مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۴، شماره ۱، سال ۱۳۸۲ (۶۵-۵۵)

تولید کارآمدگیاهان هاپلویید به منظور ایجاد لاین‌های خالص درخربزه (*Cucumis melo L.*)

محمود لطفی[۱]، عبدالکریم کاشی[۲]، ذبیح‌اله زمانی[۳]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی[٤] و الیزابت ارل[٥]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق دوره دکتری، استاد و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
٤، استادیار دانشگاه صنعتی اصفهان، ٥، استاد گروه اصلاح نبات دانشگاه کورنل – امریکا
تاریخ پذیرش مقاله ۸۱/۸/۸

خلاصه

گیاهان هاپلویید از چند توده خربزه ایرانی و دو تا از هیبریدهای پروژه مقاومت مرکب به ویروس‌ها از طریق نجات جنین‌های پارتنوژنتیک (بکرزا) القا شده بوسیله گرده‌های پرتو دیده تولید گردید. از مجموع ۱۳٦ جنین به دست آمده در توده‌های ایرانی ۵۵ گیاه باززایی شد. نسبت جنین‌های به دست آمده با توجه به ژنوتیپ‌های مختلف از ۵٪ در طالبی سمسوری تا ۰،٤٪ در خربزه طلایی متفاوت بود. در سری دوم (هیبریدها) ضمن افزایش کارآیی از طریق ابداع روش استفاده از کشت مایع برای شناسایی و نجات جنین‌ها از مجموع ۲۳۹ جنین یافت شده ۱۷٦ گیاه باززایی گردید. در روش معمول تعداد زیادی بذر باید جهت یافتن و استخراج جنین‌های موجود مورد بازبینی قرار گیرند که کاری دشوار و وقت‌گیر می‌باشد اما کشت بذور در محیط مایع علاوه بر افزایش کمی و کیفی جنین‌های به دست آمده موجب سهولت تشخیص و استخراج آنها می‌گردد. بدین ترتیب می‌توان به آسانی به تعداد کافی گیاه هاپلویید برای مشاهده تفرق صفات و دستیابی به ژنوتیپ مورد نظر دست یافت. در روش کشت تخمدان‌های تلقیح نشده (ماده زایی) که جهت مقایسه انجام شد از مجموع ۱۲٦ تخمدان کشت شده تنها ۳ جنین در رقم خاتونی به دست آمد که بیانگر کارآیی ضعیف و وابستگی شدید آن به ژنوتیپ برای تولید گیاهان هاپلویید در خربزه می‌باشد. هاپلویید بودن گیاهان حاصله در مرحله اول با روش شمارش کروموزومی و در مرحله دوم از طریق فلوسیتومتری و همچنین صفات مورفولوژیکی مورد تایید قرار گرفت. دو مورد دوبله شدن خودبخودی مشاهده شد و مابقی گیاهان حاصله برای دیپلویید شدن در شرایط مختلف تحت تیمار کولشیسین قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: هاپلویید، خربزه، پارتنوژنسیس (بکرزایی)، کشت مایع، نجات جنین، پرتوتابی

مقدمه

انواع خربزه و طالبی که تیپ‌ها و گروه‌های مختلف یک گونه را تشکیل می‌دهند، از زمان‌های قدیم جایگاه ویژه‌ای در تغذیه مردم کشور ما داشته‌اند. ایران با تولید بیش از ۱،۱۰۰،۰۰۰ تن خربزه در سال ۲۰۰۰ مقام چهارم را در جهان دارا می‌باشد و این در حالی است که با وجود افزایش چشمگیر تولید خربزه طی دهه گذشته سهم ایران در این مدت از ۹/۲٪ تولید کل به ۵/۷٪ کاهش یافته است. این گیاه جالیزی در سالهای اخیر مورد توجه بسیاری از کشورها قرار گرفته و موسسات و شرکت‌های اصلاح بذر تحقیقات وسیعی را جهت معرفی ارقام جدید با خصوصیات کیفی بالا، مقاوم به بیماریهای مختلف و مناسب برای کشت در اقالیم گوناگون آغاز نموده‌اند. توده‌های بومی متعددی از خربزه و

مکاتبه کننده: محمود لطفی

Archive of SID
www.SID.ir

طالبی در نقاط مختلف کشور ما کشت و کار می‌شوند که بعضی از آنها از صفات کیفی و کمی فوق العاده‌ای برخوردارند و در صورت خالص سازی و تلاقی آنها با لاینهای دارای صفات مطلوب نظیر مقاومت به بیماریها می‌توان ارقام با ارزش و قابل ارائه به بازارهای جهانی را بوجود آورد.

طی چند سال گذشته روش دابل‌هاپلوییدی بصورت موفقیت‌آمیز و امیدبخشی برای تسریع برنامه‌های اصلاحی بعضی گیاهان مهم زراعی بکار گرفته شده است. درحالیکه تلاشهای انجام شده برای تولید گیاهان هاپلویید در خربزه و سایر انواع کدوییان از روشهای معمول کشت بساک و تخمک موفقیتی در پی نداشت (۵) در سال ۱۹۸۷ تولید اولین گیاهان هاپلویید در خربزه از طریق القاء جنینهای پارتنوژنتیک با استفاده از گرده‌های پرتوتابی شده توسط ساتون و همکاران گزارش گردید (۱۵). این روش در حقیقت نوعی ماده‌زایی بود که در آن از گرده‌های عقیم شده برای تحریک سلول تخم‌زا استفاده می‌شد و جنین‌های القاء شده ۵-۳ هفته پس از گرده‌افشانی استخراج و در محیط درون شیشه‌ای نمو می‌یافتند. اگرچه بعدها این روش توسط سایر محققین و در سایر انواع کدوییان نیز مورد تایید و بررسی بیشتر قرار گرفت [ساتون (۱۹۸۹) در خیار(۱۴)، کانی و همکاران (۱۹۹۲) در خربزه(۳)، ساری و همکاران (۱۹۹۴) در هندوانه(۱۲)، فیکادنتی و همکاران (۱۹۹۵) در خربزه (۷)، چاگلر و همکاران (۱۹۹۹) و لطفی و همکاران (۱۹۹۹) در خیار (۲، ۸)] ولی عدم دسترسی به منبع پرتو گاما، درصد پایین جنین‌های القا شده، دشوار بودن تشخیص و نجات جنین‌های القا شده از طریق باز نمودن تعداد زیادی بذر، مشکلات دو برابر کردن کروموزومها و در نهایت تعداد کم لاینهای به دست آمده، استفاده از آن را در برنامه‌های اصلاح خربزه محدود می‌نمود. ساوین و همکاران(۱۹۸۸) و ساتون و همکاران(۱۹۸۹) پیشنهاد نمودند از روش پرتونگاری با اشعه ایکس نرم برای تشخیص جنین‌ها در داخل بذر بدون بازکردن آنها استفاده گردد (۱۶، ۱۷). در سال ۱۹۹۹ فیکادنتی و همکاران ضمن اشاره به مشکلات یاد شده تلاش نمودند از کشت تخمدانهای تلقیح نشده به عنوان روشی جایگزین استفاده نمایند و اگرچه موفق شدند تعدادی گیاه هاپلویید تولید نمایند ولی کارآیی واقعی آن نسبت به روش قبلی مقایسه نگردید (۶). در این تحقیق سعی گردید ضمن بررسی واکنش توده‌های مهم خربزه ایرانی به تولید گیاهان هاپلویید با استفاده از روش نجات جنین، با ابتکار در رفع برخی موانع یاد شده از آن بطور کارآمد در پروژه تولید لاینهای مقاوم به ۴ ویروس بهره‌برداری و ضمنا کارایی دو روش مذکور نیز مورد مقایسه قرارگیرد.

مواد و روشها

گیاهان مادری

این تحقیق در دو مرحله مختلف یکی در مورد چند توده مهم بومی ایران (خاتونی مشهد، زرد ایوانکه، سوسکی سبز ایوانکه، طالبی سمسوری ورامین، ابرامه اصفهان، شهد شیراز، گرمک اصفهان و خربزه طلایی) و تعدادی از هیبریدهای آنها در گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و دیگری در مورد دو هیبرید منتخب از پروژه اصلاح مقاومت مرکب به چهار ویروس مهم[1] در گروه اصلاح نبات دانشگاه کورنل[2] آمریکا طی یک فرصت مطالعاتی انجام شد. مشخصات این دو هیبرید به شرح ذیل می‌باشد:

هیبرید آ [(WCPM339 x ZCPM339)F5 x (HMX0583)] F1

هیبرید ب [(WCPM339 x ZCPM339)F5 x (Galia A)] F1

که در آنها والد اول نسل پنجم حاصل از تلاقی دو لاین مقاوم به ویروس‌های موزاییک هندوانه و موزاییک خیار و موزاییک زرد زوخینی، موزاییک خیار و سفیدک سطحی و والدهای دوم دو لاین مطلوب تجاری (اچ ام ایکس۰۵۸۳ شرکت هریس موران[3] و گالیا آ شرکت هولر[4]) می‌باشند.

پرتودهی گرده و نجات جنین

در سری اول گیاهان مادری به روش معمول در نیمه اردیبهشت ۱۳۷۹ در مزرعه و در سری دوم در اردیبهشت ماه ۱۳۸۰ به روش گلدانی در داخل گلخانه کشت و با محلول‌های غذایی تغذیه شدند. زمانیکه به اندازه کافی گلهای نر و ماده ظاهر می‌شدند، گلهای نر درست در روز قبل از شکفتن (گلبرگ‌های سبز مایل به زرد) جمع آوری و با دز ۲۵۰ واحد گری پرتو گاما (در مورد اول چشمه کبالت ۶۰ در مرکز تحقیقات پزشکی و کشاورزی هسته‌ای کرج و در مورد دوم چشمه سزیم ۱۳۷ در دانشگاه کورنل) پرتودهی و تا صبح روز بعد در دمای محیط نگهداری می‌شدند. در این زمان هر گل

1 . Multiple Virus Resistance project
2 . Cornell University
3 . Harris Moran Seed Co.
4 . Hollar Seed Co.

Archive of SID

www.SID.ir

ماده که در صورت نیاز از روز قبل برای جلوگیری از گرده‌افشانی ناخواسته، اخته و ایزوله شده بود با استفاده از ۳-۲ گل نر پرتوتابی شده و یا در مواردی به عنوان شاهد با استفاده از گلهای نر سالم گرده افشانی می‌شد.

میوه‌های تشکیل شده ۲۳-۲۱ روز پس از گرده‌افشانی برداشت و تا زمان استفاده در دمای محیط نگهداری می‌شدند. این میوه‌ها با محلول ۲۰٪ سفید کننده‌های تجاری (حاوی ۵٪ هیپوکلریت سدیم) به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی سطحی و در محیط سترون (لامینار فلو) شکافته می‌شدند. سپس تمام بذرهای موجود در آنها خارج گردیده روی کاغذهای استریل تمیز شده و یکی یکی جهت یافتن جنین‌ها با کمک ابزار جراحی باز می‌شدند (شکل ۲). جنین‌های یافت شده بر روی محیط کشت اختصاصی‌ای۲۰ (ساتون و دوماس دولکس ۱۹۸۷) کشت (۳ جنین در هر شیشه کشت یا ظرف پتری) و در اطاقک‌های رشد نگهداری می‌شدند.

شکل ۱- میوه حاصل از گرده‌افشانی با گرده‌های پرتودیده در رقم زرد ایوانکی

شکل۲-بازکردن تک تک بذرها جهت جستجو و استخراج جنین‌های هاپلویید القا شده

ابداع روش کشت مایع برای تشخیص جنینها

از آنجا که باز کردن تک‌تک بذرها کاری بسیار وقت‌گیر و مشکل بود در سال دوم با استفاده از تجربیات پیشین و پس از مدتی انجام بررسی‌های مقدماتی جهت رفع موانع و یافتن بهترین شرایط کشت که در اینجا از ذکر آنها صرف‌نظر می‌گردد، روشی ابداع گردید که در آن از کشت مایع بذور برای تشخیص و نجات جنین‌ها استفاده می‌گردد. در این روش بذرها پس از خارج شدن از میوه و شستشو در محیط سترون بصورت شناور در محیط کشت مایع‌ای۲۰ قرار می‌گرفتند (۹۰-۸۰ بذر در هر ظرف پتری ۲۰×۱۰۰ حاوی ۲۰ میلی‌لیتر مایع) و بر روی یک شیکر ملایم (۳۰ دور در دقیقه) و زیر نور کافی در اطاقک رشد نگهداری می‌شدند. بعد از حدود ۱۰ روز بذرهایی که حاوی جنین بودند بواسطه آنکه جنینهای آنها رشد کرده و یا به رنگ سبز گراییده و حتی در بعضی موارد ریشه‌چه آنها خارج شده بود به راحتی قابل تشخیص بودند. بدین ترتیب این جنینها خارج شده و طبق روش معمول بر روی محیط کشت جامد کشت می‌شدند (شکل۴ و ۵).

رشد و تکثیر گیاهان به دست آمده

جنین‌هایی که خوب رشد می‌کردند و گیاهچه‌های کاملی را تشکیل می‌دادند بطور جداگانه در ظروف کشت با ارتفاع ۱۵-۱۰ سانتیمتر و دربهای شفاف منتقل می‌شدند (شکل ۳). سپس هر گیاه بنام یک لاین نامگذاری و طی یک یا چند مرحله از طریق کشت جوانه انتهایی و میانگره‌های آن در محیط کشت تازه تکثیر می‌شد (شکل ۶). این تکثیر به منظور جلوگیری از دست رفتن لاین‌ها در طی مراحل مختلف و بویژه تیمار با کولشیسین انجام می‌شد. گیاهان به دست آمده پس از شستشوی کامل ریشه‌ها از محیط کشت و آگار به بسترهای خاکی (در مورد اول پرلیت و در مورد دوم ترکیب پیت ماس و ورمیکولیت) منتقل شدند و پس از مقاوم سازی تدریجی نسبت به هوای محیط در داخل اطاق رشد و یا پس از انتقال به گلخانه برای دیپلویید شدن تحت تیمارهای مختلف کولشیسین قرار گرفتند. (آزمایش جداگانه‌ای برای یافتن مناسب‌ترین غلظت، زمان و روش تیمار با کولشیسین برای دیپلویید کردن لاین‌های هاپلویید خربزه صورت پذیرفت که نتایج آن در آینده منتشر خواهد شد).

تعیین سطح پلوییدی

در مرحله اول از رنگ آمیزی سلولهای انتهای ریشه با استوکارمن و شمارش کروموزومی و در مرحله دوم از فناوری فلوسیتومتری برای حصول اطمینان از هاپلوییدی گیاهان

Archive of SID

www.SID.ir

حاصله استفاده گردید (۱). دستگاه فلوسیتومتر منحنی‌هایی بر مبنای اندازه هسته سلولها رسم می‌نماید و می‌توان از آن با استفاده از یک گیاه استاندارد که حجم هسته آن مشخص و محل پیک آن ثابت می‌باشد به آسانی برای تشخیص سطح پلوییدی گیاهان نیز استفاده نمود. در این آزمایش چند گیاه مختلف که حجم هسته‌ای نزدیک به خربزه دارند ازجمله برنج، خیار و آرابیدوپسیس برای تعیین بهترین گیاه استاندارد برای خربزه مورد آزمون قرار گرفتند.

شکل ۳- گیاه حاصل از نمو جنین در محیط کشت، ۴ هفته پس از کشت

(۴) (۵)

شکل ۴-رویت جنین‌های نمو یافته در داخل بذر در محیط مایع
شکل ۵-کشت جنین‌های هاپلویید جوانه‌زده داخل بذر

(۶) (۷)

شکل ۶-تکثیر گیاه هاپلویید در محیط کشت
شکل۷- تولید گل نر در برخی لاین‌ها در محیط درون شیشه‌ای

کشت تخمدان

به موازات روش نجات جنین ۶۲ تخمدان تلقیح نشده از هیبرید آ ،۶۰ تخمدان از هیبرید ب و ۴ تخمدان از خربزه خاتونی کشت گردیدند. بدین منظور گل‌های ماده در روز شکوفایی قبل از ظهر جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل می‌شدند. از آنجا که کرکهای روی تخمدان مانع نفوذ آب و ضدعفونی آن می‌شوند پس از قطع گلبرگها ابتدا تخمدانها (به طول ۱۵-۸ میلی‌متر) بطور کامل در محلول غلیظ توین۲۰[1] غوطه‌ور شده و سپس به مدت چند دقیقه در زیر جریان آهسته آب قرار می‌گرفتند. این تخمدان‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول سفید کننده‌های تجاری (۵،۲۵ ٪ هیپوکلریت سدیم) ضد عفونی و سه مرتبه با آب مقطر استریل شسته می‌شدند. سپس بصورت عرضی به ۱۰-۶ قطعه با قطر حدود یک میلی‌متر برش داده شده و قطعات هر تخمدان در یک ظرف پتری ۱۵×۱۰۰ بر روی محیط کشت حاوی املاح و ویتامینهای پایه ام اس[2] با ۴٪ ساکاروز، ۰/۸٪ فیتاگار[3] و ۰/۰۹ میکرومول تی دیازرون[4] قرار داده شدند. پس از ۵-۴ روز این قطعات به محیط کشت مشابهی حاوی ۰/۲۷ میکرومولار نفتالین استیک اسید[5] و ۰/۸۸ میکرومولار بنزیل آدنین[6] بجای تی دیازرون واکشت شدند. تخمدانهای کشت شده در اتاق رشدی مشابه با جنین‌ها نگهداری شدند. در مواردی که جنینی نمو یافته و قابل رویت بود از تخمدان جدا و در محیط ام اس بدون هورمون کشت می‌شد.

نتایج و بحث

میوه ها، بذور و جنینهای به دست آمده

۵۵ ٪ از گلهای گرده افشانی شده با گرده های پرتوتابی شده در مرحله اول و ۸۵٪ در مرحله دوم با شرایطی مشابه با گلهای گرده‌افشانی شده با گرده‌های سالم تشکیل میوه دادند. پایین بودن درصد میوه‌های تشکیل شده در مرحله اول حاصل از مشکلات گرده افشانی دستی در مزرعه می‌باشد. در این میوه‌ها پوسته بذر نیز بطور طبیعی توسعه یافته بود ولی اکثر آنها پوک بودند. درصد کمی از آنها حاوی جنینهای کوچکی

1 . Tween 20
2 . MS (Murashige & Skoog)
3 . Phytagar
4 . TDZ (Thiadiazuron)
5 . NAA (Naphtalin Acetic Acid)
6 . BA (Benzyl Adenin)

Archive of SID

www.SID.ir

بودند که جزییات تعداد، نسبت و گیاهان حاصل از آنها در جدول ۱ آمده است.

همانگونه که از محتوای جدول ۱ بر می‌آید نسبت جنین‌های به دست آمده در ژنوتیپهای مختلف متفاوت می‌باشد. با این وجود به نظر می‌رسد در صورت بازبینی تعداد کافی بذر در غالب توده‌ها و تیپهای مختلف بتوان به تعداد قابل توجهی جنین دست یافت. از آنجا که تشکیل جنین‌های هاپلویید یک امر احتمالی می‌باشد عدم حصول جنین در رقم شهد شیراز و گرمک را می‌توان به تعداد کم نمونه نسبت داد. همانگونه که مشاهده می‌شود طالبی سمسوری بالاترین درصد تولید جنین را دارا می‌باشد که مطابق یافته‌های قبلی مبنی بر بالا بودن درصد تشکیل جنین در ارقام گروه کانتالوپنسیس[1] نسبت به گروه اینودوروس[2] می‌باشد (۷، ۱۳).

جنین‌های به دست آمده در مراحل نموی مختلفی قرار داشتند. اگرچه بعضی جنین‌های نارستر (مرحله کروی) و یا توسعه یافته‌تر (لپه‌ای) نیز قابلیت باززایی داشتند بهترین مرحله برای باززایی در محیط کشت مرحله قلبی شکل بود. جنین‌های قهوه‌ای که به نظر می‌رسید پیش از استخراج سقط شده باشند و جنین‌های اژدری شکل که غیرطبیعی به نظر می‌آمدند قابلیت باززایی نداشتند. بنابراین در ارزیابی تولید گیاهان هاپلویید علاوه بر تعداد جنین به دست آمده باید نوع و قابلیت نمو آنها نیز مورد توجه قرار گیرد. جنین‌هایی که قابلیت باززایی داشتند در مدت کوتاهی گیاهچه‌های کاملی تشکیل می‌دادند و در غیر این صورت یا اصلا رشد نمی‌کردند و یا اندام‌های غیر طبیعی تشکیل می‌دادند که گاهی به تولید ریشه تنها و یا اندکی کالوس ختم می‌شد.

اگرچه کشت گیاهان مادری در مزرعه موفقیت‌آمیز بود و بواسطه نزدیکتر بودن به شرایط طبیعی کشت خربزه بومی مزیت‌های نسبی بر آن مترتب می‌باشد ولی به دلیل پایین بودن درصد تشکیل میوه حاصل از تلاقی دستی در مزرعه و احتمال انتقال بیماری‌های بذر زاد که در مزرعه انتشار دارند به جنین‌های حاصله قابل توصیه نمی‌باشد. از جمله در برخی گیاهان حاصل از ارقام زرد ایوانکه، ابرامه اصفهان و ابرامه×خاتونی به تدریج طی تکثیر در محیط کشت علائم بیماری شبه ویروسی آشکار شد. نتیجه بررسی این گیاهان از طریق انتقال عصاره آنها بر روی گیاه محک توتون[3] آلودگی ویروسی آنها را تایید می‌نمود ولی مجال و امکانات لازم برای بررسی بیشتر و تعیین نوع ویروس در دسترس نبود.

ارزیابی نتایج استفاده ازکشت مایع

در سری دوم (جدول ۲) که هر دو هیبرید متعلق به گروه اینودوروس بودند نسبت گیاهان به دست آمده (۱/۶-۰/۵ گیاه هاپلویید در صد بذر) از طریق بازکردن بذرها مطابق یافته‌های پیشین بود ولی با کمک کشت مایع افزایش چشمگیری نشان داد (۲/۹-۲/۸ گیاه هاپلویید در صد بذر). استفاده از روش کشت مایع همچنین نتایج مثبت و شگفت‌آوری را در جهت سهولت تشخیص و استخراج جنینها در پی‌داشت بطوری که می‌توان بیش از ۶۰۰ بذر را در طول کمتر از یک ساعت بازرسی و جنین‌های آنها را استخراج نمود و این در حالی است که باز نمودن تک تک آنها بیش از ۸ ساعت کار ظریف و خسته کننده را می‌طلبید. از طرفی در این طریق چون جنینها در داخل بذر بیشتر نمو می‌یافتند به راحتی قابل رویت بودند و در هنگام بیرون آوردن کمتر آسیب می‌دیدند. همچنین این جنینها طی یک روند تدریجی در طول دوره کشت مایع تشکیل سبزینه می‌دادند که این به باززایی بهتر آنها نسبت به جنینهایی که بطور مستقیم خارج می‌شدند کمک می‌کرد. پر واضح است که روش مذکور نسبت به پرتو نگاری با اشعه ایکس که پیش از این برای این منظور پیشنهاد شده بود (۱۶، ۱۷) مزایای بسیار زیادی دارد و علاوه بر آنکه مستلزم دسترسی به دستگاه پرتونگار نمی‌باشد هزینه و خطر کمتری را نیز در پی دارد. مزیتهای روش جدید را می‌توان به صورت دیگر بر مبنای تعداد بذر مورد نیاز و تعداد بذری که باید برای به دست آوردن ۱۰۰ گیاه هاپلویید بازبینی شود بیان نمود (جدول ۳). کاهش تعداد بذر مورد نیاز به میزان یک ششم تا یک دوم به معنی کمک این روش به نمو بهتر جنین‌ها و کاهش تعداد بذری که باید بازبینی گردد به کمتر از یک درصد تا ۱،۷ درصد به ترتیب در هیبرید آ و ب بیانگر نقش آن در سهولت کار است. بدین ترتیب استفاده از کشت مایع نقش مهمی در افزایش کارآیی تولید گیاهان هاپلویید در خربزه و احیانا سایر کدوییان دارد بطوریکه در برنامه‌های اصلاحی می‌توان به آسانی به تعداد کافی گیاهان هاپلویید برای مشاهده تفرق صفات و دستیابی به ژنوتیپ مورد نظر دست یافت.

1 . Cantalopensis

2 . Inodorus

3. Nicotinia glotinosa

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- تعداد و نسبت جنین‌ها و گیاهان هاپلویید به دست آمده در اثر گرده‌افشانی با گرده‌های پرتوتابی شده در توده‌های خربزه ایرانی

گیاهان مادری	تعداد میوه	تعداد بذر	تعداد جنینهای استخراج شده	نسبت جنین به بذر٪	نوع جنین				تعداد گیاهان به دست آمده	نسبت گیاه به جنین ٪	نسبت گیاه به بذر٪
					کروی	قلبی	لپه‌ای	اژدری			
خاتونی مشهد	۱	۵۴۸	۴	۰/۷		۴			۳	۷۵	۰/۵
زرد ایوانکه	۲	۹۶۵	۱۲	۱/۲		۷	۴	۱	۵	۴۲	۰/۵
ابرامه اصفهان	۲	۱۱۵۸	۳۴	۲/۹	۸	۱۵	۷	۴	۱۴	۴۱	۱/۲
سبز ایوانکه	۲	۱۰۲۴	۴۰	۳/۹	۴	۲۶	۵	۵	۱۵	۳۸	۱/۵
طالبی سمسوری	۱	۶۴۰	۳۲	۵	۱	۱۰	۱۹	۲	۱۰	۳۱	۱/۶
شهد شیراز	۱	۵۵۸	۰								
گرمک اصفهان	۱	۴۱۰	۰								
خربزه طلایی	۱	۴۴۵	۲	۰/۴		۱	۱		۲	۱۰۰	۰/۴
خاتونی × زرد	۱	۶۳۱	۵	۰/۸	۱	۴			۳	۶۰	۰/۵
خاتونی × ابرامه	۱	۶۷۷	۶	۱/۲		۳	۳		۳	۵۰	۰/۴
سمسوری × سبز	۱	۳۲۲	۱	۰/۳			۱				
مجموع/ میانگین	۱۴	۷۳۷۸	۱۳۶	۱/۸	۱۴	۷۰	۴۰	۱۲	۵۵	۴۰	۰/۷

جدول ۲- مقایسه تعداد و نسبت جنین‌ها و گیاهان هاپلویید به دست آمده در روش استخراج مستقیم و کشت بذور در محیط مایع در دو تا از هیبریدهای پروژه اصلاح مقاومت مرکب به ویروسها

ژنوتیپ	روش استخراج جنین	تعداد بذر	تعداد جنین	نسبت جنین به بذر٪	تعداد جنین با توجه به مراحل نمو آن/ تعداد گیاه به دست آمده از آنها				تعداد گیاهان به دست آمده	نسبت گیاه به جنین ٪	نسبت گیاه به بذر٪
					کروی	قلبی	نمو یافته*	اژدری			
هیبرید آ	مستقیم	۵۷۸	۴	۰/۷	۱/۰	۳/۳			۳	۷۵	۰/۵
هیبرید آ	کشت مایع	۲۲۹۰	۱۰۶	۴/۶	۱۶/۳	۴۲/۲۳	۴۸/۳۹		۶۵	۶۱	۲/۸
	مجموع	۲۸۶۸	۱۱۰	۳/۸	۱۷/۳	۴۵/۲۶			۶۸	۶۲	۲/۴
هیبرید ب	مستقیم	۱۰۲۸	۲۶	۲/۵	۵/۲	۲۰/۱۴		۱/۰	۱۶	۶۱	۱/۶
هیبرید ب	کشت مایع	۳۲۱۱	۱۰۳	۳/۲	۱۱/۹	۴۶/۴۵	۴۵/۳۸	۱/۰	۹۲	۸۹	۲/۹
	مجموع	۴۲۳۹	۱۲۹	۳/۰	۱۶/۱۱	۶۶/۵۹			۱۰۸	۸۴	۲/۵
جمع کل / میانگین		۷۱۰۷	۲۲۹	۳/۲	۳۳/۱۴ (٪۴۳)	۱۱۱/۸۵ (٪۷۴)	۹۳/۷۷ (٪۸۳)	۲/۰ (٪۰)	۱۷۶	۷۷	۲/۵

* جنینهای سبز شده یا جوانه زده

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- کارآیی استفاده از روش کشت مایع در مقایسه با استخراج مستقیم جنین برای به دست آوردن ۱۰۰ گیاه هاپلویید در خربزه

ژنوتیپ	روش	تعداد بذر مورد نیاز	تعدادبذری که بایدبازبینی‌گردد
هیبرید آ	استخراج مستقیم جنین	۱۹۲۵۰	۱۹۲۵۰
	استخراج جنین پس از کشت بذور در محیط مایع	۳۵۲۳	۱۶۳
هیبرید ب	استخراج مستقیم جنین	۶۴۲۵	۶۴۲۵
	استخراج جنین پس از کشت بذور در محیط مایع	۳۴۹۰	۱۱۲

گلدهی در محیط درون شیشه‌ای

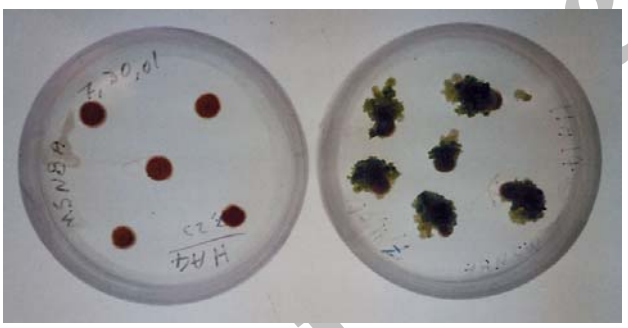
در تعدادی از گیاهان سری دوم (۱۴ لاین از هیبرید آ و ۱۷ لاین از هیبرید ب) پس از انتقال به ظروف کشت و یا در حین تکثیر در محیط درون شیشه‌ای تعداد قابل توجهی گلهای نر مشاهده گردید که بعضی از آنها بعد از مدتی شکفته می‌شدند (شکل ۷). این گلها همانگونه که انتظار می‌رفت کوچک و فاقد دانه گرده بودند. وقوع پدیده گل‌انگیزی در تعداد محدودی از لاینها اگرچه ممکن است اندکی متاثر از تغییرات جزیی عوامل محیطی در اتاق رشد بوده باشد ولی می‌تواند بیانگر تفاوت ژنتیکی آنها در زودگلدهی باشد. اگرچه گزارشی مبنی برگلدهی خربزه در محیط درون شیشه‌ای وجود ندارد ولی بررسی‌هایی در رابطه با کنترل گلدهی یا تغییر جنسیت گلهای خیار در محیط درون شیشه‌ای انجام شده است (۹، ۱۰) و نشان می‌دهد بسته به ژنوتیپ و شرایط مختلف رشد، گلدهی حتی در محیط بدون هورمون نیز ممکن است رخ دهد.

تایید هاپلویید بودن گیاهان حاصله و مقایسه آنها با گیاهان دیپلویید

جنین‌های کوچک هاپلویید به راحتی از جنین‌های کامل وبا لپه‌های توسعه یافته حاصل از لقاح مضاعف و گرده‌افشانی با گرده‌های سالم که به عنوان شاهد انجام شده بود، قابل تشخیص بودند. اندامهای رویشی گیاهان حاصله در شرایط سنی و رویشی مشابه کوچکتر از گیاهان دیپلویید بود. در سری اول حتی زمانیکه طول بوته‌ها پس از انتقال به گلخانه به حدود یک متر رسیده بود هیچگونه علائم ظهور گل به چشم نمی‌خورد. در سری دوم تقریبا تمام لاینها پس از انتقال به گلدان و قرارگرفتن در شرایط گلخانه تعداد زیادی گلهای نر و به تدریج تعدادی گل ماده ظاهر شد که از لحاظ ظاهری کوچکتر بوده و بواسطه جدا بودن گلبرگها از گلهای پیوسته گلبرگ دیپلویید متمایز بودند (شکل ۱۲). همچنین گلهای نر آنها دانه گرده تولید نمی‌کردند و گلهای ماده قادر به تلقیح و تولید میوه نبودند. به هر حال هر دو روش شمارش کروموزومی (شکل ۱۱) و تجزیه فلوسیتومتریک هسته‌های سلولی (شکل ۱۳) هاپلویید بودن گیاهان حاصله را کاملا تایید می‌نمود.

کشت تخمدان

درکشت تخمدان‌های تلقیح نشده اگر چه در بسیاری از نمونه‌ها ۳-۲ روز پس از کشت تعدادی از تخمکها اندکی نمویافته و قابل رویت بودند ولی پس از ۶ هفته انتظار هیچ گیاهچه‌ای از مجموع ۱۲۲ تخمدان کشت شده در هیبرید آ و ب به دست نیامد. حدود ۴۰٪ از تخمدانها مقدار قابل توجهی کالوس سبز از بافت‌های رویشی دیواره تخمدان تولید نمودند و مابقی بدون هیچگونه نموی به تدریج به رنگ خردلی گراییدند (شکل ۸). تنها ۳ گیاهچه کوچک از ۴ تخمدان کشت شده در خربزه خاتونی به دست آمد که آنها نیز پس از جداسازی و انتقال به محیط فاقد هورمون نموی بسیار بطئی داشتند.

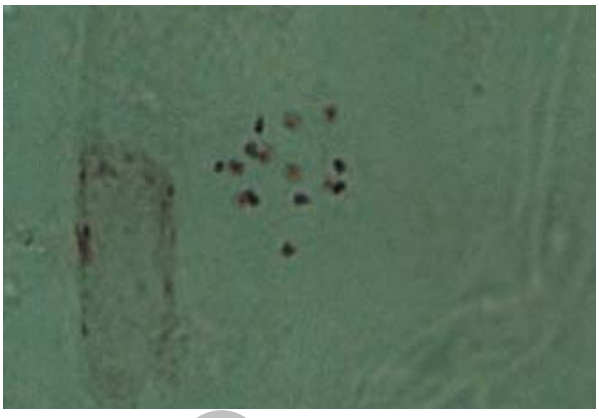


شکل ۸-کشت تخمدان‌های تلقیح نشده، عدم توسعه(سمت چپ) و یا تولید کالوس از بافتهای رویشی ۶ هفته پس از کشت(سمت راست)

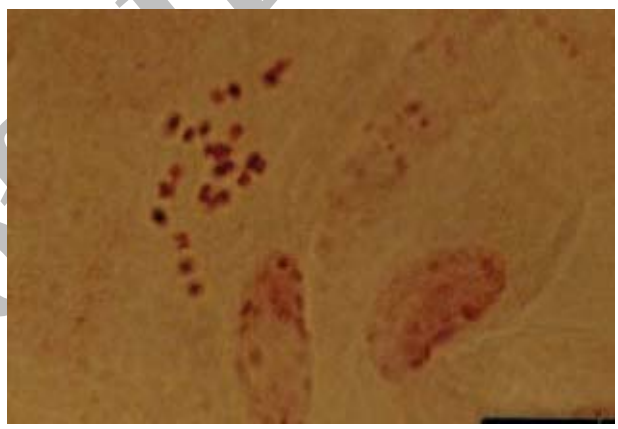
شکل ۹- تعدادی از گیاهان هاپلویید به دست آمده پس از انتقال به بستر خاکی در داخل گلخانه

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱۰-تصویر میکروسکوپی کروموزوم‌های گیاه هاپلویید در رقم زرد ایوانکی

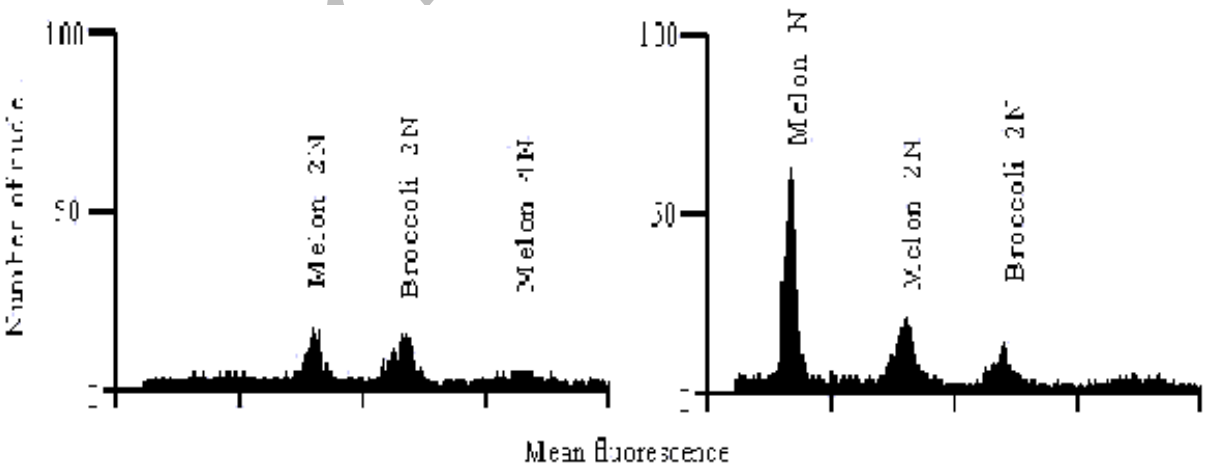


شکل ۱۱-تصویر میکروسکوپی (۴۰۰×) کروموزوم‌های گیاه شاهد دیپلویید در رقم زرد ایوانکی

شکل ۱۲-تفاوت اندازه و ریخت ظاهری گلها در گیاهان هاپلویید (سمت چپ) ودیپلویید (سمت راست)

دیپلویید شدن خودبخودی

در آزمایشات سری دوم دو مورد دوبله شدن خودبخودی در گیاهان حاصل از هیبرید ب (لاین ب۲۷ و ب۳) مشاهده شد که اگرچه میوه آن رشد بطئی داشت ولی بذر حاصل از خودگشنی دستی آنها به خوبی تشکیل و جمع‌آوری گردید. درگلهای نر لاین آ۱۳ نیز دانه های گرده مشاهده شد ولی بعد مشخص شد که این گرده‌ها پوک بوده و قادر به گرده‌افشانی و تشکیل میوه نیستند. پیش از این درصد کمی دوبله شدن خودبخودی طی تکثیرهای متوالی در محیط کشت در خیار گزارش شده بود (۱۴) ولی در آزمایشات مربوط به خربزه اشاره‌ای به مشاهده این پدیده نشده است (۳، ۷، ۱۳).



شکل ۱۳-تجزیه فلوسیتومتریک بافت برگ خربزه به همراه گیاه استاندارد کلم بروکلی، سمت چپ: نمونه شاهد دیپلویید خربزه، سمت راست: گیاه هاپلویید حاصل از نمو جنین‌های پارتنوژنتیک (لاین ب ۳۲)

www.SID.ir

از جمع بندی نتایج به دست آمده می‌توان گفت روش نجات جنین‌های القا شده بوسیله پرتو گاما روشی مطلوب برای تولید گیاهان هاپلویید در خربزه می‌باشد و تمام گیاهان به دست آمده در آن هاپلویید هستند. با وجود بحث‌های زیادی که در این باره شده است به نظر می‌رسد ۲۵۰ واحد گری پرتودهی دز مناسبی برای القا هاپلوییدی و سه هفته پس از گرده‌افشانی زمان مناسبی برای نجات جنینها باشد. همانگونه که اغلب محققین اشاره نموده‌اند نسبت جنین و گیاه به دست آمده در ژنوتیپهای مختلف متفاوت می‌باشد ولی اغلب ارقام ایرانی واکنش خوبی نسبت به این روش نشان دادند. بکارگیری کشت مایع بذور جهت تشخیص و استخراج جنینها که برای اولین بار انجام شد تاثیر بسیار زیادی در افزایش کارآیی این روش داشت بطوری که تولید تعداد زیادی گیاه هاپلویید را با سهولت و اطمینان بیشتر میسر می‌سازد. در صورت موفقیت در دیپلوییدکردن تعداد کافی از لاینهای به دست آمده بطور قطع استفاده ازگیاهان دابل‌هاپلویید برای دسترسی به لاینهای خالص و تسریع برنامه‌های اصلاحی در خربزه مفید و کارآمد خواهد بود. اگرچه مراحل انجام کار در روش کشت تخمدانهای تلقیح نشده قدری آسانتر است ولی با توجه به اینکه نتیجه آن به شدت وابسته به ژنوتیپ می‌باشد، مراحل نمو گیاهان به دست آمده بسیار کند است و تنها درصدی از آنها هاپلویید می‌باشند به نظر می‌رسد کارآیی کمی برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی داشته باشد. همچنین مشخص شد که استفاده از فناوری فلوسیتومتری بویژه زمانی که تعداد گیاهان مورد بررسی زیاد باشد روشی موثر در تعیین سریع و آسان سطح پلوییدی آنها می‌باشد.

REFERENCES

1. Arumunganathan K. and E. D. Earl. 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. Plant Molecular Biology Reporter 9(3):229-241
2. Caglar G. and K. Abak. 1999. Progress in the production of haploid embryos, plants and doubled haploids in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by gamma irradiated pollen, in Turkey. Acta. Hort. 492:317-321.
3. Cuny F., R. Dumas de Vaulx, B. Longhi and R.Siadous. 1992. Analyse des plantes de melon (*Cucumis melo L.*) issues de croisements avec du pollen irradie a differentes doses. Agronomie 12:623-630
4. Dore, C., L. Boulidard, A. Sauton, J-C. Rode, F. Cuny, K. Niemirowiecz-Szczytt, N. Sari and R. Dumas de Vaulx. 1995. Interest of irradiated pollen for obtaining haploid vegetables. Acta. Hort. 392: 123-128
5. Dryanovska O. A. and I. N. Ilieva 1983. *In vitro* anther and ovule cultures in muskmelon (*Cucumis melo* L.). C. R. Acad. Bulgare Sci. 36(8): 1107-1110.
6. 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
7. Ficcaadenti N., P. Veronese, S. Sestili, P. Crino, S. Lucretti, M. Schiavi and F. Saccrdo. 1995. Influence of genotype on the induction of haploidy in *Cucumis melo* L. by using irradiated pollen. J. Genet. & Breed. 49: 359-364
8. Lotfi, M., A. Kashi and R. Onsinejad. 1999. Induction of parthenogenetic embryos by irradiated pollen in cucumber. Acta Hort. 492: 323-326
9. Mohammadi, J. 1996.Study of plant growth regulators on sex expression of cucumber *in vitro*. Proceeding of the 1st horticultural science congress of Iran. P: 89
10. Msikita, W., R.M. Skirvin, J.A. Juvik, W.E. Splittstoesser and N. Ali. 1990. Regeneration and flowering in vitro of "Burpless hybrid" cucumber cultured from excised seed. Hortscience 25(4): 474-477
11. Przyborowski, J. 1994. Main factors affecting cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo development and haploid characteristics. Plant breeding. 112(1): 70-75
12. Sari, N., K. Abak, M. Pitrat, J. C. Rode and R. Dumas de Vaulx. 1994. Induction of parthenogenetic haploid embryos after pollination by irradiated pollen in watermelon. Hortscience 29(10): 1189-1190
13. Sauton, A. 1988. Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskmelon, *Cucumis melo L*. Scientia Hortic. 35:71-75
14. Sauton, A. 1989. Haploid gynogenesis in *Cucumis sativus* by irradiated pollen. Report of CGC.12: 22-23

Archive of SID

www.SID.ir

15. 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
16. Sauton, A., Olivier, C. and A. Chavagnat. 1989. Use of soft X-ray technique to detect haploid embryos in immature seeds of melon. Acta horticulturae 253: 131-135
17. Savin, F., V. Decomble, M. Le-Couriour and J. Hallard. 1988. The X-Ray detection of haploid embryos arisen in muskmelon (*Cucumis melo L.*) seeds and resulting from a parthenogenetic development induced by irradiated pollen. Report of CGC.11: 36-42

Archive of SID

www.SID.ir

Efficient Haploid Plant Production for Pure Line Generation in Melon (*Cucumis melo* L.)

M. LOTFI[1], A. KASHI[2], Z. ZAMANI[3], B.E. TABATABAIE[4] AND E.D. EARL[5]

1, 2, 3, Former Ph.D. Student, Professor and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran, 4, Assistant Professor, Isfahan University of Technology

5, Professor, Dept. of Plant Breeding, Cornell University, U.S.A.

Accepted Oct., 30, 2002

SUMMARY

Haploid plants were produced from several Iranian melon cultivars as well as two F1 progeny of "Multiple Virus Resistance Project" via rescuing embryos induced by irradiated pollen. In total, 55 haploid plants recovered from 136 rescued embryos in Iranian cultivars by opening and examining individual seeds. The rate of obtained embryos differed from 5% in 'Samsoori' to 0.4% in 'Talaie' cultivars. Finding and excising induced embryos through opening and examining individual seeds was a tedious and very time-consuming task. Therefore in second case (F1 progeny of MVRP), liquid culture was applied for detecting the induced embryos. This innovated method allowed embryos to get more developed in the seeds covering resulted in easy detection and rescuing task. Recovering 176 haploid plants from 239 excised embryos showed also advantages of the method in increasing the efficiency of haploid plant production in melon breeding programs. The haploid state of recovered plants was confirmed by both chromosome counting and flow cytometry techniques. A small number of plants spontaneously doubled and the rest were treated by colchicines for doubling. The seeds of doubled lines are under screening for resistance to viruses. Ovary slice culture produced only three plantlets in 'Khatooni' cultivar from 126 cultured ovaries, suggesting the low efficiency and possible genotype dependence of gynogenesis method for haploid production in melon.

Key words: Haploid, Melon, Parthenogenesis, Liquid culture, Embryo rescue, Irradiation, Gynogenesis, Ovary culture, Flow cytometry

Archive of SID

www.SID.ir