تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۵ شماره ۴، اسفندماه ۱۳۹۱

بررسی ریزازدیادی و اثر کلشی‌سین جهت القای درون شیشه‌ای پلوئیدی در گیاه نرگس (*Narcissus tazetta*)

معصومه احمدی مجد[۱]، حسن ساری‌خانی[۲]*، مهرداد چایی‌چی[۳] و عبدالکریم کاشی[۴]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۲*- **نویسنده مسؤول:** استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان (sarikhani@basu.ac.ir)

۳- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان

۴- استاد گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۱ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۳۰

چکیده

در این پژوهش ریزازدیادی نرگس گونه *Narcissus tazetta* با کمک ریزنمونه‌های دوفلسی سوخ با استفاده از غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین و پس از آن غلظت های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر ایندول استیک اسید به همراه ۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آدنین در مرکز تحقیقات کشاورزی و صنایع طبیعی همدان بررسی شد. در زمان‌های ٤ و ٦ هفته پس از کشت صفات طول برگ و تعداد سوخچه مورد ارزیابی قرار گرفتند. از گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای جهت القای پلی پلوئیدی با کلشی‌سین استفاده شد. گیاهچه‌ها با کلشی‌سین در چهار غلظت (۰/۰۰، ۰/۰۵، ۰/۱۰ و ۰/۲۰ 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 فلوسایتومتری نمونه های برگی مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر 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. کاربرد کلشی‌سین باعث کاهش معنی دار زنده مانی گیاهچه‌ها گردید. بین غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱۰ و ۰/۲۰ درصد کلشی‌سین اختلاف معنی‌داری در صفت زنده مانی گیاهچه‌ها مشاهده نشد. در نهایت از تعداد ۷۲ گیاهچه تیمار شده با کلشی سین تعداد ۳۲ گیاهچه زنده ماندند. نتایج ارزیابی‌های سطح پلوئیدی وجود سلول‌هایی را با دو سطح پلوئیدی دیپلوئید با تعداد ۲۰ کروموزوم و تتراپلوئید با تعداد ٤٠ کروموزوم را نشان دادند. همچنین نتایج حاصل از فلوسایتومتری، 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. بالاترین میزان میکسوپلوئیدی در تیمار ۰/۱۰ ٪ کلشی‌سین و مدت تیمار ٢٤ ساعت به دست آمد. هیچ گیاهی با سطح پلوئیدی تتراپلوئید خالص پس از چندین واکشت مشاهده نشد.

کلید واژه‌ها: نرگس، ریزازدیادی، پلی‌پلوئیدی، کلشی‌سین، شمارش کروموزوم، فلوسایتومتری

مقدمه

گیاه نرگس یکی از گیاهان زینتی پیازدار و متعلق به خانواده آماریلیداسه[۱] است که از نظر شکل برگ، تاج گل و همچنین رنگ و اندازه گل دارای تنوع بسیاری است (متیو[۲]،۲۰۰۲). نرگس یکی از ۶ جنس مهم گل‌های سوخ‌دار در جهان است که پس از لاله در مقام دوم

1– Amaryllidaceae

2- Mathew

کشت و کار قرار دارد (دی هرتوق[1]، ۱۹۹۶). اغلب گونه‌های مورد بررسی نرگس دیپلوئید هستند. در جنس نرگس گونه‌هایی با پایه کروموزومی مختلف x=۷، x=۱۰ و x =۱۱ وجود دارند (وان تویل و همکاران[2]،۲۰۰۲). تعداد کروموزوم پایه در گونه *N. tazetta*، x =۱۰ و ۲n =۲x =۲۰ گزارش شده است (هونگ[3]،۱۹۸۲). سرعت ازدیاد جنسی و روی شی نرگس بسیار کند است و فقط سوخ‌هایی با اندازه خیلی درشت به طور مطمئنی گلدهی دارند (هانکس[4]، ۲۰۰۲a). ازدیاد نرگس به کمک روش‌های دوفلسی و قاشی با موفقیت انجام شده است (فلینت و همکاران[5]، ۱۹۸۳ ؛ هانکس و ریس[6]، ۱۹۷۹ ؛ لین فیلد و همکاران[7]، ۱۹۹۰). ریزازدیادی ؛ با استفاده از هورمون‌های اکسین و سایتوکینین و ریزنمونه‌های مختلف مانند فلس‌های دوتایی، ساقه گل‌دهنده، برگ و کالوس در تعدادی از گونه‌های نرگس سبب بهبود تکثیر این گیاه شده است (چن و همکاران[8]، ۲۰۰۵ ؛ سیج و همکاران[9]، ۲۰۰۰ ؛ سانتوز و همکاران[10]، ۱۹۹۸).

کار بهنژادی محدودی در نرگس تاکنون صورت گرفته است. در یک برنامه تحقیقاتی مقاومت به پوسیدگی انتهایی سوخ بررسی شده است. از طریق دورگ گیری، ارقام تجاری بزرگ‌تر و قوی‌تر نسبت به والدین وحشی تولید شده است. همچنین گل‌هایی باشیپور زرد و فنجان بزرگ و دارای مقاومت نسبی به پوسیدگی انتهایی از طریق دورگ گیری به وجود آمده‌اند (هانکس، ۲۰۰۲a). پژوهش‌های زیادی برای ایجاد مقاومت به پوسیدگی قارچی فوزاریوم در گیاه نرگس انجام شده است. همچنین اصلاح جهشی نرگس با استفاده از اشعه گاما گزارش شده است (هانکس، a ۲۰۰۲). با توجه به پژوهش‌های اصلاحی انجام شده و اهمیت نرگس به عنوان یکی از گل‌های سوخ دار، 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 سوخ و تنش‌های محیطی باشند و در تمام طول سال قابل تولید باشند از اهداف اصلی بهنژادی انواع مختلف نرگس به شمار می روند (هانکس، ۲۰۰۲a؛ هانکس، ۲۰۰۲b).

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 (اهدائی، ۱۳۷۹). 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 (فارسی و باقری، ۱۳۷۷). 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 (اسکاندون و همکاران[11]، ۲۰۰۷). برای القای پلی‌پلوئیدی از بخش‌های مختلف گیاه مانند بذور در حال جوانه زنی، غنچه‌های بسیار جوان یا مناطق مریستمی نوک جوانه‌ها می‌توان استفاده کرد (اهدائی، ۱۳۷۹). بسته به نوع گیاه، کلشی‌سین با غلظت ۰/۰۵ تا ۰/۵ درصد به مدت چند ساعت تا چند روز برای القای پلی‌پلوئیدی به کار می‌رود (فارسی و باقری، ۱۳۷۷). تأثیر کلشی‌سین (۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ درصد) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در گیاه زینتی *Mecardonia tenella* روی گیاهان رشد یافته در شرایط درون

1- De Hertogh
2- Van tuyl *et al.*
3- Hong
4- Hanks
5- Flint *et al.*
6-Hanks & Rees
7- Linfield *et al.*
8- Chen *et al.*
9- Sage *et al.*
10- Santos *et al.*
11- Escandon *et al.*

شیشه‌ای بررسی شد و گیاهان تتراپلوئید تولید شده گل‌ها و برگ‌های درشت‌تر داشتند (اسکاندون و همکاران، ۲۰۰۷). در گل اطلسی گیاهچه‌های حاصل از بساک به مدت ۵ ساعت با ۰/۱ درصد کلشی‌سین تیمار شدند، ۸۰ درصد گیاهان زنده مانده دو برابر شدن تعداد کروموزوم را نشان دادند (حسندخت و ابراهیمی، ۱۳۸۵). تیمار درون شیشه‌ای نهال‌های آزالیا با غلظت ۰/۰۵ و ۰/۲۵ درصد کلشی‌سین اثری روی سطح پلوئیدی نداشت (جونز و همکاران[1]، ۲۰۰۸). 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 (تائو و همکاران[2]، ۲۰۰۳).

با توجه به اینکه القای پلی‌پلوئیدی به عنوان یکی از روش‌های اصلاحی در بسیاری از گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است، اما تاکنون در نرگس گونه *Narcissus tazetta*. بررسی نشده است. 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 پلی-پلوئیدی 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 سوخ‌های نرگس گونه *Narcissus tazetta* از گلخانه‌ای در شمال کشور تهیه گردید. در این آزمایش از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار به عنوان محیط پایه استفاده شد. pH محیط کشت قبل از اضافه کردن آگار روی ۰/۱± ۵/۷ تنظیم شد و پس از حل شدن آگار به میزان ۳۰ میلی‌لیتر در شیشه‌های ۲۰۰ میلی‌لیتری توزیع گردید و در شرایط دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند. سوخ‌ها پس از تیمار آب گرم ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، در محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد تیمار شدند و پس از برش به مدت ۸ دقیقه با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد ضدعفونی سطحی شدند. پس از جدا کردن قسمت‌های لزج، ریزنمونه‌های دو فلسی (دو فلس و جوانه وسط آنها با قسمتی از صفحه پایگاهی) به صورت عمودی به گونه‌ای که صفحه پایگاهی درون محیط کشت قرار گیرد، کشت شدند. کشت‌های انجام شده در اتاقک رشد با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۱± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای بررسی شاخه‌زایی از هورمون بنزیل آدنین (BA) در ۴ غلظت (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. سپس برای افزایش رشد گیاهچه‌های بدست آمده، از هورمون ایندول استیک اسید (IAA) در چهار غلظت (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین استفاده شد. هر دو آزمایش فوق در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و دو شیشه در هر تکرار و سه گیاهچه در هر شیشه انجام شدند و در زمان‌های ۴ و ۶ هفته پس از کشت صفات طول برگ و تعداد سوخچه اندازه‌گیری شدند.

آزمایش تیمار کلشی‌سین برای القای پلی‌پلوئیدی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور غلظت کلشی‌سین در چهار سطح (۰/۰۰، ۰/۰۵، ۰/۱۰ و ۰/۲۰ درصد) و زمان تیمار در دو سطح (۲۴ و ۴۸ ساعت) با سه تکرار و دو شیشه در هر تکرار و چهار گیاهچه در هر شیشه انجام شد. برای تهیه محیط کشت حاوی کلشی‌سین، ابتدا محیط کشت MS به روش معمول تهیه گردید و پس از توزیع به میزان ۳۰ میلی‌لیتر در شیشه‌های ۲۰۰ میلی‌لیتری، در اتوکلاو با شرایط بالا

1- Jones *et al.*
2- Thao *et al.*

ضدعفونی شده و به زیر لامینار فلو منتقل شدند. سپس با توجه به حساس بودن کلشی‌سین به گرما، استوک محلول کلشی‌سین تهیه گردید. محلول کلشی‌سین با استفاده از فیلتر سرسرنگی استریل با قطر منافذ ۰/۲ میکرومتر ضدعفونی شد و قبل از جامد شدن محیط کشت درون شیشه‌ها، به مقدار لازم به هر کدام از شیشه-ها اضافه گردید. برای القای پلی‌پلوئیدی از گیاهچه‌های پرورش یافته در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شد (شکل ۱). گیاهچه‌هایی با طول یک تا دو سانتی‌متر در شیشه-های حاوی کلشی‌سین واکشت شده و پس از ۲۴ یا ۴۸ ساعت گیاهچه‌های تیمار شده با آب مقطر استریل شستشو شده و به محیط کشت MS بدون کلشی‌سین منتقل شدند. پس از گذشت ۴ هفته زنده‌مانی گیاهچه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه آماری داده‌های رشدی گیاهچه‌ها و صفت زنده‌مانی آنها توسط نرم افزار SAS صورت گرفت و از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد.

پس از رشد کافی گیاهچه‌های زنده مانده در طی چندین واکشت، پس از حدود ۵ ماه، برای بررسی وضعیت پلی‌پلوئیدی از روش‌های شمارش کروموزوم نمونه‌های نوک ریشه و فلوسایتومتری نمونه‌های برگی استفاده شد. شمارش کروموزوم انتهای ریشه به روش استواورسین انجام گرفت (ساینگ[1]، ۲۰۰۲). برای این منظور، ۳ تا ۴ میلی‌متر انتهای ریشه‌ها بریده شده و در محلول کلشی‌سین ۰/۵ درصد به مدت چهار ساعت قرار گرفتند. سپس ریشه‌ها با آب مقطر به مدت ۲۰ دقیقه شسته شدند و به مدت ۲۴ ساعت در تثبیت کننده فارمر (اسید استیک ۱ : اتانول ۳) قرار گرفتند. پس از شستشو با آب مقطر، به مدت یک ساعت در اسید کلریدریک یک نرمال در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس برای رنگ آمیزی از استواورسین ۱ درصد در شرایط دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید و با استفاده از ۱ میلی‌متر انتهای ریشه که نسبت به بقیه قسمت‌ها پررنگ‌تر بود، لام تهیه و با میکروسکوپ نوری و بزرگ نمایی ۴۰ و ۱۰۰، کروموزوم‌ها شمارش شدند.

شکل ۱- الف- پیازچه‌های تولید شده در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیترIAA ، ۸ هفته پس از کشت. ب- گیاهچه‌های تولید شده در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA پس از ٦ هفته. ج- گیاهچه‌های تیمار شده با ۰/۲۰ درصد کلشی‌سین به مدت ٤٨ ساعت، ۳ هفته پس از تیمار. د- گیاهچه‌های زنده مانده در تیمار ۰/۲۰ درصد کلشی‌سین به مدت ٤٨ ساعت، ٦ هفته پس از تیمار.

در روش فلوسایتومتری از دستگاه سایتومتری جریانی با نام پارتک[2] موجود در آزمایشگاه سیتوژنتیک بخش بانک ژن موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج استفاده شد. در این روش حدود یک سانتی‌متر مربع از بخش رشد یافته برگ‌های گیاهان تیمار شده و شاهد نرگس به صورت جداگانه در پتری‌دیش کوچک قرار داده شدند و به آن ۵۰۰ میکرولیتر بافر ایزولاسیون کننده هسته Partec اضافه و نمونه‌ها با تیغه اسکالپل

1- Singh

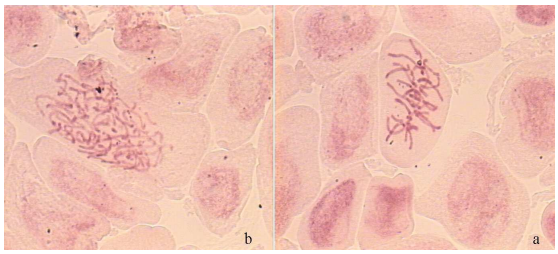
2- Partec

تمیز کاملاً ریز شدند. برای رنگ آمیزی از ۴ و ۶ دی آمیدینو -۲ – فنیلیندل با علامت اختصاری DAPI استفاده شد. این رنگ به صورت کمپلکس در نواحی باز A-T باند می‌شود و بین بازها قرار نمی‌گیرد. پس از ۴-۳ دقیقه نمونه‌ها به وسیله قیف‌های ویژه با قطر منافذ ۳۰ میکرومتر صاف و درون تیوپ مخصوص دستگاه ریخته شد و تیوپ روی سنسور دستگاه قرار گرفت. پیک‌های به دست آمده از آنالیز نمونه‌های مختلف جهت بررسی وضعیت DNA هسته‌ای گیاهان شاهد و تیمار شده مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این مطالعه از گیاه جعفری[1] به عنوان گیاه شاهد استفاده شد که مقدار 2CDNA آن برابر با ۴/۴ پیکو گرم می‌باشد.

نتایج

نتایج نشان داد اثر بنزیل آدنین بر رشد طولی برگ‌ها پس از ۴ و ۶ هفته در سطح احتمال یک درصد و تولید سوخچه پس از ۶ هفته در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. بیشترین رشد طولی برگ‌ها با میانگین ۲/۶۵ سانتی متر در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و کمترین رشد طولی برگ‌ها در تیمار شاهد مشاهده شد (۰/۷۹ سانتی‌متر) که تیمار شاهد با تیمارهای ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌دار نداشت. کاربرد غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین باعث رشد جوانه‌ها و در نهایت تولید سوخچه گردید. در تیمارهای شاهد و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هیچ سوخچه‌ای تولید نشد (جدول ۱). اثر غلظت‌های مختلف هورمون ایندول استیک اسید در ترکیب با ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین بر رشد طولی برگ‌ها پس از ۴ و ۶ هفته و تولید سوخچه پس از ۶ هفته معنی‌دار نشد (داده ها آورده نشده اند).

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 ترتیب۴۵/۸، ۴۱/۷ و ۴۵/۸ درصد) (جدول۲). تعداد کروموزوم سلول‌های نوک ریشه در همه سلولهای گیاهان شاهد برابر ۲۰ بود. در گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین هر دو حالت تعداد ۲۰ کروموزوم در یک سلول و تعداد ۴۰ کروموزوم در یک سلول دیگر را نشان دادند (شکل۲).



شکل ۲- شمارش کروموزوم سلول دیپلوئید با تعداد ۲۰ کروموزوم در گیاه شاهد (a) و سلول تتراپلوئید با تعداد ٤٠ کروموزوم در گیاهچه تیمار شده با ۰/۲۰ درصد کلشی‌سین به مدت ٤٨ ساعت (b). (بزرگنمایی x ۱۰۰) .

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

1- *Petroselinum crispum*

ناهمسان هسته ارزیابی شدند. مقدار DNA هسته‌ای (شدت نسبی فلورسنس) گیاهان شاهد ۶۴/۲۱ 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 فلوسایتومتری در جدول ۲ بیان شده است.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف هورمون بنزیل آدنین بر رشد طولی برگ‌ها و تولید سوخچه

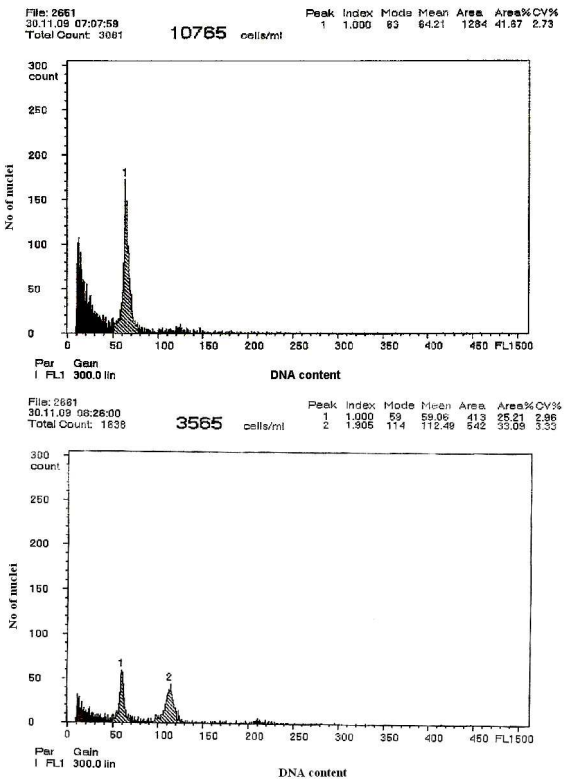
غلظت BA (میلی‌گرم در لیتر)	رشد طولی برگ ها (سانتیمتر)		تولید سوخچه
	پس از ۴ هفته	پس از ۶ هفته	پس از ۶ هفته
۰	۰/۶۷b	۰/۷۹ b	۰/ ۰b
۰/۵	۱/۱۸ b	۱/۳۵ b	۰/۰ b
۱	۱/۲۲ b	۱/۶۷ b	۰/۲۵ab
۲	۲/۲۷a	۲/۶۵a	۰/۵۰ a

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ ٪ در آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

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	۲۴	(۲۴) ۱۰۰/۰۰ a	۱۰۰	–	–
۰/۰۵	۲۴	(۱۱) ۴۵/۸۳ b	۵۴/۵۵	۴۵/۴۵	–
۰/۱۰	۲۴	(۱۰) ۴۱/۶۶ b	۵۰/۰۰	۵۰/۰۰	–
۰/ ۲۰	۲۴	(۱۱) ۴۵/۸۳ b	۴۵/۴۵	۵۴/۵۵	–
مدت زمان(ساعت)					
۲۴	۴۸	(۱۷) ۶۰/۴۱ a	۳۵/۳۰	۶۴/۷۰	–
۴۸	۴۸	(۱۵) ۵۶/۲۵ a	۶۶/۶۶	۳۳/۳۴	–
اثر متقابل کلشی سین × زمان					
۰/۰۰ و ۲۴	۱۲	(۱۲) ۱۰۰/۰۰a	۱۰۰	–	–
۰/۰۵ و ۲۴	۱۲	(۵) ۴۱/۶۶ b	۴۰/۰۰	۶۰/۰۰	–
۰/۱۰ و ۲۴	۱۲	(۵) ۴۱/۶۶ b	۲۰/۰۰	۸۰/۰۰	–
۰/۲۰ و ۲۴	۱۲	(۷) ۵۸/۳۳ b	۴۲/۸۰	۵۷/۲۰	–
۰/۰۰ و ۴۸	۱۲	(۱۲) ۱۰۰/۰۰a	۱۰۰	–	–
۰/۰۵ و ۴۸	۱۲	(۶) ۵۰/۰۰ b	۶۶/۶۷	۳۳/۳۳	–
۰/۱۰ و ۴۸	۱۲	(۵) ۴۱/۶۶ b	۸۰/۰۰	۲۰/۰۰	–
۰/۲۰ و ۴۸	۱۲	(۴) ۳۳/۳۳ b	۵۰/۰۰	۵۰/۰۰	–

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



شکل۳- 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 ۲٤ ساعت (پایین)

بحث

در بسیاری از گیاهان سوخدار ریزنمونه‌های دو فلسی سوخ برای تولید سوخچه استفاده شده است و تولید موفق گیاهچه از فلس‌های دوتایی در نرگس (سانتوز و همکاران، ۱۹۹۸) گونه‌های لیلیوم (هان و همکاران[1]، ۲۰۰۵) و کرتانتوس (موران و همکاران[2]، ۲۰۰۳) گزارش شده است. در پژوهش حاضر استفاده از ریزنمونه‌های دوفلسی سوخ نتیجه مطلوبی داشت. تولید سوخچه و رشد گیاهچه در محیط کشت MS بسیار کند بود اما استفاده از سایتوکینین برای تحریک رشد، افزایش رشد طولی برگ‌ها و تحریک به تولید سوخچه مؤثر بود به طوریکه غلظت بالای آن باعث تولید تعداد مطلوب سوخچه گردید. به طور کلی سایتوکینین‌ها پرآوری و تولید سوخچه را افزایش می‌دهند (هان و همکاران، ۲۰۰۵؛ سانتوز و همکاران، ۱۹۹۸). همچنین به دلیل تاثیر بر تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلولی باعث رشد طولی بهتر گیاهچه‌ها می‌شود (یوسف[3]، ۱۹۹۴) که با نتایج به دست آمده در گیاه کرتانتوس (موران و همکاران، ۲۰۰۳) و سلیویا (ران و سیمپسنون[4]، ۲۰۰۵) مطابقت دارد. در بین سایتوکینین‌ها، بنزیل آدنین به علت تأثیر زیاد آن در تشکیل شاخه نابجا به میزان زیادی در پژوهش‌های درون شیشه‌ای در گیاهان مختلف به کار رفته است (هان و همکاران، ۲۰۰۵). در خصوص تولید سوخچه پس از ۴ هفته در هیچ تیماری سوخچه تولید نشد و پس از ۶ هفته سوخچه‌ها روی برگ‌های پیر به وجود آمدند. به نظر می‌رسد برای تولید سوخچه، گیاهچه‌ها باید مدت زمان بیشتری در محیط کشت قرار گیرند که این امر با نتایج سانتوز و همکاران (۱۹۹۸) مطابقت دارد که در یک دوره ۷۰ روزه، سوخچه‌های کوچک روی برگ‌های پیر به وجود آمدند.

کلشی‌سین یکی از مواد ضد میتوزی است که به طور وسیعی برای القای پلی‌پلوئیدی در بسیاری از گونه‌ها استفاده شده است (جونز و همکاران، ۲۰۰۸). در این پژوهش کاربرد کلشی‌سین باعث دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌های برخی از سلول‌ها و در نهایت میزان DNA هسته‌ای در این سلول‌ها گردید. پیک‌های به دست آمده توسط دستگاه فلوسایتومتری و شمارش کروموزوم نوک ریشه این موضوع را تائید می‌کند. به طور معمول کلشی‌سین بسته به نوع گیاه در غلظت‌های کمتر از ۰/۵ درصد به مدت چند ساعت تا چند روز به کار می‌رود (فارسی و باقری، ۱۳۷۷). غلظت‌های بیشتر معمولاً باعث سوختگی کامل و از بین رفتن گیاهچه‌های

1- Han *et al.*
2- Moran *et al.*
3- Youssef
4- Ran & Simpson

تیمار شده می‌شوند. در پژوهش حاضر غلظت ۰/۲٪ کلشی‌سین باعث بیشترین سوختگی و در نتیجه کمترین میزان زنده مانی گیاهچه‌ها شد. این نتایج با بررسی‌های انجام شده روی سوسن که غلظت ۰/۲ درصد سبب از بین رفتن تعداد قابل توجهی از گیاهان شد (وو و همکاران[1]، ۲۰۰۷) و گیاه زرشک که با افزایش غلظت از ۰/۰۲ به ۰/۲ درصد میزان بذرهای زنده از ۷۶ درصد به ۲۶ درصد کاهش یافت مطابقت دارد (لهرر و همکاران[2]، ۲۰۰۸). علاوه بر غلظت کلشی‌سین، زمان تیمار نیز عامل مؤثری در زنده مانی گیاهچه ها و تغییر سطح پلوئیدی است (لهرر و همکاران، ۲۰۰۸ ؛ روبولوزا و همکاران[3]، ۲۰۰۷ ؛ تائو و همکاران، ۲۰۰۳). اما در آزمایش حاضر اختلاف معنی داری بین زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت از لحاظ زنده‌مانی گیاهچه‌ها مشاهده نشد. در برخی از پژوهش‌های مشابه تاثیر زمان تیمار کلشی‌سین بر زنده-مانی گیاهچه‌ها معنی‌دار نشده است که احتمالاً این موضوع به تعداد کم گیاهچه‌های تیمار شده ارتباط داشته باشد (تائو و همکاران، ۲۰۰۳).

در پژوهش حاضر تعداد ۲۰ کروموزوم در سلول های سوماتیک گونه *N.tazetta* مشاهده گردید که این کروموزوم‌ها از نظر تعداد و شکل با نتایج حاصل از پژوهش هونگ (۱۹۸۲) مطابقت دارد. تعداد کروموزوم‌های سلول‌های سوماتیک در گونه *N.tazetta* (۲n = ۲x) در منابع مختلف ۱۴، ۲۰، ۲۲، ۲۴ و ۲۸ عدد ذکر شده است (به نقل ازهونگ، ۱۹۸۲). هونگ (۱۹۸۲) کاریوتایپ کروموزوم‌های گونه *N. tazetta* را بررسی کرد و تعداد ۲۰ کروموزوم را مشاهده کرد که ۶ جفت آنها بلند و ۴ جفت آنها کوتاه بودند.

با توجه به نتایج به دست آمده توسط فلوسایتومتری، در ۵۰٪ از گیاهچه‌های زنده مانده پیک دو برابر شدن میزان DNA مشاهده شد. از ۷۲ گیاهچه تیمار شده با کلشی‌سین ۳۲ گیاهچه زنده ماند که ۱۶ گیاه دیپلوئید و ۱۶ گیاه میکسوپلوئید به دست آمدند. در غلظت ۰/۱۰ درصد و زمان ۲۴ ساعت ۸۰ درصد گیاهان زنده مانده میکسوپلوئید بودند که مؤثرترین تیمار در تغییر پلوئیدی بود. تولید گیاهان میکسوپلوئید به همراه گیاهان تتراپلوئید یا به صورت تنها پس از تیمار کلشی‌سین در موارد بسیاری مانند پیاز (آلان[4] و همکاران، ۲۰۰۷)، آلوکازیا (تائو و همکاران، ۲۰۰۳) و نوعی گون (چن و همکاران، ۲۰۰۷) گزارش شده است. اگرچه گیاهان میکسوپلوئید تولیدی می‌توانند به عنوان یک پتانسیل خوب جهت تولید گیاهان تتراپلوئید از طریق تکنیک-های کشت بافت کاربرد داشته باشند، در پژوهش حاضر پس از گذشت ۵ ماه و چندین واکشت گیاه تتراپلوئید خالصی یافت نشد. در گیاه *Mecardonia tenella* تیمار ۰۱/ درصد کلشی‌سین و زمان ۴۸ ساعت باعث تولید گیاهان تتراپلوئید و میکسوپلوئید شد. گیاهان تتراپلوئید یک پیک و گیاهان میکسوپلوئید دو پیک نشان دادند، پیک اول مربوط به سلول‌های دیپلوئید و پیک دوم مربوط به سلول‌های تتراپلوئید بود (اسکاندون و همکاران، ۲۰۰۷).

هدف از پژوهش حاضر افزایش سطح پلوئیدی در این گونه از نرگس بود که پس از واکشت‌های 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 می‌کنند تشکیل شده است. هر کدام از این مناطق مریستمی از لایه‌های متعددی تشکیل شده‌اند. از آنجائی‌که این مناطق مسئول تولید بخش‌های رشد یافته جدید هستند، بنابراین افزایش سطح پلوئیدی در تمامی لایه‌های مریستمی ضروری است (جونز و همکاران، ۲۰۰۸). در صورتیکه دو برابر کردن کروموزوم‌ها فقط در یکی یا تعدادی از لایه‌ها رخ دهد حالتی از بافت ناهمسانی که بافت ناهمسانی هسته‌ای

1- WU *et al.*
2- Lehrer *et al.*
3- Rubuluza *et al.*
4- Alan *et al.*

نامیده می‌شود 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، گیاهچه‌هایی با سطح پلوئیدی میکسوپلوئید (حاوی بافت دیپلوئید و تتراپلوئید) مشاهده گردید.

منابع

۱. اهدائی، ب. ۱۳۷۹. اصلاح نبات. انتشارات بارثاوا مشهد. ۴۵۸ ص.

۲. حسندخت، م. و ابراهیمی، ر. ۱۳۸۵. مبانی کشت بافت گیاهی. انتشارات مرز دانش. ۳۲۸ ص.

۳. فارسی، م. و باقری، ع. ۱۳۷۷. اصول اصلاح نباتات. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۲۹۶ ص.

4. Alan, A.R., Lim, W., Mutschler, M.A., and Earle, E.D. 2007. Complementary strategies for ploidy manipulations in gynogenic onion (*Allium cepa*). Plant Science, 173: 25-31.

5. Chen, L.L., & Gao, SH. L. 2007. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus memberanaceus*. Scientia Horticulture, 112: 339-344.

6. Chen, L., Zhu, X., Gu, L., and Wu, J. 2005. Efficient callus induction and plant regeneration from anther of Chinese narcissus (*Narcissus tazetta* L. var. Chinensis Roem). Plant Cell Report, 24(7): 401-407.

7. De Hertogh, A.A. 1996. Marketing and research requirements for *Lilium* in Worth America. Acta Horticulture, 414: 17-24.

8. Escandon, A.S., Alderete, L.M., and Hagwara, J.C. 2007. *In vitro* polyploidization of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America. Scientia Horticulture, 115: 56-61.

9. Flint, G.J., and Alderson, P.G. 1983. *Narcissus* propagation by chipping: Effect of a range of plant growth regulators on bulbil yield and length. Acta Horticulture, 21: 173- 180.

10. Han, B.H., Yae, B.W., Yu, H. J., and Peak, K.Y. 2005. Improvement of *in vitro* micropropagation of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' by the formation of shoots with abnormally swollen basal plates. Scientia Horticulture, 103: 351-359.

11. Hanks, G.R., and Rees, A.R. 1979. Twin – scale propagation of *Narcissus.* Scientia Horticulture, 10:1-14.

12. Hanks, G.R. 2002a. Commercial production of *Narcissus* bulbs. In: G.R. Hanks (ed), Narcissus and Daffodil. Taylor & Francis Inc., pp: 53-131.

13. Hanks, G.R. 2002b. The biology of *Narcissus*. In: G.R. Hanks (ed), Narcissus and Daffodil. Taylor & Francis Inc., pp: 1-19.

14. Hong, D. 1982. A new karyotype for *Narcissus tazetta*. Hereditas, 97: 29-31.

15. Jones, J.R., Ranney, T.G., and Eaker, T.A. 2008. A novel method for inducing polyploidy in *Rhododendron* seedlings. Journal of American Rhododendron Society, 130- 135.

16. Lehrer, J.M., Brand, M.H., and Lubell, J. D. 2008. Induction of tetraploidy in meristematically active seeds of Japanese barberry (*Berberis thunbergii* var. Atropurpurea) through exposure to colchicines and oryzalin. Scientia Horticulture, 3013: 1-5.

17. Linfield, C.A., and Price, D. 1990. Effect of fungicides on the production of adventitious bulbils in the propagation of *Narcissus* by the chipping technique. Crop Protection, 9:143- 147.

18. Mathew, B. 2002. Classification of the genus *Narcissus*. In: G.R. Hanks (ed), Narcissus and Daffodil. Taylor & Francis Inc., pp: 30- 53.

19. Moran, G.P., Calque, R.,Viladomat, F., Bastida, J., and Codina, C. 2003. Mass propagation of *Cyrtanthus clavatus* and *Cyrtanthus spiralis* using liquid medium culture. Scientia Horticulture, 98:49-60.

20. Ran, Y., and Simpson, S. 2005. *In vitro* propagation of the genus *Clivia*. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 81: 239 -242.

21. Rubuluza, T., Nikolova, R.V., Smith, M.T., & Hannweg, K. 2007. *In vitro* induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicine. South African Journal of Botany, 73: 259-261.

22. Sage, D.O., Lynn, J., and Hamatt, N. 2000. Somatic embryogenesis in *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St. Keverne. Plant Science, 150: 209-216.

23. Santos, J., Santos, I., and Salema, R. 1998. *In vitro* production of bulbs of *Narcissus bulbocodium* flowering in the first season of growth. Scientia Horticulture, 76: 205-217.

24. Singh, R.J. 2002. Plant cytogenetics, (Second Edition). CRC Press. 512 p.

25. Thao, N.T.P., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y., and Okuba, H. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 72: 19 -25.

26. Van Tuyl, J.M., Lim, K.B., and Ramanna, M.S. 2002. Interspecific hybridization and introgression. In: A. Vainstein (ed.), Breeding for ornamental: classical and molecular approaches. Kluwer Academic publisher, pp: 85- 103.

27. Wu, H., Zheng, S., He, Y., Yan, G., Bi, Y., and Zhu, Y. 2007. Diploid female gametes induced by colchicine in oriental lilies. Scientia Horticulture, 114: 50 – 53.

28. Youssef, E.M.A. 1994. Effect of cytokinins and related subcultures on *in vitro* micropropagation potentiality of *Acacia salicina* Lindi. Proceedings of the First Conf. Ornamental Horticulture, 1, 30–43.