القاء جنین های هاپلوئید از طریق پرتو گاما در توده های تجاری خربزه و طالبی

مصطفی ناصرترابی (۱)، شهاب صالحی (۱)، محمود لطفی (۲)

۱ و ۲- دانشجویان کارشناسی ارشد، ۳- استادیار گروه مهندسی تولیدات گیاهی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

گیاهان هاپلوئید و دابل هاپلوئید مواد ارزشمندی برای مطالعات ژنتیکی و سیتولوژیکی و همچنین اهداف اصلاحی می باشند. در این تحقیق هفت توده بومی شامل خربزه خاتونی مشهد، سوسکی زرد، سوسکی سبز ایوانکی، طالبی سمسوری ورامین، طالبی ساوه، گرمک اصفهان و قراملکی تبریز و دو رقم خارجی آناناسی و زرد قناری بعنوان مواد مادری استفاده شدند. گل های نر در چند مرحله جمع آوری و با پرتو گاما، دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ واحد گری حاصل از چشمه کبالت ۶۰ پرتوتابی شد و روز بعد با گرده های پرتوتابی شده عمل گرده افشانی انجام گرفت. این گرده ها باعث تشکیل میوه های طبیعی شدند.دوز ۲۵۰ گری برای عقیم سازی گرده ها کافی نبود و موجب تشکیل بذور طبیعی گردید ولی اغلب بذور داخل میوه های حاصل از دوز ۵۰۰ گری پوک بودند و تنها بعضی از آنها حاوی جنین های هاپلوئید فاقد آندوسپرم بودند. بهترین شرایط استریل سازی بذرها برای کشت در محیط مایع E20 غوطه ورسازی به بذور به مدت ۱۰ دقیقه محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰٪ بود و بیشترین جنین از این طریق در رقم سمسوری حاصل گردید. محلول پاشی تخمدان ها با جیبرلین ۷۵۰*ppm* موجب درشتی میوه ها شد ولی تاثیر آن در القای جنین معنی دار نبود. سطح پلوئیدی گیاهان حاصله از طریق شمارش کروموزومی و بررسی سلول های اپیدرمی صورت گرفت و هاپلوئید بودن آنها تأئید گردید .

واژه های کلیدی: هاپلوییید، خربزه، پارتنوژنسیس (بکرزایی)، پرتوتابی

مقدمه

از میان روش های مختلف برای تولید هاپلوئید در انواع گیاهان تیره کدوئیان از جمله کشت بساک، تخمک و تخمدان تلقیح نشده موفقیت چندانی ندارد (فیکادنی و همکاران،۱۹۹۹) . ایجاد گیاهان هاپلوئید از طریق القاء جنین‌های پارتنوژنیک با استفاده از گرده‌های پرتوتابی توسط ساتون و همکاران (۱۹۸۷)، ساری وآباک (۱۹۹۴)، دوره وهمکاران (۱۹۹۵)، فیکادنتی وهمکاران(۱۹۹۵)، لطفی وهمکاران (۲۰۰۳) و لیم و ارل (۲۰۰۸) گزارش شده است. این روش در حقیقت یک آپومیکسی (مصنوعی) از نوع بکرزایی است که در آن گرده‌های عقیم شده فقط نقش تحریک سلول‌های تخمزا را به عهده دارند. از معایب مهم این روش دسترسی محدود به پرتو گاما، درصد پایین جنین های القا شده، مشکل بودن شناسایی و نجات تعداد محدودی از جنین های القا شده از میان تعداد زیادی بذر حاصل از یک میوه است. تکنیک کشت مایع برای سهولت شناسایی جنین‌های القا شده و افزایش کارآیی پیشنهاد شد (لطفی و همکاران ۲۰۰۳). هدف از این تحقیق تولید گیاهان دابل هاپلوئید با استفاده از روش نجات جنین‌های القاء شده از طریق پارتنوجنسیس و رفع برخی از موانع موجود از جمله القاء بیشتر پارتنوجنسیس و کاهش آلودگی‌های محیطی به منظور استفاده در پروژه‌های آینده برای ایجاد وبررسی صفات مطلوب و منابع مقاومت می باشد.

مواد وروش ها

مواد گیاهی مورد نظر توده های بومی کشور شامل خربزه خاتونی مشهد، سوسکی زرد، سوسکی سبزایوانکی، طالبی سمسوری ورامین، طالبی ساوه ، گرمک اصفهان، قراملکی و ارقام تجاری وادداتی آناناسی و زرد قناری بودند که به دو صورت هیدروپونیک و کشت خاکی گلخانه‌ای در اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۷ کشت شدند. زمانی که در بوته ها به اندازه کافی گل‌های نر و دو جنسه ظاهر شدند گل‌های نر در روز قبل از شکوفایی و آزاد شدن گرده‌ها (گلبرگهای سبز مایل به زرد) درون یک پتری‌دیش جمع‌آوری و با دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ واحد پرتو گاما حاصل از چشمه کبالت ۶۰ پرتودهی و تا صبح روز بعد در دمای اتاق نگهداری می‌شدند تا گرده‌ها آزاد گردند. همزمان اخته و ایزوله نمودن گل‌های دو جنسه به‌منظور جلوگیری از گرده-افشانی ناخواسته انجام می‌شد.

روز بعد طی ساعات ۹ تا ۱۱ صبح عمل گرده‌افشانی دستی با ۳-۲ گل نر پرتوتابی شده روی هر یک ازگل-های ایزوله روز قبل صورت می‌گرفت. برای القا یا تقویت جنین‌های هاپلوئید تخمدان گلها دو روز بعد از تلقیح با جیبرلین ppm ۷۵۰ محلول‌پاشی شدند.

میوه‌های تشکیل شده سه الی چهار هفته بعد از گرده‌افشانی برداشت سپس بذور را از میوه خارج و بعد از شستشو با محلول ۲۰٪ سفید کننده‌های تجاری (حاوی ۵٪ هیپوکلرید سدیم) به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی نموده و بعد از آن بذرهای حاصل از میوه‌ها که پوک بودند را در محیط سترون (لامینارفلو) شستشو ودر محیط کشت اختصاصی مایع E20 (ساتون و دوماس۱۹۸۷) قرار می گرفتند (۴۰-۳۰ بذر در هر پتری دیش) و در اتاقک رشد به مدت ۸ تا ۱۵ روز نگهداری می‌شدند. پتری‌های حاوی بذور هر روز با دست تکان داده می‌شدند تا به جنین‌های احتمالی موجود در داخل بذور بدین وسیله هوادهی شود.

بدین‌ترتیب جنین‌های کوچک هاپلوئید داخل بذور به راحتی از بذور پوک قابل تشخیص بودند و جنین‌هایی که در مراحل مختلف رشدی بودند را خارج کرده و در محیط کشت E20 جامد کشت داده می‌شدند.

جنین‌هایی که رشد مطلوبی داشتند در ظروف کشت به ارتفاع ۱۵_۱۰ سانتی‌متر منتقل می‌شدند وهر کدام به عنوان یک لاین نامگذاری و چند بار از طریق کشت جوانه‌های جانبی واکشت و تکثیر می‌شدند. این تکثیر برای جلوگیری از دست رفتن لاین‌ها درطی مراحل مختلف آزمایش انجام شد.

تعیین سطح پلوئیدی به روش مستقیم از طریق شمارش کروموزومی صورت گرفت رنگ‌آمیزی سلول‌های مریستم نوک ریشه با استوکارمن و جهت شمارش کروموزوم‌ها از مریستم انتهایی ریشه گیاه داخل بطری استفاده شد. سلول‌های مریستمی بعد از رنگ‌آمیزی به روش فولگن و روش غیر مستقیم از طریق شمارش تعداد روزنه و مقدار کلروپلاست‌های موجود در روزنه مورد مشاهده قرار گرفتند.

نتایج و بحث

گرده‌ها پرتودیده باعث تشکیل میوه‌های طبیعی شدند.دوز ۲۵۰ گری برای عقیم‌سازی گرده‌ها کافی نبود و موجب تشکیل بذور طبیعی گردید ولی اغلب بذور داخل میوه‌های حاصل از دوز ۵۰۰ گری پوک بودند و تنها بعضی از آنها حاوی جنین‌های هاپلوئید فاقد آندوسپرم بودند. بهترین شرایط استریل‌سازی بذرها برای کشت در محیط مایع E20 دقیقه محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰٪ و ۳۰ ثانیه الکل ۷۵٪ بود و بیشترین جنین از این طریق در رقم سمسوری مشخص گردید. محلولپاشی تخمدان‌ها با جیبرلین ***۷۵۰ppm*** موجب درشتی میوه‌ها شد ولی تاثیر آن در القای جنین معنی‌دار نبود.

جنین های به دست آمده در مراحل نموی مختلفی قرارداشتند. گرچه بعضی جنین های نارستر (مرحله کروی و لپه ای) نیز قابلیت باززایی داشتند بهترین مرحله برای باززایی در محیط کشت مرحله قلبی شکل بود. جنین های قهوه ای هم به نظر می رسید پیش از استخراج سقط شده باشند. نسبت جنین و گیاه بدست آمده در ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت بود ودر پایان چهارلاین هاپلوئید (دو گیاه از رقم قراملکی، یک گیاه از رقم زرد ایوانکه و یک گیاه نیز از رقم سبز ایوانکه) باززایی شد.

منابع

1- Dore, C., L. Boulidard, A. Sauton, J-C. Rode, F. Cuny, K. Niemirowiecz-Szczytt, N. Sari and R. Dumas deVaulx. 1995. Interest of irradiated pollen for obtaining haploid vegetables. Acta. Hort. 392: 123-128

2- Ficcaadenti N., S. Sestili, S. Annibali, M. Di Marco and M. Schiavi. 1999. In vitro gynogenesis to induce haploid plants in melon *Cucumis melo* L. J. Genet. & Breed. 53:255-257

3- Lotfi. M,, Alan AR, Henning Mj, Jahn MM, Earl ED. 2003. 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.

4- Sari, N. Abak, K. Pirat, M. Rode, jc. And Dumas de Vaulx R (1994) Induction of Parthenogenic Haploid Embryos after Pollination by Irradiated Pollan in Watermelon. Hhortsienc. 29(10):1189-1190

5- Sauton, A. and R. Dumas de Vaulx. 1987. Obtention de plantes haploids chez le melon (*Cucumis melo L.*) par gynogenes induite par du pollen irradie.Agronomie 7(2):141-148

6- Lim. W,, ED. Earl. 2008. Effect of in vitro and in vivo colchicine treatment on pollen production and fruit set of melon plants obtained by pollination with irradiated pollen. Plant Cell Tiss Organ Cult 95:115-124

Abstract

Haploid and doubled haploid plants are valuable materials for genetic and cytogenetic studies as well as for plant breeding purpose. Seven field cultivar and tow non native cultivar used as maternal genotype. Male flower collected several times exposed to gamma radiation at 500 Gy. The following day pollination was performed with those irradiated pollen. These pollen caused fruit set naturally but with empty seed. Only some of these seed have haploid embryo that have no endosperm. After 3 or 4 week the embryo were rescued and cultured on liquid E20 medium then 8 day later the seed have embryo distinguished and transferred to solid E20 medium. Ploidy level determined with chromosome counting and morphological assay.

Key words: Haploid, Melon, Parthenogenesis, Embryo rescue, Irradiation.