

تأثیر سطوح مختلف پلویدی بر قابلیت باروری دانه‌گرده، جوانه‌زنی بذر و نشاپذیری گیاهچه تولیدی بادمجان

حامد کاوه^{۱*} و حسین نعمتی^۲

۱- *نویسنده مسئول: استادیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تربت حیدریه، ایران (h.kaveh@torbath.ac.ir)

۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۱۹

چکیده

به منظور بررسی اثر اتوتتراپلویدی در گیاه بادمجان (*Solanum melongena* L.)، بر قابلیت باروری، تعداد روز تا تشکیل میوه، سرعت و درصد جوانه‌زنی بذر و نشاپذیری؛ آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی بر روی چهار رقم کشتزار، یلدا، چاه‌بلند و پاسارگاد انجام گرفت. در آزمایشی جداگانه و در سه تکرار اندازه‌گیری درصد و سرعت جوانه‌زنی در هر رقم و سطح پلویدی انجام گرفت. بذور تتراپلوئید از گیاهان اتوتتراپلوئید که با تیمار کلشیسین به دست آمده بودند، تهیه شدند. برای مقایسه صفات بین سطوح مختلف پلویدی موجود، بذرها در شرایط گلخانه‌ای در تخته پرورش نشا، کشت شده و درصد و سرعت ظهور گیاهچه محاسبه گردید. با گذر از دوره دانه‌الی، نشاها به گلخانه با بستر خاکی منتقل شدند. از زمان کشت بذرها در جعبه کاشت، سرعت نمو مراحل مختلف نونهالی (دو برگی شدن، چهار برگی شدن)، اندازه‌گیری شد. تعداد روز تا تشکیل میوه، خصوصیات بذر و دانه‌الی و سرعت نمو در مراحل دانه‌الی به طور معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد تحت تأثیر تغییرات القاشده در تعداد دسته‌جات کروموزومی بودند. رنگ آمیزی دانه‌های گرده با استوکارمن به منظور تعیین درصد باروری آن‌ها نشان داد که با افزایش سطح پلویدی، قابلیت باروری دانه‌های گرده در سطح احتمال ۵ درصد افزایش می‌یابد. در تلاش برای تولید گیاهان تری پلوئید، هیچ یک از تلاقی‌های انجام‌شده بین دو فرم دیپلوئید و تتراپلوئید موفقیت‌آمیز نبوده و میوه‌ای تشکیل نگردید.

کلید واژه‌ها: تتراپلوئید، سرعت نمو، کلشیسین

مقدمه

میزان آب بیشتر و تأخیر در گلدهی همراه با افزایش دوره گلدهی می‌باشند (Kondorosi et al., 2000). گیاهان پلی پلوئید سازگاری اکولوژیکی بالاتری دارند و در نتیجه از پتانسیل بالاتری برای تحمل شرایط تنش نسبت به دیپلوئیدها برخوردارند. این دسته از گیاهان استقرارپذیری بهتری در طی مراحل تکاملی از خود نشان می‌دهند. افزایش مقاومت به عوامل نامساعد محیطی و در نتیجه افزایش قدرت رقابت، به یک گونه خاص اجازه می‌دهد تا به صورت یک جمعیت غالب در یک ناحیه شود (Levin, 1983). البته محدودیت‌هایی در زمینه تولید گیاهان اتوتتراپلوئید وجود دارد. برای مثال بزرگ

فراوانی پلی پلوئیدی در گیاهان اهلی شده در حدود ۷۵ درصد می‌باشد و پلی پلوئیدی به عنوان یک نیروی تکاملی مهم در گیاهان گلدار شناخته شده است. موز، نیشکر، سبب زمینی شیرین، توت فرنگی، یونجه و گندم از دسته گیاهانی هستند که پلی پلوئید می‌باشند. از پلی پلوئیدی در باغبانی به عنوان یک ابزار اصلاحی در صفاتی از قبیل اندازه گیاه، ضخامت برگ، افزایش نسبت طول به عرض برگ و اندازه گل استفاده شده است (Shao and Chen, 2003). گیاهان پلی پلوئید دارای سلول‌های بزرگتر، برگ‌های ضخیم‌تر، رشد کندتر،

شدن جته گیاه در اثر تراپلوئیدی ممکن است وابسته به گونه و ژنوتیپ باشد. از طرفی در بعضی موارد برگشتگی سطح پلوئیدی به حالت پایه اولیه نیز مشاهده شده است. بنابراین می توان گفت که هر گیاهی سطح پلوئیدی خاصی را تحمل می کند (Lavania, 2005). Medina et al. (1972) اولین گزارش رسمی در تلاش برای القای پلی پلوئیدی در بادمجان (*Solanum melongena* L.) را ارائه نمودند که در آن تیمار بذور بادمجان با غلظت های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد کلشی سین، گیاهان تراپلوئید با ۴۸ کروموزوم و گیاهان شیمر با ۲۴ تا ۴۸ تا ۹۶ کروموزوم ایجاد کرد. بررسی گیاهان حاصله نشان داد تعداد بذور در میوه های گیاهان تراپلوئید نسبت به دیپلوئید کمتر بوده و میوه ها با افزایش قطر و بدون تغییر در طول همراه بودند. طول دوره نمو مراحل مختلف در گیاهان تراپلوئید با تغییر همراه بود. علی رغم گزارش افزایش اندازه گل، به تغییرات در اندامک های گل اشاره ای نشده و تنها مشخص شده که درصد باروری در دانه های گرده افزایش یافته و تعداد دانه های گرده بدون رشد (پوک) در گیاهان تراپلوئید کاهش نشان داده است. Dirks et al. (2010) در یک پروژه تجاری موفق به تولید بادمجان تریپلوئید شدند. تیمار نوک شاخساره قلمه های دیپلوئید بادمجان با محلول کلشی سین ۰/۵ درصد به مدت ۲ ساعت منجر به تولید گیاهچه های تراپلوئید گردید. در این آزمایش چهار اینبرد لاین مورد استفاده قرار گرفتند که تفاوت معنی داری در قابلیت تراپلوئید شدن آن ها، گزارش شد.

شمارش کروموزومی پس از گذشت ۱۴ تا ۲۱ روز از جوانه زنی، از ریشه دانه های حاصله از بذور نمونه تهیه شد و به منظور مشاهده و شمارش کروموزوم ها و همچنین بررسی تغییرات کروموزومی در سلول های در حال تقسیم، به ترتیب مراحل ۱ تا ۴ انجام گرفت: ۱- پیش تیمار با

پژوهش حاضر به هدف رفع موانع تولید گیاه بدون بذور بادمجان از طریق تلاقی بین والدین دی و تراپلوئید صورت گرفته است. تمامی لاین های تراپلوئید توسط خود محققین و با اعمال تیمار کلشی سین تولید شده اند.

مواد و روش ها

برای تولید گیاهان تراپلوئید، گیاهان دیپلوئید به روش های خیساندن بذور و تیمار نوک شاخساره تحت تیمارهای مختلف کلشی سین (غلظت های ۰/۵، ۱ و ۲ درصد) قرار گرفته و پس از تشخیص دقیق سطح پلوئیدی با شمارش کروموزومی و فلوسایتومتری، بذور به منظور آزمایش های تکمیلی و تولید بذور در نسل بعدی، جمع آوری شدند. بذور نسل اول حاصل از خودگشتی اجباری گیاهان تراپلوئید و دیپلوئید چهار رقم کشتزار، یلدا، چاه بلند و پاسارگاد تهیه گردید. به منظور انجام عمل تلاقی (مستقیم و معکوس) بین ارقام دیپلوئید و تراپلوئید، شش بوته تراپلوئید و شش بوته دیپلوئید از هر رقم در ردیف هایی مجزا با فاصله ۸۰ سانتی متر بین ردیف ها و فاصله ۵۰ سانتی متر بین بوته ها روی ردیف در گلخانه کشت شدند. پس از این که گل ها آمادگی انجام عمل تلقیح را پیدا کردند، اخته کردن آن ها و گرده افشانی به روش دستی با استفاده از پنس انجام گرفت و پس از انجام تلقیح با استفاده از مقداری پنبه گل های گرده افشانی شده پوشانده شد تا از ورود دانه های گرده خارجی و خشک شدن کلاله جلوگیری شود.

شمارش کروموزومی

پس از گذشت ۱۴ تا ۲۱ روز از جوانه زنی، از ریشه دانه های حاصله از بذور نمونه تهیه شد و به منظور مشاهده و شمارش کروموزوم ها و همچنین بررسی تغییرات کروموزومی در سلول های در حال تقسیم، به ترتیب مراحل ۱ تا ۴ انجام گرفت: ۱- پیش تیمار با

در گیاهان پلی پلوئید معمولاً اندازه بذرها بزرگتر اما تعداد آن ها کمتر است (Dhawan and Lavania, 1996). این تغییرات بذرها در زیره اتو تراپلوئید گزارش شده است. به طوری که میزان تشکیل بذور در گیاهان اتو تراپلوئید در حدود ۷۵ درصد گیاهان دیپلوئید اما وزن ۱۰۰ دانه گیاهان پلی پلوئید ۰/۴ گرم بیشتر از گیاهان دیپلوئید گزارش شد (Dijkstra and Speckman, 1980). همچنین بزرگتر شدن اندازه و وزن بذرها در گیاهان اتو تراپلوئید در ریحان، بادرشیبی، تاتوره و بنگدانه گزارش شده است (Dhawan and Lavania, 1996)؛

نشاها به محل اصلی (گلخانه با بستر خاکی) با فواصل کاشت $40 \times 30 \times 75$ سانتی متر (فاصله کاشت 40 سانتی متر روی ردیف، 75 سانتی متر عرض پشته و 30 سانتی متر عرض جوی) منتقل گردیدند. صفات زیر در گیاهان با سطوح مختلف پلوییدی بررسی شد.

سرعت نمو، درصد و سرعت جوانه زنی بذر و ظهور گیاهچه در فرم های مختلف پلی پلویید ایجاد شده

از زمان کشت بذرها در جعبه کاشت، سرعت نمو مراحل مختلف نونهالی (دوبرگی، چهار برگی و ...)، اندازه گیری شد. در بررسی درصد و سرعت ظهور گیاهچه، گیاهچه هایی که هیپوکوتیل آن ها از خاک خارج گردیدند، ظهور یافته تلقی شدند. سپس درصد و سرعت ظهور گیاهچه با معادله های (۱) و (۲) محاسبه شد (Kaveh et al., 2011). برای اندازه گیری درصد و سرعت جوانه زنی در سه تکرار و در هر تکرار ۱۵ بذر از هر رقم و هر سطح پلوییدی در پتری قرار داده شد (به علت محدودیت در تأمین بذر تراپلویید تعداد تکرارها و بذور هر تکرار محدود در نظر گرفته شد).

$$\text{GP} = 100 \times (a/b) \quad \text{معادله (۱)}$$

GP: درصد جوانه زنی

a: تعداد بذر جوانه زده

b: تعداد کل بذور

$$\text{GR} = (a_{n1}/n_1) + (a_{n2}/n_2) + \dots + (a_{ni}/n_i) \quad \text{معادله (۲)}$$

GR: سرعت جوانه زنی

a_{n1} : تعداد بذر جوانه زده در شمارش اول

n_1 : تعداد روز تا شمارش اول

a_{n2} : تعداد بذر جوانه زده در شمارش دوم

n_2 : تعداد روز تا شمارش دوم

a_{ni} : تعداد بذر جوانه زده در شمارش آخر

n_i : تعداد روز تا شمارش آخر

نشا پذیری

برای محاسبه اثر اتوتراپلوییدی القا شده با کلشیسن بر قدرت نشاکاری چهار رقم بادمجان، درصد موفقیت در انتقال نشا با معادله (۳)، محاسبه گردید (Kaveh et al., 2011):

محلول اشباع شده بروموناتلین $0/5$ درصد به مدت سه ساعت؛ ۲- تثبیت با محلول لویتسکی (ترکیب کرومیوم تری اکسید و فرمالدهید 40 درصد به نسبت $2:3$) به مدت 18 تا 20 ساعت در دمای 4 درجه سلسیوس؛ ۳- هیدرولیز با محلول هیدروکسید سدیم 1 نرمال به مدت 18 تا 20 دقیقه در دمای 60 درجه سلسیوس؛ ۴- رنگ آمیزی با مخلوط هماتو کسلین 4 درصد و سولفات آمونیوم فریک (۱ گرم) به مدت 120 دقیقه.

برای تهیه نمونه میکروسکوپی، ریشه های رنگ آمیزی شده را روی لام گذاشته و قسمت انتهایی نوک ریشه (نوک مریستم ریشه) که به دلیل وجود سلول های در حال تقسیم میتوز، رنگ غلیظ تری به خود گرفته بودند، با استفاده از تیغ اسکالپل برش داده شدند، سپس یک قطره محلول حاوی اسید لاکتیک و اسید استیک 45 درصد برای فیکس شدن نمونه بر روی آن ریخته و لامل به نحوی که نمونه تغییر نکند روی آن گذاشته شد. خروج رنگ اضافی و حباب گیری و پخش سلول های مریستمی در یک سطح با فشار انگشت شصت روی لامل انجام شد. سپس مشاهده نمونه در زیر میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین عکاسی انجام گرفته و از هر نمونه عکس تهیه شده و شمارش کروموزومی از روی تصاویر انجام گرفت.

فلوسایتومتری

جهت اطمینان از وجود سطوح پلوییدی مورد نظر در گیاهان مورد آزمایش، با تشکیل برگ های حقیقی اولین مرحله بررسی کروموزومی به روش فلوسایتومتری انجام گرفت. مرحله دوم فلوسایتومتری در زمان گلدهی ارقام مورد آزمایش انجام گرفت تا از وجود سطح پلوییدی مورد نظر در گیاهان مطمئن شده و از ورود گیاهان شیمیر به جای گیاهان پلی پلویید واقعی در آزمایش جلوگیری شود. فلوسایتومتری با دستگاه فلوسایتومتر مدل BD FACSCalibur انجام شد. برای مقایسه صفات بین سطوح مختلف پلوییدی موجود، بذرها در جعبه کاشت حاوی بستر کوکوپیت-پرلیت به نسبت 1 به 1 کشت شدند و با گذر از دوره نونهالی،

تتراپلوئید)، آزمایشی در زمینه بررسی قابلیت تلاقی فرم‌های تتراپلوئید و فرم‌های دیپلوئید به شکل زیر انجام گرفت. شش بوته از هر والد در هر تکرار در ردیف‌هایی مجزا با فاصله ۸۰ سانتی‌متر بین ردیف‌ها و فاصله ۵۰ سانتی‌متر بین بوته‌ها روی ردیف در گلخانه (خاک لومی-رسی، دمای متوسط شبانه ۱۸ درجه سلسیوس و دمای متوسط روزانه ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰ درصد) در سه تکرار کشت شد. پس از این که گل‌های ارقام والدینی آمادگی انجام عمل لقاح را پیدا کردند، اخته کردن گل‌ها و گرده‌افشانی به روش دستی انجام گرفته و پس از انجام لقاح با استفاده از مقداری پنبه گل‌های گرده‌افشانی شده پوشانده شد، تا از ورود گرده‌های خارجی و خشک شدن کلاله جلوگیری شود. برای آن که بتوان کلیه حالات ممکن (قرار گرفتن هر یک از فرم‌های دیپلوئید و تتراپلوئید به‌عنوان والد پدری و مادری) را سنجید، تلاقی‌ها به‌صورت مستقیم و معکوس انجام شد.

آنالیز داده‌ها

برای آنالیز داده‌های آزمایش نرم‌افزار SAS-JMP (نسخه ۱۱) استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی (اچ-اس-دی)^۱ انجام گرفت.

نتایج و بحث

اثر سطح پلیویدی بر ویژگی اندام‌های زایشی

بررسی خصوصیات بساک و پرچم

بررسی بساک در گل گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید چهار رقم مورد آزمایش نشان داد که به جز مواردی در گل‌های با شکل نامتعارف (تعداد ۲۰ عدد گل بدشکل در کل بوته‌های کشت شده تتراپلوئید یعنی چیزی معادل کمتر از یک گل در هر بوته)، باز شدن بساک‌ها به‌طور طبیعی اتفاق افتاده و آزاد شدن گرده رخ می‌دهد. بررسی پرچم‌ها از نظر پیچیدگی میله پرچم، طول میله پرچم و یا بروز حالت خاص، تغییرات معنی‌داری را بین گیاهان اتوتتراپلوئید و دیپلوئید ارقام مختلف نشان نداد. تنها با افزایش میزان دسته‌جات کروموزومی که با بزرگ شدن قطر گل همراه بود، بر اندازه اندامک‌های گل نیز اثراتی

$$\text{معادله (۳)} \quad \text{STP} = 100 \times (a/b)$$

STP: قابلیت نشاپذیری

a: تعداد گیاهچه‌های استقرار یافته

b: تعداد کل گیاهچه‌های نشاکاری شده

بررسی قابلیت باروری فرم‌های مختلف پلی‌پلوئید

به منظور بررسی قابلیت باروری گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید ارقام مختلف مورد آزمایش، از هر رقم ۲۴ گیاه در سه تکرار (هشت گیاه در هر تکرار) بر روی ردیف‌هایی با طول تقریبی ۳/۵ متر (فاصله کاشت ۴۰ سانتی‌متر روی ردیف، ۷۵ سانتی‌متر عرض پشته و ۳۰ سانتی‌متر عرض جوی) در هر یک از فرم‌های پلیویدی در شرایط مزرعه (خاک لومی-رسی، دمای شبانه متوسط ۱۴ تا ۲۱ درجه سلسیوس و دمای متوسط روزانه ۲۷ درجه سلسیوس)، کشت شدند. کوددهی با کود کامل به فواصل ۲۰ روزه صورت گرفت. عملیات داشت بوته‌ها شامل حذف شاخه‌های جانبی، وجین علف‌های هرز و آبیاری برای همه گیاهان به‌صورت یکسان اعمال شد. با شروع گلدهی، خصوصیات زیر مورد بررسی قرار گرفتند: ۱- شکل گل و وجود فرم‌های غیرطبیعی. ۲- وجود فرم‌های عقیمی در گل؛ به‌عنوان مثال باز نشدن بساک‌ها به‌صورت طبیعی، بلند شدن غیرطبیعی کلاله، بلند شدن غیرطبیعی میله‌های پرچم. ۳- سنجش قابلیت باروری دانه گرده به روش رنگ‌آمیزی با استوکارمن (Ye and Tong, 2010) که در آن دانه‌های گرده بارور رنگ گرفته و دانه‌های گرده نابارور رنگ نمی‌گیرند. ۴- مدت زمان پس از گرده‌افشانی دستی تا تشکیل میوه.

برای بررسی زمان گرده‌افشانی تا تشکیل میوه، تعداد روز بعد از گرده‌افشانی دستی تا لقاح و تشکیل میوه شمارش شد. بدین منظور تاریخ گرده‌افشانی هر گل با اتیکت روی ساقه گل‌دهنده مشخص گردید و به محض تشکیل میوه، تاریخ تشکیل آن نیز بر روی همان اتیکت اضافه شد.

بررسی قابلیت تلاقی گیاهان دارای سطوح

مختلف پلیویدی

به منظور بررسی امکان تولید گیاهان تری‌پلوئید به‌عنوان یک سطح پلیویدی بینابینی (دیپلوئید و

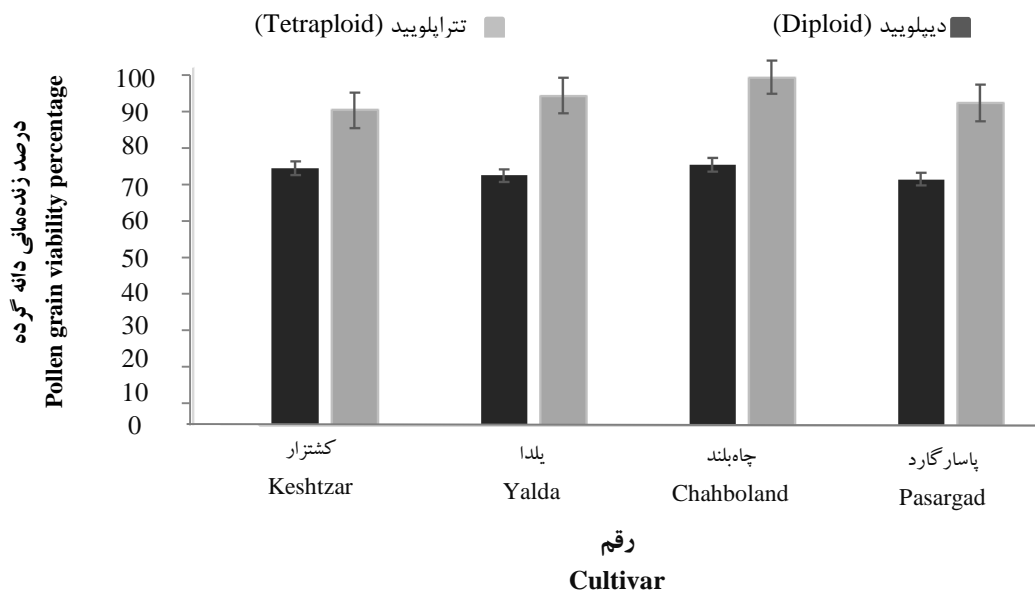
1- Tukey HSD

نسبت به گیاهان دیپلوئید شده است. هر چند تفاوت ایجاد شده در سطح احتمال پنج درصد معنی دار نبود. درصد زنده‌مانی دانه گرده در ارقام مختلف با یکدیگر اختلاف معنی دار نداشتند و سطح پلوئیدی توانست به‌طور معنی‌داری میزان زنده‌مانی دانه گرده را از ۷۲ درصد در $(P \leq 0.05)$ متوسط ارقام دیپلوئید به ۹۰/۷ درصد در متوسط ارقام تتراپلوئید افزایش دهد (شکل ۱). تفاوت رنگ‌گیری دانه‌های گرده در گیاهان دی و تتراپلوئید را نشان می‌دهد. در بخش ب شکل (۲)، دانه‌های گرده رنگ نگرته دیپلوئید وجود دارند اما نمونه تتراپلوئید (بخش الف شکل ۲) اصلاً دانه گرده رنگ نگرته ندارد.

(غیرمعنی‌دار) مشاهده شد. بررسی‌های کیفی انجام شده مشخص نمود که طول میله پرچم به نسبت افزایش اندازه ایجاد شده در گل‌های ارقام مختلف افزایشی نسبی و معنی‌دار $(P \leq 0.05)$ را از خود نشان داد.

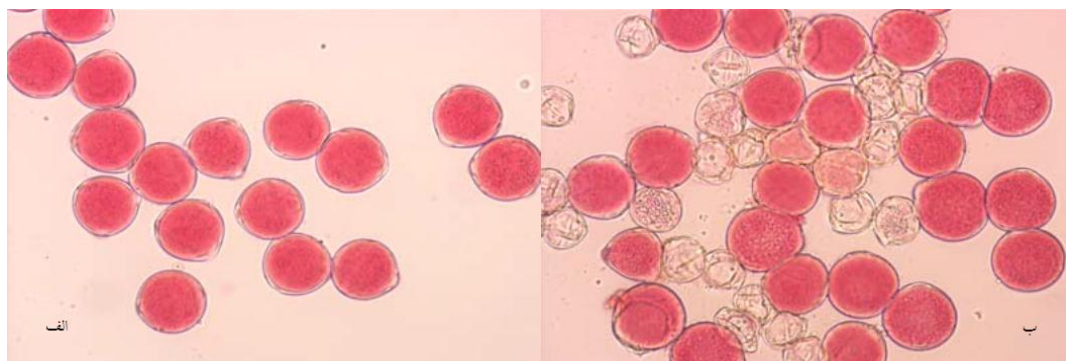
کیفیت دانه گرده

رنگ‌آمیزی دانه‌های گرده به منظور تعیین درصد باروری دانه‌های گرده نشان داد که با افزایش سطح پلوئیدی، قابلیت باروری دانه‌های گرده افزایش معنی‌داری $(P \leq 0.05)$ می‌یابد. بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که تغییرات در تعداد دسته‌جات کروموزومی موجب کاهش ۳ تا ۴/۵ میکرومتری دانه گرده در گیاهان تتراپلوئید



شکل ۱- قابلیت زنده‌مانی دانه گرده در سطوح مختلف پلوئیدی ارقام مختلف

Figure 1. Pollen grain viability in different ploidy levels of different cultivars



شکل ۲- تفاوت رنگ‌گیری دانه‌های گرده الف (دانه گرده گیاهان تتراپلوئید)؛ ب (دانه‌های گرده گیاهان دیپلوئید)

Figure 2. Difference in color density of pollen grains a (tetraploid samples), b (diploid samples)

سطح احتمال پنج درصد معنی دار نبود. بیشترین زمان در بین گیاهان دیپلوئید نیز به طور معنی داری به رقم کشتزار مربوط می شد (شکل ۳). در بین گیاهان تتراپلوئید ارقام مختلف نیز بیشترین زمان لازم از گرده افشانی دستی تا تشکیل میوه مربوط به رقم کشتزار (۲۶/۴۱) بود که اختلاف معنی داری در سطح احتمال پنج درصد نسبت به یلدا (۲۳/۱۷) داشت. بین چاه بلند با ۱۹/۶۶ و پاسارگاد با ۱۸/۲۳ روز زمان تا تشکیل میوه تفاوت معنی داری در سطح احتمال پنج درصد وجود نداشت. اما هر دو این ارقام با یلدا دارای تفاوت معنی دار در سطح احتمال پنج درصد بودند (شکل ۲). در پژوهشی به بررسی قابلیت باروری دانه گرده هیبریدهای *Solanum melongena* L. و *Solanum aethiopicum* L. به روش گرده افشانی دستی اقدام شد. نتایج به دست آمده آن‌ها نشان داد که در تلاقی‌های خودگشنی هر یک از والدین تشکیل میوه صددرصد بوده است. در گیاهان آمفی پلوئید حاصل از تلاقی *S. melongena* × *S. aethiopicum* یا تلاقی معکوس آن، از ۱۰۸ گل تلقیح شده، ۷/۴ درصد گل‌ها میوه تشکیل دادند. محققین بیان داشتند افزایش سطح پلوئیدی و اثرات سیتوپلاسمی در بهبود تشکیل میوه و قدرت باروری دانه گرده اثرات مثبتی ایجاد می کند (Isshiki and Taura, 2003). در پژوهش دیگری نشان داده شد که افزایش دسته‌جات کروموزومی در سیب باعث افزایش قابلیت باروری دانه‌های گرده شده و خود ناسازگاری را کاهش داده است (Adachi et al., 2009).

بررسی قابلیت تلاقی فرم‌های مختلف پلوئیدی

تلاقی دستی بین گیاهان کشت شده از فرم‌های مختلف پلوئیدی در ارقام مختلف انجام گرفت. اگرچه تلاقی‌های انجام شده در بین ارقام دیپلوئید با یکدیگر و ارقام تتراپلوئید با یکدیگر موفقیت آمیز بوده و تعدادی میوه تشکیل شد اما هیچ یک از تلاقی‌های انجام شده بین دو فرم دیپلوئید و تتراپلوئید موفقیت آمیز نبوده و میوه‌ای تشکیل نگردید. بررسی نتایج گزارش‌های سایر پژوهشگران هیچ نتیجه‌ای مبنی بر عدم قابلیت تلاقی بین

نتایج نشان داد که رابطه مستقیمی بین افزایش سطح پلوئیدی از دیپلوئید به تتراپلوئید با افزایش درصد زنده‌مانی دانه‌های گرده وجود دارد. قدرت باروری، شکل، اندازه، میزان رنگ‌پذیری و درصد دانه‌های گرده تحت تأثیر سطوح پلوئیدی قرار می‌گیرد. دانه‌های گرده گیاهان اتوتتراپلوئید زیره (*Carum carvi* L.) سه زاویه می‌باشند (در حالی که دانه‌های گرده گیاهان دیپلوئید زیره کشیده و مستطیلی هستند) و نسبت به دانه‌های گرده انواع دیپلوئید بزرگتر بوده و قدرت رنگ‌پذیری بیشتری دارند (Dijkstra and Speckman, 1980). نتایج آزمایش حاضر نشان داد که شکل دانه‌های گرده گیاهان تتراپلوئید بادمجان، بر خلاف نتایج سایر محققان (که در مورد گیاهان مختلف منتشر شده است و بیشتر بدان اشاره شد) تحت تأثیر تتراپلوئیدی تغییر نکرده است. هرچند قدرت رنگ‌پذیری دانه‌های گرده تتراپلوئید بادمجان، همانگونه که در تحقیقات منتشر شده از سایر گیاهان گزارش شده، افزایش داشته است. به عنوان مثال در گیاه شقایق، دانه‌های گرده اتوتتراپلوئید قدرت رنگ‌پذیری بیشتری (۱۰۰ درصد) نسبت به انواع دیپلوئید (۵۰ درصد) داشتند و از قدرت باروری نسبتاً بالایی برخوردار بودند. باروری و قدرت جوانه‌زنی دانه‌های گرده گیاهان اتوتتراپلوئید زنجبیل نیز بیشتر از انواع دیپلوئید گزارش شد (Blakeslee and Avery, 1937; Milo et al., 1987).

زمان گرده افشانی تا تشکیل میوه

آنالیز نتایج برای زمان از گرده افشانی دستی تا تشکیل میوه نشان داد که بین ارقام مختلف و سطوح مختلف پلوئیدی تفاوت معنی داری در سطح احتمال پنج درصد وجود دارد. اتوتتراپلوئیدی القاشده به طور میانگین مدت زمان تشکیل میوه را در گل‌های گرده افشانی شده ۹/۳۹ روز افزایش داد. کمترین زمان از گرده افشانی تا تشکیل میوه مربوط به گیاه دیپلوئید رقم پاسارگاد با ۸/۶۸ روز زمان بود که اختلاف معنی داری نسبت به دیپلوئید چاه بلند با ۱۱/۸۵ روز زمان در سطح احتمال پنج درصد داشت. تفاوت بین گیاهان دیپلوئید یلدا با ۱۲/۸۹ و چاه بلند در

به طور معنی داری نسبت به دیپلوئید کاهش نشان داد که نتایج به دست آمده در این تحقیق و نتایج سایرین در کند شدن نمو در گیاهان تتراپلوئید می تواند با اختلال ایجاد شده توسط مواد ضد میتوزی در فرآیندهای فیزیولوژیکی سلول مرتبط باشد که این امر خود سرعت تقسیم سلولی و در نتیجه سرعت رشد و نمو گیاه را در مراحل اولیه کاهش می دهد (Rey et al., 2002). در تحقیق دیگری مشخص شد که بذرهاى گیاهان اتوتتراپلوئید (*Dactylis glomerata*) دارای سرعت و درصد جوانه زنی بالاتری نسبت به بذرهاى گیاهان دیپلوئید هستند (Bretagnolle et al., 1995). در مورد درصد ظهور گیاهچه تفاوت بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید شدیداً تحت تأثیر ژنوتیپ قرار داشت. سرعت ظهور گیاهچه نیز به طور معنی داری در انواع تتراپلوئید یلدا و پاسارگاد به نسبت گیاهان دیپلوئید همان رقم و به طور معنی داری در سطح احتمال پنج درصد کمتر بود. تفاوت معنی داری در سطح احتمال پنج درصد بین گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید کشتزار و چاه بلند در این صفت مشاهده نشد (جدول ۱).

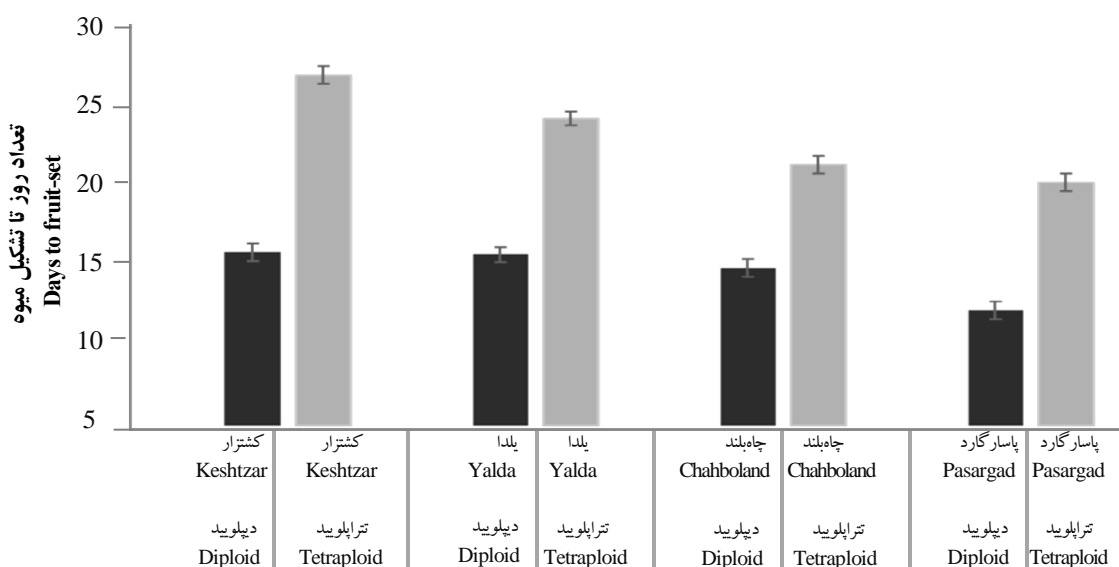
فرم های دیپلوئید و تتراپلوئید القاشده یک گیاه یافت نشد. تنها در یکی از تلاقی های انجام شده در آزمایش دیرکز و همکاران، هیچ میوه ای بین تلاقی دو لاین با سطوح مختلف پلوئیدی از چهار لاین بادمجان مورد استفاده، ایجاد نشد (Dirks et al., 2010). با وجود انجام تلاقی ها در ساعات مناسب روز و تشکیل میوه در تلاقی های درون پلوئیدی، عامل عدم موفقیت تلاقی ها ناشناخته ماند.

اثر سطح پلوئیدی بر جوانه زنی بذر و قابلیت رشد گیاهچه

بررسی خصوصیات بذر و گیاهچه

بررسی درصد و سرعت جوانه زنی و درصد و سرعت ظهور گیاهچه برای گیاهان دی و تتراپلوئید چهار رقم کشتزار، یلدا، چاه بلند و پاسارگاد نشان داد که القای اتوتتراپلوئیدی به طور معنی داری در سطح احتمال پنج درصد می تواند در صفات مورد بررسی تغییر ایجاد نماید. درصد جوانه زنی در کلیه گیاهان تتراپلوئید نسبت به انواع دیپلوئید افزایش داشت. هر چند در مواردی مانند چاه بلند و پاسارگاد این افزایش در سطح احتمال پنج درصد معنی دار نبود (جدول ۱).

سرعت جوانه زنی در همه ارقام در گیاهان تتراپلوئید



رقم / سطح پلوئیدی
Cultivar/ ploidy level

شکل ۳- تعداد روز تا تشکیل میوه پس از گرده افشانی دستی در سطوح مختلف پلوئیدی ارقام مختلف بادمجان
Figure 3. Days to fruit-set after hand pollination in different ploidy levels of different eggplant cultivars
جدول ۱- اثر سطوح پلوئیدی بر ویژگی های جوانه زنی و ظهور گیاهچه ارقام مختلف بادمجان

Table 1. Effect of ploidy levels on germination and seedling emergence of different eggplant cultivars

سرعت ظهور گیاهچه (تعداد در روز) Emergence rate (number per day)	درصد ظهور گیاهچه Emergence %	سرعت جوانه زنی (تعداد در روز) Germination Rate (number per day)	درصد جوانه زنی Germination %	رقم / سطح پلوئیدی Cultivar/ Ploidy level
2.21 ^{abc}	76.4 ^c	3.61 ^{ab}	89.2 ^c	دیپلوئید Diploid کشتزار
1.64 ^{cd}	80.44 ^{ab}	1.89 ^c	91.3 ^{ab}	تتراپلوئید Tetraploid Keshztzar
2.78 ^a	80.5 ^{ab}	3.89 ^a	90.11 ^{bc}	دیپلوئید Diploid یلدا
1.75 ^{cd}	79.93 ^{ab}	2.07 ^c	92.8 ^a	تتراپلوئید Tetraploid Yalda
2.45 ^{ab}	81.2 ^a	3.46 ^{ab}	88.93 ^c	دیپلوئید Diploid چاه بلند
1.98 ^{bc}	79.66 ^b	2.11 ^c	90.07 ^{bc}	تتراپلوئید Tetraploid Chahboland
2.30 ^{ab}	77.8 ^c	3.25 ^b	89.33 ^c	دیپلوئید Diploid پاسارگاد
1.14 ^d	80.15 ^{ab}	1.94 ^c	90.22 ^{bc}	تتراپلوئید Tetraploid Pasargad

میانگین های با حروف یکسان در ستون فاقد اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد می باشند.

Means with same letter in each column, have no significant difference at 5% probability level.

نشا پذیری

القای اتوتتراپلوئیدی باعث افزایش درصد نشا پذیری شد، هر چند اثر اتوتتراپلوئیدی در سطح احتمال پنج درصد به جز در رقم یلدا اختلاف معنی داری بین گیاهان اتوتتراپلوئید و دیپلوئید ایجاد نکرد. در بین ارقام مختلف مورد بررسی نیز تفاوت هایی در قابلیت نشا پذیری برخی ارقام مشاهده شد. گیاهان اتوتتراپلوئید یلدا و چاه بلند بیشترین میزان قابلیت نشا پذیری را به ترتیب با ۸۶/۲۳ و ۸۵/۰۱ درصد داشتند (شکل ۴).

نشا پذیری، صفتی است که بشدت به شرایط محیطی وابسته است. احتمالاً تتراپلوئیدی با کاهش سرعت نمو، مدت زمان کافی در اختیار گیاه برای توسعه ریشه ایجاد نموده و قابلیت نشا پذیری گیاه را بالاتر برده است. همچنانکه در بخش های قبلی ذکر شد، یکی از اثرات

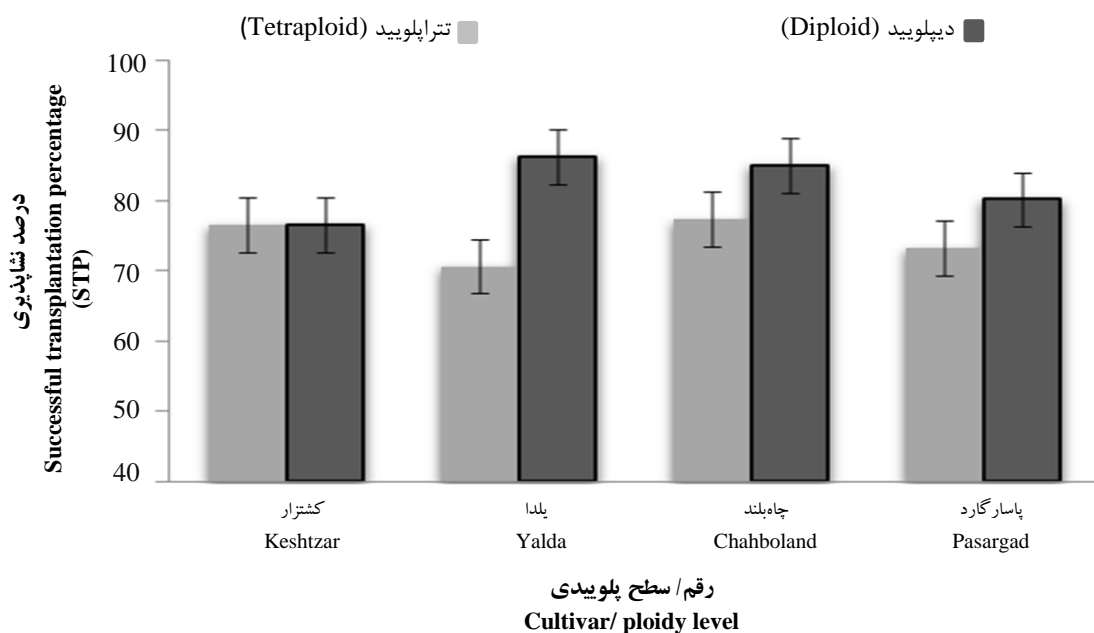
تتراپلوئیدی بهبود قابلیت های رشدی گیاه می باشد (Zhang and Hao, 2010). بر همین اساس می توان گفت گیاهان تتراپلوئید قدرت نشا پذیری بالاتری از خود نشان داده اند.

سرعت نمو مراحل دانهای

تغییرات در نمو دوران نونهال در شکل های (۵) و (۶) به ترتیب برای گیاهان دیپلوئید و اتوتتراپلوئید مشخص شده است. تفاوت بین ارقام در هر یک از سطوح پلوئیدی فاقد اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد بود. اما تفاوت بین سطوح پلوئیدی در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود و نمو گیاهان اتوتتراپلوئید کندتر از گیاهان دیپلوئید بود. نتایج به دست آمده در این تحقیق و نتایج سایرین در کند شدن نمو در گیاهان تتراپلوئید می تواند با اختلال ایجاد شده توسط

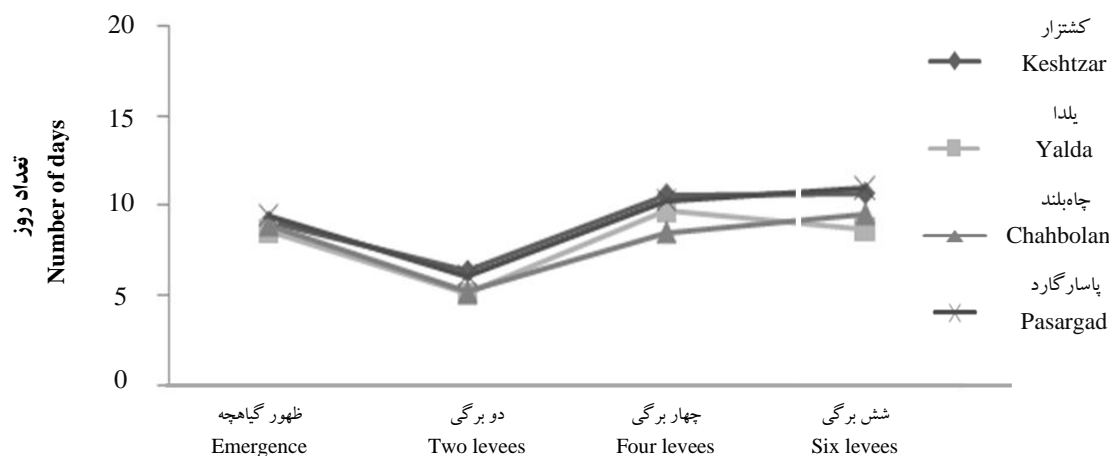
پلی پلوئیدی در گیاهان، کاهش تعداد تقسیمات سلولی در طی مراحل اولیه رشد و نمو است. به همین علت گیاهان تتراپلوئید سرعت رشد کمتری از انواع دیپلوئید دارند (Rauf *et al.*, 2006; Gonzalez and Weather, 2003). کاهش رشد پلی پلوئیدها پس از تیمار به دلیل کاهش و کم شدن تقسیم سلولی است که در نتیجه ایجاد اختلال در محتوی اکسین در سلول هاست. در این راستا میزان تنفس و فعالیت تعداد زیادی از آنزیمها کاهش می یابد (Stebbins, 1984).

مواد ضد میتوزی در فرآیندهای فیزیولوژیکی سلول مرتبط باشد. این امر خود سرعت تقسیم سلولی و در نتیجه سرعت رشد و نمو گیاه را در مراحل اولیه کاهش می دهد (Rey *et al.*, 2002). این تغییر در سرعت رشد و نمو همچنین می تواند به کاهش تعداد تقسیمات سلولی در طی مراحل مختلف رشد و نمو مربوط باشد. به همین علت گیاهان تتراپلوئید سرعت رشد کمتری از انواع دیپلوئید دارند (Gonzalez and Weather, 2003; Rauf *et al.*, 2006). در حقیقت یک نتیجه معمول



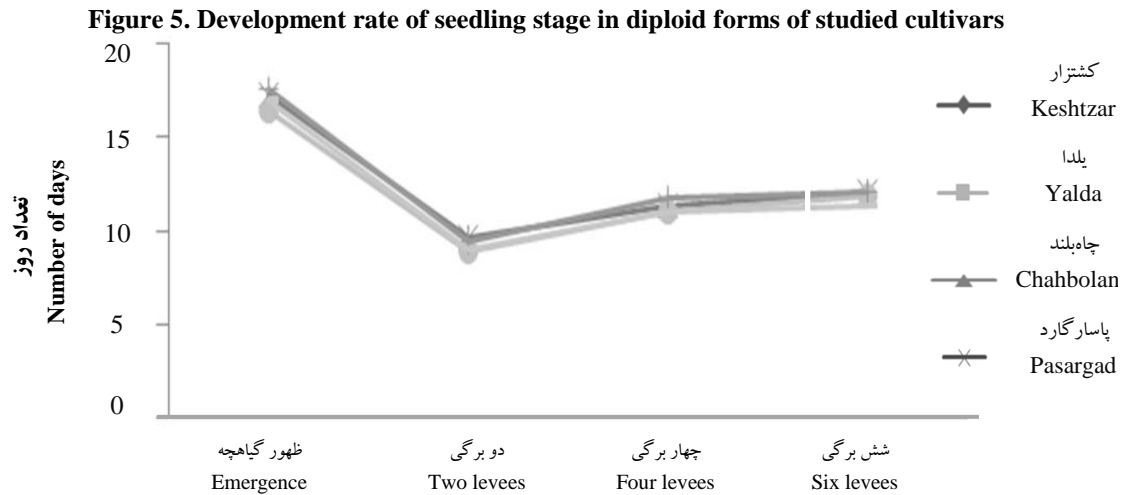
شکل ۴- قابلیت نشاء پذیری گیاهچه های تتراپلوئید و دیپلوئید ارقام مختلف بادمجان

Figure 4. Successful transplantation percentage in di and tetraploid seedlings of different eggplant cultivars



مراحل نمو گیاهچه بر اساس تعداد روز پس از کاشت بذر
Development stages of plantlet on DAP basis

شکل ۵- سرعت نمو در دوران نونهالی گیاهان دیپلوئید ارقام مختلف مورد بررسی



مراحل نمو گیاهچه بر اساس تعداد روز پس از کاشت بذر
Development stages of plantlet on DAP basis

شکل ۶- سرعت نمو در دوران نونهالی گیاهان تتراپلوئید ارقام مختلف مورد بررسی

Figure 6. Development rate of seedling stage in tetraploid forms of studied cultivars

در ایجاد تغییرات ژنتیکی و تهیه گیاهان مادری با صفات مطلوب برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی مورد توجه قرار گیرد.

سپاس‌گزاری

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربت حیدریه برای حمایت مادی و معنوی این طرح پژوهشی تشکر و قدردانی می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با بررسی کلی نتایج می‌توان گفت که علی‌رغم سرعت پایین‌تر نمو در گیاهان تتراپلوئید، به دلیل بهبود جوانه‌زنی و ظهور گیاهچه، افزایش قابلیت زنده‌مانی و باروری دانه‌گرده و نشاپذیری بالاتر در این دسته از گیاهان مورد آزمایش، افزایش القایی در تعداد دسته‌جات کروموزومی می‌تواند به‌عنوان روشی مطلوب

References

- Adachi, Y., Komori, S., Hoshikawa, Y., Tanaka, N., Abe, K., Bessho, H., Watanabe, M. and Suzuki, A. (2009). Characteristics of fruiting and pollen tube growth of apple autotetraploid cultivars showing self-compatibility. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 78(4), 402-409.
- Aversano, R., Caruso, I., Aronne, G., De Micco, V., Scognamiglio, N. and Carputo, D. (2013). Stochastic changes affect *Solanum* wild species following autopolyploidization. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 625-635.

- Blakeslee A. F. and Avery, A. G. (1937). Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. *Journal of Heredity*, 28(12), 393-411.
- Bretagnolle, F., Thompson, J. D. and Lumaret, R. (1995). The influence of seed size variation on seed germination and seedling vigour in diploid and tetraploid *Dactylis glomerata* L. *Annals of Botany*, 76(6), 607-615.
- Dhawan, O. P. and Lavania, U. C. (1996). Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: A review. *Euphytica*, 87(2), 81-89.
- Dijkstra, H. and Speckman G. I. (1980). Autotetraploidy in Caraway (*Carum carvi* L.) for the increase of the aetheric oil content of seed. *Euphytica*, 29(1), 89-96.
- Dirks, R., Petrus Adrianus Roeland Voermans, W., Oosterwijk, S. A. M., Henrikus Jacobus Van, D. E. J., Pieter, J. and Haanstra, W. (2010). Google Patent: Seedless triploid eggplant EP 2247177 A. Retrieved from <http://www.google.com/patents/EP2247177A1?cl=en> (Access may 2017).
- Gonzalez, L. D. J. and Weathers, P. J. (2003) Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. *Plant Cell Reports*, 21(8), 809-813.
- Isshiki, S. and Taura, T. (2003). Fertility restoration of hybrids between *Solanum melongena* L. and *S. aethiopicum* L. Gilo Group by chromosome doubling and cytoplasmic effect on pollen fertility. *Euphytica*, 134(2), 195-201.
- Kaveh, H., Vatandoost Jartoodeh, S., Aruee, H. and Mazhabi, M. (2011). Would trichoderma affect seed germination and seedling quality of two muskmelon cultivars, Khatooni and Qasri and increase their transplanting success?. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 5(15), 169-175.
- Kondorosi, E., Roudier, F. and Gendreau, E. (2000). Plant cell-size control: Growing by ploidy?. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(6), 488-492.
- Lavania, U. C. (2005). Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 3(2), 170-177.
- Levin, S. A. (1983). Coevolution. In *Population biology* (pp. 328-334). Berlin Heidelberg: Springer.
- Medina, D. M., da Cruz, N. D., Longo, C. R. L., Conagin, C. H. T. M. and Azzini, L. E. (1972). Poliploidização em berinjela (*Solanum melongena* L.): II - Observacoes em plantas resultantes de tratamentos com colquicina. *Bragantia*, Campinas, 31(24), 289-310.
- Milo, J., Levy, A., Palevitch, D. and Ladizinsky, G. (1987). Thebaine content and yield in induced tetraploid and triploid plants of *Papaver bracteatum* Lindl. *Euphytica*, 36(2), 361-367.
- Omidbaigi, R., Mirzaee, M., Hassani, M. E. and Sedghi Moghadam, M. (2010a). Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. *International Journal of Plant Production*, 4(2), 87-98.

- Omidbaigi, R., Yavari, S., Hassani, M. E. and Yavari, S. (2010b). Induction of autotetraploidy in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatment. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 18(1), 23-35.
- Rauf, S., Ahmad Khan, I. and Ahmad Khan, F. (2006). Colchicine-induced tetraploidy and changes in allele frequencies in colchicine-treated populations of diploids assessed with RAPD markers in *Gossypium arboretum* L. *Turkish Journal of Biology*, 30, 93-100.
- Rey, H. Y., Sansberro, P. A., Collavino, M. M., Davina, J. R., Gonzalez, A. M. and Mroginski, L. A. (2002). Colchicine, trifluralin, and oryzalin promoted development of somatic embryos in *Ilex paraguariensis*. *Euphytica*, 123(1), 49-56.
- Shao, J. and Chen, C. (2003). In vitro induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75(3), 241-246.
- Stebbins, G. L. (1984). Polyploidy and the distribution of the arctic-alpine flora: New evidence and a new approach. *Botanica Helvetica*, 94(1), 1-13.
- Ye, Y. M. and Tong, J. (2010). Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). *Scientia Horticulturae*, 124(1), 95-101.
- Zhang, W. and Hao, H. (2010). Tetraploid muskmelon alters morphological characteristics and improves fruit quality. *Scientia Horticulturae*, 125(3), 396-400.

Effect of Different Ploidy Levels on Pollen Grain Fertility, Seed Germination and Seedling Transplanting Ability of Eggplant

H. Kaveh^{1*} and H. Neamati²

- 1- ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Production, Faculty of Agriculture, University of Torbat Heydarieh, Torbat Heydarieh, Iran (h.kaveh@torbath.ac.ir)
- 2- Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 31 May, 2016

Accepted: 11 October, 2017

Abstract

Background and Objectives

Eggplant (*Solanum melongena* L.) is an economically important crop with a wide range of fruit shapes and colors. Breeding programs in eggplant focus mainly on fruit quality. Production of commercial triploid cultivars and emission of seeds in fruits may increase acceptability by consumer and increase fruit quality. Induced tetraploidy and cross between di and tetraploid parental line is a conventional method used in different fruits and vegetables like watermelon. The current study aim to find how may induced tetraploidy affect pollen grain quality, its fertility, seed and transplant vigor in different eggplant cultivars.

Materials and Methods

Aiming to investigate autotetraploidy in four cultivars of *Solanum melongena* L., Keshtzar, Yalda, Chahboland and Passargad on fertility, number of days till fruit-set, germination rate and percentage and successful transplanting percentage, a survey was done in a completely randomized design. Tetraploid plants were derived from seed maceration/shoot tip treatment (0.5, 1 and 2 percent of colchicine). To ensure ploidy level, chromosome counting of root tips and flow-cytometry was done during the experiment. To quantify germination percentage and rate, 15 seeds of each cultivar in each ploidy level were placed in petri-dishes in three replications. The seeds of each ploidy form were sown in seedling trays and after seedling period, plugs were transplanted in field for evaluation of characteristics in different ploidy levels. Growth and development rate of plant in seedling stage observed since seeds were cultivated. As soon as hypocotyl appeared on the surface, they were counted. Then seedling emergence and rate were calculated. To test viability of pollen grains, they were stained using acetocarmen. In order to find best parental lines, 18 plants from each cultivar and in each ploidy level were cultivated in the greenhouse condition in three replications. Then all plants were crossed competley (direct and reciprocal). Di and tetraploid plants were tested to find out which one would be better as which parent.

Results

Number of days till fruit-set, characteristics of seed and seedling and growth rate in seedling stage were significantly ($P \leq 5\%$) influenced by changes on levels of ploidy. Pollen grain staining with acetocarmine for evaluation of fertility percentage in pollen grains showed that with an increase in ploidy level, fertility may significantly increase ($P \leq 5\%$). In an effort to triploid plant production, none of the crosses between di and tetraploid plant could bear fruit.

Discussion

With the overall results, despite slower growth, can be tetraploid plant, due to improved germination and seedling emergence, survival and reproductive capabilities, higher transplanting success in this category of plants, induced increase in the number of chromosomal bundles can be considered as a good way to create genetic variation and prepare parental lines with desirable traits for use in the breeding programs.

Keywords: *Development rare, Colchicine, Tetraploidy*