دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشدی روی کالوس‌زایی و باززایی چند رقم برنج

ح. صالحیان آقبلاغ[۱]، ن. ع. بابائیان جلودار[۲]، غ. ع. رنجبر[۳] و ن. ع. باقری[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، نویسنده مسئول: (hamed.salehian@yahoo.com)
۲، ۳ و ۴- استاد، دانشیار و استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۴ تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۲

چکیده

در این مطالعه قابلیت کالوس‌زایی و باززایی ارقام برنج (طارم جلودار، طارم دانش، سنگ طارم و ندا) مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای کالوس‌زایی از محیط کشت پایه‌ی MS حاوی سه سطح ۲/۰، ۲/۵ و ۳/۰ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2, 4-D و برای باززایی از محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف هورمون‌های BAP، NAA و Kin استفاده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده‌ی علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال ۱۳۸۹ انجام گرفت. نتایج نشان داد که رقم طارم دانش بیشترین (۸۱/۹۲٪ = $\bar{x}$) و رقم طارم جلودار کمترین (۲۳/۸۲٪= $\bar{x}$) کالوس‌زایی را در بین ارقام مورد مطالعه داشتند. واکنش ارقام برای کالوس‌زایی در غلظت‌های ۲/۰ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر 2, 4-D بیش از غلظت ۳ میلی گرم در لیتر بوده است. اثر متقابل غلظت‌های 2, 4-D و ارقام نشان داد که رقم طارم دانش در هر سه سطح 2, 4-D و رقم ندا در دو سطح ۲/۰ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر بیشترین میزان کالوس‌زایی را داشته‌اند. ارزیابی باززایی ارقام نیز نشان داد که رقم طارم دانش (۲۰/۰٪ = $\bar{x}$) و ندا (۱۶/۷٪ = $\bar{x}$) به ترتیب در تیمار با هورمون های BAP و Kin بیشترین باززایی را در بین ارقام مورد آزمایش داشتند. همچنین رقم طارم جلودار در تیمارهای هورمونی BAP و Kin کمترین باززایی (۳/۳٪ = $\bar{x}$) را داشت.

واژه‌های کلیدی: کالوس‌زایی، باززایی، کشت جنین، برنج

مقدمه

برنج که غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان است به یک گیاه مدل تک لپه‌ای برای مطالعات ژنتیکی و مطالعات ژنومیکی کاربردی تبدیل شده است (۲۲ و ۲۶). در سال‌های اخیر تلاش‌های قابل توجهی به طور مستقیم برای بهبود صفات مهم زراعی برنج از طریق بیوتکنولوژی انجام شده است (۲۲). اصلاح

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-22]

برنج، پیشرفت معنی‌داری در جهت افزایش عملکرد، بهبود کیفیت، مقاومت به بیماری‌ها و سایر ویژگی مهم زراعی ایجاد کرده و هنوز هم نقش مهمی را بازی می‌کند (۱۵). همچنین این افزایش عملکرد ممکن است از طریق دست‌کاری ژنتیکی نیز به دست آید. پیش بینی می‌شود جمعیت جهان در سال ۲۰۵۰ به بیش از ۱۰ میلیارد نفر برسد، بنابراین نیاز به بهبود عملکرد ارقام و واریته‌های محلی وجود دارد. یکی از راه‌های ممکن برای نیل به این هدف، افزایش عملکرد از طریق کشت بافت (تنوع سوماکلونال) است که بدون دخالت زیاد در دست‌کاری ژنتیکی صورت می‌گیرد. به سبب مداخله‌ی عوامل زنده و غیر زنده‌ی مختلف در فرایند کشت بافت، تنوع نامنظم در گیاهان باززایی شده از این فرآیند قابل ملاحظه است. بنابراین می توان نسبت به اصلاح واریته‌های مقاوم و با عملکرد بالا از طریق کشت بافت در برنج اقدام نمود (۵). کشت ریزنمونه روشی سریع برای باززایی از ژنوتیپ‌های مطلوب محسوب می شود (۲۳). در چند دهه‌ی اخیر تکنیک‌های کشت بافت، مانند کشت بساک، امتزاج پروتوپلاست، کشت برگ، ریشه و بذور بدون پوسته در اصلاح برنج برای بهره‌گیری از تنوع سوماکلونال جهت تولید واریته‌های جدید برنج به کار گرفته شده است (۱۵). در این بین کشت بذور بدون پوسته روش مهمی برای بهره‌گیری از تنوع سوماکلونال می‌باشد ولی عوامل موثر بر کارایی کشت مانند ژنوتیپ گیاهی، روش‌های کشت، محیط کشت و شرایط کشت کاربرد این روش را محدود می نمایند. در گیاهان زراعی تولید کالوس و باززایی متعاقب آن، اولین قدم برای دست‌کاری از طریق بیوتکنولوژی برای استفاده از تنوع سوماکلونال می‌باشد (۱۵). باززایی گیاه به وسیله‌ی تکنیک‌های کشت سلول و بافت می‌تواند رویه‌ی اصلاح سنتی برنج را تکمیل کند، مشروط بر اینکه گیاهان بتوانند به تعداد زیاد باززایی شوند و موفقیت این روش اصلاحی به کارایی انتخاب سلول‌های کشت شده برای صفات مطلوب بستگی دارد (۱۹). برای این کار به توسعه‌ی روشی موثر نیاز است تا برای باززایی گیاه از کالوس مورد استفاده قرار گیرد.

تشکیل کالوس در گیاهان تک لپه معمولا کمتر از گیاهان دولپه صورت می‌گیرد، به همین دلیل برای تحریک هورمونی، تشکیل کالوس، نیاز به اضافه کردن هورمون اکسین می‌باشد (۳). کشت جنین نارس و کشت جنین بالغ، متداول‌ترین روش‌های تولید کالوس می‌باشد (۱۷). جنین‌های حاصل از بذور کاملا رسیده یا تقریباً رسیده، اتوتروف بوده و در یک محیط کشت ساده‌ی مواد معدنی به همراه منبع انرژی (MS) به خوبی رشد می‌نمایند. غالباً برای تولید بافت کالوس از محیط کشت معدنی MS استفاده می‌شود و ساکارز یا گلوکوز به عنوان منبع قند به کار می‌رود (۸). میدا (۱۴) تولید کالوس را در سلول‌های برنج روی محیط پایه با استفاده از 2, 4-D القا کرد. کاواتا و ایشی‌هارا (۱۳) و نیشی و همکاران (۱۶)، از ریشه‌های برنج

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-22]

روی محیط LS حاوی 2, 4-D و IAA کالوس به دست آوردند (۵، ۱۳ و ۱۵). وانگ و همکاران (۲۴)، باززایی در برنج را از طریق جنین‌زایی سوماتیکی مورد مطالعه قرار داده و مشاهده کردند که برنج دو نوع کالوس جنین‌زا و غیرجنین‌زا تولید می‌کند. کالوس‌های جنین‌زا که در ناحیه‌ی سطحی تولید می‌شوند، سریع‌تر رشد کرده و اجازه‌ی رشد سریع از طریق جنین‌زایی سوماتیکی را به گیاهچه می‌دهند. ظفر و همکاران (۲۵)، بیشترین درصد تشکیل کالوس را در برنج Basmati-370 روی محیط کشت MS با ۲/۰ میلی گرم در لیتر 2, 4-D به دست آوردند ولی با این حال، جنین‌زایی سوماتیکی روی هر دو محیط N6 و MS با ۲/۰ میلی گرم از هر دو هورمون 2, 4-D و Kin به دست آمده بود. همچنین آنها بیان داشتند که جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی زمانی که پرولین یا تریپتوفان همراه با 2, 4-D به محیط کشت اضافه شد، افزایش یافت. رشید و همکاران (۱۹) از سیتوکینین (BAP) برای القای کالوس استفاده کردند اما دریافتند که این هورمون اثر منفی روی رشد کالوس در برنج ایندیکا دارد. از طرف دیگر، مشاهده کردند که اثر 2iP که یک سیتوکینین می‌باشد، روی رشد کالوس برنج و باززایی متعاقب آن، مثبت بوده است. همچنین آنها نتیجه گرفتند که فراوانی القای کالوس، رشد کالوس و آغاز جوانه‌ی سبز می‌تواند با اضافه کردن سیتوکینین‌ها و اکسین‌ها به محیط‌های کالوس‌زایی و باززایی افزایش یابد. اگرچه موفقیت‌های متعددی در باززایی گیاه از کشت بافت برنج وجود دارد، دستورالعمل توسعه یافته‌ای برای همه‌ی ارقام برنج قابل کاربرد نیست، بنابراین باید روش مناسب برای ارقام محلی برنج توسعه یابد (۱۱).

هدف از آزمایش حاضر شناسایی بهترین ژنوتیپ و تعیین مناسب‌ترین غلظت 2, 4-D برای کالوس‌زایی و ارزیابی پتانسیل ژنوتیپ‌ها و تعیین بهترین ترکیب هورمونی جهت باززایی ارقام جدید برنج می‌باشد.

مواد و روشها

بذور چهار رقم برنج به نام‌های طارم جلودار، طارم دانش، سنگ طارم و ندا از آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده‌ی علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه شد. بعد از جدا کردن پوسته‌ی این بذور، بذوری که ظاهری سالم داشتند برای ضدعفونی و کشت انتخاب شدند. ضدعفونی با قرار دادن بذور در الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و سپس شستشوی بذور با شناور ساختن آنها در آب مقطر استریل آغاز شد. سپس بذور در زیر محفظه‌ی استریل هود لامینار در محلول هیپوکلریت سدیم ۴۵ درصد حجمی (۱/۲۵ درصد ماده‌ی موثره) همراه با ۱ قطره توین ۸۰ به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. در مرحله‌ی آخر این بذور سه بار متوالی به مدت ۱، ۵ و ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل مطابق با روش قربانپور و همکاران شستشو داده شدند (۹). بذور

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-22]

ضدعفونی شده روی کاغذ صافی استریل قرار داده شد تا آب سطحی آنها کاملا خشک شود. این بذور به طور مستقیم روی محیط کشت MS با سطوح مختلف از هورمون 2, 4-D (غلظت‌های ۲/۰، ۲/۵ و ۳/۰ میلی گرم در لیتر) کشت داده شدند. در هر پتری‌دیش که حاوی ۲۰ سی‌سی از محیط کشت بود، تعداد ۱۰ بذر کشت گردید. سپس درب ظروف با پارافیلم بسته شد. نمونه‌ها جهت کالوس‌زایی در شرایط تاریکی و دمای ۱±۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ هفته قرار داده شدند (۹). بعد از شکل گیری کالوس‌ها، تعداد کالوس‌های تولید شده در هر پتری‌دیش شمارش شده و درصد کالوس‌زایی برای هر رقم و هر تیمار به طور جداگانه محاسبه گردید. در مرحله‌ی بعد کالوس‌های تولید شده جهت رشد و تکثیر به محیط کشت مشابهی واکشت شدند. دو هفته پس از واکشت، کالوس‌های جنین‌زا برای باززایی گیاه به محیط باززایی انتقال داده شدند. کالوس‌های زرد روشن، گره‌دار و ترد و شکننده جنین‌زا و در مقابل کالوس‌های صاف، آبدار و شیری رنگ به عنوان غیرجنین‌زا تلقی شدند (۷). محیط کشت استفاده شده برای باززایی، محیط پایه‌ی MS با سطوح مختلف از هورمون‌های BAP (۱/۰، ۲/۰ و ۳/۰ میلی گرم در لیتر)، NAA (۰/۵، ۱/۰ و ۲/۰ میلی گرم در لیتر) و Kin (۰/۵، ۱/۰ و ۲/۰ میلی گرم در لیتر) بود. بعد از کشت کالوس‌ها در محیط باززایی، ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱ هفته در شرایط تاریکی و دمای ۱±۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد تیمار گردیدند. بعد از این مدت نمونه‌ها تحت تیمار ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند (۲۲). پس از آغاز باززایی، کالوس‌های تغییر رنگ داده به لوله‌های آزمایش با محیط کشت مشابه منتقل شدند تا فضای کافی برای رشد گیاهچه وجود داشته باشد. بعد از رشد گیاهچه در حد مناسب، جهت تولید و توسعه ی ریشه‌ها از محلول یوشیدا استفاده شد. گیاهان ریشه‌دار شده از لوله‌ی آزمایش خارج شده و پس از کشت در خاک استریل به محیط سازگارسازی انتقال داده شدند (۱۰).

درصد کالوس‌زایی ارقام مختلف برنج، در قالب طرح کاملا تصادفی به صورت فاکتوریل در چهار تکرار محاسبه گردید. فاکتور اول شامل ارقام سنگ طارم، طارم جلودار، طارم دانش و ندا و فاکتور دوم شامل هورمون 2, 4-D در سه سطح ۲/۰، ۲/۵ و ۳/۰ میلی‌گرم در لیتر بود. برای بررسی درصد باززایی ارقام نیز از آزمایش فاکتوریل با دو عامل رقم در چهار سطح و هورمون‌های BAP، NAA و Kin (هر یک در سه سطح به طور جداگانه) در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار استفاده شد.

درصد کالوس‌زایی با استفاده از رابطه ۱ و درصد باززایی با استفاده از رابطه ۲ محاسبه گردید.

$$\text{درصد کالوس زایی} = \frac{\text{تعداد کالوس های تولید شده}}{\text{تعداد بذرهای کشت شده}} \times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-22]

(۲)

$$\text{درصد باززایی} = \frac{\text{تعداد کالوس های باززایی شده}}{\text{تعداد کالوس های انتقال داده شده}} \times ۱۰۰$$

به دلیل اینکه داده‌ها به صورت درصد بوده و از توزیع نرمال برخوردار نبودند، از تبدیل داده‌ی $\text{Arc Sin}\sqrt{x+0.5}$ برای نرمال کردن داده‌ها استفاده شد (۴) و میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری GENSTAT نسخه‌ی ۱۲ انجام گرفت.

نتایج و بحث

کالوس‌زایی

تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف 2, 4-D (۲/۰، ۲/۵ و ۳/۰ میلی گرم در لیتر) بر کالوس‌زایی ارقام مختلف برنج نشان داد که اثر غلظت‌های فوق، ارقام و اثر متقابل بین آن‌ها معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف 2, 4-D بر کالوس‌زایی ارقام مختلف برنج

منابع تغییر	درجه‌آزادی	MS
2, 4-D	۲	۴۵۵/۰۲*
رقم	۳	۸۴۲۴/۱۸**
2, 4-D × رقم	۶	۸۶۲/۷۷**
خطای آزمایش	۳۶	۸۸/۸۱
ضریب تغییرات		۱۷/۳۰

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

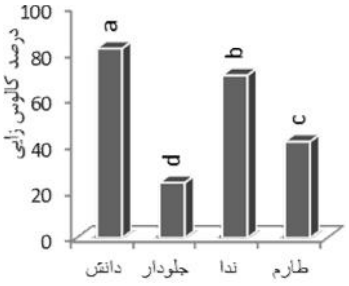
کالوس‌زایی در این آزمایش بسته به ژنوتیپ و غلظت 2, 4-D متفاوت بود که با نتایج سایر محققین نیز مطابقت دارد (۱، ۵، ۷ و ۱۱). بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به رقم طارم دانش ($\bar{x}$=٪۸۱/۹۲) و کمترین میزان کالوس‌زایی مربوط به رقم طارم جلودار ($\bar{x}$ =٪۲۳/۸۲) بود (شکل ۱).

همچنین در سطوح مختلف هورمون 2, 4-D، بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به سطح ۲/۵ میلی گرم در لیتر با میانگین ($\bar{x}$=٪۵۹/۹۷) بود (شکل ۲). بالاترین میزان کالوس‌زایی را رقم طارم دانش در سطح ۲/۵ و رقم ندا در سطوح ۲/۰ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D تولید کردند (شکل ۳).

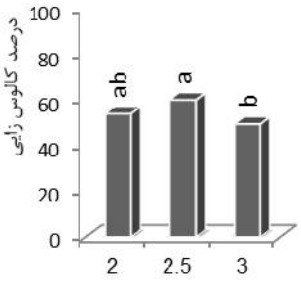
همچنین کمترین میزان کالوس‌زایی متعلق به رقم طارم جلودار در سطوح ۲/۰ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D بود. در رقم طارم دانش با تغییر سطوح هورمون 2, 4-D از ۲ به ۳ میلی گرم در لیتر، تغییر معنی‌داری در کالوس‌زایی ایجاد نشد. در حالی که در رقم طارم جلودار با افزایش غلظت هورمون 2, 4-D از ۲/۵ به ۳/۰ میلی گرم در لیتر افزایش معنی‌داری در میزان کالوس‌زایی حاصل شد. در رقم ندا برعکس رقم طارم جلودار، افزایش غلظت

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-22]

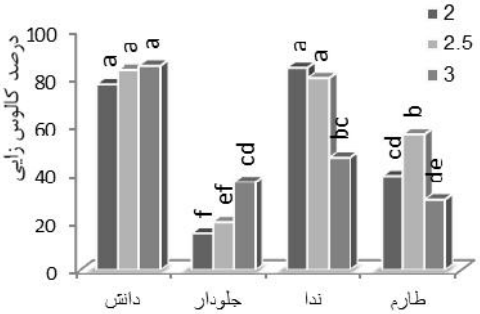
هورمون 2, 4-D از ۲/۵ به ۳/۰ منجر به کاهش معنی‌داری در میزان کالوس‌زایی شد. در رقم سنگ طارم با افزایش غلظت 2, 4-D از ۲/۰ به ۲/۵ افزایش معنی‌دار و با افزایش آن از ۲/۵ به ۳/۰ کاهش معنی‌داری در میزان کالوس‌زایی حاصل شد (شکل ۳).



شکل ۱- مقایسه‌ی میانگین درصد کالوس‌زایی ارقام برنج مورد مطالعه.



شکل ۲- مقایسه‌ی درصد کالوس‌زایی ارقام برنج در غلظت‌های مختلف (۲/۰، ۲/۵ و ۳/۰ میلی گرم در لیتر) 2, 4-D.



شکل ۳- مقایسه‌ی میانگین درصد کالوس‌زایی ارقام مختلف برنج در سطوح مختلف غلظت هورمون 2, 4-D.

باززایی:

تجزیه واریانس اثر غلظت هورمون‌های مختلف بر باززایی ارقام مورد مطالعه نشان داد که اثر رقم، غلظت هورمون و اثر متقابل آنها در هورمون‌های BAP و Kin معنی‌دار بود، اما در هورمون NAA فقط اثر غلظت هورمون معنی‌دار شد (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر غلظت هورمون‌های مختلف بر باززایی ارقام برنج مورد مطالعه

منابع تغییرات	درجه آزادی	MS		
		BAP	NAA	Kin
رقم	۳	۰/۰۲۰*	۰/۰۰۵^{ns}	۰/۰۱۴**
غلظت هورمون	۲	۰/۰۲۹**	۰/۰۴۵**	۰/۰۷۸**
رقم × غلظت هورمون	۶	۰/۰۱۴*	۰/۰۰۲^{ns}	۰/۰۰۸*
خطای آزمایش	۳۶	۰/۰۰۵	۰/۰۰۴	۰/۰۰۳
ضریب تغییرات		۹/۵	۸/۶	۷/۱

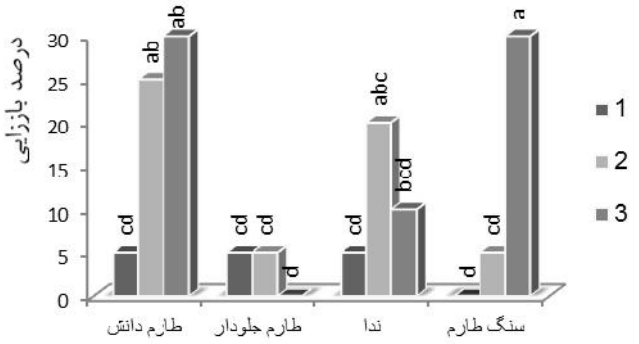
* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns: عدم معنی‌داری.

بیشترین میزان باززایی در ارقام طارم دانش و سنگ طارم در سطح ۳/۰ میلی گرم در لیتر هورمون BAP دیده شد و در رقم طارم جلودار در سطح ۳/۰ میلی گرم در لیتر و در رقم سنگ

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-22]

طارم در سطح ۱/۰ میلی گرم در لیتر باززایی صورت نگرفت. همچنین در رقم طارم دانش در سطوح ۲/۰ و ۳/۰ میلی گرم در لیتر، در رقم ندا در سطح ۲/۰ میلی گرم در لیتر و در رقم سنگ طارم در سطح ۳/۰ میلی گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری از نظر باززایی مشاهده نشد. در رقم ندا و طارم جلودار با افزایش غلظت هورمون BAP از ۱/۰ به ۳/۰ میلی‌گرم در لیتر تغییرمعنی‌داری در میزان باززایی مشاهده نشد.

در حالیکه در رقم سنگ طارم با افزایش آن از ۲/۰ به ۳/۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌داری در میزان باززایی دیده شد. در رقم طارم دانش با افزایش سطح هورمون BAP از ۱/۰ به ۲/۰ میلی گرم در لیتر نیز افزایش معنی‌داری دیده شد ولی با افزایش آن از ۲/۰ به ۳/۰ میلی گرم در لیتر تغییر معنی‌داری در میزان باززایی ایجاد نشد (شکل ۴).



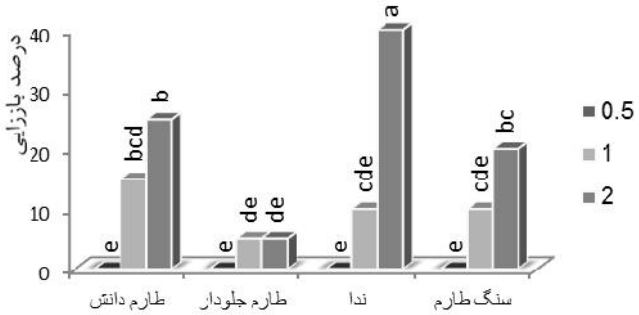
شکل ۴- مقایسه‌ی میانگین درصد باززایی ارقام مختلف برنج در سطوح مختلف غلظت هورمون BAP.

در اثر متقابل هورمون Kin و ارقام مورد مطالعه، مشاهده شد که رقم ندا در سطح هورمونی ۳/۰ میلی گرم در لیتر بیشترین میزان باززایی را داشت (۴۰/۰٪=$\bar{x}$). در رقم ندا بین سطوح ۱/۰ و ۲/۰ میلی گرم در لیتر Kin اختلاف معنی‌داری از نظر باززایی وجود داشت، اما در ارقام طارم دانش، طارم جلودار و سنگ طارم بین سطوح مذکور اختلاف معنی‌داری از نظر باززایی مشاهده نشد. هیچ یک از ارقام در سطح ۰/۵ میلی گرم در لیتر از تیمار هورمونی Kin قادر به باززایی نبودند. بیشترین مقدار باززایی نیز مربوط به رقم ندا در سطح هورمونی ۲ میلی گرم در لیتر بود (شکل ۵). در مورد هورمون NAA، اثر رقم و اثر متقابل رقم در غلظت هورمون معنی‌دار نشد و فقط اثر ساده‌ی هورمون معنی‌دار گردید. در سطوح مختلف این هورمون، بیشترین میزان باززایی مربوط به سطح ۱/۰ میلی گرم در لیتر (۱۸/۸٪=$\bar{x}$) و کمترین میزان باززایی مربوط به سطح ۲/۰ میلی گرم در لیتر بود (۲/۵٪ =$\bar{x}$)،

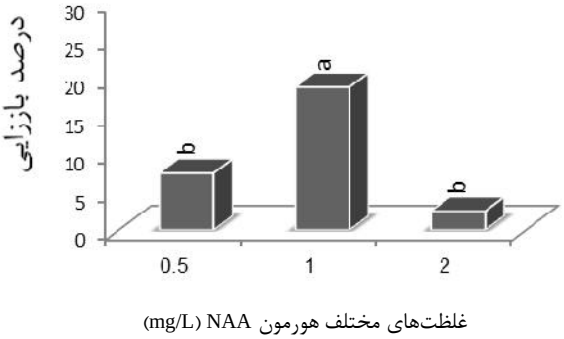
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-22]

(شکل ۶). شکل ۷ کالوس‌های تشکیل شده در رقم طارم دانش را ۲ هفته پس از کشت در محیط کالوس‌زایی نشان می‌دهد.

نمونه‌ای از کالوس‌های رقم طارم دانش ۴ هفته پس از کشت در محیط باززایی در مرحله‌ی آغاز باززایی (شکل ۸) و نمونه‌ای از گیاهچه‌های به دست آمده از ارقام مختلف ۶ هفته پس از کشت در محیط باززایی و در مرحله‌ی گیاهچه‌ی دو برگی (شکل ۹) و پس از انتقال به محیط سازگاری (شکل ۱۰) نشان داده شده است.



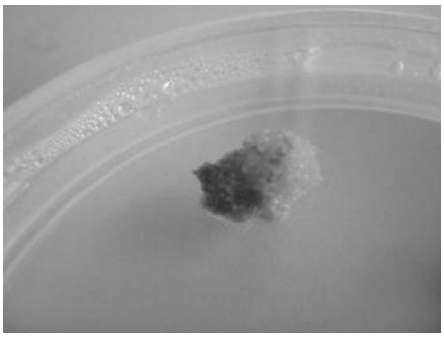
شکل ۵- مقایسه‌ی میانگین درصد باززایی ارقام مختلف برنج در سطوح مختلف غلظت هورمون Kin.



شکل ۶- مقایسه‌ی درصد باززایی ارقام برنج در غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۱/۰ و ۲/۰ میلی گرم در لیتر) هورمون NAA.

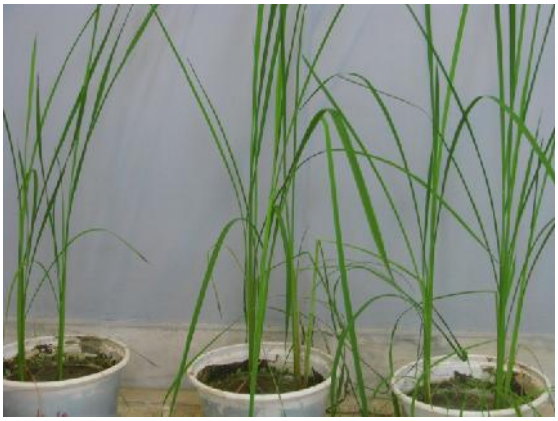
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-22]

شکل ۷- کالوس‌های تشکیل شده در رقم طارم دانش ۲ هفته پس از کشت در محیط MS محتوی 2, 4-D.



شکل ۸- آغاز باززایی کالوس‌های رقم طارم دانش ۴ هفته پس از کشت در محیط MS محتوی Kin.

شکل ۹- نمونه‌ای از گیاهان باززایی شده از ارقام مختلف پس از ۶ هفته.



شکل ۱۰- نمونه‌ای از گیاهان انتقال داده شده به محیط سازگاری.

اکسین 2, 4-D به طور معمول به عنوان یک عامل القای کالوس استفاده می‌شود، در حالی که گزارش‌های کمی استفاده از سیتوکینین را نشان می‌دهد (۲۶). در این مطالعه برای کالوس‌زایی از هورمون 2, 4-D با غلظت‌های مختلف استفاده شد که ساهاران و همکاران (۲۰) هم بیان نمودند که بیش از همه 2, 4-D به عنوان تنها تنظیم کننده‌ی رشدی در محیط القای کالوس استفاده شده است. با توجه به نتایج، درصد کالوس‌زایی در بین ارقام و در غلظت‌های مختلف هورمون 2, 4-D و اثر متقابل آنها به طور معنی‌داری متفاوت بود (جدول ۱). الخیری و اندرسون (۱) نیز دریافتند تشکیل کالوس میان ارقام برنج به طور معنی‌داری متفاوت و به غلظت 2, 4-D و غلظت Kin و اثر متقابل دوگانه‌ی آنها وابسته است. چیترا و کومار (۷) القای کالوس را زمانی که بذور روی محیط MS حاوی ۲/۰ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D کشت شدند مشاهده کردند. در تحقیق حاضر نیز برای القای کالوس از محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف 2, 4-D استفاده شد و کالوس‌های جنین‌زا براساس ویژگی‌های مذکور انتخاب گردیدند. الاهی و همکاران (۱۱) کالوس فراوان، متراکم و جنین‌زا را روی محیط کشت MS حاوی 2, 4-D، BAP

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-22]

و TPN بدست آوردند و گزارش نمودند کالوس قابل قبول زمانی که 2, 4-D و Kin به محیط MS اضافه شده بود، به دست آمد.

در این تحقیق برای باززایی از کالوس‌های به دست آمده، از محیط پایه‌ی MS با سطوح متفاوتی از هورمون‌های مختلف استفاده شد. تاداونگ و همکاران (۲۱) برای باززایی از محیط کشت MS تکمیل شده با IAA در ترکیب با BA یا Kin استفاده کردند. آنها اعلام کردند که کالوس‌های کشت شده در محیط MS تکمیل شده با ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۴/۰ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین توانایی باززایی را در میان کالوس‌های کشت شده روی تمام انواع محیط‌های باززایی نشان دادند. آرمنیا و فوتسوهارا (۲) پیشنهاد کردند که فرایند باززایی کالوس نه تنها به ژنوتیپ و محیط باززایی مناسب بلکه به نور نیز بستگی دارد. به خوبی مشخص شده است که باززایی کالوس و تبدیل به ساقه یا ریشه به طور عمده به تناسب اکسین و سیتوکینین در محیط کشت بستگی دارد. باززایی ساقه در محیط تکمیل شده با نسبت پایین اکسین به سیتوکینین به دست می‌آید درحالی که تشکیل ریشه، محیط با نسبت بالای اکسین به سیتوکینین را ترجیح می‌دهد (۲۱). تجزیه واریانس باززایی ارقام نشان داد که باززایی گیاه تحت تأثیر ژنوتیپ و نوع و غلظت هورمون مورد استفاده قرار می‌گیرد (جدول ۲)، که با یافته‌های اسلام و همکاران (۱۲) مطابقت دارد. آنها مشاهده کردند که توانایی باززایی گیاه از کالوس، به واریته و محیط القای کالوس بستگی دارد. الاهی و همکاران (۱۱) نیز برای باززایی، کالوس جنین‌زا را روی محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف NAA، Kin، BAP و IAA کشت کردند. آنها دریافتند پتانسیل اندام‌زایی بافت‌های کالوس به گونه‌ی گیاهی، نوع ریزنمونه که کالوس از آن به دست آمده، سن بافت کالوس و ترکیب مواد مغذی محیط کشت بستگی دارد. عامل مهم دیگر، نوع و سطح تنظیم کننده‌های رشدی مختلف می‌باشد. موفقیت سریع در اندام‌زایی احتمالاً با پتانسیل طبیعی باززایی بافت گیاهی همبسته باشد. همچنین زیدی و همکاران (۲۶) مشاهده کردند سیتوکینین‌ها (Kin و BAP) و اکسین (IAA) اضافه شده به محیط القای کالوس، فراوانی تشکیل کالوس، کالوس‌های جنین‌زا و باززایی را افزایش داد. علاوه بر این، ثابت کردند حضور BAP در محیط باززایی نیز مطلوب می‌باشد. بالاترین فراوانی القای کالوس، تشکیل کالوس جنین‌زا و باززایی زمانی بدست آمد که Kin، IAA و BAP در هر دو محیط کالوس‌زایی و باززایی وجود داشت. برای مشاهده‌ی تأثیر سیتوکینین‌ها و اکسین افزوده شده روی کالوس‌زایی، از محیط القای کالوس با ۲/۰ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D به صورت جدا و در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin، ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP استفاده کردند. محیط کشت باززایی استفاده شده توسط زیدی و همکاران (۲۶)

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-22]

شامل ۲/۰ میلی گرم در لیتر Kin، ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر IAA با یا بدون ۲/۰ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. آنها بعد از ارزیابی هر یک از عوامل فوق الذکر به صورت جدا از هم، اثرات توأم این عوامل در سری آزمایشات اندازه‌گیری روزهای کالوس‌دهی، فراوانی القای کالوس، فراوانی تشکیل کالوس‌های جنین‌زا، روزهای جوانه‌ی سبز و فراوانی باززایی را مورد ارزیابی قرار دادند و گزارش نمودند حضور سیتوکینین در محیط کشت کالوس‌زایی اثر مثبت زیادی بر ازدیاد سریع کالوس و به دنبال آن باززایی رقم .MDU 5 تولید کرد. نتایج مطالعه‌ی بینا (۶) نیز نشان می‌دهد باززایی کالوس‌ها به طور زیادی به وسیله‌ی ژنوتیپ متأثر می‌شود و با نتایج این گزارش مطابقت دارد (جدول ۲). همچنین ژنوتیپ‌ها ممکن است در محیط پایه‌ی مورد نیاز با هم متفاوت باشند. رامش و همکاران (۱۸) نیز ابراز نمودند که فراوانی القای کالوس و باززایی یک سلول به وسیله‌ی فاکتورهای مختلفی مانند ژنوتیپ ارقام، شرایط کشت درون شیشه‌ای نظیر مواد مغذی، ترکیب هورمون‌ها، شرایط رشد و سن ریزنمونه‌ها محدود می‌شود. همچنین اثر تحریک کنندگی BAP در ترکیب با NAA در تسهیل باززایی در کشت کالوس برنج را گزارش کردند.

نتایج حاصل از این مطالعه روی ۴ رقم برنج و سطوح هورمونی مختلف حاکی از تاثیر مهم ژنوتیپ، غلظت هورمون و اثر متقابل آنها در کالوس‌زایی و باززایی گیاه می‌باشد. با توجه به اهمیت وجود تنوع در اصلاح نباتات و گزارش‌های متعدد مبنی بر ایجاد تنوع سوماکلونال در اثر کشت بافت و باززایی گیاهچه از کالوس، پیشنهاد می‌شود تنوع سوماکلونال گیاهان باززایی شده با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی مورد بررسی و شناسایی قرار گیرد تا در صورت مفید بودن جهت اصلاح گیاه در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Al-Khayri, J.M. and E.J. Anderson. 1995. Callus induction and plant regeneration of commercial rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. Proceeding Arkansas Academy of Science. 49: 17-21.
2. Armenia, B.M. and Y. Futsuhara. 1992. Histological observations on plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.) Calli. Japan. J. Breed. 42: 33-41.
3. Bagheri, A. and M. Saffari. In Vitro Culture of Higher Plants. Translate. 4th Edition. Ferdowsi University of Mashhad. 406 pp.
4. Bagheri, N.A., N.A. BabaeianJelodar and A. Ghanbari. 2008. Diallel analysis study of yield and yield-related traits in rice genotypes. International Journal of Agricultural Research. 3(6): 386-396.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-22]

5. Bano, S., M. Musarrat., F. Rahim and I. Ilahi. 2005. Callus induction and regeneration in seed explants of rice (*Oryza Sativa* cv. SWAT-II). Pak. J. Bot., 37(3): 829-836.
6. Beena, C. 2006. Genetic effect on the regeneration of the calli of rice. Indian J. Crop Science. 1(1-2): 207-208.
7. Chitra, S. and C.R. Anander Kumar. 2006. Plant regeneration from scutellum-derived callus of Assam rice collection (*Oryza sativa* L.). Madras Agric. J., 93(1-6): 73-75.
8. Farsi, M. and J. Zolala. 2008. Introduction to Plant Biotechnology. Translate. 4th Edition. Ferdowsi University of Mashhad. 495 pp.
9. Ghorbanpour, K., N.A. Babaeian Jelodar and M. Valizadeh. 2002. Investigation of callus induction and plant regeneration through tissue culture in Iranian rice cultivars. J. Agric. Sci. Natur. Resour., 9(1): 71-80.
10. Arefi, H., M. Norouzi. and N.A. Bagheri. 2003. An investigation of callus induction and regeneration of rice genotypes (*Oryza sativa* L.) by anther culture. Iranian. J. Agric. Sci., 35(2): 293-299.
11. Ilahi, I., S. Bano, M. Jabeen and F. Rahim. 2005. Micropropagation of rice (*Oryza sativa* L. cv. SWAT-II) through somatic embryogenesis. Pak. J. Bot., 37(2): 237-242.
12. Islam, M.M., S.A. Wahed and S.A.K.U. Khan. 2004. Studies on callus induction and regeneration from dehusked rice (*Oryza sativa* L.) seeds. Plant Tissue Cult., 14(2): 155-160.
13. Kawata, S.I. and A. Ishihara. 1968. The regeneration of rice plant (*Oryza sativa* L.) in the callus derived from seminal root. Proc. Jpn. Acad., 44: 549-553.
14. Maeda, E. 1965. Callus formation and isolation of single cells from rice seedlings. Proc. Crop. Sci. Soc. Jpn., 34: 139-147.
15. Monirul, I., A. Mahatlat and M. Debabrata. 2005. In vitro callus induction and plant regeneration in seeds explants of rice (*Oryza sativa* L.). Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 1(1): 72-75.
16. Nishi, T., Y. Yamada and E. Takahashi. 1968. Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. Nature (London). 219: 508-509.
17. NouriDelavar, M.Z. and A. Arzani. 2000. Analysis of callus induction and plant regeneration from immature embryo of rice cultivars. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources. 4(4): 57-71.
18. Ramesh, M., V. Murugiah and A.K. Gupta. 2009. Efficient in vitro plant regeneration via leaf base segments of indica rice (*Oryza sativa* L.). Indian Journal of Experimental Biology. 47: 68-74.
19. Rashid, H., F. MohammadAbbasi and A. Quraishi. 2003. Plant regeneration from seed derived callus of three varieties of Basmati rice. Plant Tissue Cult., 13(1): 75-79.
20. Saharan, V., R.C. Yadav, N.R. Yadav and B.P. Chapagain. 2004. High frequency plant regeneration from desiccated calli of indica rice (*Oryza sativa* L.). African Journal of Biotechnology. 3(5): 256-259.
21. Thadavong, S., P. Sripichitt, W. Wongyai and P. Jompuk. 2002. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of glutinous rice (*Oryza sativa* L.) cultivar TDK1. Kasetsart Journal. 36(4): 334-344.
22. Xiaojia, G., C. Zhaohui, L. Yongjun and W. Shiping. 2006. A tissue culture system for different germplasms of indica rice. Plant Cell Rep., 25: 392-402.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-22]

23. Xiu-hong, W., S. Xiang-yuan and W. Xian-jun. 2005. Tissue culture responses different explants of rice. Rice Science. 12(3): 229-232.
24. Wang, M.S., F.J. Zapaa and D.C. Castro. 1987. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature seed and young inflorescence of wild rice (*Oryza perennis*). Plant Cell Report. 6: 294-296.
25. Zafar. Y., A. Wajid, K.A. Malik and O.L. Gamborg. 1992. Establishment of regenerating calli and cell suspension line of Basmati rice (*Oryza sativa* L. cv. B. 370). Pak. J. Bot., 24(1): 64-71.
26. Zaidi, M.A., M. Narayanan, R. Sardana, I. Taga, S. Postel, R. Johns, M. McNulty, Y. Mottiar, J. Mao, E. Loit and I. Altosaar. 2006. Optimizing tissue culture media for efficient transformation of different indica rice genotypes. Agronomy Research. 4(2): 563-575.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-22]

Investigation of Plant Growth Regulators Effect on Callus Induction and Green Plant Regeneration of Rice Cultivars

H. Salehian Agblagh[1], N.A. Babaeian Jelodar[2], G.A. Ranjbar[3] and N.A. Bagheri[4]

1- Former M.Sc. Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (Corresponding author: hamed.salehian@yahoo.com)
2, 3 and 4- Professor, Associate Professor and Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
Received: 15, March, 2011 Accepted: 24, July, 2011

Abstract

Callus induction and plant regeneration potential of rice cultivars (Tarom-jelodar, Sang-tarom, Tarom-danesh and Neda) were studied. MS medium culture containing 3 levels of 2, 4-D (2.0, 2.5 and 3.0 mg/l), for callus induction and MS medium culture containing different levels of BAP, NAA and Kin hormones for plant regeneration were used. These experiments were conducted at completely randomized design with Factorial arrangement with 4 replication in the biotechnology laboratory of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU) in 2010. The results showed that Tarom-danesh cultivar had the highest ($\overline{X}$ = 81.92%) and the Tarom-jelodar cultivar had the lowest ($\overline{X}$ = 23.82%) percentage of callus induction. Generally, cultivars' reactions to callus induction in 2.0 and 2.5 mg/l concentrations of 2, 4-D were more than 3.0 mg/l concentration of this hormone. The interaction between 2, 4-D concentrations and cultivars showed that Tarom-danesh cultivar in all of 2, 4-D concentrations and Neda cultivar in levels of 2.0 and 2.5 mg/l 2, 4-D had the highest amount of callus induction. The plant regeneration showed that Tarom-danesh ($\overline{X}$ = 20.0%) and Neda ($\overline{X}$ = 16.7%) cultivars in treatment of BAP and Kin had the highest regeneration percentage, respectively. Also Tarom-jelodar cultivar in treatments of BAP and Kin had the least ($\overline{X}$ = 3.3%) percent of green plant regeneration.

Keywords: Callus induction, Green plant regeneration, Embryo culture, Rice

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-22]