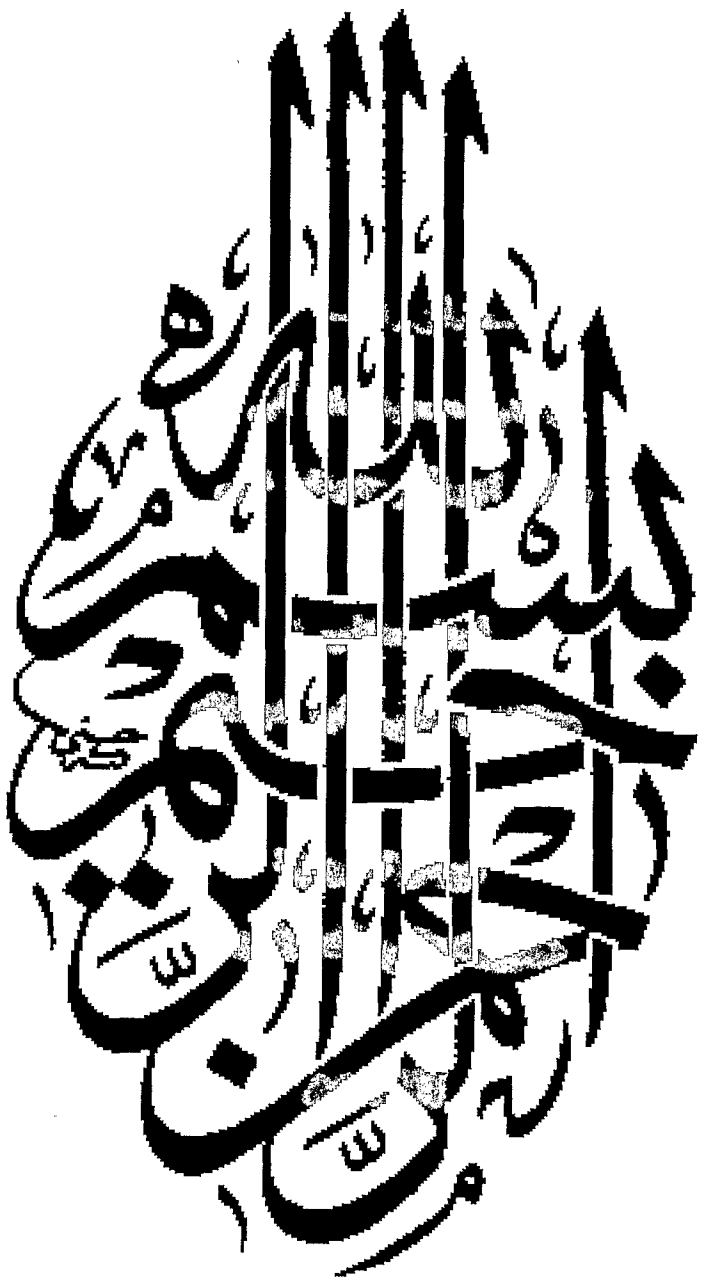

١١١٣٩١

دانشگاه زابل

تحصیلات تکمیلی دانشگاه

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نباتات

ارزیابی هیبریدهای مختلف برنج ایندیکا × ایندیکای هتروتیک برای پاسخ به کشت بساک تحت محیط های کشت مختلف

استادان راهنما :

دکتر محمود سلوکی

دکتر ابوبکر جوهرعلی

استاد مشاور:

مهندس علی اکبر عبادی

۱۳۸۸ /۲/ ۱۵

تهیه و تدوین :

خدیجه علی زاده یلوجه

آبان ۸۶

۱۱۱۳۹۱

بأسمه تعالی

وزارت علوم ، تحقیقات و فناوری

دانشگاه زابل

تاریخ:.....

شماره:.....

پیوست:.....

صفحه الف

این پایان نامه با عنوان: ((ارزیابی هیبریدهای مختلف برنج ایندیکا × ایندیکای هتروتیک برای پاسخ به کشت بساک تحت محیط های کشت مختلف)) قسمتی از برنامه آموزشی دوره کارشناسی ارشدکشاورزی گرایش اصلاح نباتات است که توسط دانشجو خدیجه علی زاده یلوجه تحت راهنمایی استادان پایان نامه آقای دکتر محمود سلوکی و دکتر ابوبکر جوهرعلی تهیه شده است. استفاده از مطالب آن به منظور اهداف آموزشی با ذکر مرجع و اطلاع کتبی به حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه زابل مجاز می باشد.

امضا دانشجو

این پایان نامه ۶ واحد درسی شناخته می شود و در تاریخ ۸۶/۸/۲۷ توسط هیئت داوران بررسی و نمره ۱۹/۸ و درجه عالی به آن تعلق گرفت.

نام و نام خانوادگی	**امضا**	**تاریخ**
۱– استاد راهنما: آقای دکتر محمود سلوکی		۸۶/۸/۲۶
۲– استاد راهنما: آقای دکتر ابوبکر جوهرعلی		
۳– استاد مشاور: آقای مهندس علی اکبر عبادی		
۴– استاد مشاور: –		
۵– داور: آقای دکتر محمود رمرودی		
۶– نماینده تحصیلات تکمیلی:		

وزارت علوم تحقیقات فناوری
دانشگاه زابل
اداره تحصیلات تکمیلی

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم، که زندگی خود را سراسر مرهون زحمات، رنج ها و محبت های بی دریغ آنان می دانم.

خواهر و برادران مهربانم، که یار و یاور من در تمام تصمیم های زندگیم بودند.

تقدیر و تشکر

اکنون که به یاری ایزد منان این تحقیق به پایان رسیده است بر خود وظیفه می دانم، تا از زحمات تمامی عزیزانی که در مراحل مختلف تحصیل و تحقیق مساعدت های بی دریغشان شامل اینجانب شده است، تشکر و قدردانی نمایم. از زحمات نخستین آموزگاران زندگی، پدر بزرگوار و مادر مهربانم، همانان که الفبای زندگی را به من آموختند، صمیمانه تشکر نمایم. از زحمات، راهنمایی ها و مشاورت های ارزشمند اساتید بزرگوارم آقایان دکتر محمود سلوکی ، دکتر ابوبکر جوهرعلی و مهندس علی اکبر عبادی کمال تشکر را دارم. از کلیه عزیزانی که زمینه انجام امور پایان نامه در موسسه تحقیقات برنج کشور را فراهم نمودند، به ویژه آقایان دکتر علی نیا، دکتر مومنی، مهندس الله قلی پور و مهندس عبادی متشکرم. از کارشناسان آزمایشگاه کشت بافت، آقایان مهندس شفیعی و مهندس ترابی که از تجربیات ارزشمندشان بهره مند بوده ام، کمال تشکررا دارم. از آقای دکتر رمرودی که داوری پایان نامه را قبول نموده و با راهنمایی های ارزنده خود مرا در تصحیح آن یاری نمودند، سپاسگزارم. از خواهر عزیزم فرحناز که در تایپ پایان نامه یاریم نمود، متشکر و ممنون هستم. از تشویق های کلیه دوستان و هم کلاسی های عزیزم قدردانی می نمایم.

چکیده

در این تحقیق پاسخ به کشت بساک سه هیبرید برنج ایندیکا × ایندیکای هتروتیک (بهار۱، IR75221H و IR69688H) روی چهار محیط کشت کالوس زا (N6 ، N6 تغییریافته ، Chu و Chu تغییریافته) در مؤسسه تحقیقات برنج کشور بررسی شده است. تغییرات در محیط کشت N6، تغییر در ترکیب هورمونی و افزودن هیدرولیزات کازئین و در محیط کشت Chu، تغییر در ترکیب هورمونی و افزودن هیدرولیزات کازئین، عصاره مخمر و نیترات نقره بود. با بررسی و تعیین درصد کالوس های ایجاد شده از بساک ها که در مرحله اواسط تک هسته ای تا اوایل مرحله دوهسته ای بودند و تعداد گیاهچه های باززایی شده از کالوس ها در محیط های کشت فوق، هیبریدها مورد ارزیابی قرار گرفتند. مرحله دقیق نمو میکروسپور برای کشت بساک از طریق بررسی های میکروسکوپی تعیین شد. به منظور بررسی تاثیر ژنوتیپ، محیط های غذایی و اثرات متقابل آنها بر روی کالوس زایی و باززایی، هیبریدها و محیط های کشت کالوس زایی در قالب آزمایش فاکتوریل کاملا تصادفی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ژنوتیپ، ترکیب محیط کشت کالوس زایی و اثرات متقابل آنها بر روی درصد کالوس زایی، باززایی گیاه سبز، باززایی گیاه آلبینو و باززایی کل به طور معنی داری مؤثر بود. مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون دانکن نشان داد که بهترین هیبرید از نظر عکس العمل ژنوتیپ ها به تولید کالوس هیبرید IR75221H (۱/۶۴ درصد) و به باززایی کل و گیاه سبز هیبرید بهار ۱ (۱۲/۲۴ درصد و ۳/۴۳ درصد) می باشد. کمترین کالوس زایی را هیبرید IR69688H (۱/۳۴ درصد) وکمترین باززایی کل را هیبرید IR69688H (۴۲/ ۸ درصد) داشت. هیبرید IR75221H باززایی گیاه سبز نداشت. بیشترین گیاه آلبینو را هیبرید IR75221H (۱۰/۶۶ درصد)و کمترین گیاه آلبینو را هیبرید IR69688H (۶/۴۵ درصد) تولید نموده است. بهترین محیط کشت کالوس زایی برای تولید کالوس محیط کشت N6 تغییریافته (۲ درصد) و برای باززایی کل (۲۱/۸۲ درصد)، گیاه سبز (۵/۶درصد) و آلبینو (۱۶/۲۲ درصد) محیط کشت Chu تغییریافته می باشد.

واژه های کلیدی : باززایی، برنج هیبرید، کالوس ، کشت بساک و محیط کشت

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل اول

۱- مقدمه ۱

فصل دوم

۲- بررسی منابع ۴
۲-۱- برنج ۴
۲-۲- طبقه بندی برنج ۵
۲-۳- تاریخچه ۶
۲-۴- روش های تولید گیاهان هاپلوئید ۷
۲-۴-۱- روش خود به خودی ۷
۲-۴-۱-۱- پارتنوژنزو آپوگامی ۷
۲-۴-۱-۲- سمی گامی ۷
۲-۴-۲- روش مصنوعی ۸
۲-۴-۲-۱- حذف کروموزومی ۸
۲-۴-۲-۲- ماده زایی ۸
۲-۴-۲-۳- نرزایی ۹
۲-۴-۲-۳-۱- کشت گل آذین ۹
۲-۴-۲-۳-۲- کشت بساک ۱۰
۲-۴-۲-۳-۳- کشت میکروسپور ۱۰
۲-۵- عوامل مؤثر در کشت بساک ۱۱
۲-۵-۱- ژنوتیپ ۱۲
۲-۵-۲- سیتوپلاسم ۱۴
۲-۵-۳- وضعیت فیزیولوژیکی گیاهان بخشنده ۱۶
۲-۵-۴- مرحله نمو دانه گرده ۱۷
۲-۵-۵- پیش تیمار بساک ها ۱۹
۲-۵-۵-۱- پیش تیمار دمایی ۲۰
۲-۵-۵-۱-۱- پیش تیمار سرمایی ۲۰
۲-۵-۵-۱-۲- پیش تیمار گرمایی ۲۱

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

۲-۵-۵-۲- پیش تیمار اسمزی..... ۲۲
۲-۵-۵-۳- فقدان قند..... ۲۲
۲-۵-۶- محیط های کشت ۲۳
۲-۵-۶-۱- منبع کربن و انرژی..... ۲۵
۲-۵-۶-۲- منبع نیتروژن ، اسیدهای آمینه و مکمل های آلی..... ۲۷
۲-۵-۶-۳- تنظیم کننده های رشدی..... ۲۸
۲-۶- اهمیت و موارد کاربرد هاپلوئیدها..... ۳۰
۲-۶-۱- تولید لاین های خالص هموزیگوس..... ۳۰
۲-۶-۲- القاء موتاسیون..... ۳۰
۲-۶-۳- ایجاد تنوع ژنتیکی..... ۳۰
۲-۶-۴- تحقیقات سیتوژنتیکی..... ۳۱
۲-۶-۵- اهمیت در آزادسازی سریع واریته های جدید..... ۳۱
۲-۶-۶- دابل هاپلوئیدها در ترسیم نقشه های ژنتیکی..... ۳۲
۲-۶-۷- افزایش کارآیی انتخاب..... ۳۳
۲-۷- باززایی..... ۳۵
۲-۸- آلبینیسم..... ۳۶
۲-۹- سطح پلوئیدی..... ۳۸

فصل سوم

۳- مواد و روش ها..... ۳۹
۳-۱- مواد گیاهی..... ۳۹
۳-۲- کشت..... ۴۰
۳-۳- جمع آوری خوشه ها..... ۴۰
۳-۴- پیش تیمار خوشه ها..... ۴۱
۳-۴-۱- پیش تیمار گرمایی..... ۴۱
۳-۴-۲- پیش تیمار سرمایی..... ۴۱
۳-۵- استریل کردن اتاق کشت ، کابینت لامینار ایرفلو ، ظروف و ابزار آلات آزمایشگاهی و محیط های کشت..... ۴۱
۳-۶- محیط های کشت..... ۴۳
۳-۶-۱- محیط های کشت کالوس زایی..... ۴۳
۳-۶-۲- محیط کشت باززایی..... ۴۴

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

۳-۶-۳- محیط کشت ریشه زایی ۴۴
۳-۷- تهیه محیط های کشت ۴۴
۳-۷-۱- تهیه محیط های کشت کالوس زایی ۴۴
۳-۷-۲- تهیه محیط کشت باززایی ۴۶
۳-۷-۳- تهیه محیط کشت ریشه زایی ۴۶
۳-۸- ضدعفونی نمودن خوشه ها ۴۷
۳-۹- کشت بساک و ایجاد کالوس ۵۱
۳-۱۰- محاسبه درصد راندمان کالوس زایی ۵۳
۳-۱۱- انتقال کالوس ها به محیط باززایی ۵۴
۳-۱۲- محاسبه درصد گیاهان سبز، گیاهان آلبینو و باززایی کل ۵۷
۳-۱۳- انتقال گیاهچه سبز به لوله های آزمایش برای ریشه زایی ۵۹
۳-۱۴- کشت گیاهچه ها در محیط کشت یوشیدا ۵۹
۳-۱۵- تجزیه و تحلیل داده ها ۶۱

فصل چهارم

۴- نتایج وبحث ۶۲
۴-۱- درصد تشکیل کالوس ۶۲
۴-۲- درصد گیاهان سبز ۶۸
۴-۳- درصدگیاهان آلبینو ۷۱
۴-۴- درصدباززایی کل ۷۴
۴-۵- نتیجه گیری ۷۷
۴-۵-۱- اثر ژنوتیپ ۷۷
۴-۵-۲- اثر محیط کشت کالوس زایی ۷۹
۴-۵-۳- اثر متقابل ژنوتیپ در محیط کشت کالوس زایی ۸۳

پیشنهدات ۸۵

منابع ۸۶

ضمائم

ضمیمه-۱ ۹۹

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

فصل سوم

جدول ۱-۳- درصدکالوس زایی ژنوتیپ ها در محیط های کشت مختلف کالوس زایی..... ۵۳
جدول ۲-۳- درصد گیاهان سبز، درصد گیاهان آلبنو و درصد باززایی کل ژنوتیپ ها در محیط کشت N6 ... . ۵۸

فصل چهارم

جدول ۱-۴- تجزیه واریانس برای چهار صفت نرزایی مورد بررسی در هیبریدهای مختلف ایندیکا – ایندیکای برنج تحت محیط های کشت مختلف کالوس زایی..... ۶۴
جدول ۲-۴- مقایسه میانگین ژنوتیپ ها برای چهار صفت اندازه گیری شده در هیبریدهای مختلف ایندیکا – ایندیکای برنج با استفاده از آزمون دانکن..... ۶۴
جدول ۳-۴- مقایسه میانگین محیط های کشت کالوس زایی برای چهار صفت اندازه گیری شده در هیبریدهای مختلف ایندیکا – ایندیکای برنج با استفاده از آزمون دانکن..... ۶۵
جدول ۴-۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل ژنوتیپ و محیط کشت کالوس زایی برای چهار صفت اندازه گیری شده در هیبریدهای مختلف ایندیکا – ایندیکای هتروتیک..... ۶۶

فهرست اشکال

عنوان | صفحه

فصل سوم

شکل ۱-۳- کابینت لامینور ایرفلو ۴۳
شکل ۲-۳- مراحل نمو میکروسپور ۴۹
شکل۳-۳- مراحل مختلف ضدعفونی نمودن خوشه ها ۵۰
شکل۴-۳- مراحل مختلف کشت بساک و ایجاد کالوس ۵۲
شکل ۵-۳- مراحل مختلف انتقال کالوس به محیط کشت باززایی ۵۵
شکل ۶-۳- باززایی گیاهچه سبز ۵۶
شکل ۷-۳- باززایی گیاهچه آلبینو ۵۶
شکل ۸-۳- گیاهچه درون لوله آزمایش ، محلول یوشیدا و گلدان ها ۶۰

فهرست نمودارها

عنوان | صفحه

فصل چهارم

نمودار ۱-۴- مقایسه میانگین درصد کالوس زایی در هیبریدهای مختلف ایندیکا – ایندیکای برنج..... ۶۷
نمودار ۲-۴- مقایسه میانگین درصد کالوس زایی در محیط های کشت مختلف کالوس زایی..... ۶۷
نمودار ۳-۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل ژنوتیپ و محیط کشت کالوس زایی برای صفت کالوس زایی..... ۶۸
نمودار ۴-۴- مقایسه میانگین درصد گیاهان سبز در هیبریدهای مختلف ایندیکا – ایندیکای برنج ۷۰
نمودار ۵-۴- مقایسه میانگین درصد گیاهان سبز در محیط های کشت مختلف کالوس زایی ۷۰
نمودار ۶-۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل ژنوتیپ و محیط کشت کالوس زایی برای صفت درصد گیاهان سبز..... ۷۱
نمودار ۷-۴- مقایسه میانگین درصد گیاهان آلبینو در هیبریدهای مختلف ایندیکا – ایندیکای برنج ۷۳
نمودار ۸-۴- مقایسه میانگین درصد گیاهان آلبینو در محیط های کشت مختلف کالوس زایی ۷۳
نمودار ۹-۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل ژنوتیپ و محیط کشت کالوس زایی بری صفت درصد گیاهان آلبینو..... ۷۴
نمودار ۱۰-۴- مقایسه میانگین درصد باززایی کل در هیبریدهای مختلف ایندیکا – ایندیکای برنج ۷۵
نمودار ۱۱-۴- مقایسه میانگین درصد باززایی کل در محیط های کشت مختلف کالوس زایی..... ۷۶
نمودار ۱۲-۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل ژنوتیپ و محیط کشت کالوس زایی برای صفت باززایی کل..... ۷۶

(Abbreviations) اختصارات

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D
6- Benzyl aminopourine	BAP
Cytoplasmic Male Sterility	CMS
Doubled Haploid	DH
Ethyl diamine tetra acetate	EDTA
Indol Acetic Acid	IAA
International Rice Research Institue	IRRI
Linsmaier & Skoog	LS
Marker Asisted Selection	MAS
Murashige & Skoog	MS
Naphthalene Acetic Acid	NAA
Quantitative Trait Loci	QTL

مقدمه

۱- مقدمه

برنج گیاه زراعی با اهمیت در جهان است و غلات غذای ثابت اولیه یا ثانویه بیش از نیمی از مردم جهان می باشند. بنابراین کوشش های زیادی برای اصلاح عملکرد برنج با استفاده از روش های بیوتکنولوژی صورت گرفته است و تولید هاپلوئید از طریق کشت بساک یکی از راه حل ها در برنامه های اصلاحی می باشد (۱۰۳). واژه هاپلوئید به گیاهانی اطلاق می شود که تعداد کروموزوم های موجود در سلول های مرحله اسپوروفیتی آنها برابر با تعداد کروموزوم های مرحله گامتوفیتی شان باشد. هاپلوئیدها در برنامه های اصلاح نباتات به ویژه برای تولید گیاهان هموزایگوس و در شناسایی فنوتیپ های موتانت از اهمیت زیادی برخوردار بوده و مورد توجه زیادی می باشند. تولید خود به خودی هاپلوئیدها معمولا از طریق مکانیسم هایی نظیر آپومیکسی و یا پارتنوژنز است که به طور نادر رخ می دهد. برای تولید مصنوعی هاپلوئیدها روش هایی از جمله هیبریداسیون دور، گرده افشانی تاخیری، استفاده از گرده های اشعه دیده، تیمار هورمونی و شوک حرارتی مورد آزمایش قرار گرفته اند. ولی هیچ

یک از این روش ها قابل اطمینان و تکرار پذیر نبودند (۳). از زمانی که اولین گیاه برنج هاپلوئید از طریق کشت بساک توسط نیزکی و اونو (۱۹٦۸) تولید شد، اصلاحگرها توجه خود را روی کشت بساک و کاربردشان در اصلاح نباتات متمرکز کردند (۱۰۲). کوشش اساسی در کشت بساک برنج بالا بردن راندمان کالوس زایی و باززایی گیاه سبز به منظور اجرای برنامه های اصلاحی است. شناسایی عکس العمل بساک های برنج نسبت به محیط های کشت و بررسی عوامل و شرایط مناسب در کشت بساک برنج گام نخست در جهت توسعه روش کشت بساک تا مرحله بازدهی اقتصادی است (۳۷).

با استفاده از کشت بساک دابل هاپلوئیدهای زیادی معرفی شده اند و کشورهایی از جمله ژاپن و کره فعالیت اصلاحی زیادی در این زمینه انجام داده اند و بیش از ۱۰۰ رقم جدید برنج در چین و بیش از ٤٤ رقم جدید برنج ژاپونیکا در کشور کره معرفی شده اند(۳٦). هم چنین از کشت بساک می توان در انجام تلاقی های بین گونه ای و انتقال ژن های مطلوب از گو نه های غیر خویشاوند به یکدیگر استفاده نمود (۹۰). اگرچه هاپلوئیدها برای تظاهر و تثبیت صفات مغلوب مناسب می باشند، اما برای تثبیت سریع ترکیبات ژنی هتروتیک از نسل اول (F_1) برای تولید لاین های هموزایگوس نیز بسیارموثر می باشند (۳۰).

پایین بودن فراوانی تولید کالوس و جنین زایی کالوس ها و متقاعب آن باززایی گیاه و نیز فراوانی گیاهچه های سبز و بالا بودن فراوانی گیاهچه های آلبینو از مسائل و مشکلات اصلی در کاربرد فن کشت بساک در برنامه های اصلاحی ارقام ایندیکا می باشد (۱۰۳). فاکتورهای زیادی از جمله ژنوتیپ (۱۳،٤۱،٤۲ و ۹۰)، محیط کشت کالوس زایی (۳۰ و ۳٦)، وضعیت فیزیولوژیکی گیاهان بخشنده (۸٦ و ۱۰۱)، پیش تیماربساک ها (۱۲،۳۰ و ۷۰) و مرحله نمو دانه گرده (۹) بر روی کشت بساک تاثیر می گذارند.

به علت اهمیت کشت بساک برنج در تولید ارقام زراعی و با توجه به این که محیط کشت یکی از عوامل مهم برای تولید کالوس از بساک های کشت شده می باشد و نیازهای غذایی برای نرزایی و رشد جنین های تشکیل شده متفاوت می باشد، مطالعه حاضر که شامل چهار ترکیب مختلف محیط کشت برای تولید کالوس و باززایی (مشتق شده از دو محیط کشت پایه) است، به منظور بررسی کارآیی باززایی هیبریدهای ایندیکا × ایندیکا انجام گرفت تا مناسبترین محیط کشت برای کالوس زایی و باززایی مشخص شود. علاوه بر این اثرات جداگانه ژنوتیپ و محیط کشت و اثرات متقابل آنها نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

بررسی منابع

۲- بررسی منابع

۲-۱- برنج

برنج بعد از گندم، از مهمترین غلات به شمار می رود که غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان را تشکیل می دهد و در بخش عظیمی از قاره آسیا بیش از ۸ درصد کالری و ۷۵ درصد پروتئین مصرفی مردم را تامین می کند. برنج گیاهی یکساله و علفی بوده و دارای جنس ها و گونه های زیادی است که مهمترین جنس آن اوریزا[1] و گونه آن ساتیوا[2] می باشد. این نبات خودبارور بوده و میزان دگرباروری در آن به عامل محیطی بستگی دارد و از ۰ تا ۳ درصد متفاوت است (۲).

---

[1]- Oryza
2- Sativa

۲- ۲- طبقه بندی برنج

ارقام زراعی برنج با توجه به توزیع جغرافیایی، شکل دانه و عقیمی هیبرید به سه زیرگونه یا گونه جغرافیایی ایندیکا[1]، ژاپونیکا[2] و جاوانیکا[3] تقسیم می شوند. زیرگونه ایندیکا معمولا در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری و زیرگونه ژاپونیکا در نواحی معتدل و مرطوب کشت می شوند، به ترتیب ۹۰ و ۱۰ درصد از سطح زیر کشت جهانی برنج را به خود اختصاص می دهند.

زیرگونه ایندیکا دارای دانه های بلند و باریک بوده و نسبت طول به عرض دانه قهوه ای در آن ۳/۱ تا ۳/۵ می باشد، در حالی که در زیرگونه ژاپونیکا دانه ها کوتاه و پهن و با مقطع گرد بوده و نسبت طول به عرض دانه قهوه ای در آن ۱/٤ تا ۲/۹ می باشد. واژه جاوانیکا که به وسیله بعضی از محققین مصطلح گردیده، یک نوع مورفولوژیک را نشان می دهد که اغلب حدواسط بین ایندیکا و ژاپونیکا است. ولی بیشتر می تواند به عنوان یک گروه از نوع ژاپونیکا در نظر گرفته شود.

بررسی های موسسه تحقیقات بین المللی برنج (IRRI[4]) نشان می دهد که ارقام برنج ایرانی از نوع ایندیکا بوده و بعضی از ارقام تا حدودی خصوصیات جاوانیکا را نیز دارا هستند (۲).

1- Indica
2- Gaponica
3- Javanica
4- International Rice Research Institue (IRRI)