مضاعف سازی کروموزمهای سیب زمینی از طریق تیمار جوانه با دزهای مختلف کلشیسین

شهناز فتحی (۱) ،سیروس مسیحا (۲)، جابر پناهنده (۳)
۱- مدرس دانشگاه آزاد واحد میاندوآب ۲ - استاد دانشگاه تبریز ۳- استاد دانشگاه تبریز

این تحقیق به منظور مضاعف‌سازی کروموزوم‌های دیپلوئید *solanum commersonii* 2x(2EBN) و هیبرید تریپلوئید (*S.acaule* × *S.phureja*) 3X (2EBN) به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرارو چهار فاکتور(ژنوتیپ،جوانه ،غلظت کلشیسین ومدت زمان) انجام گرفت .ابتدا گیاهان با اندازه مناسب را بدست آورده، بعد از سر برداری جوانه اول و دوم و سوم، با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد کلشیسین، به مدت ۲٤ و ٤۸ ساعت تیمار شدند. سپس شاخه های حاصل از جوانه تیمار شده، جهت تعیین سطح پلوئیدی لایه L_1 بررسی شدند. برای این کارقطعه کوچکی از اپیدرم تحتانی برگ جدا و تعداد کلروپلاست‌های سلول های روزنه آن شمارش شد. نتایج حاصله نشان داد که ، فاکتورهای مورد بررسی تأثیر معنی‌داری روی مضاعف‌سازی کروموزمی داشته اند. هیبرید تریپلوئیدبا۳٤/۸٤درصد، جوانه اول با٤٥/۹۹ درصد ،کلشیسین در غلظت۱/۵درصد با۳۵/۸درصد و مدت زمان ٤۸ ساعت با۳۳/۹۸ درصد بهترین سطوح بوده اند. اما بین فاکتورها اثرات متقابل معنی‌داری وجود نداشت.

مقدمه:

سیب زمینی زراعی solanum tuberosom L.(2n = 4x = 48) یکی از محصولات غذایی مهم دنیا است و از نظر داشتن خویشاوندان وحشی و تنوع ژرم پلاسم جایگاه ویژه ای داشته ودر میان گونه های وحشی،ژنوتیپ های مقاوم به انواع بیماری ها وآفات وجود دارد. که اصلاحگران سعی دارند این صفات را به گونه های زراعی انتقال دهند. برای این کار پس از دورگ گیری با استفاده از بذر حقیقی(TPS) به ژنوتیپ های مورد نظر رسیده سپس نتاج حاصل از تلاقی های مورد نظر با تکثیر رویشی تثبیت می گردد.زیرا به استثنای جهش های نادر،هر کلون کاملاً شبیه گیاه مادر است. اما مشکل اساسی در مرحله دورگ گیری بین گونه های وحشی و زراعی ، نامتعا دل بودن عدد توازنی آندوسپرم (EBN) می باشد. در گونه های زراعی سیب زمینی EBN=٤ می باشد در حالیکه بیشتر گونه های وحشی EBN پایین تری دارند. بنابراین جهت دورگ گیری لازم است یکسان سازی EBN صورت گیرد برای این کار از دو طریق عمل می شود یا از طریق کاهش سطح پلوئیدی گونه های زراعی و سپس تلاقی با گونه های وحشی، یا افزایش سطح پلوئیدی گونه های وحشی و تلاقی با دی هاپلوئیدهای گونه های زراعی.از جمله روشهای کاهش سطح پلوئیدی، تولید هاپلوئید ها و از روشهای افزایش سطح پلوئیدی، تولید گامت های ۲n (Carputo, et al., 2003) ، مضاعف سازی از طریق کشت بافت،یا مضاعف سازی سوماتیکی از طریق In vivo یعنی تیمار مریستم های گیاهی با مواد مضا عف کننده می باشد. در این تحقیق ، مطالعه روی مضاعف سازی کروموزمهای گونه سولانوم کامرسونی وهیبرید تریپلوئید(حاصل از تلاقی سولانوم آکول و سولانوم فوریا) صورت گرفت.که در برنامه های اصلاحی جایگاه ویژه ای دارند. سولانوم کامرسونی به عنوان یک گیاه مدل برای مقاومت به سرما و یخبندان در بین گونه های سیب زمینی معرفی شده است(Laferer et al,1999). بعلاوه مقاومت به استرسهای زیستی ، مقاومت به نماتدها،بیماری آلترناریا و مقاومت به پژمردگی باکتریایی از جمله ویژگیهای آن می باشد.(Bomberg et al.1994). سولانوم آکول یک تتراپلوئید دی سومیک و دارای مقاومت به ویروس X,Y ، ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی و ویروئید دوکی

شدن غده می باشد(Watanabe et al,1991). بنابراین با توجه به اهمیت این دو گونه ، این تحقیق ، به منظور تعیین تأثیر ژنوتیپ ، غلظت ومدت زمان مناسب تیمار باکلشیسین وموقعیت جوانه روی مضاعف سازی، بررسی شد.

مواد و روشها

این آزمایش در فیتوترون دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام گرفت. برای تهیه بستر از مخلوط ۲:۱ ماسه به پرلیت استفاده شد و برای تغذیه گیاهان از محلول غذایی هوگلند استفاده شد. جهت تیمار جوانه ها با استفاده از محلول کلشیسین یک روز قبل ازتیمار، گیاهان سربرداری شده و سپس پنبه آغشته به محلول کلشیسین روی جوانه‌های جانبی قرار داده شد و به منظور تامین رطوبت ، گلدان با پلاستیک کاملاً پوشیده شد.بعد از پایان مدت تیمار پنبه ها از روی جوانه ها برداشته شده و محل جوانه ها به منظور برطرف کردن اثر کلشیسین، شستشو داده شد.در مدت رشد جوانه های تیمار شده، جهت از بین بردن رقابت، همه جوانه ها ی جانبی جز جوانه های تیمار شده حذف شدند. پس از رشد جوانه ها، از هر شاخه یک نمونه برگی برداشته و سپس قطعه ای از اپیدرم تحتانی برگ را تهیه و با شمارش تعداد کلروپلاستهای سلولهای گارد، سطح پلوئیدی لایه L1تعیین شد. در حالت دیپلوئیدی ۱۱الی ۱۵ کلروپلاست، در تریپلوئید ۱۶الی ۱۸و در حالت تتراپلوئید ۱۹الی ۲۵ عدد می باشد.در پلوئیدهای بالاتر تعداد کلروپلاست به طور معنی داری افزایش می یابد.

نتایج

نتایج حاصل از تیمار جوانه با غلظت‌های مختلف کلشیسین و شمارش تعداد کلروپلاستهای آن نشان داد که بین چهار فاکتور ژنوتیپ، جوانه، غلظت و زمان اثر متقابل معنی‌داری وجود ندارد. به عبارت دیگر فاکتورها به طور مستقل روی مضاعف‌سازی کروموزومی تأثیر می‌گذارند و تأثیرات هر فاکتور در سطوح فاکتور دیگر روند خاصی ندارد. میزان مضاعف شدن کروموزمی در گونه تریپلوئید۳٤/۸٤ درصد و در گونه سولانوم کامرسونی۲۷ درصد بود جوانه اول با (٤٥/۹) درصد و کمترین میزان آن مربوط به جوانه سوم (۱۹/۷۸) درصد می‌باشد که به نظر می رسد این موضوع مربوط به غالبیت انتهایی و فعالیت رشد بیشتر در جوانه اول نسبت به جوانه دوم و سوم باشد. بیشترین مقدار مضاعف شدگی (۳۵/۸۰ درصد) مربوط به غلظت ۱/۵ درصد و کمترین مقدار آن مربوط به غلظت ۰/۵ درصد یعنی (۲٦/۷۳) درصد می‌باشد. نتایج حاصل از مطالعات آجیلین و همکاران روی گیاه زینتی بنفشه(Ajalin,et al. 2001)، نیز نشان داند که بین غلظت کلشیسین و مضاعف شدگی کروموزمی رابطه مثبت و معنی داری وجود دارد. و مدت زمان ٤۸ ساعت (با میانگین مضاعف سازی ۳۳/۹۸درصد) نسبت به مدت زمان ۲٤ ساعت (با میانگین مضاعف سازی ۲۷/۸۷درصد) تأثیر بیشتری داشت. دی ماین و فانتس (De main and Fantes,. 1983) در تیمار فلفل دولمه ای با کلشیسین نتیجه مشابهی گرفتند. بطور کلی روش مضاعف سازی سوماتیکی کروموزمها با استفاده از کلشیسین نسبت به سایر روشها هزینه کمتری در بر دارد. و همانند کشت بافت و امتزاج پروتوپلاست مشکلات آداپته شدن، به محیط گلخانه را ندارد. اما این روش مشکل و وقت گیر است.

منابع

1- Ajalin I., Kobza F., 2001. Chromosome number doubling of *Viola* × *wittrockiana* Gams. Through colchicine treatment and its effect on early plant development. Hort. Sci. Vol. 28: 150-156.
2- Bomberg LB. Martin M.W. Scharterr J. 1994. Elite selection of tuber bearing solanum species germplasm. Inter- regional potato introduction station. NRSP 6. Sturgeon bay. Wisconsin.
3- Carputa, D., L . Frusciant and S.J. Peloquin. 2003. The role of 2n gametes and endsperm balance number in the origin and evolution of polyploidy in the tuber – bearing sloanum. Genetics. Vol.163:287-294.
4- Laferre, L. T. and J. P. Helye . C. Allen. 1999. Fertil *Solanum tuberusum+S.commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *raslstonia solanaceurum*.
5-Watanabe, K. ,c. Arbizu and P.E.schmiediche, 1991, Potato germ plasm enhancement with disomic tetraploid *solanum acaule*.I.Efficiency of introgression.Genome.vol.35:53-**57.**

Doubling potato chromosome by treatment buds with different doze of Colchicines

Abstract :

The aim of this research was to double the somatic chromosome number of *solanum commersonii* 2x(2EBN) and triploid hybrid *(S.acaule* × *S.phureja*) 3X (2EBN) by colchicine .This research was tested by using factorial experiment, based on completely randomized design.

at first, suitable plant material was obtained and pinched ,then first , second and terth buds were treated with colchicine solution (%0.5, %1, %1.5) for 24 and 48 hours . chloroplast in stomata guard cells was counted to determine (L1), the results showed that triploid hybrid with (%34.84), first bud (%45.99), colchicine %1.5 (%35.8) and 48 hours (%33.98) were the best level, of factors.