بررسی امکان القاء پلی پلوئیدی در بنفشه آفریقایی با استفاده از کلشی سین در گیاهچه های باززایی شده بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha*)

اکرم امیری [۱*]، مینا تقی زاده [۲]، محمود شور [۳]، حسین نعمتی [۳]، علی تهرانی فر [۴]

۱-دانشجوی دکتری باغبانی دانشگاه علوم و تحقیقات تهران. ۲- هیئت علمی گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه اراک. ۳- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۴- دانشیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

*نویسنده مسئول: (Email: Amiri۲۰۰۸@yahoo.com)

چکیده

القاء تتراپلوئیدی در شرایط کشت بافت به عنوان راهبردی مناسب جهت نیل سریع به گیاهان با خصوصیات و شکل‌های جدید در گیاهان زینتی اهمیت بسیار دارد. این مطالعه با هدف امکان ایجاد گیاهان تتراپلوئید با استفاده از کلشی سین انجام شد. گیاهچه های حاصل از کشت درون شیشه‌ای در مرحله انتقال به بیرون از شیشه کشت تحت تیمار کلشی سین قرار گرفتند.آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور غلظت کلشی سین و مدت زمان تیمار انجام شد. غلظت کلشی سین در سه سطح ۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد و مدت زمان تیمار در سه سطح ۱۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت بود. درصد زنده مانی تا سه ماه پس از اعمال تیمار محاسبه شد. بررسی صفات مورفولوژیکی رویشی و زایشی، مطالعات میکروسکوپی و آزمایشات فلوسایتومتری جهت تائید سطح پلوئیدی انجام گرفت. نتایج نشان داد که غلظت‌های بالاتر و زمان‌های بیشتر باعث از بین رفتن درصد بالاتری از گیاهان شد، به طوری که در تیمار ۴۸ ساعت در هر سه غلظت نمونه‌ها از بین رفتند. غلظت ۰/۰۵ درصد کلشی سین به مدت ۲۴ ساعت ضمن درصد قابل قبول زنده مانی بیشترین درصد تتراپلوئیدی را ایجاد کرد.

کلمات کلیدی: فلوسایتومتری، میکسوپلویئدی، کلشی سین.

مقدمه

بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha*) یک گیاه زینتی مهم با تنوع شکل و رنگ فراوان و متعلق به خانواده *Gesneriaceae* با عدد کروموزومی ۲n= ۲۶ است. این گیاه به خاطر توانایی بالای باززایی، دست یابی راحت و قدرت اندام زایی بالا مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. از آن جا که یکی از جنبه‌های مطالعات جهانی، بر پایه ایجاد تنوع در خصوصیات گیاهان، به ویژه گیاهان زینتی استوار است و به دلیل اهمیت این گیاه در صنعت تولیدات گیاهی و نیاز روز افزون به ارقام و خصوصیات جدید در گیاهان، تا کنون مطالعه چندانی برای ایجاد بنفشه آفریقایی با خصوصیات جدید در شرایط درون شیشه‌ای صورت نگرفته است. یکی از راه‌های ایجاد تنوع و ترکیب خصوصیات مطلوب در گیاهان پلی پلوئیدی می‌باشد(تاکامورا و همکاران، ۲۰۰۲). برای دست‌یابی به گیاهان پلی پلوئید می‌توان از مواد شیمیایی که از تقسیم سلول و جدا شدن کروموزوم‌ها با از بین رفتن میکروتوبول های دوک تقسیم جلوگیری می‌کنند و موجب دو برابر شدن محتوای ژنتیکی در هنگام تقسیمات سلولی می‌شوند، استفاده کرد (کوتولیس و همکاران، ۲۰۰۵). نظر به موارد یاد شده، در این مطالعه هدف بررسی امکان تتراپلوئید کردن گیاهان دیپلوئید با قرار دادن گیاهچه های حاصل از کشت بافت در معرض ماده شیمیایی کلشی سین بود تا بتوان بستری مناسب برای تحقیقات آتی در بهبود صفات زینتی این گیاه ایجاد کرد.

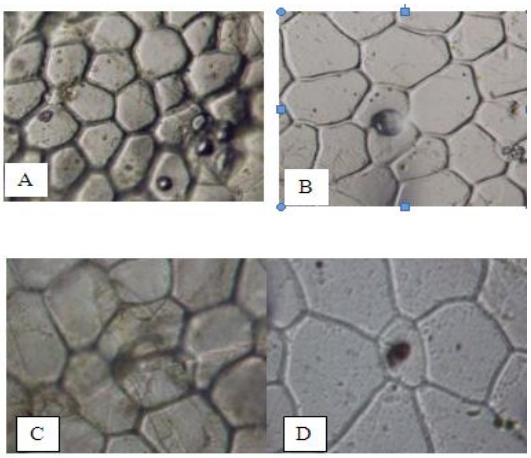
مواد و روش‌ها

به دلیل اطمینان از یکنواختی ژنتیکی مواد گیاهی مورد تیمار پلی پلوئیدی در این آزمایش از کلون های تکثیر شده بنفشه آفریقایی طی کشت درون شیشه ای استفاده شد. به منظور کشت درون شیشه‌ای، پهنک برگ‌ها به عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفت که پس از استریل و کشت در محیط MS، گیاهچه های باززایی شده در مرحله انتقال به شرایط برون شیشه‌ای تحت تیمار کلشی سین قرار گرفتند.آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل ۳×۳ انجام گرفت. فاکتور اول غلظت کلشی سین در سه سطح ۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد و فاکتور دوم زمان تیمار در سه سطح ۱۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت با ۱۱ تکرار بود. نمونه‌های شاهد بدون اعمال تیمار در نظر گرفته شدند. نحوه اعمال تیمارها به این ترتیب بود که پس از این که گیاهچه ها از شیشه های کشت خارج و شست و شو شدند، به محیط مناسب ریشه زایی شامل پیت- پرلایت انتقال داده و در شرایط مناسب با رطوبت نسبی ۷۵ درصد و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گلخانه نگه داری شدند. و مریستم انتهایی گیاهچه ها با پنبه‌های آغشته در تیمارهای مورد نظر کلشی سین پوشیده شد. پس از اتمام زمان تیمار، پنبه‌ها از روی مریستم برداشته شده و محل آن با آب به خوبی شست و شو داده شد. پس از آن، مراحل سازگاری گیاهچه ها و انتقال به گلخانه انجام گرفت. صفات مورد ارزیابی درصد زنده مانی گیاهچه ها تا سه ماه پس از اعمال تیمار، مقایسات مورفولوژیک صفات رویشی و زایشی پس از مرحله سازگاری کامل گیاهان وانتقال گلدان‌ها به گلخانه، مقایسات میکروسکوپیک با تهیه نمونه از اپیدرم فوقانی و بررسی با عدسی شیئی ۲۰x و ۴۰x و آزمایشات فلوسایتومتری (توسط دستگاه فلوسایتومتر Partec pA, Germany) بود. تجزیه آماری داده‌ها در کلیه آزمایشات با استفاده از نرم افزار آماری SAS انجام شد و مقایسه میانگین تیمارها به وسیله آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج به دست آمده، با افزایش غلظت و زمان تیمار کلشی سین از درصد زنده مانی کاسته شد، به گونه‌ای که در ماه سوم بیشترین زنده مانی در زمان ۱۸ ساعت و بیشترین تلفات نیز مربوط به تیمار زمانی ۴۸ ساعت در هر سه غلظت بود که هیچ یک از نمونه‌ها زنده نماند. نمونه‌های شاهد در هر دو شرایط ۱۰۰ درصد زنده ماندند. این رابطه معکوس بین غلظت کلشی سین و زمان استفاده از آن با بقاء نمونه‌ها در مورد مطالعات درون شیشه‌ای و برون شیشه‌ای در گیاهان دیگر نیز صادق می‌باشد (چن و گائو، ۲۰۰۷). به نظر می‌رسد فعالیت کلشی سین ممکن است در مریستم متمرکز باشد و یک اختلال فیزیولوژیکی در کاهش تقسیم سلولی و یا مرگ ریزنمونه ها ایجاد کند(گا و همکاران، ۲۰۰۵). ارزیابی صفات ظاهری نشان داد گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید از نظر خصوصیات مورفولوژیک رویشی مانند اندازه، ضخامت، تعداد، حاشیه، نوک، رنگ و اندازه برگ و صفات زایشی مانند تعداد گل و گلبرگ، ارتفاع گل آذین و قطر گل با یکدیگر تفاوت محسوسی نشان دادند، به طوری که گیاهچه های تحت تیمار کلشی سین، پا کوتاه‌تر، برگ‌های پهن‌تر و ضخیم‌تر، دمبرگ قطورتر، پر گل‌تر، پرپر تر و دارای گل‌های درشت تر بودند و این تفاوت‌ها می‌توانند معیار تقریباً مناسبی جهت جداسازی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید از یکدیگر باشند. در این تحقیق این تفاوت‌ها به ویژه در صفات زایشی تتراپلوئیدها محسوس‌تر بود. به نظر می‌رسد که مقدار هورمون اکسین که مسئول رشد می‌باشد، در گیاهان پلی پلوئید کمتر بوده و گل‌دهی گیاهان پلی پلوئید به تأخیر افتاده و مدت گل‌دهی افزایش می‌یابد (فارسی و ذوالعلی ، ۱۳۸۲). مشاهدات میکروسکوپی، بزرگ‌تر بودن سلول‌های اپیدرمی و محافظ روزنه سلول‌های تتراپلوئید نسبت به نمونه‌های دیپلوئید را کاملاً نشان داد (شکل۱)، که این می‌تواند به عنوان یک ملاک قوی در تشخیص و جداسازی گیاهان بنفشه آفریقایی با سطوح پلوئیدی مختلف تلقی گردد. پیش از این دهقان (۱۳۸۸) نیز با مقایسه میکروسکوپی سلول‌های اپیدرم در نمونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید گیاه بذرالبنج مصری، بزرگ‌تر بودن سلول‌های

اپیدرمی نمونه‌های تتراپلوئید را نشان داد. در آزمایشی که بر روی لیلیوم ***Lilium*** کولتیوارهای Con. Amore و Acapulco در غلظت‌های ۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد انجام شده نتایج بیانگر آن بود که بعد از ایجاد تیمار با کلشی سین قطر دانه‌های گرده ۳۰ درصد افزایش یافته بود و کلاله نیز بزرگ‌تر و گوشتالود شده بود (هانگژی و همکاران، ۲۰۰۷)،



شکل۱- مقایسه میکروسکوپی سلول‌های اپیدرم در نمونه‌های دیپلوئید (A و C) و تتراپلوئید (B و D) بنفشه آفریقایی (درشت نمایی ۲۰X(A و B) و ۴۰ X(C و D)

نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان داد که با افزایش غلظت کلشی سین از تعداد گیاهان دیپلوئید کاسته شده و به گیاهان میکسوپلوئید و تتراپلوئید افزوده گشته است. اغلب گیاهان میکسوپلوئید بودند. بیشترین درصد تتراپلوئید مربوط به تیمار ۲۴ ساعت و غلظت ۰/۰۵ درصد کلشی سین بود (۵۰ درصد) که بتوان ضمن این که درصد زنده مانی در حد قابل قبول بود (۵۴/۵۰ درصد)، به هدف اصلی یعنی تولید گیاهان تتراپلوئید نیز دست یافت. استفاده از روش‌های جدید مثل فلوسایتومتری به جای شمارش کروموزومی می‌تواند مزیت‌های زیادی داشته باشد. سرعت، دقت، امکان بررسی سریع سطح پلوئیدی در گیاهان با تعداد کروموزوم زیاد و کوتاه مانند بنفشه آفریقایی تتراپلوئید و تفکیک گیاهان میکسوپلوئید از تتراپلوئید از مزایای بررسی فلوسایتومتری می‌باشد. بر اساس یافته های این آزمایش استفاده از تیمار ۰/۰۵ درصد به مدت ۲۴ توانست بنفشه های آفریقایی با افزایش در سطوح پلی پلوئیدی ایجاد کند که این روش اصلاحی می تواند به عنوان روشی برای ایجاد ارقامی متنوع با صفات برجسته به گونه ای موفقیت آمیز در این گیاه گلدانی بکار رود.

منابع

دهقان، ا. ۱۳۸۸. بررسی اثرات القاء تتراپلوئیدی در ریشه‌های مویین گیاه بذرالبنج مصری (*Hyoscyamus muticus*) پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۱۷ صفحه.

فارسی، م. و ذوالعلی، ج. ۱۳۸۲. اصول بیوتکنولوژی گیاهی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

Chen, L., and S. L Gao. ۲۰۰۷. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetarploids from mixoploid in Astrangalus membranaceus. Sci. Hortic. ۱۱۲:۳۳۹-۳۴۴.

GU, X. F., A. F. Yang, H. Meng, and J. R. Zhang. ۲۰۰۵. *In vitro* induction of tetraploid plants from *Ziziphus jujube* Mill.

Cv. Zhanhua. Plant Cell Rep. ۲۴: ۶۷۱–۶۷۶.

Diploid female gametes induced by ., Zh. Sixiang, H. Yueqiu, Y. Guijun, B. Yufen and Zh.Youyong ۲۰۰۷.Hongzhi, W Scientia Horticulturae, ۱۱۴ :۵۰–۵۳. .colchicine in Oriental lilies

Koutoulis, A., A. T. Roy, A. Price, L. Sheriff, and G. Legget. ۲۰۰۵. DNA ploidy level of colchicines- treated hops (*Humulus lupulus*L.). Sci. Hortic. ۱۰۵:۲۶۳–۲۶۸.

Senvirtne, K.S.C.N., and D.S.A. Wijesundara. ۲۰۰۴. New African violets (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.) induced by colchicines. Curr Sci . ۸۷:, ۱۳۸–۱۴۰.

Takamura, T., , K. B. Lim, and J. M. Van. ۲۰۰۲. effect of a new compound on the mitotic poe lyploidization of *Lilium longiflorum* and oriental hybrid Lilies. ISHS Acta Horticulturae. ۵۷۲:۳۷–۴۲.

Investigation of the polyploidy induced possibility in using Colchicine in regenerated plant of African violet (*Saintpaulia ionantha*)

A.Amiri[۱*], M. Taghizade[۲], M. Shoor[۳]- H. Nemati[۳]- A. Tehranifar[٤]

۱ Dept. of Horticultural Sciences, Science and Research Branch Islamic Azad University, Tehran - Iran.

۲Dept. of Horticultural Sciences, Arak University, Arak- Iran. ۳،۴- Dep of Horticultural Sciences, Ferdowsi University,Mashhad- Iran.

* : Corresponding author Email: Amiri۲۰۰۰۸@yahoo.com

Abstract

Tetraploidy induction in tissue culture conditions is very important as an appropriate strategy for achieving rapid to new forms and properties of plants in ornamental plants. This study with the aim of enables the production of tetraploidy plant. Seedlings grown in vitro conditions in moving to the in vivo condition stage were treated under colchicine treatment. The test in the factorial design was performed with two factors of concentrations and times of colchicine treatment. colchicine concentration were in three levels ۰,۰۲, ۰,۰۵ and ۰,۱٪ and times in three levels ۱۸, ۲۴ and ۴۸ hours. Survival Percentage Was calculated for three month after treatments tetraploidy induction successfully confirmed by morphological characteristics, microscopic studies and flowcytometry tests. The results showed that higher concentrations and more time Cause of death was a higher percentage of plants, so that ۴۸ hours treatment were destroyed in all three concentrations. ۰,۰۵ % concentration of colchicines in ۲۴ hours created the highest Percentage of acceptable viability and tetraploidy percentage.

Keywords: flowcytometry, mixoploidy, colchicines.