پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوتکنولوژی

دانشکده علوم کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان پایان نامه

توسعه تولید دابل هاپلوئیدها با استفاده از کلشی سین در محیط کشت بساک برنج

استادان راهنما

دکتر ابوبکر جوهرعلی

دکتر غلامرضا بخشی خانیکی

استاد مشاور

دکتر علی اکبر عبادی

نگارش:

لیلا خزایی

مهر ۸۸

تقدیم به:

دخترم عسل به پاس مهری که بر دلم نهاد

همسرم به پاس صبوری، مهربانی، همدلی و همراهیش

پدرم به پاس حمایت، تلاش و فداکاری بی دریغش

مادرم به پاس مهربانی، عاطفه و پارسائیش

سپاسگزاری:

حمد وسپاس خداوند منان را که در پرتو الطاف بیکرانش، توفیق کسب علـم و دانـش را بـه بنده ارزانی داشت و تلاش و کوششم را به نتیجه رساند و اینک به پاس کرم معبود، نتیجه تلاش و کوشم را در این پایان نامه به همه کسانی که در این راه به طریقی بذل محبت کردند تقدیم می کنم. در این خصوص لازم می دانم از راهنمائی ها و کمک های بی شائبه اسـاتید گرانقـدر و فرهیختـه جناب آقای دکتر ابوبکر جوهر علی و جناب آقای دکتر غلامرضـا بخشـی خـانیکی کـه در سـمت اساتید راهنما بر بنده منت گذاردند و افتخار شاگردی را به اینجانب عطا نمودنـد صـمیمانه تشـکر نمایند. همچنین از استاد مشاور جناب آقای دکتر علی اکبر عبادی که در نهایت لطف و بزرگـواری در پیچ و خم های دشوار این تحقیق همواره پشتیبان من بوده اند، تشکر و قدردانی مـی نمـایم. از استاد بزرگوار جناب آقای دکتر محمد علی ابراهیمی که زحمت داوری این پایـان نامـه را متحمـل گردیدند، کمال تشکر را دارم. از کلیه عزیزانی که زمینه به ثمـر رسـیدن ایـن پـژوهش در موسسـه تحقیقات برنج کشور (رشت) را برایم فراهم نمودند به ویـژه جنـاب آقایـان دکتـر شـهدی، دکتـر کاووسی، مهندس قدسی، مهندس فرحمند، مهندس الله قلی پور، مهندس عبدالهی و سـایر عزیـزان سپاسگزارم. از زحمات جناب آقای مهندس شفیعی که دلسوزانه در راستای اجرای این پایان نامـه مرا یاری نمودند تشکر و قدردانی می نمایم. از همکاران بسیار خوب در موسسـه تحقیقـات بـرنج خانم ها مهندس نویریان، مهندس خشکدامن، مهندس اقلیـدی، مهنـدس رمضـانی، خـانم یکتـا و آقایان مهندس بابا زاده، مهندس محمدی و ایران پرست که بـا همفکـری و همـدلی خـود همـواره پشتیبان و همراه من بودند نهایت تشکر را دارم.

چکیده

هدف از این تحقیق تاثیر کلشی سین روی نرزایی برنج در شرایط آزمایشگاهی می باشد. تاثیر غلظت های کلشی سین و روش کاربرد کلشی سین در دو برابر کردن کروموزوم های برنج هاپلوئید بررسی شد. در این تحقیق میزان دابل هاپلوئید شدن گیاهان حاصل از کشت بساک بوته های F_1 هیبرید حاصل از تلاقی سپیدرود در غریب در موسسه تحقیقات برنج کشور بررسی شده است. بساک های از یک ژنوتیپ روی دو محیط کشت N6, Chu با و بدون کلشی سین (۰، ۲۰ ، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر)تیمار شده بودند برای ۷ روز قرار داده شدندو پس از ۷ روز بساک ها را از محیط کشت حاوی کلشی سین به محیط های کشت کالبوس زایی بدون کلشی سین منتقل شدند.کلشی سین اضافه شده به محیط القایی اثر منفی روی پاسخ نرزایی ژنوتیپ مورد آزمایش نداشت. با بررسی و تعیین درصد کالوس های ایجاد شده از بساک ها که در مرحله اواسط تک هسته ای تا اوایل مرحله دو هسته ای بودند ، تعداد گیاهان دابل هاپلویید باززا شده از کالوس ها در محیط های کشت فوق مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور بررسی تاثیر محیط کشت ، غلظت های مختلف کلشی سین و اثرات متقابل آنها بروی کالوس زایی، باززایی و دابل هاپلوئیدی شدن در قالب آزمایش فاکتوریل کاملا تصادفی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که اختلاف معنی دار بین محیط های کشت کالوس زایی برای چها صفت مورد بررسی (کالوس زایی ،گیاهان سبز، گیاهان آلبینو، باززایی کل) وجود دارد اما بین محیط های کشت کالوس زایی برای صفت درصد دابل هاپلوئیدی اختلاف معنی داری وجود ندارد. اما مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن نشان داد که بهترین محیط کشت از نظر عکس العمل به تولید کالوس محیط کشت N6 (۵/۱۰۲) درصد و به گیاهان سبز ، باززایی کل و دابل هاپلوئیدی محیط Chu (۱۷/۵۱۵ ، ۲۲/۷۱۷ و ۴۹/۴۱۱) درصد می باشد. بیشترین میزان دابل هاپلوئیدی در غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر کلشی سین (۶۸/۱۹درصد) بدست آمد که با بقیه غلظت ها میزان دابل هاپلوئید شاهد(۳۱/۹۸درصد) بدون کلشی سین تفاوت معنی دار داشت. همچنین محیط کشت کالوس زای Chu با غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر (۶۹/۱۷درصد) و محیط کشت کالوس زای N6 با غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر (۶۷/۲۲درصد) بیشترین درصد دابل هاپلوئیدی را دارند و محیط کشت کالوس زای N6 با غلظت ۰میلی گرم در لیتر(۳۰/۰۰) درصد دابل هاپلوئیدی پایینی دارد، یعنی بین غلظت های مختلف در محیط های کشت کالوس زایی اختلاف معنی دار وجود دارد.

واژه های کلیدی: برنج، کالوس، کشت بساک، هاپلوئید، دابل هاپلوئید، غلظت، کلشی سین

عنوان **صفحه**

فصل اول

۱- مقدمه ۱

فصل دوم

۲- بررسی منابع

۲-۱- برنج ۴
۲-۲- طبقه بندی برنج ۵
۲-۳- تاریخچه ۵
۲-۴- روش های تولید گیاهان هاپلوئید ۶
۲-۴-۱- روش خودبخودی ۶
۲-۴-۱-۱- پارتنوژنز و آپوگامی ۶
۲-۴-۱-۲- سمی گامی ۶
۲-۴-۲- روش مصنوعی ۷
۲-۴-۲-۱- حذف کروموزومی ۷
۲-۴-۲-۲- تیمار شیمیایی ۷
۲-۴-۲-۳- تیمار های فیزیکی ۷
۲-۴-۲-۴- ماده زایی ۷
۲-۴-۲-۵- نرزایی ۸
۲-۴-۲-۵-۱- کشت گل آذین ۸
۲-۴-۲-۵-۲- کشت جنین ۸
۲-۴-۲-۵-۳- لقاح کاذب ۸
۲-۴-۲-۵-۴- تولید تخمک های لقاح نیافته بدون گرده افشانی کاذب ۸
۲-۴-۲-۵-۵- کشت بساک ۹
۲-۴-۲-۵-۵-۱- کشت بساک در برنج ۱۰
۲-۴-۲-۵-۶- کشت میکروسپور ۱۰
۲-۵- عوامل موثر در کشت بساک ۱۱
۲-۵-۱-ژنوتیپ ۱۱
۲-۵-۲- سیتوپلاسم ۱۳
۲-۵-۳- وضعیت فیزیولوژیکی گیاه بخشنده ۱۴
۲-۵-۴- مرحله نمو دانه گرده ۱۴
۲-۵-۵- پیش تیمار بساک ها ۱۵

۲-۵-۵-۱- پیش تیمار دمایی ۱۶
۲-۵-۵-۱-۱- پیش تیمار سرمایی ۱۶
۲-۵-۵-۱-۲- پیش تیمار گرمایی ۱۶
۲-۵-۵-۲- پیش تیمار اسمزی ۱۷
۲-۵-۲-۳- پیش تیمار شیمیایی ۱۷
۲-۵-۵-۴- فقدان قند ۱۷
۲-۵-۶- محیط های کشت ۱۸
۲-۵-۶-۱- منبع کربن و انرژی ۱۹
۲-۵-۶-۲- منبع نیتروژن، اسید های امینه و مکمل های آلی ۲۰
۲-۵-۶-۳- تنظیم کننده های رشدی ۲۱
۲-۵-۶-۴- شرایط کشت ۲۲
۲-۶- اهمیت و موارد کاربرد هاپلوئید ها ۲۲
۲-۶-۱- تولید لاین خالص هموزیگوس ۲۲
۲-۶-۲- القاء موتاسیون ۲۳
۲-۶-۳- تولید هیبرید ۲۳
۲-۶-۴- تولید گیاهان ابرنر ۲۳
۲-۶-۵- ایجاد تنوع ژنتیکی ۲۳
۲-۶-۶- تحقیقات سیتوژنتیکی ۲۳
۲-۶-۷- اهمیت در آزاد سازی سریع واریته های جدید ۲۴
۲-۶-۸- مقاومت به بیماری ها ۲۴
۲-۶-۹- مقاومت به حشرات ۲۵
۲-۶-۱۰- تحمل به نمک ۲۵
۲-۶-۱۱- دابل هاپلوئید ها در ترسیم نقشه های ژنتیکی ۲۵
۲-۶-۱۲- افزایش کارایی انتخاب ۲۵
۲-۷- باززایی ۲۶
۲-۸- آلبینیسم ۲۷
۲-۹- سطح پلوئیدی ۲۸
۲-۱۰- گیاهان دابل هاپلوئید ۲۹
۲-۱۱- روش های تولید گیاهان دابل هاپلوئید ۲۹
۲- ۱۱-۱-روش خودبخودی ۲۹
۲-۱۱-۲- روش القائی ۳۰
۲- ۱۱-۲-۱- کلشی سین ۳۰
۲- ۱۱-۲-۲- سایر ترکیبات ۳۱
۲- ۱۱-۳- استفاده از کلشی سین در محیط کشت ۳۱

۲- ۱۱-۴- استفاده از کلشی سین خارج از محیط کشت..... ۳۴
۲- ۱۲- کاربرد دابل هاپلوئید ها..... ۳۵
۲- ۱۲-۱- تولید لاین های خالص..... ۳۵
۲- ۱۲-۲- اصلاح هیبرید ها و هتروزیس..... ۳۵
۲- ۱۲-۳- تولید ارقام هیبرید..... ۳۵
۲- ۱۲-۴- کوتاه کردن روش های اصلاحی..... ۳۶
۲- ۱۲-۵- استفاده از دابل هاپلوئید ها در نقشه برداری های ژنتیکی..... ۳۶
۲- ۱۲-۶- کاربرد دابل هاپلوئید ها در ژنوم ها..... ۳۶
۲- ۱۲-۷- کاربرد دابل هاپلوئید ها در موتاسیون..... ۳۶

فصل سوم

۳- مواد و روش ها
۳-۱- مواد گیاهی..... ۳۷
۳-۲- زمان کشت..... ۳۷
۳-۳- جمع آوری خوشه ها..... ۳۸
۳-۴- پیش تیمار خوشه ها..... ۳۹
۳-۴-۱- پیش تیمار گرمایی..... ۴۰
۳-۴-۲- پیش تیمار سرمایی..... ۴۰
۳-۵- استریل کردن اتاق کشت، کابینت لامینار ایرفلو، ظروف و ابزارآلات آزمایشگاهی و محیط های کشت ۴۰
۳-۶- محیط های کشت..... ۴۱
۳-۶-۱- محیط های کشت کالوس زایی..... ۴۱
۳-۶-۲- محیط های کشت باززایی..... ۴۱
۳-۶-۳- محیط های کشت ریشه زایی..... ۴۱
۳-۷- تهیه محیط های کشت..... ۴۲
۳-۷-۱- تهیه محیط های کشت کالوس زایی..... ۴۲
۳-۷-۲- تهیه محیط های کشت باززایی..... ۴۴
۳-۷-۳- تهیه محیط های کشت ریشه زایی..... ۴۴
۳-۸-ضدعفونی نمودن خوشه ها..... ۴۴
۳-۹- کشت بساک و ایجاد کالوس..... ۴۵
۳-۱۰- محاسبه درصد راندمان کالوس زایی..... ۴۷
۳-۱۱- انتقال کالوس ها به محیط باززایی..... ۴۷
۳-۱۲- محاسبه درصد گیاهان سبز، گیاهان آلبینو و باززایی کل..... ۴۹
۳-۱۳- انتقال گیاهچه سبز به لوله های آزمایش برای ریشه زایی..... ۴۹

۳-۱۴- کشت گیاهچه ها در محیط کشت یوشیدا..... ۵۰
۳-۱۵- تجزیه و تحلیل داده ها..... ۵۴

فصل چهارم

۴- نتایج و بحث
۴-۱- درصد تشکیل کالوس..... ۵۵
۴-۲- درصد گیاهان سبز..... ۶۰
۴-۳- درصد گیاهان آلبینو..... ۶۳
۴-۴- درصد باززایی کل..... ۶۶
۴-۵- درصد دابل هاپلوئیدی ۶۹
۴-۵- نتیجه گیری..... ۷۲
۴-۵-۱- اثر محیط کشت..... ۷۲
۴-۵-۲- اثر غلظت کلشی سین ۷۳
۴-۵-۳- اثر متقابل محیط در غلظت های مختلف کلشی سین..... ۷۴

پیشنهادات ۷۵

منابع ۷۶

ضمائم

ضمیمه-۱ ..... ۸۵

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۴-۱- تجزیه واریانس برای پنج صفت نرزایی مورد بررسی در محیط های کشت کالوس زایی ۵۶
جدول ۴-۲- مقایسه میانگین محیط ها برای پنج صفت اندازه گیری شده در غلظت های مختلف کلشی سین با استفاده از آزمون دانکن ۵۶
جدول ۴-۳- مقایسه میانگین محیط های کشت کالوس زایی برای پنج صفت اندازه گیری شده در غلظت های مختلف کلشی سین با استفاده از آزمون دانکن ۵۷
جدول ۴-۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط و غلظت های کلشی سین برای پنج صفت اندازه گیری شده با استفاده از آزمون دانکن ۵۷

فهرست نمودار ها

عنوان صفحه

نمودار ۴-۱- مقایسه میانگین درصد کالوس زایی در محیط های کشت کالوس زایی ۵۸
نمودار ۴-۲- مقایسه میانگین درصد کالوس زایی در غلظت های مختلف کلشی سین ۵۸
نمودار ۴-۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط و غلظت کلشی سین برای صفت کالوس زایی..... ۵۹
نمودار ۴-۴- نمودار اثر متقابل محیط کشت و غلظت های مختلف کلشی سین برای صفت کالوس زایی ۵۹
نمودار ۴-۵- مقایسه میانگین درصد گیاهان سبز در محیط های کشت کالوس زایی ۶۱
نمودار ۴-۶- مقایسه میانگین درصد گیاهان سبز در غلظت های مختلف کلشی سین..... ۶۱
نمودار ۴-۷- مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط و غلظت کلشی سین برای صفت درصد گیاهان سبز ۶۲
نمودار ۴-۸- اثر متقابل محیط کشت و غلظت های مختلف کلشی سین برای صفت گیاهان سبز ۶۲
نمودار ۴-۹- مقایسه میانگین درصد گیاهان آلبینو در محیط های کشت کالوس زایی..... ۶۴
نمودار ۴-۱۰- مقایسه میانگین درصد گیاهان آلبینو در غلظت های مختلف کلشی سین..... ۶۴
نمودار ۴-۱۱- مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط و غلظت کلشی سین برای صفت درصد گیاهان آلبینو ۶۵
نمودار ۴-۱۲- اثر متقابل محیط کشت و غلظت های مختلف کلشی سین برای صفت گیاهان آلبینو..... ۶۵
نمودار ۴-۱۳- مقایسه میانگین درصد باززایی کل در محیط های کشت کالوس زایی..... ۶۷
نمودار ۴-۱۴- مقایسه میانگین درصد باززایی کل در غلظت های مختلف کلشی سین ۶۷
نمودار ۴-۱۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط و غلظت کلشی سین برای صفت درصد باززایی کل ۶۸
نمودار ۴-۱۶- اثر متقابل محیط کشت و غلظت های مختلف کلشی سین برای صفت باززایی کل ۶۸
نمودار ۴-۱۷- مقایسه میانگین درصد دابل هاپلوئیدی در محیط های کشت کالوس زایی ۷۰
نمودار ۴-۱۸- مقایسه میانگین درصد دابل هاپلوئیدی در غلظت های مختلف کلشی سین..... ۷۰
نمودار ۴-۱۹- مقایسه میانگین اثرات متقابل محیط و غلظت کلشی سین برای صفت درصد دابل هاپلوئیدی..... ۷۱
نمودار۴-۲۰- اثر متقابل محیط کشت و غلظت های مختلف کلشی سین برای صفت دابل هاپلوئید ۷۱

فهرست اشکال

عنوان صفحه

شکل ۳-۱- مراحل مختلف جمع آوری خوشه ها از مزرعه ۳۸
شکل ۳-۲- پیش تیمار خوشه ها ۳۹
شکل ۳-۳- کابینت لامینار ایرفلو ۴۰
شکل ۳-۴- مراحل مختلف تهیه محیط کشت ۴۳
شکل ۳-۵- ضدعفونی نمودن گلچه ها ۴۵
شکل ۳-۶- مراحل مختلف کشت بساک ۴۶
شکل ۳-۷- کالوس های تشکیل شده از بساک های کشت شده در محیط القای کالوس ۴۶
شکل ۳-۸- انتقال کالوس به محیط کشت باززایی ۴۷
شکل ۳-۹- باززایی گیاهچه سبز، گیاهچه آلبینو در محیط باززایی ۴۸
شکل ۳-۱۰- گیاهچه سبز منتقل شده به لوله آزمایش ۵۰
شکل ۳-۱۱- انتقال گیاهچه ها به محلول یوشیدا ۵۱
شکل ۳-۱۲- گیاه هاپلوئید ۵۲
شکل ۳-۱۳- گیاه دابل هاپلوئید ۵۳

اختصارات(Abbreviations)

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

مقدمه

برنج گیاهی بااهمیت در دنیا است و غلات غذای ثابت اولیه یـا ثانویـه بـیش از نیمـی از مـردم جهـان مـی باشـد. بنابراین کوشش های زیادی برای اصلاح عملکرد برنج با استفاده از روشهای بیو تکنولوژی صورت گرفته است و تولید هاپلویید از طریق کشت بساک یکی از راه حلها در برنامه های اصلاحی می باشد(Trejo-tapia *et al.*, 2002). واژه هاپلویید به گیاهانی اطلاق می شود که تعداد کروموزومهای موجود در سلولهای مرحله اسپوروفیتی آنها ، برابر با تعـداد کروموزومهای مرحلـه گـامتوفیتی شـان باشـد. هاپلوییـد هـا در برنامـه هـای اصـلاح نباتـات بـویژه بـرای تولیـد گیاهـان هموزایگوس و در شناسایی فنوتیپ های موتانت از اهمیت زیادی برخوردار بوده و مورد توجه زیادی می باشـند. تولیـد خودبخودی هاپلوییدها معمولا از طریق مکانیسم هایی نظیر آپومیکسی و یا پارتنوژنز است که بطور نـادر رخ مـی دهـد. برای تولید مصنوعی هاپلوئید ها روشهایی از جمله هیبریداسیون دور ، گرده افشانی تاخیری، استفاده از گرده های اشـعه دیده تیمار هورمونی و شوک حرارتی مورد آزمایش قرار گرفته اند.ولی هیچ یک از این روشها قابـل اطمینـان و تکـرار پذیر نبودند.(فارسی و ذوالعلی،۱۳۸۲). از زمانی که اولین برنج گیاه هاپلویید از طریق کشت بساک توسط نیزکی و اونـو (۱۹۶۸) تولیـد شـد، اصـلاحگرها توجـه خـود را روی کشـت بسـاک و کاربردشـان در اصـلاح نباتـات متمرکـز کردند(Thuan *et al.*, 2001).کوشش اساسی در کشت بساک برنج بالا بردن راندمان کالوس زایی و باززایی گیـاه سبز بمنظور اجرای برنامه های اصلاحی است. شناسایی عکس العمل بساک های بـرنج نسـبت بـه محـیط هـای کشـت و بررسی عوامل و شرایط مناسب در کشت بساک برنج گام نخست در جهت توسعه روش کشت بساک تا مرحله بازدهی اقتصادی است (Gioi & Thuan, 2004).

با استفاده از کشت بساک دابل هاپلوئید های زیادی معرفی شده اند و کشور هایی از جمله ژاپن وکره فعالیـت اصـلاحی زیادی در این زمینه انجام داده اند و بیش از ۱۰۰ رقم جدید برنج در چـین و بـیش از ۴۴ رقـم جدیـد بـرنج ژاپونیکـا در کشور کره معرفی شده اند(Gioi & Thuan, 2002).هم چنین از کشت بساک میتوان در انجام تلاقی های بین گونه

ای و انتقال ژنهای مطلوب از گونه های غیر خویشاوند به یکدیگر استفاده نمود (Roy & mandal, 2005). اگر چه هاپلوییدها برای تظاهر و تثبیت صفات مغلوب مناسب میباشند، اما برای تثبیت سریع ترکیبات ژنی هتروتیک از نسل اول بعد از تلاقی (F_1) برای تولید لاین های هموزایگوس نیز بسیار موثر می باشند (Datta, 2005).

پایین بودن فراوانی تولید کالوس و جنین زایی کالوسها و متعاقب آن باززایی گیاه و نیز فراوانی گیاهچه های سبز و بالا بودن فراوانی گیاهچه های آلبینو از مسائل ومشکلات اصلی در کاربرد فن کشت بساک در برنامه های اصلاحی ارقام ایندیکا میباشد (Asaduzzman, *et al.*, 2003). فاکتور های زیادی از جمله ژنوتیپ (Bishnoi *et al.*, 2000، Hassawi, 2004، He et al., 2006و Roy & Mandal, 2005) محیط کشت کالوس زایی (Datta, 2005و Gioi & Thuan, 2002)وضعیت فیزیولوژیکی گیاه بخشنده (Raina & Zapata, 1997و Sun *et al.*, 1992)پیش تیمار بساکها(Bhojwani &Razdan, 1996، Datta, 2005و Moraes *et al.*, 2004) و مرحله نمو دانه گرده(Bajaj, 1991) برروی کشت بساک تاثیر گذار می باشند.

کشت بساک یکی از بهترین روشهای اصلاحی با اهداف بی شمار :مانند کوتاه کردن دوره اصلاحی با تثبیت سریع هموزیگوستی ،افزایش راندمان انتخاب،تنوع گسترده ژنتیکی از طریق تولید تنوع سلول های گامت و تظاهر سریع ژنهای مغلوب می باشد(Zapata,1992) .بدلیل اینکه این تکنیک ها در بر گیرنده گامت های هاپلوییدها(دانه های گرده) بجای والدین دیپلوئید است تعداد گیاهان لازم جهت بیان باز ترکیب های مختلف کمتر از روش های سنتی است . تولید هاپلوئیدها در ژنتیک و اصلاح نباتات سال هاست شناخته شده وبا ظهور علم بیوتکنولوژی اهمیت تازه ای یافته است. تولید گیاهان هاپلوییدودوبرابر نمودن مجموعه کروموزومی آنها(ژنوم آنها)منجربه ایجاد گیاهان دابل هاپلوئید میگردد. این روش سریعترین روش برای دستیابی به لاین های صد در صد خالص(اینبرد)میباشد(Zapata, 1984). ایجاد گیاهان دابل هاپلوییدابزاری ارزشمند در اصلاح گیاهان بوده وسریع ترین روش جهت ایجادو انتخاب لاین های هموزیگوس خالص با صفات زراعی برتر می باشد.در مرحله ای از تشکیل جنین در غلات دوبله شدن کروموزوم ها ممکن است بصورت خود بخودی رخ دهد ولی عموما نرخ پایینی دارد (Hansen & Andersen, 1996 و Mohan Jain, 1996).در شرایط درون شیشه ای دوبرابر شدن کروموزوم هابه میزان وسیعتری رخ میدهد که می تواند منجر به تنوع سوماکلونال گردد(دوبرابر شدن کروموزوم هاگونه های سیب زمینی توسط اوریزالین). سلول های هاپلوئید عموما در محیط کشت ثبات نداشته وتمایل به اندو میتوز دارند (به دوبرابر شدن کروموزوم ها بدون تقسیم هسته گفته میشود (Hansen & Andersen, 1996، Sunderland *et al.*,1974). مجموعه های کروموزومی هاپلوئید در گیاهان در شرایط محیط کشت میتوانند به صورت خود بخودی دوبرابر شوند .با این حال میزان دوبرابر شدن در آنها متفاوت است.

دوبرابر شدن خودبخودی کروموزوم ها در آزمایشگاه در چندین گونه برنج به وسیله نیزیکی و اونو در سال ۱۹۷۱ مشاهده شد(Mohan Jain, 1996).

روش دیگری برای دوبرابر کردن کروموزوم ها وجود دارد که بطور وسیعی در بسیاری از گونه های گیاهی بکار میرود در این روش القای میتوزبیشتر توسط کلشی سین وهمچنین اکسید نیتروزودیگر عوامل مانند اثر تنظیم کننده های رشد گیاهی ،دما و مرحله رشدی گیاه است(Mohan Jain, 1996).

کلشی سین عامل موثری برای بدست آوردن پلی پلوئیدی یا دابل هاپلوئیدی در گونه های دو لپه ای است (Kato & Akio, 2006)

کلشی سین ،کروموزوم ها در مرحله متافاز نگهداری کرده و از آنافاز جلوگیری می کند(Redha *et al.*, 2000).و به طور وسیع روی مرحله جفت شدن کروموزوم ها خصوصا روی ترکیبات اتصال کننده کلشی سین در غشاء هسته عمل می کند. علاوه بر آن کلشی سین اغلب جهت دوبرابر کردن کروموزوم ها در شرایط این ویترو واین سیتو بکار میرود این ترکیب با جلوگیری از تشکیل دوک ومهاجرت قطبی کروموزوم ها مانع از تقسیم سلولهامیگردد(Saisingtong *et al.*,1996) . یکی از راههای تولید لاینهای دابل هاپلوئید تیمار بوته های هاپلویید ایجاد شده با کلشی سین و راه دیگر اضافه کردن کلشی سین به محیط کشت باززایی و القاء کالوس میباشد(Bishnoi *et al.*, 2000).

در سال ۱۹۳۸ لوان تکنیک های کاربرد کلشی سین را با خیساندن ریشه پیازدر محلول کلشی سین آغاز نموده است. دراین تحقیق بساک های بوته های F_1 حاصل از تلاقی دو رقم غریب در سپید رود رادر دو نوع محیط کشت N6 Chu, با و بدون کلشی سین در غلظت های (۰،۲۰،۴۰و۶۰ میلی گرم در لیتر) قرار داده و پس از ۷ روز به محیط بدون کلشی سین انتقال داده و سپس ازنظر دابل هاپلویید شدن در چهار تیمار مورد مطالعه قرار می گیرند. هدف از این تحقیق بهینه کردن غلظت و مدت زمان استفاده از کلشی سین در محیط کشت باززایی جهت بدست آوردن حداکثر گیاهان دابل هاپلویید در کشت بساک برنج می باشد.

۲- بررسی منابع

۲-۱- برنج

برنج بعد از گندم ،از مهمترین غلات بشمار میرود ،که غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان را تشکیل میدهدو در چرخه غذایی جهان نقش مهمی دارد و در بخش عظیمی از قاره آسیا بیش از ۸ درصد کالری و ۷۵ درصد پروتئین مصرفی مردم را تامین میکند.از قدیمی ترین گیاهانی است که در دنیا کشت شده است . مبدا پیدایش برنج در آسیا از جمله هندوستان و چین میباشد. این گیاه حدود ۵۰۰۰ هزار سال قبل از میلاد در چین بصورت دیم کشت می شده است. زراعت برنج در ایران از زمانهای بسار دور معمول بوده وتاریخ کشاورزی نشان می دهد که زمان هخامنشیان در ایران کشت می شد و در دوره اشکانیان نیز در گیلان ،مازندران،و خراسان زراعت آن معمول بوده است و در دوران ساسانیان نیز در قسمتی از ایران مانند کاشمر و تاشکند ، برنجزارهای وسیعی وجود داشته است(خدابنده،۱۳۷۷). برنج در ایران از جایگاه ویژه ای در تغذیه مردم برخوردار می باشد، بطوریکه قسمت اعظم غذای مردم ایران بویژه استانهای گیلان و مازندران را تشکیل میدهد.

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] میباشد. این نبات خودبارور بوده و میزان دگرباروری در آن به عامل محیط بستگی دارد . از ۰ تا ۳ درصد متفاوت است.

از اهداف مهم در اصلاح برنج علاوه بر افزایش عملکرد در واحد سطح،بهبود کیفیت آن میباشد.

۱

1. Oryza
2. sativa

۲-۲-طبقه بندی برنج

برنج گیاهی است مخصوص مناطق پر آب و گرم ،از رده تک لپه ایها ،متعلق به قبیله گلومی فلوره [1]و تیره گرامینه [2] و زیر تیره اوریزوییده[3] و جنس اوریزا می باشد. جنس اوریزا دارای حدود ۲۵ گونه مختلف است(Aruga *et al.*,1985 و Gupta & Borthakur,1987) . تاکنون شش نوع ژنوم مختلف برای برنج تشخیص داده شده است ، که گونه زراعی آن (اوریزا ساتیوا) با ژنوم AA و 2n=2x=24 کروموزوم که منشا آن جنوب و جنوب شرقی آسیا می باشد ودر آسیا ، اروپا و آمریکا کشت می شود.برنج معمولی از لحاظ ژنتیکی شبیه گونه های دیپلوییـد است ولی اطلاعات ژنتیکی و سیتولوژیکی نشان میدهد که این گونه در اصل پلی پلوییـد بوده و شماره کروموزومی پایه آن ۵ است(x=۵).

ارقام زراعی برنج با توجه به توزیع جغرافیایی ،شکل دانه و عقیمی هیبرید به سه زیر گونه یا گونه جغرافیایی ایندیکا،ژاپونیکاو جاوانیکا تقسیم میشوند. زیر گونه ایندیکا معمولا در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری و زیر گونه ژاپونیکا در نواحی معتدل و مرطوب کشت می شوند،بترتیب ۹۰و۱۰ درصد از سطح زیر کشت جهانی برنج را به خود اختصاص می دهند.

زیر گونه ایندیکا دارای دانه های بلند و باریک بوده و نسبت طول به عرض دانه قهوه ای در آن ۳/۱ تا۳/۵ می باشد، در حالی که در زیر گونه ژاپونیکا دانه ها کوتاه و پهن و با مقطع گرد بوده و نسبت طول به عرض دانه قهوه ای در آن ۱/۴ تا ۲/۹ می باشد . واژه جاوانیکا که بوسیله بعضی از محققین مصطلح گردیده ، یک نوع مورفولوژیک را نشان میدهد 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) نشان میدهد که ارقام برنج ایرانی از نوع ایندیکا بوده و بعضی از ارقام تا حدودی خصوصیات جاوانیکا را نیز دارا هستند(خدابنده،۱۳۷۷).

۲-۳- تاریخچه

روش های کشت بافت یک ابزار قوی برای توسعه روش های زراعت مطلوب برنج مانند قابلیت تولید را فراهم می کند(Rashid *et al*, 2003). لذا کشت بساک یک تکنولوژی مناسب برای تسریع در اصلاح و تولید ارقام زراعی جدید می باشد(Jiang *et al.*, 2002).

گوها و ماهشواری (۱۹۶۴) تولید مستقیم جنین و گیاهچه از میکروسپور های گیاه داتوره (*Datura innoxia*) با کشت بساکهای قطع شده را گزارش نمودند. در سالهای بعد بورگین و نیچ (۱۹۶۷) موفق به تولید گیاهان هاپلوید توتون (*Nicotiana tabacum*) شدند. از آن زمان به بعد کشت بساکهای محتوی دانه گرده نابالغ در بسیاری از گونه های گیاهی مهم از نظر اقتصادی با موفقیت انجام شد. نیزکی و اونو (۱۹۶۸) تولید اولین هاپلوید گیاه برنج از طریق کشت بساک را گزارش دادند.(Shahnevaz *et al.*,2003).

۲

1-Glumiflorae
2-Graminae
3-Oryzoideae

۳

یین(۱۹۷۶) اولین واریته برنج از روش کشت بساک را معرفی کرد و پس از آن ارقام مختلفی مانند Zhong hua 8,9 در سطح تجاری معرفی شدند که علاوه بر کیفیت مطلوب و عملکرد بالا مقاوم به بلاست نیز بودند(Chu,1982).

در سال ۱۹۷۷ دو واریته برنج Mocoi,Petei از طریق کشت بساک توسعه یافتند که برای کشت تجاری در آرژانتین معرفی شدند و دارای خصوصیاتی مانند عملکرد بالا ،کیفیت مطلوب، مقاوم به بلاست، مقاوم به ورس و مقاوم به شوری هستند(Marassi *et al.*,2000). در چین نیز ۱۰۰ واریته برنج از طریق کشت بساک توسعه یافته است (Shahnevaz *et al.*,2003).

۲-٤- روشهای تولید گیاهان هاپلویید

به دو روش خودبخودی و مصنوعی صورت می گیرد.

۲-٤-۱- روش خودبخودی

هاپلویید در این روش تحت تاثیر عوامل طبیعی اتفاق می افتد و فراوانی آن خیلی پایین است (فارسی و ذوالعلی،۱۳۸۲). روش های مختلفی به شرح زیر برای آن گزارش شده است.

۲-٤-۱-۱- پارتنوژنز و آپوگامی

پارتنوژنز[1] عبارت است از تولید جنین از سلول تخم بدون دخالت گامت نر و آپوگامی[2] عبارت است از تولید جنین از یک سلول دیگری به غیر از سلول تخم در کیسه جنینی، که این دو حالت در ۳۰ گونه متعلق به ۱۸ خانواده نهاندانگان گزارش شده است. در این حالت هسته نر فقط هسته قطبی را بارور می کند، که منتج به تولید آندوسپرم طبیعی و در نتیجه بذر طبیعی حاوی جنین هاپلویید می گردد(Kush & virmani,1996).

۲-٤-۱-۲- سمی گامی[3]

در سمی گامی گرده افشانی کامل نیست و حالتی بین سینگامی[4] یعنی ترکیب گامتهای نر و ماده و زدوگامی یعنی نمو جنین در پی گرده افشانی بدون دخالت گامت نر می باشد. در حالت معمولی گامت نر وارد تخمک می شود و با هسته آن ترکیب می شود اما در موارد استثنایی مشاهده شده که هسته بعد از ورود به داخل تخمک با هسته تخمک ترکیب نمی شود و بطور جداگانه رشد می کند که منجر به تولید یک گیاه شیمر می شود. این پدیده را اولین بار تورکت و فیستر (۱۹۷۴) در گیاه پنبه گزارش کردند. سمی گامی تحت عوامل ژنتیکی است و می تواند به نتاج منتقل شود(Turcott & feaster,1974).

۴

1- Parthenogenesis
2- Apogamy
3- Semigamy
4- Syngamy

۲-٤-۲- روش مصنوعی

۲-٤-۲- ۱-حذف کروموزومی[1]

در بعضی از تلاقی های دور ناسازگاری کروموزوم ها سبب حذف کروموزومهای پایه نر در ابتدای نمو جنین می شود که پس از نجات جنین و انتقال آن به محیط کشت ،گیاهچه هاپلویید تولید می شود. این سیستم برای اولین بار توسط کاشا و کائو (۱۹۷۰) در تلاقی بین(جو زراعی و جو وحشی) هوردئوم ولگار[2] × هوردئوم بولبوزوم[3] گزارش شد و سپس به چند گونه دیگر نیز گسترش یافت. اما این فن مختص به چند گیاه خاص است و در سطح عمومی قابل استفاده نیست(باقری،۱۳۷۶).

۲-٤-۲-۲- تیمار شیمیایی

با استفاده از ترکیبات شیمیایی تولوئن آبی، مالیک هیدرازید، اکسید نیتروز و کلشی سین می توان حذف کروموزوم ها را تحریک، و گیاه هاپلوئید ، تولید نمود(باقری، ۱۳۷۶).

۲-٤-۲-۳- تیمار های فیزیکی

با استفاده از شوک با درجه حرارت های بالا و پایین و یا پرتو تابی با اشعه ایکس و نور ماوراءبنفش می توان تولید گیاهان هاپلوئید را القاء کرد(باقری، ۱۳۷۶).

۲-٤-۲-4- ماده زایی[4]

در چند گونه زراعی از قبیل جو و چغندر القاء بکرزایی تخمک و تخمدان در شرایط آزمایشگاهی امکان پذیر است. سلولهای کیسه جنینی شامل سلول تخم، متقاطر هاو هسته های قطبی که هاپلوییدند، قادر به تولید کالوس یا جنین در محیط کشت هستند. بازدهی ماده زایی نسبت به نرزایی کمتر است،زیرا هر گیاه دارای تعداد زیادی دانه گرده است در حالیکه تعداد معدودی تخمک دارد. اما مزیت اصلی کشت تخمک این است که اکثر گیاهان باززایی شده سبز و از نظر ژنتیکی با ثبات ترند(باقری،۱۳۷۶).

۵

---

1. Choromosome elimination
2. *Hodeom vulgar*
3. *H. bulbasum*
4. Gynogenesis

۲-٤-۲-۵- نرزایی[1]

به نمو میکروسپور در ایجاد یک اسپورفیت هاپلویید، نرزایی اطلاق می شود. از طریق فن آزمایشگاهی می توان نمو گامتوفیتی نرمال میکروسپور ها و مگاسپور ها را به یک مسیر اسپوروفیتی تغییر داد. این روش کارامد ترین و معمول ترین طریقه تولید گیاهان هاپلویید است(Lynch et al.,1991). اولین نرزایی مصنوعی توسط گوها و مهشواری(۱۹۶۴) در نوعی داتوره گزارش شد. در حال حاضر از نرزایی برای تولید گیاهان هاپلویید در بیش از ۲۴۷ گونه گیاهی از ۸۸ جنس و ۳۴ خانواده از نهاندانگان استفاده می شود(Kush & virmani,1996). نرزایی در برنج نسبت به سایر غلات دارای یک مزیت منحصر بفرد است، زیرا برنج تنها غله ای است که شش پرچم دارد. به همین دلیل استخراج و کشت تعداد زیادی بساک و میکروسپور در زمان کوتاهی امکان پذیر می شود. نرزایی عموما به سه روش انجام می شود که هدف همه آنها رشد و نمو میکروسپور هاست.

۲-٤-۲-۵-۱- کشت گل آذین

این روش که برای اولین بار در جو بکار برده شد، معمولا در محیط کشت مایع انجام می شود. کشت گل آذین به ویژه در گونه ها و علف های چمنی که گلهای آنها کوچک هستند،مورد استفاده قرار می گیرد(باقری،۱۳۷۶).

۲-٤-۲-۵-۲- کشت جنین

در تلاقی بین *Hordeum vulgare* ا *H.bulbosum* لقاح صورت می گیرد، ولی بلافاصله پس از آن ، کروموزوم های *H.bulbosum* حذف می شود، و یک جنین هاپلوئید از *Hordeum vulgare* که اندوسپرم آن رشد نکرده ، بدست می آید، که بدون کشت جنین، جنین سقط می شود(باقری، ۱۳۷۶).

۲-٤-۲-۵-۳- لقاح کاذب

هسی و واگنر در سال ۱۹۷۴ در شرایط این ویترو *Minulus luteus* را با گرده گیاه غیر خویشاوند *Torenia fournieri* گرده افشانی کردند، و از سلول هاپلوئید *Minulus* یک گیاه هاپلوئید را به وجود آوردند(باقری، ۱۳۷۶).

۲-٤-۲-۵-٤-تولید تخمک های لقاح نیافته بدون گرده افشانی کاذب

مزیت اصلی کشت تخمک، این است که اکثر گیاهان باززایی شده ، سبز بوده و از نظر ژنتیکی با ثبات ترند. از کشت تخمک های گیاهانی چون گندم ، برنج و ذرت گیاه هاپلوئید بدست آمده است(باقری، ۱۳۷۶).

۶

1. Anderogenesis