

طرح تحقیقاتی

۱- عنوان تحقیق :

تهیه لاینهای دبلد هاپلوئید گندم به منظور ایجاد ارقام پرمحصول مقاوم به فوزاریوم خوشه

۲- نوع طرح:

بنیادی کاربردی توسعه ای

۳- اجرا کنندگان:

۳-۱- مجری مسئول : رضا بزرگی پور

۳-۲- سایر مجریان: فرشاد بختیار- میترا سراج آذری - مجتبی وهابزاده

۳-۳- همکاران:

۴- تاریخ شروع و مدت اجرا: پاییز ۱۳۷۸ به مدت چهار سال

۵- محل اجرا: مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر - کرج

۶- هدف :

۱- استفاده از روش به نژادی هاپلوئید به منظور دستیابی به ارقام پرمحصول مقاوم به فوزاریوم

خوشه در گندم

۲- افزایش دقت و کارایی سلکسیون در برنامه به نژادی فوق

۷- چکیده:

استفاده از ارقام متحمل به بیماری بهترین روش کاهش خسارت می باشد و استفاده از روش اصلاحی هاپلوئیدی سریعترین راه جهت دستیابی به خلوص ژنتیکی مطلق می باشد. دو کراس F1 (F1 system) و دو کراس F3 (F3 system) به عنوان مواد اولیه جهت تولید لاینهای دبلدهالوئید استفاده می شوند. تولید هاپلوئید با استفاده از سیستم حذف کروموزومی از طریق تلاقی با ذرت انجام می گردد. با روش کشت جنین گیاهچه های هاپلوئید و متعاقباً گیاهان دبلدهالوئید گندم تولید خواهند شد واکنش آنها به بیماری فوزاریوم در شرایط گلخانه و مزرعه بررسی و لاینهای برتر انتخاب می شوند.

مراحل اجرای طرح:

سال اول: انجام کراسها و کشت مواد اولیه در آزمایشگاه و تولید گیاهان هاپلوئید و دو برابر کردن کروموزومها.

سال دوم: یک مرحله تکثیر و تولید لاینهای دبلدهالوئید و آزمایشات مشاهده ای گلخانه ای.

سال سوم: مزرعه ای جهت تعیین و انتخاب بهترین لاینها با توجه به عملکرد، مقاومت به فوزاریوم و سایر صفات مهم زراعی و آزمایشات گلخانه‌ای.

۸- توجیه اجرای طرح:

بیماری فوزاریومی خوشه گندم (*Fusarium head blight*) یکی از بیماریهای مهم گندم در مناطق مرطوب و نیمه مرطوب جهان بوده و پراکندگی وسیعی نیز در مناطق معتدله و گرمسیری جهان دارد. در ایران اسکب گندم در نواحی شمالی کشور گزارش شده است (بامدادیان و ترابی ۱۳۶۸) در چند سال اخیر این بیماری به غیر از مناطق شمالی، در شمال غربی و جنوب کشور یعنی دشت مغان و فارس حضور داشته است.

بجز خسارت های کمی این بیماری نظیر چروکیدگی بذر و کاهش عملکرد، خسارات کیفی نظیر کاهش قوه نامیه و آلودگی بذر به توکسین های تولید شده توسط قارچ از عوارض دیگر بیماری می باشند که برای سلامتی انسان نیز زیان آور می باشند.

استفاده از قارچ کش ها علاوه بر زیان های زیست محیطی ، تا کنون به طور کامل در کنترل این بیماری موفق نبوده اند. استفاده از منابع ژنتیکی مقاومت به بیماری فوزاریوم خوشه، بهترین روش کاهش خسارت می باشد و استفاده از روش اصلاحی هاپلوئیدی سریعترین راه جهت دستیابی به ارقام سازگار مقاوم به بیماری می باشد.

۹- سابقه تحقیق:

تولید هاپلوئید در گندم از روش های مختلف نظیر کشت پرچم، دانه گرده، حذف کروموزومی و غیره حاصل می گردد. یکی از بهترین روش های تولید هاپلوئید در گندم در حال حاضر روش حذف کروموزومی از طریق تلاقی با ذرت می باشد که در سال ۱۹۸۸ میلادی توسط دکتر لاری و بنت در انگلستان گزارش شد. مزایای روش هاپلوئیدی توسط اسنپ ۱۹۸۲ و بزرگی پور ۱۹۹۱ ارائه گردیده است. در ایران تولید هاپلوئید در گندم در قالب یک طرح تحقیقاتی (۷۱۶۳۴) در مؤسسه اصلاح بذر انجام پذیرفته است و نتایج آن در سومین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران - تبریز (شهریور ۱۳۷۳) گزارش شده است. تولید موفقیت آمیز لاینهای دبلد هاپلوئید گندم مقاومت به بیماری زنگ همراه با خصوصیات زراعی مطلوب در مؤسسه اصلاح بذر انجام گرفته طرح تحقیقاتی (۷۵۰۱۵) است و در حال حاضر مقایسه عملکرد لاینهای مذکور در حال اجرا می باشد. اولین بار بیماری فوزاریومی پوسیدگی خوشه گندم به وسیله Smith در سال ۱۸۸۴ میلادی گزارش گردید و او عامل این بیماری را قارچ *F. culmorum* تشخیص داد. در مطالعات اولیه بیماری

Atanosoff در سال ۱۹۲۴ میلادی گزارش داد که بیماری فوزاریوم در مناطق غله‌خیز آمریکا شایع است. این بیماری همچنین در انگلستان، روسیه، سوئد، فرانسه، ایتالیا، آلمان، استرالیا، سیسیل، هلند، نروژ، ژاپن، کانادا و برزیل گزارش شده است (Parry et al., 1995).

این بیماری از سالها قبل و به طور پراکنده در ایران وجود داشته (بامدادیان و ترابی، ۱۳۶۲) و یکی از بیماریهای مهم گندم به ویژه در گرگان و گنبد (گلزار ۱۳۷۲)، مازندران (فروتن ۱۳۷۲) و مغان (ملیحی پور ۱۳۷۵) به شمار می‌رود و خسارت محصول گاهی تا ۷۰٪ در مزارع گنده مورد محاسبه قرار گرفته است (فروتن ۱۳۷۲).

در ارتباط با ارزیابی ارقام متحمل در ایران (گلزار ۱۳۷۴) تعدادی از ارقام و لاینهای گندم دریافتی از خارج و داخل کشور را از نظر مقاومت به بیماری فوزاریومی خوشه مورد بررسی قرار داد و نتیجه گرفت که سه رقم چینی Wangshui-bai, Sumai 3, Ning 7840k مقاومت مطلوبی به این بیماری نشان می‌دهند و می‌توان در دورگ گیری به عنوان مقاومت از آنها استفاده کرد.

۱۰- روش تحقیق:

الف - تولید لاینهای دبلدهاپلوئید

بذور گندم حاصل از دو کراس در مرحله F1 و دو کراس در مرحله F3 که با اهداف انتقال مقاومت به ارقام سازگار ایجاد شده‌اند به عنوان مواد اولیه جهت تولید لاینهای دبلدهاپلوئید استفاده خواهند شد. گیاهان گندم و ذرت در گلخانه کشت شده و در زمان گلدهی گیاهان گندم عقیم و توسط دانه گرده ذرت بارور می‌شوند. گیاهان مذکور یک روز بعد از گرده افشانی توسط 2. 4-D 10 mg/l تزریق می‌شوند. ۱۴ الی ۱۸ روز بعد از تلقیح، بذور نارس از گیاهان مادر خارج و در آزمایشگاه استریلیزه شده و جنین های هاپلوئید از بذور مذکور خارج و در محیطهای B5, MS و Gamborgs کشت خواهند شد که منجر به ایجاد گیاهچه‌های هاپلوئید خواهد شد. زمانی که گیاهچه‌ها به حد مناسب رشد رسیدند از لوله های آزمایشگاهی خارج شده و در محیط کنترل شده حرارتی (20 ± 2 °C, 16 h/s light) در گلخانه‌های کوچک با رطوبت بالا انتقال می‌یابند. نهایتاً گیاهان دبلدهاپلوئید به داخل گلخانه انتقال می‌یابند و زمانی که به مرحله مناسب رشد (three tiller stage) رسیدند توسط کلچیسین (0.05% colchicine + 1.5% DMSO + 1 drop Tween 20) کروموزومهای آنها دو برابر می‌شود که باعث ایجاد گیاهان دبلدهاپلوئید (Doubled haploid) می‌گردد که زایا و هموزیگوت مطلق خواهند بود.

ب : ارزیابی مقاومت به بیماری

a: در شرایط گلخانه: پس از جمع آوری جدایه ها از خوشه های آلوده (طی بازدید از مزارع) و خالص سازی، یک میلی متر مربع از هر جدایه داخل محیط تکثیر آبی، کاه جهت تولید ماکروکبندی قرار می گیرد. ارلن ها روی شیکرهای افقی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و در تازاریکی قرار می گیرند. پس از چهار روز مخلوط درون ارلن ها به وسیله پارچه مملول استریل صاف می شود. به منظور شمارش ماکروکبندیها از لام Fuchs-Rosental استفاده می گردد. بطور معمول 40-100 ماکروکبندی در حجم معینی از سوسپانسیون (5µl) در نظر گرفته می شود. مایه زنی در مرحله گلدی و خروج پرچمها (anthesis) صورت می گیرد. پس از تزریق مایه تلقیح درون یکی از گلچه های خوشه، کل خوشه به کمک اسپری مرطوب می شود و داخل نایلونهای پلاستیکی به مدت ۷۲ ساعت قرار می گیرد. پس از سه روز علائم اولیه قابل رویت می باشد و پس از ۱۰ روز از جدول زیر جهت ارزیابی مقاومت استفاده به عمل می آید.

Scale	Response	%infection
0	Immune	0
1	Resistant	1-8
2	Moderately R.	9-11
3	Moderately susceptible	12-20
4	Susceptible	21-50
5	Very susceptible	>50

مقیاس ژاپنی جهت تخمین تعداد دانه های آلوده به *F. graminearum* تحت شرایط گلخانه ای .

Wheat special Report No. 216 CIMMYT. 1994.

b: در شرایط مزرعه:

در این روش ارقام انتخابی گندم در کرت های خزانه ای که به این منظور آماده شده است، کاشته می شوند. در ارتباط با بیماری FHB استفاده از سیستم Mist مناسب می باشد. در مرحله گلدهی و خروج پرچمها (anthesis) آلوده سازی به کمک سمپاش دستی صورت می گیرد. در این روش، مشابه روش گلخانه غلظت سوسپانسیون تهیه شده مشخص می باشد. ترجیحاً اسپورپاشی در ساعات خنک تر روز (غروب آفتاب) انجام می گیرد. یک ماه پس از مایه زنی (حداقل سه مرتبه مایه زنی در طول سه هفته) اول، ارزیابی ارقام صورت می گیرد.

ابتدا ۵۰ خوشه به صورت تصادفی از هر کرت انتخاب می شوند. سپس تعداد خوشه های آلوده تعیین می گردد. این تعداد شاخص Disease Incidence می باشد. جهت تعیین Disease Incidence خوشه هایی آلوده در هر خوشه ابتدا گلچه هایی که علائم بیماری را نشان میدهند شمارش می گردند.

در مرحله بعد بر اساس مقیاس ذیل با توجه به درصد آلودگی در هر خوشه اعداد ۰-۵ خوشه آلوده داده می شود.

0: خوشه کاملاً سالم است.

- 1: حدود 20٪ از خوشه چه هایی یک خوشه آلوده می باشند.
- 2: حدود 40٪ از خوشه چه هایی یک خوشه آلوده می باشند.
- 3: حدود 60٪ از خوشه چه هایی یک خوشه آلوده می باشند.
- 4: حدود 80٪ از خوشه چه هایی یک خوشه آلوده می باشند.
- 5: حدود 100٪ از خوشه چه هایی یک خوشه آلوده می باشند.

سپس جهت ارائه Disease Index تعداد خوشه ها در مقیاس مربوطه جذب شده و با یکدیگر جمع می شوند و بر تعداد کل خوشه ها تقسیم می شوند. به نظر دکتر راجرام و همکاران انتخاب و شمارش 0-5 خوشه از هر کرت کافی می باشد (مذاکرات شخصی در بازدید از مناطق آلوده شمال کشور) اما از آنجایی که انتخاب 50-100 خوشه مستند بوده و در ارائه گزارش مورد استفاده قرار می گیرد، ترجیحاً از روش استفاده به عمل می آید.

۱۱-۱- مراحل زمانی برای اجرای طرح و ارسال گزارش پیشرفت کار:

درصد مورد نیاز	**	مدت اجرای هر مرحله به ماه	درصد پیشرفت کار	توضیح هر مرحله	ترتیب مراحل
۴۰		۱۶	۵۰	انجام کراسها و کشت مواد اولیه در آزمایشگاه و تولید هاپلوئید و دو برابر کردن کروموزومها	۱
۲۵		۸	۲۰	یک مرحله تکثیر و تولید لاینهای دبلدها پلوئید و آزمایشات مشاهده ای مزرعه‌ای	۲
۲۵	×	۱۲	۳۰	آزمایشات مزرعه (خصوصیات زراعی و مقاومت و آزمایشات گلخانه)	۳

** لطفاً در این ستون با علامت × مراحل ارائه گزارش را تعیین نمایید:

۱۱-۲- نحوه ارائه نتایج طرح

گزارش نهایی × گزارش نهایی و مقاله ×

۱۲- منابع مورد استفاده:

- ۱- بامدادیان، ع- ترابی، م. ۱۳۶۲. بیماری های مهم گندم و جو و نحوه یادداشت از آنها. انتشارات مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، ایران. ۶۷ صفحه.
- ۲- بزرگی پور، رضا. ۱۳۷۳. استفاده از روش اصلاحی هاپلوئیدی در غلات. مقاله کلیدی سومین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران- تبریز
- ۳- بزرگی پور، رضا. ۱۳۷۳. تولید گیاهان هاپلوئید در گندم. مقاله اختصاصی سومین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران- تبریز. ۲۹۷.
- ۴- بزرگی پور، رضا. ۱۳۷۴. بررسی پتانسیل ژنوتیپ های گندم ایران برای تولید هاپلوئید از طریق حذف کروموزومی - گزارش پژوهشی. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر.
- ۵- فروتن، ع- رعیت پناه، س - ناطق، ز-رضانی- اسپهبدی نیا، ع. ۱۳۷۲. انتخاب مقدماتی ارقام و لاینهای متحمل گندم در مقابل فوزاریوم در مازندران. خلاصه مقالات کنگره گیاهپزشکی ایران-رشت.
- ۶- گلزار، ح. ۱۳۷۲. بررسی پراکنندگی فوزاریوم خوشه گندم در مازندران و گرگان و میزان حساسیت ارقام تجاری گندم. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران- رشت.
- ۷- گلزار، ح. ۱۳۷۴. معرفی چند منبع مقاومت به فوزاریوم خوشه گندم. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. آموزشکده کشاورزی کرج. ایران.
- ۸- ملیحی پور، ع. ۱۳۷۵. بررسی نقش چند عامل محیطی در توسعه بیماری بلایت فوزاریومی خوشه گندم در شرایط گلخانه ای و مزرعه ای. گزارش بیماریهای غلات، بخش تحقیقات غلات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر ۲۰۵-۱۹۷.
- 9-Bozorgipour, R. (1991) The use of in vitro Techniques for Crop Improvement in Cereals. Ph.D thesis the University of Cambridge.
- 10- Laurie, D.A. and Bennet, M.D. (1988). The production of haploids by wheat x maize crosses. Theor. Appl. Genet. 76, 393-395.
- 11-Laurie, D.A.(1998). Prersonal Communication.
- 12- Parry, D.W., Jen Kinson, P. and Mcleod, L. (1995). Fusarium ear light (Scab) in small grain cereals-a review Crop and Environment Research Center, Haper Adams Agricultural College, Shrophshire, TF 108 NB, U.K.

۱۳- مختصات اقلیمی و جغرافیایی در ارتباط با طرح

منطقه: کرج

۱۴-۳- هزینه مواد و لوازم مصرف نشدنی به تفکیک سالهای اجرای طرح:

نوع	تعداد یا مقدار	قیمت واحد	هزینه ها به ریال			
			سال جاری	سال دوم	سال سوم	سال چهارم
محیط های کشت B5	برای ۱۰ لیتر	۱۱۵۰۰	۱۱۵۰۰۰	-	-	۱۱۵۰۰۰
MS	برای ۱۰ لیتر	۷۰۰۰	۷۰۰۰۰	-	-	۷۰۰۰۰
کلچسین	۵ گرم	۱۰۰۰۰۰۰	۱۰۰۰۰۰۰	-	-	۱۰۰۰۰۰۰
خاک برگ	۱۰۰ بسته	۱۸۰۰	-	۹۰۰۰۰	۹۰۰۰۰	۱۸۰۰۰۰
ماسه	۲ متر مربع	۹۰۰۰۰	-	۴۵۰۰۰	۴۵۰۰۰	۹۰۰۰۰
محیط کشت PDA	۲ بسته	۳۶۰۰۰۰	-	۷۲۰۰۰۰	-	۷۲۰۰۰۰
الکن اینتیک ۹۶۰	۱۰ لیتر	۱۸۰۰۰	-	۹۰۰۰۰	۹۰۰۰۰	۱۸۰۰۰۰
لام شمارش هیدرومتر	۲ بسته	۳۰۰۰۰	-	۳۰۰۰۰	۳۰۰۰۰	۶۰۰۰۰
دستکش یکبار مصرف	۲ جعبه	۳۰۰۰۰	-	۳۰۰۰۰	۳۰۰۰۰	۶۰۰۰۰
جمع هزینه ها			۱۱۸۵۰۰۰	۱۰۰۵۰۰۰	۲۸۵۰۰۰	۲۴۷۵۰۰۰

۱۴-۴- هزینه لوازم مصرف نشدنی به تفکیک سالهای اجرای طرح:

نوع	تعداد یا مقدار	قیمت واحد	هزینه ها به ریال			
			سال جاری	سال دوم	سال سوم	سال چهارم
گلدان پلاستیکی	عدد ۵۰۰	۱۲۰۰	۲۴۰۰۰	۱۸۰۰۰	۱۸۰۰۰	۶۰۰۰۰
زیر گندانی	عدد ۵۰۰	۸۰۰	۱۶۰۰۰	۱۲۰۰۰	۱۲۰۰۰	۴۰۰۰۰
سرویس	عدد ۵۰۰	۴۵۰	۹۰۰۰۰	۶۷۵۰۰	۶۷۵۰۰	۲۲۵۰۰۰
میکروبیست 0.5-10	۱	۱۸۰۰۰۰۰	-	-	-	۱۸۰۰۰۰۰
میکروبیست 1-50	۱	۱۸۰۰۰۰۰	-	-	-	۱۸۰۰۰۰۰
میکروبیست 10-100	۱	۱۸۰۰۰۰۰	-	-	-	۱۸۰۰۰۰۰
میکروبیست 100-1000	۱	۱۸۰۰۰۰۰	-	-	-	۱۸۰۰۰۰۰
شیکر	۱	۸۰۰۰۰۰	-	-	-	۸۰۰۰۰۰۰
لامیناز فلو کابینت	۱	۱۵۰۰۰۰۰	-	-	-	۱۵۰۰۰۰۰
رطوبت سنج	۱	۱۰۰۰۰۰۰	-	-	-	۱۰۰۰۰۰۰
رنج ۲۵۰ cc	۲۰	۲۰۰۰۰	۳۰۶۲۰۰۰	۲۰۰۰۰	۲۰۰۰۰	۴۰۰۰۰
جمع هزینه ها			۳۰۶۲۰۰۰	۵۶۷۵۰۰	۱۵۶۲۷۵۰۰	۲۲۸۲۵۰۰۰

۱۴-۵- هزینه های مسافرت به تفکیک سال های اجرای طرح:

نام و نام خانوادگی	نوع مسئولیت	محل مسافرت	مدت مسافرت به روز	هزینه ها به ریال			
				سال جاری	سال دوم	سال سوم	سال چهارم
رضا بزرگی پور	مجری مسئول	گرگان	۱۰	۲۵۰۰۰۰	۲۵۰۰۰۰	۲۵۰۰۰۰	۲۵۰۰۰۰
مجتبی وهابزاده	مجری مسئول	گرگان	۱۰	۲۰۰۰۰۰	۲۰۰۰۰۰	۲۰۰۰۰۰	۲۰۰۰۰۰
مسترا سراج آفری	سایر مجریان	گرگان	۱۰	۲۰۰۰۰۰	۲۰۰۰۰۰	۲۰۰۰۰۰	۲۰۰۰۰۰
جمع هزینه ها				۶۵۰۰۰۰۰	۶۵۰۰۰۰۰	۶۵۰۰۰۰۰	۶۵۰۰۰۰۰

هزینه های انتشار	سال جاری	سال دوم	سال سوم	سال چهارم	جمع کل به ریال
عکس و اسلاید و تهیه گزارشات	۶۰۰۰۰۰	۶۰۰۰۰۰	۶۰۰۰۰۰		۱۸۰۰۰۰۰

۱۴-۷- هزینه ارائه مقالات	سال جاری	سال دوم	سال سوم	سال چهارم	جمع کل به ریال
		۳۰۰۰۰۰	۳۰۰۰۰۰		۶۰۰۰۰۰

۱۴-۸- جمع هزینه ها به تفکیک سال های اجرای طرح:

نوع هزینه	جمع هزینه ها به ریال				جمع کل
	سال جاری	سال دوم	سال سوم	سال چهارم	
هزینه پرسنلی	۶۰۰۰۰۰۰	۱۰۴۰۰۰۰۰	۱۳۶۰۰۰۰۰		۳۰۰۰۰۰۰۰
هزینه مواد و لوازم مصرف شدنی	۱۱۸۵۰۰۰	۱۰۰۰۰۰۰	۲۸۵۰۰۰۰		۲۴۷۵۰۰۰۰
هزینه مواد و لوازم مصرف نشدنی	۳۰۶۹۰۰۰۰۰	۵۶۷۵۰۰	۱۵۶۷۵۰۰		۳۲۸۲۵۰۰۰۰
هزینه مسافرت	۶۵۰۰۰۰	۶۵۰۰۰۰	۶۵۰۰۰۰		۱۹۵۰۰۰۰۰
هزینه انتشار	۶۰۰۰۰۰	۶۰۰۰۰۰	۶۰۰۰۰۰		۱۸۰۰۰۰۰۰
هزینه ارائه مقالات	-	۳۰۰۰۰۰	۳۰۰۰۰۰		۶۰۰۰۰۰۰
جمع کل هزینه	۳۶۷۲۵۰۰	۱۱۷۰۲۵۰۰	۱۶۱۰۲۵۰۰		۶۹۶۵۰۰۰۰