بیوتکنولوژی براسیکا: پیشرفت در بیولوژی سلولی و مولکولی

Brassica Biotechnology: progress in cellular and molecular biology

مهتاب صمدی*

کارشناس ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر، شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

براسیکا از نظر اقتصادی مهم‌ترین جنس در خانواده Brassicaceae (Syn Cruciferae) است. گونه‌های مختلف آن بصورت محصولات روغنی مهم، سبزیجات، محصولات علوفه‌ای استفاده می‌شوند. در میان محصولات براسیکا، محصولات روغنی دارای بیشترین ارزش اقتصادی هستند. براسیکا روغنی در گونه‌های *Brassica juncea*، *Brassica carinata*، *Brassica rapa (Brassica campestris)* و *Brassica napus* یافت می‌شود و معمولاً به آنها بطور کلی *oilseed rape* گفته می‌شود. در حالی که بیشتر تحقیقات انجام‌شده در محصولات براسیکا روی بیوتیپ‌های روغنی و سبزیجات است، بیوتیپ‌های با چرخه رشد سریع و زندگی کوتاه ۶۰-۲۰ روز در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند. این گیاهان به دلیل اندازه ژنوم کوچک، در برخی موارد فقط ۴-۳ برابر بزرگ‌تر از آرابیدوپسیس *(Arabidopsis thaliana)*، گیاهان آزمایشگاهی جذابی محسوب می‌شوند. پیشرفت قابل‌توجهی در زیست شناسی سلولی و مولکولی گونه‌های براسیکا در چند سال گذشته انجام شده است. باززایی آنها از طریق اندام‌زایی و جنین زایی سوماتیکی به‌طور فزاینده‌ای با استفاده از انواع مختلف ریزنمونه و با بهبود کشت بافت با تمرکز بر عواملی مانند سن ریزنمونه، ژنوتیپ و افزودنی‌های محیط کشت بهینه شده است. تولید هاپلوئید و دابل هاپلوئید با استفاده از میکروسپور باعث افزایش تولید لاین های هموزیگوت در گونه براسیکا شده است. امتزاج سلول سوماتیکی ایجاد هیبریدهای بین‌گونه‌ای و بین جنسی را درگونه‌های ناسازگار جنسی براسیکا تسهیل کرده است. بهبود محصولات براسیکا با استفاده از تنوع سوماکولونال نیز گزارش شده است. استفاده از نشانگرهای مولکولی در تکنیک انتخاب به کمک مارکر و تکنولوژی ترانسفورماسیون بخش مهمی از تحقیقات جاری در گیاهان براسیکا هستند. در این مقاله مروری به تحقیقات مرتبط با بیوتکنولوژی در براسیکا شامل اندام‌زایی، جنین زایی سوماتیکی، کشت میکروسپور و دابل هاپلوئید، امتزاج سلول سوماتیکی، نشانگرهای مولکولی جهت بررسی ژنتیکی گیاهان رشد یافته در شرایط *invitro*، انتخاب به کمک مارکر و ترانسفورماسیون خواهد شد.

اندام‌زایی:(Organogenesis)

اندام‌زایی ابزار ضروری برای باززایی گیاه با استفاده از تکنیک‌های کشت بافت و ترانسفورماسیون است. اندام‌زایی به‌طور گسترده‌ای برای باززایی محصولات

* Samadi.m@arc-ordc.ir

براسیکا در مقایسه با باززایی سایر محصولات مورد استفاده قرارگرفته است. باززایی گیاهان از طریق اندام‌زایی از بافت‌های مختلف مانند کوتیلدون، هیپوکوتیل، بخش‌هایی از دمگل، برگ، لایه‌های سلولی نازک اپیدرمی و سلول‌ها ساب اپیدرمال، ریشه‌ها و پروتوپلاست‌ها انجام می‌شود. جنبه‌های متعدد شرایط کشت بافت که بر باززایی گیاه تأثیر می‌گذارد در زیر مورد بحث قرار می‌گیرد.

ژنوتیپ: باززایی در براسیکا بسیار به ژنوتیپ وابسته است. در *B. napus* تنوع زیادی در ارقام آزمایش شده از ۹۱ تا ۱۰۰ درصد مشاهده شد. در یک مطالعه رقم *B. napus* GSL-1 باززایی بهتری از رقم Westar (یک رقم استاندارد برای ترانسفورماسیون) نشان داد. از ۱۲۳ ژنوتیپ کلم چینی (*B. rapa.* ssp. pekinensis) بررسی شده، تنوع زیادی در میزان فراوانی باززایی بین صفر تا ۹۵ درصد مشاهده شد. بنابراین ویژگی ژنوتیپ در کشت بافت براسیکا و باززایی آن‌ها یک عامل محدود کننده است به‌طوری که تعداد ژرم‌پلاسم‌هایی که می‌تواند با دستکاری ژنتیکی بهبود یابد، به‌شدت محدود است.

سن ریزنمونه: در بیشتر گونه‌های براسیکا، باززایی به سن ریزنمونه وابسته است. در اکثر گونه‌های براسیکا ریزنمونه‌های جوان نتایج بهتری نسبت به ریزنمونه‌های مسن نشان دادند. اکثر محققان متوجه شده‌اند که ریزنمونه های حاصل از گیاهچه های ۴-۳ روزه میزان باززایی مطلوب‌تری دارند. مثلاً درگیاهچه‌های سه‌روزه *B. rapa* ssp. oleifera باززایی نسبت به گیاهچه‌های با سن بیش از چهار روز بهتر بوده است. باززایی *B. napus* با راندمان ۹۰ درصد از گیاهچه‌های چهار روزه به اثبات رسیده است. در بررسی‌های انجام با استفاده از گیاهچه‌های بالاتر از چهار روز میزان باززایی به‌طور چشمگیری کاهش یافته است.

مهار کننده‌های اتیلن: یک عنصر بسیار مهم که به نظر می‌رسد برای باززایی براسیکا ضروری است مهارکننده اتیلن نیترات نقره است. بنابراین نیترات نقره به‌طور معمول درکشت بافت براسیکا استفاده می‌شود. مهارکننده‌های اتیلن دیگر مانند تیوسولفات نقره aminoethoxyvinylglycine با تأثیر مثبت بر باززایی در گونه‌های براسیکا گزارش شده است. در تربچه چینی (*Raphanus sativus* var. longipinnatus)، ترکیبی از نیترات نقره و aminoethoxivinylglycine به‌طور قابل‌توجهی باززایی را افزایش داد.

سایر مؤلفه‌های محیط کشت: مواد افزودنی مختلف محیط کشت ممکن است باززایی را در برسیکا افزایش دهد Methylglyoxal-bis (گانیل هیدرازون) (MGBG)، مهارکننده بیوسنتز اسپرمیدین، جهت افزایش فراوانی باززایی از ۷ به ۶۳ درصد در براسیکا و جنس‌های دیگر گزارش شد، و نیز دیگر محققان اثرات مثبت MGBG را بر روی باززایی جوانه در *B. napus* کشف کردند Putrescine، پلی‌آمینی است که به‌منظور افزایش باززایی جوانه در تربچه چینی همراه با نیترات نقره یا aminoethoxivinylglycine بکار گرفته شد.

جنین زایی سوماتیکی

جنین زایی به یکی از مسیرهای مطلوب در باززایی گیاهان از طریق کشت بافت تبدیل‌شده است. جنین‌زایی سوماتیکی ممکن است بر مشکلات ناشی از روش‌های

ریزازدیادی در گونه‌هایی که ریشه‌زایی آن‌ها دشوار است غلبه کند. اگرچه جنین زایی سوماتیکی در سیستم‌های ترانسفورماسیون و باززایی بسیاری از گونه‌های گیاهی استفاده شده است، به نظر می‌رسد گیاهان براسیکا در این جهت عقب‌مانده‌اند که احتمالاً به دلیل پیشرفت در روش‌های اندام‌زایی در این گیاهان است. میکروسپورها و بساک‌ها ریزنمونه‌های انتخاب‌شده برای جنین زایی سوماتیکی در بیشتر گونه‌های براسیکا محسوب می‌شوند. جنین‌های سوماتیکی از هیپوکوتیل‌ها، کلونی‌های حاصل از پروتوپلاست و کوتیلدون های نابالغ در *B. napus* به دست آمد. ژنوتیپ عامل بسیار مهمی در فراوانی جنین زایی بیشتر گونه‌های براسیکا است. اثرات ژنوتیپ در مطالعات *B. rapa*، *B. carinata* (Barro) و *B. napus* (Chuong) با اهمیت نشان داده‌شده است.

کشت بساک/ میکروسپور و دابل هاپلوئید

یکی از پیشرفت‌های هیجان انگیز در بیوتکنولوژی تولید گیاهان هاپلوئید و دابل‌هاپلوئید بوده است. هاپلوئید و دابل هاپلوئید در گونه‌های براسیکا با استفاده از کشت بساک یا میکروسپورهای ایزوله ایجاد شد و ابزاری برای تولید سریع لاین‌های هموزیگوت در مدت زمان نسبتاً کوتاه برای تولید بذر هیبرید فراهم می‌نماید. بیشتر ژنوتیپ‌ها به کشت میکروسپور پاسخ مناسبی می‌دهند و این ریزنمونه‌ها عملکرد جنین بیشتری نسبت به کشت بساک دارند. جنین‌های حاصل از کشت میکروسپور در *B. napus* جهت بررسی مسیرهای بیوشیمیایی و انتخاب محصولات متابولیک مورد استفاده قرار گرفته است. لینکاژ ژن در *B. campestris* با استفاده از گیاهان هاپلوئید موردمطالعه قرار گرفته است. همچنین ثابت شده است که میکروسپورها برای اهداف ترانسفورماسیون در جهت تولید گیاهان تراریخته *B. napus* حیاتی هستند. همانند سایر تکنیک‌های کشت بافت، کشت میکروسپور براسیکا نیز به ژنوتیپ وابسته است. به عنوان مثال، تنها ۳۰ درصد از ژنوتیپ های *B. juncea* که مورد آزمایش قرار گرفتند به کشت میکروسپورها پاسخ مثبت دادند. از این رو هنوز نیاز به گسترش این تکنولوژی در ارقام غیر پاسخ دهنده است. هنگامی که گیاه هاپلوئید تولید می‌شود گیاهان دابل هاپلوئید با استفاده از کلشی سین در گیاه هاپلوئید و یا توسط فرآیند دو برابر شدن خودبه‌خودی کروموزوم به دست می‌آیند. در براسیکا دو برابر شدن خودبه‌خودی کروموزوم‌ها به ژنوتیپ، مرحله تکاملی میکروسپور و شرایط کشت بستگی دارد. استفاده از کشت میکروسپور نسبت به کشت بساک در تولید گیاهان دابل‌هاپلوئید ترجیح داده می‌شود زیرا در کشت بساک احتمال ایجاد دیپلوئید به‌صورت خود به خودی وجود دارد.

منبع:

Cardoza, V., & Stewart Jr, C. N. (2004). Invited review: Brassica biotechnology: progress in cellular and molecular biology. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 40(6), 542-551.