القاء درون شیشه‌ای پلی‌پلوئیدی با استفاده از کلشی سین در بنت‌القنسول

ژیلا مهر ثمرین[۱]، مصطفی عرب*[۲]، مریم نوروزی[۲]، شیرین دیانتی دیلمی[۲]
[۱] دانش‌آموخته مقطع کارشناسی ارشد علوم باغبانی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران
[۲] استادیار، گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
*نویسنده مسئول: mosarab@ut.ac.ir

چکیده

در این پژوهش تأثیر بازدارنده میتوزی کلشی سین برای القاء تتراپلوئیدی در گیاه زینتی بنت القنسول رقم Pandora red روی نوک شاخساره در شرایط درون شیشه‌ای با غلظت‌های ۰/۰۰، ۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد وزنی به حجمی کلشی سین و در سه بازه زمانی ۶، ۱۲ و ۲۰ ساعته به‌صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی موردبررسی قرار گرفت. مؤثرترین تیمار القاء پلی‌پلوئیدی با غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی کلشی سین و مدت‌زمان ۶ ساعت و با نرخ القاء ۳۳ درصد بدست آمد. گیاهان شاهد در بنت‌القنسول که به‌عنوان گیاهان دیپلوئید عدد کروموزومی برابر 2n= 2x=۲۸ نشان دادند درحالی‌که گیاهان تیمار شده با غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی و زمان ۶ ساعت کلشی سین، دارای سلول هایی با تعداد کروموزوم دو برابر شده (2n=4x=56) بودند که به‌عنوان گیاهان تتراپلوئید معرفی شدند. در تیمار ۱ درصد وزنی به حجمی و زمان ۶ ساعت، گیاه دارای سیستم ریشه‌ای کوچک‌تر و رشد آهسته‌تر و ارتفاع گیاه کمتر بود.

کلمات کلیدی: **بنت‌القنسول، درون شیشه‌ای، القاء پلی‌پلوئیدی، کلشی سین**

مقدمه

بنت‌القنسول، یکی از مهم‌ترین گیاهان گل دهنده گلدانی و معروف به گل کریسمس با نام علمی *Euphorbia pulcherrima*Willd. گیاهی از تیره فرفیون (Euphorbiaceae) و بومی مکزیک است (Kimberly Ann Pickens, 2004).گل‌های حقیقی آن کوچک و به رنگ زرد و به‌صورت گل‌آذین سیاتیوم می‌باشد. گل‌های بنت‌القنسول به‌وسیله تعداد زیادی براکته بیضوی به رنگ‌های متنوع وجود دارند. (Jasrai, Thaker, & D'souza, 2003). بر اساس آمار سازمان کشاورزی ایالات متحده آمریکا، در ایالت کالیفرنیا از این گیاه به‌عنوان گل گلدانی تنها در سال ۲۰۱۶ میلادی قریب به ۶/۵ میلیون گلدان به ارزش ۱۴۰ میلیون دلار فروخته شده است (USDA, 2016). تنوع در صفاتی همچون رنگ، ساختار و شکل گل و گیاه، عطر گل، ماندگاری پس از برداشت و مقاومت به بیماری‌ها و آفات از مهم‌ترین اهداف اصلاحی گیاهان زینتی می‌باشند. در این بین پلی پلوئیدی به‌عنوان یکی از ابزارهای اصلاح گیاهان زینتی معمولاً منجر به ایجاد گیاهان درشت‌تر، با برگ‌های ضخیم و تیره‌تر خواهد شد. تغییر سطح پلوئیدی با استفاده از مواد شیمیایی با کاربرد بازدارنده‌های میتوزی مانند کلشی سین، اوریزالین، تریفلورالین، امی‌پروفسفومتیل، پرونامید، پودوفیلین، آکریدین، اکسید نیتروز و اسیداسکوربیک در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش شده است.کلشی سین نوعی ترکیب آلکالوئیدی طبیعی است که از گیاه گل حسرت (*Colchicum autumnale* L.) استخراج می‌شود و به‌عنوان یک بازدارنده طبیعی میتوزی و ترکیب دپلیمریزه کننده میکروتول‌ها باعث تخریب رشته‌های دوکی‌شکل شده و چرخه تقسیم سلولی را در مرحله متافاز میتوزی متوقف می‌کند در نتیجه کروموزوم‌های دو برابر شده درون یک هسته باقی می‌مانند (Caperta et al., 2006).پژوهش حاضر با هدف بررسی امکان القاء پلی پلوئیدی و تولید گیاهان پلی‌پلوئید بنت القنسول در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از کلشی سین انجام شد

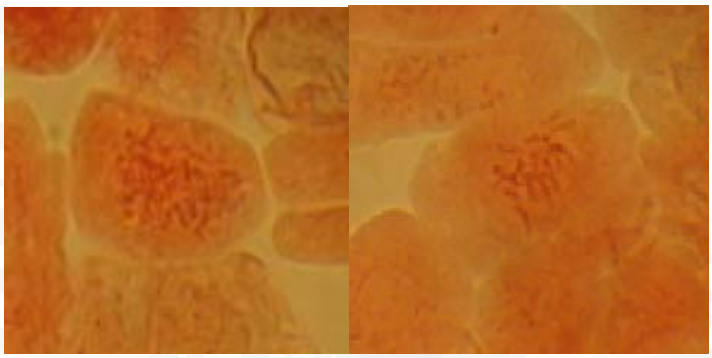
مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده باغبانی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران به اجرا درآمد. برای انجام این پژوهش گلدان‌های بنت القنسول (*Euphorbia pulcherrima* var. *Pandora red*) از گلخانه‌ای در شهر پاکدشت تهیه گردید. شاخه‌های بنت‌القنسول پس از شستشو به مدت نیم ساعت زیر آب جاری، در الکل ۷۰ درصد به مدت ۲۰ ثانیه قرار گرفته و پس از شستشو، با هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند (Kimberly Ann Pickens, 2004). سپس ریزنمونه‌های نوک شاخساره به محیط کشت پرآوری شاخساره حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار منتقل شدند. جهت القاء پلی‌پلوئیدی، نوک شاخساره های پرآوری شده با طول یک سانتی‌متر در غلظت‌های مختلف کلشی‌سین ۰/۰۰، ۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد (وزنی به حجمی) به مدت ۶، ۱۲ و ۲۰ ساعت به روش غوطه‌وری استفاده شد. سپس از روش شمارش کروموزوم نمونه‌های نوک ریشه و بررسی روزنه‌های گیاهچه‌های زنده مانده برای تعیین سطح پلوئیدی استفاده شد (Singh, 1993). بررسی مورفولوژیکی روزنه‌ها توسط ارزیابی میکروسکوپی ویژگی‌های سلول‌های روزنه شامل اندازه طول، عرض و تراکم روزنه‌ها در سطح اپیدرم تحتانی برگ و با استفاده از تکنیک نیل-وارنیش (Väinölä, 2000) از اپیدرم زیرین برگ بالغ و توسعه‌یافته نمونه‌برداری صورت گرفت. ریزنمونه‌های تیمار شده از نظر طول و تعداد شاخساره جانبی، طول و تعداد ریشه، تعداد روز تا ریشه‌دهی، سطح برگ (با کاغذ میلی‌متری)، شکل پهنک و حاشیه برگ چهار هفته پس از واکشت با گیاهان شاهد موردبررسی قرار گرفتند .طرح آماری مورد استفاده به‌صورت آزمون فاکتوریل با دو فاکتور غلظت کلشی سین و زمان تیمار در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار (هر تکرار ۴ ریزنمونه) انجام شد.تجزیه آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS(SAS9.1, 2004)صورت گرفت و از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan, 1955) برای مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. برای مقایسه وجود اختلاف معنی‌دار اندازه طول و عرض سلول‌های روزنه در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید از آزمون t استفاده شد.

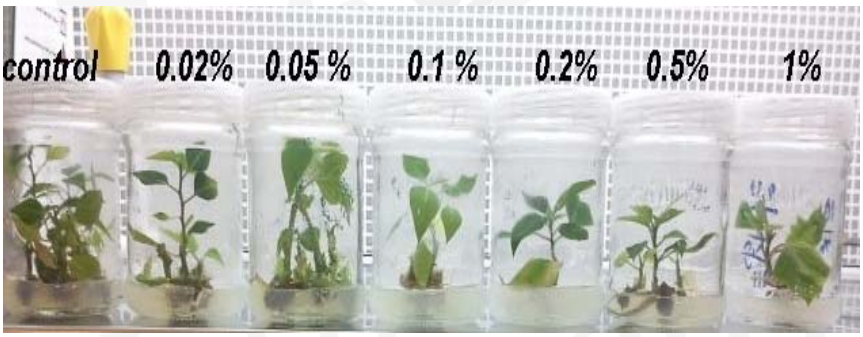
نتایج و بحث

اثر متقابل غلظت ماده کلشی‌سین و زمان تیمار با این ماده در سطح۵٪معنی‌دار بود. با افزایش غلظت کلشی‌سین و طولانی کردن مدت تیمار آن به‌طور مشخصی درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها کاهش یافت. بیشترین درصد زنده‌مانی در تیمار شاهد و تیمار ۶ ساعت کلشی سین با غلظت‌های ۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد وزنی به حجمی کلشی سین (۱۰۰درصد) و کمترین درصد زنده‌مانی در تیمار ۱٪ وزنی-حجمی کلشی سین به مدت ۲۰ ساعت(۰ درصد) مشاهده شد که در این تیمار کلیه ریز نمونه‌ها از بین رفتند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین طول شاخساره غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی و زمان ۶ ساعت (۳/۱ سانتی‌متر) نسبت به تیمار شاهد (۵ سانتی‌متر) نشان داد که طول شاخساره گیاهان تیمار شده با غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی و زمان ۶ ساعت به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است (شکل ۲). کاربرد کلشی سین با غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی در مدت‌زمان ۶ ساعت بیشترین تأثیر را بر کاهش ارتفاع شاخساره توأم با القای پلوئیدی داشته است. اثر غلظت‌های مختلف کلشی سین و مدت‌زمان تیمار بر تعداد شاخساره‌ها هر یک به‌تنهایی در سطح احتمال ۵ درصد معنی شد. به‌طوری‌که با افزایش غلظت کلشی سین تعداد شاخساره کاهش پیدا کرد و غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد وزنی به حجمی کلشی سین تأثیر بیشتری بر کاهش تعداد شاخساره داشتند و بالاترین تعداد شاخساره جانبی با مدت‌زمان ۶ ساعت به دست آمد.همچنین مشخص شد که در تیمار ۱ درصد وزنی به حجمی زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت کوتاه‌ترین مدت‌زمان جهت ظهور ریشه‌چه در بنت‌القنسول می‌باشد و در غلظت‌های بالا (۰/۵ و ۱ درصد وزنی به حجمی) طول ریشه کاهش نشان داد. میانگین طول و عرض روزنه‌ها در نمونه‌های دیپلوئید به ترتیب برابر با ۱۲/۱و ۴/۳۱ میکرومتر و در نمونه‌های تتراپلوئید ۱۸/۲۳ و ۵/۳۷ میکرومتر می‌باشد همچنین میانگین تراکم روزنه در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۲۳/۱۰ عدد در میلی‌متر مربع و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با

۱۴/۸۹ عدد در یک میلی‌متر مربع بود. همچنین با بررسی تعداد کروموزوم در گیاهان تیمار شده مشخص شد که تنها، غلظت ۱درصد وزنی به حجمی و زمان ۶ ساعت، دارای سلول‌هایی با تعداد کروموزوم دو برابر شده (2n=4x=56) بودند که به‌عنوان گیاهان تتراپلوئید معرفی شدند (شکل ۱). مؤثرترین تیمار القاء تتراپلوئیدی، تیمار شاخساره‌ها با غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی کلشی سین و مدت‌زمان ۶ ساعت و با نرخ القاء ۳۳درصد بدست آمد و در سایر تیمارها القای پلی پلوئیدی صورت نگرفت گیاهان تیمار شده با کلشی سین در مقایسه با گیاهان دیپلوئید یا شاهد دارای سطح برگ بزرگ‌تر بوده و همچنین تغییراتی را در حاشیه و سطح برگ نشان دادند.گزارش شده تمام گیاهچه‌های باززایی شده بنت‌القنسول حاصل از کالوس‌های تیمار شده با کلشی سین به‌طور مشخصی دارای شاخه‌های کوتاه‌تری در مقایسه با شاهد بودند (Kimberly A Pickens & Kania, 2006). در گیاه چنار نیز گیاهان القاء شده دارای برگ‌های بزرگ‌تر، تیره‌تر، ضخیم‌تر و با حاشیه‌های تغییر شکل یافته مشاهده شد (Liu, Li, & Bao, 2007). در ژربرا (Gantait, Mandal, Bhattacharyya, & Das, 2011) و آویشن ایرانی (Tavan, Mirjalili, & Karimzadeh, 2015) مشخص شد که افزایش سطح پلوئیدی باعث کاهش تراکم روزنه‌ها در واحد سطح برگ و افزایش اندازه سلول‌های نگهبان روزنه می‌شود.



شکل ۱- تصویر کروموزومی سلول مریستمی ریشه گیاه تتراپلوئید (سمت راست) و دیپلوئید (سمت چپ).



شکل ۲- کاهش طول گیاهان تیمار شده با سطوح مختلف کلشی سین

منابع

Caperta, A., Delgado, M., Ressurreição, F., Meister, A., Jones, R., Viegas, W., & Houben, A. (2006). Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. *Protoplasma, 227*(2-4), 147-153.

Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics, 11*(1), 1-42.

Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., & Das, P. K. (2011). Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of Gerbera jamesonii Bolus cv. Sciella. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 106*(3), 485-493. doi:10.1007/s11240-011-9947-1

Jasrai, Y. T., Thaker, K., & D'souza, M. (2003). In vitro propagation of Euphorbia pulcherrima Willd. through somatic embryogenesis.

Liu, G., Li, Z., & Bao, M. (2007). Colchicine-induced chromosome doubling in Platanus acerifolia and its effect on plant morphology. *Euphytica, 157*(1-2), 145-154.

Pickens, K. A. (2004). In Vitro Propagation, Regeneration, Attempted Tetraploid Induction, and Agrobacterium-mediated Transformation of Euphorbia pulchurrima 'Winter Rose'™.

Pickens, K. A., & Kania, S. A. (2006). Effects of Colchicine and Oryzalin on Callus and Adventitious Shoot Formation of Euphorbia pulchurrimaWinter Rose'. *HortScience, 41*(7), 1651-1655.

SAS9.1. (2004). *SAS/GRAPH 9.1 Reference*: SAS Institute.

Singh, R. (1993). Plant Cytogenetics CRC Press. *Inc Boca Raton, Florida, USA.*

Tavan, M., Mirjalili, M. H., & Karimzadeh, G. (2015). In vitro polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of Thymus persicus (Lamiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 122*(3), 573-583.

USDA. (2016). Published estimates data base (PEDB) [Online]. Available at http://usda.mannlib.cornell.edu. *Washington, DC. USA.*

Väinölä, A. (2000). Polyploidization and early screening of Rhododendron hybrids. *Euphytica, 112*(3), 239-244.

In Vitro Polyploidy Induction by Colchicine in Poinssetia

ZhilaMehrSamarin[1], Mustafa Arab*[2], Maryam Norouzi[2], ShirinDianati Daylami[2]
[1]Graduated Student of Horticultural Sciences, Collage of Aburaihan,University of Tehran
[2]Assistant professor of Department of Horticulture, Collage of Aburaihan,University of Tehran
*Corresponding Author: mosarab@ut.ac.ir

Abstract

In this experiment the mitotic inhibitor colchicine was evaluated for tetraploid induction of Poinssetia (*Euphorbia pulcherrima* var. *pendora red)* .The regenerated shoot tip explants were induced with 0.00, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 and 1%(w/v) concentrations of colchicine for 6, 12 and 20 hours respectively,as a factorial experiment was conducted in a completely randomized design. . The most effective treatment was 0.1% colchicine for 12 hours withpolyploidy induction rate of 33.0%. The stomata size of tetraploids (18.23× 5.37µm) was significantly larger than that of diploids (12.1× 4.31 µm) butthe stomata density of tetraploids (14.89 mm^2) was significantly lower than that of diploids (23.10 mm^2). Compared with diploids, tetraploids had thicker, wider, shorter, rougher and deeper-colorful leaves, fewer roots, shorter shoots and slower growth. Control plants that were considered as diploid plants showed 2n = 2x =28 chromosome number whereas treated plants with 1 w/v% and 6 hours colchicine, showed doubled the number of chromosomes (2n = 4x = 56) who were identified as tetraploid plants.The leaf and the stoma characteristics and chromosome counting could be regarded as helpful indexes to identify colchicine-induced tetraploids in *Poinssetia.*

***Keywords*: *Poinssetia*, in vitro, poylyploidy induction, colchicine.**