دابل هاپلوییدی و بررسی آن در فلفل دلمه‌ای

Double haploidy and its investigation in sweet pepper

در شش دهه گذشته، تحقیقات بسیاری بر روی سلول‌های هاپلوئید با منشاء دانه‌ی گرده و سلول تخمک برای تولید دابل هاپلوییدها در شرایط آزمایشـــگاهی مورد بررسی قرار گرفته‌اند که البته میزان موفقیت آنها باهم متفاوت بوده است(Jose M, et. 2021).

براي توليد گياهان هاپلوئيد روش‌هاي درون شيشه‌اي مختلفي وجود دارد كه به دو دسته اصلي آندروژنز و ژينوژنز تقسيم مي‌شوند. به فرآيند القاء و باززايي گياه هاپلوئيد با استفاده از سلول‌هاي گامتي نر، آندروژنز وبرای گامت‌هاي ماده ژينوژنز گفته مي‌شـود (زمانی، ۱۳۹۵).تولید آزمایشـگاهی دابل هاپلوییدهای آندروژنیک به دلایل متعددی نسـبت به تولید دابل هاپلوییدهای ژنوژنیک موفق‌تر بوده است:

اول اینکه سلول‌های هاپلوئید نر به مراتب فراوان‌تر هستند. در یک گل هرمافرودیت مشخص، هزاران میکروسپور یا دانه گرده در هر یک از چندین بسـاک یک گل وجود دارد، در حالی که تنها یک مگاسـپور عملکردی وجود دارد که باعث ایجاد شـش سـلول هاپلوئید در هر کیسـه جنینی، از جمله سـلول تخم، در هر تخمک می‌شـود. گونه‌های مختلف ممکن اسـت تعداد تخمک‌های متفاوتی در هر گل داشته باشند، و در برخی موارد ممکن است تا صدها تخمک وجود داشته باشد، اما این تعداد هرگز با تعداد بسیار زیاد گرده‌های تولید شده توسط یک گل قابل مقایسه نخواهد بود.

دوم، سـلول‌های هاپلوئید ماده در داخل تخمک‌ها محصـور شـده‌اند، که توسـط لایه‌هایی از بافت‌های هسـته و دیواره تخمک احاطه شـده‌اند که این امر جنین‌های هاپلوئید تازه تشـکیل شـده را در فضـای بسـیار کوچکی محدود می کند و به موازات جنین بزرگ می شـوند، در حالیکه در روش آندروژنیک جنین‌ها فقط باید بر سـد تحمیل شـده توسـط دیواره‌های بســاک غلبه کنند بنابراین، بیرون آمدن از بافت‌های اطراف برای رویان‌های ژنوژنیک مشـــکل‌تر خواهند بود، که باعث کاهش میزان موفقیت می‌شود (Jose M, et. 2021).

در اصلاح نباتات فناوری دابل هاپلوئید یک رویکرد بسیار مناسب برای صرفه جویی در زمان و هزینه‌های مربوطه، برای تولید لاین خالص کاملا هموزیگوت مشابه والدین است که برای تولید بذر هیبرید در مقیاس بزرگ توصیه می‌شود. علاوه بر این، تولید گیاهان دابل هاپلوئید در تحقیقات ژنتیکی کاربردی، از جمله تخمین نوقص نوترکیبی و نقشـه‌برداری ژنتیکی صـــفات کیفی پیچیده، تثبیت ژن‌ها در لاین‌ها هموزیگوت، یا جهش‌یافته‌های مغلوب و غیره مفید محدود، هســـتند (شریعت پناهی، ۱۳۸۸).

فناوری (دابل هاپلوئیدی) بر اسـتفاده از سـلول‌های هاپلوئید (عمدتا گامت‌های گیاهی یا سـلول‌های اولیه آنها) به عنوان جنین هاپلوئید متکی است. دوبل شدن خود به خودی کرومزوم ها به ندرت و با نرخ پایینی در طبیعت اتفاق می افتد، و به همین دلیل اســـت که چنین فرآیندی باید از طریق دســـتکاری تجربی القا شـــود تا نرخ آن افزایش یابد (شریعت پناهی، ۱۳۸۸).

روش‌های تولید گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوییدهای بسیار متنوع هستند. در یک طبقه بندی ساده آنها را به دو روش in vivo (روش هایی که در شرایط طبیعی انجام می شود) و in vitro (روش هایی که نیاز به کشت در شرایط آزمایشگاهی برخی از قسمت های گیاه دارند) تقسیم می کند. گونه‌هایی وجود دارند که به یکی از این روش‌ها یا هر دو روش پاسخ می‌دهند و برخی دیگر هستند که به هیچ یک از روش‌های موجود پاسخ نمی‌دهند که نیازمند تحقیقات بیش‌تر می‌باشد.

کاربرد هاپلوئیدها و دابل هاپلوییدها

گیاهان هاپلوئید با دو برابر کردن کروموزوم‌ها به گیاهان دابل هاپلوئید تبدیل مي‌شوند. انواع کاربردهاي هاپلوئیدهاي مضاعف شده عبارتند از :

- ایجاد تنوع ژنتیکي از طریق اعمال جهش‌زاهاي فیزیکي و شیمیایي در لاین‌های هاپلوئید و در ادامه مضاعف کردن تعداد کروموزوم‌های آنها
- تظاهر ژن‌هاي مغلوب در نسل‌هاي اولیه
- کوتاه کردن دوره تفکیك نسلهاي در حال تفرق و رسیدن به خلوص کامل
- افزایش کارآیي انتخاب، به ویژه غربال کردن لاین‌ها در شرایط تنش‌هاي محیطي
- بازیابي تنوع F2 از طریق کشت میکروسپورهاي گیاهان F1 (Forster and Thomas, 2005).

روش‌های تولید گیاهان دابل‌هاپلویید در فلفل

فلفل، در میان خانواده سولاناسه، از نظر سختي پاسخ‌دهي به نرزایي در رتبه سوم قرار دارد، با این حال پس از کشت بساك براي القا ء نرزایي، این روش بیشترین اثر بخشی را در زمینه آندروژنز داشته است (Simarro Seguí, 2011) , با اینکه از کشت بساك فلفل به عنوان یك ابزار در مطالعات پایه‌اي استفاده شده است، اما مهم‌ترین کاربرد آن، تولید گیاهان هاپلوئید مضاعف شده به منظور استفاده در برنامه‌هاي اصلاحي و در ادامه کمك به تولید ارقام هیبرید تجاري با حداکثر هتروزیس بوده است (Simarro Seguí, al e. 2011). در این زمینه اولین گزارش تولید هاپلوئیدهاي خود به خودي در گیاه فلفل در سال ۱۹۴۳ ارائه شد (Bamford and Christensen, 1943).

تولید گیاهان دابل هاپلویید فلفل با روش‌های مختلفی ارزیابی شده است، اما در حال حاضر، کارآمدترین و جهانی ترین روش تا حد زیادی کشت بساک بر اساس استفاده از روش Dumas de Vaulx و همکاران(۱۹۸۱) است. این پروتکل (جدول ۱) منتشر شده در سال با ویژگی‌های هر زمینه فلفل خاص سازگار شده است (Mireia, et. 2021).

	Milieu C	Milieu R
Macro-éléments (en mg/l) :		
KNO_3	2 150	2 150
NH_4NO_3	1 238	1 238
$MgSO_4$, $7H_2O$	412	412
$CaCl_2$, $2H_2O$	313	313
KH_2PO_4	142	142
$Ca(NO_3)_2$, $4H_2O$	50	50
NaH_2PO_4, H_2O	38	38
$(NH_4)_2SO_4$	34	34
KCl	7	7
Micro-éléments (en mg/l) :		
$MnSO_4$, H_2O	22,130	20,130
$ZnSO_4$, $7H_2O$	3,625	3,225
H_3BO_3	3,150	1,550
KI	0,695	0,330
Na_2MoO_4, $2H_2O$	0,188	0,138
$CuSO_4$, $5H_2O$	0,016	0,011
$CoCl_2$, $6H_2O$	0,016	0,011
Vitamines et acides aminés (en mg/l) :		
méso-inositol	50,300	50,300
pyridoxine (HCl)	5,500	5,500
acide nicotinique	0,700	0,700
thiamine (HCl)	0,600	0,600
pantothénate de Calcium	0,500	0,500
vitamine B12	0,030	—
biotine	0,005	0,005
glycine	0,100	0,100
Fer chélaté (en mg/l) :		
Na_2E.D.T.A.	18,65	18,65
$FeSO_4$, $7H_2O$	13,90	13,90
Additifs (en g/l) :		
saccharose	30	30
agar	8	8
pH ajusté à :	5,9	5,9

جدول ۱- پروتکل Dumas de Vaulx,

شامل عناصر ماکرو و میکرو و ویتامین ها در دو محیط کشت R و C

(Dumas de Vaulx, 1981)

- کشت بساک و میکروسپور

در کشت بساک در یک مرحله حساس و کوتاه بساک‌ها از گیاه جدا شده و روی یک محیط کشت مناسب قرار می گیرند. 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 می باشد و بر اساس نظرات بعضی. محققین، مناسب‌ترین بساک‌ها، آنهایی هستند که هنگام جداسازی حاوی میکروسپورهای تک هسته‌ای (مرحله قبل از اولین تقسیم میتوز دانه گرده) باشند. کشت بساک با وجود کاربردهای فراوان، مشکلاتی نیز دارد. بافت دیواره اسپروفیتی بساک در روند جنین زایی به صورت مفید و یا بازدارنده اثر گذار است و در نهایت مطالعات را روی مکانیزم القاء جنین زایی میکروسپور مشکل می‌سازد. جذب مواد غذایی به وسیله میکروسپور در بساک‌های کشت شده بستگی به موقعیت آن‌ها در بساک‌ها دارد که در نتیجه یک انتخاب نامطلوب را بین میکروسپورها باعث می‌شود. موادی که به وسیله دیواره بساک آزاد می شود ممکن است باعث بازدارندگی یا پشتیبانی جنین زایی شود. همچنین دیواره‌ی بساک هاپلوئید نبوده و باعث تولید گیاهان دیپلوید می‌شود.

کشت میکروسپور به لحاظ مزایای آن نسبت به 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، بخصوص استخراج

میکروسپورها، این روش مشکلات ناشی از کشت بساک را تا حدودی بر طرف نموده است (عنایتی شریعت پناهی، م.، امامی میبدی، د. ۱۳۸۸).

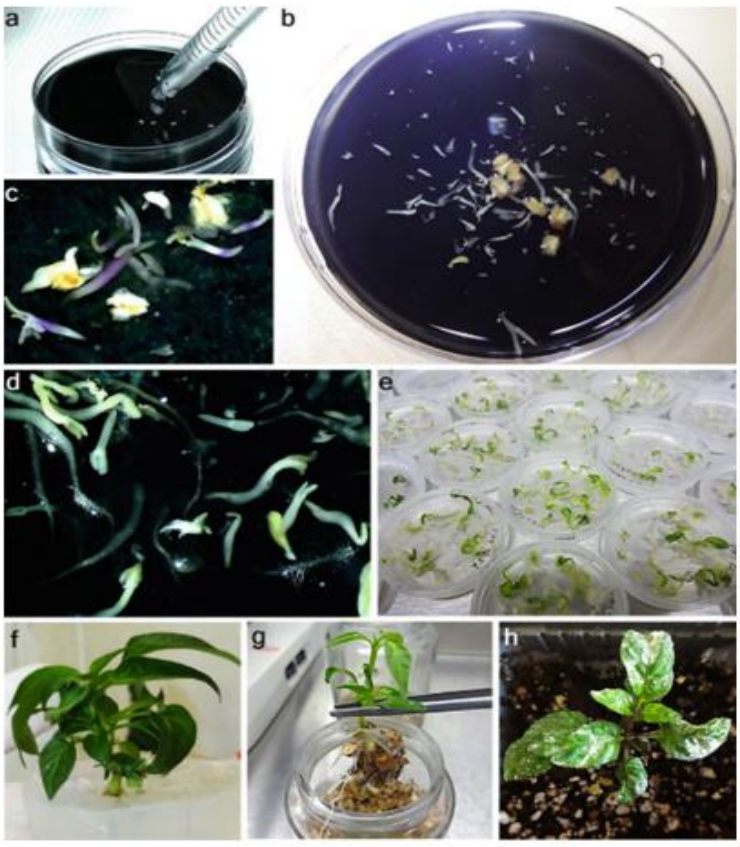
- کشت میکروسپور ریخته شده (Shed-Microspore Culture)

این روش جایگزین سیستم‌های مختلف کشت بساک و میکروسپور، برای ایجاد یک روش کارآمد در تولید دابل هاپلویید فلفل تند اندونزیایی (Capsicum annuum L) شد که از روش‌های گزارش شده قبلی بهتر عمل کرد.

عوامل مهم پروتکل عبارتند از:

- انتخاب جوانه های گل با بیش از ۵۰ درصد میکروسپورهای تک سلولی دیررس
- یک روز پیش تیمار جوانه ها در دمای چهار درجه سانتی گراد
- کشت بساک ها در سیستم محیطی دو لایه به مدت یک هفته در دمای نه درجه سانتی گراد. C و پس از آن در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در تاریکی مداوم.
- محیط حاوی اجزای Nitsch و ۲٪ مالتوز، با ۱٪ زغال چوب فعال در زیر لایه‌ی جامد و ۲/۵ میکرومولار
- زاتین و ۵ میکرومولار ایندول-۳ استیک اسید در لایه بالایی مایع.

در این بررسی تمام ده ژنوتیپ فلفل تند مورد آزمایش، به این پروتکل پاســـخ دادند. بهترین ژنوتیپ‌ها در هر جوانه گل اصلی چهار تا هفت گیاه تولید کردند(شکل ۱) (supena, et. 2006).



شکل ۱- مراحل کشت (a)، جنین‌زایی (b)، باززایی (c, e و d) و سازگار کردن (f، g، h) گیاه فلفل در روش کشت میکروسپور ریخته شده

نتیجه گیری

روش کشت میکروسپور ریخته شده قابل بهینه سازی برای انواع رقم‌های فلفل می‌باشد و در محیط کشت از دو فاز جامد و نیمه مایع استفاده شده است. در این روش بساک‌ها بعد از جداسازی از محور گل در محیط جامد قرار داده شده و روی آنها یک محیط نیمه مایع ریخته می‌شود. بساک‌ها بعد از چند روز باز شده و میکروسپورها در محیط نیمه مایع پخش می‌شوند که بعد از دو یا سه هفته میکروسپورها شروع به کالوس زایی و باززایی می‌کنند. در این پروتکل میکروسپورها از صدمات مکانیکی که در استخراج میکروسپور و همچنین عوامل بازدارنده که در دیواره‌ی بساک برای میکروسپورها وجود داشت به دور می‌مانند و همین عامل می‌تواند سبب جنین زایی و باززایی بیشتر شده و متعاقباً امکان تولید گیاهان هاپلویید و دابل هاپلویید را بالا ببرد.

منابع:

۱- زماني، م، معینی، ا. چوکان، ر. ۱۳۹۵. بررسي آندروژنز (کشت بساك و میکروسپور) هیبریدهاي تجاري فلفل فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum L.*) پایان نامه‌ی دکتری دانشگاه علوم کشاورزی تربیت مدرس تهران

۲- 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.

1- Dumas de Vaulx,R., Chambonnet, D., Pochard, E. 1981. Culture in vitro d'anthe`res du piment (*Capsicum annuum L.*): ame´lioration des taux d'obtention de plantes chez diffe´rents ge´notypes par des traitements a` +35C. Agronomie 1:859–864

2- Forster, B. P., Thomas, W. 2005. Doubled haploids in genetics and plant breeding. Plant Breeding Reviews, 25: 57–88.

3- Jose, M., Seguı´-Simarro (ed). 2021. Doubled Haploid Technology: Volume 2: Hot Topics, *Apiaceae, Brassicaceae,* Solanaceae, Methods in Molecular Biology, vol. 2288, part of Springer Nature 2021 https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1335-1_17,

4- Mireia A, P, J., Seguı´-Simarro, M. 2021. Anther Culture in Sweet Pepper (*Capsicum annuum L.*) Methods in Molecular Biology, vol. 2288, part of Springer Nature https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1335-1_17,

5- Seguí-Simarro, J, M. 2016. Androgenesis in solanaceae. In Vitro embryogenesis in higher plants. Springer, 209–244.

6- Seguí-Simarro, J., Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V., González-García, B. 2011. Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. Plant Cell Reports, 30: 765–78.

7- Supena, E. D. J., Suharsono, S., Jacobsen, E., Custers J. B. M. 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum L.*). Plant Cell Reports, 25: 1–10