عوامل مؤثر در تولید هاپلوئیدی به روش بکرزایی القایی حاصل از گرده‌افشانی با گرده پرتوتابی شده در گیاهان جالیزی

لیلا باقری[1*]، رحیم امیری خواه[2]، حمیدرضا باقری[3]

۱ و ۲ - به ترتیب پژوهشگر و کارشناس ارشد پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، کرج، ایران. ۳- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: lbagheri@nrcam.org

چکیده

هدف اصلی از تولید گیاهان هاپلوئید در خانواده کدوئیان به منظور تسریع برنامه‌های به‌نژادی برای گزینش ژنوتیپ‌های مطلوب از طریق استفاده از لاین‌های دابل هاپلوئید خالص می‌باشد. نرزایی، ماده زایی و بکرزائی روش‌های معمول تولید گیاهان هاپلوئید هستند. مطالعه‌ی مروری حاضر، فاکتورهای مؤثر در افزایش کارایی روش بکرزایی القایی با تکنیک گرده پرتوتابی شده در گیاهان خانواده جالیزی را بیان می‌کند. رایج‌ترین و بهترین روش شناخته شده برای دستیابی به گیاهان هاپلوئید جالیزی روش گرده افشانی با گرده پرتوتابی شده است که نمو جنین‌های هاپلوئید بکرزا را در گیاه القاء می‌کند. در این روش جنین‌ها از بذور نابالغ خارج شده و در شرایط درون شیشه‌ای نجات می‌یابند تا به گیاه کامل توسعه پیدا کنند. در گیاهان جالیزی، اولین گزارش در تولید موفق هاپلوئیدی از این روش توسط Sauton و Dumas منتشر گردید و بعد از آن توسط محققان دیگر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی‌های مختلف نشان داد که موفقیت در این روش تحت تأثیر چندین فاکتور از جمله ژنوتیپ و قدرت رشد گیاه مادری، تعیین دز مناسب پرتو، زمانی از سال که گرده‌افشانی با گرده پرتوتابی شده صورت می‌گیرد و روش تشخیص، جداسازی و نجات جنین قرار می‌گیرد و پیشنهاد می‌گردد که در استفاده از این تکنیک فاکتورهای ذکر شده مورد توجه اصلاح‌گران نبات قرار گیرد.

کلمات کلیدی: خانواده کدوئیان، بکرزایی، گرده پرتوتابی شده، هاپلوئیدی

مقدمه

گیاهان جالیزی از مهمترین محصولات صیفی در کشور هستند که طی سالیان متمادی کشت و کار شده‌اند و دارای صفات با ارزش فراوانی می‌باشند، ولی به دلیل گرده‌افشانی آزاد و بذرگیری سنتی غالباً از یکنواختی و ثبات کامل جهت معرفی به عنوان لاین اصلاحی برخوردار نیستند. از طرفی، انجام هر گونه برنامه اصلاحی و بررسی و انتقال صفات مقاومت به بیماری‌ها و تولید بذر هیبرید منوط به وجود لاین‌های خالص می‌باشد. با توجه به اینکه تولید لاین‌های خالص از طریق خودگشنی مکرر زمان زیادی نیاز دارد و معمولا گیاهان حاصله صد درصد هموزیگوس نمی‌باشند، از این رو روش هاپلوئیدی[1] و هاپلوئیدی مضاعف[2] با کوتاه کردن زمان مورد نیاز برای دست‌یابی به گیاه خالص نقش مهمی را در برنامه‌های به نژادی گونه‌های مختلف زراعی ایفا می‌کند. هاپلوئیدها گیاهانی هستند که حاوی تعداد کروموزوم‌های گامتوفیتک در مرحله اسپوروفیتی می‌باشند که می‌توانند به صورت خودبخودی در طبیعت و یا در نتیجه تکنیک‌های گوناگون القاء هاپلوئید حاصل شوند. علاقه‌مندی به هاپلوئیدی از سال ۱۹۲۱ شروع شد و نمو خودبخودی گیاهان هاپلوئید در سال ۱۹۲۲ برای اولین بار در گیاه تاتوره توسط Blakeslee معرفی شد (Blakeslee et al., 1922). سپس گزارشات مشابهی در تنباکو، گندم و چندین گونه دیگرارائه گردید (Forster et al., 2007). با این حال، وقوع خودبخودی این پدیده به ندرت اتفاق می‌افتد که ارزش کاربردی آن را محدود می‌کند. گیاهان هاپلوئید می‌توانند از طریق روش‌های نرزایی درون شیشه‌ای[3] (کشت درون شیشه‌ای دانه گرده و بساک) ماده زایی درون شیشه‌ای[4] (کشت درون

1 -Haploid
2 -doubled haploid
3 - In vitro androgenesis

شیشه‌ای تخمک و تخمدان) و بکرزائی[5] (تحریک به رشد سلول تخمزا در کیسه جنینی عمدتاً با گرده افشانی با گرده پرتو دیده) بدست آیند (۸). پتانسیل هاپلوئیدی در به‌نژادی گیاهان از ۱۹۶۴ با دستیابی جنین هاپلوئید از کشت درون شیشه‌ای بساک تاتوره و پس از آن تولید موفق درون شیشه‌ای هاپلوئید در گیاه تنباکو مشخص گردید (Guha and Maheshwari, 1966) . تلاش‌های زیادی در این زمینه صورت گرفت که نتیجه آنها دستیابی به پروتوکل‌هایی برای ۲۵۰ گونه گیاهی بود که تقریباً متعلق به همه خانواده‌های سلسه گیاهی می‌باشند (Maluszynski et al., 2003). یکی از جدیدترین تکنیک‌های تولید گیاهان هاپلوئیدی که در بسیاری از گونه‌های گیاهی در تولید جنین و گیاه هاپلوئید و دابل هاپلوئید موفقیت‌آمیز بوده تکنیک گرده پرتوتابی شده می‌باشد. روش‌های مرسوم 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 بکرزا با استفاده از گرده‌های پرتودیده و سپس نجات جنین‌ها در محیط کشت اختصاصی می‌باشد (Lotfi et al. 2003). مطالعه‌ی مروری حاضر به بررسی مهم‌ترین نتایج حاصل از تکنیک گرده پرتوتابی شده و فاکتورهایی که میزان موفقیت این تکنیک را تحت تأثیر قرار می‌دهند، می‌پردازد.

کاربرد تکنیک گرده پرتو دیده در تولید گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئید: تکنیک گرده پرتوتابی شده یکی از روش‌های بکرزایی (parthenogenesis) است. در واقع این تکنیک شامل القاء جنین بکرزا با استفاده از گرده‌افشانی با گرده‌های پرتودیده و سپس نجات جنین‌های القاء شده در شرایط درون شیشه ای است. این تکنیک در تولید گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئید چندین گونه گیاهی موفقیت آمیز بود و مورد توجه اصلاح‌گران نباتات قرار گرفت. برای گیاهان جالیزی، اولین بار حدود ۲۰ سال پیش به طور موفقیت آمیزی القاء نمو بکرزایی در سلول تخم توسط گرده‌افشانی با گرده پرتودیده و به دنبال آن نجات جنین برای دستیابی به گیاهان هاپلوئید در خربزه و خیار مورد استفاده قرار گرفت (Sauton and Dumas 1987, 1988). علاوه بر این، تولید گیاه هاپلوئید با کمک این تکنیک در هندوانه و کدو تابستانه بدست آمد (Kurtar et al. 2002). در طول سال‌های بعدی ، اثر ژنوتیپ، زمان کاربرد، و دز پرتو بر تعداد گیاهان هاپلوئید به دست آمده در بررسی‌ها مورد توجه قرار گرفت. اخیراً، کاربرد این روش در القای هاپلوئید در کدو تنبل و کدو حلوایی گزارش گردید (Kurtar et al. 2009, Kurtar and Balkaya 2010). تلاش‌های بعدی در جهت بهینه سازی این روش در خیار و خربزه صورت گرفت (Lofti et al. 2003; Ari et al. 2010, Sari et al. 2010). از این رو، گرده‌افشانی با گرده پرتوتابی شده به عنوان یک روش کارآمد در القای هاپلوئیدی در گیاهان جالیزی شناخته شد.

نحوی عمل: پرتوتابی دانه گرده با موتاژن‌های فیزیکی (اشعه گاما اشعه ماورای بنفش و اشعه ایکس) به منظور عقیم کردن دانه گرده و القای بکرزایی در این روش استفاده می‌شود. اشعه گاما به خاطر سهولت کاربرد، قدرت نفوذ بالا، اثربخشی مطلوب و خطرات کمتر در برنامه‌های تولید گیاهان هاپلوئید به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد (Kurtar and Balkaya 2010). در این تکنیک، ابتدا دانه گرده با پرتوتابی توسط موتاژن فیزیکی عقیم می‌شود سپس پایه مادری با گرده عقیم شده گرده افشانی می‌شوند. با قرار گرفتن گرده پرتوتابی شده بر روی کلاله، دانه گرده قادر است بر روی کلاله جوانه زده و لوله گرده را در داخل خامه گل تشکیل دهد ولی توانایی بارور کردن سلول تخم‌زا و هسته‌های قطبی داخل کیسه جنینی را ندارد. غیر فعال بودن از لحاظ ژنتیکی و قدرت جوانه‌زنی گرده‌های پرتو دیده می‌تواند باعث تحریک تقسیم سلولی در سلول تخم‌زا گردد و بنابراین باعث القا بکرزائی و نمو میوه پاتنوکارپ گردد (Ari et al. 2010).

کارایی تکنیک گرده پرتوتابی شده در تولید هاپلوئیدی: انتخاب دز مناسب پرتو، شرایط رشد گیاهان مادری، بهینه سازی روش گرده افشانی، زمان برداشت میوه، روش تشخیص و استخراج جنین، مرحله نموی جنین، محیط کشت و شرایط کاشت از جمله مهم‌ترین فاکتورهای تأثیر گذار در موفقیت روش گرده پرتودیده و تعداد جنین و گیاه هاپلوئید نجات یافته دارد. Saton et al. (۱۹۸۹) میانگین ۰/۹ نسبت جنین به میوه را در خیار بدست آوردند. در حالی که Niemirowicz-Szczytt (۱۹۹۴) توانست تعداد ۴

4 - In vitro gynogenesis
5 - parthenogenesis

جنین به میوه را بدست آورند. همچنین Çağlar و Abak (۱۹۹۶) تعداد ۱۶ جنین به میوه را در خیار گزارش کردند. در کدو تابستانه،.Kurtar et al (۲۰۰۲) تعداد ۷/۵ جنین به میوه را گزارش کردند. در حالی که .Sari et al (۲۰۱۰) تعداد ۰/۷ جنین به میوه را در خربزه گزارش کردند. اخیراً، یک میانگین کارایی ۱۳/۷ جنین به میوه در کدو زمستانه بدست آمد (Kurtar and Balkaya 2010).

تعیین دز مناسب پرتو: تعیین دز مناسب جهت پرتوتابی دانه گرده یکی از مراحل با اهمیت در این روش می باشد. دزی مناسب است که حداکثر عقیمی دانه گرده را ایجاد نماید و در عین حال دانه‌های گرده پرتوتابی شده توانایی القاء تشکیل میوه پارتنوکارپ را در پایه مادری داشته باشند. با توجه به نتایج بررسی های مختلف دز مناسب جهت پرتوتابی و القاء هاپلوئید در گونه‌ها و یا حتی ارقام مختلف متفاوت می‌باشد. در بررسی انجام شده بر روی خربزه توسط Sauton (۱۹۸۸) دز ۳۰۰ گری پرتو گاما را به عنوان دز مؤثر گزارش کردند که این دز همچنین در تولید هاپلوئیدی در خیار به عنوان دز مناسب معرفی شد. .Faris et al (۱۹۹۹) اثر دزهای ۵۰ تا ۳۰۰ گری پرتو گاما را بر روی نمو جنین هاپلوئید در خیار مورد بررسی قرار دادند و دز ۱۰۰ گری را به عنوان دز مناسب گزارش کردند. در حالی که .Claveria et al (۲۰۰۵) دز ۵۰۰ گری را به عنوان دز مناسب معرفی کردند. برای تعیین دز معمولا گل نر که گلپوش های آن حذف گردیدند جهت پرتوتابی استفاده می‌شود. اگرچه در برخی بررسی ها از پرچم و یا جوانه گل جهت پرتوتابی استفاده کردند.

ژنوتیپ و قدرت رشد پایه مادری: ژنوتیپ، قدرت رشد و شرایط فیزیولوژیکی گیاهان مادری از جمله فاکتورهایی است که ممکن است در موفقیت القای جنین هاپلوئید تأثیرگذار باشد. اثر معنی دار ژنوتیپ گیاهان مادری بر تولید هاپلوئید در خیار، خربزه، و کدو تابستانه مشاهده گردید. علاوه بر این، قدرت رشد و وضعیت فیزیولوژیکی گیاهان مادری برای تشکیل خربزه هاپلوئید مهم بود. .Niemirowicz-Szczytt et al (۱۹۹۵) لاین‌های اینبرد خیار و هیبریدهای آن‌ها را به عنوان پایه مادری استفاده کردند و مشاهده کردند که تعداد کل جنین های هاپلوئید بدست آمده در هیبریدها نسبت به لاین‌های اینبرد بالاتر بود. Sestili و Ficcadenti (۱۹۹۶) تفاوت معنی داری در تعداد هاپلوئیدهای بدست آمده با گرده پرتو دیده در میان هیبرید های حاصل از تلاقی‌های دای‌آلل لاین های مختلف مشاهده کردند. بنابراین قدرت گیاه به نظر می‌رسد نقش مهمی در القاء جنین های هاپلوئید ایفا می‌کند.

زمانی از سال که گرده افشانی صورت می‌گیرد: زمانی از سال و یا ماهی که گرده‌افشانی با گرده پرتوتابی شده بر روی پایه مادری انجام می‌گیرد میزان کارایی این روش را در تولید گیاه هاپلوئید تحت تأثیر قرار می‌دهد. Sauton (۱۹۸۸) بالاترین عملکرد در تولید هاپلوئید را بین ماه‌های جون (تیرماه) و سپتامبر (شهریور ماه) گزارش کرد. در خیار تعداد جنین‌هایی که تولید گیاه هاپلوئید نمودند در تابستان بیشتر از بهار بودند. علاوه بر این، بالاترین تعداد گیاهان هاپلوئید خیار در ماه‌های جون و جولای توسط Çağlar و Abak (۱۹۹۹) بدست آمد. در کدو خورشی بیشترین تعداد جنین به بذر در سپتامبر و جون بدست آمد(Kurtar et al.2002). در کدو تنبل و کدو حلوایی تأثیر مثبت فصل بهار بر میزان جنین هاپلوئید مشاهده گردید (Kurtar and Balkaya 2010).

تشخیص، جداسازی و کشت جنین‌ها: علاوه بر فاکتورهای ذکر شده، روش تشخیص و نجات جنین از بذر یکی از فاکتورهای موثر در تولید هاپلوئیدی است. بعد از گرده افشانی با گرده پرتوتابی شده به خاطر عدم لقاح مضاعف، آندوسپرم در بذر تشکیل نمی‌شود اگرچه جنین‌های القاء شده نیازی به حضور آندوسپرم برای رشد اولیه خود ندارند. با این حال، توسعه کامل جنین نیازمند مواد ذخیره‌ای اندوسپرم می‌باشد. برای توسعه کامل جنین‌های القاء شده در بذور که فاقد آندوسپرم هستند نیازمند نجات جنین و کشت آن در شرایط دورن شیشه‌ای می‌باشد. رایج‌ترین محیط کشتی که برای نجات جنین استفاده می‌شود محیط کشت E20A است که توسط Sauton و Dumas (۱۹۸۷) برای تولید هاپلوئید خربزه تهیه گردید. عمومی‌ترین روش تشخیص بذرهای حاوی جنین باز کردن مستقیم همه بذرهاست که روشی دقیق ولی وقت‌گیر و پرهزینه است که ممکن است کارایی تولید را کاهش دهد (Sari et al. 2010). روش مؤثرتر تشخیص جنین با استفاده از رادیوگرافی با اشعه ایکس در بذرها است که بذرهای حاوی جنین

در حال نمو را شناسایی می‌کند (Claveria et al. 2005). استفاده از جعبه نوری و قرار دادن بذرها بر روی صفحه شفاف از دیگر روش‌های مؤثر در تشخیص بذرهای حاوی جنین می‌باشد..Lotfi et al (۲۰۰۳) روش کشت مایع را ابداع کردند که نشان دادند با کشت بذرهای استخراج شده بر روی محیط کشت مایع E20A حدود ۱۰ روز (قبل از نجات جنین بر روی محیط کشت جامد) تعداد گیاهان هاپلوئید را افزایش می‌دهد. افزایش تعداد ممکن است به خاطر توسعه بیشتر جنین‌ها در بذور و قابل تشخیص بودن بذور حاوی جنین در زیر صفحه نوری باشد. با این حال .Ari et al (۲۰۱۰) بیان کردند روش کشت مایع نسبت به روش استفاده از جعبه نوری، هزینه بالاتر دارد و مقرون به صرفه نیست. علاوه بر این، محیط کشت مایع به خاطر آلودگی‌های میکروبی بالا، خطر از دست دادن مواد گیاهی را افزایش می‌دهد.

بحث

گیاهان خانواده کدوئیان به خاطر گرده‌افشانی آزاد و بذرگیری سنتی غالباً از یکنواختی و ثبات کامل جهت معرفی به عنوان لاین اصلاحی برخوردار نیستند. با توجه به اینکه تولید لاین‌های خالص از طریق خودگشنی مکرر زمان زیادی نیاز دارد و معمولا گیاهان حاصله صد درصد هموزیگوس نمی‌باشند، از این رو روش هاپلوئیدی و هاپلوئیدی مضاعف با کوتاه کردن زمان مورد نیاز برای دست‌یابی به گیاه خالص نقش مهمی را در برنامه‌های به نژادی گیاهان جالیزی ایفاء می‌کند. روش‌های مرسوم نظیر کشت بساک، تخمک و تخمدان تلقیح نشده برای تولید هاپلوئید در گیاهان جالیزی موفقیت چندانی ندارد و موفق‌ترین روش در این خانواده القاء جنین‌های بکرزا با استفاده از گرده‌های پرتودیده و سپس نجات جنین‌ها در محیط کشت اختصاصی می‌باشد. موفقیت در تعداد گیاهان هاپلوئید حاصله، تابع چندین فاکتور از جمله ژنوتیپ و شرایط فیزیولوژی گیاهان مادری، دز مناسب پرتو، روش های جداسازی و نجات جنین می‌باشد که در استفاده از این تکنیک بایستی مورد توجه به‌نژادگر قرار گیرد.

منابع

1. Blakeslee, A.F.; Belling, J.; Farnham, M.E. & Bergner, A.D. 1922. A haploid mutant in the Jimson weed. Datura stramonium. Science, 55: 646-647
2. Çağlar G., Abak K., 1996. Efficiency of haploid production in cucumber. Cucurbit Genetics Coop. Rep. 19: 36-37.
3. Claveria E., Garcia-Mas J., Dolcet-Sanjuan R., 2005. Optimization of cucumber doubled haploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. J. Am. Soc. Hort. Sci. 130: 555-560.
4. Forster, B.P.; Heberle-Bors, E.; Kasha, K.J. & Touraev, A. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. Trends in Plant Science, 12: 368-375.
5. Guha, S. & Maheshwari, S.C. 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. Nature, 212: 97–98
6. Kurta r E.S., Balkaya A., 2010. 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 Tiss. Org. Cult. 102(3): 267-277.
7. Kurtar E.S., Balkaya A., Ozba kir M., Ofluoglu T., 2009. Induction of haploid embryo and plant regeneration via irradiated pollen technique in pumpkin (Cucurbita moschata Duchesne ex. Poir). Afr. J. Biotechnol. 8: 5944-5951.
8. Kurtar E.S., Sari N., Aba k K., 2002. Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). Euphytica 127: 335-344.
9. Lofti M., Alan A.R., Henning M.J., Jah n M.M., Earle E.D., 2003. Production of haploid and double haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. Plant Cell Rep. 21: 1121-1128.
10. Maluszynski, M.; Kasha, K.J.; Forster, B.P. & Szarejko, I. (Eds.). 2003. *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*, Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-1544-5, Dordrecht
11. Niem irowicz-Szczytt K., Faris N.M., Nikolova, V., Rakoczy-Troja nowska M., Malep szy S. 1995. Optimization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid production and doubling. In: *Cucurbitaceae* '94, G. Lester (ed.): 169-171.
12. Sari, N., Solmaz I., Kasap oglu S., Gursoy I., Szam osi C., Unlu H. et al., 2010. Effect of different pollination dates with irradiated pollens on fruit set, haploid embryo induction and plant obtention in Turkish (Kirkagac, Yuva and Hasanbey) melons. Acta Hort. 871: 639-648.

13. Sauton, A., 1989. Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* induced by irradiated pollen. Cucurbit Genetics Coop. 12: 22-23.
14. Sauton, A., Duma s de Vaulx R., 1987. Production of haploid plants in melon (*Cucumis melo* L.) as a result of gynogenesis induced by irradiated pollen. Agronomie 7: 141-147.
15. Sestili, S., Ficcade nti N., 1996. Irradiated pollen for haploid production. In: In vitro haploid production in higher plants: Oil, Ornamental and Miscellaneous Plants. J. Mohan Jain, S.K. Sopory and R.E. Veilleux (eds): Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands: 263-274.
16. Ari, E., Ikten H., Gocme n M., Coskun R., Eren A., 2010. Comparative evaluation of different embryo rescue techniques on parthenogenetic melon (Cucumis melo L.) fruits induced with irradiated pollen. Afr. J. Biotechnol. 9(33): 5347-5356.

Affecting Factors on efficacy of production of haploid by Induced parthenogenesis via pollination with irradiated pollen in *Cucurbitaceae* family

L. Bagheri[1*], R. Amiri-Khah[1], H.R. Bagheri[2]

1- Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran. 2- Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: lbagheri@nrcam.org

Abstract

The main objective of the research on the production of haploid cucurbit plants is to accelerate breeding programs through the use of homozygous double haploid lines (DHL) and to facilitate the selection of desired (e.g. disease-resistant) genotypes for breeding. Haploids can be obtained via the routes of androgenesis, gynogenesis or parthenogenesis. This review provides a summary of factors affecting the efficacy of Induced parthenogenesis via pollination with irradiated pollen as applied to the Cucurbitaceae family. The most common and best-known method of obtaining haploid cucurbit plants is via pollination with irradiated pollen, which induces parthenogenetic development of haploid embryos in plants. The embryos are extracted from immature seeds and cultured in vitro to facilitate the maturation and development of plants. In cucurbits, the first report success in obtaining haploid/ doubled haploid by irradiated pollen technique was achieved by Seton and Dumas de Vaulx (1987). This was confirmed and investigated further by other authors. Several factors could affect on the number of haploid embryos and plants obtained, such as donor plant genotype and vigour, determination of an appropriate dose of radiation, The time of the year and the month during which pollination with irradiated pollen takes place, and the method of embryo detection and isolation as well as the manner of handling the seeds.

Kay words: cucurbit plants, parthenogenesis, irradiated pollen, Haploid