پشت صحنه‌ی توسعه‌ی دابل هاپلوئیدی بر پایه‌ی میکروسپور در *Brassica napus*

رضا وجدان

دابل هاپلوئیدی چیست؟

گیاهان دابل هاپلوئید، همانند گیاهان دیپلوئید طبیعی دو مجموعه کروموزوم دارند. اما تفاوت اصلی آنها در این است که دابل هاپلوئیدها (در این مثال دابل هاپلوئید حاصل از کشت میکروسپور) از دانه گرده‌ی هاپلوئید (بدون باروری) و کشت شده بر روی محیط کشت بوجود آمدند. ژنوم هاپلوئید دانه گرده بطریق شیمیایی دو برابر شده و گیاهی با ژنوم هموزیگوس کامل بوجود می‌آورد. معمولاً ماده‌ی شیمیایی و سمی کلشی سین برای دو برابر کردن کروموزوم و تبدیل گیاه هاپلوئید عقیم به گیاه دابل هاپلوئید بارور استفاده می‌شود. بنابراین این گیاهان در هر مکان ژنی هموزیگوس هستند و ظرفیت بالایی از ترکیبات فنوتیپی متفاوت را دارا می‌باشند. تکنیک تولید چنین گیاهانی از دانه‌ی گرده، تحت عناوینی نظیر کشت میکروسپور، جنین‌زایی گرده یا آندروژنز خوانده می‌شود. نخستین گزارش موفقیت آمیز کشت بساک در براسیکا توسط keller و همکاران (1975) و Thomas و Wenzel (۱۹۷۵) ثبت گردید. بهر حال Lichter (۱۹۸۲) نخستین سیستم کشت برای تولید گیاهان دابل هاپلوئید از میکروسپور را ارائه نمود. در اواخر دهه‌ی ۸۰ میلادی مطالعات بر روی کلزا (*Brassica napus*) نشان داد که جنین‌ها را می‌توان با کارایی بالا بوسیله‌ی کشت میکروسپور در محیط کشت عاری از هورمون و بدون مرحله‌ی کالوس تولید نمود (Pechan and Keller. 1988 , keller et al., 1987).

اهمیت دابل هاپلوئیدی در برنامه اصلاح نباتات گیاهی

در اصلاح نباتات کلاسیک برای دستیابی به لاین‌های تقریباً خالص (۹۹/۲٪) برای صفات مورد نظر در حدود هشت نسل خودگشنی نیاز است. این در حالیست که در تکنیک دابل هاپلوئیدی طی یک نسل به هموزیگوسیتی ۱۰۰٪ می‌رسیم (شکل ۱). انتخاب گیاه از جمعیت دابل هاپلوئید بی‌نهایت ارزشمند و موثر است، زیرا لاین‌ها بطور کامل خالص هستند و نیازی به نسل‌های پیاپی خودگشنی ندارند. لاین‌های دابل هاپلوئید نه تنها چرخه‌ی اصلاحی را کوتاه می‌کنند (Chang and Coe. 2009, Geiger and Gordillo. 2009, Szarejko and Forster. 2007) بلکه کارایی انتخاب را نیز افزایش می‌دهند (Röber et al., 2005- Geiger and Gordillo. 2009, Geiger. 2009) بعلاوه دیگر نیازی به خودگشنی و انتخاب جهت نگهداری لاین‌های اصلاحی نمی‌باشد.

دابل هاپلوئید در مطالعه‌ی ژنتیک، توسعه‌ی مارکرهای مولکولی و ترانسفورماسیون

لاین‌های دابل هاپلوئید در مطالعه‌ی ژنتیک صفات مورد نظر با راندمان بالایی بکار گرفته می‌شوند. در جمعیت F2 حاصل از تلاقی سنتی دو والد و صفتی که با تک ژن غالب کنترل می‌شود، نسبت ژنوتیپی بصورت ۱:۲:۱ که به ترتیب هموزیگوس غالب، هتروزیگوس و هموزیگوس مغلوب تفکیک می‌شوند، ولی همان صفت در جمعیت دابل هاپلوئید با نسبت ۱:۱ بترتیب برای هموزیگوس غالب و هموزیگوس مغلوب تفکیک خواهد شد. در مورد صفات چند ژنی، این تکنیک توانست نوترکیبی-های ژنتیکی را برای هموزیگوسیتی در تعداد زیادی مکان ژنی طی یک نسل ایجاد نماید. بنابراین این روش مزیت بکارگیری جمعیتی کوچکتر را برای مطالعه‌ی صفات کمی بهمراه دارد.

در ساخت نقشه‌ی ژنتیکی، جمعیت‌های در حال تفرق شامل یکی از جمعیت‌های: F2، تلاقی برگشتی یا NILs یا دابل هاپلوئید هستند. دابل هاپلوئیدها لاین‌های اصلاحی حقیقی[1] هستند که در برنامه‌ی توسعه‌ی مارکری بطور مکرر قابل استفاده‌اند، این در حالیست که در جوامع F2 یا تلاقی برگشتی در هر نسل تفکیک صورت می‌گیرد. مطالعه‌ی صفات پیچیده بمنظور شناسایی QTL[2] به آزمایش‌های تکراردار طی چند سال و چند مکان نیاز دارد، از این رو دابل هاپلوئید جمعیتی ایده‌آل برای دستیابی به این هدف است. مزیت اصلی دابل هاپلوئیدی در استفاده از مارکرهای غالب، انتخاب گیاهان هموزیگوس ۱۰۰٪ از جوامع در حال تفرق می‌باشد، حال آنکه در جمعیت F2 تفکیک صفت غالب به بصورت یک سوم غالب هموزیگوس، دو

1. True-breeding line
2. Quantitative trait loci

سوم هتروزیگوس می‌باشد. بنابراین نرخ موفقیت استفاده از مارکر غالب برای انتخاب گیاهان هموزیگوس غالب در جوامع F2 تنها ۳۳٪ می‌باشد.

در ترانسفورماسیون ژنتیکی، میکروسپورهای هاپلوئید را می‌توان قبل از فرایند دو برابر کردن کروموزوم‌ها که سبب تثبیت پایداری هموزیگوسیتی می‌شود، مورد هدف انتقال ژن قرار دارد. ژن مقاومت به خشکی (HVA1) بطور موفقیت آمیزی به گندم نان هاپلوئید منتقل شده و بعد از دیپلوئید شدن هموزیگوسیتی ژن توانسته اند آن را وارد گیاه و تثبیت نمایند (Chauhan and Khurana, 2011).

سفری بسوی دابل هاپلوئیدی در کلزا

باززایی میکروسپور در جنس براسیکا تحت تاثیر عوامل زیادی قرار دارد، نظیر شرایط رشد گیاهان دهنده، ژنوتیپ، پیش تیمار، مواد بکار رفته در محیط کشت، مرحله‌ی زندگی دانه گرده، بعلاوه شرایط کشت میکروسپور (Ferrie, 2003). هر یک از عوامل نامبرده در باززایی میکروسپور تاثیر گذارند و به منظور افزایش بهره برداری می‌بایست هر یک از آنها بهینه سازی گردند. در ادامه برخی از این عوامل بطور خلاصه شرح داده خواهد شد.

ژنوتیپ‌ها برای تولید دابل هاپلوئید

کلزا (*Brassica napus*) در مقایسه با سایر گونه‌های خانواده‌ی براسیکا پاسخ بهتری برای تولید لاین‌های دابل هاپلوئید می‌دهد (۲۲). ولی تفاوت‌های ژنتیکی در میکروسپورهای گرفته شده برای تولید دابل هاپلوئیدی در یک گونه نیز گزارش گردیده است. برای مثال *B. napus cv Topas* قدرت جنین زایی بسیار بالایی دارد (۲۲). تفاوت در قدرت جنینی‌زایی در تیپ‌های رشدی مختلف نیز مشاهده شده است، بعنوان نمونه تیپ بهاره‌ی *B. napus* در مقاسیه با تیپ زمستانه قدرت جنینی زایی بالاتری دارد(Kott et al., 1988 - Huang et al., 1990). ژنوتیپ‌هایی که پاسخ ضعیفی به کشت میکروسپور می‌دهند، دارای تنوع گسترده‌ای در مراحل مختلف میوز هستند (Kott et al., 1988).

شرایط رشد گیاهان دهنده[3]

شرایط رشد گیاهان دهنده بسیار مهم است و پیشنهاد می‌شود این گیاهان در شرایطی با حداقل تنش های محیطی کشت شوند (Ferrie, 2003). مشخص شده است، گیاهان رشد یافته در دمای پائین ^{0}C ۱۲/۱۰، یک هفته قبل از جداسازی میکروسپور برای *B. napus* بهترین وضعیت را ایجاد می‌نماید (۱۹). در اغلب موارد برای کشت میکروسپور، گیاهان دهنده در اتاق رشد پرورش یافتند. بطوریکه کارایی جنین‌زایی در گیاهان رشد کرده در گلخانه و مزرعه کاهش یافته است (Ferrie, 2003).

تیمار سرما

تیمار سرمایی جوانه‌های گل، فرایند جنین‌زایی را تحریک می‌نماید و کیفیت جنین را نیز بهبود می‌بخشد (Gu et al., 2004). همچنین گزارش شده است، تیمار سرمایی در کشت میکروسپور *B. rapa* تاثیر کمتری دارد و در *B. oleracea* تاثیر منفی می‌گذارد. در تیمار سرمایی، غنچه‌های گل مناسب برای کشت میکروسپور در چهار درجه سانتی گراد بمدت ۲-۴ روز در محیط کشت مایع با ۱۳٪ سوکروز و در تاریکی قرار می‌گیرند (Gu et al., 2004).

انتخاب غنچه و مرحله‌ی تکاملی دانه گرده

اندازه‌ی غنچه همبستگی مستقیمی با مرحله‌ی میوزی دانه‌های گرده دارد. اما این همبستگی برای ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مختلف متفاوت است. تمایز میان مقدار بزرگ‌تر و کوچک‌تر میکروسپور جنینی[4] از اندازه‌ی غنچه امکان پذیر است، ولی پیش بینی واقعی تولید جنین امکان پذیر نیست (Pechan and Keller, 1988). طی فرایند میوز، با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین می‌توان مرحله‌ی رشدی میکروسپور را تشخیص داد. غنچه‌ها در اواسط مرحله‌ی تک هسته‌ای کامل‌ترین اندازه

3. Donor plants growing condition
4. embryogenic microspore

را برای تولید دابل هاپلوئید دارند (Kontowski and Friedt, 1994-Ferrie, 2003). در این مرحله میکروسپورها شکل گرد دارند و هسته در وسط سلول قرار دارد (Ferrie and Caswell, 2011). گزارش شده است که در مراحل جلوتر ممکن است میکروسپورها ترکیبات سمی و مهارکننده در طی کشت میکروسپور آزاد کنند که کارایی تولید دابل هاپلوئید از میکروسپور را کاهش می‌دهد (Kott et al., 1988, 2004).

منابع

1. Chang, MT and Coe, EH. 2009. Doubled haploids. InKriz AL, Larkins A (eds). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 63. Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. 127-142.
2. Chauhan, H and Khurana, P. 2011. Use of doubled haploid technology for development of stable drought tolerant bread wheat (Triticum aestivum L.) transgenics. Plant Biotechnol J. 9:408-17.
3. Ferrie, A. 2003. Microspore culture of Brassica species. Doubled Haploid Production in Crop Plants. 65:205-215.
4. Ferrie, AMR and Caswell, KL. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 104:301-309.
5. Geiger, HH and Gordillo, GA. 2009. Doubled haploids in hybrid maize breeding. Maydica. 54:485-499.
6. Geiger, HH. 2009. Doubled haploids. InJ. 21: 641-659.
7. Gu, HH, Hagberg, P and Zhou, WJ. 2004. Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus L.*). Plant Growth Regulation. 42:137-143.
8. Huang, B. Bird, S. Kemble, R. Simmonds, D. Keller, W. and Miki, B. 1990. Effects of culture density, conditioned medium and feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus L.* cv. Topas. Plant Cell Rep. 8:594-7.
9. Keller, WA. Arnison, PG. and Cardy, BJ. 1987. Haploids from gametophytic cells recent developments and future prospects. 14: 223-241.
10. Keller, WA. Rajhathy, T. and Lacapra, J. 1975. In vitro production of plants from pollen in Brassica campestris. Can. J. Genet. Cytol. 17:655-666.
11. Kontowski, S. and Friedt, W. 1994. Genotypic effects on microspore culture in a breeding program for high-erucic acid content of *Brassica napus*. GCIRC Bull. 10:30-38.
12. Kott, LS. Polsone, L. Ellis, B. and Beversdorf, WD. 1988. Autotoxicity in isolated microspore cultures of *Brassica napus*. Can. J. Bot. 66:1665- 1670.
13. Kott, LS. Polsoni, L. and Beversdorf, WD. 1988. Cytological aspects of isolated microspore culture of Brasica napus. Can. J. Bot. 66:1658-1664.
14. Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of Brassica napus. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. 105:427-434.
15. Pechan, PM. and Keller, WA. 1988. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. Plant Physiol. 74:377-384.
16. Pechan, PM. and Keller, WA. 1988. Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. Plant Physiol. 74:377-384.

17. Röber, FK. Gordillo, GA. and Geiger, HH. 2005. In vivo haploid induction in maize-Performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. Maydica. 50:275-283.
18. Szarejko, I. and Forster, BP. 2007. Doubled haploidy and induced mutation. Euphytica. 158:359-370.
19. Thomas, E. and Wenzel, G. 1975. Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. Z. Pflanzenzücht. 74:77-81.