اثر قندهای مختلف بر تولید گیاهان هاپلویید توده‌های بومی پیاز خوراکی (*Allium cepa* L.)

نصراله سوری (۱)، محمدرضا حسندخت (۲) و غلامعلی پیوست (۳)

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه پیام نور لرستان- کوهدشت، ۲- استادیار گروه باغبانی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران

۳- دانشیار گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

این پژوهش به منظور بررسی اثر انواع قند (ساکارز، گلوکز و فروکتوز) بر القای هاپلوئیدی نه توده پیاز ایرانی از طریق کشت گل کامل در محیط درون‌شیشه‌ای انجام گرفت و صفاتی مانند رویان‌زایی، باززایی گیاه، بقای گیاه، شیشه‌ای شدن گلها و زمان لازم جهت ظهور رویان ارزیابی شدند. در این آزمایش از مجموع ٤٧٥٨ گل کشت شده در محیط‌کشت‌های مختلف، ٦٤ رویان (١/٣٤٪) تولید شد. بیشترین و کمترین درصد رویان‌زایی به ترتیب در محیط‌کشت‌های دارای گلوکز و فروکتوز بدست آمد. توده اقلید فارس با میانگین ۲/۳۲ درصد رویان‌زایی و توده طارم زنجان با میانگین ۰/۰۲ درصد رویان‌زایی به ترتیب بیشترین و کمترین واکنش به ماده‌زایی در محیط درون شیشه‌ای نشان دادند. بیشترین رویان‌زایی مربوط به توده سفید نیشابور در محیط‌کشت دارای گلوکز با میانگین ٥/٠٦ درصد و توده اقلید فارس در محیط‌کشت دارای ساکارز با میانگین ٤/٥١ درصد بود. بیشترین و کمترین درصد باززایی به ترتیب مربوط به توده اقلید فارس و طارم زنجان بود (۲/۱۹ و ۰/۱۹ درصد). توده اقلید فارس دارای بیشترین درصد بقا (٦٣/٨٩ درصد) و توده سفید قم دارای کمترین درصد بقا (۱۳/۸۹ درصد) بود. بنابراین قند گلوکز همانند ساکارز می‌تواند بعنوان منبع هیدرات کربن مورد استفاده قرار گیرد و مصرف قند فروکتوز رویان‌زایی را کاهش می‌دهد.

مقدمه

پیاز (***Allium cepa L.***) یکی از مهمترین سبزیهای جنس ***Allium*** و تیره Alliaceae می‌باشد. ایجاد دابل- هاپلوئیدها یک راه‌برد جایگزین می‌باشد که همزمان هموزیگوزیتی کامل و یکنواختی فنوتیپی را به ارمغان می‌آورد (۲). گیاهان هاپلوئید می‌توانند از سلول‌های گامت نر یا ماده به‌دست آیند (۲). بر طبق نظر کلر و کورزون (١٩٩٦)، حسندخت و همکاران (۱۳۷۹) و بوهانک (۲۰۰۲) در پیاز، آزمایش‌های تولید هاپلوئید از طریق نرزایی (کشت بساک‌های بزرگ و کشت میکروسپور) به شکست منجر شده است. لذا، تولید گیاهان هاپلوئید پیاز به روش ماده‌زایی در محیط درون‌شیشه‌ای با کشت گل کامل و به دنبال آن تولید گیاهان دابل- هاپلوئید ساده‌ترین و سریعترین روش دستیابی به هموزیگوتی کامل و تولید لاین خالص است (۱). وینترهالتر و وینترهالتر (۱۹۹۹) پیشنهاد نمودند که بعضی اثرات ساکارز مشابه با فعالیت‌های شبه‌هورمونی در بعضی سیستم‌های کشت درون‌شیشه‌ای است به طوری که نقش ساکارز در ماده‌زایی پیاز به مطالعات دقیق‌تری نیاز دارد. ساختار ژنتیکی گیاهان مادری پیاز و شرایط رشد مهمترین نقش در موفقیت ماده‌زایی آن دارند. هدف این پژوهش ارزیابی اثرات انواع قند ساکارز، گلوکز و فروکتوز در محیط‌کشت القایی بر القای هاپلوئیدی نه توده پیاز ایرانی بود.

مواد و روشها

در بهار سال ۱۳۸۳ بذرهای نه توده پیاز ایرانی شامل توده‌های اقلید فارس، مشکان فارس، درچه اصفهان، قرمز نیشابور، سفید نیشابور، سفید کاشان، سفید کردستان، سفید قم و طارم زنجان در مزرعه پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس در شرایط آب و هوایی یکسان کاشته شدند و پس از برداشت تعداد ۲۰ سوخ از هر توده انتخاب شدند. در آبان ماه سال، ۱۳۸۳ به منظور

برطرف شدن سرمای موردنیاز آنها جهت بهاره‌سازی، سوخ‌ها در محیط خارج از گلخانه در گلدان‌هایی با بستر مناسب که شامل ۵۰ درصد ماسه و ۵۰ درصد خاک رس بود، کشت گردیدند و در بهمن ماه به گلخانه منتقل شدند. در اردیبهشت ماه سال بعد گلدهی پیازها شروع شد. برای کاشت گلها، چترهای گل را سه تا پنج روز قبل از باز شدن گلها از بوته جدا کرده و به منظور ضدعفونی سطحی ابتدا به مدت ۱۰ ثانیه در متیل الکل (الکل صنعتی) و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ قرار گرفتند و پس از آن سه بار با آب مقطر سترون، شستشو شدند (٦). سپس گلها با دمگل کوتاه (حدود دو میلی‌متر) روی محیط‌های کشت ساکارز (S)، فروکتوز (F) و گلوکز (G) هر کدام به میزان ۱۰۰ گرم در لیتر کاشته شدند. در هر پتری‌دیش ۱۵ × ۹۰ میلی‌متری ۳۰ گل کاشته شد. گلها به طور تصادفی بین دو تکرار تقسیم شدند. درب پتریها بوسیله پارافیلم پوشانده شد و در اطاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی۵۰٪ و تحت نور مصنوعی لامپهای فلورسنت با دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. محیط‌های کشت حاوی عناصر پرمصرف محیط‌کشت پایه BDS، عناصر کم‌مصرف محیط‌کشت پایه B_5 و ویتامین‌ها به همراه هورمون‌های توفوردی (2,4- D) و بنزیل‌آدنین (6- BA) هر کدام به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر و تفاوت آنها فقط در نوع قند بود. پس از یک ماه گلهای کاشته شده روی محیط‌های کشت S، G و F به ترتیب به محیط‌های کشت جدید با ترکیب مشابه محیط‌های S، G و F و فاقد هورمون منتقل شدند. رویان‌های قابل مشاهده با بینوکولر و در شرایط سترون از تخمک جدا و به محیط‌کشت باززایی M_4 (بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی) حاوی عناصر پرمصرف محیط‌کشت پایه BDS، عناصر کم‌مصرف محیط‌کشت پایه B5 و ساکارز به میزان ٤٠ گرم در هر لیتر محیط‌کشت منتقل شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با همان دوره نوری قبلی قرار داده شدند. لازم به ذکر است که در تمام محیط‌های کشت تهیه شده برای آزمایش، pH برابر با ٦ تنظیم گردید (٦). صفات درصد رویان‌زایی (E %) (تعداد رویان قابل مشاهده در ۱۰۰ گل کشت شده)، درصد باززایی گیاه (R %) (تعداد گیاه باززایی شده در ۱۰۰ گل کشت شده)، درصد بقا گیاه (R/E %) (تعداد گیاه باززایی شده در ۱۰۰ رویان)، زمان لازم جهت ظهور رویان (روز) و درصد گلهای شیشه‌ای شده یادداشت برداری و داده‌های آزمایش که بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی پیاده شده بود با نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. سطح پلوئیدی گیاهان باززایی‌شده با استفاده از رنگ‌آمیزی سلول‌های انتهای ریشه و شمارش کروموزومی تعیین گردید و برای تعیین سطح پلوئیدی گیاهان باززایی شده از روش تغییر یافته فولگن استفاده گردید (٦ و ۷).

نتایج و بحث

براساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر محیط‌کشت در مورد همه صفات مورد مطالعه در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده برای سه نوع محیط‌کشت ساکارز، گلوکز و فروکتوز (جدول ۲) نشان می‌دهد که میزان رویان‌زایی و باززایی گیاه برای محیط‌کشت‌های با منبع ساکارز و گلوکز با یکدیگر اختلاف معنی‌دار آماری نداشته و در گروه برتر قرار گرفتند، اما درصد رویان‌زایی محیط‌کشت حاوی قند فروکتوز کمتر بود. نتایج این تحقیق تایید کننده تحقیقات وینترهالتر و وینترهالتر (۱۹۹۹) و جوفریا و همکاران (۱۹۹۷) می‌باشد. این محققین در تحقیقات خود گزارش نمودند که منبع کربن ساکارز در رویان‌زایی پیاز مؤثر است و نتایج خوبی در پی دارد. وینترهالتر و وینترهالتر (۱۹۹۹) پیشنهاد نمودند که بعضی اثرات ساکارز مشابه با فعالیت‌های شبه‌هورمونی در بعضی سیستم‌های کشت درون‌شیشه‌ای است. بر اساس نتایج این تحقیق مشخص گردید که اثر گلوکز بر روی رویان‌زایی پیاز مانند ساکارز است، ولی فروکتوز تأثیر منفی بر رویان‌زایی توده‌های پیاز ایرانی مورد مطالعه در این تحقیق داشته است. آزمون چند دامنه‌ای دانکن (جدول ۲) میانگین درصد باززایی گیاه در دو محیط‌کشت ساکارز (۱/۰۱٪) و گلوکز (۱/۰۹٪) را در یک گروه و فروکتوز (۰/٤٪) را در گروه دیگر قرار داد. نتایج گروه‌بندی برای درصد باززایی مشابه رویان‌زایی بود. درصد بقای گیاه در محیط‌کشت دارای ساکارز بیشترین و در محیط‌کشت

دارای فروکتوز کمترین بود. درصد شیشه‌ای شدن گلها در محیط‌کشت دارای گلوکز کمترین بود. با توجه به اینکه شیشه‌ای شدن گلها در اثر جذب زیاد آب صورت می‌گیرد و رشد گلهای شیشه‌ای شده معمولاً متوقف شده و در نهایت این گلها از بین می‌روند، بنابراین محیط‌کشت دارای گلوکز از این نظر برتری دارد. بیشترین و کمترین زمان ظهور رویان به ترتیب مربوط به محیط‌های کشت دارای فروکتوز و ساکارز بود. نتایج این پژوهش تایید نمود که القای هاپلوئیدی در توده‌های پیاز ایرانی در کشت درون شیشه‌ای مقدور بوده و لذا با تهیه لاین خالص از آنها می‌توان به بهنژادی این توده‌ها و تولید بذر دورگ مبادرت نمود. در این آزمایش از مجموع ٤٧٥٨ گل کشت شده در محیط‌کشت‌های مختلف ٦٤ رویان (١/٣٤٪) تولید شد. از این تعداد، ٣ رویان (٤/٧٪) از آنها بدون رشد باقی ماند، ٦ رویان (٩/٣٤٪) فقط برگ و ٣ رویان (٤/٧٪) فقط ریشه تولید کرد و ٤٠ رویان (٦٢/٥٪) نیز به گیاه کامل تبدیل شدند. آنالیز شمارش کروموزومی سلولهای انتهای ریشه نشان داد که ٧٣/٥٪ گیاهان آنالیز شده هاپلوئید, ١٧/٦٪ دیپلوئید و ٩/١٪ شیمر هاپلوئید- دیپلوئید بودند. وجود گیاهان شیمر هاپلوئید- دیپلوئید نشان‌دهنده عدم پایداری حالت هاپلوئیدی و دو برابر شدن خودبخودی کروموزوم‌ها است. البته ممکن است این دو برابر شدن کروموزوم‌ها تنها در سلول‌های ریشه اتفاق افتد و قسمت هوایی گیاه همچنان هاپلوئید باقی بماند (٧ و ٨). بیشترین میزان رویان‌زایی مربوط به توده سفید نیشابور در محیط‌کشت دارای گلوکز با میانگین ٥/٠٦ درصد و توده اقلید فارس در محیط‌کشت دارای ساکارز با میانگین ٤/٥١ درصد بود. در این مطالعه، بررسی اثر انواع قند ساکارز، گلوکز و فروکتوز نشان داد که قند گلوکز نیز همانند ساکارز در توده‌های پیاز ایرانی مورد مطالعه می‌تواند به عنوان منبع کربنی در کشت درون شیشه‌ای استفاده شود. از معایب روش ماده‌زایی درصد موفقیت کم در تولید رویان است و باید توده‌های زیادی مورد آزمایش قرار گیرند تا بهترین آنها با پتانسیل تولید رویان بالا انتخاب شوند.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات رویان‌زایی، باززایی گیاه، بقای گیاه، شیشه‌ای شدن گلها و زمان ظهور رویان در ۹ توده پیاز ایرانی

منابع تغییر	درجه‌آزادی	میانگین مربعات درصد رویان‌زایی گیاه	میانگین مربعات درصد باززایی گیاه	میانگین مربعات درصد بقای گیاه	میانگین مربعات درصد شیشه‌ای شدن گلها	میانگین مربعات زمان ظهور رویان (روز)
محیط‌کشت	۲	۰/۷۲۱**	۰/٦٦۳**	۹۷/۰۰۲**	۳/٥۲٥**	۸٦/۲۲٥**
توده	۸	۰/٥۹۱**	۰/٤٥۲**	۲٤/۳۲٤**	۲/۰۹۱**	۲۹/۲۲۰**
محیط‌کشت×توده	۱٦	۰/۸۲۲**	۰/٦۱۰**	٤۹/۰۷۸**	۲/۰٤۷**	۳۸/۸۰۸**
اشتباه آزمایشی	٥٤	۰/۰٤۰	۰/۰٤٥	٤/۳۳٤	۰/۱۲۷	۳/۰۲۷

** اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪

جدول ۲- مقایسه میانگین* محیط‌کشت‌های دارای ساکارز، گلوکز و فروکتوز از نظر رویان‌زایی، باززایی، بقای گیاه، زمان ظهور رویان‌زایی و شیشه‌ای شدن

محیط‌کشت	درصد رویان‌زایی	درصد باززایی گیاه	درصد بقای گیاه	درصد شیشه‌ای شدن	زمان ظهور رویان (روز)
ساکارز	۱/۲۹ a	۱/۰۱ a	٥٤/٦٤ a	۱/٥۸ a	٦۸/۲۲ b
گلوکز	۱/٤۰ a	۱/۰۹ a	۳۹/٥٤ b	۳/۷٥ c	۷٦/٥۲ c
فروکتوز	۰/٦٤ b	۰/٤۰ b	۱٥/۷٤ c	۲/۹۹ b	٦٤/۷۷ a

* مقایسه دانکن در سطح احتمال ٥٪

منابع

- حسندخت، م.، ع. کاشی، ب. کامپیون و ر. بزرگی‌پور. ۱۳۷۹. بررسی تولید گیاهان هاپلوئید پیازهای خوراکی بومی ایران (***Allium cepa L.***) به روش ماده‌زایی در محیط درون‌شیشه‌ای. نشریه علمی- پژوهشی نهال و بذر، جلد ۱۶، شماره ۳، صفحات ۳۱۲-۳۰۰.

2. Bohanec, B., 2002. Doubled haploid onions, in: H. D. Rabinowitch, L. Currah (Eds.), Allium Crop Science: Recent Advances. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 145–158.
3. Bohanec, B., & M. Jakse, 1999. Variations in gynogenic response among long- day onion (*Allium cepa* L.) accessions. Plant Cell Reports 18: 737–742.
4. Bohanec, B., M. Jakse, A. Ihan, & B. Javornik. 1995. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. Plant Science 104: 215–224.
5. Bohanec, B., M. Jakse, A. Ihan, & M. J. Havey. 1999. Effects of genotype on onion gynogenesis and attempts of genome doubling at embryo stage-a progress report. In: Gametic Embryogenesis in Monocots, COST-824 Workshop, 10-13 June 1999, Jokioinen, Finland, pp. 37-38.
6. Campion, B., M. T. Azzimonti, E. Vicini, M. Schiavi, & A. Falavigna. 1992. Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis. Plant Science 86: 97–104.
7. Campion, B., B. Bohanec, & J. Javornik. 1995a. Gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.): evidence of their homozygosity. Theorical and Applied Genetics 91: 598–602.
8. Campion, B., E. Perri, M. T. Azzimonti, E. Vicini, & M. Schiavi. 1995b. Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.). Plant Breeding 114: 243–246.
9. Geoffriau, E., R. Kahane, & M. Rancillac. 1997. Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.). Euphytica 94: 37–44.
10. Javornik, B., B. Bohanec, & B. Campion. 1998. Studies on the induction of a second cycle gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.) and genetic analysis of the plants. Plant Breeding 117: 275–278.
11. Keller, E. R. J., & L. Korzun. 1996. Haploidy in onion (*Allium cepa* L.) and other *Allium* species. In: Jain, S. M., Sopory. S. K. and Veillux, R. E. (Eds.) *In vitro* Haploid Production in Higher Plants, Vol. 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp.51-75.
12. Muren, R. 1989. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. HortScience 24: 833–834.
13. Vinterhalter, D. V., & B. S. Vinterhalter. 1999. Hormone- like effects of sucrose in plant *in vitro* cultures. Phyton (Austria) Special Issue 'Plant Physiology' 39: 57-60.

Effect of Different Sugars on Haploid Plants Production of Iranian Onion Landraces (*Allium cepa* L.)

N. SOORI[1], M. R. HASSNDOKHT[2] AND G. PAYVAST[3]
1- Staff Member, Lorestan University of Payam Noor- Kouhdasht
2- Assistant Professor, Horticultural Dept of Agriculture College, Tehran University
3- Associate Professor, Horticultural Dept of Agriculture College, Guilan University

Abstract

To investigate effect of different sugars (sucrose, glucose and fructose) on haploid induction of nine Iranian onion landraces via *in vitro* whole flower culture, this research was carried out and triats such as embryogenesis, plant regeneration, plant survival rate, vitrified flowers and sprouting times were evaluated. In this research, from 4758 cultured flowers in different media, 64 embryos (%1.34) were produced. The highest and lowest embryo percentages were obtained in medium containing glucose and fructose, respectively. Eghlid- e- Fars and "Tarom- e- Zanjan" landraces showed the highest and lowest response to *in virto* gynogenesis (2.32 and 0.02 %, respectively). The highest embryogenesis (5.06 %) was belong to "Sefid- e- Naishabur" in medium containing glucose and Eghlid- e- Fars in medium containing sucrose (4.51%). The highest and lowest plant regeneration was belong to "Eghlid- e- Fars" and "Tarom- e- Zanjan", respectively (2.19 and 0.19%). "Eghlid- e- Fars" had the highest

plant survival rate (63.89%) and "Sefid- e- Qom" had the lowest (13.89%). Therefore, glucose like sucrose could be used as carbohydrate source and using fructose reduces embryogenesis.
Keywords: Onion, Haploid, *In vitro* culture, Gynogenesis.