بسم الله الرحمن الرحيم

نوع نشریه: دستورالعمل فنی
نام نشریه: تولید لاین‌های دابلدهاپلوئید (خالص ژنتیکی) به روش کشت میکروسپور در گندم
نویسندگان: دکتر مهران عنایتی شریعت‌پناهی و مهناز عروجلو
ویراستار علمی: دکتر بابک ناخدا
ویراستاران ادبی: دکتر حسن رهنما و عصمت جعفری‌نژاد
طراحی: محمد جداری
تهیه شده در: پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی
شمارگان: ۳۰
نوبت انتشار: اول
سال انتشار: ۱۳۹۷
مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است.

شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی ۵۴۸۵۵ به تاریخ ۱۳۹۷/۱۰/۲۹ است

تولید لاین‌های دابلدهاپلوئید (خالص ژنتیکی) به روش کشت میکروسپور در گندم

دکتر مهران عنایتی‌شریعت‌پناهی

مهناز عروجلو

فهرست مطالب

چکیده ۱
کلمات کلیدی ۱
مقدمه ۲
مواد و روش‌ها ۵
کشت مواد گیاهی والدینی ۵
شرایط اتاق رشد ٦
مراقبت‌های زراعی ٦
ضدعفونی کردن وسایل ٦
محیط‌های لازم ٦
ضدعفونی کردن محیط‌ها ۸
مراحل انجام رنگ‌آمیزی با DAPI ۹
مراحل کشت میکروسپورها ۱۰
برداشت سنبله‌های مناسب ۱۰
ضدعفونی کردن سنبله‌ها ۱۰
جداسازی بساک‌ها از سنبله و کشت میکروسپورهای آن‌ها ۱۱
انواع میکروسپورها در محیط القایی ۱۳
روند جنین‌زایی و باززایی ۱٤
بررسی سطح پلوئیدی گیاهچه‌های باززایی شده با روش فلوسایتومتری ۱۸
تیمار گیاهچه‌های هاپلوئید با کلشی‌سین برای ایجاد گیاهان دابلدهاپلوئید ۱۸
نتیجه‌گیری ۱۹
سپاس‌گزاری ۱۹
فهرست منابع ۲۰

چکیده

تولید گندم هم به عنوان یک محصول استراتژیک و هم به لحاظ سهم بالای آن در الگوی تغذیه خانوار و تأمین بخش عظیمی از کالری و پروتئین مورد نیاز جمعیت رو به افزایش کشور، همواره مورد توجه خاص مسئولان کشور قرار داشته است. این در حالی است که ایجاد ارقام جدید با صفات برتر زراعی بسیار زمان‌بر و پرهزینه می‌باشد. امروزه روش‌های نوین اصلاحی به کاهش زمان و هزینه‌ها در اصلاح گندم کمک شایانی نموده است. در اصلاح گندم با روش خویش‌آمیزی متداول به ۵ یا ٦ نسل نیاز می‌باشد درحالی که در روش هاپلوئیدی، هموزیگوسیتی یا خلوص ۱۰۰ درصد ژنتیکی یک نسل بعد از دورگ‌گیری حاصل می‌شود و این موضوع به صرفه‌جویی ۳ الی ۵ نسل برای ایجاد یک رقم جدید گندم منجر می‌شود. علاوه بر این هاپلوئیدهای مضاعف‌شده در تمام مکان‌های ژنی به طور کامل خالص می‌باشند، در حالی که مقداری ناخالصی همواره در لاین‌های اصلاحی که پس از ۵ تا ٦ نسل خویش‌آمیزی انتخاب شده‌اند، وجود دارد. همچنین ژن‌های مغلوب در لاین‌های اصلاحی دیپلوئید ناخالص امکان دارد توسط آلل غالب مخفی نگه داشته شوند، در حالی که در فنوتیپ هاپلوئیدها یا هاپلوئیدهای مضاعف‌شده ظاهر خواهند شد. سیستم هاپلوئیدی امتیازات زیادی برای استفاده از تکنیک‌های موتاسیون در اصلاح گیاهان از جمله امکان غربال کردن برای موتانت‌های غالب و مغلوب در اولین نسل پس از تیمار موتاژن دارد. جمعیت‌های دابلدهاپلوئید وسیله‌ای قوی برای شناسایی همبستگی و اثرات متقابل ژنی، تخمین واریانس ژنتیکی و تعداد ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی می‌باشند. در میان روش‌های مختلف تولید گیاهان دابلدهاپلویید، روش کشت میکروسپور جدیدترین و کارآمدترین روش است. در این نشریه مراحل تولید لاین‌های دابلدهاپلوئید گندم از طریق روش جنین‌زایی میکروسپور به طور کامل ارایه شده است.

کلمات کلیدی: جنین‌زایی، دابلدهاپلوئید،گندم، میکروسپور

مقدمه

گندم نان با نام علمی (*Triticum aestivum* L.) مهم‌ترین گیاه زراعی جهان است که میزان تولید سالیانه آن ٦٥١ میلیون تن گزارش شده است (FAO, 2012). این گیاه در مقایسه با سایر گیاهان غذایی رقابت‌کننده، از جمله برنج، ذرت و سیب‌زمینی، بیشترین کالری و پروتئین را برای تغذیه بشر در دنیا تأمین می‌کند و تجارت جهانی آن بیشتر از تجارت مجموع غلات است (کاظمی‌اربط، ١٣٨٤). گندم در درجـــه نخست به عنوان یک محصول غذایی کشت می‌شود اما گیاه و دانه آن در فراورده‌های صنعتی و برای تغذیه دام نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (شاهچراغی و معصومی، ١٣٧٦). اولین و مهم‌ترین فراورده حاصل از گندم، آرد و سپس نان می‌باشد که روزانه مورد مصرف چندین میلیون نفر از مردم قرار می‌گیرد (خدابنده،١٣٨٢). از سال ١٩٦١ تا سال ٢٠٠٨ تولید گندم حدود ٣٠٠ درصد افزایش یافته است، به طوری که در این سال در٢٠٠ میلیون هکتار سطح زیر کشت ٦٠ میلیون تن گندم تولید شده است. این افزایش تولید به طور عمده به دلیل افزایش عملکرد در واحد سطح بوده و مربوط به افزایش سطح زیرکشت نمی‌باشد (FAO, 2010a). متوسط عملکرد جهانی گندم در چهار دهه اخیر از یک تن در هکتار به سه تن در هکتار رسیده است. این در حالی است که جمعیت جهان دو برابر شده است و تا سال ٢٠٥٠ به نه میلیارد نفر خواهد رسید (FAO, 2010b). نرخ رشد سالیانه تولید جهانی گندم کمتر از یک درصد است و ظرف چهار دهه آینده جواب‌گوی بازار جهانی مصرف نخواهد بود (Fischer *et al*., 2009). در ایران، تولید گندم هم به عنوان یک محصول استراتژیک و هم به لحاظ اهمیت آن در الگوی تغذیه خانوار و تأمین بخش عظیم انرژی و پروتئین جمعیت رو به افزایش، همواره مورد توجه مسئولان و سیاست‌گذاران کشور بوده است. بر طبق گزارش وزارت جهاد کشاورزی در سال زراعی ٩٥-١٣٩٤ سطح زیرکشت محصولات زراعی ١١/٧٧ میلیون هکتار بوده که سطح مربوط به غلات ٧١/٧٥ درصد، حبوبات ٦/٦٩ درصد، محصولات صنعتی ٤/١٧ درصد، سبزیجات ٤/٥١ درصد، محصولات جالیزی ٢/٧٧ درصد، گیاهان علوفه‌ای ٨/٩٢ و سایر محصولات ١/١٩ درصد بوده است که بیشترین سطح مربوط به گندم با ٥٠/٣٩ درصد بوده است (آمارنامه جهاد کشاورزی، ١٣٩٤).

با توجه به محدودیت‌های افزایش سطح زیر کشت گندم، افزایش عملکرد در واحد سطح می‌تواند نقطه اتکای راهکارهای عملی برای پاسخ‌گویی به نیازهای گندم کشور محسوب شود. روش دابلدهاپلوئیدی در جهت تسریع برنامه‌های به‌نژادی گندم و همچنین افزایش کارایی انتخاب بسیار مفید و کاربردی می‌باشد. جمعیت‌های دابلدهاپلوئید همچنین وسیله‌ای قوی جهت شناسایی همبستگی و اثرات متقابل ژنی، تخمین

واریانس ژنتیکی و تعداد ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی می‌باشند. خصوصیت خلوص کامل یا عدم تفکیک ژنتیکی جمعیت‌های دابلدهاپلوئید که موجب عدم تنوع نمونه‌برداری در برآورد واریانس و میانگین‌های ژنوتیپی می‌شود، بسیار ارزشمند است (Snape and Simpson, 1986).

وارد کردن سیستم هاپلوئیدی باعث کوتاه شدن برنامه به‌نژادی و افزایش راندمان انتخاب می‌شود. برنامه اصلاحی کلاسیک شجره‌ای آهسته بوده و ۱۰ الی ۱۵ سال طول می‌کشد تا یک واریته جدید تولید شود. ضعف دیگر روش اصلاحی شجره‌ای، ناکارآمدی انتخاب در نسل‌های اولیه است. چون همه افراد در نسل‌های اول از نظر ژنتیکی ناخالص (هتروزیگوت) هستند، هیچ تکرار و انتخابی نمی‌تواند انجام شود. در نتیجه صفات غالب دارای برتری بوده و افراد غیرقابل رقابت حذف می‌شوند. به علاوه انتخاب برای صفات کمی تا قبل از رسیدن لاین‌ها به خلوص نمی‌تواند رخ دهد و بذر کافی نیز برای بررسی خصوصیات زراعی تکرارپذیر موجود نمی‌باشد. یک راه سرعت بخشیدن جهت دسترسی به لاین‌های خالص، روش انتخاب تک‌بذر است که در آنها چرخه زندگی و زمان‌های تولید کاهش پیدا کرده است (شریعت‌پناهی و امامی، ۱۳۸۸). هر چند این روش دارای تأخیر زمانی (به خصوص در ژنوتیپ‌های پائیزه که نیازمند بهاره‌سازی می‌باشند) بوده و متأثر از عکس‌العمل‌های رقابتی بین گیاهان است. دابلدهاپلوییدی نه تنها باعث تسریع در روش‌های اصلاحی می‌شود بلکه انعطاف‌پذیری بیشتری در رابطه با استفاده در هر نسل داشته و پاسخ سریع به تغییرات در تقاضای بازار را ممکن می‌سازد. در گیاهان زراعی خودگشن یکساله مثل گندم بهاره امکان ارزیابی‌های مزرعه‌ای جمعیت‌های دابلدهاپلویید در طی دو سال پس از تلاقی اولیه وجود دارد. با توجه به خلوص ژنتیکی لاین‌های دابلدهاپلویید، امکان غربال قابل اعتماد لاین‌های امیدبخش در شرایط گلخانه‌ای برای بعضی صفات مثل مقاومت به بیماری‌ها وجود دارد. انتخاب مزرعه‌ای لاین‌های دابلدهاپلویید به دلیل خلوص ۱۰۰ درصد ژنتیکی و عدم وجود اثرات غالبیت از لاین‌های منفرد خالص منتج از روش شجره‌ای قابل اطمینان‌تر است (جدول ۱).

مطالعات علمی متعددی نشان داده است که استفاده از روش دابلدهاپلوییدی هیچ انحرافی در جمعیت‌ها ایجاد نمی‌کند و دابلدهاپلوییدهای تصادفی قابل رقابت با لاین‌های انتخابی حاصله از روش شجره‌ای می‌باشند. لذا هیچ دلیل ژنتیکی برای سازگار نبودن دابلدهاپلوییدها به جای لاین‌های خالص شجره‌ای در برنامه‌های اصلاحی وجود ندارد.

برای تولید لاین‌های DH با تعداد معنی‌دار، به کار گرفتن یک یا دو شخص آموزش‌دیده برای پروراندن گیاهان بخشنده، برداشت کردن و آماده کردن مواد و انجام همه روش‌های مختلف کشت بافت لازم است. این‌ها اجزای اساسی برای تولید DH است که نیازمند مهارت در کشت بافت و امکانات رشد با کیفیت بالا برای گیاهان بخشنده است.

لاین‌های DH می‌توانند به طور مستقیم به عنوان رقم رهاسازی شوند و یا ممکن است به عنوان والدین در تولید رقم هیبریدی یا غیرمستقیم در تولید لاین‌های اصلاحی و در نگهداری ژرم‌پلاسم مورد استفاده قرار بگیرند. رقم جو «مینگو» نخستین رقم DH زراعی بود که در کانادا در اواخر دهه ۱۹۷۰ (Ho and Jones, 1980) تولید شده و رشدیافته است. در جو، بالغ بر ۱۰۰ رقم DH مستقیم وجود دارد و دابلدهاپلوییدها در اصلاح تعداد مشابه از ارقام گندم نیز درگیر بوده‌اند، اما احتمالاً این آمار ناقص باشد، چون اطلاعات از بعضی کشورها اندک است و بسیاری از اصلاح‌کننده‌ها تمایلی به فاش کردن روش‌های تولیدشان ندارند (جدول ۲). بختیار و همکاران در سال ۱۳۸٤ لاین‌های دابلدهاپلوئید گندم را با استفاده از تلاقی گندم و ذرت تولید نموده‌اند.

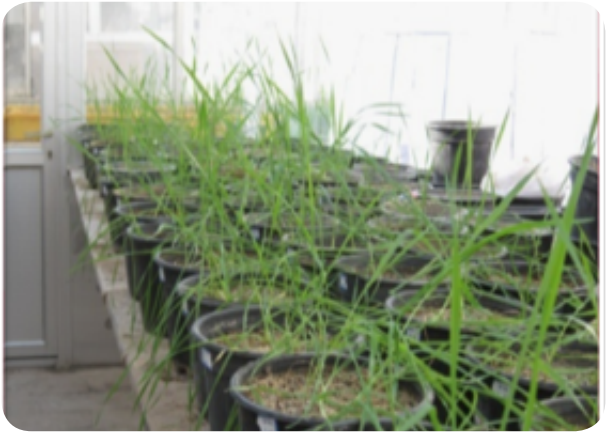
جدول ۲- واریته‌های DH گندم تولید شده در کشورهای مختلف با استفاده از روش القاء هاپلوییدی (Patial *et al*., 2017)

Haploid production method Varieties	Varieties	Country	Sources	Year
Anther culture	Hua Pei 1, Lung Hua 1	China	Han	1988
	Jinghua 1, Yunhua 1	Morocco	De Dwivedi *et al.*	2015
	Yunhua 2	France	Buyser	1987
	Kharoba	Canada	Graf *et al.*	2013
	Florin McKenzie.			
Wheat * Maize	Glosa, Faur F, Litera,	Romania	Saulescu *et al.*	2012
	Miranda, Gruia, BRS 328	Brazil	Scheeren *et al.*	2014
	Emerson	Canada	Randhawa *et al.*	2005
	AAC Elevate, AAC		DePauw *et al.*	2011
	Connery		Humphreys *et al.*	2013
	Snowstar, Sunrise		Graf *et al.*	2005
	Bhishaj, Lillian etc.			2013
				2013
Wheat * *Imperata cylindrica*	Him Pratham	India	Chaudhary *et al.*	2015

مواد و روش‌ها

● کشت مواد گیاهی والدینی

به منظور ایجاد لاین‌های دابلدهاپلوئید (۱۰۰ درصد خالص ژنتیکی)، از هیبریدهای F_1 گندم در برنامه‌های متنوع به‌نژادی استفاده می‌شود. مثلاً در برنامه‌های به‌نژادی گندم برای مقاومت به بیماری، این هیبریدها می‌توانند از تلاقی ارقام پرمحصول ولی حساس به بیماری با ارقام مقاوم به بیماری ایجاد شوند. برای به دست آوردن خوشه‌های حاوی بساک و در نتیجه جداسازی میکروسپورها نیاز است که هر دو هفته یک‌بار تعداد ۱۲ تا ۱۵ گلدان در نظر گرفته شده و در هر کدام تعداد ٤ تا ٥ بذر سالم کاشته شود (شکل ۱). محتوی گلدان‌ها متشکل از ترکیب پیت و پرلیت و مقداری خاک مزرعه به نسبت ۲:۱:۱ می‌باشد. پس از حدود ۱۰ تا ١٤روز از کاشت در صورت ضعیف بودن، گیاهچه از گلدان مربوطه حذف می‌شود. گیاهان باقی‌مانده در گلخانه در دمای ۲٤±۲ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱٥±۲ درجه سانتی‌گراد در شب، در شرایط ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با رطوبت ٦۰ درصد و روشنایی ۳۰۳ $\mu mol\ photon\ m^{-2}\ s^{-1}$ رشد می‌کنند. همچنین برای بهاره‌سازی[1] ارقام زمستانه، گیاهان سه‌برگی در اتاق رشد در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، با ۱۰ ساعت روشنایی و رطوبت ۸۰ درصد به مدت ۲ ماه نگهداری شده و سپس به گلخانه منتقل می‌شوند.



شکل ۱– بذور مواد والدینی کشت شده در گلخانه

1- vernalization

● شرایط اتاق رشد

نور اتاق‌های رشدی که گلدان‌های ارقام بهاره در آن قرار می‌گیرند با ٦ لامپ ٥٠ وات کم‌مصرف LED تامین می‌شود. لامپ‌ها در ارتفاع ١/٤ متری از سطح گلدان‌ها قرار داشته و شدت نور در اتاق رشد حدود µmol $photon\ m^{-2}\ s^{-1}$ ١٧٠ می‌باشد. از لحاظ فتوپریود، اتاق رشد روی ١٦ ساعت نور و دمای ١٥ 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 بوده، ولی برای بهاره کردن گلدان‌ها به مدت ٨ هفته در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس به اتاق رشد موردنظر منتقل می‌شوند.

● مراقبت‌های زراعی

بسته به فصل رشد در تابستان یا زمستان هر یک تا سه روز در میان، گلدان‌ها آبیاری می‌شوند. کوددهی به شکل پای گلدان از کود جامد NPK به نسبت ٣ گرم‌درلیتر و نیز به صورت مه‌پاش از کود مایع حاوی ریزمغذی‌ها هر ١٥ روز یک‌بار صورت می‌گیرد. در صورت مشاهده آفات یا بیماری‌ها اقدام به سم‌پاشی می‌شود. برای سم‌پاشی از دیازینون به نسبت ٢ در ١٠٠٠ سی‌سی برای آفاتی مثل شته، کنه و تریپس و از توپاز به نسبت ٠/١٢٥ در ١٠٠٠ سی‌سی برای سفیدک سطحی استفاده می‌شود.

● ضدعفونی کردن وسایل

قبل از شروع کشت باید تمام ظروف شیشه‌ای، فالکون‌ها، پنس و آب مقطر مورد مصرف توسط اتوکلاو در دمای ١٢١ درجه سانتی‌گراد به مدت ١٥ دقیقه ضدعفونی شوند.

● محیط‌های لازم

محلول‌های مورداستفاده شامل محیط جداسازی میکروسپور گندم (AB_2)، محیط القای جنین‌زایی(A_2) و محیط باززایی(A_2R) به شرح جدول‌های ٢ تا ٤ می‌باشند:

جدول۲- ترکیب محیط کشت AB_2 برای جداسازی میکروسپورها در گندم (Shariatpanahi *et al*., 2006b)

اجزاء	غلظت (mgl^{-1})
KCl	۶۵
KH_2PO_4	۶۰۰
$MgSO_4.7H_2O$	۱۲۵
$Ca(No_3)_2.4H_2O$	۵۰۰
Mannitol	۵۴۶۵۰
Sorbitol	۵۴۶۵۰
Phosphate buffer	۱ ml
*pH	۷

*تنظیم اسیدیته با KOH و محیط با فیلتر استریل شود.

جدول۳- ترکیب محیط القای جنین‌زایی A_2 برای کشت میکروسپورهای گندم (Shariatpanahi *et al*., 2006b)

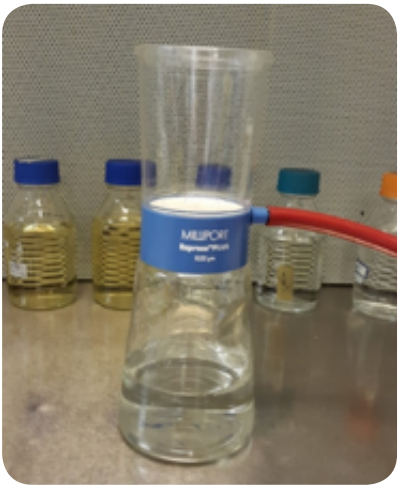
اجزاء	غلظت (mgl^{-1})
KNO_3	۲۸۰۰
$CaCl_2.2H_2O$	۱۶۶
$MgSO_4.7H_2O$	۱۸۵
KH_2PO_4	۴۰۰
$(NH_4)_2SO_4$	۴۶۰
B_5 Vitamins	۱ml از محلول مادری ۱۰۰۰X
B_5 Microsalts	۱ml از محلول مادری ۱۰۰۰X
Fe-NaEDTA	۱۰ml از محلول مادری ۳/۶۷ gl^{-1}
MES	۱۹۵۰
Glutamine	۵۰۰
Maltose (Merck)	۶۰۰۰۰-۹۰۰۰۰ (بسته به رقم)
pH	۶/۲

جدول ٤- ترکیب محیط باززایی A_2R برای باززایی جنین‌های گندم (Shariatpanahi *et al*., 2006b)

اجزاء	غلظت (mgl^{-1})
KNO_3	۱۹۵۰
$CaCl_2.2H_2O$	۱۶۶
$MgSO_4.7H_2O$	۱۸۵
KH_2PO_4	۴۰۰
$(NH_4)_2SO_4$	۲۷۷
B_5 Vitamins	۱ml از محلول مادری ۱۰۰۰X
B_5 Microsalts	۱ml از محلول مادری ۱۰۰۰X
Fe-NaEDTA	۱۰ml از محلول مادری ۳/۶۷ gl^{-1}
Glutamine	۵۰۰
Sucrose	۲۰۰۰۰
Phytagel	۲۴۰۰
pH	۵/۸

● ضدعفونی کردن محیط‌ها

جهت ضدعفونی محیط‌های مورد استفاده فیلترهای مخصوص که دارای دو سر آزاد و دو مخزن یکی جهت تجمع محیط قبل از استریل شدن و دیگری جهت تجمع محیط پس از استریل شدن می‌باشد، استفاده می‌شود. مابین دو مخزن فیلتر کاغذی با قطر منافذ حدود ۰/۲ میکرومتری قرار گرفته، به طوری که یک سر فیلتر به پمپ خلاء متصل شده و با روشن شدن پمپ، محیط از مخزن بالایی با عبور از فیلتر به مخزن پایینی وارد می‌شود و بدین ترتیب میکروارگانیسم‌ها و سایر آلودگی‌های آن زدوده می‌شود. محیط ضدعفونی شده، از مخزن پایین خارج شده و درون شیشه استریل در یخچال نگهداری می‌شود. پمپ‌های خلاء در اندازه‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌لیتری استفاده می‌شوند (شکل۲).



شکل۲- فیلتر ۲۵۰ میلی‌لیتری جهت استریل کردن محیط‌های مایع مورد استفاده

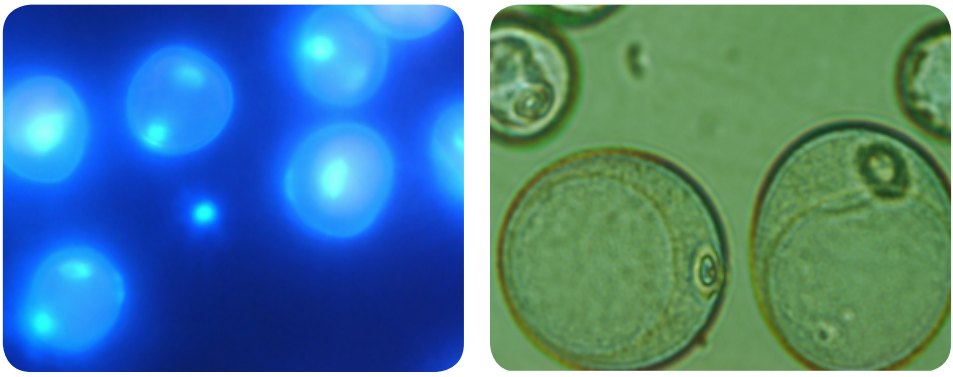
● مراحل انجام رنگ‌آمیزی با DAPI

روی رسوب میکروسپور به‌دست آمده پس از سانتریفیوژ، چند قطره محلول ۳ به ۱ اتانول-اسید استیک ریخته می‌شود. پس از ۳۰ دقیقه تیوب حاوی رسوب داخل سانتریفیوژ (دور۲۰۰۰ و مدت ۳ دقیقه) قرارگرفته، پس از سانتریفیوژ مایع بالایی رسوب دور ریخته می‌شود و مقداری اتانول۵۰ درصد به رسوب حاوی میکروسپورها اضافه می‌شود و بدین‌ترتیب رسوب شست‌وشو پیدا می‌کند. می‌توان دو بار این عمل را جهت شست‌وشوی بهتر تکرار کرد و هر بار پس از سانتریفیوژ، مایع بالای رسوب را دور ریخت.

به رسوب باقی‌مانده، ۱۰ میکرولیتر از محلول رنگی DAPI[1] و ۲۰ میکرولیتر از محلول گلیسرول (جهت اثر بهتر DAPI) اضافه می‌شود. درب تیوب بسته شده و به مدت ۲٤ ساعت در تاریکی و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری می‌شود.

پس از ۲٤ ساعت تیوب از یخچال خارج، و دوباره سانتریفیوژ شده و از رسوب حاصل توسط سمپلر چند میکرولیتر برداشته و روی لام ریخته می‌شود. لامل به آرامی روی آن قرار گرفته تا حباب هوا ایجاد نشود، سپس زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده می‌شود. در اینجا هسته کاملاً رنگ گرفته و بدین‌ترتیب در مورد شاخص مورفولوژیک جهت برداشت سنبله تصمیم مناسب گرفته می‌شود (شکل ۳).

1- 4,6-Diamidino-2-pheylindoledihydrochloride



شکل ۳- تعیین بهترین مرحله کشت میکروسپور گندم از طریق رنگ‌آمیزی با رنگ DAPI

● مراحل کشت میکروسپور

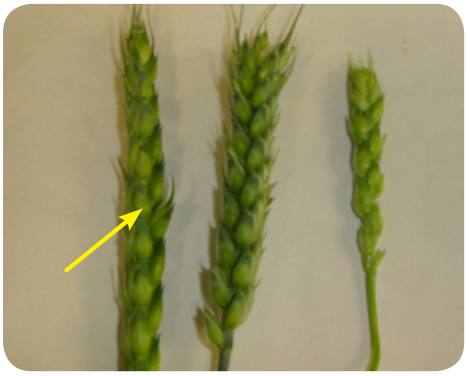
● برداشت سنبله‌های مناسب

زمان برداشت سنبله‌ها بسته به نوع رقم و زمان رسیدگی آن‌ها متفاوت می‌باشد. مثلاً در رقم فلات باید سنبله‌ها تقریباً داخل غلاف برگ پرچم باشند و فقط به اندازه یک شکاف باریک از داخل غلاف نمایان باشد. این حالت منطبق با مرحله انتهایی تک‌سلولی میکروسپور است. سنبله‌ها به همراه ساقه توسط قیچی از ارتفاع ۵ سانتی‌متری خاک بریده شده و در یک ارلن حاوی آب مقطر قرار داده می‌شوند و برای جلوگیری از کاهش رطوبت یک کیسه نایلونی روی آن‌ها کشیده و سپس به اتاق کشت حمل می‌شوند (شکل٤).

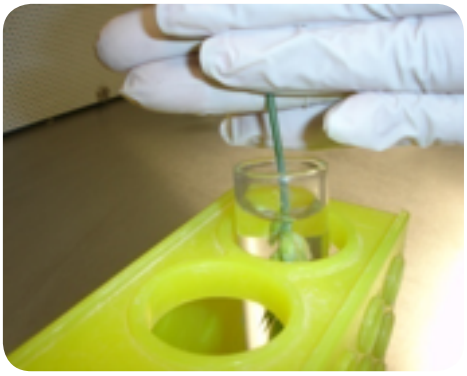
● ضدعفونی کردن سنبله‌ها

پس از انتقال سنبله‌ها به اتاق کشت و ضدعفونی هود لامینار ایرفلو ابتدا چند کاغذ صافی استریل زیر هود قرار گرفته و سپس سطوح بیرونی سنبله‌ها یکی یکی توسط الکل ۷۰ درصد اسپری می‌شوند. در ادامه، سنبله از داخل غلاف خارج و روی کاغذ صافی قرار داده می‌شود.

سپس حدود ۵۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد درون یک لوله آزمایش ریخته شده و سنبله‌ها یکی پس از دیگری در آن غوطه‌ور گردیده و به مدت یک دقیقه چرخانده می‌شوند (شکل۵) و بدین‌ترتیب ضدعفونی کامل صورت می‌گیرد. سنبله‌ها جهت خشک شدن در پتری‌های ۱۵-۱۰ سانتی‌متری، بسته به اندازه سنبله قرارداده می‌شوند. بدین ترتیب اگر حدود ۱۰ سنبله وجود داشت، پس از استریل کردن سنبله آخر، سنبله اول تقریباً خشک شده و آماده جداسازی بساک‌ها می‌باشد (Shariatpanahi *et al*., 2006a).



شکل ٤- برداشت سنبله مناسب



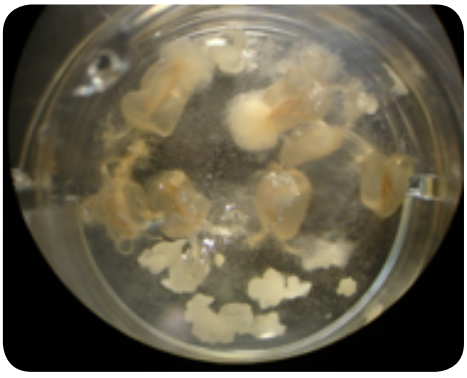
شکل٥- نحوه ضدعفونی کردن سنبله

● **جداسازی بساک‌ها از سنبله و کشت میکروسپورهای آن‌ها**

شیشه‌های ۲۰ میلی‌لیتری که حاوی یک مگنت کوچک ۲ سانتی‌متری هستند، زیر هود قرار داده شده و داخل هر یک توسط سمپلر ۳ میلی‌لیتر محلول شست‌وشو (AB_2) ریخته می‌شود. محیط AB_2 (Shariatpanahi *et al*., 2006b) شبیه محیط B(Touraev *et al*., 1996) است با این تفاوت که علاوه بر مانیتول دارای همان مقدار سوربیتول نیز می‌باشد.

ابتدا گلوم و گلومل توسط پنس از گلچه‌های جانبی خارج شده تا بساک‌ها کاملاً نمایان شوند (شکل ٦). در این حالت هر سه بساک با نوک پنس گرفته شده و به داخل شیشه حاوی محلول شست‌وشو (AB_2) منتقل می‌گردند. هم‌زمان تخمدان‌ها نیز جدا شده و داخل پتری ٦ سانتی‌متری، حاوی محیط کشت (A_2) نگهداری می‌شود (شکل ۷).

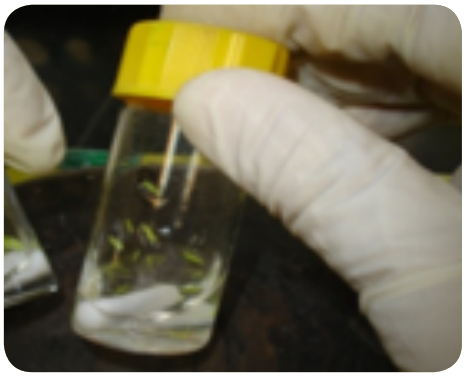
شکل٦- نحوه جداسازی بساک و تخمدان



شکل ۷- کشت هم‌زمان تخمدان و میکروسپور

بساک‌ها و تخمدان‌های گلچه‌های دو طرف سنبله بدین‌ترتیب جدا می‌شوند. درب شیشه‌ها بسته شده، سپس روی یک همزن مغناطیسی با دور ۵۰۰–۶۰۰ rpm به مدت حدود ٤–۳ دقیقه قرار داده شده تا با حرکت مگنت و ضربه زدن به جداره شیشه (شکل۸) میکروسپورها از داخل دیواره بساک به درون محیط ریخته شوند. تغییر رنگ محیط با خروج میکروسپورها و پاره شدن دیواره بساک روی می‌دهد.

در این مرحله درب شیشه باز شده و کلیه محتویات آن از یک صافی (شکل۹) با قطر منافذ ۸۰ میکرومتری عبور داده می‌شود. جهت عبور بهتر و بیشتر میکروسپورها از صافی، به جز محیط شست‌وشوی داخل شیشه‌ها که حاوی میکروسپورهاست، مقداری محیط شست‌وشوی اضافی نیز از صافی عبور داده می‌شود.



شکل۸– جداسازی میکروسپورها از داخل بساک به روش مگنت مغناطیسی

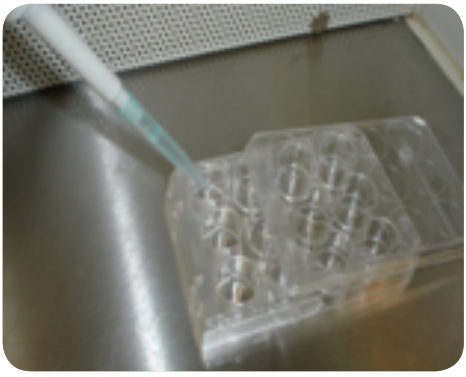
شکل ۹– عبور محیط حاوی بساک‌های متلاشی شده از صافی به منظور جداسازی میکروسپورها

پس از عبور از صافی، میکروسپورها داخل فالکون ۵۰ میلی‌لیتری جمع آوری شده و در سانتریفیوژ با دور ۱۱۰۰ و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌شوند. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی توسط سمپلر خارج و دور ریخته می‌شود. سپس روی رسوب سفید رنگ باقی‌مانده که حاوی میکروسپورهای جدا شده است، کمی محیط شست‌وشو ریخته و دوباره سانتریفیوژ انجام می‌شود. این عمل برای خالص‌سازی هر چه بیشتر رسوب حاصل از دیواره‌های سلولی بساک انجام می‌گیرد.

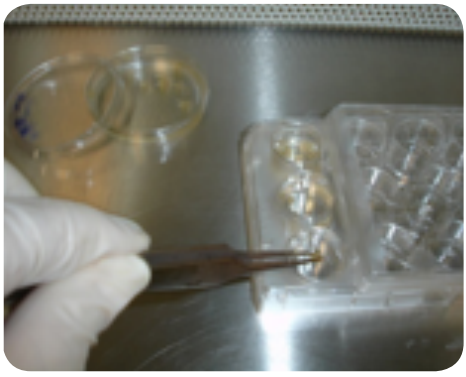
پس از دومین سانتریفیوژ مایع رویی خارج شده و رسوب حاصل در محیط کشت A_2 با تراکم ۱×۱۰^{٤} (۱۰ هزار میکروسپور) در هر میلی‌لیتر در پتری‌دیش‌های ٦ سانتی‌متری و یا در مالتی‌دیش‌های شش تا دوازده خانه‌ای با حجم هر خانه ۳–۲ میلی‌لیتر و یا در پتری‌دیش‌های ٦ سانتی‌متری وارد می‌شوند (شکل۱۰).

پتری‌دیش‌های حاوی میکروسپور با پارافیلم بسته شده و در تاریکی در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند.

پس از ٤ روز از آغاز کشت، تخمدان‌ها به تعداد ٤ عدد در هر میلی‌لیتر به پتری‌دیش‌های حاوی میکروسپور اضافه شده (شکل۱۱) و دوباره پس از بستن درب پتری‌دیش‌ها با پارافیلم به انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی منتقل می‌شوند.



شکل۱۰- انتقال میکروسپورها به مالتی‌دیش‌های حاوی محیط کشت



شکل ۱۱- انتقال تخمدان‌ها پس از ٤ روز به محیط کشت حاوی میکروسپور

● انواع میکروسپورها در محیط القایی

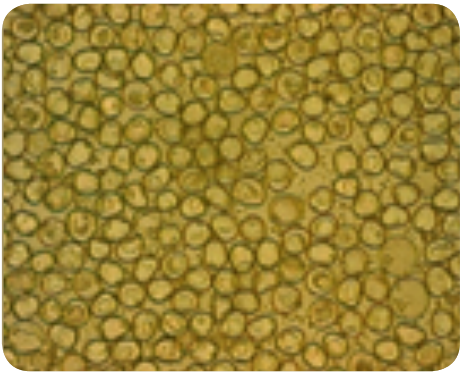
٤ روز پس از جداسازی میکروسپورها وکشت آن‌ها در محیط القایی A_2، وضعیت آن‌ها به یکی از سه حالت زیر دیده می‌شود:

نوع اول: شامل میکروسپورهایی هستند که جمع شده و به حالت پلاسمولیز در آمده باشند (شکل۱۲). این گروه دیگر زنده نبوده و قدرت جنین‌زایی ندارند. عوامل مختلفی می‌توانند توان جنین‌زایی را از آنها بگیرند. بالا رفتن دما و در زمان ایزوله کردن (هر چند ناچیز) در مراحل جداسازی میکروسپورها موجب مرگ تعداد زیادی از آنها می‌شود. اندازه آنها حدود ۳۰ میکرون است.

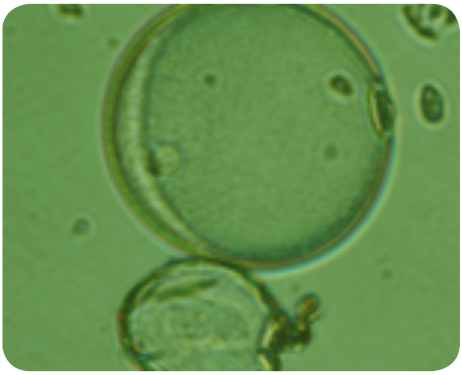
نوع دوم: میکروسپورهایی هستند که از نظر مورفولوژی مانند میکروسپورهای مرحله انتهایی تک‌هسته‌ای باشند. در آغاز کشت به صورت کاملاً گرد بوده و زنده هستند (شکل۱۳) اما روند تکوینی آن‌ها بسیار کند و گاه کاملاً متوقف می‌باشد. گروهی از میکروسپورها نیز دارای یک واکوئل بزرگ در مرکز و یک هسته در

لایه نازک سیتوپلاسم در مقابل محل خروج لوله گرده می‌باشند که تقسیمات سلولی در این گروه در بیشتر موارد منجر به تولید جنین نمی‌شود.

نوع سوم: این گروه از نظر اندازه تقریباً مانند میکروسپورهای نوع دوم بوده و به شکل دایره کامل می‌باشند. واکوئل آن‌ها بزرگ بوده و هسته در مرکز میکروسپور توسط رشته‌های سیتوپلاسمی احاطه شده است و این رشته‌ها نیز تا دیواره سلول ادامه دارند. با استفاده از میکروسکوپ اینورت به خوبی ساختار ستاره‌ای شکل تشکیل شده در این گروه قابل مشاهده می‌باشد (شکل۱٤).



شکل۱۲- میکروسپورهای نوع اول، غیرزنده زیر میکروسکوپ اینورت



شکل ۱۳- میکروسپورهای نوع دوم، زنده اما فاقد قدرت جنین‌زایی زیر میکروسکوپ اینورت

در طول اولین روزها پس از کشت ممکن است برخی از میکروسپوهای نوع دوم به نوع سوم تبدیل شده و به سمت جنین‌زایی تمایل پیدا کنند. اما جنین‌های بدست آمده از میکروسپورهای نوع دوم ضعیف‌تر از جنین‌های بدست آمده از میکروسپورهای نوع سوم هستند.

● روند جنین‌زایی و باززایی

واکوئل بزرگ درون میکروسپور که بیشتر حجم سلول را فرا گرفته، در میکروسپورهای زنده که در اواخر مرحله تک‌هسته‌ای هستند، دیده می‌شود. هسته نیز نزدیک دیواره سلول است و تقریباً در محل تشکیل لوله گرده قرار دارد. مطالعات نشان داده که میکروسپورها در جریان تکوین، واکوئل خود را جذب کرده و به سلول‌هایی غنی از نشاسته و سیتوپلاسم تمایز می‌یابند و به شکل ساختارهای چندسلولی در می‌آیند و در

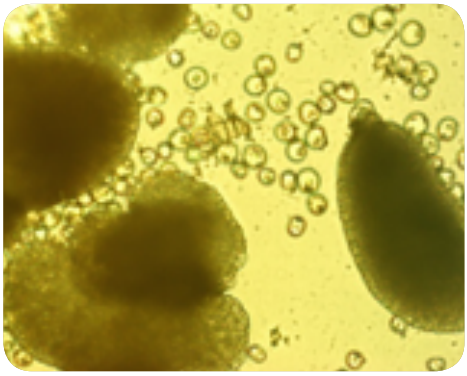
فاصله روز اول تا چهارم پس از کشت در میکروسپورهایی که قابلیت حرکت در مسیر آندروژنزی را دارند، ساختارهای ستاره‌مانند دیده می‌شود. مشاهده این ساختارها دلیل پویا بودن میکروسپور به سوی جنین‌زایی است. این ساختار ستاره‌ای‌شکل همان واکوئل سلول است که تکه‌تکه شده و به این صورت درآمده است. میکروسپورهای با ساختار ورودی شبیه ستاره، برای شروع تکوین جنین‌زایی میکروسپورهای جدا شده گندم ضروری است. پس از آن تقسیمات هسته ادامه می‌یابد و میکروسپور به یک ساختار چندسلولی تبدیل می‌شود (شکل۱۵).

شکل۱٤– میکروسپورهای زنده و دارای قدرت جنین‌زایی با ساختار ستاره‌ای شکل زیر میکروسکوپ اینورت

شکل ۱۵– ساختارهای چندسلولی زیر میکروسکوپ اینورت

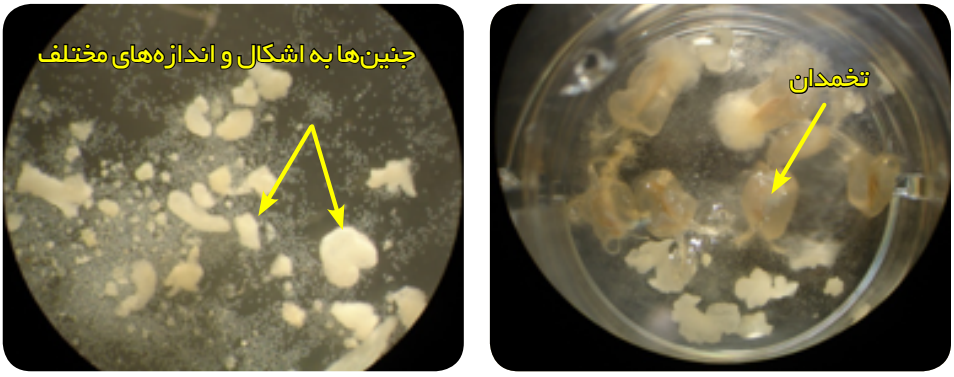
این سلول‌ها، سلول‌های خواهری نیز نامیده می‌شوند. سلول‌های خواهری داخل دیواره میکروسپور در پایان هفته اول زیر میکروسکوپ قابل مشاهده هستند، پس از آن به‌تدریج این سلول‌ها با پاره شدن دیواره اگزین رها شده و به شکل یک توده سلولی آزاد می‌شوند. در این میان گاه برخی از آن‌ها پس از پاره کردن دیواره میکروسپور می‌میرند و قادر به ادامه راه نیستند. اما تعداد زیادی که در هفته دوم از دیواره آزاد می‌شوند با شدت زیادی رشد می‌کنند و در حدود روز بیستم ساختارهای پیش‌جنینی زیر میکروسکوپ قابل مشاهده‌اند (شکل۱٦).

به تدریج از روز ۳۰ام تا ٤٥ام پس از کشت، جنین‌ها به اشکال مختلف با چشم و بدون نیاز به میکروسکوپ قابل مشاهده‌اند (شکل ۱۷) و (شکل ۱۸).



شکل۱۶- ساختارهای پیش‌جنینی در محیط کشت A_2 زیر میکروسکوپ اینورت

شکل ۱۷- انواع جنین‌ها به اشکال قلبی و اژدری مستقر در محیط باززایی A_2R زیر استریومیکروسکوپ

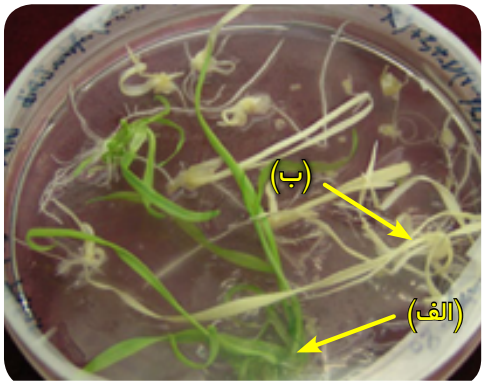


شکل۱۸- جنین‌ها به اشکال و اندازه‌های مختلف (چپ)، جنین‌ها به همراه تخمدان در محیط کشت A_2 زیر استریومیکروسکوپ (راست)

برخی از جنین‌ها در روز ۳۰ام آماده انتقال به محیط باززایی هستند. جنین‌های بالغ بزرگتر از ۲ میلی‌متر پس از ۲۸ روز آماده انتقال به محیط باززایی هستند. اما برخی برای انتقال به محیط باززایی نیاز به مدت زمان بیشتری دارند. از این رو تا روز ٤٥ام در محیط A_2 می‌مانند. جنین‌ها پس از انتقال به محیط باززایی یک هفته در تاریکی قرار گرفته و پس از آن به روشنایی انتقال می‌یابند.

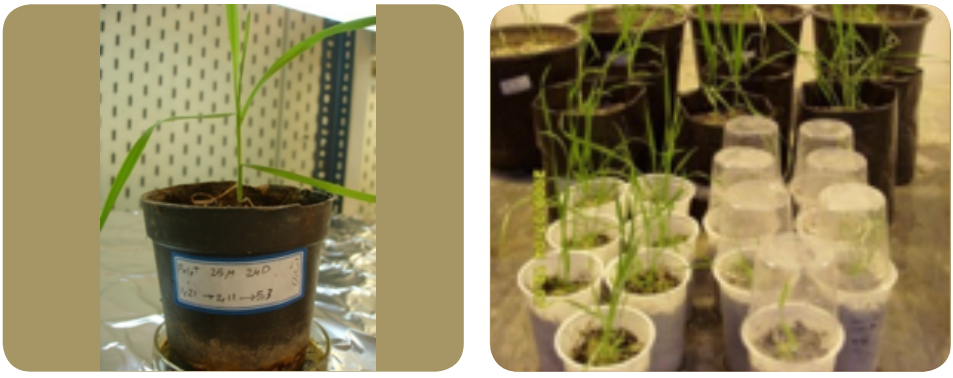
باززایی جنین از نظر زمانی متفاوت است. در بهترین حالت در عرض ۳-۲ روز پس از انتقال به روشنایی باززایی انجام می‌شود. اما در برخی ۱۲-۱۰ روز طول می‌کشد. در روشنایی رشد ادامه یافته و تعدادی از

گیاهچه‌ها بصورت سبز و تعدادی نیز به شکل آلبینو به وجود می‌آیند (شکل۱۹). گیاهچه‌های سبز در خاک گلدان بدون نیاز به محیط کشت به رشد خود ادامه می‌دهند (شکل۲۰).



شکل ۱۹- گیاهچه‌های حاصل از جنین‌های باززایی شده پس از انتقال به روشنایی الف- گیاهچه سبز، ب- گیاهچه آلبینو

در شروع کشت تعداد زیادی میکروسپور زنده در محیط وجود دارد. اما با گذشت زمان از تعداد آن‌ها کاسته می‌شود. همین‌طور از بین ساختارهای چندسلولی و پیش‌جنینی تعداد کمی به رشد و تقسیم ادامه داده و به جنین تبدیل می‌شوند. فقط تعداد کمی از ساختارهای چندسلولی به تقسیم خود برای تشکیل جنین ادامه می‌دهند. به‌علاوه ممکن است عدم تکامل جنین نیز اتفاق بیفتد.



شکل ۲۰- گیاهان سبز منتقل شده به گلدان

● بررسی سطح پلوئیدی گیاهچه‌های باززایی شده با روش فلوسایتومتری

برای تعیین سطح پلوئیدی، معمولاً از دستگاه فلوسایتومتری مدل Partec PA 1 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، 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 ۲-۳ هفته نگهداری کرد.

ب) نمونه برگ در داخل یک پتری‌دیش کوچک قرار داده شده و ٤۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی ((Extraction 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.

● تیمار گیاهچه‌های هاپلوئید با کلشی‌سین برای ایجاد گیاهان دابلدهاپلوئید

از آنجایی که هاپلوئیدها عقیم هستند، از طریق تیمار آن‌ها با کلشی‌سین اقدام به تولید گیاهان دابلدهاپلوئید می‌شود. بهترین زمان اعمال تیمار کلشی‌سین در مرحله ۳ برگی است. در این مرحله گیاهان از خاک خارج می‌شوند و بلافاصله پس از خروج از خاک، ابتدا با آب شسته شده و سپس ۳-۲ سانتی‌متر از ریشه گیاهان انتهایی نگهداری شده و بقیه قطع می‌گردند. گیاهان فوق‌الذکر از قسمت ریشه و طوقه در محلولی متشکل

از کلشی‌سین ۰/۰۵ درصد و DMSO[1] ۲ درصد به‌علاوه یک قطره Tween 20 به مدت ۵/۵-۶ ساعت در درجه حرارت آزمایشگاه قرار داده شده و به منظور کاهش تعرق با استفاده از کیسه‌های پلاستیکی شفاف، پوشیده می‌شوند. پس از اتمام تیمار با کلشی‌سین، ریشه‌ها از محلول مورد اشاره خارج شده و به دقت با آب شیر شسته و سپس مجدداً به گلدان منتقل و تا تشکیل بذر در گلخانه نگهداری می‌شوند.

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 گندم مورد بهره‌برداری قرار گیرد و نیاز کشور را به معرفی ارقام جدید در حداقل زمان ممکن مرتفع سازد. در ضمن این مساله قابل ذکر است که بعضی از ژنوتیپ‌های گندم نیاز به اعمال تنش حرارتی (۳۳ درجه سانتی‌گراد و دوره زمانی ٤ روز) به میکروسپورهای جدا شده برای تشکیل میکروسپورهای جنین‌زا دارند که این تنش حرارتی باید بعد از جداسازی میکروسپورها و قبل از هم‌کشتی با تخمدان‌ها اعمال شود.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی به دلیل حمایت مالی در قالب پروژه تحقیقاتی با شماره مصوب: ۸٦۰۱۲-۰۵-۰۵-۲ تقدیر و تشکر می‌شود.

1-Dimethyl Sulfoxide

فهرست منابع

بختیار ف، بزرگی‌پور ر و شهابی س (۱۳۸۵). تولید لاین‌های دابلدهاپلوییید گندم با استفاده از روش کشت ساقه بریده شده در تلاقی گندم و ذرت و ارزیابی برخی صفات زراعی. مجله نهال و بذر. جلد ۲۲، شماره ۳.

خدابنده، ن (۱۳۸۲). غلات. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ هفتم.

شاهچراغی م و معصومی م (۱۳۷٦). راهنمای بیماری‌های گندم. مرکز نشر دانشگاهی تهران.

شریعت‌پناهی ع م، امامی‌میبدی د (۱۳۸۸). میکروسپور: سلولی هاپلوئید با کاربردهای متنوع در ژنتیک و اصلاح نباتات. مجله ژنتیک نوین، دوره چهارم. شماره ۳. صفحه: ۱٦-۵.

کاظمی‌اربط، ح (۱۳۸٤). مورفولوژی و آناتومی غلات. جلد دوم. انتشارات دانشگاه تبریز.

آمارنامه جهاد کشاورزی، ۱۳۹٤.

FAO (2012). FAOSAT agriculture data. Agricultural production 2009. FAO. Rome. Fao. Org.Accessed 22 April 2012.

FAO (2010a). http://faostat.fao.org/site/339/derault.aspx.

FAO (2010b). http://faostat.fao.org/site/550/Desktop Default.aspx? pageID =550#ancor.

Fischer R, Byerlee D, and Edmeades G (2009). Can technology deliver on the yield challenge to 2050. In FAO Expert Meeting on How to Feed the World in 2050 (rome).

Ho KM and Jones GE (1980). Mingo barley. Can. Journal Plant Science. 60:279-280

Patial M, Pal D, Thakur A, Swaroop Bana R and Patial S (2017). Doubled Haploidy Techniques in Wheat (*Triticum aestivum* L.). Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B- Biological Sciences. DOI 10.1007/s40011-017-0870-z

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

Shariatpanahi ME, Belogradova K, Hessamvaziri L, Heberle-Bors E and Touraev A (2006b). Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. Plant Cell Reports. 25: 1294-1299.

Snape JW, and Simpson E (1986). The utilization of doubled haploid lines in quantitative genetics. Bulletin de la Société botanique de France.133, Actualités Botaniques:59-66.

Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O and Heberle-Bors E (1996). Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperatures. Sexual Plant Reproduction. 9:209-215