



## اثر پیش تیمارهای دمایی و محیط کشت بر کالزایی و باززایی تلاقی‌های مرکب ارقام پر محصول برنج با لاین قائم

مجید ذاکری<sup>۱</sup>، قربانعلی نعمت‌زاده<sup>۲</sup> و سیدکمال کاظمی تبار<sup>۳</sup>

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، (نویسنده مسوول: zakerimajid@yahoo.com)

۲ و ۳- به ترتیب استاد و دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۳

### چکیده

با توجه به اهمیت بسیار بالای برنج در تامین غذای مورد نیاز بشر و همچنین افزایش رشد جمعیت جهان، بهبود ژنتیکی و افزایش تولید این گیاه زراعی مهم از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. یکی از روش‌های مهم در اصلاح گیاهان از جمله برنج استفاده از روش‌های مختلف کشت بافت نظیر کشت بساک می‌باشد. در جهت رسیدن به اهداف ذکر شده، در این آزمایش اثر پیش تیمارهای دمایی ( $T_1=4^\circ$ ,  $T_2=8^\circ$ ) به مدت ۱۰ روز روی بساک‌های شش ترکیب ژنی مختلف از لاین پر محصول 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 نشان داد که میان ژنوتیپ‌ها، محیط کشت‌های تغییر یافته N6، پیش تیمار دمایی و اثرات متقابل آنها تفاوت معنی‌دار در میانگین کالوس‌زایی وجود دارد ( $P<0/01$ ). ترکیب ژنتیکی (دم‌سیاه / قائم // فجر / قائم) با اعمال پیش تیمار سرمایی ۸ درجه سانتی‌گراد به عنوان مناسب‌ترین ژنوتیپ در کالوس‌زایی با میانگین ۱۸/۲٪ کالوس، تعیین شد. از میان محیط کشت‌های تغییر یافته N6 محیط کشت N1 ( $2,4-D + N_6$ )  $0.5 \text{ mg/L}^{-1} + \text{NAA } 2.5 \text{ mg/L}^{-1} + \text{Kin } 0.5 \text{ mg/L}^{-1}$  + ۲۰ گرم در لیتر مالتوز و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بهترین محیط کشت بود. بهترین باززایی کل را ترکیب ژنی (شصتک / قائم // نعمت / قائم) با ۲۳/۳٪ گیاه آلبینو، از کالوس‌های انتقالی که پیش تیمار ۸ درجه سانتی‌گراد اعمال شده بود تعیین شد. در این آزمایش ۱۰۰٪ گیاهان باززایی شده آلبینو بودند. پیش تیمار ۸ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ روز مناسب‌ترین پیش تیمار برای القای کالوس و باززایی این ترکیب‌ها بود.

واژه‌های کلیدی: برنج، کالوس، لاین اصلاحی، کشت بساک

### مقدمه

میلی‌گرم در لیتر در هر سه محیط کشت فوق‌الذکر، بیشترین میزان تولید کالوس در محیط کشت N6 تغییر یافته به میزان ۲۹/۴ درصد در هیبریدها دست یافتند. بالاترین میزان باززایی گیاه سبز مربوط به ارقام هیبرید به میزان ۴۱ درصد بود. نتیجه کار این تحقیق نشان از میزان بالایی از گیاهان آلبینو نسبت به گیاه سبز تولید شده می‌باشد (۶). زمان و مدت اعمال پیش تیمار ممکن است بر اساس نوع پیش تیمار و تیپ‌های برنج متفاوت باشد (۴). هراث و همکاران (۶) طی تحقیقی اثر تیمار سرمایی در دماهای (۵، ۷، ۸ و ۱۰) درجه سانتی‌گراد به مدت (۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸) روز روی تیپ‌های ژاپنی، هندی و هیبریدهای آنها مطالعه و نشان دادند که تیپ‌های ژاپنی و ژاپنی / هندی بالاترین کالوس‌زایی را در پیش تیمار ۸ درجه سانتی‌گراد برای ۱۴ روز (۷۰-۱۲/۳) درصد، و بالاترین گیاه سبز را هیبرید ژاپنی / هندی در ۸ درجه سانتی‌گراد برای ۱۴ 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 کشت‌های مختلف می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

انتخاب و جمع‌آوری خوشه‌ها جهت تأمین بساک در ساعات اولیه صبح یعنی حدود ۶ الی ۸ صبح از پنجه‌های اولیه

برنج (*Oriza sativa* L.) متعلق به خانواده گرامینه و از مهم‌ترین محصولات غذایی دنیا به شمار می‌آید. غذای مورد نیاز ۵۰ درصد جمعیت دنیا و ۵۰ تا ۸۰ درصد انرژی مورد نیاز بدن را تأمین می‌کند (۱۱،۱). در سال‌های اخیر تلاش‌های قابل توجهی به طور مستقیم برای بهبود صفات مهم زراعی برنج از طریق بیوتکنولوژی انجام شده است (۱۰). برای بهبود ژنتیکی گیاه برنج و افزایش تولید از تکنیک‌های مختلف در زمینه کشت بافت برنج نظیر کشت بساک و غیره استفاده می‌گردد (۲). بنابراین می‌توان با پیشرفت بیوتکنولوژی و تغییر در گیاه برنج، به وارثه‌هایی دست یافت که با افزایش محصول، باعث تأمین مهم‌ترین محصول غذایی در جهان شد (۳). عوامل یا فاکتورهای موثر 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 غیره (۱۲).

طی بررسی‌های انجام شده در کشت بساک برنج ارقام هندی، ژاپنی و هیبریدهای آن‌ها بر روی سه محیط کشت تغییر یافته N6 و B5 و میلر، با مصرف تنظیم‌کننده‌های رشد کابنتین به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر و 2,4-D به میزان ۲

درصد کالوس: تعداد کالوس تشکیل شده به ازای ۱۰۰ بساک کشت شده

درصد باززایی کل: تعداد ( گیاه سبز + آلبینو) تولید شده به ازای ۱۰۰ کالوس انتقال شده.

درصد گیاه آلبینو: تعداد گیاه آلبینو تولید شده به ازای ۱۰۰ کالوس انتقال شده.

#### روش‌های آماری

این آزمایش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در هشت تکرار اجرا گردید. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های کالوس‌دهی، از نرم‌افزار MSTATC و برای نرمال‌سازی داده‌ها از تبدیل زاویه‌ای ARCSin  $\sqrt{x+0.5}$  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 نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها، محیط‌های کشت کالوس‌زایی و پیش تیمار سرمایی (۴ درجه سانتی‌گراد و ۸ درجه سانتی‌گراد) و اثر متقابل آنها در تولید کالوس وجود دارد (جدول ۱). در این آزمایش اختلاف در درصد تولید کالوس، در ترکیبات ژنی مختلف نسبت به پیش تیمار سرمایی ۴ درجه سانتی‌گراد و ۸ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. و ترکیب ژنی دم‌سیاه/ قائم// فجر/ قائم با تولید میانگین (۱۸/۲٪) کالوس با پیش تیمار ۸ درجه سانتی‌گراد، بالاترین میزان درصد کالوس را نسبت به سایر ترکیبات ژنی داشت و در کلاس a قرار گرفته شد. و ترکیب ژنی نعمت/ قائم// فجر/ قائم با کمترین درصد کالوس‌دهی (۴/۲۷٪) با پیش تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد در آخرین رده گروه‌بندی قرار گرفت (جدول ۲). نتایج نشان داد که در ژنوتیپ‌های مختلف با اعمال پیش تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد و ۸ درجه سانتی‌گراد اختلاف مشاهده شد. داتا (۴) مدت اعمال پیش تیمار ممکن است بر اساس نوع پیش تیمار و تیپ‌های برنج، متفاوت باشد (۴).

که فاصله قاعده برگ پرچم تا برگ ما قبل آن ۹-۵ سانتی‌متر بود انجام شد. بعد از شستشوی خوشه‌ها با آب به وسیله الکل اتیلیک ۷۰٪ ضد عفونی سطحی شدند و سپس با دستمال کاغذی مرطوب در فویل آلومینیومی پیچیده و جهت اعمال پیش تیمار سرمایی در دو یخچال جداگانه در دو دمای ۸ و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند. بعد از اعمال پیش تیمار سرمایی گلچه‌های حاوی بساک‌های مستعد برای کشت در زیر کابینت لامینار ایرفلو با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضد عفونی شدند و بعد از ۳ مرحله شستشو با آب دو بار تقطیر، بساک‌ها از گلچه خارج و به تعداد ۳۰ بساک در هر پتری‌دیش پلاستیکی کاملاً استریل شده به ابعاد ۱۵×۶۰ میلی‌متر حاوی ۸ میلی‌لیتر محیط غذایی کالوس‌زا قرار داده شد. پس از درزگیری با پارافیلیم به مدت ۶-۸ هفته در دمای ۲۵±۱ درجه سانتی‌گراد در اتاقک رشد در تاریکی کامل قرار گرفتند. محیط کشت‌های کال‌زایی مورد استفاده در این تحقیق، ۳ محیط N6 تغییر یافته به شرح: N1 (N6 + ۰/۵ میلی‌گرم 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) بود. کالوس‌دهی در اواخر هفته هفتم شروع شد. بعد از اینکه قطر کالوس‌ها به اندازه تقریبی ۴-۲ میلی‌متر رسید پس از تعیین درصد کالوس‌زایی به محیط کشت باززایی انتقال داده شد. جهت باززایی از محیط کشت MS شامل (MS+۱ میلی‌گرم در لیتر BA+۲ میلی‌گرم در لیتر Kin) استفاده شد. بعد از انتقال کالوس‌ها به محیط کشت باززایی، کالوس‌ها به اتاق روشنائی تحت شرایط نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنائی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این آزمایش برای هر ژنوتیپ به ازای هر محیط کشت و پیش تیمار سرمایی ۸ تکرار منظور گردید. هر تکرار در این آزمایش شامل ۳۶ عدد پتری‌دیش است که در آنها ۱۰۸۰ بساک کشت شد. صفات آندروژنیک ذیل در این آزمایش مورد مطالعه قرار گرفتند.

جدول ۱- تجزیه واریانس کالوس‌دهی ترکیبات مختلف ژنتیکی برنج تحت تاثیر دماهای مختلف و ترکیبات متفاوت محیط کشت  
Table 1. Variance analysis of callus induction in various rice crosses influenced by different culture media and temperature

منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
محیط کشت	۲	۷۲/۰۸
ژنوتیپ	۵	۴۵۲/۳۶ <sup>**</sup>
دما	۱	۱۳۶۷/۲۱ <sup>**</sup>
محیط کشت × ژنوتیپ	۱۰	۱۱/۳۷ <sup>**</sup>
محیط کشت × دما	۲	۴۲/۹۹ <sup>**</sup>
ژنوتیپ × دما	۵	۱۴۹/۳۲ <sup>**</sup>
ژنوتیپ × محیط کشت × دما	۱۰	۱۰/۸۶ <sup>**</sup>
خطای آزمایش	۲۵۲	۱/۳۷۴

C.V=۱۵/۵۲

\*\*منفی‌دار در سطح احتمال ۱٪

زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار دادند. وارپته‌ها و پیش تیمارهای سرمایی در سطح ۵٪ معنی‌دار گردید. بیشترین مقدار و بالاترین کیفیت تولید کالوس در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در ارقام ژاپنی و هیبریدهای آن به میزان (۷۰-۱۲/۳) درصد بود (۷).

زایاتا (۱۶) دماهای ۸ درجه سانتی‌گراد تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۸ روز برای اکثر تیپ‌ها در ارقام برنج مناسب و مطلوب می‌باشد. هراث و همکاران (۶) اثر پیش تیمار سرما در درجه‌های ۵، ۷، ۸ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد در تیپ‌های ژاپنی و هندی و هیبریدهای آنها را برای مدت

جدول ۲- مقایسه میانگین کالوس‌زایی اثرات ژنوتیپ و دما با استفاده از آزمون دانکن ( $\alpha=1\%$ )  
Table 2. Mean comparison of callus induction influenced by genotype and temperature using Duncan test

کد	ژنوتیپ	دما	درصد میانگین کالوس‌زایی
۱	شصتک / قائم // نعمت / قائم	T1 = ۴c	۵/۶۴ <sup>d</sup>
		T2 = ۸c	۸/۹۵ <sup>c</sup>
۲	شصتک / قائم // دم‌سیاه / قائم	T1 = ۴c	۴/۴۸ <sup>g</sup>
		T2 = ۸c	۶/۶۱ <sup>c</sup>
۳	نعمت / قائم // دم‌سیاه / قائم	T1 = ۴c	۴/۳۴ <sup>g</sup>
		T2 = ۸c	۶/۴۴ <sup>ef</sup>
۴	شصتک / قائم // فجر / قائم	T1 = ۴c	۵/۷۷ <sup>cd</sup>
		T2 = ۸c	۱۲/۴۶ <sup>b</sup>
۵	نعمت / قائم // فجر / قائم	T1 = ۴c	۴/۲۷ <sup>g</sup>
		T2 = ۸c	۵/۷۴ <sup>ef</sup>
۶	دم‌سیاه / قائم // فجر / قائم	T1 = ۴c	۷/۷۵ <sup>d</sup>
		T2 = ۸c	۱۸/۲ <sup>a</sup>

\*: در هر ستون اعدادی که حداقل یک حرف مشترک دارند اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد با همدیگر ندارند.

دم‌سیاه/ قائم/ فجر/ قائم در محیط کشت N1 در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد بهترین ژنوتیپ برای کالوس‌دهی تعیین شد (شکل ۱).

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، 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



شکل ۱- کالوس حاصل از ترکیب ژنی دم‌سیاه/ قائم/ فجر/ قائم در محیط کشت N1  
Figure 1. Callus derived from Crosses between Domsiah/Ghaem//Fajr/Ghaem in N1 media

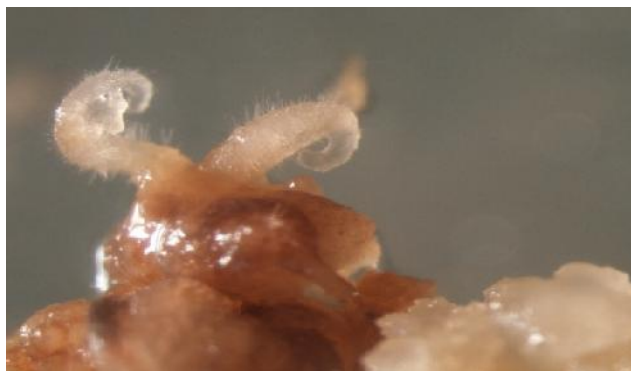
جدول ۳- مقایسه میانگین کالوس‌زایی اثرات محیط کشت و دما با استفاده از آزمون دانکن ( $\alpha=1\%$ )  
Table 3. Mean comparison table of Callus induction influenced by media composition and Temperature using Duncan test

درصد میانگین کالوس‌زایی	دما	محیط کشت
۵/۵۹ <sup>d</sup>	T1 = ۴c	N1
۱۱/۱ <sup>a</sup>	T2 = ۸c	
۵/۳۴ <sup>d</sup>	T1 = ۴c	N2
۱۰/۰۲ <sup>b</sup>	T2 = ۸c	
۵/۱۸ <sup>d</sup>	T1 = ۴c	N3
۸/۰۷ <sup>c</sup>	T2 = ۸c	

\*: در هر ستون اعدادی که حداقل یک حرف مشترک دارند، بر اساس آزمون دانکن، اختلاف معنی‌دار ندارند ( $p < 0.01$ ).

در مرحله کالوس‌زایی حاصل شده بودند. محیط کشت باززایی MS با ترکیب (  $2 \text{ mg/L}^{-1} \text{ BA} + 1 \text{ mg/L}^{-1} \text{ Kin} + 30 \text{ g/L}^{-1}$  ساکارز) بود.

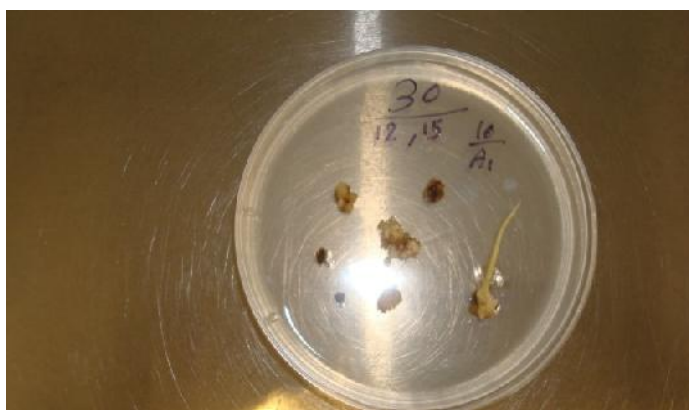
بررسی باززایی بر روی ژنوتیپ‌ها در دو بخش انجام گردید. ۱- کالوس‌هایی که از پیش تیمار سرمایی ۴ درجه سانتی‌گراد در مرحله کالوس‌زایی به دست آمده بودند ۲- کالوس‌هایی که از پیش تیمار سرمایی ۸ درجه سانتی‌گراد



شکل ۲- باززایی حاصل از ترکیب ژنی (شصتک / قائم // نعمت / قائم)  
Figure 2. Regeneration from crosses between Shastak Ghaem//Nemat/Ghae

(شصتک / قائم // نعمت / قائم) یا کد ۱ که دارای کالوس‌زایی کمی بود، در باززایی بالاترین باززایی کل را داشت. یعنی القای کالوس و باززایی همیشه دارای ارتباط مثبت با هم نمی‌باشند (۸).

ترکیب ژنی (دم‌سیاه / قائم // فجر / قائم) یا کد ۶ که در مرحله کالوس‌زایی بالاترین میزان کالوس را داشت، دارای باززایی پائین بود. اما در این محیط ترکیب ژنی (شصتک / قائم // نعمت / قائم) بالاترین درصد باززایی کل ۳/۲۳ را نسبت به سایر ترکیبات ژنی داشت (شکل‌های ۲ و ۳). ترکیب ژنی



شکل ۳- باززایی حاصل از محیط کشت MS  
MS+1mg/l BA + 2 mg/L Kin + 30 g/L sucrose  
Figure 3. The regeneration from MS media supplemented with 1mg/l BA, 2 mg/L Kin and 30 g/L sucrose

افزایشی و غالبیت به ارث رسیده باشد و تحت تأثیر عوامل محیط کشت باشد که این نتیجه خود نیازمند تحقیق جداگانه می‌باشد. این اختلاف حتی ممکن است در سنبلیچه‌های گیاه و حتی بساک‌های یک سنبلیچه نمایان گردد (۱۳). نتایج آزمایش هرات و همکاران (۷) روی کشت بساک برنج نشان داد که اعمال پیش تیمار ۸ درجه سانتی‌گراد در ۱۰ روز مناسب‌تر از سایر پیش تیمارهای بررسی شده می‌باشد. از طرفی پاسخ یا واکنش به پیش تیمار سرمایی به ژنوتیپ وابسته است (۴). گیاهان حاصل از شش ترکیب ژنی مختلف مورد آزمایش:

۱- شصتک / قائم // نعمت / قائم

همچنین اغلب گونه‌های با القای کالوس بالا، دارای توانایی ضعیف‌تری در باززایی می‌باشند (۱۴). فراوانی القای کالوس و باززایی یک سلول به وسیلهی فاکتورهای مختلفی مانند ژنوتیپ ارقام، شرایط کشت درون شیشه‌های نظیر مواد مغذی، ترکیب هورمون‌ها، شرایط رشد و سن ریزنمون‌ها محدود می‌شود (۱۰).

نتایج باززایی نشان داد که صفت باززایی و کالوس‌زایی در این ژنوتیپ‌ها ممکن است دو صفت مستقل باشند. و صفت باززایی در این ترکیبات ژنی امکان دارد به صورت آثار ژنتیکی

- ۲- شصتک / قائم // دم‌سیاه / قائم  
 ۳- نعمت / قائم // دم‌سیاه / قائم  
 ۴- شصتک / قائم // فجر / قائم  
 ۵- نعمت / قائم // فجر / قائم
- ۶- دم‌سیاه / قائم // فجر / قائم  
 صد در صد آلبینو بود به طوری که از تعداد کل کالوس انتقالی برای باززایی (۴۹۰) میزان ۱۱/۰۲ درصد گیاه آلبینو حاصل شد (شکل ۴).



شکل ۴- گیاهان آلبینو حاصل از ترکیب ژنی شصتک / قائم // نعمت / قائم  
 Figure 4. The Albino plantlets from crosses between Shastak/Ghaem and Nemat/Ghaem.

جدول ۴- فراوانی مجموع درصد باززایی گیاه سبز و آلبینو در محیط کشت MS<sub>30</sub>  
 Table 4. The percentage of of regeneration frequency of Green and Albino plantlets in MS<sub>30</sub> Media.

ژنوتیپ	انتقال شده از دو پیش تیمار	قهوایی و تیره شده (درصد)	فقط ریشه دار شده (درصد)	گیاه سبز (درصد)	گیاه آلبینو (درصد)	کالوس بدون تغییر (درصد)	باززایی کل (درصد)
شصتک/قائم // نعمت/قائم	۴درجه ۲۰	۸(۲۶/۶)	۱۲(۴۰)	.	۴(۱۳/۳)	۶(۲۰)	۱۳/۳
شصتک/قائم // دم‌سیاه/قائم	۸درجه ۶۰	۱۳ (۲۱/۶)	۲۳(۳۸/۳)	.	۱۴(۲۳/۳)	۱۰(۱۶/۶)	۲۳/۳
شصتک/قائم // فجر/قائم	۴درجه ۲۰	۸ (۴۰)	۱(۲/۵)	.	۳(۱۵)	۸(۴۰)	۱۵
دم‌سیاه / قائم // نعمت / قائم	۸درجه ۵۰	۱۹(۳۸)	۳(۶)	.	۷(۱۴)	۲۱(۴۲)	۱۴
دم‌سیاه / قائم // شصتک / قائم	۴درجه ۲۰	۲(۱۰)	.	.	۱(۵)	۱۷(۸۵)	۵
شصتک / قائم // فجر / قائم	۸درجه ۴۰	۵( ۱۲/۵)	.	.	۳( ۷/۵)	۳۲(۸۰)	۷/۵
شصتک / قائم // دم‌سیاه / قائم	۴درجه ۳۰	۸( ۲۶/۶)	۱۰(۳۳/۳)	.	۲(۶/۶)	۱۰(۳۳/۳)	۶/۶
فجر / قائم // نعمت / قائم	۸درجه ۶۰	۱۵(۲۵)	۱۷(۲۸/۳)	.	۳(۵)	۲۵(۴۱/۶)	۵
فجر / قائم // دم‌سیاه / قائم	۴درجه ۱۰	۵(۵۰)	۱(۱۰)	.	.	۴(۴۰)	.
فجر / قائم // شصتک / قائم	۸درجه ۲۰	۴(۲۰)	۳(۱۵)	.	۱(۵)	۱۲(۶۰)	۵
دم‌سیاه / قائم // فجر / قائم	۴درجه ۵۰	۱۵(۳۰)	۱۴(۲۸)	.	۶(۱۲)	۱۵(۳۰)	۱۲
فجر / قائم	۸درجه ۱۰۰	۲۸(۲۸)	۲۲(۲۲)	.	۱۰(۱۰)	۴۰(۴۰)	۱۰
جمع	-	۴۹۰	-	.	۵۴	-	۱۱/۰۲

مختلف دارای ۱۰۰ درصد باززایی آلبینو بوده‌اند. در تحقیق حاضر مشخص شد که پیش تیمار هشت درجه سانتی‌گراد بهترین پیش تیمار سرمایی در کالوس‌زایی و باززایی کل می‌باشد و ژنوتیپ گیاه یکی از فاکتورهای مهم در پاسخ بساک به القای کالوس می‌باشد. هر چند که فاکتورهای دیگری نظیر محیط کشت مناسب نیز در این رابطه بسیار مهم می‌باشند و نقش مهمی بر عهده دارند. بنابراین، مجموعه شرایط مختلفی برای ایجاد القای کالوس و در نهایت باززایی لازم است که برای هر ژنوتیپ، خاص آن ژنوتیپ می‌باشد.

آلبینیسیم می‌تواند تحت تأثیر یک عامل یا ترکیبی از عوامل مختلف باشد شامل: ژنوتیپ، محیط کشت، حالت‌های غیر نرمال تقسیم میوزی، عدم تعادل هورمونی، ناسازگاری ژنوم هسته‌ای- پلاستییدی، حذف، موتاسیون‌هایی در ژن‌های مسوول بیوزنر کلروفیل و غیره باشد (۱۵). باززایی گیاه آلبینو در برنج می‌تواند از ۵ تا ۱۰۰ درصد باشد (۱۴). همچنین در آزمایشات مختلف کشت بساک برنج، نظیر آزمایشات گویی و ندیر (۵) و نتایج آزمایشات نیرولا و بیم (۹) و هراث (۷)، بعضی از ژنوتیپ‌ها یا هیبریدها و ترکیبات ژنی

## منابع

1. Amarasinghe, A.Y. and Y.S. Yang. 2005. comparative studies on in vitro Response of fresh and old culli of Rice (*Oryza Sativa* L.) Journal of Agricultural Sciences, 1: 1-14.
2. Asaduzzaman, M., M.A. Bari, M.H. Rahman, N. Khatun, M.A. Islam and M. Rahman. 2003. In vitro plant regeneration through anther culture of five rice varieties. Journal of Biological Sciences, 3: 167-171.
3. Bajaj, S. and A. Mohanty. 2005. Recent advances in rice biotechnology-towards genetically superior transgenic rice. Plant Biotechnology Journal, 3: 275-307.
4. Datta, S.K. 2005. Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. Current Science, 89: 1870-1878.
5. Gueye, T. and K.N. 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: 709-713.
6. Herath, H.M.I., D.C. Bandara and P.K. Samaraje. 2007. Effect of culture Media for Anther Culture of Indica Rice Varieties and hybrids of Indica and Japonica tropical Agricultural Research and Extension, 10: 11-22.
7. Herath, H.M.I., D.C. Bandara, P.K. Samarajeewa 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. Ceylon Journal of Science (Biological Sciences), 38: 11-16.
8. Javed, M.A., T. Ishii, O. Kamijima and S. Misoo. 2007. The role of alternating culture temperatures and maltose in enhancing the anther culture efficiency of salt tolerant indica rice (*Oryza Sativa* L.) cultivars Pokkali and Nona Bokra. Plant Biotechnology, 2: 283-257.
9. Niroula, R.K. and H.P. Bim. 2009. Effect of Genotype and callus Induction Medium on Green plant Regeneration from Anther of Nepalese Rice cultivars. Asian Journal of plant sciences, 8: 368-374.
10. Salehian, H.A., N.A. Babaeian Jelodar, G.A. Ranjbar and N.D. Bagheri. 2011. Investigation of Plant Growth Regulators Effect on Callus Induction and Green Plant Regeneration of Rice Cultivars. Journal of Crop Breeding, 4(10): 90 (In Persian).
11. Sasaki, T. 2005. The mapped base sequence of the rice genome. Nature, 436: 793-800.
12. Silva, T.D. 2010. Indica rice anther culture: Can the impasse be surpassed? Plant cell Tiss organ cult, 100: 1-11.
13. Tabatabaei, B.E.S. and M. Omid. 2009. plant cell and Tissue culture. Tehran university press, 172 pp (In Persian).
14. Talebi R., MR. Rahemi, H. Arefi and M. Nourozi. 2007. In vitro plant regeneration through anther culture of some Iranian local rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10: 2056-2060.
15. Yao, J.L. and D. Cohe. 2000. Multiple gene control of plastome-genome incompatibility and plastid DNA inheritance in interspecific hybrids of *Zantedeschia*. Theoretical Applide Genetics, 101: 400-406.
16. Zapata-Arias, F.J. 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, 109-116.

## Effect of Temperature Pretreatment and Culture Media on Callus Induction and Regeneration in Composite Crosses between High Yielding Rice Cultivars and Ghaem line

Majid Zakeri<sup>1</sup>, Ghorban Ali Nematzadeh<sup>2</sup> and Seyed Kamal Kazemitabar<sup>3</sup>

1- Graduated M.Sc. Student, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran  
(Corresponding author: zakerimajid@yahoo.com)

2 and 3- Professor and Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Received: January 13, 2015

Accepted: January 11, 2016

### Abstract

In the present study, the effect of temperature pretreatment ( $T_1=4$  and  $T_2=8$  °C) for 10 days on anthers of six different genetic compositions of Ghaem with other high-yielding lines of rice have been studied. For callus induction, three modified culture media of  $N_6$  ( $N_1$ ,  $N_2$  and  $N_3$ ) and MS culture medium was used for regeneration. results of statistical analysis showed that there was significant difference ( $P<0.01$ ) among genotypes, modified media of  $N_6$ , temperature pretreatment and their interactions on callus induction. The genetic composition of (Ghaem /fajr // Ghaem /Domsiah) was identified as the most suitable genotype regarding to the callus induction (18.2%, at 8°C cold pretreatment). Among modified media of  $N_6$ , medium the  $N_1$  medium ( $N_6+ 0.5 \text{ mg/L}^{-1}$  2,4-D +  $2.5 \text{ mg/L}^{-1}$  NAA +  $0.5 \text{ mg/L}^{-1}$  Kin +  $20 \text{ g/L}^{-1}$  maltose and  $30 \text{ g/L}^{-1}$  sucrose) was evaluated as the best culture medium. Among pre-treated callus at 8 °C, the highest regeneration was related to genetic composition of (Ghaem /Nemat // Ghaem /shastak) with 23.3% regeneration (albino plant) successes. In current study 100% of regenerated plants were albino and the temperature of 8 °C pretreatment for 10 days was the best for callus induction and regeneration of these genetic compositions.

**Keyword:** Anther culture, Breeding lines, Callus, Rice