جهت تهیه فایل WORD 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 کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۲، سال ۱۳۸۴ (۳۳۹-۳۳۱)

کشت میکروسپور و تولید گیاهان هاپلوئید در ارقام مختلف کلزا (*Brassica napus*)

فتاح اصلانی[۱]، جواد مظفری[۲]، محمد رضا قنادها[۳] و احمد علی خواجه احمد عطاری[٤]
۱، عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میاندوآب ۲، ٤، استادیاران پژوهش،
مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج ۳، دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۱/۲٦

خلاصه

بمنظور بررسی امکان بکارگیری هاپلوئیدبریدینگ برای اصلاح کلزا در ایران، کشت میکروسپور بر روی ده رقم کلزا، انجام گردید. برای برداشت میکروسپور، ارقام مورد نظر طی دو آزمایش جداگانه، درچهارتاریخ کاشت متمادی در گلخانه کشت شدند. آزمایش اول در فصل تابستان با فتوپریود ۱٦/۸ ساعت (تاریکی/روشنایی) و دمای ۳۰/۲۵°C (شب/ روز) و آزمایش دوم در فصل پائیز با همان فتوپریود و دمای ۲۰/۱۵°C (شب/ روز) انجام گردید. میکروسپورها در مرحله مناسب تکوین (اواخر تک هسته‌ای تا اوایل دوهسته‌ای) و با تراکم کشت ۱۰۰/۰۰۰-۸۰/۰۰۰ میکروسپور در هر میلی‌لیتر بر روی محیط کشت مایع القاء جنین (NLN) و با غلظتهای مختلف ساکارز (۱۳۰g/l و ٦۵) کشت گردیدند. در آزمایش اول تحت این شرایط جنینی بدست نیامد. در آزمایش دوم تنها با تغییر دمای گلخانه‌ای که گیاهان مادری در آن کشت شده بودند رقم کلزای بهاره Quantum جنین هاپلوئید تولید نمود. از مجموع ٤۰ جنین بدست آمده تعداد نُه جنین پس از باززایی، به گیاهچه تبدیل شدند. بررسیهای سیتوژنتیکی نشان داد که در سه تای این گیاهان با مضاعف شدن خودبخودی کروموزومها، گیاهان دابل هاپلوئید حاصل شده است. نتایج این تحقیق حاکی از این است که علاوه بر ژنوتیپ گیاه، شرایط رشد گیاهان مادری عامل تعیین کننده‌ای در موفقیت آمیز بودن تکنیک کشت میکروسپور به‌شمار می‌آید. مشاهدات ما نشان داد که غلظت ساکارز در محیط کشت مایع القاء جنین (NLN) نیز حائز اهمیت بوده و میزان ۱۳۰g/l در این مطالعه مناسب تشخیص داده شد. بررسی اثر تیمار سرمادهی در باززایی جنین ها نیز نشان داد که یک تیمار سرمایی ٤ درجه سانتیگراد اثر کاملا معنی داری (در سطح ۱٪) بر روی افزایش باززائی جنین ها دارد در حالیکه اثر سن جنین در میزان باززایی معنی دار نبود.

واژه‌های کلیدی: دابل هاپلوئیدی، کشت میکروسپور، هاپلوئید بریدینگ، کلزا، *Brassica napus*

مقدمه

بیش از ۹۰٪ مصرف روغن خوراکی کشور از طریق واردات تأمین می‌گردد. گیاه کلزا (مهمترین گونه زراعی جنس *Brassica*) که بعد از سویا و نخل روغنی با تولید ۱۴/۷ درصد روغن‌نباتی، مقام سوم را در جهان دارد بعلت ویژگیهایی از قبیل قابلیت کشت در نقاط مختلف، درصد بالا و کیفیت مطلوب روغن بعنوان نقطه امیدی جهت تأمین روغن خام مورد نیاز کشور و رهایی از وابستگی در آمده است (۳). اما در حال حاضر سطح زیر کشت کلزا در کشور بسیار پایین است بطوریکه در سالهای ۷٦-۷۵ حدود ۱۰۵٦۰ هکتار گزارش شده است (۲). به همین لحاظ ایجاد واریته‌های مناسب کشت در شرایط مختلف کشورمان مهمترین پیش‌نیاز توسعه زراعت این محصول تلقی می‌گردد. سیستم هاپلوئید بریدینگ در این گیاه مدل موفقی از کاربرد بیوتکنولوژی در اصلاح نباتات بوده است. در این روش علاوه بر کاهش مدت زمان برنامه‌های اصلاحی و افزایش قابل ملاحظه کارائی گزینش، صفات مطلوب زراعی به سرعت تثبیت

مکاتبه کننده: جواد مظفری
e-mail: jmozafar@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD 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

می‌یابند در حالیکه در روشهای مرسوم تولید گیاهان خالص به طریقه خویش‌آمیزی، درصدی از ناخالصی باقی می‌ماند (۴). علاوه بر این ایجاد گیاهان هاپلوئید برای استفاده در برنامه‌های به نژادی و تحقیقات ژنتیکی بنیادی در گیاهان عالی نیز از اهمیت زیادی برخوردار است (۱۷). یکی از روشهای تولید گیاهان هاپلوئید روش کشت میکروسپور می‌باشد. این روش یک تکنیک مؤثر و مطمئن برای تولید تعداد زیادی از گیاهان هموزیگوس بشمار می‌رود. در این روش امکان بازیافت تعداد زیادی از گیاهان هاپلوئید به‌علت دارا بودن تعداد زیادی میکروسپور در هر بساک وجود دارد. کشت میکروسپور روشی است که اخیرا به لحاظ مزایای آن بر کشت بساک، مورد توجه قرار گرفته است (۱۶). پتانسیل تولید گیاهان هاپلوئید در روش کشت میکروسپور بیشتر بوده و تولید سریع لاینهای خالص از میکروسپورهای ایزوله، مهمترین ویژگی آن در برنامه‌های اصلاحی می‌باشد. تولید لاینهای خالص توسط این روش، در تهیه نقشه‌های ژنتیکی بسیار مؤثر بوده است به‌علاوه میکروسپور یک ماده ژنتیکی ایده‌آل جهت انتقال DNA و مطالعات موتاسیون می‌باشد (۷). تولک (۱۹۵۳) نخستین دانشمندی بود که مشاهده کرد اگر دانه‌های گردهٔ رسیدهٔ گیاه *Ginkgo biloba* (از بازدانگان) در محیط غذایی مناسبی کشت داده شوند، می‌توانند کالوس هاپلوئید تولید نمایند. اولین گزارش قطعی از جنین‌زایی هاپلوئید حاصل از میکروسپور توسط گوها و مهشواری در سال ۱۹۶۴ منتشر شد (۱۵). سپس در سال ۱۹۷۴ بود که میکروسپورهای ایزوله شده از بافت بساک گیاه *Datura innoxia* کشت گردید (۱۴). تشکیل جنین‌های هاپلوئید از میکروسپورهای ایزوله شده در کلزا برای اولین‌بار بوسیله لیشتر در سال ۱۹۸۲ گزارش گردید (۱۱). از آنزمان تاکنون پیشرفتهای قابل توجهی برای توسعه یک روش مؤثر برای تولید جنین‌های حاصل از میکروسپور در گونه‌های مختلف کلزا صورت گرفته است. باقری و معینی نیز (۱۳۷۹) موفق شدند از کشت میکروسپورهای سه رقم پائیزه Ceres,Bounty SLM 046,تعداد ۴۵ جنین بدست آورند (۱). با توجه به کارائی بالای روش هاپلوئیدی در زمینه تولید واریته‌های جدید کلزا در اروپا و آمریکای شمالی، برای سرعت بخشیدن به برنامه‌های نوپای اصلاح این گیاه در کشورمان، ایجاد و بکارگیری روش کشت میکروسپورهای ایزوله کلزا در ایران نیز می‌تواند کارساز گردد. تحقیق حاضر جهت بررسی امکان استفاده از تکنولوژی کشت میکروسپور و بهینه سازی آن برای ایجاد گیاهان هاپلوئید و لاین‌های دابل هاپلوئید به منظور توصیه جهت برنامه اصلاحی کلزا در بخش تحقیقات دانه‌های روغنی وزارت جهاد کشاورزی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

کاشت و پرورش گیاهان مادری

تعداد ده رقم کلزا شامل دو رقم‌پائیزه(SLM046, Orient) و هشت رقم بهاره (Cyclone, Quantum, Balero, Dakini, PF-7045/91, Shiralee, Option-500, Sponsor) در یک طرح بلوکهای کامل تصادفی و با پنج تکرار کشت شدند. کشت ارقام مذکور به‌منظور تأمین مداوم میکروسپور در چهار تاریخ کاشت متمادی در دو آزمایش در گلخانه صورت گرفت. در هر گلدان ابتدا ده عدد بذر کاشته شده و پس از رشد گیاهان تعداد آنها به دو عدد در هر گلدان کاهش داده شد. در آزمایش اول گیاهان مادری (میکروسپوردهنده) تحت شرایط گلخانه با فتوپریود ۱۶/۸ ساعت (تاریکی/ روشنایی) و دمای ۳۰/۲۵°C (شب/ روز) و در آزمایش دوم تحت همان شرایط و فقط با دمای متفاوت در ۲۰/۱۵°C (شب/ روز) پرورش داده شدند.

استخراج میکروسپور و کاشت آنها

بعد از ظهور اولین غنچه‌ها، تعداد ۱۰۰-۵۰ عدد از آنها در مرحله مناسبی از تکوین(طول‌غنچه۴mm-۲/۵) از گل‌آذین‌های انتهایی برداشت شده و ضدعفونی سطحی شدند. به‌منظور بهینه‌سازی روش استخراج میکروسپور، ابتدا استفاده از دو نوع میکروتیوب با حجم ۱/۵ ml و ۳۰ml در تهیه سوسپانسیون میکروسپور و میزان آلودگی آن بررسی گردید. همچنین مناسب‌ترین روش سترون‌سازی محیط کشت NLN (۱۱) با مقایسه سه روش اتوکلاوکردن، استفاده از فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرون و فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرون تعیین شد. بمنظور مشاهده مراحل تکامل میکروسپور و اطمینان از قرار داشتن میکروسپورها در مرحله مناسب کشت (مرحله اواخر تک هسته‌ای تا اوایل دو هسته‌ای) با استفاده از محلول رنگی

جهت تهیه فایل WORD 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

استوکارمن[1] ۲٪ یک تست سیتولوژیکی بر روی آنها انجام شد. سپس میکروسپورها با خرد کردن غنچه‌ها در محیط مایع B_5 (محیط استخراج میکروسپور) حاوی ۱۳٪ ساکارز ایزوله شدند و پس از تعیین تراکم مناسب کشت (۱۰۰/۰۰۰ cell/ml-۸۰/۰۰۰) به وسیله هماسیتومتر[2] در محیط کشت NLN (۱۱) با غلظت ۱۳٪ و ۶/۵٪ ساکارز بعنوان محیط کشت القاء جنین زایی اضافه شده و در داخل پتری‌دیش‌ها توزیع گردیدند. ویژگی محیط کشت NLN داشتن منبع هیدروکربن زیاد (ساکارز۱۳٪) می‌باشد که محیط اسمزی مناسب جهت مراحل القاء جنین را فراهم می‌کند همچنین در این محیط کشت بدلیل آنکه میکروسپورها خود یک منبع غنی از هورمونهای رشد (اکسین، سیتوکینین) هستند نیازی به افزودن هورمونها به محیط کشت NLN نیست. پتری‌ها (۵ پتری‌دیش برای هر رقم کلزا) ابتدا در انکوباتور در دمای ۳۲°C بمدت ۷۲ ساعت و در تاریکی نگهداری، سپس به اتاق کشت با دمای ۲۵°C بمدت ۱۸ روز و در تاریکی منتقل شدند.

بازززایی جنین‌ها و تعیین سطح پلوئیدی آنها

جنین‌ها در مرحله لپه‌ای شکل به محیط بازززایی (B_5 جامد) (۱۱) منتقل شدند. اثر دو سطح دما(۴°C و ۲۵°C)و دو سطح جنین در زمان انتقال (۲۱ و ۲۸ روز پس از کشت میکروسپور) در یک آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی با دو تکرار بررسی گردید. برای این‌کار دو پتری‌دیش هر یک حاوی پنج جنین ۲۱ روزه بلافاصله پس از انتقال به محیط بازززایی در دمای ۴°C بمدت ده روز تحت شوک سرمائی قرار داده شدند و دو پتری‌دیش دیگر در دمای ۲۵°C باقی ماندند. همین عمل برای جنین‌های ۲۸ روزه (بعد از یک هفته ماندن بر روی محیط بازززایی در دمای ۲۵°C) نیز انجام گردید. نیمی از پتری‌ها بلافاصله پس از انتقال به محیط بازززایی تحت شوک سرمایی ۴°C و نیمی دیگر پس از یک هفته رشد در دمای ۲۵°C به دمای ۴°C برده شدند و پس از ده روز شوک سرمایی به دمای ۲۵°C برگردانده شدند تا در زیر نور با شدت ۴۰µ $molm^{-2}s^{-1}$ گیاهچه‌های هاپلوئید بازززایی شوند. جهت بررسیهای سیتوژنتیکی شمارش کروموزوم‌های گیاهچه‌های حاصل در سلولهای مریستمی انتهای ریشه مطابق روش مجیب و میراندا (۱۳) انجام گردید و سطح پلوئیدی آنها مشخص شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق از میان ده رقم مورد آزمایش تنها در رقم Quantum میکروسپورها مستقیما به جنین تبدیل شدند بطوریکه ۴۰ جنین از این رقم بدست آمد و میزان جنین‌زایی بقیه ژنوتیپها معادل صفر بود بنابراین تجزیه واریانس آزمایش‌های مربوطه برای هیچکدام از صفات میسر نبوده و به‌علت تفاوت بسیار روشن و فاحش جنین‌زایی ژنوتیپ رقم Quantum با دیگر ژنوتیپها نیازی نیز به آن نمی‌باشد. تولید جنین از ژنوتیپ Quantum بیانگر این است که فرکانس پاسخ به کشت میکروسپور در آن نسبت به سایر ژنوتیپهای مورد استفاده بسیار زیادتر است (جدول ۱). نقش عامل ژنوتیپ در فراوانی جنین زایی، بسیار با اهمیت بوده و گیاهانی که دارای ساختار ژنتیکی متنوع تری باشند دامنه پاسخ آنها به کشت می‌تواند بطور برجسته‌ای متغیر باشد (۵). بهترین ژنوتیپ برای کشت میکروسپور که دارای عملکرد بالایی از جنین زایی بود و توسط هوانگ معرفی گردید واریته Topas بود (۶).

در این آزمایش تنها میکروسپورهای حاصل از گیاهان کشت شده (مربوط به رقم Quantum) در دمای ۲۰°C-۱۵ (روز-شب) جنین تولید نمودند در حالیکه در میکروسپورهای برداشت شده از گیاهان کشت شده همان رقم، در دمای ۳۰°C-۲۵ (روز- شب) جنین‌زایی صورت نگرفت. بنابراین می‌توان گفت شرایط رشدی گیاهان والد گرده دهنده عامل تعیین‌کننده‌ای در پاسخ جنین‌زایی میکروسپور آنهاست. در دماهای پایین بمیزان قابل توجهی رشد دانه‌های گرده کاهش یافته و می‌توان اکثر میکروسپورها را در مرحله مناسب کشت (اواخر تک هسته‌ای تا اوایل دوهسته‌ای) انتخاب نمود. دستیابی به میکروسپورهای مناسب جنین‌زایی علاوه بر پرورش گیاهان مادری گرده‌دهنده در درجه حرارت پایین و یکنواخت گلخانه مستلزم داشتن گیاهان سالم و قوی و بدون آلودگی به هرگونه آفت و بیماری نیز می‌باشد. بر اساس تحقیقات صورت گرفته (۸) بیشترین پاسخ به کشت میکروسپور از گیاهان کلزایی بدست آمده که در

1. Acetocarmine
2. Hemocytometer

دمای ۵-۱۰°C (روز- شب) در شرایط تغذیه‌ای خوب رشد کرده‌اند(جدول ۱).

جدول۱- جنین‌های بدست آمده از ژنوتیپهای کلزا در دو شرایط متفاوت رشد گیاهان گرده دهنده

رقم	تعداد پتری کشت شده [a]	تعداد جنین حاصل: شرایط رشد گیاهان والد گرده دهنده	
		آزمایش اول [c]	آزمایش دوم [b]
SLM046	۱۲۸	۰	۰
Orient	۱۶۸	۰	۰
Cyclone	۱۵۲	۰	۰
Quantum	۱۹۲	۰	۴۰
Balero	۱۸۰	۰	۰
Dakini	۸۰	۰	۰
PF-7045/91	۱۹۲	۰	۰
Shiralee	۱۷۶	۰	۰
Option-500	۶۰	۰	۰
Sponsor	۶۴	۰	۰

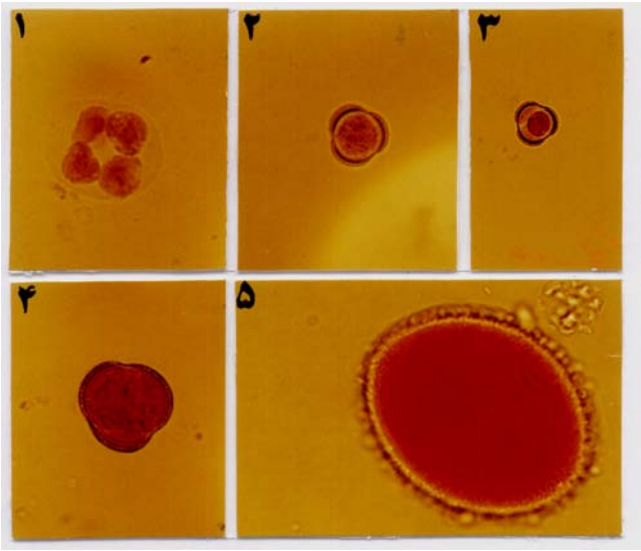
[a]- مجموع پتریهای کشت شده در طی چهار بار تکرار آزمایش که در هر بار در هر پتری‌دیش حدود ۱۰۰/۰۰۰-۸۰/۰۰۰ میکروسپور در هر میلی‌لیتر کشت می‌گردید.

[b]- فصل پاییز، دمای گلخانه ۱۵-۲۰° C

[c]- فصل تابستان، دمای گلخانه ۲۵-۳۰° C

تمامی جنین‌ها، از کشت میکروسپورهایی بدست آمدند که در طول مرحله تکوین در مرحله اواخر تک هسته‌ای تا اوایل مرحله دوهسته‌ای بودند. در این مرحله که بعد از مرحله تک هسته‌ای میانی می‌باشد سیتوپلاسم میکروسپور شفاف بوده و هسته آن در اطراف دیواره سلول قرار می‌گیرد (شکل ۱). بنظر می‌رسد که میکروسپورهای واقع شده در این مرحله نسبت به سایر مراحل تکوین، قابلیت جنین‌زایی بیشتری داشته باشند. بنا به اظهارات بسیاری از دانشمندان نیز این مرحله بحرانی‌ترین مرحله در بین تمامی فاکتورهای مؤثر در کشت میکروسپور کلزا می‌باشد. طبق گزارشات (۱۰) بالاترین فرکانس جنین‌زایی در میکروسپورهایی رخ می‌دهد که در این مرحله قرار داشته باشند.

مقایسه جنین‌زایی میکروسپورها در محیط کشت NLN حاوی غلظتهای ۱۳۰ گرم و ۶۵ گرم در لیتر ساکارز نشان داد که جنین‌زایی رقم Quantum فقط در محیط حاوی ۱۳۰ گرم در لیتر ساکارز اتفاق افتاد. در حالیکه بر اساس گزارشات قبلی نیز غلظت مناسب ساکارز توصیه‌شده مابین ۱۴-۱۰ درصد متغیر می‌باشد (۱۲). این نتایج حاکی از آنست که ساکارز موجود در محیط کشت میکروسپور هم بعنوان یک منبع کربن و هم بعنوان یک محیط اسمزی لازم جهت القاء جنین از اهمیت بالایی برخوردار بوده و وجود غلظت مناسب آن (۱۳٪) در میزان عملکرد جنین‌زایی تأثیربسزایی دارد.



شکل ۱- مراحل نمو میکروسپور: ۱- مرحله تتراد که در اثر تقسیم میوز سلول میکروسپور دارای چهار هسته میشود. ۲- مرحله تک‌هسته‌ای میانی که هسته تقریبا در وسط میکروسپور قرار می‌گیرد. ۳- مرحله اواخر تک هسته‌ای که هسته در اطراف دیواره میکروسپور قرار می‌گیرد و سیتوپلاسم شفاف می‌باشد. ۴- مرحله دو هسته‌ای که میکروسپور دارای سیتوپلاسم دانه‌ای و متراکم می‌باشد. ۵- مرحله دانه گرده کامل که سلول میکروسپور بیضوی شکل بوده و دارای سیتوپلاسم متراکم می‌باشد.

در طی این بررسی، مشخص گردید که اولین غنچه‌های گرفته شده از گیاهان گرده‌دهنده نقش بسزایی در افزایش جنین زایی داشتند همچنین نشان داده شد که استفاده از طریقه صحیح استریل کردن محیط کشت و بکار بردن لوله‌های سانتریفوژ مناسب این کار، درصد آلودگی را در محیط کشت به میزان زیادی پایین می‌آورد و کمترین میزان آلودگی زمانی بدست آمد که از فیلترهای سرسرنگی ۰/۲ میکرون جهت استریل کردن محیط کشت و از لوله‌های آزمایش با حجم ml ۳۰ جهت استخراج میکروسپور استفاده گردید (جدول ۲).

جدول ۲- تأثیر استفاده از روشهای مختلف استریل کردن محیط کشت و استخراج میکروسپور بر میزان آلودگی کشت

درصد آلودگی	تعداد پتری آلوده	تعداد پتری کشت شده	استریل کردن محیط کشت	استخراج میکروسپور
٪۵۲	۱۰۰	۱۹۰	اتوکلاو	در میکروتیوب ۱/۵ ml
٪۲۰	۴۰	۲۰۰	اتوکلاو	با تیوب ۳۰ ml
٪۷۵	۴۵	۶۰	فیلتر سرسرنگی۴۵/. میکرون	در میکروتیوب ۱/۵ ml
٪۴۲	۸۵	۲۰۰	فیلتر سرسرنگی۴۵/. میکرون	در تیوب ۳۰ ml
٪۳۳	۱۲۶	۳۸۰	فیلتر سرسرنگی ۲/. میکرون	در میکروتیوب ۱/۵ ml
٪۷	۵۰	۶۵۰	فیلتر سرسرنگی ۲/. میکرون	در تیوب ۳۰ ml

*: تراکم کشت ۱۰۰۰۰۰-۸۰۰۰۰ میکروسپور در هر میلی لیتر

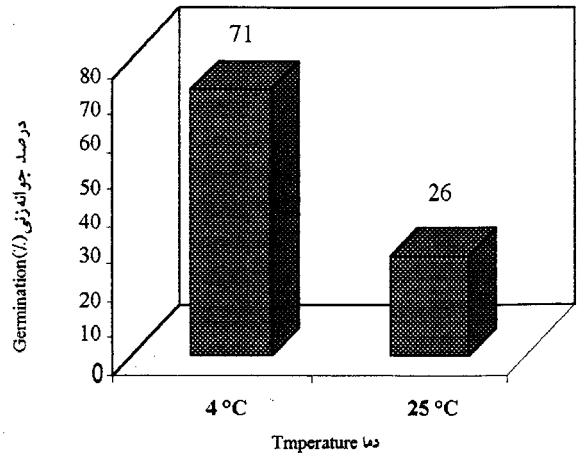
نتایج تجزیه واریانس اثرات سرمادهی و سن جنین در زمان انتقال نشان داد که اثر سرمادهی بمدت ۱۰ روز در دمای ۴° C در افزایش باززایی گیاهچه‌ها از جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور کاملا معنی دار است (جدول۳). در حالیکه اثر سن جنین در زمان انتقال و اثر متقابل سن جنین و تیمار سرما معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین تیمار سرمادهی با شاهد نیز حاکی از آنست که درصد جوانه‌زنی در جنین‌های پیش تیمار شده (۷۱درصد) بطور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد (۲۶ درصد) می‌باشد.(شکل ۲).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثرات سن جنین در زمان انتقال و تیمار سرما بر روی باززایی جنین‌های رقم Quantum

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	F
سن جنین	۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۳۷۰ ns
تیمار سرما	۱	۰/۶۰۳	۰/۶۰۳	۲۲/۳۳۳۳ **
سن جنین× سرما	۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۷٤۰ ns
خطای آزمایشی	٤	۰/۱۱۱	۰/۰۲۷	
کل	۷	۰/۷۱۷		CV=٪ ۲٤/۱

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

در گزارشهای قبلی نشان داده شده است که جنین‌هایی که بلافاصله بعد از انتقال به محیط جامد باززایی در معرض یک دوره سرمادهی (۱۲-۷ روزه) در دمای۴° C قرار می‌گیرند در مقایسه با شاهد (۲۵° C) درصد جوانه‌زنی بالایی نشان می‌دهند (۹).

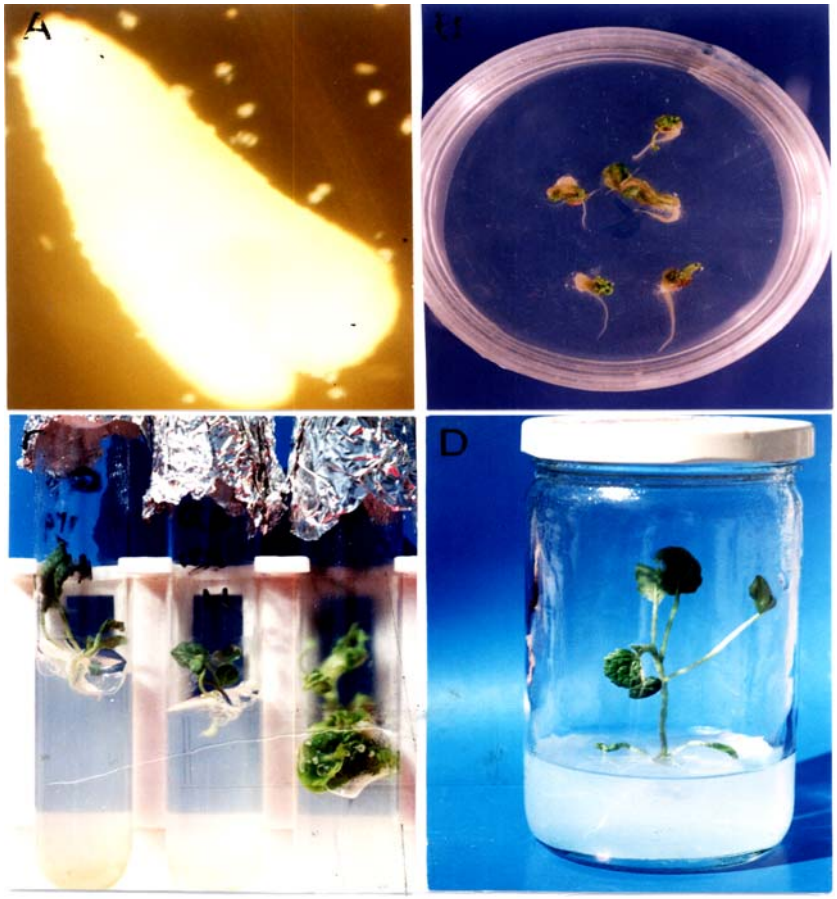


شکل ۲- اثر تیمار سرما بر روی درصد باززائی جنین‌ها

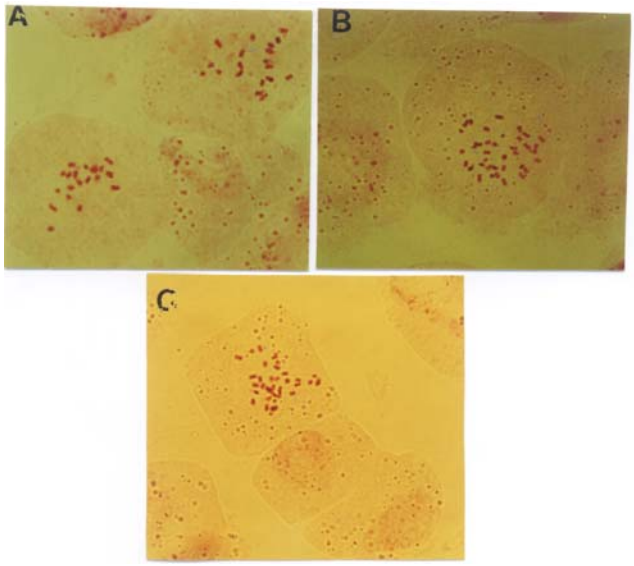
بررسیهای انجام شده در حین کار نشان داد که دقت عمل در حین انتقال جنین به محیط باززایی و جلوگیری از آلودگی محیط رشد جنین در افزایش فراوانی تولید گیاهچه‌های حاصل تأثیر قابل توجهی دارند. جنین‌های باقیمانده نیز در اتاق رشد با دمای ۲۵°C و نور مناسب شروع به رشد و نمو کرده، طی یک دوره یک ماهه تولید گیاهچه‌هایی را نموده (شکل ۳) و پس از عمل واکشت در شرایط درون‌شیشه‌ای[3] گیاهچه‌های کاملی را ایجاد کردند. با توجه به اینکه در کشت میکروسپور جنین‌ها مستقیما از سلول میکروسپور و نه کالوس بوجود می‌آیند و جنین‌های بدست آمده در این تحقیق بطور مستقیم از رشد میکروسپور حاصل شده و دارای ریشه‌چه و برگچه بودند این موضوع گویای این است که جنین‌های بدست آمده هاپلوئید می‌باشند که نتایج حاصل از تست سیتوژنتیکی گیاهچه‌های بدست آمده نیز صحت این موضوع را تایید نمود (شکل۴).

بطورکلی بایستی به این نکته اشاره نمود که فراهم بودن امکانات تحقیقی مناسب (آزمایشگاه و گلخانه مجهز) تأثیر بسزایی در نتایج این آزمایش دارند. مجموعه بررسیهای انجام شده در دو مرحله نشان داد که فراوانی القاء جنین از میکروسپورها و درصد باززایی جنین به عوامل مختلفی بستگی دارد که در این بین عامل شرایط پرورش و نگهداری گیاهان

1. *in vitro*



شکل ۳- رشد و نمو جنین و تولید گیاهچه‌های هاپلوئید: تشکیل جنین قلبی شکل از میکروسپور(A)، ظهور ریشچه و برگچه (B)، گیاهچه‌ها پس از یک هفته از واکشت (C)، گیاهچه کامل رشد کرده پس از یک ماه از واکشت (D).



شکل ۴- تعداد کروموزوم‌های یک گیاه هاپلوئید (n = 19) (A) و یک گیاه دیپلوئید (2n = 38) (B) حاصل از کشت میکروسپور کلزا در مقایسه با کروموزوم‌های یک گیاه دیپلوئید حاصل از بذر (2n = 38) (C).

گرده‌دهنده بسیار با اهمیت بوده و نقش بسزایی را در موفقیت‌آمیز بودن کشت میکروسپور کلزا دارد. جنین‌زائی در ژنوتیپ بهاره Quantum موفقیت‌آمیز بوده و جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور در این رقم، گیاهان هاپلوئید تولید نمودند. در ارتباط با ضرورت تولید هاپلوئیدها می‌توان به این نکته اشاره نمود که تکنیک تولید گیاهان هاپلوئید و ایجاد هاپلوئیدهای مضاعف علاوه بر کاهش مدت زمان برنامه‌های اصلاحی، سیستم ایده‌آلی برای جداسازی موتانتها و انتقال ژن نیز محسوب می‌شود همچنین چون سلولهای گیاهان هاپلوئید دارای مجموعه کاملی از کروموزوم‌های منفرد هستند با دو برابر کردن کروموزوم‌های آنها، هاپلوئیدهای مضاعف که گیاهان کاملا خالصی هستند تولید می‌شوند (۴). بدلیل پایداری و هموزیگوس بودن گیاهان هاپلوئید مضاعف، کارایی سلکسیون نیز به مقدار قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد یعنی این گیاهان در تمام مکانهای ژنی کاملا خالص هستند در حالیکه در روش تولید

گیاهان خالص به طریقه خویش‌آمیزی، درصدی از ناخالصی باقی می‌ماند. از نظر اصلاحی نیز در گیاهان خودگشن نظیر، غلات و کلزا سیستم دابل هاپلوئید می‌تواند مستقیما جهت تولید ارقام جدید استفاده شود، زیرا هر لاین هاپلوئید مضاعف تولید شده توانایی تبدیل شدن به یک کولتیوار جدید را دارا می‌باشد. علاوه براین، ایجاد گیاهان هاپلوئید برای استفاده در برنامه‌های به‌نژادی و تحقیقات ژنتیکی بنیادی در گیاهان عالی نیز از اهمیت زیادی برخوردار است (۱۷).

بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق و همچنین جهت استفاده موفقیت آمیز از این تکنیک در بخش دانه‌های روغنی پیشنهاداتی مطرح می‌گردد که می‌تواند در آینده راهگشای تحقیقات گسترده‌تری در این زمینه باشد:

اثر سن گیاه و گل‌آذین بر روی جنین‌زایی میکروسپور را می‌توان طی یک آزمایش بررسی نمود.

می‌توان با بررسی تراکم‌های مختلف کشت میکروسپور و مقایسه نتایج حاصل به تراکم مطلوب برای هر رقم دست یافت.

تعیین درصد زنده‌بودن[۴] میکروسپورها قبل از کشت وحصول اطمینان از بالا بودن این درصد، می‌تواند به بسیاری از ابهامات بعدی خاتمه دهد. می‌توان با تعویض محیط کشت بدلیل برطرف نمودن اثر مواد سمی تولید شده توسط میکروسپورها درصد جنین‌زایی را بهبود بخشید.

سپاسگزاری

این تحقیق بخشی از پروژهٔ ملی شمارهٔ ۲۰۶۸۰ تحت عنوان «تحقیقات و تولید بذر دانه‌های‌روغنی» می‌باشد. از آقایان دکتر عبدالرشید، مقصود پژوهنده و محسن آقائی‌زاده که در اجرای این پژوهش ما را یاری نموده‌اند صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم.

1. Viability

مراجع مورد استفاده REFERENCES

۱. باقری، هـ . ۱۳۷۹. بررسی پاسخ به کشت میکروسپورهای ایزوله در تعدادی از ژنوتیپهای کلزا. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

۲. دهشیری، ع. ۱۳۷۸. زراعت کلزا. وزارت کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، معاونت ترویج.

۳. ناصری، ف. ۱۳۷۰. دانه‌های‌روغنی. (تألیف ای. آ. وایس). انتشارات معاونت فرهنگی آستان قدس رضوی.

4. Mohan jain, S., S. K. Sopory, & R. E. Veilleux. 1996. *In vitro* Haploid Production in Higher Plants. Volum1-4, kluwer Academic Publishers.
5. Ferrie, A. M. R., D. J. Epp, & W. A. Keller. 1995. Evaluation of *Brassica rapa* L. genotypes for microspore culture response and identification of a highly embryogenic line. Plant cell reports, 14: 580-584.
6. Huang, B. 1992. Genetic manipulation of microspores and microspore –derived embryos. *In vitro* Cell Development Biology, 28p.53-58.
7. Kasha, K.J., A. Ziauddin, & V. H. Cho. 1990. Haploid in cereal improvement anther and microspore culture. In: Gustafson, J.P.(ed), Gene Manipulation in Plant Improvement. Newyork. Plenum press. pp. 213-255.
8. Keller, W.A., P. G. Arnison, & B. J. Cordy. 1987. Haploids from gametophytic cells-recent developments and future prospects. In: Plant Tissue and Cell Culture Alan R.Liss, New York, pp.233-241.
9. Kott, L.S. & W. D. Beversdorf. 1990. Enhanced plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus* by chilling, partial desiccation age selection. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,23:187-192.
10. Kott, L.S., L. Polsoni, & W. D. Beversdorf. 1988. Cytological aspects of isolated microspore culture in *Brassica napus*. Canadian Journal of Botany, 66:1658-1664.
11. Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzen – physiology, 105:427-434.
12. Lichter, R. 1989. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species. Plant Breeding, 103: 119-123.
13. Mujeeb-Kazi, A. & J. L. Miranda. 1985. Enhanced resolution of somatic chromosome constrictions as aid to identifying intergeneric hybrids among some triticeae. Cytologia, 50: 701-710.

14. Nitsch, C. 1974. Pollen culture. A new technique for mass production of haploids and homozygous plants. In: Kasha, K. J. (ed.), Haploids in plants. University of Guelph, Guelph, ont., pp.123-135.
15. Palmer, C. E., & W. A. Keller. 1999. Haploidy. In: Gomez-campo, C. (ed), Biology of *Brassica* Coenospecies. Elsevier Science B.V.All rights reserved. pp. 247-286.
16. Pickering, R. A., & P. Devaux. 1992. Haploid production approaches and use in plant breeding. In: shewry, P, R. (ed), Barley, Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and U.K. CAB international. pp. 519-547.
17. Poehlman, G. M. & J. Mitton. 1987. Breeding Field crops.Van Nostrand Reinhold. Newyork. P:724.
18. Tuleke, W. 1953. A tissue derived from the pollen of *Ginkgo biloba*. Science, 117:599-600.

Iranian, J. Agric. Sci. Vol. 36, No. 2, 2005

Microspore Culture for Producing Haploid Plants in Different Rapeseed (*Brassica napus*) Cultivars

F.ASLANI[1], J. MOZAFFARI[2], M. R. GHANNADHA[3], AND A. A. ATTARI[4]

1, Scientific board, Faculty of Agriculture Islamic Azad University, 2, 4, Research Professor and Research Assistant Professor , Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, 3, Associate Professor, University College of Agriculture & Natural Resources (UCAN), University of Tehran, Karaj, Iran
Accepted. April. 14, 2004

SUMMARY

In order to develop and optimize a procedure for producing double haploid lines in rapeseed breeding program, microspore culture was investigated in ten rapeseed cultivars. The cultivars included two winter (Orient, SLM 046) and eight spring cultivars (Cyclone, Quantum, Balero, Dakini, PF-7045/91, Shiralee, Option 500, Sponsor). The experiment was conducted on plants grown under greenhouse conditions in two different seasons of summer and fall 2001. The plants were grown during summer under 25-30°C and fall under 15-20°C temperature conditions and seasonal natural daylight. Microspores were cultured in recommended developmental stage (late uninucleate to early binucleate) with a density of 80000 to 100000 cells/ml on NLN media containing either 6.5% or 13% sucrose. No embryo induction occurred in microspores derived from plants grown under 25-30°C in summer, while from the same cultivars grown under 15-20°C in fall, embryos were developed only from microspores of the spring cultivar Quantum on B_5 liquid media. Comparison of different sucrose levels in the media proved that 13% sucrose is a proper concentration for microspore culture in rapeseed. Nine out of 40 embryos produced from microspore culture in this cultivar were developed into putative haploid plantlets. Effects of cold pretreatment on regeneration of embryos into plantlets was significant at %1 level. Cytological analyses were carried out to verify the ploidy level in putative haploid plantlets. Six out of nine regenerated plantlets were confirmed to be haploids while three were diploids. Results in this study indicated that genotypic characteristics as well as growing conditions of donor plants are important factors in embryogenesis of microspores. The temperature in which plants were grown during flowering stage is a major determinant for success of microspore culture in rapeseed.

Key words: Microspore culture, Double haploid, *Brassica napus,* Rapeseed