نشریه زراعت
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۱۰۴، پائیز ۱۳۹۳

اثر مدت زمان و غلظت تیمار کلشی سین برفراوانی تولید برنج دابل هاپلویید

• اعظم اقلیدی، محقق بخش اصلاح و تهیه بذر موسسه تحقیقات برنج کشور (نویسنده مسئول)
• غلامرضا بخشی خانیکی، استاد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور تهران
• علی اکبر عبادی، استادیار پژوهش و عضو هیئت علمی بخش اصلاح و تهیه بذر موسسه تحقیقات برنج کشور
• محمود صیادی، محقق بخش اصلاح و تهیه بذر موسسه تحقیقات برنج کشور

تاریخ دریافت: تیر ماه ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۱۳۹۰
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۱۱۴۹۰۰۵۷
پست الکترونیک نویسنده مسئول: aeghlidi@yahoo.com

چکیده:

کاربرد کشت بساک و تولید گیاهان هاپلویید در تولید واریته های جدید تاثیر بسزائی در کاهش زمان و هزینه های اصلاحی داشته است. کلشی سین مهمترین ماده جهت دو برابر کردن مجموعه کروزومی و ایجاد دابل هاپلوییدهاست. این تحقیق با هدف بررسی تاثیر غلظت های متفاوت کلشی سین بر دابل هاپلویید شدن بوته های هاپلویید برنج در زمان های متفاوت صورت گرفت. در این تحقیق بوته های هاپلویید حاصل از کشت بساک دو رقم هیبرید GRH1 (دیلم) و IR69 در سه غلظت ۰/۰۵ ، ۰/۱ و۰/۱۵ گرم بر لیتر و سه تیمار زمانی ۸ ، ۱۲ و ۱۸ ساعت در قالب آزمایش فاکتوریل کاملا تصادفی در سه تکرار تحت تیمار با کلشی سین واقع شدند. نتایج نشان داد که درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید در رقم GRH1 بطور معنی داری بیشتر از رقم IR69 بود(بترتیب۵۳/۳۳ درصد و۴۵/۹۲درصد). همچنین بیشترین درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید در غلظت۰/۱ و کمترین آن در غلظت ۰/۰۵ (بترتیب۵۳/۳۳ و ۳۷/۷۷) و بهترین زمان تیمار ۱۲ ساعت (با ۸۶/۸۸۹ درصد) بود. رقم GRH1 در غلظت ۰/۱ و زمان ۱۲ ساعت بیشترین میانگین درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید (به میزان ۸۶/۶۶) را داشت.

کلمات کلیدی: واژه های کلیدی : هاپلویید، دوبرابر کردن کروموزوم،غلظت ،کلشی سین، برنج

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No:104 pp: 2-8

Study on the effects of time and concentration of colchicine treatment in doubled haploidrice production

By:

- *A. Eghlidi, (Corresponding Author; Tel: 09111490057), Researcher of Iran Rice Research Institute*
- *Gh. Bakhshi Khaniki, Professor of Payame Noor University of Tehran*
- *A. Ebadi, Assistant Professor of Iran Rice Research Institute*
- *M. Saiadi, Researcher of Iran Rice Research Institute*

Received: July 2009 **Accepted: August 2011**

Anther culture application and haploid plant production for releasing new varieties have led to shorten plant breeding cycle. Colchicine is one of the most important materials for doubling chromosomes set and doubled haploid production. The main purpose of this study was to determinate the best colchicine concenteration for doubling rice chromosomes. For this purpose, two pollen-drived haploid plantlets of two hybrid rice (GRH1 and IR69) at the booting stage were selected to treat with colchicine in three concenteration levels (0.05, 0.1, 0.15 g/l) and three time treatments (8,12,18h). The experiment carried out as a factorial experiment complete block design in three replications. Results showed that plantlet percentage of doubled haploid tillers in GRH1 were significantly more than IR69 (53.33 and 45.59 respectively). Also the most percentage of plantlets with double haploid tillers were in 0.1g/l and the minimum of them were in 0.05 g/l (53.33 and 37.77 respectively). The best e time treatment was 12 hours (86.889). In 0.1 g/l concenteration level and 12 hours had the most percentage of plantlets with doubled haploid tillers.

Keywords: Colchicine, Concenteration, Doubling Chromosome, Haploid, *Oryza sativa*

مقدمه

برنج، یکی ازمنابع عمده غذایی است که بیش از نیمی از جمعیت جهان از نظر تامین کالری وپروتئین به آن وابسته اند. خصوصا در بین کشورهای آسیایی که بیش از ۵۰ درصد از کالری مورد نیاز روزانه آنها از برنج تامین می‌گردد [Bajaj,1991]. با توجه به روند رو به افزایش جمعیت جهان، طبق آمارهای سازمان خواروبار جهانی(فائو) تا سال ۲۰۲۵ میزان ۷۶۰ میلیون تن شلتوک نیاز خواهد بود تا بتوان میزان تقاضای جمعیت جهان را به این منبع مهم غذایی تامین نمود و این در حالی است که بیشتر زمین‌های زراعی مورد بهره برداری قرار گرفته است. بویژه در آسیا که بیش از ۹۰درصد از برنج جهان تولید و مصرف می‌شود [Kush 2004,]. بنابراین، افزایش تولید برنج در آینده، نیاز به بهبود راندمان تولید و ابداع تکنولوژی‌های جدیدتری دارد. روش‌های کشت بافت برنج، می تواند در اصلاح وتولید واریته‌هایی با عملکرد بالا و مقاوم به آفات وبیماری‌ها کمک نماید [Zapata, 1984]. کشت بافت گیاهی، فرآیندی است که در آن قطعات کوچکی از بافت زنده از گیاه جدا ودر یک محیط مغذی رشد داده میشود. کشت بافت گیاهی یا کشت گندزدایی شده سلولها، بافت‌ها و اندام‌ها تحت شرایط فیزیکی و شیمیایی معین در شرایط درون شیشه ابزاری مهم در مطالعات پایه وکاربردی میباشد. این تکنیک مهم، مرهون نظریات دانشمند آلمانی هابرلانت در آغاز قرن بیستم است [Trevor and Thrope,2007]. یکی ازکاربردهای کشت بافت، تولیدگیاهان هاپلویید است. مهمترین روش‌های تولید گیاهان هاپلویید در محیط درون شیشه ای شامل کشت بساک، کشت دانه گرده جدا شده و کشت تخمک می باشد. کشت بساک رایج‌ترین شکل کشت گرده است که بساک‌ها در مرحله نموی تک هسته‌ای انتخاب میشوند. [Bahar, et al. 2008]. تولید گیاهان هاپلویید در برنج با استفاده از کشت بساک اولین بار توسط اونو و نیزیکی در سال۱۹۶۸ انجام شد. [Niizeki and Oono, 1968] تکنیک‌های کشت بساک در برنامه‌های اصلاحی برنج اهمیت بسیاری دارد. چون موجب افزایش کارآیی انتخاب شده، دوره اصلاحی را تسریع نموده وامکان تولید سریع تر وانتخاب لاین های موتانت مفید تری را در برنامه‌های اصلاحی موتاسیونی میدهد. بدلیل اینکه این تکنیک‌ها در بر گیرنده گامت های هاپلویید)دانه‌های گرده(بجای والدین دیپلویید است، تعداد گیاهان لازم جهت بیان باز ترکیب‌های مختلف، کمتر از روش‌های سنتی است.[Guey,2010] تولید گیاهان هاپلویید ودوبرابر نمودن مجموعه کروموزومی(ژنوم) آنها به ایجاد گیاهان دابلد هاپلویید منجر میگردد. این روش، سریعترین روش برای دستیابی به لاین‌های صد در صد خالص) اینبرد لاین) میباشد [Zapata, 1984. Talebi et al.,2007].

کلشی سین، مهمترین عامل شیمیایی، جهت دوبرابر کردن کروموزوم‌ها می باشدکه در سطح وسیعی بکار می‌رود[Ryopy,1997.,Burun2008. Segui-Simarro and Nuez,2008]. کلشی سین، باز دارنده رشته‌های دوکی شکل وعمل کننده در سلول‌های در حال تقسیم گیاهان میباشدکه از تشکیل میکروتوبول‌ها، از طریق پیوند با زیر واحد پروتئینی میکروتوبولی (توبولین) ممانعت میکند. لذا کروموزومها در مرحله متافاز، یک جا وارد یک سلول میگردند. در نتیجه تعداد کروموزوم سلول حاصل از تقسیم دو برابر میگردد [Nitch and Kasha,1975].

این مطلب که گیاهان حاصل ازکشت بساک و دانه گرده، درجات پلوییدی متفاوتی مانند x، x2x,3x,4 و x5 دارند بخوبی شناخته شده است. ولی بیشتر آنها هاپلویید ودیپلویید هستند. طبق گزارش هوآنگ

وهمکاران (۱۹۷۸) از ۲۴۹۶ مجموعه از گیاهان باززایی شده از گرده،۳۵/۳ درصد هاپلویید و۵۳/۴ درصد دیپلویید بودند. ین وهمکاران (۱۹۷۶)و چن و لی(۱۹۷۸) با توجه به مشاهدات خود،فراوانی دیپلوییدهارادر گیاهان حاصل از گرده، بیش از ۵۰ درصد گزارش نمودند. تجزیه ژنتیکی نشان داد که بیش از ۹۰ درصد نتاج دیپلویید حاصل ازدورگه‌ها هموزیگوس بودند. بنابر این می‌توان چنین نتیجه گرفت که گیاهان دیپلویید، بصورت خود بخودی در محیط کشت دوبرابر شده‌اند و از سلولهای سوماتیکی دیواره بساک مشتق نشده‌اند. دوبرابر شدن کروموزومها با غوطه ور کردن ریشه‌ها وگره‌های واجد پنجه در محلول مایع ۰/۲ درصد کلشی سین و۰/۱درصد فومیرون افزایش می‌یابد [et al.,1976 Chen and Lee1978., Yin]. ولی هاپلوییدها در محیط کشت کالوس‌زای سوماتیکی نیز دوبرابر میشوند. ما میدانیم که خوشه‌چه وبرگهای جوان هاپلویید برنج وقتی در یک محیط کشت دارای D-۴-۲ قرارداده شوندکالوس سوماتیکی تولید میکنند. پس درنتیجه اندومیتوز یا اندو دوپلیکیت سلول‌های کالوس تعدادی از گیاهان بایستی دوبرابرشوند[IRRI,1982]. ین وهمکاران غلظت ۰/۱ را بهترین غلظت برای تولید گیاهان دابلد هاپلوییداز تیمار گیا هچه های هاپلویید معرفی کردند[et al.,1976 Yin]. همچنین با بررسی غلظت ها وزمان مختلف تیمار گیاهچه های هاپلوییدبا کلشی سین بهترین غلظت و زمان تیمار غلظت ۰/۱ و زمان ۱۰ و ۱۲ ساعت معرفی شده است[Shouyi and Shouyin,1991]. دراین تحقیق، به منظور تعیین بهترین غلظت کلشی‌سین و مدت زمان مناسب تیمار گیاهان هاپلویید جهت مضاعف شدن کروموزوم‌های آنها، بوته‌های هاپلوئید بدست آمده از کشت بساک دو هیبرید برنج با سه غلظت متفاوت از محلول کلشی‌سین با سه تیمار زمانی متفاوت مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد وروش ها

موادگیاهی

دو رقم هیبرید به نام های GRH1 (دیلم) وIR69688H در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

جهت کشت بساک و تولید گیاهان هاپلوییددر آزمایشگاه کشت بافت در موسسه تحقیقات برنج کشورعملیات مربوط به کاشت دو رقم هیبرید ازبهارسال ۱۳۸۶ آغاز گردید . این عملیات در مزارع تحقیقاتی واقع در موسسه تحقیقات برنج کشور واقع در رشت صورت گرفت. کلیه عملیات خزانه گیری، بذر پاشی، نشاءکاری طبق روش معمول در موسسه تحقیقات برنج صورت گرفت. در طول این مدت عملیات داشت، شامل وجین علف های هرز، کود پاشی، مبارزه با آفات وبیماری ها نیز طبق روش متداول انجام گرفت. گیاهان هاپلوییدی که از کشت بساک دو رقم هیبرید GRH1 [دیلم] وIR69 بدست آمده بودند در مزرعه پنجه های زیادی تولید کردند .تعداد ۱۳۵ بوته از هر رقم برداشت و جهت اعمال تیمارهای مورد نظر به گلخانه انتقال یافت. بعد از برداشت بوته‌ها تعداد ۱۰ پنجه از هر بوته جهت اعمال تیمار جدا گردید.پس از انتقال بوته‌های هاپلویید به گلخانه، ابتدا جهت پاک نمودن ریشه‌ها ازخاک، ریشه‌های هر بوته کاملا با آب شستشو و تمیز گردید سپس نوک ریشه‌های هر بوته توسط قیچی قطع گردید و سپس به منظور راتون‌دهی ساقه‌ها درارتفاع ۱۵ سانتی متری از طوقه بریده شدند.جهت غوطه ور کردن گیاهچه های هاپلویید در محلول کلشی سین سه غلظت ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ از این محلول تهیه گردید.اعمال تیمارهای کلشی سین بصورت آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور (میزان غلظت درسه سطح (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵) و زمان (۸، ۱۲ و۱۸ ساعت) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار ودر هر تکرار ۵ بوته انجام گرفت. جهت انجام بهتر ودقیق تر آزمایش بوته های مربوط به هر غلظت بطور جداگانه در یک روز برداشت وآماده تیمار شدند. بطور مثال ابتدا میزان محلول لازم برای غلظت۰/۰۵ تهیه گردید.پس از ریختن محلول در ظرف مخصوص بوته های آماده شده برای این غلظت یعنی ۴۵بوته از هیبرید GRH1 (5 بوته به ازاء هر تکرار ،سه تکرار وسه زمان مختلف) در داخل ظرف قرار داده شد. بعد از ۸ ساعت بوته های مربوط به زمان اول یعنی ۱۵ بوته برداشت گردید. بعد از ۱۲ ساعت ۱۵ بوته مربوط به زمان دوم وپس از ۱۸ ساعت ۱۵ بوته مربوط به زمان سوم برداشت شدند سپس ۴۵ بوته مربوط به غلظت۰/۱ و بعد ۴۵ بوته مربوط به غلظت ۰/۱۵ از هیبریدGRH1 به شرح فوق تیمار گردیدند سپس همین کار برای ۱۳۵ بوته مربوط به هیبرید IR69 انجام گرفت بوته‌های تیمارشده با کلشی سین پس از اتمام زمان مقرر بمدت ۲۴ ساعت در آب جاری قرار گرفت وسپس در گلدان هایی که محتوی خاک مزرعه بود کشت گردید. بوته‌های کاشته‌شده در گلدان به گلخانه منتقل شدند. ودر طی این مدت، کلیه مراقبت‌های زراعی مانند آبیاری، وجین علف‌های هرز، کوددهی(در صورت نیاز) ومبارزه با آفات وبیماری‌ها انجام گردید.صفاتی که در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفت عبارت بودند از ۱- میانگین تعداد پنجه تولید شده در هر بوته۲- متوسط تعداد پنجه دابل هاپلویید تولید شده در هر بوته ۳- درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید۴- درصد بوته های دارای پنجه پلی پلویید۵- درصد بوته های دارای هر دو نوع پنجه دابل هاپلویید و پلی پلویید۶- متوسط تعداد بذور در هر خوشه. کلیه صفات مذکور اندازه گیری شدند وداده ها ثبت گردیدند تجزیه وتحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار MSTATC انجام ومقایسه میانگین تیمار ها واثرات متقابل آنها بر صفات اندازه گیری شده بر اساس آزمون LSD انجام شد.

بحث ونتیجه گیری

در این تحقیق شش صفت اندازه گیری و مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج مربوط به هرصفت بطور جداگانه ارائه و مورد بحث وبررسی قرار می گیرد. در صفات درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید،درصد بوته های دارای پنجه پلی پلویید ودرصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید وپلی پلویید بدلیل نرمال نبودن داده هادر ابتدا تبدیل داده ها به صورت $\sqrt{x+0.5}$ انجام شد وسپس تجزیه واریانس ومقایسات میانگین بر روی داده ها ی تبدیل شده صورت گرفت ولی در جداول مقایسه میانگین از میانگین های اصلی استفاده شد.

۱- میانگین تعداد پنجه تولید شده در هر بوته

تجزیه واریانس این صفت نشان دادکه تفاوت معنی داری بین دو واریته، سه غلظت مختلف کلشی سین و سه زمان متفاوت وجود داردکه این نشاندهنده متفاوت بودن دو رقم در صفت درصد پنجه زنی می‌باشد و از طرفی این صفت تحت تاثیر غلظت وزمان تیمار کلشی‌سین نیز می‌باشد. اما اثر متقابل واریته در غلظت، واریته در زمان، غلظت درزمان و واریته در غلظت در زمان معنی‌دار نشده است (جدول۱).

مقایسه میانگین واریته ها نشان داد که رقم دیلم(GRH1) بیشترین میزان پنجه تولید شده یعنی ۷/۹۳۳ پنجه را در بین دو رقم داشته است. همچنین با بررسی مقایسه میانگین غلظت ها برای این صفت، بیشترین

تعداد پنجه تولید شده در غلظت۰/۰۵ بدست آمد. در بررسی اثرات متقابل طبق نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل بین واریته وغلظت معنی دار نگردید. معنی دار نشدن اثر متقابل واریته بر غلظت نشاندهنده تاثیر مستقل این دو تیمار(واریته وغلظت) بر روی صفت مورد بررسی(تعداد پنجه) می باشد یا بعبارت دیگر این دو تیمار در صفت مورد بررسی فاقد اثر متقابل می باشند. اثراصلی زمان بر روی صفت میزان تولید پنجه در سطح احتمال ٪۱ معنی دار گردید(جدول۱). بیشترین تعداد پنجه بدست آمده در ۸ ساعت وپس از آن ۱۲ و۱۸ ساعت در کلاس های بعدی قرار می گیرند یا بعبارتی با افزایش زمان تیمار بوته ها میزان تولید پنجه در آنها کاهش می یابد که البته این امر طبیعی بنظر می رسد چرا که هرچه زمان تیمار بوته ها زیاد تر باشد آسیب بیشتری از لحاظ تنش غذایی، پلاسیده شدن بیشتر ریشه ها ویا حتی مرگ تعدادی از پنجه های اولیه به بوته های تحت تیمار وارد می گرددکه این آسیب ها باعث ضعیف شدن بوته ها و در نهایت کاهش تعداد پنجه های بعدی آنها می گردد.اثر متقابل بین رقم وزمان معنی دار نیست.بدین معنی که مدت زمان تیمار بوته ها بطور مستقل از رقم بر روی صفت تعداد پنجه تاثیر داردیا به عبارتی تاثیر رقم و زمان بر روی صفت تعداد پنجه بطور موازی می باشد. جدول مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت بر زمان برای تعداد پنجه نشان می دهد که بیشترین میزان تولید پنجه در غلظت ۰/۰۵ وزمان ۸ ساعت (۸/۹۰۰) و کمترین میا نگین تولید پنجه در غلظت ۰/۱۵ در ۱۸ ساعت بود(۶/۶۰۰).

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده در دو واریته هیبرید

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		متوسط تعداد پنجه تولید شده در هر بوته	متوسط تعداد پنجه دابل‌هاپلوئید تولید شده در هر بوته	درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلوئید	درصد بوته های دارای پنجه پلی پلوئید	درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلوییدوپلی پلوئید	متوسط تعداد بذور در هر خوشه
واریته	۱	۲/۰۰۳**	۱/۸۵۳*	۵/۵۹۰*	۱۶/۰۹۲*	۶/۶۵۳^{ns}	۵۴/۱۳۰^{ns}
غلظت	۲	۳/۱۵۰**	۰/۷۴^{ns}	۱۳/۱۳۱**	۱۶/۱۶۰**	۸/۶۷۱^{ns}	۱۹/۳۴۷^{ns}
واریته×غلظت	۲	۰/۲۱^{ns}	۰/۶۹۵^{ns}	۰/۵۵۱^{ns}	۲/۱۱۰^{ns}	۰/۸۸۴^{ns}	۳۳/۵۱۷^{ns}
زمان	۲	۹/۶۸۱**	۰/۹۳۱*	۲۸/۲۳۴**	۷۵/۷۷۸**	۳۲/۹۳۶**	۲۶/۰۱۷^{ns}
واریته×زمان	۲	۰/۰۱۴^{ns}	۰/۰۹۷^{ns}	۰/۴۹۳^{ns}	۰/۲۳۹^{ns}	۱/۶۶۳^{ns}	۴۳/۳۶۳^{ns}
غلظت ×زمان	۴	۰/۱۰۷^{ns}	۰/۲۱۶^{ns}	۳/۸۵۰*	۰/۴۸۲^{ns}	۲/۵۳۴^{ns}	۸۰/۰۷۸*
واریته×غلظت×زمان	۴	۰/۰۰۵^{ns}	۰/۰۹۲^{ns}	۰/۵۸^{ns}	۰/۹۴۷^{ns}	۰/۳۶۱^{ns}	۲۸/۸۱۱^{ns}
خطا	۳۶	۰/۰۵۰	۰/۲۸۶	۱/۱۰۷	۲/۳۶۷	۲/۸۱۸	۳۰/۰۶۹
ضریب تغییرات		٪۲/۸۸	٪۱۹/۶۰	٪۱۵/۲۹	٪۳۱/۷۱	٪۷۶/۶۴	٪۱۵/۷۸

ns ، *، ** بترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ ،و ۱ درصد

۲- متوسط تعداد پنجه دابل هاپلویید تولید شده در هر بوته

تجزیه واریانس صفت متوسط تعدادپنجه دابلد هاپلویید تولید شده نشان داد که بین ارقام مورد بررسی تفاوت معنی داری در سطح ۰/۰۵ وجود دارد(جدول۱). متوسط تعداد پنجه دابل هاپلویید تولید شده در رقم GRH1(۷/۹۳)بطور معنی داری از رقم IR6988 (۷/۵۴) بیشتر بود(جدول۲). اثر اصلی زمان نیز برای این صفت معنی دار بود یا بعبارتی متوسط تعداد پنجه دابل هاپلویید تولید شده در هر بوته بطور کلی در تیمار های زمانی مختلف متفاوت بوده است . معنی دار شدن اثر اصلی غلظت بر روی این صفت نشان دهنده متفاوت بودن متوسط تعداد پنجه دابل هاپلویید تولید شده در هر بوته در تیمار های غلظتی مختلف می باشد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس هیچ کدام از اثرهای متقابل دو گانه و سه گانه معنی دار نگردیده است. (جدول۱). معنی دار نشدن اثر متقابل نشان دهنده تاثیر مستقل هر یک از تیمار ها بر روی متوسط تولید پنجه دابلد هاپلویید در هر بوته می باشد. یا بعبارتی اثر تیمار های مورد بررسی بر روی صفت مذکور بطورموازی ودرجهت و یا درخلاف جهت همدیگر بوده است. نتایج مقایسه میانگین واریته ها، غلظت ها و زمان ها واثرات متقابل آنها بر هم در جداول و نمودار ها نشان داده شده است. مقایسه میانگین زمان های متفاوت برای این صفت نشان دادکه بیشترین میانگین در زمان ۱۸ ساعت بوده (۲/۹۴پنجه دابل هاپلویید در هر بوته) که تفاوت معنی داری

جدول ۲- مقایسه میانگین دو واریته از نظر صفات اندازه گیری شده

واریته	متوسط تعداد پنجه تولید شده در هر بوته	متوسط تعداد پنجه دابل هاپلوئید تولید شده‌در هربوته	درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلوئید	درصد بوته های دارای پنجه پلی پلوئید
IR69688H	۷/۵۴^{b}	۲/۵۴^{b}	۴۵/۹۲۶^{b}	۲۳/۷۰۴^{b}
GRH1	۷/۹۳۳^{a}	۲/۹۱^{a}	۵۳/۳۳۳^{a}	۳۳/۳۳۳^{a}

میانگین های دارای حروف مشابه اختلاف معنی دار ندارند

جدول ۳- مقایسه میانگین غلظت های مختلف کلشی سین برای صفات اندازه گیری شده

غلظت	متوسط تعداد پنجه تولید شده در هر بوته	درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلوئید	درصد بوته های دارای پنجه پلی پلوئید
۰/۰۵	۸/۲۲^{a}	۳۷/۷۷۸^{b}	۲۰/۰۰۰^{b}
۰/۱	۷/۵۳^{b}	۵۳/۳۳۳^{a}	۲۶/۶۶۷^{b}
۰/۱۵	۷/۴۶^{b}	۵۷/۷۷۸^{a}	۳۸/۸۸۹^{a}

میانگین های دارای حروف مشابه،اختلاف معنی دار ندارند.

با زمان ۸ ساعت (۲/۴۹پنجه دابل هاپلویید در هر بوته) دارد که دارای کمترین میانگین پنجه دابل هاپلویید بوده است(جدول۴). همچنین مطالعه اثر متقابل واریته در زمان نشان داد که بیشترین میانگین تعداد پنجه دابل هاپلویید در رقم GRH1در۱۲و۱۸ ساعت(به ترتیب ۲/۸۴ و۳/۱۸) و کمترین آن در رقم IR6988در ۸ ساعت(۲/۲۷۸) می باشد(جدول ۵).

۳- درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید

تجزیه واریانس صفت درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید نشان داد که اثر اصلی واریته، غلظت و زمان معنی دار می باشد در این صفت نیز همانند دو صفت قبلی اثر اصلی این صفت معنی دار گردید.که این معنی دار شدن نشان دهنده تفاوت معنی دار در اثرات اصلی هر سه تیمار اعمال شده می باشد اما از بین اثرهای متقابل فقط اثر متقابل زمان در غلظت معنی دار گردیده است یعنی این که اثر این دوفاکتور بر روی درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید بطورموازی باعث کاهش یا افزایش این صفت نمی شوند. بهترین نتیجه را می توان در یک غلظت وزمان خاصی بدست آورد.نتایج مقایسه میانگین واریته ها نشان می دهد که بیشترین درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید مربوط به رقم GRH1(۵۳/۳۳۳) می باشد که با درصد پنجه دابل هاپلویید در رقم IR69اختلاف معنی داری دارد. همچنین در بین سه غلظت بکار رفته در آزمایش موثر ترین غلظت بکار رفته جهت تولید بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید مربوط به غلظت های ۰/۱ و۰/۱۵(به ترتیب به میزان ۵۳/۳۳۳ و ۵۷/۷۷۸) می باشد که تفاوت معنی داری با غلظت ۰/۰۵(به میزان ۳۷/۷۷۸) دارد.با مقایسه میانگین زمان های مختلف مشخص شد که بیشترین درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید در زمان ۱۲ ساعت(با مقدار۸۶/۸۸۹) وکمترین آن زمان ۸ ساعت(۳۶/۶۶۷) بدست آمد. همچنین با بررسی مقایسه میانگین اثر متقابل واریته وزمان برای این صفت بیشترین مقدار آن مربوط به رقم GRH1 و IR6988 در تیمار زمانی ۱۲ ساعت بود(بترتیب۷۱/۱۱۱ و۶۶/۶۶۷) و کمترین درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید مربوط به رقم IR6988 در تیمار زمانی ۸ساعت(به میزان۳۳/۳۳۳) بود. (جدول۵) با مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت وزمان بر این صفت بیشترین میانگین درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلوییددر زمان ۱۲ ساعت و غلظت ۰/۱ (به مقدار ۸۳/۳۳۳) مشاهده شد که با کمترین مقدار آن در غلظت ۰/۰۵ وتیمار زمانی ۸ ساعت(به میزان۲۰/۰) اختلاف معنی‌دار داشت (جدول۶).

۴- درصد بوته های دارای پنجه پلی پلویید

با تجزیه واریانس این صفت، اثر اصلی واریته در سطح احتمال ٪۵ واثرات اصلی غلظت وزمان در سطح احتمال ٪۱ معنی دار گردیددر حالی که هیچ کدام ازاثرات متقابل تیمار ها معنی دار نگردید(جدول۱) که این معنی دار نشدن همانند بعضی از صفات قبلی نشاندهنده تاثیر مستقل تیمار ها بر روی صفت درصد بوته های دارای پنجه پلی پلویید می باشد. بعضی تیمار های اعمال شده بطور موازی در یک راستا باعث کاهش یا افزایش صفت مذکور شده اند. رقم GRH1بطور میانگین دارای درصد پنجه پلی پلویید بیشتری(به میزان۳۳/۳۳۳) از رقم IR6988 (به میزان ۲۳/۷۰۴) بود(جدول ۲). میانگین این دو رقم برای صفت مذکور با هم اختلاف معنی داری داشتند. با مقایسه سه تیمار غلظت اعمال شده مشاهده می شود که در غلظت ۰/۱۵ کلشی سین بیشترین درصد بوته های دارای پنجه پلی پلویید وجود دارد(به میزان۳۸/۸۸۹) و در دوغلظت دیگرمقدار این صفت بطور معنی داری کمتر است(۲۶/۶۶۷ و۲۰/۰۰۰) (جدول۳). زیاد بودن درصد پنجه پلی پلویید در غلظت ۰/۱۵ دور از انتظار نیست چرا که با افزایش غلظت کلشی سین احتمال جذب بیشتر کلشی سین و در نتیجه تولید بیشترپنجه های پلی پلویید افزایش می یابدکه البته این موضوع در تحقیقات قبلی از جمله ین وهمکاران(Yin etal,1977) ولیانگ شویی و هوآنگ شویین [Shouyi and Shouyi ۱۹۹۱,] نیز به اثبات رسیده بود. با افزایش زمان تیمار نیز درصد بوته های دارای پنجه پلی پلویید افزایش یافت بطوری که در زمان ۱۸ ساعت بیشترین درصد بوته های دارای پنجه پلی پلویید (به مقدار ۴۵/۵۵۶ درصد) و بعد از آن در زمان ۱۲ ساعت (به مقدار ۳۰ درصد) وسپس کمترین میزان نیز در زمان ۸ ساعت (به مقدار۱۰درصد) مشاهده گردید. البته افزایش میزان درصد پلی پلوییدی با افزایش زمان تیمار امری کاملا طبیعی می باشد چرا که با افزایش مدت زمان تیمار میزان کلشی سین جذب شده توسط گیاه افزایش خواهد یافت و از طرفی هرچه گیاه مدت زمان زیادتری در معرض تیمار کلشی سین قرار داشته باشد سلول های مریستمی در حال تقسیم میتوز ممکن است که چندین تقسیم متوالی را در حضور کلشی سین انجام دهند وکلشی سین با مختل کردن رشته های دوک باعث بوجود آمدن سلول های مریستمی دارای چندین نسخه کامل ژنوم گردند و در نتیجه پنجه های پلی پلویید حاصل گردد. این موضوع یعنی افزایش درصد پنجه پلی پلویید بالطبع باعث کاهش درصد پنجه های دابل هاپلویید خواهد گردید. بطوری که با نگاهی به صفت درصد پنجه دابل هاپلوییدمتوجه می شویم که افزایش زمان از ۱۲ به ۱۸ ساعت موجب کاهش درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید شده است. محققینی نظیر لیانگ شویی وهوآنگ شویین[Shouyi and Shouyi ۱۹۹۱,].و ین وهمکاران((Yin etal,1977)) اذعان کرده اند که با افزایش مدت زمان تیمار باکلشی سین علاوه بر افزایش درصد پنجه های پلی پلویید باعث کاهش درصد پنجه های دابل هاپلویید نیز می شودبطوریکه لیانگ شویی در تحقیقات خود اعلام داشت که در مدت زمان ۱۲ ساعت بیشترین درصد پنجه دابل هاپلویید بدست آمدو با افزایش زمان به ۱۸ و۲۴ ساعت میزان درصد دابل هاپلویید به طور معنی داری کاهش یافت. مقایسه میانگین اثر متقابل واریته و زمان برای این صفت نشان داد که بیشترین مقدار آن در واریته GRH1و زمان ۱۸ ساعت(به میزان ۵۳/۳۳) مشاهده شد که با کمترین مقدار آن در واریته IR69 در زمان ۸ ساعت و واریته GRH1 در زمان ۸ ساعت(بترتیب۶/۶۶۷ و۱۳/۳۳۳) اختلاف معنی‌دار داشت(جدول۵).

۵- درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلویید و پلی پلویید

با تجزیه واریانس این صفت مشخص گردید که فقط اثر اصلی زمان در سطح ٪۱ معنی دار می باشد و سایر اثرهای اصلی و متقابل برای صفت درصد بوته های دارای هر دو پنجه دابل هاپلویید وپلی پلویید معنی دار نیست(جدول۱). بنابراین میانگین درصد بوته های دارای هر دو پنجه برای هر دو رقم از نظر آماری یکسان بوده است(جدول۲). با بررسی مقایسه میانگین تیمار های زمانی مختلف مشخص شد که بیشترین درصد بوته های دارای هر دونوع پنجه در زمان ۱۸ و۱۲ ساعت (بترتیب۱۴/۴۴۴ و۱۰/۰۰۰) وکمترین آن در زمان ۸ ساعت(۰) مشاهده شد (جدول ۴). البته صفر بودن این صفت در زمان ۸ ساعت بدین معنی است که میزان جذب کلشی سین و یا بعبارتی در معرض کلشی سین قرار گرفتن سلول

های مریستمی به اندازه ای نبوده است که سلول های مریستمی بتوانند چندین تقسیم میتوز را در حضور کلشی سین انجام دهندتا منجر به تولید سلول های حاوی چندین کپی از ژنوم کامل برنج باشند.

۶- متوسط تعداد بذور در هر خوشه

تجزیه واریانس این صفت نشان داد که متوسط تعداد بذور در هر خوشه فقط برای اثر متقابل غلظت در زمان معنی دار گردید و سایر اثرهای اصلی و متقابل برای این صفت معنی دار نگردید (جدول۱). بنابر این میانگین تعداد بذور در هر خوشه برای دو واریته از نظر آماری یکسان بود (جدول۲). بیشترین میانگین تعداد بذور در خوشه در واریته IR69 و زمان ۱۸ ساعت (به میزان ۳۷/۹۵) و کمترین آن در رقم GRH1 و زمان ۱۲ ساعت (به میزان ۳۱/۹) بود (جدول ۵). با بررسی اثر متقابل غلظت در زمان مشخص گردید که در غلظت ۰/۰۵ و زمان ۱۸ ساعت(۳۸/۲۴۹) و در غلظت ۰/۱ وزمان ۸ و۱۸ ساعت(به ترتیب۳۷/۹۶۳ و۳۶/۵۱۷) بیشترین متوسط تعداد بذور در هر خوشه ودر زمان ۸ ساعت و غلظت ۰/۰۵ کمترین مقدار این صفت(۲۹/۰۴۵)مشاهده گردید(جدول۶). در این تحقیق به ازای هر خوشه بذر کمی در مقایسه با خوشه‌های برنج در حالت طبیعی تولید گردید بدلیل اینکه خوشه های باردار خوشه اصلی نبوده ودر واقع راتون می باشند وهمانطوری که در تحقیقات مختلف نشان داده شده است که میزان بذر در راتون بسیار کمتر از خوشه اصلی می باشد همچنین بوته ها بعد از تیمار کلشی سین به علت استرس وارده رشد کمتری دارند و اینکه بوته ها در شرایط گلخانه ای رشد کرده اندکه در شرایط گلخانه ای رشد بوته ها کمتربود وبنابر این پنجه ها وراتون های ضعیف تری تولید کردندکه منجر به تولید بذر کمی در خوشه گردید.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل واریته ×زمان برای صفات اندازه گیری شده

واریته	زمان	متوسط تعداد پنجه تولید شده در هر بوته	متوسط تعداد دابل هاپلوئید تولید شده در هر بوته	درصد بوته های دارای پنجه دابل هاپلوئید	درصد بوته های دارای پنجه پلی پلوئید	درصد بوته های دارای پنجه دابلد هاپلویید وپلی پلوئید	متوسط تعداد بذور در هر خوشه
IR69688H	۸	۸/۲۸۹^{b}	۲/۲۷۸^{b}	۳۳/۳۳۳^{c}	۶/۶۶۷c	۰/۰۰۰c	۳۳/۵۱۹^{ab}
	۱۲	۷/۵۱۱^{d}	۲/۶۴۴^{ab}	۶۶/۶۶۷^{a}	۲۶/۶۶۷b	۶/۶۶۷bc	۳۵/۷۸۷^{ab}
	۱۸	۶/۸۴۴^{f}	۲/۷۰۴^{ab}	۳۷/۷۷۸^{bc}	۳۷/۷۷۸ab	۱۱/۱۱۱ab	۳۷/۹۵۱^{a}
GRH1	۸	۸/۶۶۷^{a}	۲/۷۰۴^{ab}	۴۰/۰۰۰^{bc}	۱۳/۳۳۳^{c}	۰/۰۰۰^{c}	۳۵/۰۹۹^{ab}
	۱۲	۷/۹۵۶^{c}	۲/۸۴۸^{a}	۷۱/۱۱۱^{a}	۳۳/۳۳۳^{ab}	۱۳/۳۳۳^{ab}	۳۱/۸۷۸^{b}
	۱۸	۷/۱۷۸^{e}	۳/۱۸۵^{a}	۴۸/۸۸۹^{b}	۵۳/۳۳۳^{a}	۱۷/۷۷۸^{a}	۳۴/۲۷۳^{ab}

میانگین های دارای حروف مشابه،اختلاف معنی دار ندارند.

جدول ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل غلظت کلشی سین× زمان برای صفات اندازه گیری شده

غلظت	زمان	درصد بوته های دارای پنجه دابل‌هاپلوئید	متوسط تعداد بذور در هرخوشه
۰/۰۵	۸	۲۰/۰۰۰^{d}	۲۹/۰۴۵^{b}
	۱۲	۵۳/۳۳۳^{bc}	۳۵/۶۰۱^{ab}
	۱۸	۴۰/۰۰۰^{c}	۳۸/۲۴۹^{a}
۰/۱	۸	۳۶/۶۶۷^{c}	۳۷/۹۶۳^{a}
	۱۲	۸۳/۳۳۳^{a}	۳۳/۳۳۳^{ab}
	۱۸	۴۰/۰۰۰^{c}	۳۶/۵۱۷^{a}
۰/۱۵	۸	۵۳/۳۳۳^{bc}	۳۵/۹۲۰^{ab}
	۱۲	۷۰/۰۰۰^{ab}	۳۲/۵۶۴^{ab}
	۱۸	۵۰/۰۰۰^{bc}	۳۳/۵۷۱^{ab}

میانگین های دارای حروف مشابه،اختلاف معنی دار ندارند.

منابع مورده استفاده

1. Bahar,B.Gence, B. Hatipo, R. et al..2008.Correlation between anther culture traites and some agrophysiology.American Eurasian J.Agric and Environ.Sci.4:30-33.
2. Bajaj,Y.P.S.1991 .Biotechnology in Rice Improvement. ed:Biotechnology in Agriculture and forestry,.Springer-Verlag. vol.14,p:3
3. Burun, B. EML, U.2008. A comparative study on colchicine Application methods in obtaining Doubled haploids of tobacco (*Nicotinia tabacum*.L).Turk.J.Bio.32:105-111.
4. Chen,Y.Li,LT.1978.Investigation and utilization of pollen-derived haploid plants in rice and wheat.proc Symp Plant Tissue Cult.Science Press. Peking. pp199-211
5. Gueye,T. Ndoye,K.2010.In vitro production of doubled haploid plants from two rice species (*oryza sativa* L.and *oryza glabrima Steudt.*) for the rapid development of new breeding. material.Scientific Research and Essays., vol.5 ,(7) pp.709-.713
6. Kush,G. 2004.Harnessing Science and technology for sustainable rice based production systems.FAO RICE CONFERENCE. Page:1
7. Nitsch, C. and Kasha, K. j,. 1975. Chromosome doubling of barely haploid by nitrous oxid and colchicines treatment .,Can. J., Gent. cytol. 17 :573-583.
8. Niizeki,H. and Oono,k., 1968., Induction of haploid rice plant from anther culture. ,proc. ,jpn. Acad. ,44 : 554-557
9. Ryoppy,P.H.1997.Haploidy in Triticale.in:mohan jains.ed:In vitro haploid production in higher plants. Vol.1 PP:13
10. Segui-Simarro,J.M.and Nuez,F.2008.Pathways to doubled haploidy:Chromosome doubling during androgenesis. Cytogenet Genome Res. 120:358-369
11. Shouyi, L., and Shouyin, H., 1991 Huayu15, a high-Yielding rice variety bred by anther culture.In: Bajaj,Y.P.S.(ed.) Biotechnology in agriculture and forestry.,vol 14 pp:230-147
12. Talebi,R.Rahimi,M.Arefi,H. Nourozi,M and Bagheri,N.2007. In vitro plant regeneration through anther culture of some Iranian local Rice(Oryza sativa L.)Cultivars.Pakistan Journal of biological Science 10 (12):2056-2060
13. Trevor,A. Thrope,O.,2007.History of plant tissue culture,Humana press Inc.vol 37 pp:169-180
14. Yin,K. C. ,Hsu,C. Chu,C. Y. Pi,F.Y. Wang,S.T. Liu,T.Y. 1976. A study of the new cultivar of rice raised by haploid breeding methods. Sci. Sin. 19:227-242.
15. Zapata,F. J. 1984. Tissue culture and its application in rice improvement. In the Proceeding of the ASEAN-EEC Seminar on Biothecnology. Singapore pp:113-114