بسم الله الرحمن الرحيم

نوع نشریه: دستورالعمل فنی
نام نشریه: تولید لاین‌های خالص ژنتیکی در کلزا (*Brassica napus* L.) از طریق فناوری هاپلوئیدی
نویسندگان: دکتر مهران عنایتی شریعت‌پناهی و مهناز عروجلو
ویراستار علمی: دکتر رضا ضرغامی
ویراستاران ادبی: دکتر حسن رهنما و عصمت جعفری‌نژاد
طراحی: محمد جداری
تهیه شده در: پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
شمارگان:۳۰
نوبت انتشار: اول
سال انتشار: ۱۳۹۷
مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است.

شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی ۵۴۸۲۷ به تاریخ ۱۳۹۷/۱۰/۲۴ است

تولید لاین‌های خالص ژنتیکی در کلزا (*Brassica napus* L.) از طریق فناوری هاپلوئیدی

دکتر مهران عنایتی‌شریعت‌پناهی

مهناز عروجلو

فهرست مطالب

مقدمه ۱
مواد و روش‌ها ۵
کشت مواد گیاهی والدینی ۵
شرایط اتاق رشد ٦
مراقبت‌های زراعی ٦
برداشت غنچه‌ها و تعیین مرحله تکوینی میکروسپورها ٦
روش رنگ‌آمیزی با رنگ فلوئورسنت DAPI ۷
محیط‌های جداسازی، جنین‌زایی و باززایی گیاه از میکروسپورها ۸
محیط جداسازی میکروسپورها ۸
محیط کشت جنین‌زایی مستقیم میکروسپورها ۸
سترون کردن محیط کشت جنین‌زایی میکروسپورها ۸
محیط کشت باززایی گیاه از جنین‌های حاصل از کشت میکروسپورهای کلزا ۹
مراحل کشت میکروسپورهای کلزا ۱۱
برداشت غنچه‌ها ۱۱
استریل کردن غنچه‌ها ۱۱
استخراج میکروسپورها ۱۱
توزیع سوسپانسیون حاوی میکروسپورها در پتری‌دیش‌ها ۱۲
تنش حرارتی ۱۳
باززایی گیاه از جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور ۱۳
باززایی گیاهچه‌ها ۱٤
تهیه محیط کشت باززایی ۱٤
انتقال جنین‌های بالغ به محیط کشت باززایی ۱٤
اعمال پیش‌تیمار سرمایی ۱۵
انتقال جنین‌ها به اتاق رشد ۱۵
انتقال گیاهچه‌های نرمال به شیشه (جار) کشت‌بافتی ۱۵
انتقال گیاهچه‌ها به گلدان ۱٦
بررسی سطح پلوئیدی گیاهچه‌های باززایی‌شده با روش فلوسایتومتری ۱٦
تیمار گیاهچه‌های هاپلوئید با کلشی‌سین برای ایجاد گیاهان دابلدهاپلوئید ۱۹
نتیجه‌گیری ۲۰
سپاس‌گزاری ۲۰
فهرست منابع ۲۰

چکیده

کلزا دارای پتانسیل عملکرد بالا بوده و در بین دانه‌های روغنی از درصد روغن دانه بالایی (۴۵-۴۰ درصد) برخوردار است. تولید بذور هیبرید F_1 به دلیل افزایش معنی‌دار در عملکرد، قیمت بالا و امکان محافظت از حقوق اصلاح‌گر، کارآمدترین و جذاب‌ترین تکنولوژی برای مؤسسات تولید بذر می‌باشد. اصلاح بذور هیبرید F_1 کلزا، به دسترسی تجاری به گیاهان خالص از نظر ژنتیکی (لاین‌های اینبرد) وابسته است. برای ایجاد لاین‌های اینبرد معمولاً از روش‌های پرهزینه و زمان‌بر نظیر خودگشنی استفاده می‌شود. ایجاد فن‌آوری‌های کارآمد جدید نظیر هاپلوئیدهای مضاعف شده (دابلدهاپلوییدها) می‌تواند یک راه‌حل کارآمد و سریع برای تهیه لاین‌های خالص باشد. در این نشریه مراحل تولید لاین‌های دابلدهاپلوئید کلزا از طریق روش جنین‌زایی میکروسپور به طور کامل ارایه شده است.

کلمات کلیدی: کلزا، هاپلوئید/دابلدهاپلوئید، لاین خالص، هیبرید F_1

مقدمه

دانه‌های روغنی با توجه به بازار وسیع مصرف و اهمیت بالا از لحاظ غذایی، در سطح ملی از اولویت خاصی برخوردار هستند و از دیرباز، بخش مهمی از کشاورزی کشورها را تشکیل داده و حتی برخی از آن‌ها جزء اقلام عمده صادراتی کشورها محسوب شده‌اند. در بین دانه‌های روغنی، گیاه کلزا به عنوان یک گیاه مناسب برای کاشت در شرایط آب و هوایی ایران مورد توجه قرار گرفته است. کلزا با بیش از ٤٠ درصد روغن در دانه، از گیاهان مهم جهت توسعه کشت نباتات روغنی و تولید روغن نباتی در ایران است. قابلیت کشت در نقاط مختلف کشور، درصد بالای روغن و کیفیت بالای روغن از جمله ویژگی‌های منحصر به فرد کلزا است که سبب شده است که توسعه کشت این گیاه، به عنوان نقطه امیدی جهت تأمین روغن خام مورد نیاز کشور به شمار رود. این گیاه در برابر خشکی و سرما مقاوم بوده و به دلیل سازگاری، دامنه کشت وسیعی دارد (دهشیری، ۱۳۷۸). کلزا با نام علمی *Brassica napus* L. گیاهی است روغنی از خانواده شب‌بویان و آلوتتراپلوییدبا ۱۹ جفت کروموزم ($2n = 4x = 38$) که دارای دو تیپ متفاوت بهاره و پائیزه است. تیپ بهاره نسبت به تیپ پاییزه کم محصول‌تر و کم ارتفاع‌تر بوده و به سرما حساس‌تر است ولی در مقابل، زودرس‌تر از تیپ پائیزه بوده و در مناطق دارای زمستان‌های معتدل قابل‌کشت است. تیپ پاییزه پرمحصول‌تر، قدبلندتر و مقاوم‌تر می‌باشد و بعد از طی یک مرحله روزت گلدهی را آغاز می‌کند. طول دوره رشد کلزا در ارقام زودرس و کشت بهاره از ۹۰ تا ۱۵۰ روز و در کشت پاییزه از ۲۰۰ تا ۳۳۰ روز می‌رسد. کلزا گیاهی خودگشن- دگرگشن می‌باشد و درصد دگرگشنی آن در ارقام مختلف ۳۳-۲۲ درصد گزارش شده است (شهیدی و فروزان، ۱۳۷٦).

در دهه اخیر این محصول روغنی از نظر متوسط مصرف روغن جهانی از رتبه پنجم به رتبه سوم صعود کرده و بعد از نخل روغنی و سویا قرار گرفته است. روغن کلزا به دلیل حضور اسیدهای چرب اشباع نشده و فاقد کلسترول از کیفیت تغذیه‌ای بالایی برخوردار است و بین ارقام و در شرایط مختلف تنوع زیادی در ترکیب اسیدهای چرب آن مشاهده می‌شود. روغن کلزا همچنین حاوی مقادیر زیادی اُمگا ٦ و اُمگا ۳ با نسبت ۱:۲ است. زمانی که روغن‌های کلزا کمترین گلوکوزینولات آلفاتیک و اسید اروسیک را داشته باشند، عموماً تحت عنوان کَنولا خوانده می‌شوند (نگارش، ۱۳۸۷). در اغلب اوقات لفظ کنولا به گونه براسیکا نیپوس اشاره دارد. کلزا به عنوان یک گیاه علفی در اروپا جهت علوفه گوسفندان و خوک‌ها نیز کاربرد داشته است، گاهی بذر آن برای خوراک پرندگان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Webster, 1998). کاغذ و محصولات کاغذی به عنوان یکی از کالاهای مصرفی، نقش مهمی در زندگی انسان‌ها ایفا می‌کنند. با توجه به مشخصات الیاف

کلزا (گونه‌ی غیرچوبی) و مقایسه آن با سایر مواد اولیه موجود، می‌توان استفاده از آن را به منظور تولید خمیر کاغذ توصیه نمود (حمصی و پیروز ۱۳۸۵). کاغذ تولید شده با کلزا دارای مقاومت خوبی در برابر کشش، تاخوردگی و ترکیدگی می‌باشد. روغن کلزا محتوی مقدار قابل ملاحظه‌ای ویتامین C و فیبرهای قابل حل و ترکیبات ضد سرطان شامل سلنیوم، دی‌ایندول‌متان و سولفورافِن می‌باشد. دی‌ایندول‌متان قابلیت تلفیق با پاسخ‌های ابتدایی سیستم ایمنی را با خاصیت‌های ضد ویروسی، ضد باکتریایی و ضد سرطان دارد. تحقیقات کلزا در ایران از اوایل سال‌های دهه هفتاد هجری شمسی با وارد کردن رقم‌های اصلاح شده پاییزه و بهاره یک صفر از خارج و بررسی سازگاری آن‌ها با شرایط آب و هوایی مناطق مختلف ایران آغاز شد (احمدی، ۱۳۷٤). در این راستا تعداد قابل‌توجهی رقم‌های اصلاح شده از مؤسسات تحقیقاتی کشورهای آلمان، سوئد، کانادا، لهستان، فرانسه و غیره دریافت و با بررسی‌های انجام شده برتری رقم‌هایی مانند رقم‌های یک صفر پاییزه بلیندا و کوینتا در مناطق سرد و معتدل سرد و رقم یک صفر بهاره رافال در مناطق ساحلی شمال ثابت گردید. ایجاد تنوع ژنتیکی به منظور فراهم آوردن امکان سلکسیون ژنوتیپ‌های مطلوب جهت اجرای برنامه‌های اصلاحی یکی از پیش‌شرط‌های لازم برای ایجاد رقم‌های اصلاح شده جدید محسوب می‌شود (Mendham, 1995; Rakow, 1995). در چند سال اخیر ارقام دلگان (بهاره)، صادق (دیم)، ظفر (بینابین)، احمدی (زمستانه)، نیما (زمستانه) و نفیس (زمستانه) به روش دورگ‌گیری و گزینش شجره‌ای توسط مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و مؤسسه دیم معرفی شده‌اند. در سال‌های اخیر به دلیل توجه بیشتر به توسعه کشت کلزا، سطح زیر کشت آن رو به افزایش گذاشته است و پیش‌بینی می‌شود تا چند سال آینده توسعه سطح زیر کشت این محصول چندین برابر افزایش یابد. در سال زراعی ۹۵-۱۳۹٤ کلزا با ۱۰/٦٦ درصد از سطح کل برداشت محصولات صنعتی در کشور (٤۹۰/۲ هزار هکتار) رتبه پنجم این محصولات را در ایران دارا می‌باشد. لذا تحقیقات در این زمینه بیش از پیش از اهمیت برخوردار است. استفاده از سیستم دابلدهاپلوییدی برای کمک به اصلاح کلزا در این راستا است.

مهم‌ترین روش‌های اصلاحی که برای اصلاح کلزا به کار می‌روند عبارتند از: انتخاب توده‌ای، به‌نژادی شجره‌ای، گزینش بالک، تلاقی برگشتی، انتخاب دوره‌ای، اصلاح واریته‌های ساختگی و به کارگیری دورگ‌ها. از معایب این روش‌ها طولانی بودن دوره آن‌ها می‌باشد. امروزه متخصصین اصلاح نباتات به دنبال روش‌های دیگری هستند که بتوانند این مدت را به حداقل ممکن برسانند تا در وقت و هزینه‌های سنگین برنامه‌های اصلاح نباتات صرفه‌جویی شود. یکی از این روش‌ها، اصلاح از طریق سیستم هاپلوئیدهای مضاعف‌شده

می‌باشد که به عنوان وسیله‌ای برای ترکیب صفات یک تلاقی می‌تواند مکمل روش شجره‌ای باشد. اهمیت استفاده از گیاهان هاپلوئید در برنامه‌های اصلاح نباتات از مدت‌ها پیش برای دانشمندان مسلم بوده است و یکی از موضوعات مهم تحقیقاتی در این زمینه، تولید لاین‌های هموزیگوت جهت تولید گیاهان هیبرید در گونه‌های خود ناسازگار می‌باشد. با تولید لاین‌های کاملاً هموزیگوت در این روش ۵-۳ سال در زمان برنامه‌های اصلاحی صرفه‌جویی می‌شود (Koprna *et al*., 2005). سیستم هاپلوئیدی در صورتی موفق است که بتواند گیاهان هاپلوئید و هاپلوئید مضاعف‌شده تولید کند. روش کشت میکروسپورهای جدا شده امروزه در خیلی از برنامه‌های اصلاحی کلزا در سراسر جهان به عنوان یک روش متمم و مکمل روش‌های معمول تولید لاین‌های خالص استفاده می‌شود. استفاده از کشت میکروسپور تنها محدود به تولید لاین‌های دابلد هاپلویید نبوده بلکه با ایجاد فن‌آوری، میکروسپور به یک سلول فوق‌العاده در خدمت علوم پایه جهت پاسخ‌گویی به سوالات اساسی و حل مشکلات تبدیل گشته است. به عنوان سیستم‌های آزمایشی، کشت میکروسپور می‌تواند برای تشخیص نمو گرده و گرده‌افشانی، جنین‌زایی، توتی‌پوتنسی، چرخه سلولی، تغییر فاز و نقش تنش در نمو مورد استفاده قرار گیرد (شریعت‌پناهی، ۱۳۸٦). در مطالعات ژنتیکی و به‌نژادی، کشت میکروسپورهای ایزوله شده می‌تواند به عنوان جدیدترین و کارآمدترین روش جهت تولید دابلدهاپلوییدها (لاین‌های اینبرید نوترکیب) به منظور استفاده در اصلاح نباتات و تهیه نقشه‌های ژنتیکی، غلبه کردن بر موانع تلاقی (نرعقیمی و خودناسازگاری)، القاء و انتخاب جهش‌ها و ایجاد گیاهان تراریخته استفاده گردند (شریعت‌پناهی و همکاران، ۱۳۹۰). میکروسپور به عنوان یک سلول با پتانسیل توسعه محدود، می‌تواند با تیمار تنش در جهت ایجاد توتی‌پوتنت مجدداً برنامه‌ریزی شود. آنالیزهای مولکولی، فیزیولوژیکی، بیولوژی سلولی و بیوشیمیایی باعث افزایش اطلاعات در مراحل برنامه‌نویسی مجدد سلولی می‌شود (شریعت‌پناهی و امامی، ۱۳۸۷; شریعت‌پناهی و همکاران،۱۳۹۰). از جنین‌زایی میکروسپور جهت شناسایی مسیرهای بیوشیمیایی و ارزیابی محصولات متابولیکی استفاده می‌شود (Keller and Armstrong, 1987). جنین‌زایی مستقیم و تولید سریع لاین‌های خالص از میکروسپورهای ایزوله، مهم‌ترین ویژگی این روش در برنامه‌های اصلاحی می‌باشد. همچنین با توجه به فراوانی بالای تولید گیاه از کشت میکروسپور و نیز سهولت انتقال ژن، کشت میکروسپور، کارآمدترین و بهترین اندام هدف در انتقال ژن به شمار می‌آید و دانشمندان امیدوارند که در آینده‌ای نزدیک از این روش به عنوان یک روش متداول در مهندسی ژنتیک استفاده نمایند (Wang *et al*., 2018). علی‌رغم مشکلات تکنیکی که روش کشت میکروسپور دارد، این روش در مقایسه با

کشت بساک دارای مزایای زیر می‌باشد (Pickering and Devaux, 1992):

۱- شانس باززایی گیاهان دیپلوئید به دلیل حذف بافت‌های دیپلوئیدی مانند دیواره بساک و آوندها، محدود می‌شود.

۲- استفاده یکسان تمام میکروسپورها از مواد غذایی به علت آزاد بودن آن‌ها و نیز رفع مشکل رقابت میکروسپورها

۳- دیواره بساک به عنوان مانعی در برابر انتقال مواد غذایی از محیط کشت به میکروسپورها عمل نمی‌کند.

٤- برطرف نمودن مشکل ترشحات حاصل از دیواره بساک همانند آبسیزیک اسید و مواد سمی که اثر بازدارندگی بر روی رشد میکروسپورها دارند.

۵- امکان‌پذیر بودن مشاهده دقیق تمام مراحل آندروژنز

٦- سهولت انجام بررسی اثرات مختلف فاکتورهای گوناگون بر روی میکروسپورها به علت جدا بودن میکروسپورها از همدیگر و مشاهده راحت آن‌ها

۷- ایده‌آل بودن میکروسپورها برای اعمال تیمارهای موتاژن و بررسی موتاسیون‌ها

۸- استفاده از روش‌های انتقال ژن بطور مستقیم بر روی میکروسپورها

۹- از تشکیل کالوس حاصل از بساک‌ها اجتناب می‌شود و در نتیجه شیمرهای کمی تولید خواهد شد.

۱۰- در کشت میکروسپور، اغلب تبدیل مستقیم میکروسپور به جنین اتفاق می‌افتد و تشکیل جنین در کشت میکروسپور بهتر از کشت بساک روی می‌دهد.

۱۱- از لحاظ تئوری هر میکروسپور قادر به تولید یک گیاه کامل است لذا عملکرد تولید گیاهان هاپلوئید از طریق کشت میکروسپورهای ایزوله بسیار بیشتر از کشت بساک است (Pauls *et al.*, 1994).

کشت میکروسپور کلزا به دلیل فراوانی بالا جنین‌زایی که می‌تواند در محدوده وسیعی از ژنوتیپ‌ها به دست آید، در تولید لاین‌های دابلدهاپلویید در برنامه‌های اصلاحی کلزا به طور معمول استفاده می‌شود. هم اکنون تکنولوژی کشت میکروسپور قسمت مهمی از چندین برنامه اصلاحی براسیکا می‌باشد. با استفاده از روش کشت میکروسپور تاکنون تعدادی از واریته‌های کلزا مانند Quantum، Viz cyclone و Q2 و غیره جهت کشت تجارتی آن در دنیا تهیه و توزیع شده‌اند اما در ایران هنوز رقمی با بکارگیری سیستم دابلدهاپلوئیدی تجاری نشده است.

مواد و روش‌ها

● کشت مواد گیاهی والدینی

بذور هیبریدهای کلزا در مزرعه و همچنین در گلخانه (گلدان‌هایی با قطر ۲۵ سانتی‌متر و با عمق کاشت حدود ۰/۵ سانتی‌متر) کشت می‌شوند. خاک مورد استفاده شامل دو قسمت خاک مزرعه، یک قسمت کود دامی پوسیده و یک قسمت پیت و پرلیت می‌باشد. در داخل هر گلدان حدود ۵ بذر کشت شده، گلدان‌ها پس از کشت بذور در اتاق رشد قرار داده می‌شوند. حدود ۳ هفته پس از سبز شدن بذور و اطمینان از رشد مطلوب گیاهچه‌ها، در هر گلدان ۲ گیاهچه حفظ گردیده و بقیه حذف می‌شوند. به صورت متناوب در هر ۲۰ روز تعدادی گلدان کشت می‌شوند و گیاهان تا ظهور گلچه‌ها مورد مراقبت‌های لازم از نظر آبیاری و کوددهی قرار می‌گیرند (شکل ۱).

شکل ۱– a– گیاهان والدینی کلزا برای کشت میکروسپور، b– مراحل رشد گیاهان والدینی کلزا در گلخانه

● شرایط اتاق رشد

نور اتاق‌های رشدی که گلدان‌های ارقام بهاره در آن قرار می‌گیرند با ٦ لامپ ٤٠٠ وات بخار سدیم تأمین می‌شود. لامپ‌ها در ارتفاع ١/٤ متری از سطح گلدان‌ها قرار داشته و شدت نور در اتاق رشد ۵۵۰۰ لوکس می‌باشد. از لحاظ فتوپریود، اتاق رشد روی ١٦ ساعت نور و دمای ١۵ درجه سانتی‌گراد و ٨ ساعت تاریکی با دمای ١٠ درجه سانتی‌گراد تنظیم می‌شود. نور اتاق رشدی که گلدان‌های ارقام پاییزه در آن قرار می‌گیرند مشابه ارقام بهاره بود، ولی برای بهاره کردن (ورنالیزاسیون) گلدان‌ها به مدت ٨ هفته در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس به اتاق رشد موردنظر منتقل می‌شوند.

● مراقبت‌های زراعی

مراقبت‌های زراعی شامل آبیاری، سم‌پاشی و محلول‌پاشی می‌باشد. آبیاری هر ٣ روز یکبار انجام می‌گیرد. از نظر کنترل آفات و بیماری‌ها، یکی از آفاتی که به وفور در اتاق رشد دیده می‌شود، معمولاً شته و تریپس می‌باشد که جهت دفع آن‌ها از دیازینون ١/٢ در هزار و متاسیستوکس ١ در هزار می‌توان استفاده کرد و برنامه سم‌پاشی در دوره رشد گیاهان ٢ مرتبه انجام می‌گیرد. یکی از کارهایی که جهت جلوگیری از شیوع آفات و بیماری‌ها انجام باید بگیرد، حذف برگ‌های زرد و خشک در قسمت تحتانی گیاه است که معمولاً هر هفته یک بار این عمل انجام می‌گیرد. برای رشد بهتر گیاهان مادری، کود مایع فوسامکو و هوگلند نیز هر١٤ روز یکبار به میزان ٣/۵ در هزار به روی گیاهان اسپری می‌شود. همچنین ماهیانه نیز حدود ۵ گرم کود اوره در آب حل شده و همراه با آب آبیاری به هر گلدان داده می‌شود.

● برداشت غنچه‌ها و تعیین مرحله تکوینی میکروسپورها

گیاهان کلزا، حدوداً ٦٠ روز پس از کشت در اتاق رشد به تدریج شروع به غنچه‌دهی می‌کنند. غنچه‌های به طول ٣/۵–٢/۵ میلی‌متر که بهترین غنچه‌ها برای کشت میکروسپور می‌باشند، از این گیاهان انتخاب و برداشت می‌شوند و از طریق رنگ‌آمیزی با DAPI و رویت زیر میکروسکوپ فلورسنت، مرحله تکوین میکروسپورها شناسایی می‌شود. غنچه‌هایی با طول ٣/۵–٢/۵ میلی‌متر، حاوی میکروسپورهای مرحله انتهایی تک‌هسته‌ای و ابتدای دوهسته‌ای هستند و این غنچه‌ها برای کشت میکروسپورهای جدا شده، مناسب می‌باشند (شکل ٢).

شکل ۲- انتخاب غنچه‌های مناسب کلزا برای کشت میکروسپور

● **روش رنگ‌آمیزی با رنگ فلوئورسنتی DAPI**

بهترین مرحله تکوین میکروسپورها (مرحله میانی تا انتهایی تک‌سلولی) و همچنین میزان تقسیمات هسته‌ای در ساختارهای چندهسته‌ای/ چند سلولی با رنگ‌آمیزی DAPI [1] تعیین می‌گردد. جهت رنگ‌آمیزی با DAPI به ٤ محلول زیر نیاز است:

محلول ۳:۱ اسید استیک به اتانول ۹٦ درصد

اتانول ۵۰ درصد

ماده رنگ‌آمیزی‌کننده (DAPI)

گلیسرول ۸۷ درصد

برای رنگ‌آمیزی DAPI ابتدا محیط کشت را داخل تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتر پخش کرده و در ۲۰۰۰ دور در دقیقه (٣١٤ g) به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ می‌نماییم. سپس محیط رویی هر تیوب برداشته شده و روی رسوب ته‌نشین شده به مقدار یک میلی‌لیتر محلول ۳:۱ اضافه کرده، بعد از گذشت ۲۰ دقیقه مجدداً با همان سرعت و زمان سانتریفیوژ شده و بعد از برداشتن محلول روی رسوب ته‌نشین شده (روشناور)، روی رسوب باقی مانده به مقدار یک میلی‌لیتر اتانول ۵۰ درصد اضافه کرده و بلافاصله دوباره سانتریفیوژ انجام می‌شود. بعد از برداشت اتانول بالای رسوب میکروسپورها، روی رسوب باقی‌مانده ۲۰ میکرولیتر ماده رنگ‌آمیزی‌کننده DAPI و حدود ۱۰ میکرولیتر گلیسرول اضافه می‌شود. تیوب‌های حاصل را در تاریکی به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از گذشت ٢٤ ساعت سانتریفیوژ نموده و رسوب باقی‌مانده را روی لام گذاشته و بعد از قرار دادن لامل، در زیر میکروسکوپ فلورسنت‌دار مشاهده

1- 4`,6-diamidino-2-phenlindole

می‌نماییم. لامل باید طوری روی لام قرار گیرد که بین لام و لامل هیچ‌گونه حباب هوایی وجود نداشته باشد. برای از بین بردن حباب‌های هوای بین لام و لامل می‌توان لام را روی یک کاغذ خشک‌کن گذاشته و کاغذ را روی لام تا کرده و به آرامی با انگشت از قسمت مرکزی لام به سمت کنارین حرکت کرد.

- **محیط‌های جداسازی، جنین‌زایی و باززایی گیاه از میکروسپورها**

- **محیط جداسازی میکروسپورها**

این محیط، برای آسیاب غنچه‌ها و سپس جداسازی میکروسپورها از سایر قسمت‌های غنچه که طی آسیاب شدن ایجاد شده‌اند، استفاده می‌شود. برای تهیه محیط جداسازی، ۱۳۰ گرم ساکارز در داخل یک لیتر آب مقطر حل گردیده و pH آن روی ٦ تنظیم می‌شود. پس از تهیه آن، در بطری‌های درب آبی مخصوص اتوکلاو به مقدار ۱۵۰ میلی‌لیتر در هر بطری توزیع شده و جهت استریل شدن در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ بار قرار می‌گیرند. محیط جداسازی میکروسپورها پس از اتوکلاو شدن در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری می‌شود (جدول۱).

- **محیط کشت جنین‌زایی مستقیم میکروسپورها**

محیط کشت جنین‌زایی مورد استفاده، محیط NLN-13 (Lichter, 1982) می‌باشد که میکروسپورهای استخراج شده در این محیط کشت می‌شوند. به منظور تهیه محیط کشت NLN-13 طبق دستورالعمل از محلول‌های مادری تهیه شده به مقدار مورد نیاز برداشته می‌شود و سپس ۱۳۰ گرم ساکارز به آن اضافه می‌گردد. حجم محلول به یک لیتر رسانده شده و در نهایت pH آن روی ۵/۸ تنظیم می‌شود. لازم به یادآوری است که محیط کشت مورد استفاده در کشت میکروسپورهای کلزا مایع بوده و فاقد هر گونه هورمون است (جدول۱).

- **سترون کردن محیط کشت جنین‌زایی میکروسپورها**

به دلیل حساس بودن بعضی ویتامین‌ها مثل ویتامین اسکوربیک اسید به گرمای اتوکلاو، استریل کردن محیط کشت با دستگاه فیلتراستریلیزاسیون انجام می‌گیرد. بدین ترتیب که ابتدا فیلتری با سوراخ هایی به قطر ۰/۲۲ میکرومتر روی دستگاه نصب می‌شود و سپس دستگاه فیلتراستریلیزاسیون در داخل فویل آلومینیوم پیچیده شده و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ بار استریل می‌شود. سپس در

زیر لامینارایرفلو، شلنگ پمپ خلاء پس از ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد به یک طرف دستگاه فیلتر استریلیزاسیون وصل می‌شود و درب دستگاه برداشته شده و پمپ خلاء روشن می‌گردد. سپس محیط کشت تهیه شده در داخل مخزن بالایی ریخته می‌شود. در اثر خلاء ایجاد شده در مخزن پایین، محلول محیط کشت از فیلتر عبور کرده و آلودگی‌های آن حذف می‌گردد. پس از عبور تمام محیط کشت از فیلتر، در حالی‌که دستگاه روشن است درپوش لاستیکی طرف دیگر دستگاه را به آهستگی باز کرده و سپس پمپ خلاء خاموش می‌شود. در این مرحله عمل فیلتراستریلیزاسیون محیط کشت تمام شده و محیط کشت داخل مخزن در داخل بطری‌های درب آبی استریل شده به میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر در هر بطری توزیع می‌گردد. بطری‌های حاوی محیط کشت استریل شده به مدت ۳-۲ روز در دمای اتاق قرار گرفته و پس از اطمینان از استریل بودن آن‌ها در یخچال در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند.

● محیط کشت باززایی گیاه از جنین‌های حاصل از کشت میکروسپورهای کلزا

بهترین محیط کشت باززایی گیاه محیط B5 حاوی میلی‌گرم بر لیتر۰/۰۱ اسید جیبرلیک است. برای تهیه یک لیتر محیط کشت باززایی، پس از تهیه محلول‌های مادری، ویتامین‌ها و محلول مادری یدید پتاسیم، از هر کدام مطابق دستورالعمل موجود به مقدار مورد نیاز برداشته می‌شود، سپس ۲ درصد ساکارز، ۸ گرم بر لیتر آگارآگار و هورمون جیبرلیک اسید به محیط کشت باززایی اضافه شده و در نهایت حجم محلول به یک لیتر رسانده می‌شود. pH آن روی ۵/۷ تنظیم گردیده و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ بار به مدت ۲۰ دقیقه سترون می‌گردد (جدول۱). سپس از اتوکلاو خارج شده و حدود ۳۰ دقیقه زیر لامینار رها می‌شود تا کمی خنک شده و در مرحله بعد به میزان ۱۲/۵ میلی‌لیتر در پتری‌دیش‌های یکبار مصرف با قطر ۸ سانتی‌متر توزیع می‌شود. سپس درب آن‌ها بسته شده و در داخل پلاستیک‌های محافظ غذا قرار می‌گیرند و بعد از ٤-۳ روز برای کشت استفاده می‌شوند. البته لازم به ذکر است برای اضافه نمودن جیبرلیک اسید، یک میلی‌گرم آن را در یک میلی‌لیتر اتانول ۹۸ درصد حل کرده و حجم آن را با آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده و سپس برای یک لیتر محیط کشت، حجم مورد نظر را از این محلول برداشته و به بقیه مواد اضافه کرده، همچنین برای اضافه نمودن اسید آبسیزیک، مقدار لازم را با یک میلی‌لیتر NaOH یک نرمال حل کرده و حجم آن را با آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده و با روش فیلتراستریلیزاسیون به یک لیتر محیط کشت اضافه می‌شود. جنین‌های ٥-٤ میلی‌متری ۳۰ روزه

و لپه‌ای شکل به این محیط کشت منتقل می‌گردد (در هر پتری‌دیش ۱۰ عدد جنین قرار داده می‌شود).

جدول ۱- مواد مورد نیاز جهت تهیه یک لیتر محیط کشت القاء NLN-13 و محیط جداسازی میکروسپورها و محیط باززایی B5 (Gamborg *et al.*, 1968).

اجزا	محیط کشت (mgl^{-1})		
B	**5**	**NLN-13**	**جداسازی میکروسپور**
Macroelements			
KNO_3	2500	125	-
$MnSO_4.H_2O$	10	95.18	-
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	-	500	-
KH_2PO_4	-	125	-
$CaCl_2(NH_4)$	150	-	-
Na_2SO_4	134	-	-
$H_2PO_4.H_2O$	150	-	-
Microelements			
$MnSO_4.H_2O$	10	-	-
H_3BO_3	3	10	-
$ZnSO_4.7H_2O$	2	10	-
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25	-
KI	0.75	-	-
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.025	-
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.025	-
Vitamins and Amino acid			
Biotin	0.05	-	-
Acid Folic	0.5	-	-
Glycin	2	-	-
Acid Nicotinic	5	1	-
Pyridoxine HCl	0.5	1	-
Thyamine HCl	0.5	10	-
Gluthathion	30	-	-
L-Glutamine	800	-	-
L-Serin	10	-	-
Myo inositol	100	100	-
Agar	-	8000	
Sucrose	130000 2	0000	130000
pH	5.8	5.8	6

● **مراحل کشت میکروسپورهای کلزا**

● **برداشت غنچه‌ها**

ابتدا ۱۰۰ غنچه ٤-۳ میلی‌متری که حاوی میکروسپورهای انتهایی تک‌هسته‌ای الی ابتدای دوهسته‌ای می‌باشند، از گیاهان کشت شده در داخل اتاق رشد انتخاب شده و در یک ظرف کوچک فلاسک مانند که در دیواره آن یک لایه یخ وجود دارد قرار داده می‌شود (در صورت وجود فاصله زیاد بین اتاق رشد و آزمایشگاه، غنچه‌ها بهتر است توسط یک فلاسک حاوی یخ به محل آزمایشگاه منتقل شوند).

● **استریل کردن غنچه‌ها**

در زیر لامینار، غنچه‌ها در داخل یک فالکون میلی‌لیتر۵۰ استریل ریخته شده و حدود میلی‌لیتر٤۰-۳۰ هیپوکلریت سدیم (NaClO) ۳/۵ درصد به آن اضافه می‌گردد. درب فالکون را بسته و به مدت ۱۵ دقیقه تکان داده به طوری که دست فقط با درب فالکون تماس داشته باشد تا دمای دست به غنچه‌ها منتقل نشود. پس از ضدعفونی کردن غنچه‌ها با هیپوکلریت سدیم، با استفاده از سمپلر ۵ میلی‌لیتر هیپوکلریت سدیم موجود در داخل فالکون برداشته می‌شود. سپس حدود ٤۰-۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به داخل فالکون اضافه می‌شود. در مجموع شست‌وشوی غنچه‌ها با آب مقطر استریل ۲ مرتبه و هر مرتبه ۵ دقیقه انجام می‌گیرد. لازم به یادآوری است که ظروف حاوی هیپوکلریت سدیم و آب مقطر تا قبل از شروع ضدعفونی غنچه‌ها بهتر است در یخچال با دمای ٤-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند.

● **استخراج میکروسپورها**

غنچه‌های استریل شده، به داخل فالکون ۵۰ میلی‌لیتر دیگر منتقل می‌شوند. سپس ۳۰ میلی‌لیتر محیط استخراج میکروسپورها (محیط شست‌وشو) را به داخل فالکون اضافه نموده، ظروف حاوی محیط استخراج میکروسپورها تا قبل از شروع مرحله جداسازی میکروسپورها در یخچال با دمای ٤-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. سپس حدود ۳ میلی‌لیتر از محیط استخراج میکروسپورها که حاوی غنچه‌های استریل شده می‌باشند، به داخل بشر کوچک استریل شده ریخته و با استفاده از ته پیستون استریل داخل سرنگ به آرامی غنچه‌ها له می‌شوند تا میکروسپورهای داخل غنچه‌ها در داخل محیط شست‌وشو آزاد شوند. سوسپانسیون حاصل از آسیاب کردن غنچه‌ها در شرایط کاملاً استریل به ترتیب از دو الک آزمایشگاهی با سوراخ‌هایی به

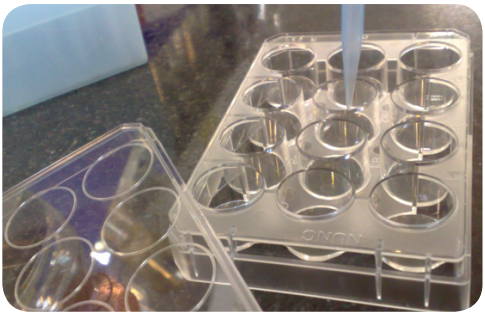
قطر ۹۰ و ٦۳ میکرومتر، عبور داده می‌شود. پس از عبور سوسپانسیون میکروسپورها از الک‌های آزمایشگاهی و قرار گرفتن در یک ظرف استریل، سوسپانسیون حاصل توسط پیپت استریل به داخل فالکون ۵۰ میلی‌لیتر مخصوص سانتریفیوژ (از قرار ۳۰-۲۵ میلی‌لیتر در هر لوله) توزیع می‌گردد. سپس فالکون‌های فوق به داخل جافالکون‌های سانتریفیوژ منتقل شده و جافالکون‌ها در داخل دستگاه سانتریفیوژ قرار می‌گیرند. لازم به یادآوری است که جافالکون‌های سانتریفیوژ باید قبل از سانتریفیوژ از لحاظ وزنی کاملاً هم وزن باشند تا تعادل آن‌ها در هنگام سانتریفیوژ حفظ گردد. سانتریفیوژ در ۱۲۷۰ دور در دقیقه (یا g ۲۰۰) و به مدت ٤ دقیقه باید انجام شود. پس از اتمام سانتریفیوژ، لوله‌های سانتریفیوژ از دستگاه خارج می‌شوند. پس از سانتریفیوژ، یک لایه رسوب زرد رنگ در ته فالکون‌ها قرار دارد و در بالای آن روشناور مایع سبز رنگی می‌باشد. مایع سبز رنگ روی رسوب میکروسپورها (روشناور) با پیپت استریل حذف شده، سپس ۲۵ میلی‌لیتر محیط تازه جداسازی میکروسپورها به رسوب اضافه می‌گردد و عمل سانتریفیوژ ٤ دقیقه دیگر به همان ترتیب گفته شده انجام گرفته که در این مرتبه مایع فوقانی بالای رسوب میکروسپور شفاف‌تر می‌شود. در این آزمایش، در کل، ۲ مرتبه عمل سانتریفیوژ انجام می‌گیرد و هر بار مایع فوقانی بالای رسوب میکروسپورها حذف می‌شود (شکل۳).

شکل ۳- مراحل استخراج میکروسپورهای کلزا

● **توزیع سوسپانسیون حاوی میکروسپورها در پتری‌دیش‌ها**

پس از حذف مایع فوقانی بالای میکروسپورها در دومین سانتریفیوژ، ۵-٤ میلی‌لیتر محیط کشت NLN-13 به رسوب میکروسپورها اضافه شده و چند بار به هم زده می‌شود تا سوسپانسیون کاملاً یکنواخت حاصل گردد. سپس پتری‌دیش‌های ٦ سانتی‌متر یکبار مصرف استریل بسته به مقدار سوسپانسیون حاوی میکروسپورها زیر هود باز شده و در ادامه در داخل هر کدام ۵/۸ میلی‌لیتر محیط NLN-13 توزیع شده و ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی میکروسپورها به پتری‌دیش‌های محتوی NLN-13 اضافه می‌گردد

(میکروسپورهای هر ۱۰–۸ غنچه به یک پتری دیش ٦ سانتی‌متر حاوی ۵/۸ میلی‌لیتر محیط NLN-13 منتقل می‌شوند) و دور هر پتری‌دیش با دو لایه پارافیلم درزگیری می‌شود. سپس مشخصات تیمار اعمال شده و تاریخ کشت میکروسپور روی پتری‌دیش‌ها یادداشت گردیده و پتری‌دیش‌ها در داخل انکوباتور در دماهای حرارتی مختلف (۳۰ درجه سانتی‌گراد) جهت اعمال تیمار پیش حرارتی موردنظر قرار می‌گیرند و پس از ١٤ روز نمونه‌ها به شیکر انکوباتور با دور ٤٠ rpm و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل می‌شوند (شکل ٤).



شکل ٤– توزیع میکرسپورهای استخراج شده داخل پتری دیش های چند خانه

● **تنش حرارتی**

دمای بالا، یک فاکتور کلیدی جهت موفقیت‌آمیز بودن کشت میکروسپور در گیاهان براسیکا می‌باشد. در اکثر موارد، جنین‌زایی با قرار دادن کشت‌ها در دمای ۳۵–۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲–۲٤ ساعت شروع می‌گردد و پس از آن جنین‌ها می‌توانند در دماهای پایین‌تر تکامل یابند. همچنین در آزمایشی تیمار دمایی ۳۰ به مدت ١٤ روز منجر به افزایش قابل‌توجهی در جنین‌زایی میکروسپورها گردید. میکروسپورهایی که در پتری‌دیش‌ها کشت داده می‌شوند، برای اعمال تنش حرارتی داخل انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ١٤ روز در تاریکی قرار می‌گیرند و بعد از اتمام دوره تنش به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تا زمان تشکیل رویان منتقل می‌شوند.

● **باززایی گیاه از جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور**

۳۰ روز پس از کشت میکروسپورها، جنین‌های ۵–٤ میلی‌متری لپه‌ای شکل تشکیل شده که در شرایط استریل (سترون) به محیط کشت باززایی گیاه منتقل می‌گردند (در هر پتری دیش ۵ تا ۱۰ عدد جنین قرار داده می‌شود). سپس پتری‌دیش‌های مورد نظر به اتاق رشد با فتوپریود ١٦ ساعت نور و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد منتقل می‌شوند.

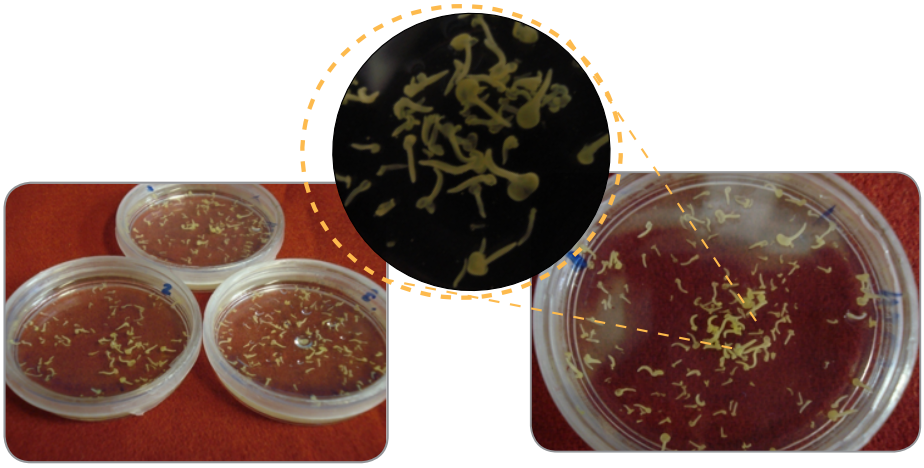
● **باززایی گیاهچه‌ها**

بعد از گذشت ۲۵ تا ۳۰ روز از کشت میکروسپور، جنین‌ها به مرحله لپه‌ای‌شکل رسیده و آماده انتقال به محیط جامد باززایی (B5) می‌باشند. در این مرحله، جنین‌های لپه‌ای با استفاده از پنس استریل به محیط باززایی که از قبل تهیه شده، منتقل می‌شوند (شکل۵).

● **تهیه محیط کشت باززایی**

با توجه به جدول (۱) که قبلاً ذکر شد، محیط کشت جامد B5 تهیه شده و به وسیله اتوکلاو استریل می‌شود و سپس در پتری‌دیش‌های یکبار مصرف استریل به قطر ۱۰سانتی‌متر و از قرار۱۲-۱۰ میلی‌لیتر در هر پتری‌دیش توزیع می‌گردد. این مرحله از کار در زیر لامینار ایرفلو و در محیط استریل باید انجام شود. پس از توزیع و جامد شدن محیط داخل پتری‌ها، پتری‌های حاوی محیط کشت جامد با دو لایه پارافیلم درزگیری می‌شود.

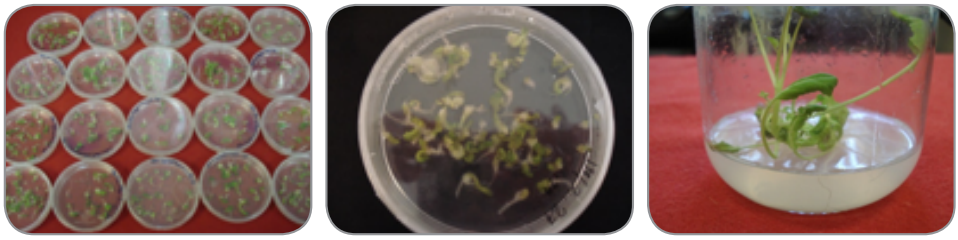
●



شکل ۵- جنین های لپه‌ای قابل انتقال به محیط B5

انتقال جنین‌های بالغ به محیط کشت باززایی

پس از گذشت چند روز از توزیع محیط کشت باززایی در پتری‌ها و حصول اطمینان از عدم آلودگی آن‌ها، انتقال جنین‌ها با استفاده از پنس کاملاً استریل و در زیر لامینار ایرفلو انجام می‌شود. جنین‌ها طوری در محیط کشت قرار می‌گیرند که محل خروج ریشه‌چه آن‌ها در تماس با محیط کشت باشد. پس از انتقال، برای جلوگیری از نفوذ هر گونه آلودگی دور پتری‌دیش‌ها به وسیله پارافیلم باید درزگیری شود (شکل ٦).



شکل ٦- انتقال جنین‌های کامل منتج از میکروسپور به محیط B5 بدون هورمون

● **اعمال پیش تیمار سرمایی**

می‌توان بعد از انتقال جنین‌ها به محیط کشت جامد باززایی گیاهچه، پتری‌دیش‌های حاوی جنین را برای مدت ۱۰ روز به یخچال با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و تاریکی منتقل کرد. اعتقاد بر این است که اعمال پیش تیمار سرمایی اثر مثبتی بر تولید گیاهچه‌های نرمال از این جنین‌ها دارد.

● **انتقال جنین‌ها به اتاق رشد**

بعد از گذشت ۱۰ روز و اعمال پیش تیمار سرمایی پتری‌دیش‌های حاوی جنین، به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد باید منتقل شوند. بعد از حدود ۳۰ روز، گیاهچه‌ها در داخل پتری‌دیش‌ها قابل رویت می‌باشند. در این مرحله بررسی پتری‌دیش‌ها و یادداشت‌برداری برای سه صفت جنین‌های بدون تغییر، جنین‌های فقط ریشه‌دار و گیاهچه‌های طبیعی انجام می‌شود.

● **انتقال گیاهچه‌های نرمال به شیشه (جار) کشت بافتی**

بعد از مشاهده گیاهچه‌های نرمال در داخل پتری‌دیش‌ها، این گیاچه‌ها در زیر لامینار ایرفلو و در شرایط استریل به شیشه کشت بافتی در ابعاد قطر ٦ سانتی‌متر و ارتفاع ۹ سانتی‌متر، حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت جامد B5 منتقل می‌شوند. درب این شیشه‌ها بسته شده و سپس به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد باید منتقل شوند.

● **انتقال گیاهچه‌ها به گلدان**

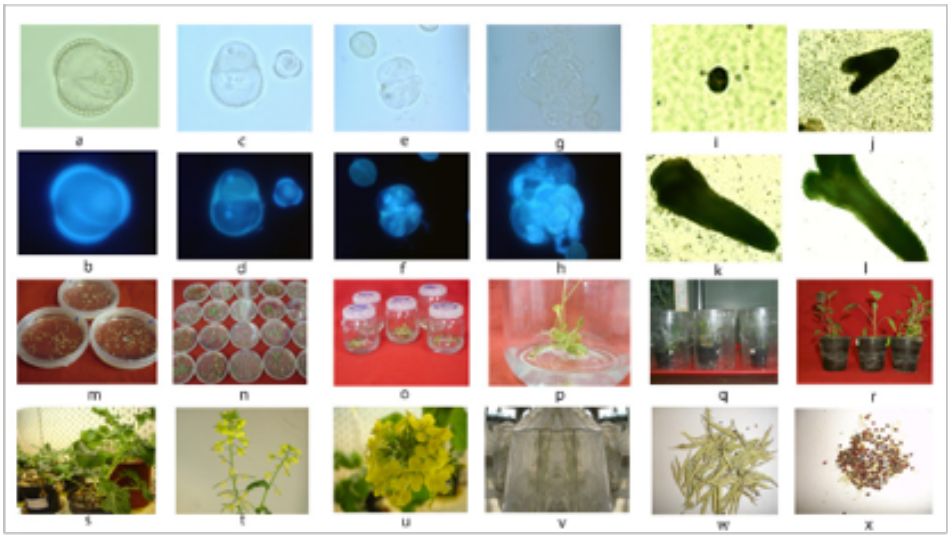
بعد از اینکه گیاهچه‌ها در شیشه کشت بافتی به حداکثر رشد خود رسیدند، به گلدان‌های حاوی پرلیت، ورمی‌کولیت و ماسه به نسبت مساوی منتقل می‌شوند. برای جلوگیری از نفوذ هر گونه آلودگی، مواد ذکر شده به همراه گلدان‌ها بوسیله اتوکلاو، باید استریل شوند. برای حفظ رطوبت نسبی، روی گلدان‌ها بوسیله نایلون پوشانده می‌شود (شکل ۸). آبیاری این گلدان‌ها به وسیله کود هوگلند به صورت یک روز در میان و از طریق زیرگلدانی انجام می‌گیرد. پس از گذشت مدتی و استقرار گیاهچه‌ها در گلدان و رشد آن‌ها، پوشش نایلونی روی گلدان‌ها برداشته شده و به گلدان‌هایی بزرگ‌تر حاوی خاک سبک، ماسه و پرلیت منتقل می‌شوند (شکل ۷).

● **بررسی سطح پلوئیدی گیاهچه‌های باززایی شده با روش فلوسایتومتری**

برای تعیین سطح پلوئیدی معمولاً از دستگاه فلوسایتومتری مدل PA 1 Partec استفاده می‌شود. روش کار با دستگاه فلوسایتومتری به شرح ذیل می‌باشد:

الف) ابتدا یک نمونه برگ گیاه حدود ۱ سانتی‌مترمربع (ترجیحاً از برگ‌های جوان) انتخاب می‌شود. بهتر است نمونه برگ قدری بزرگ‌تر و در حدود ۵-٤ سانتی‌مترمربع باشد تا در صورت نیاز به تکرار آزمایش، این امکان مهیا باشد. ضمناً در صورتی که امکان بررسی سطح پلوئیدی در همان روز وجود نداشته باشد،

شکل ۷– انتقال گیاهچه‌ها به گلدان‌های حاوی پیت و پرلیت



شکل۸ – مراحل مختلف کشت میکروسپور و باززایی گیاهان هاپلوئید در کلزا

a– میکروسپورهای مرحله انتهایی تک‌سلولی در زمان ایزوله کردن.

b– میکروسپورهای مرحله انتهایی تک‌سلولی در زمان ایزوله کردن رنگ‌آمیزی 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 رنگ‌آمیزی شده با DAPI.

h ,g ,f ,e– ساختارهای چند سلولی پس از گذشت ۳ هفته از کشت زیر میکروسکوپ نوری و همچنین رنگ‌آمیزی شده با DAPI.

l ,k ,j ,I – ساختارهای مختلف جنین شامل کروی، قلبی، اژدری و لپه ای.

p ,o ,n ,m– مراحل مختلف باززایی درون شیشه ای

q– مرحله سازگاری گیاهچه‌ها با محیط.

r– مرحله دو برابر کردن کروموزوم‌ها با کلشیسین.

x ,w ,v ,u ,t ,s– مراحل گلدهی و بذرگیری.

می‌توان نمونه‌ها را در کاغذهای خشک‌کن یا دستمال کاغذی مرطوب قرار داده و سپس در داخل کیسه نایلونی پیچیده و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد آن‌ها را برای مدت ۳-۲ هفته نگهداری کرد.

ب) نمونه برگ در داخل یک پتری‌دیش کوچک قرار داده شده و ٤۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی (Ex-traction Buffer(Partec. germany) (که ترکیبی از آنزیم‌های هضم‌کننده دیواره‌های سلولی نظیر سلولاز و پکتیناز می‌باشد) روی آن‌ها ریخته می‌شود. سپس با استفاده از یک تیغ تیز با ضربات عمودی و محکم روی نمونه‌ها در جهات مختلف، بافت برگ برش خورده تا هضم آنزیمی تسریع شود.

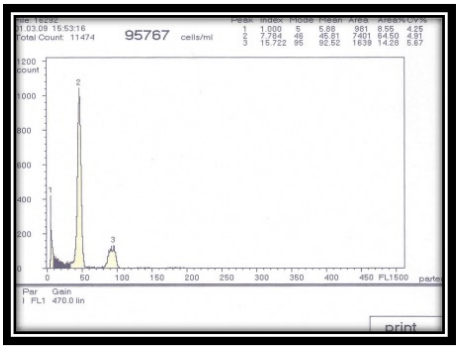
ج) در ادامه نمونه برگ از صافی‌هایی با منافذی به قطر ۵۰ میکرومتر عبور داده شده تا ضایعات، حذف گردند و سپس با ۱٦۰۰ میکرولیتر محلول رنگی اختصاصی DNA به نام DAPI سلول‌ها باید رنگ‌آمیزی شوند.

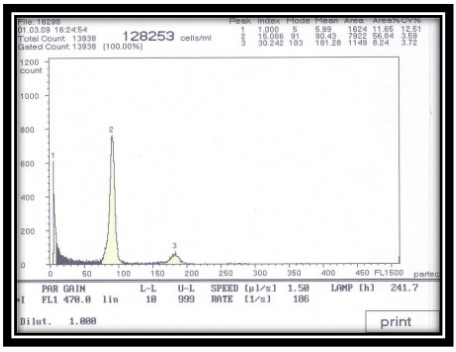
د) پس از مدت ۲ الی ۳ دقیقه، نمونه درون دستگاه قرار می‌گیرد و با عبور تک سلول‌ها از جلو آشکارساز دستگاه، علاوه بر شمارش تعداد سلول‌ها، مقدار DNA مربوطه نیز تعیین می‌شود. بر این اساس و بر مبنای Gain تعریف شده برای نمونه‌ها، پیک‌های مربوطه توسط دستگاه معلوم می‌شوند. لازم به توضیح است که چون کلزا همانند گیاه سیب‌زمینی در هنگام کار با فلوسایتومتر تشکیل دو پیک شامل یکی در مرحله G_1 یعنی قبل از سنتز DNA و یکی در مرحله G_2 یعنی پس از سنتز DNA دارد، لذا در این پژوهش در صورتی که به عنوان شاهد از کلزا دیپلوئید استفاده شود، دو پیک مربوطه با هم همپوشانی خواهند داشت. پیک P_2 گیاه دیپلوئید، بر پیک P_2 گیاهی که سطح پلوییدی آن اندازه گرفته خواهد شد، منطبق خواهد شد و لذا بهتر است از نمونه گیاه دیگری مثل جعفری به عنوان شاهد استفاده شود که سطح پلوئیدی آن بالا و خارج از محدوده پیک‌های تشکیل شده توسط گیاه مورد ارزیابی باشد.

براساس بررسی پیک‌های (تعداد سلول‌های موردبررسی) حاصل از فلوسایتومتری، مشخص می‌شود که پیک‌های بین FL100 و FL200 که به ترتیب نمایانگر فاز G_1 و G_2 یا M هستند به عنوان مواد دیپلوئید یا دابلدهاپلوئید معرفی شده و Peakهای بین FL50 تا FL100 به عنوان مواد هاپلوئید معرفی می‌شوند (Weber *et al.*, 2005). براساس نسبت مدهای گیاه هاپلویید به دیپلویید گیاهچه‌های هاپلویید از دابلدهاپلوییدهای خود به خودی تفکیک می‌گردند (شکل ۹).

● **تیمار گیاهچه‌های هاپلوئید با کلشی‌سین برای ایجاد گیاهان دابلدهاپلوئید**

از آنجایی که گیاهان هاپلوئید عقیم هستند، با تیمار آن‌ها با کلشی‌سین اقدام به تولید گیاهان دیپلوئید بارور می‌شود. بهترین زمان اعمال تیمار کلشی‌سین بر گل، شاخه و حتی کل گیاه، زمان تولید غنچه می‌باشد. به دلیل رشد سریع گیاه در این مرحله جذب کلشی‌سین از طریق ریشه سریع‌تر می‌باشد. طبق تحقیقات انجام شده در مورد تیمار گیاهچه‌های هاپلوئید حاصل از کشت میکروسپور مشخص شده است که بهترین نتیجه در تولید دابلد هاپلوئیدی، قرارگیری طوقه و ریشه‌های گیاهچه در غلظت ۳/٤ گرم‌درلیتر کلشی‌سین به مدت ۱/۵ ساعت می‌باشد (Zhou *et al*., 2002). گیاهچه‌های تیمار شده را سپس به مدت ۱/۵ ساعت در معرض نور شدید قرار داده تا میزان فتوسنتز بیشتر شود و به مدت یک هفته قبل از تیمار با کلشی‌سین، بهتر است آبیاری صورت نگیرد تا کلشی‌سین به خوبی توسط ریشه‌ها جذب شود. قبل از اعمال تیمار کلشی‌سین، تشخیص بین گیاهان هاپلوئید و گیاهان دیپلوئید خود به خودی بسیار حائز اهمیت است. تشخیص گیاهان دیپلوئید خود به خودی در این زمان بسیار ساده است به دلیل این‌که این نوع گیاهان گل‌های بزرگتری دارند و گرده بیشتری تولید می‌کنند.





شکل۹- آنالیز فلوسایتومتری سطح پلوئیدی. محور x در هیستوگرام نمایانگر میزان فلورسانس DNA می‌باشد و محور Y نمایانگر تعداد سلول شمرده شده به ازاء هر کانال هیستوگرام می‌باشد.
پیک ۱) نمایانگر peak برای سلول‌های مرده و غیره می‌باشد که ما آن را محاسبه نمی‌کنیم.
پیک ۲) نمایانگر فاز G_1 برای یک گیاه هاپلوئید یا دیپلویید می‌باشد.
پیک ۳) نمایانگر فاز G_2 یا فاز M برای یک گیاه هاپلویید یا دیپلویید می‌باشد.

● نتیجه‌گیری

دستورالعمل معرفی شده در این پژوهش به سهولت می‌تواند در صورت تأمین امکانات مورد نیاز توسط بخش‌های دولتی یا خصوصی تولیدکننده بذر، جهت تهیه لاین‌های دابلدهاپلوئید به منظور استفاده در برنامه‌های به‌نژادی کلزا مورد بهره‌برداری قرار گیرد و نیاز کشور را به معرفی ارقام جدید در حداقل زمان ممکن مرتفع سازد. ضمناً پیشنهاد می‌شود چنانچه هیبریدهای F_1 جدیدی به عنوان مواد گیاهی کشت میکروسپور مورد استفاده قرارگیرد، ابتدا تنش حرارتی ۳۰ درجه سانتی‌گراد دوره زمانی ۱۴ روز استفاده شود و در صورت پایین بودن درصد جنین‌زایی سپس سایر تیمارهای حرارتی مقایسه و بررسی شوند.

● سپاس‌گزاری

بدین‌وسیله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به دلیل حمایت مالی در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۸۶۰۱-۰۵-۰۵-۱ تقدیر و تشکر می‌گردد.

● فهرست منابع

احمدی م ر (۱۳۷٤). گزارش بررسی‌های کلزا. بخش تحقیقات دانه‌های روغنی مؤسسه تحقیقات نهال و بذر.
حمصی، ا و پیروز، م م (۱۳۸۵). بررسی ویژگی‌های شیمیایی و آناتومی ساقه کلزا. مجله علمی پژوهشی علوم کشاورزی، سال دوازدهم، شماره ۳.
دهشیری، ع (۱۳۷۸). زراعت کلزا. وزارت جهاد کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، معاونت ترویج، ٦۳ ص.
شریعت‌پناهی، ع م (۱۳۸٦). کاربرد میکروسپور در بیوتکنولوژی کشاورزی. پنجمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران.
شریعت‌پناهی، ع م و امامی‌میبدی، د (۱۳۸۷). مزایا و نقش میکروسپور در اصلاح نباتات مدرن. دهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. ۱۷۷-۱۸۱.
شریعت‌پناهی، ع م، شکیب، ع م و امامی‌میبدی، د (۱۳۹۰). هاپلوییدی و کاربردهای آن در ژنتیک و اصلاح نباتات. انتشارات پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران. ۹۷۸- ۲۷٦.
شهیدی، ا و فروزان ک (۱۳۷٦). کلزا. شرکت سهامی خاص توسعه کشت دانه‌های روغنی، ۵۰ ص.
نگارش، ا (۱۳۸۷). خودکفایی در تولید دانه‌های روغنی حداقل سه برنامه ۵ ساله می‌خواهد. ماهنامه آفتابگردان ۲۸: ۲۷- ۳۵.

Gamborg OL, Miller RA and Ojiwa K (1968). *In vitro* microspore reaction of suspension culture of soybean root callus. Experimental Cell Research. 50: 151-158.
Keller WA and Armstrong KC (1987). *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*. Journal of Cytology. 17: 655-666.
Koprna R, Kucera V, Kolovrat O, Vyvadilova M and Klima M (2005). Development of self-incompatible lines with improved seed quality in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) for hybrid breeding. Gzech Journal of Genetics and Plant Breeding. 41: 105-111.

Lichter R (1982). Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspore of different Brassicacea species. Plant Bree. 103: 119-123.
Mendham NJ (1995). Physiological basis of seed yield and quality in oilseed rape. Proc. of 9th Inter. Rapeseed Cong. 2: 485-490.
Pauls KP, Van Deynze A, Deslauriers C, Powell A, Siebel J, Cloutier C, Lo KH, Fuchs K and Fu CY (1994). Microspore culture in *Brassica napus* - a method for haploid production and a model system for studying embryogenesis in plants. Current Topics in Molecular and Genetics. 2: 35-51.
Pickering RA and Devaux P (1992). Haploid production approaches and use in plant breeding. In: PR Shewryed. Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and U.K. CAB International ed. 519-547.
Rakow JPR (1995). Field performance of quality in *Brassica juncea*. Proc. Of 9th inter. Rapeseed Cong. 2: 428
Wang Z, Yang C, Chen H, Wang P, Wang P, Song Ch, Zhang X, Wang D (2018). Multi-gene co-experssion can improve comprehensive resistance to multiple abiotic stresses in *Brassica napus* L.. Plant Science. 247: 410-419.
Weber S, Ünker F and Friedt W (2005). Improved doubled haploid production protocol for *Brassica napus* using microspore colchicine treatment *in vitro* and ploidy determination by flow cytometry. Plant Breeding. 124: 511-513.
Webster M (1998). Merriam Websters collegiate dictionary.10th Edition. Springfield. Massachusetts, USA. 228 and 968.
Zhou WJ, Hagberg P and Tang GX (2002). Increasing embryogenesis and doubling efficiency by immediate colchicine treatment of isolated microspores in spring *Brassica napus*. Euphytica. 128(1): 27-34.