به نژادی گیاهان زراعی و باغی
دوره ۴ ■ شماره ۱ ■ بهار و تابستان ۱۳۹۵
صفحه‌های ۴۷-۳۵
انتشار الکترونیکی: بهار ۱۳۹۸

القای درون‌شیشه‌ای پلی پلوییدی با استفاده از کلشی‌سین در بنت‌القنسول

ژیلا مهر ثمرین[۱]، مریم نوروزی[۲*]، مصطفی عرب[۲]، شیرین دیانتی دیلمی[۲]، سینا خلیلی[۱]

۱. کارشناس ارشد اصلاح گیاهان باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، ایران.
۲. استادیار، گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۰۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۱۱

چکیده

در این آزمایش مهارکننده میتوزی کلشی‌سین برای القای تتراپلوییدی در گیاه زینتی بنت‌القنسول (*Euphorbia pulcherrima*) رقم Pandora red استفاده شد. تیمار کلشی‌سین روی نوک شاخساره در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام گرفت و ریزنمونه‌ها با غلظت‌های ۰/۰۰، ۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد (وزنی به حجمی) کلشی‌سین، در سه بازه زمانی ۶، ۱۲ و ۲۰ ساعته مورد تیمار قرار گرفتند. زنده‌مانی ریز نمونه‌ها پس از تیمار با کلشی‌سین با غلظت و مدت‌زمان تیمار ارتباط داشت و غلظت‌های بالاتر و مدت‌زمان طولانی‌تر منجر به کاهش نرخ زنده‌مانی و افزایش مرگ‌ومیر شد، به‌طوری‌که ریز نمونه‌ها در تیمار فاقد کلشی‌سین و غلظت بالای کلشی‌سین (۱٪) به‌مدت ۲۰ ساعت کمترین درصد زنده‌مانی (۰٪) را داشتند. گیاهان شاهد در بنت‌القنسول که به‌عنوان دیپلوییدلوییدِ درنظر گرفته شدند عدد کروموزومی برابر ۲x=۲ n=۲۸ نشان دادند درحالی‌که گیاهان تیمارشده با غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی و زمان ۶ ساعت کلشی‌سین، دارای سلول‌هایی با تعداد کروموزوم دو برابر شده (2n=4x=56) بودند که به‌عنوان گیاهان تتراپلوییدلوییدِ معرفی شدند. مؤثرترین تیمار القای پلی‌پلوییدلوییدی با غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی کلشی‌سین و مدت‌زمان ۶ ساعت و با نرخ القای ۳۳٪ به‌دست آمد. میانگین اندازه سلول‌های روزنه در گیاهان تتراپلوییدلوییدِ (۱۸/۲۳×۵/۳۷ µm) به‌صورت معناداری از گیاهان دیپلوییدلوییدِ (۱۲/۱×۴/۳۱ µm) بزرگ‌تر است اما تراکم سلول‌های روزنه در گیاهان تتراپلوییدلوییدِ (۱۴/۸۹ روزنه در میلی‌مترمربع) به‌صورت معناداری کمتر از گیاهان دیپلوییدلوییدِ (۲۳/۱۰ روزنه در میلی‌مترمربع) مشاهده گردید. در تیمار ۱ درصد وزنی به حجمی و زمان ۶ ساعت، گیاه دارای سیستم ریشه‌ای کوچک‌تر و رشد آهسته‌تر و ارتفاع گیاه کمتر بود. تغییر در تعداد و تراکم روزنه‌ها و تغییر در عدد کروموزومی گیاهان تیمارشده شاخصه‌ای مهمی در شناسایی گیاهان تتراپلوییدلوییدِ القا شده توسط کلشی‌سین می‌باشند.

کلیدواژه‌ها: القای پلی‌پلوییدی، بنت‌القنسول، درون‌شیشه‌ای، لوییدکلشی‌سین.

* نویسنده مسئول
Email: mnorouzi91@ut.ac.ir

مقدمه

بنت‌القنسول با نام علمی *Euphorbia pulcherrima* گیاهی از تیره فرفیون (Euphorbiaceae) و بومی مکزیک می‌باشد. گل‌های آن کوچک و به رنگ زرد به‌صورت گل‌آذین سیاتیوم تشکیل می‌شود. بنت‌القنسول، یکی از مهم‌ترین گیاهان زینتی کاشانه‌ای محسوب می‌شود که در زمان کریسمس به بازار عرضه می‌شود و به‌عنوان سمبل کریسمس در اروپا و آمریکا به‌شمار می‌رود. برگ‌های آن بیضوی، سبز روشن با لبه صاف یا کمی دالبردار دیده می‌شود. گل‌های بنت‌القنسول به‌وسیله تعداد زیادی براکته بیضوی احاطه شده‌اند که رنگ براکته‌ها از قرمز مایل به زرد تا قرمز سیر متغیر بوده و به رنگ‌های سفید و صورتی نیز وجود دارند. قابلیت بقا و ماندگاری این براکته‌های زیبا و تماشایی به‌مدت سه تا چهار ماه تقاضا و بازارپسندی این گیاه زینتی را چند برابر می‌نماید. براساس آمار سازمان کشاورزی ایالات متحده آمریکا (USDA)، در ایالت کالیفرنیا از این گیاه به‌عنوان گل گلدانی تنها در سال ۲۰۱۲ میلادی قریب به ۶/۵ میلیون گلدان به ارزش ۳۰ میلیون دلار فروخته‌شده است [۲۱]. علی‌رغم این‌که بنت‌القنسول بومی آمریکای مرکزی و مکزیک می‌باشد این گیاه سریع‌الرشد یکی از رایج‌ترین درختچه‌ها در سرتاسر دنیا است. دست‌کاری پلی‌پلوییدی به‌صورت موفقیت‌آمیزی در برنامه‌های به ژادی گیاهان به‌منظور تسهیل تولید واریته‌های برتر در بسیاری از گونه‌های گیاهی استفاده‌شده است [۱۶]. تنوع در صفاتی همچون رنگ، فرم و عطر گل از مهم‌ترین اهداف اصلاحی گیاهان زینتی می‌باشند و پلی‌پلوییدی معمولاً منجر به ایجاد گیاهان درشت‌تر، با برگ‌های ضخیم و تیره‌تر می‌شود. ازجمله موفقیت‌های حاصل از به‌کارگیری این فن در اصلاح گیاهان زینتی، می‌توان به ایجاد رنگ‌های ویژه در گل‌های زینتی اشاره کرد. صفات دیگری که توجه خاصی را به خود جلب نموده‌اند شامل ساختار و شکل گل و گیاه، عطر گل، ماندگاری پس از برداشت و مقاومت به بیماری‌ها و آفات می‌باشد [۹].

تغییر سطح پلوییدی با استفاده از مواد شیمیایی با کاربرد بازدارنده‌های میتوزی مانند کلشی‌سین، اوریزالین، تریفلورالین، امی‌پروفسفومتیل، پرونامید، پودوفیلین، آکریدین، اکسید نیتروز و اسید اسکوربیک در بسیاری از گونه‌های گیاهی گزارش‌شده است [۸]. کلشی‌سین نوعی ترکیب آلکالوییدی طبیعی است که از گیاه گل حسرت (*Colchicum autumnale* L.) استخراج می‌شود و به‌عنوان یک بازدارنده طبیعی میتوزی و ترکیب دپلیمریزه‌کننده میکروتول‌ها باعث تخریب رشته‌های دوکی‌شکل شده و چرخه تقسیم سلولی را در مرحله متافاز میتوزی متوقف می‌کند درنتیجه کروموزوم‌های دو برابر شده درون یک هسته باقی می‌مانند [۲]. کلشی‌سین در گیاهانی نظیر داتوره، اطلسی، خرفه و ... جهت افزایش سطح پلوییدی مورداستفاده قرار گرفت و باعث تولید گل‌آذین بزرگ‌تر، میوه و دانه گرده درشت‌تر و درعین‌حال گیاه متراکم‌تر و ساقه کوتاه‌تر شد. هم‌چنین اثر کلشی‌سین به نوع گونه گیاهی، روش و غلظت آن بستگی دارد و روی بافت‌های رویشی که در حال رشد سریع هستند بسیار موفقیت‌آمیز بوده است. به‌عنوان مثال بافت‌هایی مانند بذور در حال جوانه‌زنی، غنچه‌های بسیار جوان یا مناطق مریستمی نوک جوانه‌ها را می‌توان نام برد [۱۱]. برای القای تنوع در ارقام قدیمی ژربرا از طریق دو برابر کردن تعداد کروموزوم در شرایط آزمایشگاهی، شاخه‌های رشدیافته با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین (۰/۱٪، ۰/۵٪، ۰/۱، ۰/۵ وزنی به حجمی) به‌مدت ۲، ۴ یا ۸ ساعت تیمار شدند و هنگامی‌که شاخه‌ها با ۰/۱٪ کلشی‌سین برای ۸ ساعت تیمار شدند ۶۴٪ گیاهان باززایی‌شده تتراپلویید بودند. گیاهان تتراپلویید دارای تکثیر کندتر با قدرت بالاتر، برگ‌های ضخیم گسترده، گل‌های بزرگ‌تر، ساقه بلندتر و عمر گلدانی

بیشتر بودند که همه این‌ها ارزش زینتی ژربرا را افزایش می‌دهد [۴]. این پژوهش با هدف بررسی امکان تولید گیاهان پلی‌پلوییدی بنت‌القنسول در شرایط درون‌شیشه‌ای با استفاده از کلشی‌سین انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و کشت درون‌شیشه‌ای

این پژوهش در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده باغبانی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران به‌اجرا درآمد. برای انجام این پژوهش گلدان‌های بنت‌القنسول (*Euphorbia pulcherrima* var. Pandora red) از گلخانه‌ای در شهر پاکدشت تهیه گردید. شاخه‌های بنت‌القنسول پس از شستشو به‌مدت نیم ساعت زیرآب جاری، در الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۲۰ ثانیه قرار گرفته و پس از شست‌وشو، با هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند [۱۲]. سپس جوانه‌های تک‌گره به‌صورت عمودی در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی به‌همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار کشت شدند و به‌مدت ۴ هفته در این محیط استقرار یافتند، سپس ریزنمونه‌ها به محیط کشت پرآوری شاخساره حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار منتقل شدند.

القای پلی‌پلوییدی در شرایط درون شیشه‌ای

جهت القای پلی‌پلوییدی، نوک شاخساره‌های پرآوری‌شده با طول یک سانتی‌متر در غلظت‌های مختلف کلشی‌سین ۰/۰۰، ۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد (وزنی به حجمی) به‌مدت ۶، ۱۲ و ۲۰ ساعت غوطه‌ورشده و بعد با آب مقطر استریل ۲ تا ۳ دقیقه شست‌وشو داده شدند. سپس شاخساره‌ها در محیط کشت MS فاقد هورمون کشت شده و درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها پس از ده روز بررسی شد. ریزنمونه‌ها طی مراحل القا تا ریشه‌زایی در شرایط دمایی ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد نگهداری شدند.

ریشه‌زایی نوک شاخساره‌ها

جهت بررسی میزان ریشه‌زایی از تنظیم‌کننده‌های رشد NAA با ۵ سطح ۰، ۰/۳، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و IAA با ۵ سطح ۰، ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و IBA با ۵ سطح ۰، ۰/۳، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر به‌تنهایی استفاده شد. ریزنمونه‌های ۲ ماهه در محیط‌های ریشه‌زایی کشت و پس از یک ماه از نظر تعداد ریشه، طول ریشه و روز تا ریشه‌دهی (تعداد روز سپری‌شده از کشت ریز نمونه در محیط کشت ریشه‌زایی تا ظهور اولین ریشه‌چه) مورد بررسی قرار گرفتند.

تعیین سطح پلوییدی

پس از رشد کافی گیاهچه‌های زنده‌مانده در طی سه واکشت، از روش‌های شمارش کروموزوم نمونه‌های نوک ریشه و بررسی روزنه‌های گیاهچه‌های زنده‌مانده برای تعیین سطح پلوییدی استفاده شد. بررسی مورفولوژیکی روزنه‌ها توسط ارزیابی میکروسکوپی ویژگی‌های سلول‌های روزنه شامل اندازه طول، عرض و تراکم روزنه‌ها در سطح اپیدرم تحتانی برگ انجام شد. جهت مشاهده روزنه‌ها از هر تکرار یک گیاه چه شاهد و یک گیاهچه تیمارشده انتخاب و با استفاده از فن نیل- وارنیش [۲۰] از اپیدرم زیرین برگ بالغ و توسعه‌یافته نمونه‌برداری صورت گرفت. روش کار بدین‌صورت بود که قسمتی از برگ به‌اندازه تقریبی یک سانتی‌متر که ترجیحاً فاقد رگبرگ اصلی بود با استفاده از لاک ناخن شفاف پوشانده شد. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه که لاک کاملاً خشک شد، با استفاده از پنس نوک‌تیز لایه لاک به‌آرامی از روی برگ

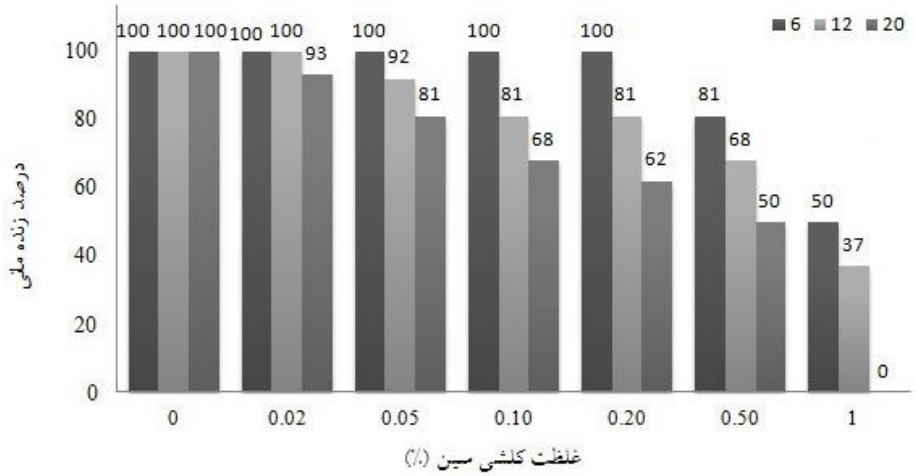
جدا و بر روی لام قرار داده شد. جهت استقرار نمونه بر روی لام یک لایه چسب شیشه‌ای شفاف بر روی نمونه کشیده شد و ارزیابی تراکم روزنه‌ها بر اساس تعداد در هر میلی‌مترمربع از نمونه با بزرگنمایی ۴۰X میکروسکوپ نوری و تعیین طول و عرض روزنه بر اساس میکرومتر با بزرگنمایی X ۱۰۰ انجام گرفت.

هم‌چنین برای ارزیابی سطح پلی‌پلوییدی به‌روش شمارش کروموزوم نوک ریشه، ۵ تا ۱۰ میلی‌متر انتهای ریشه‌های جوان بریده‌شده و در محلول ۸- هیدروکسی‌کوئینولین ۰/۰۰۲ مولار به‌مدت ۳ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس ریشه‌ها با آب مقطر شسته شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت در تثبیت‌کننده کارنوی I (اسیداستیک گلایسیال ۱: ۳ اتانول خالص) قرار گرفتند پس از شست‌وشو با آب مقطر، نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در اسیدکلریدریک یک نرمال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در بن ماری هیدرولیز شدند و سپس برای رنگ‌آمیزی از استواورسئین ۱ درصد استفاده گردید. درنهایت به‌روش اسکواش لام تهیه‌شده و با میکروسکوپ نوری شمارش کروموزوم‌ها انجام شد [۷]. پس از تعیین سطح پلوییدی توسط شمارش کروموزومی، ریز نمونه‌های تیمارشده از نظر طول و تعداد شاخساره جانبی، طول و تعداد ریشه، تعداد روز تا ریشه‌دهی، سطح برگ (با کاغذ میلی‌متری)، شکل پهنک و حاشیه برگ چهار هفته پس از واکشت با گیاهان شاهد موردبررسی قرار گرفتند. طرح آماری مورد استفاده به‌صورت آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار (هر تکرار ۴ ریز نمونه) انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS صورت گرفت و از آزمون چنددامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. برای مقایسه وجود اختلاف معنی‌دار اندازه طول و عرض سلول‌های روزنه در گیاهان دیپلوییدو و تتراپلوییدو از آزمون t استفاده شد.

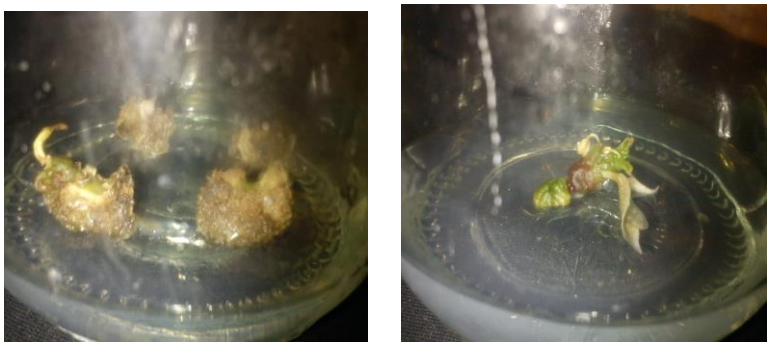
نتایج و بحث

درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها

ریزنمونه‌ها پس از اعمال تیمار و واکشت در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده رشد، به رنگ سبز و در حالت طبیعی قرار داشتند اما پس از گذشت ۴ هفته برخی جوانه‌های انتهایی شروع به خشک شدن و تغییر رنگ به سمت قهوه‌ای شدن نمودند. جوانه‌ها قهوه‌ای و بدون رشد با ظاهر سوخته به‌عنوان ریزنمونه‌ها مرده و از بین رفته در نظر گرفته شدند (شکل ۱). زنده‌مانی ریزنمونه‌ها پس از تیمار با کلشی‌سین با غلظت و مدت‌زمان تیمار ارتباط داشت و غلظت‌های بالاتر و مدت‌زمان طولانی‌تر منجر به کاهش نرخ زنده‌مانی و افزایش مرگ‌ومیر شد، به‌طوری‌که ریزنمونه‌ها در تیمار فاقد کلشی‌سین و غلظت پایین کلشی‌سین (۰/۰۲٪) به‌مدت ۶ و ۱۲ ساعت بیشترین درصد زنده‌مانی (۱۰۰٪) را داشتند که با نتایج روی و همکاران (۲۰۰۱) که بیان کردند تمام ریز نمونه‌های گیاه رازک در تیمار شاهد و هم‌چنین تیمار با غلظت‌های پایین کلشی‌سین (۰/۰۱ و ۰/۰۵٪) به‌مدت ۲۴ ساعت زنده بودند تا حدود زیادی مطابقت داشت [۱۴]. در مدت‌زمان ۲۰ ساعت در تمامی غلظت‌ها درصد بالایی از مرگ‌ومیر مشاهده گردید. در غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی کلشی‌سین، ریز نمونه‌های تیمارشده در ۶ ساعت ۵۰ درصد زنده‌مانی و در ۱۲ ساعت ۳۷ درصد زنده‌مانی از خود نشان دادند. در تیمار ۱ درصد وزنی به حجمی کلشی‌سین به‌مدت ۲۰ ساعت کلیه ریزنمونه‌ها از بین رفتند (نمودار ۱). وجود رابطه معکوس بین غلظت کلشی‌سین و بقای ریز نمونه‌ها در این آزمایش مورد انتظار بوده و با نتایج سایر بررسی‌های انجام‌شده روی گیاهان مختلف در شرایط طبیعی و درون‌شیشه‌ای مانند گیاه سالویا [۵] و عناب [۶] مطابقت دارد.



نمودار ۱. درصد زنده‌مانی و مرگ‌ومیر ریز نمونه‌های تیمارشده با کلشی‌سین و نمونه‌های شاهد



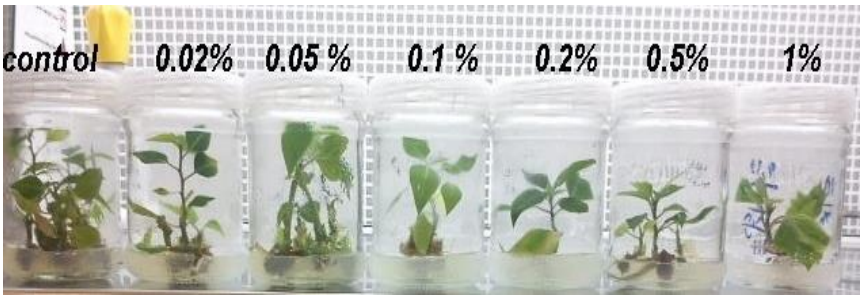
شکل ۱. ریزنمونه‌های مرده در اثر تیمار با کلشی‌سین ۱٪ در مدت زمان ۲۰ ساعت

طول و تعداد شاخساره

براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین و مدت‌زمان تیمار با کلشی‌سین، هر یک به‌تنهایی و اثر متقابل غلظت و زمان‌بر ارتفاع شاخساره‌ها در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد (نمودار ۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین طول شاخساره غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی و زمان ۶ ساعت (۳/۱ سانتی‌متر) نسبت به تیمار شاهد (۵ سانتی‌متر) نشان داد که طول شاخساره گیاهان تیمارشده با غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی و زمان ۶ ساعت به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است (شکل ۲ و نمودار ۲). کاربرد کلشی‌سین با غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی در مدت زمان ۶ ساعت بیشترین تأثیر را بر کاهش ارتفاع شاخساره توأم با القای پلوییدی داشته و درعین‌حال با افزایش غلظت و مدت‌زمان تیمار علاوه بر کاهش ارتفاع شاخساره، توقف در رشد و مرگ بافت مشاهده شد به‌طوری‌که در غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی کلشی‌سین و مدت‌زمان ۲۰ ساعت کاهش ارتفاع بیشتری را شاهد بودیم که این مورد به‌دلیل اثر فیزیولوژیکی کلشی‌سین بر روی کاهش سرعت تقسیم سلولی هست. گزارش‌شده تمام گیاهچه‌های باززایی‌شده بنت‌القنسول حاصل از کالوس‌های تیمارشده با کلشی‌سین به‌طور مشخصی دارای شاخه‌های کوتاه‌تری در مقایسه با شاهد بودند [۱۲].

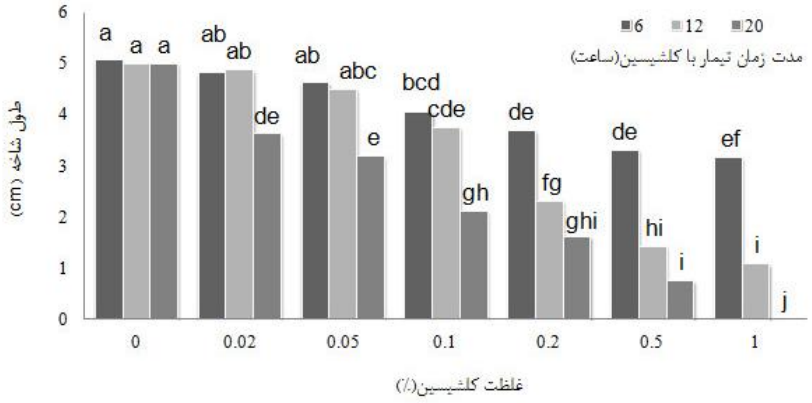
براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها اثر غلظت‌های

مختلف کلشی‌سین و مدت‌زمان تیمار بر تعداد شاخساره‌ها هر یک به‌تنهایی در سطح احتمال ۵ درصد معنی شد. به‌طوری‌که با افزایش غلظت کلشی‌سین تعداد شاخساره کاهش پیدا کرد و غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد وزنی به حجمی کلشی‌سین تأثیر بیشتری بر کاهش تعداد شاخساره داشتند و بالاترین تعداد شاخساره جانبی با مدت‌زمان ۶ ساعت به‌دست آمد (نمودار ۳). کاهش تعداد شاخساره در غلظت‌های بالای کلشی‌سین می‌تواند احتمالاً مربوط به برهم خوردن توازن سطح اکسین به سایتوکینین در ریزنمونه‌های تیمارشده نسبت به شاهد باشد [۳].

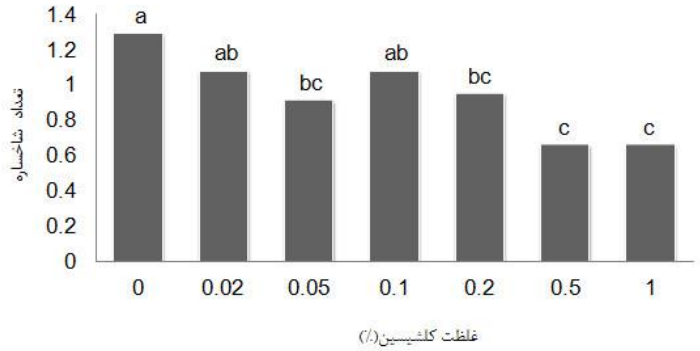


شکل ۲. کاهش طول گیاهان تیمارشده با سطوح مختلف کلشی‌سین

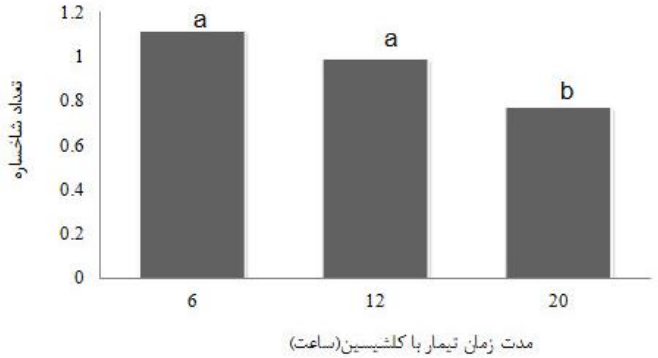
شکل ۳. مقایسه طول و تعداد ریشه در گیاه شاهد (سمت چپ) و گیاه تیمارشده با غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی کلشی‌سین در مدت‌زمان ۶ ساعت (سمت راست)



نمودار ۲. مقایسه میانگین اثر کلشی‌سین و زمان‌بر طول شاخساره در بنت‌القنسول



نمودار ۳. اثر غلظت کلشی‌سین بر افزایش تعداد شاخساره بنت‌القنسول

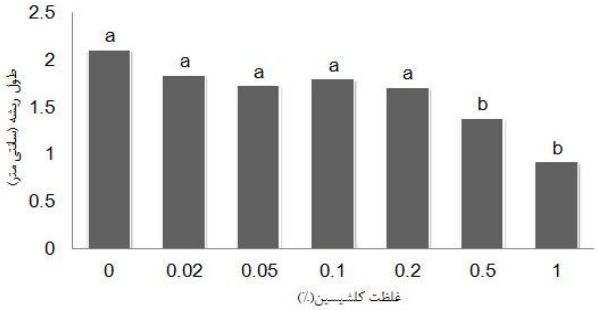


نمودار ۴. اثر زمان تیمار با کلشی‌سین بر تعداد شاخساره بنت‌القنسول

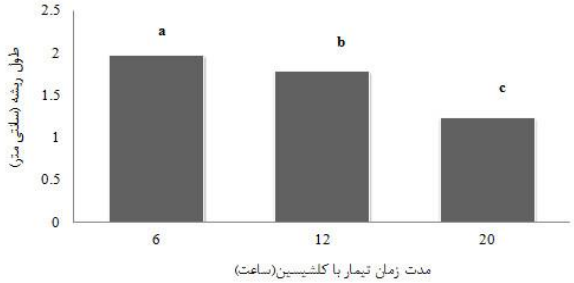
طول ریشه، تعداد ریشه و تعداد روز تا ریشه‌دهی در گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین

براساس نتایج حاصل از این تحقیق، کلشی‌سین بر ریشه‌دهی گیاهان تأثیر دارد و در غلظت‌های بالا (۰/۵ و ۱ درصد وزنی به حجمی) طول ریشه کاهش نشان داد (شکل ۴ و نمودار ۵). هم‌چنین بازه زمانی ۲۰ ساعت نسبت به ۶ و ۱۲ ساعت در کاهش طول ریشه مؤثرتر بود. براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، غلظت‌های مختلف کلشی‌سین و مدت‌زمان تیمار با کلشی‌سین و اثر متقابلشان بر تعداد روز تا ریشه‌دهی در سطح احتمال پنج درصد اثر معنی‌داری داشتند. با توجه به نتایج مقایسه میانگین حاصل از اثر مدت‌زمان تیمار با کلشی‌سین بر تعداد روز تا ریشه‌دهی بنت‌القنسول مشخص شد که در تیمار ۱ درصد وزنی به حجمی زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت کوتاه‌ترین مدت‌زمان جهت ظهور ریشه‌چه در بنت‌القنسول هست (نمودار ۶). هم‌چنین با افزایش غلظت کلشی‌سین در غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی کلشی‌سین اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد دیده شد و در این غلظت ریشه‌ها پس از ۲۷ روز ظاهر شدند و محدوده تعداد ریشه‌ها ۵ الی ۷ عدد بود (نمودار ۷). در تیمار ۱ درصد وزنی به حجمی و زمان ۶ ساعت، گیاه دارای سیستم ریشه‌ای کوچک‌تر و رشد آهسته‌تر و ارتفاع کمتر بود. هم‌چنین اثر اصلی و متقابل سطوح غلظت کلشی‌سین و مدت‌زمان تیمار با کلشی‌سین بر تعداد ریشه در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری نداشت. در ژربرا نشان داده شد که مدت‌زمان ریشه‌زایی در غلظت‌های بالای کلشی‌سین افزایش‌یافته است [۴].

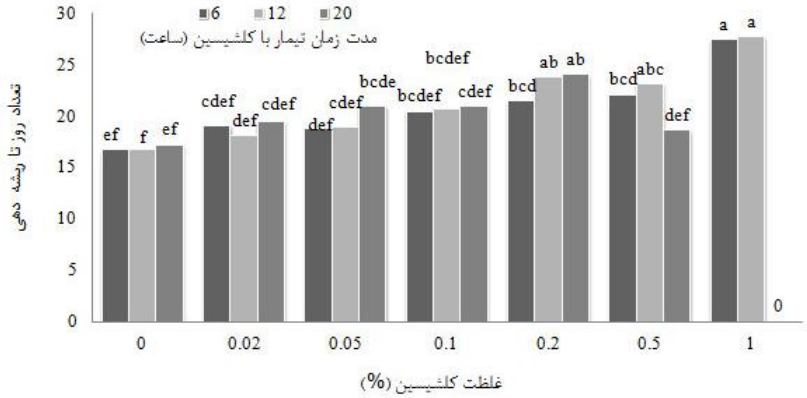
شکل ۴. طول ریشه شاخساره تیمارشده با کلشی‌سین ۱ درصد ۶ ساعت (راست) و گیاه شاهد (چپ)



نمودار ۵. مقایسه میانگین اثر کلشی‌سین بر طول ریشه در بنت‌القنسول



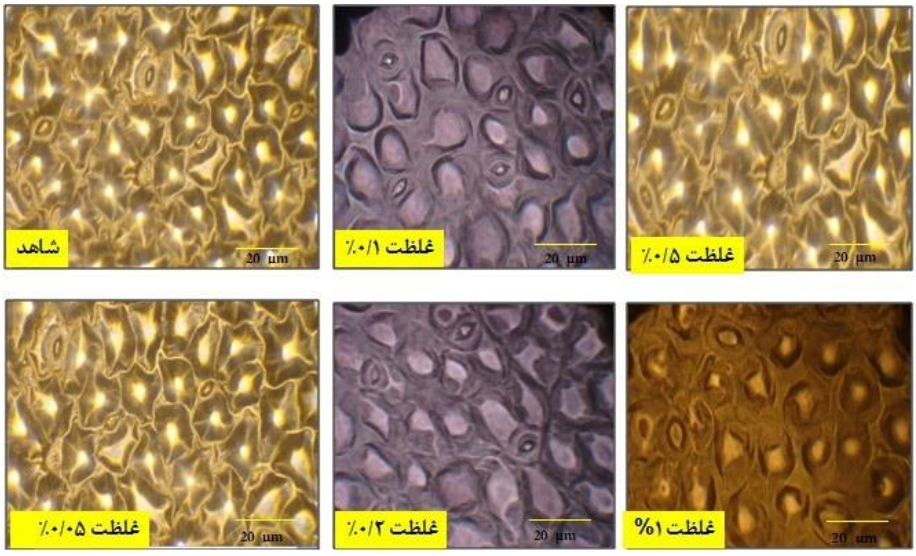
نمودار ۶. مقایسه میانگین اثر مدت‌زمان تیمار با کلشی‌سین بر طول ریشه بنت‌القنسول



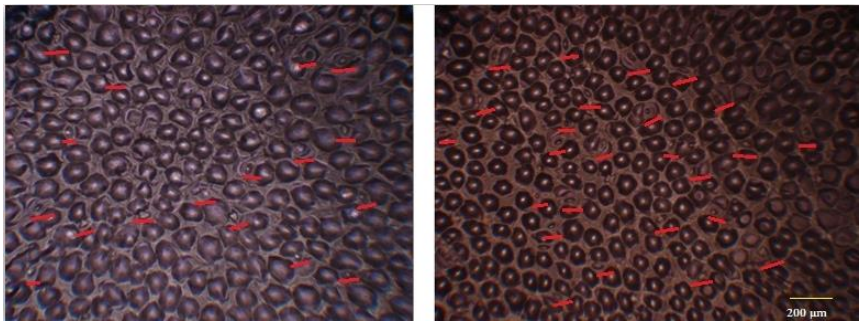
نمودار ۷. مقایسه میانگین اثر کلشی‌سین و زمان‌بر تعداد روز تا ریشه‌دهی شاخساره‌های بنت‌القنسول

طول، عرض و تراکم روزنه

نتایج حاصل از مقایسه اندازه طول و عرض و تراکم سلول‌های روزنه در یک میلی‌مترمربع در ۲۰ نمونه از گیاهان تیمارشده با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین در سطح اپیدرم پشتی برگ‌های توسعه‌یافته، بر اساس آزمون آماری t نشان داد که اندازه روزنه‌ها و تراکم آن‌ها در گیاهان دیپلوییید و تتراپلوییید متفاوت است (شکل‌های ۵ و ۴)، به‌طوری‌که میانگین طول و عرض روزنه‌ها در نمونه‌های دیپلوییید به‌ترتیب برابر با ۱۲/۱ و ۴/۳۱ میکرومتر و در نمونه‌های تتراپلوییید ۱۸/۲۳ و ۵/۳۷ میکرومتر هست (جدول ۱). هم‌چنین میانگین تراکم روزنه در نمونه‌های دیپلوییید برابر با ۲۳/۱۰ عدد در میلی‌مترمربع و در نمونه‌های تتراپلوییید برابر با ۱۴/۸۹ عدد در یک میلی‌مترمربع بود و درواقع پلی‌پلوییدها ممکن است قدرت زنده ماندن بیشتری نسبت به اجداد دیپلوییید خود در برابر عوامل نامساعد محیطی داشته باشند، زیرا با کاهش سطح برگ و از طرف دیگر افزایش اندازه سلول روزنه، توانایی گیاه در حفظ آب و ایجاد تعادل آبی بیشتر می‌شود [۲۲]. نتایج این پژوهش با نتایج پژوهش‌های قبلی که نشان دادند با افزایش سطح پلوییدی و اندازه روزنه، تراکم روزنه در واحد سطح برگ کاهش می‌یابد، منطبق است [۴].



شکل ۴. اندازه روزنه گیاهان شاهد و تیمارشده بنت‌القنسول (X ۱۰۰)



شکل ۵. مقایسه تراکم روزنه‌ها در نمونه‌های دیپلوییید (سمت راست) و تتراپلوییید (سمت چپ) بنت‌القنسول (۴۰x)

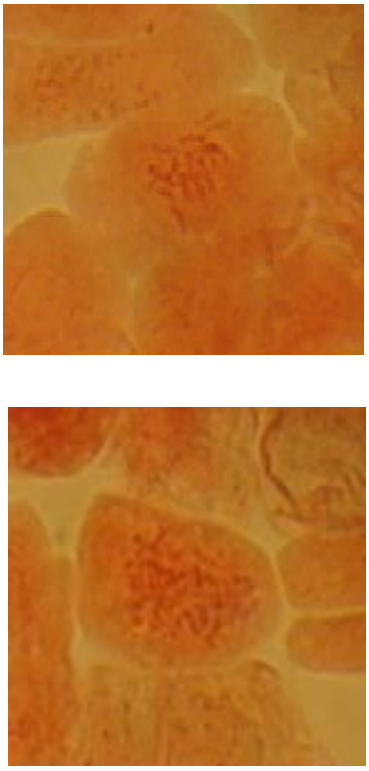
جدول ۲. مقایسه میانگین طول و عرض و تراکم سلول‌های روزنه در گیاهان دیپلوییدو و تتراپلوییدو

سطح پلوییدی	تعداد نمونه	تراکم روزنه (تعداد/ میلی‌مترمربع)	خطای استاندارد ± میانگین طول روزنه	خطای استاندارد ± میانگین عرض روزنه
دیپلوییدو (2x)	۲۰	۲۳/۱۰	۱۲/۱ ± ۰/۲۶	۴/۳۱ ±۰/۲۱
تتراپلوییدو (4x)	۲۰	۱۴/۸۹	۱۸/۲۳ ± ۰/۳۲	۵/۳۷ ±۰/۳۹

لوییدو لوییدو

تعداد کروموزوم

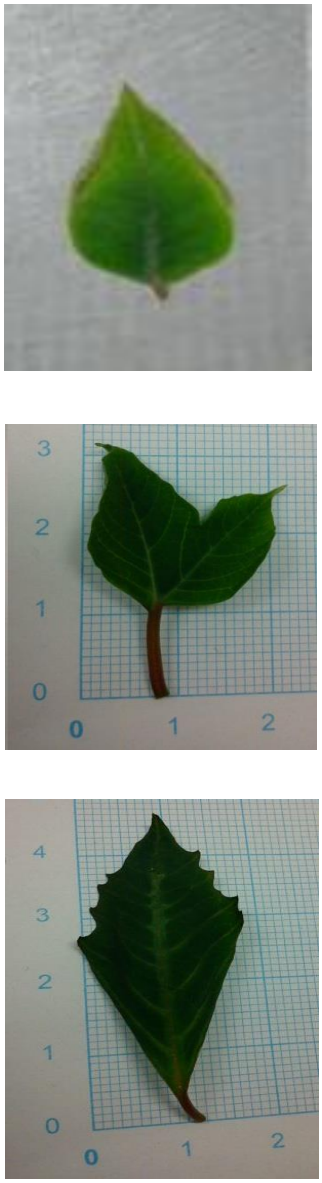
دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌ها به‌وسیله شمارش کروموزوم‌ها در سلول‌های نوک ریشه گیاهان پرآوری‌شده پس از تیمار با کلشی‌سین مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل ۶ نشان‌دهنده سلول‌هایی با تعداد کروموزوم‌های دیپلوییدو و تتراپلوییدو حاصل از گیاهان شاهد و گیاهان تیمارشده با کلشی‌سین است. گیاهان شاهد تعداد 2n=2x=۲۸ کروموزوم را در سلول‌های نوک ریشه نشان دادند که مشخص‌کننده دیپلوییدو بودن آن‌ها می‌باشد. این نتایج با نتایج به‌دست‌آمده از شمارش کروموزوم توده‌های بنت‌القنسول که در آن تعداد کروموزوم این گیاه ۲۸ عدد گزارش‌شده است مطابقت دارد [۱۰]. هم‌چنین با بررسی تعداد کروموزوم در گیاهان تیمارشده مشخص شد که تنها، غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی و زمان ۶ ساعت، دارای سلول‌هایی با تعداد کروموزوم دو برابر شده (2n=4x=56) بودند که به‌عنوان گیاهان تتراپلوییدو معرفی شدند. مؤثرترین تیمار القای تتراپلوییدی، تیمار شاخساره‌ها با غلظت ۱ درصد وزنی به حجمی کلشی‌سین و مدت‌زمان ۶ ساعت و با نرخ القای ۳۳٪ به‌دست آمد و در سایر تیمارها القای پلی‌پلوییدی صورت نگرفت. با کاربرد کلشی‌سین و اوریزالین بر روی رقم وینتر رز در بنت‌القنسول مشخص شد که کاربرد کلشی‌سین و اوریزالین به‌عنوان ماده ضدمیتوزی تأثیری بر روی تغییر سطح پلوییدی بر روی گیاهان دیپلوییدو نداشت [۱۲].



شکل ۶. تصویر کروموزومی سلول مریستمی ریشه گیاه تتراپلوییدو (سمت راست) و دیپلوییدو (سمت چپ)

مورفولوژی برگ

گیاهان تیمارشده با کلشی‌سین در مقایسه با گیاهان دیپلوییدو یا شاهد دارای سطح برگ بزرگ‌تر بوده و هم‌چنین تغییراتی را در حاشیه و سطح برگ نشان دادند (شکل ۷). با کاربرد کلشی‌سین بر روی گیاه اسپاتیفیلوم برگ‌های گیاهان باززایی‌شده دارای زاویه‌های تغییرشکل‌یافته، ضخیم و دارای سطحی بزرگ‌تر از گیاهان شاهد بودند [۱۹].



شکل ۷. تغییرات مورفولوژیکی پهنک برگ گیاه شاهد (راست) و گیاهان تیمارشده با کلشی‌سین (چپ)

نتیجه‌گیری و بحث

در بین روش‌های مختلف اصلاح گیاهان زینتی القای پلی‌پلوییدی در شرایط درون‌شیشه‌ای به‌عنوان تکنیکی نوین در رفع محدودیت، سایر روش‌های اصلاحی و ایجاد جمعیتی بزرگ با قابلیت کلونینگ بالا مطرح است [۱۳]. فن دو برابر کردن کروموزوم‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای تنها زمانی مؤثر است که سلول‌های در حال تقسیم در معرض مواد ضدمیتوزی همچون کلشی‌سین قرار گیرند. لذا گزارش‌های متعددی از استفاده کلشی‌سین در شرایط درون‌شیشه‌ای در گیاهان زینتی موجود هست [۱۵]. زنده‌مانی ریزنمونه‌ها پس از تیمار با کلشی‌سین به غلظت کلشی‌سین و مدت‌زمان تیمار بستگی دارد. به‌طورکلی غلظت بالا و زمان طولانی باعث کاهش درصد زنده‌مانی و افزایش مرگ‌ومیر جوانه‌های انتهایی خواهد شد [۱۸]. در تحقیق حاضر، غلظت ۰/۰۲ و ۰/۰۵ درصد کلشی‌سین به‌مدت ۶ ساعت کمترین تأثیر را جهت القای پلی‌پلوییدی داشته و تیمارهای مناسبی محسوب نمی‌شوند. هم‌چنین تیمارهای زمانی به‌مدت ۲۰ ساعت در تمامی غلظت‌ها دارای اثرات سمی بوده و در غلظت‌های پایین باعث کاهش رشد اولیه بدون تأثیر بر تغییر سطح پلوییدی گردید. در گیاهان تیمارشده با کلشی‌سین، غلظت ۱ درصد بیشترین اثر را روی کاهش طول شاخساره داشت. اثر کلشی‌سین بر تعداد روز تا ریشه‌زایی موجب طولانی شدن ریشه‌دهی گیاهان تیمارشده در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد وزنی به حجمی کلشی‌سین گردید. بیشترین درصد زنده‌مانی در غلظت صفر و ۰/۰۲ درصد کلشی‌سین با ۶ ساعت و بیشترین میزان از بین رفتن ریزنمونه‌ها در غلظت ۱ درصد کلشی‌سین با مدت‌زمان ۲۰ ساعت مشاهده شد. استفاده از غلظت ۱ درصد کلشی‌سین به‌مدت ۶ ساعت بیشترین تأثیر را در تولید گیاهان تتراپلویید داشت. هم‌چنین طول و عرض روزنه با افزایش سطح پلوییدی افزایش و تراکم روزنه در واحد سطح برگ کاهش یافت.

منابع

1. Antait S, Mandal N Bhattacharyya S and Das P K (2011) Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of Gerbera jamesonii Bolus cv. Sciella. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 106(3), 485-493.

2. Caperta A D, Delgado M Ressurreição F Meister A Jones R N Viegas W and Houben A (2006) Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. Protoplasma, 227: 147-153.
3. Ehdai B (2000) Plant Breeding. Bartava Press. Mashhad. 458Pp. (in Farsi)
4. Gantait, S and Mandal N (2011) Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicines treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 106: 485-493.
5. Gao S L, Zhu, D N Cai Z H and Xu D R (1996) Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of Salvia miltiorrhiza Bge Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47:73-77.
6. Gu X , Yang A Meng H Zhang J (2005) In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Ziziphus jujuba* Mill. cv. Zhanhu. Plant cell reports, 24(11): 671-676.
7. Hamill S D, Smith M K and Dodd W A (1992) In vitro Induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. Australian Journal of Botany, 40: 887-896.
8. Hasandokht M and Ebrahimi R (2006) Principals of Plant tissue culture, Marzedanesh Publication,328Pp. (In Farsi)
9. Jafarkhani Kermani M, Jokar A Habashi A A (2008) A Revision on Moderrn ornamental plants breeding teqniques. Modern Genetics 3th Issue, Third Volume.Pp.5-14. (in Farsi)
10. Mendioro M S, Genaleen M Diaz Q Alcantara M Hilario O J Mateo P and Maghirang R (2005). Cytological Studies of Selected Medicinal Plants: Euphorbia pulcherrima Willd. ex Klotz., *Moringa oleifera* Lam., *Catharanthus roseus* (L.) Don., and Chrysanthemum indicum Linn. Philippine Journal of Science, 134 (1): 31-37.
11. Pikens K A (2004) In vitro propagation regeneration attempted tetraploid induction, and agrobacterium-mediated transformation of *Euphorbia pulcherrima* 'winter rose'. A dissertation presented for the doctor of philosophy degree the University of Tennessee, Knoxville. 117p.
12. Pikens K A and Cheng Z M (2006) Effects of Colchicine and Oryzalin on Callus and Adventitious Shoot Formation of *Euphorbia pulchrrima* 'Winter Rose'. HortScience, 41(7): 1651- 1655.
13. Predieri S (2001) Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell Tiss Organ Cult 64: 185-210
14. Roy A, Leggett G and Koutoulis A (2001) In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploid in hop (Humulus lupulus L.) Plant Cell Reports, 20: 489-495.
15. Rose J B, Kubba J Tobutt K R (2001) Induction of tetraploids for breeding hardy ornamentals. Acta Hortic, 560: 109-112
16. Shahriari Ahmadi F, Dehghan E Farsi M and Azizi M (2008) Tetraploid induction of Hyoscyamus muticus L. using colchicine treatment. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11: 2653- 2659.
17. Singh R J (1993) Plant cytogenetics. CRC Press, USA.
18. Tang Z Q, Chen D L Song Z J He Y C and Cai D T (2010) In vitro induction and identification of tetraploid plants of Paulownia tomentosa. Plant Cell Tiss Organ Cult, 102: 213-220.
19. Vanstechelman I , Vansteenkiste H , Eeckhaut T, Van Huylenbroeck J and Van Labeke M C (2009) Morphological and anatomical characterisation of chemically induced polyploids in Spathiphyllum wallisii. In XXIII International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals: Colourful Breeding and Genetics 836: 79-84.
20. Vainola A (2000) Polyploidization and early screening of Rhododendron hybrids. *Euphytica*, 112: 239- 244.
21. United States Department of Agriculture. National Agricultural Statistics Service (2013) *California Floriculture Report*.
22. Wissemann H, Zimmermann I Hensen G Werlemark and Nybom H (2011) Roses In chittaranjan kole (ed.) Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Plantation and Ornamental Crops (pp.243-275). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Breeding of Agronomic and Horticultural Crop
(Journal of Agriculture, University of Tehran)

Vol. 4 ■ No. 1 ■ Spring & Summer 2016

In vitro polyploidy induction by colchicine in Poinssetia

Zhilla Mehrs-Samin[1], Maryam Norouzi[2*], Mostafa Arab[2], Shirin Dianati Daylami[2], Sina Khalili[1]

1. Former M.Sc. Student, Department of Horticultural Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran.

Received: February 21, 2016 Accepted: April 30, 2016

Abstract

In this experiment the mitotic inhibitore colchicine was evaluated for tetraploid induction of Poinssetia (*Euphorbia pulcherrima* var. *pendora red*). The regenerated shoot tip explants were induced with 0.00, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 and 1% (w/v) concentrations of colchicine for 6, 12 and 20 hours, respectively. The most effective treatment was 0.1% colchicine for 12 hours with polyploidy induction rate of 33.0%. The stomata size of tetraploids (18.23× 5.37μm) was significantly larger than that of diploids (12.1× 4.31 μm) but the stomata density of tetraploids (14.89 mm^2) was significantly lower than that of diploids (23.10 mm^2). Compared with diploids, tetraploids had thicker, wider, shorter, rougher and deeper-colorful leaves, fewer roots, shorter shoots and slower growth. Control plants that were considered as diploid plants showed 2n = 2x =28 chromosome number whereas treated plants with 1 w/v % and 6 hours colchicine, showed doubled the number of chromosomes (2n = 4x = 56) who were identified as tetraploid plants. The leaf and the stoma characteristics and chromosome counting could be regarded as helpful indexes to identify colchicine-induced tetraploids in *Poinssetia.*

Keywords: Colchicine, *Poinssetia*, in vitro, polyploidy induction.

Corresponding author: mnorouzi91@ut.ac.ir