جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

استفاده از روش اصلاحی هاپلوئیدی در غلات

چکیده

تولید هایلوئید و به دنبال آن دابلد هاپلوئید (Doubled haploids) باعث دستیابی به هموزیگوتی مطلق از گیاهان هتروزگوت (F3 یا F1) در حداقل ممکن گردد. از نقطه نظر اصلاحی در گیاهان خودگشن، همچون غلات، دستیابی به لاینهای هموزیگوت می تواند باعث سرعت بخشیدن و همچنین افزایش کارایی گزینش در برنامه های اصلاحی شود.

در حال حاضر روشهای مختلفی از قبیل پرچم، دانه گرده، تخمدان، تخمک و حذف کروموزومی برای تولید هاپلوئید در گیاهان زراعی موجود می باشند. شرایط لازم جهت انتخاب و بکارگیری یک سیستم تولید هاپلوئید برای برنامه هیا اصلاحی عبارتند از: 1-میزان کافی تولید هاپلوئید کهد از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد 2-لاینهای دابلد هاپلوئید بدین انده می بایست از نظر سیتولوژیکی پایدار و طبیعی باشد 3-لاینهای کتولید شده می بایست یک نمونه تصادیف از گامتهای والدین باشند.

تولید هاپلوئید از طریق گشت پرچم ساده ترین و معمولترین روش می باشد که در بسیاری موارد میزان تولید گزارش شده قابل ملاحظه می باشند. متاسفانه وابستگی ژنتیکی در غالب گزارشهای یاد شده به چشم یم خورد،

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

بطوری که فقط بعضی از ژنوتیپ ها نسبت به یک تکنیک کشت پرچم واکنش مطلوب نشان می دهند. از طرف دیگر ظهور گیاهان آلبینو یک مشکل اساسی در ایم سیستم محسوب می شود.

تولید هاپلوئید از طریق حذف کروموزومی مبنی بر تلقیح بین دو گونه گیاهی می باشد که بعد از تلقیح و در طول تشکیل جنین کروموزومهای یکی از والدین حذف گردیده و باعث ایجاد جنین و بدنبال آن گیاهچه های هاپلوئید یم شود.

تولید هاپلوئید از طریق حذف کروموزومی برای اولین بار در جو در نتیجه تلاقی با جو وحشی گزارش شد که به خاطر مزیتهای آن نسبت به روشهای دیگر مورد توجه قرار گرفت. تولید هاپلوئید از طریق حذف کروموزومی در گندم در نتیجه تلاقی با ذرت اخیراً در انگلستان گزارش شد. در ایران این روش تولید هاپلوئید در گندم مورد نظر موسسه اصلاح بذر می باشد. پروژه تولید هاپلوئید در گندم با همکاری بخش غلات و بخش فیزیولوژی موسسه اصلاح بذر از سال 1371 آغاز گردیده و نتایج آن در مقاله جداگانه اراده خواهد شد.

مقدمه

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

در حال حاضر گرایش فزاینده ای برای تولید انبوه هاپلوئید در غلات و سایر گیاهان زراعی و باغی وجود دارد. هاپلوئید استفاده های فراوانی در تحقیقات ژنتیکی و برنامه هیا اصلاحی از قبیل تعیین نقشهد های ژنتیکی، تعیین همولوژی در یک ژنوم و همچنین بین ژنومها، تسهیل مطالعات موتاسیون، تسهیل مطالعات صفات کمی، سرعت بخشیدن به برنامه های اصلاحی و افزایش کارآیی سلکسیون دارند. در این مقاله استفاده از هاپلوئیدها در برنامه های اصلاحی با تاکید در غلات ارائه یم گردد.

مزایای روش اصلاحی هاپلوئید (Doubled haploid system)

از نظر اصلاحی در گیاهان خودگشن همچون غلات، سیستم دابلد هاپلوئید می تواند مستقیماً جهت تولید ارقام جدید استفاده شود. زیرا هر لاین دابلد هاپلوئید تولید شده پتانسیل تبدیل شدن به یک کالتیوار جدید را دارا می باشد. مزایای اصلی سیستم دابلد هاپلوئید در مقایسه با روشهای کلاسیک اصلاحی بشرح ذیل است:

1-سرعت بخشیدن به برنامه اصلاحی

2-افزایش کارایی سلکسیون در طول برنامه

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

1-سرعت بخشیدن به برنامه اصلاحی

در روشهای کلاسیک اصلاحی (پدیدگری، بالک) حدوداً 6 نسل خودگشنی جهت دستیابی به حد نصاب کافی هموزیگوتی بعد از کراس اولیه زمان لازم است. هر نسل خودگشنی باعث کاهش هتروزیگوسیتی و افزایش هموزیگوسیتی می گردد. با n تعداد ژن، نسبت گیاهان هموزیگوت بعد از m نسل خودگشنی را می توان با فرمول $[(2^m-1)/2^m]^n$ محاسبه نمود. برای مثال با درنظر گرفتن 5 جفت ژن مستقل بعد از 5 نسل خودگشنی حدوداً 85٪ گیاهان هموزیگوت خواهند بود.

بدیهی است که با درنظر گرفتن کلیه ژنهای حتی بعد از تعداد زیاد نسلهای خودگشنی هموزیگوسیتی کامل بدست نمی آید. مهمترین مزیت سیستم دابلد هاپلوئیدی دستیابی به هموزیگوسیتی در حداقل زمان ممکن می باشد و بعد از تولید هاپلو.ئید از گیاهان هتروزیگوت (F1) و سپس دابلد هاپلوئید، هموزیگوسیتی مطلق بدون توجه به تعداد ژنهای در حال تفکیک حاصل میگردد. (شکل شماره 1). این امتیاز جهت تثبیت ژنهای صفات کمی حائز اهمیت است.

2-افزایش کارآیی سلکسیون:

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

الف-صفات کیفی (ژنهای اصلی): احتمال دستیابی به یک ژنوتیپ خاص مورد نظر (ترکیب خاصی از ژنها در شرایط هموزیگوت) با n تعداد ژن در نسل $F2(1/4)^n$ در حالی که این احتمال با سیستم هاپلوئیدی در مقابل 1/64 در نسل F2 روشهای کلاسیک می شود.

ب-صفات کمی: امتیاز افزایش کارآیی سلکسیون در سیستم هاپلوئیدی بیشتر در مورد صفات کمی مورد توجه می باشد. اولا در این سیستم واریانس افزایشی تنها جز واریانس ژنتیکی در لاینها می باشد که ارزش واقعی بریدینگ آنها اشکار می سازد. در مقایسه در سیستمهای کلاسیک واریانس غالبیت نیز وجود دارد که باعث می شود ارزش واقعی بریدینگ آنها مبهم و پیچیده گردد (جدول شماره 1). ثانیاً در سیستم هاپلوئیدی از آنجائی که لاینها هموزیگوت مطلق می باشند، تمام گیاهان در یک واحد / قطعه آزمایشی از نظر ژنتیکی یکسان می باشند. درصورتی که سیستمهای کلاسیک مثل F_3 و یا F_4 از آنجائی که تفرق ژنتیکی در گیاهان داخل قطعه آزمایش صورت می گیرد باعث بروز اختلافات ژنتیکی داخل قطعه ازمایشی و در نتیجه بریدر می بایستی هم داخل قطعه و همچنین بین قطعات آزمایشی سلکسیون را انجام دهد که تا حدودی باعث پیچیدگی و مستلزم دقت بیشار می باشد. در سیستم هاپلوئیدی سلکسیون فقی بین قطعات آزمایشی انجام می گیرد (جدول شماره 2). ثالثاً تا

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

آنجائی که حساسیت سلکسیون از یک نسل به نسل دیگر مطرح می باشد، لاینهیا دابلد هاپلوئید بواسطه هموزیگوسیتی مطلق یک همبستگی ژنتیکی کامل از والدین به نتاج نشان می دهند، در حالی که در سیستمهای کلاسیک هیچگاه چنین همبستگی کاملی وجود ندارد (جدول شماره 3).

علیرغم موارد فوق استفاده از روش اصلاحی هاپلوئیدی به دلیل نیاز این سیستخم به امکانات آزمایشگاه گشت بافت، محیطهای قابل کنترل رشد، پرسنل متخصص، گسترده و همه جایی نمی باشد.

شرایط یک سیستم تولید هاپلوئید برای استفاده در برنامه های اصلاحی

با درنظر گرفتن مزایای سیستم تولید هاپلوئیدی نسبت به روشهای کلاسیک قبل از بکارگیری این روش باید توجه داشت که سیستم تولید هاپلوئید داریا ویژگی های لازم جهت استفاده در برنامه های اصلاحی می باشد. این شرایط شامل:

1-1-میزان تولید هاپلوئید

مهمترین معیار انتخاب یک روش تولید هاپلوئیدی میزان تولید اقتصادی با درنظر گرفتن بودجه، پرسنل و امکانات آزمایشگاهی می باشد. در حال حاضر روشهای متنوع تولید هاپاوئید در گیاهان زراعی وجود دارد. بهرحال اکثر این

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

روشها قادر به تولید اقتصاید هاپلوئید به یمزان قابل استفاده در برنامه های اصلاحی نیستند. از طرف دیگر سیستم تولید هاپلوئید نباید دارای وابستگی ژنتیکی باشد. لطوری که بعضی ژنوتیپ ها واکنش مطلوب و بعضی دیگر واکنش ضعیف نشان دهند. متایقانه ئابستگی ژنتیکی در بیشتر سیستمهای تولید هاپلوئید در گزارشهای منتشر شده به چشم می خورد.

2-دابلد هاپلوئید می بایست از نظر ستولوژیکی و مورفولوژیکی طبیعی باشند این ملاک استگی به روش و مسیر تولید هاپلوئید دارد. بطور کلی با روشهای کشت بافت از دو مسیر می تواند گیاه هاپلوئید ایجاد نمود.

الف-غیرمستقیم از طیرق کالوس، بعد از تولید کالوس از سلول هاپلوئید از طریق جنینهای رویشی و یا ارگان زایی گیاهچه های هاپلوئید بدست می آیند. گیاهان تولید شده از این مسیر ممکن است دارای ناپایداری کروموزومی (جابجائی ها، آنیوپلوئیدها، حذف بازوی کروموزومها) و ظهور گیاهان آلبینو (ناشی از ناپاداری کلروپلاست) شود.

بطور کلی موسانات ژنتیکی ناشی از فاز کالوس یک عامل منفی منفی در برنامه های هاپلوئید بریندینگ محسوب می شود.

ب-مستقیم بدون فاز کالوس، در این مورد گیاهچه های هاپلوئید بدون تشکیل کالوس تولید می شوند. برای مثال تولید هاپلوئید از جنینهای نارس حاصل

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

تلاقی ذرت با گندم و تولید جنینهای رویشی مستقیماً از میکروسپور در جو از این گروه می باشند. گیاهان هاپلوئید بدست آمده از این مسیر نسبتاً پایدار، دارای ژنوم هاپلوئید n کروموزومی، بدون ناهنجاری کروموزومی و کلروپلاست پایدار هستند.

3-دابلد هاپلوئید بدست آمده می بایست یک نمونه تصادفی گامتهای والدین باشند.

به عبارت دیگر سیستم تولید هاپلوئید نباید هیچگونه سلکسیون روی گامتهای والدین طی روند ایجاد هاپلوئید اعمال کند و هرگونه سلکسیون روی گامتهای (هاپلوئید) توسط بریدر انجام پذیرد. در مورد صفات کیفی (ژنهای اصلی) نسبت 1:1 از گامتهای والدین در دابلد هاپلوئید F1 انتظار می رود و در مورد صفات کمی میانگین عملکرد دابلد هاپلوئید F1 می بایستی مطابق با حد واسط عملکرد والدین باشد و هرگونه اختلاف معنی دار از نمایانگر سلکسیون گامتها به یک سو می باشد. گزارشات منتشر شده در مورد دابلد هاپلوئیدهای گندم و جو از طریق تلاقی وحشی تائید بر تصادفی بودن گامتها دارند (2 و 7).

روشهای تولیدی هاپلوئید

روشهای مختلفی برای تولید هاپلوئید (متعاقب آن دابلد هاپلوئید) در گیاهان زراعی وجود دارند. علاوه بر تکنیکهای کشت بافت روشهای دیگر مثل

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

پارتینوژنز و آپوگامی نیز وجود دارند که به لحاظ اهمیت کمتر کاربردیشان در اینجا بحث نمی شوند.

1-کشت پرچم و دانه گرده نارس

کشت پرچم ساده ترین و معمولترین روش تولید هاپلوئید محسوب می شود و در حال حاضر در بیش از 200 گونه گیاهی در این زمینه گزارش وجود دارد. یکی از مشکلات کشت پرچم این است که مشخص نیم باشد گیاهب دست آمده از دانه گرده یا قسمتهای دیگر پرچم می باشد که باعث بروز نتایج با سطوح مختلف پلوئیدی می گردد. عوامل بازدارنده استفاده گسترده کشت پرچم در برنامه های اصلاحی شامل وابستگی ژنتیکی (واکنش ضعیف برخی ژنوتیپها)، ظهور گیاهان آلبینو و نوسانات می باشد. پیشرفتهای اخیزر در تکنیک پرچم همچون جایگزینی مالتوز بجای سوکروز، آگارز بجای آگار، پیش تیمار مانیتول، پیش تیمار سرما و غیره، گامهای مثبت در بهینه سازی این تکنیک بشمار می آیند.

کشت دانه گرده نارس روشی است که اخیراً به لحاظ مزایای آن بر کشت پرچم بیشتر مورد توجه یم باشد. در این روش مشکگل دخالت دیواره پرچم مرتفع و همچنین دارای پتانسیل بالاتر تولید می باشد. بعلاوه دانه گرده یک ماده ایده ال جهت انتقال DNA برای ترانسفورماسیون و مطالعات موتاسیون

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

یم باشد. جداسازی میکروسپور از طریق مکانیکی با استفاده از سانتریفوژ و یا پیش از تیمار انوسیتول (Inositol 1-2f/1) صورت میگیرد. بطور کلی کشت کیکروسپور در جو تا بحال موفق تر از گندم بوده است. پیشرفتهای اخیر در بهینه سازی تکنیک کشت پرچم و میکروسپور در جو اخیراً توسط پیکرینگ و دیواکس (6) مروز شده است. در گندم هگزاپاوئید و ترتیکال و گندم تتراپلوئید پیشرفتهای تکنیک کشت پرچم اخیراً در هشتمین سمپوزیوم ژنتیک گندم گزارش شده اند 9).

2-کشت تخمدان و تخمک

در این روش تخمدان تلقیح نشده و یا تخمک جدا شده (کشت تخمک) کشت یم شود. در گیاهان ذرت، جو، گندم، تنباکو، برنج و چغندر قند تولید هاپلوئید از این روش گزارش شده است.

عوامل موثر در تولید هاپلوئید در این روش:

الف-مرحله رشد کیسه جنین، همزمان با موقعی مه میکروسپورها دو هسته ای می شوند.

ب-اجزاء محیط کشت و شرایط رشد (پیش تیمار سرما، وضعیت قرار رگفتن در محیط کشت و غیره) بطور کلی در این روش پائین و پرهزینه یمب شاد و تنها در مورد چغندر قند نسبت به کشت پرچم برتر گزارش شده است.

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

2-حذف کروموزومی

تولید هاپلوئید از طریق حذف کروموزومی مبنی بر تلقیح بین دو گونه گیاهی یم باشد که بعدداز تلقیح در طول تشکیل جنین کروموزومهای یکی از والدین حذف گردیده و باعث ایجاد جنین هاپلوئید می شود. جنین هاپلوئید کشت شده و بدنیال آن گیاهچه های هاپلوئید حاصل می شوند. این روش برای اولین بار در جو در نتیجه تلاقی با جو وحشی (Hordeum vulgrare x H.bullbosum 2n=2x=14) گزارش شد (3). تولید هاپلوئید در گندم در نتیجه تلاقی با جو وحشی (Triticum aestivum x G.bulgbosum 1n=4x=2) گزارش شد (1). بدلیل وابستگی ژنتیکی این سیستم بطور گسترده ساتفاده شد. اخیراً در انگلستان تولید هاپلوئید در نتیجه تلاقی با ذرت (T,aestivum x zea mays 2n=20) گزارش گردید (4). در این سیستم وابستگی ژنتیکی شدید وجود ندارد و در حال حاضر بهترین روش تولید هاپلوئید در گندم استفاده در برنامه های اصلاحی محسوب می شود.

تولید ارقام جدید با استفاده از روش اصلاحی هاپلوئیدی

نسلهای مختلف در حال تفکیک بعنوان ماده اولیه برنامه اصلاحی هاپلوئیدی ممکنم است مورد استفاده قرار گیرند. بطور کلی سیستم F1 معمولترین و

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

سریع ترین روش راه جهت دستیابی و معرفی ارقام جدید می باشد. بهرحال دو مشکل در این سیستم وجود دارد:

الف-از آنجائی که دابلد هاپلوئیدهای تولید شده از هیبریدهای F1 می باشند و هیچگونه گزینش در مرحله F1 صورت نمی گیرد، تعداد زیاد لاین دابلد هاپلوئید جهت دستیابی به نوترکیبی مطلوب لازم می باشد و ممکن است حتی با داشتن 800-700 لاین دابلد هاپلوئید احتمال گرفتن رقم جدید بدست نیاید.

ب-در سیستم F1 بخاطر اینکه یک چرخه نوترکیبی یا میوز انجام پذیرفته، ممکن است که جهت شکستن لینگاژهای نامطلوب کافی نباشد. این مشکلات را می توان با به تعویق انداختن مرحله تولید هاپلوئید در نسلهای بعدی مرتفع نمود. به همین خاطر بعضی از محققیت (اسنپ مذاکره حضوری) سیستم F3 را تریجیح می دهند. در این سیستم گرچه مزیت سرعت بخشیدن به برنامه اصلاحی تا حدودی کاهش می یابد اما تعداد کمترین لاین دابلد هاپلوئید (حدودا 150 لاین) نیاز و شانس شکسته شدن لینگاژهای نامطلوب بیشتر است.

در حال حاضر در ایران روش تولید هاپلوئید در گندم با روش حذف کروموزومی (تلاقی با ذرت) و سیستم F3 مورد نظر موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر می باشد.

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

جدول 1-واریانسهای فنوتیپی مورد انتظار در نسلهای

F2 و F3 و جمعیت DH حاصل از F1

$V_A+V_D+V_{EI}$ $V_A+1/2V_D+V_{EP}$ $2V_A+V_{EP}$	بین تک بوته ها F_2 بین میانگین خانواده ها F_3 میانگین خانواده های DH حاصل از F_1
واریانس افزایشی = V_A واریانس غالبیت =V_D واریانس محیطی بین افراد = V_{EI} واریانس محیطی بین کرتها = V_{EP}	

جدول 2-واریانسهای فنوتیپی درون کرتی مورد انتظار

در نسلهای E_3 و E_4 و جمعیت DH حاصل از F_2

واریانس	نسل
$1/2V_A+1/2V_D+V_{EI}$ $1/4V_A+1/4V_D+V_{EI}$ V_{EI}	کرتهای F_3 کرتهای F_4 کرتهای GH حاصل از F_2

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

جدول 3-مقایسه بین همبستگی های ژنتیکی در

نسلهای F_2 و F_3 و جمعیت DH حاصل از F_1

		نسل
		جمعیت F_1 DH/جمعیت F_1 DH گیاهان F_2/میانگین های F_3 میانگین های F_3/ میانگین های F_4

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

نتایج مورد استفاده

1-Barclay, I.R. 1975. High ferequencies of haploid production in wheat (Ttricum aestivum) by chromosomr elimination. Nature 256: 410-411.

2-Bazorgipour, R. 1991. the use of in vitro techniques or crop improvement in cerals. Ph. D. thesis. The University of Cambridge. U.K.

3-Jasha, K.J and Kao. 1970. High frequency haploid production in barley (Hordeum vulgare L.). Nayure 225: 874-876.

4-Laurie, D.A and M.D. Vennet 1988. The production of gapioid wgeat plants from wheat x maize crosses. Theor. Appl. Genet. 76: 393-397.

5-Nei, M, 1953. the effeciency odf haploid method of plant breeding. Heredity 18:19-100.

6-Pickering, R.A. and P. Fevaux, 1992. Haploid production: Approaches and usr in plant breeding. In: P.R.Shewry. (ed). Barley: biochemistry, molecular biology and biotechnology. G.A.B International Wallingford U.K.

7-Sitch. L.A. 1985. The produvtion and utilization of wheat doubles hapioids from the interspecific crosses with Hordeum bulbosu,. Ph. D. thesis. The University of Cambridge.

8-Snape, J.W. 1982. the uses of doubled haploids in plant breeding. In: Induced variability in plant breeding. Venter for Agricultural Publishinh and Documentation. Wegenigen, The Netherlands, 52-58.

9-International Wheat Genetics Symposium 1993. Abstracts and programme,. Beihing. China