جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

"مجله علوم زراعی ایران"
جلد پنجم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۲

مطالعه کالوس زائی بساک ها و باززائی گیاهان سبز در تعدادی ازلاین‌های خالص ایرانی و خارجی برنج و گیاهان هیبرید حاصله از آن ها در شرایط درون شیشه‌ای*

Studying on callus formation and plant regeneration in some Iranian and foreign rice pure lines and their hybrids *in vitro* conditions through anther culture

رضا شیرزادیان[۱]، قربانعلی نعمت زاده[۲]، محمد پورخیراندیش[۳]، میرحسام الدین حسینی[۴] و نصراله لطفی[۵]

چکیده

تولید گیاهان هاپلوئید با استفاده از روش کشت بساک و دانه گرده از گیاهان نسل F1 در بهنژادی و تهیه ارقام جدید برنج از اهمیت قابل توجهی برخوردار هستند. در این تحقیق کشت بساک لاین های والد و گیاهان هیبرید به دست آمده از تلاقی آن ها مورد بررسی قرار گرفت. انتخاب خوشه ها از گیاهان در مرحله تک هسته‌ای دانه‌های گرده (Booting) انجام شد و پس از اعمال تیمار سرمائی خوشه ها به مدت هشت روز در هشت درجه سانتیگراد، بررسی تأثیر محیط های غذایی N6 و B5 بر کالوس زایی بساک های ژنوتیپ های مختلف در قالب آزمایش فاکتوریل دو متغیر صورت پذیرفت. نتایج به دست آمده حاکی از تفاوت معنی دار ژنوتیپ های مختلف و غالبیت نسبی واکنش کالوس زائی بساک گیاهان F1 در مقایسه با والدین در محیط های غذایی بود. هم چنین اثر متقابل معنی داری بین محیط های غذایی و ژنوتیپ ها مشاهده شد. بیشترین فراوانی کالوس زائی بساک ها در رقم خزر با متوسط ۳۰٪ و در محیط غذایی N6 مشاهده گردید. محیط کشت N6 با متوسط ۲۰٪ در مقایسه با B5 جهت کالوس‌زائی در بیشتر ژنوتیپ‌ها، راندمان، مطلوب تری داشت. کالوس ها به منظور القاء تمایز به محیط غذایی SK-11 حاوی سطوح مختلف هورمون Kinetin انتقال یافتند و بررسی‌ها نشان داد که محیط غذایی SK-11 حاوی دو میلیگرم برلیتر Kinetin و با متوسط حدود ۳۲٪ به نحو مطلوبی تمایز و تولید گیاهچه سبز را القا نمود و کالوس های حاصل از هیبرید [نعمت / IRRI 15] با متوسط ۵۳/۷۵٪ مطلوب ترین میزان تولید گیاهچه سبز را داشتند. گیاهچه‌های سبز به منظور تقویت طول ریشه ها و تعداد آن ها به بستر غذایی LS و سپس به منظور سازگاری به محلول غذایی یوشیدا با رطوبت محیطی مناسب انتقال یافته و آنگاه به گلدان های حاوی خاک مزرعه منتقل و در شرایط گلخانه ای نگهداری شدند. بالاترین میزان گیاهان سبز تولید شده در این مرحله با متوسط ۶۹٪ به هیبرید [نعمت / IRR 15] تعلق داشت. در آخرین مرحله از پروژه، تعداد ۱۴۱ گیاه سبز و سازگار با شرایط طبیعی به گلخانه منتقل شد و ۲۳/۴٪ از مجموع گیاهان حاصله در این مرحله هاپلوئیدهای خودبخودی بودند.

واژه های کلیدی: هاپلوئید، کشت بساک، کالوس زائی، باززائی گیاهان، *in vitro* .

مقدمه

بخش عمده‌ای از تحقیقات کشت بافت برنج در جهان به کشت بساک (Anther culture) اختصاص داشته و مقالات متعددی در کشورهائی چون چین، ژاپن،

تاریخ دریافت: ۱۳۸۰/۲/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۲/۵/۹

* این پروژه تحقیقاتی با حمایت دانشگاه گیلان انجام شد.

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه گیلان.
۲- عضو هیأت علمی دانشگاه مازندران.
۳- محقق دانشگاه گیلان.
۴ و ۵- کارشناسان کشت بافت.

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

فیلیپین ،هند و... در این زمینه منتشر شده است (Raina, 1989). با استفاده از این روش می توان به سلول ها، بافت ها و ارگان های حاوی فقط نیمی از مجموعه کروموزوم ها دست یافت و در برنامه‌های به نژادی در زمانی بسیار کوتاه لاین های خالص هاپلوئید مضاعف تهیه نمود. در این لاین‌ها امکان دسترسی به جهش‌ها و صفات نوترکیب افزایش می‌یابد، در حالی که در روش‌های معمولی دورگ گیری ارقام برنج، تفرق صفات در نسل های F2 و F3 صورت گرفته و چندین نسل خود گشنی جهت تهیه لاین‌های خالص ضروری است. دانشمندان چینی با بهره‌گیری از این روش اثبات نمودند که حدود ۱۵۰ گیاه حاصل از کشت بساک هیبرید F2 برای دستیابی به اهداف انتخاب کافی است (Shen et al., 1983). از دیگر کاربردهای کشت بساک برنج می‌توان به امکان انتقال ژن از یک گونه به گونه دیگر در هیبریدهای بین گونه‌ای (Chen and Li, 1987)، ایجاد و القاء تحمل به شوری و سرما (Senadhira et al, 2002) اشاره نمود.

تهیه گیاهان با استفاده از کشت بساک در دو مرحله کلی کالوس زائی (Callus induction) و باززائی (Regeneration) تحقق می‌یابد. در مرحله اول کیسه‌های بساک حاوی دانهٔ های گرده به صورت بافت های غیرمتمایز سلولی به نام کالوس ظاهر شده و سپس در مرحله دوم ارگان زائی از کالوس‌ها شکل می‌گیرد، محیط غذایی در هر یک از مراحل یاد شده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این زمینه مقالات متعددی به چاپ رسیده و محیط های متنوعی پیشنهاد شده است که در بعضی موارد این بسترهای غذائی بسیار اختصاصی بوده‌اند. کیفیت و کمیت هورمونی و ایجاد تعادل در مصرف اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها در واکنش بساک ها به محیط کشت و ایجاد تغییرات ژنتیکی در آن ها ازاهمیت زیادی برخوردار است، معمولا اکسین زیاد و سیتوکنین کم، فراوانی ایجاد کالوس را افزایش می‌دهد (Chu et al., 1976). موضوع یافتن محیط مطلوب غذایی جهت ایجاد تمایز و تهیه گیاهان هاپلوئید از اهمیت خاصی برخوردار بوده و این مرحله به شدت می‌تواند تحت تأثیر مراحل پیشین قرار گیرد، کاهش میزان اکسین و افزایش سیتوکنین در محیط کشت، موجب افزایش جوانه زنی و به دنبال آن تشکیل گیاهچه‌ها را سبب ساز است. در غلات عموما به منظور باززائی گیاهان از غلظت 2,4-D کاسته و آن را با اکسین‌های ضعیف تر مثل NAA و IAA جایگزین می‌نمایند (Raina, 1989). در این تحقیق ابتدا تأثیر محیط های مختلف کشت بر کالوس زائی بساک‌های تعدادی از والدین و هیبریدهای آن ها مورد بررسی قرار گرفته و در ادامه، یافتن محیط غذائی مطلوب برای القای تمایز در کالوس‌های به دست آمده از بساک‌های نسل F1 ارزیابی شده است.

مواد و روش ها

مواد ژنتیکی مورد نظر در طرح دورگ‌گیری شامل ارقام خوش کیفیت دمسیاه ، IRRI 15 و IRRI 14 و ارقام پر محصول نعمت و خزر، کشت و تلاقی های زیر به منظور تلفیق ژرم پلاسم لاین‌ها و تهیه بذور F1 انجام شد:

[خزر / دمسیاه (۲ ـ F1)] و [نعمت / IRRI 14 (۱ ـ F1)]

[نعمت / دمسیاه (٤ ـ F1)] و [نعمت / IRRI 15 (۳ ـ F1)]

٤۰۰ بذر تهیه شده از هر تلاقی، در مزرعه تحقیقاتی کشت و مراقبت های مطلوب محیطی در زمان رشد رویشی و زایشی اعمال گردید. انتخاب و برداشت خوشه های مطلوب (Booting) در مرحله زایشی با دانه‌های گرده تک هسته‌ای (Mid - Uninucleate stage) (Oene, 1986) در حالتی که فاصله برگ پرچم تا گره بعدی ساقه حدود ۸-۱۰cm بود،در اوایل صبح و غروب صورت پذیرفت (شیرزادیان و احمدیان (a) ۱۳۷۵). به منظور افزایش راندمان کالوس زایی وکاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز (Fang & Liang, 1985) و تحریک دانه‌های گرده به تولید هسته‌های مشابه (Zapata et al., 1983) کلیه

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

خوشه ها به مدت هشت روز در دمای هشت درجه سانتیگراد در انکوباتور یخچال دار پیش تیمار گردیدند (شیرزادیان و احمدیان، ۱۳۷۵). به منظور بررسی تأثیر محیط‌های کشت بر کالوس‌زایی ارقام والدینی و هیبریدهای حاصله، بستر غذایی N6 (Chu et al., 1975) شامل : مواد معدنی میکرو و ماکرو، یک میلیگرم تیامین ، ۰/۵ میلیگرم پیریدوکسین، ۰/۵ میلیگرم نیکوتینیک اسید،دو میلیگرم گلایسین ، دو میلیگرم 2,4-D ، ۶۰ میلیگرم ساکارز و هشت گرم آگار و pH= ۵/۶ -۵/۸ و محیط غذایی B5 (Gamborg, 1968) شامل: مواد معدنی میکرو، و ماکرو، یک میلیگرم نیکوتینیک اسید، یک میلیگرم پیریدوکسین، ده میلیگرم تیامین، ۱۶۰ گرم اینوزیتول، یک میلیگرم BAP، ۰/۵ میلیگرم IAA، ۲۰ گرم ساکارز و هشت گرم آگار و pH = ۵/۶ – ۵/۸ تهیه و در هر پتری ۶۰ بساک کشت گردید. بررسی یاد شده درقالب آزمایش فاکتوریل دو متغیره و در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار صورت گرفت. پتری‌های محتوی کیسه‌های بساک کشت شده به مدت چهار تا شش هفته در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد (Zapata, 1985) نگهداری شدند.

به منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف Kinetin شامل یک و دو و سه و چهار میلیگرم در لیتر بر القاء تمایز در کالوس‌ها و تولید گیاهچه های سبز ، تعداد ۸۰۰ کالوس مناسب به تفکیک شامل (F1 -۱) ۱۶۰، (F1-۲) ۲۴۰، (F1-۳) ۳۲۰ و (F1-٤) ۸۰ و با ضخامت دو تا سه mm به محیط کشت SK – 11 (Murashing and Skoog, 1962) حاوی مواد معدنی ماکرو و میکرو ، دو میلیگرم گلایسین ، ۰/۱ میلیگرم تیامین ، یک میلیگرم پیریدوکسین ، یک میلیگرم نیکوتینیک اسید ، ۱۰۰ میلیگرم اینوزینول، ۵۰۰ میلیگرم کازئین، یک میلیگرم NAA، یک میلیگرم BAP ، ٤۰ گرم ساکارز و هشت گرم آگار و pH= ۵/۸ انتقال یافتند. ارلن‌های محتوی کالوس‌ها، در شرایط فتوپریود (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) و شدت نور ده هزار لوکس و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. تعداد ۲۵۰ گیاهک سبز (Plantlet) حاصل از مرحله باززایی به منظور تقویت ریشه زایی و رشد مناسب تر گیاهک‌ها به بستر غذایی LS (Linsmaier & Skoog, 1965) حاوی مواد معدنی میکرو و ماکرو، ٤۰ میلیگرم اینوزیتول ، دو میلیگرم تیامین ، ٤۰ گرم ساکارز و هشت گرم آگار و pH= ۵/۶ – ۵/۸ انتقال و به مدت دو هفته در شرایطی مشابه مرحله قبل نگهداری شدند. به منظور سازگاری گیاهان حاصل با شرایط طبیعی و غیراستریل و تقویت رشد آن ها ، کلیه گیاهان به محلول یوشیدا (Yoshida) (Yoshida et al., 1976) انتقال و به مدت دو هفته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت ۹۵٪ محیطی و در شرایط فتوپریود مناسب (۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی) در اطاقک رشد (Growth chamber) نگهداری و آنگاه به گلدان های محتوی خاک مزرعه برنج انتقال و مراقبت‌های زراعی و کنترل های محیطی و مبارزه با آلودگی های در گلخانه مجهز به امکانات مناسب جهت استریل درجه حرارت ، رطوبت و نور صورت گرفت. در آخرین مرحله از این پروژه، تعداد ۱٤۱ گیاه سبز و سازگار با شرایط طبیعی رشد و نمو به گلدان های حاوی خاک مزرعه برنج انتقال و در گلخانه‌نگهداری شده و مراحل تکمیل رشد آن ها در این شرایط دنبال گردید. گیاهانی که به عنوان هاپلوئید ارزیابی شده بودند تحت تیمار کولشیسین قرار گرفتند.

نتایج و بحث

الف - مرحله کالوس زایی

براساس مشاهدات انجام شده در زمینه واکنش بساک ها در ژنوتیپ های والدینی و گیاهان F1، بساک های این گیاهان بعد از مدت حدود ٤-۳ هفته به تدریج شروع به کالوس زایی نموده و پس از مدت شش هفته یادداشت برداری از پتری ها انجام شد (شکل ۱). تجزیه داده‌های حاصل نشان داد که کالوس زایی گیاهان

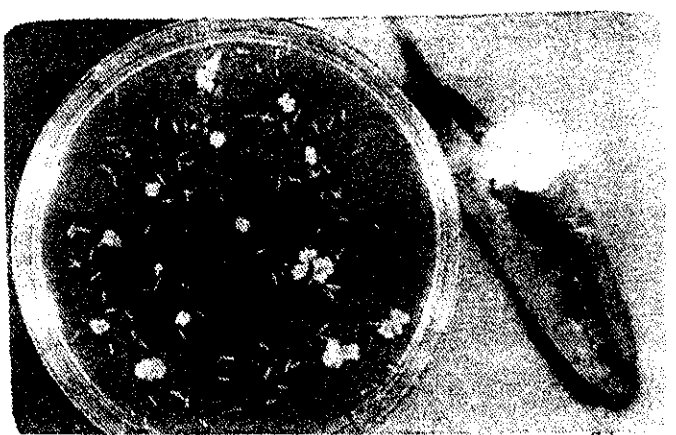
والد و نسل F1 حاکی از تفاوت معنی دار ژنوتیپ های مختلف در سطوح احتمال ۱٪ و ۵٪ می‌باشد (جدول ۱). نتایج یاد شده بر تأثیر ژنوتیپ به عنوان یکی از عوامل تعیین کننده بر میزان راندمان تولید کالوس در بافت های هاپلوئید برنج، صحه گذاشته است (Chen & Li, 1978 و شیرزادیان و احمدیان ۱۳۷۵a و Hou et al, 1994)، وجود تفاوت معنی‌دار بین کولیتوارهای گندم مورد مطالعه به کشت بساک در مطالعه ارزانی و چغامیرزا در سال ۱۳۷۷، اهمیت فاکتور ژنوتیپ را به عنوان یک فاکتور مؤثر بر کالزائی تأیید می کند.

جدول ۱ - تجزیه واریانس کالوس زایی ژنوتیپ های والدینی و F1 در محیط های مختلف کشت

Table 1. Analysis of variance for callus induction of parental genotypes and F1. hybrids in the different culture media

S.O.V.	منبع تغییرات	df	MS	F
A Factor (Media culture)	فاکتورA (محیط کشت)	1	0.025	1.148^{ns}
B Factor (Genotype)	فاکتورB (ژنوتیپ)	8	79.683	3.6363**
Interaction (AB)	اثرمتقابل AB	8	56.279	2.5683*
Error	خطای آزمایش	54	21.913	

ns و **: به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح ۱٪ احتمال. ns and **: Non significant and significant at the 1% level of probability.



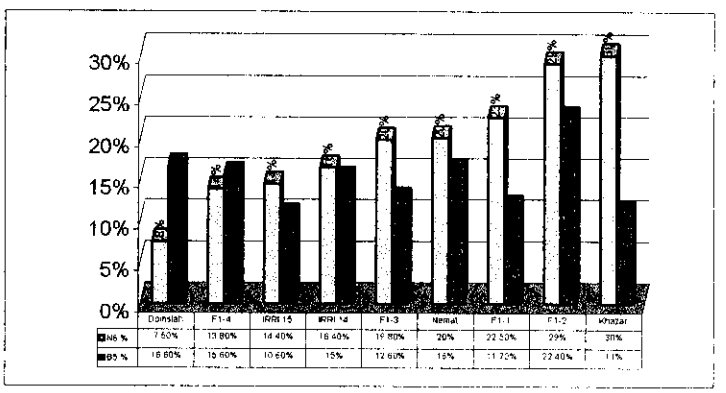
الف (a) ب (b)

شکل ۱- الف- کالوس‌زایی بساک های برنج بعد از مدت ٤ هفته، ب- کالوس حاصل از بساک با بزرگنمایی ٤٠٠ برابر

Fig. 1. a. Callus induction in anther of rice after four weeks, b.Derived callus from anthers with 400 times magnification

در این زمینه اثر متقابل معنی داری نیز بین بسترهای غذایی وژنوتیپ ها در سطوح احتمال ۵٪ ملاحظه گردید (جدول ۱)، در واقع تأثیر ترکیب موجود در بستر غذایی در ارتباط با ساختار ژنوتیپی گیاهان می تواند از عوامل مهم تعیین کننده بر میزان واکنش کیسه های بساک محتوی دانه های گرده به کالوس زایی محسوب شود (شیرزادیان و احمدیان ۱۳۷۵(a) و Khin, 1988) و لذا با تغییر ترکیب غذایی محیط کشت ، واکنش ژنوتیپ‌ها به کالوس زایی تغییر می‌یابد. بررسی فراوانی کالوس زایی ژنوتیپ ها ی والدینی و هیبریدهای F1 نشان داد که رقم خزر با متوسط ۳۰٪ و هیبرید حاصل از تلاقی [دمسیاه/ خزر] با متوسط ۲۹٪ در محیط N6 به نحو مطلوبی کالوس زایی داشته‌اند (شکل ۲). مطالعات انجام شده توسط چن و لی (Chen & Li, 1996) در سال ۱۹۹۶ نشان داد که اختلاف واریته‌ها در زمینه کالوس زایی و باززائی گیاهان عمدتاً به خصوصیات ژنتیکی و محیط رشد و نمو آن ها مربوط می باشد. محیط کشت N6 با متوسط ۲۰٪ در مقایسه با

محیط کشت B5 کالوس زایی مطلوبی را در بساک ژنوتیپ‌ها القا نموده است، موضوع یاد شده با نتایج ارایه شده توسط شیرزادیان و احمدیان در سال(a) ۱۳۷۵ تطبیق دارد. این محیط برای واریته‌های japoinca نیز توصیه شده است به طوری که بهترین محیط شناخته شده برای کشت بساک برنج مطرح شده و برای سایر محصولات نیز مفید می‌باشد(Raina, 1989)، هم چنین تسی و یهک (Tsay & Yehcc, 1988) در سال ۱۹۸۸ گزارش نمودند که ترکیبات معدنی محیط غذایی N6 در به تأخیر انداختن قهوه‌ای شدن بافت، بسیار مؤثر بوده است و کالوس زائی را تسریع می‌کند. مقایسه فراوانی کالوس زایی والدین و گیاهان نسل F1 حاکی از غالبیت نسبی واکنش بساک های گیاهان نسل F1 در مقایسه با کالوس زایی والدین می‌باشد، و موضوع یاد شده نتایج ارایه شده توسط چن (Chen, 1986) را مورد تأکید قرار می‌دهد (شکل ۲).



شکل ۲- فراوانی کالوس زایی ارقام والدینی و هیبریدهای F1 در دو محیط کشت B5,N6

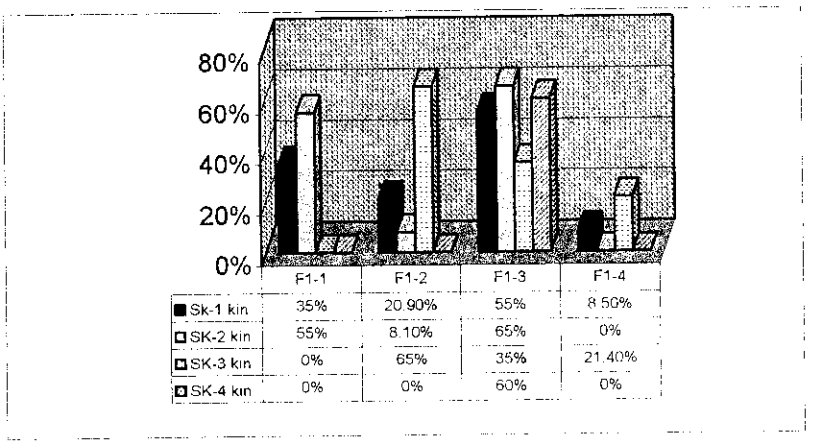
Fig. 2. Callus induction frequency in the parental lines and their F1 hybrids in two culture media (B5,N6)

ب - مرحله باززایی گیاهان

بررسی های انجام شده در زمینه واکنش هشتصد کالوس منتقل شده به محیط های غذایی القاء تمایز در کالوس‌ها، نشان داد حدود دو تا سه هفته پس از انتقال ، تمایز کالوس ها عموماً به صورت سبز شدن سلول های کالوس، ریشه زایی، حجیم شدن کالوس ها و تولید گیاهچه های سبز و آلبینو ملاحظه گردیدند. این مشاهده با نتایج ارایه شده توسط شیرزادیان و احمدیان در سال ۱۳۷۵(b) مطابقت دارد. مقایسه فراوانی گیاهچه‌های سبز حاصل از کالوس‌ها در محیط غذایی SK-11 با مقادیر متفاوت هورمون Kinetin نشان داد، بستر غذایی SK-11 حاوی دو میلیگرم در لیتر Kinetin با متوسط ۳۲٪ به نحو مطلوبی عمل تمایز و تولید گیاهچه‌های سبز را در کالوس‌ها القا نموده و کالوس های حاصل از بساک های گیاهان هیبرید [نعمت/ IRRI 15]بامتوسط ۵۳/۷۵٪ مطلوب ترین میزان تولید گیاهچه را داشتند (شکل ۳). نتایج یاد شده حاکی از تفاوت واکنش کالوس در ژنوتیپ های مختلف به سیستم های غذایی القا کننده تمایز می‌باشد، که این بحث با مطالعات جعفری در سال ۱۳۷۵ منطبق بود.

تعداد گیاهان سبز به دست آمده، متأثر از نوع ژنوتیپ و ترکیبات بستر غذایی کالوس زایی می‌باشد و براساس مطالعات ارزانی و چغامیرزا در سال ۱۳۷۷ بساک های ژنوتیپ های مختلف گندم که در محیط های کشت متفاوتی از قبیل N6 و B5 کشت شدند، در محیط غذایی باززائی، تعداد متفاوتی گیاه سبز تولید نمودند. هم چنین بین سطوح متفاوت Kinetin و ژنوتیپ ها اثر متقابل وجود دارد شیرزادیان و احمدیان (b)۱۳۷۵ و کین (Khin, 1988) براساس مطالعات زو و کُنزُگ (Zhou & Konzok,

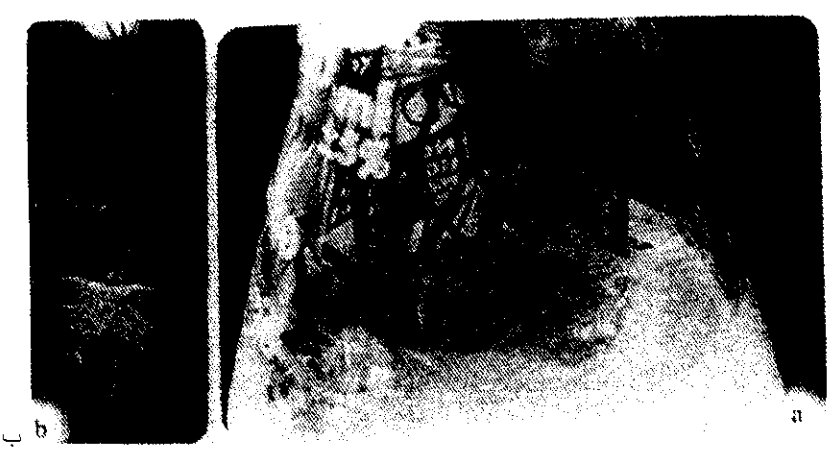
(1992 درصد باززائی گیاه سبز در کشت بساک در برخی موارد با ژن های هسته‌ای و در موارد دیگر براساس آزمایشات تلاقی‌های متقابل به ژن های سیتوپلاسمی نسبت داده‌شده‌اند.



شکل ۳- فراوانی باززائی گیاهک سبز در هیبریدهای F1 در سطوح متفاوت هورمون Kinetin

Fig. 3. Efficiency of regenerated green plantlets from F1 hybrids in different levels of kinetin hormone

۲۵۰ گیاهک انتقال یافته به محیط کشت LS پس از توسعه ریشه ها و رشد مطلوب ساقه‌ها (شکل ۴-ب) و برگ‌ها به محلول غذایی یوشیدا انتقال و به مدت دو هفته در این محیط نگهداری شدند (شکل ۵) و آنگاه به گلدان های حاوی خاک مزرعه برنج انتقال یافتند (شکل ۶) (احمدیان و شیرزادیان، ۱۳۷۷). براساس فراوانی باززائی گیاهک های سبز (شکل ۳) از مجموع گیاهان حاصله در این مرحله، بالاترین میزان تولید گیاهان به هیبرید[نعمت / IRRI 15] با متوسط ۶۹٪ تعلق داشت. رعایت دقیق شرایط نگهداری گیاهچه ها در محلول یوشیدا (رطوبت ۹۵-۹۰) و در شرایط *in vivo* از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و در صورت کاهش رطوبت محیطی گیاهان حاصل پلاسیده شده و از بین می روند. مجموع ۱٤۱ گیاه منتقل شده به گلخانه را

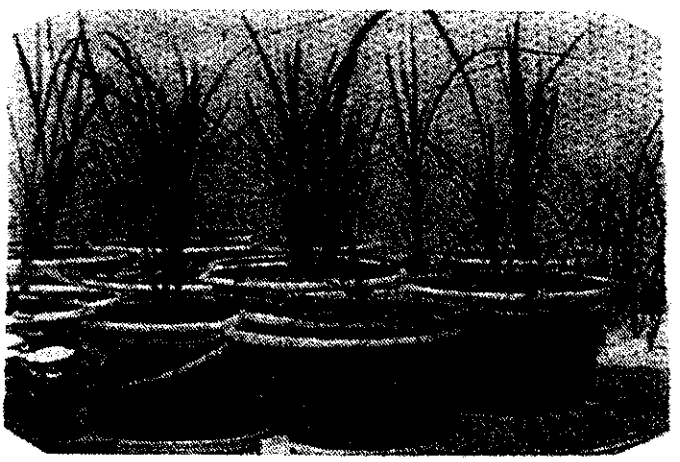


شکل ۴- الف باززائی گیاهک های سبز از کالوس‌ها در محیط Sk-11 ب- ریشه دار شدن گیاهک در محیط LS

Fig. 4. a. Regenerated green plantlets from calluses on SK-11 medium, b. Root induction in plantlets on the LS medium

شکل ۵ - رشد و نمو ریشه ها و گیاهان در محلول یوشیدا

Fig. 5. The developed roots and plants in the Yoshida Sulotion



شکل ۶ - انتقال گیاهان حاصل از کالوس های برنج به گلدان های حاوی خاک مزرعه برنج

Fig. 6. Transplantation of the produced plants from calluses to the rice field soil

می توان به ۳ گروه زیر تقسیم نمود:

۱- گیاهانی که هیچ گونه بذری تشکیل ندادند و از میزان رشد کمتری برخوردار بوده و بر اساس شاخص های ارایه شده توسط شیرزادیان و احمدیان درسال ۱۳۷٤ به عنوان هاپلوئید های ظاهری و خودبخودی ارزیابی گردیدند. این گیاهان ۲۳/٤٪ از مجموع گیاهان را به خود اختصاص دادند.

۲- گیاهان دیپلوئید که تشکیل بذر داده و از رشد مطلوب و نرمال برخوردار بوده و به عنوان گیاهان دیپلوئید ارزیابی شدند، این گیاهان ٦٦/٦٦٪ از مجموع گیاهان را به خود اختصاص دهند.

۳- گیاهان حدواسط که دارای ریشه های بسیار سطحی بوده و خوشه‌هائی با میزان متفاوت از دو گروه قبلی بودند، به طوری که در بعضی قسمت ها حاوی دانه و در بعضی قسمت ها پوک بودند و به عنوان گیاهان حدواسط ارزیابی شدند. ضرورت بررسی های سیتوژنتیکی این گیاهان در مطالعات بعدی مهم به نظر می رسد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات مسئولین محترم دانشگاه گیلان خصوصاً معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و همکاران محترم این حوزه که امکانات و اعتبار لازم را برای اجرای این طرح فراهم نمودند قدردانی و تشکر

می شود، از مساعدت و تشویق کلیه همکاران دانشکده کشاورزی صومعه سرا خصوصاً آقای دکتر میرحسینی و آقای مهندس باقری که در مراحل مختلف اداری مساعدت و را همایی نمودند سپاسگزاری می گردد.

منابع مورد استفاده

References

ارزانی، ا. و ک.، چغامیرزا. ۱۳۷۷. کشت بساک ژرم پلاسم گندم ایرانی بااستفاده از محیط کشت‌های مختلف. مجله تحقیقات کشاورزی ایران. جلد ۱۷. شماره ۲. سال ۱۳۷۷.

جعفری، ع. ۱۳۷۵. ایجاد کالوس و باززائی گیاه هاپلوئید از کشت بساک در دو گونه صنوبر. مجله پژوهش و سازندگی. جلد ۱. شماره ۳۰. صفحات ۷۱-۶۸.

شیرزادیان خرم آباد، ر. و.پ. احمدیان تهرانی ، ۱۳۷٤. کشت بساک به منظور ارزیابی کالزائی و عوامل مؤثر بر آن در برنج و بررسی امکان باززائی گیاهان هاپلوئید، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران.

شیرزادیان خرم آباد، ر.و. پ. احمدیان تهرانی ، a ۱۳۷۵. بررسی تأثیر عوامل محیطی برکالوس زایی بساک ها در تعدادی از واریته های برنج ایرانی ، دانشگاه صنعتی اصفهان ، چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران ، ۷-٤ شهریور ، ص ۷۷.

شیرزادیان خرم آباد، ر. و. پ. احمدیان تهرانی، b ۱۳۷۵. تأثیر محیط های مختلف کشت بر تمایز پذیری کالوس ها و بازائی گیاهان سبز در کشت بساک برنج ایرانی ، دانشگاه صنعتی اصفهان ، چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، ۷-٤ شهریور ، ص ۷۸.

شیرزادیان خرم آباد، ر.و. پ. احمدیان تهرانی، ۱۳۷۷.تولید گیاهان هاپلوئید با استفاده از روش کشت بساک در برنج های ایرانی، کرج - مؤسسه اصلاح بذر و نهال ، پنجمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران،۱۳ - ۹ شهریور، ص ۲۰۷.

Chu, C. C., C. Wang, C.S. Sun, Hsu, C., Yin, K. C., Chu, C.Y., 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sinica, **18**:659-668.

Chu, C. C., C.C. Wang, and C.S. Sun, 1976. Development of pollen embryos of rice and wheat on a medium devoid of hormones. Acta. Bot. Sin – **18(3)**:239 – 244.

Chen, Y., L.T.Li, 1978. Investigation and utilization of pollen – derived haploid plant in rice and wheat,. Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Beijing, PP. 199-207.

Chen, Y., 1986. Haploids of higher plant *in vitro*. PP. 118-137. Springer-Verlag. Berlin.

Fang, G.H. and H.M.Liang, 1985. Studies of function of cold pretreatment effecting the efficiency of rice anther culture. Acta. Phytophysi. Sinica. **11**:4, 366-380.

Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. Exp. Cell-Res., **50**: 151-158.

Hou,L., S.E. Ullrich, A., Kleinlofs, 1994. Inheritance of anther culture traits in barley. Crop Sci. **34**:1243-1247.

Khin, S, 1988. Effect of culture media on callus induction and plant regeneration in anther culture of some rice College, Laguna (Philippines). 101 leaves.

Linsmaier, E. M. and F. Skoog, 1965. Organic growth factor requierments of tobacco tissue cultures. Phsiol.

Plant. **18:**100-127.

Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. **15:**473-497.

Oene, K. 1986. Regeneration of plant using pollen culture of rice. Ann. Rep. Nati. Inst. Agrobiol. Resour., Jpn. (Yatabe). PP. 27-28.

Raina, S.K., 1989. Tissue culture in rice improvement. I.A.R.I Advances. In Agronomy. **42**:339-39.

Shen, J., M. Li, Y. Chen, Z. Zhang, 1983. " Cell and tissue culture techiques for cereal crop improvement" , PP. 183-202. Science Press, Beijing.

Senadhira, D., F.J. Zapata – Arias, G.B. Grogoria, M.S. Alejar, H.C. de la Cruz, T.F. Padolina, A.M. Galvez, 2002. Development of the Pirst salt – tolerant rice cultivar throush indica/indica anther culture. Field Crops Research, **79:**103–110.

Tsay, H. S., Yehcc. H., 1988. Influence of cold shock treatment and microspore development stage on rice anther culture. J. Agric Res. Cina 37,**3:**257-265.

Yoshida, S., D.A. Forno, G. H. Cock and K.A. Gomes, 1976. Routin procedures for growing rice plants in culture solution, P. 61-66. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice IRRI. Los Banos, Laguna, Philippines.

Zapata, F. J., G.S. Khush, J. P. Grill, M.H. Nea, R. O. Romero, L. B. Torrizo and M. Alejar, 1983. Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. PP. 27-46. Science Press, Beijing.

Zapata, F. J., 1985. Biotechnology in International Agriculture Research. PP. 85-95 IRRI. Manila.

Zapata, F.J. and R.P. Aldermita. 1989. Induction of salt tolerance in high –yeilding rice varietics through mutagenesis and anther culture. Advances in agricula. Biotic. No. **24:**193-202.

Zhou, H., and C.F., Konzak, 1992. Genetic control of green plant regeneration from anther culture of wheat. Genome, **35:**957-961.