فناوری بذر مصنوعی

هلال نعمت فرح‌زادی
دکترای زیست شناسی سلولی تکوینی علوم گیاهی

کلیدواژه‌ها:
بذر مصنوعی، ریز نمونه، ژرم پلاسم، ریزازدیادی

چکیده

پیشرفت در تحقیقات زیست‌فناوری طی دو دهۀ گذشته، زمینۀ پیشرفت بهتری را برای محصولات زراعی، درختان جنگلی و سایر گونه‌های مهم گیاهی فراهم کرده است. ازدیاد گیاهان با استفاده از بذر مصنوعی، پیشرفت‌های جدیدی را در زمینۀ کشاورزی به وجود آورده است. فناوری بذر مصنوعی تکنیکی بسیار مهم برای مدیریت ازدیاد گونه‌های گیاهی تراریخته و بدون هسته، گیاهان پلی‌پلوئید با صفات متمایز و لاین‌های گیاهی است که امکان تکثیر آن‌ها از طریق روش‌های متداول وجود ندارد. بذر مصنوعی به کاهش انجام واکشت‌های متعدد در «شرایط آزمایشگاهی» (In vitro) و «شرایط سازگاری» (ex vitro) می‌شود. بهینه‌سازی هم زمان ازدیاد گیاهان با روش‌های تهیۀ بذر مصنوعی که در مسیرهای کاملاً اتوماتیکی (مرتب‌کردن، برداشت‌کردن، کپسولی‌کردن و تبدیل) دنبال می‌شود، می‌تواند روند تولید بذر مصنوعی را افزایش دهد. از طریق فناوری بذر مصنوعی، می‌توان تبادل ژرم پلاسم[1] میان کشورها را با کاهش مدت قرنطینۀ گیاهان به دلیل انجام مراحل ضدعفونی مواد گیاهی، تسریع بخشید.

۱. مقدمه

موراشینگ (۱۹۷۷) بذر مصنوعی را «رویان‌های سوماتیکی[2] تک‌کپسولی‌شده» تعریف کرده است. بدین معنی که یک محصول «کلونال»[3] است که می‌توان از آن به‌عنوان دانۀ واقعی برای انتقال، ذخیره و کاشت استفاده کرد. بنابراین در نهایت در شرایط آزمایشگاهی و خارج از آزمایشگاه به یک گیاهچه تبدیل می‌شود (تبدیل). با وجود این، بسیاری از گونه‌های گیاهی قادر به تولید رویان سوماتیکی نیستند، بنابراین پیشنهاد داده‌اند که بذر مصنوعی را از ریزنمونه‌هایی در آزمایشگاه به غیر از رویان‌های سوماتیکی به‌ویژه در گونه‌های بدون رویان‌زایی تولید کرد. بنابراین، بذر مصنوعی به رویان سوماتیکی، جوانۀ شاخساره و یا هر بافت مریستمی کپسوله‌شده‌ای که بتواند عملکرد دانه را به‌صورت کاشت و قدرت تبدیل به یک گیاه در شرایط آزمایشگاهی و خارج از آزمایشگاه و ذخیره‌سازی داشته باشد، اطلاق می‌شود.

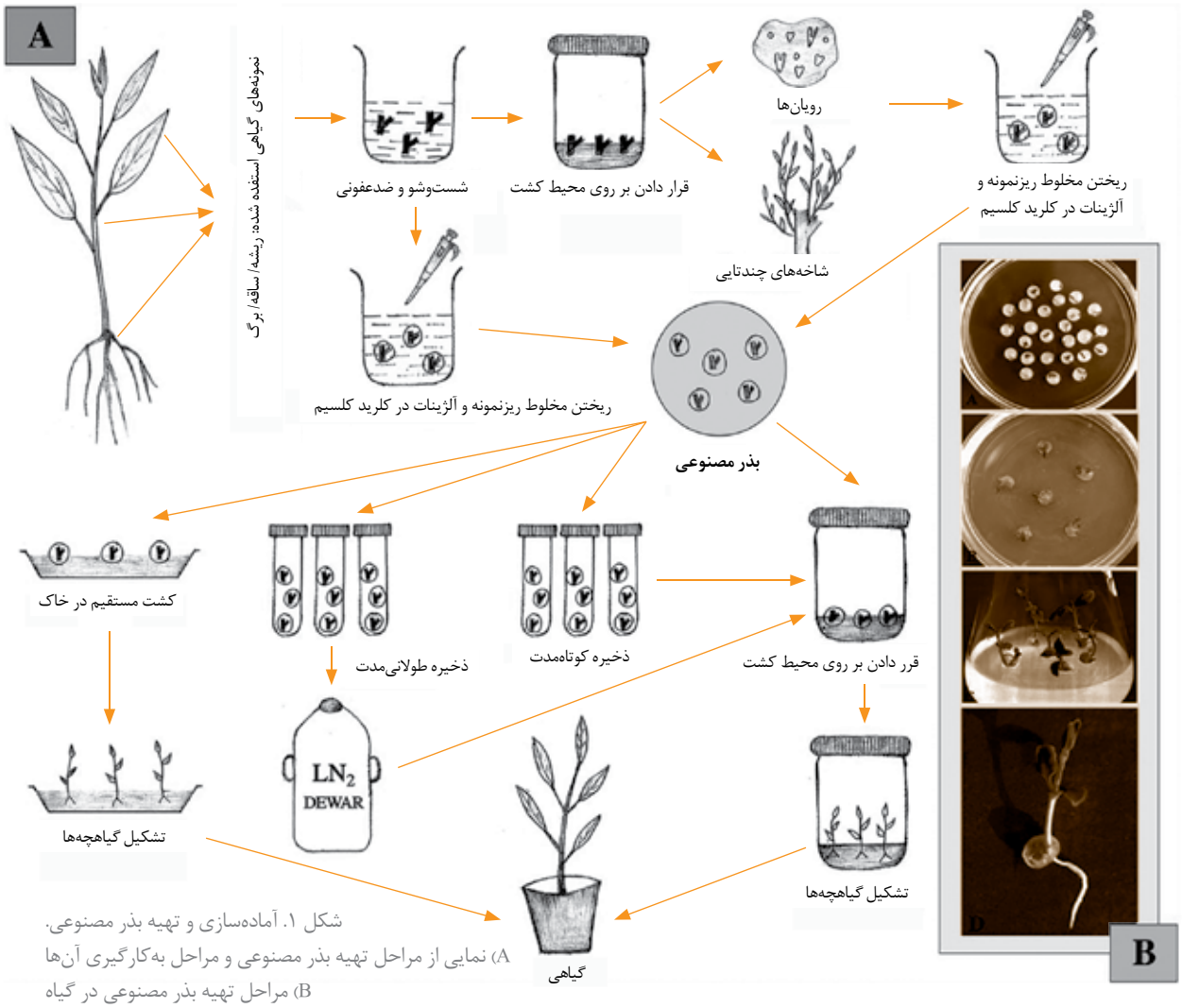
این تعریف مفهوم بذر مصنوعی، ارتباط آن را با رویان‌زایی سوماتیکی گسترش می‌دهد و با ذخیره، کاشت و تولید گیاهچه مرتبط می‌سازد.

ریزنمونه‌هـــای رویشـــی غیررویـــان‌زا، مانند رئوس ســـاقه، بخش‌های گره‌ای/جوانه‌ای جانبی، اندام‌های شـــبیه پروتوکروم، وکالوس‌های رویـــان‌زا یا اندام‌زا را به‌عنـــوان جایگزین مناســـبی بـــرای رویان‌های سوماتیکی معرفی کرده‌اند. برای تکمیل این تعریف بایـــد تأکید کرد که لازم اســـت ریزنمونه‌ها توانایی تبدیل به گیاهچه‌ها را بعد از کاشـــت داشته باشند [Sharma, et al, 2013: 186–207]. در طول دو دهۀ گذشته، پیشرفت‌های زیادی در مسیر فناوری بذر مصنوعی صورت گرفته‌اند.

فناوری بذر مصنوعی برای حفاظت و ازدیاد توده‌ای کلونال هیبریدهای بـــاارزش و کمیاب، ژنوتیپ‌های منتخب، ژنوتیپ‌های اســـتریل ناپایـــدار، و گیاهان تولیدی از طریق مهندســـی ژنتیک که دانه ندارند یا برای جوانه‌زنی نیازمند ارتباط با قارچ میکوریزای هســـتند، مانند نمونه‌هایـــی در ارکیده‌ها، بســـیار نویدبخش است.

۲. انواع بذر مصنوعی

از زمان تعریف واژۀ بذر مصنوعی توسط موراشینگ (۱۹۷۷)، مطالعـــات زیادی در ارتباط با این موضوع در زیســـت‌فناوری گیاهی صورت گرفته است. مانع اصلی برای فناوری بذر مصنوعی کمبود آندوســـپرم طبیعی و پوشـــش محافظتی رویان‌های سوماتیکی بود که نگهداری و استفاده از آن‌ها را با مشکل مواجه می‌کرد. بنابراین، تلاش‌های ابتدایی در مورد فناوری بذر مصنوعی بر ایجاد شـــرایط مشـــابه مسیرهای رویان‌زایـــی زیگوتـــی برای رویان‌های ســـوماتیکی متمرکز بودنـــد. این اولین گام اصلـــی در موفقیت زیست‌فناوری بذر مصنوعی بود (شکل ۱).



شکل ۱. آماده‌سازی و تهیه بذر مصنوعی.
A) نمایی از مراحل تهیه بذر مصنوعی و مراحل به‌کارگیری آن‌ها
B) مراحل تهیه بذر مصنوعی در گیاه

فناوری بذر مصنوعی توسط گروه‌های تحقیقاتی متفاوتی برای انواع گونه‌های گیاهی، شامل غلات، حبوبات، میوه‌ها، سبزی‌ها، گیاهان دارویی، درختان جنگلی، ارکیده‌ها و گیاهان زینتی دیگر توسعه یافته است. بر اساس منابع موجود تا به امروز، بذر مصنوعی را می‌توان به دو گروه طبقه‌بندی کرد:

۱-۲. کپسولی خشک‌شده

در این حالت ابتدا رویان‌های سوماتیکی را به منظور افزایش مقاومت نسبت به خشک‌شدن به حالت جامد در می‌آورند. این حالت باعث القای خواب در جنین گیاهان می‌شود. خشک‌کردن می‌تواند به تدریج طی یک یا دو هفتهٔ متناوب با استفاده از محفظه‌های کاهش‌دهندهٔ رطوبت نسبی انجام شود، یا به سرعت طی یک شبانه‌روز در «پتری‌دیش»های روباز صورت گیرد. مقاومت به خشک‌شدن را می‌توان با استفاده از محیط کشت دارای پتانسیل اسمزی بالا، حاوی مواد اسمزی (ساکارز و مانیتول) و مواد غیراسمزی (پلی‌اتیلن گلیکول) یا محیط‌های کشت حاوی ترکیبات ژله‌ای (برای محدودکردن آب قابل در دسترس) القا کرد.

پس از خشک‌شدن، رویان‌ها با لایهٔ محافظتی و مغذی پوشیده می‌شوند تا از صدمهٔ مکانیکی در حین کار جلوگیری شود و تغذیه را طی مراحل ابتدایی تبدیل فراهم کند. پوشش باید غیرسمی، بدون آب (برای جلوگیری از آبگیری مجدد رویان‌ها)، دارای توانایی ذوب در دماهای نسبتاً پایین (رویان‌ها صدمهٔ دمایی را طی پوشش‌دهی تحمل نمی‌کنند) باشد. به‌علاوه باید قابلیت اتصال به رویان را داشته باشد. استحکام پوشش نیز باید به اندازه کافی نرم باشد تا امکان ایجاد پریموردیوم‌های ریشه و ساقه را فراهم کند.

۲-۲. کپسولی کردن هیدراته

ردنبگ و همکارانش (۱۹۸۴) کپسولی‌کردن هیدروژل[۴] (آبژل) رویان‌های منفرد سوماتیکی یونجه (*Medicago sativa*) را انجام دادند و این فناوری را در سال ۱۹۸۸ ثبت کردند. از آن زمان تاکنون، این مطالعه به‌عنوان بهترین مطالعهٔ تولید بذر مصنوعی مطرح است. تعدادی از مواد پوششی همانند آگار، سدیم آلژینات، پتاسیم آلژینات، سدیم پکتات، کاراژینان، سدیم آلژینات با کربوکسی متیل سلولز، ژلاتین، ژل رایت و غیره، به‌عنوان «هیدروژل» مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. سدیم‌آلژینات به دلیل ویسکوزیتهٔ مناسب، قدرت حلالیت پایین، غیرسمی‌بودن برای ریزنمونه‌ها، ژله‌ای شدن سریع، قیمت پایین و سازگاری زیستی غالباً مورد استفاده قرار می‌گیرد. سدیم آلژینات و نمک کلسیم بهترین ترکیب برای کپسولی‌کردن تا قبل از اینکه یون‌های آن‌ها آسیب ببینند، گزارش شده‌اند. علاوه بر این، قیمت پایینی دارند، کاربرد آن‌ها آسان است و در تبدیل بالای رویان به گیاه نقش دارند. ژل کپسول به طور بالقوه به صورت ذخیرهٔ مواد مغذی به کار گرفته می‌شود که به بقا و رشد سریع رویان‌ها کمک می‌کند.

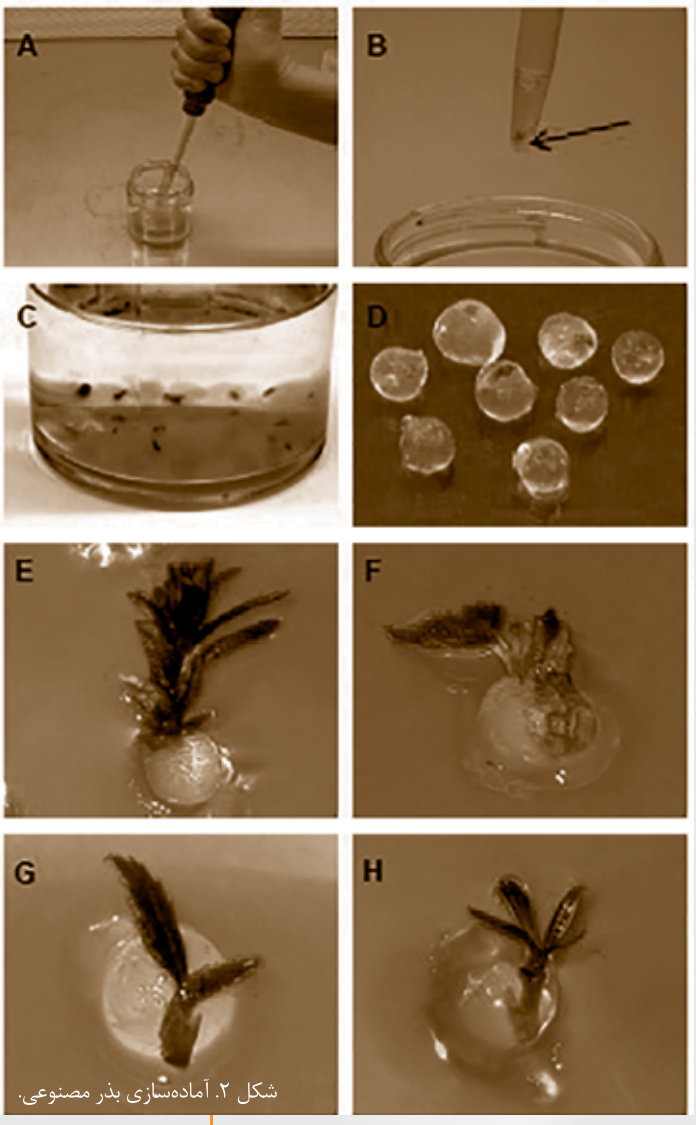
۳. تکنیک‌های کپسولی‌کردن هیدروژل

۱-۳. بذر مصنوعی تک‌لایه‌ای

این روش آسان‌ترین مسیر برای دستیابی به کپسولی‌کردن هیدروژل است. برای تولید بذرهای مصنوعی تک‌لایه‌ای، ریزنمونه‌ها را با دقت از منبع اصلی جدا می‌کنند و با هیدروژل مناسبی مانند سدیم آلژینات مخلوط می‌کنند. محلول آلژینات در آب دو بار تقطیر یا محیط کشت مایع مغذی تهیه می‌شود و به همراه ریزنمونه، همانند پوشش دانه، در مخلوطی مانند محلول کلسیم کلرید یا کلسیم نیترات وارد می‌شود. اصل مهم در فرایند کپسولی‌کردن آلژینات، تشکیل گوی‌های گرد و نازک کلسیم آلژینات به علت تبادل میان یون‌های سدیم (Na^+) و کلسیم (Ca^{++}) است. تراوایی، سختی یا سفتی گوی‌ها و متعاقباً موفقیت در روش کپسولی‌کردن تحت‌تأثیر غلظت آلژینات و کلسیم کلرید استفاده شده و زمان مراقبت، در ریز نمونه‌های مختلف و همچنین در گونه‌های گوناگون گیاهی، متفاوت است. از این رو، غلظت این دو محلول و زمان مخلوط سازی باید برای تشکیل یک گوی مناسب بهینه‌سازی شود.

برای ساختن گوی‌های بذر مصنوعی، معمولاً از پمپ‌های پریستالیک و پیپت‌ها استفاده می‌شود. محلولی که در آن دانه‌ها تشکیل می‌شوند، دائماً در حال تکان و حرکت است تا از به هم چسبیدن آن‌ها به یکدیگر جلوگیری کند و تشکیل شکل‌های کروی گوی‌ها را طی پلیمریزاسیون افزایش دهد. اندازهٔ دانه‌ها به‌وسیلهٔ قطر داخلی دهانهٔ پیپت کنترل می‌شود (شکل ۲).

ترکیب ژل زمینه، اثرات مهمی بر عملکرد تبدیل بافت کپسولی‌شده دارد. برای رشد مجدد و تبدیل مؤثر مواد گیاهی کپسولی‌شده نیازمند اجزای ترکیبی مشخص ماتریکس هیدروژل هستیم که در هر گونهٔ گیاهی اختصاصی است (یعنی مواد غیرآلی، مواد آلی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهان، منابع کربن و غیره). آماده‌سازی ماتریکس ژل در محیط کشت مغذی، رشد مجدد بافت کپسولی‌شده گیاهی را بهبود می‌بخشد. تنظیم‌کننده‌های مختلف و مواد افزودنی محرک رشد به ماتریکس ژل، برای افزایش تبدیل بذر مصنوعی، افزوده می‌شوند. گزارش شده است، بذرهای مصنوعی بسیار مستعد ابتلا به عفونت‌های باکتریایی، قارچی و دیگر میکروب‌ها در گلخانه‌ها هستند. بنابراین برای کاهش آلودگی میکروبی، عوامل ضدمیکروبی متفاوتی را می‌توان به ماتریکس ژل افزود.



شکل ۲. آماده‌سازی بذر مصنوعی.

۲-۳. بذر مصنوعی دولایه‌ای

برای تولید بذر مصنوعی دولایه‌ای، دانهٔ تک‌لایه‌ای با غلظت مشابه محلول سدیم آلژینات بیشتر پوشیده می‌شود و در محلول کلرید کلسیم در ۳۰ دقیقه چکانده می‌شود. سپس با آب دو بار تقطیر استریل شسته می‌شود. این بذرهای مصنوعی دو بار کپسولی‌شده تمامی مزیت‌های بذر تک لایه‌ای را دارند. امتیاز کپسولی‌شدن مضاعف برای محافظت بیشتر اضافه شده است.

۴. ریزنمونه‌های مورد استفاده برای تولید بذر مصنوعی

بذر مصنوعی به‌صورت دانه جایگزین برای گونه‌هایی که دانه زیگوتی تولید نمی‌کنند یا بذر آن‌ها دوام ندارد عمل می‌کند. انواع ریز نمونه‌های برای تولید بذر مصنوعی با موفقیت بکار برده شده‌اند. این واحدهای کپسولی شده را می‌توان به دو نوع به شرح زیر تقسیم‌بندی کرد.

۱-۴. ریزنمونه‌های دو قطبی

رویان سوماتیکی به‌صورت یک ساختار دو قطبی در نظر گرفته می‌شود، زیرا هم‌زمان دارای قطب ریشه و ساقه است. از بین ریزنمونه‌های مختلف، در ابتدا رویان‌های سوماتیکی مناسب‌ترین گزینه برای تولید بذر مصنوعی بودند. زیرا در حالت طبیعی دو قطبی

هســـتند (دارای ریشه‌چه و ساقه‌چه) و قادرند ریشه و ســـاقه‌ها را در یک مرحله به وجود آورند. مشکل اصلـــی در به‌کارگیری رویان‌های ســـوماتیکی برای تولید بـــذر مصنوعی، ناهم‌زمانـــی و بلوغ دیرهنگام قطب رویان‌زایی است.

۲-۴. ریزنمونه‌های تک‌قطبی

ریزنمونه‌های گیاهی تنها با داشـــتن قطب ریشه‌ای یا ساقه‌ای به‌صورت ریزنمونه‌های تک‌قطبی شناخته می‌شوند. دیدگاه جدیدی در فناوری بذر مصنوعی با استفاده از ریزنمونه‌های تک‌قطبی گیاهی آغاز شده است. با توجه به توانایی طبیعی گونه‌ها، برای تولید ریزنمونه‌های رویشی یا در صورت عدم دسترسی به آن، جداسازی بخش‌های سوماتیکی به طور مستقیم از گیـــاه، و برای کاهش مشـــکلات و تعمیم کاربرد فناوری بذر مصنوعی در ژنوتیپ‌ها و گونه‌های زیادی از آن‌ها، می‌توان از ریزنمونه‌های تک‌قطبی استفاده کرد.

درگزارش‌هـــای مقالات علمـــی نمونه‌های متفاوتی از ریزنمونه‌های تک‌قطبـــی به‌صورت بذر مصنوعی گزارش شده است. ریز نمونه‌های تک‌قطبی را به سه گروه با توجه به نوع ریزنمونه‌ها دسته‌بندی می‌کنند: گروه اول، گره‌ها با جوانه‌های انتهایی، جانبی و میکرو ساقه‌ها هستند. این نوع ریزنمونه‌ها برای تولید بذر مصنوعی، احتمالاً به دلیل سهولت نسبی استفاده از آن‌ها برای سیستم ریزازدیادی، مورد توجه هستند. گروه دوم، شامل ریز جوانه‌ها، میکروکورم‌ها، ریزوم‌ها و بنه‌هاســـت. این ریزنمونه‌ها به طور طبیعی آمادهٔ تبدیـــل و اغلب حـــاوی بافت ذخیره‌ای هســـتند. کپســـولی‌کردن ریزجوانه‌ها، ریزوم‌هـــا و پروتوبنه‌ها برای تعدادی از گونه‌های گیاهی، از جمله ارکیده‌ها، گزارش شده است. تولید بذر مصنوعی در ارکیده‌ها، از نظر اینکه دانه‌های کوچک و بدون آندوســـپرمی تولید می‌کنند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

گروه ســـوم، بخش‌های مریســـتمی، تودهٔ سلول و پریموردیا هســـتند. این ریزنمونه‌ها برای آزمایش پیچیدگی‌های زیادی دارند.

۵. روش‌های استفاده از بذر مصنوعی

فناوری بذر مصنوعی مســـیر جدیـــدی در زمینهٔ زیســـت‌فناوری گیاهی ایجاد کرده است. از بذرهای مصنوعـــی می‌توان در مســـیرهای متفـــاوت برای مدیریت ژرم پلاســـم گیاهی استفاده کرد. برخی از روش‌های استفاده از آن‌ها به شرح زیرند:

۱-۵. تولید در آزمایشگاه

کپسولی‌کردن ابزاری قابل اعتماد و ساده برای تولید گیاهان در آزمایشگاه است. بذر مصنوعی را می‌توان در آزمایشـــگاه در محیط کشت نیمه‌جامد یا بستر کاشت (ورمی کولیت، ورمی کمپوست، سویلریت، خاک، شن و ماســـه) برای تبدیل به گیاهچه های کامل پرورش داد.

۲-۵. کاشت مستقیم

کشـــت بذرهای مصنوعی خارج از آزمایشگاه، یک روش تجـــاری مهم و اقتصـــادی را بـــرای بازیابی مستقیم گیاهچه‌ها فراهم می‌کند. این فناوری تأثیر زیـــادی بر افزایش تولید گونه‌هـــای مهم گیاهی با کاهش هزینه‌ها خواهد داشت. اگرچه تعداد زیادی از گیاهان را می‌توان از طریق کشت بافت به‌وسیلهٔ

رویان‌زایی و / یا اندام‌زایی مستقیم و غیرمستقیم تولید کرد. برخلاف روش کشت بافت، در کاشت مستقیم بذرهای مصنوعی در خاک یا سایر بسترها، نیازی به فرایند سازگاری گیاهچه‌ها نیست. در زمان کاشت مستقیم، آلودگی توسط میکروارگانیسم‌ها یکی از مهم‌ترین موانع برای تجاری‌سازی فناوری کپسولی‌کردن است. مواد مغذی، به‌ویژه مواد آلی که توسط گوی‌ها آزاد می‌شوند، باعث آلودگی‌های شدید می‌شوند. افزودن قارچ‌کش‌ها (کاربندازیم یا باویستین و بنومیل) به ماتریکس آلژینات برای مقابله با این مشکل پیشنهاد شده است.

۳-۵. حفاظت کوتاه‌مدت ژرم پلاسم

فناوری بذر مصنوعی به‌عنوان ابزاری برای تبادل ژرم پلاسم میان کشورها عمل می‌کند. به این منظور، ذخیرهٔ بذر مصنوعی عامل مهمی است. بنابراین، شرایط نگهداری مناسب و تعیین دورهٔ نگهداری برای حفظ قدرت زیستی بذر مصنوعی پیش‌شرط لازم برای انتقال است که به موفقیت صنعت فناوری بذر مصنوعی منجر می‌شود. به طور کلی، چهار درجهٔ سانتی‌گراد مناسب‌ترین دما برای نگهداری بذر مصنوعی شناخته شده است.

۴-۵. حفاظت بلندمدت ژرم پلاسم (حفاظت‌سرمایی)

تلاش برای حفظ ریزنمونه‌های گیاهی در دمای پایین به مدت طولانی «حافظت سرمایی» نامیده می‌شود [Walter, 2006]. حفاظت سرمایی‌زیستی بافت‌ها، اگر از تشکیل کریستال بین سلولی که باعث خسارت به غشاهای سلولی می‌شود و نیمه تراوایی آن‌ها را از بین می‌برد، جلوگیری کند (کاهش آسیب به غشاهای سلولی و نیمه‌تراوایی آن‌ها)، مفید است. تا به امروز، راهبردهای گوناگونی برای حفاظت سرمایی بافت‌های متفاوت گیاهی، برای مثال، یخ‌زدگی دومرحله‌ای، خشکی ساده، کپسولی کردن از طریق آب‌گیری و یا انجماد به کار گرفته شده‌اند.

۶. فناوری نشانگر DNA در آزمایشات بذر مصنوعی

با افزایش کاربرد بذر مصنوعی برای حفظ ژرم پلاسم، ارزیابی پایداری ژنتیکی آن‌ها ضروری است. در سال‌های اخیر، بررسی پایداری ژنتیکی گیاهچه‌های به دست آمده از بذرهای مصنوعی با استفاده از فناوری نشانگرهای DNA مورد ارزیابی قرار گرفته و پایداری ژنتیکی این گیاهچه‌ها از طریق این تکنیک‌ها تأئید شده است. از فناوری بذر مصنوعی برای حفاظت و ازدیاد توده‌ای کلونال هیبریدهای با ارزش و کمیاب مانند ارکیده‌ها، استفاده می‌شود.

پی‌نوشت‌ها

۱. به هر نوع مادهٔ گیاهی که در تولید و اصلاح‌نژاد به کار می‌رود، گفته می‌شود و شامل بذر، گیاه کامل و بافت‌های گیاهی است.

۲. فرایندی مصنوعی است که در آن یک گیاه یا جنین از یک سلول بدنی یا سوماتیکی منفرد یا گروهی از سلول‌های بدنی ایجاد می‌شود.

۳. وابسته به تولید مثل غیرجنسی

۴. دسته‌ای از مواد پلیمری با ساختار شبکه‌ای (پیوندهای عرضی فیزیکی یا شیمیایی) هستند که قابلیت تورم و جذب آب بالایی دارند.

منابع

1. Sharma, S. Shahzad, A. J.A. (2013) Teixeira da Silva Synseed technology—A complete synthesis, Biotechnology Advances, Vol. 31, pp. 186–207.
2. Murashige T. (1977) Plant cell and organ cultures as horticultural practices, Acta Horticulturae, Vol. 78, pp. 17–30.
3.Redenbaugh, K.Nichol, J.W. Kossler, M.E.. Paasch , B.D (1984) Encapsulation of somatic embryos and for artificial seed production. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, Vol. 20, pp. 256–7.
4. Walter, R.B. Hazlewood, L. Kazianis S. (2006). The Xiphophorus Genaetic Stock Center Manual. Texas State University.