بررسی القاء هاپلوئیدی از طریق کشت تخمدان در خیار(*Cucumis sativus* L.)

حسین کریمی‌فر[1*]، شیوا عزیزی نیا[2]، محمود لطفی[3]، عبدالله وروانی فراهانی[4] و الهه آرمیون[5]

۱، ۴ و ۵- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح گیاهان باغی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران. ۲- استادیار گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران.
۳- دانشیار گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران.

*نویسنده مسئول:h_karimifar@ut.ac.ir

چکیده

ماده‌زایی در دو ژنوتیپ داخلی و دو رقم هیبرید خیار از طریق کشت تخمدان لقاح نیافته بررسی شد. در مطالعه حاضر سه آزمایش برای بررسی تاثیر ژنوتیپ، هورمون تیدیازرون و زمان برداشت درقالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی انجام شد.تخمدان های چهار رقم (تبریز، اصفهان، سوپر دامینوس و سوپر سلطان) در دو زمان ۱۲ ساعت قبل از شکوفایی و در حین شکوفایی برداشت شده و در محیط MS حاوی تیدیازرون(۰، ۰/۰۲ و ۰/۰۴ µl/L)کشت شدند. بیشترین فراوانی القا جنین در رقم تبریز و در غلظت ۰/۰۲ µl/L تیدیازرون[1] در زمان ۱۲ ساعت قبل از شکوفایی مشاهده شد. کمترین میزان القاء جنین، در رقم سوپر سلطان و در محیط شاهد و حین شکوفایی مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: ماده‌زایی، کشت تخمدان، جنین زایی، تیدیازرون

مقدمه

گیاهان دارای کروموزوم گامتوفیتی(x=n) را هاپلوئید می‌نامند. به علت اینکه گیاهان هاپلوئید اطلاعات مفیدی در مورد نوترکیبی وکنترل ژنتیکی جفت شدن کروموزومی ارائه می‌دهند در عرصه‌های مختلف رشته‌های تحقیقاتی مانند بیوتکنولوژی گیاهی، ژنتیک مولکولی و اصلاح‌نباتات سنتی بسیار مهم هستند(Basu, s. k. et al., 2011). گیاهان با تعداد کروموزوم برابر با کروموزوم گامتوفیتی آن‌ها(چه دیپلوئید و چه پلی‌پلوئید)هاپلوئید خوانده می‌شوند(Chen, J.-F. et al., 2011). بررسی هاپلوئیدی در گیاهان با کشف اینکه اسپروفیت آن‌ها می‌تواند در گیاهان عالی دارای کروموزوم گامتوفیتی(n) تولید و با تیمار کلشی‌سین تعداد کروموزوم آن‌ها دوبرابر می‌تواند دو برابر شود، آغاز گردید(Brian P. Forster et al., 2007). تولید لاین‌های خالص در ارقام گوناگون بویژه در ارقام آزاد گرده‌افشان مثل *Cucurbita pepo L.* نیازمند دو عامل زمان و امکانات می‌باشد که اخیراً لاین‌های خالص در یک زمان کوتاه از طریق کشت این‌ویترو بساک و یا تخمک تولید می‌شوند(Metwally, E et al., 1998). تولید لاین‌های خالص در گیاهان دو پایه به علت تنوع ژنتیکی بالا در پایه‌های نر و ماده به روش کلاسیک امکان‌پذیر نیست، اما با کشت این‌ویترو بساک و تخمدان می‌توان به هاپلوئید دست یافت(Thomas, T. D. et al., 1999). اجرای برنامه‌های اصلاحی درکدوئیان نیازمند تعداد زیادی گیاهان هموزیگوت می‌باشد و باتوجه به نادر بودن هاپلوئیدی خودبخودی در کدوئیان ایجاد یک روش برای تولید گسترده هاپلوئید و در نتیجه تسریع توسعه لاین‌های هموزیگوت،ضروری می‌باشد(Shalaby, T. A, 2007).

مواد و روش‌ها

پرورش گیاهان مادری: دراین پژوهش دو رقم هیبرید سوپرسلطان و سوپردامینوس و دو ژنوتیپ محلی تبریز و اصفهان مورد مطالعه قرارگرفت. گیاهان مادری درگلخانه پژوهشی پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران پرورش یافتند.

[1]- Thidiazuron(TDZ)

تهیه محیط کشت و کشت تخمدان: برای کشت تخمدان از محیط پایه موراشیک و اسکوگ(MS) استفاده شد.pHمحیط کشت روی ۵/۷ - ۵/۸تنظیم گردید و برای استریل در دمای ۱۲۱ درجه و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. با توجه به حساسیت TDZبه حرارت، بعد از اتمام اتوکلاو و خنک شدن محیط کشت تیدیازرون از فیلتر استرلیزاسیون ۲۲µmعبور داده شد. سپس محیط تکمیل شده با TDZدر پلیت استریل ۸۰ میلی‌متری پخش گردید. دو هفته پس از ظهور اولین گل ماده، تخمدان‌های لقاح نیافته برداشت شدند. برای ضدعفونی سطحی تخمدان‌ها به مدت ۲۰ ثانیه در الکل ۷۰٪ قرارگرفتند، سپس به مدت ۲۰ دقیقه به هیپوکلریت سدیم ۱٪ منتقل شدند. بعد از آن تخمدان‌ها سه بار درآب مقطر دوبار استریل شستسو داده شدند.برای بررسی تاثیر مرحله نموی تخمک بر میزان جنین‌زایی، تخمدان‌ها در دو زمان متفاوت(۱۲ساعت قبل از شکوفایی، حین شکوفایی) برداشت شدند. تخمدان‌ها به صورت عرضی به قطعات یک میلیمتری برش داده شدند و در محیط MSحاوی غلظت‌های مختلف(۰، ۰/۰۲ و ۰/۰۴ µl/L) هورمون تیدیازرون در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی کشت شدند.برای اعمال پیش‌تیمار حرارتی و تاریکی پتری‌دیش‌های حاوی قطعات تخمدان به مدت سه روز در دمای ۳۵ درجه در انکوباتور قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از سه روز از انکوباتور خارج و پس از شمارش ساختارهای بصری تشکیل شده بر روی قطعات تخمدان به اتاقک کشت با شرایط نوری ۸/۱۶ (نور/تاریکی) و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد منتقل گردیدند. با گذشت یک هفته از تاریخ کشت، قطعات تخمدان در محیط با غلظت قبلی هورمون تیدیازرون واکشت گردیدند و برای بار دوم شمارش صورت گرفت. پسازدوهفتهازکشت،تخمدان‌هابه مدت یک هفته درمحیط بدون هورمون واکشت شدند. سپس برای اندام‌زایی در محیط حاویBA کشت گردیدند.داده‌های به دست آمده از شمارش دوم پس از آزمون نرمالیته در نرم‌افزارSAS 9.3.1 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی نشان داد که اثر ساده رقم، هورمونTDZ و زمان برداشت بر فراوانی القاء جنین و تعداد قطعه تخمدان جنین زا در سطح یک درصد معنی دار بود. در حالیکه اثر ساده هورمون TDZو رقم برای میانگین جنین در هر قطعه معنی‌دار نبود ولی زمان برداشت بر میانگین جنین در هر قطعه در سطح یک درصد معنی‌دار بود. نایمروز و همکاران(۱۹۹۵) بیان کردند که ژنوتیپ گیاهان اعطا کننده بر میزان جنین‌زایی از طریق کشت تخمدان لقاح نیافته در خیار تاثیر مستقیم دارند(Gałązka,J.andNiemirowicz-Szczytt, K. 2013). سستیلی[1]و فیکادنتی[2](۱۹۹۶) تفاوت معنی‌داری در میان هیبریدهای به دست آمده در تلاقی‌های دای آلل لاین‌های مختلف با تعداد خربزه هاپلوئید به دست آمده با گرده‌افشانی بوسیله گرده پرتودیده مشاهده نمودند.نتایج بررسی حاضر نیز با گزارشات فوق مطابقت داشت، بنابراین اهمیت رقم در القاء جنین واضح است.نتایج به دست آمده با گزارش مالیک[3] و همکاران(۲۰۱۲) که بیان کردند، در بسیاری از گونه های زراعی TDZباعث تحریک جنین‌زایی با کارآیی و فراوانی بالاتری در مقایسه با سایر سیتوکنین ها و یا تیمار ترکیبی سیتوکنین و اکسین شده است مطابقت داشت. نتایج مطالعات انجام شده بر روی کشت تخمدان در مراحل مختلف نشان داد که بیشترین فراوانی تشکیل جنین در تخمدان های کشت شده در حین شکوفایی اتفاق افتاد که نشان دهنده تاثیر مرحله نمو تخمک می باشد(Li, J. et al., 2013). نتایج تجزیه میانگین نشان داد که بیشترین درصد قطعه جنین زا در ژنوتیپ های اصفهان، سوپر دامینوس و تبریز کمترین درصد قطعه جنین‌زا در سوپر سلطان مشاهده شد. همچنین برای میانگین جنین در هر قطعه تخمدان رقم تبریز بهترین عملکرد و رقم سوپر سلطان کمترین عملکرد را داشت و میانگین جین در هر قطعه تخمدان در ارقام سوپر دامینوس و اصفهان به یک اندازه بود. ارقام اصفهان، تبریز و سوپر دامینوس بیشترین فراوانی تشکیل جنین و رقم سوپر سلطان کمترین فراوانی را داشت.در غظت ۰/۰۲ و ۰/۰۴ µl/Lتیدیازرون

[1]- Sestili
[2]- Ficcadenti
[3]- Malik

بالاترین میزان قطعه جنین‌زا به دست آمد و محیط شاهد(غلظت ۰ تیدیازرون) کمترین بود. غلظت µl/L۰/۰۴ بالاترین میانگین جنین در هرقطعه را نشان داد، در حالیکه کمترین میزان جنین در هر قطعه در محیط بدون هورمون مشاهده شد.

جدول-۱ مقایسه میانگین

ارقام	تیدیازرون µl/L	زمان برداشت	درصدقطعه جنین‌زا	میانگین جنین در هرقطعه تخمدان	فراوانی جنین‌های القاءشده
اصفهان	۰	۱	۱/۲۶۴efg	۱/۴۶۲cde	۱/۲۶۴gh
		۲	۱/۳۴۱b-e	۱/۶۸۰b-e	۱/۳۷۸d-h
	۰/۰۲	۱	۱/۲۵۱gf	۱/۳۹۳de	۱/۲۶۳gh
		۲	۱/۳۶۵bcd	۱/۸۵۷abc	۱/۴۵۹c-f
	۰/۰۴	۱	۱/۳۴۱b-e	۱/۶۵۵b-e	۱/۳۷۶d-h
		۲	۱/۴۵۸a	۱/۷۰۴b-e	۱/۵۶۲abc
تبریز	۰	۱	۱/۲۹۰c-g	۱/۶۳۱b-e	۱/۳۰۳fgh
		۲	۱/۲۹۰c-g	۱/۵۴۶b-e	۱/۳۱۴e-h
	۰/۰۲	۱	۱/۲۵۱gf	۱/۶۵۵b-e	۱/۲۷۷gh
		۲	۱/۴۱۳ab	۱/۸۹۵ab	۱/۶۳۶a
	۰/۰۴	۱	۱/۳۷۷abc	۲/۱۲۷a	۱/۶۲۹ab
		۲	۱/۳۲۸b-f	۱/۶۹۶b-e	۱/۳۷۶d-h
سوپر دامینوس	۰	۱	۱/۲۷۷d-g	۱/۵۱۲b-e	۱/۲۹۰gh
		۲	۱/۳۲۹b-f	۱/۸۳۶abc	۱/۴۲۵c-g
	۰/۰۲	۱	۱/۲۹۰c-g	۱/۵۴۶b-e	۱/۳۱۴e-h
		۲	۱/۳۷۸abc	۱/۸۹۷ab	۱/۵۲۶a-d
	۰/۰۴	۱	۱/۳۰۳c-g	۱/۶۴۶b-e	۱/۳۲۷e-h
		۲	۱/۳۷۷abc	۱/۸۰۶abc	۱/۴۷۹b-e
سوپر سلطان	۰	۱	۱/۲۳۸g	۱/۳۴۳e	۱/۲۳۸h
		۲	۱/۳۰۳c-g	۱/۷۷۱a-d	۱/۳۵۳e-h
	۰/۰۲	۱	۱/۲۶۴efg	۱/۵۵۸bcde	۱/۲۷۷gh
		۲	۱/۳۶۶bcd	۱/۷۲۲b-e	۱/۴۲۵c-g
	۰/۰۴	۱	۱/۲۵۱gf	۱/۴۶۲cde	۱/۲۵۱h
		۲	۱/۲۹۰c-g	۱/۷۲۸b-e	۱/۳۱۶e-h

از نظر فراوانی تشکیل جنین غلظت‌های ۰/۰۲ و µl/L ۰/۰۴تفاوت چندانی نداشتند و بیشترین فراوانی تشکیل جنین در این غلظت‌ها رخ داد. طبق نتایج به دست آمده در تخمدان های برداشت شده در ۱۲ ساعت قبل از شکوفایی نسبت به تخمدان‌های برداشت شده در حین شکوفایی بیشترین درصد قطعه جنین‌زا مشاهده شد. بیشترین میزان جنین در هر قطعه در زمان برداشت ۱۲ساعت قبل از شکوفایی به دست آمد. همچنین نتایج نشان داد زمان برداشت تاثیر معنی‌داری بر فراوانی تشکیل جنین دارد تخمدان‌های برداشت

شده در ۱۲ ساعت قبل از شکوفایی بالاترین فراوانی تشکیل جنین را از خود نشان دادند.از بین ارقام مورد آزمایش ژنوتیپ اصفهان در غلظت ۰/۰۴ µl/L تیدیازرون بالاترین قطعه جنین‌زا را داشت، در حالیکه رقم سوپرسلطان در تیمار شاهد کمترین میزان جنین‌زایی در هر قطعه را نشان داد. کمترین میزان جنین در هر قطعه در رقم سوپر سلطان در محیط بدون هورمون مشاهده شد در حالیکه رقم تبریز در محیط کشت حاوی ۰/۰۴ µl/L بهترین عملکرد را از نظر میانگین جنین در هر قطعه از خود نشان داد. اثرات متقابل رقم در هورمون تاثیر معنی‌داری بر فراوانی تشکیل جنین داشتند، رقم تبریز و اصفهان در غلظت ۰/۰۴ بیشترین فراوانی تشکیل جنین را نشان دادند و رقم سوپر سلطان در غلظت ۰/۰۴ کمترین میزان فراوانی تشکیل جنین را بروز داد.تخمدان های برداشت شده ژنوتیپ اصفهان در ۱۲ ساعت قبل از شکوفایی در با بیشترین درصد قطعه جنین‌زا بهترین حالت را در بین سه رقم دیگر داشت، در حالیکه سوپرسلطان ضعیف ترین حالت را داشت. در رقم سوپر دامینوس در زمان ۱۲ساعت ساعت قبل از شکوفایی و رقم تبریز در زمان حین شکوفایی بیشترین میزان جنین در هر قطعه تشکیل شد. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین فراوانی تشکیل جنین تحت تاثیر اثر متقابل غلظت ۰/۰۲ µl/L و زمان برداشت ۱۲ساعت قبل از شکوفایی مشاهده شد و کمترین فراوانی در۰ و ۰/۰۲µl/L تیدیازرون و در زمان شکوفایی مشاهده شد. بیشترین درصد قطعه جنین‌زا در غلظت ۰/۰۲ و ۰/۰۴ µl/Lتیدیازرون در ۱۲ ساعت قبل از شکوفایی مشاهده شد و کمترین قطعه جنین زا در تیمار ۰ و ۰/۰۲ µl/Lدر تخمدان‌های برداشت شده در حین شکوفایی به دست آمد. از لحاظ تاثیر بر تعداد جنین در هر قطعه تفاوت چندانی بین ارقام مورد بررسی مشاهده نشد، با این حال در غلظت ۰/۰۲ تیدیازرون در زمان شکوفایی و بیشترین و محیط بدون هورمون در حین شکوفایی کمترین میزان جنین در هر قطعه مشاهده شد. رقم سوپر دامینوس در اثر متقابل با زمان برداشت ۱۲ ساعت قبل از شکوفایی بیشترین فراوانی تشکیل جنین را نشان داد و کمترین فراوانی در رقم سوپرسلطان مشاهده شد.

منابع

۱. حسندخت،م.،کاشی،ع.،کامپیون،ب. وبزرگی‌پور،ر. ۱۳۷۹. بررسی تولیدگیاهان هاپلوئید پیازهای خوراکی بومی ایران(*Alliumcepa*L.)به روش ماده‌زایی. نهال وبذر. ۳.

۲. نجفیان،گ. وسینگ،ت. ب. ۱۳۸۳. مطالعه اثرات ژنوتیپی گندم هگزاپلوئید روی تولیدگیاهان هاپلوئید آن ازطریق تلاقی با ذرت. علوم کشاورزی ایران. ۳۵: ۱۷۶-۱۶۷.

3. Basu, S. K., Datta, M., Sharma, M. & Kumar, A. 2011. Haploid production technology in wheat and some selected higher plants.

4. Chen, J.-F., CUI, L., Malik, A. A. &mbira, K. G. 2011.In vitro haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 104: 311-319.

5. Gałązka, J. &Niemirowicz-szczytt, K. 2013. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits. Folia Horticulturae. 25: 67-78.

6. Li, J., Si, S., Cheng, J., LI, J. & LIU, J. 2013. Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of Cucumissativus. BiologiaPlantarum.57: 164-168.

7. Metwally, E., Moustafa, S., EL-Sawy, B., Haroun, S. &Shalaby, T. 1998.Production of haploid plants from in vitro culture of unpollinated ovules of Cucurbita pepo.Plant cell, tissue and organ culture.52: 117-121.

8. SHALABY, T. A. 2007. Factors affecting haploid induction through< i> in vitro</i>gynogenesis in summer squash (< i>Cucurbitapepo</i> L.).Scientiahorticulturae. 115: 1-6.

9. Thomas, T. D., Bhatnagar, A., Razdan, M. &Bhojwani, S. 1999.A reproducible protocol for the production of gynogenic haploids of mulberry, Morusalba L. Euphytica. 110: 169-173.

The study of haploid induction through ovary culture in cucumber(*Cucumis sativus* L.)

H. Karimifar[1] *, S. Azizinia[2], M. Lotfi[3], A .Varvani farahani[4] and Elahe Armiyoun[5]

1, 4 and 5 - M.Sc student of horticultural plant breeding, College of Aburaihan, university of Tehran. 1- Assistant Professor of Academic Affairs, College of Aburaihan, university of Tehran. 2- Associate Professor of Academic Affairs, College of Aburaihan, university of Tehran.

*Corresponding author: h_karimifar@ut.ac.ir

Abstract

Gynogenesis of two local and two hybrid varieties of cucumber were investigated via ovary culture of *Cucumis sativus*.The experiment was carried out as factorial based of completely randomized design with three replication to study the effects of genotype, Thidiazuron and harvest time . Ovaries from four genotypes (*Tabriz, Isfahan, super dominus and Super Soltan*) were harvested at the time and 12 hours before blossom and were cultured in MS medium consisting 0, 0.02 and 0.04 µ L/lof Thidiazuron. The most embryo induction was recorded in Tabriz Variety using 0.20 µL/l of Thidiazuron 12 h before blossom while the least embryo induction was from Super Sultan variety, control medium and at the time of blossom.

Key words: Gynogenesis, Ovary culture, Emberyogenesis, Thidiazeron