آیا سطح پلوئیدی و محتوای DNA در ارقام و پایه‌های مختلف نخل خرما (*Phoenix dactylifera*) متفاوت است؟

سکینه علوی‌پور جلیعه[۱]، اسماعیل خالقی*[۲]، نوراله معلمی[۳]، خسرو مهدی‌خانلو[۴]

[۱] دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

[۲]* استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

[۳] استاد گروه علوم باغبانی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

[۴] استادیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

*نویسنده مسئول: khaleghi2184@gmail.com

چکیده

نخل خرما از جمله گیاهان تک‌لپه‌ای و دوپایه‌ای می‌باشد که در ایران به عنوان غنی‌ترین ژرم‌پلاست شناخته‌شده دارای تنوع ۴۰۰ رقم می‌باشد. علی‌رغم وجود گیاهان پاجوشی و کشت‌بافتی بسیاری از ارقام مهم تجاری، با توجه به ماهیت دوپایه این گیاهان دارای انواع پایه‌های نر و ماده بوده که از نظر گرده‌افشانی و همچنین عملکرد نهایی نخل خرما حائز اهمیت می‌باشند. این در حالی است که تاکنون تنوع سطح پلوئیدی و مقدار DNA سلول‌های گیاهی ارقام و پایه‌های مختلف نخل خرما مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا، این پژوهش به منظور بررسی تنوع سطح پلوئیدی و مقدار DNA جمعیت بالای سلول گیاهی ارقام ماده برحی پاجوشی و کشت‌بافتی و ارقام نر غنامی سبز و غنامی قرمز با استفاده از روش فلوسایتومتری صورت گرفته است. نتایج حاصل از گراف‌های فلوسایتومتری نشان داد که بین سطح پلوئیدی ارقام برحی پاجوشی و کشت‌بافتی و همچنین ارقام نر غنامی سبز و غنامی قرمز تفاوتی وجود نداشت و دیپلوئید (۲n) بودند. این در حالی است که مقدار DNA ارقام نر و ماده متفاوت بوده و ارقام ماده پاجوشی و کشت‌بافتی دارای مقدار محتوای DNA بالاتری نسبت به ارقام نر غنامی سبز و غنامی قرمز بودند.

کلمات کلیدی: برحی پاجوشی، برحی کشت‌بافتی، غنامی سبز، غنامی قرمز، فلوسایتومتری

مقدمه

نخل خرما از گیاهان تک لپه‌ای است که به خانواده نخل‌ها تعلق دارد. این خانواده ۲۰۰ جنس و ۱۵۰۰ گونه دارد (Hazzouri *et al.*, 2015). بومی مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری آفریقا و جنوب آسیا می‌باشد. یکی از این گونه‌های نخل، *Phoenix dactylifera* L. یا نخل خرما است. نخل خرما گیاهی چند ساله و دو پایه با تعداد کروموزوم ۲n=۳۶ می باشد (سرخه تمیمی و همکاران، ۱۳۹۵). خرما از نظر سطح زیر کشت به عنوان دومین محصول باغی کشور، با تولید یک میلیون تن در سال، در ۱۵ استان کشت می‌شود و یکی از با ارزش‌ترین مواد غذایی است (حسینی و همکاران، ۱۳۹۵). ایران با داشتن تنوع ۴۰۰ رقم خرما، به عنوان غنی‌ترین ژرم‌پلاست در دنیا شناخته می‌شود و از مهمترین ارقام تجاری آن می‌توان به ارقامی مانند برحی، استعمران، کبکاب، شاهانی، زاهدی، خضراوی، مضاوتی و حلاوی اشاره کرد (سیاه‌سر و همکاران، ۱۳۹۶). همچنین، با توجه به اینکه نخل خرما گیاهی دو پایه است، دارای ارقام نر گرده‌دهنده متفاوتی است و انتخاب پایه نخل گرده‌دهنده مناسب عملکرد را به میزان زیادی تحت تأثیر قرار می‌دهد (Sudhersan *et al.*, 2010). از سویی دیگر، کاربرد شیوه‌های کشت بافت به منظور باززایی و تولید تجاری گیاه کامل پیشرفتی است که در نیم قرن اخیر صورت گرفته و در حال حاضر برای ازدیاد بسیاری از گونه‌های گیاهی جایگزین روش‌های عادی تکثیر شده است. نیاز به حجم انبوه پاجوش برای اجرای برنامه‌های توسعه ای و همچنین ضرورت اصلاح و احیای نخلستان‌های خرما به عنوان دومین محصول مهم باغی کشور که در اثر جنگ تحمیلی و یا شرایط خشکسالی از بین

IrHC2019

رفته یا خسارت دیده‌اند، موجب شد تا بجای تکثیر خرما به روش سنتی، استفاده از تکنیک کشت بافت مورد توجه قرار گیرد (دامن‌کشان و همکاران، ۱۳۹۱). ارقام برحی، زاهدی، پیارم، دیری و مضافتی و ارقام خارجی مانند مجول و تـوری از طریق تکنیک کشت بافت در ایران تولید شده است. به طورکلی، روش تکثیر این گیاه به وسیله پـاجوش اسـت ولـی تعداد پاجوش‌ها کم می‌باشد در تکثیر گیاه به روش کشت‌بافتی نتاج حاصله با گیاه مادری تفاوت‌هایی را نشان می‌دهـد (توان و همکاران، ۱۳۹۳).

فلوسیتوژنتیک به معنای استفاده از فلوسایتومتری برای دسته‌بندی و آنالیز کروموزوم‌های منفرد و تعیین نقشه فیزیکی ژن‌ها با استفاده از روش دورگه‌سازی فلوئورسنتی در محل (FISH) است (امیـدی و همکـاران، ۱۳۹۲). فلوسـایتومتری (FCM)در دهه ۱۹۵۰ توسعه یافت و مقدار DNA ثابت هر ارگانیسم تخمین زده شد و با اصطلاحC-value برای اولین بار توسط اسوافت (۱۹۵۰) تعریف شد که عبارتند از مقدار DNA کروموزوم‌های هاپلوئید غیر تکـرار شـونده مـی‌باشـد. بنابراین هسته در فاز G1 چرخه سلولی با دو نسخه ژنوم غیر تکرار شونده مقدار 2C DNA گفته می‌شود (Dolezel and Bartos, 2005). اما کاربرد فلوسایتومتری برای علوم گیاهی تا زمان دهه ۱۹۸۰ به تـاخیر افتـاد یعنـی زمـانی کـه ایـن تکنیک به منظور تخمـین مقـدارDNA، تخمـین سـطوح پلوئیـدی DNA و آنالیزهـای چرخـه سـلولی پراهمیـت شـد (Galbraith *et al.*, 1983). تصاویر سیتومتری DNA می‌تواند به عنوان تغییرات الکترونیکی میکرواسـپکتروفتومتری بـه وسیله تخمین مقدار سطوح خاکستری، گرفتن پیکسل تصاویر بوسیله دوربین ویدیویی تعیین می‌شود. در صورت عدم وجود میکرواسپکتروفتومتری و تصاویر سیتومتری، آنالیزهای فلوسـایتومتری را مـی‌تـوان بکـار گرفـت (Dolezel and Bartos, 2005). این بررسی به علت عدم وجود اطلاعات کافی در مورد سطح پلوئیدی ارقام و پایـه هـای مختلـف نـر و ماده نخل خرما صورت گرفته است و در آن سطح پلوئیدی ارقام ماده پاجوشی و کشت بافتی خرما رقم برحی و ارقام نر عنامی سبز و قرمز مورد مقایسه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

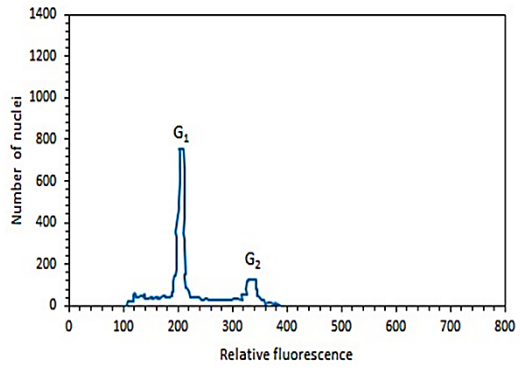
به منظور بررسی تفاوت سطح پلوئیدی در ارقام و پایه‌های مختلف نخل خرما، پژوهشی در سال ۱۳۹۸ در نخلستان پژوهشکده خرما و میوه های گرمسیری و نیمه‌گرمسیری و پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران انجام شد. این بررسی بر روی پایه‌های نخل رقم برحی پاجوشی و کشت‌بافتی و پایه‌های گرده‌دهنده رقم غنامی سبز و رقم غنامی قرمز با سه تکرار انجام شد. جهت ارزیابی سطح پلوئیدی از برگ‌های جوان نمونه‌گیری کرده و سطح پلوئیدی پایه‌های پاجوشی و کشت‌بافتی رقم ماده و رقم نر توسط دستگاه فلوسایتومتری با نام PA1 (پارتک ، ساخت کشور آلمان)، مجهز به لامپ HBO و لیزر اشعه ماوراءبنفش و با استفاده از روش تغییر یافته Galbraith و همکاران (۱۹۸۳) صورت گرفت. در این بررسی جعفری به عنوان گیاه شاهد در نظر گرفته شد و پس از انجام فرآیند سایتومتری، نتایج تجزیه پراکنش هسته‌های سلولی رنگ‌آمیزی شده بر مبنای حجم آنها در مانیتور نمایش داده شد. در نهایت، درصد هسته با هر سطح پلوئیدی در هر نمونه به صورت هیستوگرام بیان شد. ارتفاع تمام سطوح پلوئیدی اندازه‌گیری‌شده و مقدار DNA جمعیت سلول‌های گیاهی از ارتفاع پیک‌های هیستوگرام‌ها محاسبه شد (Glowacka *et al.*, 2010).

نتایج و بحث

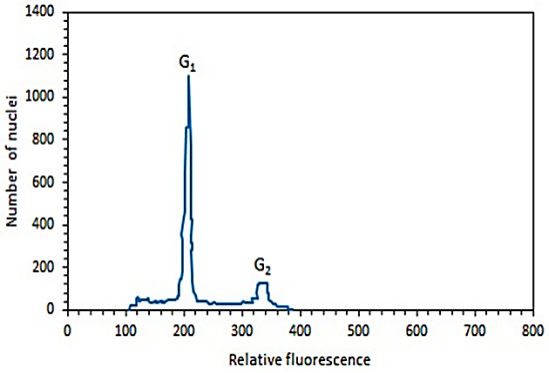
فلوسایتومتری از جمله ابزار قدرتمند در جهت تعیین سطوح پلوئیدی گیاهان مختلف با دقت بالا می‌باشد که در به-نژادی گیاهی برای آنالیز سطوح پلوئیدی، انتخاب هیبریدهای بین‌گونه‌ای و آپومیکسی، تعیین اندازه ژنوم و در تحقیقات اخیر به منظور شناسایی جنسیت مورد استفاده قرار می‌گیرد (Rubuluza *et al.*, 2007). بطور کلی، مطالعات مختلف نشان داد که فلوسایتومتری یک روش موثر، سریع و قابل دسترس برای بررسی سطوح پلوئید DNA هسته است (Praca *et al.*, 2009). در این بررسی نیز سطح پلوئیدی و مقدار DNA پایه‌ها و ارقام مختلف نر و ماده نخل خرما مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. نتایج هیستوگرام فلوسایتومتری نشان داد که ارقام ماده برحی پاجوشی (شکل ۱) و

IrHC2019

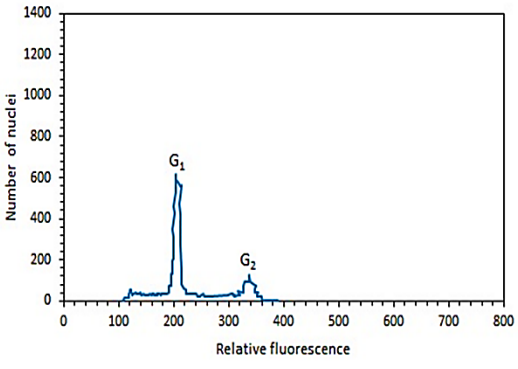
کشت بافتی (شکل ۲) و همچنین ارقام نر غنامی سبز (شکل ۳) و غنامی قرمز (شکل ۴) دارای سطح پلوئیدی یکسان (۲n=۳۶) می‌باشند و تفاوت آماری بین آن‌ها وجود نداشت. این در حالی است که در مقایسه گراف ارقام ماده (رقم برحی پاجوشی و کشت‌بافتی) و نر (ارقام غنامی سبز و غنامی قرمز) نخل می‌توان اظهار داشت که مقدار DNA ارقام ماده بالاتر از ارقام نر بود. به عبارتی با توجه به نتایج حاصل می‌توان استفاده از فلوسایتومتری را به عنوان ابزاری سودمند جهت تعیین جنسیت در گونه‌های مختلف گیاهی دوپایه از جمله نخل توصیه نمود. این در حالی است که گزارشات مختلف نشان می‌دهد که هیچ رابطه معنی‌داری بین اندازه ژنوم و تعداد کروموزوم‌ها وجود ندارد و آنالیزهای قبلی بر اساس مقایسه اندازه ژنوم در مقادیر مختلف کروموزوم ها بود. با این حال، تغییرات تعداد کروموزوم می‌تواند یک نیروی تکاملی مهم درگیر در تنوع گونه‌ای که اغلب پس از یک رویداد پلی‌پلوئیدی رخ می‌دهد، باشد (Barrett *et al.*, 2019). به طور کلی، به استناد نتایج بدست‌آمده وجود تفاوت قابل توجه در مقدار DNA ارقام و پایه‌های مختلف گیاهان نخل دوپایه علی‌رغم اینکه به وضوح می‌تواند جهت تعیین جنسیت مورد استفاده قرار بگیرد اما به نظر می‌رسد که نیاز به بررسی و ارزیابی بیشتر دیگر ارقام این گونه می‌باشد.



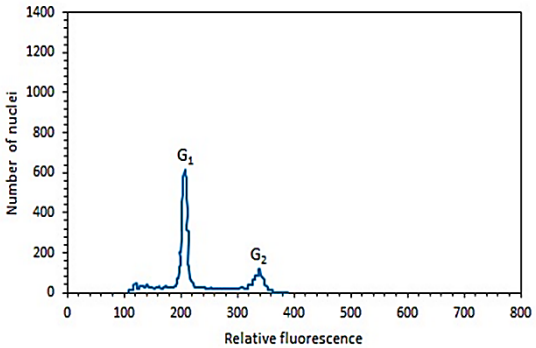
شکل «۱» نتایج هیستوگرام
فلوسایتومتری رقم برحی پاجوشی



شکل «۲» نتایج هیستوگرام
فلوسایتومتری رقم برحی کشت‌بافتی



شکل «۳» نتایج هیستوگرام
فلوسایتومتری رقم غنامی سبز



شکل «۴» نتایج هیستوگرام
فلوسایتومتری رقم غنامی قرمز

IrHC2019

منابع

امیدی، م.، عالیشاه، ع. و سامان‌فر، ب. ۱۳۹۲. سیتوژنتیک گیاهی. چاپ چهارم. انتشارات دانشگاه تهران. تهران. ۵۶۵ صفحه.

توان، ز.، عالمی سعید، خ.، شافعی‌نیا، ع. ر. و پورمحمدی، پ. ۱۳۹۳. مقایسه میزان بیان ژن PABP گیاهچه‌های خاصل از کشت بافت نخل خرما با گیاه پاجوشی به روش Realtime-PCR. اولین کنگره ملی زیست‌شناسی و علوم طبیعی ایران. ۵-۱.

حسینی، ی.، محبی، ع. ح.، پوزش‌نژاد شیرازی، م. رجالی، ف.، ظهرانی، م.م. و بصیرت، م. ۱۳۹۵. آشنایی با شرایط کشت خرما. نشریه آموزش کشاورزی. ۲۴ صفحه.

دامنکشان، ب.، پناهی، ب.، اسعدی، م. و حاجیان، س. ۱۳۹۱. گزارشی از مشاهدات ناهنجاری‌های موجود در درختان رقم برحی بدست‌آمده از روش تکثیر کشت بافت در استان کرمان. مدیریت هماهنگی ترویج کشاورزی کرمان، اداره رسانه های ترویجی. ۲۴ صفحه

سرخه تمیمی، ک.، عالمی سعید، خ. و شافعی نیا، ع.ر. ۱۳۹۵. بررسی جایگاه کروموزومی ژن‌های تعیین کننده جنسیت در نخل خرما به روش دورگه‌سازی DNA در محل (FISH). پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی (گروه بیوتکنولوژی کشاورزی)، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان. ۹۶ صفحه.

سیاه‌سر، م.، خضری، م. و توسلیان، ا. ۱۳۹۶. تأثیر ژنوتیپ‌های مختلف گرده‌زا بر برخی ویژگی‌های کمی، کیفی و عملکرد خرمای کشت‌بافتی زاهدی. پژوهش‌های میوه‌کاری، ۲(۲): ۵۳-۴۱.

Barrett, C.F., McKain, M.R., Sinn, B.T., Ge, X., Zhang, Y., Antonelli, A. and Bacon, C.D. 2019. Ancient Polyploidy and Genome Evolution in Palms. Genome Biology and Evolution, 11(5):1501–1511.

Dolezel, J. and Bartos, J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. Annals of Botany, 95: 99-110.

Galbraith, D. W., Harkins, K. R. Maddox, J. M. Ayres, N. M. Sharma, D. P. and Firoozabady, E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. Science, 220: 1049-1051.

Glowacka, K., Jezowshi, S. and Kaczmarek, Z. 2010. *In vitro* induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterization of induced polyploids in two *Miscanthus* species. Industrail Crops and Products, 32: 88-86.

Hazzouri, K.M., Flowers, J.M., Visser, H.J., Khierallah, H.S.M., Rosas, U., Pham, G.M., Meyer, R.S., Johansen, C.K., Fresquez, Z.A., Masmoudi, K., Haider, N., Kadri, N.E., Idaghdour, Y., Malek, J.A., Thirkhill, D., Markhand, G.S., Krueger, R.R., Zaid, A. and Purugganan, M.D. 2015. Whole genome re-sequencing of date palms yields insights into diversification of a fruit tree crop. Nature Communications, 6:8824.

Praca, M. M., Carvalho, C. R. and Clarindo, W. R. 2009. A practical and reliable procedure for *in vitro* induction of tetraploid tomato. Scientia Horticulturae, 122: 501-505.

Rubuluza, T., Nikolova, R. V., Smith, M. T. and Hannweg, K. 2007. In vitro induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicines. South African Journal of Botany, 73: 259-261.

Sudhersan C, Jibi Manuel S, Al-Sabah L. 2010. Xenic and metaxenic effect of *Hoenix Pusilla* pollen on certain date palm cultivars. Acta Horticulture (ISHS). 882: 297-302.

IrHC2019

Is ploidy level and DNA content different in various cultivars and off-shoots of *Phoenix dactylifera*?

Sakineh Alavipour Jalieh[1], Esmaeil Khaleghi[2]*, Norollah Moalemi[3], Khosroo Mehdikhanlo[4]
[1] Ph.D. student of Horticulture Department, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz
[2*] Assistant Professor of Horticultural Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz
[3] Professor of Horticultural Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz
[4] Assistant Professor of Plant Production and Genetics Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz
[*]*Corresponding Author: khaleghi2184@gmail.com*

Abstract
Date palm is one of the most common monocotyledon and dioecious plants that in Iran, the richest known germplasm, has a diversity of 400 varieties. In spite of the existence of off-shoot and tissue culture plants of many commercial cultivars but they have a variety of male and female plants due to the nature of these two plants that are important for pollination and also the final yield of the palm fruit. However, so far ploidy levels and cell DNA amount of various cultivars and off-shoot of date palm have not been investigated. Therefore, this study was carried out to investigate the ploidy level diversity and cell DNA content of off-shoot and tissue culture cv. Barhi female plant as well as male plants of cv. Green Ghanamy and Red Ghanamy using flow cytometry method. The results of flow cytometry graphs showed that there was no difference between ploidy level of cultivars of off-shoot and tissue culture cv. Barhi female plant as well as male plants of cv. Green Ghanamy and Red Ghanamy and were diploid (2n). However, the DNA content of male and female varieties was different, and the female cultivars of off-shoot and tissue culture had a higher DNA content than the male of cv. Green Ghanamy and Red Ghanamy.

***Keywords*:** Off-shoot cv. Barhi, Tissue culture cv. Barhi, Green ghanamy, Red ghanamy, Flow cytometry

IrHC2019