تولید گیاهان تتراپلوئید با استفاده از کلشی سین در قلمه های بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha*)

مرتضی دانشخواه [۱]، اکرم امیری [۲*]، مینا تقی زاده [۳]

۱- هیئت علمی گروه تولیدات گیاهی، مرکز آموزش عالی امام خمینی. ۲- دانشجوی دکتری باغبانی، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران. ۳- هیئت علمی گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه اراک.

*نویسنده مسئول: Email: Amiri20008@yahoo.com

چکیده

گیاه بنفشه آفریقایی یک گیاه زینتی گلدانی چند ساله با تنوع رنگ و شکل بسیار زیاد است. از این رو توجه به این پتانسیل جهت تولید گیاهان با صفات جدید بسیار مورد توجه است. هدف از این تحقیق تولید گیاهان پلی پلوئید با استفاده از ماده شیمیایی کلشی سین بود و بدین منظور قلمه های این گیاه تحت تیمار کلشی سین قرار گرفتند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور غلظت در چهار سطح ۰/۰۲،۰/۰۴، ۰/۰۶ و ۰/۱ درصد و مدت زمان تیمار در سه سطح ۱۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام گرفت. مطالعات مورفولوژیک، روزنه‌ای و فلوسایتومتری جهت تأیید سطح پلوئیدی آن‌ها انجام پذیرفت. گیاهان تتراپلوئید از نظر صفات مورفولوژیک رویشی و زایشی و از نظر پروفیل فلوسایتومتری با نمونه‌های دیپلوئید متفاوت بودند. نتایج کلی نشان داد که در تیمار ۰/۱ درصد در هر سه زمان و تیمار ۴۸ ساعت در هر ۴ غلظت همه نمونه‌ها از بین رفتند و بیشترین زنده مانی مربوط به تیمارهای ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد به مدت ۱۸ ساعت بود. بیشترین میزان پلوئیدی احتمالی مربوط به غلظت ۰/۰۴ درصد کلشی سین به مدت ۲۴ ساعت بود.

واژگان کلیدی: فلوسایتومتری، میکسوپلوئیدی، کلشی سین.

مقدمه

بنفشه آفریقایی (Saintpaulia ionantha) از گیاهان آپارتمانی مهم خانواده Gesneriaceae با شکل و رنگ‌های متنوع است. این گیاه از جنبه اقتصادی و زینتی بسیار پراهمیت بوده و از آن جا که توجه به گیاهان با خصوصیات جدید امروزه مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است، لذا این گیاه توان بسیار بالایی جهت دست ورزی‌های ژنتیکی دارد. پلی پلوئید کردن گیاهان، از راه‌های ایجاد تنوع و ترکیب خصوصیات مطلوب در گیاهان به شمار می‌رود. برای دست‌یابی به گیاهان پلی پلوئید می‌توان از مواد شیمیایی از جمله کلشی سین استفاده کرد که از تقسیم سلول و جدا شدن کروموزوم‌ها با از بین رفتن میکروتوبول های دوک تقسیم جلوگیری می کنند و موجب دو برابر شدن محتوای ژنتیکی در هنگام تقسیمات سلولی می‌شوند (تاکامورا و همکاران، ۲۰۰۲). هدف از این تحقیق، بررسی اثر کلشی سین بر پلی پلوئیدی گیاهان بنفشه آفریقایی در شرایط گلخانه است تا بتوان به گیاهان با خصوصیات جدید از جمله گل‌های پرپر و درشت‌تر دست یافت.

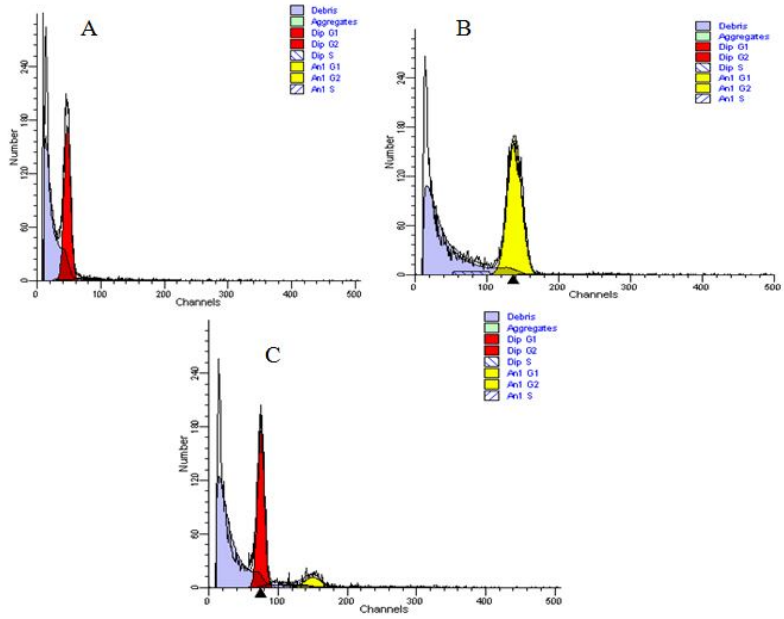
مواد و روش‌ها

مواد گیاهی این تحقیق گیاه بنفشه آفریقایی با گل‌های کم پر بود که در شرایط مناسب در گلخانه دانشکده کشاورزی مرکز آموزش عالی امام خمینی نگه داری شدند. نحوه انجام آزمایش به این ترتیب بود که برگ‌های بنفشه آفریقایی بهمراه ۱/۵ سانتی متر از دمبرگ از ردیف‌های میانی گلدان قطع گردید و از قسمت دمبرگ در غلظت‌های مختلف کلشی سین غوطه‌ور شد. سپس نمونه‌ها بر روی شیکر قرار گرفت و پس از پایان زمان‌های مورد نظر تیمار، از هر غلظت به تعداد ۱۰ قلمه برداشته شده و پس از ۴ بار شست و شو با آب مقطر، در گلدان‌های کوچک حاوی پیت و پرلایت به نسبت ۳:۱ کاشته شد. گیاهان شاهد تنها با آب مقطر شست و شو و در همان بستر کشت

گردید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل با دو متغیر غلظت کلشی سین (۴ سطح ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۶ و ۰/۱ درصد) و زمان (۳ سطح ۱۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت) با ۱۰ تکرار انجام گرفت. صفات مورد ارزیابی شامل درصد زنده مانی گیاهچه ها تا ماه پنجم، مقایسه مورفولوژیک صفات رویشی و زایشی، مقایسه میکروسکوپیک و آزمایش فلوسایتومتری بود. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین تیمارها به وسیله آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج و بحثبر اساس نتایج به دست آمده، با افزایش زمان و غلظت کلشی سین از میزان مقاومت قلمه ها کاسته شد، به طوری که در غلظت ۰/۱ درصد و تیمار زمان ۴۸ ساعت بعد از ۵ ماه هیچ‌کدام گیاهچه ها زنده نماندند. بیشترین زنده مانی مربوط به تیمار ۰/۰۲ و ۰/۰۴ درصد به مدت ۱۸ ساعت با ۴۰ درصد زنده مانی بود. به نظر می‌رسد فعالیت کلشی سین ممکن است یک اختلال فیزیولوژیکی در کاهش تقسیم سلولی و یا مرگ ریزنمونه ها ایجاد کند(جیو و همکاران، ۲۰۰۵). از آن جا که یکی از روش‌های شناسایی پلی پلوئیدی، صفات ظاهری و مورفولوژی گیاه است که می‌توان از این طریق تتراپلوئید های احتمالی را شناسایی کرد (حسن دخت و ابراهیمی، ۱۳۸۵)، ارزیابی صفات ظاهری نشان داد که گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید از نظر خصوصیات مورفولوژیک رویشی مانند اندازه، ضخامت، تعداد، حاشیه، نوک، رنگ و اندازه برگ و زایشی مانند تعداد گل و گلبرگ، ارتفاع گل آذین و قطر گل با نمونه های شاهد تفاوت محسوسی داشتند، به نحوی که 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 در تیمار ۰/۰۴ و ۰/۰۶ درصد به مدت ۲۴ ساعت مشخص‌تر بود. تأخیر در گل‌دهی نیز به دلیل کندی رشد از دیگر اثرات کلشی سین می‌باشد. در این آزمایش دیده شد که گیاهان شاهد رشد قابل ملاحظه‌ای نسبت به گیاهان تیمار شده داشت. به طور کلی میزان رشد پلی پلوئیدها کمتر از دیپلوئیدها می‌باشد. در مقایسه میزان رشد گیاهان پلی پلوئید و دیپلوئید، مشاهده شده است که مقدار هورمون اکسین که مسئول رشد می‌باشد، در گیاهان پلی پلوئید کمتر بوده و گل‌دهی گیاهان پلی پلوئید به تأخیر می‌افتد و مدت گل‌دهی افزایش می‌یابد. پلی پلوئیدها اغلب سلول‌های بزرگ‌تر، برگ‌های ضخیم‌تر، رشد کندتر، میزان آب بیشتر و تأخیر گلدهی همراه با افزایش دوره آن را نشان می‌دهند (کندورزی و همکاران، ۲۰۰۰). سن ویراتن و ویجیساندرا (۲۰۰۴) تولید گیاهانی با خصوصیات جدید با استفاده از کلشی سین بر روی قلمه های بنفشه آفریقایی را مورد مطالعه قرار دادند. به این منظور از غلظت‌های متفاوت از کلشی سین ۰، ۰/۰۲۵، ۰/۰۴، ۰/۰۵، ۰/۰۶ و ۰/۱ درصد در زمان‌های ۱۸، ۲۳/۵، ۲۷، ۴۳، ۴۷ و ۱۱۷ ساعت استفاده نمودند. نتایج آزمایش آن‌ها نشان دهنده تفاوت گیاهان تیمار یافته از نظر خصوصیات ظاهری از جمله تفاوت در رنگ، ضخامت برگ، سطح و ضخامت برگ ، تعداد گلبرگ، قطر گل، تعداد گل در گل آذین و ارتفاع گل آذین بود، نتیجه کلی آزمایش آن‌ها بیانگر وابستگی تغییرات ایجاد شده به غلظت و زمان بود که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در مشاهدات میکروسکوپی، بزرگ‌تر بودن سلول‌های اپیدرمی و محافظ روزنه سلول‌های تتراپلوئید نسبت به نمونه‌های دیپلوئید کاملاً مشهود بود، در حقیقت می‌توان چنین اظهار نمود که افزایش اندازه سلولی یکی از اثرات عمومی القاء تتراپلوئیدی در بنفشه آفریقایی می باشد. در بسیاری موارد پلی پلوئیدی سبب افزایش اندازه سلول و به خصوص بافت‌های مریستمی می‌شود (کندورزی و همکاران، ۲۰۰۰). در گل داوودی با اعمال تیمار کلشی سین در شرایط درون شیشه‌ای اندازه سلول‌های روزنه گیاهان تتراپلوئید ۱/۵۳ برابر بزرگ‌تر از گیاهان دیپلوئید بود (گائو و لیو ، ۲۰۰۷). روش فلوسایتومتری نیز قادر به تشخیص سریع سلول‌های هاپلوئید، میکسوپلوئید و پلی پلوئید پس از آزمایشات دست ورزی پلوئیدی می‌باشد. بر اساس پیک‌های به دست آمده از فلوسایتومتری حاصل از این آزمایش، گیاهان در سه دسته دیپلوئید، میکسوپلوئید و تتراپلوئید قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل۱ دیده می‌شود، گیاهان تتراپلوئید دارای یک پیک با میانگین ۱۴۰ است، در حالی که نمونه دیپلوئید یک پیک با میانگین ۵۰ را نشان می‌دهد. نمونه‌های میکسوپلوئید پیک‌های

مربوط به گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید را هم‌زمان نشان داده و دارای دو پیک است که میانگین پیک اول ۵۰ و پیک دوم ۱۴۰ است که حاکی از وجود سلول‌های دیپلوئید و تتراپلوئید در آن‌ها می‌باشد. نتایج فلوسایتومتری گیاهان تیمار شده با کلشی سین نشان داد که با افزایش زمان تیمار دهی از ۱۸ به ۴۸ ساعت از میزان گیاهان دیپلوئید کاسته شده است و به درصد گیاهان تتراپلوئید و میکسوپلوئید افزوده شده است. غیور (۱۳۸۶) در آزمایشات فلوسایتومتری که بر روی گیاهچه های تیمار یافته ژربرا با اوریزالین در شرایط درون شیشه‌ای انجام داده بود، همین نتیجه را گزارش کرد. در این پژوهش در همه تیمارها درصد گیاهان میکسوپلوئید نسبت به دیپلوئید و تترا پلوئید بیشتر بود. بیشترین درصد تتراپلوئید در تیمار ۰/۰۴ درصد به مدت ۲۴ ساعت بود و این تیمار ضمن درصد قابل قبول زنده مانی به هدف اصلی تحقیق یعنی ایجاد گیاهان پلی پلوئید نزدیک‌تر بود.



شکل ۱ - پیک‌های به دست آمده از فلوسایتومتری کلشی سین، A: دیپلوئید، B: تتراپلوئید و C: میکسوپلوئید.

از عوامل دخیل که می‌تواند در تولید میکسوپلوئید نقش داشته باشد، تأثیر انحصاری کلشی سین بر سلول‌های در حال تقسیم است. بنابراین پلی پلوئیدی به طور مساوی در تمام سلول‌های نمونه رخ نداده و میکسوپلوئیدی را به همراه خواهد داشت (وان و همکاران، ۲۰۰۱). روش فلوسایتومتری در سال‌های اخیر به خاطر سهولت، سرعت و دقت در تخمین محتوای DNA هسته‌ای ترجیح داده می‌شود و سبب صرفه جویی در هزینه، انرژی و به ویژه زمان که در سایر روش‌ها نیاز بود می‌گردد (اکات و همکاران، ۲۰۰۵). در آخر انتظار می‌رود چنین دست‌ورزی هایی در ژنوم گیاهان، تغییراتی بر مورفولوژی و روند رشد و گل‌دهی گیاه داشته باشد، چه بسا رقم یا ارقامی جدید را بتوان به این روش تولید و به ثبت رساند (غیور، ۱۳۸۶).

منابع

حسن دخت، م. ر. و ابراهیمی، ر. ۱۳۸۵. مبانی کشت بافت گیاهی. انتشارات مرز دانش. ۳۲۸ صفحه.

غیور، ز. ۱۳۸۶. کشت بافت ژربرا و بررسی امکان تولید گیاهان تتراپلوئید با استفاده از کلشی سین. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه فردوسی مشهد.

Eekhaut, T., Leus, M., and Huylenbroeck, J. V. 2005. Exploitation of flocytometeryfor plant breeding. Acta Physiologica Plantarum. 27: 743-750.
Gao, S., Liu, Zh., 2007. Micropropagation and induction of autotetraploid plants of Chrysanthemum cinerariifolium (Trev.) Vis. In Vitro Cell.Dev.Biol. 43:404–408.GU, X. F., A. F. Yang, H. Meng, and J. R. Zhang. 2005. In vitro induction of tetraploid plants from Ziziphus jujube Mill. Cv. Zhanhua. Plant Cell Rep. 24: 671-676.
Kondorosi, E., Roudier, F. and E. Gendrau. 2000. Plant cell-size: growing by ploidy? Curr. Opin. Plant Biol. 3:488-492.
Senvirtne, K.S.C.N., and Wijesundara, D.S.A. 2004. New African violets (Saintpaulia ionantha H. Wendl.) induced by olchicines. Curr .Sci., 87: 138-140.

Wan, Y., Petolino, J.F., Widholm, J.M,. 2001. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. Theor. Appl. Genet. 77: 889-892.

Production of tetraploidy plants using colchicine in cuttings of African violet (*Saintpaulia ionantha*)

M. Daneshkhah[1], A. Amiri[2]*, M. Taghizadeh[3]

1- Dept. of Imam Khomeini higher education center. 2- Dept. of Horticultural Sciences, Science and Research Branch Islamic Azad University, Tehran - Iran. 3- Dept. of Horticultural Sciences, Arak University, Arak- Iran.

Abstract

African violet is potted ornamental plants with a variety of colors and shapes. Thus Considering the potential for production of plants with new characters is highly regarded. This study was with the aim of enables the production of polyploidy plant. In order, cuttings of this plant were treated under colchicine treatment. The experiment in the factorial design was performed with four concentrations (0.02, 0.04, 0.06 and 0.1%) and three times of treatment (18, 24 and 48 hours). Tetraploidy induction successfully confirmed by morphological characteristics, Stomatal and flowcytometry techniques. Tetraploid plants were different from vegetative and reproductive morphological characteristics and flowcytometry profile with diploid plants. The overall results showed that in 0.1 % treatment for three times and 48 hours treatment for four concentration of colchicine, all the samples was died and the highest survival plant was related to 0.02 and 0.04 % for 18 hours. The highest possible polyploidy concentration was related to 0.04 % concentration for 24 hours.

Keywords: flowcytometry, mixoploidy, colchicines.