القاء هاپلوئیدی در گردو بوسیله گرده‌های پرتو دیده (پوستر)

محمد سادات حسینی (۱)، کورش وحدتی (۱)، محمود لطفی (۱) و داراب حسنی (۲)

۱- گروه باغبانی، پردیس کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ۲- بخش تحقیقات باغبانی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

چکیده

در این پژوهش برای اولین بار تولید سه گیاه هاپلوئید در گردو با روش بکرزایی و کشت جنین‌های نابالغ گزارش می‌شود. هارتلی، پدرو، Z_{67} و Z_{63} بعنوان والد مادری و ژنوتیپ‌های Z_{53} و Z_{30} بعنوان والد پدری (گرده‌زا) انتخاب شدند. پرتو تابی گرده‌ها با اشعه گاما از منبع کبالت ٦٠ در چهار سطح ۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ٦٠٠ گری انجام شد. گرده‌افشانی با این گرده‌ها برروی تشکیل میوه‌ها و نمو جنین‌ها موثر بود. در روزهای ٤٥ و ۵۵ روز بعد از گرده‌افشانی میوه‌ها برداشت و جنین‌ها بیرون آورده شدند ودر محیط کشت DKW کشت شدند. برای غلبه بر دوره خواب، جنین‌ها ۳۰ روز در تاریکی در دمای ٤ درجه سانتی-گراد قرار گرفتند. بعد از جوانه‌زنی سطح پلوئیدی گیاهان بوسیله شمارش کروموزومها مشخص شد. گیاهان هاپلوئید برای پدرو، Z_{67} و Z_{63} در دو دوز ۳۰۰ و ٦٠٠ گری بدست آمدند. گیاهان حاصله از دوزهای ۵۰ و ۱۵۰ گری همگی دیپلوئید بودند. شرایط مناسب برای القاء هاپلوئیدی در گردو با روش پرتوتابی گرده ایجاد شد.

مقدمه

در گیاهان چوبی طول دوره تولید مثلی طولانی، درجه هتروزیگوسی بالا و اندازه بزرگ گیاه، بدست آوردن گیاهان خالص با روش‌های معمول را تقریبا غیر ممکن کرده است. عدم وجود لاین خالص در این گیاهان سبب شده است که مطالعات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی با مشکل روبه رو شوند و روند بسیار کندی را طی کنند (هافر و گراف، ۲۰۰۳).

مواد و روش‌ها

پرتوتابی دانه‌های گرده گردو بوسیله منبع کبالت ٦٠ در چهار سطح ۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ٦٠٠ گری انجام شد و سپس گل‌های ایزوله شده بوسیله پاکت‌های کاغذی،با این گرده‌ها گرده‌افشانی شدند. جهت انجام تست جوانه زنی گرده‌های پرتوتابی شده از محیط درون شیشه‌ای طبق روش لوزا و همکاران (۱۹۸۳) استفاده شد که حاوی ۲۰٪ ساکارز، یک میلی مول کلرید کلسیم، ۰/۱٦ میلی مول اسید بوریک و ٦/۵ گرم آگار بود. میوه‌های تشکیل شده، در روزهای ۳۵ و ٤٥ بعد از گرده افشانی برداشت شدند و جنین‌های حاصل از آنها در محیط DKW کشت گردیدند و برای غلبه بر خواب، جنین‌های کشت شده در محیطی تاریک با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ روز قرار گرفتند. به منظور تعیین سطح پلوئیدی از شمارش کروموزوم‌ها طبق روش فرولیچر و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد.

نتایج و بحث:

میزان جوانه‌زنی دانه گرده پرتو دیده با شاهد تفاوت معنی‌دار نبود اما دو زمان برداشت دارای تفاوت معنی‌داری بودند. در دوز ٦٠٠ گری اندازه میوه‌ها نسبت به دوزهای دیگر کوچکتر بود. دو عدد گیاه هاپلوئید در دوز ٦٠٠ گری برای Z_{67} و Z_{63} و یک عدد برای پدرو در دوز ۳۰۰ گری بدست آمدند. گیاهان حاصله از دوزهای ۵۰ و ۱۵۰ گری همگی دیپلوئید بودند. تولید گیاهان هاپلوئید در این روش به دوز پرتو، زمان برداشت، محیط کشت و طول تیمار سرمایی بستگی داشت.

منابع:
1- Froelicher Y., Bassene J.B., Jedidi-Néji E., Dambier D., Morillon R., Bernardini G., Costantino G., Ollitrault P. (2007) Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: Induced procedure and genetic analysis of plantlets. Plant Cell Rep. 26: 937-944.
2- Hofer M., Grafe Ch. (2003) Induction of double haploid in sweet cherry (*Prunus avium* L.). Euphytica. 130:191-197.
3- Luza G., Polito S. (1985) *In vitro* germination and storage of English walnut pollen. Scientia Hortic. 27:303-316.
4-Musial K., Przywara L. (1998) Influence of irradiated pollen on embryo and endosperm development in kiwifruit. Annals Bot. 82:747-756.
5-Chalak L., Legave J.M. (1997) Effects of pollination by irradiated pollen in 'Hayward' kiwifruit and spontaneous doubling of induced parthenogenetic trihaploids. Sci. Hortic. 68:83–93.
6-Zhang X.Y., LesspinasseY. (1991) Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetic plant in apple. Euphytica. 54:101-109.
7-Peixe A., Campos M.D., Cavaleiro C., Barroso J., Pais M.S. (2000) Gamma-irradiated pollen induces the formation of 2n endosperm and abnormal embryo development in European plum (*Prunus domestica cv.* Rainha Claudia Verda). Sci. Hortic. 86:267-278.
8-Yang A.F., Meng H., Zhang J.R (2005) *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujube* Mill. cv. Zhanhua. Plant Cell Rep. 24:671-676.
9- Kurtar E.S., Sari N., Abak K. (2002) Obtention of haploid embryos and plant through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). Euphytica 127:335-344.

Induction of haploid in walnut by irradiated pollen

Sadat Hosseini[a] M., Vahdati[a] K., Lotfi[a] M. and Hassani D[b]
[a] Department of Horticulture, Abouraihan Campus, University of Tehran, Tehran, Iran.
[b] Department of Horticulture, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran.

Abstract
For the first time in the world, we report the regeneration of three haploid lines in Persian walnut (*Juglans regia*) by *in situ* parthenogenesis followed by embryo culture. The cultivars 'Hartley', 'Pedro' and native selected genotypes 'Z_{63}' and 'Z_{67}' were selected as female parents for pollination with four levels of gamma-ray-irradiated pollens (50, 150, 300 and 600 Gy) of 'Z_{53}' and 'Z_{30}'. Pollination with such irradiated pollens induced fruit set and development of parthenogenetic embryos. The immature embryos of the nuts were extracted 30 and 45 days after pollination, and cultured in *in-vitro* culture. The embryos were stratified for 30 days at 4 ºC, for overcoming the dormancy. Ploidy level of the plantlets was determined by chromosome counting, flow cytometrical analysis and morphological studies. Haploid plants were obtained in 'Pedro', 'Z_{63}' and 'Z_{67}', after pollination with irradiated pollens at 300 and 600 Gy. The plants which obtained from 50 and 150 Gy, were diploid. The techniques used for induction of haploid walnut plants by irradiated pollen were very successful in this study.