نشریه زراعت

شماره ۱۰۴، پائیز ۱۳۹۳

(پژوهش و سازندگی)

توسعه تولید دابل هاپلوئیدها با استفاده از کلشی سین در محیط کشت بساک برنج

• لیلا خزایی، دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پیام نور کرج (نویسنده مسئول)
• غلامرضا بخشی خانیکی، استاد گروه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور کرج
• علی اکبر عبادی، عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات برنج کشور
• ابوبکر جوهرعلی، عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات بین المللی برنج

تاریخ دریافت: شهریور ماه ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۱۳۹۰
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۱۱۳۵۱۳۹۵
پست الکترونیک نویسنده مسئول: Leila_khazaie@yahoo.com

چکیده:

در این تحقیق میزان دابل هاپلوئید شدن گیاهان حاصل از کشت بساک بوته‌های F1 (حاصل از تلاقی غریب در سپیدرود) در موسسه تحقیقات برنج کشور بررسی شده است. بساک های از یک ژنوتیپ روی دو محیط کشت N6, Chu با و بدون کلشی سین (۰، ۲۰ ، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر)تیمار شده بودند برای ۷ روز قرار داده شدند و پس از ۷ روز بساک ها را از محیط کشت حاوی کلشی سین به محیط های کشت کالوس زایی بدون کلشی سین منتقل شدند. به منظور بررسی تاثیر محیط کشت ، غلظت های مختلف کلشی سین و اثرات متقابل آنها بروی کالوس زایی، باززایی و دابل هاپلوئیدی شدن در قالب آزمایش فاکتوریل کاملا تصادفی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که اختلاف معنی دار بین محیط های کشت کالوس زایی برای چها صفت مورد بررسی (کالوس زایی ،گیاهان سبز، گیاهان آلبینو، باززایی کل) وجود دارد اما بین محیط های کشت کالوس زایی برای صفت درصد دابل هاپلوئیدی اختلاف معنی داری وجود ندارد. اما مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن نشان داد که بهترین محیط کشت از نظر عکس العمل به تولید کالوس محیط کشت N6 (۵/۱۰۲) درصد و به گیاهان سبز ، باززایی کل و دابل هاپلوئیدی محیط Chu (۱۷/۵۱۵ ، ۲۲/۷۱۷ و ۴۹/۴۱۱) درصد می باشد. بیشترین میزان دابل هاپلوئیدی در غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر کلشی سین (۶۸/۱۹درصد) بدست آمد که با بقیه غلظت ها میزان دابل هاپلوئید شاهد(۳۱/۹۸ درصد) بدون کلشی سین تفاوت معنی دار داشت. همچنین محیط کشت کالوس زای Chu با غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر (۶۹/۱۷ درصد) و محیط کشت کالوس زای N6 با غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر (۶۷/۲۲ درصد) بیشترین درصد دابل هاپلوئیدی را دارند و محیط کشت کالوس زای N6 با غلظت ۰میلی گرم در لیتر(۳۰/۰۰) درصد دابل هاپلوئیدی پایینی دارد، یعنی بین غلظت های مختلف در محیط های کشت کالوس زایی اختلاف معنی دار وجود دارد.

کلمات کلیدی: برنج، کالوس، کشت بساک، هاپلوئید، دابل هاپلوئید، غلظت، کلشی سین

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No:104 pp: 29-39

Improvement of doublehaploids production with colchicines in rice anther culture media

By:

- *L. Khazaie, (Corresponding Author; Tel: 09111351395), M.Sc. Karaj Payam Noor University*
- *Gh. Bakhshi Khaniki, Professor of Payame Noor University of Tehran*
- *A.Ebadi, Scientific Staff of Researcher of Iran Rice Research Institute*
- *A. Joharali, Scientific Staff of Researcher of International Rice Research Institute*

Received: October 2009 **Accepted: July 2011**

A study was set up in the research station of rice research institute of iran (RRII) to rate plant double haploids anther culture-derived plant F1. Anther cultures of a genotype to put on two medium Chu, N6 were treated with or without (0,20,40,60 mg/l) colchicines for 7 days and then the anthers from culture media containing colchicines transfer to medium without colchicines. The effect of media, colchicines concentration and their intractions on callus iniation, regeneration and double haploidy, the compelet random factorial design with three replication was formed. The results indicated to be affected significantly between callus induction medium for four manners case evaluation (callus induction, green plants, total regeneration) but not to be between on callus induction media for double haploidy affected significantly. Also means comparison at P= 0/05 based on Duncan,s multiple range test, indicated culture media N6 (5/102) was considerably better for callus induction and for green plants, total regeneration and double haploidy. The most percentage of double haploids were in 60 mg/l colchicine concentration (68/19) that with other concentrations was doubling rate control 0 mg/l (31/98) affected significantly. Also callus induction media Chu with 60 mg/l concentration(69/17) and callus induction media N6 with 60 mg/l concentration (67/22) had the most double haploids. culture media N6 was the least with control 0 mg/l colchicines(30/00). In fact of to be between different concentration in callus induction media affect significantly.

key Words: Oryza sativa, Callus, Anther culture, haploid, double haploid, concentration, colchicine

مقدمه

برنج گیاهی بااهمیت در دنیا است و غلات غذای ثابت اولیه یا ثانویه بیش از نیمی از مردم جهان می باشد. بنابراین کوشش های زیادی برای اصلاح عملکرد برنج با استفاده از روشهای بیو تکنولوژی صوزت گرفته است و تولید هاپلویید از طریق کشت بساک یکی از راه حلها در برنامه های اصلاحی می باشد(۳۰). از زمانی که اولین برنج گیاه هاپلویید از طریق کشت بساک توسط نیزکی و اونو (۱۹۶۸) تولید شد، اصلاحگرها توجه خود را روی کشت بساک و کاربردشان در اصلاح نباتات متمرکز کردند(۳۱).

پایین بودن فراوانی تولید کالوس و جنین زایی کالوسها و متعاقب آن باززایی گیاه و نیز فراوانی گیاهچه های سبز و بالا بودن فراوانی گیاهچه های آلبینو از مسائل ومشکلات اصلی در کاربرد فن کشت بساک در برنامه های اصلاحی ارقام ایندیکا میباشد (۲). فاکتور های زیادی از جمله ژنوتیپ (۶،۱۶، ۱۷و۲۵) محیط کشت کالوس زایی (۱۰و۱۳)وضعیت فیزیولوژیکی گیاه بخشنده (۲۳و۲۹)پیش تیمار بساکها(۵،۱۰و۲۰) و مرحله نمو دانه گرده(۴) برروی کشت بساک تاثیر گذار می باشند.

تولید گیاهان هاپلویید ودوبرابر نمودن مجموعه کروموزومی آنها(ژنوم آنها)منجربه ایجاد گیاهان دابل هاپلوئید میگردد. این روش سریعترین روش برای دستیابی به لاین های صد در صد خالص(اینبرد)میباشد(۳۵). در مرحله ای از تشکیل جنین در غلات دوبله شدن کروموزوم ها ممکن است بصورت خود بخودی رخ دهد ولی عموما نرخ پایینی دارد (۱۵ و۱۹).

دوبرابر شدن خودبخودی کروموزوم ها در آزمایشگاه در چندین گونه برنج به وسیله نیزیکی و اونو در سال ۱۹۷۱ مشاهده شد.

روش دیگر با استفاده از تیمار های شیمیایی (کلشی سین و سایر ترکیبات)، گیاهان هاپلوئید دوبرابر می شوند (۱۹).

کلشی سین ،کروموزوم ها در مرحله متافاز نگهداری کرده و از آنافاز جلوگیری می کند(۲۴). و این ترکیب با جلوگیری از تشکیل دوک ومهاجرت قطبی کروموزوم ها مانع از تقسیم سلولهامیگردد(۲۶) . یکی از راههای تولید لاینهای دابل هاپلوئید تیمار بوته های هاپلویید ایجاد شده با کلشی سین و راه دیگر اضافه کردن کلشی سین به محیط کشت باززایی و القاء کالوس میباشد (۶).

در سال ۱۹۳۸ لوان تکنیک های کاربرد کلشی سین را با خیساندن ریشه پیازدر محلول کلشی سین آغاز نموده است. در این تحقیق بساک های بوته های F_1 حاصل از تلاقی دو رقم غریب در سپید رود رادر دو نوع محیط کشت Chu, N6 با و بدون کلشی سین در غلظت های (۰،۲۰،۴۰و۶۰ میلی گرم در لیتر) قرار داده و پس از ۷ روز به محیط بدون کلشی سین انتقال داده و سپس ازنظر دابل هاپلویید شدن در چهار تیمار مورد مطالعه قرار می گیرند. هدف از این تحقیق بهینه کردن غلظت و مدت زمان استفاده از کلشی سین در محیط کشت باززایی جهت بدست آوردن حداکثر گیاهان دابل هاپلویید در کشت بساک برنج می باشد.

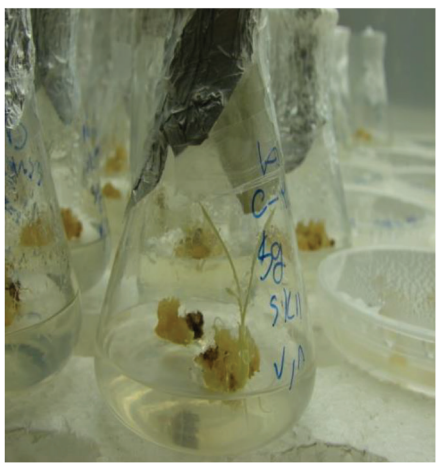
مواد و روشها

در این تحقیق از بوته های F_1 حاصل از تلاقی دو رقم غریب در سپیدرود استفاده شد. این تحقیق بصورت آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور محیط کشت در ۲ سطح (N6,Chu) و میزان تیمار کلشی سین در ۴ سطح (میزان ۰، ۲۰، ۴۰و۶۰ میلی گرم در لیتر) در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد. جمع آوری خوشه ها در مرحله بوتینگ و از هر بوته ۳-۴ پنجه اولیه که فاصله گوشوارک برگ پرچم تا برگ ماقبل خود حدود ۹-۵ سانتی متر بود، انتخاب گردیدند. ساقه های جمع آوری شده در آزمایشگاه شسته و با الکل اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی، در داخل فویل آلومینیومی پیچیده و در یخچال نگهداری شدند. استریل کردن اتاق کشت به وسیله لامپ ماوراء بنفش (UV) میکروب کش انجام شد. استریل کردن ظروف شیشه ای مانند پتری ها ، ارلن ها و .... ، فیلتر ، آب مقطر و همچنین استریل کردن محیط های کشت به وسیله اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد، اما برای استریل کردن محیط های کشت حاوی مالتوز از فیلتر استفاده شد. محیط های کشت کالوس زایی مورد استفاده در این تحقیق N6 (۷)و Chu (۸) است. محیط کشت باززایی مورد استفاده در این تحقیق محیط کشت N6 با ترکیب هورمونی ۱ میلی گرم در لیتر NAA ، 1 میلی گرم در لیتر کینتین و ۱ میلی گرم در لیتر BAP است و میزان ساکارز ۴۰ گرم در لیتر می باشد. محیط کشت ریشه زایی مورد استفاده در این تحقیق محیط کشت MS بدون هورمون است. بعد از پیش تیمار سرما ، قسمت هایی از خوشه ها که رنگ لمای گلچه ها سبز روشن بود و اندازه میله پرچم حدود ۳۰-۵۰ درصد اندازه طول گلچه بود ، انتخاب گردیدند. خوشه ها در زیر کابینت لامینار ایرفلو به وسیله یک پنس استریل در داخل ارلن استریل قرار گرفتند. سپس محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم (NACLO مایع سفید کننده تجاری) و ۲ قطره توین ۲۰ درون ارلن ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه خوشه ها در داخل محلول قرار گرفتند، خوشه ها سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند. خوشه های ضدعفونی شده در سطح یک پتری دیش استریل حاوی کاغذ صافی استریل به وسیله پنس استریل قرار گرفتند. سپس گلچه ها را با یک قیچی جراحی کوچک تیز استریل، درست زیر کیسه بساک ها قطع شدند. به وسیله پنس بساک ها بر روی محیط کشت پخش شدند. حدود ۵۰ بساک در هر پتری دیش پلاستیکی استریل یکبار مصرف به ابعاد ۵۵×۱۰ میلی متر که محتوی ۵ میلی لیتر محیط غذایی کالوس زا قرار گرفتند.

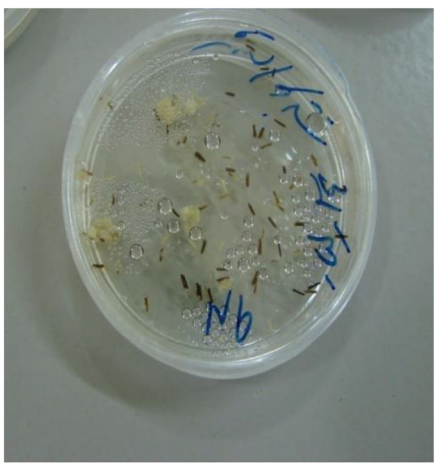
پتری دیش ها در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تحت شرایط تاریکی به مدت ۴ الی ۱۲ هفته برای محیط های بدون کلشی سین و ۷ روز برای محیط های حاوی کلشی سین برای القاء کالوس منتقل شدند. سپس بعد از ۷ روز بساک ها را از محیط حاوی کلشی سین به محیط بدون کلشی سین منتقل شدند. سه هفته بعد از کشت بساک ها، معمولا کالوس هایی به ضخامت ۲-۳ میلی متر به محیط باززایی انتقال می یابند . پتری های حاوی کالوس در انکوباتور با شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد و فتوپریود ۱۶/۸ (تاریکی/روشنایی) نگهداری شدند. گیاهچه های سبز تولید شده به لوله های آزمایش محتوی محیط کشت MS بدون هورمون برای ریشه زایی انتقال یافتند.گیاهچه هایی که ریشه های آنها در لوله های آزمایش به اندازه کافی رشد کرده بودند ، انتخاب و در داخل تشک تیره محتوی محلول یوشیدا (۳۴) قرار گرفتند گیاهچه های کشت شده در محلول یوشیدا برای ادامه رشد و توسعه ریشه ها به فیتوترون با شرایط ۹ ساعت روشنایی با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و ۱۵ ساعت تاریکی با دمای ۲۱ درجه سانتی گراد منتقل شدند. پس از دوهفته گیاهانی که دارای ریشه های قوی بودند به گلدان های حاوی خاک حاصلخیز و نرم انتقال یافتند و در گلخانه نگهداری شدند بعد از اینکه گیاهان به خوشه رفتندو تولید بذر نمودند از روی مورفولوژی خوشه و تشکیل و عدم تشکیل بذر گیاهچه های هاپلوئید ، دابل هاپلوئید و سطوح دیگر پلوئیدی تشخیص داده شده و تعداد آنها یادداشت گردیدو سپس درصد گیاهان دابل هاپلوئید محاسبه گردید.

نتایج

تجزیه واریانس برای پنج صفت مورد بررسی (درصد کالوس زایی، درصد گیاهان سبز، درصد گیاهان آلبینو، درصد باززایی کل و درصد دابل هاپلوئیدی) در جدول ۴-۱ نشان داده شده است که اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد در اثر محیط کشت بر روی ۴ صفت (درصد کالوس زایی، درصد گیاهان سبز، درصد گیاهان آلبینو، درصد باززایی کل) مشاهده شد، اما اختلاف معنی دار بین محیط کشت از نظرصفت دابل هاپلوئیدی وجود ندارد. همچنین بین غلظت های مختلف کلشی سین از نظر ۳ صفت مورد بررسی(درصد گیاهان سبز، درصد گیاهان آلبینو، درصد باززایی کل) اختلاف معنی دار وجود ندارد اما از نظر دو صفت مورد بررسی(درصد باززایی کل و درصد دابل هاپلوئیدی) اختلاف معنی دار وجود دارد، یعنی وابستگی



الف: باززایی گیاهچه سبز



ب: تشکیل کالوس در محیط کشت القایی

این صفات به غلظت های کلشی سین در محیط کشت های کالوس زایی را نشان می دهد. اثرمتقابل محیط کشت تولید کننده کالوس و کلشی سین از نظر پنج صفت مورد بررسی(درصد کالوس زایی، درصد گیاهان سبز، درصد گیاهان آلبینو، درصد باززایی کل و درصد دابل هاپلوئیدی) معنی دار نمی باشد و نشان دهنده این است که تغییرات این صفات در دو محیط برای غلظت های مختلف کلشی سین بطور موازی بوده است و با هم اثر متقابل نداشته اند که این موضوع با رسم نمودار برای پنج صفت بالا در دو محیط در مقابل غلظت های مختلف کلشی سین بوضوح قابل مشاهده است(نمودار ۴-۲،۴-۵، ۴-۸، ۴-۱۱و۴-۱۴).

درصد تشکیل کالوس

مقایسه میانگین محیط ها و غلظت های کلشی سین و اثرات متقابل آنها در نمودار های ۴-۱و ۴-۳ برای صفت درصد کالوس زایی نشان داده شده است. محیط N6 با درصد کالوس زایی ۵/۱۰۲ درصد دارای بیشترین درصد کالوس زایی بین دو محیط مورد بررسی می باشد.بعد از آن محیط Chu(۴/۶۳۰ درصد) در کلاس بعدی قرار می گیرد. مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان می دهد که محیط N6 در غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر(۵/۵۵۶ درصد) کلشی سین بیشترین کالوس زایی را بطور معنی دار داشت و محیط N6 در غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر (۵/۳۷۰ درصد) و محیط Chu با غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر (۵/۰۳۷ درصد) در کلاس بعدی قرار گرفتند.

درصد تولید گیاهان سبز

مقایسه میانگین محیط ها و غلظت های کلشی سین و اثرات متقابل آنها برای این صفت در نمودار های۴-۴ و ۴-۶ نشان داده شده است.در بین محیط های مورد بررسی، محیط Chu با ۱۷/۵۱۵ درصد تولید گیاه سبز، دارای بیشترین درصد تولید گیاه سبز می باشد.مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان می دهد که محیط کشت Chu در غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر کلشی سین بیشترین باززایی را دارد(۱۹/۰۶درصد) و دیگر غلظت های ۰، ۲۰و ۴۰ میلی گرم در لیتر کلشی سین در محیط Chu اختلاف معنی داری با این غلظت ندارند ولی با درصد تولید گیاه سبز در غلظت های مختلف کلشی سین در محیط N6 اختلاف معنی دارند.

درصد تولید گیاهان آلبینو

تولید گیاهان آلبینو یکی از معایب کشت بساک مطرح می باشد. در هر دو محیط کشت کالوس زایی تولید گیاه آلبینو بیشتر از گیاه سبز بود که این مطابق با نتایج سایر محققین می باشد(۶،۲، ۱۴، ۱۳ و ۱۱). مقایسه میانگین محیط ها ، غلظت های کلشی سین و اثرات متقابل آنها برای این صفت در نمودار های ۴-۷و ۴-۹ نشان می دهد که در بین محیط های مورد بررسی محیط Chu با تولید ۲۲/۱۸۷ درصد تولید گیاه آلبینو دارای بیشترین درصد تولید گیاه آلبینو بود. بعد از ان محیط N6 با ۱۶/۰۱۳درصد در کلاس بعدی قرار گرفتند. همچنین محیط کشت کالوس زایی Chu با غلظت ۶۰(۲۴/۹۶)و ۴۰(۲۳/۰۴) میلی گرم در لیتر بیشترین تولید گیاهان آلبینو را داشته اند . غلظت های ۲۰(۲۱/۶۳ درصد) و ۰(۲۱/۲۴ درصد) میلی گرم در لیتر محیط کشت کالوس زایی Chu و غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر محیط کشت کالوس زای N6 (۱۷/۸۸ درصد) در کلاس بعدی قرار می گیرند.

درصد باززایی کل

نتایج مقایسات میانگین محیط های کشت کالوس زایی و غلظت های کلشی سین و اثرات متقابل آنها برای این صفت در نمودار های ۴-۱۰، ۴-۱۲ نشان داده شده است. دربین محیط های کشت مورد بررسی ، محیط Chu با باززایی کل ۴۰/۲۳۲ درصد بیشترین درصد باززایی کل بود.

مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان می دهد که محیط کشت کالوس زایی Chu با غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر (۴۴/۰۴درصد) کلشی سین بیشترین درصد باززایی را بطور معنی دار دارد و غلظت های ۴۰ میلی گرم در لیتر (۴۱/۴۵درصد) و ۲۰میلی گرم در لیتر(۳۸/۲۸ درصد) و ۰ میلی گرم در لیتر(۳۷/۱۵ درصد) با غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر اختلاف معنی داری وجود ندارد. اما بین غلظت های مختلف کلشی سین در محیط های کشت کالوس زایی ,Chu N6 اختلاف معنی دار وجود دارد.

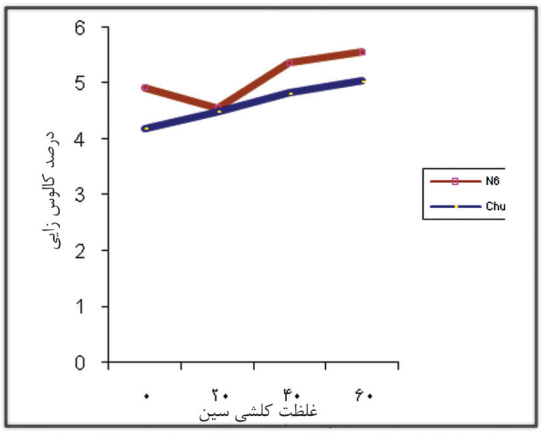
درصد دابل هاپلوئیدی

نتایج مقایسات میانگین محیط های کشت کالوس زایی ، غلظت های کلشی سین و اثرات متقابل برای این صفت درنمودار های ۴-۱۳، ۴-۱۵نشان داده شده است. نتایج مقایسات میانگین در نمودار نشان می دهد که محیط کشت کالوس زای Chu با غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر(۶۹/۱۷ درصد) و محیط کشت کالوس زایN6 با غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر (۶۷/۲۲ درصد) بیشترین درصد دابل هاپلوئیدی را دارند به ترتیب غلظت های ۴۰ میلی گرم در لیتر (۵۴/۲۲ درصد) کلشی سین در محیط کشت کالوس زای Chu و غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر کلشی سین در محیط کشت کالوس زای N6 (۵۱/۶۷ درصد) وغلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر کلشی سین در محیط کشت کالوس زای Chu (۴۰/۲۸درصد) وغلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر کلشی سین در محیط کشت کالوس زای N6 (۳۸/۳۳درصد) در کلاس های بعدی قرار دارند. محیط کشت کالوس زای N6 با غلظت ۰ میلی گرم در لیتر کلشی سین(۳۰/۰۰) درصد دابل هاپلوئیدی پایینی دارد، یعنی بین غلظت های مختلف در محیط های کشت کالوس زایی اختلاف معنی دار وجود دارد. میزان درصد دابل هاپلوئیدی در محیط کشت بدون کلشی سین نشان دهندهٔدرصد دابل هاپلوئیدی خودبخودی می باشد که بطور میانگین درصد دابل هاپلوئیدی خودبخودی در دو محیط ۳۱/۹۸ درصد بوده است که اعمال تیمار کلشی سین در محیط کشت مقدار دابل هاپلوئیدی را به ۶۸/۱۹ درصد در غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر کلشی سین رسانده است.

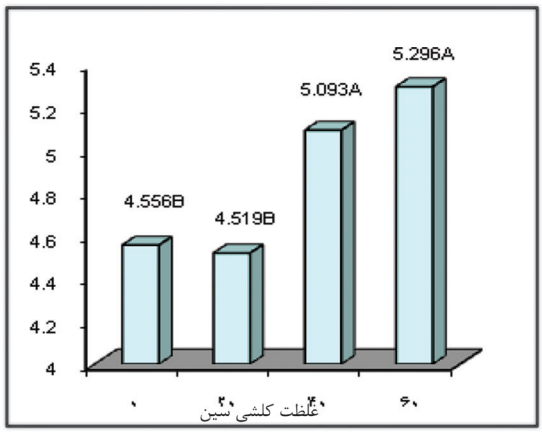
جدول ۴-۱- تجزیه واریانس صفات نرزایی (درصد کالوس زایی، درصد گیاهان سبز، درصد گیاهان آلبینو،درصد باززایی کل و درصد دابل هاپلوئیدی) در محیط های کشت کالوس زایی Chu,N6

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		کالوس زایی	گیاهان سبز	گیاهان آلبینو	باززایی کل	دابل هاپلوئیدی
محیط کشت	۱	۱/۳۳۸**	۳۴۰/۶۲۰**	۲۶۹/۶۳۵**	۱۳۱۶/۲۹۵**	۴۰/۷۴۰ns
کلشی سین	۳	۰/۹۰۷**	۳/۱۰۱ ns	۳/۱۲۵ns	۱۱/۲۵۸ns	۱۵۲۸/۷۵۶ **
محیط کشت × کلشی سین	۳	۰/۱۲۰ns	۳/۹۵۳ns	۱۰/۲۱۰ns	۲۶/۱۶۳ns	۱/۳۶۶ns
خطا	۱۶	۰/۰۶۰	۳/۷۷۲	۵/۴۸۱	۱۷/۸۲۵	۱۰۷/۴۹۹
ضریب تغییرات		۵/۴۰%	۱۴/۱۳%	۱۲/۰۹%	۱۲/۷۵%	۲۱/۵۵%

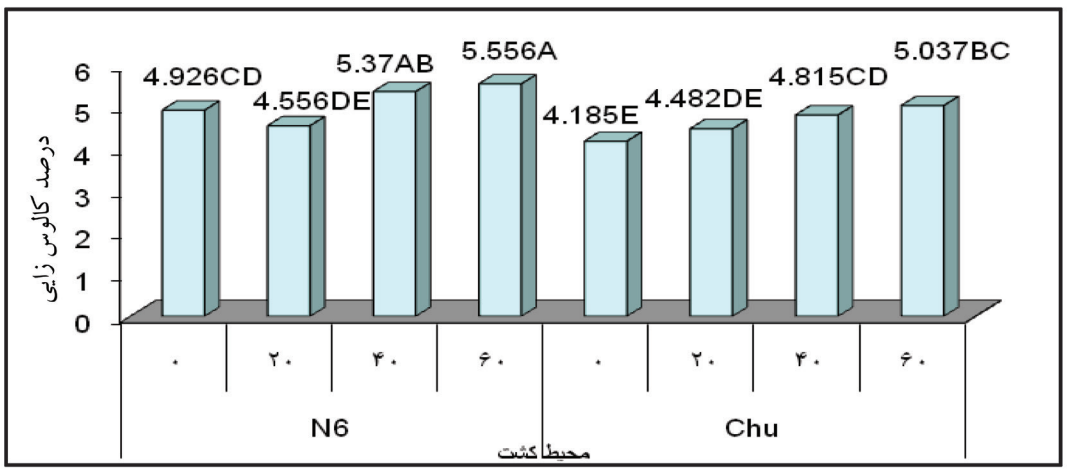
** و ns به ترتیب معنی دار در سطح ۰/۰۱ ، ۰/۰۵ و غیر معنی دار



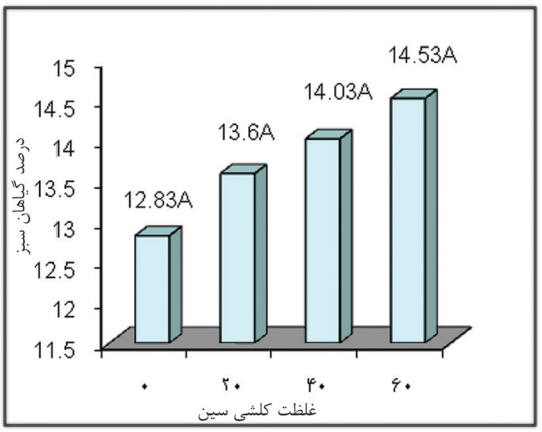
نمودار ۴-۱- مقایسه میانگین درصد کالوس زایی در غلظت های مختلف کلشی سین



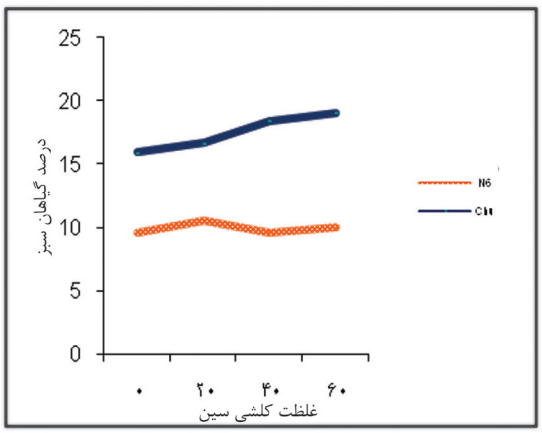
نمودار ۴-۲- نمودار اثر متقابل محیط کشت و غلظت های مختلف کلشی سین برای صفت کالوس زایی



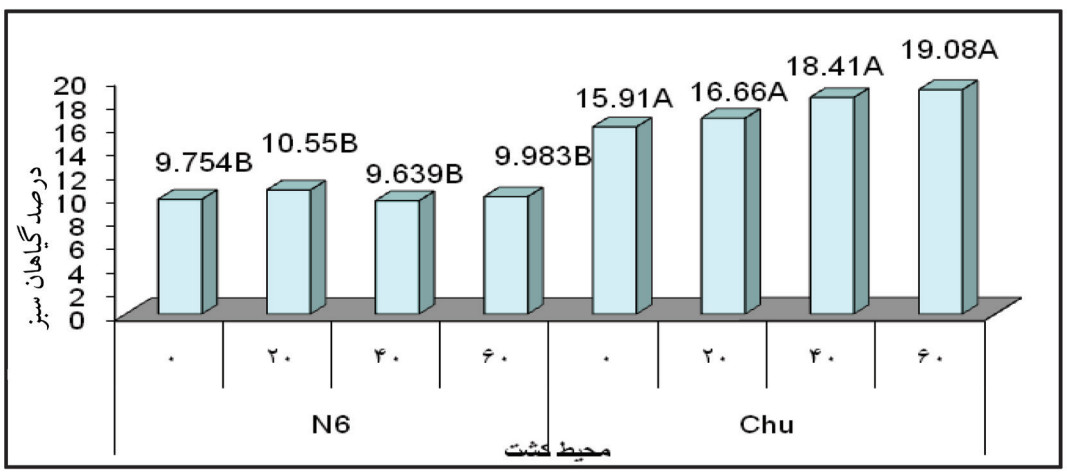
نمودار ۴-۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط کشت و غلظت های مختلف کلشی سین برای صفت کالوس زایی



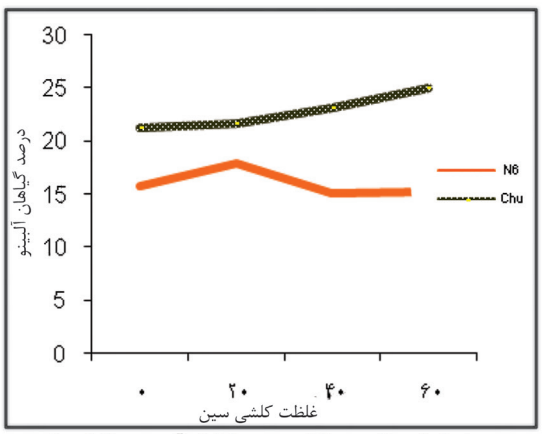
نمودار ۴-۴- مقایسه میانگین درصد گیاهان سبز در غلظت های مختلف کلشی سین



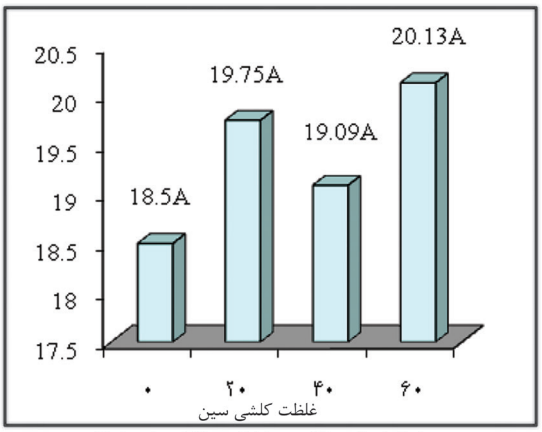
نمودار ۴-۵- اثر متقابل محیط کشت و غلظت های مختلف کلشی سین برای صفت گیاهان سبز



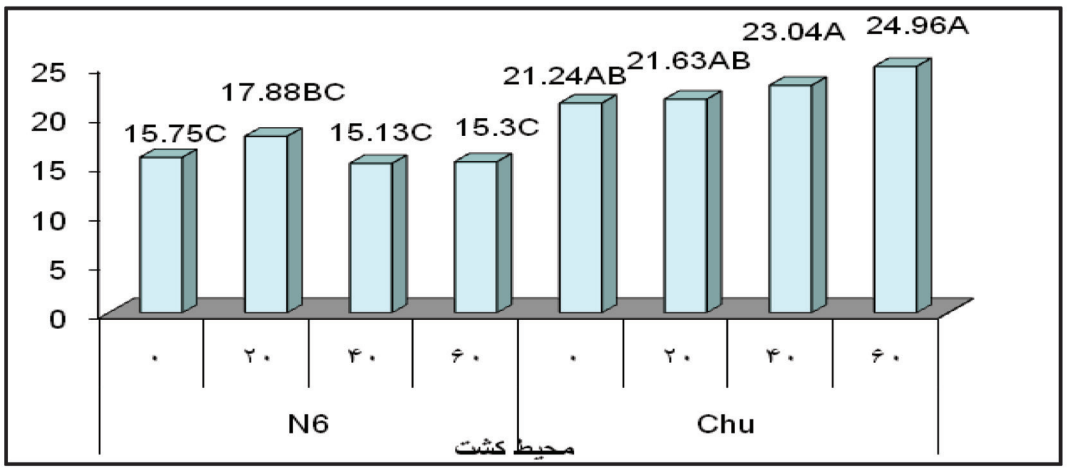
نمودار ۴- ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط کشت و غلظت های مختلف کلشی سین برای صفت گیاهان سبز



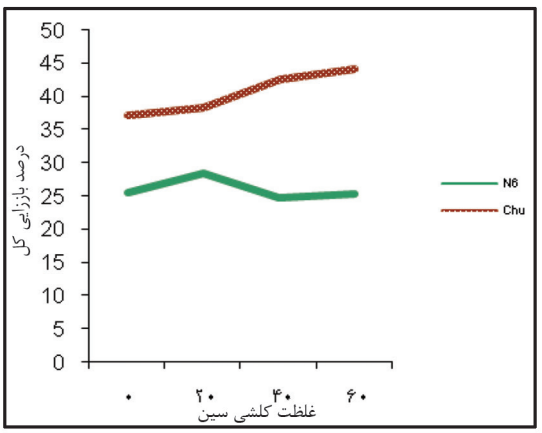
نمودار ۴-۷- مقایسه میانگین درصد گیاهان آلبینو در غلظت های مختلف کلشی سین



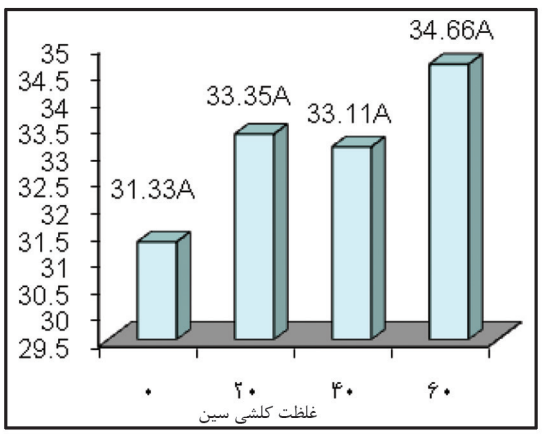
نمودار ۴-۸- اثر متقابل محیط کشت و غلظت های مختلف کلشی سین برای صفت گیاهان آلبینو



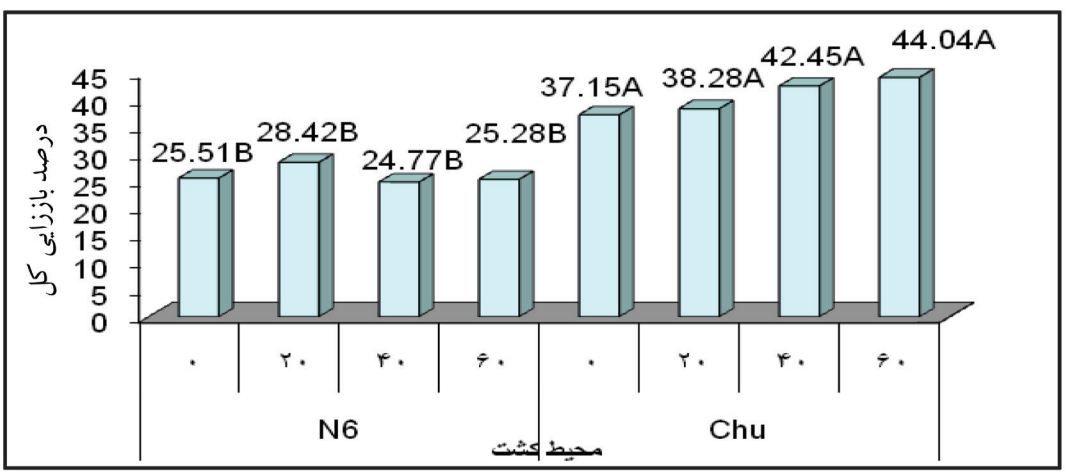
نمودار ۴-۹- مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط کشت و غلظت های مختلف کلشی سین برای صفت گیاهان آلبینو



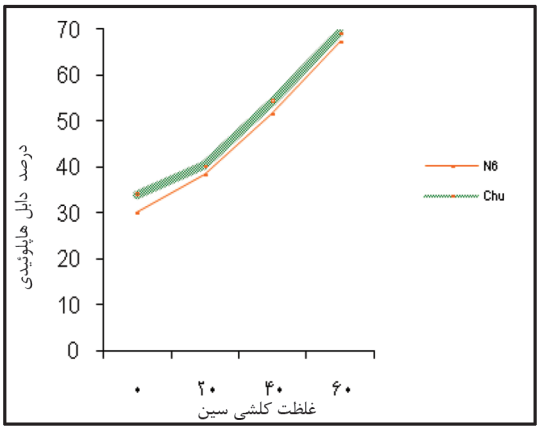
نمودار ۴-۱۰- مقایسه میانگین درصد باززایی کل در غلظت های مختلف کلشی سین



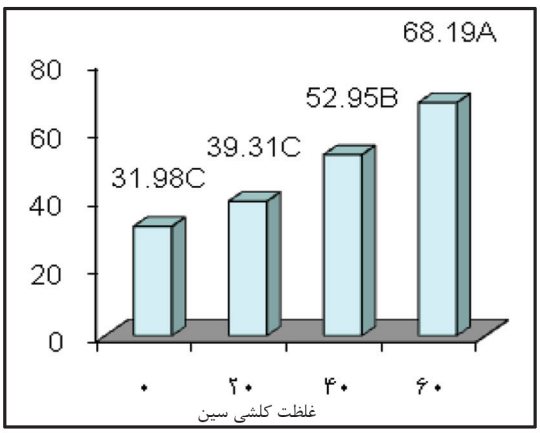
نمودار۴-۱۱- مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط کشت و غلظت های مختلف کلشی سین برای صفت باززایی کل



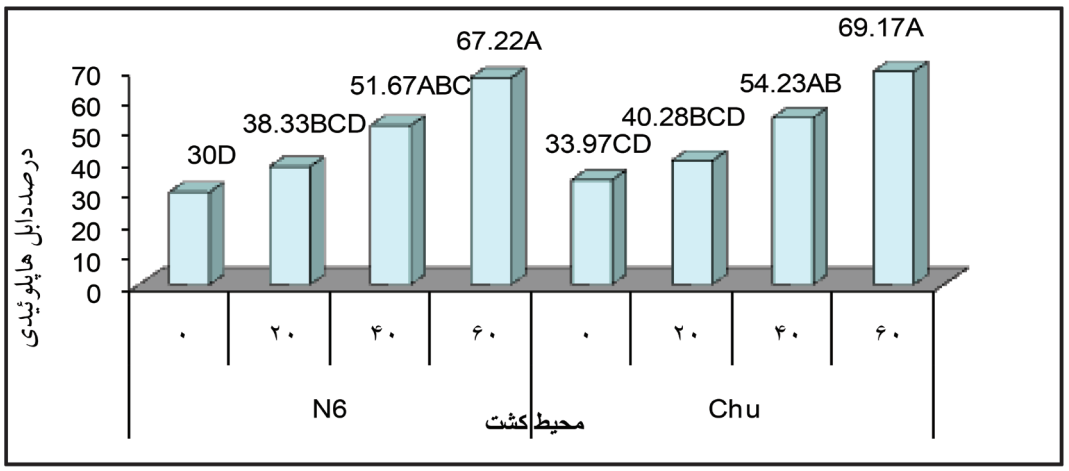
نمودار ۴-۱۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط کشت و غلظت های مختلف کلشی سین برای صفت باززایی کل



نمودار ۴-۱۳- مقایسه میانگین درصد دابل هاپلوئیدی در غلظت های مختلف کلشی سین



نمودار۴- ۱۴- نمودار اثر متقابل محیط کشت و غلظت های مختلف کلشی سین برای صفت دابل هاپلوئید



نمودار ۴-۱۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط کشت و غلظت های مختلف کلشی سین برای صفت دابل هاپلوئیدی

بحث

اثر محیط کشت

نتایج تجزیه واریانس جدول (۴-۱) براساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی نشان داد که اختلاف معنی داری بین محیط های کشت کالوس زایی برای چهار صفت مورد بررسی (درصد کالوس زایی، درصد گیاهان سبز، درصد گیاهان آلبینو ودرصد باززایی کل) وجود دارد اما بین محیط های کشت کالوس زایی برای صفت درصد دابل هاپلوئیدی اختلاف معنی داری وجود ندارد که نشان دهنده این است که بین این صفت و محیط های کشت کالوس زایی وابستگی وجود نداشته است. با توجه به نتایج به دست آمده هر چند که در محیط کشت N6 درصد کالوس بیشتری تولید شده است ولی بالا بودن درصد باززایی گیاه سبز در محیط Chu نشان دهنده بالا بودن تعداد کالوس های جنین زا در این محیط می باشد. بعبارت دیگر بساک هایی که در داخل این محیط قرار گرفته اند هرچند کالوس کمتری تولید کرده اند ولی تعداد بیشتری از این کالوس های تولید شده جنین زا بوده اند. با مقایسه ترکیبات پایه استفاده شده در این محیط مشخص می شود که در محیط Chu ماده KNO3 بیشتر از محیط N6 بوده و ماده (NH4)2SO4 بالعکس در محیط N6 بیشتر بود. به عبارتی بالاتر بودن یون نیترات در محیط باعث افزایش پاسخ به کشت بساک گردیده است، که این موضوع در تعدادی از تحقیقات قبلی نیز به اثبات رسیده است(۳۵، ۱۰و ۹). تفاوت دیگر دو محیط کشت در نوع هورمون های استفاده شده در آنها می باشد، در محیط کشت N6 تنها از هورمون 2-4,D که یک اکسین مصنوعی است استفاده شد ولی در محیط کشت Chu علاوه بر 2-4,D از یک سیتوکینین طبیعی به نام زآتین نیز استفاده شده است. هورمون 2-4,D بعنوان یک اکسین بیشتر در ایجاد کالوس موثر می باشد و طبق تحقیقات گذشته و اظهار نظر اکثر محققین استفاده از اکسین به تنهایی باعث افزایش کالوس می شود ولی برای تولید کالوس های جنین زا و به تبع آن افزایش باززایی گیاهچه سبز وجود یک هورمون سیتوکنینین در کنار هورمون اکسین ضروری بنظر می رسد(۳، ۳۲). در این تحقیق نیز هرچند میزان کالوس در محیط کشت N6 بیشتر بود ولی کالوس جنین زا که هدف اصلی کشت بساک می باشد در محیط کشت Chu بیشتر بود که احتمالا به دلیل وجود هورمون زآتین در این محیط می باشد.میزان و نوع کربن یکی از عوامل تاثیر گذار بر تولید کالوس

و باززایی گیاهچه سبز در کشت بساک غلات و همچنین برنج می باشد(۲۷، ۱۸). بطوریکه اغلب محققین براین عقیده اند که استفاده از مالتوز به عنوان منبع کربن به جای ساکارز باعث افزایش کالوس جنین زا در کشت بساک بیشتر گونه های گیاهی و از جمله غلات می شود (۳۲، ۳۳،۵، ۱۸و ۱۰). در این تحقیق حاضر نیز در محیط کشت Chu ترکیبی از کربوهیدرات ها شامل (مالتوز، سوربیتول و ساکارز) استفاده شده است که باعث افزایش درصد باززایی گیاهچه سبز شده است که این موضوع را لینتینی و همکاران در سال ۱۹۹۵ با تحقیق بر روی ۲۳ واریته ایندیکای برنج نیز اثبات کردند. آنها در تحقیق خود وقتی از میزان بیشتری مالتوز استفاده کردند درصد تولید گیاهچه سبز از ۰/۶ به ۱ درصد افزایش یافت. در مورد افزایش نرزایی در هنگامی که به جای ساکارز از مالتوز استفاده می شود دلائل متفاوتی ذکر شده است. بعضی از محققین علت آن را هیدرولیز آرامتر مالتوز نسبت به ساکارز دانسته و عقیده دارند که تجمع گلوکز اثر بازدارندگی بر روی نرزایی داردو همچنین میکروسپور ها به فرکتوز حاصل از تجزیه ساکارز حساسیت دارند. مالتوز به تدریج گلوکز آزاد می کند، لذا بافت های کشت شده طی مدت زمان طولانی از گلوکز استفاده خواهند نمود و به این طریق از تجمع گلوکز و اثر بازدارندگی آن روی رشد جلوگیری می شود. علت دیگر تثبیت فشار اسمزی محیط کشت به وسیله مالتوز است، در حالیکه ساکارز میکروسپور ها را پلاسمولیز می کند(۱۸). در دو محیط کشت مورد بررسی درصد گیاهان آلبینو بیشتر از درصد باززایی گیاهان سبز می باشد که این یکی از صفات نامطلوب کشت بساک می باشد. آسادوزمان و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کرده اند که باززایی گیاه آلبینو به طور ژنتیکی کنترل می شود و در کشت بساک برنج فراوانی گیاه آلبینو زیاد می باشد. در گزارشات دیگر کشت بساک نیز به باززایی زیاد گیاهان آلبینو اشاره شده است(۱۴،۱۳، ۱۱ و ۶).

اثر غلظت های کلشی سین

نتایج تجزیه واریانس جدول (۴-۱) نشان می دهد که اختلاف معنی داری بین غلظت های کلشی سین در محیط های کشت کالوس زایی برای دو صفت مورد بررسی (درصد کالوس زایی ودرصد دابل هاپلوئیدی) در سطح ۱ درصد معنی دار بود، اما بر روی صفات(درصد باززایی گیاهان سبر، درصد گیاهان آلبینو و درصد باززایی کل) معنی دار نمی باشد که این نشان دهنده وابستگی این صفات (کالوس زایی و دابل هاپلوئیدی) به غلظت های کلشی سین در محیط های کشت کالوس زایی می باشد. محققین معتقدند کشت بساک یک روش انتخابی برای تولید دابل هاپلوئید ها در گیاهان زراعی است(۱۲) و گیاهان هاپلوئید به دو روش خودبخودی و القایی می توانند دیپلوئید شوند. مجموعه های کروموزومی هاپلوئید در گیاهان در شرایط محیط کشت می توانند بطور خودبخودی دوبرابر شوند با این حال میزان دو برابر شدن در آنها متفاوت است. روش دیگر برای دو برابر کردن کروموزوم ها روش القایی با استفاده از کلشی سین و ترکیبات دیگر است. در بررسی گندم در محیط کشت القایی با ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کلشی سین به مدت ۱-۳ روز تعداد دابل هاپلوئید ها به میزان زیادی افزایش یافت(۲۴). کاربرد کلشی سین به طور موفقیت آمیز در طی ساعات اولیه کشت بساک و میکروسپور، باعث افزایش دابل هاپلوئیدی در گونه های مختلف گندم ، ذرت، برنج و... می شود(۲۸).

اما با کشت بساک های گیاه برنج بر روی محیط دارای ۲۵۰- ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر کلشی سین به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت و سپس انتقال آنها به محیط کشت فاقد کلشی سین میزان گیاهان سبز دابل هاپلوئید نسبت به شاهد به میزان ۱/۵ تا ۲/۵ برابر افزایش یافت. افزودن کلشی سین به محیط کشت نه تنها اثر منفی بروی پاسخ به کشت بساک نداشت ، بلکه در بعضی از غلظت ها درصد کالوس زایی و همچنین باززایی گیاهچه سبز را نیز افزایش داد که این با تحقیقاتی که این موضوع را در مقاله تحقیقی خود عنوان کرده بودند، مطابقت داشت. از طرفی افزودن کلشی سین به محیط کشت باعث افزایش میزان دابل هاپلوئیدی گردید بطوریکه در غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر بیشترین میزان دابل هاپلوئیدی بدست آمد که با بقیه غلظت ها و همچنین میزان دابل هاپلوئیدی شاهد (بدون کلشی سین) تفاوت معنی دار داشت.

در جدول ۴-۳ نیز افزودن کلشی سین به محیط کشت کالوس زایی باعث کاهش کالوس های جنین زا ، باززایی گیاه سبز در مقایسه با تیمار شاهد شده است، اما درصد دابل هاپلوئیدی افزایش داشته است.

اثر متقابل محیط کشت کالوس زایی و غلظت های کلشی سین

نتایج تجزیه واریانس جدول (۴-۱) نشان می دهد که اختلاف معنی داری بین اثر متقابل محیط کشت کالوس زایی و غلظت های کلشی سین برای ۵ صفت مورد بررسی وجود ندارد. اما در محیط های کشت کالوس زایی اختلاف معنی داری در کلیه صفات مورد بررسی وجود دارد یعنی بیشترین درصد کالوس زایی مربوط به محیط N6 می باشد و بیشترین درصد گیاهان سبز، گیاهان آلبینو و باززایی کل در محیط Chu می باشد ، که این رابطه نیز توسط داتا، راینو زاپاتا، چو نیز گزارش شده است. همچنین اثر غلظت های کلشی سین در محیط های کشت کالوس زایی بر روی چهار صفت مورد بررسی (کالوس زایی، گیاهان سبز، گیاهان آلبینوو باززایی کل) اثر منفی نداشته است و در بعضی موارد باعث بهبود این صفات شده است، همچنین باعث افزایش فراوانی دابل هاپلوئیدی می گردد که به این موضوع در تحقیقات سایرین نیز اشاره شده است(۱، ۲۱).

بنابراین محیط کشت Chu با ۶۰ میلی گرم در لیتر بیشترین کالوس زایی، گیاهان سبز، گیاهان آلبینو، باززایی کل و دابل هاپلوئیدی را داشته است. بنابراین بطور کلی می توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت کلشی سین در محیط کشت کالوس زای Chu بر میزان ۵ صفت مورد بررسی (کالوس زایی، گیاهان سبز، گیاهان آلبینو، باززایی کل و دابل هاپلوئیدی) تولیدی افزوده شده اما در مقابل با افزایش غلظت کلشی سین در محیط کشت کالوس زای N6 باعث افزایش تولید (کالوس زایی و دابل هاپلوئیدی) شده است ، اما سه صفت دیگر (گیاهان سبز ، گیاهان آلبینو و باززایی کل) کاهش یافته است. از طرفی تعیین غلظت کلشی سین به نوع رقم مورد استفاده و حتی نوع محیط کشت نیز بستگی دارد.

منابع مورد استفاده

1. Alemanno, L. and Guiderdoni E. 2004. Increased doubled haploid plant regeneration from rice (Oryza sativa L.) anthers cultured on colchicine-supplemented media Plant cell reports.13(8): 432-436.
2. Asaduzzman, m., Bari, M. A., Rahman, M. H. and Rahman,M. 2003. In vitro plant regeneration through anther culture of rice varieties.Biological sciences.Vol 3.N 2.PP 167-171.
3. Ball, S.T., Zhou. H, and Konzak, C.F.1993. Influence of 2,4-D,IAA and duration of callus induction in anther cultures of spreaing wheat.Plant Sci.,90:195-200.
4. Bajaj, Y.P.S.1991.Biotechnologh in agriculture and forestry,14,Rice Springer-Verlag.Berlin heidelderg.
5. Bhojwani, S.S. and Razdam, W.K. 1996. Plant tissue culture:Theory and practice,A Revised Edition. Elsevier,Amsterdam.
6. Bishnoi , U.J., Jain, R.K., Rohilla, J.S. and Chowdhury, J.B. 2000. High frequency anderogenesis in India *basmati rice hybrids using liquid culture media.Euphytica. 114(2): 93-101.
7. Chu, C. C. 1982. Anther culture of rice and its significant in distant hybridization. In: Rice Tissue Culture Planing conf., :47-53.
8. Chu, C. C., Wang, C. C., Sun, C. S. 1978. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: Proc. Symp. Plant tissue culture, Science Oress, Peking.,: 45-50.
9. Chu, C. C., Wang, C. C., Sun, C. S., Hsu, C., Yin, K. C., Chu, C. Y., Bi, F. Y. 1975. establishment of an efficient medium for anther culture of rice through
10. Datta, S. K. 2005. Anderogenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. Current Science., 89(11): 1870-1878.
11. Faraque, M. O., Farzana, T., Seraj, Z. I., Sarker, R. H. and Khatun, A. A. 1998. Variations in green plant regeneration response from anthers of indica rice and their hybrids with japonica cv. Taipei 309. Plant cell, Tissue and organ culture. 54: 191-195.
12. Forester. B. P., Heberle-bors, E., Kasha, K. J. and Touraev, A. 2007. The resurgence of haploids in higher plants.plant science. 12(8): 368-375.
13. Gioi, T. D. and Thuan, V. d. 2002. Effect of different media and genotypes on anther culture efficiency of F1 plants derived from crosses between IR64 and new plant type rice cultivars. Omon rice. 10: 107-109.
14. Gioi, T.D. and Thuan, V. D.2004. Anther culture from crosses between IR64 and new plant type rice cultivars. Omon rice. 12: 27-32.
15. Hansen, N. and Anderson. B. 1996. Invitro chromosome doubling potential of colchicines,oryzalin ,trifluralin and AMP in Brassica napus microspore culture. Euphytica. 88: 159-164.
16. Hassawi, D. S. 2004. Evaluation of Jordanian wheat and barley genotypes for anther culture response. Food, Agriculture and environment. 2(1): 193-197.
17. He, T., Yang, Y., Tu, S. B., Yu, M. Q. and Li, X.F. 2006. selection of enterspecific hybrids for anther culture of indica rice. Plant cell, Tissue and Organ culture. 86: 271-277.
18. Last, D.I. and Brettel. 1990. Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. Plant cell Rep., 9:14-19.
19. Mohan jain, S. 1996. In vitro haploid production in higher plants. 1: 319-334.
20. Moraes, A. P., Bonades- Zanettini, M. H. Callegavi-Jacques, S. M. and Kaltchuk-santos, E. 2004. effect of temperature shock on soybean microspore embryogenesis. ISSN 1516-8913. Printed in Brazil., 47(4): 537-544.
21. Navarro-alvarez, N., Baenzigar, P. S., Eskridge, K. m., Shelton, S. D., Gustafson, V. D. and Hugo, M. 1994. Effect of sugars in wheat anther culture media. Plant Breeding, 112: 53-62.
22. Niizeki, H. and Oono, K. 1968. Induction of haploid rice plant from anthers culture, Proc.Japan, Acad., 44: 554-557.
23. Raina, S. K. and Zapata, F. J. 1997. Enhanced anther culture efficiency of indica rice(*Oryzae sativa L.)*through modification of anther culture media. Plant breeding. 116: 305-315.
24. Redha, A., Islam, S.M.S., Buter, B., Stamp, P. and Schmid, J. E. 2000. The improvement in regenerated doubled haploids from anther culture of wheat by anther transfer.plant cell. 63(3): 167-172.
25. Roy, B. and Mandal, B. 2005. Anther culture response in indica rice and variations in major agronomic characters among the androclones of a scented cultivar, Karnal local. African Journal of Bio., 4(3): 235-240.
26. Saisingtong, S., Schmid, J. E., Stamp, P. and Buter, B.1996. Colchicine-mediated choromosome doubling during anther culture of maize.TAG Theoretical and applied genetics. 92 (8): 1017-1023.
27. Shahnavaz, S. h. and Bari, M. A. 2004. Effect of concentration of sacarose on the frequency of callus induction and plant regeneration hn anther culture of rice(*Oryzae sativa L.)*. Plant tissue and organ culture. 14(1): 37-43.
28. Soriano, M., Cistue, L., Valles, M. P. and Castillo, A. M. 2007. Effect of colchicines on anther and microspore culture of bread wheat. amcast@eead.csic.es

29. Sun, Z. X., Si, H. M., Zahan, X. Y. and Chen, S. H. 1992. The effect of thermo-photoperiod of donor plant growth on anther culture of indica rice. In: C.B.Y.U.(Ed), Biotecnology on agriculture. Proceeding, of the first asian pacific conference on agricultural biotechnology, Bijing China, 20-24 Aggus 1992. Current plant science and biotechnology on agriculture., 15: 361-364.
30. Tersi, M., Xynias, I.N., Goli-Vavdinoudi, E. and Roupakias, D. G. 2006. Anther culture response of f1 durom × bread wheat hybrids after colchicine application .plant breeding. 125(5): 457-460.
31. Thuan, O. T., Thuan, V. D. and Bong, B. B. 2001. Study on anther culture of f1 plants from crosses between aromatic and improved reice cultivars. Omonric. 9: 41-45.
32. Trejo-Tapia, G., Amata, U. M. Morales, G. S., Sanches, A. D. J., Bonfil, B. M., Rodriguez-Monroy, M. and Jimenez-Aparicio, A. 2002. The effect of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice. Plant cell, Tissue and organ cultures. 71: 41-46.
33. Xie, J. H., Gao, M., Sheng, X., Shen, Y. and Liang, Z. 1995. Improved isolated microspore culture efficiency in medium with maltose and optimized growth regulator combination in japonica rice(*Oryzae sativa)*. Plant cell Tissue and organ culture. 42: 245-250.
34. Yoshida, S., Forno, D., Cock, J. H. and Gornez, K. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. The International Rice Rresearch Institue, Philippines.
35. Zapata, F. J. 1984. Tissue culture and its application in rice improvement. in proceedingof the ASEAN-EEC seminar on Biothecnology.singapore: 113-114.
36. Zapata, F. J. 1985. Rice Anther Culture at IRRI, In Proceeding of the Inter-Center Seminar on International Agriculture Research Centers & Biothechnology. Int. Rice Res. Inst., College, Philippines.