هاپلوئیدی و مزیتهای کشت میکروسپور

علی محمد عزیزی
کارشناس به نژادی مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر
شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

Haploidy and advantages of microspore culture

مقدمه :

گیاهان هاپلوئید به گیاهانی اطلاق می شود که تعداد کروموزوم‌های آنها برابر با کروموزوم‌های گامتی باشند. هاپلوئیدها در گیاهان برای اولین بار در سال ۱۹۹۲ در *Datura stramonium L.* تشخیص داده شدند که به وسیله بلکسلی و همکاران گزارش گردید. اولین بار در سال ۱۹۶۶ تولید جنین و گیاه هاپلوئید به وسیله کشت بساک را در *Datura*، گزارش شده است (*Dunwell JM. 1996*). گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئید در ژنتیک و اصلاح نباتات کاربردهای فراوانی دارند که مهمترین آنها عبارت‌اند از:

_تولید لاین‌های کاملا خالص پس از دو برابر کردن تعداد کروموزوم‌های گیاهان هاپلوئید (دابل هاپلوئید)

_وجود تفرق ژنتیکی و نسبت‌های ژنتیکی ساده‌تر در گیاهان هاپلوئید و در نتیجه نیاز به جمعیت‌های کوچک جهت مطالعات ژنتیکی

_برطرف نمودن محدودیت تهیه لاین خالص در گیاهان دو پایه و خود ناسازگار

_تسهیل مطالعات موتاسیون

_استفاده از هاپلوئیدها در امتزاج سوماتیکی برای تولید هیبریدهای بین گونه ای

_استفاده از هاپلوئیدهای مضاعف شده برای شناسایی هیبریدهای برتر در برنامه های اصلاحی

دابل هاپلوئیدی سریع‌ترین مسیر برای رسیدن با لاین‌های هموزیگوت می‌باشد. یکی از روش‌های تولید گیاهان هاپلوئید استفاده ازگرده پرتوتابی شده و هاپلوئیدهای حاصل از کشت میکروسپور یا دانه‌های گرده نارس می‌باشد

کشت بساک و میکروسپور

کشت بساک روشی ساده است و در برنامه های اصلاحی بسیاری از گونه ها استفاده شده است و محققین زیادی با به کارگیری این روش موفق به تولید گیاهان هاپلوئید در تعداد زیادی از گونه های گیاهی شده اند. در این تکنیک، بساک‌ها در یک مرحله حساس و کوتاه از گیاه جدا شده و روی یک محیط کشت مناسب قرار می گیرند. در کشت بساک، میکروسپورهای داخل بساک به جای تولید گامت نر تغییر مسیر داده و تولید کالوس یا جنین می‌نمایند. کالوس‌ها به دو طریق اندام‌زایی یا جنین‌زایی به گیاهان هاپلوئید تبدیل می‌شوند. مرحله زمانی برداشتن بساک‌ها برای القای هاپلوئیدی بسیار حساس است و یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین کننده در تعیین میزان موفقیت در تولید جنین از کشت بساک می‌باشد و بر اساس اظهارات بعضی محققین، مناسب‌ترین بساک‌ها آن‌هایی هستند که هنگام برداشت، حاوی میکروسپورهای تک هسته ای (مرحله قبل از اولین تقسیم میتوز دانه گرده) باشند. کشت بساک با وجود کاربردهای فراوان، مشکلاتی نیز دارد. بافت دیواره اسپروفیتی بساک می‌تواند در روند جنین‌زایی تاثیر مثبت یا منفی داشته و به همین دلیل در نهایت مطالعات را روی مکانیزم القاء جنین‌زایی میکروسپور مشکل می‌سازد. وجود اثرهای ژنوتیپی قوی و تغییرات گامتوکلونی در کشت‌های بساک تهدیدی عملی برای این روش می‌باشد. جذب

مواد غذایی به وسیله میکروسپور در بساک‌های کشت شده بستگی به موقعیت آنها در بساک‌ها دارد. موادی که به وسیله دیواره بساک آزاد می‌شود ممکن است باعث بازدارندگی یا تقویت جنین‌زایی شود. بافت دیواره بساک هاپلوئید نبوده و گیاهی که از دیواره بساک تولید می‌شود هاپلوئید نخواهد بود و گاهی اوقات نیز کروموزم‌های گیاهان هاپلوئید حاصل از کشت بساک به طور خود به خودی مضاعف می‌شوند و تولید هاپلوئید مضاعف (دابل هاپلوئید) می‌نمایند که آن‌ها را نمی‌توان به سهولت از گیاهان حاصل از دیواره بساک تشخیص داد.

کشت میکروسپور روشی است که به لحاظ مزایای آن بر کشت بساک، مورد توجه قرار گرفته است. در این روش امکان بازیافت تعداد زیادی گیاهان هاپلوئید وجود دارد. علیرغم پیچیدگی تکنیکی که روش کشت میکروسپور دارد، این روش در مقایسه با کشت بساک دارای مزایای متعددی می‌باشد که اهم آنها عبارتند از: ۱- شانس باززایی گیاهان دیپلوئید اسپوروفیتی به دلیل حذف بافت‌های دیپلوئیدی مانند دیواره بساک و آوندها، محدود می شود۲- استفاده یکسان تمام میکروسپورها از مواد غذایی به علت آزاد بودن آن‌ها و نیز رفع مشکل رقابت میکروسپورها، ۳- دیواره بساک بعنوان مانعی در برابر انتقال مواد غذایی از محیط کشت به میکروسپورها عمل نمی کند، ۴- برطرف نمودن مشکل ترشحات حاصل از دیواره بساک همانند آبسیزیک اسید و مواد سمی که اثر بازدارندگی بر روی رشد میکروسپورها دارند، ۵- امکان پذیر بودن مشاهده دقیق تمام مراحل آندروژنز، ۶- سهولت انجام بررسی اثرات عوامل گوناگون بر روی میکروسپورها به علت جدا بودن میکروسپورها از همدیگر و مشاهده راحت آنها، ۷- ایده آل بودن میکروسپورها برای اعمال تیمارهای موتاژن و بررسی موتاسیونها، ۸- استفاده از روش های انتقال ژن بطور مستقیم بر روی میکروسپورها، ۹- در کشت میکروسپور، اغلب تبدیل مستقیم میکروسپور به جنین اتفاق می افتد لذا تنوع گامتوکلونی صورت نمی‌گیرد و ۱۰- میسر بودن جداسازی سلول‌های مرده و زنده به وسیله سانتریفیوژ. کشت میکروسپور بهترین سیستم برای بررسی کاربرد جهش درون شیشه ای و انتخاب آنها است. به دلیل کشت تک سلول میکروسپور، امکان تولید گیاهان تراریخته با کارایی بیشتری وجود دارد.

نقش تنش در کشت هاپلویید

جنین‌زایی میکروسپور در گیاه و در حالت طبیعی نتیجه نمو میکروسپور و تمایز آن به دانه گرده و انجام باروری است. اما میکروسپورهای ایزوله و کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای می‌توانند، از یک طرف، در صورت عدم اعمال تنش و کشت در یک محیط غنی از نظر مواد غذایی به دانه گرده رسیده تکامل نمایند و از طرف دیگر، با اعمال تنش بطور مکرر تقسیم شده و به جنین نمو پابند. به عبارتی میکروسپورها چه در محیط طبیعی (داخل بساک‌ها) و چه در صورت ایزوله شدن و کشت درون شیشه (بدون اعمال تنش)، مسیر طبیعی تکاملی خود را طی کرده و با انجام اولین تقسیم میتوزی، دانه گرده نارس را تولید می‌نمایند که طی یک مجموعه تغییرات فیزیولوژیکی (از قبیل تجمع دانه های نشاسته و غیره) متورم شده و تشکیل دانه گرده رسیده را می‌دهد. در شرایط تغییر برنامه میکروسپورهای جدا شده توسط تنش می‌توانیم تولید جنین نماییم که قابل باززایی به گیاه هاپلوئید می‌باشد.

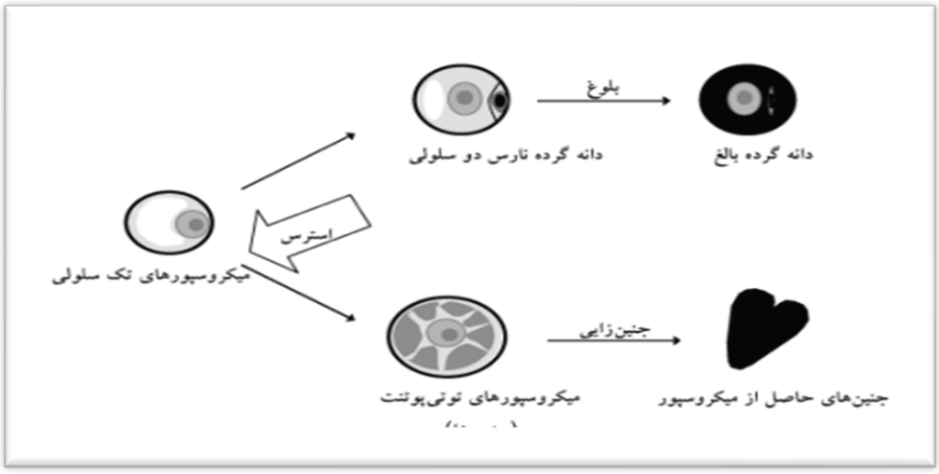
نقش تنش در جنین‌زایی میکروسپور به توانایی سلول‌های منفرد هاپلوئید، میکروسپور، در جهت تمایز و باززایی به یک گیاه کامل بعد از قرار گرفتن در معرض تنش اطلاق می‌شود. یک عامل جرقه‌ای که تنش می‌باشد برای القاء جنین زایی در میکروسپور لازم است. استفاده از تنش به شکل پیش تیمار سرمایی اولین بار روی کشت بساکهای داتوره گزارش شده است(شکل ۱ *Shariatpanahi ME, et al, 2006*).

شریعت پناهی و همکاران (۲۰۰۶) تنش ها را به سه دسته مختلف تقسیم کردند:

۱- تنش‌هایی که به فراوانی برای القاء جنین زایی در میکروسپور مورد استفاده قرار می گیرند و شامل تیمارهای سرمایی، حرارتی، کمبود مواد غذایی و کشی سین می باشند.

۲- تنش‌هایی که کمتر مورد استفاده قرار گرفته اند که شامل: اشعه گاما، تنش اتانول، تیمار سانتریفیوژ، کاهش فشار اتمسفر، عامل‌های ماده‌زایی، آبسزیک اسید جزء این دسته بندی تنش‌ها می باشند. این تنش‌ها در تعداد کمی از گونه‌ها استفاده شده است. این تنش‌ها ممکن است برای القاء جنین‌زایی در گونه‌هایی که سخت پاسخ ده هستند، موثر باشند.

۳- تنش‌هایی که جدیدا مورد استفاده قرار گرفته اند شامل *pH* : بالای محیط ، الیگوساکارید کاراگینن (*carrageenan oligosaccharides*)، تنش‌های فلزهای سنگین و القاء کننده های شیمیایی. در ادامه به نقش تعدادی از مهم‌ترین تنش های به کار گرفته شده برای جنین زایی میکروسپور اشاره می‌شود.



شکل ۱- نقش تنش در کشت میکروسپور

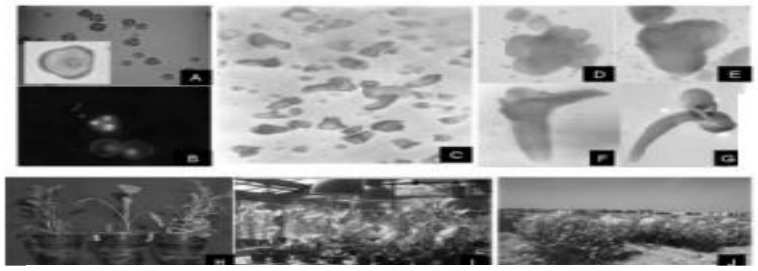
کاربردهای جنین‌زایی و بلوغ درون شیشه ای میکروسپور:

کشت میکروسپور علاوه بر نقش برجسته‌اش به عنوان یکی از کارآمدترین روش تولید گیاهان دابل هاپلوئید، دارای کاربردهای زیادی از قبیل غلبه بر موانع تلاقی (نرعقیمی و خودناسازگاری)، ایجاد گیاهان نرعقیم از طریق غیر فعال کردن یا کم توان کردن آنزیم های دخیل در مرحله تکامل میکروسپور به دانه گرده، حفظ گیاه نر عقیم از طریق جنین زایی میکروسپور و امکان برگرداندن نر باروری از طریق بلوغ درون شیشه ای میکروسپور، انتقال ژن به میکروسپور با استفاده از سیستم‌های اختصاصی، امکان

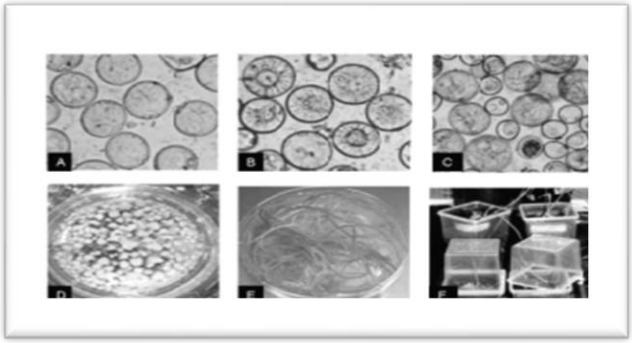
انجام نوترکیبی مبتنی بر تشابه *(Homologous Recombination)*، امکان بررسی نمو گرده و گرده افشانی، جنین زایی، توتی پوتنسی، چرخه سلولی، تغییر فاز و نقش تنش در نمو می‌باشد. در ادامه به برخی از کاربردهای کشت میکروسپور بطور تفصیلی اشاره می‌گردد (عنایتی شریعت پناهی، م، امامی میبدی، د. ۱۳۸۸).

کاربرد کشت میکروسپور در تولید گیاهان دابلد هاپلوئید:

با توجه به تعداد زیاد میکروسپورها در هر غنچه و امکان کشت ده‌ها هزار میکروسپور در هر پتری‌دیش، کشت میکروسپور به طور بالقوه توانایی تولید هزاران لاین دابل هاپلوئید از یک غنچه را دارد و از این نظر در مقایسه با سایر روش‌های تولید هاپلوئیدی کارآمدترین است، هر چند هنوز کارآیی بالقوه آن بالفعل نشده و مشکلاتی نیز از نظر ظهور گیاهان آلبینو[1] در غلات دارد و در پاره ای از گونه ها نیز هنوز دستورالعمل جنین زایی میکروسپور شناسایی نشده است. در اشکال ۲ و۳ نمونه‌هایی از جنین زایی میکروسپور و باززایی گیاهان هاپلوئید (دابل هاپلوئید گوجه فرنگی و کلزا ارایه شده است).



شکل ۲- مراحل مختلف جنین



شکل ۳- مراحل مختلف جنین زایی میکروسپور در گوجه فرنگی

کاربرد کشت میکروسپور در مطالعات علوم پایه:

[1] - **اختلال ژنتیکی که در نتیجه کمبود در سنتز تیروزینازها ظاهر می شود،** آنزیم هایی که مسئول تشکیل ملانین (سلول های رنگی) در ملانوسیت ها هستند ، که می توانند در هر موجود زنده ، اعم از گیاهی یا حیوانی (از جمله انسان) ظاهر شود.

جنین‌زایی میکروسپور در کلزا به‌عنوان یک سیستم مدل برای مطالعه شروع فرآیند جنین‌زایی در گیاه مورد بهره برداری متخصصین علوم پایه قرار گرفته است. اخیرا میکروسپورها در باززایی گیاهان گندم بارور از زیگوت های جدا شده نقش موثر و کلیدی ایفا کرده اند. دانشمندان با استفاده توام از فناوری های تصویر برداری زیستی میکروسکوپی کنفوکال و جنین‌زایی میکروسپور موفق به شناسایی تعداد زیادی از پروتئین های دخیل در فرآیند جنین زایی در مراحل مختلف سنی جنین از قبیل بروز پروتئین های مرتبط با تنش شامل *HSP90* و *HSP70* بلافاصله پس از القاء جنین‌زایی، بروز ژن‌های اختصاصی اندوسپرم در فرآیند جنین‌زایی میکروسپور از قبیل ژنهای *ZmAE3 ZmAEl Esr* مشابه جنین‌زایی زیگوتی، تغییرات ایجاد شده در ترکیب دیواره سلولی و پکتین شده‌اند که این یافته‌ها قابل استفاده در فرآیند جنین‌زایی سوماتیکی و زیگوتی نیز می‌باشند (عنایتی شریعت پناهی، م.، امامی میبدی، د. ۱۳۸۸).

کاربرد کشت میکروسپور در رفع موانع خودناسازگاری درختان میوه:

در درختان میوه که اغلب از نظر ژنتیکی هتروزیگوت (نا خالص) بوده و خود ناسازگاری بالایی دارند، تنها راه ممکن برای تولید گیاهان خالص روش هاپلوئیدی و بویژه کشت بساک و میکروسپور می‌باشد. گزارشات متعددی در زمینه انجام موفقیت آمیز کشت میکروسپور در سیب، مرکبات و زیتون وجود دارد و پروژه های در حال انجام بر روی سایر درختان میوه (از قبیل گیلاس و هلو) نیز نتایج امیدوار کننده ای از نظر شروع تقسیمات اسپوروفیتی نشان می‌دهد.

کاربرد کشت میکروسپور در تسهیل مطالعات موتاسیون:

تکنیک کشت میکروسپور (چنانچه موجود باشد)، بهترین سیستم جهت کاربرد موتانت زایی درون شیشه ای و گزینش می باشد. موارد موفقیت آمیز این روش به ویژه در ارتباط با کلزا و دیگر اعضاء خانواده چلیپائیان که در آنها موتانت‌های مهم متعددی از طریق تکنولوژی میکروسپور ایجاد شده اند، معرفی *(in vitro mutagenesis)* گردیده است *(Kott, LS, 1998)*. از جنین‌های حاصل از میکروسپورهای تیمار شده با اشعه UV و موتاژن شیمیایی *MNU* ، لاین های کلزای مقاوم به علف کش گلایفوسیت و کلروسولفوران تولید شده است. در ارتباط با تیمار میکروسپورها، هر دو نوع موتاژن فیزیکی و شیمیایی موفقیت آمیز گزارش شده‌اند هرچند که با توجه به سختی کار با موتاژنهای شیمیایی به عنوان مثال در لزوم انجام مرحله شستشو میکروسپورها پس از اعمال موتاژن جهت از بین بردن بقایای موتاژن، استفاده از موتاژنهای فیزیکی معمول تر است.

کاربرد کشت میکروسپور در انتقال ژن:

میکروسپور یک سلول منفرد و در دسترس در بسیاری از گونه ها می باشد که توانایی تولید گیاهان تراریخته را در دو مسیر گامتوفیتی و اسپرو فیتی داراست. گیاهان باززایی شده اولیه ممکن است هاپلوئید بوده و یا اینکه پس از دو برابر کردن کروموزوم ها گیاه دیپلوئید خالص بدست آیند. تکنیک هایی که در آن انتقال ژن به میکروسپور یا دانه گرده انجام می شود عبارتند از: الف- انتقال بر مبنای گرده بالغ که در آن DNA قبل از گرده افشانی وارد دانه گرده می شود و قبل یا بعد از گرده افشانی به کلاله منتقل می گردد (مسیر لوله گرده)، ب- انتقال *DNA* از طریق تفنگ پرتاب ذره (بیو لیستیک) به درون میکروسپورهای تک سلولی در فاز G1 سیکل سلولی و سپس کشت درون شیشه ای میکروسپورها به منظور تشکیل دانه گرده بارور و سپس گرده

افشانی طبیعی (برون شیشه ای) و جمع آوری بذور تراریخته و ج- انتقال ژن به میکروسپور یا دانه های گرده نابالغ جنین، که به وسیله تنش القا شده اند که در آن جنین زایی در میکروسپور صورت گرفته و باعث رشد جنین ها و گیاهان هاپلوئید تحت شرایط بهینه می‌شود.

کاربرد کشت میکروسپور در ایجاد نرعقیمی و تولید بذور هیبرید F1:

بذور هیبرید F1 بدلیل افزایش معنی‌دار در عملکرد و قیمت بالا از اهمیت ویژه‌ای در برنامه‌های به‌نژادی برخوردار هستند. برای ایجاد بذور هیبرید F1 می‌بایست دو لاین اینبرد با یکدیگر تلاقی داده شوند که برای این منظور استفاده از سیستم نرعقیمی باعث کاهش قابل ملاحظه هزینه‌ها در تولید بذور هیبرید می‌شود، اگر چه کمبود تکنولوژی‌های عمومی در جهت ایجاد نرعقیمی و برگشت‌پذیری نر باروری بزرگ‌ترین مانع برای استفاده از مزایای تولید بذور هیبرید F1 در تعداد زیادی از گونه های گیاهی می‌باشد. بیشترین نرعقیمی مورد استفاده نرعقیمی سیتوپلاسمی است اگر چه در بسیاری از گیاهان در دسترس نبوده و نیازمند مراحل اصلاحی مکرر می‌باشد. حال آنکه در برنامه تولید بذور هیبرید، گیاهان نرعقیم می‌توانند از طریق غیر فعال کردن یا کم توان کردن آنزیم های دخیل در مرحله تکامل میکروسپور به دانه گرده (از قبیل گلوتامین سنتتاز) ایجاد گردند. حفظ گیاهان نرعقیم از طریق جنین زایی میکروسپور امکان پذیر است و نیازی به یافتن والد نگهدارنده نر عقیمی نیست. بعلاوه امکان برگرداندن نرباروری از طریق بلوغ درون شیشه ای میکروسپور(*in vitro maturation*) و در نهایت گرده افشانی آنها بطور برون شیشه ای (*in vivo pollination*) وجود دارد (عنایتی شریعت پناهی، م.، امامی میبدی، د. ۱۳۸۸.).

کاربرد کشت میکروسپور در ردیابی ژنی:

ردیابی ژنی (Gene targeting) بوسیله نوترکیبی مبتنی بر تشابه (Homologous Recombination) از ابزارهای ژنتیکی جدید است که امکان الحاق ژن خارجی در مکان‌های ژنومی از پیش تعیین شده را در انتقال ژن میسر می‌سازد. ردیابی ژنی بطور کارآمد و موفقیت آمیزی در باکتری‌ها و مخمر اتفاق می‌افتد و در یوکاریوت‌های پیشرفته نیز از قبیل مگس سرکه (Drosophila)، موش و سلول‌های سوماتیکی انسان به عنوان ابزاری توانمند قابل دسترس و بهره برداری است (عنایتی شریعت پناهی، م.، امامی میبدی، د. ۱۳۸۸).

پیشنهادات:

بر طبق مزایایی که در رابطه با کشت میکروسپور گفته شد، پیشنهاد می شود:

۱. تحقیقات گسترده در رابطه با تهیه‌ی بهترین بستر کشت میکروسپور در ارقام زراعی مهم صورت پذیرد.
۲. تقریبا ۹۸ درصد از بذرهای سبزی و صیفی کشور از طریق واردات به دست کشاورزان می‌رسد که توجه ویژه به تکتیک‌های هاپلوییدی در تولید ارقام هیبرید و ارقام برتر می‌تواند کمک شایانی به تسهیل در تولید ارقام برتر و صرفه جویی در خروج ارز از کشور شود.

منابع:

۱.عنایتی شریعت پناهی، م.، امامی میبدی، د. ۱۳۸۸. میکروسپور: سلولی هاپلوئید با کاربردهای متنوع در ژنتیک و اصلاح نباتات. انتشارات ژنتیک نوین، شماره ۳. صفحه ۱۳-۵.

2. Blakeselee, A F., Belling, J., Farnham, ME., Bergner, AD. 1922. A haploid mutant in the jimson weed, Datura stramonium. Science 55: 646-647

3. Dunwell, JM. 1996. Microspore culture. In: Mohan Jain, Sopory, S.K. and Veilleux, R.E. (eds), In vitro Haploid production in Higher plants. Vol.l.K1uwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 205-216

4. Kott, LS.1998. Application of doubled haploid technology in breeding of oilseed *Brassica napus*. AgBiotech News and Information, 10(3): 69N-74N .

5. Shariatpanahi, ME., Bal, U., Heberle-Bors, E., Touraev, A. 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. Physiol Plant 127:519-534