القای درون شیشه ای پلی پلوئیدی در گیاه نرگس (*Narcissus tazetta*)

معصومه احمدی مجد (١)، حسن ساری‌خانی (٢)، مهرداد چایی‌چی (٣)، عبدالکریم کاشی (٤)
١- دانشجوی کارشناسی‌ارشد دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ٢- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ٣- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، ٤- استاد گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج.

در این پژوهش از گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای جهت القای پلی پلوئیدی با استفاده از کلشی‌سین استفاده شد. گیاهچه‌ها با کلشی سین در چهار غلظت (٠/٠٠، ٠/٠٥، ٠/١٠ و ٠/٢٠ درصد) به مدت ٢٤ و ٤٨ ساعت تیمار شدند و درصد زنده مانی گیاهچه‌ها بررسی شد. پس از رشد کافی گیاهچه‌های زنده مانده، سطح پلوئیدی آنها با روش‌های شمارش کروموزوم نوک ریشه به روش استواورسین و فلوسیتومتری نمونه های برگی مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر غلظت کلشی‌سین بر صفت زنده مانی گیاهچه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد اما زمان تیمار آن و اثر متقابل غلظت کلشی‌سین و زمان تیمار معنی‌دار نشد. بین غلظت‌های ٠/٠٥، ٠/١٠ و ٠/٢٠ درصد کلشی‌سین اختلاف معنی‌داری در صفت زنده مانی گیاهچه‌ها مشاهده نشد. نتایج ارزیابی‌های سطح پلوئیدی وجود سلول‌هایی را با دو سطح پلوئیدی دیپلوئید با تعداد ٢٠ کروموزوم و میکسوپلوئید با $2x=20$ و $4x=40$ تعداد ٤٠ کروموزوم را نشان دادند. همچنین نتایج حاصل از فلوسیتومتری نتایج حاصل از شمارش کروموزوم نمونه‌های نوک ریشه را تایید کرد. از گیاهچه‌های زنده مانده تعداد ١٦ گیاهچه با سطح پلوئیدی دیپلوئید و تعداد ١٦ گیاهچه با سطح پلوئیدی میکسوپلوئید ارزیابی شدند. هیچ گیاهی با سطح پلوئیدی تتراپلوئید خالص پس از چندین واکشت مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: ریزازدیادی، پلی‌پلوئیدی، کلشی‌سین، فلوسیتومتری.

مقدمه:

گیاه نرگس یکی از گیاهان زینتی پیازدار و متعلق به خانواده آماریلیداسه (Amaryllidaceae) است که از نظر شکل برگ، تاج گل و همچنین رنگ و اندازه گل دارای تنوع بسیاری است (Mathew, 2002). با توجه به اهمیت نرگس به عنوان یکی از گل‌های پیازی، بالابردن کیفیت گل در این گیاه ضروری است. بنابراین تولید گل‌های نرگس با ساقه و برگ‌های محکم، ماندگاری طولانی، گل‌های درشت‌تر که دارای عطر، بو و مقاومت به پوسیدگی پیاز و تنش‌های محیطی باشند و در تمام طول سال قابل تولید باشند از اهداف اصلی بهنژادی انواع مختلف نرگس می‌باشد (Hanks, 2002). یکی از روش‌های بهنژادی که در مورد بسیاری از گیاهان گزارش شده است، القای پلی‌پلوئیدی مصنوعی است. در پلی‌پلوئیدی، اندام‌های مختلف مانند کاسبرگ‌ها، گلبرگ‌ها، پرچم‌ها، میوه‌ها و بذور افزایش رشد نشان می‌دهند (Ehdaei, 2001). گیاهان تتراپلوئید نسبت به انواع دیپلوئید خود به طور معمول رشد رویشی بیشتر، ساقه‌های درشت‌تر، برگ‌های کلفت‌تر، گل‌های بزرگ‌تر با گلبرگ‌های ضخیم‌تر و پایداری طولانی‌تر، دارند (Farsi & Bagheri, 1999). القای درون شیشه‌ای آتوپلوئیدی روشی کاربردی برای بهبود این ویژگی‌ها و ایجاد تنوع در گیاهان زینتی است. برای این منظور از مواد مختلفی مانند کلشی‌سین و اوریزالین برای القای پلی‌پلوئیدی استفاده شده است (Escandon et al., 2007). تأثیر کلشی‌سین (٠/٠٠١ و ٠/٠١ درصد) به مدت ٢٤ و ٤٨ ساعت در گیاه زینتی *Mecardonia tenella* روی گیاهان رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای بررسی شد و گیاهان تتراپلوئید تولید شده گل‌ها و برگ‌های درشت تر داشتند (Escandon et al., 2007). اثر کلشی‌سین و اوریزالین روی نوک شاخه گیاهان دیپلوئید آلوکازیا در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان تتراپلوئید به دست آمده دارای برگ‌های گرد بودند در صورتی که گیاهان دیپلوئید برگ‌های قلبی شکل و کشیده داشتند (Thao et al., 2003). در این

پژوهش با هدف القای پلی‌پلوئیدی، ابتدا ریزازدیادی این گونه نرگس با کمک هورمون‌های بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید بررسی شده و سپس با استفاده از کلشی‌سین القای پلی‌پلوئیدی در آن مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها:

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان انجام شد. برای انجام این پژوهش پیازهای نرگس گونه *Narcissus tazetta* از گلخانه‌ای در شمال کشور تهیه گردید. برای تهیه محیط کشت حاوی کلشی سین، ابتدا محیط کشت MS به روش معمول تهیه گردید و پس از توزیع به میزان ۳۰ میلی‌لیتر در شیشه‌های ۲۰۰ میلی‌لیتری در اتوکلاو در شرایط دمای 121^{oc} و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند و به زیر لامینار فلو منتقل شدند. سپس با توجه به حساس بودن کلشی سین به گرما، محلول کلشی سین با استفاده از فیلتر سرسرنگی استریل با قطر منافذ ۰/۲ میکرومتر ضدعفونی شد و قبل از جامد شدن محیط کشت درون شیشه ها، به مقدار لازم به هر کدام از شیشه ها اضافه گردید. برای القای پلی‌پلوئیدی از گیاهچه‌های پرورش یافته در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شد. گیاهچه‌هایی با طول یک تا ۲ سانتی‌متر در شیشه‌های حاوی کلشی‌سین واکشت شده و پس از ٢٤ یا ٤٨ ساعت گیاهچه‌های تیمار شده با آب مقطر استریل شستشو شده و به محیط کشت MS بدون کلشی سین منتقل شدند. پس از گذشت ٤ هفته زنده مانی گیاهچه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش تیمار کلشی‌سین برای القای پلی‌پلوئیدی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. پس از رشد کافی گیاهچه‌های زنده مانده در طی چندین واکشت، پس از حدود ۵ ماه، برای بررسی وضعیت پلی-پلوئیدی از روش‌های شمارش کروموزوم نمونه‌های نوک ریشه و فلوسیتومتری نمونه‌های برگی استفاده شد. شمارش کروموزوم انتهای ریشه به روش استواورسین انجام گرفت (Singh, 2002). در روش فلوسیتومتری از دستگاه سیتومتری جریانی با نام Partec موجود در آزمایشگاه سیتوژنتیک بخش بانک ژن موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج استفاده شد.

الف) **ب)** **ج)**

شکل ۱- الف- گیاهچه‌های تولید شده در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA پس از ٦ هفته. ب- گیاهچه‌های تیمار شده با ۰/۲۰ درصد کلشی‌سین به مدت ٤٨ ساعت، ۳ هفته پس از تیمار. ج- گیاهچه‌های زنده مانده در تیمار ۰/۲۰ درصد کلشی‌سین به مدت ٤٨ ساعت، ٦ هفته پس از تیمار.

نتایج:

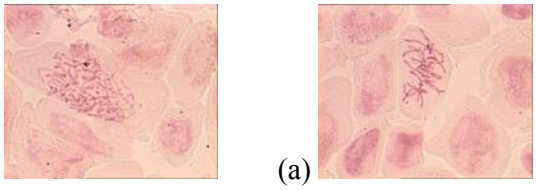
اثر غلظت کلشی‌سین روی زنده ماندن گیاهچه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد اما مدت تیمار و اثر متقابل غلظت کلشی‌سین و زمان تیمار معنی‌دار نشده است. کاربرد کلشی‌سین باعث کاهش زنده ماندن گیاهچه‌ها شد. در تیمار شاهد همه گیاهان تیمار شده زنده ماندند. بین غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱۰ و ۰/۲۰ درصد کلشی‌سین اختلاف معنی‌داری در صفت زنده ماندن گیاهچه‌ها مشاهده نشد (به ترتیب ٤٥/٨، ٤١/٧ و ٤٥/٨ درصد) (جدول۲).

جدول ۲- اثر غلظت کلشی‌سین، زمان و اثرات متقابل زمان و غلظت کلشی‌سین بر درصد زنده مانی و سطح پلوئیدی گیاهچه‌ها در نرگس.

غلظت کلشی سین (درصد)	تعداد گیاهان تیمار شده	درصد زنده مانی گیاهچه‌ها پس از ٤ هفته (تعداد گیاهچه زنده مانده)	درصد گیاهان با سطح پلوئیدی		
			دیپلوئید (۲x)	میکسوپلوئید (۲x +٤x)	تتراپلوئید (٤x)
۰/۰۰	۲٤	(۲٤) ۱۰۰/۰۰ a	۱۰۰	–	–
۰/۰۵	۲٤	(۱۱) ٤٥/۸۳ b	٥٤/٥٥	٤٥/٤٥	–
۰/۱۰	۲٤	(۱۰) ٤۱/٦٦ b	٥۰/۰۰	٥۰/۰۰	–
۰/ ۲۰	۲٤	(۱۱) ٤٥/۸۳ b	٤٥/٤٥	٥٤/٥٥	–
مدت زمان(ساعت)					
۲٤	٤۸	(۱۷) ٦۰/٤۱ a	۳٥/۳۰	٦٤/۷۰	–
٤۸	٤۸	(۱٥) ٥٦/۲٥ a	٦٦/٦٦	۳۳/۳٤	–
اثر متقابل کلشی سین × زمان					
۰/۰۰ و ۲٤	۱۲	(۱۲) ۱۰۰/۰۰a	۱۰۰	–	–
۰/۰۵ و ۲٤	۱۲	(٥) ٤۱/٦٦ b	٤۰/۰۰	٦۰/۰۰	–
۰/۱۰ و ۲٤	۱۲	(٥) ٤۱/٦٦ b	۲۰/۰۰	۸۰/۰۰	–
۰/۲۰ و ۲٤	۱۲	(۷) ٥۸/۳۳ b	٤۲/۸۰	٥۷/۲۰	–
۰/۰۰ و ٤۸	۱۲	(۱۲) ۱۰۰/۰۰a	۱۰۰	–	–
۰/۰۵ و ٤۸	۱۲	(٦) ٥۰/۰۰ b	٦٦/٦۷	۳۳/۳۳	–
۰/۱۰ و ٤۸	۱۲	(٥) ٤۱/٦٦ b	۸۰/۰۰	۲۰/۰۰	–
۰/۲۰ و ٤۸	۱۲	(٤) ۳۳/۳۳ b	٥۰/۰۰	٥۰/۰۰	–

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد در آزمون چند دامنه ای دانکن است.

هیستوگرام‌های بررسی وضعیت DNA هسته‌ای، دو برابر شدن مقدار DNA را در بعضی از سلول‌ها نشان دادند. تعدادی از گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین یک پیک را نشان دادند که با مقایسه این پیک با گیاه شاهد، یکسان بودن مقدار DNA را نشان دادند. این گیاهان به عنوان گیاهان دیپلوئید بدون تغییر در تعداد کروموزوم ارزیابی شدند. تعدادی از گیاهچه‌ها دو پیک نشان دادند. پیک اول مشابه گیاه شاهد بود که مربوط به سلول‌های دیپلوئید است و پیک دوم که دارای محتوای DNA دو برابر گیاه شاهد است مربوط به سلول‌های تتراپلوئید است در واقع این گیاهچه‌ها میکسوپلوئید هستند که به عنوان گیاهان بافت ناهمسان هسته ارزیابی شدند. مقدار DNA هسته ای (شدت نسبی فلورسنس) گیاهان شاهد ٦٤/۲۱ مشخص گردید که پیک دوم گیاهان میکسوپلوئید میزان DNA هسته‌ای را دو برابر آن نشان دادند (شکل ۳). نتایج نهایی حاصل از تعیین سطح پلوئیدی گیاهان با استفاده از شمارش کروموزوم و فلوسیتومتری در جدول ۲ بیان شده است. تعداد کروموزوم سلول‌های نوک ریشه در همه سلولهای گیاهان شاهد برابر۲۰ بود. درگیاهان تیمار شده با کلشی‌سین هر دو حالت تعداد ۲۰ کروموزوم در یک سلول و تعداد ٤۰ کروموزوم در یک سلول دیگر را نشان دادند (شکل۲)



شکل ۲- (راست) شمارش کروموزوم سلول دیپلوئید با تعداد ۲۰ کروموزوم در گیاه شاهد (a) و سلول تتراپلوئید با تعداد ٤۰ کروموزوم در گیاهچه تیمار شده با ۰/۲۰ درصد کلشی‌سین به مدت ٤۸ ساعت (b). (بزرگنمایی x ۱۰۰).

شکل ۳- (چپ) هیستوگرام محتوای DNA هسته‌ای مربوط به نمونه شاهد (۲n =۲x) (بالا) و گیاه میکسوپلوئید (۲x +٤x) حاصل از تیمار کلشی‌سین به غلظت ۰/۲۰ درصد به مدت ٢٤ ساعت (پایین).(هیستوگرام به دلیل مشکل در ارسال آورده نشده،در نسخه پرینت ارسال شده موجود است)

در پژوهش حاضر تعداد ۲۰ کروموزوم در سلول‌های سوماتیک گونه *N. tazetta* مشاهده گردید که با توجه به اندازه و همچنین تعداد با نتایج حاصل از پژوهش Hong (1982) مطابقت دارد. تعداد کروموزوم‌های سلول‌های سوماتیک در گونه *N. tazetta* (۲n = ۲x) در منابع مختلف ١٤، ٢٠، ٢٢، ٢٤ و ٢٨ عدد ذکر شده است (Hong, 1982). کاریوتایپ کروموزوم‌های گونه *N. tazetta* را بررسی کرد و تعداد ۲۰ کروموزوم را مشاهده کرد که ٦ جفت آنها بلند و ٤ جفت آنها کوتاه بودند. هدف از پژوهش حاضر افزایش سطح پلوئیدی در این گونه از نرگس بود که پس از واکشت های متوالی گیاهچه‌های زنده مانده و بررسی سطح پلوئیدی آنها، گیاه تتراپلوئید خالصی مشاهده نگردید. در گیاهان نهاندانه مریستم انتهایی از دو منطقه مشخص و مجزا که هر یک بخشی از گیاه را ایجاد می کنند تشکیل شده است. هر کدام از این مناطق مریستمی از لایه‌های متعددی تشکیل شده‌اند. از آنجائی‌که این مناطق مسئول تولید بخش های رشد یافته جدید هستند، بنابراین افزایش سطح پلوئیدی در تمامی لایه های مریستمی ضروری است (Jones et al., 2008). در صورتیکه دو برابر کردن کروموزوم‌ها فقط در یکی یا تعدادی از لایه‌ها رخ دهد حالتی از بافت ناهمسانی که بافت ناهمسانی هسته‌ای نامیده می شود رخ می‌دهد. در این حالت سلول‌هایی با دو سطح پلوئیدی در کنار هم قرار خواهند گرفت. در پژوهش حاضر نیز به جای تولید گیاهچه‌های تتراپلوئید خالص، گیاهچه هایی با سطح پلوئیدی میکسوپلوئید (حاوی بافت دیپلوئید و تتراپلوئید) مشاهده گردید.

منابع:

1. Escandon, A.S., Alderete, L.M. & Hagwara, J.C. (2007). *In vitro* polyploidization of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America. Scientia Horticulturae, 115, 56-61.
2. Hanks, G.R. (2002) Commercial production of Narcissus bulbs. In: G.R. Hanks (ed), Narcissus and Daffodil. Taylor & Francis Inc., pp. 53-131.
3. Hong, D. (1982). A new karyotype for *Narcissus tazetta*. Hereditas, 97: 29-31.
4. Jones, J.R., Ranney, T.G. & Eaker, T.A. (2008). A Novel method for inducing polyploidy in *Rhododendron* seedlings. Journal of American Rhododendron Society, 130- 135
5. Mathew, B. (2002). Classification of the genus *Narcissus*. In: G.R. Hanks (ed), Narcissus and Daffodil. Taylor & Francis Inc., pp. 30- 53.
6. Singh, R.J. (2002). Plant Cytogenetics, (Second Edition). CRC Press. 512 p.
7. Thao, N.T.P., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y. & Okuba, H. (2003). Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 72: 19 -25.

polyploidy in vitro induction in narcissus (*Narcissus tazetta*)

Abstract:

In this research from I*n vitro* grown plantlets were used for polyploidy induction with colchicine . Plantlets were treated by colchicine at four concentrations (0.00, 0.05, 0.10 and 0.20 %) for 24 and/or 48 h and the percentage of explants survival rate were measured. Survived explants were analyzed for ploidy level by counting chromosome numbers of root tip cells by using acetoorceine squash method and by neclei DNA content of leaf samples by flow cytometry. The effect of colchicine concentrations on plantlet survival was significant at the level of 1%. However, treatment duration and their interaction were not significant. there was no significant difference among the colchicine concentrations on plantlets survival (0.05, 0.10 and 0.20%) Results of ploidy evaluation indicated the cells with two ploidy levels, diploid ones with 2x=20 chromosomes and mixoploids ones with 2x=20 and 4x=40 chromosome tissues. Also the obtained results from ploidy level determination with flow cytometry were similar with those from chromosome counting of root tip cells. From survived plantlets 16 diploid plantlet and 16 mixoploid plantlets were evaluated. After several subculture there was no tetraplpid plant.

Key words: colchicines, polyploidy, chromosome counting, flow cytometry.