مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۹
صفحه ۲۷۲-۲۶۱

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1399.9.2.16.1

DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.16.1

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشدگیاهی و سویه اگروباکتریوم بر باززایی و تراریختی چند رقم برنج ایرانی

Investigation on the effects of plant growth regulators and Agrobacterium strain on regeneration and transformation of some Iranian rice cultivars

ابراهیم دورانی*، ساناز همتی اصل

Ebrahim Dorani*, Sanaz Hemmati Asl

گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
Plant Biotechnology and Breeding Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: dorani@tabrizu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۱۲/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۷)

چکیده

کشت بافت یکی از مهمترین مراحل مهندسی ژنتیک و سایر برنامه های اصلاح گیاهان است. در این پژوهش اثر تنظیم کننده‌های رشدی مختلف شامل 2,4-D در ٤ سطح (۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی-گرم در لیتر) و Kin در سه سطح (۰، ۰/٤ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر) بر کالوس‌زایی و باززایی چهار رقم برنج ایرانی شامل ارقام هاشمی، کاظمی، طارم و شفق مورد مطالعه قرار گرفت. این آزمایش در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی با سه عامل در سه تکرار انجام گردید. نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل نشان داد که رقم شفق بیشترین وزن تر کالوس (۳۱۲ میلی‌گرم) و رقم کاظمی کمترین میزان وزن تر کالوس (۱۹۷ میلی‌گرم) را در بین ارقام مورد مطالعه داشتند. بهترین کالوس‌زایی در ترکیب هورمونی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد. تجزیه واریانس داده‌ها برای تاثیر محیط کشت کالوس‌زایی به باززایی نشان داد که اثر هورمون کالوس‌زایی بر درصد باززایی در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار است. اثر رقم نیز در میزان باززایی اثر معنی‌دار داشت. بیشترین درصد باززایی و تعداد شاخه برای هر ریزنمونه از کالوس‌های حاصل از تیمار هورمونی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر Kin به همراه ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد. بیشترین درصد باززایی مربوط به رقم کاظمی ۷٤٪ و کمترین آن مربوط به رقم طارم ۱۰٪ بود. بیشترین شاخه‌زایی مربوط به رقم شفق با ٤/٤۱ شاخه به ازای هر کالوس و کمترین آن با یک شاخه مربوط به رقم طارم بود. در میان سه سویه LBA4404، EHA105، AGL-1 بکار گرفته شده با ناقل بیان گیاهی pCAMBIA1304 در تراریختی برنج، کالوس‌های تراریخته تنها با استفاده از سویه EHA105 بدست آمدند و بیان ژن gus را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم،
باززایی،
برنج،
تراریختی،
کالوس‌زایی

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.16.1]

مقدمه

برنج با نام علمی (*Oryza sativa*) پس از گندم، دومین غله‌ی مهم دنیا محسوب می‌شود (Walter et al. 2008). نزدیک به ۹۰ درصد سطح زیر کشت و تولید برنج متعلق به کشورهای آسیایی بوده و دانه‌ی برنج و فرآورده‌های آن تقریبا ۲۰ درصد غذای مردم دنیا را تشکیل می‌دهد، بنابراین بهبود تغذیه‌ای آن می‌تواند در کاهش خطر سوء تغذیه در این کشورها موثر باشد (and Bajaj 2005 Mohanty). لذا در کنار روش‌های مرسوم استفاده از روش‌های نوین بیوتکنولوژی برای افزایش عملکرد این محصول یک راهبرد معقول می‌باشد (Hoque et al. 2007). کشت بافت یکی از ابزارهای ضروری در مهندسی ژنتیک گیاهی و سایر برنامه‌های اصلاحی می‌باشد. انتخاب ارقام برنج با توانایی باززایی بالا یکی از نیازهای اولیه برای پیشبرد اهداف بیوتکنولوژی دراصلاح برنج است (Takeuchi et al. 1997).

با توجه به اهمیت دست‌ورزی‌های ژنتیکی در برنج بهینه‌سازی کشت کالوس‌های جنین‌زا و باززایی گیاهچه از این کالوس‌های جنین‌زا نقش حیاتی در موفقیت برنامه‌های تراریختی این گیاه دارد (Datta et al. 1992). گزارش‌های متعددی در مورد موفقیت باززایی برنج از ریزنمونه‌های مختلف از قبیل برگ (Ramesh et al. 2009)، جنین بالغ (Ramesh and Gupta 2006)، جنین نارس (Tariq et al. 2008)، کلئوپتیل (Saharan et al. 2004)، دمبرگ (Ramesh et al. 2009) و بساک (Asaduzzaman et al. 2003) وجود دارد. هورمون اکسین به تنهایی و یا در ترکیب با سیتوکینین برای القای کالوس در گیاه برنج استفاده می‌شود (Kumar et al. 2010).

اغلب 2,4-D به میزان ۲ تا ۳ میلی‌گرم در لیتر به عنوان تنظیم کننده رشد برای القای کالوس در برنج توصیه شده است (Kumar et al. 2010). استفاده از 2,4-D به تنهایی و بدون ترکیب با Kin به طور معمول کالوس‌های جنینی کمتری را نسبت به محیط تکمیل شده با Kin تولید کرد (Takeuchi et al. 1997). در مطالعه‌ای القای کالوس از ریزنمونه‌های جنین بالغ در محیط کشت MS تکمیل شده با پرولین و در غلظت‌های مختلف 2,4-D و Kin مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه بالاترین میزان کالوس‌زایی (٤٤/٤ درصد) در غلظت هورمونی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بدست آمد (Takeuchi et al. 1997). ترکیب اکسین و سیتوکنین همراه با اثر نمک‌های ماکرو نقش مهمی در باززایی گیاهان ایفا می‌کنند (Lee et al. 2000). در مطالعه‌ای باززایی کامل گیاه از کالوس‌ها در محیط کشت MS تکمیل شده با دو ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد به صورت NAA و BAP مورد بررسی قرار گرفت و بهترین باززایی مربوط به ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بود (Hussain et al. 2010). نتایج این آزمایش با تحقیقات آگاروال و همکارانش (Agrawal et al. 2006) همخوانی داشت.

بهینه‌سازی عوامل مؤثر در القای کالوس و تراریختی گیاهان، ازجمله برنج، اولین قدم در بهره‌برداری از کشت درون‌شیشه‌ای در اصلاح این گیاه می‌باشد. با توسعه سویه‌های آگروباکتریوم مستعدتر برای آلوده‌سازی گیاهان تک لپه، تراریختی برنج با استفاده از باکتری آگروباکتریوم یک امر عادی تبدیل شده است (Hiei et al., 2008). موفقیت این روش در انتقال ژن به گیاه به ژنوتیپ و گونه گیاهی، نوع و سن ریزنمونه، نوع ناقل استفاده شده برای انتقال ژن، سویه‌ی آگروباکتریوم و غلظت آن، مراحل و عمل آلودگی با باکتری شامل مدت زمان تلقیح، مناسب بودن محیط هم‌کشتی به خصوص از لحاظ دمایی و pH وابسته است (Dai et al., 2001).

در این پژوهش، اثر غلظت های متفاوت Kin و 2,4-D بر کالوس‌زایی و باززایی چهار رقم برنج شامل کاظمی، هاشمی، شفق و طارم و نیز اثر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم در تراریختی برنج ایرانی با استفاده از جنین بالغ، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

بذور ارقام کاظمی، هاشمی، شفق و طارم از موسسه تحقیقات برنج کشور تهیه شد. بعد از جدا کردن پوسته‌ی بذور، بذوری که ظاهر سالمی داشتند برای ضدعفونی و کشت انتخاب شدند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.16.1]

ضدعفونی با قرار دادن بذور در الکل ۷۰ درصد به مدت ۹۰ ثانیه و سپس شستشوی بذور با شناور ساختن آن‌ها در آب مقطر استریل آغاز شد. سپس بذور در زیر محفظه‌ی استریل با هود لامینار در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد حجمی به ۱۰۰× دقیقه قرار داده شدند. در مرحله‌ی آخر این بذور سه بار به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده ۱۰۰× بذور ضدعفونی شده روی کاغذ صافی استریل قرار داده شد تا آب سطحی آنها کاملا خشک شود. بذور به طور مستقیم روی محیط کشت MS تکمیل شده با ترکیبات مختلف از 2,4-D (غلظت‌های ۳ و ۲/۵، ۲، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و Kin (غلظت‌های ۰/۸ و ۰/٤، ۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت داده شدند. در هر پتری‌دیش که حاوی ٤۰ سی‌سی از محیط کشت بود، تعداد ۱۲ بذر کشت گردید. سپس درب پتری‌دیش‌ها با پارافیلم بسته شد. نمونه‌ها جهت کالوس‌زایی در شرایط تاریکی و در دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ روز قرار داده شدند. بعد از یک ماه کالوس‌های تولید شده جهت رشد و تکثیر به محیط کشت مشابهی واکشت شد. بعد از دو ماه کالوس‌ها و درصد کالوس زایی ریزنمونه‌ها برای تمام تیمارها یادداشت گردید و به محیط کشت باززایی منتقل شدند. محیط کشت استفاده شده برای باززایی، محیط پایه MS تکمیل شده با ۳ درصد ساکاروز، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. بعد از قرار دادن کالوس‌ها در محیط باززایی، نمونه‌ها به محیط روشنایی به صورت ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۱±۲۵ قرار گرفتند. پس از باززایی کالوس‌ها، درصد باززایی و سپس میزان شاخه‌زایی تحت تنظیم‌کننده رشد Kin محاسبه شد. با توجه به ریشه دار شدن گیاهچه‌ها در محیط باززایی، نیازی به انتقال آنها به محیط کشت ریشه‌زایی نبود و مستقیما به خاک منتقل شدند. درصد کالوس‌زایی ارقام مختلف برنج، در قالب فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی با سه عامل در سه تکرار انجام گردید. فاکتور اول شامل ارقام (کاظمی، هاشمی ، شفق و طارم) و فاکتور دوم ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی بود. برای بررسی درصد باززایی ارقام نیز درصد باززایی محاسبه و پس از باززایی تعداد شاخه‌ها باززایی شده برای هر ریزنمونه شمارش شد.

درصد کالوس‌زایی با استفاده از رابطه‌ی ۱ و درصد باززایی با رابطه ۲ محاسبه گردید.

$$\text{درصد کالوس‌زایی} = \frac{\text{تعداد کالوس‌های تولید شده}}{\text{تعداد بذر های کشت شده}} \quad (۱$$

$$\text{درصد باززایی} = \frac{\text{تعداد کالوس های باززایی شده}}{\text{تعداد کالوس های انتقال شده}} \quad (۲$$

به دلیل اینکه داده های درصد کالوس‌زایی با هیچ روشی نرمال نشدند، به همین خاطر از آزمون غیرپارامتری Kruskal- Wallis برای آنالیز آن‌ها استفاده شد. ولی وزن تر کالوس‌ها نرمال بوده و با توجه به معنی‌داری اثر متقابل ژنوتیپ و ترکیبات تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ترکیبات تیماری مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های حاصل برای درصد باززایی و شاخه‌زایی ابتدا با روش نرمال شدند و سپس با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند.

به منظور بدست آوردن مناسب‌ترین سویه باکتری، سه سویه LBA4404، EHA105، AGL-1 اگروباکتریوم با ناقل بیان گیاهی pCAMBIA1304 حاوی ژن *GUS* تراریخت شد. **تأیید** مولکولی تراریختی اگروباکتریوم با پلاسمید نوترکیب با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، صورت گرفت.

پس از تایید مولکولی باکتری‌های تراریخت، کالوس‌های جنین‌زای ۲۱ روزه، تحت شرایط استریل به مدت ۲ دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور شدند. سپس ریزنمونه‌ها از سوسپانسیون باکتری خارج و روی کاغذ واتمن استریل بطور نسبی خشک شدند. سپس به مدت ٤۸ ساعت برای هم‌کشتی در محیط MS جامد بدون تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و آنتی‌بیوتیک و دارای استوسرینگون ۱۰۰ میلی مولار قرار گرفتند. پس از سپری شدن مدت زمان لازم برای هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها در محیط MS مایع حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین شستشو داده شدند و پس از خشک شدن روی کاغذ واتمن استریل، در محیط MS جامد دارای ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین واکشت شدند. به

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.16.1]

تعداد پنجاه کالوس جنین زای رقم شفق رشد یافته در محیط کشت تکمیل شده با ۲/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۸ میلی گرم در لیتر Kin در پنج تکرار (ده کالوس در یک پتریدیش) برای تراریختی با هر کدام از سویه ها انتخاب شدند. نمونه‌ها در پایان هر ۱۵ روز در همان محیط کشت واکشت شدند و در نهایت کالوس‌های رشد یافته به منظور بررسی هیستوشیمیایی کالوس‌های تراریخته با محلول X-gluc رنگ‌آمیزی شدند. به این منظور ۱۰ میلی‌گرم از پودر X-gluc در متیل فورمامید حل گردید و محلول حاصل به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات اضافه شد. تمامی کشت‌ها در اتاق رشد با دمای ۲±۲۷ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط تاریکی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

کالوس زایی

بذور بالغ ارقام هاشمی، کاظمی، شفق و طارم پس از گذشت یک هفته از زمان کشت در محیط کشت MS حاوی ترکیبات مختلف 2،4–D (۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳) میلی‌گرم در لیتر و Kin (۰، ۰/٤ و ۰/۸) میلی‌گرم در لیتر شروع به تولید کالوس نمودند و کالوس‌های تولید شده پس از یک ماه از بخش باقی مانده بذر و کلئوپتیل رشد کرده جدا شده و به محیط جدید با همان ترکیب منتقل شدند. فقط اثر رقم طارم در سطح احتمال ۰/۰۵ بر روی درصد کالوس‌زایی با سایر ارقام تفاوت معنی‌داری داشت. رقم کاظمی با هاشمی تفاوت معنی‌داری در درصد کالوس‌زایی نداشتند. درصد کالوس‌زایی رقم کاظمی در مقایسه با رقم‌های هاشمی و شفق در سطح احتمال ۰/۰۱ تفاوت معنی‌داری نشان داد. همچنین رقم شفق و هاشمی با طارم در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار شدند. پس از محاسبه درصد کالوس‌زایی، کالوس‌ها در محیط جدید با همان ترکیبات واکشت گردیدند. پس از گذشت یک ماه دیگر وزن ترکالوس‌ها یادداشت گردید. تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثرات رقم، Kin و 2،٤–D در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار بود و در بین اثرات متقابل آنها فقط اثر متقابل رقم و Kinدر سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار بود. با توجه به جدول تجزیه واریانس وزن ترکالوس‌ها به صورت معنی‌داری تحت تاثیر ژنوتیپ، تیمار تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و اثرات متقابل آنها بود (جدول۱). رقم طارم با ۹۹ درصد کالوس‌زایی دارای درصد کالوس‌زایی بیشتری بود و ارقام هاشمی و شفق تفاوت معنی‌داری با هم نداشته و درصد کالوس‌زایی تقریبا یکسانی (٪۹۷) داشتند و کمترین میزان درصد کالوس‌زایی مربوط به رقم کاظمی بود (شکل ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه (مطالعه اثر تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر روی کالوس‌زایی و باززایی برنج)

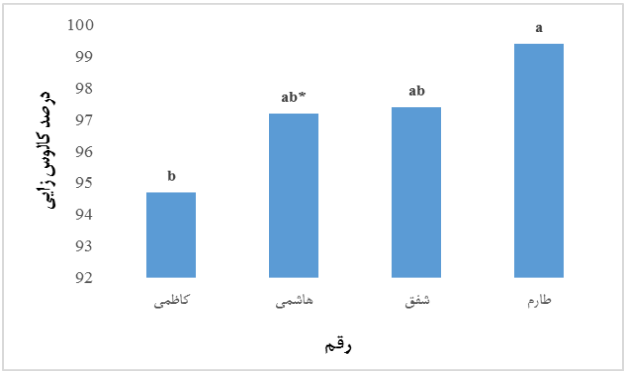
Table 1. The variance analysis of studied traits (study of the effect of plant growth regulatory treatments on callus formation and regeneration of rice)

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		وزن تر کالوس‌ها	متوسط تعداد شاخه‌زایی در کالوس‌ها	درصد باززایی از کالوس‌ها
رقم	۳	۱۰۰**	۹۶/۹**	۲۸۶**
2,4-D	۳	۸۰۷**	۸/۲۷**	۸۱۳**
Kin	۲	۵۴۳**	۱۰۷**	۴۸۶*
2,4-D × Kin	۶	۸۹۰^{ns}	۱۰/۱**	۱۰۳*
رقم × 2,4-D	۹	۱۱۲^{ns}	۲/۷۲**	۴۷۷^{ns}
رقم × Kin	۶	۸۹۸**	۷/۶۴**	۱۲۰*
رقم × 2,4-D × Kin	۱۸	۱۷۸^{ns}	۲/۹۹**	۵۶۴**
خطای آزمایش	۹۶	۱۱۷	۰/۶۹۷	۳۴۷
ضریب تغییرات (٪)		۴/۲	۰/۲۸	۰/۴۵۶

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۱ و۰/۰۵ و ns غیر معنی‌دار W/C

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.16.1]

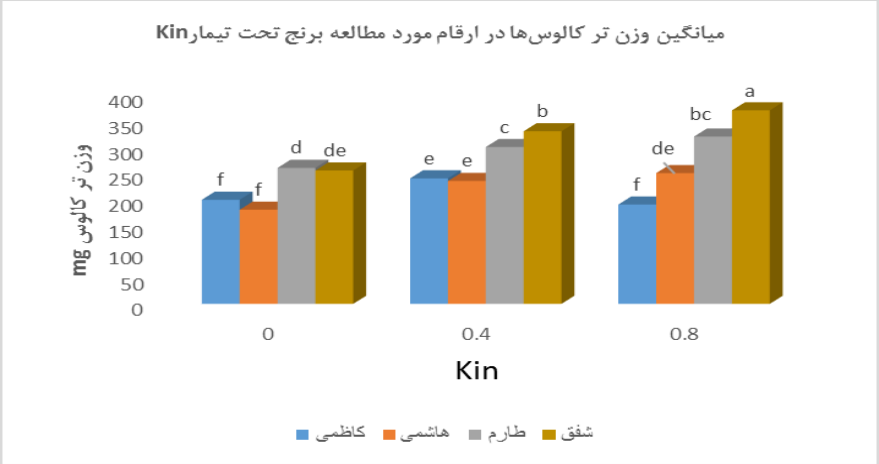


شکل ۱- درصد کالوس‌زایی ارقام مختلف برنج

Figure 1. The percentage of callus formation of different rice cultivars

*حروف مشابه نشانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ می‌باشد.

نتایج تجزیه واریانس برای صفت وزن ترکالوس‌ها نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها و سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشدی و اثر متقابل ژنوتیپ و تیمار تنظیم کننده‌های رشدی در سطح احتمال ۰/۰۱ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بیشترین میزان میانگین وزن تر کالوس مربوط به رقم شفق ۳۱۲ میلی‌گرم و کمترین میزان میانگین وزن تر کالوس مربوط به رقم کاظمی ۱۹۷ میلی‌گرم بود (شکل۲). در سطوح مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی Kin بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به ترکیب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر Kin به میزان ۲۷٦ میلی‌گرم و کمترین میزان وزن ترکالوس مربوط به ترکیب فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی Kin، ۲۱۳ میلی‌گرم بود (شکل۲). بالاترین میزان وزن کالوس را به ترتیب ارقام شفق، هاشمی و کاظمی در محیط حاوی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر Kin و رقم کاظمی در محیط حاوی ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر Kin تولید کردند (شکل ۲).



شکل۲- میانگین وزن تر کالوس‌ها در ارقام مورد مطالعه برنج تحت تیمار Kin (میلی‌گرم در لیتر)

Figure 2. Mean fresh weight of calluses in studied rice cultivars under Kin treatment

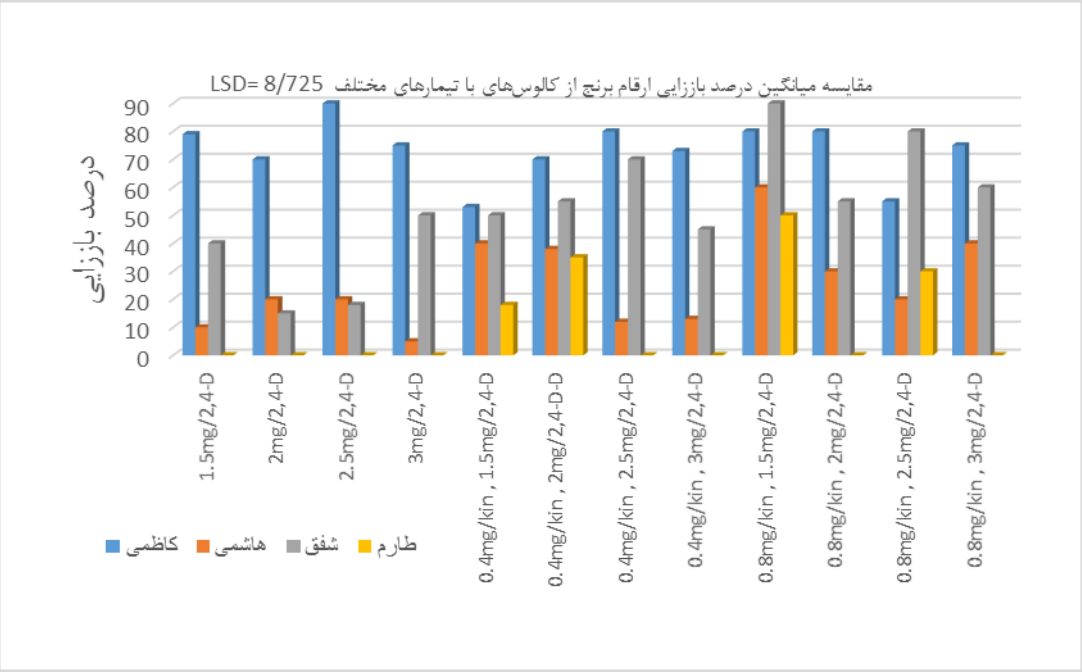
شکل ۳- مقایسه میانگین وزن تر کالوس‌ها در سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی2,4-D (میلی‌گرم در لیتر)

Figure 3. Comparison of the average fresh weight of callus at different levels of plant growth regulator 2,4-D

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.16.1]

مشاهده شد که رقم کاظمی در سطوح صفر و ۰/۸ میلی گرم Kin و همچنین رقم هاشمی در تیمارهای فاقد Kin وزن تر کالوس کمتری را تولید کردند و رقم شفق در تیمارهای حاوی ۰/۸ میلی-گرم بیشترین میزان وزن تر کالوس را موجب شد (شکل ۲).

در ارقام شفق، هاشمی و طارم با افزایش سطح تنظیم کننده رشد گیاهی Kin محیط القای کالوس از صفر به ۰/٤ و از ۰/٤ به ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر نیز افزایش معنی‌داری در میزان درصد باززایی دیده شد. ولی در رقم کاظمی بین سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشدی Kin محیط القای کالوس اختلاف معنی‌داری از نظر باززایی وجود نداشت می‌توان گفت که کاظمی از نظر ژنوتیپ دارای درصد باززایی بالایی می‌باشد (شکل٤). در این مطالعه از نظر مورفولوژی دو نوع کالوس تولید شدند، یک نوع بعنوان کالوس‌های جنین‌زا دارای رنگ زرد مایل به سفید، گره‌دار، خشک، شکننده و فشرده بودند (شکل٦- ب) اما گروه دوم کالوس‌های با رنگ زرد مایل به قهوه‌ای، آبدار، لزج و سطح صاف بودند که جنین‌زا نبودند(شکل ٦- ج). در این آزمایش رقم شفق بیشترکالوس‌های جنینی تولید کردند و در مقایسه با سایر ارقام خیلی کمتر و دیرتر فنوله شدند. علاوه بر این رشد کلئوپتیل در این رقم کمتر از سایر ارقام بود. در رقم کاظمی کالوس‌های جنینی و کالوس‌های غیرجنینی هر دو حاصل شدند. در این رقم ابتدا کالوس‌های غیرجنینی تولید شد و کالوس‌های جنینی از کالوس‌های غیرجنینی به حالت گره‌دار، خشک و فشرده بعد از مدتی حاصل شدند که آنها نیز به راحتی باززا می‌شدند. چنانچه کالوسی قادر به باززا شدن نبود سریعاً فنوله شده و از بین می‌رفت (شکل٦- ب). ارقام طارم و هاشمی کالوس‌های غیرجنینی تولید کردند همانطوریکه در شکل (٦- ب) ملاحظه می‌گردد این دو رقم کالوس‌هایی با مورفولوژی متفاوت تولید کردند.کالوس‌های رقم هاشمی دارای رنگ سفید، سطح صاف، آبکی و لزج بود ولی کالوس‌های رقم طارم به رنگ زرد مایل به قهوه‌ای، ترد، آبدار و لزج بودند (شکل٦- ج).



شکل ٤- مقایسه میانگین درصد باززایی ارقام برنج از کالوس‌های با تیمارهای مختلف

Figure 4. Comparison of the average percentage of regeneration of rice cultivars from callus with different treatments LSD = 8/725

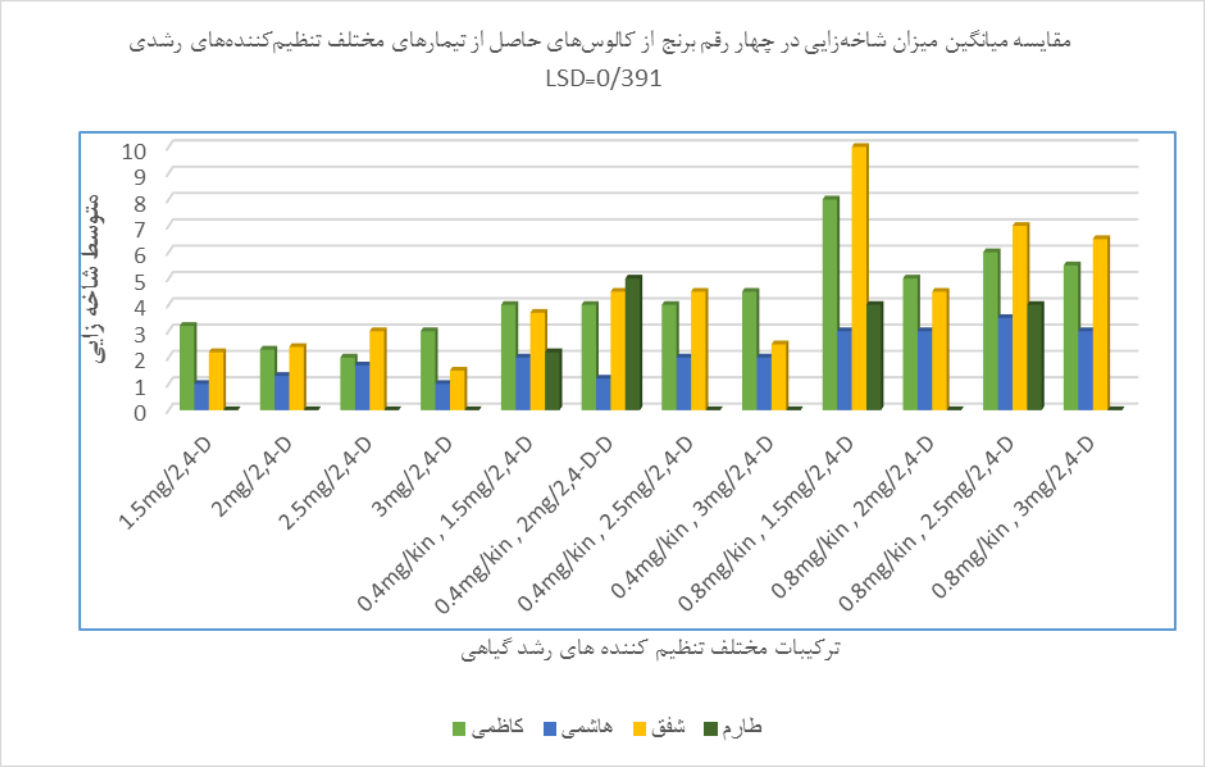
باززایی

براساس تجزیه واریانس اثرات رقم، ۲،٤-D و Kin در سطح احتمال ۰/۰۵ برای درصد باززایی معنی‌دار بودند و اثرات متقابل رقم و Kin و اثرات متقابل ۲،٤-D و Kin در سطح ۰/۰۱ درصد برای درصد باززایی معنی‌دار شدند، ولی اثرات متقابل رقم و ۲،٤-D معنی دار نشد. اثرات متقابل سه جانبه رقم، ۲،٤-D و Kin در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار گردید (جدول ۱). بین هورمون‌های

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.16.1]

محیط القای کالوس و ارقام مورد مطالعه درصد باززایی اثر متقابل وجود داشت. مقایسه میانگین تیمارها برای صفت باززایی نشان داد که رقم شفق در سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر D-۲،٤و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر Kin بیشترین میزان باززایی (۹۰ درصد) را داشت رقم طارم به جز در ٤ ترکیب تنظیم کننده‌های رشدی در بقیه تیمارها باززا نشد (شکل٤). رقم هاشمی در همه تیمارها با درصد پایینی باززا شد. رقم شفق اختلاف بسیار معنی داری در میزان باززایی بین سطوح مختلف Kin نشان داد.

هر چند درصد باززایی در طارم در اغلب تیمارها پایین بود ولی از نظر مرفولوژیکی و توانایی بالای رشد گیاهچه‌های باززا شده بهترین گیاهچه‌ها را تولید کرد. بطوریکه گیاهان حاصل ریشه‌های فراوان و سرعت رشد زیادی داشتند و پس از آن به ترتیب رقم‌های کاظمی و شفق گیاهچه‌های خوبی را تولید کردند ولی رقم هاشمی گیاهچه‌های نسبتا ضعیفی بوجود آورد.



شکل ۵- مقایسه میانگین میزان شاخه‌زایی در چهار رقم برنج از کالوس‌های حاصل از تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی

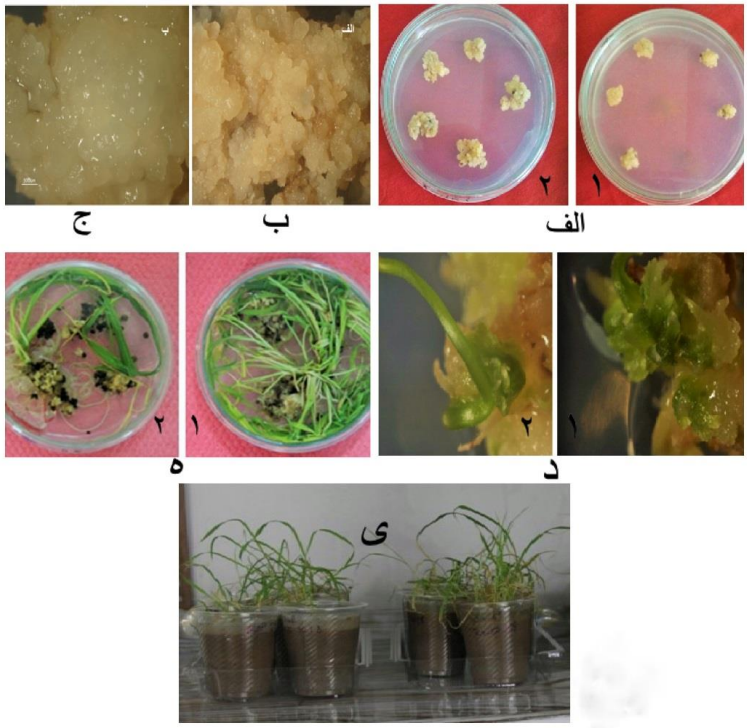
Figure 5. Comparison of the average rate of shooting in four rice cultivars from calluses from different treatments of growth regulators LSD=0.391

شاخه‌زایی

رقم، Kin و D-۲،٤ و اثرات متقابل آنها در سطح ۰/۰۵ درصد صفت شاخه‌زایی اثرات معنی‌دار داشتند (جدول۱). مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از روش دانکن نشان داد که بیشترین میزان شاخه‌زایی مربوط به رقم شفق با ٤/٤۱ شاخه به ازای هر کالوس و کمترین میزان شاخه‌زایی با ۱/۲ شاخه به ازای هر کالوس مربوط به رقم طارم بود. بیشترین تعداد شاخه به ازای هر ریزنمونه مربوط به کالوس‌های حاصل از تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌همراه ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر D-۲،٤ با میانگین ٦/۳۱ شاخه بود. کمترین میزان تولید شاخه مربوط به تیمار تنظیم کننده‌های رشد گیاهی محیط القای کالوس ۳ میلی‌گرم در لیتر D-۲،٤ با میانگین ۱/٤۱ شاخه بود (شکل٦-د). از همان ابتدا که کالوس‌ها شروع به باززایی نمودند تاثیر Kin در شاخه‌زایی واضح بود به طوریکه کالوس شکل گرفته در محیط فاقد Kin دارای شاخه کم و کالوس شکل گرفته در محیط حاوی Kinدارای شاخه های زیادی بود.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.16.1]

سرعت رشد گیاهچه ها براساس رقم و تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی کالوس‌زایی متفاوت بود. سرعت رشد گیاهچه در رقم طارم بهتر از سایر ارقام بود و گیاهچه‌های رقم هاشمی سرعت رشد کمتری را داشت. کالوس‌های حاصل از تیمار تنظیم‌کننده رشد گیاهی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر Kin به همراه ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ۲،٤-D از سرعت باززایی و رشد بیشتری نسبت به سایر تیمارها برخوردار بودند. بالاترین میزان شاخه‌زایی مربوط به رقم شفق در ترکیب تنظیم کننده رشد گیاهی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر Kin و به همراه ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بود (شکل٦- ه).



شکل ٦- الف) مقایسه کالوس‌زایی در محیط MS تکمیل شده با ۲/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۸ میلی گرم در لیتر Kin در دو رقم ۱- رقم کاظمی ۲-رقم شفق ب) مقایسه تولید کالوس‌های جنینی در محیط MS تکمیل شده با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر Kin: در رقم شفق ج) کالوس‌های غیرجنینی در محیط MS تکمیل شده با ۱/۵ میلی-گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر Kin در رقم هاشمی د) شاخه‌زایی از کالوس‌ها: ۱- کالوس‌های حاصل از محیط کشت حاوی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۲- کالوس‌های حاصل از محیط کشت فاقد Kin ه) تاثیر Kin در محیط القای کالوس بر شاخه‌زایی برنج ۱- شاخه‌زایی کالوس‌های حاصل از محیط کشت حاوی Kin ۲- شاخه‌زایی کالوس‌های حاصل از محیط کشت فاقد Kin ی) استقرار گیاهچه‌های حاصل از کالوس در محیط خاک

Figure 6. a) Comparison of callus formation in MS medium supplemented with 2.5 mg / l 2,4-D and 0.8 mg / l Kin in two cultivars 1- Kazemi cultivar 2- Shafaq cultivar, b) Comparison of embryonic callus production in MS medium supplemented with 1.5 mg / l 2,4-D and 0.8 mg / l Kin: in Shafaq cultivar, c) Non-embryonic calli in MS medium supplemented with 1.5 mg / l 2,4-D and 0.8 mg / l Kin in Hashemi cultivar, d) Shooting of calluses: 1- Calluses from culture medium containing 0.8 mg / l Kin and 2- Calluses from culture medium without Kin, e) The effect of Kin in callus induction medium on shooting of rice 1- shooting of calluses from culture medium containing Kin 2- shooting of calluses from culture medium without Kin, f) Establishment of callus plantlet in soil

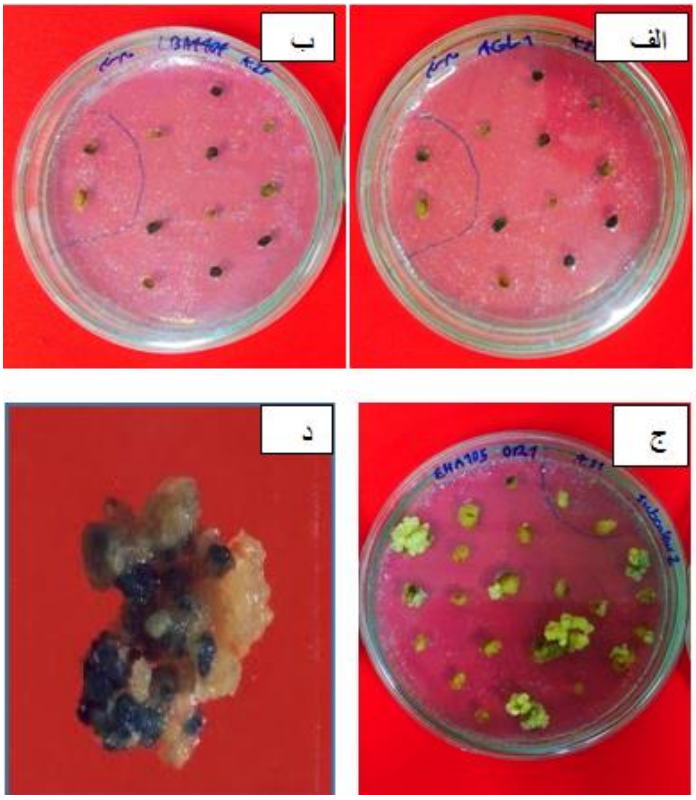
میزان شاخه‌زایی از کالوس‌های حاصل از سطوح مختلف Kin و در ارقام مختلف متفاوت بود و در حالت کلی سطح دارای تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی Kin اثر معنی‌داری در میزان شاخه‌زایی داشت بطوریکه با افزایش سطح Kin از صفر به ۰/٤ و از ۰/٤ به ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر شاخه‌زایی نیز به مقدار قابل توجهی افزایش یافت. بجز رقم هاشمی که بین سطوح صفر و ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر Kin تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. ارقام نیز در سطوح مختلف Kin از لحاظ میزان شاخه‌زایی تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. بالاترین میزان شاخه‌زایی در رقم شفق در ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر Kin و به همراه ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ۲،٤-D حاصل شد (شکل٦- د و ۵).

از آنجا که گیاهچه‌های بدست آمده دارای ریشه‌های خوبی بودند بدون انتقال به محیط ریشه‌زایی مستقیما به خاک انتقال داده شدند

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.16.1]

و ۱۰۰ درصد گیاهان منتقل شده توانستند بدون آسیب به رشد خود در خاک ادامه دهند (شکل٦-ی).

در آزمایش دوم، اثر سویه اگروباکتریوم در تراریزش کالوس‌ها مورد بررسی قرار گرفت و در بررسی اثر سویه بر تراریختی کالوس‌های برنج، مشاهده شد که از میان کالوس‌هایی که با سه سویه اگروباکتریومEHA105, LBA4404, AGL1 تلقیح شده بودند، تنها کالوس‌های سویه EHA105 قادر به رشد در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک بود و در مجموع سه تکرار تعداد ۲۰ ریزنمونه رشد کالوسی داشتند (شکل ۷-الف، ب، ج) و رنگ آمیزی برای بیان ژن گاس بیان ژن گاس را در کالوس های تراریخت نشان داد (شکل ۷-د).



شکل ۷- الف) نکروزه شدن کالوس‌های جنین‌زای برنج در تلقیح با سویه AGL-1(الف) و LBA4404 (ب) و تراریختی کالوس‌ها و ادامه رشد کالوس‌ها در تلقیح با سویه EHA105 ، د) کالوس‌های رنگ آمیزی شده با محلول رنگ آمیزی X-gluc

Figure 7. a) Necrosis of embryonic calluses of rice in inoculation with AGL-1 strain, b) And LBA4404, c) And transgenic calluses and continued callus growth in EHA105 inoculation, d) Calluses stained with X-gluc staining solution

نتایج حاصل از این مطالعه روی ٤ رقم برنج و سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف، حاکی از اهمیت و تاثیر ژنوتیپ، غلظت تنظیم کننده‌های رشدی و اثر متقابل آن‌ها در کالوس‌زایی و باززایی گیاه برنج می‌باشد. نتایج این تحقیقات با نتایج کارهای هوگ و همکاران مطابقت دارد به طوری که آنها نیز در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که توانایی باززایی گیاه از کالوس بستگی به ژنوتیپ و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشدی محیط القای کالوس دارد (Hoque and Mansfield 2004). گزارش‌های متعددی حاکی از تاثیر عوامل مختلف از جمله ژنوتیپ و نوع محیط در باززایی گیاه است (Htwe et al. 2011). مطالعات متعددی ثابت کرده اند که افزودن ۲،٤-D در محیط کشت باعث القای تشکیل کالوس از بذر برنج می شود (Thadavong et al. 2002). با این حال، غلظت مناسب ۲،٤-D برای القای کالوس به منبع ریزنمونه و ژنوتیپ برنج بستگی دارد (Raina 1989).

میزان کالوس‌زایی ارقام در این آزمایش بسته به رقم، نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی متفاوت بود که با نتایج سایر محققین مطابقت داشت (Zaidi et al. 2006). در مطالعه‌ای برای القای

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.16.1]

کالوس از ریز نمونه‌های جنین بالغ در محیط کشت MS تکمیل شده با غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی۲،٤-D و Kin، بالاترین میزان کالوس‌زایی از محیط دارای ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر ۲،٤-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin بدست آمد (Takeuchi et al. 1997). خانا و رینا اثر متقابل ژنوتیپ و محیط کشت را جهت کالوس‌زایی و باززایی مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند که کالوس‌زایی و باززایی گیاه از طریق عامل‌های ژنتیکی کنترل می‌شود. گزارش‌های فراوانی از کنترل کالوس‌زایی و باززایی گیاه در ارقام مختلف از طریق ژنوتیپ وجود دارد (Khanna and Raina 1998).

نتایج مطالعه حاضر، با مطالعات پاندی و همکاران (Pandey et al. 1994)، تاداونگ و همکاران (Thadavong et al. 2002) و آبیارانت و همکاران (Abeyaratne et al. 2004) مقایسه شده است. نتایج نشان داد که غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر ۲،٤-D بیشترین میزان القای کالوس از بذر برنج را به دست می‌دهد. در تحقیقی دیگر حسین و همکاران (Hussain et al. 2010) دریافتند که در القای کالوس مربوط به سه رقم متفاوت برنج، میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر ۲،٤-D بیشترین کالوس‌زایی را دارد.

ترکیب اکسین و سایتوکنین معمولا برای باززایی گیاه از کالوس‌ها نیز در برخی واریته‌های برنج استفاده می‌شود (Rueb et al. 1994)، در این مطالعه نیز ترکیب ۲،٤-D و Kin به عنوان بهترین تیمار برای القای کالوس و باززایی به دست آمد. این نتایج با توجه به اهمیت وجود تنوع در اصلاح نباتات و گزارش‌های متعدد مبنی بر ایجاد تنوع سوماکلونال در اثر کشت بافت و باززایی گیاهچه از کالوس، پیشنهاد می‌شود تنوع سوماکلونال گیاهان باززایی شده با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی مورد بررسی و شناسایی قرار گیرد تا در صورت مفید بودن جهت اصلاح گیاه در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

در مطالعه‌ای، میزان القای کالوس از بذر برنج بیریس و باززایی آن بررسی شده است. نتایج نشان داده که بالاترین میزان کالوس‌زایی (۹۷٪) در محیط MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر ۲،٤-D بوده است. کالوس‌های ایجاد شده برای بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و Kin برای توانایی باززایی گیاه، مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که کالوس‌های موجود در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با یک میلی‌گرم در لیتر Kin باززایی موفقی داشتند (Libin et al. 2012).

القای کالوس و باززایی جنین بالغ در سه رقم برنج هندی مورد مطالعه قرار گرفتند. هر سه رقم دارای بیشترین فراوانی القای کالوس در محیط MS با دو میلی‌گرم در لیتر ٤،۲-D بودند. باززایی کالوس‌ها نیز با موفقیت انجام شد و به خاک منتقل شدند (Upadhyaya et al. 2015).

در آزمایش دوم، برای تأیید تراریختی کالوس‌ها مشاهده شد که سویه EHA105 برای انتقال ژن به این گیاه کارآتر است ولی اختلاف معنی داری بین دو سویه EHA105 و AGL1 وجود نداشت.

در آزمایشی که برای تراریختی برنج Indica رقم IR58025B با چهار سویه از آگروباکتریوم EHA105، EHA101، LBA404 و AGL1 انجام دادند؛ بیشترین کارایی تراریختی با سویه EHA105 حاصل شده است (Gui*et al*., 2016). از طرفی در آزمایشی که سویه‌های آگروباکتریوم LBA4404 (pTOK233)، LBA4404 (pIG121Hm) و EHA101 (pIG121Hm) برای بررسی میزان تراریختی جنین‌های نابالغ ارقام IR64 و IR72 مقایسه شدند، مشاهده شد که انتقال ژن با LBA4404 (pTOK233) بیشترین کارایی تراریختی را در برداشته است (Hiei and Komari, 2006).

منابع

Abeyaratne W, De Silva, Kumari and D. De Abeysiriwardena. 2004. Callus induction, plantlet regeneration and occurrence of somaclonal variation in somatic tissues of some indica rice varieties. Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture 6: 1-11.

Agrawal P, Gosal and Sidhu G. 2006. Sequential reduction of 2,4-D improves whole plant regeneration from long-term

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.16.1]

maintained calli in some indica cultivars of rice. Oryza 43: 10-18.

Bajaj S and Mohanty A. 2005. Recent advances in rice biotechnology—towards genetically superior transgenic rice. Plant Biotechnology Journal 3: 275-307.

Chen T, Lam and Chen S. 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured young inflorescences of Oryza sativa L. (rice). Plant cell, Tissue and Organ culture 4: 51-54.

Dai S, Zheng P, Marmey P, Zhang S, Tian W, Chen S, Beachy R, and Fauquet C. 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. Molecular Breeding 7: 25-33.

Datta S, Datta N, Soltanifar G, Donn and Potrykus I. 1992. Herbicide-resistant Indica rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplasts. Plant Molecular Biology 20: 619-629.

Heyser J, Dykes K, DeMott J and Nabors M. 1983. High frequency, long term regeneration of rice from callus culture. Plant Science Letters 29: 175-182.

Hoque M, Ali E and Karim H. 2007. Embryogenic callus induction and regeneration of elite Bangladeshi Indica rice cultivars. Plant Tissue Culture and Biotechnology 17: 65-70**.**

Hoque M, and Mansfield J. 2004. Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of Indica rice genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78: 217-223.

Htwe N, Maziah M, Ling H, Zaman F and Zain A. 2011. Responses of some selected Malaysian rice genotypes to callus induction under in vitro salt stress. African Journal of Biotechnology 10: 350-362.

Hussain Z, Khan M, Bano R, Rashid H and Chaudhry Z. 2010. Protocol optimization for efficient callus induction and regeneration in three Pakistani rice cultivars. Pakistan Journal of Biological Sciences 42: 879-882.

Karthikeyan A, Pandian S and Ramesh M. 2009. High frequency plant regeneration from embryogenic callus of a popular indica rice (*Oryza sativa L.*). Physiology and Molecular Biology of Plants 15: 365-371.

Khanna H, and Raina S. 1998. Genotype x culture media interaction effects on regeneration response of three indica rice cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52: 145-153.

Khush G. 1997. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. Plant molecular biology 35: 25-34.

Kumar V, Shriram V, Kishor P, Jawali N and Shitole M. 2010. Enhanced proline accumulation and salt stress tolerance of transgenic indica rice by over-expressing P5CSF129A gene. Plant Biotechnology Reports 4: 37-48.

Lee K, Jeon H and Kim M. 2002. Optimization of a mature embryo-based in vitro culture system for high-frequency somatic embryogenic callus induction and plant regeneration from japonica rice cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71: 237-244**.**

Libin A, King P, Ong K, Chubo J and Sipen P. 2012. Callus induction and plant regeneration of Sarawak rice (*Oryza sativa L.*) variety Biris. African Journal of Agricultural Research 7: 4260-4265.

Pandey S, Ramesh B and Gupta P. 1994. Study on effect of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa L.*). The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 54: 293-299.

Raina S. 1989. Tissue culture in rice improvement: Status and potential. In Advances in Agronomy. Academic Press 42: 339-398.

Ramesh M and Gupta A. 2006. Genetic transformation of embryogenic callus cultures of indica rice using particle bombardment and selection of stably transformed hygromycin resistant plants. Asian Journal of Microbiology Biotechnology and Environmental Sciences 8: 610-617.

Ramesh M, Murugiah V and Gupta A. 2009. Efficient in vitro plant regeneration via leaf base segments of indica rice (*Oryza sativa L.*). Indian Journal of Experimental Biology (IJEB) 47: 68-74.

Rueb S, Leneman M, Schilperoort R and Hensgens L. 1994. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa L.*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36: 259-264.

Shahnewaz S, Bari M, Siddique A and Rahman M. 2004. Effects of genotype on induction of callus and plant regeneration potential in vitro anther culture of rice (*Oryza sativa L.*). Pakistan Journal of Biological Sciences 7: 235-237.

Takamura T, Miyajima I and Matsuo E. 1995. Somatic embryogenesis of Cyclamen persicum Mill.'Anneke'from aseptic seedlings. Plant cell reports 15: 22-25.

Takeuchi Y, Abe T and Sasahara T. 1994. Genetic analysis of plant regeneration from seed-derived calli in rice (*Oryza sativa L.*). Crop science 37: 963-965.

Thadavong S, Sripichitt P, Wongyai W and Jompuk P. 2002. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of glutinous rice (*Oryza sativa L.*) cultivar TDK1. Kasetsart Journal 36: 334-344.

Upadhyaya G, Sen M and Roy A. 2015. In vitro callus induction and plant regeneration of rice (*Oryza sativa L.*) var.'Sita','Rupali'and 'Swarna Masuri'. Asian Journal of Plant Science and Research 5: 24-27.

Walter M, Marchezan E and Avila L. 2008. Rice: composition and nutritional characteristics. Science Rural 38: 1184-1192.

Wernicke W, Brettell R, Wakizuka T and Potrykus I. 1981. Adventitious embryoid and root formation from rice leaves. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 103: 361-365.

Yamada Y, Yang Z and Tang D. 1986. Plant regeneration from protoplast-derived callus of rice (*Oryza sativa L.*). Plant cell reports 5: 85-88.

Zaidi M, Narayanan M, Sardana R, Taga I, Postel S, Johns R ... and Altosaar I. 2006. Optimizing tissue culture media for efficient transformation of different indica rice genotypes. Agronomy Research 4: 563-575.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.16.1]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

Investigation on the effects of plant growth regulators and *Agrobacterium* strain on regeneration and transformation of some Iranian rice cultivars

Ebrahim Dorani*, Sanaz Hemmati Asl

Plant Biotechnology and Breeding Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
*Corresponding Author, Email: dorani@tabrizu.ac.ir

Abstract

Tissue culture is one of the most critical steps in genetic engineering and other breeding programs of plants. In this study, the effect of some factors in regeneration of four rice cultivars, including Hashemi, Kazemi, Tarom and Shafagh has been studied. In the first experiment the effect of 2,4-D at 4 levels (1.5, 2, 2.5 and 3 mg/l) combination with Kin at three levels (0, 0.4 and 0.8 mg/l) on callus induction and plant regeneration in rice cultivars were studied. After two months calli were transferred to MS medium supplemented with 30g sucrose containing 2.5 mg/l BAP. Analysis of variance showed that Shafagh and Kazemi give the highest and lowest callus respectively. The best callus was obtained in medium supplemented with 0.8 mg/l Kin and 2.5 mg/l of 2,4-D. Analysis of variance showed that plant growth regulators used in callus induction medium, significantly affected the regeneration of plants. Cultivar had a significant effect on the regeneration rate. The highest plant regeneration and number of shoots per explant were obtained from callus derived from medium containing 0.8 mg/l Kin and 1.5 mg/l of 2,4-D. The Kazemi gave the highest percentage (74 %) and Tarom gave the lowest percentage (10%). Among the three strains used for transformation of rice, transgenic callus was obtained only with strain EHA105.

Key words: Agrobacterium, Transgenic, Callus induction, Regeneration, Rice

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.16.1]