تعیین دز مؤثر پرتو گاما در القای پارتنوژنز به منظور تولید لاین های خالص خربزه در شرایط گلخانه

لیلا باقری[1*]، محمود لطفی[2]

۱. پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج- ایران
۲. گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران- ایران

چکیده:

تولید لاین‌های خالص از گیاهان هاپلوئید خربزه، نیازمند به کارگیری روش‌های مؤثر دو برابر نمودن کروموزم است. در این راستا، به منظور تولید گیاهان هاپلوئید، از تکنیک گرده پرتوتابی شده استفاده گردید. در این روش، گل‌های ماده با گرده‌های پرتوتابی شده با پرتو گاما با دزهای مختلف (۲۵۰ تا ۵۵۰ گری)، گرده‌افشانی شدند. سه هفته پس از تلقیح، جنین‌ها از بذور، خارج شده و بر روی محیط کشت اختصاصی، کشت گردیدند. همچنین، جهت دو برابر نمودن کروموزوم از تیمار کلشی‌سین استفاده شد. نتایج تعیین دز موثر پرتو گاما نشان داد که در القای بکرزایی، دز ۵۵۰ گری موثرترین دز پرتو گاما بود. همچنین، از بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، توده‌های طالبی سمسوری و ساوه بالاترین درصد جنین به بذر را نشان دادند. با توجه به نتایج حاصله مشخص شد که، تولید گیاهان هاپلوئید، تحت تاثیر دز پرتو و ژنوتیپ قرار می‌گیرد. نتایج دو برابر نمودن کروموزوم با تیمار کلشی‌سین در گلخانه نیز نشان داد که موثرترین تیمار، غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلشی‌سین به مدت ۲۴ ساعت بود.

کلید واژه‌ها : دز مؤثر، کلشی‌سین، خربزه، گرده، بکرزایی

Determination of gamma effective dose in induction of parthenogenesis in order to produce of melon pure lines in greenhouse conditions

L. Bagheri[*1], M. Lotfi[2]

1. Nuclear Agriculture School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran.
2. Department of Horticulture, College of Aboureihan, University of Tehran, Tehran, Iran.

Abstract:

Production of pure lines from haploid melon plants require efficient chromosome doubling methods. In this regard, in order to produce haploid plants, the irradiated pollen technique was used. In this way, Female flowers were pollinated with gamma-irradiated pollen at different doses (250 to 550 Gy). Three weeks after inoculation, the embryos were removed from the seeds and cultured on a specific culture medium. Also, colchicine treatment was used to duplicate the chromosome. The results of determination of the effective dose showed that for induction of parthenogenesis, dose of 550 Gy was the most effective dose of gamma ray. The percent of embryos per seeds were the highest in Samsoori and Saveh cultivars. As a result of the present study, haploid plants production influenced by gamma ray doses and genotypes .The results of chromosome duplication with colchicine treatment in the greenhouse also showed that the most effective treatment was 1000 mg. l^{-1} of colchicine for 24 h.

Key words: Effective dose, Colchicine, Melon, Pollen, Parthenogenesis

Email: llbagheri@aeoi.org.ir

۱. مقدمه

خربزه یکی از مهم‌ترین محصولات صیفی در کشور است . در سال‌های اخیر، تقاضا برای این محصول به خاطر ارزش غذایی و افزایش میزان تولید آن به طور گسترده‌ای افزایش یافته است. برنامه‌های به‌نژادی این گونه عمدتاً بر اساس تولید لاین‌های خالص به عنوان مرحله اساسی در تولید ارقام هیبرید به منظور توسعه ارقام پر محصول و همچنین مقاوم به آفات و بیماری‌ها و تنش‌های محیطی می‌باشد. تکنیک هاپلوئیدی و دابل هاپلوئیدی با کوتاه کردن زمان مورد نیاز برای دستیابی به گیاه هموزیگوس نقش مهمی را در برنامه‌های بهنژادی گونه‌های مختلف زراعی ایفا می‌کند . گیاهان هاپلوئید می‌توانند از طریق روش‌های آندروژنسیس و پارتنوژنسیس بدست آیند [۱]. روش‌های مرسوم دابل هاپلوئیدی 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 پارتنوژنیک با استفاده از گرده‌های پرتودیده و سپس نجات جنین‌ها در محیط کشت اختصاصی می‌باشد [۲]. در حال حاضر، بررسی‌های مختلف تکنیک گرده‌های پرتو دیده (اشعه گاما، اشعه ایکس و فرابنفش) را به عنوان تکنیکی موثر در تولید گیاهان هاپلوئید معرفی می‌کنند [۲ - ۵]. پرتو گاما به خاطر کاربرد راحت، نفوذ خوب، اثربخشی بالا و خطرات کمتر در برنامه‌های تولید گیاهان هاپلوئید به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. گرده پرتو دیده از لحاظ ژنتیکی غیر فعال بوده و قادر به باروری سلول تخم نیست ولی در سطح کلاله جوانه می‌زند که باعث تحریک به تقسیم سلولی در سلول تخم گردد و بنابراین باعث القا پارتنوجنسیس یا نمو میوه پارتنوکارپ می‌گردد [۶]. تولید جنین هاپلوئید و بدست آوردن گیاه به کمک تکنیک گرده پرتودیده در گیاهان جالیزی از جمله خربزه [۲، ۴]، خیار [۷]، هندوانه [۸] و کدو [۵] مورد بررسی قرار گرفت. انتخاب دز مناسب پرتو، شرایط رشد گیاهان مادری، بهنیه سازی روش گرده افشانی، زمان برداشت میوه، مرحله نموی جنین، محیط کشت و شرایط کاشت از جمله مهم‌ترین فاکتورهای تاثیر گذار در موفقیت این تکنیک و تعداد جنین‌های هاپلوئید نجات یافته دارد. بنابراین با توجه به فاکتورهای متعدد تاثیرگذار در موفقیت این روش این آزمایش به منظور دستیابی به روش جامع و موثر برای تولید گیاهان هاپلوئید جهت تولید لاین خالص در توده‌های خربزه ایرانی صورت گرفت.

۲. روش کار

بذور توده‌های شش رقم خربزه و طالبی بومی ، دو رقم وارداتی (آناناسی و زرد قناری) و شش بذر گیاهان هیبرید حاصل از تلاقی توده‌های ایرانی با ارقام خارجی تهیه شد (جدول ۲). در زمان گلدهی، گل‌های نر در چند نوبت درست قبل از شکفتن جمع‌آوری شده و با دزهای مختلف پرتوی گاما (۲۵۰، ۳۵۰، ۴۵۰ و ۵۵۰ گری) پرتودهی شدند. هر گل ماده با استفاده از دو عدد گل نر پرتوتابی شده، گرده‌افشانی شد و با کپسول‌های ژلاتینی پوشانده شدند. میوه‌های تشکیل شده سه هفته، پس از گرده افشانی جمع‌آوری شدند. میوه‌های برداشت شده در آزمایشگاه استریل سطحی شدند، سپس بذرها از داخل آنها خارج گردید. پس از شناسایی بذوری که حاوی جنین بودند، این بذور توسط محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۲۰ دقیقه در زیر هود لامینار ضدعفونی شدند. پس از این مدت بذرها چندین بار با آب مقطر استریل شسته شدند. پس از ضدعفونی، جنین‌های موجود از داخل بذور خارج شده و در محیط کشت جامد E20A کشت شدند. جنین‌هایی که از قابلیت نمو و باززایی برخوردار بودند، چند روز بعد از کشت، شروع به رشد نمودند و چندین بار، در محیط کشت جامد ریزازدیادی شدند. سپس گیاهچه‌ها در اتاقک رشد در ۲۵ درجه سانتی گراد، نگهداری شدند. بعد از سازگاری، گیاهچه‌ها به گلخانه منتقل شدند. جهت تعیین سطح پلوئیدی گیاهچه‌های حاصله علاوه بر بررسی‌های مورفولوژیکی، از روش شمارش کروموزومی سلول‌های مریستمی انتهای ریشه براساس روش تغییر یافته فولگن [۲] استفاده گردید. جهت دو برابر نمودن کروموزوم با تیمار کلشی‌سین در شرایط گلخانه‌ای (*in vivo*)، گیاهان، در معرض تیمار کلشی‌سین با غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفتند. مریستم انتهایی شاخه اصلی در مدت زمان‌های

۱۲ و ۲۴ ساعت در محلول کلشی‌سین قرار گرفتند. بعد از اتمام مدت زمان تیمار سرشاخه‌ها با آب شیر شسته شدند تا کاملاً از محلول کلشی‌سین پاک شوند.

۳. نتایج و بحث:

نتایج نشان داد که با افزایش میزان دز پرتو گاما میزان تشکیل میوه کاهش و میزان میوه‌های بدون بذر (پوک) افزایش یافت. بیشترین میوه‌های تولید شده حاوی بذر پر در دز ۲۵۰ گری (۸۱٪) بود. با افزایش میزان دز پرتو تا ۴۵۰ گری تولید میوه حاوی بذر پر مشاهده گردید اگرچه روند کاهشی نشان داد. تمام بذور میوه های حاصل از گل‌های گرده افشانی شده با گرده‌های پرتوتابی شده با دز ۵۵۰ واحد گری پوک بودند. با توجه به این نتایج دز ۵۵۰ گری پرتو گاما به عنوان دز موثر برای پارتنوجنسیس موفق در توده‌های خربزه ایرانی مشخص گردید (جدول ۱). گزارش گردید که تولید جنین و گیاه هاپلوئید از دزهای پایین تر پرتو در کدو تابستانه [۵]، کدو تنبل [۶] و کدو تلخ [۱۳] با موفقیت صورت گرفت در حالی که در هندوانه [۳، ۱۲]، خربزه [۴] و خیار [۱۰] دزهای بالاتر پرتو ضروری بود. بررسی حاضر نشان داد که دز بالای پرتو (۵۵۰ گری) برای ایجاد جنین‌های پارتنوژنتیک در توده‌های بومی خربزه موثر بود.

جدول ۱. تاثیر گرده پرتوتابی شده با دزهای مختلف پرتو گاما بر تشکیل میوه و جنین در توده های خربزه ایرانی

دز پرتو گاما	تعداد گل گرده‌افشانی شده	تعداد میوه تشکیل شده (٪)	تعداد میوه با بذر پر (٪)	تعداد میوه با بذر پوک (٪)
۲۵۰	۸۶	۶۸	۸۱	۱۹
۳۵۰	۲۹	۶۶	۵۸	۴۲
۴۵۰	۱۷	۵۹	۳۰	۷۰
۵۵۰	۱۲۳	۵۵	۰	۱۰۰
مجموع	۲۵۵	۱۵۵	۶۱	۹۴

با توجه به نتایج موجود در جدول ۲، درصد بسیار کمی از بذرهای پوک حاوی جنین بودند و جنین‌های که استخراج شده و نجات یافتن از لحاظ نموی در مراحل مختلفی از مرحله کروی، قلبی شکل و لپه‌ای قرار داشتند. به طور کلی ۲۷۴ جنین نجات یافتند که اکثریت آن‌ها در مرحله کروی و قلبی شکل بودند. برخی از جنین‌های که در مراحل قلبی شکل و لپه‌ای بودند قادر به باززایی به گیاه را داشتند (جدول ۳). بر طبق گزارشات قبلی میزان باززایی تحت تاثیر مرحله نموی جنین قرار می‌گیرد و مرحله لپه‌ای بالاترین میزان باززایی را دارد که نتایج حاضر دارای تطابق است[۳، ۶، ۷]. بالاترین درصد جنین به بذر در طالبی سمسوری (۱/۲ ٪) و طالبی ساوه (۱/۱ ٪) بدست آمد و کمترین درصد در هیبرید آناناسی × سمسوری بود. بیشترین درصد نسبت گیاه به بذر در طالبی ساوه (۰/۲۶ ٪) و کمترین در هیبریدها مشاهده شد و در دو هیبرید سوسکی زرد × آناناسی و خاتونی × هانی دیو گیاهی بدست نیامد. این نتایج با یافته‌های لطفی و همکاران [۲] مطابق دارد که مشاهده کردند بیشترین درصد تولید جنین در توده طالبی سمسوری و گروه کانتالوپنسیس نسبت به گروه اینودروس می‌باشد. نهایتاً تعداد ۵۲ گیاهچه بدست آمده که از طریق قلمه تک‌گره در شرایط این‌ویترو ریزازدیادی شدند. گیاهچه‌های بدست آمده بعد از سازگاری و مقاوم سازی در شرایط گلخانه نگهداری شدند. بررسی مورفولوژیکی گیاهچه‌های بدست آمده نشان داد که گیاهان هاپلوئید ضعیفتر و دارای برگها و گل‌های کوچکتر نسبت گیاهان دیپلوئید بودند. برای اطمینان بیشتر از سطح پلوئیدی گیاهان بدست آمده از روش شمارش کروموزومی استفاده گردید که از این طریق هاپلوئید بودن گیاهان حاصله (n=۱۲) تایید شد و با تعداد کروموزوم‌های گیاهان دیپلوئید (۲n=۲۴) مقایسه شدند. میزان زنده‌مانی سرشاخه‌های گیاهان تیمار شده در گلخانه بسته به غلظت کلشی‌سین بین ۶۸/۵ و ۸۵ درصد بود. با وجود اینکه با افزایش غلظت کلشی‌سین باززایی کاهش یافت ولی بیشترین میزان دیپلوئید شدن در تیمار ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر به مدت ۲۴ ساعت در گیاهچه‌هایی که دارای تعداد گرده بیشتر از ۲۰ عدد بودند

حاصل شد. دوبل شدگی در گیاهان هاپلوئید تیمار شده با ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر کلشی‌سین به مدت ۱۲ ساعت رخ نداد در حالی که افزایش غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تحت تیمار میزان دو برابر شدن کروموزم‌ها افزایش داد.

جدول ۲- القایی جنین و گیاهان هاپلوئید پارتنوژنتیک بدست آمده از گرده‌افشانی با گرده پرتوتابی شده در خربزه ایرانی

گیاهان مادری	تعداد میوه	تعداد بذر سالم	تعداد جنین	نسبت جنین به بذر٪	مرحله جنینی			تعداد گیاه بدست آمده
					کروی	قلبی شکل	لپه‌ای	
خاتونی مشهد	۱۹	۴۹۱۳	۳۹	۰/۷۹	۱۵	۱۰	۱۴	۸
سوسکی زرد ایوانکی	۹	۲۴۳۷	۲۱	۰/۸۶	۱۳	۴	۴	۳
سوسکی سبز ایوانکی	۱۲	۳۱۷۵	۲۷	۰/۸۵	۱۵	۷	۸	۵
طالبی سمسوری	۱۳	۳۰۹۵	۳۷	۱/۲۰	۱۶	۹	۱۱	۷
طالبی ساوه	۱۶	۳۸۹۲	۴۳	۱/۱۰	۱۴	۱۴	۱۳	۱۰
گرمک اصفهان	۱۷	۴۶۹۱	۴۵	۰/۹۶	۲۰	۱۴	۱۲	۷
آناناسی	۴	۱۲۱۸	۹	۰/۷۴	۲	۲	۵	۳
زرد قناری	۲	۶۷۸	۳	۰/۴۴	۰	۱	۲	۱
آناناسی× گرمک	۹	۲۰۵۴	۱۶	۰/۷۸	۴	۷	۴	۵
سوسکی زرد × هانی دیو	۵	۱۰۰۰	۸	۰/۸۰	۴	۲	۲	۱
آناناسی × سمسوری	۱۱	۲۲۰۰	۷	۰/۳۲	۳	۲	۲	۱
آناناسی × ساوه	۶	۱۲۰۰	۷	۰/۵۸	۵	۱	۱	۱
سوسکی زرد × آناناسی	۷	۱۴۰۰	۸	۰/۵۷	۶	۲	۰	۰
خاتونی × هانی دیو	۴	۸۰۰	۴	۰/۵	۲	۱	۱	۰
مجموع/میانگین	۱۳۴	۳۲۷۵۴	۲۷۴	۰/۷۵	۱۲۰	۷۵	۷۹	۵۲

جدول ۲- اثر تیمار گلخانه‌ای کلشی‌سین بر زنده‌مانی و تعداد دانه گرده گیاهان هاپلوئید بکرزا رشد یافته در گلخانه

تیمار کلشی‌سین(mg/l)	مدت زمان تیمار کلشی‌سین	تعداد گیاه تیمار شده	تعداد زنده‌مانی	تعداد دانه گرده		
				<۵	۵-۲۰	>۲۰
۵۰۰	۱۲	۸	۸۷ a	۷۱	۲۹	۰
	۲۴	۱۰	۸۰ a	۵۰	۲۵	۲۵
	کل	۱۸	۸۵ a	۶۰	۲۷	۱۳
۱۰۰۰	۱۲	۱۱	۶۴ b	۴۲	۲۹	۲۹
	۲۴	۸	۶۳ b	۶۰	۰	۴۰
	کل	۱۹	۶۸/۵ b	۵۰	۱۷	۳۳
کل		۳۷	۷۴	۵۲	۲۴	۲۴

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱ درصد اختلاف معنی دار ندارند

۵. نتیجه‌گیری کلی

موفق‌ترین روش در القاء جنین‌های پارتنوژنز در خربزه و طالبی، استفاده از گرده‌های پرتودیده می‌باشد. همچنین، با توجه به نتایج تعیین دز موثر برای القای هاپلوئیدی، دز ۵۵۰ گری بعنوان دز بهینه مشخص گردید. همچنین، موثرترین روش جهت دیپلوئید نمودن در تیمار گلخانه با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۲۴ ساعت می‌باشد.

۶. منابع

1- Germana, M.A., Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell Tissue Organ Culture Journal. 104,283–300 (2011).
2. Lotfi, M., A. Kashi, Z. Zamani,.B. Tabatabaee,. Efficient production of haploid plants to create pure lines in melon (cucumis melo L.). Iranian Journal of Agricultural Sciences. 43, 55-65 (2004) (In Persian).
3- Godbole, M. and H. N. Murthy. Parthenogenetic haploid plants using gamma irradiated pollen in snapmelon (*Cucumis melo* var. momordica). Plant Cell Tiss Organ Culture. 109, 167–170 (2012).
4- Lotfi, M. A.R. Alan, M.J. Henning, M. Jahn, E.D. Earle. 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(2003).
5- Kurtar, E.S. A. Balkaya. 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 Tissue Organ Cult. 102, 267–277 (2010).
6- Chahal, G. S. and S. S. Gosal. Principles and procedures of plant breeding. Alpha Science, Oxford. pp: 399-412 (2002).
7- Faris, N.M. V. Nikolova, K. Niemirowicz-Szczytt. The effect of gamma irradiation dose on cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo production. Acta Physiology Plant. 21,301–396 (1999).
8- Gursoz, N. K. Abak, M. Pitrat, J.C. Rode, and R. Dumas de Vaulx. Obtention of haploid plants induced by irradiated pollen in watermelon (*Citrullus lanatus*). Cucurbit Genetic Coop. 14, 109–110 (1991).