شماره ۹۴، بهار ۱۳۹۱

نشریه زراعت

(پژوهش و سازندگی)

اثرات پیش تیمار سرمایی و محیط کشت بر کارایی کشت بساک برنج

• **علی اکبر عبادی** (نویسنده مسئول)
عضوهیات علمی موسسه تحقیقات برنج کشور
• **آذرخش ترابی جفرودی**
کارمند سازمان جهاد کشاورزی گیلان
• **حمید شفیعی ثابت**
کارشناس موسسه تحقیقات برنج کشور
• **خدیجه علیزاده**
دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه زابل
تاریخ‌دریافت: شهریور ماه ۱۳۸۶ تاریخ‌پذیرش: مرداد ماه ۱۳۸۹
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۱۱۳۸۴۸۲۳
Email: ebady_al@yahoo.com

چکیده

اثر مدت زمان پیش تیمار سرمایی (۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ روز در دمای ۸ درجه سانتی گراد) و دو محیط کشت مختلف (N۶ و Chu) بر کالوس‌زایی و باززایی گیاهچه سبز در کشت بساک اولین رقم هیبرید ایران (بهار۱) بررسی گردید. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. بر اساس نتایج این تحقیق درصد تولید کالوس در محیط N۶ بطور معنی داری بالاتر از محیط Chu بود ولی درصد باززایی گیاهچه سبز در محیط کشت Chu از محیط کشت N۶ بطور معنی داری بیشتر بود. به عبارت دیگر کالوس‌های جنین‌زای بیشتری در محیط کشت Chu در مقایسه با محیط کشت N۶ تشکیل گردید. نتایج این آزمایش نشان می دهند که پیش تیمار سرمایی برای کالوس‌زایی از بساک‌های برنج هیبرید ضروری است. افزایش مدت زمان پیش تیمار سرمایی منتج به تولید کالوس بیشتری می‌شود اما درصد گیاهچه سبز کاهش می یابد بطوری که بهترین مدت زمان پیش تیمار سرمایی برای تولید گیاهچه سبز ۸ تا ۱۰ روز در دمای ۸ درجه سانتی گراد می‌باشد. بنابراین بهترین شرایط برای کشت بساک در برنج هیبرید بهار ۱ استفاده از محیط کشت Chu با مدت زمان ۸ تا ۱۰ روز پیش تیمار سرمایی خوشه ها می‌باشد.

کلمات کلیدی: برنج، کشت بساک، پیش تیمار سرمایی و کالوس‌زایی

www.SID.ir

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No:94 pp: 7-15

The effects of cold pre-treatment and induction medium on anther culture efficiency of rice

By: Ali Akbar Ebadi (Corresponding Author; Tel: +989111384823) Researcher of Rice Research Institute of Iran (RRII), Azarakhsh Torabi Jafrodi- Staff of Jihad-Agriculture of Gilan, Hamid Shafie Sabet- Master of Rice Research Institute of Iran (RRII), Khadije Alizadeh- Student of Zabol University

The effects of cold pre-treatment duration (8, 10, 12 & 14 days at 8^{oC}) and different induction media (N6 and Chu) were studied on callus induction and plant regeneration of the first Iranian hybrid rice "Bahar1" anther culture. The experiment was performed in randomized complete design with three replications. Percentage of callus induction in N6 medium was higher than Chu medium, but the percentage of green plant regeneration in Chu media was significantly higher than N6 medium. In the other words embryogenic callus in chu medium was more than N6 medium. The results showed that a cold pre-treatment was essential for the induction of callus from anthers. Increasing the duration of cold pre-treatment resulted in more callus production but green plant regeneration decreased. The best duration of cold pre-treatment for percentage of green plant regeneration was 8 to 10 days at 8^{oC}. Thus the best conditions to anther culture of hybrid rice was using of chu medium with 8 to 10 days cold pre-treatment.

Key words: Rice, Anther culture, Cold pre-treatment and Callus induction

مقدمه

برنج یکی از مهمترین گیاهان زراعی دنیا می‌باشد. این غله دومین غذای اصلی نیمی از مردم دنیا است. کوشش های قابل توجهی برای افزایش تولید برنج از طریق اصلاح ارقام پر محصول با روش های کلاسیک و یا با کمترین ابزارهای بیوتکنولوژی و کشت بافت در دنیا صورت گرفته است(۱۳). کشت بساک یکی از مهم ترین روش های کشت بافت در اصلاح برنج می‌باشد. بطوری که تعداد زیادی واریته‌های پر محصول در دنیا از طریق این تکنیک طی سالیان اخیر معرفی شده است (۲۰). تولید گیاهان هاپلوئید دارای فواید زیادی از قبیل: کوتاه کردن دوره اصلاحی با تثبیت سریع هموزیگوسیتی(خلوص)- افزایش کارایی انتخاب – افزایش تغییرات ژنتیکی از طریق تولید تنوع گامتی و ظهور سریع تر ژن های مغلوب می‌باشد (۳۲). هر چند که این روش دارای مشکلاتی از قبیل وابستگی شدید ژنتیکی بوده و عوامل مختلفی از جمله ژنوتیپ گیاه (۱۷)، شرایط رشد گیاهان دهنده بساک (۳)، مرحله تکامل میکروسپورها (۸)، شوک حرارتی (۱۴، ۲۸) و محیط کشت (۷ ، ۳۲) بر روی کارآیی کشت بساک تاثیر گذار می‌باشند.

شوک حرارتی و نوع محیط کشت یکی از فاکتورهای کلیدی مؤثر در میزان القای کالوس و تولید گیاهچه‌های سبز در برنج می‌باشد (۳۱). شوک حرارتی به عنوان یک فاکتور حیاتی جهت القاء تقسیم میکروسپورهای برنج و بنابراین تشکیل کالوس گزارش شده است (۱۴). مهمترین پیش تیمار مورد استفاده برای آندروژنز (نرزایی) در برنج شوک حرارتی بوده و لیکن دما و مدت زمان آن متفاوت می‌باشد (۱۱، ۱۲). Matsushima و همکاران (۱۸) گزارش کردند که پیش تیمار سرمایی به مدت ۳۰-۱۰ روز در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد برای القاء تقسیمات اسپروفیتیک در میکروسپورها ضروری می‌باشد. Ogawa و همکاران (۲۳) مشاهده کردند که بهترین پیش تیمار سرمایی برای واریته ایندیکا IR۲۴، ۲۸ روز در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بود. Gupta و Borthakur (۱۰) پیش تیمار سرمایی به مدت ۱۱ روز در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد را برای واریته ایندیکا Khonorullo مناسب تشخیص دادند. پیش تیمار سرمایی با مدت زمان طولانی باعث افزایش تولید گیاهان آلبینو و کاهش تولید گیاهچه سبز خواهد شد. بطوری که Pande (۲۴) نشان داد که بهترین پیش تیمار سرمایی ۱۰ روز در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد برای واریته IR۴۳ می‌باشد و پیش تیمار سرمایی بالاتر از ۱۱ روز باعث افزایش تولید گیاهچه های آلبینو شد. Reddy و همکاران(۲۷) گزارش کردند که یک شوک کوتاه (۱۰ دقیقه‌ای) حرارتی با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قبل از پیش تیمار سرمایی باعث افزایش کالوس‌زایی می‌شود ولی بر روی تولید گیاهچه سبز تاثیر معکوس دارد. مواد غذایی موجود در محیط کشت نه تنها مواد مورد نیاز برای رشد میکروسپورها را فراهم می کند بلکه بر روی تغییر رشد آنها به سمت تولید کالوس و جنین نیز اثر مستقیم دارد (۱۴). دو محیط پایه اصلی معرفی شده برای کشت بساک و میکروسپور محیط کشت های N۶ و MS می‌باشد (۴ ، ۲۱)، که در اغلب گزارشات و تحقیقات از این دو نوع محیط کشت با یکسری تغییرات استفاده می‌شود و محیط کشت N۶ بهترین محیط کشت برای واریته‌های ژاپونیکا معرفی شده است (۲۶). با مقایسه ۸ واریته ایندیکا بر روی محیط کشت های N۶ و He۲ مشخص شد که محیط He۲ بهتر از محیط N۶ بود و میزان یون NH^{+4} در مقایسه با سایر منابع نیتروژنی نظیر نیترات مناسب‌تر است (۲۷). Bishnoi و همکاران (۲) با مقایسه سه نوع محیط کشت (N۶M HeH ,H۵M, RZM) بر روی رقم ایندیکای با سماتی و نسل های F۱ و F۲ حاصل از تلاقی با دیگر ارقام ایندیکا نشان دادند که RZM بهترین محیط برای تولید کالوس بود. همچنین بوته‌های نسل F۲ نسبت به والدین و نسل F۱ پاسخ بهتری به کشت بساک نشان دادند. Raina و Zapata (۲۶) با بررسی چهار فقره (هیبرید) F۱ حاصل تلاقی دو رقم ایندیکا بر روی محیط های کشت N۶, MSN, SK۱ و RZ به این نتیجه رسیدند که فرم نیترات در داخل محیط کشت بر ای ارقام ایندیکا مناسب تر از فرم آمونیوم می‌باشد.هدف از این تحقیق تعیین محیط کشت مطلوب و زمان مناسب پیش تیمار سرمایی برای کشت بساک برنج در هیبرید معرفی شده توسط مؤسسه تحقیقات برنج کشور بنام بهار ۱ می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش ها

این آزمایش در طی سال ۱۳۸۵ در بخش تحقیقات اصلاح و تهیه بذر مؤسسه تحقیقات برنج کشور واقع در شهرستان رشت اجرا گردید. بذور هیبرید بهار ۱ (حاصل تلاقی بین دو لاین IR۴۲۶۸۶R و IR۵۸۰۲۵B به ترتیب به عنوان والد پدری و مادری) در ده تاریخ کاشت به فاصله ۵ روز پس از جوانه دار کردن در درون پتری دیش های حاوی کاغذ صافی در داخل ژرمیناتور، ابتدا در خزانه پاشیده شده و وقتی که سن نشاء ها به ۲۱ روز رسید به زمین اصلی انتقال یافتند و عملیات داشت بر اساس روش معمول انجام گرفت و هر صبح خوشه های برنج در طی مرحله آبستنی زمانیکه فاصله گوشوارک برگ پرچم با برگ قبلی بین ۵ تا ۹ سانتیمتر بود (میکروسپورها در این مرحله بین اواسط تا اواخر تک هسته ای بودند) از پنجه های اصلی برداشت شدند. خوشه ها پس از انتقال به آزمایشگاه توسط آب شسته شده و بعد از ضد عفونی با الکل ۷۰ درصد داخل دستمال کاغذی مرطوب و فویل آلومینیومی پیچیده شدند. سپس تحت پیش تیمارهای سرمای (۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶ روز) در دمای ثابت ۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

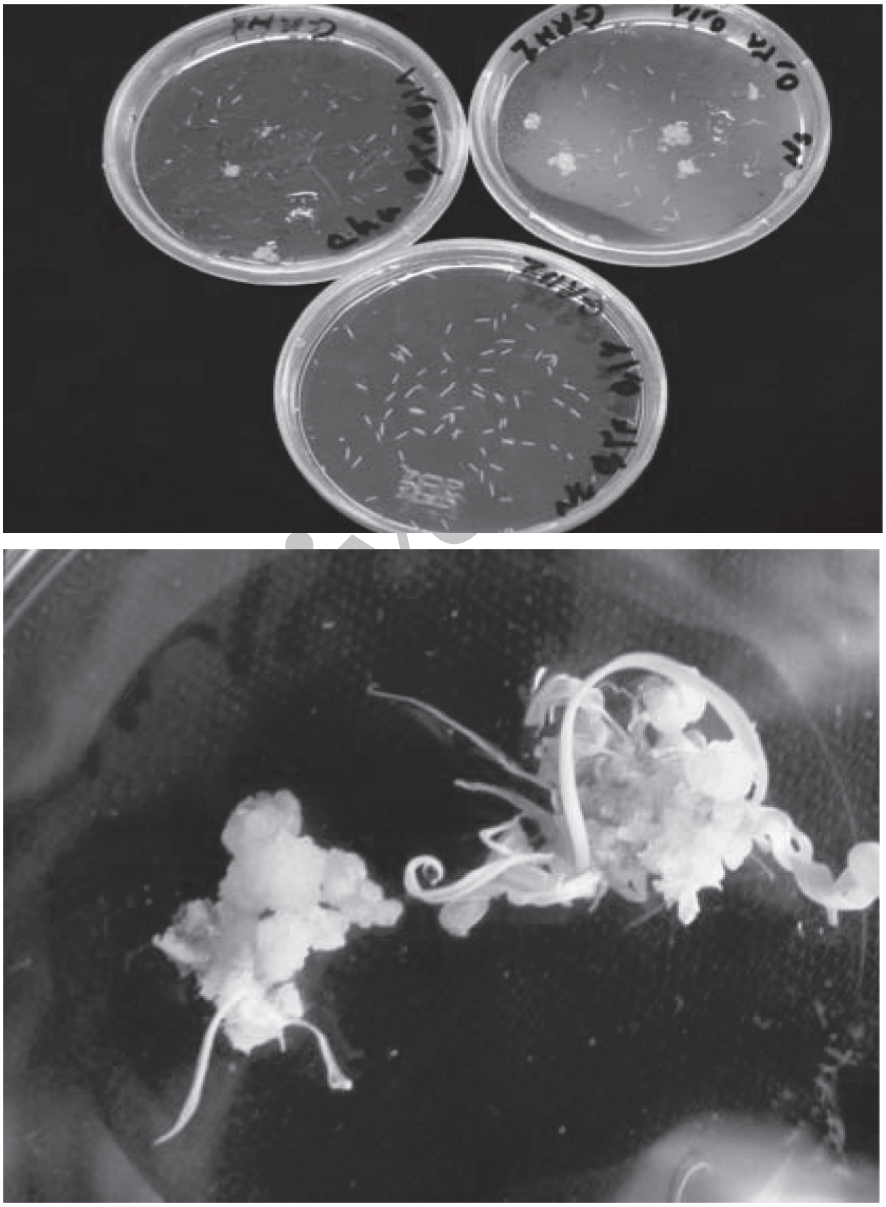
پس از پایان پیش تیمار سرمایی، گلچه های میانی هر خوشه جدا شده و پس از انتقال به داخل دستگاه لامینارایرفلو (اتاقک استریل) بوسیله هیپوکلریت سدیم[1] ۵ درصد (Na0Cl) و به مدت ۲۰ دقیقه در داخل ظروف شیشه ای یا فلاسک اتوکلاو شده، ضد عفونی شدند. سپس گلچه ها از داخل محلول هیپوکلریت سدیم خارج و توسط آب مقطر استریل در سه مرحله شستشو گردیدند. پس از آن گلچه ها با یک قیچی کوچک استریل درست از زیر میله بساک ها قطع گردیدند و با استفاده از یک پنس استریل بساک ها درون پتری دیش ۱۰× ۶۰ میلی متری حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کالوس‌زایی کشت گردیدند. محیط های کشت کالوس‌زایی شامل ۲ محیط کشت مختلف N۶ (۵) و Chu (۶) بودند (جدول ۱).

جدول ۱- ترکیب محیط های کشت کالوس‌زایی مورد استفاده (مقادیر بر حسب میلی گرم در لیتر می باشند)

ترکیبات	N۶	Chu
مواد ماکرو		
$MgSO_4,7H_2O$	۱۸۵	۲۰۰
KH_2PO_4	۴۰۰	۵۰۰
KNO_3	۲۸۳۰	۳۰۰۰
$CaCl_2,2H_2O$	۱۶۶	۱۵۰
$SO_4.2(NH_4)$	۴۶۳	۳۰۰
مواد میکرو		
H_3BO_3	۱/۶	۲
$MnSO_4,4H_2O$	۴/۴	۵
$ZnSO_4,4H_2O$	۱/۵	۳
$Na_2Mo_4,2H_2O$	۰	۰/۲۵
$CuSO_4,5H_2O$	۰	۰/۰۲۵
$CoCl_2,5H_2O$	۰	۰/۰۲۵
KI	۰/۸	۰/۸۳
$FeSO_4,7H_2O$	۲۷/۸	۴۳
$2H_2O.Na_2EDTA$	۳۷/۳	۵۶
ویتامین ها و مواد ارگانیک		
تیامین HCl	۱	۴
پیردوکسینHCl	۰/۵	۲
نیکوتنیک اسید	۰/۵	۲
میو – اینوسیتول	–	۱۰۰
گلایسین	۲	۱۰
هورمون و دیگر مواد		
۲-۴-D	۲	۱
زآتین	–	۰/۱
ساکارز(گرم)	۶۰۰۰۰	۲۰۰۰۰
سوربیتول(گرم)	۰	۲۰۰۰۰
مالتوز(گرم)	۰	۲۰۰۰۰
آگار	۸۰۰۰	۸۰۰۰
pH	۵/۸	۵/۸

www.SID.ir

در حدود ۴۰۰ بساک برای هر تیمار کشت شد و در هر پتری دیش حدود ۵۰-۴۵ بساک قرار گرفتند و هر تیمار شامل ۸ تا ۹ پتری دیش بود. پتری دیش های حاوی بساک توسط پارافیلم بسته شده و در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی گراد و در تاریکی برای تشکیل کالوس قرار گرفتند. پتری دیش ها بطور روزانه بررسی شد و درصد کالوس بر اساس رابطه تعداد کالوس تولیدی بر ۱۰۰ بساک کشت شده و مورد محاسبه قرار گرفت (۳۰). کالوس‌های با قطر ۳-۲ میلی متر به محیط کشت MS (۲۱) حاوی ۱mg/L BAP[2]، ۱mg/L کینیتین[3] و ۱ mg/L NAA[4] جهت باززایی انتقال داده شدند و تحت شرایط فتوپریودی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و سپس کالوس‌های باززاشده جهت ریشه‌زایی به محیط غذایی MS فاقد هورمون‌های رشد منتقل شدند. برای تعیین درصد باززایی از رابطه تعداد گیاه تولیدی نسبت به تعداد بساک کشت شده بر حسب درصد استفاده شد (۱ ، ۱۷). این تحقیق بر اساس آزمایش فاکتوریل(با دو فاکتور) در قالب طرح کاملاً تصادفی (RCD) با ۳ تکرار اجرا شد (۹) و در پایان تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار MSTATC انجام گردید و با توجه به نرمال نبودن داده های مربوط به صفات درصد کالوس‌زایی، درصد باززایی سبز و درصد باززایی کل تبدیل جذری $\sqrt{x + 0/5}$ قبل از تجزیه واریانس انجام شد.



شکل ۱- کالوس تولید شده از کشت بساک در محیط کشت القایی(سمت راست)
گیاهچه سبز و آلبینو باززایی شده از کالوس ها در محیط باززایی (سمت چپ)

www.SID.ir

نتایج و بحث

نتایـج تجزیه واریانس داده ها بر اسـاس آزمایـش فاکتوریل در قالب طـرح کاملاً تصادفی نشـان داد که اثرات تیمارهای محیط کشـت و مدت پیش تیمار سـرمایی بر روی درصد کالوس‌زایی، درصد باززایی سـبز و کل در سـطح ۱ درصد معنی دار بود ولی اثر متقابل تیمارهای محیط کشـت و مدت زمان پیش تیمار سـرمایی فقط در صفت درصد باززایی سبز و درصد باززایی کل در سـطح ۱ درصد معنی دار گردید. برای صفت درصد باززایی آلبینو تنها اثر مدت زمان پیش تیمار سـرمایی در سطح ۱ درصد معنی دار شد(جدول ۲).

درصـد کالوس‌زایی در محیط کشـت N۶، بطور معنـی داری بالاتر از محیط کشـت Chu بود (به ترتیـب ۲/۵۱ و ۲/۲۲ نمـودار ۱). اما درصد باززایی گیاه سبز در محیط Chu بطور معنی داری بالاتر از محیط N۶ بود (بـه ترتیب ۰/۴۷ و ۰/۱۶ نمودار ۱). همچنین درصد باززایی کل هم مانند درصد باززایی سـبز در محیط Chu بیشـتر از N۶ بود (به ترتیب ۰/۸۲ و ۰/۵۳ نمـودار ۱) اما درصد باززایی آلبینو در دو محیط اختلاف معنی داری نداشـت. با توجه به نتایج بدسـت آمده هر چند کـه در محیط N۶ درصد کالوس بیشـتری تولید شـده اسـت ولی بالا بودن درصد باززایی گیاه سبز در محیط Chu نشـان دهنده بالا بودن تعداد کالوس‌های جنین‌زا در این محیط می‌باشـد به عبارت دیگر بسـاک هایی که در داخل این محیط قرار گرفته‌اند هر چند کالوس کمتری تولید کرده‌اند ولی تعداد بیشـتری از این کالوس‌های تولید شـده جنین‌زا بوده‌اند. با مقایسـه ترکیبات پایه استفاده شـده در این محیط مشـخص می گردد که در محیط Chu ماده KNo_3 بیشـتر از محیـط N۶ بوده و مـاده $(NH_4)_2So_4$ بالعکس در محیط N۶ بیشتر بود. به عبارتی بالاتر بودن یون نیترات در محیط باعث افزایش پاسخ به کشـت بساک گردیده است که این موضوع در تعدادی از تحقیقات قبلی نیز به اثبات رسـده اسـت (۲، ۲۶ ، ۲۷). تفاوت دیگر دو محیط کشت در نوع هورمون های اسـتفاده شـده در آنها می باشـد، در محیط کشت N۶ تنها از هورمون D-۴-۲[۵] که یک اکسـین مصنوعی می باشد استفاده شده اسـت ولی در محیط کشـت Chu علاوه بر D-۴-۲ از یک سـیتوکنین طبیعی بنام زآتین[۶] نیز اسـتفاده شده است. هورمون D-۴-۲ به عنوان یک اکسـین بیشـتر در ایجاد کالوس مؤثر می باشد و طبق تحقیقات گذشته و اظهار اکثر محققین اسـتفاده از اکسـین به تنهایی باعـث افزایش کالوس می شود ولی برای تولید کالوس جنین زا و به تبع آن افزایش باززایی گیاهچه سـبز وجود یک هورمون سیتوکنین در کنار هورمون اکسین ضروری بنظر می رسد (۶ ، ۲۶). در این تحقیق نیز هر چند میزان کالوس در محیط N۶ بیشـتر بود ولی کالوس جنین زا که هدف اصلی کشـت بساک می باشد در محیط کشت Chu بیشتر بود که احتمالاً به دلیل وجود هورمون زآتین در این محیط می باشد.

میـزان و نوع منبع کربـن یکی از عوامل تاثیرگذار بـر تولید کالوس و باززایی گیاهچه سـبز در کشـت بسـاک غلات و همچنین برنج می باشـد (۱۹، ۲۲). بطوریکه اغلب محققین بر این عقیده اند که استفاده از مالتوز به عنوان منبع کربن بجای سـاکاروز باعث افزایش کالوس جنین زا در کشـت بسـاک بیشـتر گونه های گیاهی و از جمله غلات می شـود (۱۵، ۲۵). در تحقیق حاضر نیز در محیط کشت Chu ترکیبی از کربوهیدرات ها شامل: مالتوز، سـوربیتول و سـاکاروز استفاده شده اسـت که باعث افزایش درصد باززایی گیاهچه سـبز شـده اسـت. و این موضوع را Lentini و همکاران (۱۶) بـا تحقیق بـر روی ۲۳ واریته ایندیکای برنج نیز اثبـات کردند. آنها در تحقیق خود وقتی که از میزان بیشـتری مالتوز اسـتفاده کردند درصد تولید گیاهچه سـبز از ۰/۶ به ۱ درصد افزایش یافت. از طرفی محققین بر این عقیده اند که سـاکاروز به سرعت در محیط کشت به گلوکز و فروکتوز شکسـته شـده و بعد از گذشت سـه هفته از کشـت محیط فاقد ساکاروز می باشـد در حالیکه هیدرولیز شدن مالتوز در یک دوره زمانی مشابه بطور معنی داری کندتر ازهیدرولیز شـدن سـاکاروز می‌باشد. همچنین سمیت سـاکاروز برای میکروسپورها به علت حساسـیت میکروسپورها به فروکتوز می باشـد در حالی که مالتوز از دو مولکول گلوکز تشـکیل شده است (۱۵) و از طرفـی به علـت کندتر تجزیه شـدن مالتوز نوعی اسـترس غذایی به

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات درصد کالوس، درصد باززایی گیاهچه سبز، درصد باززایی گیاهچه آلبینو و درصد باززایی کل

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		درصد کالوس‌زایی	درصد باززایی گیاهچه سبز	درصد باززایی گیاهچه آلبینو	باززایی کل
محیط کشت	۱	۰/۰۵۹**	۰/۲۰۸**	۰/۰۰۴	۰/۱۲۷**
مدت زمان پیش‌تیمار سرمایی	۴	۰/۲۹۲**	۰/۰۶۸**	۰/۰۰۷**	۰/۰۳۰**
اثر متقابل	۴	۰/۰۰۲	۰/۰۱۳**	۰/۰۰۱	۰/۰۰۸**
اشتباه	۲۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۳۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات		۲/۰۹	۲/۱۲	۱۰	۲/۰۹

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

Archive of SID

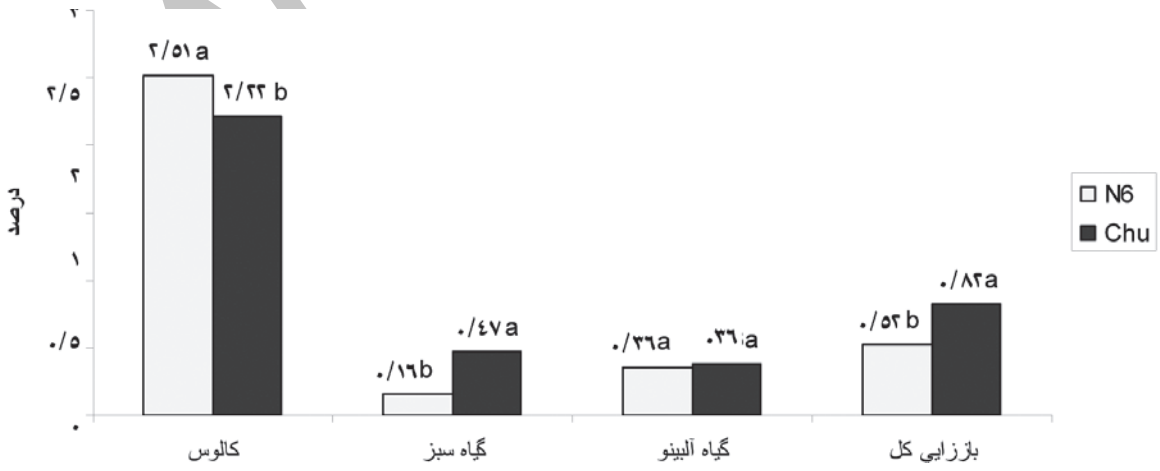
www.SID.ir

میکروسپورها وارد می‌شود که این استرس جهت تغییر مسیر رشد آنها مفید است.

اثر مدت زمان پیش تیمار سرمایی در تمامی صفات مورد مطالعه در سطح یک درصد معنی دار شده است (جدول ۲). میانگین درصد کالوس‌زایی در مدت زمان ۸ روز کمترین مقدار (۱/۵۳۳) و در ۱۴ روز بیشترین مقدار (۳/۲۲) را داشت. با افزایش مدت زمان پیش تیمار سرمایی درصد کالوس‌زایی نیز افزایش می یابد تاجائیکه در۱۴ روز به بیشترین مقدار می رسد و بعد از آن شروع به کاهش می کند بطوریکه درصد کالوس‌زایی در ۱۶ روز پیش تیمار سرمایی کمتر از ۱۴ روز پیش تیمار سرمایی می‌باشد (نمودار ۲). میانگین درصد باززایی گیاهچه سبز در تیمارهای مختلف مدت زمان پیش تیمار سرمایی بطور معنی داری با هم متفاوت می باشند بطوری که در مدت زمان ۸ و ۱۰ روز بیشترین درصد باززایی گیاه سبز بدست آمد (به ترتیب ۰/۴۴۵ و ۰/۴۳۳) و در مدت زمان ۱۶ روز کمترین میزان باززایی گیاهچه سبز (۰) را داشتیم (نمودار ۳). در مورد باززایی گیاهچه آلبینو تیمارهای ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ روز با هم اختلاف معنی داری نداشتند ولی تیمار ۱۶ روز بطور معنی داری باعث افزایش درصد باززایی گیاهچه آلبینو شده است (نمودار ۴). درصد باززایی کل در ۱۰ روز بیشترین مقدار (۰/۷۸۹) و در ۱۶ روز کمترین مقدار (۰/۴۲۲) را داشت (نمودار ۵). Pande (۲۴) با بررسی مدت زمان‌های متفاوت پیش تیمار سرمایی بر روی ارقام ایندیکا اعلام کرد که بهترین مدت زمان پیش تیمار سرمایی، ۱۰ روز می‌باشد هر چند که با افزایش درصد باززایی آلبینو همراه می‌باشد یعنی تعداد زیادی از کالوس‌ها تبدیل به گیاهچه آلبینو می شوند. در این تحقیق نیز با توجه به نتایج بدست آمده بهترین مدت زمان پیش تیمار سرمایی ۱۰ تا ۱۱ روز می‌باشد زیرا هر چند با افزایش مدت زمان پیش تیمار سرمایی درصد کالوس‌زایی افزایش می یابد ولی علاوه بر کاهش درصد باززایی گیاهچه سبز درصد باززایی گیاهچه آلبینو افزایش می یابد. در تحقیق دیگری Gupta وBorthakur (۱۰) پیش تیمار سرمایی ۱۰ تا ۱۱ روز را مناسب‌ترین زمان برای ارقام ایندیکا معرفی کردند و اعلام کردند که افزایش مدت زمان پیش تیمار سرمایی هر چند درصد کالوس‌زایی را افزایش می دهد ولی اغلب کالوس‌ها گیاهچه آلبینو تولید می کنند Trejo-Tapia و همکاران (۲۹) با بررسی مدت زمان پیش تیمار سرمایی در هیبریدهای ایندیکا در ژاپونیکا بهترین مدت زمان پیش تیمار سرمایی برای تولید کالوس را ۱۴ روز اعلام کردند. بنابراین با توجه به تحقیق حاضر و نتایج تحقیقات گذشته می توان گفت که هر چند پیش تیمار سرمایی در ژنوتیپهای مختلف اثرات متفاوتی دارد ولی علاوه بر ضروری بودن پیش تیمار سرمایی برای تغییر مسیر تکامل میکروسپورها مدت زمان خیلی طولانی باعث کاهش پاسخ به کشت بساک می گردد.

اثر متقابل بین مدت زمان پیش تیمار سرمایی و محیط کشت در صفت درصد کالوس زایی معنی‌دار نشده است (جدول ۲) و همانطور که در نمودار ۱ مشخص می باشد بیشترین درصد کالوس‌زایی در هر دو محیط در مدت زمان ۱۴ روز و کمترین آن برای هر دو محیط کشت در مدت زمان ۸ روز به‌دست آمده است (نمودار ۲).

ولی در مورد درصد باززایی گیاهچه سبز اثر متقابل مدت زمان پیش تیمار سرمایی و محیط کشت معنی‌دار گردیده است یا به عبارتی میزان باززایی گیاهچه سبز در هر دو محیط کشت با اعمال زمان‌های مختلف پیش تیمار سرمایی متغیر می باشد. بطوری‌که بیشترین درصد باززایی گیاهچه سبز در محیط کشت chu با مدت زمان ۸ و ۱۰ روزه (به ترتیب ۰/۶۲ و ۰/۶۵ درصد) و کمترین آن در هر دو محیط با مدت زمان ۱۶ روز پیش تیمار سرمایی (به میزان ۰ درصد) بود (نمودار ۳). اثر متقابل پیش تیمار سرمایی و نوع محیط کشت بر روی درصد بوته‌های آلبینو معنی‌دار نشد (جدول ۲) در حالی‌که با افزایش مدت زمان پیش تیمار سرمایی در هر دو محیط کشت بر درصد گیاهچه های آلبینو افزوده شد (نمودار ۴) که این رابطه مستقیم بین مدت زمان پیش تیمار سرمایی و درصد گیاهان آلبینو توسط Gupta و Borthkur (۱۰) نیز گزارش شده است. در این مطالعه اثر متقابل بین دو فاکتور مورد بررسی بر روی صفت درصد باززایی کل معنی‌دار شد (جدول ۲) به‌گونه‌ای که بیشترین درصد باززایی کل در محیط کشت chu با تعداد روزهای پیش تیمار سرمایی ۸، ۱۰ و ۱۲ روزه به ترتیب معادل ۰/۹۱، ۰/۹۶ و ۰/۹۶ درصد بود و کمترین آن در هر دو محیط کشت در ۱۶ روز سرمادهی بدست آمد. بنابراین تاثیر مدت زمان پیش تیمار سرمایی بر روی صفات درصد باززایی گیاهچه سبز و گیاهچه کل بسته به نوع محیط کشت متفاوت می باشد که به این موضوع در تحقیقات سایرین نیز اشاره شده است (۲۴ ، ۲۹).

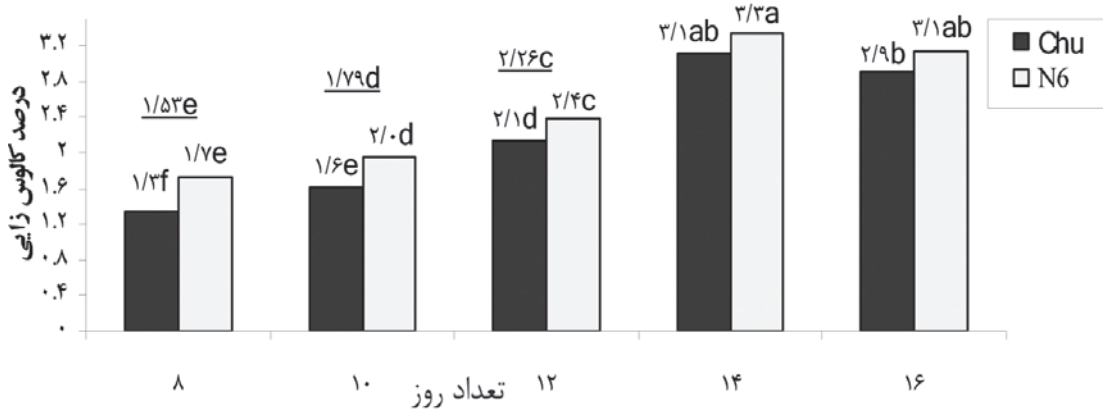


نمودار ۱- تأثیر تیمارهای مختلف حاصلخیزی خاک بر وزن خشک ریشه اسفرزه

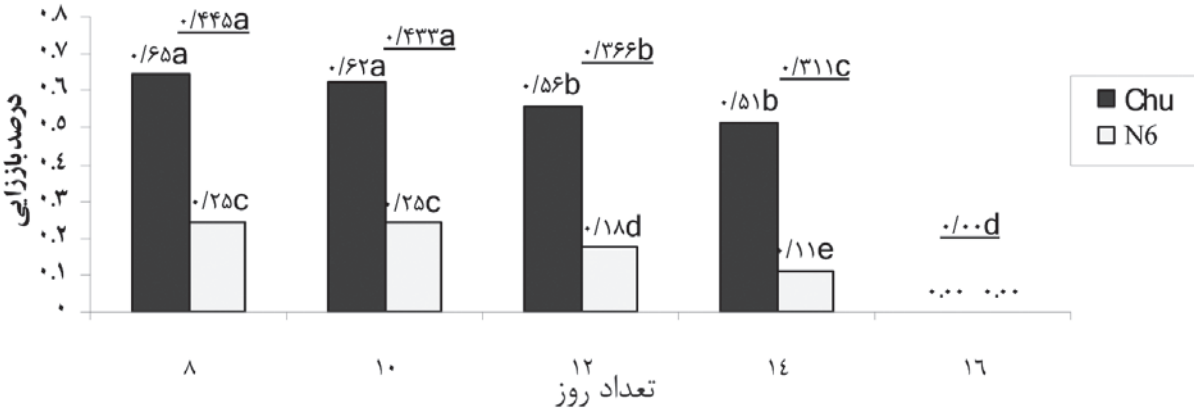
نمودار ۱- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی، باززایی گیاه سبز، آلبینو و کل در دو محیط کشت مختلف (میانگین دارای حروف متفاوت در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار دارند).

Archive of SID
www.SID.ir

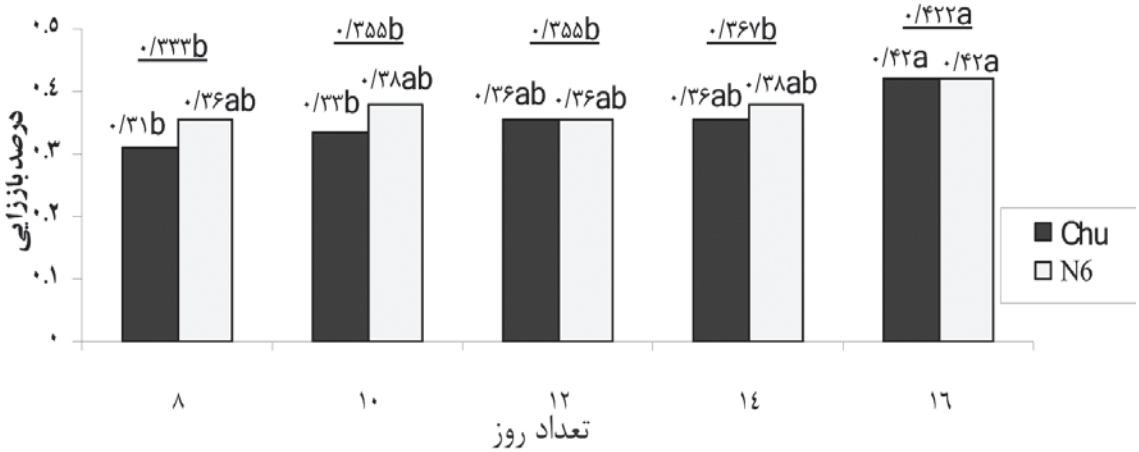
بنابراین به طور کلی می توان نتیجه گرفت که با افزایش مدت زمان پیش تیمار سرمایی بر میزان کالوس زایی و گیاهچه های آلبینو تولیدی افزوده شـده و در مقابل میـزان باززایی گیاهچه های سـبز کاهش می یابد و از طرفی تعیین مدت زمان پیش تیمار سـرمایی به نوع رقم مورد اسـتفاده و حتی نوع محیط کشـت، نیز بسـتگی دارد. از طرفی توصیه می‌گردد در تحقیقات آتی تاثیر پیش‌تیمارهای دیگری نظیر شـوک حرارتی و مانیتول نیز همرا پیش‌تیمار سـرمایی بر روی پاسـخ به آنروژنز مورد بررسـی قرار گیرد.



نمودار ۲- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی در پیش تیمارهای سرمایی مختلف و اثر متقابل آن با محیط کشت

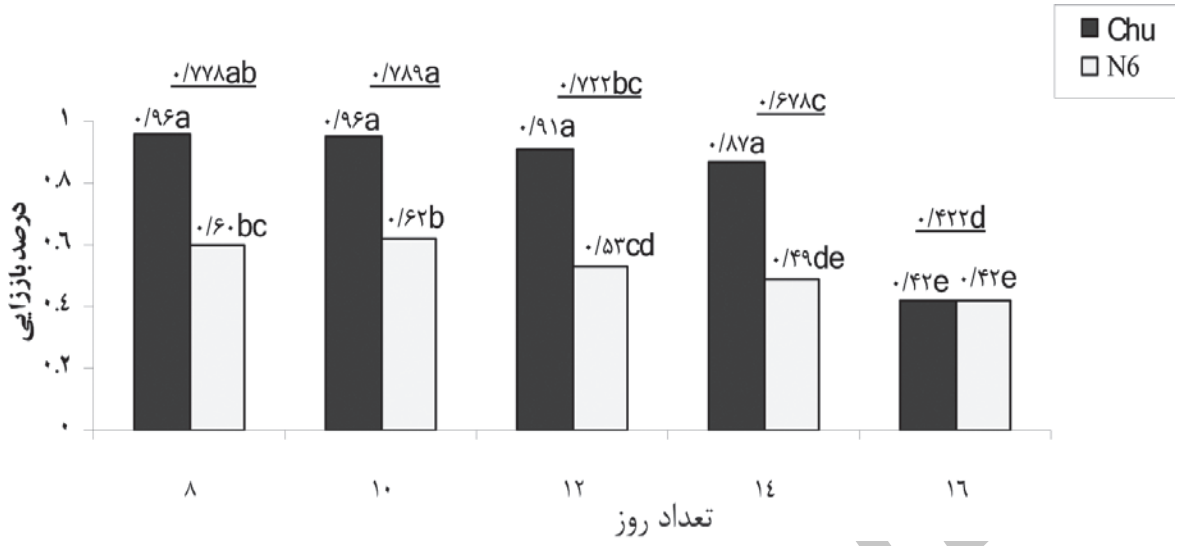


نمودار ۳- مقایسه میانگین درصد باززایی گیاهچه سبز در پیش تیمارهای سرمایی مختلف و اثر متقابل آن با محیط کشت
(میانگین دارای حروف متفاوت در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار دارند)



نمودار ۴- مقایسه میانگین درصد باززایی گیاهچه آلبینو در پیش تیمارهای سرمایی مختلف و اثر متقابل آن با محیط کشت
(میانگین دارای حروف متفاوت در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار دارند)

www.SID.ir



نمودار ۵- مقایسه میانگین درصد باززایی گیاهچه کل (سبز + آلبینو) در پیش تیمارهای سرمایی مختلف و اثر متقابل آن با محیط کشت (میانگین دارای حروف متفاوت در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار دارند)

پاورقی ها

1- Sodium Hypochloride
2- 6-Benzylaminopurin
3- Kinetin
4- Naphetalen acetic acid
5- 2,4-dichlorophenoxi-acetic acid
6- Zeatin

منابع مورد استفاده

۱- عبادی. ع.ا.، م. حسینی و شفیعی ثابت. ح. (۱۳۸۲) تجزیه ژنتیکی صفات تولید کالوس و باززایی گیاه از کشت بساک برنج. مجله علوم کشاورزی. جلد ۵ شماره ۲: ص ۳۹-۵۱.

2- Bishnoi. U., Jain. R.K. Rohilla. J.S. Chowdhury. V.K. Gupta K.R. and Chowdhury. J.B. (2000) Anther culture of recalcitrant indica × Basmati rice hybrids. *Euphytica*. 114: 1573-5060.

3- Chen. Y., (1988) *In vitro development of plant from microspores of rice*. In: Hu, H., and Y. Chen (ed) Plant Somatic Genetics and Crop Improvement (pp 27-67). Beijing Univ Press. Beijing.

4- Chu. C.C., (1978) *The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops*. Proceeding Symposium Plant Tissue Culture. Science Press, Peking. pp: 43-50.

5- Chu. C.C., Wang. C.C. Sun. C.S. Hsu. C. Yin. K.C. Chu. Y.C. and Bi. F.Y. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin*. 85: 659-668.

6- Chu. Q.R., Cao. H.X. and Linscombe. S.D. (2005) *A novel medium for introduction of embryogenic callus in rice anther culture of Southern* U.S. crosses. In: www.LSUAgCenter.com.

7- Data .K.S., (2005) Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Sci*. VOL. 89, NO. 11. 1870-1878.

8- Genovesi. A.D ., and Magil. C.W. (1979) Improved rate of callus and plant regeneration from rice anther culture following cold shock. *Crop Sci*. 19: 662-664.

9- Gomez. K.A., and Gomez. A.A. (1984) *Statistical procedures for agricultural research*. IRRI, Philippines.

10- Gupta, H.S. and Borthakur D.N. (1987) Improved rate of callus induction from rice anther culture following microscopic staging of microspores in iron alum-haemotoxylin. *Theor. Appl. Genet*. 74, 95-99.

11- Guzman. M., and Zapata. F.J. (2000) Increasing anther culture efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) using anthers from ratooned plants. *Plant. Sci*. 151:107-114.

12- He. T., Yang. Y. Tu. S.B. Yu M.Q. and Li. X.F. (2006) Selection of interspecific hybrids for anther culture of Indica rice. Plant Cell Tiss. *Org. Cult*. 86: 271-277.

13- Khush. G.S., (1997) Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Mol. Biol*. 35: 25-34.

14- Kim, H. S., Lee, Y. T., Lee, S. Y., Kim, T. S. (1991) Anther culture efficiency in different rice genotypes under different cold pretreatment durations and culture temperatures. Research Reports of the Rural Development Administration, *Bio/Technology* 33: 5-13..

15- Last. D.J., and Brettell. R.I.S. (1990) Embryo yield in wheat

Archive of SID

www.SID.ir

25- Pande. H., and BhoJwani. S.S. (1999) Promotion of androgenesis in rice anther cultures by substitution of sucrose with maltose and mannitol. *Biol. Plant*. 42: 125-128.

26- Raina, S.K. and Zapata. F.J. (1997) Enhanced anther culture efficiency of indica rice (*Oryza sativa* L.) through modification of the culture media. *Plant Breed*. 116: 305-315.

27- Reddy, V.S., Leelavathi S. and Sen. S.K. (1985) Influence of genotype and culture medium on microspore callus induction and green plant regeneration in anthers of *Oryza sativa*. *Physiol. Plant.* 63: 309-314.

28- Thuan1. O.T., Tuan V.D. and Bong. B.B. (2001) Study on anther culture of F1 plants from crosses between aromatic and improved rice cultivars. *Omonrice*. 9: 41-45.

29- Trejo-Tapia. G., Amaya. U.M. Morales. G.S. Sanchez. A.D.J. Bonfil. B.M. Rodriguez-Monroy M. and Jimenez-Aparicio. A. (2002) The effects of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 71: 41-46.

30- Xie. J.H., Gao. M.W. Cai. Q. 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 (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Tiss. *Org. Cult*. 42: 245-250.

31- Xie. J.H., Gao., M.W. Liang., Z.Q. Shu. Q.Y. Cheng., X.Y. and Xue., Q.Z. (1997) The effect of cold-pretreatment on the isolated microspore culture and the free amino acid change of anthers in Japonica rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol*. 151: 79-82.

32- Zapata. F.J. (1992) *IRRI Anther culture: Procedure, Progress, problem and prospects.* In: Workshop on anther culture for rice breeders 12-24 October 1992. China National Rice Research Institute.

anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Rep*. 9: 14-16.

16- Lentini. Z., Reyes. P. Martinez C.P. and Roca. W.M. (1995) Androgenesis in highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. *Plant Sci*. 110: 127-138.

17- Li. M.F., (1991) *Anther culture breeding of rice.* In: Yan CJ (ed) Tissue Culture of Field Crops (pp 135-152). Shanghai Scientific and Technical Publishers. Shanghai.

18- Matsushima, T., Kikuchi, S. Takaiwa F. and Oono K. (1988) Regeneration of plants by pollen culture in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Tissue Cult. Lett*. 5: 78-81.

19- Mejza. S.J., Morgant. V. DiBbina D.E. and Wong. J.R. (1993) Plant regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum L.*. *Plant Cell Rep.* 12: 149-153.

20- Mohan Jain. S., Sopory S.K. and Veilleux. R.E. (1996) *In vitro haploid production in higher plants.* Kluwer Academic Publisher. IV. 1. Gosal. S.S., A.S. Sindhu. J.S. Sandhu. R. Sandhu-Gill. B. Singh. G.S. Khehra. G.S. Sidhu and H.S. Dhaliwar. Haploidy in rice. pp: 1-37.

21- Murashige. T., and Skoog., F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 15: 473-497.

22- Navarro-Alvarez. W., Baenzigar. P.S. Eskridge. K.M. Shelton. D.R. Gustafson V.D. and Hugo. M. (1994) Effect of sugars in Wheat anther culture media. *Plant Breed*. 112: 53-62.

23- Ogawa, T., Fukuwa H. and Ohkawa. Y. (1995) Plant regeneration through direct culture of isolated pollen grains in rice. *Breed. Sci*. 45: 301-307.

24- Pande, H. (1997) *Androgenesis in anther cultures of an indica cultivar of Oryza sativa* L. Ph.D. Thesis, University of Delhi.

Archive of SID