آنالیز کاریوتیپ دو ژنوتیپ گل زرد و نارنجی همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.)

سکینه علوی پور*[۱]، مهرانگیز چهرازی[۲] و اسماعیل خالقی[۲]

[۱]- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز [۲]- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز

* نویسنده مسئول: alavi.horticulture@gmail.com

چکیده

توجه و بررسی تنوع گیاهی موجود در بین گونه‌های مختلف گیاهی در جهت دسترسی به اهداف اصلاحی و به‌نژادی امری ضروری می‌باشد. بنابراین جهت بررسی کاریوتیپ و ویژگی‌های مورفولوژیکی کروموزوم دو ژنوتیپ گل زرد و نارنجی همیشه بهار، بذرها پس از جمع‌آوری، ریشه‌دار شدند. به منظور تهیه گستره متافازی مناسب، از محلول پیش‌تیمار آلفابرومونفتالین ۲٪ به مدت ۲/۵ ساعت استفاده شد. سپس نمونه‌ها در محلول فارمر تثبیت و رنگ‌آمیزی ریشه‌ها با استفاده از محلول استوکارمین ۲٪ انجام شد. نتایج مطالعات کروموزومی نشان داد که هر دو ژنوتیپ مورد بررسی دیپلوئید و دارای تعداد کروموزوم ۲n=۲۸ می‌باشند. ژنوتیپ گل زرد با فرمول کاریوتیپی ۳m +۱۰ sm+۱st و ژنوتیپ گل نارنجی با فرمول کاریوتیپی ۸m +۴ sm+۲st تشخیص داده شدند. در مطالعه ویژگی‌های کاریوتیپی هر دو ژنوتیپ مشخص شد که ژنوتیپ گل زرد دارای طول کروموزوم کمتری نسبت به ژنوتیپ گل نارنجی می‌باشد. همچنین بین دو ژنوتیپ از لحاظ طول بازوی کوتاه و بلند و محل قرارگیری سانترومر اختلاف معنی داری وجود داشت.

کلمات کلیدی: همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)، کاریوتیپ، تعداد کروموزوم، گستره متافازی

مقدمه

توجه به ذخایر ژنتیکی در زمینه اصلاح گیاهان بسیار مهم است که اولین قدم در این زمینه مطالعه و بررسی تنوع ژنتیکی موجود و القاء تنوع در گونه‌های مختلف است. همچنین بررسی رفتار کروموزوم‌های بدست آمده جهت اطلاع از میزان تغییرات کروموزومی و سطوح پلوئیدی بسیار حائز اهمیت است (رجبی و همکاران، ۱۳۷۵). گل همیشه‌بهار با نام علمی *Calendula officinalis* L، گیاهی یکساله، متعلق به خانواده Asteraceae و بومی مناطق مدیترانه‌ای است (Warren, 1997). این گیاه علاوه بر استفاده زینتی به صورت گل بریدنی و حاشیه‌ای و به علت دارا بودن بودن کالندیک اسید بسیار بالا به عنوان گیاهی دارویی بسیار مهم نیز شناخته‌شده‌است (Joly et al., 2013). گل همیشه‌بهار گیاهی ژینومونوشز و دگرگشن است که بوسیله حشرات بویژه زنبور دگرگرده‌افشانی می‌شود (Ao, 2007) و به همین دلیل موجب تنوع زیاد کروموزوم و افزایش ویژگی‌های سیتوژنتیکی همیشه‌بهار از جمله تعداد کروموزوم‌ها و خصوصیات مورفولوژیکی کروموزوم‌ها شده است (Nura et al., 2013). به طور کلی، برخی از محققان جنس همیشه‌بهار را یکی از پیچیده‌ترین جنس‌های تاکسونومی گیاهی معرفی کرده‌اند که مهمترین دلیل آن سطح بالای هیبریداسیون بین‌گونه‌ای بیان شده است. تاکنون مطالعات تعداد کروموزوم پایه جنس کالندولا به علت هیبریداسیون و بک‌کراس-های بسیار، متفاوت گزارش شده است. جاناکا آمال و همکاران (۱۹۶۱) تعداد کروموزوم پایه گیاهان کالندولا آفیسینالیس رشد یافته در منطقه جاما را ۲n=۳۲ ارزیابی کردند. در مطالعه‌ای دیگر توسط کار و همکاران (۱۹۹۹) مشخص شد که تعداد کروموزوم در حداقل پنج گونه از جنس کالندولا از جمله آفیسینالیس ۲n=۲۸ بود. این در حالی می‌باشد که دالگارد (۱۹۸۶) در نتیجه مطالعه تعداد کروموزوم جنس کالندولا، ۱۴، ۱۸، ۳۰، ۳۲، ۴۴ و ۸۵ کروموزوم را در گیاهان دیپلوئید گزارش دادند. این در حالی است که با توجه به تنوع موجود در این گونه تاکنون مطالعات سیتوژنتیکی و مورفولوژیکی کروموزم گل همیشه‌بهار موجود در ایران

انجام نشده است و از طرفی با توجه به اهمیت زینتی و دارویی و جهت انجام برنامه‌های اصلاحی این گیاه، مطالعه کاریوتیپ کروموزوم دو ژنوتیپ گل زرد و نارنجی همیشه‌بهار ضروری به نظر رسید.

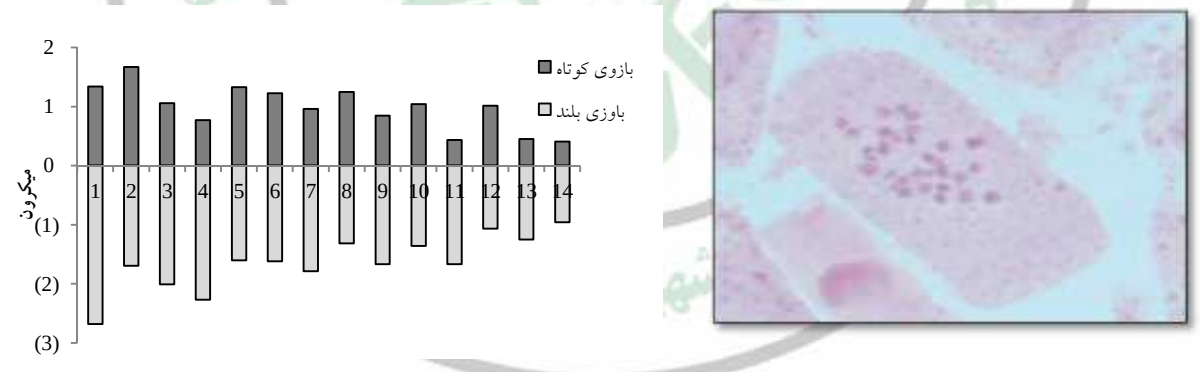
مواد و روش‌ها

این مطالعه به منظور ارزیابی ویژگی‌های مورفولوژیکی کروموزوم دو ژنوتیپ گل زرد و نارنجی همیشه‌بهار رشد یافته در ایران (استان خوزستان) اجرا شد. جهت تهیه گستره کروموزومی از نوک ریشه‌های رشد یافته در مرحله متافاز تقسیم میتوز به روش اسکواش استفاده شد. به منظور پیش‌تیمار ریشه‌ها از محلول آلفا برومونفتالین ۲٪ به مدت ۲/۵ ساعت و جهت تثبیت نمونه‌ها از محلول فارمر (اسید استیک و اتانول خالص به نسبت ۱ به ۳) به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد. سپس نمونه‌های ریشه در اسیدکلریدریک یک نرمال به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد هیدرولیز شدند. در نهایت جهت رنگ‌آمیزی نمونه‌ها از محلول استوکارمین ۲٪ به مدت ۲۰ ساعت در دمای آزمایشگاه استفاده شد. بررسی نمونه‌ها، مشاهده و شمارش کروموزوم‌ها در ۱۰ گستره کروموزومی با استفاده از میکروسکوپ نوری "Olympus U-DA" (با بزرگنمایی ×۲۲۰) و دوربین عکاسی دیجیتالی "DPI2" متصل به آن انجام شد. در نهایت براساس پیشنهاد Levan و همکاران (۱۹۶۴)، ویژگی‌های مختلف کروموزوم مورد مطالعه قرار گرفت.

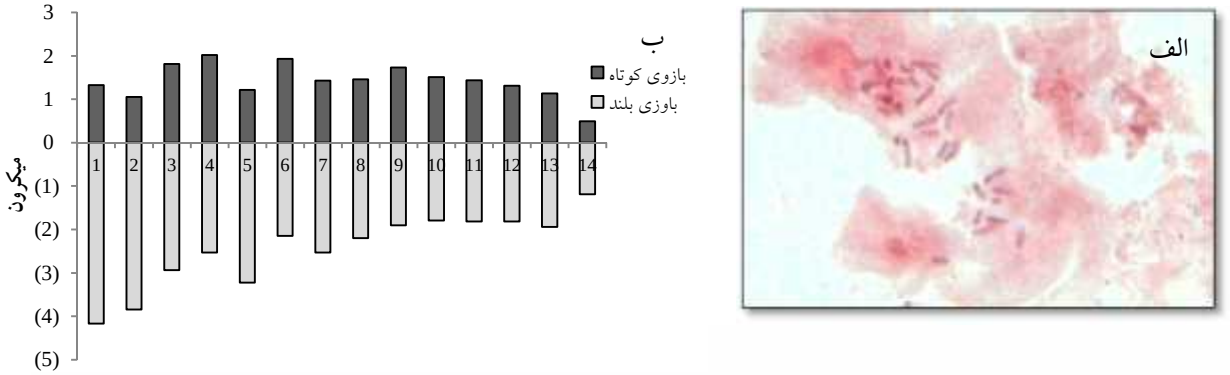
نتایج و بحث

یکی از مطمئن‌ترین روش‌های سیتوژنتیک به منظور تعیین تعداد کروموزوم هسته سلول، شمارش کروموزوم می‌باشد. در این روش از سلول‌های مرحله متافازی نوک ریشه استفاده شد. نتایج گستره کروموزومی دو ژنوتیپ گل زرد و نارنجی همیشه‌بهار نشان داد که هر دو ژنوتیپ مورد بررسی دیپلوئید و با تعداد کروموزوم ۲n=2x=۲۸ می‌باشند (شکل ۱ و۲).

الف



شکل ۱- تصویر گستره کروموزومی (الف) و ایدیوگرام (ب) ژنوتیپ گل زرد همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.)



شکل ۲- تصویر گستره کروموزومی (الف) و ایدیوگرام (ب) ژنوتیپ گل نارنجی همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.)

جدول۱- برخی از ویژگی‌های کاریوتیپ دو ژنوتیپ گل زرد و نارنجی همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.)

ژنوتیپ	تعداد کروموزوم	فرمول کاریوتیپی	سطح پلوئیدی
گل زرد	۱۴	۳m +۱۰ sm+۱st	دیپلوئید
گل نارنجی	۱۴	۸m +۴ sm+۲st	دیپلوئید

m= متاسنتریک، sm= ساب متاسنتریک و st= ساب تلوسنتریک

اگرچه تعداد کروموزوم گونه‌های کالندولا آفیسینالیس جمع‌آوری شده از مناطق مدیترانه‌ای ۲n=۳۲ اعلام شد (Nora et al., 2013)، اما در بررسی کاریوتیپ کروموزوم‌های این پژوهش مشخص شد که تعداد کروموزوم گیاهان دو ژنوتیپ گل زرد و نارنجی جمع آوری شده از سطح استان خوزستان (ایران) ۲۸ عدد می‌باشد، که این مورد تاکنون در ایران گزارش نشده است. به طور کلی، تعداد و ویژگی‌های کروموزوم‌ها به عنوان اساس فرضیه تنوع در ارزیابی این جنس می‌باشد و به عنوان ابزار بسیار مهمی در شناسایی چندین گونه مشابه از نظر آناتومیکی و مورفولوژیکی به شمار می‌رود.

در بررسی کاریوتیپ هر دو ژنوتیپ مشخص شد که از نظر شکل، اندازه و فرمول کاریوتیپی کروموزوم تفاوت‌هایی وجود داشت. در کاریوتیپ ژنوتیپ گل زرد، سه جفت کروموزوم متاسنتریک، ده جفت کروموزوم ساب متاسنتریک و یک کروموزوم تلوسنتریک مشاهده گردید و طول کروموزوم ژنوتیپ گل زرد از ۴/۰۲ میکرون در کروموزوم ۱ تا ۱/۳۷ میکرون در کروموزوم ۱۴ متغیر بود.

در کاریوتیپ ژنوتیپ گل نارنجی، هشت جفت کروموزوم متاسنتریک، چهار جفت کروموزوم ساب متاسنتریک و دو جفت کروموزوم ساب تلوسنتریک مشاهده شد و طول کروموزوم ژنوتیپ گل نارنجی از ۵/۴۹ میکرون در کروموزوم ۱ تا ۱/۶۸ میکرون در کروموزوم ۱۴ متغیر بود. در مقایسه بین ویژگی‌های کاریوتیپ ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌توان به این نکته اشاره داشت که اگرچه ژنوتیپ گل زرد دارای طول کروموزوم کوچک‌تر و ساختار متفاوتی نسبت به ژنوتیپ گل نارنجی بود ولی تعداد کروموزوم و سطح پلوئیدی هر دو ژنوتیپ مشابه می‌باشد. چهرازی و همکاران (۱۳۹۱) اظهار داشتند که سطوح پلوئیدی و مطالعات سیتوژنتیکی مثل اندازه و شکل کروموزوم‌ها می‌تواند در تلاقی های بین و درون‌گونه‌ای کاربرد داشته باشد و در تغییر دیپلوئیدها به سطوح بالاتر احتمال امکان آن را فراهم کند.

منابع

۱. چهرازی، م.، نادری، ر.، شاه‌نجات بوشهری، ع. ا.، حسنی، م ا. و ظریفی، ع. ۱۳۹۱. بررسی کاریوتایپ و سطوح پلوئیدی برخی از ژنوتیپ های گل نرگس بومی و غیر بومی ایران. تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی) جلد ۳۵، شماره ۲: ۱۳-۲۷.

۲. رجبی معماری، ح. ۱۳۷۸. بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های آگروپایرون با استفاده از روش‌های ژنتیکی، سیتوژنتیکی و تجزیه ترکیبات شیمیایی. پایان نامه کارشناسی ارشد. کرمانشاه: دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی. ۱۹۸ صفحه.

3. Ao, C. 2007. Comparative anatomy of bisexual and female florets, embryology in Calendula officinalis (Asteraceae), a naturalized horticultural plant. Scientia Horticulturae, 114: 214-219.

4. Carr, G. D., King, R. M., Powell, A. M. and Robinson, H. 1999. Chromosome numbers in Compositae. XVII. American Journal of Botany, 86(7): 1003-1013.

5. Dalgaard, V. 1986. Chromosome studies in flowering plants from Macaronesia. Anales Jardin Botanico de Madrid; 43(1): 83-111.

6. Janaki ammal, E. K. and Sobti, S. N. 1962. Chromosome relationship in calendula species. Indian Academy of Sciences, 55(3): 128-130.

7. Joly, R., Forcella, F., Petersonb, D. and Eklund, J. 2013. Planting depth for oilseed calendula. Industrial Crops and Products, 42: 133-136.

8. Levan, A., Fredga, K. and Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52: 201-220.

9. Nora, S., Castro, S., Loureiro, J., Gonçalves, A. C., Oliveira, H., Castro, M., Santos, C. and Silveira, P. 2013. Flow cytometric and karyological analyses of Calendula species from Iberian Peninsula. Plant Systematics and Evolution, 299(5): 853-864.

10. Warren, W. 1997. Botanica. Gorden cheers. New York.

Karyotype analysis of yellow and orange flower genotype of Calendula (*Calendula officinalis* L.)

S. Alavipour[1*], M. Chehrazi[2] and E. Khaleghi[2]

1- M. Sc of Horticultural Science, Shahid Chamran University of Ahvaz. 2- Assistant Professor, Dep. of Horticultural Science, Shahid Chamran University of Ahvaz.
*Corresponding author: alavi.horticulture@gmail.com

Abstract

Consideration and study of plant diversity is necessary to achieve to breeding goals between different plant species.
Thus, the seeds were initially collected and were rooted to investigate chromosome karyotype and morphological characteristics of the two genotype of yellow and orange flower calendula. To provide a appropriate metaphase range was used of alphabromonaphtalin 2% as pre-treatment solution for 2.5 hr. Then, samples were fixed in farmer solution and root stained was due using acetocarmin 2% solution. The results of chromosome study showed that both genotype were diploid and chromosome numbers are 2n=28. The karyotype formula of yellow and orange flower genotype was diagnosed 3m+10sm+1st and 8m+4sm+2st, respectively. In karyotype characteristics study of both genotypes showed that chromosome length of yellow flower genotype was less than orange flower genotype. Also, in terms of long and short arm length and location of the centromer was significantly difference between two genotypes.

Key words: Calendula (*Calendula officinalis* L.), Karyotype, Chromsome number, Metaphase range