اصلاح معکوس: رویکرد جدید بر پایه‌ی مهندسی فرایند میوز

Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis

رضا وجدان

یکی از مهمترین پدیده‌ها در اصلاح نباتات ایجاد نتاج نسل اول هیبرید (F1) است که از لحاظ اندازه، ویژگی‌های رشدی و عملکرد در مقایسه با والدین خالص اولیه برتر باشد، به این پدیده هتروزیس می‌گویند. بروز این پدیده، می تواند ناشی از عوامل مختلفی باشد که هنوز به طور کامل شناخته نشده است نشده است (Springer and Stupar, 2007; Stupar et al., 2008; Fernandez-Silva et al., 2009; Wei et al., 2009). به نژادگران از طریق تلاقی‌های کنترل شده‌ی لاین‌های اینبرد می‌توانند هتروزیس را برآورد کنند. طبیعت تصادفی بودن این رویکرد، موجب دشواری بهینه سازی اثرات هتروزیس می‌شود. یکی از استراتژیهای جایگزین برای این روش، بر پایه‌ی معکوس کردن انتخاب گیاهی در نسل‌های جوامع تعریف شده با سطوح بالای هتروزیگوسیتی و تنوع تصادفی می‌باشد. سپس این جوامع، در شرایط محیطی مختلف (از نظر عرض جغرافیایی، شوری، رطوبت و ...) مورد بررسی قرار می‌گیرند و بهترین ژنوتیپ‌های هتروزیگوت برای ادامه پروسه‌ی اصلاحی انتخاب می‌شوند. یکی از عوامل محدود کننده در دستیابی به سطوح بالای تنوع در برنامه‌های اصلاحی رایج این است که تولید دوباره‌ی هتروزیگوت‌ها از طریق بذر، غیرممکن یا دشوار است. ترکیب آلل‌های مطلوب بدلیل تفرق صفات در نسل‌های بعد بهم می‌خورد. بنابراین توسعه روش‌هایی به منظور سهولت نگهداری ژنوتیپ‌های هتروزیگوت، یکی از بزرگ‌ترین چالش‌ها در به نژادی گیاهی می‌باشد. آپومیکسی به عنوان روشی برای نگهداری فنوتیپ‌های هتروزیگوت پیشنهاد شده است، ولی هنوز بعنوان یک روش کاربردی در اصلاح نباتات مورد استفاده قرار نگرفته است (Perotti et al., 2004).

تکنیک اصلاح معکوس با مختل نمودن فرایند کراسینگ اوور و تثبیت کروموزوم‌های غیرنوترکیب حاصل و به دنبال آن دابل هاپلوئیدی، سبب بازسازی لاین‌های هموزیگوت اولیه شده و چالش عدم امکان نگهداری هتروزیگوت مطلوب را بر طرف می‌سازد. در این روش دو مرحله ضروری شامل ممانعت از برقراری کراسینگ اوور در بوته‌های انتخابی و به دنبال آن بازیابی دابل هاپلوئیدها از اسپورهای دارای کروموزوم غیرنوترکیب می‌باشد. از لاین‌های دابل هاپلوئید حاصل می‌توان هموزیگوت‌های برتر را در سطح تجاری مجدداً بدست آورد. از سوی دیگر این تکنیک برای گیاهانی با زمینه ژنتیکی مشخص نیز قابل استفاده است. اگر کراسینگ اور به جای F2 در F1 حذف شود، اصلاح معکوس می‌تواند لاین‌هایی با کروموزوم‌های جایگزین شده شده تولید نماید. این لاین‌ها دارای یک یا بیش از یک کروموزوم از یک والد در زمینه ژنتیکی والد دوم هستند. با تلاقی برگشتی این لاین‌ها با لاین‌های والدینی اصلی، جوامعی که برای کروموزوم (ها) تفرق می‌یابند، بدست می‌آید. به لحاظ تئوریک، تکنیک اصلاح معکوس منجر به بازترکیبی کروموزومی میان دو گیاه هموزیگوس در تمام حالات ممکن می‌شود.

نوترکیبی در گیاهان گدار توسط کمپلکس سیناپتونمال، طی مراحل چرخه‌ی میوز رخ می‌دهد. در پروفاز یک، کروموزوم‌های همولوگ در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند (Bivalent) و با مبادله‌ی قطعاتی میان کرماتیدهای غیرخواهری، کراسینگ اوور شکل می‌گیرد. کروموزوم‌های آکیاسماتیک (که نوترکیبی را نشان نمی‌دهند) بصورت Univalent باقی می‌مانند. کیاسماتا که در Bivalent موجبات تفرق کروموزوم‌های همولوگ را فراهم می‌آورد، در Univalent وجود ندارند. در نتیجه ممکن است تمامی

کرموزوم‌ها در یک سمت سلول تجمع یابند و یا با نسبت‌های متفاوتی به دو قطب سلول حرکت نمایند. این وضعیت یک توزیع نامتعادل در تعداد کروموزوم‌ها را بوجود می‌آورد (آنیوپلوئیدی)، از این روی گیاهان آکیاسماتیک بشدت عقیم هستند (Couteau et al., 1999; Hartung et al., 2007). با فرض اینکه هر Univalent شانس مساوی برای حرکت به دو قطب سلول داشته باشد، احتمال تشکیل اسپور با تعداد کروموزوم نرمال برابر $^{x}/_{2}$[1] خواهد بود (x برابر تعداد کروموزوم هاپلوئید گونه‌ی مورد نظر). بعنوان مثال برای گیاه آرابیدوپسیس (2n = 2x = 10)، فراوانی اسپورهای متعادل، یک در هر ۳۲ اسپور است (۳٪). برای گیاهانی با عدد کروموزومی هاپلوئید بالاتر از ۱۲ این احتمال بسیار ضعیف می‌شود یعنی یک در بیش از ۴۰۰۰ اسپور. این مورد در گونه‌های مختلف باید بررسی شود. همانطور که می‌دانید اصلاح معکوس بر پایه سرکوب موثر کراسینگ اوور میوزی است. بنابراین ژن‌هایی که در تشکیل کراسینگ اوور ضروری هستند نیز می‌توانند مورد هدف قرار گیرند. برای مثال ژن ASY1 در آرابیدوپسیس و برنج و بعلاوه موتانت‌هایی نظیر dmc1, sds, ptd & spo11 که در فرایند شکل‌گیری کراسینگ اوور در گیاهان مختلف نقش دارند (Couteau et al., 1999; Azumi et al., 2002; Stacey et al., 2006; Wijeratne et al., 2006). با استفاده از RNA interference (RNAi) (Siaud et al., 2004; Higgins et al., 2004) و یا siRNAs که موجب خاموشی دائمی ژن می‌شود، می‌توان ژن‌های هدف را غیر فعال نمود. برای گیاهانی که ترانسفورماسیون پایدار، سخت یا غیرممکن باشد، راه جایگزین استفاده از القای خاموشی ژن با استفاده از ویروس Virus-induced gene silencing (VIGS) به عنوان روشی موثر برای القای خاموشی ژن پس از نسخه برداری (Post-Transcriptional Gene Silencing,PTGS). در این روش گیاه با ویروسی تغییر یافته که شامل یک توالی RNA دارای ژن هدف است، آلوده می‌شود. گیاه در پاسخ دفاعی متقابل، با استفاده از siRNA[1]، RNA ویروسی و بطور همزمان RNA آندوژنز گیاهی را تجزیه می‌کند (Ruiz et al.,1998; Baulcombe, 2004). روش دیگری که بر مبنای غربالگری ژنتیکی-شیمیایی است، استفاده از ماده‌ی شیمیایی میرین، به عنوان مهارکننده کمپلکس Mre11-Rad50-Nbs1 (Dupre´ et al., 2008) می‌باشد. این ماده با مهار یا حذف نوترکیبی طی فرایند میوز، سبب تسریع اصلاح معکوس می‌شود. کارایی تشکیل دابل هاپلوئیدی از اسپورهای هاپلوئید، کاملاً وابسته به گونه است (Forster et al., 2007). ویژگی منحصر به فرد DHهای [2]بدست آمده از اسپورهایی که از طریق میوز آکیاسماتیک بوجود آمدند، این است که حاوی کروموزوم‌های والدینی غیر نوترکیب هستند. . در این روش به دلیل عدم توزیع طبیعی کروموزوم‌ها در دو قطب سلول، احتمال تشکیل اسپورهای نابارور آنیوپلوئید بسیار محتمل است . بنابرین انتخاب اسپورهای یوپلوئید مورد نیاز، تا حدی بصورت خودکار انجام می‌شوند، زیرا تنها اسپورهای دارای یک نسخه از تمام کروموزوم‌ها قادرند از تمامی مراحل نموی از تقسیم سلولی و جنین‌زایی تا بازیابی گیاه کامل عبور کنند. هاپیرپلوئیدی نتاج (نوعی عقیمی کروموزومی که عدد کروموزومی از حالت نرمال دیپلوئیدی بیشتر است) با استفاده از مارکرهای همبارز یا جریان سیتومتری (flow cytometry) (دستگاهی برای شمارش تعداد سلول در محلول سوسپانسیون) قابل تشخیص‌اند. گسترش اصلاح معکوس به گیاهانی محدود است که تکنیک دابل هاپلوئیدی در آنها بطور معمول انجام شود. این تکنیک در برنامه‌های اصلاحی

1 Small interfering RNA sometimes known as short interfering RNA or silencing RNA

2 Doubled haploids

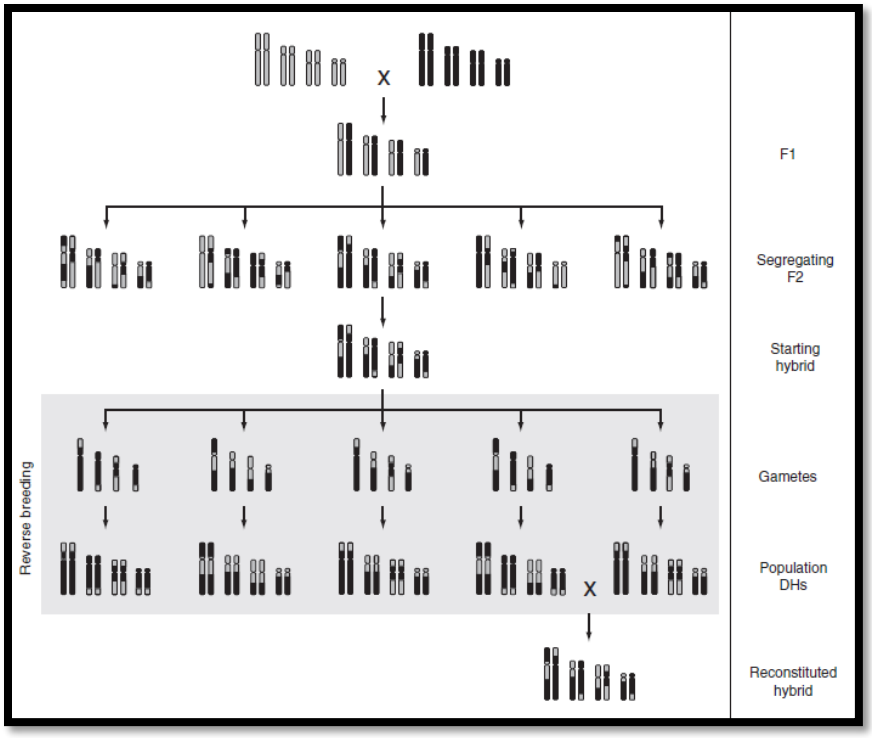
اغلب گونه‌های گیاهی بطور معمول اجرا می‌شود، در هر حال استثناهایی هم وجود دارد، نظیر: سویا، پنبه، کاهو و گوجه فرنگی که گیاهان دابل‌هاپلوئید یا تشکیل نمی‌شوند و یا با نرخ بسیار پائینی تولید می‌شوند (Zhang et al., 2008).

ترکیب سرکوب کراسینگ اوور، به همراه باززایی اسپورهای هاپلوئید در تکنیک DH منجر به کاربردهای اصلاحی قدرتمند و جدید می‌شود. یکی از کاربردهای مهم تولید لاین‌های هموزیگوت مکمل[3]است که برای تولید هیبریدهای F1 اختصاصی استفاده می‌شوند. بعلاوه وقتی که RB [4]در خصوص هتروزیگوت‌های F1 بکار گرفته می‌شود، امکان تولید لاین‌هایی با کروموزوم‌های جایگزین وجود دارد که این خود امکان اصلاح هدفمند در مقیاس تک کروموزوم را فراهم می‌آورد. RB کاملاً با لاین‌های نرعقیم سیتوپلاسمی تجاری، که در کشاورزی مدرن بسیار مورد استفاده‌اند، قابل رقابت است. این تکنیک به گیاهانی با عدد هاپلوئیدی ۱۲ یا کمتر و اینکه اسپورها به گیاه دابل هاپلوئید قابل بازیابی باشند، محدود می‌باشد. در گونه‌های پلی پلوئید با تعداد کروموزوم زیاد، بازسازی بساک که برپایه‌ی حذف تقسیم دوم میوز بوده (سبب تولید اسپورهای غیرکاهشی تقسیم دوم میوز(SDR[5]) می‌شود) پیشنهاد شده است. استفاده از اسپورهای SDR بازسازی سریع فنوتیپ مورد نظر و همچنین امکان دستیابی به لاین‌های دارای کروموزوم جایگزین را امکان پذیر می‌نمایند (Van Dun and Dirks, 2006).

3 complementary homozygous lines

4 Reverse breeding

5 Second Division Restitution, SDR



شکل۱: اصلاح معکوس قادر است برای اصلاح هتروزیگوت‌های نا معلوم بکار گرفته شود. تلاق دو والد هموزیگوس (نوارهای خاکستری و سیاه) یک هتروزیگوت F1 را می سازد و وقتی آن را خودگشن کنیم، جمعیت F2 بدست می‌آید. هیبرید اولیه از ساختار ژنتیکی نامعلوم برای خصوصیات مطلوبش انتخاب می شود و تحت دو مرحله اصلاح معکوس قرار می گیرد (قسمت خاکستری شکل). با خاموشی کراسینگ اوور در فرایند میوز، تمام کروموزوم‌های والدینی از طریق اسپورها منتقل می‌شوند. نکته در این مثال چهار کروموزوم در هیبرید ۱۶ ترکیب متفاوت در گامت‌ها ایجاد می‌نمایند- تنها ۵ ترکیب برای راحتی نمایش داده شده است. گامت‌های آکیاسماتیک بااستفاده از تکنیک کشت درون شیشه برای تولید لاین‌های دابل هاپلوئید بکار گرفته می‌شوند. از این جمعیت، والدین مکمل را می‌توان انتخاب نمود تا بعد از تلاق هیبرید اولیه بطور کامل بازسازی شود. لاین‌های دابل هاپلوئید حاصل جهت ساخت کتابخانه‌ی دائمی برای خلق تنوع گسترده از هیبریدهای تعریف شده قابل بهره‌برداریست.

منابع

1. Azumi, Y., Liu, D., Zhao, D., Li, W., Wang, G., Hu, Y. and Ma, H. 2002. Homolog interaction during meiotic prophase I in Arabidopsis requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. EMBO J. 21, 3081–3095.
2. Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. Nature, 431, 356– 363.

3. Couteau, F., Belzile, F., Horlow, C., Grandjean, O., Vezon, D. and Doutriaux, M.-P. 1999. Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a dmc1 mutant of Arabidopsis. Plant Cell, 11, 1623–1634.
4. Dupre´ , A., Boyer-Chatenet, L., Sattler, R.M., Modi, A.P., Lee, J.-H., Nicolette, M.L., Kopelovich, L., Jasin, M., Raer, R., Paull, T.T. and Gautier, J. 2008. A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the mre11-rad50-nbs1 complex. Nat. Chem. Biol. 4, 119–125.
5. Fernandez-Silva, I., Moreno, E., Eduardo, I., Arus, P., Alvarez, J.M. and Monforte, A.J. 2009. On the genetic control of heterosis for fruit shape in melon (Cucumis melo L.). J. Hered. 100, 229–235.
6. Forster, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K.J. and Touraev, A. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. Trends Plant Sci. 12, 368–375.
7. Hartung, F., Wurz-Wildersinn, R., Fuchs, J., Schubert, I., Suer, S. and Puchta, H. 2007. The catalytically active tyrosine residues of both SPO11-1 and SPO11-2 are required for meiotic doublestrand break induction in Arabidopsis. Plant Cell, 19, 3090– 3099.
8. Higgins, J.D., Armstrong, S.J., Franklin, F.C.H. and Jones, G.H. 2004. The Arabidopsis MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in Arabidopsis. Genes. Dev, 18, 2557–2570.
9. Perotti, E., Grimanelli, D., John, P., Hoisington, D. and Leblanc, O. 2004. Why is transferring apomixis to crops still a dream? In new directions for a diverse planet: proceedings for the 4th International Crop Science Congress (Fischer, T., Turner, N., Angus, J., McIntyre, L., Robertson, M., Borrell, A. and Lloyd, D., eds), Brisbane, Australia: URL: http://www.cropscience.org.au/ icsc2004/poster/3/2/1/1367_perottie.htm.
10. Ruiz, M.T., Voinnet, O. and Baulcombe, D.C. 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. Plant Cell, 10, 937–946.
11. Siaud, N., Dray, E., Gy, I., Ge´ rard, E., Takvorian, N. and Doutriaux, M.-P. 2004. Brca2 is involved in meiosis in Arabidopsis haliana as suggested by its interaction with Dmc1. EMBO J 233, 1392–1401.
12. Springer, N.M. and Stupar, R.M. 2007. Allelic variation and heterosis in maize: how do two halves make more than a whole? Genome Res. 17, 264–275.

13. Stacey, N.J., Kuromori, T., Azumi, Y., Roberts, G., Breuer, C., Wada, T., Maxwell, A., Roberts, K. and Sugimoto-Shirasu, K. 2006. Arabidopsis SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. Plant J. 48, 206–216.
14. Stupar, R., Gardiner, J., Oldre, A., Haun, W., Chandler, V. and Springer, N. 2008. Gene expression analyses in maize inbreds and hybrids with varying levels of heterosis. BMC Plant Biol. 8,33.
15. Van Dun, C.M.P. and Dirks, R.H.G. 2006. Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel B.V. Near Reverse Breeding, WO/ 2006 / 094773.
16. Wei, G., Tao, Y., Liu, G., Chen, C., Luo, R., Xia, H., Gan, Q., Zeng, H., Lu, Z., Han, Y., Li, X., Song, G., Zhai, H., Peng, Y., Li, D., Xu, H., Wei, X., Cao, M., Deng, H., Xin, Y., Fu, X., Yuan, L., Yu, J., Zhu, Z. and Zhu, L. 2009. A transcriptomic analysis of superhybrid rice LYP9 and its parents. PNAS, 106, 7695–7701.
17. Wijeratne, A.J., Chen, C., Zhang, W., Timofejeva, L. and Ma, H. 2006. The Arabidopsis thaliana PARTING DANCERS gene encoding a novel protein is required for normal meiotic homologous recombination. Mol. Biol. Cell 17, 1331–1343.
18. Zhang, X, Jin, S, Liu, D, Lin, Z, Zeng, F, Zhu, L, Tu, L and Guo, X. 2008. Cotton biotechnology: challenge the future for cotton improvement. In Advances in Plant Biotechnology (Rao, G.P., Zhao, Y., Radchuk, V.V. and Bhatnagar, S.K., eds), pp. 241– 301. Houston, Texas: Studium Press LLC.