



نشریه زراعت

شماره ۱۰۴، پائیز ۱۳۹۳

(پژوهش و سازندگی)

اثر مدت زمان و غلظت تیمار کلشی سین بر فراوانی تولید برنج دابل هاپلوئید

- اعظم اقلیدی، محقق بخش اصلاح و تهیه بذر موسسه تحقیقات برنج کشور (نویسنده مسئول)
- غلامرضا بخشی خانیکی، استاد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور تهران
- علی اکبر عبادی، استادیار پژوهش و عضو هیئت علمی بخش اصلاح و تهیه بذر موسسه تحقیقات برنج کشور
- محمود صیادی، محقق بخش اصلاح و تهیه بذر موسسه تحقیقات برنج کشور

تاریخ دریافت: تیر ماه ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۱۳۹۰
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۱۱۴۹۰۰۵۷

پست الکترونیک نویسنده مسئول: aeghlidi@yahoo.com

چکیده:

کاربرد کشت بساک و تولید گیاهان هاپلوئید در تولید واریته های جدید تاثیر بسزائی در کاهش زمان و هزینه های اصلاحی داشته است. کلشی سین مهمترین ماده جهت دو برابر کردن مجموعه کروموزومی و ایجاد دابل هاپلوئیدهاست. این تحقیق با هدف بررسی تاثیر غلظت های متفاوت کلشی سین بر دابل هاپلوئید شدن بوته های هاپلوئید برنج در زمان های متفاوت صورت گرفت. در این تحقیق بوته های هاپلوئید حاصل از کشت بساک دو رقم هیبرید GRH1 (دیلیم) و IR69 در سه غلظت ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ گرم بر لیتر و سه تیمار زمانی ۸، ۱۲ و ۱۸ ساعت در قالب آزمایش فاکتوریل کاملا تصادفی در سه تکرار تحت تیمار با کلشی سین واقع شدند. نتایج نشان داد که درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلوئید در رقم GRH1 بطور معنی داری بیشتر از رقم IR69 بود (بترتیب ۵۳/۳۳ درصد و ۴۵/۹۲ درصد). همچنین بیشترین درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلوئید در غلظت ۰/۱ و کمترین آن در غلظت ۰/۰۵ (بترتیب ۵۳/۳۳ و ۳۷/۷۷) و بهترین زمان تیمار ۱۲ ساعت (با ۸۶/۸۸۹ درصد) بود. رقم GRH1 در غلظت ۰/۱ و زمان ۱۲ ساعت بیشترین میانگین درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلوئید (به میزان ۸۶/۶۶) را داشت.

کلمات کلیدی: واژه های کلیدی: هاپلوئید، دو برابر کردن کروموزوم، غلظت، کلشی سین، برنج

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No:104 pp: 2-8

Study on the effects of time and concentration of colchicine treatment in doubled haploid rice production

By:

- A. Eghlidi, (Corresponding Author; Tel: 09111490057), Researcher of Iran Rice Research Institute
- Gh. Bakhshi Khaniki, Professor of Payame Noor University of Tehran
- A. Ebadi, Assistant Professor of Iran Rice Research Institute
- M. Saiadi, Researcher of Iran Rice Research Institute

Received: July 2009

Accepted: August 2011

Anther culture application and haploid plant production for releasing new varieties have led to shorten plant breeding cycle. Colchicine is one of the most important materials for doubling chromosomes set and doubled haploid production. The main purpose of this study was to determinate the best colchicine concentration for doubling rice chromosomes. For this purpose, two pollen-driven haploid plantlets of two hybrid rice (GRH1 and IR69) at the booting stage were selected to treat with colchicine in three concentration levels (0.05, 0.1, 0.15 g/l) and three time treatments (8, 12, 18h). The experiment carried out as a factorial experiment complete block design in three replications. Results showed that plantlet percentage of doubled haploid tillers in GRH1 were significantly more than IR69 (53.33 and 45.59 respectively). Also the most percentage of plantlets with double haploid tillers were in 0.1g/l and the minimum of them were in 0.05 g/l (53.33 and 37.77 respectively). The best time treatment was 12 hours (86.889). In 0.1 g/l concentration level and 12 hours had the most percentage of plantlets with doubled haploid tillers.

Keywords: Colchicine, Concentration, Doubling Chromosome, Haploid, *Oryza sativa*

مقدمه

برنج، یکی از منابع عمده غذایی است که بیش از نیمی از جمعیت جهان از نظر تامین کالری و پروتئین به آن وابسته اند. خصوصاً در بین کشورهای آسیایی که بیش از ۵۰ درصد از کالری مورد نیاز روزانه آنها از برنج تامین می گردد [Bajaj, 1991]. با توجه به روند رو به افزایش جمعیت جهان، طبق آمارهای سازمان خواروبار جهانی (فائو) تا سال ۲۰۲۵ میزان ۷۶۰ میلیون تن شلتوک نیاز خواهد بود تا بتوان میزان تقاضای جمعیت جهان را به این منبع مهم غذایی تامین نمود و این در حالی است که بیشتر زمین های زراعی مورد بهره برداری قرار گرفته است. بویژه در آسیا که بیش از ۹۰ درصد از برنج جهان تولید و مصرف می شود [Kush 2004]. بنابراین، افزایش تولید برنج در آینده، نیاز به بهبود راندمان تولید و ابداع تکنولوژی های جدیدتری دارد. روش های کشت بافت برنج، می تواند در اصلاح و تولید ااریته هایی با عملکرد بالا و مقاوم به آفات و بیماری ها کمک نماید [Zapata, 1984]. کشت بافت گیاهی، فرآیندی است که در آن قطعات کوچکی از بافت زنده از گیاه جدا و در یک محیط مغذی رشد داده میشود. کشت بافت گیاهی یا کشت گندزدایی شده سلولها، بافتها و اندامها تحت شرایط فیزیکی و شیمیایی معین در شرایط درون شیشه ابزاری مهم در مطالعات پایه و کاربردی میباشد. این تکنیک مهم، مرهون نظریات دانشمندان آلمانی هابرلانت در آغاز قرن بیستم است [Trevor and Thrope, 2007]. یکی از کاربردهای کشت بافت، تولید گیاهان هاپلوئید است. مهمترین روش های تولید گیاهان هاپلوئید در محیط درون شیشه ای شامل کشت بساک، کشت دانه گرده جدا شده و کشت تخمک می باشد. کشت بساک رایج ترین شکل کشت گرده است که بساکها در مرحله نموی تک هسته ای انتخاب میشوند.

[Bahar, et al. 2008]. تولید گیاهان هاپلوئید در برنج با استفاده از کشت بساک اولین بار توسط اونو و نیزیکی در سال ۱۹۶۸ انجام شد. [Niizeki and Oono, 1968] تکنیک های کشت بساک در برنامه های اصلاحی برنج اهمیت بسیاری دارد. چون موجب افزایش کارایی انتخاب شده، دوره اصلاحی را تسریع نموده و امکان تولید سریع تر و انتخاب لاین های موتانت مفیدتری را در برنامه های اصلاحی موتاسیونی میدهد. بدلیل اینکه این تکنیکها در بر گیرنده گامت های هاپلوئید (دانه های گرده) بجای والدین دیپلوئید است، تعداد گیاهان لازم جهت بیان باز ترکیب های مختلف، کمتر از روش های سنتی است. [Guey, 2010] تولید گیاهان هاپلوئید و دوبرابر نمودن مجموعه کروموزومی (ژنوم) آنها به ایجاد گیاهان دابلد هاپلوئید منجر میگردد. این روش، سریعترین روش برای دستیابی به لاین های صد در صد خالص اینبرد لاین) میباشد [Zapata, 1984. Talebi et al., 2007]. کلشی سین، مهمترین عامل شیمیایی، جهت دوبرابر کردن کروموزومها می باشد که در سطح وسیعی بکار می رود. [Burun 2008., Ryopy, 1997. Segui-Simarro and Nuez, 2008]. کلشی سین، باز دارنده رشته های دوکی شکل و عمل کننده در سلول های در حال تقسیم گیاهان میباشد که از تشکیل میکروتوبولها، از طریق پیوند با زیر واحد پروتئینی میکروتوبولی (توبولین) ممانعت میکند. لذا کروموزومها در مرحله متافاز، یک جا وارد یک سلول میگردد. در نتیجه تعداد کروموزوم سلول حاصل از تقسیم دو برابر میگردد [Nitch and Kasha, 1975]. این مطلب که گیاهان حاصل از کشت بساک و دانه گرده، درجات پلوئیدی متفاوتی مانند x, 2x, 3x, 4x و 5x دارند بخوبی شناخته شده است. ولی بیشتر آنها هاپلوئید و دیپلوئید هستند. طبق گزارش هوآنگ

سطح (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵) و زمان (۸، ۱۲ و ۱۸ ساعت) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و در هر تکرار ۵ بوته انجام گرفت. جهت انجام بهتر و دقیق تر آزمایش بوته های مربوط به هر غلظت بطور جداگانه در یک روز برداشت و آماده تیمار شدند. بطور مثال ابتدا میزان محلول لازم برای غلظت ۰/۰۵ تهیه گردید. پس از ریختن محلول در ظرف مخصوص بوته های آماده شده برای این غلظت یعنی ۴۵ بوته از هیبرید GRH1 (5 بوته به ازاء هر تکرار، سه تکرار و سه زمان مختلف) در داخل ظرف قرار داده شد. بعد از ۸ ساعت بوته های مربوط به زمان اول یعنی ۱۵ بوته برداشت گردید. بعد از ۱۲ ساعت ۱۵ بوته مربوط به زمان دوم و پس از ۱۸ ساعت ۱۵ بوته مربوط به زمان سوم برداشت شدند سپس ۴۵ بوته مربوط به غلظت ۰/۱ و بعد ۴۵ بوته مربوط به غلظت ۰/۱۵ از هیبرید GRH1 به شرح فوق تیمار گردیدند سپس همین کار برای ۱۳۵ بوته مربوط به هیبرید IR69 انجام گرفت. بوته های تیمار شده با کلسی سین پس از اتمام زمان مقرر بمدت ۲۴ ساعت در آب جاری قرار گرفت و سپس در گلدان هایی که محتوی خاک مزرعه بود کشت گردید. بوته های کاشته شده در گلدان به گلخانه منتقل شدند. و در طی این مدت، کلیه مراقبت های زراعی مانند آبیاری، وجین علف های هرز، کوددهی (در صورت نیاز) و مبارزه با آفات و بیماری ها انجام گردید. صفاتی که در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفت عبارت بودند از ۱- میانگین تعداد پنجه تولید شده در هر بوته ۲- متوسط تعداد پنجه دابل هاپلوئید تولید شده در هر بوته ۳- درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلوئید ۴- درصد بوته های دارای پنجه پلی پلوئید ۵- درصد بوته های دارای هر دو نوع پنجه دابل هاپلوئید و پلی پلوئید ۶- متوسط تعداد بذور در هر خوشه. کلیه صفات مذکور اندازه گیری شدند و داده ها ثبت گردیدند تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار MSTATC انجام و مقایسه میانگین تیمار ها و اثرات متقابل آنها بر صفات اندازه گیری شده بر اساس آزمون LSD انجام شد.

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق شش صفت اندازه گیری و مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج مربوط به هر صفت بطور جداگانه ارائه و مورد بحث و بررسی قرار می گیرد. در صفات درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلوئید، درصد بوته های دارای پنجه پلی پلوئید و درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلوئید و پلی پلوئید بدلیل نرمال نبودن داده هادر ابتدا تبدیل داده ها به صورت $\sqrt{x} + 0.5$ انجام شد و سپس تجزیه واریانس و مقایسات میانگین بر روی داده ها ی تبدیل شده صورت گرفت ولی در جداول مقایسه میانگین از میانگین های اصلی استفاده شد.

۱- میانگین تعداد پنجه تولید شده در هر بوته

تجزیه واریانس این صفت نشان داد که تفاوت معنی داری بین دو واریته، سه غلظت مختلف کلسی سین و سه زمان متفاوت وجود دارد که این نشان دهنده متفاوت بودن دو رقم در صفت درصد پنجه زنی می باشد و از طرفی این صفت تحت تاثیر غلظت و زمان تیمار کلسی سین نیز می باشد. اما اثر متقابل واریته در غلظت، واریته در زمان، غلظت در زمان و واریته در غلظت در زمان معنی دار نشده است (جدول ۱).

مقایسه میانگین واریته ها نشان داد که رقم دیلم (GRH1) بیشترین میزان پنجه تولید شده یعنی ۷/۹۳۳ پنجه را در بین دو رقم داشته است. همچنین با بررسی مقایسه میانگین غلظت ها برای این صفت، بیشترین

و همکاران (۱۹۷۸) از ۲۴۹۶ مجموعه از گیاهان باززایی شده از گروه ۳۵/۳ درصد هاپلوئید و ۵۳/۴ درصد دیپلوئید بودند. بن همکاران (۱۹۷۶) و چن و لی (۱۹۷۸) با توجه به مشاهدات خود، فراوانی دیپلوئیدها را در گیاهان حاصل از گروه، بیش از ۵۰ درصد گزارش نمودند. تجزیه ژنتیکی نشان داد که بیش از ۹۰ درصد نتاج دیپلوئید حاصل از دورگه ها هموزیگوس بودند. بنابر این می توان چنین نتیجه گرفت که گیاهان دیپلوئید، بصورت خود بخودی در محیط کشت دوبرابر شده اند و از سلولهای سوماتیکی دیواره بساک مشتق نشده اند. دوبرابر شدن کروموزومها با غوطه ور کردن ریشه ها و گره های واجد پنجه در محلول مایع ۰/۲ درصد کلسی سین و ۰/۱ درصد فومیرون افزایش می یابد [et al., 1976 Chen and Lee 1978., Yin]. ولی هاپلوئیدها در محیط کشت کالوس زای سوماتیکی نیز دوبرابر میشوند. ما میدانیم که خوشه چه و برگهای جوان هاپلوئید برنج وقتی در یک محیط کشت دارای ۲-۴-D قرار داده شوند کالوس سوماتیکی تولید میکنند. پس در نتیجه اندومیتوز یا اندو دوپلیکیت سلول های کالوس تعدادی از گیاهان بایستی دوبرابر شوند [IRRI, 1982]. بن همکاران غلظت ۰/۱ را بهترین غلظت برای تولید گیاهان دابلد هاپلوئید از تیمار گیاهچه های هاپلوئید معرفی کردند [et al., 1976 Yin]. همچنین با بررسی غلظت ها و زمان مختلف تیمار گیاهچه های هاپلوئید با کلسی سین بهترین غلظت و زمان تیمار غلظت ۰/۱ و زمان ۱۰ و ۱۲ ساعت معرفی شده است [Shouyi and Shouyin, 1991]. در این تحقیق، به منظور تعیین بهترین غلظت کلسی سین و مدت زمان مناسب تیمار گیاهان هاپلوئید جهت مضاعف شدن کروموزوم های آنها، بوته های هاپلوئید بدست آمده از کشت بساک دو هیبرید برنج با سه غلظت متفاوت از محلول کلسی سین با سه تیمار زمانی متفاوت مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

دو رقم هیبرید به نام های GRH1 (دیلم) و IR69688H در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

جهت کشت بساک و تولید گیاهان هاپلوئید در آزمایشگاه کشت بافت در موسسه تحقیقات برنج کشور عملیات مربوط به کاشت دو رقم هیبرید از بهار سال ۱۳۸۶ آغاز گردید. این عملیات در مزارع تحقیقاتی واقع در موسسه تحقیقات برنج کشور واقع در رشت صورت گرفت. کلیه عملیات خزانه گیری، بذر پاشی، نشاء کاری طبق روش معمول در موسسه تحقیقات برنج صورت گرفت. در طول این مدت عملیات داشت، شامل وجین علف های هرز، کود پاشی، مبارزه با آفات و بیماری ها نیز طبق روش متداول انجام گرفت. گیاهان هاپلوئیدی که از کشت بساک دو رقم هیبرید GRH1 [دیلم] و IR69 و بدست آمده بودند در مزرعه پنجه های زیادی تولید کردند. تعداد ۱۳۵ بوته از هر رقم برداشت و جهت اعمال تیمارهای مورد نظر به گلخانه انتقال یافت. بعد از برداشت بوته ها تعداد ۱۰ پنجه از هر بوته جهت اعمال تیمار جدا گردید. پس از انتقال بوته های هاپلوئید به گلخانه، ابتدا جهت پاک نمودن ریشه ها از خاک، ریشه های هر بوته کاملاً با آب شستشو و تمیز گردید سپس نوک ریشه های هر بوته توسط قیچی قطع گردید و سپس به منظور راتون دهی ساقه ها در ارتفاع ۱۵ سانتی متری از طوقه بریده شدند. جهت غوطه ور کردن گیاهچه های هاپلوئید در محلول کلسی سین سه غلظت ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ از این محلول تهیه گردید. اعمال تیمارهای کلسی سین بصورت آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور (میزان غلظت درسه

تر باشد آسیب بیشتری از لحاظ تنش غذایی، پلاسیده شدن بیشتر ریشه ها و یا حتی مرگ تعدادی از پنجه های اولیه به بوته های تحت تیمار وارد می گردد که این آسیب ها باعث ضعیف شدن بوته ها و در نهایت کاهش تعداد پنجه های بعدی آنها می گردد. اثر متقابل بین رقم و زمان معنی دار نیست. بدین معنی که مدت زمان تیمار بوته ها بطور مستقل از رقم بر روی صفت تعداد پنجه تاثیر دارد یا به عبارتی تاثیر رقم و زمان بر روی صفت تعداد پنجه بطور موازی می باشد. جدول مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت بر زمان برای تعداد پنجه نشان می دهد که بیشترین میزان تولید پنجه در غلظت ۰/۰۵ و زمان ۸ ساعت (۸/۹۰۰) و کمترین میانگین تولید پنجه در

تعداد پنجه تولید شده در غلظت ۰/۰۵ بدست آمد. در بررسی اثرات متقابل طبق نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل بین واریته و غلظت معنی دار نگردید. معنی دار نشدن اثر متقابل واریته بر غلظت نشان دهنده تاثیر مستقل این دو تیمار (واریته و غلظت) بر روی صفت مورد بررسی (تعداد پنجه) می باشد یا بعبارت دیگر این دو تیمار در صفت مورد بررسی فاقد اثر متقابل می باشند. اثر اصلی زمان بر روی صفت میزان تولید پنجه در سطح احتمال ۱٪ معنی دار گردید (جدول ۱). بیشترین تعداد پنجه بدست آمده در ۸ ساعت و پس از آن ۱۲ و ۱۸ ساعت در کلاس های بعدی قرار می گیرند یا عبارتی با افزایش زمان تیمار بوته ها میزان تولید پنجه در آنها کاهش می یابد که البته این امر طبیعی بنظر می رسد چرا که هر چه زمان تیمار بوته ها زیاد

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده در دو واریته هیبرید

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		متوسط تعداد پنجه تولید شده در هر بوته	متوسط تعداد پنجه تولید شده در هر بوته	درصد بوته های دارای پنجه دابل	درصد بوته های دارای پنجه پلی
واریته	۱	۲/۰۰۳**	۱/۸۵۳*	۵/۵۹۰*	۱۶/۰۹۲*
غلظت	۲	۳/۱۵۰**	۰/۷۴ ^{ns}	۱۳/۱۳۱**	۱۶/۱۶۰**
واریته×غلظت	۲	۰/۲۱ ^{ns}	۰/۶۹۵ ^{ns}	۰/۵۵۱ ^{ns}	۲/۱۱۰ ^{ns}
زمان	۲	۹/۶۸۱**	۰/۹۳۱*	۲۸/۲۳۴**	۷۵/۷۷۸**
واریته×زمان	۲	۰/۰۱۴ ^{ns}	۰/۰۹۷ ^{ns}	۰/۴۹۳ ^{ns}	۰/۲۳۹ ^{ns}
غلظت×زمان	۴	۰/۱۰۷ ^{ns}	۰/۲۱۶ ^{ns}	۳/۸۵۰*	۰/۴۸۲ ^{ns}
واریته×غلظت×زمان	۴	۰/۰۰۵ ^{ns}	۰/۰۹۲ ^{ns}	۰/۵۸۱ ^{ns}	۰/۹۴۷ ^{ns}
خطا	۳۶	۰/۰۵۰	۰/۲۸۶	۱/۱۰۷	۲/۳۶۷
ضریب تغییرات		٪۲/۱۸۸	٪۱۹/۶۰	٪۱۵/۲۹	٪۳۱/۷۱

ns ، * ، ** بترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۵، ۱ و ۱ درصد

جدول ۲- مقایسه میانگین دو واریته از نظر صفات اندازه گیری شده

واریته	متوسط تعداد پنجه تولید شده در هر بوته	متوسط تعداد پنجه تولید شده در هر بوته	درصد بوته های دارای پنجه دابل	درصد بوته های دارای پنجه پلی
IR69	۷/۵۴ ^b	۲/۵۴ ^b	۴۵/۹۲۶ ^b	۲۳/۷۰۴ ^b
GRH ۱	۷/۹۳۳ ^a	۲/۹۱ ^a	۵۳/۳۳۳ ^a	۳۳/۳۳۳ ^a

میانگین های دارای حروف مشابه اختلاف معنی دار ندارند

غلظت	متوسط تعداد پنجه تولید شده در هر بوته	درصد بوته های دارای پنجه دابل	درصد بوته های دارای پنجه پلی
۰/۰۵	۸/۲۲ ^a	۳۷/۷۷۸ ^b	۲۰/۰۰۰ ^b
۰/۱	۷/۵۳ ^b	۵۳/۳۳۳ ^a	۲۶/۶۶۷ ^b
۰/۱۵	۷/۴۶ ^b	۵۷/۷۷۸ ^a	۳۸/۸۸۹ ^a

میانگین های دارای حروف مشابه اختلاف معنی دار ندارند.

غلظت ۰/۱۵ در ۱۸ ساعت بود (۶/۶۰۰).

۲- متوسط تعداد پنجه دابل هاپلوئید تولید شده در هر بوته

تجزیه واریانس صفت متوسط تعداد پنجه دابل هاپلوئید تولید شده نشان داد که بین ارقام مورد بررسی تفاوت معنی داری در سطح ۰/۰۵ وجود دارد (جدول ۱). متوسط تعداد پنجه دابل هاپلوئید تولید شده در رقم (۷/۹۳)GRH1 بطور معنی داری از رقم IR6988 (۷/۵۴) بیشتر بود (جدول ۲). اثر اصلی زمان نیز برای این صفت معنی دار بود یا عبارتی متوسط تعداد پنجه دابل هاپلوئید تولید شده در هر بوته بطور کلی در تیمار های زمانی مختلف متفاوت بوده است. معنی دار شدن اثر اصلی غلظت بر روی این صفت نشان دهنده متفاوت بودن متوسط تعداد پنجه دابل هاپلوئید تولید شده در هر بوته در تیمار های غلظتی مختلف می باشد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس هیچ کدام از اثرهای متقابل دو گانه و سه گانه معنی دار نگردیده است. (جدول ۱). معنی دار نشدن اثر متقابل نشان دهنده تاثیر مستقل هر یک از تیمار ها بر روی متوسط تولید پنجه دابل هاپلوئید در هر بوته می باشد. یا عبارتی اثر تیمار های مورد بررسی بر روی صفت مذکور بطور موازی و در جهت و یا در خلاف جهت همدیگر بوده است. نتایج مقایسه میانگین واریته ها، غلظت ها و زمان ها و اثرات متقابل آنها بر هم در جداول و نمودار ها نشان داده شده است. مقایسه میانگین زمان های متفاوت برای این صفت نشان داد که بیشترین میانگین در زمان ۱۸ ساعت بوده (۲/۹۴) پنجه دابل هاپلوئید در هر بوته که تفاوت معنی داری

این صفت بطور معنی داری کمتر است (۲۶/۶۶۷ و ۲۰/۰۰۰) (جدول ۳). زیاد بودن درصد پنجه پلی پلویید در غلظت ۰/۱۵ دور از انتظار نیست چرا که با افزایش غلظت کلسی سین احتمال جذب بیشتر کلسی سین و در نتیجه تولید بیشتر پنجه های پلی پلویید افزایش می یابد که البته این موضوع در تحقیقات قبلی از جمله ین وهمکاران (Yin et al, 1977) و لیانگ شویی و هوآنگ شوییین [Shouyi and Shouyi, ۱۹۹۱] نیز به اثبات رسیده بود. با افزایش زمان تیمار نیز درصد بوته های دارای پنجه پلی پلویید افزایش یافت بطوری که در زمان ۱۸ ساعت بیشترین درصد بوته های دارای پنجه پلی پلویید (به مقدار ۴۵/۵۵۶ درصد) و بعد از آن در زمان ۱۲ ساعت (به مقدار ۳۰ درصد) و سپس کمترین میزان نیز در زمان ۸ ساعت (به مقدار ۱۰ درصد) مشاهده گردید. البته افزایش میزان درصد پلی پلوییدی با افزایش زمان تیمار امری کاملاً طبیعی می باشد چرا که با افزایش مدت زمان تیمار میزان کلسی سین جذب شده توسط گیاه افزایش خواهد یافت و از طرفی هرچه گیاه مدت زمان زیادتری در معرض تیمار کلسی سین قرار داشته باشد سلول های مریستمی در حال تقسیم میتوز ممکن است که چندین تقسیم متوالی را در حضور کلسی سین انجام دهند و کلسی سین با مختل کردن رشته های دوک باعث بوجود آمدن سلول های مریستمی دارای چندین نسخه کامل ژنوم گردند و در نتیجه پنجه های پلی پلویید حاصل گردد. این موضوع یعنی افزایش درصد پنجه پلی پلویید بالطبع باعث کاهش درصد پنجه های دابل هاپلویید خواهد گردید. بطوری که با نگاهی به صفت درصد پنجه دابل هاپلویید متوجه می شویم که افزایش زمان از ۱۲ به ۱۸ ساعت موجب کاهش درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید شده است. محققینی نظیر لیانگ شویی و هوآنگ شوییین [Shouyi and Shouyi, ۱۹۹۱]، و ین وهمکاران ((Yin et al, 1977)) ادعان کرده اند که با افزایش مدت زمان تیمار با کلسی سین علاوه بر افزایش درصد پنجه های پلی پلویید باعث کاهش درصد پنجه های دابل هاپلویید نیز می شود بطوریکه لیانگ شویی در تحقیقات خود اعلام داشت که در مدت زمان ۱۲ ساعت بیشترین درصد پنجه دابل هاپلویید بدست آمد و با افزایش زمان به ۱۸ و ۲۴ ساعت میزان درصد دابل هاپلویید به طور معنی داری کاهش یافت. مقایسه میانگین اثر متقابل واریته و زمان برای این صفت نشان داد که بیشترین مقدار آن در واریته GRH1 و زمان ۱۸ ساعت (به میزان ۵۳/۳۳) مشاهده شد که با کمترین مقدار آن در واریته IR69 در زمان ۸ ساعت و واریته GRH1 در زمان ۸ ساعت (بترتیب ۶/۶۶۷ و ۱۳/۳۳۳) اختلاف معنی دار داشت (جدول ۵).

۵- درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید و پلی پلویید

با تجزیه واریانس این صفت مشخص گردید که فقط اثر اصلی زمان در سطح ۱٪ معنی دار می باشد و سایر اثرهای اصلی و متقابل برای صفت درصد بوته های دارای هر دو پنجه دابل هاپلویید و پلی پلویید معنی دار نیست (جدول ۱). بنابراین میانگین درصد بوته های دارای هر دو پنجه برای هر دو رقم از نظر آماری یکسان بوده است (جدول ۲). با بررسی مقایسه میانگین تیمار های زمانی مختلف مشخص شد که بیشترین درصد بوته های دارای هر دو نوع پنجه در زمان ۱۸ و ۱۲ ساعت (بترتیب ۱۴/۴۴۴ و ۱۰/۰۰۰) و کمترین آن در زمان ۸ ساعت (۰) مشاهده شد (جدول ۴). البته صفر بودن این صفت در زمان ۸ ساعت بدین معنی است که میزان جذب کلسی سین و یا بعبارتی در معرض کلسی سین قرار گرفتن سلول

با زمان ۸ ساعت (۲/۴۹) پنجه دابل هاپلویید در هر بوته) دارد که دارای کمترین میانگین پنجه دابل هاپلویید بوده است (جدول ۴). همچنین مطالعه اثر متقابل واریته در زمان نشان داد که بیشترین میانگین تعداد پنجه دابل هاپلویید در رقم GRH1 در ۱۲ و ۱۸ ساعت (به ترتیب ۲/۸۴ و ۳/۱۸) و کمترین آن در رقم IR6988 در ۸ ساعت (۲/۲۷۸) می باشد (جدول ۵).

۳- درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید

تجزیه واریانس صفت درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید نشان داد که اثر اصلی واریته، غلظت و زمان معنی دار می باشد در این صفت نیز همانند دو صفت قبلی اثر اصلی این صفت معنی دار گردید. که این معنی دار شدن نشان دهنده تفاوت معنی دار در اثرات اصلی هر سه تیمار اعمال شده می باشد اما از بین اثرهای متقابل فقط اثر متقابل زمان در غلظت معنی دار گردیده است یعنی این که اثر این دو فاکتور بر روی درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید بطور موازی باعث کاهش یا افزایش این صفت نمی شوند. بهترین نتیجه را می توان در یک غلظت و زمان خاصی بدست آورد. نتایج مقایسه میانگین واریته ها نشان می دهد که بیشترین درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید مربوط به رقم GRH1 (۵۳/۳۳۳) می باشد که با درصد پنجه دابل هاپلویید در رقم IR69 اختلاف معنی داری دارد. همچنین در بین سه غلظت بکار رفته در آزمایش موثر ترین غلظت بکار رفته جهت تولید بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید مربوط به غلظت های ۰/۱ و ۰/۱۵ (به ترتیب به میزان ۵۳/۳۳۳ و ۵۷/۷۷۸) می باشد که تفاوت معنی داری با غلظت ۰/۰۵ (به میزان ۳۷/۷۷۸) دارد. با مقایسه میانگین زمان های مختلف مشخص شد که بیشترین درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید در زمان ۱۲ ساعت (با مقدار ۸۶/۸۸۹) و کمترین آن زمان ۸ ساعت (۳۶/۶۶۷) بدست آمد. همچنین با بررسی مقایسه میانگین اثر متقابل واریته و زمان برای این صفت بیشترین مقدار آن مربوط به رقم GRH1 و IR6988 در تیمار زمانی ۱۲ ساعت بود (بترتیب ۷۱/۱۱۱ و ۶۶/۶۶۷) و کمترین درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید مربوط به رقم IR6988 در تیمار زمانی ۸ ساعت (به میزان ۳۳/۳۳۳) بود. (جدول ۵) با مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت و زمان بر این صفت بیشترین میانگین درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید در زمان ۱۲ ساعت و غلظت ۰/۱ (به مقدار ۸۳/۳۳۳) مشاهده شد که با کمترین مقدار آن در غلظت ۰/۰۵ و تیمار زمانی ۸ ساعت (به میزان ۲۰/۰) اختلاف معنی دار داشت (جدول ۶).

۴- درصد بوته های دارای پنجه پلی پلویید

با تجزیه واریانس این صفت، اثر اصلی واریته در سطح احتمال ۵٪ و اثرات اصلی غلظت و زمان در سطح احتمال ۱٪ معنی دار گردید در حالی که هیچ کدام از اثرات متقابل تیمار ها معنی دار نگردید (جدول ۱) که این معنی دار نشدن همانند بعضی از صفات قبلی نشان دهنده تاثیر مستقل تیمار ها بر روی صفت درصد بوته های دارای پنجه پلی پلویید می باشد. بعضی تیمار های اعمال شده بطور موازی در یک راستا باعث کاهش یا افزایش صفت مذکور شده اند. رقم GRH1 بطور میانگین دارای درصد پنجه پلی پلویید بیشتری (به میزان ۳۳/۳۳۳) از رقم IR6988 (به میزان ۲۳/۷۰۴) بود (جدول ۲). میانگین این دو رقم برای صفت مذکور با هم اختلاف معنی داری داشتند. با مقایسه سه تیمار غلظت اعمال شده مشاهده می شود که در غلظت ۰/۱۵ کلسی سین بیشترین درصد بوته های دارای پنجه پلی پلویید وجود دارد (به میزان ۳۸/۸۸۹) و در دو غلظت دیگر مقدار

گردید که در غلظت ۰/۰۵ و زمان ۱۸ ساعت (۳۸/۲۴۹) و در غلظت ۰/۱ و زمان ۸ و ۱۸ ساعت (به ترتیب ۳۷/۹۶۳ و ۳۶/۵۱۷) بیشترین متوسط تعداد بذور در هر خوشه و در زمان ۸ ساعت و غلظت ۰/۰۵ کمترین مقدار این صفت (۲۹/۰۴۵) مشاهده گردید (جدول ۶). در این تحقیق به ازای هر خوشه بذر کمی در مقایسه با خوشه‌های برنج در حالت طبیعی تولید گردید بدلیل اینکه خوشه‌های باردار خوشه اصلی نبوده و در واقع راتون می باشند وهمانطوری که در تحقیقات مختلف نشان داده شده است که میزان بذر در راتون بسیار کمتر از خوشه اصلی می باشد همچنین بوته ها بعد از تیمار کلشی سین به علت استرس وارده رشد کمتری دارند و اینکه بوته ها در شرایط گلخانه ای رشد کرده اند که در شرایط گلخانه ای رشد بوته ها کمتر بود و بنا بر این پنجه ها و راتون های ضعیف تری تولید کردند که منجر به تولید بذر کمی در خوشه گردید.

های مریستمی به اندازه ای نبوده است که سلول های مریستمی بتوانند چندین تقسیم میتوز را در حضور کلشی سین انجام دهند تا منجر به تولید سلول های حاوی چندین کپی از ژنوم کامل برنج باشند.

۶- متوسط تعداد بذور در هر خوشه

تجزیه واریانس این صفت نشان داد که متوسط تعداد بذور در هر خوشه فقط برای اثر متقابل غلظت در زمان معنی دار گردید و سایر اثرهای اصلی و متقابل برای این صفت معنی دار نگردید (جدول ۱). بنا بر این میانگین تعداد بذور در هر خوشه برای دو واریته از نظر آماری یکسان بود (جدول ۲). بیشترین میانگین تعداد بذور در خوشه در واریته IR69 و زمان ۱۸ ساعت (به میزان ۳۷/۹۵) و کمترین آن در رقم GRH1 و زمان ۱۲ ساعت (به میزان ۳۱/۹) بود (جدول ۵). با بررسی اثر متقابل غلظت در زمان مشخص

جدول ۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل واریته × زمان برای صفات اندازه گیری شده

متوسط تعداد	متوسط تعداد پنجه تولید شده	زمان	درصد بوته های دابل هاپلوئید تولید شده در هر بوته	درصد بوته های دابل هاپلوئید	درصد بوته های دارای پنجه پلی	درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلوئید	درصد بوته های دابل هاپلوئید و پلی پلوئید	متوسط تعداد بذور در هر خوشه
۸	۸/۲۸۹ ^b	۲/۲۷۸ ^b	۳۳/۳۳۳ ^c	۶/۶۶۷ ^c	۰/۰۰۰ ^c	۳۳/۵۱۹ ^{ab}	۳۳/۵۱۹ ^{ab}	۳۳/۵۱۹ ^{ab}
۱۲	۷/۵۱۱ ^d	۲/۶۴۴ ^{ab}	۶۶/۶۶۷ ^a	۲۶/۶۶۷ ^b	۶/۶۶۷ ^{bc}	۳۵/۷۸۷ ^{ab}	۳۵/۷۸۷ ^{ab}	۳۵/۷۸۷ ^{ab}
۱۸	۶/۸۴۴ ^f	۲/۷۰۴ ^{ab}	۳۷/۷۷۸ ^{bc}	۳۷/۷۷۸ ^{ab}	۱۱/۱۱۱ ^{ab}	۳۷/۹۵۱ ^a	۳۷/۹۵۱ ^a	۳۷/۹۵۱ ^a
۸	۸/۶۶۷ ^a	۲/۷۰۴ ^{ab}	۴۰/۰۰۰ ^{bc}	۱۳/۳۳۳ ^c	۰/۰۰۰ ^c	۳۵/۰۹۹ ^{ab}	۳۵/۰۹۹ ^{ab}	۳۵/۰۹۹ ^{ab}
۱۲	۷/۹۵۶ ^c	۲/۸۴۸ ^a	۷۱/۱۱۱ ^a	۳۳/۳۳۳ ^{ab}	۱۳/۳۳۳ ^{ab}	۳۱/۸۷۸ ^b	۳۱/۸۷۸ ^b	۳۱/۸۷۸ ^b
۱۸	۷/۱۷۸ ^c	۳/۱۸۵ ^a	۴۸/۸۸۹ ^b	۵۳/۳۳۳ ^a	۱۷/۷۷۸ ^a	۳۴/۲۷۳ ^{ab}	۳۴/۲۷۳ ^{ab}	۳۴/۲۷۳ ^{ab}

میانگین های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی دار ندارند.

جدول ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت کلشی سین × زمان برای صفات اندازه گیری شده

غلظت	زمان	درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلوئید	متوسط تعداد بذور در هر خوشه
۰/۰۵	۸	۲۰/۰۰۰ ^d	۲۹/۰۴۵ ^b
	۱۲	۵۳/۳۳۳ ^{bc}	۳۵/۶۰۱ ^{ab}
	۱۸	۴۰/۰۰۰ ^c	۳۸/۲۴۹ ^a
۰/۱	۸	۳۶/۶۶۷ ^c	۳۷/۹۶۳ ^a
	۱۲	۸۳/۳۳۳ ^a	۳۳/۳۳۳ ^{ab}
	۱۸	۴۰/۰۰۰ ^c	۳۶/۵۱۷ ^a
۰/۱۵	۸	۵۳/۳۳۳ ^{bc}	۳۵/۹۲۰ ^{ab}
	۱۲	۷۰/۰۰۰ ^{ab}	۳۲/۵۶۴ ^{ab}
	۱۸	۵۰/۰۰۰ ^{bc}	۳۳/۵۷۱ ^{ab}

میانگین های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی دار ندارند.

منابع مورد استفاده

1. Bahar, B. Gence, B. Hatipo, R. et al. 2008. Correlation between anther culture traits and some agrophysiology. American Eurasian J. Agric and Environ. Sci. 4:30-33.
2. Bajaj, Y.P.S. 1991. Biotechnology in Rice Improvement. ed: Biotechnology in Agriculture and forestry, Springer-Verlag. vol. 14, p:3
3. Burun, B. EML, U. 2008. A comparative study on colchicine Application methods in obtaining Doubled haploids of tobacco (*Nicotinia tabacum*.L). Turk. J. Bio. 32:105-111.
4. Chen, Y. Li, L.T. 1978. Investigation and utilization of pollen-derived haploid plants in rice and wheat. proc Symp Plant Tissue Cult. Science Press. Peking. pp199-211
5. Gueye, T. Ndoye, K. 2010. In vitro production of doubled haploid plants from two rice species (*oryza sativa* L. and *oryza glaberrima* Steudt.) for the rapid development of new breeding material. Scientific Research and Essays., vol. 5 (7) pp. 709-713
6. Kush, G. 2004. Harnessing Science and technology for sustainable rice based production systems. FAO RICE CONFERENCE. Page:1
7. Nitsch, C. and Kasha, K. j. 1975. Chromosome doubling of barely haploid by nitrous oxid and colchicines treatment. Can. J., Gent. cyt. 17 :573-583.
8. Niizeki, H. and Oono, k., 1968., Induction of haploid rice plant from anther culture. ,proc. jpn. Acad. ,44 : 554-557
9. Ryopy, P.H. 1997. Haploidy in Triticale. in: mohan jains. ed: In vitro haploid production in higher plants. Vol. 1 PP:13
10. Segui-Simarro, J.M. and Nuez, F. 2008. Pathways to doubled haploidy: Chromosome doubling during androgenesis. Cytogenet Genome Res. 120:358-369
11. Shouyi, L., and Shouyin, H., 1991. Huayu15, a high-Yielding rice variety bred by anther culture. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.) Biotechnology in agriculture and forestry., vol 14 pp:230-147
12. Talebi, R. Rahimi, M. Arefi, H. Nourozi, M and Bagheri, N. 2007. In vitro plant regeneration through anther culture of some Iranian local Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. Pakistan Journal of biological Science 10 (12):2056-2060
13. Trevor, A. Thrope, O., 2007. History of plant tissue culture, Humana press Inc. vol 37 pp:169-180
14. Yin, K. C., Hsu, C. Chu, C. Y. Pi, F. Y. Wang, S. T. Liu, T. Y. 1976. A study of the new cultivar of rice raised by haploid breeding methods. Sci. Sin. 19:227-242.
15. Zapata, F. J. 1984. Tissue culture and its application in rice improvement. In the Proceeding of the ASEAN-EEC Seminar on Biothecnology. Singapore pp:113-114