Sohag University
Faculty of Agriculture
Department of Genetics

جامعة سوهـــــاج
كليــة الزراعـــــــــة
قسم الوراثـــــــة

المحاضرة السابعة

زراعة الانسجة والتكنولوجيا الحيوية

المستوي الثالث برنامج التكنولوجيا الحيوية

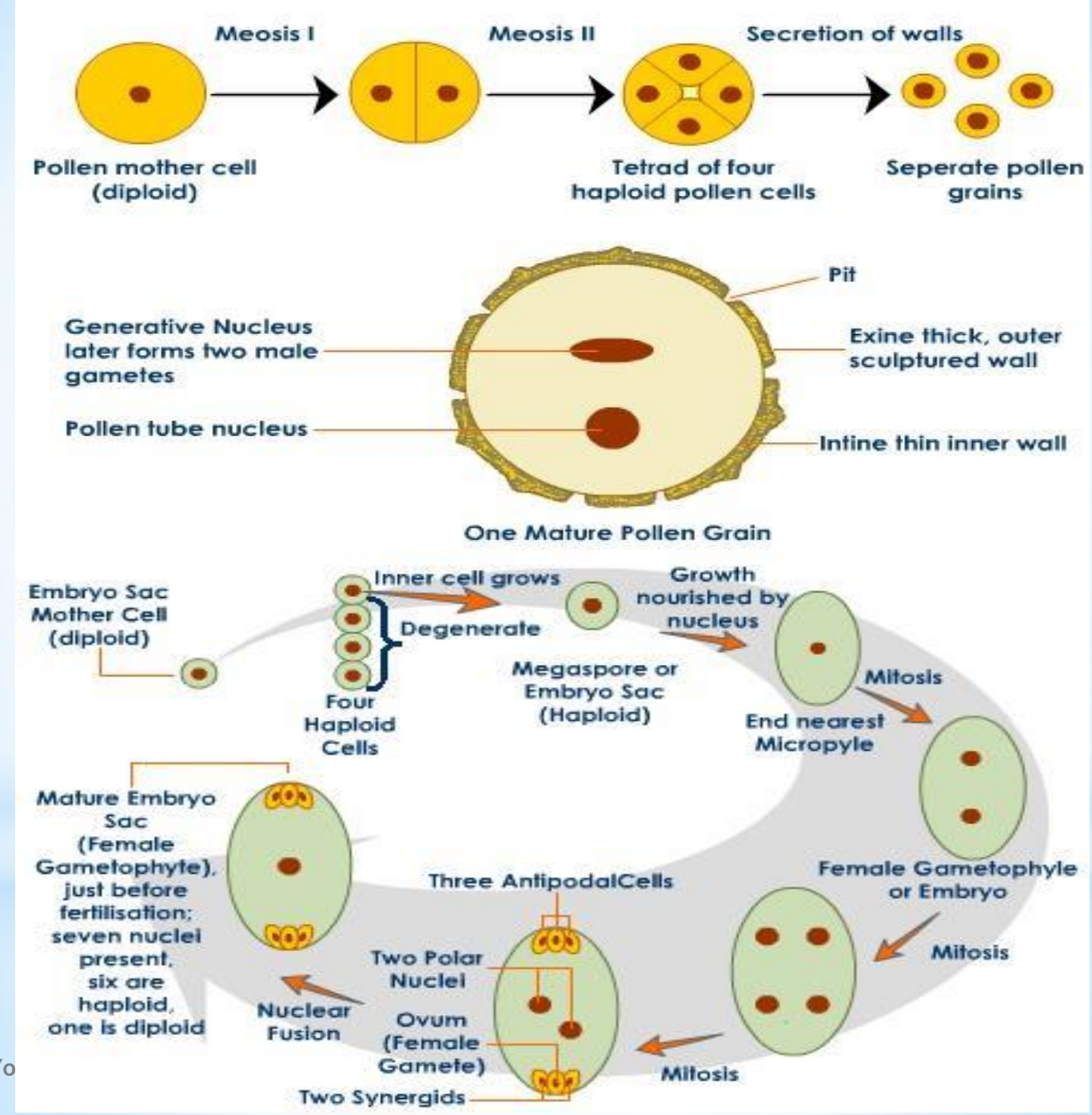
اعداد

د. احمد يوسف محمد

قسم الوراثة – كلية الزراعة – جامعة سوهاج

انتاج النباتات الأحادية Haploid plants production

في البداية يجب أن نميز بين مصطلح Haploid الذي يعبر عن أي كائن حي يحمل في خلاياه العدد الجاميطي (١ ن) بدلا من العدد الزيجوتي (٢ن). ومصطلح Monoploid الذي يعني أن الكائن يحمل في خلاياه نسخة واحدة من كل زوج من أزواج المجموعة الكروموسومية (أي جينوم واحد في كل خلية). والتفرقة بين هذين الإصطلاحين هامة لأن العدد الجاميطي لكروموسومات النبات المتضاعف قد يكون Haploid بالنسبة لعدد كروموسومات الكائن (Ha= النصف) وليس Monoploid بالنسبة لعدد الجينومات (Mono = ١) لأنه قد يحمل في خلاياه الجسمية جينومين أو أكثر، مثل قمح الخبز وبعض أنواع الموز.


Meosis I
Meosis II
Secretion of walls
Pollen mother cell (diploid)
Tetrad of four haploid pollen cells
Seperate pollen grains
Pit
Generative Nucleus later forms two male gametes
Exine thick, outer sculptured wall
Pollen tube nucleus
Intine thin inner wall
One Mature Pollen Grain
Embryo Sac Mother Cell (diploid)
Inner cell grows
Degenerate
Four Haploid Cells
Megaspore or Embryo Sac (Haploid)
Growth nourished by nucleus
Mitosis
End nearest Micropyle
Female Gametophyle or Embryo
Mitosis
Mitosis
Three AntipodalCells
Two Polar Nuclei
Ovum (Female Gamete)
Two Synergids
Nuclear Fusion
Mature Embryo Sac (Female Gametophyte), just before fertilisation; seven nuclei present, six are haploid, one is diploid

تعتبر تقنية إنتاج النباتات الأحادية Haploid plants عن طريق زراعة الأنسجة هي إحدي المميزات التي قدمتها التقنية الحيوية لتربية النبات في السنوات القليلة الماضية. والتي تستخدم في إنتاج السلالات النقية Homozygous lines في برامج التربية. ففي برامج التربية التقليدية، يمكن انتاج توليفات جينية جديدة عن طريق التلقيح بين الأنواع النباتية بعيدة القرابة.

وبالرغم من ذلك، فإن النسل الهجين الناتج عادة ما يكون قليل العدد ومن المحتمل أن يكون غير ثابت وراثياً. والأمر الأكثر أهمية في هذا الموضوع، أن هذه الهجن الناتجة تحتاج إلي سنوات عديدة (تتراوح ما بين ٦ إلي ١٠ سنوات) من التهجين أو التلقيح الذاتي المستمر للحصول علي الأصالة الوراثية Homozygosity التي تتضمن ثبات الصفات المرغوبة وإقصاء الصفات غير المرغوب فيها.

تحتوي النباتات الأحادية علي مجموعة بسيطة أو جاميطة (١ن) من الكروموسومات والتي قد تكون عقيمة. وعلي الرغم من ذلك فإن النباتات الأحادية يمكنها مضاعفة العدد الكروموسومي الخاص بها ذاتياً أو بإستخدام بعض المواد الكيميائية (مثل الكوليشيسين ، الذي يتسبب في عدم تكوين خيوط المغزل مما ينتج عنه مضاعفة الكروموسومات دون حدوث أنقسام خلوي) وبذلك يتم انتاج نباتات خصبة تحتوي علي ضعف العدد الكروموسومي (Dihaploid). ويلاحظ أن الميزة في ذلك هو انتاج نباتات ثنائية أصيلة وراثياً لكل الجينات، مما يجعلها أكثر صلاحية لعملية الإنتخاب الفعال للصفات المرغوب فيها في برنامج التربية.

من الممكن أن يحدث تكوين للنباتات الأحادية طبيعياً بعدة طرق مثل :

١. من الخلايا الأحادية المؤنثة (البويضات) Gynogenesis :

حيث تنمو البويضات غير المخصبة نتيجة تأخر التلقيح أو لعقم حبة اللقاح وهذه الحالة منتشرة في نباتات البطاطس وبعض النباتات الآخري مثل الهجن النوعية.

٢. من الخلايا الأحادية المذكرة Androgenesis:

وفيها يحدث الأخصاب بين حبة اللقاح والبويضة ولكن يحدث بعدها استبعاد لنواة البويضة وبالتالي ينشأ الجنين من حبة لقاح فقط كما يحدث في الهجن النوعية.

٣. استبعاد الجينوم Genome elimination :

تحدث عند التهجين النوعي (بين أنواع نباتية مختلفة) حيث يتم استبعاد لأحد النواتين المشتركتين في عملية الإخصاب (النواة المذكرة أو المؤنثة) ويتكون جنين أحادي يحتوي علي كروموسومات نوع واحد فقط . ولوحظ ذلك عند تهجين الشعير مع الأنواع الآخري.

٤. التوالد البكري الناقص Semigamy:

تنفصل نواة البويضة عن نواة حبة اللقاح بعد الإخصاب كلاً في خلية مستقلة، وينشأ جنين أحادي التركيب نصف خلاياه ناتج من الخلية المذكرة (حبة اللقاح) والنصف الآخر ناتج من الخلية المؤنثة (البويضة).

٥. المعاملة الكيميائية Chemical treatment:

إذا تمت معاملة البويضات أو حبوب اللقاح ببعض المواد الكيميائية التي تعمل علي تنشيط النمو دون أخصاب مثل أكسيد النيتروز والـ Malic hydrazine و Toluene blue ، يحدث نمو للخلايا الأحادية لتكوين جنين دون أن يحدث إخصاب.

٦. الصدمة الحرارية Temperature shock:

يحدث زيادة في نسبة تكوين النباتات الأحادية في الطبيعة عند تعرض النباتات لدرجات حرارة عالية أو منخفضة أثناء عملية التلقيح والإخصاب.

٧. التعرض للإشعاع Irradiation:

عند تعرض حبوب اللقاح أو البويضات لأشعة X أو UV قد يؤدي إلي عقمها وبالتالي عند إشتراك هذه الجاميطات العقيمة في الإخصاب لا تنمو أنويتها وينشأ عن ذلك تكوين نباتات أحادية ، غالباً ما تتلاشي أو تتحلل داخل الخلية.

طرق إنتاج النباتات الأحادية بزراعة الأنسجة

بالرغم من أنه تم ملاحظة تكوين النباتات الأحادية طبيعياً من الأنسجة المذكرة في بعض محاصيل الحبوب منذ الثلاثينيات إلا أنه لم يتم تطوير بروتوكول خاص بزراعة الأنسجة للحصول بواسطته علي النباتات الأحادية في العديد من المحاصيل الزراعية الهامة، وبالرغم من ذلك فهناك مجموعة من النباتات منخفضة الإستجابة لهذه التقنية.

ويمكن الحصول علي نباتات أحادية في المعمل بأحد الطرق التالية:

١. زراعة المتوك: تعتبر الأكثر شيوعاً حيث يتم زراعتها علي بيئة صلبة أو سائلة ويعمل جدار المتك علي تخفيف تعرض حبوب اللقاح للبيئة مما يشجع نموها وتكوين كالس أو أجنة.

٢. زراعة البراعم الزهرية: يتم زراعة البرعم الزهري بالكامل وغالباً ما تستخدم في النباتات ذات الأزهار الصغيرة جداً.

٣. زراعة حبوب اللقاح: أقل أستخداماً، حيث تستخرج حبوب اللقاح من المتك وتزرع مباشرة.

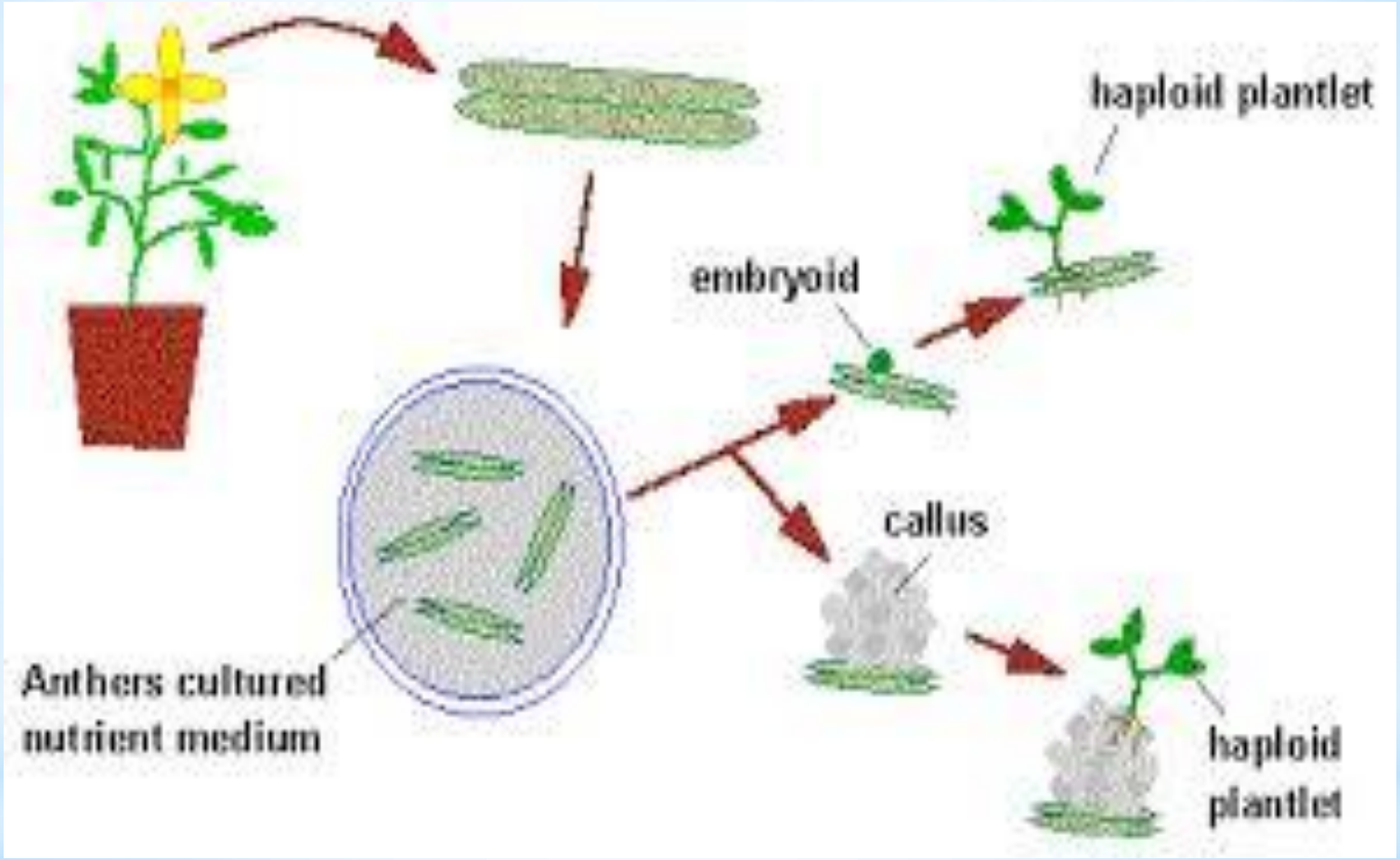
٤. زراعة الأجنة: تستخدم في حالة التهجين بين الأنواع، حيث يعقبها إزالة كروموسومية كاملة لأحد أنوية الأنواع المستخدمة.

٥. الاخصاب الكاذب: حيث يتم الإخصاب في أنابيب الزراعة بالمعمل ويتم الإخصاب بحبوب لقاح تم معاملتها بالإشعاع، حيث تفقد قدرتها علي الإخصاب وتعمل علي تنشيط نمو البويضات.

٦. تنمية البويضات غير المخصبة: يتم عن طريق زراعة المبيض المحتوي علي بويضات غير مخصبة وبالتالي نحصل علي نباتات أحادية محتوية علي كروموسومات الأم فقط.

أولاً: زراعة المتك Anther culture :

تقوم هذه التقنية علي زراعة المتوك المجمعة من أزهار النباتات في وقت معين من مراحل تطور حبوب اللقاح، وأحياناً ما يتم معاملة المتوك سواء بالحرارة أو البرودة قبل التعقيم والزراعة علي بيئة خاصة. تتكون حبوب اللقاح الناضجة من خلايا غير ناضجة أحادية التركيب الوراثي تعرف بالـ Microspore والتي بدورها تتكون نتيجة الإنقسام الميوزي في خلايا معينة في نسيج المتك تعرف بأمهات حبوب اللقاح Mother pollen cells . وتحتوي الـ Microspore علي نواة مفردة بينما تحتوي حبة اللقاح الناضجة علي ثلاثة أنوية. ويتم إختيار حبوب اللقاح غير الناضجة التي تحتوي علي نواة واحدة في مرحلة وسطية أو متأخرة من تطورها، ليتم زراعتها علي بيئة غذائية صلبة لينتج عنها تكون كالس. ويمكن أن تتكشف النباتات الأحادية من هذا الكالس إما مباشرة عن طريق تكون الأجنة الخضرية Somatic embryogenesis أو بطريق غير مباشر عن طريق تكون الأعضاء النباتية Organogenesis . كما يمكن أن تعطي خلايا الـ Microspores ما يعرف بالـ Embryoids وهي تجمعات خلوية لها تركيب يشبه الأجنة وتتكشف فيما بعد إلي أجنة. ويوضح الشكل التالي عملية إنتاج النباتات الأحادية من زراعة المتوك:


haploid plantlet
embryoid
callus
Anthers cultured
nutrient medium
haploid
plantlet

ثانياً: زراعة حبوب اللقاح غير الناضجة (الميكروسبور Microspore):

تتضمن خطوات زراعة الميكروسبور في البداية عزله من المتوك خلال مرحلة فسيولوجية معينة، يكون فيها الميكروسبور ذو نواة واحدة Uni-Vaculate microspore . وبعد معاملة المتوك بالحرارة أو البرودة يتم هرسها جيداً وجعلها متجانسة ، ثم يتم عزل وتنقية الميكروسبور من خلال الترشيح والطرد المركزي. يلي ذلك زراعة الميكروسبور المعزول في بيئة غذائية سائلة. وتتكشف الأجنة الصغيرة مباشرة من الميكروسبور فيما يعرف بـ Microspore Embryogenesis حيث يمكن تمييز الميكروسبور الجنيني بالحجم ويبلغ ضعف حجم الميكروسور الغير جنيني. ويتم نقل هذه الأجنة إلي بيئات التكشف للحصول علي نباتات كاملة، حيث يمكن حدوث تضاعف لأعداد الكروموسومات ذاتياً أو أستخدام بعض المواد الخاصة مثل الكولشيسين.

يمكن تلخيص الخطوات العامة في ثلاث نقاط أساسية كما هو الحال في البروتوكول المستخدم مع الشعير لإنتاج أجنة خضرية من زراعة الميكروسبور (حبة اللقاح غير الناضجة):

١. المعاملة المبدئية Pretreatment :

وهي عبارة عن تعريض المتوك في مرحلة تطورية (نمو) مناسبة لمعاملة مبدئية لمدة أربعة أيام. والهدف من هذه المعاملة المبدئية هو حث الميكروسبور علي التحول من الحالة الجاميطية Gametophyte إلي الحالة الجرثومية Sporophyte ويمكن أن تكون المعاملة حرارية (صدمة حرارية أو برودة) أو ضغط أسموزي. ويتم تطبيق هذه المعاملة علي الأزهار الكاملة (السنبلة في حالة الشعير والقمح) أو علي المتوك المعزولة أو حتي الميكروسبور المفردة. ويمكن أستخدام حامض الأبسيسيك في إعادة برمجة تكشف الميكروسبور.

٢. زراعة الميكروسبور:

يتم إخراج الميكروسبور من المتوك التي سبق معاملتها وزراعتها علي البيئة الغذائية المناسبة. ويمكن ملاحظة بداية الإنقسام الخلوي بعد الزراعة بأربعة أيام، وتتكون التكوينات عديدة الخلايا بعد ١٤ يوم من الزراعة تقريباً.

٣. تطور الأجنة:

تتكشف التكوينات عديدة الخلايا إلي أجنة ونموات ثانوية حتي تصل لمرحلة النبات الكامل، ويحتاج هذا عادة إلي ٢١ يوم إضافي. والجدير بالذكر أن هذا البروتوكول يختلف من نبات لآخر.

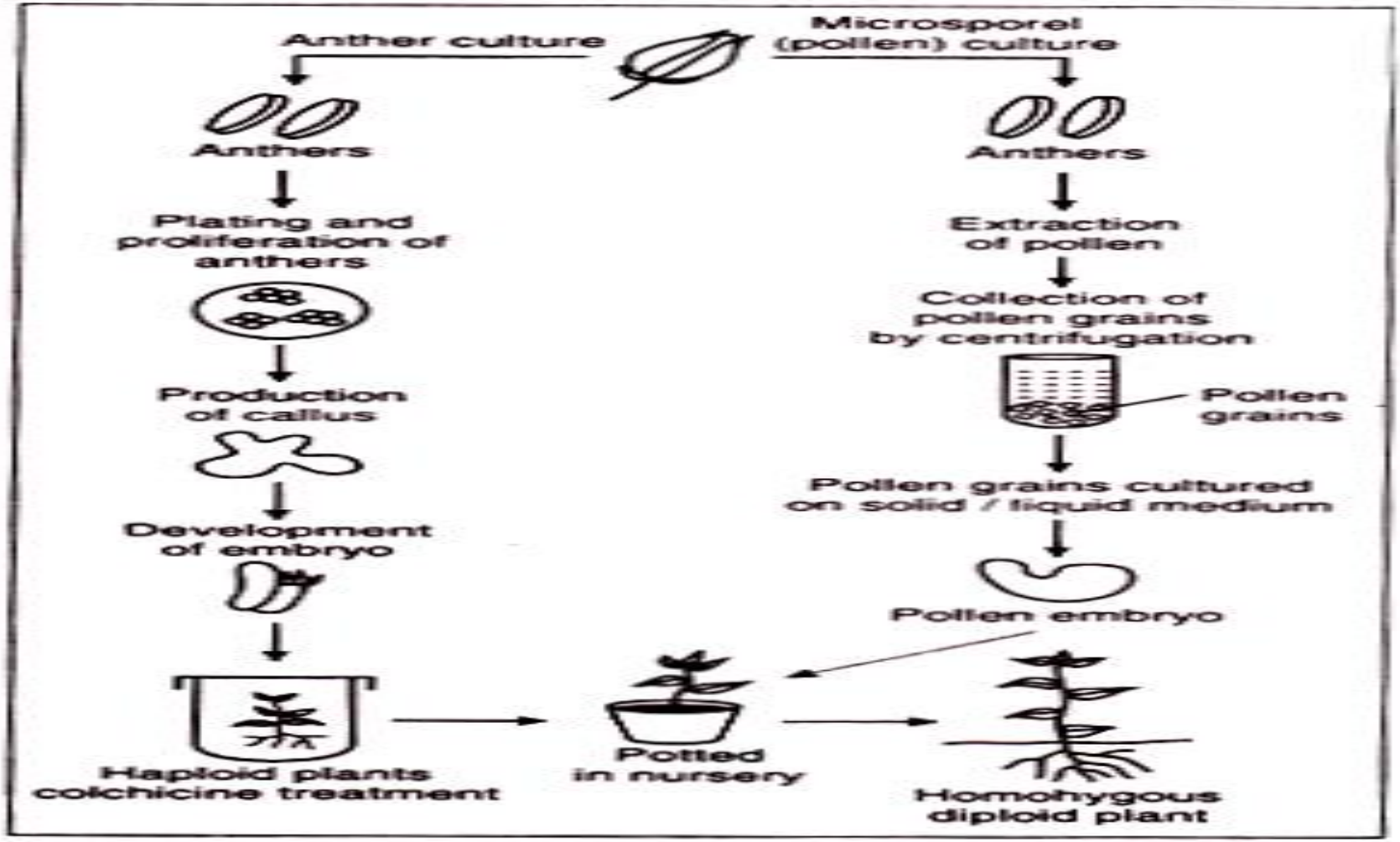


Fig. 10.14: Anther and microspore culture for the generation of haploid plants

انتاج النباتات الأحادية عن طريق زراعة الميكروسبور

العوامل المؤثرة علي نجاح زراعة المتوك والميكروسبور:

١. الحالة الفسيولوجية للنبات المأخوذ منه المتوك.

٢. نوع النبات المستخدم في زراعة المتوك.

٣. عمر النبات المستخدم وعمر البرعم الزهري.

٤. نوع البيئة الغذائية ومحتواها.

أهمية الحصول علي نباتات أحادية:

١. إمكانية الحصول علي نباتات أصيلة وراثياً Homozygous من إجراء التضاعف للنباتات الأحادية، حيث تعتبر أسرع طريقة للحصول علي السلالات النقية من النباتات مفتوحة التلقيح مثل الذرة أو النباتات ثنائية المسكن.

٢. إمكانية إنتاج الهجن بطريقة سريعة وغير مكلفة عن طريق التهجين بين السلالة النقية الناتجة من مزارع المتوك.

٣. في حالة النباتات رباعية المجموعة الكروموسومية مثل البطاطس (4n= 4x) يمكن الحصول علي نباتات ثنائية (2X) أو أحادية (1X) ويمكن أن يجري لها تضاعف ونحصل علي نباتات أصيلة (2n = 2x) يسهل استخدامها في الدراسات الوراثية وبرامج التربية المختلفة.

٤. تتميز النباتات الناتجة بسهولة تمييز الطفرات المتنحية التي تحدث بها (a A) وكذلك سهولة الحصول علي هذه الطفرات بصورة أصيلة عند التضاعف (aa).

٥. يمكن استخدامها في إجراء انتخاب لصفة معينة مثل تحمل الإجهادات البيئية (ملوحة أو جفاف مثلاً) حيث تجري علي حبوب اللقاح التي ينتجها النبات الواحد بإعداد كبيرة جداً (تصل للملايين) كلها مختلفة وراثياً عن بعضها تماماً (في حالة الهجن) وبالتالي يكون الإنتخاب أكثر فاعلية.

٦. يمكن الحصول علي نباتات متضاعفة (2n) من الأب المذكر فقط والتي يكون لها في بعض النباتات أهمية مثل الحال في نبات الأسبرجس، حيث وجد أن النباتات الناتجة من الأب المذكر تتميز بالإنتاجية العالية والتبكير في المحصول عن تلك الناتجة من الأب المؤنث.

٧. تستخدم لإنتاج الهجن الخضرية الثنائية عن طريق إتحاد البروتوبلاست الناتج من الخلايا الاحادية (1n)، ليعطي نباتات ثنائية التركيب بدلا من رباعية التراكيب الوراثية في حالة اتحاد بروتوبلاست الخلايا الجسمية.

٨. التغلب علي عدم التوافق الذاتي ، حيث يمكن انتاج نباتات متماثلة التركيب.

التهجين بين الأجناس وإنقاذ الأجنة:

تستخدم هذه الطريقة كبديل لإنتاج النباتات الأحادية، وفيها يتم التهجين بين أجناس نباتية مختلفة يليه عملية إنقاذ للجنين المتكون. ويتسبب البعد الوراثي بين الأجناس في فشل تكون البذرة ، ولكن يمكن لهذا التهجين أن يكون أجنة أحادية لأحد الجنسين، حيث يمكن بعد ذلك بإستخدام وسائل زراعة الأنسجة إنقاذ هذه الأجنة من البذور غير الناضجة وإعادة زراعتها للحصول علي نباتات أحادية. وأساس هذه العملية يبني علي الإخصاب الذي ينتج زيجوت ثنائي يليه استبعاد تلقائي لأحد المجموعات الكروموسومية الخاصة بالجنس الآخر. ولضمان نجاح هذا التكنيك يتم استخلاص الجنين من البذرة وإعادة زراعته مرة أخري علي بيئة غذائية جديدة. وقد تم تطبيق هذا التكنيك بنجاح في محاصيل الحبوب فعلي سبيل المثال يمكن التهجين بين القمح والشعير أو التهجين بين القمح والذرة الشامية.