Archive of SID

بررسی کالوس‌زایی و باززایی از کشت جنین نارس ارقام برنج

محمد زمان نوری دلاور و احمد ارزانی[۱]

چکیده

تحقیق حاضر، به منظور ارزیابی واکنش ۱۸ رقم برنج (*Oryza sativa* L.) مشتمل بر ۱۵ رقم برنج ایرانی و سه رقم خارجی، برای کالوس زایی و باززایی گیاهچه از کالوس با کشت جنین نارس نسبت به سه محیط کشت MS، LS و N۶ اجرا گردید. میزان کالوس‌دهی با استفاده از صفات قطر کالوس، وزن تر و وزن خشک مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس با انتقال کالوس‌های تولیدی از سه محیط کشت ذکر شده به محیط کشت باززایی (MS_R)، و از طریق سنجش درصد گیاهچه‌های تولید شده از کالوس‌ها، میزان باززایی اندازه‌گیری گردید.

نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری هم از لحاظ کالوس‌زایی و هم باززایی بین ارقام وجود دارد ($P<0/01$). در مرحله کالوس‌زایی، از نظر قطر کالوس، ارقام نعمت و چرام-۲ به ترتیب با متوسط قطر ۴/۸۳ و ۴/۶ میلی‌متر به عنوان ژنوتیپ‌های برتر شناخته شدند. از نظر وزن تر کالوس ارقام نعمت، چرام-۲ تا سپیدرود، طارم محلی و لاین‌های خارجی IRCTN۹۱۳۳ و IRFAON-۳۰ به طور معنی‌داری بهتر از سایرین بودند. ارقام نعمت، زاینده‌رود و لاین IRCTN۹۱۳۳ بالاترین درصد محتویات آبی را داشتند. از نظر باززایی، لاین IRCTN۹۱۳۳ و ارقام عنبربو محلی، نعمت، چرام-۲ و طارم محلی بیشترین میزان باززایی گیاهچه از کالوس را دارا بودند. از هر دو جنبهٔ کالوس‌زایی و باززایی بین محیط‌های کشت تفاوت معنی دار وجود داشت. بدین ترتیب که از لحاظ قطر کالوس، وزن تر، و میزان باززایی، محیط‌های کشت MS و N۶ با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند، ولی نسبت به محیط کشت LS، به طور معنی‌داری برتر بودند ($P<0/01$). کالوس‌هایی که در محیط کشت MS رشد یافتند، بیشترین و در محیط کشت LS، کمترین درصد آب را داشتند. محیط کشت MS و N۶ برای کشت این ویترو جنین نارس برنج مناسب تشخیص داده شد، و از بین ارقام مورد مطالعه، ارقام نعمت و چرام-۲ به عنوان ارقام برتر از لحاظ کالوس‌دهی و میزان باززایی گیاهچه شناخته شدند. هم‌چنین، برنج‌های ژاپونیکای مورد مطالعه در زمرهٔ بهترین ارقام از نظر میزان باززایی گیاهچه بودند. مطالعهٔ روابط هم‌بستگی بین صفات نشان داد که بین صفت کالوس‌زایی و باززایی گیاهچه، هم‌بستگی معنی‌داری وجود ندارد، و این دو صفت مستقل از هم عمل می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: برنج (*Oryza sativa* L.)، کشت جنین نارس، کالوس‌زایی و باززایی

مقدمه

از تولید کالوس و باززایی آن، برای تکثیر کلونی، گزینش این ویترو برای افزایش مقاومت نسبت به تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده (از طریق استفاده از تنوع موجود و یا تنوع سوماکلونی ناشی از محیط)، و در مهندسی ژنتیک به منظور انتقال ژن مورد

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

www.SID.ir

Archive of SID

نظر از منبعی بیگانه به گیاه زراعی استفاده می‌شود (۲ و ۹). در برنج، با توجه به دستاوردهای ژنتیک مولکولی، ترانسفورماسیون ژنی با استفاده از کالوس‌های حاصل از جنین نارس موفق بوده است (۹ و ۲۹). گونه‌های مختلف، ارقام درون گونه، یا حتی قسمت‌های مختلف یک گیاه، به یک روش کشت بافت واکنش یکسان نشان نمی‌دهند (۱، ۲، ۲۰، ۲۳، ۲۵ و ۲۶). این موضوع سبب شده است تا نتوان در برنامه‌های اصلاحی روشی همگن و روزمره برای تمام ارقام یک گیاه زراعی به کار برد. بنابراین، برای هر مورد ژنتیکی باید ترکیب محیط کشت مصنوعی مطلوب همان مورد مشخص گردد. در برنج، تفاوت‌های چشمگیری بین ارقام ژاپونیکا و سایر تیپ‌های زراعی، از نظر پاسخ به کشت بافت وجود دارد. ارقام برنج ژاپونیکا برای تولید کالوس و باززایی گیاهچه ظرفیت زیادی دارند (۱، ۱۴ و ۲۶). با این وجود، در داخل هر دو گروه برنج‌های ایندیکا و ژاپونیکا، ارقام مختلف، واکنش متفاوتی نسبت به تولید کالوس و باززایی گیاه نشان می‌دهند. برخی از پژوهشگران این گونه تفاوت‌ها را در پاسخ به کشت بافت، به اختلاف ترکیب و غلظت‌های هورمون‌های داخلی گیاه، و تفاوت‌های حساسیت به هورمون‌های مصنوعی افزوده شده به محیط کشت نسبت می‌دهند (۱). اخیراً اگاوا و همکاران (۲۰) روابط بین وابستگی ژنوتیپی برای رشد کالوس و فعالیت آنزیم‌های احیا کنندهٔ نیترات و نیتریت را در برنج مورد مطالعه قرار دادند. آنها بین محتوای یون نیتریت موجود در کالوس و میزان رشد آن هم‌بستگی منفی مشاهده کردند. بدین ترتیب که، ارقام با رشد ضعیف کالوس دارای سطوح بسیار پایین‌تری از آنزیم نیتریت ردوکتاز در مقایسه با ارقام دارای رشد کالوس مطلوب هستند. علاوه بر ژنوتیپ گیاه و ترکیب محیط کشت، نوع بافتی که برای تولید کالوس از آن استفاده می‌شود نیز سهم بسزایی در پاسخ به کشت بافت دارد (۵).

برای اولین بار گیاه کامل برنج در سال ۱۹۶۱ به دست آمد، و این اولین موفقیت در تک لپه‌ای‌ها بود (۲۷). کشت جنین نارس و کشت جنین بالغ، متداول‌ترین روش‌های تولید کالوس است. در این میان کشت جنین نارس بیشترین کاربرد را، به ویژه در غلات داشته است (۲، ۳، ۵، ۶، ۲۱ و ۲۳). سراج و همکاران (۲۶) گزارش کردند که کالوس‌های حاصل از جنین نارس برنج، نسبت به کالوس‌های بذر بالغ متراکمترند و از قابلیت باززایی زیادتری برخوردارند.

مطالعهٔ حاضر به بررسی واکنش ارقام برنج ایرانی از لحاظ کالوس‌زایی و باززایی از ریز نمونهٔ جنین نارس، در سه محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS)، لینزمایر و اسکوگ (LS) و نیچ (N6) پرداخته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این مطالعه از ۱۸ رقم برنج ایرانی و خارجی استفاده شد (جدول ۱). ارقام ایرانی مشتمل بر ۱۰ رقم از مناطق گیلان و مازندران، رقم‌های بومی چرام-۲ و عنبر بو محلی از منطقهٔ غرب کشور، دو رقم زاینده‌رود و سازندگی از منطقهٔ اصفهان، و یک رقم کامفیروزی از منطقهٔ فارس، و ارقام خارجی مورد استفاده لاین‌های IRCTN۹۱۳۳ و IRFAON-۳۰ و رقم بسماتی[1] بودند.

این ارقام در بهار سال ۱۳۷۷ در گلخانهٔ دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان کشت شدند. بدین منظور، ابتدا بذور با سم بنومیل دو در هزار ضدعفونی شده، و سپس در داخل ظروف پتری و درون ژرمیناتور جوانه‌دار شدند. بذور جوانه‌دار شدهٔ هر رقم، در داخل دو گلدان پلاستیکی با قطر ۲۵ سانتی متر، حاوی مخلوط خاک و کود کشت گردید. خاک گلدان‌ها دو هفته قبل از کشت توسط گاز متیل بروماید[2]، به نسبت یک کیلوگرم گاز در یک متر مکعب خاک ضدعفونی شد. این ژنوتیپ‌ها در مزرعهٔ مرکز تحقیقات کشاورزی استان اصفهان نیز کشت گردیدند. بدین ترتیب که ابتدا بذور به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شدند. سپس به صورت کپه‌ای و به روش خزانه ژاپنی

1. Basmati 2. Methyl bromide

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. مقایسهٔ میانگین ارقام برنج مورد مطالعه از نظر قطر کالوس و وزن ترکالوس

شماره ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	تیپ زراعی	میانگین قطر کالوس (mm)	وزن تر کالوس (gr)
۱	آمل-۳	ایندیکا	۳/۹۷^{g}	۰/۰۴۵^{de}
۲	بسماتی	ایندیکا	۴ ^{efg}	۰/۰۴۲^{de}
۳	سپیدرود	ایندیکا	۴/۴۵^{bc}	۰/۰۷۶^{a}
۴	خزر	ایندیکا	۳/۶^{h}	۰/۰۳۹^{e}
۵	33IRCTN91	ژاپونیکا	۴ ^{efg}	۰/۰۷۳^{a}
۶	دشت	ایندیکا	۳/۹۹^{fg}	۰/۰۴۱۵^{e}
۷	نعمت	ایندیکا	۴/۸۳^{a}	۰/۰۸۲۵^{a}
۸	سازندگی	ایندیکا	۴/۰۵$^{d-g}$	۰/۰۴۸^{cde}
۹	دم‌سیاه	ایندیکا	۴/۲۸^{cd}	۰/۰۵۵^{bc}
۱۰	زاینده‌رود	ایندیکا	۴/۲۴^{cde}	۰/۰۵۴۷^{bc}
۱۱	طارم محلی	ایندیکا	۴/۰۸$^{d-g}$	۰/۰۷۳^{a}
۱۲	IRFAON-۳۰	ایندیکا	۴/۵۳^{b}	۰/۰۷۲۷^{a}
۱۳	بینام	ایندیکا	۴/۱۵$^{d-g}$	۰/۰۵۱^{bcd}
۱۴	سالاری رودسر	ایندیکا	۳/۶۵^{h}	۰/۰۵۱^{bcd}
۱۵	ندا	ایندیکا	۴/۲۳$^{c-f}$	۰/۰۵۹۹^{b}
۱۶	چرام-۲	ایندیکا	۴/۶^{ab}	۰/۰۸۱^{a}
۱۷	عنبر بومحلی	ژاپونیکا	۴/۱۴$^{d-g}$	۰/۰۵۶^{b}
۱۸	کامفیروزی	ایندیکا	۳/۷۲^{h}	۰/۰۴۴^{de}

اعدادی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، براساس آزمون LSD، اختلاف معنی‌دار ندارند ($P<0/01$).

کشت، و پس از آماده شدن نشاها، در زمین اصلی در ردیف‌های دو متری کشت گردیدند.

تهیهٔ محیط‌های کشت

از سه محیط کشت القای کالوس MS (۱۹)، N۶ (۸) و LS (۱۶)، که حاوی اجزای پایه مشتمل بر عناصر پر مصرف، کم مصرف و ویتامین‌های مربوط بود، استفاده شد. به محیط کشت MS، ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون D-۴و۲ و یک میلی گرم در لیتر هورمون کاینتین، به محیط کشت LS، دو میلی گرم در لیتر هورمون D-۴و۲ و دو میلی گرم در لیتر هورمون کاینتین، و به محیط کشت N۶، یک میلی گرم در لیتر هورمون D-۴و۲ و یک میلی گرم در لیتر هورمون کاینتین اضافه گردید. برای باززایی گیاهچه از کالوس، از محیط کشت پایهٔ MS همراه با یک میلی گرم در لیتر هورمون ایندول استیک اسید (IAA) و ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین (BA) استفاده شد (MS_R). مقدار ۳۰ گرم در لیتر ساکارز برای محیط‌های کشت MS و LS، و ۲۴ گرم در لیتر برای محیط کشت N۶ به کار رفت. برای نیمه جامد کردن محیط کشت از آگارز از نوع ۱A سیگما، به

www.SID.ir

Archive of SID

میزان ۲/۸ گرم در لیتر برای MS و LS، و ۲/۴ گرم در لیتر برای N۶ استفاده گردید.

کالوس‌زایی و واکشت

بذرهای نارس ابتدا با اتانول ۷۰% به مدت یک دقیقه و سپس با محلول ۱% هیپوکریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه سترون شدند. بذور نارس پس از ضدعفونی، به اتاقک کشت منتقل، و در زیر بینوکالار به کمک پنس ثابت نگه داشته شدند، و با یک برش مورب به وسیلهٔ اسکالپل و فشار مختصر، جنین‌های نارس جدا گردیدند. سپس در داخل هر ظرف پتری، پنج عدد جنین قرار داده شد. جنین‌ها طوری در روی محیط کشت قرار گرفتند که ناحیهٔ اسکوتلومی جنین نارس به سمت بالا قرار داشت. به دنبال آن، درب ظروف پتری با نوار پارا فیلم مسدود گردید، و هر ظرف پس از علامت‌گذاری، داخل ژرمیناتور و در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گذشت ۱۰ روز از کشت، مشاهده شد که به دلیل رشد کولئوپتیل جنین و فرو رفتن آن درون محیط کشت، ناحیهٔ اسکوتلومی جنین از سطح محیط کشت جدا گردیده است. بنابراین، برای جلوگیری از این امر و اندازه‌گیری دقیق‌تر رشد کالوس، در روز دهم، کالوس‌های ایجاد شده از هر جنین در زیر اتاقک کشت جداسازی و مجدداً بر روی محیط کشت تازه از همان نوع قرار داده شد. در این واکشت، در هر ظرف پتری کالوس‌زایی، پنج قطعه کالوس قرار داده شد و در ۱۰ تکرار (پتری دیش) کشت گردید.

نحوهٔ ارزیابی و تجزیه و تحلیل آماری

ده روز پس از کشت جنین، و در هنگام واکشت کالوس‌ها به محیط کشت تازه، قطر کالوس‌ها در هر تکرار اندازه‌گیری و ثبت، و به عنوان اولین یادداشت برداری در روز صفر در نظر گرفته شد. سپس چهار بار، و هر بار به فاصلهٔ چهار روز قطر کالوس‌ها اندازه‌گیری شد. بنابراین، به طور کلی پنج بار اندازه‌گیری قطر کالوس در صفر، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ روز پس از واکشت انجام، و برای هر رقم و محیط کشت و تکرار، به طور جداگانه منظور گردید. هم چنین، وزن تر و خشک کالوس تعدادی از تکرارهای تیمارهای مختلف با نمونه برداری اندازه گرفته شد، و به کمک معادلات رگرسیونی لگاریتمی ($y=aX^b$)، وزن تر و خشک تیمارها در ۴ و ۱۶ روز پس از واکشت به دست آمد. متعاقباً درصد محتویات آبی کالوس‌ها به کمک رابطهٔ زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد محتویات آبی} = \frac{\text{وزن تر} - \text{وزن خشک}}{\text{وزن تر}} \times ۱۰۰$$

پس از انتقال کالوس‌های تولید شده در سه محیط کشت، به محیط کشت باززایی MS_R، درصد گیاهچه‌های باززایی شده مورد محاسبه قرار گرفت. به منظور تجزیهٔ واریانس بخش کالوس‌زایی، از طرح کرت‌های خرد شده در زمان (زمان‌های مختلف یادداشت برداری) که محیط کشت و رقم به صورت فاکتوریل در غالب طرح پایهٔ کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار بودند، استفاده شد. در بخش باززایی گیاهچه از کالوس، از آزمایش چند عاملی (فاکتوریل) با طرح پایهٔ کاملاً تصادفی با پنج تکرار استفاده گردید. برنامهٔ مدل عمومی رگرسیون (GLM) نرم‌افزار اس. ا. اس (۲۴)، برای تجزیهٔ واریانس نتایج حاصل به کار رفت. مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی دار فیشر (LSD) انجام شد.

نتایج و بحث

ارزیابی کالوس‌زایی بر اساس قطر کالوس

نتایج تجزیهٔ واریانس تفاوت معنی داری را ($P<۰/۰۱$) بین ارقام مورد مطالعه نشان داد (نتایج مقایسه میانگین‌ها مندرج در جدول ۱ را ببینید). محیط‌های کشت MS، LS و N۶ به کار رفته نیز از لحاظ آماری تفاوت معنی داری داشتند. این دو عامل سطوح فاکتوریل آزمایش را تشکیل می‌دادند، و بررسی اثر متقابل این دو عامل حاکی از معنی دار بودن اثر متقابل رقم × محیط کشت بود. عامل زمان یادداشت برداری به عنوان فاکتوریل فرعی، معنی‌دار بود. اثر متقابل زمان با محیط کشت و زمان با رقم، و نیز اثر متقابل سه جانبه، در سطح احتمال یک

www.SID.ir

Archive of SID

درصد معنی‌دار گردید.

مقایسهٔ میانگین‌های سه نوع محیط کشت نشان داد که محیط کشت MS و N۶ به ترتیب با متوسط قطر کالوس ۴/۵۳ و ۴/۴۷ میلی متر، در گروه اول آزمون حداقل اختلافات معنی دار (LSD) واقع شدند، و محیط کشت LS، با متوسط قطر کالوس ۳/۲۸ میلی متر در رتبهٔ بعدی قرار گرفت.

در تهیهٔ محیط‌های کشت القای کالوس، تلاش شد تا هم اثر عناصر اصلی تشکیل دهندهٔ محیط کشت بر کالوس‌زایی آزمون شود، و هم تأثیر ویتامین‌ها و تنظیم کننده‌های رشد، به عنوان عوامل کلیدی پاسخ به کشت، مشخص گردد. بدین لحاظ، از سه محیط کشت به کار رفته، محیط‌های کشت MS و LS از لحاظ ترکیب و میزان اجزای تشکیل دهنده، به استثنای ویتامین‌ها و تنظیم کننده‌های رشد، مشابه هم بودند و تفاوت‌های مشاهده شده در این دو محیط کشت در پاسخ به کشت بافت، منحصراً مربوط به سطوح هورمونی و میزان ویتامین‌ها، و احتمالاً تا حدودی مربوط به pH بود. هم‌چنین، با مقایسهٔ ترکیب محیط کشت MS و N۶، نتیجه می‌شود که برغم تفاوت دو محیط کشت در میزان عناصر پر مصرف و کم مصرف، این دو محیط در میزان القای کالوس تفاوتی ندارند. از آن جایی که میزان هورمون اکسین به کار رفته در محیط کشت، و نسبت آن با سیتوکینین، یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین کنندهٔ پاسخ به القای کالوس می‌باشد (۱۰، ۱۵، ۲۸ و ۳۰)، و با توجه به نتایج به دست آمده، نتیجه‌گیری می‌شود که میزان ویتامین‌ها و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی تأثیر بارزی بر القای کالوس از جنین نارس برنج دارند. این نتیجه‌گیری با گزارش بریزیب و همکاران (۷) و هنری و همکاران (۱۲) هماهنگی دارد. از طرفی، می‌توان چنین استنباط نمود که محیط‌های غذایی مختلف، در صورتی که در میزان ویتامین‌ها و تنظیم کننده‌های رشد تفاوت زیادی نداشته باشند، احتمالاً در میزان کالوس‌زایی از جنین نارس برنج تفاوت معنی‌داری ندارند. این نتیجه، موافق نظر کویی‌میو و زاپاتا (۲۲) است، که تفاوت محیط‌های کشت N۶ و E-۲۴ را در کالوس‌زایی از بساک برنج، غیر معنی‌دار ذکر نمودند.

مقایسهٔ میانگین‌های ارقام مورد مطالعه نیز نشان داد که رقم نعمت با متوسط قطر ۴/۸۳ میلی متر بیشترین میزان تولید کالوس را در هر سه محیط کشت و در زمان‌های مختلف دارد، که به همراه رقم چرام-۲ با قطر کالوس ۴/۶ میلی متر در رتبه اول قرار گرفت. لاین خارجی IRFAON-۳۰ و رقم سپید رود، به ترتیب با متوسط قطر کالوس ۴/۵۳ و ۴/۴۵ میلی متر، در رتبهٔ دوم قرار گرفتند. از بین ارقام مورد مطالعه، رقم‌های کامفیروزی، سالاری رودسر و خزر کمترین تولید کالوس را داشتند و به ترتیب با متوسط قطرهای ۳/۷۲، ۳/۶۵ و ۳/۶ میلی متر، آخرین رتبه را کسب نمودند (جدول ۱). نتایج فوق، نقش بارز رقم را در میزان القای کالوس، نشان می‌دهد. خانا و رینا (۱۳) با بررسی تأثیر رقم و محیط کشت، در پاسخ به کشت بذر بالغ تعدادی از ارقام برنج ایندیکا، مشاهده نمودند که اثر رقم در میزان واکنش بسیار معنی‌دار بوده است.

عامل زمان به عنوان فاکتور فرعی، از طریق آزمون حداقل اختلافات معنی‌دار مورد مقایسهٔ میانگین قرار گرفت، و پنج زمان اندازه‌گیری صفر، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ روز پس از واکشت به ترتیب در پنج رتبه قرار گرفتند، بدین ترتیب که ۱۶ روز پس از واکشت با متوسط قطر ۵/۲ میلی متر بیشترین میزان تولید کالوس، و زمان اول اندازه‌گیری با متوسط قطر ۲/۹۲ میلی متر کمترین میزان تولید کالوس را در بین ارقام و محیط‌های کشت دارا بود. این نتیجه نشان می‌دهد که میزان افزایش قطر کالوس در فاصلهٔ چهار روز کاملاً معنی‌دار بوده است ($P< ۰/۰۱$). حتی در فواصل زمانی پایان دورهٔ کشت هم کالوس‌ها هم چنان به رشد خود ادامه می‌دادند.

با مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و محیط کشت، مشخص شد که ارقام ندا و سپید رود، به ترتیب با میانگین قطر کالوس ۵/۶ و ۵/۴ میلی‌متر در محیط کشت MS و رقم نعمت و چرام-۲ هر دو با میانگین قطر ۵/۵ میلی متر در محیط کشت N۶، بیشترین پاسخ را به القای کالوس دادند، و به همراه رقم نعمت در محیط کشت MS، با میانگین قطر کالوس ۵/۳ میلی متر در رتبهٔ اول قرار گرفتند، ضمن این که اختلاف آنها نسبت به

www.SID.ir

Archive of SID

سایرین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. از سوی دیگر، رقم‌های خزر و کامفیروزی در محیط کشت LS، به ترتیب با میانگین قطر کالوس ۲/۷۵ و ۲/۷۴ میلی متر، کمترین میزان پاسخ به القای کالوس را به خود اختصاص دادند (شکل ۲). کویی‌میو و زاپاتا (۲۲) نیز با تجزیهٔ دای آلل روی چهار رقم برنج از هر دو نوع ژاپونیکا و ایندیکا و ۱۶ نتاج آنها، از نظر میزان کالوس‌زایی و باززایی گیاهچه سبز از کشت بساک، نتیجه گرفتند که تفاوت آثار رقم و محیط کشت معنی‌دار بوده است.

نتایج تجزیهٔ واریانس حاکی از معنی‌دار بودن اثر متقابل محیط کشت و زمان برای میزان متوسط قطر کالوس است (جدول ۱). مقایسهٔ میانگین‌های این اثر متقابل نشان داد که در زمان آخر اندازه‌گیری قطر کالوس، دو محیط کشت MS و N۶، به ترتیب با میانگین قطر ۵/۷۳ و ۵/۶۷ میلی متر، بیشترین تولید کالوس را داشتند، و زمان اول اندازه‌گیری در محیط کشت LS با میانگین ۲/۷ میلی متر کمترین میزان را دارا بود (شکل ۱). مفهوم این امر این است که برای همهٔ ارقام برنج مورد مطالعه، متوسط میزان قطر کالوس در پایان دورهٔ کشت، در دو محیط کشت غذایی MS و N۶ یکسان است، و نسبت به زمان‌های اندازه‌گیری قبلی، و نیز نسبت به محیط کشت LS، با آزمون حداقل اختلافات معنی‌دار ($LSD_{\%1}$) در گروه متمایز قرار گرفته است.

نتیجهٔ قابل توجهی که با مشاهدهٔ شکل ۱ به دست می‌آید این است که میزان کالوسی که در چهار روز پس از واکشت در محیط‌های کشت MS و N۶ تولید می‌شود، بسیار بیشتر از کالوسی است که در پایان دورهٔ کشت (۱۶ روز پس از واکشت) در محیط کشت LS تولید می‌گردد. این موضوع بیانگر برتری قطعی دو محیط کشت MS و N۶ بر محیط کشت LS در ارقام برنج مورد مطالعه است. بدیهی است که تولید حداکثر کالوس در مدت زمان کوتاه، یکی از اهداف مهم کشت بافت است. این موضوع علاوه بر صرفه‌جویی در هزینه و وقت، از تنوع سوماکلونی احتمالی در نتیجهٔ طولانی شدن مدت زمان کشت جلوگیری می‌کند (۳۱). هم‌چنین، در مورد کشت‌هایی که محدودیت زمانی دارند، استفاده از محیط کشت MS و N۶ به جای LS، زمان عملیات را به نصف کاهش می‌دهد، که در تسریع پروژه‌های اصلاحی بسیار مهم است.

ارزیابی کالوس‌زایی بر اساس وزن کالوس

نتایج تجزیه واریانس وزن تر کالوس نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، و نیز محیط‌های کشت مورد مقایسه، از نظر میزان کالوس‌دهی در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند. تفاوت بین زمان اول و زمان آخر نمونه‌برداری نیز معنی‌دار بود. هم‌چنین، تمامی آثار متقابل دو عاملی و سه عاملی معنی‌دار ($P<0/01$) بود (شکل ۲).

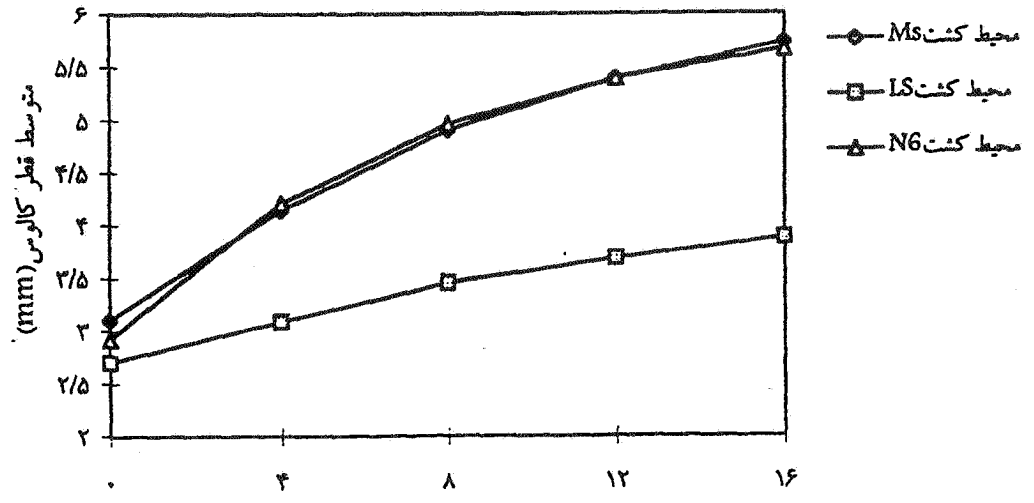
گزارش‌های متعدد نشان می‌دهد که وزن تر کالوس شاخص مناسبی برای رشد کالوس است (۱۵، ۱۹ و ۲۵). مقایسهٔ میانگین‌های سه نوع محیط کشت نشان داد که محیط‌های کشت MS و N۶، به ترتیب با میانگین وزن تر ۰/۷۲ و ۰/۷ گرم در یک گروه، و به عنوان بهترین محیط کشت می‌باشند. محیط کشت LS با میانگین وزن تر ۰/۲۶ گرم در رتبهٔ بعدی قرار گرفت. این نتیجه نشان می‌دهد که بین ارقام کشت MS و N۶ از نظر میزان تولید کالوس اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، و اختلاف این دو محیط با محیط LS کاملاً معنی‌دار است ($P<0/01$).

مقایسهٔ میانگین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نیز بیانگر نقش رقم در پاسخ به کالوس‌زایی از جنین نارس ارقام برنج می‌باشد. رقم‌های نعمت، چرام-۲، سپید رود، طارم محلی و لاین‌های خارجی IRCTN۹۱-۳۳ و IRFAON-۳۰ بیشترین وزن تر کالوس را دارا بودند، و به ترتیب با میانگین وزن تر ۰/۸۲، ۰/۷۶، ۰/۸۱، ۰/۷۳، ۰/۷۲ و ۰/۷۲ گرم در گروه اول قرار گرفتند (جدول ۱). نتیجهٔ فوق عیناً شبیه معیار قبلی (قطر کالوس) است، و حاکی از تأثیر محیط کشت بر میزان رشد کالوس ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است.

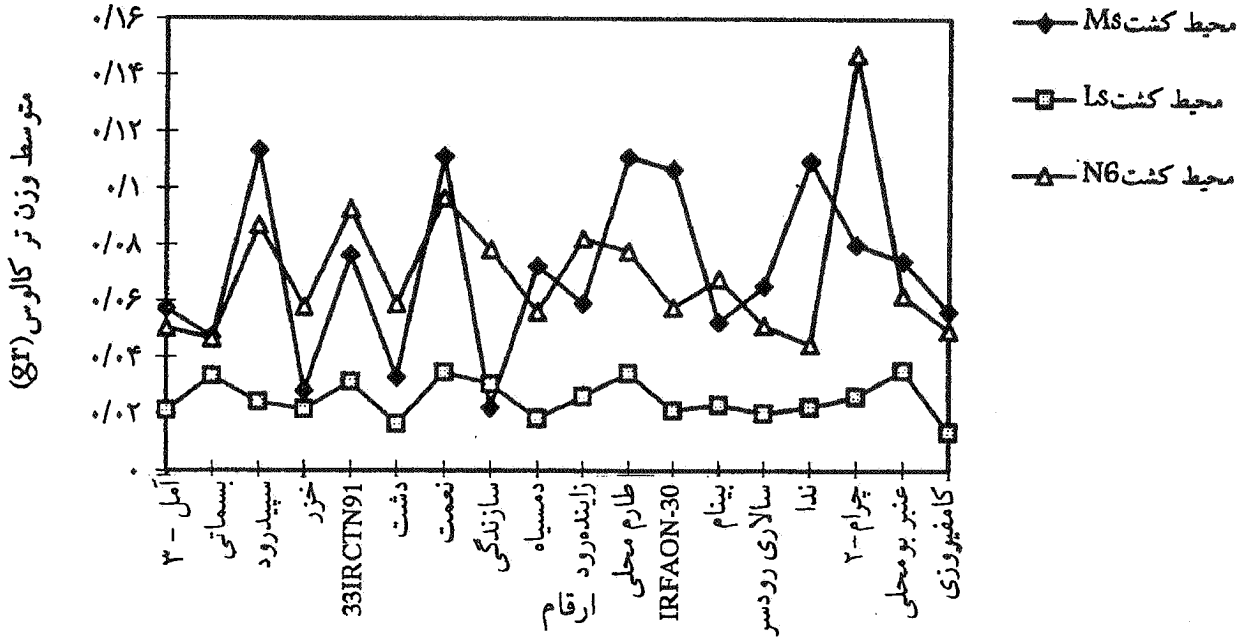
با مقایسهٔ نتیجه معیار ارزیابی قطر کالوس با معیار وزن تر، چنین بر می‌آید که ارقامی نظیر طارم محلی و لاین خارجی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. مقایسهٔ میانگین‌های اثر متقابل محیط کشت و زمان بر اساس متوسط قطر کالوس



شکل ۲. مقایسهٔ میانگین‌های اثر متقابل ژنوتیپ و محیط کشت بر اساس متوسط وزن تر کالوس

۳۳IRCTN۹۱ در ارزیابی قبلی که بر مبنای قطر کالوس بود، در گروه‌های پایین قرار دارند. ولی در این‌جا که بر مبنای وزن تر ارزیابی انجام شد، این ژنوتیپ‌ها در گروه اول جای گرفتند. این حاکی از بالا بودن میزان آب در کالوس این ژنوتیپ است، بدین ترتیب که این کالوس‌ها اگر چه از نظر ظاهری رشد چشم‌گیر ندارند، ولی به علت آبدار بودن توانستند با رقم‌های برتر رقابت کنند. میانگین عامل زمان نیز مقایسه گردید، و زمان آخر با میانگین وزن تر ۰/۰۹۵ گرم در گروه اول، و زمان اول اندازه‌گیری با میانگین ۰/۰۳۵ گرم در گروه دوم قرار گرفت. این نتیجه نیز نشان می‌دهد که افزایش وزن تر کالوس طی ۱۲ روز

www.SID.ir

Archive of SID

(فاصلهٔ بین زمان اول و زمان آخر اندازه‌گیری) کاملاً معنی‌دار بوده است ($P<0/01$).

اثر متقابل محیط کشت و رقم برای وزن تر کالوس نشان داد که رقم چرام-۲ با وزن تر ۰/۱۴۷ گرم در محیط کشت N۶، بیشترین عملکرد را داشت، و در آزمون LSD به تنهایی در رتبهٔ اول قرار گرفت. رقم‌های سپید رود، نعمت، طارم محلی، ندا و لاین IRFAON-۳۰ در محیط کشت MS در گروه بعدی قرار گرفتند. کمترین میزان تولید کالوس از نظر وزن تر مربوط به رقم کامفیروزی، با میانگین ۰/۰۱۳ گرم در محیط کشت LS بود (شکل ۲). با بررسی اثر متقابل محیط کشت و زمان نتیجهٔ جالبی به دست آمد، بدین ترتیب که زمان‌های آخر اندازه‌گیری در محیط‌های کشت MS و N۶ در گروه اول قرار گرفتند، که مورد انتظار نیز بود، ولی در گروه دوم، زمان اول اندازه‌گیری در محیط‌های کشت MS و N۶ و زمان آخر اندازه‌گیری در محیط کشت LS قرار گرفت. این نشان می‌دهد که وزن تر کالوس در زمان اول محیط‌های MS و N۶ هیچ گونه اختلاف معنی داری با زمان آخر اندازه‌گیری در محیط کشت LS ندارد، و طول رشد ۱۲ روزه هیچ تأثیری در افزایش وزن تر کالوس محیط LS نسبت به دو محیط دیگر نداشته است (شکل ۳). مشابه چنین نتیجه‌ای در مورد معیار قبلی نیز بحث گردید، و همانگونه که ذکر شد، استفاده از محیط‌های کشت MS و N۶ تأثیر زیادی در تولید کالوس در مدت زمان کوتاه، و در نتیجه کوتاه کردن دورهٔ اصلاحی دارد.

محاسبهٔ درصد محتویات آبی

همان گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، محیط‌های کشت و ارقام مورد مطالعه و اثر متقابل آنها، از نظر درصد محتویات آبی در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی دار داشتند. علاوه بر این، عامل زمان و اثر متقابل آن با هر یک از عوامل فوق نیز دارای اختلاف معنی‌دار از نظر محتویات آبی بودند ($P<0/01$).

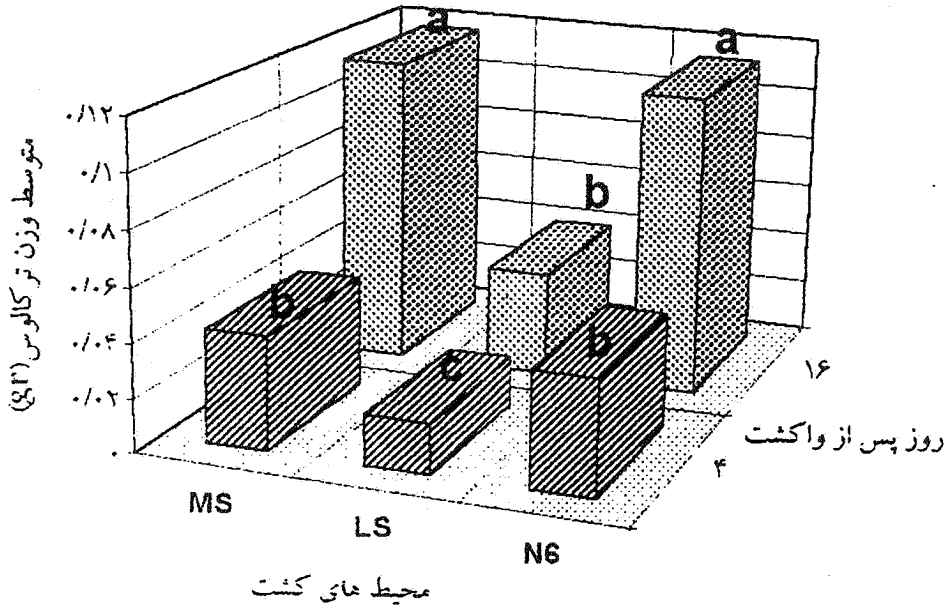
مقایسهٔ میانگین سه محیط کشت نشان داد که محیط کشت MS با ۸۶ درصد محتویات آبی برای کالوس‌ها در گروه اول، محیط کشت N۶ با ۸۳ درصد در گروه دوم، و محیط کشت LS با ۸۲ درصد در گروه سوم قرار گرفت ($P<0/01$). بنابراین، محیط کشت MS که از نظر میزان تولید کالوس (بر حسب قطر یا وزن تر) اختلاف معنی‌داری با محیط کشت N۶ نداشت، از نظر درصد محتویات آبی نسبت به این محیط کشت برتری نشان داد. دلیل آن را می‌توان چنین بیان نمود که به علت مقدار زیاد ساکارز، هم‌چنین استفاده از کازئین هیدرولیزات در ترکیب محیط کشت N۶، میزان پتانسیل اسمزی این محیط نسبت به محیط کشت MS بیشتر بوده، و بدیهی است که در محیط‌های کشت با پتانسیل اسمزی زیاد قابلیت جذب آب توسط کالوس کاهش می‌یابد.

مقایسهٔ میانگین ارقام مورد مطالعه نشان داد که رقم‌های نعمت، زاینده‌رود و لاین ۳۳IRCTN۹۱ بیشترین درصد محتویات آبی را دارا بودند. ارقام دشت، آمل-۳، ندا و لاین IRFAON-۳۰ کمترین میزان آب را داشتند و در گروه آخر قرار گرفتند (شکل ۴). با مقایسهٔ نتایج این بخش و اثر متقابل رقم و زمان، با استفاده از دو معیار ارزیابی کالوس‌زایی، چنین استنباط می‌گردد که لاین ۳۳IRCTN۹۱ دارای کالوس آبدار است و همان طور که در ارزیابی با معیار اول مشاهده شد از نظر قطر در گروه پنجم آزمون مقایسهٔ میانگین‌ها قرار داشت، ولی در این‌جا از نظر وزن به گروه اول ارتقا یافت. نظیر همین مطلب در مورد رقم طارم محلی نیز صادق است، به طوری که این رقم از گروه هفتم آزمون LSD در آزمایش اول به گروه دوم در این بخش انتقال یافت. از طرفی، رقم چرام-۲ که از نظر قطر و وزن تر در مقام نخست قرار داشت، از نظر درصد محتویات آبی در گروه سوم جای گرفت. بنابراین، چنین نتیجه‌گیری می‌شود که کالوس‌های حاصل از ارقام مختلف دارای میزان آب متفاوتی هستند، که این میزان در حالت کلی مستقل از اندازهٔ قطر آنهاست.

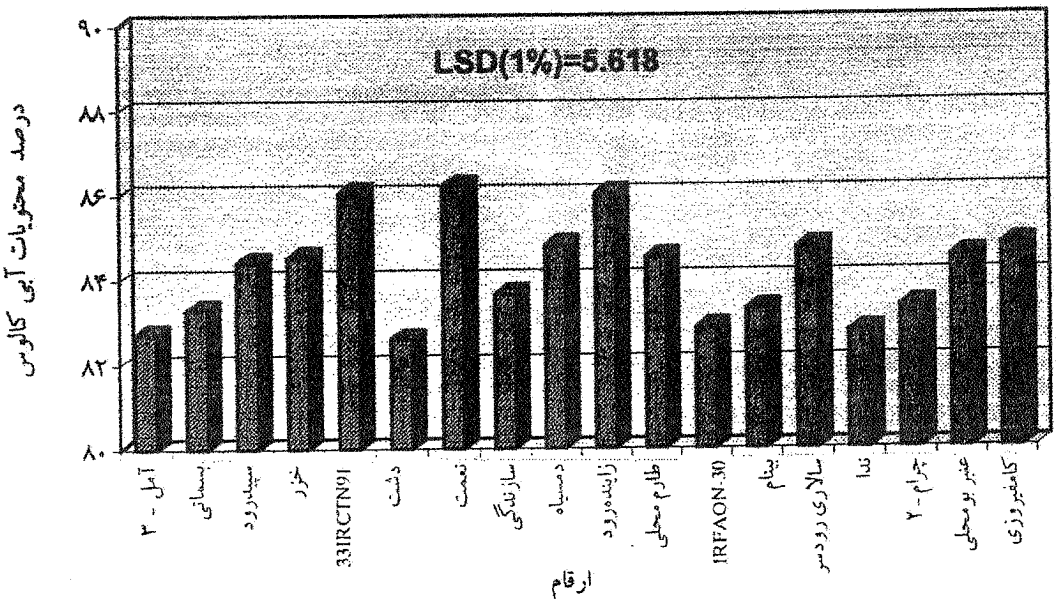
مقایسه میانگین عامل زمان نیز حاکی از معنی‌دار بودن تفاوت زمان‌های اول و آخر نمونه‌برداری از نظر میزان آب کالوس‌ها بود ($P<0/01$).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. مقایسهٔ میانگین‌های اثر متقابل محیط کشت و زمان بر اساس متوسط وزن تر کالوس

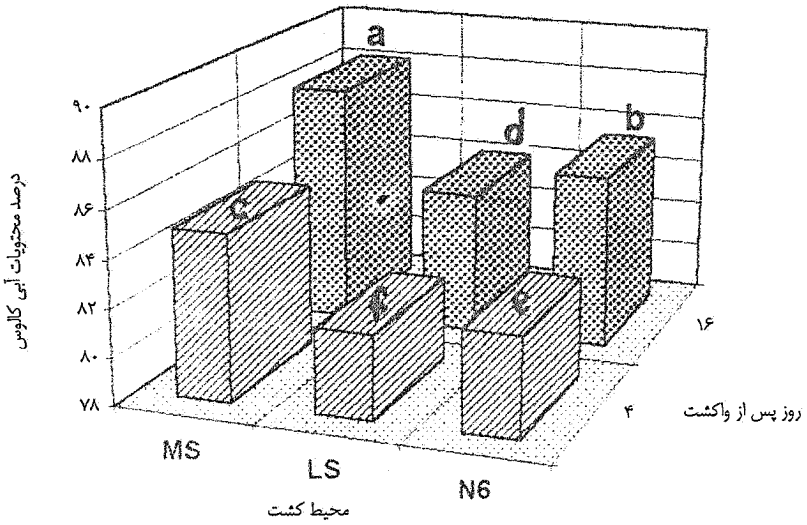


شکل ۴. مقایسهٔ میانگین‌های ارقام بر اساس درصد محتویات آبی کالوس

مقایسه میانگین اثر متقابل محیط کشت و زمان نیز معنی‌دار شدن تمامی سطوح مورد مطالعه را نشان داد. به طوری که محیط‌های MS و N۶ در زمان آخر نمونه‌برداری، به ترتیب در دو گروه مستقل قرار گرفتند. نکته قابل توجه این بود که میزان محتویات آبی کالوس‌های موجود در محیط کشت LS در زمان آخر نمونه‌برداری، بسیار کمتر از آب کالوس‌های محیط‌های کشت MS و N۶ در زمان اول نمونه‌برداری بود. این بیانگر رکود و عدم رشد کالوس در محیط کشت LS است (شکل ۵). با ملاحظه مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و زمان، برتری لاین ۳۳IRCTN۹۱ از نظر میزان آب کالوس آشکار می‌شود، که به

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵. مقایسهٔ میانگین‌های اثر متقابل محیط کشت و زمان بر اساس درصد محتویات آبی کالوس

تنهایی در گروه اول جای گرفت، و رقم‌های زاینده رود، طارم محلی و نعمت در رتبه بعدی قرار گرفتند.

باززایی گیاهچه

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که ارقام مورد مطالعه، محیط‌های کشت کالوس‌زایی و اثر متقابل این دو عامل اثر معنی‌داری بر درصد باززایی گیاهچه‌های برنج دارند (شکل ۶). با ملاحظه مقایسهٔ میانگین‌های ژنوتیپ‌های مورد مطالعه (شکل ۶)، چنین برمی‌آید که لاین ۳۳IRCTN۹۱ و رقم عنبربو محلی، بیشترین درصد باززایی را داشتند و به همراه ارقام نعمت، چرام-۲ و طارم محلی در رتبهٔ اول آزمون LSD قرار گرفتند ($P<0/01$)، در حالی که ارقام بسماتی و سازندگی دارای کمترین درصد باززایی بودند.

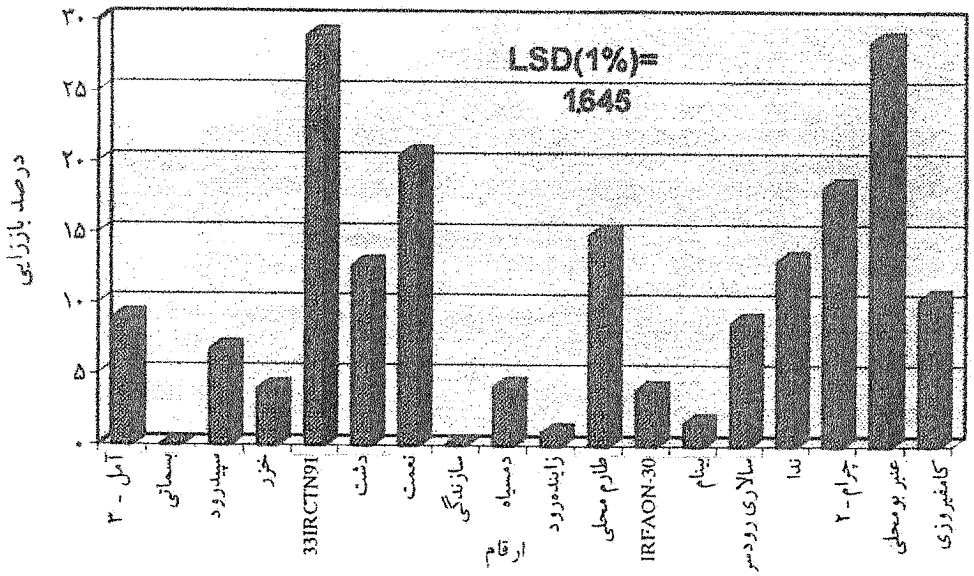
همان گونه که در شکل ۶ ملاحظه می‌شود، رقم عنبربو محلی و لاین ۳۳IRCTN۹۱ از گروه ژنوتیپ‌هایی هستند که بیشترین میزان باززایی را به خود اختصاص داده‌اند. این دو رقم متعلق به تیپ زراعی ژاپونیکا می‌باشند و بقیه از نوع ایندیکا هستند (جدول ۱). این بررسی نشان می‌دهد که ارقام ژاپونیکا به همراه تعدادی از ارقام ایندیکا پاسخ مناسبی به کشت بافت دادند، که این ارقام ایندیکا در آزمایش‌های کالوس‌زایی نیز پاسخ خوبی به کشت بافت داده بودند. از طرفی، رقم خارجی بسماتی یک رقم معروف از نوع ایندیکا است، که گزارش‌های زیادی در زمینهٔ کشت بافت این رقم موجود است. به عنوان نمونه، باسو و همکاران (۴) در مطالعه خود مقاومت به شوری را در این رقم مورد ارزیابی قرار دادند. چنان که از جدول برمی‌آید، این رقم درصد باززایی کمی دارد. در آزمایش‌های کالوس‌زایی نیز این رقم، عملکرد کمی داشت.

کیوزوکا و همکاران (۱۵) اظهار داشتند که پاسخ ارقام برنج ایندیکا به کشت پروتوپلاست متفاوت است. پاسخ برخی از این ارقام به خوبی واریته‌های ژاپونیکا بوده و در مقابل این تنوع در پاسخ ارقام ایندیکا، تنوع کمی در ارقام ژاپونیکا مشاهده شده است. گزارش‌های موجود نیز حاکی از برتری برنج‌های ژاپونیکا بر ایندیکا از نظر پاسخ به کشت بافت می‌باشد، که تأییدی بر نتیجه به دست آمده در این آزمایش است (۱، ۱۱، ۱۳، ۱۷ و ۱۸). بریزیب و همکاران (۷) در گزارش خود، علاوه بر نقش رقم در فراوانی گیاهان حاصل از کالوس، اثر منبع اکسینی به کار رفته را در محیط کشت مهم ذکر نمودند. تاکئوشی و همکاران (۲۷) نیز به دخالت برخی عوامل ژنتیکی در باززایی گیاه برنج از کالوس اشاره کردند.

مقایسهٔ میانگین محیط‌های کشت القای کالوس نشان داد که

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶. مقایسهٔ میانگین‌های ارقام بر اساس درصد باززایی

درصد باززایی کالوس‌های حاصل از دو محیط کشت MS و N۶ با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند، ولی کالوس‌های حاصل از محیط کشت LS به طور معنی‌داری درصد باززایی کمتری دارند.

مقایسهٔ میانگین‌های اثر متقابل محیط کشت و رقم نیز حاکی از آن بود که کالوس‌های ارقام عنبربو محلی، چرام -۲، نعمت و لاین ۳۳IRCTN۹۱ رشد یافته در محیط کشت MS، و کالوس‌های ارقام عنبربو محلی، نعمت، ندا، طارم محلی و لاین ۳۳IRCTN۹۱ رشد یافته در محیط کشت N۶، بیشترین درصد باززایی را دارا بودند، و در گروه اول آزمون LSD قرار گرفتند.

با توجه به این نتایج، مشاهده می‌شود که کالوس‌های رقم چرام-۲ که در محیط کشت MS تولید شده‌اند، برای باززایی بسیار مناسب‌تر از کالوس‌های تولید شده در محیط کشت N۶ هستند، و یا کالوس‌های تولیدی ارقام طارم محلی و ندا در محیط کشت N۶، پتانسیل باززایی بیشتری نسبت به کالوس‌های تولید شده در محیط کشت MS دارند. در این‌جا نیز نقش اثر متقابل رقم و محیط کشت مشخص است، که با گزارش‌های متعدد (۳، ۷، ۱۲، ۱۳ و ۲۲) مطابقت دارد.

هم‌بستگی بین صفات

برای بررسی روابط موجود بین صفات اندازه‌گیری شده، ضرایب هم‌بستگی بین این صفات تعیین گردید. از آن جایی که این صفات در سه محیط کشت جداگانه و با ترکیب متفاوت مطالعه شده است، بنابراین برای حذف اثر محیط کشت بر هم‌بستگی صفات، ضرایب هم‌بستگی به طور جداگانه محاسبه گردید (جداول ۲، ۳ و ۴). در تمامی محیط‌های کشت، هم‌بستگی مثبت و معنی‌داری بین قطر کالوس و وزن تر کالوس وجود داشت ($P<0/01$)، که بیانگر رابطهٔ قوی بین قطر و وزن کالوس می‌باشد. بین درصد باززایی از گیاهچه و میزان قطر و وزن تر و خشک کالوس هیچ ارتباط معنی‌داری وجود نداشت. با توجه به این که صفاتی همچون قطر و وزن کالوس از صفات بارز رشد کالوس می‌باشند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بین میزان کالوس‌زایی از جنین نارس برنج و درصد باززایی گیاهچه از کالوس هیچ ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. اوزگن و همکاران (۲۱) نیز در مطالعه کالوس‌زایی جنین نارس ژنوتیپ‌های گندم، هیچ هم‌بستگی بین کالوس‌زایی و باززایی از کالوس مشاهده نکردند. آنها این موضوع را به کنترل ژنتیکی مستقل در دو

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. ضرایب هم‌بستگی بین صفات مختلف در محیط کشت MS برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

صفات	قطر کالوس	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس	درصد محتویات آبی کالوس	درصد باززایی
قطر کالوس	۱				
وزن تر کالوس	۰/۸۹	۱			
وزن خشک کالوس	۰/۸۷	۰/۹۵	۱		
درصد محتویات آبی کالوس	۰/۵۳	۰/۶۳	۰/۴۲	۱	
درصد باززایی	۰/۲۲	۰/۲۹	۰/۲۹	۰/۲۸	۱

- ضرایب هم‌بستگی بزرگ‌تر از ۰/۵۷۵+ و کوچک‌تر از ۰/۵۷۵- در سطح احتمال یک درصد، و ضرایب هم‌بستگی بزرگ‌تر از ۰/۴۵۶+ و کوچک‌تر از ۰/۴۵۶- در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار می‌باشند (n=۱۸).

جدول ۳. ضرایب هم‌بستگی بین صفات مختلف در محیط کشت LS برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

صفات	قطر کالوس	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس	درصد محتویات آبی کالوس	درصد باززایی
قطر کالوس	۱				
وزن تر کالوس	۰/۷۹	۱			
وزن خشک کالوس	۰/۸۶	۰/۹۵	۱		
درصد محتویات آبی کالوس	۰/۱۷	۰/۳۷	۰/۱۱	۱	
درصد باززایی	۰/۱۸	۰/۲۱	۰/۲۱	-۰/۰۱	۱

- ضرایب هم‌بستگی بزرگ‌تر از ۰/۵۷۵+ در سطح احتمال یک درصد، و بزرگ‌تر از ۰/۴۵۶+ در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار می‌باشند (n=۱۸).

جدول ۴. ضرایب هم‌بستگی بین صفات مختلف در محیط کشت N۶ برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

صفات	قطر کالوس	وزن تر کالوس	وزن خشک کالوس	درصد محتویات آبی کالوس	درصد باززایی
قطر کالوس	۱				
وزن تر کالوس	۰/۶۷	۱			
وزن خشک کالوس	۰/۶۷	۰/۹۶	۱		
درصد محتویات آبی کالوس	۰/۲۳	۰/۴۲	۰/۲۲	۱	
درصد باززایی	-۰/۲۲	-۰/۰۹	-۰/۰۸	-۰/۱۹	۱

- ضرایب هم‌بستگی بزرگ‌تر از ۰/۵۷۵+ و کوچک‌تر از ۰/۵۷۵- در سطح احتمال یک درصد، و ضرایب هم‌بستگی بزرگ‌تر از ۰/۴۵۶+ و کوچک‌تر از ۰/۴۵۶- در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار می‌باشند (n=۱۸).

مرحلهٔ کالوس‌زایی و باززایی نسبت دادند.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتایج حاصل از این مطالعه بر روی ۱۸ رقم برنج و سه محیط MS، LS و N۶ حاکی از مهم بودن تأثیر رقم و محیط کشت و اثر متقابل آنها بر روی کالوس‌زایی از جنین نارس و باززایی گیاهچه از کالوس‌های حاصله می‌باشد. بنابراین، برای هر کشت این ویترو موفقیت‌آمیز، لازم است ترکیب مناسب محیط کشت

www.SID.ir

Archive of SID

برای هر گروه ژنوتیپی معین معلوم گردد. مشابه با سایر گزارش‌ها، در این آزمایش نیز در صفت درصد باززایی گیاهچه برنج‌های تیپ ژاپونیکا در زمرهٔ بهترین ژنوتیپ‌ها بودند. هم‌چنین، از نظر عملکرد کالوس و میزان باززایی محیط‌های کشت MS و N۶ برتری قابل ملاحظه‌ای نسبت به محیط کشت LS نشان دادند. به طوری که کالوسی که در چهار روز پس از واکشت در این دو محیط تولید شده، بسیار بیشتر از کالوسی بود که در پایان دوره کشت در محیط کشت LS تولید گردید. بدیهی است که تولید کالوس بیشتر در مدت زمان کمتر، یکی از اهداف مهم روش‌های کشت بافت می‌باشد.

در این مطالعه معلوم شد که ویتامین‌ها و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، بخصوص هورمون اکسین به کار رفته در محیط کشت، تأثیر شگرفی بر القای کالوس از جنین نارس برنج دارد. هم‌چنین، مشخص شد که اگر محیط‌های کشت غذایی در میزان ویتامین‌ها و تنظیم کننده‌های رشد تفاوت نداشته باشند، احتمالاً در میزان القای کالوس از جنین نارس برنج تفاوت معنی‌داری ندارند. به عبارتی، می‌توان گفت که ترکیبات پر مصرف و کم مصرف، اثر معنی‌داری بر کالوس‌زایی از جنین نارس برنج ندارند. با بررسی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر القای کالوس و باززایی گیاهچه از کالوس، مشخص شد که ارقام نعمت و چرام-۲، از هر نظر بر سایر ارقام برتری داشتند، و برای تولید کالوس از جنین نارس، و نیز باززایی گیاهچه از آن بسیار مناسب هستند.

از آن جایی که نقش کنترل ژنتیکی پاسخ به کشت این ویترو در گیاه برنج حایز اهمیت زیادی است، بنابراین در طرح‌های به نژادی که بر پایه کشت بافت استوار است، توصیه می‌شود از ارقام نعمت و چرام-۲، و یا از ژنوتیپ‌های برنج تیپ ژاپونیکا، که در کشور کشت و کار می‌شود، به عنوان والد در تلاقی‌ها استفاده شود. نیز لازم است مطالعات ژنتیکی در زمینهٔ شناسایی نحوه وراثت ژن‌های مسئول کالوس‌زایی و باززایی صورت گرفته، و در صورت لزوم این ژن‌ها به ارقام مورد نظر انتقال یابند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای حسنعلی عابدی از مرکز تحقیقات اصفهان به خاطر تأمین بخشی از بذور مورد استفاده، و هم چنین همکاری صمیمانه در اجرای مزرعه‌ای طرح قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

1. Abe, T. and Y. Futsuhara. 1986. Genotypic variability for callus induction and plant regeneration in rice (*Oryza sativa*). Theor. Appl. Genet. 72: 3-10.
2. Arzani, A. and S. S. Mirodjagh. 1999. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and *in vitro* salt stress. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 58: 67-72.
3. Barakat, M. N. 1994. Combining ability of *in vitro* traits in wheat (*Triticum aestivum* L.) immature embryo culture. Euphytica. 76: 169-175.
4. Basu, S., G. Gangopadhyoy, B. B. Mukherjee and S. Gupta. 1997. Plant regeneration of salt adapted callus of indica rice (var. Basmati 370) in saline conditions. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 50: 153-159.
5. Bhaskaran, S. and R. H. Smith. 1990. Regeneration in cereal tissue culture: A review. Crop Sci. 30: 1328-1336.
6. Bright, S. W. J. and M. G. K. Jones. 1985. Cereal Tissue and Cell Culture. Martinus Nijhoff, London, UK.
7. Brisibe, E. A., H. Miyake, T. Taniguchi and E. Meada. 1992. Callus formation and scanning electron microscopy of plantlet regeneration in Africa rice (*Oryza glaberrima* Sleud). Plant Sci. 83: 217-224.
8. Chu, C. 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. pp. 45-50, *In*: Proc.

www.SID.ir

Archive of SID

Plant Tissue Culture Symp. Science, Peking, China.

9. Christou, P., T. L. Ford and M. Kofron. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. Bio/Tech. 9: 957-962.
10. Close, K. R. and L. A. Gallagher-Ludeman. 1989. Structure-activity relationships of auxin-like plant growth regulators and genetic influences on the culture induction responses in maize (*Zea mays* L.). Plant Sci. 61: 245-252.
11. Ghosh, G. C. and F. J. Zapata. 1993. High-frequency plant regeneration from protoplasts of indica rice (*Oryza sativa* L.) using maltose. J. Plant Physiol. 141: 470-475.
12. Henry, Y., P. Vain and J. Buyser. 1994. Genetic analysis of in vitro plant tissue culture responses and regeneration capacities. Euphytica 79: 45-58.
13. Khanna, H. K. and S. K. Raina. 1998. Genotype×culture media interaction effects on regeneration responses of three indica rice cultivars. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 52: 145-153.
14. Kuroda, S., H. Kato and R. Ikedo. 1998. Heterosis and combining ability for callus growth rate in rice. Crop Sci. 38: 933-936.
15. Kyozuka, J., E. Otoo and K. Shimamoto. 1988. Plant regeneration from protoplasts of indica rice: Genotypic differences in culture response. Theor. Appl. Genet. 76: 887-890.
16. Linsmaier, E. M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tabacco tissue culture. Physiol. Plant 18: 101-127.
17. Marassi, M. A., O. A. Bovo, G. L. Lavia and L. A. Mroginski. 1993. Regeneration of rice double haploids using a one step culture procedure. J. Plant Physiol. 141: 610-614.
18. Miah, M. A. A., E. D. Earle and G. S. Khush. 1985. Inheritance of callus formation ability in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 70: 113-116.
19. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-497.
20. Ogawa, T., H. Fukuoka, H. Yano and Y. Ohkawa. 1999. Relationships between nitrite reductase activity and genotype-dependent callus growth in rice cell cultures. Plant Cell Reports 18: 576-581.
21. Özgen, M., M. Tüert, S. Özcan and C. Sancak. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. Plant Breeding 115: 455-458.
22. Qiomio, C. A. and F. J. Zapata. 1990. Diallel analysis of callus induction and green-plant regeneration in rice anther culture. Crop Sci. 30: 188-192.
23. Raina, S. K. 1989. Tissue culture in rice improvement: Status and potential. Adv. Agron. 42: 339-397.
24. SAS Institute. 1997. SAS User's Guide, Ver. 6.12, SAS Institute Inc., Cary, NC.
25. Sears, R. G. and E. L. Deckard. 1982. Tissue culture variability in wheat: Callus induction and plant regeneration. Crop Sci. 22: 546-550.
26. Seraj, Z. I., Z. Islam, M. O. Faruque, T. Devi and S. Ahmed. 1997. Identification of the regeneration potential of embryo derived calluses from various indica rice varieties. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 48: 9- 13.
27. TaKeuchi, Y., T. Abe and T. Sasahara. 1997. Genetic analysis of plant regeneration from seed-deived calli in rice (*Oryza sativa* L.). Crop Sci. 37: 963-965.

www.SID.ir

Archive of SID

28. Thorpe, T. A. 1981. Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture. Academic Press, New York.

29. Yamagishi, M. O. and T. Shimada. 1996. A comparison of somaclonal variability in rice plants derived and not derived from protoplasts. Plant Breeding 115: 289-294.

30. Yoshida, K. 1995. Evidence for the involvement of glycanase activities in the dissociation of cortical cell walls during the emergence of callus from rice root tissues in presence of 2, 4-D. Plant Cell Reports 15: 43-50.

31. Zapata, F. J. and E. M. Abrigo. 1968. Plant regeneration and screening from long-term NaCl-stressed rice callus. International Rice Res. News 11: 24-25.

www.SID.ir