پژوهش‌نامه کشاورزی و منابع طبیعی شماره ۱۴، سال ۱۳۹۱
(ویژه‌نامه انگور)

بررسی اثر غلظت‌های کلشی سین و زمان کاربرد آن بر ایجاد تتراپلوئیدی در انگور یاقوتی (*Vitis vinifera* Var.Yagoti)

ولی اله رسولی[۱]، محمد علی نجاتیان[۲]، مجید گل محمدی[۳]، محمد فدایی اقدم[۴]، رضا ستوده[۴]

چکیده

افزایش عملکرد ارقام بی‌دانه و بزرگ‌تر شدن انـــدازهٔ حبه‌های آن از طریق پلی پلوئیدی ضروری به نظر می‌رسد. تعیین بهترین غلظت کلشی سین و مدت زمان کاربری آن، بررسی و مقایسه بیومتری بافت‌های دی پلوئید و اتوتتراپلوئید انگور یاقوتی، تهیه و تعیین کاریوتیپ کروموزومی انگور رقم یاقوتی دیپلوئید و تتراپلوئید و بررسی ساختار سیتولوژیکی قسمت‌های مختلف رویشی اهداف این بررسی بودند. این آزمایش در بهار ۱۳۸۹ در ایستگاه تحقیقات انگور تاکستان انجام شد. طرح در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار به صورت فاکتوریل اجرا گردید که فاکتور غلظت کلشی‌سین در ۶ سطح (۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۰/۹، ۱/۱ درصد) و مدت زمان کاربری آن در ۴ سطح (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) همراه با شاهد بود. اعمال تیمارها بر روی جوانه‌های باز نشده به طریقه پانسمان و تزریق در اوایل فروردین ماه انجام شد. ۶۰ روز پس از اعمال تیمارها، از ساقه و برگ‌های تولید شده جدید، نمونه‌برداری و مطالعات بیومتری میکروسکوپی بر اساس اندازه‌گیری ابعاد سلول‌های محافظ روزنه، ابعاد سلول‌های اپیدرمی برگ و تعداد کلروپلاست موجود در سلول‌های محافظ روزنه جهت اثبات تتراپلوئیدی انجام گرفت. پس از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها با شاهد به روش دانکن، کلشی‌سین با غلظت ۰/۹ و ۱/۱ درصد در ۷۲ و ۹۶ ساعت بهترین تیمار جهت ایجاد اتوتتراپلوئیدی به دست آمدند. سپس در پاییز همان سال از شاخه‌های اتوتتراپلوئید (تأیید شده به روش بیومتری) قلمه تهیه گردید. شمارش کروموزوم در ریشه‌های قلمه‌ها انجام گرفت و تتراپلوئیدی در شاخه‌های تیمارهای کلشی‌سین با غلظت ۰/۹ و ۱/۱ درصد در ۷۲ و ۹۶ ساعت نیز به اثبات رسید. مطالعه تشریحی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نیز توسط روش‌های متداول سلولی- بافت شناسی انجام گرفت. در ساختار تشریحی تفاوت قابل ملاحظه‌ای در ساختمان سلولی دمبرگ، ساقه، برگ و ریشه در تیمارهای مختلف آزمایشی بین کلشی سین ۰/۹ و ۱/۱ درصد نسبت به شاهد و سایر تیمارها مشاهده شد که برتری سلول‌های اتوتتراپلوئیدی را نسبت به سلول‌های دیپلوئید نشان داد.

واژه‌های کلیدی: موتاسیون القایی، کلشی سین، انگور بی‌دانه، یاقوتی

مقدمه

یکی از محاسن بسیار مهم انگورهای بی‌دانه، عدم وجود دانه، در داخل حبه‌های آن است که سبب سهولت مصرف تازه‌خوری و کشمش آن می‌شود. در این ارقام پس از گرده افشانی، جنین تشکیل شده ولی پس از مدت

[۱]- عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین
[۲]- استادیار پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین
[۳]- عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین
[۴]- محققین مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین

کوتاهی سقط می‌شود. در نتیجه میوه بدون بذر تولید می‌شود. به این حالت استینواسپرموکارپی گویند (ناظمیه، ۱۳۷۲). ولی مهم‌ترین پیامد این پدیده، کوچک ماندن حبه‌هاست که در اثر تقلیل ترشح هورمون‌های گیاهی در میوه از جمله جیبرلین ها است. به همین علت، افزایش عملکرد و بازار پسندی ارقام بی‌دانه و بزرگ‌تر شدن انـــدازهٔ حبه‌های آن از طریق پلی پلوئیدی ضروری به نظر می‌رسد که متداول‌ترین روش به نژادی گیاهان در افزایش حجم و ابعاد بافت رویشی می‌باشد. در این روش تعداد کروموزوم هسته سلول افزایش یافته که این امر موجب افزایش حجم سلول و بافت گیاهی می‌شود (عبدمیشانی و شاه نجات بوشهری، ۱۳۷۶).

برای اولین بار (Leyer, 1965) از اتوتتراپلوئیدی در به نژادی انگور استفاده کرد. او از غلظت ۰/۲۵ الی ۰/۵ درصد جهت ایجاد اتوتتراپلوئیدی استفاده کرده که انگورهای اتوتتراپلوئید در مقایسه با ارقام دی‌پلوئید، دارای حبه‌های درشت‌تری بودند. مقایسهٔ بافت‌های واریته‌های دی پلوئید و تتراپلوئید توسط (Todor and Dimitrov, 1974) انجام شد که سلول‌های روزنه و دانهٔ گردهٔ تتراپلوئیدها درشت‌تر از دی‌پلوئیدها بوده و همچنین میزان عملکرد و تعداد پلاست در سلول‌های روزنه تتراپلوئید بیشتر از دی‌پلوئیدها بود. با استفاده از کلشی‌سین، تتراپلوئیدهای مصنوعی در انگور ایجاد می‌شود (Galiev, 1985) که در مقایسهٔ عملکرد با ارقام دی‌پلوئید دارای اختلاف معنی‌داری بود. کلشی سین ۰/۲ ٪ انگور تتراپلوئید توسط (Luo and Qiao, 1995) ایجاد گردید که در مقایسه با افراد دی‌پلوئید، تتراپلوئیدها دارای اندام‌های رویشی درشت تری بود. ارقام انگور تتراپلوئیدی را (Li & et al., 1996) ایجاد نمودند که وزن حبه‌های آن به ۲۰ گرم می‌رسید. خوشه‌ها به طور متوسط معادل ۶۰۰ گرم بودند که در بعضی از آن‌ها تا ۱۸۰۰ گرم نیز می‌رسید. مقاومت به بیماری نیز در این ارقام نسبتاً بالا بود. توسعه و انتقال بافت در مادگی انگورهای دی‌پلوئید و تتراپلوئید با همدیگر مورد مقایسه قرار گرفت. دو رقم انگور دی‌پلوئید کامپل[1] و موسکات الکساندریا[2] و دو رقم انگور تتراپلوئید کیوهو[3] و سوی‌هو[4] در طول ۲۱ روز با همدیگر تلاقی داده شدند. میزان رشد لوله دانه گرده در خامه و کلاله تمام ارقام مورد مطالعه قرار گرفت که مقدار رشد لوله دانه گرده در ارقام دی‌پلوئید کندتر از ارقام تتراپلوئید بود. رشد تخمدان نیز در ارقام تتراپلوئید سریع‌تر از ارقام دی‌پلوئید بوده و طی ۲ هفته انجام شد (Okamoto et al., 2002). انگور تتراپلوئید رقم هیوکگوسل[5] از تلاقی گلدن موسکات[6] و پیون[7] در یک برنامه اصلاحی در سال ۱۹۸۸ بدست آمده که پس از انجام آزمایشات سازگاری منطقه‌ای در سال ۲۰۰۰ معرفی گردید. این رقم برخلاف سایر ارقام تتراپلوئید دارای خوشه پرپشت و یکدستی بود (Park et al., 2004).

درجه سقط جنین بذر و درصد جوانه زنی بذرهای حاصل از تلاقی بین کولتیوارهای انگور دی‌پلوئید و تتراپلوئید در اصلاح تریپلوئید را (Heo & et al., 2007) مورد بررسی قرار دادند. در تلاقی بین ۳ دی‌پلوئید و ۶ تتراپلوئید به وسیله ۱۱۰۱۵ دانه گرده، گرده‌افشانی شده و ۲۱/۷٪ بذر هیبرید بدست آمد. در تلاقی بین ۵ تتراپلوئید و ۱۲ دی‌پلوئید که به وسیله ۹۰۱۷ دانه گرده، گرده افشانی شدند، ۹٪ بذر هیبرید بدست آمد. در تلاقی 4x × 2x و 2x × 4x به ترتیب ۲۵۵۱ و ۶۰۳ بذر هیبرید ناقص که فقط حاوی جنین و اندوسپرم بود، بدست آمد. بذرهای هیبرید حاصل از تلاقی فوق ابتدا به وسیله درجه حرارت پایین تیمار شده سپس جهت تعیین جوانه زنی در خاک کشت گردیدند. در تلاقی 4x × 2x، ۱۹۴ عدد بذر جوانه زده که درصد جوانه زنی آن ۶/۷٪ بدست آمد در حالی که

[1] - Campbell
[2] - Muscat of Alexandria
[3] - Kyoho
[4] - Suiho
[5] - Heukgoosul
[6] - Golden Muscat
[7] - Pione

در تلاقی 2x × 4x، ۷۷ عدد بذر جوانه زده که درصد جوانه زنی آن ۱۲/۸٪ بدست آمد که فاقد اختلاف معنی‌دار با همدیگر بودند. تعداد کروموزوم‌های مشاهده شده در مریستم ریشه تمامی هیبریدها ۵۷ عدد و تریپلوئید بودند.

عوامل مؤثر بر نجات جنین نتاج حاصل از هیبرید بین ارقام انگور دی‌پلوئید و تتراپلوئید جهت تولید هیبریدهای تری‌پلوئید و رشد آن در این ویترو[1] را (Yang et al., 2007) مورد بررسی قرار دادند. اتوتتراپلوئید سه رقم انگور پایه گلوری دمونپلیر[2] ، جورج[3] و کودرک ۳۳۰۹[4] با استفاده از کلشی‌سین در گیاهچه‌های حاصل از ریز ازدیادی توسط (Motosugi & et al., 2007) القاء گردید. دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌ها در کلون‌های تیمار شده با کلشی‌سین به وسیله روش تجزیه سیتومتریک برگ‌های نارس به اثبات رسید. برگ‌های تتراپلوئید نسبت به برگ‌های ارقام دی‌پلوئید اولیه سلول‌های روزنه بزرگی داشتند. در کشت درون شیشه‌ای ریشه، ارقام تتراپلوئید نسبت به ارقام دی‌پلوئید اولیه طول ریشه کوتاه‌تری داشتند. شاخه‌های تتراپلوئید ارقام گلوری و جورج نسبت به شاخه‌های دی‌پلوئید کوتاه‌تر بودند در حالی که در تتراپلوئید رقم ۳۳۰۹ این مورد صدق نمی‌کرد. در مرحله سازگاری گیاهان به محیط بیرون ارقام تتراپلوئید دارای شاخه، میان گره و ریشه کوتاه‌تر از گیاهان دی‌پلوئید اولیه بودند. در آزمایشات گلخانه‌ای، شاخه پایه-های تتراپلوئید نسبت به شاخه‌های دی‌پلوئید دارای رشد ضعیف‌تر بودند ولی قطر ساقه و مساحت برگ آن‌ها بسیار بالا بود. ریشه کوتاه و قطور پایه‌های تتراپلوئید باعث ایجاد یک سیستم ریشه فشرده‌تری نسبت به ارقام دی‌پلوئید شد.

رسولی (۱۳۸۶) به منظور افزایش اندازهٔ حبه‌های انگور رقم بی‌دانه، افزایش عملکرد و بازار پسندی بیشتر و تعیین بهترین غلظت کلشی سین و مدت زمان کاربری آن جهت ایجاد موتاسیون، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار به صورت فاکتوریل اجرا نمود. او پس از اعمال تیمارها، از برگ‌های تولید شده روی شاخه‌های حاصل از جوانه‌های تیمار شده، نمونه برداری نموده و مطالعات میکروسکوپی روزنه‌های برگ و تعیین مساحت آن‌ها جهت اثبات تتراپلوئیدی انجام داد. در مقایسه تعداد کروموزوم‌های شاهد و تیمارهای مورد آزمایش، تیمار کلشی‌سین با غلظت ۰/۹ و ۱/۱ درصد در ۹۶ ساعت بهترین تیمار جهت ایجاد اتوتتراپلوئیدی بدست آورد. در مقایسه عملکرد و سایر صفات میوه ارقام انگور اتوتتراپلوئید و دی‌پلوئید، طول و عرض حبه‌ها، طول و قطر خوشه، زمان رسیدن و عملکرد میوه در رقم اتوتتراپلوئید بیشتر بود ولی از نظر pH، TSS و TA با ارقام دی‌پلوئید تفاوت معنی‌داری نشان نداد. هدف این تحقیق عبارت بود از: تعیین بهترین غلظت کلشی سین و مدت زمان کاربری آن و مقایسه بیومتری بافت‌های دی پلوئید و اتوتتراپلوئید انگور یاقوتی.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۸۹ در ایستگاه تحقیقات انگور تاکستان شروع شد. در فروردین ماه پایه‌های مرغوب و مناسب و سالم انگور رقم یاقوتی(*Vitis vinifera* Var.Yagoti) انتخاب و علامت گذاری شدند و سپس عملیات هرس روی آن‌ها انجام شده به طوری که در روی هر شاخه بارده ۲ عدد جوانه نگه داشته شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار طراحی و به مرحله اجرا در آمد. فاکتور اول غلظت کلشی‌سین در ۶ سطح (۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۰/۹ و ۱/۱ درصد وزنی به حجمی) و فاکتور دوم مدت زمان کاربری آن در ۴ سطح (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) بود. پس از هرس هر روز جوانه‌ها مورد بازدید قرار گرفته و به محض تغییر رنگ و رشد

[1] - In vitro
[2] - Gloire de Montpellier
[3] - George
[4] - Couderc 3309

اولیه در نوک جوانه‌ها، عملیات تیمار جوانه‌ها با کلشی سین انجام گرفت. بدین منظور ابتدا جوانه‌های مذکور به وسیله پنبه و نایلون سلیفون پانسمان گردیده وبا استفاده از سرنگ نمره ۴ تیمارهای کلشی سین در داخل پانسمان تزریق گردید. ۶۰ روز پس از اعمال تیمارها، از ساقه، دمبرگ و برگ‌های تولید شده روی ابتدا، وسط و انتهای شاخه‌های حاصل از جوانه‌های تیمار شده، نمونه‌برداری شد و مطالعات میکروسکوپی اندازه‌گیری ابعاد سلول‌های روزنه‌های برگ، ابعاد سلول‌های برگ (به طریق میکرومتری)، شمارش تعداد کلروپلاست‌ها و مساحت برگ (بر حسب سانتی‌متر مربع و از طریق نسبت سطح به وزن) به آزمایشگاه سیتوژنتیک به عمل آمد. کلیه مطالعات، عکس‌برداری و اندازه‌گیری‌های میکروسکوپی به وسیله میکروسکوپ مجهز به دوربین دیجیتالی و رایانه انجام شد. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات فوق‌الذکر به وسیله نرم افزار آماری SPSS18 و مقایسه میانگین‌های تیمارها به روش دانکن در سطح ۵٪ انجام شد. در این مرحله بهترین تیمار زمانی و غلظت کلشی سین برای ایجاد اتوتتراپلوئیدی تعیین گردید. جهت اثبات نهایی پلی‌پلوئیدی جوانه‌های مورد تیمار، در پاییز از آن‌ها قلمه تهیه نموده پس از ریشه‌دار شدن و تهیه نمونه ریشه، به روش اسگوواش تعداد کروموزوم‌های آن‌ها مورد شمارش قرار گرفت.

نتایج و بحث

الف) مطالعات بیومتری

در بررسی تجزیه واریانس و تعیین آماری معنی‌داری و یا عدم معنی‌داری اثر زمان‌ها و غلظت‌های مختلف کاربری کلشی سین، اثر غلظت، زمان و اثر متقابل، مدل رگرسیون خطی بر اندازه صفات مورد بررسی معنی‌دار شد. این نکته موید این است که تیمارهای مختلف غلظت و زمان کاربری کلشی سین در صفات مورد بررسی معنی‌دار بوده و تغییرات ایجاد شده در اثر کاربرد کلشی سین می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس و رگرسیون نتایج حاصل اندازه‌گیری صفات مورد بررسی

منبع تغییر	درجه آزادی	عرض سلول‌های محافظ روزنه	طول سلول‌های محافظ روزنه	مساحت برگ	تعداد کلروپلاست	طول سلول‌های برگ	قطر ریشه
مدل	۲۷	۱۸/۳**	۹۴/۸**	۵۶۹۳/۱۶**	۱۷/۷۸**	۱۷۰/۶۲**	۱۴/۱**
درجه یک	۱	۳۶۵۲**	۳۹۶۷۸/۴۲*	۵۲۲۶۷۲/۲۲**	۹۹۱/۸۲**	۳۷۸۴۸/۱۵**	۹۸۱/۸۲**
غلظت	۵	۳۱/۶**	۱۶۶/۴۶*	۱۰۷۹۰/۶۴**	۲۸/۱۵*	۲۹۴/۳۹*	۲۶/۱۵*
زمان	۳	۳۸/۹**	۲۳۰/۴**	۹۸۶۹/۶۶*	۳۵/۶**	۴۲۴/۴۵*	۳۲/۳**
غلظت × زمان	۱۵	۸/۱۱**	۴۲/۹۲**	۴۱۰۳/۵۶*	۱۰/۱۸*	۶۹/۱۸*	۹/۵*
تکرار	۳	۱/۱ ns	۴/۰۳ ns	۴۷۶/۰۵۵ ns	۲/۴ ns	۱/۵ ns	۰/۷ ns
خطا	۸۱	۱/۵	۴/۵	۱۰۱۶/۳۶۵	۱/۰۷	۶/۷۶	۰/۹۵
درصد همبستگی		۸۰/۷	۸۷/۵	۶۵/۱	۸۴/۷	۸۹/۴	۸۶/۷

میزان وراثت پذیری صفات مورد بررسی (جدول ۲) به غیر از مساحت برگ، نسبتاً بالا بوده که نشان دهنده تأثیر کمتر محیط بر این صفات است. بنابراین این صفات به راحتی به نسل‌های بعدی منتقل گشته و از روی اندازه‌گیری این صفات، ژنو تیپ آن قابل تخمین خواهد بود. همچنین در انتخاب ارقام اتوتتراپلوئید، این صفات یک معیار کمی

بسیار خوبی تلقی خواهد شد زیرا کمتر تحت تأثیر محیط قرار خواهد گرفت. ولی مساحت برگ به علت اینکه بیشتر تحت تأثیر محیط قرار می‌گیرد صفت مناسب کمی برای تعیین اتوتتراپلوئیدی محسوب نمی‌شود.

جدول ۲- برآورد میزان وراثت پذیری در صفات مورد بررسی

	عرض سلول‌های محافظ روزنه	طول سلول‌های محافظ روزنه	مساحت برگ	تعداد کلروپلاست	طول سلول‌های برگ	قطر ریشه
میزان وراثت پذیری	٪۹۰/۰۹	٪۸۳/۲۹	٪۵۶/۵۵	٪۷۹/۲۲	٪۸۵/۳۶	٪۸۰/۰۰

جهت مقایسه میانگین تیمارها و تعیین بهترین تیمار زمان و غلظت کلشی سین کاربری روش دانکن در α=٪۵ انجام گرفت (جدول۳). در عرض سلول‌های محافظ روزنه غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳و ۰/۵ با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداده و در یک گروه قرار گرفتند. در حالی که سایر غلظت‌های کلشی سین (۰/۷، ۰/۹ و ۱/۱ درصد) نسبت به تیمارهای گروه ۱ و شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داده و باهم دیگر در گروه برتر قرار گرفتند. علت اختلاف جزئی در این گروه و یا درون افراد گروه اول ناشی از اثرات محیطی است. بیشترین میانگین مربوط به تیمار ۱/۱ ٪ با ۹/۰۳ میکرون بود. در مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف غلظت و زمان کاربری کشی سین بر طول سلول‌های محافظ روزنه، غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳و ۰/۵ با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداده و در یک گروه قرار گرفتند. در حالی که غلظت‌های کلشی سین ۰/۷ و ۰/۹ درصد نسبت به تیمارهای گروه ۱ و شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داده و باهم دیگر در گروه دوم قرار گرفتند. با این وجود تیمار ۱/۱٪ در گروه سوم قرار گرفته و با میانگین ۲۷/۸ میکرون برتر از سایر تیمارها بود و این در حالی بود که با تیمار ۰/۷٪ اختلاف معنی‌دار نشان نداد. در مقایسه میانگین مساحت سطح برگ، ۳ گروه بدست آمد. غلظت ۱/۱٪ با میانگین ۱۲۹/۹۴ سانتی‌متر مربع نسبت به سایر تیمارها برتر بوده و مستقلاً در گروه سوم قرار گرفت. غلظت ۰/۳٪ با میانگین ۶۴/۱۶ سانتی متر مربع از همه تیمارها کمتر بوده ولی با شاهد و تیمارهای ۰/۱٪، ۰/۵٪ و ۰/۹ ٪ اختلاف معنی‌دار نشان نداد. این در حالی است که این تیمارها با ۰/۷ درصد اختلاف معنی‌دار نشان نداد ولی تیمار ۰/۳٪ با ۰/۷ اختلاف معنی‌دار نشان داد. در مقایسه میانگین تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳و ۰/۵ با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداده و در یک گروه قرار گرفتند. در حالی که سایر غلظت‌های کلشی سین (۰/۷، ۰/۹ و ۱/۱ درصد) نسبت به تیمارهای گروه ۱ و شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داده و با هم دیگر در گروه برتر قرار گرفتند. این مسئله در نمودار شماره ۷ نیز دیده شد. علت اختلاف جزئی در این گروه و یا درون افراد گروه اول ناشی از اثرات محیطی است. بیشترین میانگین مربوط به تیمار ۱/۱ ٪ با ۵/۵ عدد بود. در مقایسه میانگین طول سلول برگ، غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳و ۰/۵ با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداده و در یک گروه قرار گرفتند. در حالی که سایر غلظت‌های کلشی سین (۰/۷، ۰/۹ و ۱/۱ درصد) نسبت به تیمارهای گروه ۱ و شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داده و باهم دیگر در گروه برتر قرار گرفتند. علت اختلاف جزئی در این گروه و یا درون افراد گروه اول ناشی از اثرات محیطی است. بیشترین میانگین مربوط به تیمار ۱/۱ ٪ با ۲۸/۱۴ میکرون بود. در مقایسه میانگین قطر ریشه، غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداده و در یک گروه قرار گرفتند. در حالی که سایر غلظت‌های کلشی سین (۰/۹ و ۱/۱ درصد) نسبت به تیمارهای گروه ۱ و شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داده و باهم دیگر در گروه برتر قرار گرفتند. علت اختلاف جزئی در این گروه و یا درون افراد گروه اول ناشی از اثرات محیطی است. بیشترین میانگین مربوط به تیمار ۱/۱ ٪ با ۱/۷ میلی‌متر بود (شکل۱).

جدول ۳- مقایسه میانگین حاصل از اندازه گیری صفات مورد بررسی در غلظت‌های مختلف کاربری کلشی سین به روش دانکن

غلظت هورمون (٪)	عرض سلول‌های محافظ روزنه (میکرون)	طول سلول‌های محافظ روزنه (میکرون)	مساحت برگ (سانتی متر مربع)	تعداد کلروپلاست	طول سلول‌های برگ (میکرون)	قطر ریشه (سانتی متر)
۰	۶/۱۲b	۲۱/۱c	۶۹/۲ab	۲/۸b	۲۱/۱b	۰/۸b
۰/۱	۵/۸b	۲۰/۵۷c	۶۴/۲c	۲/۷b	۱۹/۰۵b	۰/۷b
۰/۳	۷/۰۱b	۲۰/۲۶c	۶۹/۶ab	۲/۸b	۱۸/۷۶b	۰/۸b
۰/۵	۵/۹b	۲۱/۳c	۶۹/۴ab	۲/۵b	۱۹/۶b	۰/۵b
۰/۹	۸/۵a	۲۶/۸ab	۹۸/۰۴b	۵a	۲۷/۵a	۰/۹b
۰/۷	۸/۷a	۲۵/۸b	۸۶/۴ab	۵/۲a	۲۷/۳۲a	۱/۵a
۱/۱	۹/۰۳a	۲۷/۸a	۱۲۹/۹۴a	۵/۵a	۲۸/۱۴a	۱/۷a

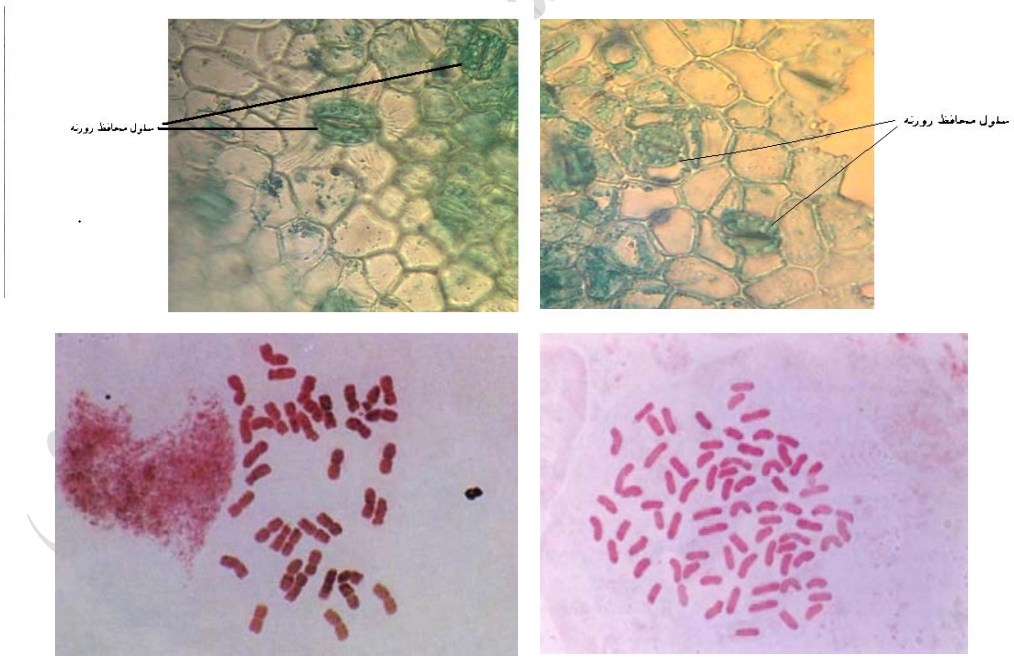
در مقایسه میانگین زمان‌های مختلف کاربری کلشی سین بر عرض سلول‌های محافظ روزنه نیز دو گروه بدست آمد. که شاهد همراه با ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در گروه اول قرار داشته و باهم اختلاف معنی‌دار نشان ندادند. در حالی که مدت زمان ۷۲ ساعت و ۹۶ ساعت با تیمارهای گروه اول اختلاف معنی‌دار نشان داده و برتر از آن‌ها بودند. بیشترین مقدار میانگین عرض سلول محافظ روزنه با ۹/۲ میکرون در ۷۲ ساعت مشاهده شد (جدول ۴). در مقایسه میانگین زمان‌های مختلف کاربری کلشی سین بر طول سلول‌های محافظ روزنه، دو گروه بدست آمد. که شاهد همراه با ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در گروه اول قرار داشته و باهم اختلاف معنی‌دار نشان ندادند. در حالی که مدت زمان ۷۲ ساعت و ۹۶ ساعت با تیمارهای گروه اول اختلاف معنی‌دار نشان داده و برتر از آن‌ها بودند. بیشترین مقدار میانگین عرض سلول محافظ روزنه با ۲۶/۸ میکرون در ۷۲ ساعت مشاهده شد. در مقایسه میانگین زمان‌های مختلف کاربری کلشی سین بر مساحت برگ، دو گروه بدست آمد. که شاهد همراه با ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در گروه اول قرار داشته و باهم اختلاف معنی‌دار نشان ندادند. در حالی که مدت زمان ۷۲ ساعت و ۹۶ ساعت با تیمارهای گروه اول اختلاف معنی‌دار نشان داده و برتر از آن‌ها بودند. بیشترین مقدار میانگین مساحت برگ با ۱۱۷/۰۱ سانتی مترمربع در ۹۶ ساعت مشاهده شد. در مقایسه میانگین زمان‌های مختلف کاربری کلشی سین بر تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه نیز دو گروه بدست آمد. که شاهد همراه با ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در گروه اول قرار داشته و با هم اختلاف معنی‌دار نشان ندادند. در حالی که مدت زمان ۷۲ ساعت و ۹۶ ساعت با تیمارهای گروه اول اختلاف معنی‌دار نشان داده و برتر از آن‌ها بودند. بیشترین مقدار میانگین تعداد کلروپلاست در سلول محافظ روزنه با ۵/۲ عدد در ۷۲ ساعت مشاهده شد. در مقایسه میانگین زمان‌های مختلف کاربری کلشی سین بر طول سلول‌های برگ نیز دو گروه بدست آمد. که شاهد همراه با ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در گروه اول قرار داشته و باهم اختلاف معنی‌دار نشان ندادند. در حالی که مدت زمان ۷۲ ساعت و ۹۶ ساعت با تیمارهای گروه اول اختلاف معنی‌دار نشان داده و برتر از آن‌ها بودند. بیشترین مقدار میانگین طول سلول‌های برگ با ۲۷/۶ میکرون در ۷۲ ساعت مشاهده شد. در مقایسه میانگین زمان‌های مختلف کاربری کلشی سین بر قطر ریشه نیز دو گروه بدست آمد. که شاهد همراه با ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در گروه اول قرار داشته و باهم اختلاف معنی‌دار نشان ندادند. در حالی که مدت زمان ۷۲ ساعت و ۹۶ ساعت با تیمارهای گروه اول اختلاف معنی‌دار نشان داده و برتر از آن‌ها بودند. بیشترین مقدار میانگین قطر ریشه با ۱/۹ عدد در ۹۶ ساعت مشاهده شد.

جدول ۴- مقایسه میانگین حاصل از اندازه‌گیری صفات مورد بررسی در زمان‌های مختلف کاربری کلشی سین به روش دانکن

غلظت هورمون (٪)	عرض سلول‌های محافظ روزنه (میکرون)	طول سلول‌های محافظ روزنه (میکرون)	مساحت برگ (سانتی‌متر مربع)	تعداد کلروپلاست	طول سلول‌های برگ (میکرون)	قطر ریشه (سانتی متر)
۰	۶/۱۲b	۲۱/۱b	۶۷/۲b	۲/۸b	۲۱/۲b	۱/۰۵b
۲۴	۶/۱b	۲۰/۲۹b	۶۵/۸b	۲/۸b	۱۸/۶۸b	۱/۱b
۴۸	۵/۹b	۲۱/۲b	۶۹/۳b	۲/۶b	۱۹/۶۹b	۰/۹۶b
۷۲	۹/۲a	۲۶/۸a	۹۷/۷۵a	۵/۲a	۲۷/۶a	۱/۸a
۹۶	۸/۶a	۲۶/۶a	۱۱۷/۰۱a	۵/۱a	۲۷/۱۴a	۱/۹a

ب) مطالعه سیتوژنتیکی

در بررسی سیتوژنتیکی سلول‌های مریستمی در حال تقسیم میتوز نتایج حاصل از تیمار۰/۷ درصد در کلیه زمان‌های کاربری و ۰/۹ و ۱/۱ درصد در ۲۴ و ۴۸ ساعت افزایش کروموزومی مشاهده نشد. در حالی که در تیمار ۰/۹ و ۱/۱ درصد در ۷۲ و ۹۶ ساعت افزایش کروموزومی مشاهده گردید (شکل ۱).



شکل۱- سلول‌ها محافظ روزنه برگ دیپلوئید (بالا سمت راست)، اتوتتراپلوئید (بالا سمت چپ)، کروموزوم‌های سلول اتوتتراپلوئید ریشه (پایین سمت راست) و کروموزوم‌های سلول دیپلوئید ریشه (پایین سمت چپ)

دقیق‌ترین روش در تأیید سطح پلی پلوئیدی، شمارش تعداد کروموزوم‌های سلول‌های مریستمی نوک ریشه و نوک ساقه در مرحله پروفاز و متافاز می‌باشد. در این مرحله از تقسیم سلولی کروموزوم‌ها حداکثر فشردگی و ضخامت را دارد که به راحتی قابل اندازه‌گیری و شمارش می‌باشند. در بررسی اندازه طول و عرض سلول‌های محافظ روزنه

برگ، سلول‌های برگ، مساحت سطح برگ و تعداد کلروپلاست موجود در سلول‌های محافظ روزنه اختلاف معنی‌دار بین شاهد و تیمارهای کلشی‌سین ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ درصد مشاهده نشد. این بدان معنی بود که این تیمارهای کلشی سین در زمان‌های مختلف کاربری آن‌ها بر روی جوانه‌های انگور رقم یاقوتی جهت افزایش تعداد کروموزوم و ایجاد اتوتتراپلوئیدی بی تأثیر بودند. این نتیجه در بررسی مقایسه میانگین‌ها به طور وضوح دیده شد.

ایجاد تتراپلوئیدی در مقایسه میانگین‌ها بین تیمارهای ۰/۷، ۰/۹ و ۱/۱ دیده شد زیرا در این تیمارها افزایش حجم و اندازه طول و عرض سلول‌های محافظ روزنه برگ، سلول‌های برگ، مساحت سطح برگ و تعداد کلروپلاست موجود در سلول‌های محافظ روزنه مشاهده شد. ولی این مورد باید خاطر نشان شود که فقط تیمارهای زمانی ۷۲ و ۹۶ ساعت باعث ایجاد اتوتتراپلوئیدی بودند و زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت در ایجاد اتوتتراپلوئیدی بی اثر بودند. با توجه به این نکته که چون کلشی سین مستقیماً به سلول‌های در حال تقسیم میتوز جوانه شاخه‌ها مورد استفاده قرار گرفت لذا مدت زمانی طولانی جهت تأثیر کلشی سین دو از انتظار نبود. این بدان علت بود که برگچه های موجود در اطراف سلول‌های مریستمی عامل اصلی در جلوگیری از نفوذ کلشی سین به درون سلول‌های مریستمی جوانه‌های شاخه‌ها بود. این نتایج در تحقیقات موتوسوگی و همکاران در سال ۲۰۰۷ نیز بدست آمده بود.

در بررسی تعداد کروموزوم‌ها جهت تعیین دقیق تیمار کلشی سین و مدت زمان کاربری آن در ایجاد اتوتتراپلوئیدی و موتاسیون القایی در میان تیمارهای ۰/۷ ، ۰/۹ و ۱/۱ درصد با زمان کاربری ۷۲ و ۹۶ ساعت، نتایج جالب توجهی بدست آمد. تیمار ۰/۷٪ فاقد افزایش کروموزوم بود. این بدان معنی بود که تیمارهای مختلف کلشی سین در زمان‌های مختلف کاربری در ایجاد اتوتتراپلوئیدی بی اثر بود. ولی اختلاف مشاهده شده در افزایش اندازه طول و عرض سلول‌های محافظ روزنه برگ، سلول‌های برگ، مساحت سطح برگ و تعداد کلروپلاست موجود در سلول‌های محافظ روزنه نسبت به شاهد می‌توان به عوامل محیطی و موتاسیون لکه‌ای اشاره کرد. در موتاسیون لکه‌ای فقط سلول‌های چند برگ اتفاق افتاده و این صفت به سایر سلول‌های مریستمی سرایت نمی‌نماید. لذا این نوع موتاسیون قابل انتقال به نسل‌های بعدی نخواهد بود. این نتایج توسط موتوسوگی و همکاران در سال ۲۰۰۷، تودورو و دیمیترو در سال۱۹۷۴ نیز بدست آمد. تفاوت نتایج حاصل از این مرحله از تحقیق با نتایج مورد بررسی سایر محققین از جمله لیر (۱۹۶۵)، کلیو (۱۹۹۱)، لئو و گیو (۱۹۹۵)، اختلاف زیاد درصد کلشی‌سین مصرفی بود که حداکثر میزان مصرفی آن ۰/۷ درصد بود. نتایج بدست آمده از پژوهش موتوسوگی و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داد که قطر ریشه افزایش یافته و سیستم ریشه فشرده‌تر شده بود و این با نتایج مطالعه حاضر همسو بود ولی در نتایج این پژوهش طول ریشه نیز افزایش یافت که علت آن به نوع رقم و ژنو تیپ انگورهای مورد استفاده و نحوه آزمایش بستگی داشت. که در این پژوهش از روش این ویترو در تیمار کلشی سین استفاده شد در حالی که در پژوهش موتوسوگی و همکاران در سال ۲۰۰۷ از روش این ویترو جهت اعمال تیمار کلشی‌سین و ایجاد پلی‌پلوئیدی استفاده شد. درحالی‌که بهترین تیمار کلشی‌سین در این پروژه ۰/۹ و ۱/۱ درصد بدست آمد که از مهم‌ترین عوامل افزایش درصد کلشی‌سین مصرفی می‌توان به نحوه تیمار جوانه‌ها و نوع رقم انگور مورد تیمار اشاره کرد که در این روش به علت سادگی و سهولت کار از پنبه آغشته به کلشی‌سین و باند پیچی نایلونی در روی جوانه‌ها استفاده گردید در حالی که در کار سایر محققین از خمیر نالولین استفاده شده بود که از نقاط قوت این پروژه به حساب می‌آید که در نحوه استفاده از تیمار کلشی‌سین شیوه جدیدی می‌باشد. در این پژوهش برگ‌های تتراپلوئید بزرگ‌تر از برگ‌های دی‌پلوئید بودند که با نتایج کاپلان و همکاران و همچنین سیورستین و همکاران همسو بود. آن‌ها همچنین در تأیید پلی‌پلوئیدی از اندازه سلول‌های روزنه و ابعاد دانه گرده استفاده نمودند در حالی که در این تحقیق علاوه بر ابعاد سلول‌های محافظ

روزنه، از ابعاد سلول‌های برگ، تعداد کلروپلاست و قطر ریشه استفاده شد و همچنین به وسیله روش‌های بیوتری مانند محاسبه وراثت‌پذیری بهترین صفات در تأیید پلی‌پلوئیدی تعیین گردید.

در پژوهش‌های به نژادی، انجام بررسی‌های سیتوژنتیکی از قدم‌های اولیه به شمار می‌رود. زیرا که شناخت تعداد و ساختمان کروموزوم‌ها و تعیین سطح پلوئیدی در موفقیت دو رگ گیری کمک شایانی می‌کند. برای استفاده از ژن‌های مطلوب گونه‌های مختلف یک جنس در برنامه اصلاحی، تعیین تعداد کروموزوم‌ها و سطح پلوئیدی بسیار ضروری است. تا بهترین روش انتقال ژن‌ها طراحی شود. انتقال ژن بین گونه‌هایی که شباهت کروموزومی بیشتری دارند از موفقیت بیشتری برخوردار است. یکی از مشکلات تلاقی بین گونه‌ای، اختلاف در سطح پلوئیدی گونه‌های خویشاوند است. برای رفع این مشکل، سطح پلوئیدی گونه‌های دیپلوئید را افزایش و سطح پلوئیدی گونه‌های پلی‌پلوئید را کاهش می‌دهند. کروموزوم‌ها حامل ژن‌ها هستند و اطلاعات قابل توارث مربوط به فنوتیپ گیاه را حمل می‌کنند. دانشمندان سیستماتیک گیاهی عقیده دارند که بررسی‌های کروموزومی همراه با پژوهش‌های ژنتیکی و مورفولوژیکی جهت تشخیص و ارزیابی قابل اطمینان روابط خویشاوندی گونه‌های یک جنس می‌تواند بسیار مفید باشد. از روی مقایسه طول و شکل کروموزوم‌ها، محل قرار گرفتن سانترومر، محل ماهواره‌ها و فرورفتگی ثانویه، می‌توان به شباهت و قرابت ژنتیکی دو یا چند گونه پی برد و در برنامه‌های تلاقی بین گونه‌ای به منظور انتقال ژن‌های مطلوب و ترکیب چند ژن مرغوب در یک گونه استفاده کرد (رسولی، ۱۳۸۶). در انگور رقم یاقوتی میزان TF برابر ۷۷/۵ ٪ بدست آمد که مهم‌ترین عامل در شناسایی این رقم با سایر گونه‌های جنس ویتیز خواهد بود که تعیین کننده نوع کاریوتیپ گونه می‌باشد این نتایج توسط رسولی در سال۱۳۸۶ در مطالعات سیتوژنتیکی انگور رقم بی‌دانه سفید نیز بدست آمد که نشان دهنده قرابت ژنتیکی بسیار بالای انگور رقم یاقوتی با انگور رقم بی‌دانه سفید است. از این امر می‌توان نتیجه گرفت که این دو رقم دارای یک جد مشترک اولیه بوده که در اثر جهش ژنتیکی و تکامل از همدیگر متمایز شده‌اند. بر اساس روش‌های بیومتری کاریوتیپ، می‌توان به روش کمی به راحتی مقایسه کروموزومی و کاریوتیپ گونه‌ها را انجام داده که این روش‌ها بسیار دقیق‌تر از روش‌های شناسایی ظاهری خواهد بود زیرا به وسیله شاخص‌های آماری میزان خطای آن سنجیده و شباهت‌ها و اختلافات گونه‌ها با دقت بیشتری سنجیده می‌شود.

در این آزمایش کلشی سین با غلظت ۰/۹ و ۱/۱ درصد و مدت زمان کاربری ۷۲ و ۹۶ ساعت بهترین تیمار جهت ایجاد موتاسیون القایی و اتوتتراپلوئیدی بدست آمد. با توجه به مسایل اقتصادی و هزینه کاربری کلشی سین، تیمار ۰/۹ درصد با ۷۲ ساعت بهترین تیمار معرفی می‌گردد. مهم‌ترین نتیجه کاربردی این تحقیق تولید انگور رقم اتوتتراپلوئید یاقوتی است که اندازه حبه در آن بزرگ‌تر از اندازه حبه رقم دیپلوئید یاقوتی خواهد بود که دارای ارزش اقتصادی و بازاریابی بالایی خواهد بود بدین منظور جهت بررسی این مورد و اندازه‌گیری عملکرد و تکثیر برای کشت در قالب طرح آزمایشی جداگانه، به ایستگاه تحقیقات انگور تاکستان تحویل داده شد.

منابع مورد استفاده

۱- رسولی، ولی اله. ۱۳۸۶. ایجاد اتوتتراپلوئیدی القایی در انگور رقم بی‌دانه سفید. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. انتشارات سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.

۲- عبدمیشانی، سیروس و شاه نجات بوشهری، ع. ۱۳۷۶. اصلاح نباتات تکمیلی. جلد اول. انتشارات نشر دانشگاهی. تهران. صفحه ۲۰۵-۲۰۷.

۳- ناظمیه، علی. ۱۳۷۲. بیولوژی مو. انتشارات دانشگاه تبریز. صفحه ۸۹ – ۱۱۱.

4- Galiev,N. M. 1985. Producing polyploid grape forms by colchicine treatment, Azerbaidzhanskoi-SSR- Bioloyi- Cheskikh- Nauk, 4(14), 91-97.
5- Heo, J.Y. Park, K.S. Yun, H.K. and Park, S.M. 2007. Degree of Abortion and Germination Percentage in Seeds Derived from Interploid Crosses between Diploid and Tetraploid Grape Cultivars. Crop husbandry. 48(2) p. 115-121
6- Kuliev, V. M. 1991. Use of induced tetraploid forms in breeding grape, THIK, 2(7), 150-151.
7- Law, C.N. , J.W. Snape, and A.J. Worland. 1980. Aneuploidy in wheat and its uses in genetic analysis. PP. 71 – 107. In F.G.H. lupton (ed.), wheat breeding. Chapman and Hall, London.
8- Leyer, C. 1965. Increasing colchincine effectiveness in woody Plants with special references to fruit crop, Euphytical, 14(12), 293-295.
9- Luo, Y. and Qiao, w. 1995. Study on the induction of a tetraploid mutant from diploid grape cultivar muscat Hambury by treatment with colchicine, S. C. Fruits, 25(8), 1-23.
10- Luo,-Z-W; Zhang,-R-M; Kearsey,-M-J. 2004. Theoretical basis for genetic linkage analysis in autotetraploid species. Proceedings-of-the-National-Academy-of-Sciences-of-the-United-States-of-America. 101(18): 7040-7045.
11- Motosugi, H. Okudo, K. Kataoka, D. and Naruo, T. 2007. Comparison of Growth Characteristics between Diploid and Colchicine-induced Tetraploid Grape Rootstocks. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 2 (6) 25
12- Okamoto, G. Hayashi, Y. and Hirano, K. 2002. Morphological Studies on the Development of Transmitting Tissues in Diploid and Tetraploid Grape Pistils. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 71(1) 8-12
13- Park, K.S. Yun, H.K. Suh, H.S. Jeong, S.B. Chung, K.H. Jun, J.H. Cho, H.M. and Kang, S.J. 2004. Breeding of a Black Table Grape Cultivar 'Heukgoosul' (Vitis sp.) with Large Berries and High Quality. Korean Journal of Horticultural Science and Technology. 22(4) p. 462-466
14- Syvertsen-JP; Lee-LS; Grosser-JW. 2000. Limitations on growth and net gas exchange of diploid and tetraploid Citrus rootstock cultivars grown at elevated CO2. Journal-of-the-American-Society-for-Horticultural-Science. 2000, 125: 2, 228-234; 35 ref.
15- Todoro, I. and Dimitrov, B. 1974. A study of some in direct methods of determining ploidy in the variety Bulgar (vitis vinifera), Citation 1(3), 345- 346.
16- Yang, Li. Yang, W. Li, S. Wu, X. L. and Cao, J. 2007. In vitro embryo rescue culture of F-1 progenies from crosses between diploid and tetraploid grape varieties. Plant Growth Regulation. 51 (1).

Tetraploid Induction by Colchicine in Yagoti Grape (*Vitis vinifera* var.Yagoti)

Valiallah Rasolli, Mohammad Ali Nejatian, Majid Golmohammadi, Mohammad Fadaei aghdam, Reza Sotuodeh

Abstract

Growth performance and crop increasing based on production of seedless grape and berry growth using autotetraploid is seeing necessary. The current study was conducted to investigate on increasing grape berries size, marketing and yield, and to determine the best concentration and time length of colchicines. The experiment was carried out in spring season in a Takestan grape researches station. In The first decade of March, favorite grape rootstocks (*Vitis vinifera* var. Yagouti) were selected and labeled. It was in a factorial RCBD with 4 replications. Colchicines' concentrations were 0.1 %, 0.3 %, 0.5 %, 0.7 %, 0.9 % and 1.1 % with 4 levels of time length 24, 48, 72 and 96h. Colchicine was applied using cotton in different times on closed buds. Leaves sample were collected for cytological study and tetraploide conformation 60 days after treatments. ANOVA table and means comparisons were administrated by DMRT test using SAS software. Colchicines concentration with 0.9% and 1.1% via 72 and 96h were the beast treatment for autotetraploidy induction in *Vitis vinifera* var. Yagoti respectively. However, samples were taken for cutting from the trees which were treated by colchicines in autumn. Samples were collected to cytological study after rooting. Tetraploid characters were observed in 0.9% and 1.1% concentration via 72 and 96h treatments respectively but the other treatments identified as a diploid. In these two treatments significant differences were observed in the anatomical structure of the cellular structure of petioles, stems, leaves and roots were observed in different treatments compared to non-treated and other treated samples.

Key words: Mutation induction, colchicine, seedless grapes, yagoti

پژوهش‌نامه کشاورزی و منابع طبیعی