

تاثیر دما بر جنین‌زایی میکروسپور و باززایی گیاهان دابلد هاپلوئید در سه هیبرید
کلزا (*Brassica napus* L.)

Effect of Temperature on Microspore Embryogenesis and Regeneration of
Doubled Haploid Plants in Three Canola (*Brassica napus* L.) Hybrids

مهناز عروجلو^۱، مهران عنایتی شریعت‌پناهی^۱، صمد حبیب‌زاده^۱، مونا امامی‌فر^۱ و
فرزاد جاویدفر^۲

۱- به ترتیب کارشناس ارشد، استادیار، کارشناس ارشد و کارشناس ارشد، موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی
ایران، کرج

۲- مربی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۳۰

چکیده

عروجلو، م.، عنایتی شریعت‌پناهی، م.، حبیب‌زاده، ص.، امامی‌فر، م.، و جاویدفر، ف. ۱۳۹۰. تاثیر دما بر جنین‌زایی میکروسپور و باززایی گیاهان
دابلد هاپلوئید در سه هیبرید کلزا (*Brassica napus* L.). مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۷: ۱۸۲-۱۶۷.

در این پژوهش، مراحل مختلف کشت میکروسپور (اعم از جنین‌زایی و باززایی) جهت تولید گیاهان
دابلدهاپلوئید کلزا (*Brassica napus* L.) مورد بررسی قرار گرفت. هیبریدهای RGS003×ARC5، Hyola 401 و
Hyola 420 به عنوان مواد گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند. میکروسپورها در مرحله تکوینی انتهای تک‌سلولی
تا ابتدای دوسلولی از غنچه‌هایی به طول ۲/۵ تا ۳/۵ میلی‌متر جدا شدند و در محیط کشت NLN-13 حاوی
۱۳ درصد ساکارز کشت شدند و سپس تحت تنش‌های حرارتی ۳۷°C به مدت ۸ ساعت، ۳۵°C به مدت
۱۸ ساعت، ۳۲°C به مدت ۷۲ ساعت و ۳۰°C به مدت ۱۰ و ۱۴ روز قرار گرفتند. هیبریدهای مورد استفاده تنها در
۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ و ۱۴ روز تولید جنین رویشی کردند، هر چند تیمار ۳۰°C به مدت ۱۴ روز
جنین‌زایی و باززایی بهتری نشان داد. بهترین روش برای غلبه بر جنین‌زایی ثانویه، انتقال جنین‌های لپه‌ای شکل
به محیط B5 حاوی اسید جیبرلیک (۰/۰۱ mg l⁻¹) و نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و تاریکی به مدت
۱۰ روز و سپس انتقال به روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. بعد از رشد، جنین‌ها به محیط B5
بدون اسید جیبرلیک جهت باززایی انتقال یافتند. گیاهان هاپلوئید به منظور افزایش سطح پلنوئیدی با محلول
کلشیسین (۰/۳۴ درصد) به مدت ۱/۵ ساعت تیمار شدند. گیاهان دابلد هاپلوئید از هر سه ژنوتیپ مورد بررسی،
تولید بذر کردند.

واژه‌های کلیدی: کلزا، میکروسپور، جنین‌زایی، باززایی، تنش حرارتی.

مقدمه

دنیا ارایه شده است (Gu *et al.*, 2003)؛
 موفقیت در جنین‌زایی (Custers *et al.*, 1994).
 میکروسپورهای گیاهان جنس براسیکا به میزان
 زیادی وابسته به ژنوتیپ است و پارامترهای کمی
 وراثتی در جنین‌زایی دخالت می‌کنند
 (Zhang and Takahata, 2001). در کلزا
 صفت جنین‌زایی میکروسپور توسط دو مکان
 ژنی با اثر افزایشی کنترل می‌شود در
 حالی که ژن‌هایی با اثر غالبیت هم در
 جنین‌زایی میکروسپورها اثر مثبتی دارند
 (Zhang and Takahata, 2001). شرایط
 رشدی گیاه بخشنده میکروسپور نیز یکی از
 فاکتورهای تعیین‌کننده جهت تولید موفقیت‌آمیز
 جنین از میکروسپورها در کلزا است، به طوری
 که گیاه مولد میکروسپورها باید در درجه
 حرارت‌های پایین (10°C – 12°C) در روز و 5°C – 8°C
 در شب) رشد کند (Palmer and Keller, 1999)؛
 (Ferrie and Keller, 1995). در کلزا، فقط
 میکروسپورهایی که در مرحله انتهایی
 تک‌هسته‌ای یا ابتدایی دو هسته‌ای هستند،
 به جنین‌زایی پاسخ مثبت می‌دهند
 (Wang *et al.*, 2002). یکی از مهم‌ترین اجزای
 محیط کشت موثر در القای جنین‌زایی،
 غلظت ساکارز در محیط کشت است
 (Ferrie *et al.*, 1999). مطالعات نشان داده
 است که سطوح بالای ساکارز (۱۰–۱۴٪) برای
 زنده ماندن میکروسپور و شروع تقسیم آن
 ضروری است (Touraev *et al.*, 2001). پیش
 تیمار حرارتی، یک عامل کلیدی برای
 موفقیت‌آمیز بودن کشت میکروسپور در گیاهان

گیاهان هاپلوئید / دابلدهاپلوئید
 در اصلاح نباتات دارای کاربردهایی
 از قبیل سرعت بخشیدن به برنامه‌های به‌نژادی،
 بهبود کارایی انتخاب، تسهیل انتقال
 ژن و مطالعات موتاسیونی هستند
 (Enayati Shariatpanahi and Emami)
 (Meybodi, 2009).

یکی از متداول‌ترین روش‌های تولید گیاهان
 هاپلوئید، کشت میکروسپور است. میکروسپورها
 یا بساک‌های جدا سازی شده از خوشه‌های
 گل یا غنچه‌ها، پس از انتقال به محیط
 کشت به سمت جنین‌زایی القاء می‌شوند
 (Touraev *et al.*, 1997). در همه این موارد،
 فعال شدن مسیر اسپروفیتی می‌تواند به
 وسیله قرار گرفتن میکروسپورها تحت
 تنش‌های مختلف صورت گیرد
 (Simmonds and Keller, 1999). تنش‌های
 مورد استفاده جهت القاء جنین‌زایی در
 میکروسپور می‌توانند به تنش‌های کلاسیک
 (سرمایی، حرارتی، گرسنگی و کلشی‌سین)،
 تنش‌های خاص (پرتوتابی گاما، سانتی‌فیوژ، اسید
 آبسزیک، مواد القاء کننده ماده‌زایی،
 اتانول) و تنش‌های جدید (pH بالای محیط،
 الیگوساکارید، 2,4-D) طبقه‌بندی شوند
 (Shariatpanahi *et al.*, 2006).

کشت میکروسپورهای کلزا برای اولین بار در
 سال ۱۹۸۲ گزارش شد (Lichter, 1982).
 مقالات متعددی در زمینه بهینه‌سازی
 کشت میکروسپور کلزا در سال‌های اخیر در

در تحقیق حاضر به منظور معرفی دستورالعملی کاربردی اثر عوامل مهم موثر بر جنین‌زایی میکروسپورها و باززایی جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور کلزا مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش بذر F1 حاصل از تلاقی RGS003×ARC5 و هیبریدهای به‌اره Hyola 401 و Hyola 420 کلزا تهیه شده از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، در گلدان و داخل اتاق رشد در دمای ۱۵ تا ۱۸ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و همچنین در مزرعه تحقیقاتی بخش دانه‌های روغنی کاشته شدند. در زمان گلدهی حدود ۲۵ غنچه به طول ۲/۵ تا ۳/۵ میلی‌متر حاوی میکروسپورهای مرحله انتهایی تک سلولی تا ابتدای دو سلولی جدا شدند. در زیر لامین-ایر فلو در شرایط استریل، غنچه‌ها با محلول‌های مختلف ضد عفونی شامل اتانول (۱۵، ۳۰ و ۶۰ ثانیه) و هیپوکلرید سدیم ۳/۵ درصد (۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) ضد عفونی و سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. برای جداسازی میکروسپورها از محیط شستشو (محلول ۱۳۰ گرم در لیتر ساکارز در یک لیتر آب مقطر استریل با pH = ۶/۲) استفاده شد. بعد از له کردن غنچه‌ها در محیط شستشو، محلول سوسپانسیون حاوی میکروسپورها به ترتیب از دو الک آزمایشگاهی با اندازه سوراخ‌هایی به قطر ۹۰ و ۶۳ میکرومتر عبور داده شد. سوسپانسیون حاوی میکروسپورها، داخل لوله‌های آزمایشگاهی ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و با سرعت ۱۲۰۰ rpm به

براسیکا است (Zhao *et al.*, 1996). در اکثر موارد، جنین‌زایی با قرار دادن کشت‌ها در دمای ۳۵-۳۰ °C به مدت ۷۲-۲۴ ساعت شروع می‌شود و پس از آن جنین‌ها می‌توانند در دماهای پایین‌تر تکامل یابند (Duijs *et al.*, 1992؛ Fletcher *et al.*, 1998).

عوامل مختلفی بر میزان باززایی جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور تاثیر می‌گذارند (Palmer and Keller, 1999). در جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور کلزا، مقدار اندکی اسید آبسزیک تولید می‌شود و در نتیجه بلوغ نرمال اتفاق نمی‌افتد، اما در عوض جنین‌ها زودتر جوانه زده و با دستکاری در کشت می‌توان به مرحله بلوغ نرمال رسید (Palmer and Keller, 1999).

در ایران نیز کشت میکروسپور کلزا مورد بررسی قرار گرفته است (Abdullahi *et al.*, 2003؛ Hosseinpour 2003؛ Bagheri, 2000؛ Aslani 2002). باقری (Bagheri, 2000) موفق به اکتساب درصد پایینی باززایی در ارقام پاییزه شد. اصلانی (Aslani, 2002) تعداد ۴۰ جنین از کلزا رقم Quantum به دست آورد که تنها تعداد نه جنین پس از باززایی در محیط B5 جامد به گیاهچه تبدیل شدند. آزمایش‌های حسین‌پور (Hosseinpour, 2003) نیز منجر به تولید تعدادی گیاه در دابله‌پلوئید در کلزا شد. برخی فاکتورهای موثر بر جنین‌زایی میکروسپور توسط عبداللهی و همکاران (Abdullahi *et al.*, 2003) مورد بررسی قرار گرفت.

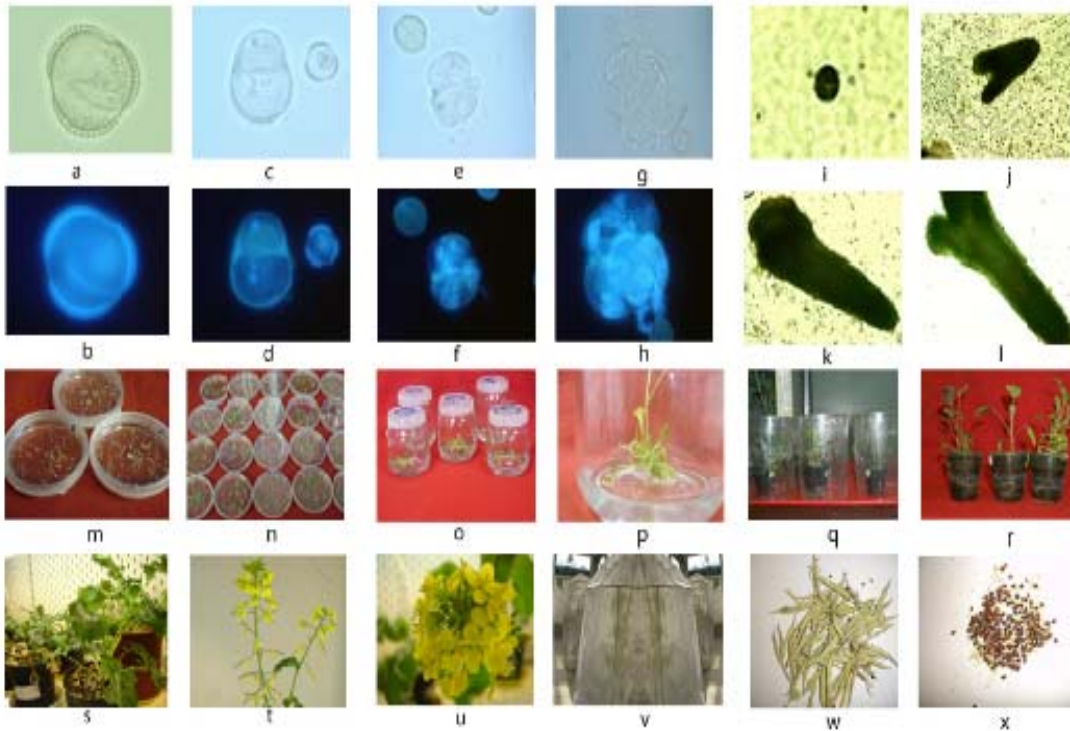
مدت ۱/۵ ساعت، ۲ ساعت و ۷ ساعت (جذب کلشی سین از طریق ریشه) انجام شد. در آزمایش‌ها ابتدا آزمون نرمال بودن توسط نرم‌افزار MINITAB انجام شد. بر اساس نمودار نرم‌افزار MINITAB، در صورت نیاز به تبدیل داده به دلیل عدم نرمال بودن از تبدیل مناسب داده‌ها استفاده شد. پس از انجام تجزیه واریانس و مقایسه میانگین، داده‌ها به مقیاس اصلی خود باز گردانده شدند. کلیه تجزیه واریانس‌ها و مقایسه میانگین‌ها با نرم‌افزارهای SAS و MSTATC انجام شدند. مقایسه میانگین‌ها به روش‌های آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

بهینه کردن ضدعفونی و جداسازی میکروسپورها

تیمارهای مختلف ضدعفونی شامل اتانول و هیپوکلرید سدیم و روش‌های مختلف جداسازی میکروسپورها (روش جداسازی با مگنت و استریلر، روش له کردن بساک با استفاده از انتهای سرنگ) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین فراوانی میکروسپورهای زنده (بیش از ۷۰ درصد) از غنچه‌های دارای بساک‌های حاوی میکروسپورهای انتهای تک‌سلولی الی ابتدای دو سلولی و ضدعفونی شده با محلول هیپوکلریت سدیم ۳/۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه که در ظروف شیشه‌ای حاوی محیط شستشو با استفاده از انتهای سرنگ له شدند، به دست آمد (شکل ۱). ضدعفونی غنچه‌ها با اتانول به طور موفقیت‌آمیزی در گونه‌هایی نظیر گندم، جو و

مدت پنج دقیقه در دمای 4°C سانتریفیوژ شد و سپس مایع سبز رنگ رویی حذف شد. رسوب زرد رنگ ته نشین شده با اضافه کردن دو تا سه میلی‌لیتر از محیط کشت NLN-13 رقیق شد. برای کشت میکروسپورها در هر تشتک پتری ۶ سانتی‌متری، ۵/۸ میلی‌لیتر از محیط NLN-13 توزیع و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروسپورهای رقیق شده به آن اضافه گردید. میکروسپورهای کشت شده تحت تنش حرارتی شامل 37°C به مدت ۸ ساعت، 35°C به مدت ۱۸ ساعت، 32°C به مدت ۷۲ ساعت و 30°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ و ۱۴ روز قرار گرفتند. پس از اعمال تنش حرارتی، تشتک‌های پتری حاوی میکروسپورها به انکوباتور 25°C درجه سانتی‌گراد و تاریکی انتقال یافتند. پس از حدود ۲۰ تا ۳۰ روز از کشت میکروسپورها، جنین‌ها در مرحله لپه‌ای شکل به محیط باززایی B5 حاوی اسید جیبرلیک ($1\text{mgI}^{-1}/0.1\%$) منتقل شدند. به منظور تیمار سرمایی جهت جلوگیری از جنین‌زایی ثانویه و تولید گیاهچه‌های نرمال، جنین‌ها در تاریکی و در دمای 4°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ تا ۱۰ روز قرار داده شدند. سپس جنین‌ها به داخل اتاق رشدی با دمای 25°C درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. میانگین تعداد جنین‌های تشکیل شده (قابل انتقال به محیط باززایی) از ۲۵ غنچه و درصد جنین‌های باززایی شده محاسبه شد. سطح پلوئیدی گیاهان باززایی شده با استفاده از روش فلوسایتومتری تعیین شد. برای افزایش سطح پلوئیدی گیاهان هاپلوئید، تیمار با کلشی سین 0.34% ($3/4$ گرم در لیتر) به



شکل ۱- a-x: مراحل مختلف کشت میکروسپور و باززایی گیاهان هاپلوئید در کلزا

a- میکروسپورهای مرحله انتهایی تک- سلولی در زمان ایزوله کردن، b- میکروسپورهای مرحله انتهایی تک- سلولی در زمان ایزوله کردن رنگ آمیزی شده با DAPI، c- میکروسپورهای با تقسیمات اسپوروفیتی پس از گذشت یک هفته در محیط NLN، d- میکروسپورهای با تقسیمات اسپوروفیتی پس از گذشت یک هفته و رنگ آمیزی شده با DAPI، e, f, g, h- ساختارهای چند سلولی پس از گذشت ۳ هفته از کشت زیر میکروسکوپ نوری و همچنین رنگ آمیزی شده با DAPI، i, j, k, l- ساختارهای مختلف جنین شامل کروی - قلبی - اژدری و لپه ای . m, n, o, p- مراحل مختلف باززایی درون شیشه ای q- مرحله سازگاری گیاهچه ها با محیط، r- مرحله دو برابر کردن کروموزومها با کلشیسین . S, t, u, v, w, x- مراحل گلدهی و بذر گیری .

Fig. 1. a-x. Stages of microspore embryogenesis and regeneration in canola

a- Freshly isolated late uni-cellular microspores, b- DAPI-stained unicellular microspores c-sprophytically-devided microspores in NLN medium after 1 week, d- DAPI-stained sprophytically-devided microspores after 1 week, e, f, g, h- DAPI stained/light microscopy of multicellular structures after 3 weeks, i, j, k, l- embryo structures in different stages i. e. globular, heart, torpedo and cotyledonary, m, n, o, p- *In vitro* regeneration stages q-Adaptation of regenerants r- Chromosome doubling with colchicines s, t, u, v, w, x-Flowering and seed setting stages

آزمایشگاهی و همزن مغناطیسی نتیجه بهتری را از نظر تعداد و درصد زنده‌مانی میکروسپورها نشان داد.

تولید جنین‌های هاپلوئید به شدت به مرحله رشد و نموی میکروسپورها در زمان ایزوله شدن حساس است و در کلزا، فقط میکروسپورهایی که در مرحله تک سلولی انتهایی یا ابتدای دو سلولی هستند، به جنین‌زایی پاسخ مثبت می‌دهند (Kott and Polsoni, 1987؛ Fan *et al.*, 1988)

تنباکو استفاده شده است و هیپوکلریت سدیم نیز به طور گسترده در غلات و بسیاری از دولپه‌ای مورد استفاده قرار گرفته است. این در حالی است که استفاده از اتانول برای میکروسپورهای کلزا باعث کاهش زنده‌مانی آنها شد ولی هیپوکلریت سدیم ۳/۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه بهترین نتیجه را از نظر درصد زنده‌مانی و عدم آلودگی به دنبال داشت. روش جداسازی با انتهای سرنگ در مقایسه با روش‌های همزن

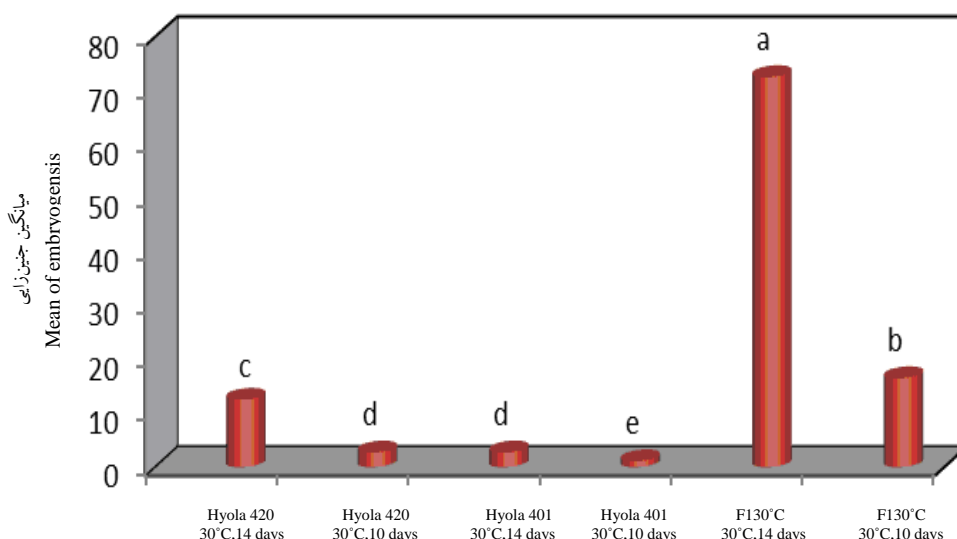
Hyola 401 و Hyola 420 به منظور القای جنین‌زایی تحت تنش‌های حرارتی مختلف شامل 37°C به مدت ۸ ساعت، 35°C به مدت ۱۸ ساعت، 32°C به مدت ۷۲ ساعت، 30°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ و ۱۴ روز و 25°C درجه سانتی‌گراد (شاهد) قرار گرفتند. گیاهان F1 و هیبریدهای Hyola 420 و Hyola 401 تنها در 30°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ و ۱۴ روز تولید جنین کردند (شکل ۱).

در مورد صفت جنین‌زایی میکروسپورها تحت این تنش حرارتی، بین گیاهان F1 و هیبریدهای Hyola 420 و Hyola 401 و همچنین از نظر مدت زمان اعمال تیمار حرارتی 30°C اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (شکل ۲).

که مشابه این نتایج در تحقیق حاضر نیز مشاهده شد، به طوری که وقتی میکروسپورها در مراحل تکوینی جوان‌تر (شامل تتراد و ابتدای تک‌سلولی) و یا مسن‌تر (انتهای دو سلولی) جدا شدند، موفق به جنین‌زایی نشدند. میکروسپورها در مرحله انتهایی تک‌سلولی دارای آگزمین زرد رنگ و متراکم بوده و هسته در موقعیت کناری قرار دارد و میکروسپورها به صورت کاملاً سه‌لویی مشاهده می‌شوند. این مرحله، مرحله مناسب برای جنین‌زایی میکروسپورهای کلزا است (Fletcher *et al.*, 1998).

القای جنین‌زایی در میکروسپور

میکروسپورهای جدا شده از گیاهان F1 حاصل از تلاقی (۱۹۰) RGS003×ARC5، هیبریدهای

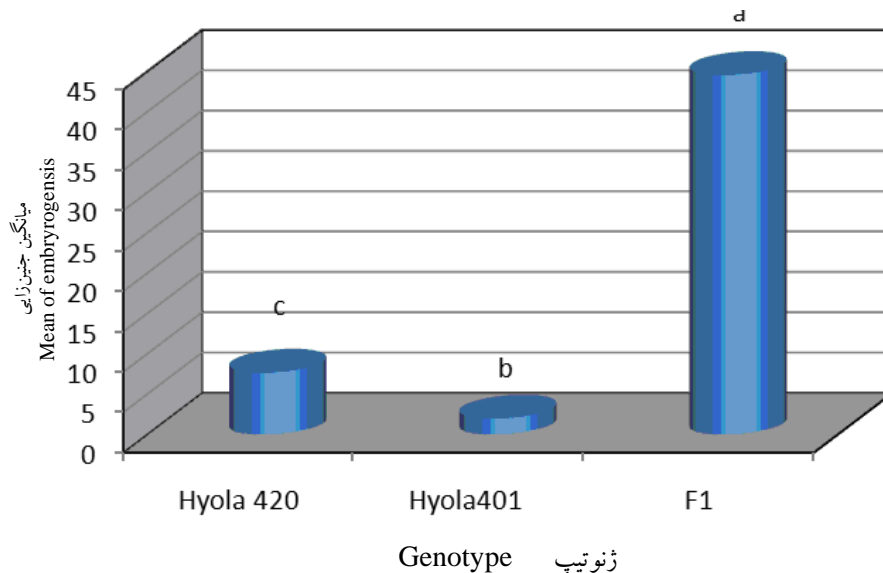


شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ × تنش حرارتی بر میزان جنین‌زایی میکروسپور
Fig. 2. Mean comparison for the effect of heat shock × genotypes interactions on microspore embryogenesis

میانگین‌های دارای حروف مختلف در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار هستند.
 Means with different letters are significantly different at 5% probability level.

ژنوتیپ F1 شماره ۱۹۰ با میانگین تولید ۴۴/۶ جنین از ۲۵ غنچه بهترین ژنوتیپ در مقایسه با هیبریدهای Hyola 401 و Hyola 420 به ترتیب با میانگین‌های تولید ۲ و ۷/۷ بود (شکل ۳).

همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود، F1 شماره ۱۹۰ و تیمار حرارتی ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ روز بیشترین فراوانی جنین‌زایی را در بین هیبریدهای مورد آزمایش و تیمارهای حرارتی نشان دادند.



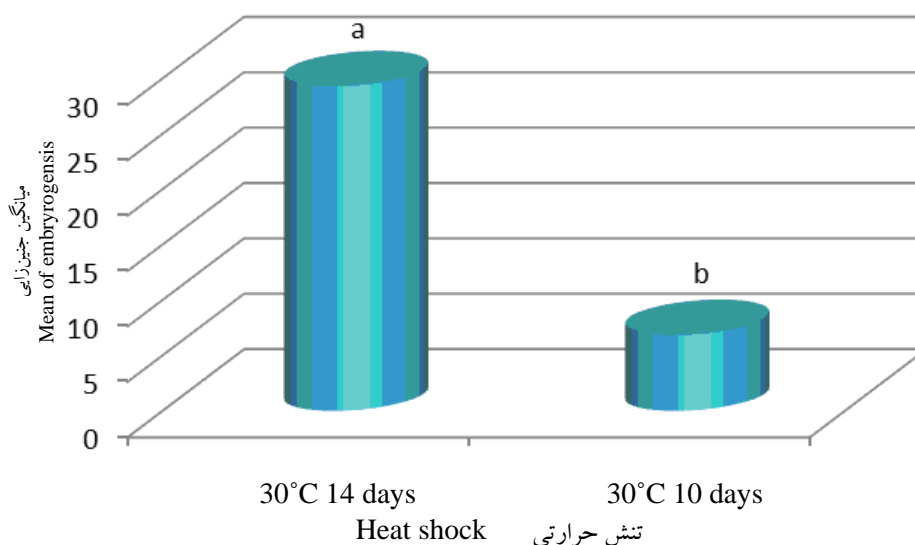
شکل ۳- مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ‌ها (Hyola 420، Hyola 401 و F1) بر میزان جنین‌زایی میکروسپور
Fig. 3. Mean comparison for the effect of genotypes (Hyola 401, Hyola 420 and F1) on microspore embryogenesis

میانگین‌های دارای حروف مختلف در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار هستند.
 Mean with different letters are significantly different at 5% probability level.

می‌کنند (Zhang and Takahata, 2001). در داخل یک ژنوتیپ نیز ممکن است از گیاهی به گیاه دیگر از نظر میزان جنین‌زایی تفاوت وجود داشته باشد. در کلزا صفت جنین‌زایی میکروسپور توسط دو مکان ژنی با اثر افزایشی کنترل می‌شود در حالی که ژن‌هایی با اثر غالبیت هم در جنین‌زایی میکروسپورها اثر مثبتی دارند (Zhang and Takahata, 2001). در تحقیقی دیگر، تفاوت معنی‌داری از میزان جنین‌زایی بین سه هیبرید F1 مورد مقایسه مشاهده شد

تیمار حرارتی ۱۴ روز نیز برترین تیمار حرارتی در تمامی ژنوتیپ‌های مورد استفاده با میانگین تولید ۲۹/۳۳ جنین از ۲۵ غنچه بود (شکل ۴).

تأثیر ژنوتیپ بر روی جنین‌زایی میکروسپور در تحقیقات قبلی نیز گزارش گردیده است (Zhang and Takahata, 2001; Zhou et al., 2002). توانایی جنین‌زایی میکروسپورها توسط فاکتورهای ژنتیکی کنترل می‌شوند و پارامترهای کمی وراثتی در جنین‌زایی میکروسپورها دخالت



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر مدت زمان اعمال تیمار حرارتی بر میزان جنین زایی میکروسپور
 Fig. 4. Mean comparison for the effect of heat treatment duration on microspore embryogenesis

میانگین های دارای حروف مختلف در سطح احتمال ۵٪ معنی دار هستند.
 Mean with different letters are significantly different at 5% probability level.

کشت ها به دمای ۲۵°C به مدت ۱۸ روز منتقل می شوند (Duijs *et al.*, 1992). در گزارشی دیگر، یک پیش تیمار حرارتی در ۳۵°C و فقط برای ۱۸ ساعت و به دنبال آن قرار گرفتن کشت ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵°C و تعداد و کیفیت جنین ها را به ازای هر غنچه افزایش داده است (Gland *et al.*, 1988). در آزمایشی دیگر که نتایج آن مشابه نتایج تحقیق حاضر است، تیمار دمایی ۳۰°C به مدت ۱۴ روز منجر به افزایش قابل توجهی در جنین زایی میکروسپورها شد (Fletcher *et al.*, 1998). اصولاً بر اساس گزارش های مختلف، قرار دادن کشت ها در درجه حرارت بالا (۳۰-۳۵°C) قبل از قرار دادن در دمای ۲۵°C، برای القای جنین ضروری است. مناسب ترین درجه حرارت برای القای جنین در

(Zhou *et al.*, 2002). با وجود این که پاسخ پذیری ژنوتیپ های مختلف به کشت میکروسپور تا حدودی به ریخته ارثی آن مربوط است اما می توان با بهینه سازی تنش مورد استفاده در القاء میکروسپورهای جنین زا از نظر نوع و شدت تنش حتی در ژنوتیپ های سخت پاسخ ده (ریکالسیترنت) نیز جنین زایی را القاء کرد، به همین دلیل در تحقیق حاضر از تیمارهای دمایی متفاوت در زمان های مختلف استفاده شد.

دمای مناسب برای القای جنین زایی میکروسپور در کلزا ۳۰-۳۵°C به مدت ۲۴-۷۲ ساعت گزارش شده است (Duijs *et al.*, 1992). در بعضی ارقام کلزا نظیر Topas دمای مناسب برای جنین زایی ۳۲°C به مدت ۲۴-۷۲ ساعت است که پس از آن،

گلخانه به طور دائم (به خصوص در فصل تابستان) مورد حمله آفات قرار می‌گرفتند و صدمه می‌دیدند (مقایسه مشاهده‌ای).

باززایی جنین‌ها و ایجاد گیاهان هاپلوئید

پس از انتقال جنین‌ها به محیط باززایی، درصد باززایی در بین ژنوتیپ‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در مورد صفت باززایی، بین هیبرید F1 و هیبریدهای Hyola 401 و Hyola 420 و همچنین بین تیمارهای مختلف حرارتی مورد استفاده در القای میکروسپورهای جنین‌زا اختلاف معنی‌داری وجود دارد (شکل ۵). هیبرید F1۱۹۰ با میانگین درصد باززایی ۶۳/۲۳ بیشترین میزان باززایی را در مقایسه با هیبریدهای Hyola 401 و Hyola 420 نشان داد (شکل‌های ۱ و ۵).

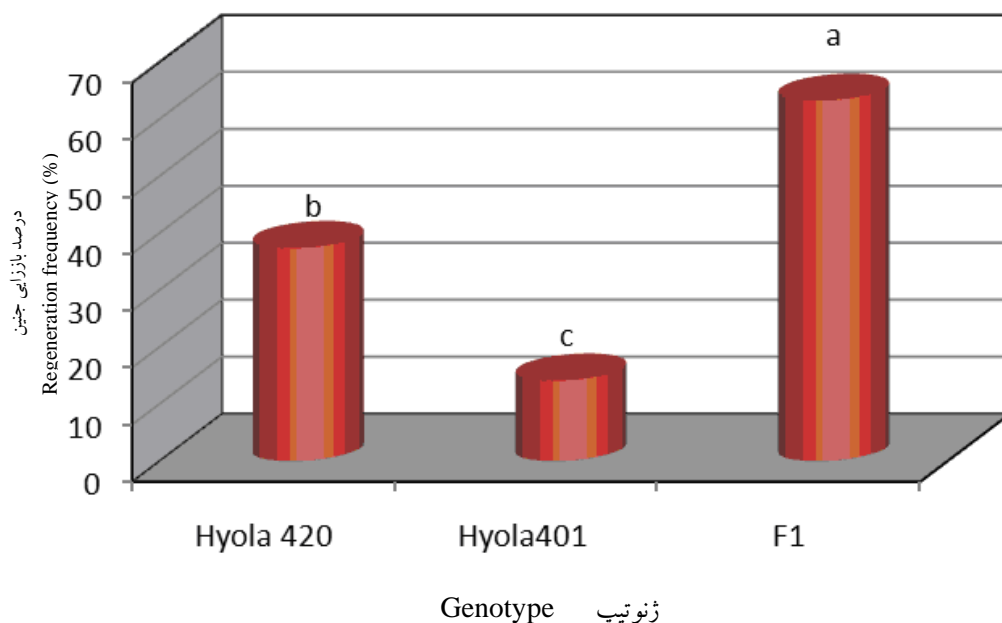
ضمناً جنین‌های حاصله از تیمار حرارتی 30°C دوره زمانی ۱۴ روز با میانگین درصد باززایی ۴۹/۵۲ بیشترین باززایی را در مقایسه با تیمار حرارتی 30°C دوره زمانی ۱۰ روز نشان دادند (شکل ۶).

تاثیر ژنوتیپ و تیمار حرارتی بر درصد باززایی جنین‌های منتج از میکروسپور در کلزا قبلاً نیز گزارش شده است (Burbalis *et al.*, 2002) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. علاوه بر رشد و نمو ظاهری، بلوغ فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی جنین‌ها نیز یکی از فاکتورهای مهم در باززایی جنین‌ها است (Takahata *et al.*, 1991). در آزمایشی مشخص شد که درصد باززایی جنین‌های بزرگ، بیش از ۲۰ درصد نسبت به

بسیاری از گونه‌ها $32-33^{\circ}\text{C}$ است و یک تیمار سه چهار روزه در این درجه حرارت در افزایش تولید جنین در کلزا می‌تواند موثر باشد (Chuong and Beversdorf, 1985). همچنین در مورد تاثیر مثبت تیمار حرارتی مشخص شده است که بالا رفتن دمای محیط کشت، فراوانی تقسیمات متقارن سلولی را در میکروسپورها افزایش داده و موجب ادامه تقسیم هسته‌های رویشی در میکروسپورهای دو هسته‌ای می‌شود (Custers *et al.*, 1994). البته در تحقیق حاضر سعی شد از میکروسپورهای انتهایی تک هسته‌ای استفاده شود.

به هر حال بر اساس نتایج ارائه شده می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تیمار دمایی 30°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ روز بهترین تیمار حرارتی جهت القای جنین‌زایی در میکروسپورهای کلزا است هر چند ممکن است در بعضی از ژنوتیپ‌های سخت پاسخ ده به کشت میکروسپور نیاز باشد تیمار حرارتی طولانی‌تر استفاده شود.

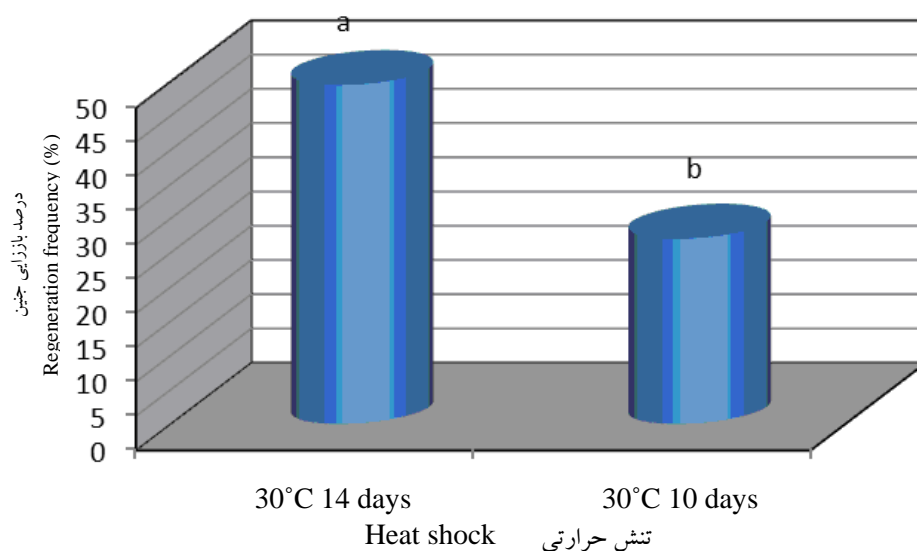
اثر متقابل ژنوتیپ و محیط نیز در میزان پاسخ‌دهی میکروسپورها به جنین‌زایی نقش دارند (Palmer and Keller, 1999). به طوری که گیاهان پرورش یافته در مزرعه نسبت به گیاهانی که در گلخانه رشد کرده بودند میزان پاسخ‌دهی بیشتری به کشت میکروسپور نشان دادند (Roulund *et al.*, 1990) و مشابه این نتیجه در تحقیق حاضر نیز مشاهده شد، چرا که گیاهان مزرعه‌ای دارای رشد کاملاً طبیعی بوده و غنچه‌هایی با میکروسپورهای فراوان و زنده تولید کردند در حالی که گیاهان رشد کرده در



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر ژنوتیپ (Hyola 401، Hyola 420 و F1) بر درصد باززایی جنین‌های منتج از میکروسپور

Fig. 5. Mean comparison for the effect of genotypes (Hyola 401 , Hyola 420 and F1) on regeneration frequency(%) of microspore-derived embryos

میانگین‌های دارای حروف مختلف در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار هستند.
Mean with different letters are significantly different at 5% probability level.



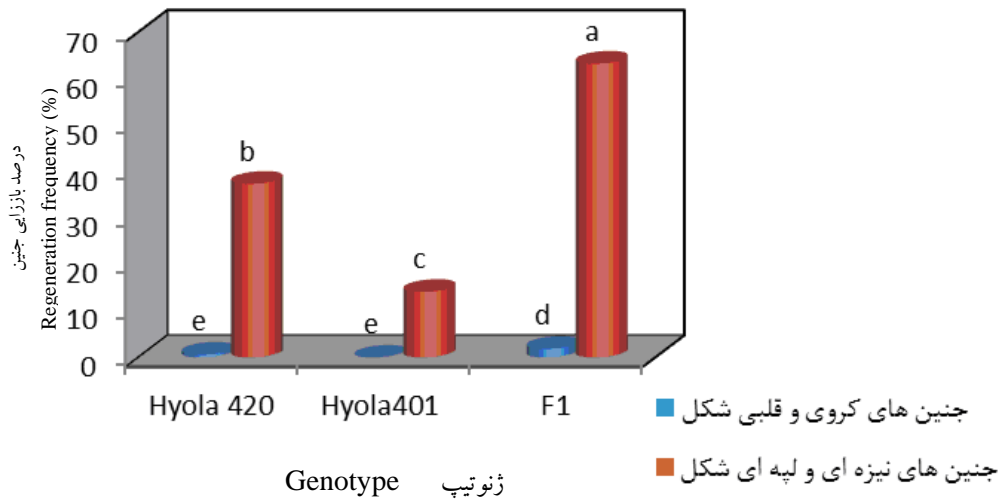
شکل ۶- مقایسه میانگین اثر تنش حرارتی بر درصد باززایی جنین

Fig. 6. Mean comparison for the effect of heat shock on regeneration frequency(%) of microspore-derived embryos

میانگین‌های دارای حروف مختلف در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار هستند.
Mean with different letters are significantly different at 5% probability level.

جنین‌های اژدری و لپه‌ای شکل در مقایسه با جنین‌های قلبی شکل بزرگ‌تر بوده و باززایی نرمال و بهتری نشان دادند (شکل ۷).

جنین‌های با اندازه متوسط و ۳۴ درصد نسبت به جنین‌های با اندازه کوچک بیشتر بود (Takahata, 1997) که مشابه این نتایج در تحقیق حاضر نیز مشاهده شد به طوری که



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر اشکال مختلف جنین بر درصد باززایی جنین

Fig. 7. Mean comparison for the effect of various shapes of microspore-derived embryos on regeneration frequency(%)

میانگین‌های دارای حروف مختلف در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار هستند.

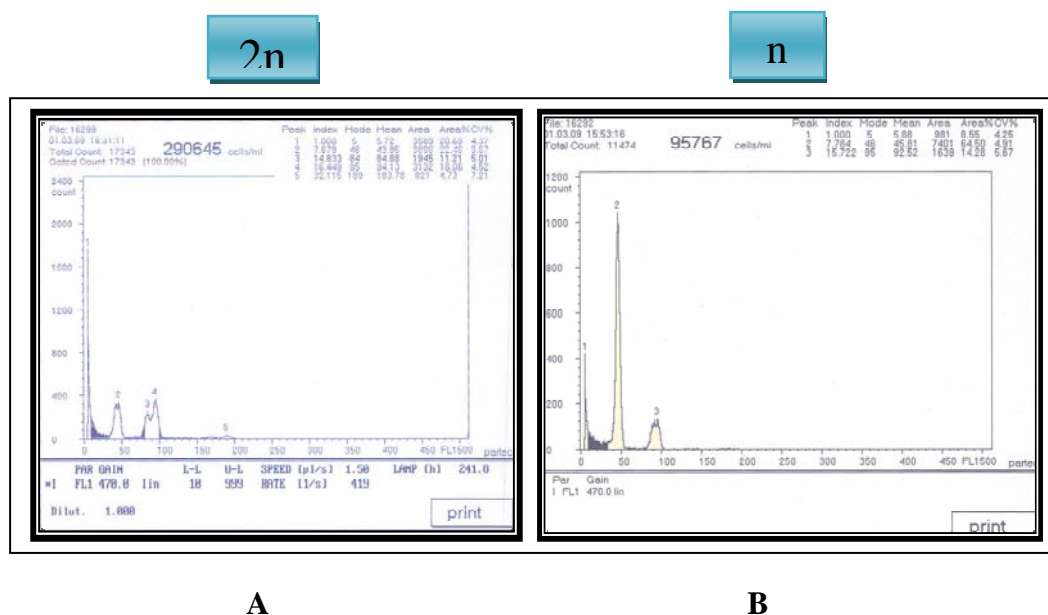
Mean with different letters are significantly different at 5% probability level.

(Kawana and Ohkawa, 1992). هرچند در تحقیق حاضر تیمار توام سرما (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز) و اسید جیبرلیک (1 mg l^{-1}) بر روی جنین‌های انتقال یافته به محیط باززایی در محیط B5 در تاریکی و سپس انتقال به روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، بیشترین تأثیر را بر روی محدود کردن جنین‌زایی ثانویه (از طریق کند کردن چرخه تقسیم سلولی) و متعاقب آن باززایی بهتر نشان داد. در مورد تأثیر سرما، مشخص شده است که با قرار گرفتن جنین‌ها در سرما، به علت یکنواخت شدن چرخه

برای باززایی گیاه از جنین‌های هاپلوئیدی کلزا می‌توان از محیط‌های کشت B5 یا MS استفاده کرد اما براساس تأکید بیشتر گزارش‌های قبلی (از قبیل Gland *et al.*, 1988)، محیط کشت B5 مورد استفاده قرار گرفت. تیمار جنین‌ها از قبیل تیمار سرمایی و تاریکی جهت افزایش باززایی مستقیم گزارش شده است (Wakui *et al.*, 1994). محققین مشاهده کردند که جنین‌هایی که با اسید آبسزیک و سرما پیش تیمار شده بودند، توانایی بالایی جهت باززایی گیاه در شرایط خاکی داشتند

تعیین سطح پلوئیدی و تیمار گیاهان هاپلوئید با کلشی‌سین
 پس از باززایی جنین‌های هاپلوئید و انتقال آن‌ها به گلدان بعد از چند برگی شدن، سطح پلوئیدی آن‌ها با دستگاه فلوسایتمتری اندازه‌گیری شد. نتیجه سطح پلوئیدی گیاهچه هاپلوئید در شکل ۱ نشان داده شده است.

سلولی کلیه سلول‌ها، باززایی گیاه افزایش می‌یابد. همچنین مشخص شده است که دوره سرمایی یکی از عوامل مهم در افزایش باززایی است به طوری که تیمار رویان‌ها به مدت ۸ تا ۱۰ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی باززایی گیاه را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد (Fletcher *et al.*, 1998).



شکل ۸- تعیین سطح پلوئیدی گیاهچه‌های هاپلوئید (A) و دیپلوئید (B) با دستگاه فلوسایتمتری
 Fig. 8. Determination of ploidy level of haploid plantlets(A) and diploids (B) using flow cytometry

والد اولیه است، پس گیاه باززایی شده، منشاء گرفته از میکروسپور گیاه دیپلوئید اولیه است. برای افزایش سطح پلوئیدی گیاهان هاپلوئید، گیاهان با کلشی‌سین با غلظت $3/4 \text{ gr l}^{-1}$ بدون DMSO در سه دوره زمانی ۱/۵، ۲ و ۷ ساعت تیمار شدند. نتایج نشان داد که تیمار ۱/۵ ساعت با کلشی‌سین گیاهان دابلدها پلوئید نرمال داد و غلاف‌های طبیعی تشکیل شدند و در نهایت

همان‌طور که در شکل ۸ (A) ملاحظه می‌شود، مد به دست آمده در گیاه هاپلوئید ۴۶ (پیک ۲) است، با توجه به شکل (B) که گیاه هاپلوئید و دیپلوئید اولیه با یک‌دیگر از نظر سطح پلوئیدی اندازه‌گیری شده است، مد گیاه دیپلوئید برابر با ۹۵ (پیک ۴) تقریباً دو برابر مد گیاه هاپلوئیدش بوده است. شکل (A) نشان می‌دهد که سطح پلوئیدی گیاه باززایی شده نصف گیاه

کلشی سین انجام شود (Fletcher *et al.*, 1998). کلشی سین با مولکول توبولین (یک نوع پروتئین) باند می‌شود. این پروتئین مانع از پلیمریزاسیون میکروتوبول و تشکیل دوک‌ها در طول متافاز شده و در نتیجه سبب دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌ها در هسته سلول در پایان میتوز می‌شود (Taji *et al.*, 2000). تیمار با کلشی سین، برای به دست آوردن گیاهانی با تعداد کروموزوم‌های مضاعف شده به سه روش می‌تواند انجام شود (Zhou *et al.*, 2002): الف) تیمار میکروسپورهای ایزوله شده، ب) تیمار جنین‌ها قبل از انتقال به محیط کشت باززایی و ج) اعمال کلشی سین روی طوقه گیاهان باززایی شده.

با توجه به نتایج این بررسی به نظر می‌رسد که روش معرفی شده در این پژوهش بتواند به سهولت برای تهیه لاین‌های دابلدهاپلوئید به منظور استفاده در برنامه‌های به نژادی کلزا مورد بهره برداری قرار گیرد.

سپاسگزاری

این تحقیق بخشی از پروژه تحقیقاتی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی به شماره ۸۶۰۰۱-۸۶۰۰۱-۰۵-۰۵-۱۲ است. بدین وسیله از آقای دکتر علی اکبر حبشی رئیس بخش کشت بافت و انتقال ژن این پژوهشکده به خاطر فراهم کردن مواد شیمیایی و امکانات آزمایشگاهی و همچنین آقای مهندس محمدرضا شمس سروشک به خاطر کمک‌های آزمایشگاهی و مزرعه‌ای تشکر و قدردانی می‌شود.

بذرهای لاین‌های دابلدهاپلوئید جمع‌آوری شد و بقیه لاین‌ها در حال بذرگیری هستند (شکل ۱).

بهترین نتیجه تیمار با کلشی سین از نظر درصد تولید گیاهان دابلدهاپلوئید، قرارگیری طوقه و ریشه‌های گیاهچه‌ها در غلظت $3/4 \text{ g l}^{-1}$ کلشی سین به مدت ۱/۵ ساعت بود که گزارش‌های قبلی نیز آن را تایید می‌کند (Zhou *et al.*, 2002). تیمار میکروسپورها بلافاصله پس از جداسازی با کلشی سین (500 mg l^{-1} به مدت ۱۵ ساعت) نیز با تاثیر معنی‌دار بر روی درصد مضاعف شدگی مورد استفاده قرار گرفته است (Zhou *et al.*, 2002).

دو برابر کردن کروموزوم‌های گیاهان هاپلوئید و تولید جنین و سپس گیاهان دابلدهاپلوئید از دو جهت دارای اهمیت بسیار بالایی است. اول آن که هاپلوئیدها عقیم می‌باشند و گیاهان هاپلوئید عقیم نمی‌توانند به بذر بروند و مراحل زایشی را طی کنند و دیگر آن که جنبه مهم تکنولوژی کشت میکروسپور، تولید لاین‌های هموزیگوت جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی است. چون گیاهان حاصل از کشت میکروسپور در کلزا اکثراً هاپلوئید و عقیم هستند، لذا برای تولید گیاهانی با گل‌ها، شاخه‌ها و تمام قسمت‌های گیاهی دیپلوئید و بارور تعداد کروموزوم‌های این گیاهان باید دو برابر شود. دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌ها و تولید گیاهان دابلدهاپلوئید می‌تواند از طریق دو برابر شدن خودبه‌خودی کروموزوم‌ها در طی فرآیند آندومیتوز (تکثیر و دو برابر شدن کروموزوم‌ها بدون تقسیم هسته) و یا به وسیله تیمار با یک ماده آنتی‌میکروتوبول نظیر

References

- Abdullahi, B. R., Moeini, A., Haddadi, P., and Jalali Jorani, M. 2003.** Somatic embryogenesis from isolated microspore culture in different cultivars of canola (*Brassica napus* L.). Pajouhesh-va-Sazandegi 3: 48-52 (in Persian).
- Aslani, F. 2002.** Study of microspore culture and production of pure lines through double haploidy in different cultivars of canola. MSc. Thesis, College of Agriculture, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran (in Persian).
- Bagheri, H. 2000.** Study of isolated microspore culture in different genotypes of canola. MSc. Thesis, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (in Persian).
- Burbalis, N., Kuusiene, S., and Sliesaravicius, A. 2002.** Plant regeneration in androgenic culture of spring rapeseed (*Brassica napus* L.). Sodininkyste ir Darzinikyste 19: 419 – 426.
- Chuong, P. V., and Beversdorf, W. D. 1985.** High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun. Plant Science 39: 219-226.
- Custers, J. B. M., Cordwener, J. H. G., Nollen, Y., Dons, J. J. M., and Van Lookeren Campagne, M. M. 1994.** Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. Plant Cell Rep. 13: 267-271.
- Duijs, J. G., Voorrips, R. E., Visser, D. L., and Custers, J. B. M. 1992.** Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea*. Euphytica 6: 45-55.
- Enayati Shariatpanahi, M., and Emami Meybodi, D. 2009.** Microspores: a haploid cell with various applications in genetics and plant breeding. Modern Genetics Journal 4(3): 5-16 (in Persian).
- Fan, Z., Armstrong, K. C., and Keller, W. A. 1988.** Development of microspores *in vivo* and *in vitro* in *Brassica napus* L. Protoplasma 147: 191-199.
- Ferrie, A. M. R., and Keller, W. A. 1995.** Microspore culture. pp. 155-164. In: Gamborg, O. L., and Philips, G. C. (eds.) Plant Cell, Tissue and Organ Culture Fundamental Methods. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Ferrie A. M. R., Taylor, S. L., Mackenzie, W. A., and Keller, W. A. 1999.** Microspore embryogenesis of high erucic acid *Brassica oleracea* germplasm. Plant Cell, Tissue

and Organ Culture 57: 79-84.

Fletcher, R., Coventry, J., and Kott, L. S. 1998. Double Haploid Technology for Spring and Winter *Brassica napus*. Technical Bulletin, OAC Publication, Canada.

Gland, A., Lichter, R., and Schweiger, H. G. 1988. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore culture of *Brassica napus*. Plant Physiology 132: 613-617.

Gu H. H., Zhou, W. J., and Hgberg, P. 2003. High frequency spontaneous production of doubled haploid plants in microspore culture of Brassica. Euphytica 134: 239-245.

Hosseinpour, B. 2003. Production of haploid plants via microspore culture in canola. MSc. Thesis, College of Agriculture, Mazandaran University, Sari, Iran (in Persian).

Kawana, H., and Ohkawa, Y. 1992. Methods for high frequency leafing of microspore derived embryos. Japanese Journal of Breeding 42: 70-71.

Kott, L. S., and Polsoni, L. 1987. Autotoxicity in isolated microspore culture of *Brassica napus*. Canadian Journal of Botany 66: 1665-1670.

Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* L. Z. Pflanzenphysiologie 105: 427-434.

Palmer, C. E., and Keller, W. E. 1999. Haploidy. pp. 274-286. In: Gomez-Campo, C. (ed.). Biology of Brassica Coenospecies. Elsevier Sci. B. V. The Netherlands.

Roulund, N., Hansted, L. Anderson, S. B., and Faresveit, B. 1990. Effect of genotype, environment and carbohydrate on anther culture response in head cabbage. Euphytica 49: 237-242.

Shariatpanahi, M. E., Bal, U., Heberle-Bors, E., and Touraev, A. 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. Physiologia Plantarum 127: 519-534.

Simmonds, D. H., and Keller, W. A. 1999. Significance of preprophase bands of microtubules in the induction of microspore embryogenesis of *Brassica napus*. Planta 208: 383-391.

Taji, A., Kumar, P. P., and Lakshmanan, P. 2000. *In vitro* Plant Breeding. Food Products Press, New York, USA.

Takahata, Y. 1997. Microspore culture. pp. 160-181. In: Kalia, H. R. and Gupta, S. K. (eds.) Recent Advances in Oilseed Brassicas. Kalyani Publishers, Ludhiana, India.

Takahata, Y., Brown, D. C. W., and Keller, W. A. 1991. Effect of donor plant age and inflorescence age on microspore culture of *Brassica napus*. Euphytica 58: 51-55.

- Takahata, Y., and Keller, W. A. 1991.** High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Science* 74: 235-242.
- Touraev A, Pfosser, M., and Heberle-Bors, E. 2001.** The microspore: a haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research* 35: 53-109.
- Touraev, A., Vicente, O., and Heberle-Bors, E. 1997.** Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Plant Science* 2: 297-302.
- Wakui, L., Takahata, Y., and Kaizuma, N. 1994.** Effect of abscisic acid and high osmoticum concentration on the induction of desiccation tolerance in microspore-derived embryos of Chinese cabbage (*Brassica compestris* L.). *Breeding Science* 44: 29.
- Wang M., Van Bergen, S., And Van Duyijn, B. 2002.** Insights into a key development switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiology* 124: 5213-530.
- Zhang, F. L., and Takahata, Y. 2001.** Inheritance of microspore embryogenic ability in Brassica crops. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 254-258.
- Zhao, J., Simmonds, D. H., and William, N. 1996.** High frequency production of doubled haploid plants of *Brassica napus* cv. Topas derived from colchicines-induced microspore embryogenesis without heat shock. *Plant Cell Rep.* 15: 668-671.
- Zhou, W. J., Hagberg, P., and Tang, G. X. 2002.** Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicines treatment of isolated microspores in spring *Brassica napus*. *Euphytica* 128: 27-34.

