اثر پیش تیمارهای دمایی و محیط کشت بر کالوس‌زایی و باززایی تلاقی‌های مرکب ارقام پر محصول برنج در لاین قائم

مجید ذاکری*[۱]، قربانعلی نعمت‌زاده [۲] وکمال کاظمی‌تبار[۳]

۱- کارشناس ارشد سازمان جهاد کشاورزی مازندران - فارغ التحصیل رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

۲- استاد و عضو هیئت علمی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳-دانشیار و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

*zakerimajid@yahoo.com

چکیده

در این آزمایش اثر پیش تیمارهای دمایی (T1=4 , T2=8) درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز بر روی بساک‌های شش ترکیب ژنی مختلف از لاین پرمحصول برنج قائم مورد مطالعه قرار گرفته است. برای کالوس‌زایی از سه محیط کشت تغییر یافته N6 (N1,N2,N3) و برای باززایی از محیط کشت MS استفاده شد . نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که میان ژنوتیپ‌ها، محیط کشت‌های تغییریافته N6، پیش تیمار دمایی و اثرات متقابل آنها تفاوت معنی‌دار در میزان میانگین کالوس‌زایی وجود دارد ($P<\%1$). ترکیب ژنتیکی (دمسیاه / قائم // فجر / قائم) برترین ژنوتیپ در کالوس‌زایی با میانگین ۱۸/۲٪ و اعمال پیش تیمار سرمایی ۸ درجه سانتی‌گراد ارزیابی گردید. از میان محیط کشت‌های تغییر یافته N6 محیط کشت N1 (N6+ 2,4-D) به میزان (Kin 0/5 mg/L + NAA 2/5 mg/L + 0/5mg/L) + ۲۰ گرم در لیتر مالتوز و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز – برترین محیط کشت ارزیابی گردید. بالاترین باززایی کل را ترکیب ژنی (شصتک / قائم // نعمت / قائم) با ۲۳/۳٪ از کالوس‌های انتقالی که پیش تیمار ۸ درجه سانتی‌گراد اعمال شده بود ارزیابی گردید. در این آزمایش ۱۰۰٪ گیاهان باززایی شده آلبینو بوده پیش تیمار ۸ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ روز مناسب‌ترین درجه برای القاء کالوس و باززایی این ترکیب‌ها ارزیابی گردید.

واژه‌های کلیدی: برنج ، کالوس ، لاین ، کشت بساک

مقدمه

برنج متعلق به خانواده گرامینه است و غذای مورد نیاز ۵۰٪ جمعیت دنیا و ۵۰ تا ۸۰ درصد انرژی مورد نیاز را تأمین می‌کند (Sasaki, 2005., Amarasinghe and Yang, 2005). برای بهبود ژنتیکی گیاه برنج و افزایش تولید از تکنیک‌های مختلف در زمینه کشت بافت برنج نظیر کشت بساک استفاده می‌گردد (Asaduzzaman *et al*, 2003). بنابراین می‌توان با پیشرفت علوم بیوتکنولوژی و تغییر در گیاه برنج، به واریته‌هایی دست یافت که با افزایش محصول، باعث تأمین مهم‌ترین غذای مورد نیاز انسان شد (Bajaj and Mohanty, 2005). عوامل یا فاکتورهای مؤثر بر کشت بساک در تیپ‌های مختلف برنج ژاپنی و هندی مورد بررسی قرار داده شد که مهمترین آنها عبارتند از ژنوتیپ، محیط کشت، سطوح مختلف نیترات آلی و معدنی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه، ممانعت‌کننده‌های رشد نظیر اتیلن تولید شده در محیط کشت، مرحله فیزیولوژیکی میکروسپور و گیاه بخشنده، پیش تیمار سرمایی و ... (Silva, 2010). هراث و همکاران (۲۰۰۷) طی بررسی‌هایی در کشت بساک برنج ارقام هندی، ژاپنی و هیبریدهای آن بر روی سه محیط کشت

تغییر یافته N6 و B5 و میلر، مصرف تنظیم‌کننده‌های رشد Kin به میزان (میلی‌گرم در لیتر و 2,4-D به میزان ۲ میلی‌گرم) در لیتر در هر سه محیط کشت کالوس‌زایی، بالاترین میزان کالوس در محیط کشت N6 تغییر یافته به میزان ۲۹/۴٪ در هیبریدها دست یافتند. و بالاترین میزان باززایی گیاه سبز مربوط به ارقام هیبرید به میزان ۴۱٪ بود. نتیجه کار این تحقیق نشان از میزان بالایی از گیاهان آلبینو نسبت به گیاه سبز حاصل شده می‌باشد. زمان و مدت اعمال پیش تیمار ممکن است بر اساس نوع پیش تیمار و تیپ‌های برنج متفاوت باشد (Datta,2005). هراث و همکاران (۲۰۰۹) طی تحقیقی اثر تیمار سرمایی در دماهای ۵، ۷، ۸ و۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز بر روی تیپ‌های ژاپنی، هندی و هیبریدهای آنها مطالعه و نشان دادند که تیپ‌های ژاپنی و ژاپنی / هندی بالاترین کالوس‌زایی را در پیش‌تیمار ۸ درجه سانتی‌گراد برای ۱۴ روز (۷۰-۱۲/۳ درصد)، و بالاترین گیاه سبز را هیبرید ژاپنی / هندی در ۸ درجه سانتیگراد برای۱۴ روز دارا بود. هدف از تحقیق حاضر بررسی درصد کالوس‌زایی، باززایی گیاه سبز، و تعیین بهترین ترکیب ژنتیکی از نظر پاسخ به کشت بساک با پیش تیمارهای اعمال شده در محیط کشت‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

انتخاب و جمع‌آوری خوشه‌ها جهت تأمین بساک در ساعات اولیه صبح یعنی حدود ۶ الی ۸ صبح از پنجه‌های اولیه که فاصله قاعده برگ پرچم تا برگ بعدی ۹-۵ سانتی‌متر بوده انجام شد. سپس خوشه‌ها با اتانول ۷۰٪ ضدعفونی سطحی شده و با دستمال کاغذی مرطوب در فویل آلومینیمی پیچیده و جهت اعمال پیش تیمار سرمایی در یخچال در دو دمای ۸ و ۴ درجه سانتی‌گراد بطور مجزا به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند . گلچه‌های حاوی بساک‌های مستعد برای کشت ابتدا با الکل ۷۰٪ اتانول به مدت یک دقیقه و بعد با محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ با یک یا دو قطره توین ۲۰ درصد به مدت ۲۵ دقیقه ضد عفونی شدند و در نهایت با ۳ مرحله شستشو با آب دو بار تقطیر استریل شده ، عملیات شستشو انجام شد. تعداد تقریبی ۵۰ بساک در پتری‌های ۱۵×۶۰ میلی‌متر قرار داده شد. و به مدت ۸-۶ هفته در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد در اتاقک رشد در تاریکی کامل قرار داده شدند. محیط کشت‌های کال‌زایی مورد استفاده در این تحقیق ، ۳ محیط N6 تغییر یافته به شرح:N1 (N6 + ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D + ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۲۰ گرم در لیتر مالتوز + ۳۰ گرم در لیتر ساکارز) N2 (N6+ ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۵۰ گرم در. لیتر ساکارز) N3 (N6 +۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۵۰ گرم در لیتر ساکارز).کالوس دهی در اواخر هفته هفتم شروع شد. بعد از اینکه قطر کالوسها به اندازه تقریبی ۴-۲ میلی‌لیتر رسید، به محیط کشت باززایی انتقال داده شد. جهت باززایی از محیط کشت Ms+۱ میلی‌گرم در لیتر BA + ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin استفاده شد. بعد از انتقال کالوس‌ها به محیط کشت باززایی ، کالوس‌ها به اتاق روشنایی تحت شرایط نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۲۸۰۰-۲۵۰۰ لوکس و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد.

این طرح به صورت آزمایشات فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در هشت تکرار اجرا گردید. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار MSTATC و برای نرمال سازی داده‌ها از تبدیل زاویه‌ایی ARCSin √x+0/5 استفاده شد. تجزیه واریانس روی داده‌های نرمال انجام و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۱ نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها ، محیط های کشت کالوس‌زایی و اعمال پیش تیمار سرمایی ۴ درجه سانتی‌گراد و ۸ درجه سانتی‌گراد در مرحله کالوس‌زایی و اثرات متقابل آنها وجود داشت.

جدول ۱-تجزیه واریانس داده ها

منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
محیط کشت	۲	۷۲/۰۸**
ژنوتیپ	۵	۴۵۲/۳۶**
دما	۱	۱۳۶۷/۲۱**
محیط کشت × ژنوتیپ	۱۰	۱۱/۳۷**
محیط کشت × دما	۲	۴۲/۹۹**
ژنوتیپ × دما	۵	۱۴۹/۳۲**
ژنوتیپ× محیط کشت× دما	۱۰	۱۰/۸۶**
خطای آزمایش	۲۵۲	۱/۳۷۴
C.V=۱۵/۵۲		**معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

دانکن (a=٪۱)

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات ژنوتیپ و دما در کالوس‌زایی به روش

کد	ژنوتیپ	دما	درصد میانگین کالوس‌زائی
۱	شصتک / قائم // سخت / قائم	T1 =۴ċ	۵/۶۴^{f}
		T2 =۸ċ	۸/۹۵^{c}
۲	شصتک / قائم // دمسیاه / قائم	T1 =۴ċ	۴/۴۸^{g}
		T2 =۸ċ	۶/۶۱^{e}
۳	نعمت / قائم // دمسیاه / قائم	T1 =۴ċ	۴/۳۴^{g}
		T2 =۸ċ	۶/۴۴^{ef}
۴	شصتک / قائم // فجر / قائم	T1 =۴ċ	۵/۷۷^{ef}
		T2 =۸ċ	۱۲/۴۶^{b}
۵	نعمت / قائم // فجر / قائم	T1 =۴ċ	۴/۲۷^{g}
		T2 =۸ċ	۵/۷۴^{ef}
۶	دمسیاه / قائم // فجر / قائم	T1 =۴ċ	۷/۷۵^{d}
		T2 =۸ċ	۱۸/۲^{a}

* در هر ستون اعدادی که حداقل یک حرف مشترک دارند اختلاف معنیداری در سطح ۱٪ ندارند.

برابر جدول شماره ۲ ترکیب ژنی دمسیاه / قائم // فجر / قائم با تولید میانگین ۱۸/۲ درصد در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد بالاترین میزان کالوس دهی را داشته بود. مدت اعمال پیش تیمار ممکن است بر اساس نوع پیش تیمار و تیپ‌های برنج متفاوت باشد (Datta, 2005). دماهای ۸ درجه سانتی‌گراد تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۸ روز برای اکثر تیپ‌ها در ارقام برنج مناسب و مطلوب می‌باشد (Zapata and Arias , 2003).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات محیط کشت و دما در کالوس‌زایی به روش دانکن (a=%1)

محیط کشت	دما	درصد میانگین کالوس‌زائی
N1	T1 =۴ċ	۵/۵۹^{d}
	T2 =۸ċ	۱۱/۱^{a}
N2	T1 =۴ċ	۵/۳۴^{d}
	T2 =۸ċ	۱۰/۰۲^{b}
N3	T1 =۴ċ	۵/۱۸^{d}
	T2 =۸ċ	۸/۰۷^{c}

*در هر ستون اعدادی که حداقل یک حرف مشترک دارند بر اساس آزمون دانکن ، اختلاف معنی‌دار ندارند (P<%1)

اثر پیش تیمار سرما در درجه‌های (۵، ۷، ۸، ۱۰) درجه سانتی‌گراد در تیپ‌های ژاپنی و هندی و هیبریدهای آنها را برای مدت زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار دادند. واریته‌های و پیش تیمارهای سرمایی در سطح ۵٪ معنی گردید. و بالاترین و بهترین تولید کالوس در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در ارقام ژاپنی و هیبریدهای آن به میزان (۷۰-۱۲/۳) درصد بود (Herath et al, 2009). برابر جدول شماره ۳ بالاترین میزان کالوس‌دهی در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت N1 به میزان (۱۱/۱ درصد) بود. بنابراین نتایج حاصله در مرحله تولید کالوس، از شش ترکیب ژنی مورد آزمایش، ترکیب ژنی دمسیاه / قائم // فجر / قائم در محیط کشت N1 در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد بهترین ژنوتیپ برای کالوس‌دهی ارزیابی گردید.

جدول ۴ فراوانی مجموع درصد باززایی گیاه سبز و آلبینو برای ژنوتیپ های مورد آزمایش

محیط کشت	تعداد کالوس انتقال داده شده	باززائی											
		مرده و قهوه ای شده		فقط ریشه دار شده		گیاه سبز		گیاه آلبینو		کالوس بدون تغییر		باززائی کل
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
MS30	۴۹۰	۱۳۰	۲۶/۵۳	۱۰۶	۲۱/۶۳	۰	۰	۵۴	۱۱/۰۲	۲۰۰	۴۰/۸۱	۱۱/۰۲

بررسی باززایی بر روی ژنوتیپ‌ها در دو گروه انجام گردید. ۱-کالوس‌هایی که از پیش تیمار سرمایی ۴ درجه سانتی‌گراد در مرحله کالوس‌زایی بدست آمده بودند. ۲- کالوس‌هایی که از پیش تیمار سرمایی ۸ درجه سانتی‌گراد در مرحله کالوس‌زایی حاصل شده بودند. ترکیبات مختلفی از محیط کشت MS (با تغییر هورن‌های ساکارز) مورد بررسی قرار گرفتند و تنها محیط کشتی از MS که بهترین نتیجه را داشت محیط کشتی با ترکیبات (ساکارز MS+1mg/l BA + 2 mg/L Kin + 30 g/L) بود. در این محیط ترکیب ژنی (شصتک / قائم // نعمت / قائم) بالاترین درصد باززایی کل (۲۳/۳) را نسبت به سایر ترکیبات ژنی داشت. ترکیب ژنی (دمسیاه / قائم // فجر / قائم) یا کد ۶ که در مرحله کالوس‌زایی بالاترین میزان کالوس را داشت ، دارای باززایی پائین بود. اما ترکیب ژنی (شصتک / قائم // نعمت / قائم) یا کد ۱ که دارای کالوس‌زایی کمی بود در باززایی بالاترین باززایی کل را داشت. یعنی القاء کالوس و باززایی همیشه دارای ارتباط مثبت با هم نمی‌باشند (Javed *et al* ., 2007). همچنین اغلب گونه‌های با القاء کالوس بالا، دارای توانایی ضعیف تری در باززایی می‌باشند (Talebi *et al*., 2007). کالوس‌هایی که از پیش تیمار ۸ درجه سانتی‌گراد بر روی بساک‌ها در مرحله کالوس‌زایی ، به محیط باززایی منتقل شده بودند ، باززایی بالاتری از پیش تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد داشتند. نتایج باززایی نشان می‌دهد که صفت باززایی و کالوس‌زایی در این ژنوتیپ‌ها دو صفت مستقل بوده، و صفت باززایی در این ترکیبات ژنی ممکن است به صورت آثار ژنتیکی افزایشی و غالبیت به ارث رسیده باشد و تحت تأثیر عوامل محیط کشت باشد. این اختلاف حتی ممکن است در سنبلچه‌های گیاه و حتی بساک‌های یک سنبلچه هویدا گردد (طباطبائی و امیدی ۱۳۸۸). نتایج آزمایشات (Herath *et al*., 2009) بر روی کشت بساک برنج ، اعمال پیش تیمار ۸ درجه سانتی‌گراد در ۱۰ روز را مناسب‌تر از سایر پیش تیمارها بیان داشتند. و از طرفی پاسخ یا واکنش به پیش تیمار سرمایی یا گرمایی به ژنوتیپ وابسته است (Datta,2005). برابر جدول شماره (۴) گیاهان حاصل از این شش ترکیب ژنی مختلف صد درصد آلبینو بود بطوریکه از تعداد کل کالوس انتقالی برای باززایی (۴۹۰) تعداد (۵۴) گیاه آلینو حاصل شد (Yao *et al*., 2000) آلبینیسم می‌تواند تحت تأثیر یک عامل یا ترکیبی از عوامل باشد شامل:

ژنوتیپ، محیط کشت، حالت‌های غیرنرمال تقسیم میوزی، عدم تعادل هورمونی، ناسازگاری ژنوم هسته‌ایی– پلاستیدی، حذف در DNA پلاستیدی، موتاسیون‌هایی در ژن‌های مسئول بیوژنز کلروفیل و غیره باشد. باززایی گیاه آلبینودر برنج می‌تواند از ۵ تا ۱۰۰ درصد باشد (TaLebi et al., 2007) .همچنین در آزمایشات مختلف کشت بساک برنج نظیر آزمایشات (Gueye and Ndir, 2010; Niroula and Bimb, 2009; Herath *et al*., 2009) می‌بینیم که بعضی از ژنوتیپ‌ها یا هیبریدها و ترکیبات ژنی مختلف دارای ۱۰۰٪ باززایی آلبینیسم بوده‌اند. در تحقیق حاضرمشخص گردیدکه مجموعه شرایطی برای ایجاد القاء و در نهایت باززایی لازم است که در این مجموعه، شرایط برای هر ژنوتیپ ، خاص آن بوده و در صورت تحقق ، رسیدن هدف تضمین شده می‌باشد.

منابع

۱.طباطبایی،ب.، امیدی،م. ۱۳۸۸، کشت بافت و سلول گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران.

2. Amarasinghe AAY, YS Yang. 2005. Comparative studies on in – vitro Response of fresh and old cultivar of Rice (*Oryza sativa* L.). Agricultural Science 1(2): 1-14.
3. Asaduzzaman, M, MA Bari, MH Rahman, N khatun, MA Islam and M Rahman, 2003. In vitro plant regeneration through anther culture of five rice varieties. Journal of Biological Sciences 3: 167-171.
4. Bajaj S, A Mohanty, 2005. Recent advances in rice biotechnology-towards genetically superior transgenic rice. Plant Biotechnology Journal 3: 275-307.
5. Datta SK. 2005. Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. Current Science 89: 1870– 1878.
6. Gueye T, KN Ndir, 2010. In vitro production of double haploid plant from two rice species (*Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* steudt.) for the rapid development of new breeding material. Scientific Research and Essays 5(7): 709-713.
7. Herath HMI, DC Bandara, PK Samarajee, 2007. Effect of culture Media for Anther Culture of Indica Rice Varieties and hybrids of Indica and Japonica .tropical Agricultural Research and Extension 10, 2007. Herath HMI, DC Bandara, PK samarajee, DSA
8. Herath.H.M.I , D.C.Bandara , P.k.samarajee wa and D.S.A.Wijeesundara .,2009. Effect of low temperature Per-treatment on anther culture in selected indica , Japonica Rice Varieties and their inter sub=specific hybrids .2009Cey.J. Sci . (Bio. Sci) 38 (1) : 11-16 , 2009.
9. Javed , M.A., T, Ishii. O, Kamijima and S,Misoo, 2007. The role of alternating culture temperatures and maltose in enhanciny the anther culture efficiency of solt tolerant indica rice (oryza sativa L.) sultivars , Pokkali and Nona Bokra . Plant Biotechnology 2 w, 283 – 257 (2007).
10. Niroula, R. K., H. P. Bimb. 2009. Effect of Genotype and callus Induction Medium on Green plant Regeneration from Anther of Nepalese Rice cultivars. Asian Journal of plant sciences 8(5):368-374, 2009.Issn 1682-3974.
11. Silva, T. D., 2010. Indica rice anther culture: Can the impasse me surpaseed?. Plant cell Tiss organ cult. 100: 1-11.
12. Talebi R, Rahemi MR, Arefi H, Nourozi M, Bagheri N. 2007. In vitro plant regeneration through anther culture of some Iranian local rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. Pakistan Journal of Biological Sciences 10(12):2056–2060.

13. Yao, J. L. and Cohen, D. 2000. Multiple gene control of plastome-genome incompatibility and plastid DNA inheritance in interspecific hybrids of Zantedeschia.. Theor. Appl. Genet., 101: 400–406.
14. Zapata-Arias FJ. 2003. Laboratory protocol for anther culture technique in rice. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) Doubled haploid production in crop plants, a manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 109–116.