جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تولید گیاهان هاپلوئید پارتنوژنتیک با استفاده از گرده پرتوتابی شده با پرتو گاما در خربزه ایرانی (*cucumis melo* L.)

لیلا باقری[۱]، محمود لطفی[۲]، رحیم امیری خواه[۳]، منصور نوری[۳]

۱- پژوهشگر پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، پژوهشکده کشاورزی هسته ای کرج

۲- دانشیار دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، گروه علوم باغبانی

۳- کارشناس پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، پژوهشکده کشاورزی هسته ای کرج

چکیده:

این پروژه به منظور بررسی تاثیر دزهای مختلف پرتو گاما (۲۵۰، ۳۵۰، ٤٥٠، ٥٥٠)، ژنوتیپ و مرحله نموی جنین حاصله از تکنیک گرده پرتوتابی شده بر القا جنین‌های هاپلوئید در چند توده بومی خربزه و هیبرید این توده‌ها با ارقام خارجی انجام گرفت. گل‌های ماده گیاهان مادری با گرده‌های پرتوتابی شده با پرتو گاما گرده‌افشانی شدند. ۲۱ روز بعد از تلقیح، جنین‌های که در مراحل مختلف نموی بودند از بذور حاصل از گرده افشانی خارج شده و بر روی محیط کشت *E20A* کشت گردیدند. نتایج نشان داد که در القایی پارتنوجنسیس و نمو میوه دز ۵۵۰ گری موثرترین دز پرتوی گاما بود در حالی که دزهای پایین تر در القایی جنین هاپلوئید موثر نبودند. از بین ژنوتیپ‌های مختلف توده طالبی سمسوری (۱/۲٪) و طالبی ساوه (۱/۱٪) بالاترین درصد جنین به بذر را نشان دادند. در کل از ۲۷٤ جنین بدست آمده از گرده افشانی با گرده پرتودیده ۵۲ گیاهچه پارتنوژنتیک خربزه باززایی شدند. با توجه به نتایج حاصله، تولید جنین و گیاهان هاپلوئید در خربزه به شدت تحت تاثیر دز پرتو، مرحله جنینی و ژنوتیپ قرار می‌گیرد. با استفاده از روش‌های غیر مستقیم و شمارش کروموزمی هاپلوئید بودن گیاهان بدست آمده ($n=x=12$) تایید گردید.

کلمات کلیدی: *پارتنوژنتیک، پرتو گاما، گرده پرتوتابی شده، توده بومی خربزه*

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Production of Parthenogenetic haploid plants using gamma irradiated pollen In Iranian melon (*cucumis melo* L.)

L. Bagheri*[1], M. Lotfi, R. Amiri Khah[1], M. Noori[1]

1- Nuclear Agricultural Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran.
2- Department of Horticulture, College of Aboureihan, University of Tehran, Tehran, Iran.
*Corresponding Author

Abstract: The influence of gamma ray doses (250, 350, 450, 550 Gy), genotypes, and stage of development of embryos obtained by irradiated pollen technique on the induction of haploid embryos were studied in several Iranian melon cultivars as well as their hybrids with alien cultivars. Female flowers were pollinated using pollen that had been irradiated with gamma rays. Different shapes and stages of embryos were excised 21 days after pollination and cultured on E20A medium. Results revealed that 550 Gray of gamma-irradiation was successful in inducing parthenogenesis and fruit development, whereas, lower irradiation doses were not effective in inducing haploid embryos. The percent of embryos per seeds were the highest in 'Samsoori' (1.2%) and 'Saveh' (1.1%) cultivars. In total, 52 parthenogentic melon plantlet recovered from 274 obtained embryos via pollination with gamma-irradiated pollen. As a result of the present study, haploid embryos and haploid plants production strongly influenced by gamma ray doses, embryo stages and genotypes. Indirect methods and chromosome counting performed on the roots of regenerated plants, showed the haploid level (n =x= 12).

Key words: parthenogenesis, gamma irradiation, irradiated pollen, Iranian melon

مقدمه: ژنوتیپ‌های بومی خربزه و طالبی ایرانی که طی سالیان متمادی کشت و کار شده‌اند دارای صفات با ارزش فراوانی می‌باشند، ولی به دلیل گرده افشانی آزاد و بذرگیری سنتی غالبا از یکنواختی و ثبات کامل جهت معرفی به عنوان لاین اصلاحی برخوردار نیستند. در حالی که انجام هر گونه برنامه اصلاحی و بررسی و انتقال صفات مقاومت به بیماری‌ها و تولید بذر هیبرید منوط به وجود لاین‌های خالص می‌باشد. تکنیک هاپلوئیدی و دابل هاپلوئیدی با کوتاه کردن زمان مورد نیاز برای دستیابی به گیاه هموزیگوس نقش مهمی را در برنامه‌های بهنژادی گونه‌های مختلف زراعی ایفا می‌کند . گیاهان هاپلوئید می‌توانند از طریق روش‌های آندروژنسیس و پارتنوژنسیس بدست آیند [۱]. روش‌های مرسوم دابل هاپلوئیدی نظیر کشت بساک، تخمک و تخمدان تلقیح نشده برای تولید هاپلوئید در انواع گیاهان جالیزی موفقیت چندانی ندارد و موفقترین روش در این خانواده القاء جنین‌های پارتنوژنیک با استفاده از گرده‌های پرتودیده و سپس نجات جنین‌ها در محیط کشت اختصاصی می‌باشد [۲]. در حال حاضر، بررسی‌های مختلف تکنیک گرده‌های پرتو دیده (اشعه گاما، اشعه ایکس و فرابنفش) را به عنوان تکنیکی موثر در تولید گیاهان هاپلوئید معرفی می‌کنند [۲، ۳، ٤، ٥]. پرتو گاما به خاطر کاربرد راحت، نفوذ خوب، اثربخشی بالا و خطرات کمتر در برنامه‌های تولید گیاهان هاپلوئید به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. گرده پرتو دیده از لحاظ ژنتیکی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

غیر فعال بوده و قادر به باروری سلول تخم نیست ولی در سطح کلاله جوانه می‌زند که باعث تحریک به تقسیم سلولی در سلول تخم گردد و بنابراین باعث القا پارتنوجنسیس یا نمو میوه پارتنوکارپ می‌گردد [٦]. تولید جنین هاپلوئید و بدست آوردن گیاه به کمک تکنیک گرده پرتودیده در گیاهان جالیزی از جمله خربزه [٢، ٤]، خیار [٧]، هندوانه [٨] و کدو [٥] مورد بررسی قرار گرفت. انتخاب دز مناسب پرتو، شرایط رشد گیاهان مادری، بهنیه سازی روش گرده افشانی، زمان برداشت میوه، مرحله نموی جنین، محیط کشت و شرایط کاشت از جمله مهم‌ترین فاکتورهای تاثیر گذار در موفقیت این تکنیک و تعداد جنین‌های هاپلوئید نجات یافته دارد. بنابراین با توجه به فاکتورهای متعدد تاثیرگذار در موفقیت این روش این آزمایش به منظور دستیابی به روش جامع و موثر برای تولید گیاهان هاپلوئید جهت تولید لاین خالص در توده‌های خربزه ایرانی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از ٦ رقم خربزه و طالبی بومی ، دو رقم وارداتی (آناناسی و زرد قناری) و ٦ بذر گیاهان هیبرید حاصل از تلاقی توده‌های ایرانی با ارقام خارجی استفاده گردید (جدول ٢). پس از تهیه بذور توده‌های مورد نظر، بذرها در گلخانه و مزرعه پژوهشی پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج کشت گردیدند. آبیاری، کوددهی و مبارزه با آفات و بیماری‌ها مطابق روش‌های مرسوم صورت گرفت. در زمان گلدهی، گل‌های نر در چند نوبت درست قبل از شکفتن جمع‌آوری شدند. بعد از جداسازی گلبرگ‌ها، با دزهای مختلف پرتوی گاما (٢٥٠، ٣٥٠، ٤٥٠ و ٥٥٠ گری) حاصل از چشمه کبالت ٦٠ پرتودهی شدند. در صبح روز بعد عملیات گرده‌افشانی با گرده‌های پرتودیده به صورت دستی روی گل‌های ایزوله صورت گرفت. هر گل ماده با استفاده از ٢-٣ عدد گل نر پرتوتابی شده، گرده‌افشانی شد و با کپسول‌های ژلاتینی پوشانده شدند. میوه‌های تشکیل شده ٢١ تا ٢٥ روز پس از گرده افشانی جمع‌آوری شدند (شکل ١ B). میوه‌های برداشت شده در آزمایشگاه با آب شسته شده و با اتانول ٧٠٪ استریل سطحی شدند، سپس بذرها از داخل آنها خارج گردید سپس بذور با آب استریل شسته شدند و در پتری قرار گرفتند. پس از شناسایی بذوری که حاوی جنین بودند، این بذور توسط محلول ١ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ٢٠ دقیقه در زیر هود لامینار ضدعفونی شدند. پس از این مدت بذرها ٣ بار با آب مقطر استریل شسته شدند. پس از ضدعفونی، بذرها شکافته شده و جنین‌های موجود از داخل آن خارج شده و در پتری‌دیش حاوی محیط کشت جامد E20A قرار گرفت. پتری‌دیش‌های کشت در اتاقک رشد با دمای ٢٥ درجه سانتیگراد و فتوپریود ١٦ ساعت روشنایی/ ٨ ساعت تاریکی با شدت نوری ٢٠٠٠-٥٠٠٠ لوکس نگهداری شدند. جنین‌هایی که از قابلیت نمو و باززایی برخوردار بودند، چند روز بعد از کشت، شروع به رشد نمودند. زمانی که گیاهچه‌های حاصله به اندازه کافی رشد کرده مجدداً در محیط کشت جامد ریزازدیادی شدند. ریزازدیادی گیاهان از طریق قرار دادن ٢-٤ عدد قلمه تک‌گره حاوی یک جوانه در شیشه‌های کشت انجام شد. گیاهچه‌های خوب توسعه یافته با آب مقطر استریل شسته شده و به گلدان‌های حاوی پیت و پرلایت با نسبت ١:١ منتقل شدند. سپس در اتاقک رشد در ٢٥ درجه

سانتی گراد، ٦٠٪ رطوبت با ١٦ ساعت فتوپریود نگهداری شدند. بعد از سازگاری، گیاهچه‌ها در گلدان‌های بزرگ‌تر کشت و به گلخانه منتقل شدند. جهت تعیین سطح پلوئیدی گیاهچه‌های حاصله علاوه بر بررسی‌های مورفولوژیکی و آناتومی، از روش شمارش کروموزومی سلول‌های مریستمی انتهای ریشه براساس روش تغییر یافته فولگن [٢] استفاده گردید.

نتایج و بحث: نتایج نشان داد که با افزایش میزان دز پرتو گاما میزان تشکیل میوه کاهش و میزان میوه‌های بدون بذر (پوک) افزایش یافت. بیشترین میوه‌های تولید شده حاوی بذر پر در دز ٢٥٠ گری (٨١٪) بود. با افزایش میزان دز پرتو تا ٤٥٠ گری تولید میوه حاوی بذر پر مشاهده گردید اگرچه روند کاهشی نشان داد. تمام بذور میوه های حاصل از گل‌های گرده افشانی شده با گرده‌های پرتوتابی شده با دز ٥٥٠ واحد گری پوک بودند. با توجه به این نتایج دز ٥٥٠ گری پرتو گاما به عنوان دز موثر برای پارتنوجنسیس موفق در توده‌های خربزه ایرانی مشخص گردید (جدول ١). گزارش گردید که تولید جنین و گیاه هاپلوئید از دزهای پایین تر پرتو در کدو تابستانه [٥]، کدو تنبل [٦] و کدو تلخ [١٣] با موفقیت صورت گرفت در حالی که در هندوانه [٣، ١٢]، خربزه [٤] و خیار [١٠] دزهای بالاتر پرتو ضروری بود. بررسی حاضر نشان داد که دز بالای پرتو (٥٥٠ گری) برای ایجاد جنین‌های پارتنوژنتیک در توده‌های بومی خربزه موثر بود.

جدول ١. تاثیر گرده پرتوتابی شده با دزهای مختلف پرتو گاما بر تشکیل میوه و جنین در توده های خربزه ایرانی

دز پرتو گاما	تعداد گل گرده‌افشانی شده	تعداد میوه تشکیل شده (٪)	تعداد میوه با بذر پر (٪)	تعداد میوه با بذر پوک (٪)
٢٥٠	٨٦	٥٨(٦٨)	٤٧ (٨١)	١١ (١٩)
٣٥٠	٢٩	١٩(٦٦)	١١ (٥٨)	٨ (٤٢)
٤٥٠	١٧	١٠(٥٩)	٣ (٣٠)	٧ (٧٠)
٥٥٠	١٢٣	٦٨(٥٥)	٠	٦٨ (١٠٠)
مجموع	٢٥٥	١٥٥	٦١	٩٤

با توجه به نتایج موجود در جدول ٢، درصد بسیار کمی از بذرهای پوک حاوی جنین بودند و جنین‌های که استخراج شده و نجات یافتن از لحاظ نموی در مراحل مختلفی از مرحله کروی، قلبی شکل و لپه‌ای قرار داشتند. به طور کلی ٢٧٤ جنین نجات یافتند که اکثریت آن‌ها در مرحله کروی (٤٣/٨ ٪) و قلبی شکل (٢٧/٣٨ ٪) بودند. برخی از جنین‌های که در مراحل قلبی شکل و لپه‌ای بودند قادر به باززایی به گیاه را داشتند (جدول ٣). بر طبق گزارشات قبلی میزان باززایی تحت تاثیر مرحله نموی جنین قرار می‌گیرد و مرحله لپه‌ای بالاترین میزان باززایی را دارد که نتایج حاضر دارای تطابق است[٣، ٦، ٧]. بالاترین درصد جنین به بذر در طالبی سمسوری (١/٢ ٪) و طالبی ساوه (١/١ ٪) بدست آمد و کمترین درصد در هیبرید آناناسی × سمسوری بود. بیشترین درصد نسبت گیاه به بذر

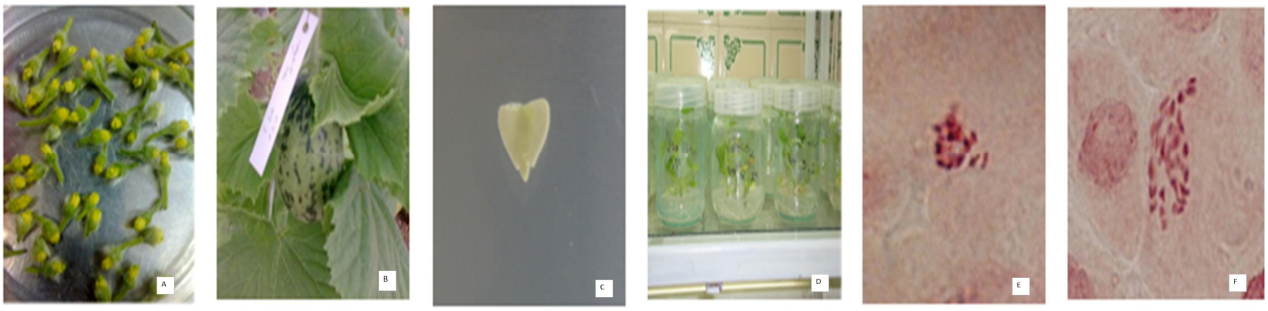
در طالبی ساوه (۰/۲٦ ٪) و کمترین در هیبریدها مشاهده شد و در دو هیبرید سوسکی زرد × آناناسی و خاتونی × هانی دیو گیاهی بدست نیامد. این نتایج با یافته‌های لطفی و همکاران [۲] مطابق دارد که مشاهده کردند بیشترین درصد تولید جنین در توده طالبی سمسوری و گروه کانتالوپنسیس نسبت به گروه اینودروس می‌باشد. در طول کشت‌های مختلف ۱۳٤میوه از ۱٤ ژنوتیپ بدست آمد و از این تعداد میوه ٤۰٦۲۳ بذر حاصل شد که ۰/۷۵ درصد از آنها حاوی جنین سالم بودند. در مجموع ۱۸٪ جنین‌های سالم به گیاه تبدیل شدند و از کل بذور استخراج شده تنها ۰/۱٤ درصد از آنها به گیاه نمو یافت (جدول ۲). در پایان تعداد ۵۲ گیاهچه بدست آمده که از طریق قلمه تک‌گره در شرایط *این‌ویترو* ریزازدیادی شدند. گیاهچه‌های بدست آمده بعد از سازگاری و مقاوم سازی در شرایط گلخانه نگهداری شدند. بررسی مورفولوژیکی گیاهچه‌های بدست آمده نشان داد که گیاهان هاپلوئید ضعیفتر و دارای برگها و گل‌های کوچکتر نسبت گیاهان دیپلوئید بودند. برای اطمینان بیشتر از سطح پلوئیدی گیاهان بدست آمده از روش شمارش کروموزومی استفاده گردید که از این طریق هاپلوئید بودن گیاهان حاصله (n=x=۱۲) تایید شد و با تعداد کروموزوم‌های گیاهان دیپلوئید (۲n=۲x=۲٤) مقایسه شدند (شکل ۱ E و F).

نتیجه‌گیری کلی: در پایان، نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که روش نجات جنین‌های القا شده بوسیله پرتو گاما روشی مطلوب برای تولید گیاهان هاپلوئید پارتنوژنتیک در توده‌های بومی خربزه می‌باشد. با توجه به نتایج تعیین دز موثر برای القای هاپلوئیدی دز ۵۵۰ گری بعنوان دز مناسب مشخص گردید.

جدول ۲- القایی جنین و گیاهان هاپلوئید پارتنوژنتیک بدست آمده از گرده‌افشانی با گرده پرتوتابی شده در خربزه ایرانی

گیاهان مادری	تعداد میوه	تعداد بذر سالم	تعداد جنین	نسبت جنین به بذر٪	مرحله جنینی			تعداد گیاه بدست آمده
					کروی	قلبی شکل	لپه‌ای	
خاتونی مشهد	۱۹	٤۹۱۳	۳۹	۰/۷۹	۱۵	۱۰	۱٤	۸
سوسکی زرد ایوانکی	۹	۲٤۳۷	۲۱	۰/۸٦	۱۳	٤	٤	۳
سوسکی سبز ایوانکی	۱۲	۳۱۷۵	۲۷	۰/۸۵	۱۵	۷	۸	۵
طالبی سمسوری	۱۳	۳۰۹۵	۳۷	۱/۲۰	۱٦	۹	۱۱	۷
طالبی ساوه	۱٦	۳۸۹۲	٤۳	۱/۱۰	۱٤	۱٤	۱۳	۱۰
گرمک اصفهان	۱۷	٤٦۹۱	٤۵	۰/۹٦	۲۰	۱٤	۱۲	۷
آناناسی	٤	۱۲۱۸	۹	۰/۷٤	۲	۲	۵	۳
زرد قناری	۲	٦۷۸	۳	۰/٤٤	۰	۱	۲	۱
آناناسی× گرمک	۹	۲۰۵٤	۱٦	۰/۷۸	٤	۷	٤	۵
سوسکی زرد × هانی دیو	۵	۱۰۰۰	۸	۰/۸۰	٤	۲	۲	۱
آناناسی × سمسوری	۱۱	۲۲۰۰	۷	۰/۳۲	۳	۲	۲	۱

آناناسی × ساوه	٦	١٢٠٠	٧	٠/٥٨	٥	١	١	١
سوسکی زرد × آناناسی	٧	١٤٠٠	٨	٠/٥٧	٦	٢	٠	٠
خاتونی × هانی دیو	٤	٨٠٠	٤	٠/٥	٢	١	١	٠
مجموع/میانگین	١٣٤	٣٢٧٥٤	٢٧٤	٠/٧٥	١٢٠	٧٥	٧٩	٥٢



شکل ۱. القایی گیاهان هاپلوئید بعد از گرده‌افشانی با گرده پرتوتابی شده در توده‌های بومی خربزه. A) گل‌های نر جمع‌آوری شده جهت پرتوتابی با پرتو گاما. B) میوه پارتنوژنتیک نمو یافته بعد از گرده‌افشانی با گرده پرتوتابی شده با دز ۵۵۰ گری پرتوی گاما در خربزه سوسکی سبز. C) نجات جنین قلبی شکل استخرج شده از بذر پارتنوژنتیک بر روی محیط کشت E20A جامد. D) ریزازدیادی گیاهان باززایی شده از طریق قلمه تک‌گره در شرایط *این ویترو*. E و F) تعداد کروموزوم‌های سلول نوک ریشه در گیاه هاپلوئید (E) و گیاه دیپلوئید (F) باززایی شده از طالبی سمسوری (n=x=12).

منابع:

1- M.A. Germana. Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell Tissue Organ Culture Journal. 104,283–300 (2011)

۲- م. لطفی، ع. کاشی، ذ. زمانی، ب.ا. سید طباطبایی، ا. ارل،. تولید کارامد گیاهان هاپلوئید به منظور ایجاد لاین‌های خالص در خربزه (*cucumis melo* L.) ، مجله علوم کشاورزی ایران. ٤٣، ٥٥-٦٥ (١٣٨٢).

3- M. Godbole, and H. N. Murthy. Parthenogenetic haploid plants using gamma irradiated pollen in snapmelon (*Cucumis melo* var. momordica). Plant Cell Tiss Organ Culture. 109, 167–170 (2012).

4- M. Lotfi, A.R. Alan, M.J. Henning, M. Jahn, E.D. Earle. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. Plant Cell Rep 21, 1121–1128(2003).

5- E.S. Kurtar, A. Balkaya. Production of in vitro haploid plants from in situ induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen. Plant Cell Tissue Organ Cult. 102, 267–277 (2010).

6- G. S. Chahal, and S. S. Gosal. Principles and procedures of plant breeding. Alpha Science, Oxford. pp: 399-412 (2002).

gamma irradiation dose 7- N.M. Faris, V. Nikolova, K. Niemirowicz-Szczytt. The effect of haploid embryo production. Acta Physiology Plant. on cucumber (*Cucumis sativus* L.) 21,301–396 (1999).

8- N. Gursoz, K. Abak, M. Pitrat, J.C. Rode, and R. Dumas de Vaulx. Obtention of haploid watermelon (*Citrullus lanatus*). Cucurbit Genetic plants induced by irradiated pollen in Coop. 14, 109–110 (1991).