مطالعات فلوسایتومتری و تعیین سطح پلوئیدی در تعیین تمایز و یکنواختی توده‌های بذری هندوانه

فرزانه رضوی [۱*]، عاطفه خندان [۲]

[۱] استادیار، موسسه باغبانی سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی (*AREEO*)

[۲] پژوهشگر موسسه ثبت و گواهی نهال و بذر

*نویسنده مسئول: f.razavi@areeo.ac.ir

چکیده

تعیین خصوصیات مورفولوژیکی و ژنتیکی، تمایز دقیق،تهیه شناسنامه واقعی ارقام در محصولات باغی، حمایت از مالکیت معنوی (Plant Variety Protection, PVR)، اعطای حقوق بهنژادگر (Plant Breeder's Rights, PBRs)، تجاری‌سازی، ثبت و اخذ مجوز توزیع تجاری ارقام اصلاح شده برای اصلاحگران حائز اهمیت می‌باشد. در مطالعه حاضر، مطالعات تکمیلی سیتوژنتیکی و فلوسایتومتری جهت ارزیابی صفات سیتوژنتیکی، سایز ژنوم و سطح پلوئیدی در ۲۱ رقم هندوانه (توده‌های بذری هندوانه ایرانی) که قبلاً بر اساس دستورالعمل بین‌المللی آزمون تمایز، یکنواختی و پایداری (DUS) هندوانه (UPOV)، مورد بررسی قرار گرفته بودند، انجام گرفت. صفات کیفی و کمی این ارقام قبلاً بر اساس دستورالعمل بین‌المللی هندوانه (UPOV) بررسی شده بودند و شناسنامه مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی (variety description) این ارقام با استفاده از مقایسه میانگین به روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) مقایسه و کاراکتریزه شده بود. در ابتدا آنالیز فلوسایتومتری و تعیین سطح پلوئیدی برای هندوانه بهینه شده و در نهایت شناسنامه سیتوژنتیکی این ارقام تهیه، با نتایج آزمون DUS مقایسه گردید. تکنیک فلوسایتومتری در واقع روشی برای آنالیز میزان نسبی DNA درون‌سلولی و تعیین سطح پلوئیدی گیاه بوده، حاوی اطلاعاتی در مورد سایز ژنوم می‌باشد. در مطالعه حاضر سیستم فلوسایتومتری PARTEC Cell Analyser جهت جمع‌آوری و آنالیز داده‌های فلوسایتومتری و تعیین سطوح پلوئیدی توده‌های بذری هندوانه استفاده شد. بذور هندوانه از ۲۱ رقم مورد مطالعه در شرایط استاندارد گلخانه در مرکز تحقیقات ژنتیک ILVO (بلژیک) کشت و پس از استقرار برگ‌های جوان واقعی، نمونه‌های ۳-۴ میلی‌متری از برگ جوان و تازه جهت آنالیز سطح پلوئیدی استفاده شد. گیاه دیپلوئید شیکوره به‌عنوان کنترل و استاندارد در این آنالیز استفاده شد. نتایج حاصله از آنالیز فلوسایتومتری سطح پلوئیدی ارقام هندوانه مورد مطالعه نشان داد که اکثر این ارقام هندوانه دیپلوئید بوده و تنها یک رقم تریپلوئید بوده که خواص میوه متمایزی نسبت به سایر ارقام دارد. این نتایج نشان می‌دهند که سایز ژنوم یا سطح پلوئیدی در هندوانه ممکن است به‌عنوان شاخصی مهم در تمایز ژنوتیپ‌های هندوانه قابل استفاده در آزمون‌های DUS باشد.

کلمات کلیدی: **پلی پلوئیدی، کروموزوم، سیتوژنتیک ، میزان DNA، سایز ژنوم**

مقدمه

هندوانه با نام علمی (*Citrullus lanatus* (Thunb)) از زیر خانواده *Cucurbitoideae*، گونه‌ای یک‌ساله، دیپلوئید (۲n=۲x=۲۲) و از زیر گونه *vulgaris* می‌باشد. تولید عمده هندوانه تجاری جهان غالباً به‌صورت ارقام هیبرید F1 است (Solmaz & Sari 2009) و ایران با تولید ۴/۵ میلیون تن پس از چین به‌عنوان بزرگ‌ترین تولید کننده هندوانه جهان با ۶۹/۵ میلیون تن، دومین تولید کننده هندوانه جهان می‌باشد (FAO 2011). هندوانه دارای ارقام مختلفی است که از نظر شکل، اندازه، رنگ پوست، رنگ گوشت، اندازه بذر، طعم و مزه گوشت و غیره با هم متفاوت می‌باشند، ارقام بدون بذر (ارقام تریپلوئید) نیز دیده می‌شود. اگرچه شرایط محیطی و عملیات زراعی می‌توانند عوامل بسیار مؤثر در عملکرد هندوانه بوده، لیکن نوع رقم عامل تعیین کننده در عملکرد کمی و کیفی هندوانه می‌باشد، تفاوت معنی‌داری در بین ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف هندوانه وجود دارد. انجام آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری (DUS) برای شناسایی و ثبت ارقام جدید ضروری بوده (Solmaz & Sari 2009)، اتحادیه بین‌المللی حمایت از ارقام گیاهی (UPOV 2013) و اتحادیه اروپا (CPVO 2014) ، دستورالعمل‌های کاربردی برای اجرای آزمون‌های DUS را ارائه نموده‌اند. در مطالعه‌ای دیگر، ۱۳۴ نمونه از ژرم‌پلاسم قدیمی و محلی هندوانه ترکیه از نقاط مختلف جمع‌آوری‌شده و ۵۶ صفت مختلف مورفولوژیکی بر اساس دستورالعمل UPOV مورد بررسی قرار گرفت که نتایج این مطالعه تنوع ژنتیکی قابل توجهی را برای اکثر صفات مورد مطالعه مورفولوژیکی در این ژرم‌پلاسم نشان داد (Solmaz & Sari 2009). در اکثر برنامه‌های به نژادی و اصلاحی هندوانه، گزارشات محدودی مبنی بر میزان پلی مورفیسم و تنوع ژنتیکی خصوصاً در صفات فیزیولوژیکی و سیتوژنتیکی گزارش شده است و اکثر گزارشات موجود در ارتباط با صفات مورفولوژیکی یا بررسی مقاومت به بیماری‌ها می‌باشند (Uluturk et al. 2011; Mujaju et al. 2010). با توجه به اهمیت صفات سیتوژنتیک، سایز ژنوم و سطح پلوئیدی در تعیین و تمایز عملکرد فیزیولوژیکی و عملکردی محصولات باغی، بررسی این فاکتورها نقش مهمی را در تمایز ژنوتیپ‌ها و ارقام زیر گونه محصولات باغی خصوصاً محصولات کشت شده تحت شرایط جغرافیایی و محیطی مختلف نظیر هندوانه دارد. آنالیز و تعیین سطح پلوئیدی گیاهان با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری روشی معمول بوده، کاربرد این تکنیک در اصلاح ژنتیکی محصولات با هدف کاراکتریزه کردن و گزینش نتاج و والدین در تلاقی‌های اینترپلوئیدی، کنترل سطوح پلوئیدی در پروسه‌های تولید و تکثیر بذور و ارزیابی آزمایشات پلی پلوئیداسیون گیاهان به‌خوبی شناخته شده می‌باشد. از طرفی پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌های فلوسایتومتری و اتوماسیون کامل این تکنیک در تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی جهت آنالیز سایز ژنوم آن‌ها، کاربرد این تکنیک را در مطالعات اصلاحی و تکنولوژی بذر و محصولات باغی آسان‌تر و کاربرد اقتصادی آن را توجیه نموده است. این اطلاعات در مورد سایز ژنوم خصوصاً در هیبریداسیون‌های بین‌گونه‌ای، می‌تواند نقش مؤثری در ارزیابی نوع و طبیعت هیبریدی نتاج و نهال‌های حاصل از هیبریداسیون داشته باشد (Van Tuyl & Loureiro et al. 2007; Johnston et al. 1999; Bretagnolle & Thompson 1995; Boon 1997; Van Tuyl et al. 1989; Arumuganathan & Earle 1991; Doležel et al 1989; Galbraith et al. 1983).

هدف از مطالعه حاضر، بهینه‌سازی آنالیز فلوسایتومتری در تعیین سطح پلوئیدی ژنوتیپ‌های کاراکتریزه شده هندوانه و نهایتاً ارزیابی تأثیر سطح پلوئیدی و سایز ژنوم در تمایز ژنوتیپ‌های هندوانه و نهایتاً معرفی این صفت به‌عنوان یک کاراکتر مؤثر در آزمون DUS بر اساس دستورالعمل UPOV بوده است.

مواد و روش‌ها

سیستم فلوسایتومتری

در این مطالعه، سیستم فلوسایتومتر PARTEC *Cell Analyser II* (Partec, Munster, Germany) تجهیز شده با نرم‌افزار DPAC (Data Pool Application for CA-II; Partec, Munster, Germany)، جهت جمع‌آوری و آنالیز داده‌های فلوسایتومتری و کاربرد در تعیین سطح پلوئیدی در پژوهش‌های گیاهی، حاوی لامپ UV LED (365 nm) با قدرت خروجی حداقل 15 mW جهت آنالیز رنگ‌آمیزی با ترکیب دپی DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ، یک ترکیب فلورسنت نفوذی جهت رنگ‌آمیزی مولکولی در تعیین سطح پلوئیدی هندوانه استفاده شد.

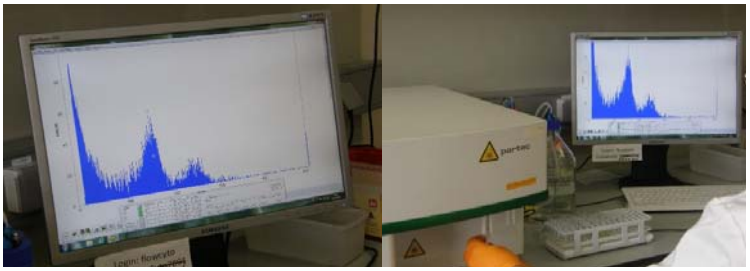
مواد رویشی استفاده شده در آنالیز فلوسایتومتری هندوانه:

بذور هندوانه از ۲۵ رقم مورد مطالعه در این پروژه در شرایط استاندارد گلخانه در مرکز تحقیقات ژنتیک کاربردی ILVO کشت شده و پس از استقرار برگ‌های جوان واقعی هندوانه، نمونه‌های ۳-۴ میلی‌متری از برگ جوان و تازه جهت آنالیز سطح پلوئیدی استفاده شد گیاه دیپلوئید شیکوره به‌عنوان نمونه کنترل و استاندارد در این آنالیز استفاده شد (شکل ۱).

تهیه نمونه و سوسپانسیون هسته سلولی جهت آنالیز فلوسایتومتری:

آنالیز فلوسایتومتری با رزولوشن و دقت بالا بر روی DNA هسته‌ای استخراجی از بافت گیاهی خرد شده بر اساس روش (Galbraith et al. 1983, Otto 1990) انجام گرفت. بر اساس این روش دیسک‌های ریز از بافت برگ جوان در سه تکرار از هر رقم هندوانه در گلخانه تهیه شده، در محلول بافر شامل سیتریک اسید خرد شده، پس از فیلتر شدن با بافر Na_2HPO4 و DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) شستشو داده شده، نهایتاً سوسپانسیون حاوی هسته‌های سلولی جهت آنالیز سطح پلوئیدی توسط فلوسایتومتری استخراج شدند (شکل ۲).

شکل ۱: بذور کاشته شده از ارقام مورد مطالعه هندوانه(راست)، و برگ گیاه شیکوری به‌عنوان شاهد دیپلوئید (چپ)



شکل ۲: تهیه نمونه و آنالیز سطح پلوئیدی نمونه با سیستم فلوسایتومتر (UV LED) مدل (*CytoFlowSpace*) PARTEC

نتایج و بحث

نتایج آنالیز فلوسایتومتری در این تحقیق نشان داده است که اکثر ارقام مورد مطالعه به‌جز رقم "ماسال" دیپلوئید بوده (۲n=۲x=۲۲)، ژنوتیپ ماسال تریپلوئید (۲n=۳x) می‌باشد (جدول ۱). نتایج نشان می‌دهد که در رقم "ماسال" تریپلوئید با سایز ژنوم بزرگ‌تر برخی از صفات کیفی میوه نیز نظیر رنگ گوشت میوه، میزان ضخامت پریکارپ کاملاً نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها متمایز می‌باشد (شکل ۳، جداول ۲-۴). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که دستورالعمل اجرای آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری (DUS) اتحادیه بین‌المللی حفاظت از ارقام گیاهی که عمدتاً بر مبنای صفات مورفولوژیکی می‌باشد، برای متمایز کردن ارقام و منابع ژرم‌پلاسم هندوانه ایران کافی نیست و لازم است تا با سایر صفات سیتوژنتیک، فیزیولوژیک و عملکردی (فانگشنال) تکمیل شود. اگرچه برخی از محققان (Roose et.al. 2006) استفاده از مارکرهای مولکولی را برای تکمیل پروسه‌های آنالیزی DUS در هندوانه را پیشنهاد کردند ولی با مطالعه جمعیت‌های متنوع و بررسی صفات مورفولوژیک در آن جمعیت، همچنین مطالعه سایر دستورالعمل‌های تمایز، یکنواختی و پایداری که توسط برخی کشورها (اتحادیه اروپا) استفاده می‌شود (CPVO, 2007)، به نظر می‌رسد که انجام مطالعات سیتوژنتیکی (فلوسایتومتری) و تعیین سطح پلوئیدی و سایز ژنوم در هر ژنوتیپ/رقم هندوانه از یک طرف و بررسی عملکرد فیزیولوژیکی آن تحت شرایط محیطی و جغرافیایی متنوع و مقایسه آن با سایز ژنوم هسته‌ای احتمالاً می‌تواند پایه‌گذار دستورالعمل اصلاح شده ملی مناسبی برای تمایز و شناسایی ژنوتیپ‌های هندوانه از توده بذری موجود در ایران و حتی پایه‌گذار اصلاحاتی در دستورالعمل بین‌المللی باشد. نتایج حاصله از آنالیز فلوسایتومتری در این پژوهش و سطوح پلوئیدی ارقام هندوانه مورد مطالعه در جدول شماره ۱ شرح داده شده است. در مطالعات آتی، نه‌تنها بررسی نحوه عملکرد (مقاومت/حساسیت) ژنوتیپ تریپلوئید ماسال تحت تنش‌های محیطی و بیماری فوزاریوم و سایر بیماری‌ها و آفات بررسی خواهد شد، بلکه با انجام آنالیزهای عملکردی (فانگشنال) ژن‌های کاندید مؤثر در انواع مقاومت هندوانه به انواع تنش‌های زیستی و غیر زیستی و کارکتریزه کردن نواحی فیزیکی این ژن‌ها بروی کروموزوم‌ها (تهیه نقشه فیزیکی ژن‌ها) با استفاده از تکنیک‌های سیتوژنتیک تکمیلی، در این هندوانه تریپلوئید ماسال، و مقایسه آن با نوع هندوانه دیپلوئید، احتمالاً به مارکرهای مولکولی فانگشنال برای تکمیل آزمون‌های DUS دست خواهیم یافت.

جدول ۱: نتایج آنالیز فلوسایتومتری و نتایج سطح پلوئیدی در ارقام هندوانه

Watermeloen		22-04-16			Gain
Nr	Sample	Comp nr	peak positi	ploidy	551
1	9369D	001-001	98	2x	
2	PHONIX	001-002	103	2x	
3	SATURN	001-003	107	2x	
4	SANCI	001-004	104	2x	
5	YAMI	001-005	110	2x	
6	WOLRD QUEEN	001-006	102	2x	
7	CHARLSTON 76	001-007	103	2x	
8	ROSHA	001-008	104	2x	
9	CRIMSON SWEET AMPHIUN	001-009	99	2x	
10	GLORY JUMBO	001-010	106	2x	
11	3X MASA	001-011	150	3x	
12	WORLD STAR	001-012	96	2x	
13	MADAGA	001-013	98	2x	
14	VENUS	001-014	101	2x	
15	YALDA	001-015	109	2x	
16	UNICORN	001-016	102	2x	
17	GLORY FUN	001-017	108	2x	
18	BEST YIELD	001-018	100	2x	
19	2720 D 2X	001-019	103	2x	
20	TITAN	001-020	105	2x	
21	TONDAR	001-021	110	2x	

Table 2: Some characteristics according to UPOV guideline for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability (DUS) in watermelon "Masal"

No.	Characters	States of expression	Note
1	Ploidy	triploid	3
2	Fruit: shape in longitudinal section	circular	1
3	Fruit: depression at apex	medium	3
4	Fruit: ground color of skin	medium green	6
5	Fruit: conspicuousness of veining	medium	3
6	Fruit: pattern of stripes	one colored and mled	4
7	Fruit: width of stripes	narrow	3
8	Fruit: main color of stripes	medium green	4
9	Fruit: conspicuousness of stripes	strong	4
10	Fruit: margin of stripes	medium	2
11	Fruit: size of insertion of peduncle	medium	5
12	Fruit: size of pistil scar	medium	5
13	Fruit: thickness of pericarp	thick	7
14	Fruit: main color of flesh	yellow	2

Table 3: Some characteristics according to UPOV Guideline for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability (DUS) in watermelon "Best yield"

No.	Characters	States of expression	Note
1	Ploidy	diploid	-
2	Fruit: shape in longitudinal section	medium elliptic	3
3	Fruit: depression at apex	medium	3
4	Fruit: ground color of skin	light green to medium green	5
5	Fruit: conspicuousness of veining	medium	3
6	Fruit: pattern of stripes	Only veins	6
7	Fruit: width of stripes	Very narrow	1
8	Fruit: main color of stripes	light green	3
9	Fruit: conspicuousness of stripes	weak	2
10	Fruit: margin of stripes	diffuse	1
11	Fruit: size of insertion of peduncle	medium	5
12	Fruit: size of pistil scar	medium	5
13	Fruit: thickness of pericarp	medium	5
14	Fruit: main color of flesh	red	6

Table 4: Characteristics according to UPOV Guideline for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability (DUS) in watermelon "Maral"

No.	Characters	States of expression	Note
1	Ploidy	diploid	-
2	Fruit: shape in longitudinal section	narrow elliptic	4
3	Fruit: depression at apex	medium	3
4	Fruit: ground color of skin	medium green to dark green	7
5	Fruit: conspicuousness of veining	weak	2
6	Fruit: pattern of stripes	Only one colored	1
7	Fruit: width of stripes	broad	7
8	Fruit: main color of stripes	dark green	5
9	Fruit: conspicuousness of stripes	Very strong	5
10	Fruit: margin of stripes	medium	2
11	Fruit: size of insertion of peduncle	medium	5
12	Fruit: size of pistil scar	medium	5
13	Fruit: thickness of pericarp	medium	5
14	Fruit: main color of flesh	red	6

شکل ۳: میوه هندوانه رقم‌های "ماسال (Masal)" (راست)، رقم "مارال (Maral)" (وسط)، رقم "بست فیلد (Best Field)" (چپ)

منابع

Arumuganathan, K. and Earle, E.D. 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. Plant Mol. Biol. Rep. 9:229-233.

Bretagnolle, F. and Thompson, J.D. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autoploid plants. New Phyt 129:1-22.

CPVO. European Union Community Plant Variety Office. 2014. Protocol for tests of distinctness, uniformity and stability (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai) watermelon. CPVO-TP/142/2. P:33

Doležel, J., Binárová, P. and Lucretti, S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. Biol. Plant. 31:113-120.

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.

Johnston, J.S., Bennett, M.D., Rayburn, A.L., Galbraith, D.W. and Price, H.J. 1999. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. Am. J. Bot. 86:609-613.

Loureiro, J., Suda, J., Doležel, J. and Santos, C.V. 2007. FLOWer – Plant DNA flow cytometry database. P.423-438. In: Doležel, J., Greilhuber, J. & Suda J. (eds.), Flow cytometry with plant cells – Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes. Wiley, Weinheim, Germany.

Mujaju, C., Sehic, J., Werlemark, G., Garkava-Gustavsson, L., Fatih, M. and Nybom, H. 2010. Genetic diversity in watermelon (*Citrullus lanatus*) landraces from Zimbabwe revealed by RAPD and SSR markers. *Hereditas* 147: 142–153

Otto, F. 1990. DAPI staining of fixed cells for high resolution flow cytometry of nuclear DNA, p. 105–110. In: Z. Darzynkiewicz and H.A. Crissman (eds.). Methods in cell biology, Vol. 33, Academic Press, New York.

Solmaz, I. & N. Sari. 2009. Characterization of watermelon (*Citrullus lanatus*) accessions collected from Turkey for morphological traits. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 56:173-188

Roose-Amsaleg, C., E. Cariou-Pham, D. Vautrin, R. Tavernier and M. Solignac. 2006. PRIMER NOTE: Polymorphic microsatellite loci in *Linum usitatissimum*. *Molecular Ecology Note*. 6:796–799

Van Tuyl, J.M. and Boon, E. 1997. Variation in DNA-content in the genus *Lilium*. Acta Hort. 430:829-835.

Van Tuyl, J.M., De Vries, J.N., Bino, R.J. and Kwakkenbos T.A.M. 1989. Identification of 2n-pollen producing interspecific hybrids of *Lilium* using flow cytometry. Cytologia 54: 737-745.

UPOV. Guidelines for the conduct of tests or distinctness, uniformity and stability in water melon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai). 2013. TG/142/5.

Uluturk Z.I., , Frary A. and Doganlar S. 2011. Determination of genetic diversity in watermelon [Citrullus lanatus (Thunb.) Matsum & Nakai] germplasm. *Australian Journal of Crop Science*. 5(13):1832-1836.

The Flow Cytometry Analyses to Clarify the Distinction OR Uniformity of Iranian Watermelon Germplasm

F. Razavi [1]*, A. Khandan[2]
[1] Institute of Horticulture
[2] Institute of Seed &Plant Certification & Registration
*Corresponding Author: f.razavi@areeo.ac.ir

Abstract

Watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.)) from sub-family *Cucurbitoideae* includes 4 diploid species (2n=2X=22) distributed over the world. *Citrullus lanatus* is an annual herbal plant and the edible watermelon is sub species *Vulgari* and commercial watermelon production is mostly based on F1 Hybrid seeds. Due to the report of FAO (2011), Iran is the second watermelon producer after the China over the world. Different watermelon's cultivars are cultivated around the world with variability in the fruit shape, size, skin color, seed number & color, as well as disease and pest resistance, etc. To date, watermelon's cultivars in Iran are rarely genetically characterized, especially their heritage and the history of breeding programs are not clearly determined. In the present study, around 60 morphological and physiological traits were already analyzed based on the UPOV instruction for the examination of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS analysis) in watermelon's Iranian varieties. To confirm the results of this study, the ploidy level and genome size of these varieties should be measured by flow cytometry technique as a well-known and established technique for ploidy analysis in plant breeding. Recent developments in the apparatus itself, as well as in automated sample preparation, simplified this technique and made it more cost effective. Commonly flow cytometry analyses the relative DNA content in the cell related to the ploidy level of the plant. Besides ploidy, information on genome sizes can be obtained. Flow cytometric technique was firstly optimized for watermelon in ILVO (Belgium) and subsequently applied to determine ploidy level in every variety. Our results confirmed that only one studied variety was triploid and others were diploids. The triploid showed some distinct fruit traits different with others. These results demonstrated the ploidy level can be considered as one of the characteristics should be measured in DUS analyses of watermelon's UPOV instruction.

***Keywords*: DNA amount, genome size, interspecific hybridisation, ploidy, polyploidisation**