پژوهش و سازندگی
در زراعت و باغبانی
شماره ۶۰، پاییز ۱۳۸۲

رویان‌زایی از کشت جدایه های میکروسپوری در ارقام مختلف کلزا (*Brassica napus* L.)

• **محمدرضا عبدالهی**، دانشجوی دکتری، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات
• **احمد معینی**، عضو هیات علمی دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات
• **پرهام حدادی**، دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات
• **مختار جلالی جواران**، عضو هیات علمی دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات

تاریخ دریافت :آذر ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۱۳۸۲

چکیده

در این آزمایش ۳ رقم کلزای بهاره گلوبال[1]، پی اف[2] و آپشن[3] به عنوان مواد گیاهی انتخاب گردیدند. گیاهان دهنده میکروسپورها در اتاق رشـدی با دمای ۱۵/۱۰ درجه سـانتیگراد و دوره نوری ۱۶/۸ ساعت(شـب / روز) قرار داده شدند. میکروسپورها در مرحلهٔ تک هسـته ای انتهایی تا ابتدای دو هسـته ای از غنچه هایی به طول ۲/۵ تا ۳/۵ میلیمتر جدا شـدند و در محیط کشت NLN-۱۳ حاوی ۱۳٪ سـاکاروز کشت گردیدند. میکروسپورهای کشت شـده به مدت ۱۴ روز در معرض تنش دمایی ۳۰درجه سانتیگراد و در شرایط تاریکی قرار گرفتند و پس از آن به اتاق رشدی با دمای ۲۵درجه سانتیگراد و در داخل یک لرزاننده منتقل گردیدند. ارقام به لحاظ توان جنین زایی میکروسپورها دارای اختلاف معنی داری در سطح ۱٪ بودند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که رقم پی اف و رقم آپشن به ترتیب با تولید ۳۴۱۲/۲۵ و ۳۰۷۹/۵ جنین، بیشترین تعداد جنین را تولید کردند.

کلمات کلیدی: کلزا ، *Brassica napus L*.، کشت میکروسپور، جنین زایی

Pajouhesh & Sazandegi No:60 pp: 48-52

Embryogenesis from isolated microspore culture in different cultivars of rapeseed (*Brassica napus L.*)

By: M. Abdollahi, Student of ph.D, Department of plant breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modarres Uneversity., A. Moieni, Assistant Prof of Tarbiat Modarres University, Departmint of Plant Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University., P. Haddadi, Student of M.Sc. (AM), Department of Plant Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University. and M. Jalali Javaran, Assistant Prof of Tarbiat Modarres University, Departmint of Plant Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University.,

Three spring cultivars of rapeseed (Global, PF and Option) were chosen as plant materials for this experiment. Donor plants were grown in a growth chamber at a day/night temperature of 15/10°C (16/8 hours). Microspores at late-uninucleate to early- bionucleate were isolated from buds 2.5-3.5 mm in length and cultured in modified Lichter medium (NLN-13) containing 13% sucrose. Cultures incubated at 30°C and darkness for 14 days, then transferred to shaker in the growth chamber at 25°C. Results showed that there were significant differences between cultivars at 1% level. The comparison of means showed that PF and Option, with 3412/25 and 3079/5 embryos were the best cultivars for embryogenesis respectively.

Key Words: *Brassica napus L.*, Rapeseed, Microspore Culture, Embryogenesis

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

اهمیت استفاده از گیاهان هاپلوئید در برنامه های اصلاح نباتات از مدت ها پیش برای دانشمندان مسلم گردیده است و یکی از موضوعات مهم تحقیقاتی در این زمینه تولید لاین های هموزیگوس جهت تولید گیاهان هیبرید در گونه های خودناسازگار می باشد. گیاهان هاپلوئید در اصلاح نباتات و مهندسی ژنتیک[۴] دارای کاربرد فراوانی هستند. مهمترین استفاده آنها در اصلاح نباتات، تولید لاین های کاملاً خالص از طریق دو برابر کردن کروموزومهای گیاهان هاپلوئید می باشد (۹). جهت مفید واقع شدن روش هاپلوئیدی در اصلاح گیاهان زراعی، هاپلوئیدها بایستی به صورت موثر و در دامنه وسیعی از گونه‌ها و ژنوتیپ‌ها تولید شوند. روشهای متعددی جهت تولید گیاهان هاپلوئید و به دنبال آن گیاهان هاپلوئید مضاعف وجود دارد که یکی از این روشها آندروژنز[۵] می‌باشد که به دو روش کشت بساک[۶] و کشت میکروسپور[۷] انجام می شود.

علیرغم مشکلات فنی روش کشت میکروسپور، این روش در مقایسه با کشت بساک دارای مزایایی است، از جمله: کاهش باززایی گیاهان دیپلوئید به دلیل حذف بافت‌های دیپلوئید دیوارهٔ بساک، حذف مواد ممانعت‌کننده رشد میکروسپورها که در کشت بساک از دیواره بساک ترشح می‌شود، مشاهده و پیگیری دقیق تمام مراحل آندروژنز، جذب بهتر مواد غذایی به دلیل تماس مستقیم میکروسپورها با محیط کشت، تبدیل مستقیم اکثر میکروسپورها به جنین، کاهش تولید شیمر به دلیل عدم تشکیل کالوس و مناسب بودن میکروسپورها برای مطالعات موتاسیون، دست ورزیهای ژنتیکی و انتقال ژن(۱۴،۴) .

کشت میکروسپور کلزا برای اولین بار توسط Lichter در سال ۱۹۸۲ (۱۲) گزارش گردید و از آن تاریخ به بعد پیشرفت های قابل توجهی برای توسعهٔ یک روش مؤثر برای تولید جنین های هاپلوئید حاصل از میکروسپور در گونه های مختلف براسیکا صورت گرفته است (۱۶،۵). فاکتورهای مختلفی، جنین زایی میکروسپورها در کلزا را تحت تأثیر قرار می‌دهند از قبیل: ژنوتیپ گیاه، شرایط مختلف و متعدد رشد گیاه، محیط کشت القاء جنین، اندازه غنچه که بعضاً بهینه‌سازی شده‌اند(۱۰). کشت میکروسپورهای کلزا در ایران برای اولین بار در قالب یک پایان‌نامه کارشناسی ارشد در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد(۱) که در این تحقیق تعدادی از ژنوتیپ‌های بهاره و پاییزه کلزا، کشت شده در مزرعه، از نظر پاسخ به جنین‌زایی میکروسپورها در شرایط درون شیشه‌ای بررسی شدند که تعداد بسیار کمی جنین فقط از ژنوتیپ‌های پاییزه تولید شد. در تحقیقی دیگر اثر تنش دمایی $32^{\circ}c$ درجه سانتیگراد در روی چند رقم کلزا مطالعه شد و نشان داده گردید که ۲ تا ۳ روز تنش $32^{\circ}c$ درجه سانتیگراد باعث بهبود جنین‌زایی گردید و به طور متوسط از هر پتری دیش ۳۲ جنین بدست آمد(۲). در این تحقیق، جنین‌زایی سه رقم کلزای بهاره مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

در این آزمایش سه رقم کلزای بهاره (گلوبال، پی اف و آپشن) به عنوان مادهٔ گیاهی در نظر گرفته شدند. گیاهان مادری در داخل اتاق رشدی در دمای $15/10^{\circ}$درجه سانتیگراد (شب/ روز) با فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی رشد کردند. ۳ ماه پس از کشت بذور ،حدود ۱۰۰ غنچه به طول ۲/۵ تا ۳/۵ میلیمتر برداشت شد. ضد عفونی غنچه ها، با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵٪ (گلرنگ) به مدت ۱۰ دقیقه و سپس دو مرتبه شستشو با آب مقطر استریل انجام شدند. پس از انجام عمل شستشو، غنچه ها در یک آسیاب کوچک به همراه ۳۰ میلی لیتر محلول جداسازی میکروسپورها (محلول حاوی ۱۳٪ ساکاروز با pH=۶) (۷) آسیاب شدند. سپس سوسپانسیون حاصل به ترتیب از دو الک آزمایشگاهی با سوراخهایی به قطر ۱۰۶µm و ۵۳ µm عبور داده شد. سوسپانسیون حاصل دو بار و هر دفعه به مدت ۴ دقیقه در دور rpm ۱۲۷۰ سانتریفیوژ شد و پس از انجام هر سانتریفیوژ مایع سبز رنگ بالای رسوب زردرنگ میکروسپورها حذف گردید. بعد از سانتریفیوژ دوم، پس از حذف مایع سبز رنگ بالای رسوب میکروسپورها حدود میلی لیتر ۵-۴ محیط کشت NLN-۱۳ (۱۲) به رسوب میکروسپورها اضافه گردید. در این مرحله با استفاده از یک لام شمارش سلول، تراکم میکروسپورها در محیط کشت تعیین گردید و سوسپانسیون میکروسپورها به حجم مورد نظر رسانده شد. سپس محیط کشت حاوی میکروسپورها در پتری دیش های شیشه ای به ابعاد ۱۵×۱۲۰ میلی متر توزیع گردید و به انکوباتوری با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و تاریکی منتقل شدند. ۱۴ روز بعد، زمانی که جنین ها با چشم غیر مسلح قابل دیدن بودند، پتری دیشها روی یک لرزاننده، در داخل اتاق رشدی با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و تاریکی قرار گرفتند. ۳۰ روز پس از کشت میکروسپورها، جنینهای رشد یافته، آماده انتقال به محیط باززایی B۵ (۸) بودند. در این تحقیق از یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار (رقم) و ۴ تکرار استفاده گردید.

نتایج

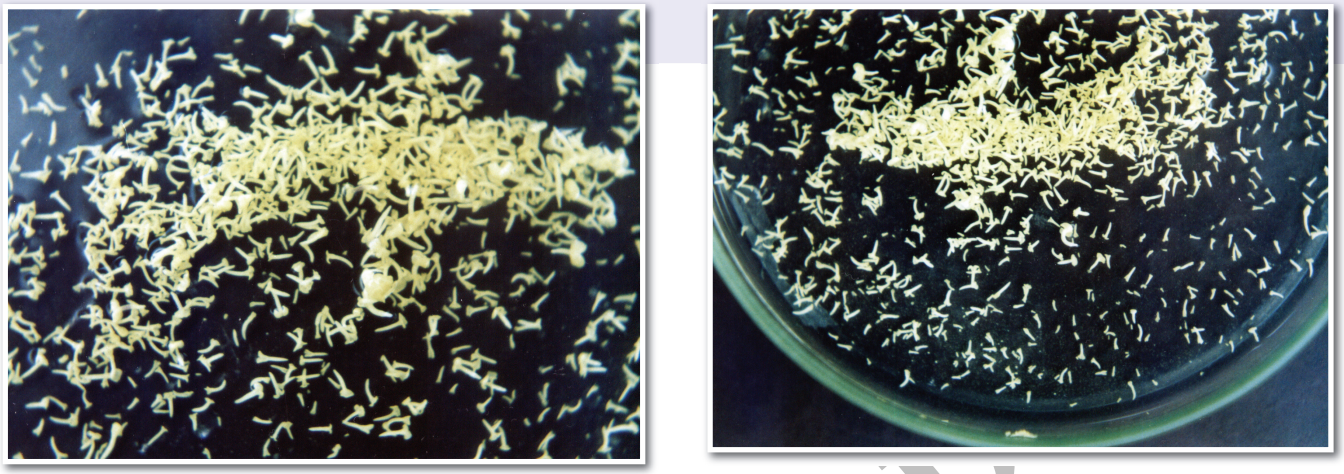
نتایج حاصل از تجزیهٔ واریانس صفت جنین زایی برای ۳ رقم آپشن، پی اف و گلوبال نشان داد که ارقام مختلف در سطح ۱٪ با هم اختلاف معنی داری دارند (جدول شماره ۱) و کلیهٔ ارقام استفاده شده در این آزمایش واکنش متفاوتی نسبت به کشت میکروسپور داشته اند.

مقایسه میانگین ارقام مختلف کلزا به روش دانکن(نمودار ۱) نشان داد که اختلاف معنی داری در سطح ۱٪ بین آنها وجود دارد. ارقام پی اف و آپشن به ترتیب با تولید ۳۴۱۲/۲۵ و ۳۰۷۹/۵ جنین، بیشترین (گروه a) و رقم گلوبال با تولید۴۶۵ جنین، کمترین تعداد جنین(گروه b) را تولید کردند. در شکل زیر تولید انبوه جنین از کشتهای میکروسپورهای کلزا و تصویر یک جنین بالغ در مرحله لپه ای شکل نشان داده شده است(شکلهای شماره ۱ و ۲).

بحث

با بررسی دقیق منابع خارجی و داخلی، به غیر از کار خنجی (۲) که از رقم گلوبال با ۲ تا ۳ روز تنش دمایی ۳۲ درجه سا نتی‌گراد استفاده کرد، در زمینه مطالعه اثر ژنوتیپ بر روی جنین‌زایی میکروسپورهای کلزا،

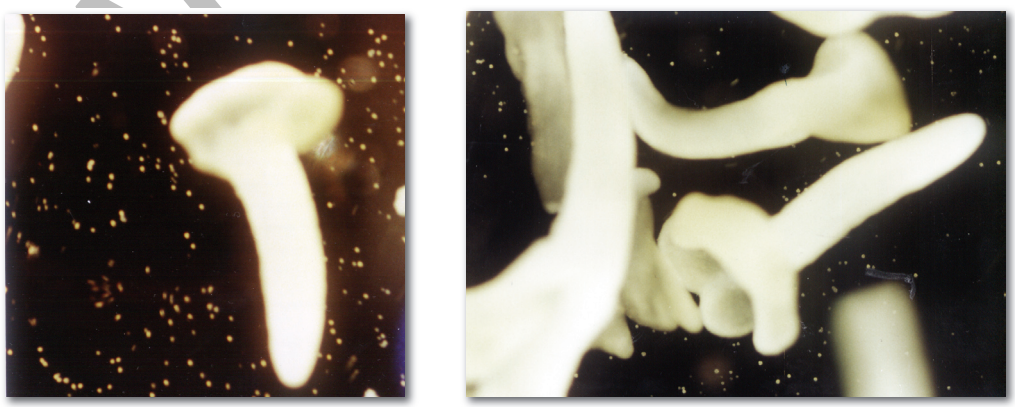
Archive of SID
www.SID.ir



شکل شماره ۱- تولید انبوه جنین در کشت میکروسپورهای کلزا

منبع دیگری که در ارتبا ط با ارقام مورد استفاده در این تحقیق باشد، پیدا نشد و به نظر می‌رسد که ارقام پی‌اف و آپشن برای اولین بار در یک آزمایش مستقل به لحاظ جنین‌زایی میکروسپورها بررسی می‌شوند. نتایج این آزمایش با نتایج محققین مبنی بر اینکه جنین زایی میکروسپورهای گیاهان جنس براسیکا وابسته به ژنوتیپ است و تنوع ژنتیکی بالایی در عملکرد جنین زایی برای ژنوتیپ‌های مختلف وجود دارد، مطابقت می‌کند (۱۱)، به طوری که پاسخ‌دهی به کشت میکروسپور در کلزا با توجه به ژنوتیپ گیاه فرق می‌کند (۱۷).

توانایی جنین زایی میکروسپورها توسط فاکتورهای ژنتیکی کنترل می شوند و پارامترهای کمی[۸] وراثتی در جنین زایی میکروسپورها دخالت می‌کنند (۱۸). فاکتورهای ژنتیکی مؤثر در جنین زایی از بسیاری جهات بین گونه‌های براسیکا مشترک هستند به طوری که در اکثر آنها اثرات غالبیت و افزایشی ژنها روی میکروسپورها اثر مثبتی دارند. در همهٔ گونه ها هر دو اثرات افزایشی و غالبیت از نظر افزایش میزان جنین زایی معنی دار هستند و هیچ اثرات مادری در جنین زایی میکروسپورها مشاهده نشده است و از طرف دیگر وراثت پذیری صفت جنین‌زایی در میکروسپورها بالا میباشد که این موارد بیان کنندهٔ کنترل صفت جنینزایی در گونه های مختلف جنس براسیکا توسط فاکتورهای ژنتیکی مشابه می‌باشد. در کلزا صفت جنین زایی توسط ۲ مکان ژنی با اثرات افزایشی کنترل می‌شود در حالیکه ژنهایی با اثرات غالب هم در جنین زایی میکروسپورها اثرات مثبتی



شکل شماره ۲- تصویر یک جنین بالغ لپه ای شکل ازمیکروسپور کلزا

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- آنالیز واریانس ارقام مختلف کلزا برای صفت جنینزایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
رقم	۲	۱۰۴۲۱۷۴۳/۵۸	۱۴/۴۴۴**
خطای آزمایشی	۹	۷۲۱۵۰۳/۵۳۸	

** وجود اختلاف معنیدار در سطح احتمال ۱٪

دارند (۱۸).

آزمایشهای اصلاحی، این حقیقت را آشکار ساخته اند که صفاتی که مربوط به پاسخ به کشت میکروسپور هستند، میتوانند از ژنوتیپ هایی با میزان پاسخدهی بالابه ژنوتیپ هایی با پاسخ دهی پایین یا غیر پاسخده منتقل شوند (۱۳). شواهدی وجود دارد که هیبریدها[9] با یک والد مشترک و تحت تیمارهای یکسان به طور مشابهای به جنین زایی میکروسپورها پاسخ می دهند، که این اهمیت کنترل ژنتیکی را برای اجزاء عملکرد در تولید جنین تأیید می‌کند (۶). بالاترین میزان جنین زایی در کشت میکروسپور کلزا در واریتهٔ Topas مشاهده شده است، به طوری که این گیاه به عنوان یک گیاه مدل در مطالعهٔ مراحل رشد و نموی میکروسپور اهمیت فراوانی پیدا کرده است (۱۹). در داخل یک ژنوتیپ ممکن است از گیاهی به گیاه دیگر از لحاظ میزان جنین زایی تفاوت وجود داشته باشد. چون اثرات متقابل ژنوتیپ و محیط هم در میزان پاسخ دهی میکروسپورها به جنین زایی نقش دارند (۱۳)، به طوری که گیاهان پرورش یافته در مزرعه نسبت به گیاهانی که در گلخانه رشد کرده بودند میزان پاسخ دهی بیشتری به کشت میکروسپور نشان دادند (۱۵). پاسخ به کشت میکروسپور از نظر ژنتیکی در گیاهان براسیکا با تعیین مارکرهای مولکولی[10] مربوط به مکان یابی ژنهایی که در جنین زایی دخالت می کنند، بهبود خواهد یافت و تعیین این ژن ها وانتخاب ژنوتیپ هایی با پاسخدهی بالا به جنین زایی در این راستا مفید می باشند(۱۸). در جنس براسیکا احتمالاً کشت میکروسپور در گونه *B.napus* و بعضی از ژنوتیپهای گونه *B.rapa* مؤثرتر از دیگر گونهها و ژنوتیپهای گونه می‌باشد (۳).

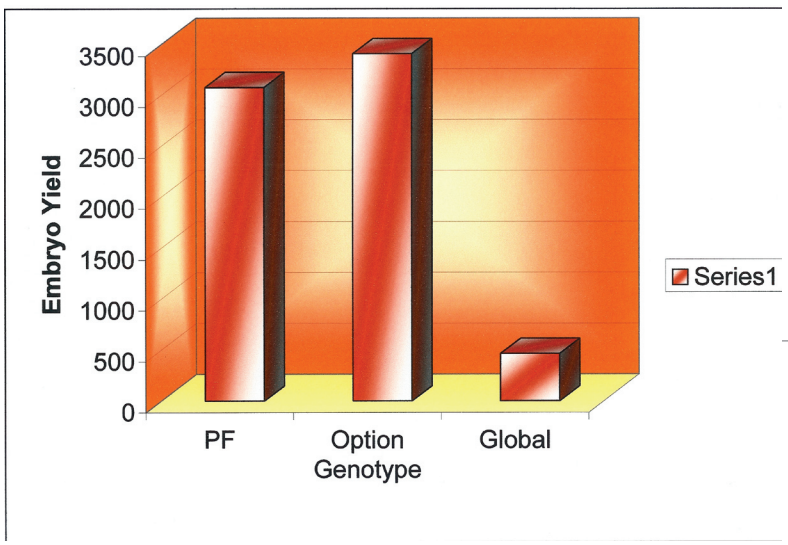
با توجه به وجود تنوع ژنتیکی برای جنین‌زایی از طریق کشت میکروسپور کلزا، با ادامه تحقیقات روی سایر مواد ژنتیکی کلزا،می‌توان بهترین ژنوتیپ برای جنین‌زایی را معرفی نمود و در صورت نیاز، ژنهای مورد نظر را از طریق روشهای کلاسیک یا انتقال ژن به ژنوتیپ یا ارقام رکلیرنت یا با پتانسیل ضعیف جنین‌زایی انتقال داد.

پاورقی‌ها

1- Global
2- PF
3- Option
4- Genetic Engineering
5- Androgenesis
6- Anther Culture
7- Microspore Culture
8- Quantitive Parpameters
9- Hybrids
10- Molecular Markers

منابع مورد استفاده

۱- باقری، ه ،۱۳۷۹. بررسی پاسخ به کشت میکروسپورهای ایزوله در تعدادی از ژنوتیپهای کلزا. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس، ۸۴ ص.



مقایسه میانگین ارقام مختلف کلزا از نظر میزان جنین‌زایی

www.SID.ir

۲- خنجی، ی ،۱۳۸۰. مطالعه آندروژنز در کلزا و گندم. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس، ۱۲۵ ص

3- Burnett, L., Yarrow, S. and Huang, B. 1992, Embryogenesis and plant regeneration from isolated microspores of *Brassica rapa*. Plant Cell Reports, 11: 215-218.

4- Chen, J. L. and Beversdorf, W. D.1992, Production of spontaneous diploid lines in isolated microspores following cryopreservation of spring rapeseed. Plant Breeding, 108: 324-327.

5- Chuong, P. V. and Beversdorf, W. D. 1985, High frequency embryogenesis through isolated microspore culturre in *Brassica napus* L. and B. carinata Braun. Plant Science, 39: 219-226.

6- Dunwell, J.M. 1996, Microspore culture. In: Mohan Jain, Sopory, S.K. and Veilleux, R.E. (eds), In vitro haploid production in Higher plants. Vol.1.Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 205-216.

7- Fletcher, R., Coventry, J. and Kott. L. S. 1998, Double haploid technology for spring and winter *Brassica napus*, Technical Bulletin, OAC Publication, Canada.

8- Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojiwa, K. 1968, Nutrient requirements of suspension culture of soybean root callus. Experimental Cell Research, 50: 151-158.

9- Kasha, k.J. 1974, Haploid in Higher Plants : Advances and potential (proceedings of the 1st International Symposium). University of Guelph, Canada.

10- Keller, W. A., Arnison, P. G. and Cardy, B. K. 1987. Haploids from gametophytic cells recent development and future prospects. In: *Plant Tissue and Cell Culture,* Green, C.E., Somers, D.A., Nackett W.P. and Biesbore, D .D. (Ed). pp:233-241. Allan R. Liss, New York, USA.

11- Kuginuki, Y., Nakamura, K., Hida, K. and Yoshikawa, H. 1997, Varietal differences in embryogenic and regenerative ability in microspore culture of Chinese cabbag (*Brassica rapa* L. ssp. Pekinensis). Breed Sci 47: 341-346.

12- Lichter, R. 1982, Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspore of different *Brassicacea species*. Plant Breeding, 103: 119-123.

13- Palmer, C.E, Keller, W.A. 1999, Haploidy. In: Gomez-campo, C. (ed), Biology of Brassica Coenospecies. Elsevier Science B.V.All rights reserved. pp. 247-286.

14- Pickering, R. A. and Devaux, P. 1992. Haploid production approaches and use in plant breeding. In: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and U.K. CAB International, ed., Shewry, P.R. Barley, pp. 519-547.

15- 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.

16- Telmer, C.A., Newcomb, W. and Simmonds, D.H. (1995).Cellular changes during heat shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* cv. Topas.

Protoplasma, 185: 106-112.

17- Thurling, N. and Chay, P. M. .1984. The ifluence of donor plant genotype and environment on production of molticellular microspores in cultured of *Brassica napus* spp. Annual Botany, 54: 681-693.

18- Zhang, F. L. and Takahata, Y. .2000. Inheritance of microspore embryogenic ability in *Brassica crops*. Theor Appl Genet, 103: 254-258.

19- 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 Reports, 15: 668-671.

Archive of SID

www.SID.ir