دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

با عنوان

بررسی عوامل موثر در جنین زایی و باززایی کلزا(*Brassica napus*) به روش کشت میکروسپور

اساتید راهنما

دکتر قربا نعلی نعمت زاده

دکتر مهران عنایتی شریعت پناهی

استاد مشاور

دکتر محمد رضا احمدی

نگارش

مونا امامی فر

بهار ۸۸

فهرست عناوین

عنوان **شماره صفحه**

فصل اول

مقدمه ۲-۶

فصل دوم

کلیات وبررسی منابع

۲-۱- روشهای درون شیشه ای تولید گیاهان هاپلویید ۸

۲-۲- تعریف هاپلویید و مشتقات آن ۱۰

۲-۳- مزایای هاپلوییدهای مضاعف شده ۱۰

۲-۳-۱- سرعت بخشیدن به برنامه های اصلاحی ۱۰

۲-۳-۲- بهبود کارایی انتخاب ۱۱

۲-۳-۳- تشخیص لینکاژ و اثر متقابل ژنها ۱۲

۲-۳-۴- تشخیص واریانس ژنتیکی و تعداد ژنهای کنترل کننده صفات کمی ۱۲

۲-۳-۵- تسهیل انتقال ژنتیکی و مطالعات موتاسیونی ۱۳

۲-۳-۶- امکان تولید گیاهان نر ۱۵

۲-۴- افزایش کارایی انتخاب ۱۶

۲-۵- روشهای تولید هاپلوییدی ۱۷

۲-۵-۱ هاپلوییدهای خودبه خودی ۱۷

۲-۵-۲- هاپلوییدهای حاصل از تخمزا یا گامتوفیت ماده (پارتنوژنزیز) ۱۸

۲-۵-۳- هاپلوییدها حاصل از تلاقی های دور وکشت جنین ۱۸

۲-۵-۴- هاپلوییدهای حاصل از گرده افشانی با دانه های گرده پرتوتابی شده ۱۹

۲-۵-۵- هاپلوییدهای حاصل از میکروسپورها یا گامتوفیت نر ۲۰

۲-۶- تفاوت آندروژنزو ژینوژنز ۲۰

۲-۷- کشت بساک/میکروسپور ۲۱

۲-۸- مزایای کشت میکروسپور ۲۲

۲-۹- معایب کشت میکروسپور ۲۳

۲-۱۰- گیاهان آلبینو مشتق شده از کشت میکروسپور ۲۳

۲-۱۱- نمو دانه گرده ۲۴

۲-۱۲- مسیرهای رشد ۲۶

۲-۱۳- نشانه های میکروسپورهای جنین زا ۲۷

۲-۱۴- عوامل موثر در کشت میکروسپور ۲۹

۲-۱۴-۱-۱- تنش ۲۹

۲-۱۴-۱-۲- عاملهای آنتی میوتیک(کلشی سین، تریفلورالین، اورایزلین و پرونامید) ۳۲
۲-۱۴-۱-۳- 2,4-D ۳۵
۲-۱۴-۲- مرحله تکاملی میکروسپور ۳۷
۲-۱۴-۳- تراکم میکروسپورهای کشت شده ۳۹
۲-۱۴-۴-فاکتورهای ژنتیکی ۴۰
۲-۱۴-۵- اثرات متقابل محیط و ژنوتیپ ۴۲
۲-۱۴-۶- ترکیب محیط کشت ۴۴
۲-۱۵- باززایی جنین ها ۴۵
۲-۱۶- دو برابر شدن خودبه خودی کروموزمها ۴۶
۲-۱۷- سوسپنسور ۴۷

فصل سوم

مواد وروشها

۳-۱- رشد ونگهداری گیاهان بخشنده میکروسپور ۵۰
۳-۲- کشت میکروسپور ۵۱
۳-۳- اعمال تنشها ۵۲
۳-۳-۱- آزمایش اول:تنشهای حرارتی ۵۲
۳-۳-۲- آزمایش دوم: 2,4-D ۵۳
۳-۳-۳- آزمایش سوم : اورایزلین و تریفلورالین ۵۴
۳-۳-۴- آزمایش چهارم:پرونامید ۵۴
۳-۴- باززایی جنین ها ۵۴
۳-۵- نحوه آماربرداری ۵۵
۳-۶- تجزیه داده ها ۵۵
۳-۷- محیط های مورد نیاز برای کشت میکروسپور و باززایی جنین ها ۵۶
۳-۷-۱- محیط شستشو ۵۶
۳-۷-۲- محیط القاء جنین زایی(NLN مایع) ۵۶
۳-۷-۳- محیط باززایی ۵۹
۳-۸- رنگ آمیزی با DAPI ۶۱

فصل چهارم

نتایج و بحث

۴-۱- آزمایش اول : مطالعه اثر تنش حرارتی بر روی جنین زایی میکروسپور در ژنوتیپ های مختلف کلزاو بهینه سازی دستورالعمل کشت میکروسپور(۶۳

جنین زایی و باززایی)
۴-۲- آزمایش دوم : مطالعه اثر تنش شیمیایی 2,4-D روی جنین زایی در ژنوتیپ های مختلف کلزا ۷۰
۴-۳- آزمایش سوم : مطالعه اثر تنش شیمیایی اورایزلین و تریفلورالین روی جنین زایی میکروسپور در ژنوتیپ های مختلف کلزا ۸۴
۴-۴- آزمایش چهارم : مطالعه اثر تنش شیمیایی پرونامید روی جنین زایی میکروسپور کلزا ۹۰
۴-۵- پیشنهادات ۹۵
فهرست منابع ۹۶
چکیده انگلیسی ۱۱۳

فهرست جداول

عنوان **شماره صفحه**

جدول۱-۱-برنامه ۵ ساله تولید دانه های روغنی سالهای(۱۳۸۸-۱۳۹۲). ۳

جدول۲-۱-واریانس های مورد انتظار در نسلهای F_2 و F_3 و جمعیتهای دابلد هاپلوِییدی حاصل از F_1. ۱۳

جدول۲-۲-گامتهای حاصل از گرده و تخمزا از گیاهی با ژنوتیپ AaBb. ۱۶

جدول۳-۱- طرز تهیه کود هوگلند برای ۱۰۰ لیتر آب. ۵۱

جدول۳-۲- عناصری که ابتدا از آنها برای تهیه محیط NLN13 استوک تهیه کرده . ۵۷

جدول۳-۳-عناصری به صورت پودری به طور مستقیم به محیطNLN-13 اضافه می شود. ۵۸

جدول۳-۴- پروتکل محیط باززایی B5 ۶۰

جدول ۴-۱-۱: آنالیز واریانس ژنوتیپ، مدت زمان اعمال تیمار و اثرات متقابل آنها روی میزان جنین زایی ۶۳

جدول ۴-۱-۲: آنالیز واریانس ژنوتیپ، مدت زمان اعمال تیمار و اثرات متقابل آنها روی میزان باززایی ۶۶

جدول۴-۲-۱: تجزیه واریانس بررسی اثر تنش شیمیایی 2,4-D روی جنین زایی میکروسپورها و باززایی جنین های بدست آمده در رقم Topas ۷۰

جدول ۴-۲-۲ : تجزیه واریانس بررسی اثر تنش شیمیایی 2,4-D روی جنین زایی میکروسپورها و باززایی جنین های بدست آمده در هیبرید Hyola 420 ۷۵

جدول۴-۲-۳-بررسی اثر تنش شیمیایی 2,4-D و تیمار حرارتی روی جنین زایی ۸۱

میکروسپورها در هیبرید های Hyola 420 و Hyola 308 (تشخیص ساختار سلولی بوسیله رنگ DAPI)

جدول۴-۳-۱: مقایسه آماری مربع کای بررسی اثر تنش شیمیایی اورایزلین و تریفلورالین روی جنین زایی در کشت میکروسپورهای کلزای هیبرید Hyola 420 ۸۵

جدول ۴-۴-۱: مقایسه میانگین بررسی اثر تنش شیمیایی پرونامید روی جنین زایی میکروسپورها و باززایی جنین های بدست آمده در ژنوتیپ Hyola 420 ۹۰

فهرست اشکال

عنوان **شماره صفحه**

شکل۱-۱: مثلث روابط ژنومی در جنس براسیکا. ۴

شکل۲-۱- مسیرهای مختلف اولین تقسیمات آندروژنز در دانه های گرده و در نهایت نمو توده های سلولی پیش جنین که به دست می آید. ۲۷

شکل۴-۱-۱: مقایسه میانگین تعداد جنین های تشکیل شده از ۲۵ غنچه در تنش حرارتی در هیبرید Hyola 420 ۶۴

شکل ۴-۱-۲ : مقایسه میانگین تعداد جنین های تشکیل شده از ۲۵ غنچه در تنش حرارتی در هیبرید Hyola 401 ۶۵

شکل ۴-۱-۳: درصد تعداد جنین های باززایی شده در تنش حرارتی در هیبرید Hyola 420 ۶۶

شکل۴-۱-۴: درصد تعداد جنین های باززایی شده در تنش حرارتی در هیبرید Hyola 401 ۶۷

شکل ۴-۱-۵: اثر متقابل ژنوتیپ و مدت زمان اعمال تیمار روی جنین زایی در دو هیبرید Hyola 401 و Hyola 420 ۶۷

شکل۴-۱-۶: اثر متقابل ژنوتیپ و مدت زمان اعمال تیمار روی باززایی در دو هیبرید Hyola 401 و Hyola 420 ۶۸

شکل۴-۲-۱: بررسی اثر تنش شیمیایی 2,4-D روی جنین زایی میکروسپورها در رقم Topas ۷۱

شکل ۴-۲-۲: مقایسه میانگین تعداد جنین های تشکیل شده مرحله نیزه ای شکل در اثر تیمار با 2,4-D در ر قم Topas ۷۲

شکل ۴-۲-۳: مقایسه میانگین تعداد جنین های باززایی شده در اثر تیمار بـا 2,4-D در ر قم Topas ۷۲

شکل۴-۲-۴: بررسی اثر تنش شیمیایی 2,4-D روی باززایی جنین های بدست آمـده در رقم Topas ۷۳

شکل۴-۲-۵: مقایسه میانگین تعداد جنین نیزه ای شکل تشکیل شده در اثر تیمـار با 2,4-D در هیبرید Hyola 420 ۷۶

شکل۴-۲-۶: مقایسه میانگین تعداد جنین های باززایی شده در اثر تیمـار بـا 2,4-D در هیبرید Hyola 420 ۷۷

شکل۴-۲-۷: اثر تنش شیمیایی 2,4-D روی جنین های نیزه ای شکل میکروسپورها در هیبرید Hyola 420 ۷۸

شکل ۴-۲-۸ : اثر تنش شیمیایی 2,4-D روی باززایی جنین هـای بدسـت آمـده در هیبرید Hyola 420 ۷۸

شکل۴-۲-۹: مقایسه جنین زایی و باززایی میکروسپورهای تحت تنش 2,4-D ۸۰

شکل ۴-۲-۱۰: مقایسه تعداد میکروسـپورهای مـرده در دو هیبریـد Hyola 420 و Hyola 308 در اثر استفاده از 2,4-D به تنهایی و یا در ترکیب با تیمار حرارتی ۸۲

شکل ۴-۲-۱۱: مقایسه تعداد سـاختارهای دوسـلولی و سـه سـلولی در دو هیبریـد Hyola 420 و Hyola 308 در اثر استفاده از 2,4-D به تنهایی و یا در ترکیـب بـا تیمار حرارتی ۸۳

شکل ۴-۳-۱: مقایسه تعداد جنین های تشکیل شده از ۲۵ غنچه در استفاده از تنش های تری فلورالین و اورایزلین و همچنین تنش تـری فلـورالین و تـنش حرارتـی در هیبرید Hyola 420 ۸۶

شکل ۴-۳-۲: مقایسه درصد جنین های باززایی شده در استفاده از تنش های تـری فلورالین و اورایزلین و همچنین تنش تـری فلـورالین و تـنش حرارتـی در هیبریـد Hyola 420 ۸۷

شکل۴-۳-۳: مراحل مختلف جنین زابی میکروسپور کلزا در تیمار با تریفلورالین ۸۹

شکل۴-۴-۱: مقایسه میانگین تعداد جنین های تشکیل شده در اثر تیمار با پرونامید در هیبرید Hyola 420 ۹۱

شکل ۴-۴-۲: مقایسه میانگین تعداد جنین های باززایی شده در اثر تیمار با پرونامید در هیبرید Hyola 420 ۹۲

شکل ۴-۴-۳: اثر تنش شیمیایی پرونامید روی تعداد جنین زایی میکروسپور در هیبرید Hyola 420 ۹۳

شکل ۴-۴-۴: اثرتنش شیمیایی پرونامید روی تعداد باززایی جنین های بدست آمده در هیبرید Hyola 420 ۹۳

فصل اول

مقدمه

کلزا به عنوان یک گیاه دانه روغنی خوراکی از زمان جنگ دوم جهانی مورد توجه واقع شد و تلاشهای به نژادی برای مواد مضره آن طی دو دهۀ گذشته شدت یافت. ارقام کلزا به دو گونه براسیکا نیپوس (*Brassica napus* L.) یا کلزای معمولی و براسیکا کمپستریس (*B. campestris* L.) یا شلغم روغنی تعلق دارند[۱۰].

دانه روغنی کلزا سومین منبع مهم روغن مصرفی گیاهی در جهان بعد از نخل روغنی و سویا می_باشد[۲۵]. روغن گیاهی جایگاه ویژه ای در سبد غذایی خانوار دارد. بااین وجود علی رغم سرانه بالای مصرف این محصول در کشور، در ۷ماهه سال ۸۷ مقدار ۶۴۲ هزارتن دانه روغنی به ارزش ۳۵۴ میلیون دلار وارد شد که در مقایسه با مدت مشابه سال قبل از نظر وزنی ۱۵ درصد کاهش و از لحاظ ارزش دلاری با ۴۳ درصد افزایش روبرو بوده است[۱۷]. ۷۰- ۷۵ درصد روغن خوراکی کشور از خارج وارد می شود. اگر نیاز کشور به جای واردات روغن خام از محل واردات دانه روغنی تامین شود هم ظرفیت کارخانه ها تکمیل شده و هم باعث ایجاد اشتغال می شود. کلزا با داشتن ۴۰-۴۵٪ روغن و ۳۸-۴۵ ٪ پروتئین در فهرست دانه های روغنی قابل کشت در کشور قرار گرفته است. مهمترین کشت محصول دانه های روغنی، کلزا است که از نظر زراعی در تناوب با محصولاتی مانند گندم و جو قرار گرفته و به صورت پاییزه کاشته می شود. براساس برنامه پنجم توسعه سطح زیرکشت کلزا از ۲۰۰ هزار هکتار به ۷۵۵ هزار هکتار در کشت آبی و دیم افزایش خواهد یافت(جدول۱_۱)[۱۷]. وابستگی شدید کشور به این محصول غذایی و ضرورت ایجاد امنیت غذایی، لزوم انجام مطالعاتی به منظور افزایش تولید دانه های روغنی و در نهایت خودکفایی در این زمینه احساس می شود.

جدول۱-۱:برنامه ۵ ساله تولید دانه های روغنی سالهای(۱۳۸۸-۱۳۹۲)[۱۷].

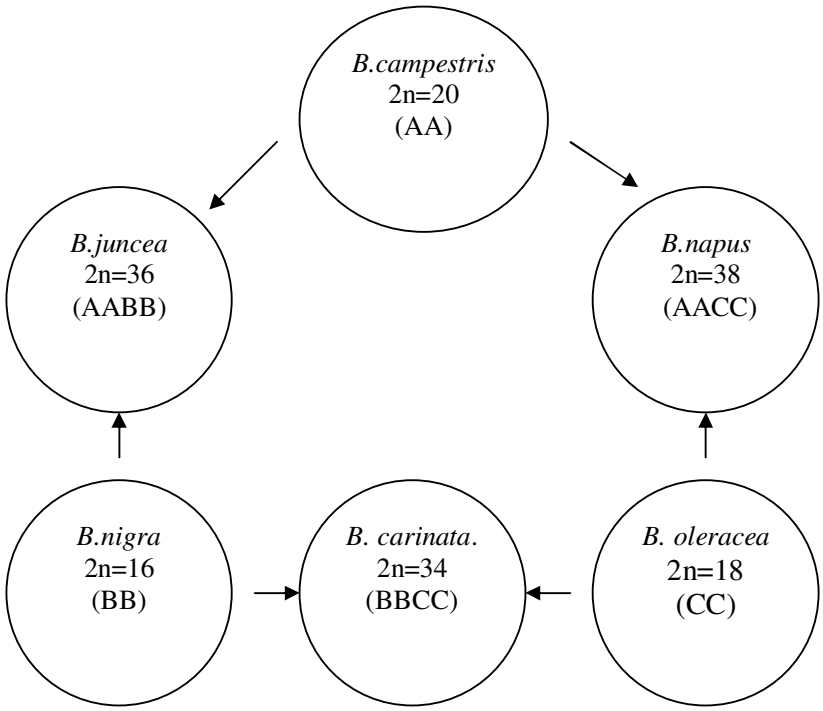
نام محصول	سال	سال اول ۸۸-۸۷	سال دوم ۸۹-۸۸	سال سوم ۹۰-۸۹	سال چهارم ۹۱-۹۰	سال پنجم ۹۲-۹۱
کلزا	سطح زیرکشت	۲۵۰۰۰۰	۳۹۵۰۰۰	۵۲۵۰۰۰	۶۴۰۰۰۰	۷۵۵۰۰۰
	متوسط عملکرد	۱۵۸۷	۱۷۸۷	۱۹۲۰	۲۰۴۷	۲۰۹۴
	تولید دانه	۳۹۸۹۰۰	۷۰۵۸۶۵	۱۰۰۸۰۰۰	۱۳۱۰۰۸۰	۱۵۸۱۰۰۰

از کلزاعلاوه برکارایی بالای آن در تهیه غذا، به عنوان یک سوخت زیستی برای حمل ونقل نیز استفاده می _شود. همچنین می توان از آن به طور کارآمدتری نسبت به سایر گونه های گیاهی در پروژه های تصفیه زیستی برای تصفیه آلودگی ناشی از تجمع فلزات سنگین خاکها سود جست[۱۱۸]. زمانیکه روغن های *Brassica* کمترین Aliphatic glucosinolates و اسید اروسیک را داشته باشد، عموماً تحت عنوان Canola خوانده می شوند. در اغلب اوقات لفظ Canola به *B.napus* اشاره دارد[۲۷].

کلزا با نام علمی براسیکا نیپوس گیاهی است یک ساله از تیره چلیپاییان خردل(*Crusiferae*)، آلوتتراپلویید با ۱۹ جفت کروموزم (2n=38) که به صورت بوته ای استوار، با انشعابات محدود و ارتفاع متوسط تا بلند رشد می کند. طول دوره رشد کلزا در ارقام زودرس و کشت بهاره از ۹۰ تا ۱۵۰ روز و در کشت پاییزه از ۲۰۰ تا ۳۳۰ روز می رسد[۱۰]. این گیاه دربرابر خشکی و سرما مقاوم بوده و به دلیل سازگاری، دامنه کشت وسیعی دارد[۱۱] . کلزا گیاهی خود گشن- دگر گشن می باشد و درصد دگرگشنی آن در ارقام مختلف ۲۲-۳۳٪ گزارش شده است [۱۳].

وجود طبیعی ژنومهای خویشاوند در *Brassica spp.* به عنوان مثالی از شناسایی ژنومها در آلوپلویید طبیعی بیان می شود. *Brassica juncea* (AABB) یک آمفی دیپلویید طبیعی است که از ترکیب ژنومهای *B.campestris*(AA) و*B.nigra*(BB) به وجود آمده است *B.napus*(AACC) آمفی دیپلویید طبیعی از

ترکیب ژنومهای *B.campestris* (AA) و *B.oleracea*(CC) و نهایتاً *B.carinata* (BBCC) آمفی دیپلوییـد طبیعی است که از ترکیب ژنومهـای *B.nigra*(BB) و*b.oleracea* (CC) بـه دسـت آمـده اسـت[۱]. روابـط ژنومی بین گونه های متعلق به جنس براسیکا در شکل۱-۱ نشان داده شده است.



شکل۱-۱: مثلث روابط ژنومی در جنس براسیکا [۱].

روشهای سنتی اصلاح نباتات در چند دهه اخیر نقش بسیار مهمی در اصلاح عملکرد و کیفیـت کلـزا داشته اند، که از میان این روشها می توان به روش انتخاب توده ای[1] و گزینش شجره ای[2] اشاره کرد. ازمعایب این روشها، طولانی بودن دوره آنها می باشد. امروزه متخصصین اصـلاح نباتـات بـه دنبـال روشـهای دیگـری هستند که بتوانند این مدت را به حداقل ممکن برسانند تا در وقت و هزینه های سنگین برنامه هـای اصـلاح

[1]-Mass selection
[2]-Pedigree

نباتات صرفه جویی شود. یکی از این روشها، اصلاح از طریق سیستم هاپلوییدی است. سیستم هاپلوییدی در صورتی موفق است که بتوان گیاهان دابلد هاپلویید تولید کرد. روش کشت میکروسپورهای جدا شده امروزه در خیلی از برنامه های اصلاحی کلزا در سراسر جهان به عنوان یک روش متمم و مکمل روشهای معمول تولید لاینهای خالص استفاده می شود[۹۲].

استفاده از کشت میکروسپور تنها محدود به تولید لاینهای دابلد هاپلوییدی نبوده بلکه با ایجاد فن آوری، میکروسپور به یک سلول فوق العاده در خدمت علوم پایه جهت پاسخگویی به سوالات اساسی و حل مشکلات تبدیل گشته است. به عنوان سیستمهای آزمایشی، کشت میکروسپور می تواند برای تشخیص نمو گرده و گرده افشانی، جنین زایی، توتی پوتنسی، چرخه سلولی، تغییر فاز و نقش تنش در نمو مورد استفاده قرار گیرد[۱۶۴]. در مطالعات ژنتیکی و به نژادی، کشت میکروسپورهای ایزوله شده می تواند به عنوان جدید ترین و کارآمدترین روش جهت تولید دابلد هاپلوییدها (لاینهای اینبرید نوترکیب) به منظور استفاده در اصلاح نباتات و تهیه نقشه های ژنتیکی، غلبه کردن بر موانع تلاقی (نر عقیمی و خود ناسازگاری)، القاء وانتخاب جهشها و ایجاد گیاهان تراریخته استفاده گردند [۱۳۰]. میکروسپور به عنوان یک سلول با پتانسیل توسعه محدود، می تواند با تیمار تنش در جهت ایجاد توتی پوتنت مجدداً برنامه ریزی شود. آنالیزهای مولکولی، فیزیولوژیکی، بیولوژی سلولی و بیوشیمیایی باعث افزایش اطلاعات در مراحل برنامه نویسی مجدد سلولی می شود[۱۲]. از جنین زایی میکروسپور جهت شناسایی مسیرهای بیوشیمیایی و ارزیابی محصولات متابولیکی استفاده می شود[۸۶]. جنین زایی میکروسپور در مطالعات میزان Glucosinolate نیز استفاده می گردد[۱۸۹].

کشت میکروسپور کلزا به دلیل فراوانی بالا جنین زایی که می تواند در محدوده وسیعی از ژنوتیپها به دست آید، در تولید لاینهای دابلد هاپلوییدی در برنامه های اصلاحی کلزا به طور معمول استفاده می شود[۱۴۷]. هم اکنون تکنولوژی کشت میکروسپور قسمت مهمی از چندین برنامه اصلاحی براسیکا می باشد. با استفاده از روش کشت میکروسپور تاکنون تعدادی از واریته های کلزا مانند Quantum،Viz cyclone و Q_2 و غیره جهت کشت تجارتی آن تهیه و توزیع شده اند[۱۵۳]. اگرچه، باززایی جنین ها و فراوانی دابلد هاپلوییدهای

بارور که از میکروسپور مشتق شده است هنـوز قابـل قبـول نیـست، بنـابراین، اسـتفاده از تکنیکهـایی بـا اثـر دیپلوییدی مثل استعمال عاملهای آنتی میتوتیک لازم است[۹۱].

در کشت میکروسپور می توان با استعمال تنشهای جدیدی که سمیت کمتـر دارنـدو درغلظـت کمتـر از آنهـا استفاده می شودو خاصیت آنتی میکروتوبولی کروموزم در محیط کشت دارند، تولید جنین کرد و این تنـشها را در گو نه هایی که به سختی یا اصلاً تولید جنین نمی کنند استفاده کرد.

فصل دوم

کلیات و بررسی منابع

۲-۱- روشهای درون شیشه ای[1] تولید گیاهان هاپلویید

کشت بافت گیاهی اصولا به محدوده وسیعی از تکنیک هایی که شامل رشد تحت شرایط استریل می _باشد اطلاق می شود، که شامل کشت اندام گیاهی، توده سلولهای بی شکل(کالوس)، سلولهای منفرد(مایع)، یا حتی سلولهایی بدون دیواره سلولی(پروتوپلاست) می باشد[۳۹].

کاربردهای کشت بافت گیاهی شامل مواردی نظیر تکثیر سریع گیاهان، نگهداری ژرم پلاسم، حذف عوامل بیماری زا از طریق کشت مریستم، رفع مساله عقیمی هیبرید بین گو نه ای، تهیه هیبریدهای سوماتیکی و تهیه گیاهان هاپلویید می باشد[۱۸].

کشت بافت برپایه تئوری توتی پوتنسی که به وسیله اسچوان[2] (۱۸۳۹) تعریف شده می باشد. تئوری توتی پوتنسی براین اساس است که سلول واحد، تحت مواد مغذی صحیح توانایی باززایی به سمت یک گیاه کامل را دارد.

هاپلوییدها در گیاهان برای اولین بار به وسیله برگنر[3] در سال ۱۹۲۱ روی *Datura stramonium* L. تشخیص داده شد ودر مجله ساینس[4] به وسیله بلک سلی و همکاران[5] (۱۹۲۲) گزارش شد[۲۴]. برطبق گفته کاشا و ملوسینزکی[6] (۲۰۰۳)، اولین تلاشها برای استفاده هاپلوییدی در اصلاح به وسیله گاس[7] (۱۹۵۲) بود، کسی که هاپلویید های پارتنوژنزیز[8] (تشکیل جنین بدون باروری سلول تخم) با فراوانی پایین در ذرت تولید کرد و سپس با استفاده از تیمار مضاعف کردن کروموزمها تولید لاینهای خالص نمود. تولید جنین ها و گیاهان به وسیله کشت بساکها ی *Datura* به وسیله گوها و مهشواری[9] (۱۹۶۶-۱۹۶۴) گزارش شده است. سپس در سال ۱۹۷۰، کاشاو کااو[10] تولید هاپلویید در جو به دنبال هیبریداسیون وحشی و حذف ترجیحی

[1]-*In vitro*
[2]-Schwann
[3]-Bergner
[4]-Sience
[5]-Blackeslee et al
[6]-Kasha and Malusynski
[7]-Ghase
[8]-Parthenogenesis
[9]-Guha and Maheshwari
[10]-Kasha and Kao

کروموزمهای گونه وحشی در طول جنین زایی اولیه را گزارش کردند[۸۴]. سن نویم[۱] (۱۹۷۶) اولین موفقیت در گیاهان هاپلویید را در *Hordeum vulgare*، از سلولهای کیسه جنینی، به دست آورد، سپس با استفاده از کلشی سین آن را دیپلویید نمود. لینگ و همکاران[۲] (۱۹۸۳) گزارش کردند که امکان القاء هاپلوییدی، به ویژه در نهاندانگان وجود دارد؛ به طوری که ۲۴۷ گونه و هیبریدهای آن از ۸۸ جنس و ۳۴ خانواده، قادر به تولید هاپلوییدی در محیط درون شیشه ای هستند. گاهی اوقات، تفاوتهای مشخصی در القاء هاپلوییدی، حتی در داخل یک جنس وجود دارد؛ به طوری که القاء هاپلوییدی در بعضی، بسیار ساده؛ و در بعضی دیگر؛ غیر ممکن است. این تفاوت را می توان در داخل جنسهای *Oryza*، *Lycopersicon*، *Arabidopsis*، *Solanum*، *Triticum*و *Nicotiana* به وضوح مشاهده کرد. تاکنون موفقیتهای کمی در ارتباط با درختان ودرختچه ها، وجود داشته است[۲]. گیاهان هاپلویید *Brassica* اولین بار توسط کشت بساک[۳] *Brassica oleracea*تولید شده است[۷۸]. مطالعات متوالی، در پیشرفت پروتکلهایی برای تولید هاپلویید گیاهان در *Brassica napus* و*Brassica campestris* نتیجه داده است[۸۷و۱۵۷]. اگرچه عملکرد جنین ها در بساکهای کشت شده رو به افزایش بود اما در مقایسه با هزاران میکروسپوری که در بساک وجود دارد کم بود. لیچتر[۴] اثبات کرد که عملکرد جنینها زمانی که میکروسپورها به جای بساکهای *Brassica napus* کشت داده شوند ۳/۴ ٪ افزایش یافت. کشت میکروسپور کلزا برای اولین بار توسط لیچتر در سال ۱۹۸۲ گزارش گردید[۹۷]. از آن تاریخ به بعد پیشرفتهای قابل توجهی برای توسعه یک روش موثر برای تولید جنین های هاپلویید حاصل از میکروسپور در گونه های مختلف براسیکا صورت گرفته است[۳۰و۱۵۶]. در دهه ۸۰، ارقام بهاره کلزا(مثل توپاس[۵]) به طور وسیعی به عنوان گیاهان مدل برای بهبود و پیشرفت پروتکل کشت میکروسپور استفاده شدند[۳۳]. بیش از ۲۰۰ واریته با استفاده از روش های مختلف هاپلوییدهای مضاعف شده تولید شده است. بیشترین واریته های ایجاد شده از روش هاپلوییدهای مضاعف شده به ترتیب در

---

[1]-San noeum
[2]-Ling et al.
[3]-Anther culture
[4]-Lichter
[5]-Topas

گیاهان جو،کلزا، و گندم می باشد[۱۵۸]. بر پایه گفته کلر و فریه[1] (۲۰۰۴)، تـاکنون بـیش از ۵۰ واریتـه از دانه های روغنی براسیکا به صورت تجاری به وسیله کشت میکروسپور تولید شده است.

۲-۲- تعریف هاپلوییدو[2] مشتقات آن

هاپلویید یک لغت عمومی برای گیاهان (اسپروفیتها[3]) است که شـامل تعـداد کرومـوزم گـامتی (n) مـی _باشد. بنابراین در گونه های اسپروفیتیک دیپلویید(2n) ، هاپلویید همچنین می توانـد بـه دلیـل دارا بـودن فقط کروموزم های یک ژنوم، مونوپلویید[4] (x) نامیده شود. در گونه هـای پلـی پلوییـد، هاپلوییـدها بـه دلیـل داشتن بیش از یک ژنوم، پلی هاپلویید[5] نامیده می شوند. گیاه هاپلویید حاصـل از یـک اتوتتراپلوییـد(4x) بـا چهار سری از یک ژنوم اصولا یک دای هاپلویید[6] نامیده می شود(زیرا 2n=2x).

این مهم است که توجه داشته باشیم وقتی تعداد کروموزم یک هاپلویید دوبرابر می شود، آن را باید دابلد هاپلویید (DH)بنامیم نه یک دای هاپلویید. یک دای هاپلویید، به خـاطر تظـاهر دو سـری کرومـوزم از چهـار سری در اتوتتراپلویید خالص نیست، در حالی که یک دابلد هاپلوییـد از یـک مونوپلوییـد یـا آلوپلوییـد کـاملا خالص می باشد[۱۴۲].

۲-۳- مزایای هاپلوییدهای مضاعف شده(دابلد هاپلویید)

۲-۳-۱- **سرعت بخشیدن به برنامه های اصلاحی**: مزیت اصلی دابلد هاپلوییدی در اصلاح، کاهش زمان مورد نیاز برای معرفی یک رقم جدید می باشد[۱۵۸و۱۶۴]. برای تولید یک رقم درمحصولا ت یکـساله خود گشن عموما ۱۰-۱۵ سال در طول یک برنامه اصلاحی معمول مثل روش شجره ای که شامل خودگشنی

[1]-Keller and Ferrie
[2]-Doubled Haploid
[3]-Sporophytes
[4]-Monoploid
[5]-Polyhaploid
[6]-Dihaploid

و سپس انتخاب می باشد زمان لازم است. روش تک دانه ای (SSD)[1] نیز برای سرعت بخشیدن به تولید لاینهای خالص بهبود یافته است، اما آن نیز همچنین متحمل تاخیر زمان و اثر متقابل رقابتی بین گیاهان می باشد. تولید هاپلوییدها به دنبال دو برابر کردن کروموزم برای تولید هموزیگوس، از لاینهای بهتر انتخاب شده، می تواند زمان تولید یک رقم را به میزان ۳-۴ سال کاهش دهد. برای گیاهان دگرگشن نا خالص[۲]، دابلد هاپلویید یک روش سریع تولید لاینهای اصلاحی خالص هموزیگوس[۳] است، که می تواند در تولید واریته های سینتتیک یا هیبریدها استفاده شود[۱۴۱].

۲-۳-۲- **بهبود کارایی انتخاب:** در روش شجره ای در مراحل اولیه تک گیاه است که انتخاب می _شود و انتخاب در جهت اثرات غالب است وانتخاب اولیه بر پایه گیاه منفرد بدون تکرار می باشد[۷۳]. تولید دابلد هاپلوییدی می تواند کارایی انتخاب را بر پایه فنوتیپ گیاه که توسط اثرات غالبیت پوشیده نشده است بهبود دهد. صفاتی که به وسیله ژنهای مغلوب کد می شوند به راحتی قابل تشخیص است[۱۴۲]. زمانی که انتخاب برای نوترکیبهای مطلوب است، جمعیت کمتری از دابلد هاپلوییدها نسبت به جمعیت دیپلوییدمعمول نیاز می باشد[۱۶۴].

در صفات کیفی احتمال دستیابی به یک ژنوتیپ خاص (ترکیبی از ژنها در شرایط هموزیگوت) با n جفت ژن در نسل F_2 برابر با $(1/4)^n$ است. در حالیکه این احتمال در روش هاپلوییدی معادل نسبتهای گامتهای نر یا ماده یعنی $(1/2)^n$ می باشد. برای مثال با ۳ جفت ژن این احتمال در روش هاپلوییدی ۱/۸ و در نسل F_2 مربوط به روش کلاسیک ۱/۶۴ می شود[۸].

[1]-Single seed descent
[2]-heterozygous
[3]-homozygous