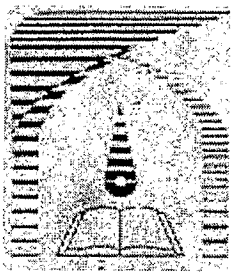
۱۰۱۷۹

۱۳۸۷ /۵/ ۲۵

«سبحانک لاعلم لنا الا ما علمتنا انک انت العلیم الحکیم».

«قرآن کریم»

۴۶۲۰۸



وزارت علوم ، تحقیقات و فناوری

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

رساله دکتری

اصلاح نباتات- ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک

عنوان

کاربرد مواد هاپلوئیدی آندروژنیک در تولید گیاه تراریخت کلزا (*Brassica napus* L.)

۱۳۸۷ /۵/ ۲۵

استاد راهنما

دکتر احمد معینی

اساتید مشاور

دکتر امیر موسوی و دکتر علی هاتف سلمانیان

نگارنده

محمد رضا عبدالهی

زمستان ۱۳۸۶

۴۲۲۰۸

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای محمد رضا عبدالهی رساله ۲٤ واحدی خود را با عنوان: کاربرد مواد هاپلوئیدی آندروژنیک در تولید گیاه تراریخت کلزا (*Brassica napus* L.) در تاریخ ۱۳۸٦/۱۲/۱۲ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تأیید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اصلی	دکتر احمد معینی	دانشیار	
۲- استاد راهنمای دوم	------		
۳- استاد مشاور اول	دکتر امیر موسوی	استادیار	
٤- استاد مشاور دوم	دکتر علی هاتف سلمانیان	دانشیار	
٥- استاد ناظر	دکتر قاسم کریم زاده	دانشیار	
٦- استاد ناظر	دکتر حمید دهقانی	دانشیار	
۷- استاد ناظر	دکتر محمد رضا زمانی	استاد	
۸- استاد ناظر	دکتر منصور امیدی	دانشیار	
۹- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر مختار جلالی جواران	دانشیار	

بسمه تعالی

آیین نامهٔ چاپ پایان نامه(رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبیّنبخشی از فعالیتهای علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

مادّه ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اطلاع دهد.

مادّه ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل رسالهٔ دکتری نگارنده در رشته **اصلاح نباتات- ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک** است که در سال ۱۳۸٦ در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی جناب آقای دکتر احمد معینی و مشاورهٔ جناب آقای دکتر امیر موسوی و مشاورهٔ جناب آقای دکتر علی هاتف سلمانیان از آن دفاع شده است"

مادّه ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّه ٤ در صورت عدم رعایت مادّه ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

مادّه ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّه ٤ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّه ٦ اینجانب محمد رضا عبدالهی دانشجوی رشته اصلاح نباتات- ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: محمد رضا عبدالهی

تاریخ و امضاء:

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسان ها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح در مورد نتایج پژوهش های علمی که تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرح های تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها، رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما نویسنده مسئول مقاله باشند.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی به صورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه و رساله منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه، رساله و تمامی طرح های تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آیین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان نامه، رساله و تمامی طرح های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

محمدرضا عباسی

تقدیم به:

روح پدر بزرگوار

و مادر عزیزم

و مجاهدینی که عمر خود را در راه اعتلای علم و کاهش آلام انسانها به تعلیم و تعلم و تحقیق و تفکر سپری می‌کنند.

تقدیر و تشکر:

✾منت خدای را عز وجل، که طاعتش موجب قربت است و به شکر اندرش مزید نعمت ؛

✾از پدر و مادر و خانواده ام که درطول زندگی و تحصیلم، مشوق و یاورم بودند سپاس ویژه دارم ؛

✾از زحمات پدر گونه همه معلمینم، از دوران کودکی تا بحال بی نهایت سپاسگزارم ؛

✾تشکر فراوان از زحمات بی دریغ و مهربانی های استاد بزرگوارم آقای دکتر احمد معینی که راهنمایی این پایان نامه را بعهده داشتند ؛

✾از زحمات استاد گرانقدر جناب آقای دکتر امیر موسوی که مشاوری راهگشا بودند قدردانی می‌کنم

✾از زحمات شایسته آقای علی هاتف سلمانیان که همیشه راهنمای من بودند، سپاسگزاری می‌کنم ؛

✾از پرسنل و کارکنان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که جهت انجام امور پایان نامه همکاری کردند نیز قدر دانی می کنم ؛

✾از زحمات همسرم خانم مریم رضایی به خاطرکمک های ارزنده شان درتهیه این رساله قدردانی می کنم.

✾و با تشکر ویژه و سپاس فراوان از تمامی دوستان و کسانیکه در دوره تحصیلم، در سختیها و مشکلات یاری ام کردند.

چکیده

رویان زایی ثانویه به عنوان یک شکل باززایی رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا، ارقام پی اف (PF704)، گلوبال (Global) و آپشن (Option) در این تحقیق مطالعه گردید. بهترین نتایج در ارتباط با درصد رویان زایی ثانویه از کشت رویان های حاصل از کشت میکروسپور رقم گلوبال و پی اف (به ترتیب ۷۵/۸۸٪ و ٦٥/٩٧٪) به دست آمد و رقم پی اف بالاترین تعداد رویان ثانویه در هر رویان اولیه را ایجاد کرد (۲/۱۸ ± ۱٤/۹۱). در قسمت دوم این تحقیق پارامتر های مختلف انتقال ژن به میکروسپورهای کلزا (نوع پروموتور، تراکم میکروسپورهای بمباران شده، تعداد دفعات شستشوی میکروسپورها، اندازه ذرات طلا، و تیمارهای اسمزی در محیط کشت بمباران میکروسپورها) و همچنین پارامترهای انتقال ژن به هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا شامل: فشار گاز هلیوم، نوع و اندازه ذرات طلا، فاصله بین صفحه متوقف کننده تا بافت هدف، فشار خلاء در اتاقک بمباران و فعداد دفعات بمباران و همین طور تیمار اسمزی در محیط بمباران بررسی گردید. میکروسپورها و هیپوکوتیل های رویان های حاصل از کشت میکروسپور به ترتیب با ذرات طلای پوشش داده شده با ناقل پلاسمیدی دوگانه pBGWFS7-64 حاوی ژن های گزارشگر *gus* و *gfp* تحت کنترل پروموتور اختصاصی گرده P28640 و ناقل پلاسمیدی دوگانه pCAMBIA3301 حاوی ژن های *gus* و *pat* بمباران شدند. ۳۰ ساعت بعد از بمباران، بافت ها با محلول GUS رنگ آمیزی شدند و میکروسپورها و نقاط آبی شمرده شدند. دراین قسمت از آزمایش به منظور حذف فعالیت GUS درون زا، pH های مختلف محلول رنگ آمیزی GUS (۵/۸، ۷ و ۸) همراه یا بدون ۲۸٪ متانول در محلول واکنش مطالعه گردید. هیچ رنگ آبی مربوط به فعالیت GUS درون زا، در محلول رنگ آمیزی با pH =۸ و ۲۸٪ متانول در محلول واکنش مشاهده نگردید. همه پارامترهای مطالعه شده برای بمباران میکروسپورها و هیپوکوتیل ها برای سطوح بیان ژن *gus* به طور معنی داری متفاوت بودند.در ارتباط با بمباران میکروسپورها بالاترین سطوح بیان ژن *gus* با استفاده از ذرات طلای µm (۱ + ۰/٦) (۳۵/۱۷ ± ۵۷٦/٦۷)، تراکم ۱۰۰۰۰۰ میکروسپور در هر شلیک (۳٦/۵۵ ± ۵۳۰)، سه دفعه شستشوی میکروسپورها (۳۰/۵۱ ± ٤٦۷)، با استفاده از پروموتور اختصاصی گرده P28640 (۱۱/۰۱ ± ۵۰۳)، در یک محیط کشت بمباران میکروسپورها حاوی ٦/۵٪ ساکارز و ۰/۲M مانیتول (۲۷/۵۳ ± ٦۷۲) به

دست آمد. بالاترین سطوح بیان ژن *gus* برای هیپوکوتیل های رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا با استفاده از ذرات طلای µm ۱/٦، در فشار گاز هلیوم psi ۱۳۵۰، فاصله بمباران cm ۹، فشار خلاء اتاقک بمباران inHg ۲٤ و یک بار بمباران در محیط کشت بمباران حاوی M ۰/٤ به دست آمد (۱۰٤/۲۳ ± ۱۱۲۰/۳۳). در قسمت دیگر این تحقیق یک روش جدید تراریختی برای میکروسپورها و هیپوکوتیل های رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا بر اساس ایجاد زخم های کوچک در این بافت ها توسط بمباران ذره ای قبل از آلوده سازی با سوسپانسیون آگروباکتریوم گزارش گردید. در این مطالعه اثر دو روش تراریختی (تلفیق دو روش تراریختی بمباران ذره ای و آگروباکتریوم و تراریختی تنها با روش بمباران ذره ای) روی بیان گذرای ژن *gus* در میکروسپورها و هیپوکوتیل های رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا رقم پی اف مطالعه گردید.پارامتر های بمباران شامل: فشار گاز هلیوم psi ۱۳۵۰، فاصله بین صفحه متوقف کننده و بافت هدف cm ۹، ذرات طلای µm ۱ و فشار خلاء اتاقک بمباران inHg ۲۷ برای میکروسپورها و inHg ۲٤ برای هیپوکوتیل ها بودند. در روش تراریختی تلفیقی، آگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) سویه LB_{4404} حاوی ناقل دوگانه pBGWFS7-64 حاوی ژن های گزارشگر *gus* و *gfp* تحت کنترل پروموتور اختصاصی گرده P28640 برای میکروسپورها و سویه AGL1 حاوی ناقل پلاسمیدی دوگانه pCAMBIA3301 حاوی ژن های *gus* و *pat* برای هیپوکوتیل ها استفاده شدند. میکروسپورها و هیپوکوتیل های بمباران شده با سازواره های ذکر شده، به ترتیب با سوسپانسیون آگروباکتریوم سویه LB_{4404} با ۰/۰۱٦، ۰/۰۰۸، ۰/۰۰٤، ۰/۰ = OD_{600} به مدت ۲٤ ساعت و سوسپانسیون آگروباکتریوم سویه AGL1 با ۱ = OD_{600} به مدت ۱۰ دقیقه و ۰/۲۵ = OD_{600} به مدت ۲٤ ساعت آلوده شدند. روش تراریختی تلفیقی، میانگین نقطه های آبی ایجاد شده را در میکروسپورها و هیپوکوتیل ها در مقایسه با روش بمباران تنها افزایش داد. و میکروسپورهای آلوده شده با آگروباکتریوم با OD_{600}=۰/۰۱٦ بالاترین تعداد میکروسپورهای آبی را در هر بمباران تولید کرد (۵۹/۷۰ ± ۷۷٤/۳۳). در حالی که هیپوکوتیل های آلوده شده با آگروباکتریوم با OD_{600}=۱ به مدت ۱۰ دقیقه بیشترین تعداد نقاط آبی را در هر بمباران تولید کردند (۲۳/٦۷ ± ۷٤۳). در قسمت آخر این تحقیق، گیاهان کلزای دابلد هاپلوئید تراریخت ارقام گلوبال و پی اف از هیپوکوتیل های رویان های حاصل از کشت میکروسپور، توسط روش بمباران ذره ای بدست آمدند. ناقل دوگانه

pCAMBIA3301 حاوی ژن های *gus* و *pat* برای آزمایشات بمباران استفاده گردید.شرایط بمباران برای انتقال ژن بهینه به این بافت ها بر اساس بیان گذرای ژن *gus* ۳۰ ساعت بعد ازبمباران برقرار گردید. گیاهان تراریخت بر روی محیط های کشت باززایی حاوی مواد انتخابگر mgl^{-1}۱۰-۵ علف کش باستا یا mgl^{-1} ۵۰ کانامایسین انتخاب گردیدند و ۲۶ گیاه تراریخت به دنبال انتخاب رویان های ثانویه برای علف کش باستا و کانامایسین بدست آمدند. تراریختی پایدار توسط آنالیزهای مولکولی PCR و RT-PCR و سنجش هیستوشیمیایی ژن *gus* تأیید گردید. سطح پلوئیدی توسط آنالیز فلوسایتومتری، قبل از تیمار با کلشیسین اندازه گیری شد. بیشتر گیاهان باززایی شده هاپلوئید بودند و ۳ گیاه دیپلوئید خود به خودی بودند و گیاهان دابلد هاپلوئید بارور تولید کردند. استفاده از باززایی هیپوکوتیل های رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا از طریق سیستم رویان زایی ثانویه، یک روش قابل اطمینان برای تولید گیاهان تراریخت در این تحقیق ایجاد کرد.

Keywords: *Brassica napus* L., Rapeseed, Secondary embryogenesis,. Microspore-derived embryos (MDE), Biolistic transformation, Transient GUS expression, reporter gene, Integrated transformation system.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۱- فصل اول : مقدمه	۱-۷
۲- فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام شده	۹
۲-۱- کلزا (Brassica napus L.)	۹
۲-۲- اصلاح گیاه کلزا	۱۱
۲-۲- ۱ - روشهای اصلاح کلزا	۱۱
۲- ۳- گیاهان هاپلوئید	۱۲
۲- ۳- ۱- مزایا و کاربرد گیاهان هاپلوئید	۱۲
۲-۳- ۲- روشهای تولید گیاهان هاپلوئید	۱٤
۲-۳-۲-۱- تولید خود به خودی	۱٤
۲-۳-۲-۲- تولید القایی(روشهای آزمایشگاهی)	۱٤
۲-۳-۲-۱- آندروژنز (نرزایی)	۱٤
۲-۳-۲-۱-۱- کشت بساک	۱۵
۲-۳-۲-۱-۲- کشت میکروسپور	۱۵
۲-۳-۲-۲- ژینوژنز (کشت تخمدان و تخمک)	۱٦
۲-۳-۲-۳- روش حذف کروموزومی	۱٦
۲ -٤ - کشت میکروسپور کلزا	۱٦
۲-۵- مطالعه رویان زایی ثانویه	۱۸
۲-۵-۱- مطالعه رویان زایی ثانویه در گیاه کلزا	۱۸
۲-۵-۲- بررسی رویان زایی ثانویه در سایر گیاهان	۲۰
۲- ٦- بررسی تراریختی ژنتیکی درگیاهان خانواده براسیکا (Brassicaceae)	۲٦
۲- ۷- ۲- ۷- روشهای انتقال ژن به سلولهای گیاهی	۳۰
۲- ۷- ۱- روش انتقال ژن بمباران ذره‌ای	۳۲
۲-۷ - ۱- ۱- انواع سیستم های بمباران ذره ای	۳۳
۲-۷ - ۱- ۱- سیستم انتقال ذره‌ای زیست پرتابی (PDS- 1000 / He, Biolistic)	۳۳
۲- ۷- ۱- ۱- ۲- تفنگ ریزش ذره‌ای	۳۵

۲- ۷- ۱- ۱- ۳- سیستم شتاب دهنده تخلیه الکتریکی (فناوری ACCELL™)	۳۶
۲- ۷- ۱- ۱- ٤- سیستم بمباران ریز هدف گیر	۳۷
۱- ۷- ۱- ۱- ٥- تفنگ‌ژنی هلیوس	۳۸
۲-۷ - ۱- ۲- کاربرد های روش انتقال ژن بمباران ذره‌ای	۳۹
۲- ۷- ۱- ۲-۱- بررسی بیان گذاری ژن	۳۹
۲-۷ - ۱- ۲-۲- تولید گیاهان و بافتهای تراریخت پایدار	٤۰
۲- ۷- ۱- ۲- ۳- تلقیح با پاتوژنهای ویروسی	٤۱
۲- ۷- ۱- ۳- روشهای و متغیرهای تعیین کنندهٔ انتقال ژن موفق توسط بمباران ذره‌ای	٤۱
۲-۷ - ۱- ۳- ۱- پارامترهای فیزیکی مؤثر در بمباران ذره‌ای	٤۱
۲-۷ - ۱- ۳- ۱- ۱- تهیهٔ حامل های کوچک	٤۱
۲-۷ - ۱- ۳- ۱- ۲- شتاب و انتقال ذرات	٤۳
۲-۷ - ۱- ۳- ۲- اهمیت بافت گیاهی هدف	٤۳
۲-۷ - ۱- ۳- ۲- ۱- بافتهای جنین‌زا	٤٤
۲-۷ - ۱- ۳- ۲- ۲- استفاده از بافت های مریستم	٤٦
۲-۷ - ۱- ۳- ۳- پیش تیمار بافت‌های گیاهی هدف	٤۷
۲- ۷- ۱- ٤- قابلیت‌های روش بمباران ذره‌ای	٤۸
۲- ۷- ۱- ٤- ۱- تراریختی همزمان با چندین ژن	٤۸
۲- ۷- ۱- ٤- ۲- تلفیق قطعات بزرگ DNA به ژنوم	٥۰
۲- ۷- ۱- ٤- ۳- تراریختی پلاستیدها	٥۱
۲- ۷- ۱- ٤- ٤- کنترل سطوح بیان و محلهای الحاق ژن در روش بمباران ذره ای	٥۱
۲- ۷- ۱- ٤- ٥- آگرولیستیک	٥۳
۲- ۷- ۱- ٤- ٦- القاء رویان‌زایی میکروسپور و بمباران ذره ای	٥۳
۲- ۷- ۱- ٥- انتقال و بیان ژن بعد از بمباران ذره‌ای	٥٤
۲- ۷- ۱- ٥- ۱- سرنوشت میکروپروجکتیل‌ها و ورود DNA به داخل هسته گیاهی	٥٥
۲- ۷- ۱- ٥- ۲- فرآیند انتقال DNA	٥٦
۲- ۷- ۱- ٥- ۳- درجهای چند نسخه ای و الحاق DNA زاید (اضافی)	٥۷
۲- ۷- ۱- ٥- ٤- بیان و خاموشی ژن در روش انتقال ژن بمباران ذره ای	٥۸
۲- ۷- ۱- ٦- روش انتقال ژن بمباران ذره‌ای در مقابل انتقال ژن به واسطهٔ آگروباکتریوم	٦۰
۲- ۸- تراریختی بافت های هاپلوئید	٦۱
۲- ۸- ۱- روشهای تراریختی مواد گیاهی هاپلوئید	٦۲
۲- ۸- ۱- ۱- بمباران ذره ای	٦۲
۲- ۸- ۱- ۱- ۱- تشکیل بذرهای تراریخت از طریق گرده‌افشانی با دانه‌های گرده	٦۳

۲- ۸- ۱- ۱- ۲- ایجاد گیاهان هاپلوئید از میکروسپورهای تراریخت	٦٥
۲- ۸- ۱- ۱- ۲- ۱- انتقال ژن با روش بمباران ذره ای به مواد گیاهی هاپلوئید کلزا	٦٦
۲- ۸- ۱- ۱- ۲- ۲- تعیین رویان های تراریخت در روش انتقال ژن به میکروسپورها	۷۱
۲- ۸- ۱- ۱- ۲- ۳- نقش فاز پیش کشت میکروسپورها در میزان بیان ژن	۷٤
۲- ۸- ۱- ۱- ۲- ٤- نقش کیفیت و میزان زنده ماندن میکروسپورها در میزان بیان ژن	۷٥
۲- ۸- ۱- ۱- ۲- ٥- نقش مراحل رشد و نموی میکروسپورها در بیان ژن	۷۸
۲- ۸- ۱- ۱- ۲- ٦- مطالعه انتقال ژن با روش بمباران ذره ای در گیاهان دیگر	۷۹
۲- ۸- ۱- ۲- انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم	۸۱
۲- ۸- ۱- ۳- روش انتقال ژن الکتروپوریشن/ پلی اتیلن گلیکول	۸٥
۲- ۸- ۱- ۳- روش انتقال ژن ریزتزریقی	۸۸
۲- ۸- ۱- ٤- روش انتقال ژن با استفاده از سیلیکون کاربید ویسکرز	۹۰
۲- ۸- ۲- پیش برنده های مربوط به ژنهای بیان شونده در گرده و بساک	۹۱
۲- ۹ - ژنهای گزارشگر	۹٥
۲- ۹ - ۱- آنزیم β- گلوکرونیداز	۹۷
۲- ۹ - ۱- ۱- مکان یابی هیستوشیمیایی فعالیت ژن گزارشگر Gus در بافتهای گیاهی	۹۷
۲- ۹ - ۱- ۲- ویژگیهای روش سنجش GUS	۹۸
۲- ۹ - ۱- ۲- ۱ - فرایند قبل از انکوباسیون بافتهای هدف	۹۸
۲- ۹ - ۱- ۲- ۲- انکوباسیون (رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی)	۹۹
۲- ۹ - ۱- ۲- ۳- عملیات بعد از انکوباسیون	۱۰۰
۲- ۹- ۱- ۳- خطاهای محتمل در سنجش هیستوشیمیایی GUS	۱۰۱
۲- ۹- ۱- ٤- نکات حائز اهمیت هنگام رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی GUS	۱۰۲
۲- ۹- ۲- پروتئین فلورسنت سبز (GFP)	۱۰۳
۲- ۱۰- نشانگرهای گزینشگر	۱۰٤
۲- ۱۰- ۱- نئومایسین فسفوترانسفراز II (NPTII)	۱۰٥
۲- ۱۰- ۲- ژن گزارشگر فسفینو تریسین استیل ترانسفراز	۱۰٦
فصل سوم- مواد و روش ها	۱۰۸
۳-۱ - مواد گیاهی	۱۰۹
۳-۲ - کشت گیاهان مادری	۱۰۹
۳-۳ - شرایط اتاق رشد (In vivo)	۱۰۹
۳-٤- مراقبتهای زراعی	۱۱۰
۳-٥ - برداشت غنچه‌ها	۱۱۰
۳-٦- وسایل و مواد شیمیایی مورد نیاز جهت کشت میکروسپور و نحوه سترون آنها	۱۱۰

۳-٦-۱- وسایل مورد نیاز	۱۱۰
۳-٦-۲ - مواد شیمیایی مورد نیاز	۱۱۱
۳-۷ - محیطهای جدا سازی، رویان زایی و باززایی گیاه از میکروسپورها	۱۱۱
۳-۷-۱ - محیط جدا سازی میکروسپورها	۱۱۱
۳-۷-۲ - محیط کشت رویان زایی میکروسپورها	۱۱۱
۳-۷-۳ - سترون کردن محیط کشت رویان زایی میکروسپورها	۱۱۱
۳-۷-٤ - محیط کشت باززایی	۱۱۲
۳- ۸- مراحل کشت میکروسپورهای کلزا	۱۱۷
۳-۸-۱ - رویان زایی	۱۱۷
۳-۸-۱-۱ - برداشت غنچه‌ها و سترون کردن آنها	۱۱۷
۳-۸-۱-۲ - جداسازی میکروسپورها	۱۱۸
۳-۸-۱-۳- تعیین تراکم در هر میلی لیتر	۱۱۹
۳-۸-۲- القاء رویان‌زایی ثانویه	۱۲۱
۳- ۹- مواد و روشهای مورد استفاده برای آزمایشات تراریختی	۱۲۱
۳- ۹- ۱- سازواره های مورد استفاده	۱۲۱
۳- ۹- ۲- بمباران ذره‌ای و روش تهیهٔ ذرات حاوی DNA	۱۲۳
۳- ۹- ۲- ۱- رسوب دادن DNA بر روی ذرات	۱۲۳
۳- ۹- ۲- ۱- ۱- شسستشوی ذرات	۱۲٤
۳- ۹- ۲- ۱- ۲- رسوب دادن DNA بر روی ذرات	۱۲٤
۳- ۹- ۲- ۲- روش انجام بمباران هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور	۱۲۵
۳- ۱۰- تراریختی رویان‌های حاصل از کشت میکروسپور کلزا با استفاده از تلفیق دو روش آگروباکتریوم و بمباران ذره‌ای	۱۲۷
۳- ۱۰- ۱- روش تهیهٔ باکتری مناسب	۱۲۷
۳- ۱۱- سنجش هیستوشیمیایی Gus برای هیپوکوتیل های بمباران شده	۱۲۸
۳- ۱۲- باززایی گیاهان تراریخت	۱۲۹
۳- ۱۳- دو برابر کردن کروموزومهای گیاهان هاپلوئید تراریخت حاصل از آزمایشات تراریختی رویان های میکروسپوری کلزا	۱۳۰
۳- ۱۳- ۱- روش دوبرابر کردن کروموزومهای گیاهان هاپلوئید	۱۳۰
۳- ۱۳- ۲- تعیین سطح پلوئیدی با استفاده ازروش فلوساتیومتری	۱۳۱
۳- ۱٤- آنالیز داده‌های مربوط به آزمایش رویان زایی ثانویه و آزمایشات بمباران هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور	۱۳۲
۳- ۱۵- انتقال ژن به میکروسپورها با روش بمباران ذره ای	۱۳۳

۳- ۱۵- ۱- آماده‌سازی میکروسپورها	۱۳۳
۳- ۱۵- ۲- آزمایشات اسمتیک	۱۳۳
۳- ۱۵- ۳- رسوب دادن DNA بر روی ذرات طلا	۱۳٤
۳- ۱۵- ٤- شرایط بمباران میکروسپورها	۱۳۵
۳- ۱۵- ۵- سنجش بیان گذرای ژن Gus در میکروسپورهای بمباران شده	۱۳۵
۳- ۱٦- مواد و روش‌ها برای آزمایشات مولکولی	۱۳٦
۳- ۱٦-۱- مواد شیمیایی، آنزیم‌ها و کیت‌ها	۱۳٦
۳- ۱٦-۲- باکتری‌ها و پلاسمیدها	۱۳٦
۳- ۱٦-۳- محیط‌های کشت باکتری و آنتی بیوتیک‌ها	۱۳۷
۳- ۱٦-٤- نحوه ساخت، نگهداری و افزودن آنتی بیوتیک‌ها به محیط کشت	۱۳۸
۳- ۱٦- ۵- روش نگهداری باکتری‌ها در دمای ۷۰ °C-	۱۳۹
۳- ۱٦- ٦- تهیه سلول‌های مستعد E. coli	۱۳۹
۳- ۱٦- ۷- انتقال ناقلها (پلاسمیدها) به سلولهای میزبان	۱٤۱
۳- ۱٦- ۸- استخراج پلاسمید به روش Mini-Preparation	۱٤۲
۳- ۱٦- ۹- استخراج DNAی ژنومی از گیاه کلزا	۱٤۵
۳- ۱٦- ۹- ۱- مواد مورد نیاز برای استخراج	۱٤۵
۳- ۱٦-۱۰- اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA	۱٤۸
۳- ۱٦- ۱۱- الکتروفورز با ژل آگارز	۱٤۹
۳- ۱٦- ۱۲- بهینه سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR)	۱٤۹
۱۳- ۱٦- ۱۲-۱- دما	۱۵۰
۱۳- ۱٦- ۱۲-۲- آنزیم‌های پلیمریزاسیون	۱۵۰
۱۳- ۱٦- ۱۲-۳- غلظت آغازگرها	۱۵۱
۱۳- ۱٦- ۱۲-٤- دی‌اکسی نوکلئوتید تری‌فسفات (dNTP)	۱۵۱
۱۳- ۱٦- ۱۲-۵- یون منیزیم (Mg^{2+})	۱۵۱
۱۳- ۱٦- ۱۲-٦- بافر PCR	۱۵۲
۱۳- ۱٦- ۱۲-۷- غلظت DNAی الگو	۱۵۲
۱۳- ۱٦- ۱۲-۸- تعداد دور واکنش	۱۵۳
۳- ۱٦- ۱۳- آنالیز گیاهان تراریخت	۱۵۳
۳- ۱٦- ۱۳-۱- آزمون PCR	۱۵۳
۳- ۱٦- ۱۳- ۲- آزمون RT-PCR	۱۵٦
۳- ۱٦- ۱۳- ۲- ۱- استخراج RNA	۱۵٦
۳- ۱٦- ۱۳- ۲- ۲- ساخت cDNA تک رشته‌ای	۱۵۸

۳- ۱۶- ۱۳- ۲- ۳- انجام واکنش PCR از cDNA به دست آمده	۱۵۹
۳- ۱۶- ۱۳-۲- آنالیز فنوتیپی گیاهان تراریخت (سنجش بیوشیمیایی GUS در برگ گیاهان هاپلوئید تراریخت حاصل از کشت میکروسپور کلزا)	۱۶۰
٤- فصل چهارم - نتایج و بحث	۱۶۱
٤- ۱-آزمایش رویان‌زایی ثانویه	۱۶۲
٤- ۲- آزمایش حذف رنگ آمیزی Gus درون زا	۱۶٤
٤- ۳- تجزیه واریانس تیمارهای بمباران	۱۶۵
٤- ٤-۱- آزمایش اول: مطالعهٔ اثرات اندازهٔ ذرات طلا و فشار گاز هلیوم بر روی بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	۱۶۷
٤- ٤-۲- آزمایش دوم: مطالعهٔ اثرات فشار گاز هلیوم و فاصلهٔ صفحهٔ متوقف کننده تا بافت هدف بر روی بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	۱۶۸
٤-٤-۳- بررسی اثر نوع ذره بر روی میزان بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	۱۶۹
٤-٤-٤- اثر فشار خلاء در اتاقک دستگاه بیولیستیک بر روی میزان بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	۱۷۰
٤- ٤-۵- اثر تعداد بمباران بر روی میزان بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	۱۷۲
٤- ٤- ٦- اثر غلظت مانیتول در محیط کشت بمباران بر روی میزان بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	۱۷۳
٤- ٤-۷- بررسی اثر روش تراریختی تلفیقی بمباران ذره‌ای و روش آگروباکتریوم بر روی میزان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا.	۱۷٤
٤- ۵- مطالعه بیان گذرای ژن Gus در میکروسپورهای تازه ایزوله شده کلزا رقم پی اف (PF_{704}).	۱۷۷
٤-۵-۱- بررسی بیان گذرای ژن Gus در میکروسپورهای کلزا رقم پی اف (PF_{704}) تحت هدایت دو پیش برنده CaMV35S و پیش برنده گرده اختصاصی Exo70	۱۷۹
٤- ۵- ۲- بررسی اثر تعداد دفعات شستشوی میکروسپورها در روش کشت میکروسپور بر روی میزان بیان ژن Gus در میکروسپورهای تازه ایزوله شده کلزا رقم PF_{704}	۱۸۰
٤- ۵- ۳- بررسی اثر تراکم میکروسپورهای بمباران شده در هر شلیک بر روی میزان بیان ژن Gus در میکروسپورهای ایزوله شده کلزا رقم PF_{704}	۱۸۱
٤- ۵- ٤- بررسی اثر محیط های بمباران حاوی مواد اسمتیک مختلف بر روی میزان بیان ژن Gus در میکروسپورهای ایزوله شده کلزا رقم PF_{704}	۱۸۳
٤- ۵- ۵- مطالعه اثر ترکیب اندازه ذرات طلا بر روی میزان بیان گذرای ژن Gus در میکروسپور های ایزوله کلزا رقم PF_{704}	۱۸٤

٤- ٥- ٦- بررسی روش تراریختی تلفیقی بمباران ذره ای و استفاده از آگروباکتریوم برای مطالعه بیان گذرای ژن Gus در میکروسپورهای کلزا رقم پی اف (PF_{704})	١٨٥
٤- ٥- ٧- بررسی اثر اندازه ذرات طلا در میزان بیان ژن Gus در میکروسپورها در روش تراریختی تلفیقی بمباران ذره ای با روش استفاده از باکتری آگروباکتریوم	١٨٨
٤- ٦- مطالعه تراریختی پایدار در رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا در ارقام گلوبال (Global) و پی اف (PF_{704})	١٨٩
٤- ٦- ١- ارزیابی مولکولی گیاهان T_0	١٩٣
٤- ٧- بحث	١٩٧
٤- ٧- ١- رویان‌زایی ثانویه	١٩٧
٤- ٧- ٢- اثر pH محلول رنگ آمیزی Gus بر روی فعالیت GUS درون زا در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	٢٠١
٤- ٧- ٣- آزمایشات انتقال ژن بر روی هیپوکوتیل های رویان‌های حاصل از کشت میکروسپور کلزا با استفاده از روش بمباران ذره‌ای	٢٠١
٤- ٧- ٤- بیان ژن Gus در میکروسپورهای ایزوله کلزا، رقم پی اف (PF_{704})	٢٠٥
٤- ٧- ٤- ١- اثر تعداد دفعات شستشوی میکروسپورها در روش کشت میکروسپور بر روی میزان بیان گذرای ژن Gus	٢٠٥
٤- ٧- ٤- ٢- اثر نوع پیش برنده بر روی میزان بیان ژنGus در میکروسپورهای ایزوله کلزا، رقم پی اف (PF_{704})	٢٠٦
٤- ٧- ٤- ٣- اثر تراکم میکروسپورهای بمباران شده بر روی میزان بیان ژن Gus در آنها	٢١٠
٤- ٧- ٤- ٤- اثر اندازه ذرات طلا و فاکتورهای مؤثر بر فراوانی نفوذ ذرات به داخل میکروسپورهای ایزوله کلزا رقم پی اف (PF_{704})	٢١١
٤- ٧- ٤- ٥- اثر تیمار های اسمزی در محیط کشت بمباران بر روی میزان بیان ژن Gus در میکروسپورهای ایزوله کلزا، رقم پی اف (PF_{704})	٢١٣
٤- ٧- ٤- ٦- اثر سیستم تلفیقی بمباران ذره‌ای و روش استفاده از آگروباکتریوم بر روی میزان بیان گذرای ژن Gus در میکروسپورها و هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا، رقم پی اف (PF_{704})	٢١٥
٤- ٧- ٥- آزمایشات تراریختی پایدار در رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	٢١٧
نتیجه گیری کلی	٢٢٠
پیشنهادات	٢٢٢
فهرست منابع	٢٢٣

فهرست جداول

عنوان	صفحه
فصل دوم	۸
جدول۲- ۱- لیست ژنها و صفات مختلف منتقل شده به گیاهان براسیکا در سالهای اخیر	۲۹
جدول ۲-۲- لیست گونه‌های زراعی که با استفاده از روش انتقال ژن بمباران ذره‌ای تراریخت شده‌اند	٤۰
جدول ۲-۳- خلاصه مطالعات انجام شده در ارتباط با انتقال ژن به مواد هاپلوئیدی	۹۳
جدول ۲-٤- ژنهای نشانگر گزینشگر که در انتقال ژن، مورد استفاده قرار می گیرند.	۱۰۵
فصل سوم	۱۰۸
جدول ۳-۱- مواد مورد نیاز جهت تهیهٔ یک لیتر محیط کشت NLN-13، محیط کشت جداسازی میکروسپورها و محیط کشت باززایی B_5	۱۱۳
جدول ۳- ۲- محلولهای مادری مورد نیاز جهت تهیهٔ محیط کشت NLN-13	۱۱۵
جدول ۳-۳- محلولهای مادری مورد نیاز جهت تهیهٔ محیط کشت باززایی B_5	۱۱٦
جدول ۳- ٤- تیمارهای اسمزی استفاده شده در آزمایشات بمباران میکروسپورها	۱۳٤
جدول ۳-۵- غلظت آنتی بیوتیک ها در محلولهای مادری و محیط های کشت مختلف	۱۳۹
فصل چهارم	۱٦۱
جدول ٤- ۱- تجزیه واریانس درصد رویان زایی ثانویه و میانگین تعداد رویان ثانویه بر روی رویان های اولیه حاصل ازکشت میکروسپور کلزا در ارقام گلوبال (Global)، پی اف (PF_{704}) و آپشن (Option)	۱٦۲
جدول ٤- ۲- حذف فعالیت بالای GUS درونزا در هیپوکوتیل رویان های هاپلوئید حاصل از کشت میکروسپور	۱٦٤
جدول ٤- ۳- تجزیه واریانس آزمایش مطالعه پارامترهای فیزیکی و بیولوژیکی تاثیر گذار بر روی بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	۱٦٦
جدول ٤- ٤- تجزیه واریانس آزمایش مطالعه اثر متقابل فشار گاز هلیوم و اندازه ذرات طلا بر روی بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	۱٦۷
جدول ٤- ۵- تجزیه واریانس آزمایش مطالعه اثرات فشار گاز هلیوم و فاصله از صفحه متوقف کننده تا بافت هدف بر روی بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	۱٦۹
جدول ٤- ٦- تجزیه واریانس آزمایش مطالعه اثر نوع ذره بر روی بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	۱۷۰
جدول ٤- ۷- تجزیه واریانس آزمایش مطالعه اثر فشار اتاقک خلاء دستگاه بیولیستیک بر روی بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	۱۷۱
جدول ٤- ۸- تجزیهٔ واریانس آزمایش مطالعه اثر تعداد بمباران بر روی بیان گذرای ژن Gus در	۱۷۲

هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	
جدول ٤- ٩- تجزیه واریانس آزمایش مطالعه اثر غلظت های مختلف مانیتول در محیط کشت بمباران بر روی بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	١٧٣
جدول ٤- ١٠- تجزیه واریانس آزمایش اثر روش تلفیقی بمباران ذره ای و استفاده از آگروباکتریوم بر روی بیان گذرای ژن Gus در رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا رقم گلوبال	١٧٥
جدول ٤- ١١- تجزیه واریانس نوع پیش برنده استفاده شده برای میزان بیان گذرای ژن Gus در میکروسپورهای تازه ایزوله شده کلزا رقم پی اف (PF_{704})	١٧٩
جدول ٤- ١٢- تجزیه واریانس اثر تعداد دفعات شستشوی میکروسپورها بر روی میزان بیان ژن Gus در میکروسپورهای ایزوله شده کلزا رقم PF_{704}	١٨١
جدول ٤- ١٣- تجزیه واریانس تراکم های مختلف میکروسپورهای بمباران شده برای میزان بیان ژن Gus	١٨٢
جدول ٤- ١٤- تیمارهای اسمزی مختلف استفاده شده در محیط کشت بمباران میکروسپورهای تازه ایزوله شده کلزا	١٨٣
جدول ٤- ١٥- تجزیه واریانس مقایسه محیط های اسمتیک مختلف استفاده شده در بمباران میکروسپورها برای میزان بیان ژن Gus	١٨٣
جدول ٤- ١٦- تجزیه واریانس آزمایش اثر استفاده از ترکیبات مختلف اندازه ذرات طلا در میزان بیان گذرای ژن Gus در میکروسپورهای کلزا رقم PF_{704}	١٨٥
جدول ٤- ١٧- تجزیه واریانس اثر تراریختی تلفیقی و غلظت آگروباکتریوم بر روی میزان بیان ژن Gus در میکروسپورهای ایزوله کلزا رقم پی اف (PF_{704})	١٨٦
جدول ٤- ١٨- تجزیه واریانس مقایسه ذرات طلا با اندازه های مختلف در میزان بیان گذرای ژن Gus در میکروسپورها با استفاده از آگروباکتریوم (OD=٠/٠١٦)، در روش تراریختی تلفیقی بمباران ذره ای و آگروباکتریوم	١٨٨
جدول ٤- ١٩- ارزیابی مولکولی گیاهان T_0	١٩٢

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
فصل دوم	۸
شکل ۲- ۱- روابط ژنومی گونه‌های جنس *Brassica*	۱۰
شکل ۲- ۲- دستگاه بیولیستیک (PDS- 1000/He) و اجزای مورد استفاده درپروسه زیست پرتابی.	۳٤
شکل ۲-۳- ساختار شیمیایی علف کش بیالافوس	۱۰٦
فصل سوم	۱۰۸
شکل ۳- ۱- مراحل رشد و نمو رویان هاپلوئیدی کلز (*Brassica napus* L. cv. PF) .	۱۲۰
شکل ۳- ۲- سازواره های استفاده شده در آزمایشات بمباران	۱۲۲
فصل چهارم	۱٦۱
شکل ٤- ۱- مقایسه میانگین ارقام مختلف کلزا برای صفت درصد رویان هایی که بر روی آنها رویان های ثانویه تشکیل شده است.	۱٦۳
شکل ٤- ۲- مقایسه میانگین ارقام مختلف کلزا از نظر میانگین تعداد رویان های ثانویه تشکیل شده بر روی هر رویان اولیه	۱٦۳
شکل ٤- ۳- تشکیل رویان های ثانویه بر روی رویان های اولیه حاصل از کشت میکروسپور کلزا.	۱٦٤
شکل ٤- ٤- اثر pH های مختلف و استفاده از متانول ۲۸٪ بر روی بیان GUS درون زای، در رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا.	۱٦٥
شکل ٤- ٥- بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا بعد از بمباران با پلاسمید pCAMBIA3301	۱٦٦
شکل ٤- ٦- مطالعهٔ اثر متقابل اندازهٔ ذرات طلا و فشار گاز هلیوم بر روی بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	۱٦۸
شکل ٤- ۷- مطالعهٔ اثر متقابل فشار گاز هلیوم و فاصله از صفحه متوقف کننده تا بافت هدف بر روی بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	۱٦۹
شکل ٤- ۸- مطالعه اثر نوع ذره بر روی بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	۱۷۰
شکل ٤- ۹- مطالعه اثر فشار اتاقک خلاء بر روی بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های حاصل از کشت میکروسپور کلزا	۱۷۱
شکل ٤- ۱۰- مطالعه اثر تعداد بمباران بر روی بیان گذرای ژن Gus در هیپوکوتیل رویان های	۱۷۲