بررسی برخی فاکتورهای مؤثر بر القاء هاپلوئیدی در خیار از طریق کشت تخمدان

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

دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح گیاهان باغی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران. ۲و۳- استادیار و دانشیار گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران. ۴و۵- دانشجوی کارشناسی ارشداصلاح گیاهان باغی،پردیس ابوریحان،دانشگاه تهران.

* نویسنده مسئول: h_karimifar@ut.ac.ir

چکیده

گیاهان هاپلوئید به طور برجسته از کاهش میوزی بافت بدون تلقیح به دست می‌آیند. در برنامه اصلاح نژاد مرسوم، لاین‌های خالص پس از چندین نسل خودگشنی توسعه یافته و ممکن است ۱۰۰٪ هموزیگوت نباشند. اما با روش هاپلوئیدی می‌توان در زمان کوتاه به لاین خالص دست یافت. فاکتورهای زیادی بر پاسخ‌دهی به ماده‌زایی در خیار مؤثرند. از جمله آنها ژنوتیپ، هورمون و مرحله نموی تخمدان می باشند که در مطالعه حاضرمورد بررسی قرار گرفتند. هورمون تیدیازرون در سه سطح ۰، ۰/۰۲ و ۰/۰۴ µl/L در ارقام مورد بررسی پاسخهای متفاوتی به جنین زایی داشتند که در میان ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی، ژنوتیپ اصفهان بهترین پاسخگویی را در غلظت ۰/۰۴ µl/L TDZ و زمان برداشت ۱۲ ساعت قبل از شکوفایی به جنین‌زایی داشت. در حالیکه رقم سوپر سلطان کمترین پاسخگویی را به جنین‌زایی در غلظت ۰/۰۲ µl/L TDZ و حین شکوفایی نشان داد.

کلمات کلیدی: ماده‌زایی، جنین‌زایی، هاپلوئیدی

مقدمه

اصلاح نباتات به طور مداوم بر افزایش تولید محصول برای پاسخگویی به نیاز های جمعیت در حال رشد جهان، بهبود کیفیت مواد غذایی برای اطمینان از یک زندگی سالم تمرکز کرده است. بیوتکنولوژی ابزارهای قدرتمند برای اصلاح نباتات ارائه می دهد و در این میان، کشت بافت و بخصوص تکنولوژی هاپلوئیدی و دبل‌هاپلوئیدی می تواند به انتخاب گیاه برتر کمک کند. در واقع هاپلوئیدها گیاهان با تعداد کروموزوم گامتی هستند و دبل هاپلوئیدها، هاپلوئیدهایی هستند که تحت نسخه برداری کروموزومی قرار گرفته‌اند، که نشان دهنده یک روش خاص بیوتکنولوژی برای سرعت بخشیدن به اصلاح نباتات می‌باشند(Germanà, 2011). یکی از روش های دستیابی به گیاهان هاپلوئید واقعی، وادار نمودن سلول های زایشی به تقسیم و نمو به گیاه می‌باشد(Kiełkowska and Adamus, 2010). گیاهان هاپلوئید به طور برجسته از کاهش میوزی بافت بدون تلقیح به دست می‌آیند(Gałązka and Niemirowicz-Szczytt, 2013). تولید اولین هاپلوئید در کدو تابستانی از طریق کشت تخمدان لقاح نیافته در ۱۹۸۶ توسط توماس دوالوکس و چامبونت گزارش شد. شایل و رابینسون(۱۹۸۷) و مت‌والی و همکاران(۱۹۹۸) نیز القاء این‌ویترو هاپلوئیدی در کدوی تابستانی به روش کشت این‌ویترو بساک و تخمدان لقاح نیافته کدوی تابستانی را مورد مطالعه قرار دادند و هر دو به گیاه هاپلوئید دست یافتند(Juhász and Jakše, 2005). در خیار نیز تولید هاپلوئید از طریق نرزایی و ماده زایی گزارش شده، هر چند موفقیت در دستیابی به گیاه هاپلوئید از طریق کشت تخمدان در خیار فراوانی پایینی داشته است اما القاء جنین‌زایی و نمو گیاهچه ها به فاکتورهای مجزا از قبیل ژنوتیپ، شرایط کشت، پیش تیمار، ترکیبات محیط کشت و مرحله نموی تخمک بستگی دارد(Li et al., 2013).

مواد و روش‌ها

پرورش گیاهان مادری

در این پژوهش دو ژنوتیپ محلی تبریز و اصفهان و دو رقم هیبرید سوپرسلطان و سوپردامینوس مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. گیاهان مادری در گلخانه پژوهشی پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران به روش هیدروپونیک پرورش یافتند.

تهیه محیط کشت و کشت تخمدان

برای کشت تخمدان از محیط پایه CBM (Cucumber Basal Media) استفاده شد. pH محیط کشت روی ۵/۷-۵/۸ تنظیم گردید و برای استریل در دمای ۱۲۱ درجه و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. با توجه به حساسیت TDZ به حرارت، بعد از اتمام اتوکلاو و خنک شدن محیط کشت تیدیازرون از فیلتر استرلیزاسیون ۲۲µm عبور داده شد. سپس محیط تکمیل شده با TDZ در پلیت استریل ۸۰ میلی‌متری پخش گردید. دو هفته پس از ظهور اولین گل ماده، تخمدان های لقاح نیافته برداشت شدند. برای ضدعفونی سطحی تخمدان‌ها به مدت ۲۰ ثانیه در الکل ۷۰٪ قرار گرفتند، سپس بهبه مدت ۲۰ دقیقه به هیپوکلریت سدیم ۱٪ منتقل شدند. برای تماس بهتر به ظروف حاوی نمونه‌ها یک قطره توین۲۰ اضافه گردید. پس از ۲۰ دقیقه تخمدان‌ها سه بار در آب 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 CBM حاوی غلظت‌های مختلف(۰، ۰/۰۲ و ۰/۰۴ µl/L) هورمون تیدیازرون جایگذاری 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 رویان های 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 پتری دیش های حاوی همان محیط واکشت گردیدند و برای بار دوم شمارش صورت گرفت. پس از دو هفته از کشت تخمدان ها به محیط بدون هورمون منتقل شدند و برای اندام زایی در محیط حاوی BA کشت گردیدند. داده ها پس از آزمون نرمالیته در نرم‌افزار SAS۹,۳,۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر رقم بر میزان جنین در هر قطعه، تعداد قطعه جنین‌زا و فراوانی تشکیل جنین در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. همچنین نتایج نشان داد که رقم اصفهان و تبریز بیشترین تاثیر را بر القاء جنین‌زایی را داشتند(جدول-۱) که این نتیجه تایید کننده گزارشات قبلی مبنی بر تاثیر معنی دارژنوتیپ بر القاء جنین بود(Sauton, 1988; Cuny et al., 1993; Kurtar et al., 2002). نتایج نشان دادکه دو غلظت ۰/۰۲ و ۰/۰۴µl/L تیدیازرون تشکیل جنین را بهبود بخشید و فراوانی جنین های القاء شده به طور معنی داری بیشتر از محیط شاهد بود(جدول-۱). این نتایج با گزارشات قبلی که بیان کرده بودند تیدیازرون سیتوکنین بسیار مؤثر بر جنین‌زایی است، مطابقت داشت(Li et al., 2013; Diao et al., 2009). در هر سه صفت مورد ارزیابی در سطح یک درصد معنی‌دار بود که این نتیجه با گزارش لی و همکاران(۲۰۱۳) که بیان نمودند تفاوت معنی‌داری در میزان القاء جنین در تخمدان های لقاح نیافته در مراحل مختلف نمو گامت وجود دارد، مطابقت داشت(جدول-۱).

جدول-۱ تاثیر ژنوتیپ، تیدیازرون و زمان برداشت بر جنین زایی

ارقام	TDZ (µl/L)	زمان برداشت*	درصد قطعه جنین‌زا	میانگین جنین در هر قطعه تخمدان	فراوانی جنین‌های القاء شده
اصفهان	۰	۱	۱/۲۵۱ DE	۱/۳۴۳ CD	۱/۲۵۱ DE
		۲	۱/۲۷۷CDE	۱/۵۵۸ A-D	۱/۳۱۲ CDE
	۰/۰۲	۱	۱/۲۹۰CDE	۱/۷۴۳ AB	۱/۳۲۷ CDE
		۲	۱/۴۱۳A	۱/۸۰۱ AB	۱/۵۴۵AB
	۰/۰۴	۱	۱/۲۶۴ DE	۱/۵۸۱ A-D	۱/۲۶۴DE
		۲	۱/۴۴۸A	۱/۹۰۵A	۱/۶۹۶A
تبریز	۰	۱	۱/۲۷۷ CDE	۱/۵۸۱ A-D	۱/۲۷۷ CDE
		۲	۱/۲۳۸ E	۱/۳۴۳ CD	۱/۲۳۸ E
	۰/۰۲	۱	۱/۳۰۳ B-E	۱/۷۴۳ AB	۱/۳۴۰ CDE
		۲	۱/۴۱۴A	۱/۸۱۲ AB	۱/۵۴۷AB
	۰/۰۴	۱	۱/۲۷۷ CDE	۱/۴۹۳ BCD	۱/۲۸۹CDE
		۲	۱/۳۷۳ ABC	۱/۵۴۹ A-D	۱/۴۳۷BCD
سوپر دامینوس	۰	۱	۱/۲۵۱ DE	۱/۴۶۲ BCD	۱/۲۵۱ DE
		۲	۱/۲۹۰ CDE	۱/۷۳۴ AB	۱/۳۴۸CDE
	۰/۰۲	۱	۱/۲۳۸ E	۱/۳۴۳ CD	۱/۲۳۸ DE
		۲	۱/۴۰۲ AB	۱/۷۱۴ AB	۱/۴۷۱BC
	۰/۰۴	۱	۱/۲۹۰ CDE	۱/۷۷۴ AB	۱/۳۱۵ CDE
		۲	۱/۳۴۹A-D	۱/۵۴۵ A-D	۱/۴۱۳ B-E
سوپر سلطان	۰	۱	۱/۲۲۴ E	۱/۲۲۴ D	۱/۲۲۴ E
		۲	۱/۲۹۰ CDE	۱/۶۷۷ ABC	۱/۳۲۶ CDE
	۰/۰۲	۱	۱/۲۲۴ E	۱/۲۲۴ D	۱/۲۲۴ E
		۲	۱/۳۷۸ ABC	۱/۷۳۸ AB	۱/۴۷۱ BC
	۰/۰۴	۱	۱/۲۲۴ E	۱/۲۲۴ D	۱/۴۲۴ E
		۲	۱/۲۹۰ CDE	۱/۵۹۲ A-D	۱/۳۲۷ CDE

*زمان برداشت: ۱: حین شکوفایی ۲: ۱۲ ساعت قبل از شکوفایی

همچنین نتایج مقایسه میانگین آشکار ساخت که تخمدان‌های برداشت شده در ۱۲ ساعت قبل از شکوفایی بیشترین فراوانی تشکیل جنین،میانگین تعداد جنین در هر قطعه تخمدان و تعداد قطعه جنین زا داشت، در حالی که لی و همکاران(۲۰۱۳) بیان نمودند که فراوانی القاء جنین در تخمدان های برداشت شده در حین شکوفایی جنین زایی بالاتر بود. در حالیکه گمز و همکاران(۲۰۰۲) ۶ساعت قبل از شکوفایی را مرحله بهینه برداشت تخمدان گزارش نمودند. اثر متقابل ژنوتیپ و هورمون در تعداد قطعه جنین‌زا و فراوانی تشکیل جنین معنی‌دار نبود اما در میانگین جنین در هر قطعه در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر

متقابل ژنوتیپ و زمان برداشت تخمدان یا به عبارتی مرحله نموی تخمک در تعداد جنین در هر قطعه در سطح یک درصد معنی‌دار بود ولی بر عداد قطعه جنین‌زا و فراوانی القاء جنین تاثیر معنی‌دار نداشت. اثر متقابل هورمون و زمان برداشت بر فراوانی القاء جنین و تعداد قطعه جنین‌زا به ترتیب در سطح یک درصد و پنج درصد معنی‌دار بود در حالی که تاثیر معنی‌داری بر تعداد جنین در هر قطعه نداشت. اثر متقابل ژنوتیپ و هورمون و مرحله نموی تخمک تاثیر معنی‌داری بر هیچکدام از صفات مورد ارزیابی نداشت.

منابع

۱. حسندخت، م.، کاشی، ع.، کامپیون، ب. و بزرگی‌پور، ر. ۱۳۷۹. بررسی تولید گیاهان هاپلوئید پیازهای خوراکی بومی ایران (*Allium cepa* L.) به روش ماده‌زایی. نهال و بذر. ۳.

۲. نجفیان، گ. و سینگ، ت. ب. ۱۳۸۳. مطالعه اثرات ژنوتیپی گندم هگزاپلوئید روی تولید گیاهان هاپلوئید آن از طریق تلاقی با ذرت. علوم کشاورزی ایران. ۳۵: ۱۷۶-۱۶۷.

3. Cuny, F., Grotte, M., DE Vaulx, R. D. & Rieu, A. 1993. Effects of gamma irradiation of pollen on parthenogenetic haploid production in muskmelon (Cucumis melo L.). Environmental and Experimental Botany. 33: 301-312

4. Diao, W.-P., Jia, Y.-Y., Song, H., Zhang, X.-Q., Lou, Q.-F. & Chen, J.-F. 2009. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenetants using SSR markers. Scientia horticulturae. 119: 246-251

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

6. Germana, M. A. 2011. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. Plant cell reports. 30: 839-857.

7. Juhász, A. G. & Jakše, M. 2005. Haploids in the improvement of miscellaneous crop species (Cucurbitaceae, Liliaceae, Asparagaceae, Chenopodiaceae, Araceae and Umbelliferae). Biotechnology in Agriculture and Forestry. 56.

8. Kiełkowska, A. & Adamus, A. 2010. In vitro culture of unfertilized ovules in carrot (Daucus carota L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 102: 309-319.

9. Kurtar, E., Sarı, N. & Abak, K. 2002. Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (Cucurbita pepo L.). Euphytica. 127: 335-344.

10. Li, J., SI, S., Cheng, J., Li, J. & Liu, J. 2013. Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of Cucumis sativus. Biologia Plantarum. 57: 164-168.

11. Sauton, A. 1988. Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskemlon, Cucumis melo L. Scientia horticulturae. 35: 71-75.

Evaluation of same factors influencing haploid induction in ovary culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.)

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

Haploid plants can be remarkably produced through reduction division of the ovary without fertilization. In the common breeding programs, pure lines usually develop after several times self-pollination and they may not 100 percent homozygous. However, using haploid induction approach it would be possible to obtain pure lines in a short time. In the current study, factors such as genotype, phytohormones and ovary developmental stage which have the capability to influence gynogenesis were investigated in cucumber. The genotypes respond in different ways to different concentrations of thidiazuron. Among studied genotypes, *Isfahan* had the best response to embryogenesis at 12 hr before anthesis and 0.04 µl/l TDZ . while *supersoltan* showed the low respond to embryogenesis at the time of anthesis and 0.02 µl/l TDZ.

Key words: Gynogenesis, Embryogenesis, Haploidy