

کاربرد فناوری هسته‌ای در تولید بذر هیبرید

INC29-1062

مهدی محمدی*، لیلا باقری و محمدطاهر حلاجیان

پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، صندوق پستی ۳۱۴۸۵۴۹۸، کرج، ایران

چکیده:

امروزه، امنیت غذایی یک مسئله مهم در سراسر دنیا است و بذر یک ساختار مهم برای حفظ ظرفیت تولید در گیاهان است. صنعت بذر در جهان، با گردش مالی زیادی، رو به رشد است. صنعت تولید بذر محصولات سبزی، صیفی و زینتی به دلیل قابلیت کارآفرینی، اشتغال‌زایی و بهره‌وری اقتصادی زیاد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و کشت گیاهان سبزی، صیفی و زینتی یکی از مهم‌ترین منابع درآمد برای کشاورزان محسوب می‌شود. افزایش جمعیت، انگیزه بالایی برای کشت منابع مهم ویتامین‌ها، مواد معدنی و افزایش زیبایی ایجاد کرده است؛ بنابراین اتخاذ تدابیری برای تولید بذر باکیفیت و در دسترس قرار دادن آن برای کشاورزان، بسیار ضروری است. خوشبختانه این تکنیک در تولید بذر هیبرید در گیاهان خیار، گوجه‌فرنگی، فلفل‌دل‌مه و غیره نیز موفقیت‌آمیز بوده است. با استفاده از روش اصلاح معکوس و تولید گیاهان دابل‌هاپلوئید، امکان دسترسی به لاین‌های اینبرد والدینی وجود دارد. برای این منظور، گرده‌های پرتودیده با گاما برای تلقیح گیاهان مادری و تهیه گیاهان هاپلوئید به روش نجات جنین به کار می‌رود و سپس به‌وسیله تیمار با کلشی‌سین، گیاهان دابل‌هاپلوئید به‌دست می‌آیند.

کلیدواژه‌ها: امنیت غذایی، بذر هیبرید، بهره‌وری اقتصادی، اشعه گاما و اصلاح معکوس.

Application of nuclear technology in hybrid seed production

M. Mohammadi*, L. Bagherim M. Taher Hallajian

1, 2. Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), P.O.BOX: 31485498, Karaj, Iran

Abstract:

Today, food security is an important issue all over the world and seeds are an important structure to maintain the production capacity in plants. The seed industry in the world is growing with a large turnover. The seed production industry of vegetable, summer and ornamental crops is of special importance due to its entrepreneurship, employment generation and high economic productivity, and the cultivation of vegetable, summer and ornamental plants is considered one of the most important sources of income for farmers. The increase in population has created a high incentive to cultivate important sources of vitamins, minerals and increase beauty; therefore, it is very necessary to take measures to produce quality seeds and make them available to farmers. Fortunately, this technique has been successful in the production of hybrid seeds in cucumber, tomato and bell pepper plants, as well as in the first phase of the melon hybrid seed production project. By using the method of reverse breeding and production of double-haploid plants, it is possible to access parental inbred lines. For this purpose, gamma-irradiated pollens are used to inoculate mother plants and prepare haploid plants by the embryo rescue method, and then by treatment with colchicine, double-haploid plants are obtained.

Keywords: Food security, Hybrid Seed, Economic productivity, Gamma ray and Reverse breeding.

۱. مقدمه

امنیت غذایی یک مسئله هشداردهنده مهم در سراسر کره زمین بوده و با توسعه سریع شهرنشینی و جهانی شدن، روش غالب برای تأمین مواد غذایی، استفاده از فن‌آوری‌های نوین است که با حفظ کیفیت محصول، عملکرد دانه و سرعت جوانه‌زنی را بهبود می‌بخشد [۱-۳]. در حقیقت، بذر به‌عنوان ماده اصلی تولید در بخش کشاورزی محسوب می‌شود و به دنبال انجام چندین فرآیند پیچیده که وابسته به تولید گرده و کیسه جنینی (گامتوفیت ماده) هستند، تشکیل می‌شود [۲]. به‌طور کلی، میوه از رشد و نمو دیواره تخمدان و بذر از رشد و نمو تخمک حاصل می‌شود [۲]. در واقع، بذر در اثر گرده‌افشانی در سطح کلاله و سپس لقاح سلول‌های زایشی گرده با تخمزا و قطبی تشکیل می‌یابد [۲].

مشخص شده است که برای مقابله با تغییرات اقلیمی، گرم شدن کره زمین و چالش‌های زیست‌محیطی فرا روی، باید بذری اصلاح شود که تولید بالایی داشته و درعین حال در مقابل انواع تنش‌های ناشی از تغییرات اقلیمی مقاوم باشد [۵]. فائو اعلام کرده است که در ۴۰ سال آینده، تأمین امنیت غذایی در جهان تنها با اصلاح بذر و کارهای تحقیقاتی امکان‌پذیر خواهد بود و حتی مکانیزاسیون و روش‌های مدرن نیز برای امنیت غذایی کشورها کافی نخواهد بود [۲].

در ایران، به‌رغم تلاش‌های تحقیقاتی روزافزون در زمینه اصلاح بذور انواع گیاهان، هنوز هم در تأمین برخی بذورهای اساسی از جمله گیاهان زینتی، سبزی و صیفی‌جات وابسته هستیم. یکی از مهم‌ترین چالش‌های کشاورزی ایران، وابستگی شدید و تمام‌عیار کشور به واردات بذور هیبرید سبزی و صیفی می‌باشد. سالانه حدود چندین میلیون دلار بذر سبزی و صیفی وارد کشور می‌شود. ۹۸ درصد بذور مصرفی سبزی و صیفی کشور وارداتی است. علاوه بر ارزشی، هیبریدهای خارجی غیر گلخانه‌ای برای شرایط آب و هوایی کشور ما اصلاح نشده‌اند و معمولاً مصرف آب آن‌ها بالاست. با توجه به اهمیت و تجاری بودن بذور هیبرید، امکان دسترس به لاین‌های اینبرد والدینی بذور هیبرید از شرکت‌های خارجی تولیدکننده بذر، غیرممکن است. با توجه به اینکه بذور هیبرید این گیاه معمولاً از خارج وارد می‌شوند و هزینه تهیه آن‌ها بسیار بالاست؛ بنابراین در صورت ایجاد بذور هیبرید در کشور، از خروج ارز جلوگیری خواهد شد [۴].

روش‌های رایج هاپلوئیدی مانند کشت بساک، تخمک و تخمدان بارور نشده برای تولید هاپلوئیدی در گیاهان جالیزی گوناگون موفقیت‌چندانی ندارد و موفق‌ترین روش در این تیره، انگیزش جنین‌های بکرزا با استفاده از گرده‌های پرتودیده و سپس نجات جنین‌ها در محیط کشت اختصاصی می‌باشد [۹]. بررسی‌های مختلف نشان می‌دهد که روش گرده‌های پرتودیده (پرتو گاما، پرتو ایکس و فرابنفش) به‌عنوان روشی کارا در تولید گیاهان هاپلوئید معرفی شده است [۷-۱۰]. پرتو گاما به دلیل کاربرد آسان، قدرت نفوذ بالا، اثربخشی مطلوب و خطرهای کمتر، در برنامه‌های تولید گیاهان هاپلوئید به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. گرده پرتودیده می‌تواند روی کلاله جوانه بزند و لوله گرده در داخل خامه گل رشد کند، اما توانایی بارور کردن سلول تخمزا و هسته‌های قطبی داخل کیسه جنینی را ندارد. غیرفعال بودن ژنتیکی و قدرت جوانه‌زنی گرده‌های پرتودیده، می‌تواند باعث تحریک تقسیم یاخته‌ای در سلول تخمزا و بنابراین باعث انگیزش بکرزایی یا نمو میوه بکر بار شود. تولید جنین هاپلوئید و به‌دست آوردن گیاه به کمک روش گرده پرتودیده در گیاهان جالیزی از جمله خیار، خربزه، هندوانه و کدو بررسی شده و مشاهده شده که موفقیت این روش به عامل‌های زیادی بستگی دارد. گزینش شدت مناسب پرتو، شرایط رشد گیاهان مادری، بهینه‌سازی روش گرده‌افشانی، زمان برداشت میوه، روش جداسازی جنین، مرحله نمو جنین، محیط کشت و شرایط کاشت مناسب از جمله مهم‌ترین عوامل در موفقیت روش گرده پرتودیده و تولید گیاه هاپلوئید نجات‌یافته هستند. فناوری هاپلوئید مضاعف (DH) در اصلاح نباتات بسیار سودمند است. این تکنیک برای کاهش زمان به دست آوردن لاین خالص مفید است و به راندمان انتخاب کمک می‌کند. با استفاده از این تکنیک می‌توان هموزیگوسیتی ۱۰۰٪ را در یک نسل به دست آورد، درحالی‌که ایجاد لاین پایدار با استفاده از روش سنتی خودگرده‌افشانی بین ۶ تا ۸ سال طول می‌کشد [۸ و ۹].

طبق آمار منتشره در سایت فائو طی دوره مورد مطالعه ۲۰۲۰، بزرگ‌ترین تولیدکنندگان خربزه و طالبی به ترتیب کشورهای چین، ترکیه، ایران، آمریکا، اسپانیا، هند، مصر، مراکش، ایتالیا و مکزیک بوده که به ترتیب رتبه‌های اول تا

دهم را به خود اختصاص می‌دهند. در سال ۲۰۲۰، با تولید ۱/۷ میلیون تن و با عملکرد ۲۰/۱ تن در هکتار و سطح زیر کشت ۸۵۰۰۰ هزار هکتار، ایران مقام سوم تولید جهانی را در اختیار داشته است. سطح زیر کشت و تولید جهانی انواع خربزه و طالبی در طی سال‌های ۲۰۰۱ الی ۲۰۲۰ در حال افزایش بوده و سطح زیر کشت از یک میلیون هکتار به بیش از ۱/۲ میلیون هکتار و تولید آن‌ها از ۲۴ به ۳۱ میلیون تن رسیده است؛ بنابراین، کشت این محصولات می‌توانند نقش مهمی در توسعه غیرنفتی داشته باشند. یکی از مهم‌ترین چالش‌های کشاورزی ایران، وابستگی شدید و تمام‌عیار کشور به واردات بذور هیبرید سبزی و صیفی باشد. سالانه حدود ۱۲۰ میلیون دلار بذور سبزی و صیفی وارد کشور می‌شود. ۹۸ درصد بذور مصرفی سبزی و صیفی کشور وارداتی است. علاوه بر ارزبری، هیبریدهای خارجی غیر گلخانه‌ای برای شرایط آب و هوایی کشور ما اصلاح نشده‌اند و معمولاً مصرف آب آن‌ها بالاست. با توجه به اهمیت و تجاری بودن بذور هیبرید، امکان دسترسی به لاین‌های اینبرد والدینی بذور هیبرید از شرکت‌های خارجی تولیدکننده بذور غیرممکن است. با توجه به اینکه بذور هیبرید این گیاه معمولاً از خارج وارد می‌شوند و هزینه تهیه آن‌ها بسیار بالاست [۴-۱].

بذور هیبرید را باید هر ساله خریداری کرد چراکه با توجه به خصوصیات ژنتیکی آن‌ها برخلاف بذور غلات، گرفتن نسل دوم از این بذرها جهت کاشت در مزرعه یا گلخانه با کاهش شدید عملکرد مواجه خواهد شد و این فرآیند برای نسل‌های بعدی نیز به تناوب اتفاق خواهد افتاد [۴-۱]. طبق آمار رسمی سازمان خواروبار جهانی، ایران از نظر تولید بسیاری از محصولات سبزی و صیفی دارای رتبه‌های برتر در جهان است. به‌عنوان مثال در تولید خیار و هندوانه رتبه دوم، در خربزه رتبه سوم، در بادمجان و پیاز رتبه پنجم، در گوجه‌فرنگی رتبه ششم و در کاهو و کلم رتبه هفتم را دارد (FAO, 2020) [۴]. بر اساس آخرین آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی در سال زراعی ۱۳۹۷-۱۳۹۶، سطح زیر کشت محصولات زراعی حدود ۱۱ میلیون هکتار بوده که تنها ۷٫۳ درصد از آن مربوط به محصولات جالیزی و سبزیجات بوده است. در حالی که در سال زراعی مذکور از ۸۱/۲ میلیون تن تولید از انواع محصولات زراعی، ۳۱٫۶ درصد متعلق به گروه محصولات جالیزی و سبزیجات بوده که نشان‌دهنده سهم بالای محصولات جالیزی و سبزیجات در امنیت غذایی کشور است. به‌استثنای سیب‌زمینی که تکثیر آن از طریق غده انجام می‌شود و کشور در زمینه این محصول مشکلی ندارد، سایر محصولات نامبرده، وابسته به بذور اصلاح‌شده وارداتی هستند [۴].

جدول ۱. سطح زیر کشت، تولید و رتبه ایران در برخی محصولات سبزی و صیفی (FAO, 2020) [۴].

محصول	سطح زیر کشت (هکتار)	تولید (تن)	رتبه تولید در جهان
خیار	۷۹۶۴۹	۲۲۸۳۷۵۰	۲
هندوانه	۱۳۶۸۷۶	۴۱۱۳۷۱۱	۲
خربزه	۸۵۰۰۰	۱۷۳۱۴۴۳	۳
بادمجان	۲۱۴۹۲	۶۶۶۸۳۸	۵
پیاز	۶۱۱۵۲	۲۴۰۶۷۱۸	۵
گوجه‌فرنگی	۱۵۸۹۹۱	۶۵۷۷۱۰۹	۶
کلم و کاهو	۱۷۰۴۵	۵۲۵۴۴۸۳	۷

در تولید گیاهان هاپلوئید در کدو، گل‌های ماده توسط بساک‌های پرتوتایی شده با دزهای مختلف (۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ گری) اشعه گاما گرده‌افشانی شدند. جنین‌های القاء شده سه تا پنج هفته پس از گرده‌افشانی، نجات داده شده و در محیط اختصاصی E20 کشت شدند. بیشترین تعداد جنین از دزهای ۵۰ و ۷۵ گری اشعه گاما به‌دست آمد. همچنین تحقیقی در اسپانیا بر روی هفت ژنوتیپ از خربزه رقم Piel de Sapo صورت گرفت، به کمک گرده‌های پرتودیده با 137Cs و روش نجات جنین، گیاهان هاپلوئید به‌دست آمده و در ادامه گیاهان دابل‌هاپلوئید شدند [11].

گیاهان هاپلوئید گیاهانی هستند که تعداد کروموزوم‌های اصلی آن‌ها به نصف کاهش یافته است. گیاهان هاپلوئید گیاهانی مستقل بوده و آلل‌های نهفته به دلیل عدم وجود آلل غالب بروز خواهند کرد. هاپلوئیدی فرآیندی است که از نظر طبیعی مشابه پارتنوژنز (حالتی است که در آن تخمک بارور نشده تبدیل به جنین می‌شود) بوده و ممکن است از طریق سه روش حذف کروموزوم (با استفاده از مواد شیمیایی مانند فنیل آلانین، مالیک هیدرازید، نیتروزاکسید یا پرتوتابی با استفاده از اشعه X و نور ماوراءبنفش)، نجات جنین و کشت میکروسپور حاصل شود. برای اولین بار هاپلوئیدی به صورت یک اتفاق طبیعی و خودبه‌خودی در تاتوره گزارش شد. در حال حاضر گرایش فزاینده‌ای برای تولید انبوه گیاهان هاپلوئید در غلات و سایر گیاهان زراعی و باغی وجود دارد [۱۲]. فناوری هاپلوئید مضاعف (DH) در اصلاح نباتات بسیار سودمند است. این تکنیک برای کاهش زمان لازم برای به‌دست آوردن خطوط خالص مفید است و به راندمان انتخاب کمک می‌کند. با استفاده از این تکنیک می‌توان هموزیگوسیتی ۱۰۰٪ را در یک نسل به دست آورد، در حالی که توسعه خطوط پایدار با استفاده از روش سنتی خودگردانه‌اشانی بین ۶ تا ۸ سال طول می‌کشد. این مدت طولانی است که در محصولات مختلف از جمله کدو استفاده می‌شود. DH ها را می‌توان از طریق پارتنوژنز (گرده‌افشانی عمدتاً با گرده‌های پرتودهی شده)، ژنوژنز (کشت آزمایشگاهی تخمک‌ها و تخمدان‌ها) و آندروژنز (کشت آزمایشگاهی میکروسپورها و بساک‌ها) به دست آورد [۱۲].

با توجه به جزئی‌نگری مدیریتی در ساختار کشاورزی ایران و با داشتن دلایلی همچون پیچیدگی دانش، زمان‌بر بودن، پرهزینه بودن و دیربازده بودن تحقیقات و فعالیت در زمینه سبزی و صیفی، عملاً در کشور فعالیت چندانی در زمینه اصلاح و تولید بذر انجام نشده است. بدیهی است که این هزینه تحقیقات در مقابل بازگشت سرمایه آن بسیار ناچیز است. به طور مثال با هزینه چند ده میلیارد تومانی در بخش تحقیقات در طی ۱۰ سال می‌توان بازار بذر گوجه‌فرنگی کشور با گردش مالی حدود دو هزار میلیارد تومان را با بذور داخلی تأمین کرد. از طرفی وجود مشوق وارداتی (ارز دولتی) برای واردات بذر و در مقابل نبود مشوق‌های کافی برای سرمایه‌گذاری و تولید در این حوزه و همچنین سختی کار و طولانی بودن مسیر اصلاح گیاهان، باعث شده است شرکت‌های خصوصی و بسیاری از دستگاه‌ها و مدیران متولی تمایلی به سرمایه‌گذاری در این موضوع نداشته باشند [۱-۱۰].

۵. نتیجه‌گیری

اشعه گاما جزو پرتوهای یونیزه‌کننده است که منجر به ایجاد شکست و تغییرات مستقیم در رشته DNA و یا تغییرات غیرمستقیم از طریق تولید رادیکال‌های آزاد در سلول می‌شود. بسته به سطح تابش، رادیکال‌های آزاد می‌توانند منجر به تغییرات مورفولوژیک، آناتومیک، بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و یا صدمه به اجزای مهم سلول شود [۸-۱۰]. برای تأمین امنیت غذایی کشور، توسعه صنعت بذر به عنوان یکی از مهم‌ترین نهاده‌ها و ساختاری تعیین‌کننده در توسعه، اشتغال، تقویت، تحکیم و افزایش تولید محصولات اساسی و از طرفی دستیابی به خوداتکایی محصولات زراعی و باغی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تولید بذر سبزی و صیفی و کاهش وابستگی کشور به واردات آن می‌تواند از اقدامات اساسی پدافند غیرعامل در بخش کشاورزی باشد و نقش اساسی در امنیت غذایی، پیشگیری و کاهش آسیب‌پذیری و ارتقای پایداری در برابر تهدیدات خارجی داشته باشد. گیاهان سبزی و صیفی و تا حدی زینتی، یکی از مهم‌ترین منابع درآمد برای کشاورزان خرد و کلان است که به دلیل قابلیت اشتغال‌زایی و بهره‌وری اقتصادی زیاد، باید مورد توجه قرار گیرند. نگاه بسیاری از دستگاه‌ها و مدیران متولی به سرمایه‌گذاری در بحث تحقیقات اصلاح گیاهان سبزی و صیفی و زینتی باید مورد بازنگری قرار گرفته و به صورت بلندمدت باشد تا کشور بتواند علاوه بر تأمین نیازهای خود، به دنبال سهمی از گردش مالی جهانی در صنعت تولید بذر سبزی و صیفی و زینتی‌ها باشد؛ بنابراین تولید بذر باکیفیت نه تنها به افزایش تولید در داخل کشور کمک می‌کند، بلکه می‌تواند منبع بزرگی از تبادلات خارجی را از طریق صادرات بذر به کشورهای

دیگر فراهم سازد [۱-۵ و ۹]. با استفاده از روش اصلاح معکوس (شکل ۱) و تولید گیاهان دابل‌هاپلوئید، امکان دسترسی به لاین‌های اینبرد والدینی وجود دارد [۱۰-۱]. برای این منظور، معمولاً از کشت میکروسپور، دانه گرده و یا نجات جنین، برای تولید گیاهان هاپلوئید استفاده شده و سپس به وسیله تیمار با کلشی‌سین، گیاهان دابل‌هاپلوئید به دست می‌آیند [۱-۵ و ۹]. یک روش مهم، استفاده از گرده‌های پرتودیده با گاما و استفاده از آن‌ها برای تلقیح گیاهان مادری و تهیه گیاهان هاپلوئید به روش نجات جنین می‌باشد [۲ و ۹]. در واقع، به منظور دستیابی به لاین‌های خالص دابل‌هاپلوئید (با استفاده از گرده‌های پرتودیده به عنوان روشی سریع و کارآمد (پارتنوژنز) خواهد بود. ابتدا تولید لاین‌های هاپلوئید و سپس لاین‌های دابل‌هاپلوئید است. تأییدیه دابل‌هاپلوئیدهای حاصل به کمک آنالیزهای سیتوژنتیکی و ترسیم کاریوتایپ و همچنین فلوسایتومتری و مولکولی، صورت می‌گیرد.



شکل ۱. روند تولید لاین‌های والدینی بذر هیبرید از طریق سیستم هاپلوئیدی و اصلاح معکوس (منبع: دستاوردهای پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی).

۶. تشکر و قدردانی

از تمامی همکارانی که بنده را در این پروژه یاری کرده و در ادامه نیز مساعدت خواهند نمود، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

۶. مراجع

- ۱- فارسی، محمد و ذوالعلی، جعفر. ۱۳۸۵. اصول بیوتکنولوژی گیاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
- ۲- محمدی، م. علی‌اصغرپور، م. دادپور، م.ر. و همکاران. ۱۳۸۸. مقایسه نمو بذر استنوسپرمیک با بذر حقیقی در انگور. پایان‌نامه ارشد. دانشگاه تبریز.
- ۳- قنادها، محمد رضا؛ زهراوی، مهدی و وحدتی، کوروش. ۱۳۸۳. اصلاح گیاهان باغبانی. موسسه فرهنگی دیباگران تهران.
- ۴- معاونت پژوهش‌های زیربنایی و امور تولیدی، ۱۳۹۹، وضعیت تولید بذر هیبرید در کشور: با تأکید بر بذر سبزی و صیفی
- [5] IAEA, 2019. Climate Change and Nuclear Power, International Atomic Energy Agency, Vienna International Centre,, p. 114.
- [6] M. Rahmanian, 2015. Water Crisis, East Special Issue , p. 500 pages, (In Persian).

- [7] Sadat Hosseini, M., K. Vahdati, M. Lotfi, D. Hassani, and N. Pirvali Biranvand. 2011. Production of haploids in Persian walnut through parthenogenesis induced by gammairradiated pollen. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 136: 198–204.
- [8] Batigina, T.B. 2006. Embryology of flowering plants: Terminology and concepts. Science Publishers. Volume 2: seed, 786 pages.
- [9] M Lotfi 1, A R Alan, M J Henning, M M Jahn, E D Earle. (2003). Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Rep Jul;21(11):1121-8.* doi: 10.1007/s00299-003-0636-3. Epub 2003 Apr 29.
- [10] T.A. Brown. 2010. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- [11] Hooghvorst, L., Torrico, O., Hooghvorst, S., & Nogués, S. 2020. In situ Parthenogenetic Doubled Haploid Production in Melon “Piel de Sapo” for Breeding Purposes. *Frontiers in plant science*, 11, 378
- [12] Nebahat Sari, Ilknur Solmaz. 2021. Doubled Haploid Production in Watermelon. DOI: 10.1007/978-1-0716-1331-3_6. *Methods Mol Biol.*:2289:97-110