نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و هشتم، شماره اول، ۱۴۰۰
۳۳-۴۴
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2021.16928.2550

القاء پلی‌پلوئیدی با استفاده از کلشی‌سین و شناسائی آن از طریق ویژگی‌های سیتولوژیکی در گل سوسن (*Lilium dandie*)

نورالدین ایزدی جلودار[۱]، *اسماعیل چمنی[۲]، علی‌اکبر شکوهیان[۳] و رسول اصغری زکریا[۴]

[۱]دانشجوی دکتری اصلاح و فیزیولوژی گل‌ها و گیاهان زینتی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران،
[۲]استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران،
[۳]دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران،
[۴]استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۷

چکیده

سابقه و هدف: دستورزی سطح پلوئیدی از طریق موتاژن‌ها به‌ویژه موتاژن‌های شیمیایی در سلول‌های سوماتیکی امکان بهنژادی به‌منظور تولید ارقام جدید و با صفات برتر و مطلوب در بسیاری از گونه‌های گیاهی را موفقیت‌آمیزتر نموده است. گونه‌های گیاهی با بیش از دو سری کروموزومی (پلی‌پلوئید) به‌علت افزایش تنوع ژنتیکی در سلسله گیاهان در سازگار کردن بهتر آن‌ها در محیط‌های جدید، تکامل طبیعی و بهنژادی گیاهان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. بر همین اساس پژوهشی به‌منظور القای پلی‌پلوئیدی از طریق کلشی‌سین به‌صورت درون‌شیشه‌ای در یکی از گونه‌های جدید هیبرید آسیایی گل سوسن (*Lilium dandie*) انجام گرفت که دارای پتانسیل بالای زینتی و دارویی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش فلس‌های سوخک درون‌شیشه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل در غلظت‌های مختلف محلول کلشی‌سین (۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد) به‌مدت ٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت تیمار گردید سپس نمونه‌های فلسی جهت باززایی و رشد عادی در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشدی واکشت شدند. پس از بررسی میزان زنده‌مانی، سطح پلوئیدی گیاهچه‌های باززایی شده از طریق شمارش مستقیم تعداد کروموزوم‌های مریستمی نوک ریشه‌ها تعیین گردید. طول، عرض و تراکم روزنه برگ با استفاده از تکنیک لاک بی‌رنگ و شمارش مستقیم تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه در برگ‌های بالغ و توسعه یافته به‌عنوان فاکتورهای سیتولوژیکی و بین گیاهچه‌های شاهد (دیپلوئید) و پلی‌پلوئید (تریپلوئید) مورد مقایسه قرار گرفت. وزن تر گیاهچه‌ها با استفاده از ترازو و شاخص‌های ریخت‌شناسی طول و عرض برگ و طول ریشه نیز از طریق خط‌کش دقیق اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بررسی نتایج نشان داد که با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار ریزنمونه‌های فلسی با کلشی‌سین میزان زنده‌مانی آن‌ها کاهش یافت، کلشی‌سین در القاء پلی‌پلوئیدی (تریپلوئیدی) گل سوسن کاملاً کارآمد و مؤثر بوده و بیش‌ترین میزان پلی‌پلوئیدی (۲٤/۵۵ درصد) در مدت زمان ۱۲ ساعت اتفاق افتاد و بالاترین ضریب بهره‌وری نیز در این مدت زمان از تیمار ۰/۰۱ درصد

* مسئول مکاتبه: echamani@yahoo.com

کلشی‌سین به‌دست آمد. در گیاهچه‌های پلی‌پلوئید نسبت به شاهد (دیپلوئید) تراکم روزنه به‌طور معنی‌داری کاهش یافت در حالی طول روزنه و تعداد کلروپلاست‌های موجود در سلول محافظ روزنه همبستگی مثبتی با افزایش سطح پلوئیدی نشان داد. شاخص‌های وزن تر و ویژگی‌های ریخت‌شناسی طول و عرض برگ و هم‌چنین طول ریشه در گیاهچه‌های پلی‌پلوئید در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد.

نتیجه‌گیری: کاربرد کلشی‌سین در القاء پلی‌پلوئیدی در گل سوسن کاملاً موفقیت‌آمیز بوده و بیش‌ترین بهره‌وری پلی‌پلوئیدی (۴۲/۸۵٪) در مدت زمان ۱۲ ساعت تیمار بهینه شد. تراکم پایین و طول بیش‌تر روزنه و هم‌چنین تعداد کلروپلاست بالای سلول‌های محافظ روزنه در گیاهچه‌های پلی‌پلوئید نسبت به دیپلوئید، شاخص خوبی برای غربال‌گری گیاهچه‌های پلی‌پلوئید می‌باشد. شاخص‌های وزن تر و ویژگی‌های ریخت‌شناسی طول و عرض برگ و طول ریشه گیاهچه‌ها با افزایش سطح پلوئیدی افزایش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: اتوپلی‌پلوئیدی، روزنه، کروموزوم، گل سوسن

مقدمه

جنس سوسن‌ها[1] مربوط به تیره سوسن‌سانان[2]، تقریباً شامل ۱۰۰ گونه بوده که زیرگونه‌ها و واریته‌های آن عمدتاً در مناطقی از نواحی معتدل و سرد آسیای میانه گسترش یافته است (۱۸). گل سوسن *Lilium dandie* یکی از گونه‌های جدید هیبرید آسیایی که در سلول‌های خود دارای ۱۲ جفت (۲n=۲x=۲٤) کروموزوم بوده و دارای گل‌های پرتقالی- قرمز رنگ هستند. دوره رشدی این گونه کوتاه و در حدود ۸۰ روز بوده و گل‌آذین بلند و مقاوم با طول عمر حدود ۲۰ روزه دارد. ارتفاع این گیاه حدود ۷۰-۶۰ سانتی‌متر و تعداد جوانه‌ها به ازای هر گیاه رشد کرده از سوخی با محیط ۱٦-۱٤ سانتی‌متر ۵-۳ عدد می‌باشد به‌علاوه سوخ آن خوراکی و دارای مزه شیرین بوده و علاوه بر این‌که دارای ارزش غذایی بالایی است حاوی مواد بیواکتیو نیز می‌باشد (۳۳).

دورگ‌گیری‌های درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای در گیاهان به بروز صفات مطلوب و برتر کمک زیادی نموده است اما ژرم‌پلاسم‌های موجود هنوز نتوانسته است جوابگوی نیاز مصرف‌کنندگان تنوع طلب باشند. بنابراین بهنژادگران و پژوهشگران همواره به دنبال منابع دیگر ایجاد تنوع در گیاهان هستند. از آنجا که جهش‌های خود به خودی در گیاهان به ندرت اتفاق می‌افتد تولید جهش یافته‌های القائی روش مناسبی برای ایجاد تنوع در گیاهان محسوب می‌شود. بنابراین دست‌ورزی سطح پلوئیدی در شرایط درون‌شیشه‌ای امکان برنامه‌های بهنژادی به‌منظور تولید رقم‌های برتر و جدید را در بسیاری از گونه‌های گیاهی موفقیت-آمیزتر نموده است (۳ و ۱۵).

به‌طورکلی پلی‌پلوئیدی نوعی استعداد و توانایی سلول در تغییر چرخه طبیعی است که در نتیجه آن تولید DNA در هسته سلولی مستقل از چرخه معمولی میتوز رخ می‌دهد و سلول نمی‌تواند وارد مرحله تقسیم طبیعی شود و در واقع یک چرخه ناقص تقسیم سلولی صورت می‌گیرد این پدیده سبب توقف تقسیم سلولی، افزایش سطح پلوئیدی سلول و در نهایت سبب افزایش ژن‌ها می‌گردد (۱). پلی‌پلوئیدی به طور معمول بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی (اندازه و شکل اندام‌های رویشی و زایشی گیاه)، میکروسکوپی (اندازه و تراکم روزنه و تعداد کلروپلاست‌های

1- Lilium L.
2- Liliaceae

موجود در سلول‌های محافظ روزنه)، فیزیولوژیکی (زمان و طول مدت گلدهی، باروری گیاه، ویژگی‌های دانه و قدرت باروری دانه‌های گرده، فتوسنتز، مقاومت در برابر تنش‌ها و غیره) و فرایندهای زیست-شیمیایی گیاه مؤثر است (۱۱).

در میان گیاهان زینتی رقم‌های زیادی از طریق پلی‌پلوئیدی تولید و توسعه پیدا کرده‌اند زیرا پلی‌پلوئیدها دارای خصوصیات باغبانی مطلوبی مانند طول عمر زیاد گل، گل پررنگ و بزرگ‌تر بوده (۲۰) و سازگاری بیش‌تری نسبت به گیاهان دیپلوئیدشان دارند (۱۰). گل‌های سوسن پلی‌پلوئید دارای مزایای بیش‌تری مانند برگ ضخیم، ساقه‌های محکم (به‌ویژه برای پیش‌رسی در طول دوره زمستان مهم است) می‌باشد. تولید گیاهان پلی‌پلوئید یکی از مسائل کنونی در اصلاح گل سوسن می‌باشد (۲۹ و ۳۰). گیاهان پلی‌پلوئید ممکن است از طریق استفاده از مضاعف‌کننده‌های کروموزوم با تیمار بافت‌های رویشی با بازدارنده‌های دوک مانند کلشی‌سین تولید شوند (۵ و ۹) و کاربردهای گسترده‌ای در برنامه‌های بهنژادی برای به‌دست آوردن تنوع ژنتیکی، تولید ارقام جدید و ترمیم عقیمی درون‌گونه‌ای دارد (۲ و ۱۲). کلشی‌سین یک آلکالوئید طبیعی و از پرکاربردترین موتاژن شیمیایی جهت القاء پلی‌پلوئیدی در سلول‌های سوماتیکی می‌باشد که از گل حسرت[1] استخراج می‌شود این ماده برای انسان خیلی مضر بوده و در برخی موارد فعالیت موتاژنی نامطلوبی بر گیاهان نیز دارد. کلشی‌سین با اتصال به زیرواحد پروتئینی میکروتوبول‌ها (توبولین)، تشکیل میکروتوبول‌ها را مهار کرده و از مهاجرت قطبی کروموزوم‌ها ممانعت می‌کند بنابراین چرخه تقسیم سلولی در مرحله آنافاز عملی نمی‌گردد که در نتیجه آن کروموزوم‌های دو برابر شده در داخل یک هسته باقی می‌مانند (۹ و ۳۰).

تاکنون ویژگی‌های بسیاری از گل‌های زینتی مانند گل داوودی، بنفشه فرنگی و زنبق از طریق پلی‌پلوئیدی بهبود و توسعه پیدا کرده است (۲۳).

برای به‌دست آوردن موفقیت در رقابت‌های جهانی در صنعت گلکاری، تولید و توسعه ارقام جدید و محبوب به‌وسیله پلی‌پلوئیدی، دورگه‌گیری و جهش ضروری به‌نظر می‌رسد بر همین اساس پژوهش حاضر در راستای القاء پلی‌پلوئیدی در واریته *Lilium dandie* انجام گرفت که در آن علاوه بر به‌دست آوردن ارقام جدید و ارائه مؤثرترین غلظت و زمان تیمار کلشی‌سین، تلاش شده است روش مناسب و آسانی برای شناسایی پلی‌پلوئیدی در گل سوسن نیز ارائه گردد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: سوخ‌های *L. dandie* با قطر تقریبی ٤/٥ سانتی‌متر در فصل خواب از رویشگاه طبیعی‌اش واقع در کشور چین تهیه و به منظور برطرف کردن نیاز سرمایی به‌مدت ۸ هفته در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال و در داخل پیت مرطوب نگهداری گردید. پس از رفع نیاز سرمایی فلس‌های وسط سوخ به طول تقریبی ۲/۵ سانتی‌متر به دقت از صفحه پایگاهی جدا شده و پس از یک ساعت شستشو زیر آب جاری جهت استریل سطحی به‌مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و سپس ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد قرار گرفت و در نهایت پس از سه بار آبکشی با آب مقطر دو بار استریل، ریزنمونه‌ها تقریباً به طول یک سانتی‌متر و عرض نیم سانتی‌متر از قسمت صفحه تحتانی و چسبیده به صفحه پایگاهی هر یک از فلس‌ها تهیه گردید و در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوک (MS) جامد بدون تنظیم‌کننده‌های رشدی با pH=۵/۷±۰/۱ قرار داده شد بدین‌منظور ۳۰ میلی‌لیتر از محیط‌کشت در شیشه‌های ۲۰۰ میلی‌لیتری ریخته

1- *Colchicum autumnale*

شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتی‌مترمربع استریل گردید و سپس ریزنمونه‌ها در آن کشت گردید. ریزنمونه‌ها در مدت سه ماه دو بار واکشت گردید و در این مدت تمامی ریزنمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، ۱۶ ساعت دوره نوری در روز و زیر تابش مداوم (۵۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه) لامپ فلوئورسنت سفید در اتاق رشد نگه‌داری شدند. سپس سوخک گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای با وزن تقریبی ۱/۵ تا ۲ گرم جمع‌آوری و برای اعمال تیمار استفاده گردید.

تیمار کلشی‌سین: تأثیر غلظت‌های کلشی‌سین بر فلس‌های سوخک برای هریک از زمان‌های تیمار به‌طور جداگانه ارزیابی گردید. فلس‌های سالم سوخک انتخاب و به‌مدت ۱۰ روز در محیط کشت پایه MS جامد بدون تنظیم‌کننده‌های رشدی جهت تمایزیابی جوانه‌ها و فعالیت‌های میتوزی قرار داده شد و سپس در غلظت‌های مختلف محلول کلشی‌سین (۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد) استریل شده با فیلتر سر سرنگی با قطر منافذ ۰/۲ میکرومتر به‌مدت ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت در دمای اتاق تیمار گردید. ریزنمونه‌های تیمار شده بلافاصله با آب مقطر استریل شستشو داده شد و به‌ازای هر تیمار ۲۴ عدد ریزنمونه در محیط کشت پایه MS بدون تنظیم‌کننده‌های رشدی کشت گردید و در مدت باززایی گیاهچه‌ها از فلس، تمامی کشت‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، ۱۶ ساعت دوره نوری در روز و زیر تابش مداوم (۵۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه) لامپ فلوئورسنت سفید نگهداری شدند. لازم به ذکر است که جهت پرآوری گیاهچه‌ها و تولید ریشه‌های جدید ریزنمونه‌ها در چندین مرتبه با فاصله یک ماه در محیط کشت جدید واکشت گردیدند.

تعیین سطح پلوئیدی: جهت تعیین سطح پلوئیدی، تعداد کروموزوم‌های هر یک از گیاهچه‌ها به‌طور جداگانه شمارش شد روش بررسی کروموزوم‌های میوزی و میتوزی تقریباً مشابه روش توصیه شده پارک و همکاران (۱۹۹۹) و به‌ترتیب شامل مراحل جمع‌آوری ریشه، پیش‌تیمار، تثبیت، نگه‌داری، هیدرولیز و رنگ‌آمیزی نمونه‌ها بود (۲۴). بدین‌منظور تقریباً یک سانتی‌متر از ریشه‌های تازه رشد کرده گیاهچه‌ها جدا و بلافاصله در پیش‌تیمار آب یخ (صفر درجه سلسیوس) به‌مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد سپس نمونه‌ها در محلول ترکیبی(۱:۱) اسید کرومیک ٪۱ و فرمالین ٪۱۰ در دمای ۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت تثبیت گردید. از این مرحله به بعد جهت نگهداری طولانی‌مدت، نمونه‌ها در الکل ٪۷۰ قرار داده شدند پس از شستشو نمونه‌ها در هیدروکسید سدیم یک نرمال به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام گرم (۶۰ درجه سلسیوس) هیدرولیز شده و مجدداً شستشو داده شدند. ریشه‌ها با قرار دادن بر روی کاغذ صافی خشک شده و جهت رنگ‌آمیزی به‌مدت ۱۵ ساعت در دمای اتاق با محلول از قبل آماده شده هماتوکسیلین تیمار گردید سپس جهت هضم دیواره سلولی و نمایان شدن بهتر هسته سلول، نمونه‌ها به‌مدت ۲-۱ ساعت با آنزیم سیتاز استخراج شده از دستگاه گوارش حلزون تیمار گردید. ۲-۱ میلی‌متر از نوک ریشه‌ها بریده شده و بر روی لام شیشه‌ای قرار داده شده و با نوک نیدل استیل له گردید. در این مرحله یک قطره اسید استیک ۴۵ درصد روی نمونه ریخته و به آرامی لامل روی آن قرار داده شد و در نهایت با زدن چند ضربه آرام با ته خودکار بر روی لامل نمونه‌ها بخوبی اسکواش شدند، طوری که فقط یک لایه هسته سلولی با فاصله مناسب از هم بین لام و لامل قرار گرفت. تعداد کروموزوم‌ها در مرحله G_1 تقسیم سلولی به‌صورت مستقیم زیر میکروسکوپ نوری شمارش و عکس‌برداری گردید.

بررسی سیتولوژیکی و ریخت‌شناسی: در پژوهش حاضر ویژگی‌های سیتولوژیکی شامل طول و عرض سلول محافظ روزنه، تراکم روزنه و تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه در گیاهچه‌های دیپلوئید و پلی‌پلوئید شناسایی‌شده از طریق شمارش کروموزومی ارزیابی و با یکدیگر مقایسه گردید. بدین‌منظور ۱۰ گیاهچه دیپلوئید (شاهد) و ۱۰ گیاهچه پلی‌پلوئید به‌صورت تصادفی انتخاب گردید و از هر کدام از آن‌ها برگ‌های بالغ و خوب توسعه یافته برای بررسی سیتولوژیکی در پژوهش حاضر در نظر گرفته شد. جهت اندازه‌گیری طول، عرض و تراکم روزنه از تکنیک لاک ناخن بی‌رنگ استفاده شد (۱۳) در این روش ابتدا اپیدرم پایینی هر یک از برگ‌ها با لاک پوشش داده شد و پس از خشک شدن قسمت میانی آن را بر روی چسب شیشه‌ای چسبانده و سپس با دقت از برگ جدا کرده و بر روی یک لام چسبانده شده و زیر میکروسکوپ نوری مقیاس‌دار ارزیابی و عکس‌برداری شد. جهت شمارش تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ، اپیدرم پایینی برگ بالغ به آرامی جدا شده و به دقت بر روی لام قرار داده شد. سپس یک قطره آب مقطر بر روی آن ریخته شده و پس از اطمینان از قرار گرفتن لایه نازک اپیدرمی در یک سطح، لامل بر روی آن قرار داده شد و زیر میکروسکوپ ارزیابی و عکس‌برداری انجام گرفت. برای اندازه‌گیری شاخص‌های ریخت‌شناسی ۵ عدد گیاهچه دیپلوئید و۵ عدد گیاهچه پلی‌پلوئید انتخاب گردید. وزن تر گیاهچه‌ها با استفاده از ترازوی ۰/۰۰۱ و شاخص‌های ریخت‌شناسی از قبیل طول و عرض برگ و طول ریشه نیز از طریق خط‌کش دقیق اندازه‌گیری شد.

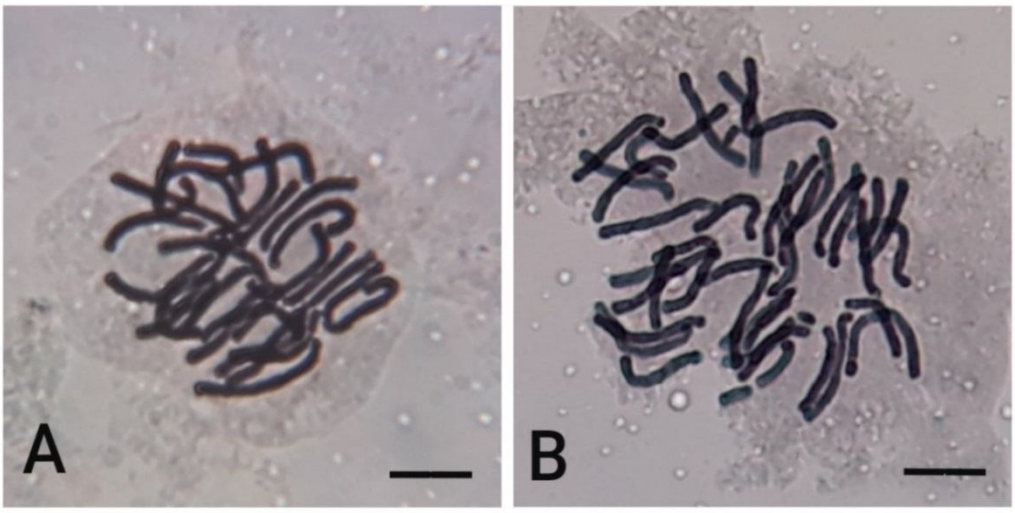
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16.0 و Excel 2010 و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت.

نتایج و بحث

میزان زنده‌مانی: درصد زنده‌مانی عامل مهمی در ارزیابی بهره‌وری القای پلی‌پلوئیدی پس از اعمال تیمار فلس‌های سوخک با محلول کلشی‌سین می‌باشد. ریزنمونه‌های تیمار شده تقریباً ٤-۳ هفته پس از اعمال تیمار، علایم تنش حاصل از تیمار با کلشی‌سین را نشان دادند. فلس‌های رشد نکرده و قهوه‌ای به‌عنوان فلس‌های بافت مرده در نظر گرفته شده و از کشت‌ها حذف شدند.

نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد بین صفت میزان زنده‌مانی و غلظت کلشی‌سین وجود دارد. در حالی که اختلاف معنی‌داری بین زمان تیمار و میزان زنده‌مانی مشاهده نگردید ولی با توجه به مقایسه میانگین داده‌ها با افزایش زمان تیمار میزان زنده‌مانی افزایش یافت. بیش‌ترین میزان زنده‌مانی در کم‌ترین غلظت کلشی‌سین ۰/۰۱ درصد به‌دست آمد (جدول ۱). به‌طورکلی در میان فلس‌های تیمار شده با محلول کلشی‌سین بیش‌ترین درصد زنده‌مانی (۹۱/٦٦ درصد) مربوط به تیمار ۰/۰۱ درصد۰ در مدت زمان ٦ ساعت بود. رابطه معکوس بین غلظت کلشی‌سین و بقاء ریزنمونه‌ها در این آزمایش مورد انتظار بود که با پژوهش‌های انجام شده در سایر گیاهان مختلف در شرایط طبیعی مطابقت داشت. این نتایج با پژوهش هوو و همکاران (۲۰۱٦) مطابقت دارد ایشان تأثیر منفی غلظت بالای کلشی‌سین را بر میزان زنده‌مانی *Lilium leichtlinii* گزارش کردند (١٤). سینگ و روی (۱۹۸۸) نیز گزارش کردند که غلظت بالای کلشی‌سین می‌تواند سبب از بین رفتن قسمت‌هایی از گیاهچه از طریق آسیب به بخش‌هایی از بافت شود (۲۷). بسیاری از پژوهشگران دیگر نیز تأثیر سمیت کلشی‌سین بر روی ریزنمونه‌ها و کاهش میزان زنده‌مانی و باززایی کشت‌ها را تأیید نموده‌اند (۷، ١٦ و ۲۸).

پلی‌پلوئیدی: تمامی گیاهچه‌های باززایی شده دو ماه بعد از تیمار با کلشی‌سین در محیط کشت‌های جدید واکشت گردید و پس از یک ماه سطح پلوئیدی هر یک از گیاهچه‌ها به‌طور جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از شمارش کروموزومی سلول‌های مریستمی نوک ریشه‌های در حال رشد نشان داد که تیمار کلشی‌سین به‌طور موفقیت‌آمیزی ۲۲ گیاهچه تریپلوئید (2n=3x=36) از فلس سوخک *L. dandie* را القاء نمود. مطالعه مرحله G_1 تقسیم سلولی در نوک ریشه‌ها تریپلوئید بودن گیاهچه‌ها را به روشنی مشخص نمود (شکل ۱). گیاهان پلی‌پلوئید در ابتدای رشد تا حدودی رشد کند و نامناسب داشتند کاهش رشد پلی‌پلوئیدها پس از تیمار با مواد ضدمیتوزی مانند کلشی‌سین به احتمال زیاد به‌دلیل کاهش سرعت و کم شدن تعداد تقسیم سلولی باشد که در اثر اختلال در میزان اکسین در سلول‌های مریستمی در حال تقسیم، کاهش میزان تنفس و فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌ها ایجاد می‌شود و به‌طور معمول در جمعیت‌های تحت تیمار با کلشی‌سین مشاهده می‌شود (۸).



شکل ۱- کروموزوم‌های متافازی در سلول‌های نوک ریشه *Lilium dandie* از فلس‌های تیمار شده با کلشی‌سین. A. دیپلوئید و B. تریپلوئید.

Fig. 1. Metaphase chromosomes in root tip cells of *L. dandie* from bulblets that treated with colchicine. A. Diploid (2n=2x=24) and B. Triaploid (2n=3x=36). Scale bar=10 μm

بررسی نتایج حاصل از یافته‌های این پژوهش نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بین پلی‌پلوئیدی و زمان تیمار کلشی‌سین وجود داشت ولی اثر غلظت بر القاء پلی‌پلوئیدی معنی‌دار نشد هرچند که در مجموع، مقایسه میانگین داده‌های مربوط به تیمارهای ۰/۰۱ درصد از تیمارهای دیگر بیش‌تر بود. بیش‌ترین تعداد گیاهچه‌های پلی‌پلوئید (۱٤ عدد) در مدت زمان ۱۲ ساعت تیمارها القاء شد (جدول ۱). این نتایج تا حدودی با نتایج آزمایش‌های هوو و همکاران (۲۰۱٦) انطباق دارد ایشان به این نتیجه رسیدند که در *Lilium leichtlinii* طولانی‌ترین مدت تیمار همراه با کم‌ترین غلظت کلشی‌سین در القای پلی‌پلوئیدی موثرتر است (۱٤). بسیاری از پژوهشگران دیگر نیز نشان دادند که تیمار با کلشی‌سین یک روش کارآمدتری جهت مضاعف‌سازی کروموزوم در گیاهان می‌باشد اما واکنش به کلشی‌سین بسته به گونه‌های گیاهی متفاوت می‌باشد (٦، ۲۵ و ۳۵). به‌طورکلی با توجه به تعداد

کل فلس‌های تیمار شده، میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در هر یک از تیمارها و تعداد گیاهچه‌های پلی‌پلوئید باززایی شده، بهینه‌ترین تیمار ۰/۰۱ درصد کلشی‌سین در مدت زمان ۱۲ ساعت بود که با ضریب بهره‌وری بالاتری (٤٢/٨٥ درصد) نسبت به تیمارهای دیگر در القای پلی‌پلوئیدی تأثیر گذاشت.

جدول ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف و مدت تیمار بر القای پلی‌پلوئیدی گیاهچه‌ها در *Lilium dandie*.

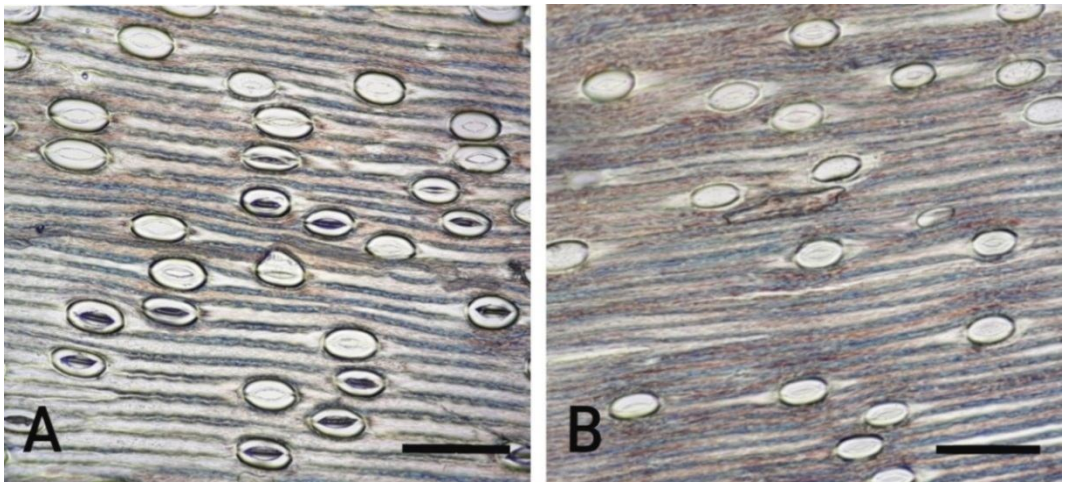
Table 1. Effect of different concentrations and treatment duration on induction of polyploid plantlets in *Lilium dandie*.

کلشی‌سین Colchicine		تعداد فلس‌های تیمار شده	میزان زنده‌مانی	تعداد گیاهچه‌های تست شده	گیاهچه‌های تریپلوئید	بهره‌وری پلی‌پلوئیدی
مدت (ساعت) Time (h)	غلظت (٪) Conc. (%)	No. of treated scales	Survival rate (%)	No. of plantlets tested	Triploid plantlets (3x)	Polyploidy efficiency (%)
6	0.01	24	91.66	22	0	0
6	0.05	24	87.49	21	0	0
6	0.1	24	74.99	18	2	11.11
12	0.01	24	78.49	21	8	42.85
12	0.05	24	78.49	21	4	19.04
12	0.1	24	70.82	17	2	11.76
24	0.01	24	83.33	20	4	20.00
24	0.05	24	74.99	18	2	11.11
24	0.1	24	62.49	15	2	13.33

بررسی ویژگی‌های روزنه‌ای: بر اساس ریخت‌شناسی روزنه می‌توان گیاهان پلی‌پلوئید را مورد شناسایی قرار داد (۱۳). تراکم روزنه تحت‌تأثیر عوامل خارجی مانند دما و محتوای آب بافت‌ها قرار نمی‌گیرد و شمارش روزنه روشی مناسب، آسان و قابل‌اعتماد است که می‌تواند برای تعیین سطح پلوئیدی استفاده شود (٢٦).

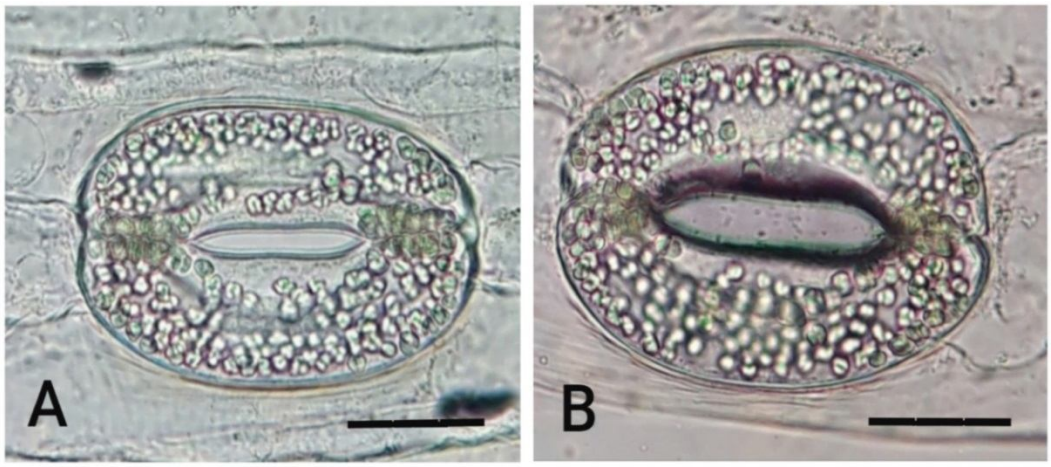
نتایج حاصل از بررسی‌های ریخت شناسی روزنه نشان داد که برگ گیاهچه‌های پلی‌پلوئید از لحاظ طول و تراکم روزنه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمالیک درصد با شاهد (دیپلوئید) وجود داشت در حالی‌که هیچ اختلاف معنی‌داری از لحاظ عرض روزنه در گیاهچه‌های دیپلوئید و پلی‌پلوئید مشاهده نگردید (جدول ۲) (شکل ۲). بر اساس این یافته‌ها می توان نتیجه گرفت که تراکم روزنه همبستگی منفی شدیدی با افزایش سطح پلوئیدی وجود دارد و این همبستگی منفی می‌تواند به‌عنوان ابزار متمایزکننده‌ای در گیاهان با سطوح پلوئیدی متفاوت مختلف مورد استفاده قرار گیرد (۲۸). تاکنون پژوهش‌های متعدی در مورد اندازه و تراکم روزنه برای متمایز کردن گیاهچه‌های پلی‌پلوئید و ژنوتیپ شاهدشان مانند ارکیدها (٢٦) و استویا[1] (٣٦) به اثبات رسیده است که با نتایج پژوهش حاضر همسو می‌باشد. در بررسی نتایج اختلاف معنی‌داری از لحاظ تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه در گیاهچه‌های دیپلوئید و پلی‌پلوئید مشاهده گردید که به‌ترتیب ۷۳/۸ و ٨٦/٥ عدد کلروپلاست در هر سلول محافظ روزنه بود (شکل ۳) که این یافته‌ها با نتایج آزمایش‌های یتیسیر و ساری (۲۰۰۳) و امیدبیگی و همکاران (۲۰۱۰a) مطابقت داشت. یافته‌های ایشان اثبات کرد که یکی از اثرات پلی‌پلوئیدی افزایش قابل‌ملاحظه تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه می‌باشد (۲۱ و ۳۲).

1- *Stevia rebaudiana*



شکل ۲- تفاوت تراکم روزنه بین گیاهچه دیپلوئید و تریپلوئید در *Lilium dandie*. A. دیپلوئید و B. تریپلوئید.

Fig. 2. Difference in stomata density between diploid and triploid plantlet in *Lilium dandie*. A. Diploid (2n=2x=24). B. Triploid (2n=3x=36). Scale bar=50 μm.



شکل ۳- ریخت شناسی سلول‌های محافظ روزنه همراه با کلروپلاست‌ها در *Lilium dandie*. A. دیپلوئید و B. تریپلوئید.

Fig. 3. Morphology of stomatal guard cells with chloroplasts in *L. dandie*. A. Diploid (2n=2x=24). B. Triploid (2n=3x=36). Scale bar=1 μm.

بررسی‌های ریخت‌شناسی: وزن تر گیاهچه‌ها در پلی‌پلوئیدها در مقایسه با گیاهچه‌های دیپلوئید افزایش معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان داد گیاهچه‌های پلی‌پلوئید و دیپلوئید به‌ترتیب دارای میانگین وزن تر ۲/۹۲ و ۲/۴۸ گرم بود (جدول ۲) که این افزایش زیست‌توده در سطوح پلوئیدی بالاتر می‌تواند به‌علت بیش‌تر بودن میانگین مساحت برگ‌ها، افزایش فتوسنتز و افزایش کارایی آن و بهبود روابط آبی و هورمونی باشد که باعث افزایش مواد ذخیره‌ای بیش‌تر در گیاهچه می‌شود که این نتایج با نتایج پژوهش‌های امیدبیگی و همکاران (۲۰۱۰b) همسو می‌باشد. پیامد بلافصل القاء پلی‌پلوئیدی افزایش اندازه سلولی است این امر می‌تواند از طریق افزایش اندازه سلول‌ها و افزایش سرعت بزرگ شدن سلولی تحقق یابد (۲۲).

بررسی نتایج نشان داد که طول و عرض برگ به‌ترتیب در سطح احتمال ۵ و یک درصدو هم‌چنین طول ریشه سطح احتمال ۵ درصد در گیاهچه‌های پلی‌پلوئید در مقایسه با گیاهچه‌های دیپلوئید به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. این افزایش شاخص‌های

ریخت‌شناسی بیانگر افزایش قدرت رشدی گیاهچه‌های پلی‌پلوئید در مقایسه با گیاهچه‌های دیپلوئید می‌باشد. زاهدی و همکاران (۲۰۱٤) گزارش کردند که تحریک پلی‌پلوئیدی در زرین‌گیاه[1] سبب ایجاد گیاهانی با برگ‌های بزرگ‌تر، ضخیم‌تر و تیره‌تر شد. امیدبیگی و همکاران (۲۰۱۰b) نیز در گیاه بادرشبی[2] به چنین نتایجی دست یافته بود (۲۲). لاوانیا (۲۰۰۵) اثبات کرد که حجم سلول‌های تتراپلوئید در مقایسه با سلول‌های دیپلوئید معمولاً دو برابر می‌باشد، در حالی‌که سطح سلولی آن‌ها ۱/۵ برابر است که این باعث بزرگ‌تر شدن جثه گیاهان در پاسخ به پلی‌پلوئیدی می‌شود افزایش حجم و سطح در گیاهان پلی‌پلوئید به احتمال زیاد به این علت است که دسته‌های کروموزومی سلول‌ها افزایش یافته و به دنبال آن افزایش رشد سبب می‌گردد تا نسبت سیتوپلاسم به حجم هسته حفظ گردد (۱۷). القاء پلی‌پلوئیدی راهبردهای را در سلول فعال کرده که در نتیجه آن میزان DNA الگو و به دنبال آن نسخه برداری و ترجمه نیز تحت‌تأثیر قرار گرفته و منجر به افزایش، کاهش و یا حتی خاموشی بیان ژن‌ها می‌شود و بدین‌طریق بسیاری از صفات فیزیولوژیکی و ریخت‌شناسی گیاه را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (۱).

انتخاب روش برای شناسایی سطوح پلوئیدی بستگی به زمان و بودجه دارد. فلوسیتومتری[3] (روش مستقیم) روشی سریع و مؤثر بوده، اما تجزیهنمونه‌ها در این روش هزینه زیادی دارد در حالی که تحلیل ریخت شناسی (روش غیرمستقیم) ارزان‌تر و در عوض زمان‌بر است. بااین‌حال تمامی روش‌ها دقیق و قابل‌اعتماد بوده و نتایج مشابهی خواهند داشت (٤).

جدول ۲- مقایسه میانگین ویژگی‌های روزنه‌ای و ریخت‌شناسی گیاهچه‌های دیپلوئید و تریپلوئید در *Lilium dandie*

Table 2. Mean comparison of stomatal and morphological traits in diploid and triploid plantlets *in Lilium dandie*.

سطح پلوئیدی/ ویژگی Ploidy level/ morphological traits	دیپلوئید Diploid (2x)	تریپلوئید Triploid (3x)
طول روزنه Stomata length (μm)	8.48 [b]	10.75 [a]
عرض روزنه Stomata width (μm)	6.58 [a]	6.74 [a]
تراکم روزنه Stomata density (1000 μm^2)	2.05 [a]	1.60 [b]
تعداد کلروپلاست/ سلول محافظ روزنه Chloroplast/ guard cell	73.8 [b]	86.5 [a]
وزن تر Fresh weight	2.48 [b]	2.92 [a]
طول برگ Leaf length	3.70 [b]	4.54 [a]
عرض برگ Leaf width	3.10 [b]	4.02 [a]
طول ریشه Root length	18.80 [b]	19.40 [a]

1- *Dracocephalum Kotschyi*
2- *Dracocephalum moldavica* L.
3- Flow cytometry

گیاهچه‌های تریپلوئید به‌دست آمده از این پژوهش چند بار در محیط کشت جدید واکشت گردید تا ضمن بزرگ شدن، سوخک درون‌شیشه‌ای برای سازگاری در محیط خاک آماده شود و هم‌چنین قابلیت زینتی و دارویی آن مورد ارزیابی قرار گیرد. باور بر این است که گیاهچه‌های تریپلوئید به‌دست آمده از این پژوهش می‌تواند برای آزادسازی رقم جدید در گونه *L. dandie* با ویژگی‌های زینتی و دارویی مطلوب مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تعیین غلظت و مدت زمان تیمار با مواد افزاینده سطح پلوئیدی کلشی‌سین، در یک برنامه القاء پلی‌پلوئیدی موفق ضروری است و برای هر گونه باید به طور جداگانه بهینه شود. در این آزمایش با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار با کلشی‌سین، درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها به‌دلیل افزایش سمّیت کلشی‌سین کاهش یافت. بیش‌ترین ضریب بهره‌وری برای القای پلی‌پلوئیدی در کلشی‌سین ۰/۰۱ درصد به‌مدت ۱۲ ساعت نسبت به سایر تیمارها به‌دست آمد. بررسی‌های سیتولوژیکی گیاهچه‌های دیپلوئید و تریپلوئید نشان داد که افزایش سطح پلوئیدی باعث افزایش طول روزنه و همچنین افزایش تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه شد در حالی که بین افزایش سطح پلوئیدی و تراکم روزنه همبستگی منفی وجود داشت. این ویژگی‌های روزنه‌ای می‌تواند به‌عنوان شاخص مفیدی برای پیش‌غربالگری سریع گیاهچه‌ها مورد استفاده قرارگیرد. شاخص‌های وزن تر، طول و عرض برگ و هم‌چنین طول ریشه در گیاهچه‌های پلی‌پلوئید در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از زحمات آقایان دکتر یونس پوربیرامی (عضو هیأت علمی دانشگاه محقق اردبیلی) و دکتر عیسی ظریفی (عضو هیأت علمی بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران) که در اجرای بهتر این پژوهش ما را یاری نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Adams, K.L. and Wendel, J.F. 2005. Polyploidy and genome evolution in plants. Curr. Opin. Plant Bio. 8: 2. 135-41.
2. Anderson, J.A., Mousset-Declas, C., Williams, E.G. and Taylor, N.L. 1991. An *in vitro* chromosome doubling method for clovers (*Trifolium* spp.). Genome. 34: 1-5.
3. Bargaei, S.F., Sarikhani, H., Chaei-chi, M. and Kashi, A. 2010. *In vitro* Polyploidy induction of *Melissa officinalis* L. I. J. Med. Ar. Plants. 26: 3. 283-295. (In Persian)
4. Beck, S.L., Visser, G. and Dunlop, R.W. 2005. A comparison of direct (flow cytometry) and indirect (stomatal guard cell lengths and chloroplast numbers) techniques as a measure of ploidy in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). S. Afr. J. Bot. 71: 3. 354-358.
5. Blakeslee, A.F. and Avery, A.G. 1937. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. J. Hered. 28: 393-411.
6. Blasco, M., Badenes, M.L. and del Mar Naval, M. 2015. Colchicine-induced polyploidy in loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 120: 2. 453-461.
7. Cohen, D. and Yao, J.L. 1996. *In vitro* chromosome doubling of nine Zantedeschia cultivars. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 47: 43-49.
8. Dijkstra, H. and Speckmann, G.I. 1980. Autotetrapliody in caraway (*Carum carvi* L.) for the increase of the aetheric oil content of the seed. Euphytica. 29: 89-96.

9.Emsweller, S.L. 1988. Developments in plant breeding due to the use of colchicine. Lily Yearbook of the North American Lily Society. 41: 75-85.
10.Gao, S.L., Zhu, D.N., Cai, Z.H. and Xu, D.R. 1996. Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 47: 1. 73-77.
11.Gotbi Ravandi, E., Dehghan, E., Estaji, A.R. and Naghdi-Badi, H. 2014. Increasing the production of valuable medicinal secondary metabolites by chromosome manipulation: Prespectives and techniques of induction and selection of polyploid plants. J. Med. Plants. 50: 2. 11-25. (In Persian)
12.Griesbach, R.J. 1990. Colchicine-induced polyploidy in *Eustoma grandiflorum*. Hort. Sci. 25: 1284-1286.
13.Hamill, S.D., Smith, M.K. and Dodd, W.A. 1992. *In vitro* Induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. Aust. J. Bot. 40: 887-896.
14.Heo, J.Y., Jeong, S.H., Choi, H.R. and Park, S.M. 2016. Polyploidy production in *lilium leichtlinii* var. maximowiczii using colchicine. J. Anim. Plant Sci. 26: 4. 1111-1116.
15.Jafarkhani Kermani, M., Abdolmohammadi, M. and Hosseini, Z.S. 2016. Ploidy level of progenitors affects polyploidization and hybridized progenies in roses. 1st International and 2nd National Ornamental Plants Congress. Mashhad, Iran. 188p. (In Persian)
16.Jahne, A. and Lorz, H. 1995. Cereal microspore culture. Plant Sci. 109: 1-12.
17.Lavania, U.C. 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phytopharmaceuticals. Plant Genet. 3: 7-170.
18.Liang, S. and Tamura, M.N. 2000. Lilium, Flora of China. Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. 24: 135-149.
19.Murashige, T. and Skoog, R. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
20.Okazaki, K. and Hane, Y. 2005. Comparison of diploid and chimeric forms (4x/2x) of asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.) under natural and early forcing culture. N. Zeal. J. Crop Hort. Sci. 33: 261-267.
21.Omidbaigi, R., Mirzaee, M., Hassani, M.E. and Sedghi Moghadam, M. 2010a. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. Int. J. Plant Produc. 4: 2.87-98.
22.Omidbaigi, R., Yavari, S., Hassani, M.E. and Yavari, S. 2010b. Induction of autotetraploidy in Dragonh (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatments. J. Fruit Or. Plant Res. 18: 1. 23-35.
23.Otto, S.P. and Whitton, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. Ann. Rev. Genet. 34: 37-401.
24.Park, S.M., Hiramatsu, M. and Wakana, A. 1999. Aneuploid plants derived from crosses with triploid grapes through immature seed culture and subsequent embryo culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 59: 2. 125-133.
25.Sarathum, S., Hegele, M., Tantiviwat, S. and Nanakorn, M. 2010. Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. Eur. J. Hort. Sci. 75: 3. 123-127.
26.Silva, P.A.K.X., Sidia, C.J. and Maria, H.B.Z. 2000. Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl. (orchidaceae) by *in vitro* techniques. Ciencia Rural. 30: 105-111.
27.Singh, R.N. and Roy, S.K. 1988. Induced colchiploidy in *Petunia hybrida*. Horticulture Morphocytogenetical studies. Cytologia. 53: 3. 577-584.
28.Song, P., Kang, W. and Peffley, E.B. 1997. Chromosome doubling of *Allium fistulosum* × *A. cepa* interspecific F_1 hybrids through colchicine treatment of regenerating callus. Euphytica. 93: 257-262.

29. Van Holsteijn, H.M. 1994. Plant breeding of ornamental crops: Evolution to a bright future. Acta Hort. 355: 63-69.
30. Van Tuyl, J.M., Van Holsteijn, H.M. and Kwakkenbos, A.A. 1990. Research on polyploidy in interspecific hybridization of lily. Acta Hort. 266: 323-329.
31. Vandehout, H., Ortiz, R., Vuylsteke, D., Swennen, R. and Bai, K.V. 1995. Effect of polyploidy on stomatal and other quantitative traits in plantain and banana hybrids. Euphytica. 83: 117-122.
32. Yetisir, H. and Sari, N. 2003. A new method for haploid muskmelon (*Cucumis melo* L.) dihaploidization. Sci. Hort. 98: 277-283.
33. Yuan, S., Liu, C. and Ming, J. 2016. A new lily cultivar ' dandie. Acta Hort. Sin. 43: 1-2.
34. Zahedi, A.A. 2014. The effects of colchicine on some morphological, biochemical and cytogenetic of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. M.Sc. Thesis. Urmia University, Iran. 96p.
35. Zhang, Z., Dai, H., Xiao, M. and Liu, X. 2008. *In vitro* induction of tetraploids in *phlox subulata* L. Euphytica. 159: 59-65.
36. Zhang, H., Shaoy, A., Juan, H., Zhe, L., Xiang, L., Han, B. and Ren, C. 2018. Induction, identification and characterization of polyploidy in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Bio. 35: 81-86.