"مجله علوم زراعی ایران"
جلد شانزدهم، شماره۲، تابستان ۱۳۹۳

اثر القای پلی‌پلوئیدی بر صفات مورفوفیزیولوژیک سورگوم (*Sorghum bicolor* cv. KFS2)

Effect of Polyploidy induction on morpho-physiologic characteristics in sorghum (*Sorghum bicolor* cv. KFS2)

گیتی ستوده اردبیلی[۱]، رسول اصغری زکریا[۲] و ناصر زارع[۳]

چکیده

ستوده اردبیلی، گ.، ر. اصغری زکریا و ن. زارع. ۱۳۹۳. اثر القای پلی‌پلوئیدی بر صفات مورفوفیزیولوژیک سورگوم (*Sorghum bicolor* cv. KFS2). **مجله علوم زراعی ایران. ۱۶(۲): ۱۶۵-۱۵۱.**

دست‌ورزی در محتوای کروموزوم گونه‌های گیاهی به علت تاثیر آن در برخی از ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی و ایجاد تنوع ژنتیکی، یکی از روش‌های توانمند اصلاح نباتات محسوب می‌شود. این آزمایش در سال ۱۳۹۱ در دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی اجرا شد و در آن به منظور القای پلی‌پلوئیدی در گیاه سورگوم، بذر، گیاهچه و جوانه‌های انتهایی ساقه با کلشی‌سین (۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) در مدت زمان‌های ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. تعیین درصد گیاهان تتراپلوئید از طریق بررسی‌های مورفولوژیکی، روزنه‌ای و کاریولوژیکی انجام شد. نتایج نشان داد که غلظت‌های ۰/۰۲۵ درصد کلشی‌سین در زمان ۴۸ ساعت و ۰/۱ درصد کلشی‌سین در زمان ۲۴ ساعت بهترین تیمارها برای تولید گیاهان تتراپلوئید در هر سه روش تیمار بودند. مقایسه گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نشان داد که گیاهان تتراپلوئید دارای تعداد روزنه کمتر ولی اندازه روزنه بزرگتری بوده و ضخامت برگ، ارتفاع بوته، طول و عرض برگ، قطر ساقه، تعداد برگ و ارتفاع و محیط خوشه در این گیاهان بیشتر بود. به علاوه، گیاهان تتراپلوئید دارای تعداد گره کمتر یا برابر با گیاهان دیپلوئید و در نتیجه فواصل میانگره بیشتری بودند. میزان کلروفیل، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌های کل محلول برگ و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان تتراپلوئید افزایش معنی‌داری را نشان دادند. نتایج حاصل از مطالعه الگوی بیان پروتئین‌های کل برگ با استفاده از روش SDS-PAGE نیز نشان دهنده افزایش تراکم نوارهای پروتئینی در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید بود. نتایج این آزمایش نشان داد که القای پلی‌پلوئیدی می‌تواند در بهبود برخی از صفات سورگوم موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تتراپلوئیدی، سورگوم، کربوهیدرات و کلشی‌سین.

تاریخ دریافت:۱۳۹۲/۱۱/۶ تاریخ پذیرش:۱۳۹۳/۰۲/۳۱ این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی
۲- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی. عضو انجمن علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران (مکاتبه کننده)(پست الکترونیک: r-asghari@uma.ac.ir)
۳- استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی

[DOR: 20.1001.1.15625540.1393.16.2.6.3]

مقدمه

سورگوم زراعی (*Sorghum bicolor* L.) (2n=2x=20)، گیاهی از خانواده غلات و مقاوم به خشکی است. از دانه و ساقه سورگوم می‌توان برای تولید شکر، شربت، علوفه و کاغذ استفاده کرد. از طرف دیگر استحصال اتانول از این گیاه می‌تواند در کاهش آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از سوخت‌های فسیلی موثر باشد. مقاومت سورگوم به تنش‌های خشکی و شوری و امکان کشت آن در گستره‌ای از انواع خاک‌ها، از مزایای این گیاه می‌باشد (Shoemaker and Bransby, 2010).

دست‌ورزی در محتوای کروموزوم و اندازه ژنوم گونه‌ها به علت تاثیر آن در برخی از ویژگی‌های اکوفیزیولوژیکی، ابزاری توانمند در مطالعات گیاهی بوده و در تکامل ژنتیکی بسیاری از گیاهان موثر شناخته شده است (Ochatt *et al*., 2011). اگر چه فراوانی گیاهان پلی‌پلوئید اغلب پایین می‌باشد، اما تنوع ایجاد شده از طریق القای آن بالا بوده و ژرم پلاسم گیاهی متنوعی را جهت انجام مطالعات اصلاحی فراهم می‌سازد (Thao *et al*., 2003). اغلب گیاهان پلی‌پلوئید در ویژگی‌هایی مانند مقاومت به خشکی، آپومیکسی، افزایش زیست توده، مقاومت در برابر آفات و تغییر در کیفیت و میزان ترکیب‌های فعال گیاهی بهتر از انواع دیپلوئید خود بوده و در نتیجه از شانس بیشتری در گزینش برخوردارند (Lavania, 2005). پلی‌پلوئیدی از طریق افزایش اندازه سلول منجر به تولید اندام‌های رویشی و زایشی بزرگتر می‌گردد (Adaniya and Shira, 2001). ارقام پلی‌پلوئید گیاه سورگوم نیز اندام‌های رویشی بزرگ‌تری داشته و در نتیجه محصول بیشتری نسبت به انواع دیپلوئید خود تولید می‌کنند (Quinby, 1974). القای مصنوعی پلی‌پلوئیدی با استفاده از عوامل بازدارنده میتوزی مختلفی مانند کلشی‌سین، اوریزالین و تریفلورالین انجام شده (Dhooghe *et al*., 2010) و به صورت موفقیت‌آمیز در برخی از ارقام سورگوم نیز گزارش شده است (Avidov *et al*., 2013; Miranda *et al*., 1979; Schertz, 1962). در تعیین سطوح پلوئیدی گیاهان روش‌های مستقیم مانند شمارش کروموزوم‌های متافازی و فلوسیتومتری کاربرد دارند (Ochatt *et al*., 2011).

گیاهان از طریق سیستم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدان خود از آسیب گونه‌های فعال اکسیژنی مانند رادیکال‌های سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل محافظت می‌شوند. گیاهان تتراپلوئید قابلیت بیشتری جهت کنترل فعالیت گونه‌های فعال اکسیژنی داشته و مقاومت بیشتری نسبت به تنش‌های محیطی از خود نشان می‌دهند (Zhang *et al*., 2010). تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی بسیاری پس از القای پلی‌پلوئیدی اتفاق می‌افتد و ممکن است به علت افزایش بیان ژن‌ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان افزایش پیدا کند (Zhang *et al*., 2010). القای پلی‌پلوئیدی به عنوان یک سازوکار برای افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه و افزایش مقاومت به برخی از تنش‌ها در نظر گرفته می‌شود (Liu *et al*., 2002). این تحقیق به منظور بهینه‌سازی و ارائه دستورالعمل مناسب برای ایجاد گیاهان تتراپلوئید در گیاه سورگوم با استفاده از کلشی‌سین و بررسی برخی خصوصیات رشدی، کمی و کیفی گیاهان حاصل انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

بذرهای سورگوم رقم KFS_2 از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور غلظت کلشی‌سین (۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) و مدت زمان تیمار (۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت) با سه تکرار و به صورت جداگانه با تیمار بذر، گیاهچه و جوانه انتهایی ساقه در گلخانه و آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. برای تیمار بذر و گیاهچه‌های سه روزه، آن‌ها در

[DOR: 20.1001.1.15625540.1393.16.2.6.3]

غلظت‌های مختلف کلشی‌سین و در زمان‌های تیمار مورد نظر غوطه‌ور شدند. جهت تیمار جوانه انتهایی ساقه نیز از گیاهچه‌های پنج روزه استفاده گردید، بدین ترتیب که ریشه‌ها خارج از محلول کلشی‌سین و در بین دو کاغذ صافی مرطوب و جوانه انتهایی آن‌ها در محلول‌های کلشی‌سین قرار گرفت. پس از اعمال تیمارهای مورد نظر، بذرها و گیاهچه‌ها با استفاده از آب مقطر استریل شست و شو داده شده و در شرایط گلخانه به منظور ایجاد گیاهان تتراپلوئید کشت شدند. برای تهیه خاک مناسب از یک قسمت ماسه بادی، یک قسمت خاک معمولی و یک قسمت کود دامی استفاده شد.

تعیین سطح پلوئیدی در گیاهان تیمار شده، ابتدا بر اساس تغییرات مورفولوژیکی در مراحل مختلف رشد و نمو و نیز ارزیابی تعداد و اندازه روزنه‌ها انجام شد و در نهایت شمارش تعداد کروموزوم در بافت مریستمی نوک ریشه‌های بذری گیاهان حاصل (پس از رسیدگی کامل و برداشت بذرها) جهت تائید سطح پلوئیدی استفاده شد و درصد گیاهان پلی‌پلوئید حاصل بدست آمد. برای تعیین تعداد روزنه‌های سطح برگ لایه فوقانی برگ پرچم با قشری نازک از لاک بی‌رنگ معمولی پوشانیده شد. پس از خشک شدن، با استفاده از نوار چسب لایه فوق روی یک لام تمیز قرار داده شده و با میکروسکوپ نوری (10X) تعداد روزنه‌ها در میلی‌متر مربع مشاهده و شمارش گردید. به منظور شمارش تعداد کروموزوم‌ها، از بذور حاصل از گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین استفاده شد. ابتدا نوک ریشه‌های یک تا ۱/۵ سانتی‌متری در محلول کلشی‌سین ۰/۰۵ درصد پیش‌تیمار شده، سپس در محلول لویتسکی (۱:۱ حجمی از فرمالدئید ۱۰ درصد و اسید کرومیک یک درصد) به مدت ۲۴ ساعت و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد تثبیت شدند. نرم کردن ریشه‌ها با استفاده از هیدرولیز با هیدروکسید سدیم یک نرمال به مدت ۱۰ دقیقه و رنگ آمیزی با استفاده از محلول استوفریک هماتوکسیلین به مدت ۱۰ ساعت انجام گرفت.

به منظور بررسی اثرات پلی‌پلوئیدی بر میزان کلروفیل، ۰/۲ گرم از بافت برگ با استفاده از استون ۸۰ درصد به تدریج ساییده شد تا کلروفیل وارد محلول استون شود. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس جذب نوری در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (Arnon, 1949). میزان کلروفیل با استفاده از روابط زیر تعیین شد که در آن V حجم نهایی استون و W وزن نمونه بر حسب گرم می‌باشند.

$$\text{کلروفیل a } (mg\ g^{-1}) = (12.7\times A_{663}) - (2.69\times A_{645}) \times V/1000W$$

$$\text{کلروفیل b } (mg\ g^{-1}) = (22.9\times A_{645}) - (4.68\times A_{663}) \times V/1000W$$

استخراج پروتئین با استفاده از روش گای و همکاران (Guy *et al.*, 1992) با تغییرات جزئی انجام شد. بافت برگی به همراه بافر استخراج (تریس- اسید کلریدریک ۵۰ میلی‌مولار، EDTA دو میلی‌مولار و ۲- مرکاپتو اتانول ۰/۰۴ درصد) همگن شده و عصاره حاصل سانتریفیوژ شد. به منظور رسم منحنی استاندارد از پروتئین آلبومین گاوی (BSA) استفاده و مقدار پروتئین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه استخراج شده توسط بافر استخراج پروتئین نیز با بافر نمونه (تریس- اسید کلریدریک ۰/۰۶۲۵ مولار، SDS دو درصد، ۲- مرکاپتو اتانول پنج درصد، گلیسرول ۱۰ درصد و برموفنل بلو ۰/۰۱ درصد) مخلوط شده و پس از ورتکس در داخل چاهک‌های ژل SDS-PAGE بارگذاری و الکتروفورز با روش لاملی (Laemmli, 1970) انجام شد.

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کربوهیدرات‌های محلول یک گرم بافت تر در یک هاون چینی محتوای پنج میلی‌لیتر بافر تریس- اسید کلریدریک ۰/۰۵ مولار همگن شده و به مدت

[DOR: 20.1001.1.15625540.1393.16.2.6.3]

۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور و دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس محلول روشناور (حاوی عصاره پروتئینی) جهت بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز به روش چنس و مهلی (Chance and Maehly, 1955) و آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز به روش کار و میشرا (Kar and Mishra, 1976) مورد استفاده قرار گرفت و فعالیت هریک از آنزیم‌ها بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. برای استخراج کربوهیدرات‌های محلول از روش اوموکولو و همکاران (Omokolo *et al*., 1996) استفاده شد و مقدار آن‌ها با استفاده از آنترون به روش مک‌کریدی و همکاران (McCready *et al*., 1950) با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون دانکن با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت. تفاوت آماری در خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون T و تجزیه و تحلیل نوارهای پروتئینی با استفاده از نرم افزار TotalLab انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان دهنده وجود اثرات متقابل معنی‌دار غلظت کلشی‌سین با مدت زمان تیمار بر درصد زنده‌مانی در هر سه روش تیمار بود. بیشترین درصد زنده‌مانی در تمام مراحل تیمار پس از تیمارهای شاهد (غلظت صفر)، در غلظت ۰/۰۲۵ درصد کلشی‌سین در زمان ۸ ساعت مشاهده شد و با افزایش درصد کلشی‌سین و مدت زمان تیمار درصد زنده‌مانی به شدت کاهش پیدا کرد (جدول ۱). کوان و همکاران (Quan *et al*., 2004) گزارش کردند افزایش غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار باعث افزایش شدت مرگ و میر و ناهنجاری در گیاهان می‌شود. با بررسی کاریولوژیکی از طریق بذور برداشت شده از گیاهان تحت تیمار کلشی‌سین، دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌های برخی از گیاهان تایید شد (شکل ۱). اثر متقابل غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار تاثیر معنی‌داری بر درصد القای تتراپلوئیدی داشتند. با افزایش غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار، احتمال تولید گیاهان تتراپلوئید افزایش یافت. در صورتی که در غلظت‌های بسیار بالای کلشی‌سین توام با افزایش مدت زمان تیمار به علت کاهش درصد زنده‌مانی، گیاهان تتراپلوئید تولید نشد و یا درصد تولید گیاهان تتراپلوئید کاهش یافت. بیشترین درصد گیاهان تتراپلوئید در تیمار بذر (حدود ۷ درصد) مربوط به غلظت‌های ۰/۰۲۵ و ۰/۰۵ درصد کلشی‌سین در زمان ۴۸ ساعت و ۰/۱ درصد کلشی‌سین در زمان ۲۴ ساعت و در تیمارهای گیاهچه (حدود ۸ درصد) و جوانه انتهایی ساقه (حدود ۱۰ درصد) در غلظت‌های ۰/۰۲۵ در زمان ۴۸ ساعت و ۰/۱ در زمان ۲۴ ساعت بود (جدول ۱). غلظت ۰/۱ درصد کلشیسین تیماری موثر برای تولید ارقام تتراپلوئید در برخی از ارقام سورگوم گزارش شده است (Delnavaz Hashemlouian *et al*., 2010 and Schertz, 1962).

استفاده از بازدارنده‌های میتوزی به منظور تغییر سطوح پلوئیدی از گذشته مورد استفاده قرار گرفته و تا حد زیادی در تولید محصولات دارای صفات مطلوب موثر بوده است (Dhooghe *et al*., 2010). این مواد از طریق ممانعت از تشکیل رشته‌های دوک باعث دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌ها می‌شوند. القای پلی‌پلوئیدی در غلات معمولا به سختی صورت می‌گیرد و موفقیت در میزان القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان به غلظت و مدت زمان مناسب تیمار بستگی دارد (Delnavaz Hashemlouian *et al*., 2010). نتایج حاصل از الگوی بیان پروتئین‌های کل برگ در گیاهان شاهد و تتراپلوئید با استفاده از روش SDS- PAGE مشخص کرد که تراکم نوارهای

[DOR: 20.1001.1.15625540.1393.16.2.6.3]

جدول ۱- درصد زنده‌مانی و تتراپلوئیدی در تیمار بذر، گیاهچه و جوانه انتهایی ساقه سورگوم در تیمارهای کلشی‌سین

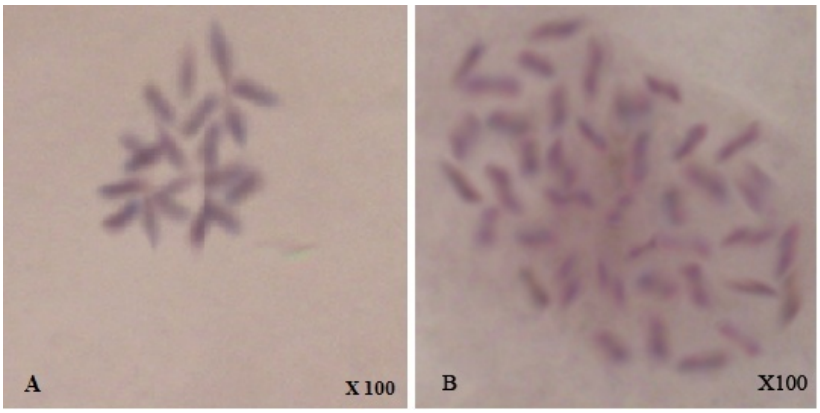
Table 1. Survival rate and tetraploidy percentage at seed, seedling and terminal bud of sorghum in colchicine treatments

	غلظت کلشی‌سین Colchicine concentration (%)	تیمار بذر Seed treatment			تیمار گیاهچه Seedling treatment			تیمار جوانه انتهایی ساقه Terminal bud treatment		
		۸ ساعت 8 h	۲۴ ساعت 24 h	۴۸ ساعت 48 h	۸ ساعت 8 h	۲۴ ساعت 24 h	۴۸ ساعت 48 h	۸ ساعت 8 h	۲۴ ساعت 24 h	۴۸ ساعت 48 h
درصد زنده‌مانی Survival rate (%)	0	86.33a	87.66a	86.33a	93a	79.67b	70.67c	84a	74.33b	61c
	0.025	67.33b	52c	25.33d	60.67d	37.33f	25.33g	51d	33.33f	22g
	0.05	53.33c	22de	13.33fg	47.33e	29.67g	11i	39.67e	25.33g	10i
	0.1	25d	16.33ef	1hi	27.33g	17.33h	6.33i	26.33g	16h	5ijk
	0.2	7.33gh	4hi	0i	6.33i	0j	0j	7.33ij	2jk	0k
درصد تتراپلوئیدی Tetraploidy (%)	0	0f	0f	0f	0h	0h	0h	0h	0h	0h
	0.025	1.1ef	3.3cd	6.6a	2.2fg	4.4de	8.8a	3.3efg	6.6bcd	8.8ab
	0.05	2.2de	4.4bc	7.7a	3.3ef	6.6bc	3.3ef	5.5cde	7.7bc	4.4ef
	0.1	3.3cd	5.5ab	1.1ef	5.5cd	7.7ab	2.2fg	7.7bc	11a	2.2fgh
	0.2	4.4bc	2.2de	0f	1.1gh	0h	0h	2.2fgh	1.1gh	0h

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند

Means in each column followed similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using Duncan's Multiple Range Test

[DOR: 20.1001.1.15625540.1393.16.2.6.3]

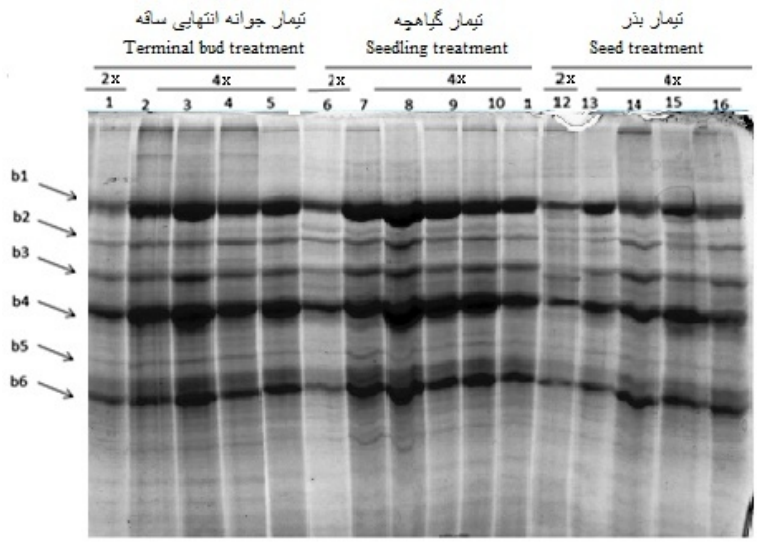


شکل ۱- تعداد کروموزوم‌ها در سلول‌های نوک ریشه، a) گیاه دیپلوئید و b) گیاه تتراپلوئید سورگوم

Fig. 1. Chromosome number in cells of the root tip, a) diploid plant (2n=2x=20) and b) tetraploid sorghum plant (2n=4x=40)

پروتئینی در هر سه روش تیمار در گیاهان تتراپلوئید بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود. در واقع سطح بیان پروتئین در گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید افزایش یافت (شکل ۲؛ جدول ۲).

اگرچه کروموزوم‌های دو برابر شده سوماتیکی گونه جدیدی را ایجاد نمی‌کنند و تنها نسخه‌های اضافی از ژن در کروموزوم‌های موجود ایجاد می‌شود، اما تغییرات ژنومی بسیاری پس از پلی‌پلوئیدی اتفاق می‌افتد (Ranney, 2006). افزایش اندازه سلول‌ها در نتیجه افزایش سطح پلوئیدی می‌تواند به عنوان عاملی جهت افزایش مواد ذخیره‌ای در سلول‌ها تلقی شود (Kondorosi *et al*., 2000). نتایج تحقیقات انجام شده توسط ژی و همکاران (Xie *et al*., 2007) نیز نشان داد که محتوای پروتئینی در اندوسپرم لاین‌های



شکل ۲- تغییرات سطح بیان پروتئین‌های کل محلول در برگ‌های گیاه سورگوم در گیاهان تتراپلوئید ودیپلوئید، در سه روش تیمار با کلشی‌سین

Fig. 2. Changes in expression levels of total soluble proteins in sorghum leaves in tetraploid and diploid plants at three method of treatment with colchicine

[DOR: 20.1001.1.15625540.1393.16.2.6.3]

اتوتتراپلوئید برنج خیلی بیشتر از انواع دیپلوئید آن بود. در حالی که الگوی بیان ژن در اتوتتراپلوئیدها مشابه با لاین‌های دیپلوئید بود.

مقایسه میانگین داده‌ها در هر سه تیمار افزایش معنی‌داری را در میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز و همچنین میزان کربوهیدرات‌های محلول و پروتئین کل در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید نشان داد (جدول ۳).

سازوکارهایی که صفات مهمی را در پلی‌پلوئیدها ایجاد می‌کنند هنوز به طور دقیق کشف نشده‌اند و تحقیقات بعدی این سازوکارها را بهتر مشخص خواهد کرد (Zhang *et al*., 2010). افزایش میزان کربوهیدرات‌ها، پروتئین کل و فعالیت آنزیمی در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئید در این تحقیق می‌تواند در نتیجه افزایش سطوح پلوئیدی باشد. سازگاری‌های بیشتر گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به تنش‌های محیطی نیز می‌تواند به علت افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آن‌ها باشد. در واقع روش دو برابر کردن تعداد کروموزوم‌ها می‌تواند با افزایش فعالیت ژنی و در نتیجه افزایش تنوع آنزیم‌ها، افزایش نسبت فتوسنتز، کاهش میزان تعرق و سرعت رشد کمتر گیاه باعث مقاومت بیشتر نسبت به تنش‌های تغذیه‌ای و معدنی و شرایط محیطی گردد (Dhawan and Lavania, 1996). لیو و همکاران (Liu *et al*., 2011) نشان دادند که در شرایط تنش‌های شوری و خشکی فعالیت آنزیم پراکسیداز و محتوای نسبی آب در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئیدها بیشتر شده است. ژانگ و همکاران (Zhang *et al*., 2010) گزارش کردند در مقایسه با گیاهان دیپلوئید میزان آنیون‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن در تتراپلوئیدها در سطح پایین‌تری بود. در حالی که فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند سوپر اکسیداز دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز، اسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز افزایش یافته و ترکیبات آنتی اکسیدان مانند اسید اسکوربیک و گلوتاتیون در غلظت‌های بالا حفظ شدند. نتایج کلی نشان داد که گیاهان پلی‌پلوئید سیستم آنتی اکسیدانی قوی‌تری داشته و مقاومت آن‌ها بیشتر است.

مطالعات روزنه‌ای در سه روش تیمار، تفاوت‌های معنی‌داری را از لحاظ اندازه و تعداد سلول‌های روزنه در بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نشان داد. گیاهان تتراپلوئید دارای تعداد روزنه کمتر ولی اندازه روزنه بزرگتری در مقایسه با گیاهان دیپلوئید بودند (شکل ۳، جدول ۴). افزایش اندازه سلول‌های روزنه در اثر القای پلی‌پلوئیدی در برخی از گیاهان مانند توت سفید (*Morus alba*) (Chakraborti *et al*., 1998)، مارچوبه (Aryavand *et al*., 2003) و گندم (Shiga *et al*., 2009) و کاهش تعداد روزنه نیز در گونه‌های پلی‌پلوئید توت سفید (Chakraborti *et al*., 1998) گزارش شده است.بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها، میزان کلروفیل‌های a، b و کل، در هر سه روش تیمار در گیاهان تتراپلوئید به صورت معنی‌دار بیشتر از گیاهان دیپلوئید بودند (جدول ۴). اندازه‌گیری محتوای کلروفیل نیز در تعیین سطح پلوئیدی در گونه‌های مختلف گیاهی با موفقیت همراه بوده است (Urwin and Horsnell, 2007). متورا و همکاران (Mathura *et al*., 2006) گزارش کردند که میزان کلروفیل در گیاهان اتوتتراپلوئید نوعی آکاسیا (*Acasia (mearnsii*) ۴۰ درصد بیشتر از انواع دیپلوئید آن بوده است. به طور کلی پلی‌پلوئیدها در مقایسه با دیپلوئیدها با حفظ تعادل آبی مناسب و محتوای کلروفیل بالا باعث کاهش تنش‌های اکسیداتیو شده و مقاومت به خشکی و شوری نیز در آن‌ها افزایش می‌یابد. در واقع پلی‌پلوئیدی با افزایش اندازه برگ‌ها، روزنه‌ها، کلروپلاست‌ها و سلول‌های نگهبان روزنه از طریق افزایش کارایی فتوسنتز موجب سازگاری به عوامل محیطی نیز می‌شود (Liu *et al*., 2011).

[DOR: 20.1001.1.15625540.1393.16.2.6.3]

جدول ۲- میانگین درصد افزایش سطح بیان پروتئین‌های کل محلول برگ، در گیاهان سورگوم تتراپلوئید نسبت به انواع دیپلوئید در تیمارهای کلشی‌سین

Table 2. Average rate of increasing expression of total soluble protein in tetraploid sorghum plants, than diploid varieties at different colchicine treatments

نوارهای پروتئینی	تیمار بذر (Seed treatment)		تیمار گیاهچه (Seedling treatment)		تیمار جوانه انتهایی ساقه (Terminal bud treatment)	
Protein bands	(Mean±SE)	T test	(Mean±SE)	T test	(Mean±SE)	T test
b1	88.82±7.11	12.48**	91.42±7.42	12.31**	80.91±1.72	46.77**
b2	40.25±2.18	18.44**	40.81±1.95	20.87**	43.28±4.33	9.98**
b3	48.35±5.68	8.5**	54.48±3.48	15.62**	46.63±2.71	17.18**
b4	104.01±8.13	12.78**	95.47±5.58	17.1**	91.48±7.28	12.56**
b5	47.74±5.86	8.14**	39.81±7.33	5.42**	31.55±7.57	4.16*
b6	64.86±14.62	4.43*	76.87±9.31	8.25**	54.04±4.84	11.15**

** significant at 1% probability level using t-test

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

جدول ۳- مقایسه میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدان، کربوهیدرات و پروتئین کل در گیاهان سورگوم دیپلوئید و تتراپلوئید در سه روش تیمار با کلشی‌سین

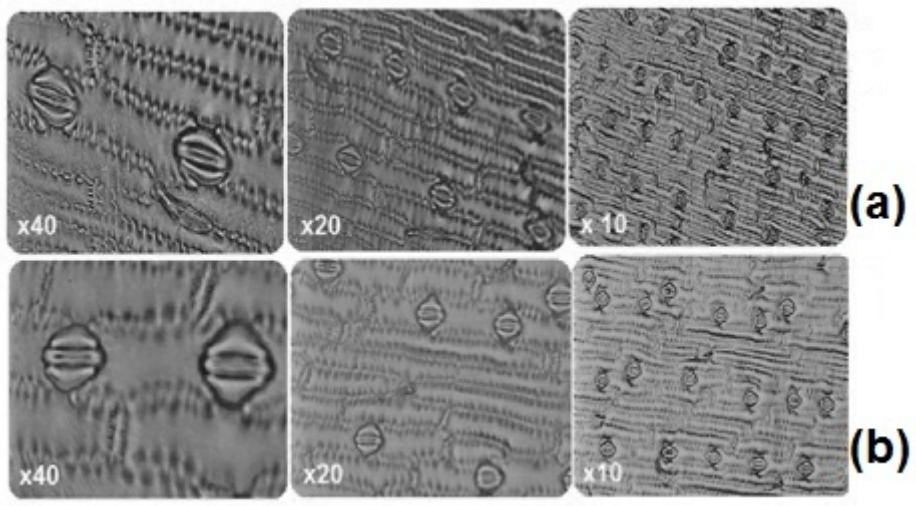
Table 3. Comparison of antioxidant enzymes, carbohydrates and total protein content in diploid and tetraploid sorghum plants in three method of treatment with colchicine

		تیمار بذر Seed treatment		تیمار گیاهچه Seedling treatment		تیمار جوانه انتهایی ساقه terminal bud treatment	
Biochemical parameters	صفات بیوشیمیایی	2x (Mean±SE)	4x (Mean±SE)	2x (Mean±SE)	4x (Mean±SE)	2x (Mean±SE)	4x (Mean±SE)
Total protein (g g^{-1})	پروتئین کل	0.13±0.1b	0.144±0.03a	0.12±0.05b	0.138±0.04a	0.127±0.05b	0.145±0.01a
Carbohydrates (mg g^{-1})	کربوهیدرات	0.65±0.1b	0.8±0.06a	0.64±0.04b	0.83±0.07a	0.63±0.04b	0.75±0.03a
Catalase (OD g^{-1}.FWmin^{-1})	کاتالاز	4.32±0.28b	5.01±0.2a	4.38±0.2b	5.05±0.09a	4.28±0.22b	4.99±0.12a
Polyphenoloxidase (OD g^{-1}.FWmin^{-1})	پلی‌فنل اکسیداز	4.79±0.08b	5.5±0.02a	4.96±0.05b	5.56±0.15a	4.78±0.19b	5.57±0.28a
Peroxidase (OD g^{-1}.FWmin^{-1})	پراکسیداز	2.50±0.1b	2.92±0.08a	2.42±0.21b	2.92±0.07a	2.58±0.12b	3.06±0.13a

در هر ستون میانگین‌هایی که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون t دارای تفاوت معنی‌دار هستند

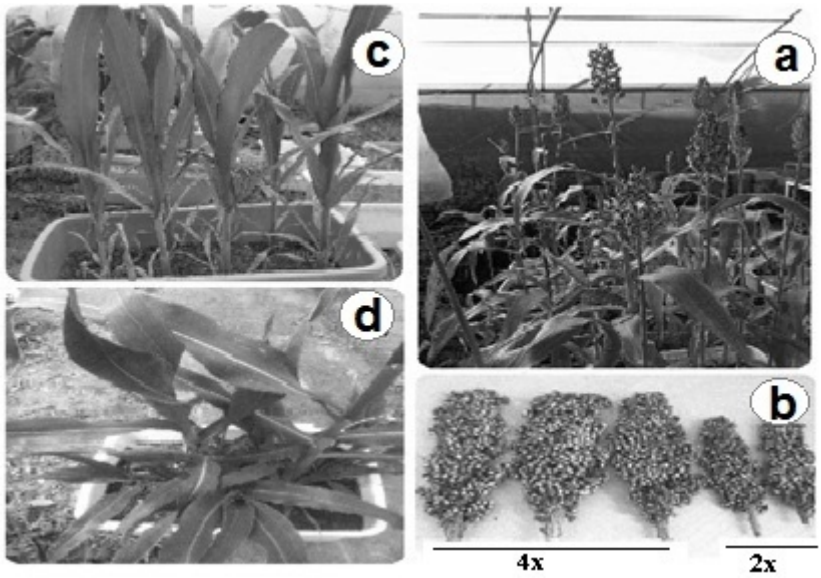
Means in each column followed by different letter(s) are significantly different using t-test

[DOR: 20.1001.1.15625540.1393.16.2.6.3]



شکل ۳- تغییرات اندازه و تعداد سلول‌های روزنه در a) گیاه دیپلوئید و b) گیاه تتراپلوئید سورگوم

Fig. 3. Differences in stomata size and number, a) diploid plant and b) tetraploid sorghum plant



شکل ۴- مقایسه گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید سورگوم، a) مرحله رسیدگی کامل؛ b) مقایسه اندازه خوشه؛ c) گیاهان دیپلوئید در مرحله رشد رویشی و d) گیاهان تتراپلوئید در مرحله رشد رویشی

Fig. 4. Comparison of tetraploid and diploid sorghum plants, a) reproductive growth; b) comparing the panicle size; c) diploid plants in vegetative stage and d) tetraploid plants in vegetative stage

بررسی برخی از صفات مورفولوژیکی و آناتومیکی در این آزمایش نشانگر افزایش ضخامت برگ، ارتفاع بوته، طول و عرض برگ، قطر ساقه، تعداد برگ و طول و محیط خوشه در هر سه روش تیمار در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید بود. از طرف دیگر این گیاهان دارای تعداد گره کمتر و یا برابر و در نتیجه فواصل میانگره بیشتر از گیاهان دیپلوئید بودند(شکل ۴؛ جدول ۴). این نتایج با گزارش آویدوف و همکاران (Avidov *et al.* , 2013) در سورگوم مطابقت داشت. القای پلی‌پلوئیدی اغلب سبب

[DOR: 20.1001.1.15625540.1393.16.2.6.3]

جدول ۴- مقایسه برخی ویژگی‌های کمّی و کیفی گیاهان دیپلوئید با تتراپلوئید سورگوم حاصل در سه روش تیمار با کلشی‌سین

Table 4. Comparison some of the qualitative and quantitative characteristics of diploid plants with derived tetraploid sorghum plants in three treatment methods with colchicine

		تیمار بذر Seed treatment		تیمار گیاهچه Seedling treatment		تیمار جوانه انتهایی ساقه Terminal bud treatment	
Plant characteristics	صفات گیاهی	2x (Mean±SE)	4x (Mean±SE)	2x (Mean±SE)	4x (Mean±SE)	2x (Mean±SE)	4x (Mean±SE)
Number of adaxial stomata (mm^2)	تعداد روزنه سطح برگ	275.73±4.5a	227.06±2.51b	256.63±3.69a	201.65±2.9b	265.8±2.6a	216.82±2.44b
Number of abaxial stomata (mm^2)	تعداد روزنه پشت برگ	421.06±5.9a	350.72±5.32b	403±2.58a	332.6±2.66b	413.6±2.3a	348.07±3.04b
Average internode length (cm)	میانگین فواصل میانگره	9.48±0.17b	11.20±0.28a	9.55±0.18b	13.53±0.16a	9.7±0.22b	14.38±0.15a
Chlorophyll a content (mg g^{-1})	محتوای کلروفیل a	1.18±0.09b	1.51±0.06a	1.08±0.02b	1.45±0.02a	1.1±0.02b	1.45±0.02a
Chlorophyll b content (mg g^{-1})	محتوای کلروفیل b	0.48±0.1b	0.87±0.1a	0.48±0.01b	0.89±0.01a	0.47±0.01b	0.88±0.01a
Average of leaf thickness (mm)	میانگین ضخامت برگ	0.21±0.01b	0.31±0.01a	0.23±0.01b	0.43±0.01a	0.28±0.01b	0.42±0.01a
Leaf length (cm)	طول برگ	20.90±0.34b	28.18±0.25a	24.22±0.65b	30.51±0.57a	25.42±0.6b	31.75±0.55a
Leaf width (cm)	عرض برگ	3.09±0.06b	4.06±0.03a	3.63±0.13b	4.87±0.07a	3.83±0.07b	4.95±0.09a
Number of nodes	تعداد گره	9.26±0.09a	9.20±0.11a	10.22±0.14a	10.28±0.1a	10.14±0.2a	9.94±0.1a
Number of leaves	تعداد برگ	10.30±0.14b	16.97±0.19a	11.54±0.1b	15.57±0.11a	11.4±0.16b	17.6±0.21a
Plant height (cm)	ارتفاع گیاه	97.96±2.15b	126.97±1.38a	105.77±1.7b	143.94±3.28a	103.7±1.7b	141.67±2.08a
Stem diameter (mm)	قطر ساقه	9.1±0.1b	13.1±0.1a	11.5±0.16b	16.2±0.19a	11.9±0.67b	16.4±0.29a
Panicle length (cm)	طول خوشه	13.63±0.28b	18.83±0.29a	16.13±0.23b	22.25±0.35a	15±0.32b	23.35±0.22a
Panicle perimeter (cm)	محیط خوشه	9.66±0.21b	14.13±0.27a	11.40±0.38b	19.97±0.28a	12.09±0.4b	20.71±0.23a

در هر ستون میانگین‌هایی که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون t دارای تفاوت معنی‌دار هستند

Means in each column followed by different letter(s) are significantly different using t-test

[DOR: 20.1001.1.15625540.1393.16.2.6.3]

افزایش اندازه گل‌ها، برگ‌ها، میوه و بذر شده و اغلب گیاهان پلی‌پلوئید دارای اندام‌های بزرگتری نسبت به انواع دیپلوئید خود می‌باشند. افزایش سطوح پلوئیدی در گیاه دارویی بنگدانه (*Hyoscyamus niger*) سبب افزایش ضخامت برگ (Lavania and Srivastava, 1991)، در گیاه دارویی اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) سبب تولید گیاهانی با اندازه گل و بذرهای بزرگ‌تر و دمگل ضخیم‌تر (Urwin and Horsnell, 2007)، در هندوانه (*Citrulus lanatus*) سبب تولید گیاهانی با قطر ساقه اصلی، ارتفاع و سطح برگ بیشتر (Srivastava and Srivastava, 2002) و در رز سبب تولید تعداد گلبرگ و گرده زنده بیشتر، طول ساقه بلندتر و نسبت عرض به طول بیشتر در برگچه‌ها (Kermani *et al*., 2003) شده است.

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که تیمار جوانه انتهایی ساقه با کلشی‌سین روش مناسبی برای القای پلی‌پلوئیدی در گیاه سورگوم با حداکثر تولید گیاهان تتراپلوئید می‌باشد و گیاهان تتراپلوئید حاصل از لحاظ برخی از ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی برتر از گیاهان دیپلوئید هستند که در آزمایش‌های مزرعه‌ای باید کمیت و کیفیت محصول این گیاهان مورد بررسی قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

References

Adaniya, S. and D. Shira. 2001. In vitro induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinali* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. Sci. Hortic. 88: 277-287.

Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. Plant Physiol. 24(1): 1-15.

Aryavand, A., B. Ehdaie, B. Tran and J. G. Waines. 2003. Stomatal frequency and size differentiate ploidy levels in *Aegilops neglecta*. Genet. Resour. Crop Evol. 50: 175–182.

Avidov, A., I. Lupo, and L. Rothem, 2013. Cultivated sorghum plant having a partially or fully multiplied genome and uses of same, Google Patents no. WO 2013098820 A1.

Chakraborti, S. P., K. Vijayan, B. Roy and S. Qadri. 1998. In vitro induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). Plant Cell Rep. 17: 799–803.

Chance, B. and A. C. Maehly. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods Enzymol. 11: 764-755.

Delnavaz Hashemlouian, B., A. Ataii Azimi and H. Ghasempour. 2010. Study of polyploidy induction and cytomixis using colchicine in three varieties of sorghum (*Sorghum bicolor*). J. Biol. Sci. Islamic Azad University Press. Zanjan. 4: 23-32 (In Persian with English abstract).

Dhawan, O. P. and U. C. Lavania. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. Euphytica. 87: 81-89.

Dhooghe, E., K. Van Laere, T. Eeckhaut, L. Leus and J. Van Huylenbroeck. 2010. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 104: 359-373.

Guy, C. L., D. Haskell, L. Neven, P. Klein and C. Smelser. 1992. Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. Planta. 188: 265-270.

Kar, M. and D. Mishra. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf

[DOR: 20.1001.1.15625540.1393.16.2.6.3]

senescence. Plant Physiol. 57: 315-319.

Kermani, M. J., V. Sarasan, A. V. Roberts, K. Yokoya, J. Wentworth and V. K. Sieber. 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in Rosa and its effect on plant morphology and pollen viability. Theor. Appl. Genet. 107: 1195-1200.

Kondorosi, E., F. Roudier and E. Gendreau. 2000. Plant cell size control: growing by ploidy. Curr. Opin. Plant Biol. 3: 488-492.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Lavania, U. C. 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto- pharmaceuticals. Plant Gen. Res. 3: 170-177.

Lavania, U. C. and S. Srivastava. 1991. Enhanced productivity of tropane alkaloids and fertility in artificial autotetraploids of *Hyoscyamus niger* L. Euphytica. 52: 73-77.

Liu, S., S. Chen, Y. Chen, Z. Guan, D. Yin and F. Chen. 2011. In vitro induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance. Scientia Hortic. 127: 411-419.

Mathura, S., A. Fossey and S. Beck. 2006. Comparative study of chlorophyll content in diploid and tetraploid black Wattle *(Acacia mearnsii*). Forestry. 79: 381-388.

McCready, R. M., J. Guggolz, V. Silviera and H. S. Owens. 1950. Determination of starch and amylase in vegetables. Anal. Chem. 22: 1156-1158.

Miranda, J. H., M. K. George and S. T. Mery. 1979. The effects of colchicines and the induction of polyploidy in *Sorghum*. Agri, Res. J. Kerala. 17: 208-216.

Ochatt, S. J., E. M. Patat-Ochatt, A. Moessner. 2011. Ploidy level determination within the context of in vitro breeding. Plant cell Tiss. Org. Cult. 104: 329-341.

Omokolo, N. D., N. G. Tsala and P. F. Djocgoue. 1996. Changes in carbohydrate, amino acid and phenol content in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. and Grif. Ann. Bot.. 77: 153-158.

Quan, K., L. Guolu, G. Qigao and L. Xiaolin. 2004. Polyploid induction of *Arctium lappa* by colchicine. Plant Physiol. 40: 157-158.

Quinby, T. R. 1974. Sorghum Iprovement and the Genetics of Growth, TX (USA). Texas A & M university press.

Ranney, T. G. 2006. Polyploidy: from evolution to new plant development. Proc. Int. Plant Propagators Soc. 56: 137-142.

Schertz, K. F. 1962. Cytology, fertility and gross morphology of induced polyploidy of *Sorghum vulgar*. Canada, T. Genet. Cytol. 4: 179-86.

Shiga, I., Y. Uno, M. Kanechi and N. Inagaki. 2009. Identification of polyploidy of in vitro anther-derived shoots of *Asparagus officinalis* L. by flow cytometric analysis and measurement of stomatal length. J. Jpn

[DOR: 20.1001.1.15625540.1393.16.2.6.3]

Soc. Hortic. Sci. 78: 103–108.

Shoemaker, C. E. and D. I. Bransby. 2010. The role of sorghum as a bioenergy feedstock. In: Braun, R., D. Karlen and D. Johnson, Sustainable alternative fuel feedstock opportunities, challenges and roadmaps for six U.S. regions, Proceeedings of the Sustainable Feedstocks for Advance Biofuels Workshop, Atlanta, GA. 28-30 September. Soil and Water Conserv. Soc., Ankeny, IA. pp. 149-159.

Srivastava, R. and G. K. Srivastava. 2002. Autopolyploids of *Helianthus annuus* L. var. Morden. Cytologia. 67: 213-220.

Thao, N. T. P., K. Ureshino, I. Miyajima, Y. Ozaki and H. Okubo. 2003. Induction of tetraploids in ornamental Alocasia through colchicine and oryzalin treatments. Plant cell Tiss. Org. Cult. 72: 19-25.

Urwin, N. A. R. and J. Horsnell. 2007. Generation and characterization of colchicine induced autotetraploid *Lavandula angustifolia.* Euphytica. 156: 257-266.

Xie, H. B., Q. C. Huang, G. P. Li, X. L. Wang, C. Y. Ye and G. Y. Qin. 2007. Differential expression of the proteins in endosperms of rice with different chromosome sets. Hereditas. 29: 360- 4.

Zhang, X. Y., C. G. Hu, and J. L. Yao. 2010. Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. Plant Physiol. 167: 88-94.

[DOR: 20.1001.1.15625540.1393.16.2.6.3]

Polyploidy induction and its effects on some morpho-physiologic characteristics in sorghum (*Sorghum bicolor* cv. KFS2)

Sotoodeh Ardabili[1], G., R. Asghari Zakaria[2] and N. Zare[3]

ABSTRACT

Sotoodeh Ardbili, G., R. Asghari Zakaria and N. Zare. 2014. Polyploidy induction and its effects on some morpho-physiologic characteristics in sorghum (*Sorghum bicolor* cv. KFS2)**. Iranian Journal of Crop Sciences. 16(2):151-164. (In Persian).**

Chromosome manipulation of the plant species for development of genetic variation in morpho-physiological characteristics is a powerful tool in plant breeding. This experiment was conducted at Mohaghegh Ardabili university, Iran, in 2013 to induce tetraploidy in sorghum seed, seedlings and terminal buds of sorghum were treated with colchicine (0.025, 0.05, 0.1 and 0.2%) for 8, 24 and 48 hours. Determination of tetraploid plants was done through the morphological, stomatal and karyological studies. The 0.025% of colchicine for 48 hours and 0.1% of colchicine for 24 hours were the effective treatments for production of tetraploid plants in all treatment. Comparison of diploid and tetraploid plants showed that tetraploid plants had less stomata number but with greater size. Thickness of leaves, plant height, leaf length and width, stem diameter, number of leaves and panicle length and diameter were also higher in these plants. In addition, tetraploid plants had fewer or equal node number with diploid plants, but longer internodes. The chlorophyll, carbohydrates, total soluble protein content of leaf and antioxidant enzymes activity were significantly greater in tetraploid plants. The protein expression patterns studied by SDS-PAGE represented an increase in density of the protein bands in tetraploid plants as compared with diploids. In conclusion, polyploidy induction can be effectively employed in improvement of some morpho-physiological traits in sorghum.

Key words: Antioxidant enzymes, Carbohydrate, Colchicine, *Sorghum* and Tetraploidy.

[DOR: 20.1001.1.15625540.1393.16.2.6.3]

Received: January, 2013 Accepted: May, 2014

1- Former MSc. Student, University of Mohaghegh Ardabili. Ardabil, Iran
2- Associate prof., University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran (Corresponding author) (Email: r-asghari@uma.ac.ir)
3- Assistant prof., University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran