جنین‌زا، در محیط باززایی به مدت شش هفته قرار گرفتند و میانگین درصد شاخه‌زایی هر رقم ثبت گردید. تجزیه واریانس داده‌های باززایی نشان داد که بین ارقام جو، محیط متفاوت کشت و نیز اثر متقابل رقم × محیط کشت از نظر درصد شاخه‌زایی حداقل در سطح احتمال پنج درصد، اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴).

جدول ۴- تجزیه واریانس فاکتوریل تأثیر محیط کشت‌های مختلف و ارقام جو بر روی باززایی جنین بالغ جو

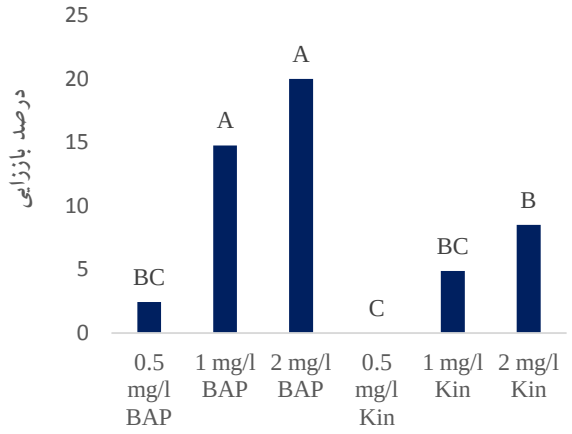
Table 4. Varietal factor analysis. Effect of different media and barley varieties on adult mature embryo regeneration.

منابع تغییرات S. O. V	درجه آزادی Df	درصد باززایی regeneration percentage
محیط کشت Medium	5	3.449**
رقم cultivar	2	3.505**
محیط کشت ×رقم cultivar× Medium	10	0.605*
خطا Error	36	0.264

* و ** به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ است.

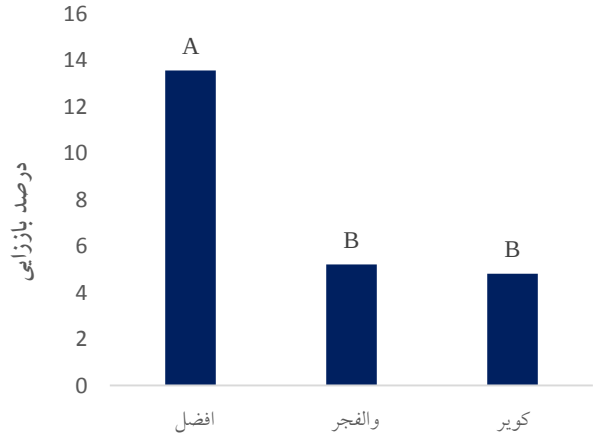
*,**: significant at 5% and 1% probability level, respectively.

محیط کشت باززایی شامل تنظیم کننده رشد Kin در سطوح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP در سطوح (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بود. تقریباً کمتر از یک هفته پس از کشت کالوس‌ها در محیط باززایی در شرایط روشنایی (نور سفید)، آغاز اندام‌زایی به صورت نقاط سبزرنگ در سطح کالوس‌ها مشاهده گردید. روند تبدیل جنین‌های سوماتیکی به اندام در هفته‌های بعد افزایش یافت. به نحوی که در هفته‌های آخر بر تعداد و رشد نوساقه‌های تشکیل شده اضافه گردید. به‌طور کلی اندام‌زایی در کالوس‌های هر سه رقم در تمام تیمارها مشاهد گردید. بیشترین میزان باززایی مربوط به رقم افضل (۱۳/۵۵٪) و کمترین میزان باززایی مربوط به رقم کویر (۴/۸۸٪) بود (شکل ۱۳). همچنین در محیط‌های کشت متفاوت بیشترین میزان باززایی مربوط به محیط کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (۲۰٪) بود (شکل۱۲). با توجه به معنی‌داری اثرمتقابل، بیشترین میزان باززایی در رقم افضل در سطح ۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BAP به ترتیب به میزان ۲۹/۵۵٪ و ۲۵/۸۸٪ دیده شد و بیشترین میزان باززایی در رقم والفجر در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BAP (۱۴/۷۷٪) دیده شد(شکل ۱۴).



شکل ۱۲- مقایسه‌ی میانگین درصد باززایی محیط‌های کشت متفاوت در باززایی جو

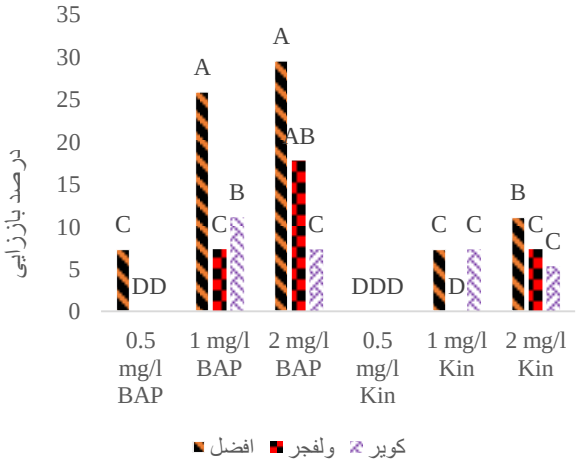
Figure 12. Comparison of the average percentage of regeneration of different culture media in barley regeneration



شکل ۱۳- مقایسه‌ی میانگین درصد باززایی ارقام جو مورد مطالعه در محیط کشت‌های متفاوت

Figure 13. Comparison of average regeneration percentage of studied barley cultivars in different media

www.jap.kiau.ac.ir



شکل ۱۴- مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل محیط‌های کشت و ارقام مختلف جو روی باززایی گیاهچه‌ها

Figure 14 - Comparison of the interactions between cultivars and different varieties of barley on the regeneration of seedlings

در پژوهشی، اثرات ژنوتیپ و محیط کشت روی ۱۵ ژنوتیپ جو روی کالوس‌زایی و باززایی از ریزنمونه جنین نارس بررسی و در این آزمایش از محیط‌های تغییریافته B5، MS و CC استفاده شد. توان باززایی تحت تأثیر ژنوتیپ، محیط کشت و اثر متقابل ژنوتیپ در محیط کشت بود (Bregitzer, 1992). در مطالعه‌ای که بر روی جنین بالغ و نابالغ جو انجام گرفت. بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی بود در این پژوهش بیشترین میزان کالوس‌زایی در جنین بالغ (۹۷/۸ ٪) و جنین نابالغ (۷۲/۲ ٪) اعلام شد، بیشترین میزان باززایی در جنین نابالغ (۹/۳٪) و جنین بالغ(۱۳/۳ ٪) در محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده رشد بود (Abumhadi *et al*,. 2005). در بررسی که در مورد کالوس‌زایی و باززایی از جنین بالغ بود از دو رقم جو (BARI-6 و BARI-3) استفاده شد. در این پژوهش بیشترین کالوس‌زایی برای رقم BARI-6 به میزان ۳۳/۶۶ ٪ و برای رقم BARI-3 به میزان ۴۹/۲ ٪ در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر سیلور نیترات و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ال-گلوتامین بدست آمد. در این پژوهش بیشترین باززایی در رقم BARI-6 به میزان ۳۰/۲۰ ٪ و برای رقم BARI-3 به میزان ۱۶/۱۳ ٪ در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ال-گلوتامین اعلام شد (Mozidu *et al*,. 2015). در بررسی، از جنین بالغ بهترین محیط کشت برای کالوس‌زایی محیط کشت حاوی ۴ میلی‌گرم بر لیتر دیکامبا گزارش شد. و بیشترین باززایی برای جو دو ردیفه محیط کشت حاوی ۱میلی‌گرم بر لیتر TDZ به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و برای جو شش ردیفه محیط کشت حاوی ۱میلی‌گرم بر لیتر TDZ به همراه ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به‌دست آمد (Erkoyuncu *et al*,. 2016).

نتیجه‌گیری کلی

بالاترین میزان کالوس‌زایی در گندم نان از لاین C-D-9 در تمامی غلظت‌های مختلف توفوردی و لاین C-D-8 در سطوح ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر توفوردی به میزان تقریبی ۸۲٪ بدست آمد. بیشترین میزان باززایی در گندم نان در لاین C-D-8 و C-D-9 در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد Kin با میانگین ۴۰٪ حاصل شد. بالاترین میزان کالوس‌زایی از رقم افضل و در درجه بعدی از رقم والفجر در سطوح ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی به‌دست آمد و کمترین میزان کالوس‌زایی متعلق به رقم کویر در سطح ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی بود. بیشترین میزان باززایی در رقم افضل در سطح ۲ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BAP به ترتیب به میزان ۲۹/۵۵٪ و ۲۵/۸۸٪ مشاهده شد و بیشترین میزان باززایی در رقم والفجر در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BAP (۱۴/۷۷٪) دیده شد.

www.iapb.kiau.ac.ir

References **فهرست منابع**

Abumhadi, N., K. Kamenarova., E. Todorovska., G. Dimov., A. Trifonova., K. Gecheff., and A. Atanassov. 2005. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos (*Hordeum vulgare* L.). Biotechnol. Biotechnol. Eq.

Ahmadabadi, M., S. Ruf., and R. Bock .2007. A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L). Transgenic Res. 16(4): 437-448**.**

Aydin, M., M. S. Taspinar., E. Arslan., Sigmazb and G. Agar. 2015. Auxin effects on somaclonal variation and plant regeneration from mature embryo of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Pak. J. Bot*., 47(5): 1749-1757.

Aydin, M., M. Tosun,. and K. Haliloglu. 2013. Plant regeneration in wheat mature embryo culture. 247 African Journal of Biotechnology 10:15749-15755.

Badr Eldin, A., E. Saeed., A. Marmar., E. Siddig, Aisha Ohag Osman-Adil and A. E Hussein. 2012. A Simple and Efficient Protocol for Callus Induction and Regeneration from Wheat (*Triticum aestivum* L.) Mature Embryos. International Journal of Science and Research (IJSR) ISSN (Online): 2319-7064.

Bi, RM., M. Kou., L. G. Chen., S. R. Mao., and H. G. Wang. 2007. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. Plant Breeding 126: 9- 12.

Bregitzer, P. 1992. Plant regeneration and callus type in barley: Effect of genotype and culture mediam. Crop Sci. 32:1108-1112.

Carman, J. G., N. E. Jefferson., and W. F. Campbell. 1988. Induction of embryogenic (*Triticum aestivum* L.) calli: I. Quantification of genotype and culture medium effects. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 10: 101-106.

Chauhan, H., S. A. Desai., and P. Khurana. 2007. Comparative analysis of the differential regeneration response of various genotypes of *Triticum aestivum*, *Triticum durum* and *Triticum dicoccum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 91: 191-199.

Chen, J., R. Yue., H. Xu., and X. Chen. 2006. Study on plant regeneration of wheat mature embryos under endosperm- supported culture. Agricultural Sciences in China 5(8): 572-578.

Chowdhury, SH., K. Kato., Y. Yamamoto., and K. Hayashi. 1991. Varietal variation in plant regeneration capacity from immature embryos among common wheat cultivars. **Japanese Journal of Breeding** 41: 443-450.

Delporte, F., O. Mostade., and J. M. Jacquemin. 2001. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 67: 73-80.

Erkoyuncu, M. T., and M. Yorgancilar. 2016. Efficient callus induction and plantlets regeneration from mature embryo Culture of barley (*Hordeum vulgare* L.).Genotypes. International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering vol:10, No:6.

Fahmy, A. H., J. Li., W. A. El-Wafa., S. E. El-Khodary., and O. M. El Shihy. 2012. Effects of different combinations of benzyl adenine and indole acetic acid concentrations on in vitro plant regeneration in hexaploid wheat GM Crops and Food. Biotechnology in Agriculture and the Food Chain 3(2):111-114.

FAO. 2012. The wheat initiative- an international research initiative for wheat improvement, second global conference of Agricultural research for development, http:// WWW.fao.org

Filippov, M., D. Miroshnichenko., D. Vernikovskaya., and S. Dolgov .2006. The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 84: 213-222.

Hakam, N., S. M. Udupa., A. Rabha., M. Ibriz., and D. Iraq. 2015. Efficient callus induction and plantlets regeneration in bread wheat using immature and mature embryos. International Journal of Biotechnology Research Vol. 3(1). 001-009, pp

www.jcb.kiau.ac.ir

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

Islam, M. M., R. N. Remme., D. Biswas., and F.Yesmin, 2015. *In vitro* plant regeneration from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). International Journal of Multidisciplinary Research and Development. 2(4): 669-672.

Jun ying, C., Y. Run qing., and C. Hai xian Xin jian. 2006. Study on plant regeneration of wheat mature embryo under endosperm-supported culture. Agricultural Sciences in China 5: 572-578.

Kazemi Arbath, H. 2005. Cereal Morphology and Physiology. Tabriz University Publication: 104

Kilinc, M. 2004. Effects of dicamba concentration on the embryo cultures of some bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. Biotechnology and Biotechnological Equipment 18(2): 58-61.

Liu, H. J., S. H. Misso., O. Kamijima., and M. Sawano. 1990. Effects of plant growth regulators on the response of immature wheat embryo culture. Plant Tiss. Cult. Lett. 7: 170-176.

Mozidu, H., A. B. Siddique., and S. M. Shahinu .2015. Effect of Silver Nitrate and Amino Acids on High Frequency Plants Regeneration in Barley (*Hordeum vulgare* L.) .Plant Tissue Cult. & Biotech. 25(1): 37-50.

Pati, P. K., S. P. Rath., M. Sharma., A. Sood., and P. S. Ahuja. 2005. *In vitro* propagation of rosea review; Biotechnology Advances; Available online at www.sciencedirect.com.

Patnaik, D., and P. Khurana. 2003. Genetic transformation of Indian bread (*Triticum aestivum*) and pasta (*Triticum durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo derived calli. BMC Plant Biology 3: 1-11.

Rashid, A., R. H. Qureshi., P. A. Hollington., and R. G. W. Jones. 1999. Comparative response of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to salinity at seedling stage. Agron. Crop Sci. 182: 199-207.

Ren, J., X. Wang., and J. Yın. 2010. Dicamba and Sugar Effects on Callus Induction and Plant Regeneration from Mature Embryo Culture of Wheat. Agricul.Sci. in China 9(1): 31-37.

Sears, R. G., and E. L. Decard. 1982. Tissue culture variability in wheat: Callus induction and plant regeneration. Crop Sci. 22: 546-550.

Shan, X. Y., D. S. Li., and R. D Qu. 2010. Thidiazuron promotes. *in vitro* regeneration callus of wheat and barley. *In vitro Cell. Dev. Biol-plant.*vol 36: 207-210.

Tarinejad, A., M. Toorchi., A. Habashi., and A. Pellegrineschi. 2007. Optimization of gene transfer in Iranian bread wheat cultivars by biolistic bombardment. Journal of Food Agriculture and Environment 5(3&4): 237-241.

Turhan, H., and I. Baser. 2003. Callus induction with mature embryo culture technique in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Indian Journal of Agricultural Sciences, 73: 399-401.

Wang, C. T., and Z. M. Wei. 2004. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf base. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 77: 149-156.

Yu, Y., J. Wang., M. L. Zhu., and Z. M. Wei. 2008. Optimization of mature embryobased high frequency callus induction and plant regeneration from elite wheat cultivars grown in China. Plant Breeding 127: 249-255.

Zale, M. J., B. W. Harmony., K. K. Kimberlee., and M. S. Camille. 2004. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult. 76: 277-281.

www.japb.kiau.ac.ir

ISSN NO: 2008-8485

Journal of Agronomy and Plant Breeding
Vol 13. No. 3, 2017

Callus induction and regeneration of bread wheat cultivars and barley from mature embryo explants

A. A. Gholami[1]*, A. Tarinejad[2]

Received date: 31 May 2017 Accepted date: 11 Aug 2017

Abstract

In recent years, cereal production has declined due to the intensification of several living and non-living tensions. Therefore, the correction of cereal varieties consistent with many living and non-living tensions is a necessity in cereal reform. Cereal modification through genetic manipulation is limited due to the lack of access to tissue culture and effective and safe regeneration. In this research, the ability of callus and regeneration of four wheat lines, CD-4, CD-6, CD-8, CD-9 and three barley cultivars (Afzal, Valfajr and Kavir) from adult fetal specimens Evaluated. For wheat callus induction, ML1G1 medium containing three levels of growth regulator 2, 4-D was used to regenerate the ML1R3 medium containing three levels of Kin and BAP growth regulators. For callus induction, ML1G1 medium containing three levels of growth regulator 2, 4-D was used for regeneration of ML1R3 medium containing different levels of BAP and Kin growth regulator. The callus evaluation of different wheat varieties showed that the highest amount of callus related to the CD-9 (79.55%) line and also at different levels of the Thorrod growth regulator had the highest level of callus induction 2.4 mg/L (77.58%). Evaluation of regeneration of wheat cultivars showed that the highest reproductive rate related to CD-9 line (20.66%), as well as in different culture media, had the highest regeneration rate of 2 mg/L Kin Kinseed medium (27.22%) Was. The results of callus evaluation of different barley varieties showed that the highest amount of callus induction related to Afzal cultivar (65.33%), as well as at different levels of Growth regulator, had the highest level of callus induction related to 3.5 mg/L (66.50%). The highest regeneration rate of Afzal cultivar (13.55%) and also in different culture media had the highest reproduction rate of 2 mg/L BAP (20%).

Keywords: barley, wheat, mature embryo, callus and regeneration

www.iapb.kiau.ac.ir

1- MSc student, Faculty of Agriculture, Department of Agriculture Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.
2- Associate Prof, Faculty of Agriculture, Department of Agriculture Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.
*- Corresponding author: Gholami.2359@gmail.com

Iranian Journal of Agronomy & Plant Breeding Islamic Azad University, Karaj Branch