

انگیزش چندگانی در انگور رقم عسکری با استفاده از اوریزالین

زهرا عطایی*^۱، علی قرقانی^۱، ابولفضل جوکار^۱

^۱ بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

*نویسنده مسئول zahra.ataee@shirazu.ac.ir

چکیده

چندگان به موجودات زنده‌ای که بیش از دو سری کروموزوم‌ها پلوئید داشته و از جد شدن غیرطبیعی کروموزوم در طول تقسیم سلولی به دست آمده‌اند، اطلاق می‌شود. چندگانی به‌عنوان یک روش اصلاحی برای بهبود خصوصیات رویشی و زایشی با افزایش مقدار ژنوم هسته در محصولات کشاورزی کاربرد دارد. به‌منظور بررسی اثر اوریزالین و تعیین بهترین میزان غلظت آن برای القای چندگانی در انگور رقم عسکری آزمایشی در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار در محل گلخانه پژوهشی بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل شاهد (عدم کاربرد اوریزالین) و ۲ سطح اوریزالین (۳۰ و ۶۰ میکرومولار) بود. اعمال تیمار اوریزالین با روش آغشته نمودن جوانه‌ها توسط گلوله پنبه‌ای در زمان تغییر رنگ جوانه‌ها و قبل از شکفتن آن‌ها انجام شد. گیاهان چندگان با استفاده از آنالیز فلوسایتومتری مشخص شدند. درصد زنده‌مانی گیاهان، تراکم و ابعاد روزنه و شمارش تعداد کروموزوم‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون آماری T در رابطه با درصد زنده‌مانی گیاهان دوگان و چندگان نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گیاهان چندگان و دوگان در رقم عسکری وجود نداشت و تمامی گیاهان مورد پژوهش بقای خود را حفظ کردند. میزان تراکم و ابعاد روزنه در گیاهان چهارگان بیشتر از گیاهان دوگان بود. شمارش کروموزوم‌ها نیز دوبرابر شده تعداد تنها در گیاهان چهارگان را تأیید کرد. از مواد ضد میتوزی به‌عنوان یک روش مؤثر می‌توان برای القای چندگانی در انگور استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اوریزالین، تراکم روزنه، ضد میتوزی، فلوسایتومتری

مقدمه

انگور رقم عسکری یکی از مهم‌ترین ارقام انگور ایران است که بیشتر مصرف تازه‌خوری دارد ولی به صورت کشمش نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. بی‌دانه بودن و نازکی پوست حبه از مهم‌ترین ویژگی‌های این رقم به‌منظور استفاده تازه‌خوری است. این رقم به دلیل داشتن پوستی نازک، از نظر حمل‌ونقل قابلیت اندکی داشته و از ماندگاری پایینی برخوردار است (تفضلی و همکاران، ۱۳۷۰). بهترین تیمار با استفاده از افزایش سطوح پلوئیدی یکی از روش‌های معمول برای افزایش کمیّت و کیفیت گیاهان باغبانی است. در پژوهشی کاربرد کلسی سین در انگیزش خودچهارگانی در سه رقم انگور 'Gloire'، 'George' و 'Couderc 3309' مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه دوبرابر شدن تعداد کروموزوم‌ها پس از تیمار کلسی سین از طریق آنالیز سیتومتری مورد تأیید قرار گرفت. به‌طور کلی ارقام چهارگان دارای اندازه سلول‌های روزنه‌ای بزرگ‌تر، قطر ساقه و مساحت سطح برگ بالاتر و طول ریشه کوتاه‌تر بودند. شاخه‌های چهارگان ارقام 'Gloire' و 'George' نسبت به شاخه‌های دوگان کوتاه‌تر بودند. این موضوع در مورد رقم 'Couderc 3309' صادق نبود (Motosugi *et al.*, 2002).

باتوجه به این که انگور یکی از مهم‌ترین محصولات باغی ایران و جهان محسوب می‌شود، همواره بررسی‌ها و پژوهش‌های زیادی در رابطه با این محصول صورت گرفته که هدف همه آن‌ها افزایش کمیّت و کیفیت میوه باتوجه به نیازهای بازار بوده است و از طرفی قابلیت ماندگاری پایین انگور رقم عسکری، کاربرد فن انگیزش چندگانی می‌تواند به‌عنوان یک راهکار جهت افزایش عملکرد کمی و کیفی خوشه و حبه‌ها در نظر گرفته شود. از آنجایی که انگیزش چندگانی یکی از روش‌های رایج به نژادی به‌منظور افزایش حجم و ابعاد بافت‌های گیاهان است، بنابراین افزایش عملکرد و بازاریابی ارقام بی‌دانه انگور و بزرگ‌تر شدن اندازه حبه آن از طریق این تکنیک ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

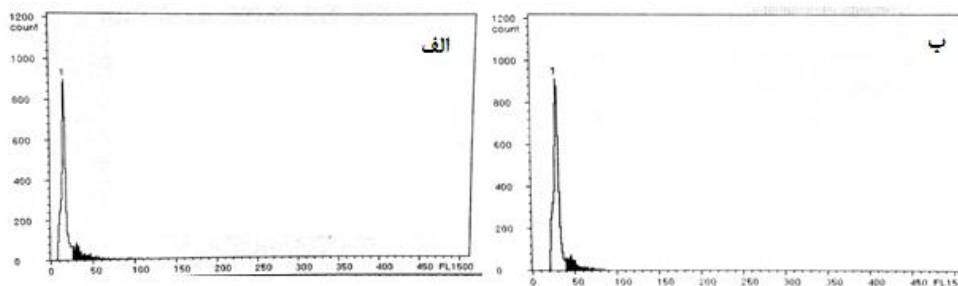
به‌منظور بررسی اثر اوریزالین و تعیین بهترین میزان غلظت آن برای القای چندگانی در انگور رقم عسگری آزمایشی در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار در محل گلخانه پژوهشی بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل شاهد (عدم کاربرد اوریزالین) و ۲ سطح اوریزالین (۳۰ و ۶۰ میکرومولار) بود. اعمال تیمار اوریزالین با روش آغشته نمودن جوانه‌ها توسط گلوله پنبه‌ای در زمان تغییر رنگ جوانه‌ها و قبل از شکفتن آن‌ها انجام شد.

سطح چندگانی گیاهانی که از طریق بررسی صفات مورفو فیزیولوژیکی آن‌ها به نظر می‌رسد که از نظر ژنتیکی تغییر یافته‌اند، با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری تعیین شد. شمارش توسط دستگاه Ploidy analyzer Partec PAI انجام شد. به طور معمول برای هر نمونه حجم حداقل ۵۰۰۰ هسته توسط دستگاه اندازه‌گیری و پیک‌های به‌دست‌آمده به کمک نرم‌افزار Mode Fit تفسیر شد. پس از تأیید نتایج فلوسایتومتری، نمونه‌های چندگان انتخاب شده جهت شمارش کروموزوم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور مطالعه بهتر مراحل تقسیم برای ثابت نگه‌داشتن سلول‌ها در مرحله متافاز میتوز از پیش تیمار نمونه‌ها در محلول ۸- هیدروکسی کوئینولین استفاده شد.

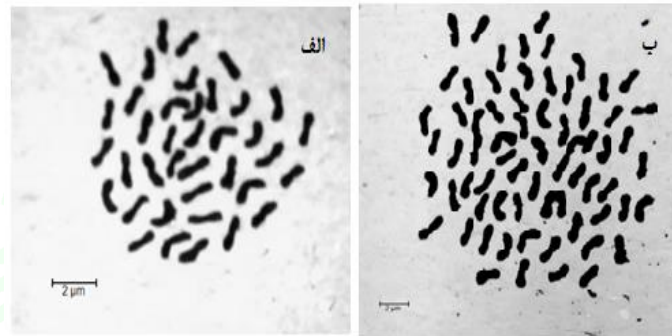
برای مشاهده روزنه‌ها، سه برگ بالغ و کاملاً توسعه‌یافته و تا حد ممکن برگ‌های هم اندازه از قسمت میانی هر یک از گیاهان مشکوک به چندگانی در مقایسه با گیاهان دوگان انتخاب و جدا شد. سپس با استفاده از تکنیک لاک ناخن، از اپیدرم سطح زیرین برگ‌ها نمونه‌برداری صورت گرفت. به‌منظور اندازه‌گیری تراکم و ابعاد سلول‌های محافظ روزنه در واحد سطح از میکروسکوپ نوری و عدسی شیئی ۴۰x استفاده شد. جهت محاسبه درصد زنده‌مانی در مرحله انتقال قلمه‌ها از بستر کاشت به گلدان، درصد زنده‌مانی قلمه‌ها ثبت و گزارش شد.

نتایج و بحث

آنالیز فلوسایتومتری: باتوجه‌به نتایج حاصل از آنالیز فلوسایتومتری، قله منحنی G1 گیاهان دوگان در این رقم ۱۰ و چهارگان ۲۰ بود (شکل ۱). همچنین تیمار گیاهان با غلظت‌های مختلف اوریزالین نشان داد که غلظت ۶۰ میکرو مول نسبت به ۳۰ میکرو مول و شاهد دارای خاصیت چندگانی بود. آنالیزهای فلوسایتومتری در بسیاری از گیاهان به‌عنوان یک روش قابل‌اعتماد گزارش شده است، به طوری که محتوای DNA تحت تأثیر فاکتورهای خارجی از جمله شدت نور، گسترش پهنک برگ، میزان آب بافت گیاه قرار نمی‌گیرد. این آنالیزها سریع بوده و گیاهان در مدت‌زمان کوتاهی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. کاربرد آنالیز فلوسایتومتری به‌منظور تشخیص دوبرابر شدن کروموزوم‌ها در مطالعات بی‌شماری توصیف شده است (Xing et al., 2011). به‌طور کلی گیاهان چهارگان در مقایسه با گیاهان دوگان دارای حجم هسته سلولی دوبرابر بوده و بدین ترتیب قله منحنی مرحله G1 این گیاهان تقریباً دوبرابر گیاهان دوگان می‌باشد.



شکل ۱. نتایج فلوسایتومتری در گیاهان چهارگان و دوگان انگور رقم عسگری. الف) دوگان، ب) چهارگان
شمارش کروموزوم: تغییر سطح پلوئیدی در انگور رقم عسگری از دوگان ($2n = 2x = 38$) به چهارگان ($2n = 4x = 76$) به‌وسیله شمارش کروموزومی تأیید شد (شکل ۲).



شکل ۲. تعداد کروموزوم در گیاهان دوگان (2n = 2x = 38) و چهارگان (2n = 4x = 76) انگور رقم عسکری. الف) دوگان، ب) چهارگان

درصد زنده‌مانی: نتایج حاصل از آزمون آماری T در رابطه با درصد زنده‌مانی گیاهان دوگان و چندگان نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گیاهان چندگان و دوگان در رقم عسکری وجود نداشت و تمامی گیاهان مورد پژوهش بقای خود را حفظ کردند (جدول ۱). پژوهش حاضر نشان داد که درصد زنده‌مانی قلمه‌های انگور چهارگان و دوگان تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد که با نتایج حاصل از پژوهش Xie و همکاران (۲۰۱۵) که بیان کردند که غلظت‌های پایین‌تر مواد ضد میتوزی تأثیری بر درصد بقا نداشته و سبب افزایش درصد زنده‌مانی گیاه می‌شود همخوانی دارد. از طرفی، طالبی و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که غلظت بالا مواد ضد میتوزی و مدت‌زمان طولانی تیمار سبب کاهش درصد بقا می‌شود که با نتایج این پژوهش همسویی ندارد. با توجه با نتایج پژوهش حاضر و پژوهش‌هایی که در راستای تحریک چندگانی با مواد ضد میتوزی در گیاهان مختلف انجام شده است، نشان می‌دهد که درصد زنده‌مانی، بقا و تولید گیاهان چهارگان به عواملی از جمله جنس، گونه، غلظت مواد میتوزی، مدت‌زمان و تعداد دفعات تیمار، نوع اندام مورد استفاده در تیمار مواد ضد میتوزی و مرحله رشد گیاه بستگی دارد (Tiwari and Mishra, 2012).

جدول ۱. مقایسه درصد زنده‌مانی در گیاهان دوگان و چهارگان انگور رقم عسکری.

دوگان	چهارگان
۹۵/۰۰ ^a	۹۸/۳۳ ^a

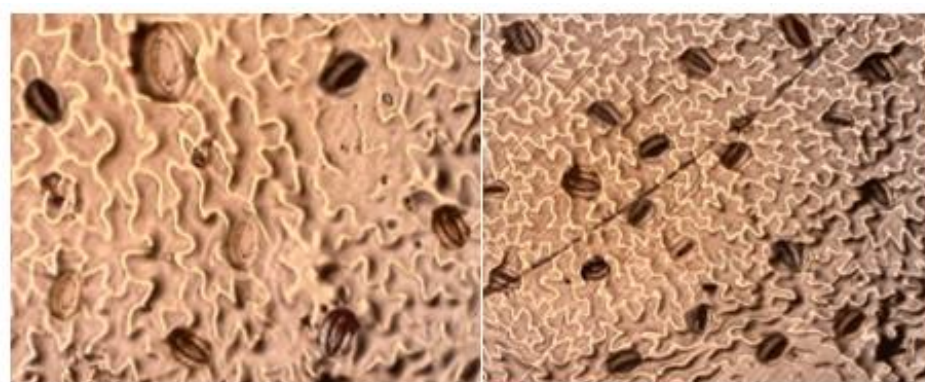
میانگین‌هایی که در هر ردیف حروف م مشابه دارند از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشند (آزمون T).

خصوصیات روزنه (تراکم و اندازه): بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد، اندازه سلول‌های روزنه (طول و عرض) در گیاهان چهارگان افزایش یافته و این گیاهان دارای روزنه‌های کشیده‌تری بودند، درحالی‌که گیاهان دوگان دارای روزنه‌های کوچک‌تر بودند (شکل ۳). طول روزنه در گیاهان دوگان ۲/۲۶ و چهارگان ۳/۸۲ میکرومتر و عرض روزنه در گیاهان دوگان ۱/۵۱ و چهارگان ۳/۶۷ میکرومتر بود (جدول ۲). به‌طور کلی باتوجه به نتایج پژوهش حاضر و مطالعات پیشین پیشنهاد می‌شود که اندازه سلول‌های نگهبان روزنه بیشتر از سلول‌های دیگر گیاه متأثر از عوامل ژنتیکی بوده و کمتر تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد (Watrous and Wimber, 1988). از این رو در مطالعات مربوط به چندگانی به‌عنوان یک شاخص مؤثر و کارا در تعیین سطح پلوئیدی به کار رود (deCarvalho et al., 2005; Yang et al., 2006).

جدول ۲. مقایسه خصوصیات روزنه در گیاهان دوگان و چهارگان انگور رقم عسکری.

چهارگان	دوگان	
^b ۱۵/۳۳	^a ۲۶/۱	تراکم روزنه (mm ²)
^a ۳/۸۲	^b ۲/۲۶	طول روزنه (μm)
^a ۳/۶۷	^b ۱/۵۱	عرض روزنه (μm)

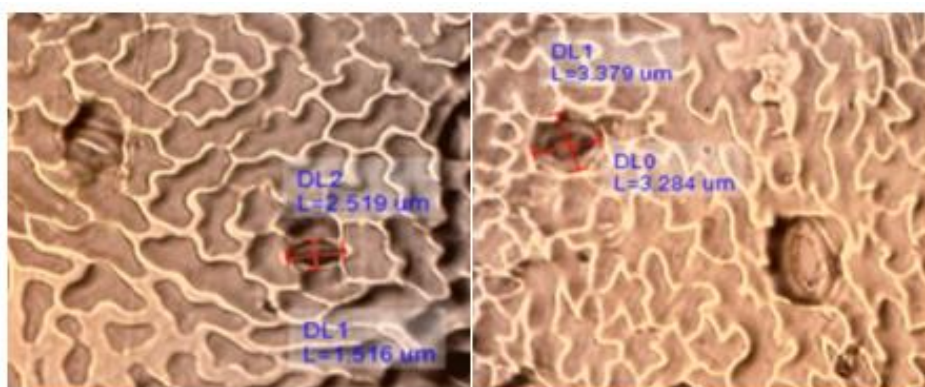
میانگین‌هایی که در هر ردیف حروف مشابه دارند از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نمی‌باشد (آزمون T).



چهارگان

دوگان

(الف)



چهارگان

دوگان

ب

شکل ۳. تغییرات تراکم روزنه (الف) و اندازه روزنه (ب) در گیاهان دوگان و چهارگان انگور رقم عسکری (اسکن بار ۲۰ میکرومتر)

منابع

- تفضلی، ع، حکمتی، ج. و فیروزه، پ. (۱۳۷۰). انگور. انتشارات دانشگاه شیراز، چاپ دوم، ۳۴۳ صفحه.
- de Carvalho, J. F. R. P., de Carvalho, C. R. D. P., & Otoni, W. C. (2005). In vitro induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). *Plant cell, tissue and organ culture*, 80(1), 69-75.
- Motosugi, H., Okudo, K., Kataoka, D., & Naruo, T. (2002). Comparison of growth characteristics between diploid and colchicine-induced tetraploid grape rootstocks. *Journal of The Japanese Society for Horticultural Science*, 71(3), 335-341.
- Talebi, S. F., Saharkhiz, M. J., Kermani, M. J., Sharafi, Y., & Raouf Fard, F. (2017). Effect of different antimitotic agents on polyploid induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.). *Caryologia*, 70(2), 184-193.

- Tiwari, A. K., & Mishra, S. K. (2012). Effect of colchicine on mitotic polyploidization and morphological characteristics of *Phlox drummondii*. *African Journal of Biotechnology*, 11(39), 9336-9342.
- Watrous, S. B., & Wimber, D. E. (1988). Artificial induction of polyploidy in *Paphiopedilum*. *Lindleyana*, 3(4), 177-183.
- Xie, X., Agüero, C. B., Wang, Y., & Walker, M. A. (2015). In vitro induction of tetraploids in *Vitis* × *Muscadinia* hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(3), 675-683.
- Xing, S. H., Guo, X. B., Wang, Q., Pan, Q. F., Tian, Y. S., Liu, P., ... & Tang, K. X. (2011). Induction and flow cytometry identification of tetraploids from seed-derived explants through colchicine treatments in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- Yang, X. M., Cao, Z. Y., An, L. Z., Wang, Y. M., & Fang, X. W. (2006). In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica*, 152(2), 217-224.

رفسنجان، ۱۴ لغایت ۱۷ شهریور ماه ۱۴۰۰

Polyploidy Induction in 'Askari' Grapevine Using Oryzalin

Zahra Atae^{1*}, Ali Gharghani¹, Abolfazl Jowkar¹

¹ Department of Horticultural Science, School of Agriculture, Shiraz University

*Corresponding Author: zahra.ataee@shirazu.ac.ir

Abstract

Polyploid refers to organisms with more than two sets of haploid chromosomes obtained by abnormal separation of chromosomes during cell division. Polyploidy induction has been used as a breeding method to enhance vegetative and reproductive characteristics by increasing total nuclear genome content in crops. In order to investigate the effect and determine the best concentration of Oryzalin on polyploidy induction of 'Askari' grape, a completely randomized design experiment was conducted at the research greenhouse of the Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Shiraz University. Experimental treatments included control (no application of Oryzalin) and two levels of Oryzalin (30 and 60 $\mu\text{mol/L}$) in three replicates. Oryzalin treatment was applied by smearing the buds with a cotton ball when bud color change and before they were broken. Polyploid plants were identified using flow cytometric analysis. The percentage of survival rate, stomata density, and dimensions, and chromosomal count were examined. The results of the t-test on the survival rate showed that there was no significant difference between diploid and polyploid plants in the 'Askari' grape and all studied plants maintained their survival. Stomata density and dimensions in tetraploid plants were higher than diploid ones. In general, using anti-mitotic agents is a feasible method to induce polyploidization in grapes.

Keywords: Anti-mitotic, Flow cytometry, Stomata density, Oryzalin.