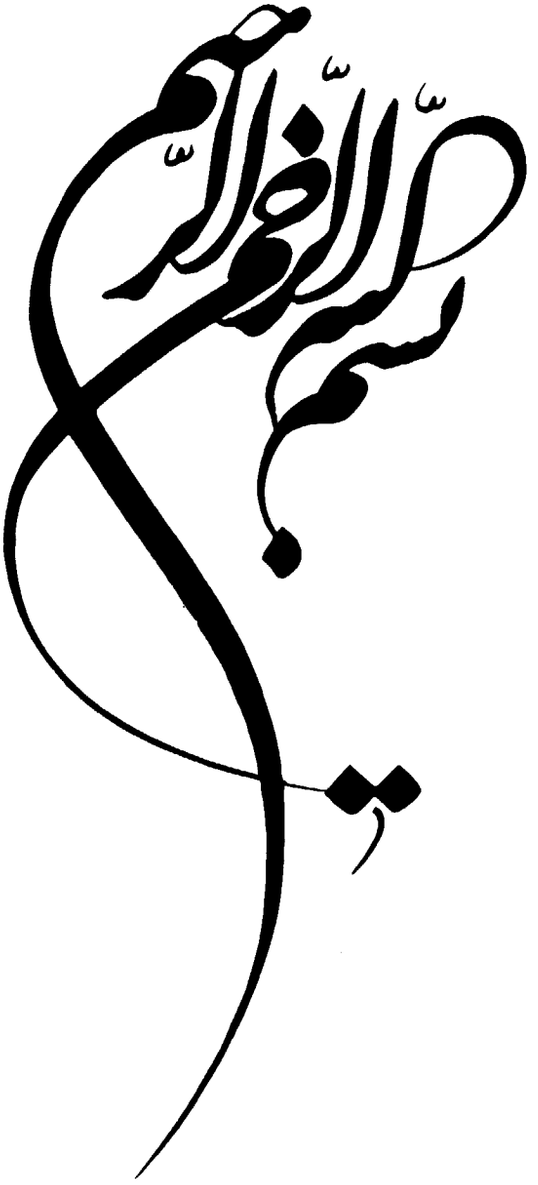


۲۷۴۱۶

۲۱۸/۸۷/۳۰

مرکز تحقیقات کشاورزی ایران
تاسیس مدارک

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد (M. Sc.)

در رشته اصلاح نباتات _ مهندسی کشاورزی

موضوع:

بررسی اثر ژنوتیپ و ترکیب محیط کشت بر روی آندروژنز (کشت بساک) گندم هگزاپلوئید (*Triticum aestivum* L.)

دانیال کهریزی

استاد راهنما :

دکتر احمد معینی

- 5125

استاد مشاور:

دکتر رضا بزرگی‌پور

شهریور ۱۳۷۸

۲۷۴۱۶

کلیه حقوق اعم از چاپ ، تکثیر ، نسخه برداری ، ترجمه ،اقتباس و ... از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ، برای دانـشگاه تربیت مدرس محـفوظ است. نقل مطالب با ذکر مآخذ بلامانع است .

آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند :

ماده ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) ی خود ، مراتب را قبلاً" به طور کتبی به " مرکز نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند :

" کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته اصلاح نباتات است که در سال ۱۳۷۸در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر احمد معینی و مشاوره جناب آقای دکتر رضا بزرگی پور از آن دفاع شده است ."

ماده ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه ، تعداد یک درصد شمارگان کتاب(در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰ ٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶ اینجانب دانیال کهریزی دانشجوی رشته اصلاح نباتات مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده ، به آن ملتزم می شوم.

تاریخ : ۷۷/۶/۳۱

امضاء :

تأییدیه هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیأت داوران نسخه نهایی پایان‌نامه آقای دانیال کهریزی تحت عنوان "**بررسی اثر ژنوتیپ و ترکیب محیط کشت بر روی آندروژنز (کشت بساک) گندم هگزاپلوئید (*Triticum aestivum* L.)**" را از نظر فرم و محتوی بررسی نموده و پذیرش آنرا برای درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر احمد معینی	استادیار	
۲- استاد مشاور	دکتر رضا بزرگی‌پور	استادیار	
۳- مدیر گروه	دکتر احمد معینی	استادیار	
۴- استاد ممتحن	دکتر محمود خسروشاهلی	استادیار	
۵- استاد ممتحن	دکتر قاسم کریم‌زاده	استادیار	
۶- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر احمد معینی	استادیار	

تقدیم به

پدر بزرگوارم و مادر فداکارم

و

برادران و خواهرانم

که همواره یاریگرم بوده‌اند

من لم یشکر المخلوق لم یشکرالخالق

سپاس و ستایش خداوند بزرگ را که به این بندهٔ کمترین منت گذاشت و تأئیداتش همواره هادی و راهنمایم بوده و هست، سپس :

از استاد گرانقدر جناب آقای **دکتر احمد معینی** استاد راهنمای بزرگوارم که در به ثمر رسیدن این پایان‌نامه از هیچگونه مساعدت و همفکری مضایقه نفرمودند، صمیمانه سپاسگذارم.

همچنین از جناب آقای **دکتر بزرگی‌پور**، ریاست محترم وقت پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی که مشاورهٔ پایان‌نامه را تقبل فرمودند و امکانات را برای اجرای پایان‌نامه مهیا نمودند، کمال تشکر را دارم.

از کلیهٔ هیئت‌های علمی، کارکنان و تکنسین‌های پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی مؤسسهٔ اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج به ویژه آقای دکتر خسرو شاهلی، آقای رستمی و آقایان مهندس بختیار، مهندس عنایتی شریعت‌پناهی و خانم مهندس خوشکام، صمیمانه سپاسگذارم.

از دوست عزیزم، آقای مهندس علی اکبر عبادی که همواره در طی اجرای پایان‌نامه یاریگر اینجانب بوده‌اند و سایر دوستان، آقایان مهندس بساطی، مهندس زبرجدی، مهندس عابدینی، مهندس خدارحمی همچنین از کلیه دوستانی که به هر نحوی اینجانب را راهنمایی نموده‌اند، کمال تشکر و سپاسگذاری را دارم.

چکیده

در این آزمایش پاسخ به کشت بساک چهار رقم گندم هگزاپلوئید بهاره (قدس، رسول، کاوه، DH19 و مغان(۱)) و یک لاین هاپلوئید مضاعف تولید شده از رقم قدس (DH19) روی محیط کشت القاء جنین مایع CHB با نوع و غلظت متفاوت منبع کربن (۹۰ g/l مالتوز، ۹۰ g/l ساکارز، ۱۴۵ g/l مالتوز و ۱۴۵ g/l ساکارز) بررسی شده است. گیاهان مادری در یک آزمایش دو فاکتوره در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در یک گلخانه با فتوپریود ۸ / ۱۶ ساعت (تاریکی / روشنایی) و درجه‌حرارت ۱۵ °C / ۲۵ °C (شب / روز) کشت شدند. هر تکرار شامل یک گلدان با سه گیاه بود. در کل حدود ۱۵۰۰۰ بساک در این آزمایش کشت شد. بر اساس نتایج این مطالعه مشخص گردید که ژنوتیپ ، ترکیب محیط کشت القاء جنین و اثرات متقابل آنها بر روی تشکیل جنین، باززایی کل (گیاهان سبز + آلبینوز)، باززایی گیاه سبز و باززایی گیاه آلبینوز به طور معنی‌داری مؤثر است. محیط کشت حاوی ۹۰ g/l مالتوز بیشترین فراوانی جنین‌زایی، باززایی گیاه سبز و باززایی کل را دارا بود. رقم مغان(۱) نیز بعنوان بهترین رقم برای جنین‌زایی، باززایی گیاه سبز و باززایی کل شناخته شد. اثر متقابل رقم مغان(۱) و محیط القاء جنین CHB حاوی ۹۰ g/l مالتوز نیز بعنوان بهترین اثر متقابل برگزیده شد (۷۲/۴۷٪ جنین‌زایی، ۳۶/۷۳٪ باززایی کل و ۲۲/۷۰٪ باززایی گیاه سبز).

فهرست مطالب

فصل اوّل ، مقدمه

۱-۱-مقدمه.....۱

فصل دوّم ، بررسی منابع

۲-۱-کلیات.....۶

۲-۲- گیاهان هاپلوئید و روش‌های تولید آنها.....۷

۲-۲-۱- موارد استفاده گیاهان هاپلوئید.....۹

۲-۲-۲- مزایای روش به نژادی هاپلوئیدی.....۱۳

۲-۲-۳- محدودیت‌های گیاهان هاپلوئید.....۱۶

۲-۲-۴- روش های تولید گیاهان هاپلوئید.....۱۷

۲-۲-۴-۱- تولید خود به خودی گیاهان هاپلوئید ۱۷

۲-۲-۴-۲- تولید القایی گیاهان هاپلوئید.....۱۸

۲-۲-۴-۲-۱- آندروژنز (Androgenesis).....۱۸

۲-۲-۴-۲-۱-۱- *کشت بساک* (Anther culture).....۱۸

۲-۲-۴-۲-۱-۲- *کشت میکروسپور*(Microspore culture) ۲۰

۲-۲-۴-۲-۲- کشت تخمدان و تخمک.....۲۰

۲-۲-۴-۲-۳- حذف کروموزومی (Chromosome elimination) ۲۱

۲-۲-۴-۲-۴- تیمار شیمیایی.....۲۲

۲-۲-۴-۲-۵- اثرات پرتوافکنی.....۲۲

۲-۲-۵- تولید ارقام جدید با استفاده از هاپلودیپلوئیدیزاسیون.....۲۲

۲-۳- کشت بساک.....۲۳

۲-۳-۱- کارایی روش هاپلوئیدهای دوبله با استفاده از کشت بساک.....۲۴

۲-۳-۲- مسیر آندروژنز در گندم.....۲۷

۲-۳-۳- عوامل مؤثر در پاسخ به کشت بساک.....۲۹

۲-۳-۳-۱- مرحله تکاملی میکروسپور.....۲۹

۲-۳-۳-۲- پیش تیمار.....۳۰

۲-۳-۳-۳- نوع میکروسپورهای موجود در بساک.....۳۲

۲-۳-۳-۴- شرایط رشد گیاه مادری.....۳۲

۲-۳-۳-۵- تأثیر ژنوتیپ.....۳۴

۲-۳-۳-۶- محیط کشت.....۴۰

۲-۳-۳-۶-۱- *محیط کشت القاء جنین (Embryoid induction)*.....۴۰

۲-۳-۳-۶-۱-۱- عناصر معدنی (Minerals).....۴۲

۲-۳-۳-۶-۱-۲- منبع نیتروژن.....۴۲

۲-۳-۳-۶-۱-۳- منبع ویتامین‌ها.....۴۳

۲-۳-۳-۶-۱-۴- عصاره سیب‌زمینی و افزودنیهای مجاز دیگر.....۴۴

۲-۳-۳-۶-۱-۵- منبع کربن.....۴۶

۲-۳-۳-۶-۱-۶- تنظیم کننده‌های رشد.....۵۰

۲-۳-۳-۶-۱-۷- عامل ژلاتینی کننده (Gelling agent).....۵۱

۲-۳-۳-۶-۲- *محیط کشت باززایی*.....۵۳

۲-۳-۳-۶-۳- *شرایط کشت*.....۵۵

۲-۳-۳-۶-۳-۱- *شرایط کشت القاء جنین*..... ۵۵

۲-۳-۳-۶-۳-۱-۱- انکوباسیون (Incubation)..... ۵۵

۲-۳-۳-۶-۳-۲- *شرایط باززایی گیاهان*..... ۵۶

۲-۳-۳-۶-۴- استریل کردن محیط کشت..... ۵۸

۲-۳-۳-۷- اثرات گیاه، پنجه و شرایط سنبله..... ۵۸

۲-۳-۳-۸- اثرات سنبلچه، گل و بساک..... ۵۸

۲-۳-۳-۹- اثرات دیواره بساک..... ۵۹

۲-۳-۴- آلبینوز..... ۶۰

۲-۳-۵- تجزیه و تحلیل سیتولوژیکی گیاهان هاپلوئید..... ۶۲

۲-۳-۶- تولید هاپلوئیدهای دوبله..... ۶۴

۲-۳-۶-۱- هاپلوئیدهای دوبله خودبخودی..... ۶۴

۲-۳-۶-۲- تیمار شیمیایی..... ۶۶

فصل سوّم ، مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد گیاهی..... ۶۹

۳-۲- جمع‌آوری سنبله‌ها و پیش‌تیمار سرمایی آنها..... ۷۰

۳-۳- محیط کشت..... ۷۲

۳-۳- استریل نمودن ظروف، لوازم آزمایشگاهی، اتاقک کشت و..... ۷۴

۳-۵- کشت بساکها در محیط کشت القاء جنین ۷۵

۳-۶- باززایی گیاهان (Regeneration)..... ۷۵

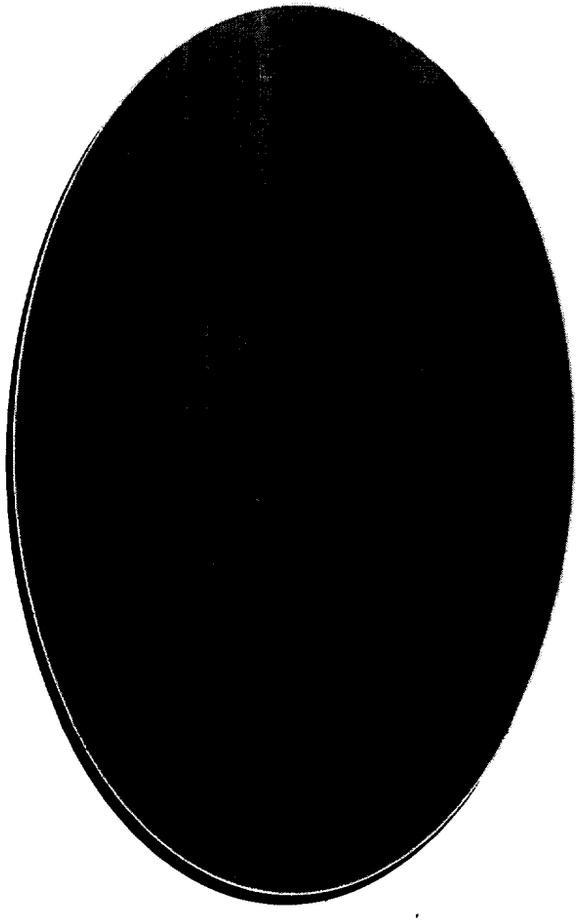
۳-۷- بررسی سیتولوژیکی گیاهچه‌های تولید شده..... ۷۸
۳-۷-۱- تهیه نمونه از ریشه (Sampling)..... ۷۸
۳-۷-۲- پیش تیمار (Pretreatment)..... ۷۸
۳-۷-۳- تثبیت و رنگ آمیزی (Fixation and Staining)..... ۷۹
۳-۷-۴- له کردن (Squashing)..... ۷۹
۳-۸- تیمار کلشیسین جهت مضاعف کردن کروموزوم..... ۸۰
۳-۹- بذرگیری از گیاهان هاپلوئید دوبله..... ۸۱
۳-۱۰- تجزیهٔ آماری..... ۸۲

فصل چهارم، نتایج و بحث

۴-۱- جنین‌زایی بساک‌ها..... ۸۳
۴-۲- باززایی گیاه..... ۹۱
۴-۳- درصد مضاعف شدگی خودبخودی و تیمار با کلشی‌سین..... ۱۰۲
۴-۴- موارد نادر در آندروژنز..... ۱۰۳
۴-۵- نتیجه‌نهایی و پیشنهادات..... ۱۰۳
منابع مورد استفاده..... ۱۰۵
ضمائم..... ۱۱۶

اختصارات *(Abbrevation)*

2,4- Dichlorophenoxya cetic acid	***2,4-D***
Abscisic acid	***ABA***
6-Benzyl aminopourine	***BAP***
Doubled haploid	***DH***
Dimethyl sulfoxide	***DMSO***
Ethyl diamine tetra acetate	***EDTA***
Gibberellic acid	***GA***
Indoleacetic acid	***IAA***
Naphthalene acetic acid	***NAA***
Linsmaier & Skoog	***LS***
Murashige & Skoog	***MS***
β- phenylethyl amine	***PEA***
Polyethylen glycol	***PEG***



۱-۱- مقدمه

مسئله مهم سیاسی، اقتصادی و اجتماعی رشد جمعیت دنیا و کمبود مواد غذایی، خصوصاً مواد پروتئینی در کشورهای در حال رشد، باعث شده است که دانشمندان و محققین کشاورزی در جستجوی روش‌های جدید و مؤثرتر برای افزایش مواد غذایی باشند. در این رابطه منابع تولید و ظرفیت ژنتیکی ارقام گیاهی حائز اهمیت بوده ولی به لحاظ محدودیت منابع تولیدی، توجه بیشتری به افزایش کمی و کیفی محصولات زراعی از طریق تغییر ساختار ژنتیکی گیاهان معطوف گردیده است. در این راستا بکار گیری روشهای مرسوم اصلاح نباتات به همراه بیوتکنولوژی (Biotechnology) گیاهی، به عنوان مکمل، نوید بخش بوده است.

روشهای کلاسیک اصلاح نباتات که با بهره‌گیری از قوانین ژنتیک در چند دهه اخیر ابداع و تکامل یافته‌اند، باعث پیشرفتهای اعجاب انگیزی در زمینهٔ تولید غلات و دیگر گیاهان در سطح دنیا گردیده‌اند.

روشهای کلاسیک اصلاح نباتات که امروز جهت ایجاد واریته‌های غلات بکار گرفته می‌شوند، عمدتاً روشهای گزینش (Selection) و یا دورگ گیری (Hybridation) است که در مورد اوّل از