دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

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

مجید ذاکری[۱]، قربانعلی نعمت‌زاده[۲] و سیدکمال کاظمی‌تبار[۳]

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 دریافت: ۹۳/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۱

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 ($T1=4^{o}$, $T2=8^{o}$) به مدت ۱۰ روز 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 نشان داد که میان ژنوتیپ‌ها، محیط کشت‌های تغییریافته 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 (N6+ 2,4-D 0.5mg/L^{-1} + NAA 2.5 mg/L^{-1} + Kin 0.5 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

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 واریته‌هایی 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 کاینتین به میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر و 2,4-D به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر در هر سه محیط کشت فوق‌الذکر، بیشترین میزان تولیدکالوس 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 (۲۸،۲۱،۱۴،۷) 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 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 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

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 اتیلیک۷۰٪ ضدعفونی سطحی شدند و سپس با دستمال کاغذی مرطوب در فویل آلومینیومی پیچیده و جهت اعمال پیش تیمار سرمایی‌در 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 کاملا استریل شده به ابعاد ۶۰×۱۵میلی‌متر حاوی۸ میلی‌لیتر محیط غذایی کالوس‌زا قرار داده شد. پس از درزگیری با پارافیلم به مدت ۸-۶ هفته در دمای ۱±۲۵ 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 درلیتر 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 روشنایی تحت شرایط نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی 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 دراین آزمایش شامل۳۶ عدد پتری‌دیش است که در آنها ۱۰۸۰ بساک کشت شد. صفات آندروژنیک ذیل دراین آزمایش مورد مطالعه قرار گرفتند.

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

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

درصد گیاه آلبینو: تعدادگیاه آلبینو تولید شده به ازای ۱۰۰کالوس 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 زاویه‌ایی 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 سرمایی۴ درجه سانتی‌گراد و ۸ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. و ترکیب ژنی دم‌سیاه/ قائم// فجر/ قائم با تولید میانگین (۱۸/۲٪) کالوس با پیش تیمار ۸درجه 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 پیش‌تیمار ۴ درجه سانتی‌گراد در آخرین رده گروه‌بندی قرارگرفت (جدول ۲). نتایج نشان داد که در ژنوتیپ‌های مختلف با اعمال پیش‌تیمار 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).

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 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**
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

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ C.V=۱۵/۵۲

زاپاتا (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 زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار دادند. واریته‌ها و پیش‌تیمارهای 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).

جدول ۲– مقایسه میانگین کالوس‌زایی اثرات ژنوتیپ و دما با استفاده از آزمون دانکن (α=٪۱)
Table 2. Mean comparison of callus induction influenced by genotype and temperature using Duncan test

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

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

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

شکل ۱– کالوس حاصل از ترکیب ژنی دم‌سیاه/ قائم/ فجر/ قائم‌در محیط کشتN1
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 (α=٪۱)
Table 3. Mean comparison table of Callus induction influenced by media composition and Temperature using Duncan test

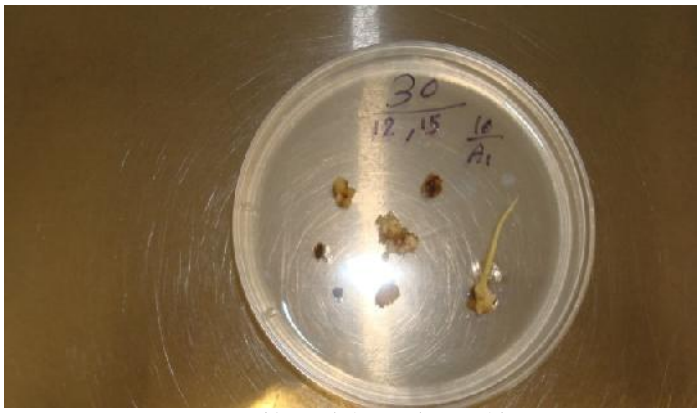
محیط کشت	دما	درصد میانگین کالوس‌زائی
N1	T1 =۴°c	۵/۵۹^{a}
	T2 =۸°c	۱۱/۱^{a}
N2	T1 =۴°c	۵/۳۴^{a}
	T2 =۸°c	۱۰/۰۲^{b}
N3	T1 =۴°c	۵/۱۸^{a}
	T2 =۸°c	۸/۰۷^{c}

*: در هر ستون اعدادی که حداقل یک حرف مشترک دارند، بر اساس آزمون دانکن ، اختلاف معنی‌دار ندارند ($p < ۰/۰۱$).

بررسی باززایی بر روی ژنوتیپ‌ها در دو بخش انجام گردید. ۱- کالوس‌هایی که از پیش تیمار سرمایی ۴ درجه سانتی‌گراد در مرحله کالوس‌زایی به‌دست آمده بودند ۲- کالوس‌هایی که از پیش‌تیمار سرمایی ۸ درجه سانتی‌گراد در مرحله کالوس‌زایی‌حاصل شده بودند. محیط کشت باززایی MS با ترکیب (MS+1mg/l^{-1} BA + 2 mg/L^{-1} Kin + ساکارز 30 g/L^{-1}) بود.

شکل۲- باززایی حاصل از ترکیب ژنی (شصتک / قائم // نعمت / قائم)
Figure 2. Regeneration from crosses between Shastak Ghaem//Nemat/Ghae

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 ۲۳/۳ را نسبت به سایر ترکیبات ژنی داشت (شکل‌های ۲ و ۳). ترکیب ژنی (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).



شکل۳- باززایی حاصل از محیط کشت MS
MS+1mg/l BA + 2 mg/L Kin + 30 g/Lsucrose
Figure 3. The regeneration from MS media supplemented with 1mg/l BA, 2 mg/L Kin and 30 g/L sucrose

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 شیشهای نظیر مواد مغذی، ترکیب هورمونها، شرایط رشد و سن ریزنمونهها 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 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 سنبلچه‌های گیاه و حتی بساک‌های یک سنبلچه نمایان گردد (۱۳). نتایج آزمایش هراث 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

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 به‌طوری 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_{30}
Table 4. The percentage of of regeneration frequency of Green and Albino plantlets in MS_{30} Media.

ژنوتیپ	تعداد کالوس انتقال شده از دو پیش تیمار	قهوایی وتیره 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 ۸درجه ۶۰	۸(۲۶/۶) ۱۳ (۲۱/۶)	۱۲(۴۰) ۲۳(۳۸/۳)	۰ ۰	۴(۱۳/۳) ۱۴(۲۳/۳)	۶(۲۰) ۱۰(۱۶/۶)	۱۳/۳ ۲۳/۳
شصتک/قائم // دمسیاه/ قائم	۴درجه۲۰ ۸درجه۵۰	۸ (۴۰) ۱۹(۳۸)	۱(۲/۵) ۳(۶)	۰ ۰	۳(۱۵) ۷(۱۴)	۸(۴۰) ۲۱(۴۲)	۱۵ ۱۴
نعمت / قائم // دمسیاه / قائم	۴درجه۲۰ ۸درجه۴۰	۲(۱۰) ۵(۱۲/۵)	۰ ۰	۰ ۰	۱(۵) ۳(۷/۵)	۱۷(۸۵) ۳۲(۸۰)	۵ ۷/۵
شصتک / قائم // فجر / قائم	۴درجه۳۰ ۸درجه۶۰	۸(۲۶/۶) ۱۵(۲۵)	۱۰(۳۳/۳) ۱۷(۲۸/۳)	۰ ۰	۲(۶/۶) ۳(۵)	۱۰(۳۳/۳) ۲۵(۴۱/۶)	۶/۶ ۵
عمت / قائم // فجر / قائم	۴درجه۱۰ ۸درجه۲۰	۵(۵۰) ۴(۲۰)	۱(۱۰) ۳(۱۵)	۰ ۰	۰ ۱(۵)	۴(۴۰) ۱۲(۶۰)	۰ ۵
دمسیاه /قائم // فجر /قائم	۴درجه۵۰ ۸درجه۱۰۰	۱۵(۳۰) ۲۸(۲۸)	۱۴(۲۸) ۲۲(۲۲)	۰ ۰	۶(۱۲) ۱۰(۱۰)	۱۵(۳۰) ۴۰(۴۰)	۱۲ ۱۰
جمع	-	۴۹۰	-	۰	۵۴	-	۱۱/۰۲

آلبینیسم 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 هسته‌ایی- پلاستیدی، حذف، موتاسیون‌هایی در ژن‌های مسوول بیوژنز 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 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 ژنوتیب 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.

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 vavieties. 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 enhanciny the anther culture efficiency of solt tolerant indica rice (*Oryza Sativa* L.) sultivars 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 maped base sequence of the rice genome. Nature, 436: 793-800.
12. Silva, T.D. 2010. Indica rice anther culture: Can the impasse me surpaseed? Plant cell Tiss organ cult, 100: 1-11.
13. Tabatabaei, B.E.S. and M. Omidi. 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[1], Ghorban Ali Nematzadeh[2] and Seyed Kamal Kazemitabar[3]

1- Graduted 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 N6, 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 N6, medium the N1 medium (N_6+ 0.5 mg/L^{-1} 2,4-D + 2.5 mg/L^{-1} NAA + 0.5 mg/L^{-1} Kin + 20 g/L^{-1} maltose and 30 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