Archive of SID

فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی ۱۱، جلد ۴، شماره ۴، پاییز ۸۹، صفحه ۲۳ تا صفحه۳۲

مطالعه القای پلی پلوئیدی و سیتومیکسیس با کلشیسین در سه رقم ذرت خوشه‌ای *(Sorghum bicolor)*

بابک دلنواز هاشملویان[۱]، عذرا عطائی عظیمی[۱]، حسن قاسم‌پور[۲]

۱- استادیارگروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه. **delnaavaz@iau-saveh.ac.ir**
۲- دانشجوی دکتری گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علوم و تحقیقات واحد تهران.

تاریخ دریافت: ۸۹/٤/۱۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/٤

چکیده

ذرت خوشه‌ای *(Sorghum bicolor)* یک گیاه کربن ٤ و مقاوم به خشکی است که از گیاهان زراعی ایران نیز می‌باشد. پژوهش‌ها نشان داده که ذرت خوشه‌ای پلی پلوئید، گل‌ها، میوه‌ها و بخش‌های رویشی بزرگ‌تر و در نتیجه محصول بیشتری نسبت به گیاه دیپلوئید تولید می‌کند. هدف از این پژوهش به دست آوردن غلظت مناسب و مدت زمان مؤثر در القای پلی پلوئیدی روی دو رقم(Keller and RIO) و یک ایزولاین(IS٤٥٤٦) ذرت خوشه‌ای می‌باشد. برای القای تتراپلوئیدی دراین سه نوع غلظت‌های ۰-۰/۱ درصد کلشیسین با زمان‌های مختلف ٦، ٤٨ و ۷۲ ساعت، روی دانه، دانه رست و مریستم ساقه‌ای دانه رست اثر داده شد. در همه موارد آزمایش کلشیسین باعث مرگ تعداد زیادی از دانه‌ها، دانه رست‌ها و حتی گیاهان حاصل ازدانه‌ها و دانه رست‌های تیمار شده شد. افزایش غلظت و افزایش زمان تیمار دهی این اثر را تشدید کرد. برای بررسی اثر کلشیسین در القای تتراپلوئیدی از سلول‌های مادر گرده گل‌های گیاهان تیمار شده، استفاده شد. تعداد کروموزوم در نمونه‌های شاهد(غلظت صفر) هر سه رقم ۲۰ (۲n=۲x=۲۰) عدد بود ولی بعد ازتأثیر دادن کلشیسین، تتراپلوئیدی(سلول‌های مادر گرده دارای چهار دست کروموزوم(۲n=٤x=٤۰) تا ۱۸/۲۵٪ رسید. در بررسی‌های سلولی مشخص شد، کلشیسین علاوه بر القای پلی پلوئیدی باعث عقب افتادگی کروموزوم‌ها، سیتومیکسیس و آنیوپلوئیدی به ویژه در تیمار مریستم ساقه‌ای دانه رست‌ها می‌شود. عقب افتادگی کروموزوم‌ها در IS٤٥٤٦ و RIO به ترتیب ۱۵و۲۸٪ بود. سیتومیکسیس درسه رقم IS٤٥٤٦, RIO ,Keller به ترتیب ۵، ۷و ۱۰٪ بود.

کلید واژه: کلشیسین، تتراپلوئیدی، عقب افتادگی کروموزوم‌ها، سلول مادر گرده، سیتومیکسیس.

مقدمه

ذرت خوشه‌ای یا سورگوم *(Sorghum bicolor)* یک گیاه (C۴) بسیار مقاوم به خشکی و تغییرات pH است. دانه‌های سورگوم به عنوان غذا برای انسان و خوراک دام‌ها استفاده می‌شود. این گیاه دارای ارقام زیادی است که دو رقم کلر(Keller)، ریو(RIO) و ایزولاین آی اس۴۵۴۶ (IS۴۵۴۶) آن در ایران بیشتر کشت می‌شود. در ساقه‌های ارقام سورگوم مقدار زیادی کربوهیدرات به ویژه ساکاروز ذخیره می‌شود که برای تولید قند و شکر از آن می‌توان استفاده کرد(۵،۸). ارقام پلی پلوئید ذرت خوشه‌ای با توانایی تولید اندام‌های رویشی، گل و میوه‌های بزرگ‌تر نسبت به گیاه دیپلوئید، محصول بیشتری تولید می‌کنند(۱۹،۲۶). برای ایجاد ارقام پلی پلوئید ازتیمار گیاه با مواد جهش‌زا می‌توان استفاده کرد. یکی از مؤثرترین مواد برای القای پلی پلوئید در این گیاه،

www.SID.ir

Archive of SID

آلکالوئید کلشیسین می‌باشد که مانع از تشکیل دوک‌های تقسیمی‌می‌شود. برای تولید گیاهان پلی پلوئید دانه‌ها یا دانه رست‌ها را باید در محلول کلشیسین برای مدت زمانی مشخص شناور کرد. وقتی این دانه‌ها و دانه رست‌های تیمار شده رشد کرده و گیاه جدیدی را به وجودآوردند، برخی از سلول‌های مادر گرده درگل‌ها و در نهایت میوه و دانه‌های آن‌ها پلی پلوئید خواهند بود(۲،۷). تعداد کروموزوم با استفاده از کلشیسین و برخی مواد دیگر منجر به تشکیل دانه‌های تتراپلوئید در ذرت خوشه‌ای خواهد شد(۱۲). در این پژوهش از غلظت‌های مختلف کلشیسین برای القای پلی پلوئیدی در دو رقم و یک ایزولاین ذرت خوشه‌ای استفاده شده است. عقب افتادگی کروموزوم (لگینگ) طی میوز در بسیاری از گیاهان اتفاق می‌افتد که منجر به پلی پلوئیدی و تغییر عدد کروموزومی و در نهایت ناباروری می‌شود(۱۰). سیتومیکسیس مهاجرت کروموزوم‌ها بین دو سلول ازطریق کانال‌های ارتباطی سلول‌های مجاور است که اولین بار در سلول‌های مادر گرده زعفران توسط کورنیک گزارش شد(۱۳،۱۵). اگر چه درسلول‌های مادر گرده بسیاری از گونه‌های گیاهی این پدیده مشاهده شده است(۱۸، ۳،۱۱)، ولی این پدیده درسلول‌های مغذی بساک(۴) و سلول‌های تخمدانی(۱۴) انواعی از گیاهان نیز انجام می‌گیرد. سیتومیکسیس بیشتر در گرده‌زایی گیاهانی که از نظر ژنتیکی عادی نیستند، مثل گیاهان‌هاپلوئید، دو رگه، جهش یافته و تری‌پلوئید(۱۴،۱۷،۲۰) و در گیاهان پلی پلوئید بیشتر از گیاهان دیپلوئید مشاهده می‌شود(۲۳،۲۴). هدف از این پژوهش به دست آوردن غلظت مناسب و مدت زمان مؤثر در القای پلی پلوئیدی روی دو رقم(Keller,RIO) و یک ایزولاین(IS۴۵۴۶) ذرت خوشه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بذر دو رقم ذرت خوشه‌ای به نام‌های کلر(Keller)، ریو(RIO) و یک ایزولاین به نام آی اس۴۵۴۶(IS۴۵۴۶) از دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران تهیه شد. برخی از بذرها برای به دست آوردن دانه رست در پتری دیش با کاغذ صافی و آب استریل کشت داده شد. برای به دست آوردن غلظت مؤثر از مقادیر۰، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۵و۰/۱ درصد کلشیسین در آب مقطر برای اثر دادن روی دانه، دانه رست و مریستم دانه رست در زمان‌های ۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت، استفاده شد. دانه‌ها و دانه رست‌های سه روزه در محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف کلشیسین غوطه ور شدند. برای اثر دادن کلشیسین روی مریستم از دانه رست‌های هفت روزه ای که ریشه‌های آن‌ها لای کاغذ صافی مرطوب روی یک بخش سبد مانند با پایه‌هایی به طول نیم سانتی متر قرار داشت ولی بخش جوانه ایی آن‌ها از منافذ ایجاد شده روی کاغذ صافی و منافذ سبد به درون محلول‌های مختلف کلشیسین هدایت شده بود، استفاده گردید. بعد از اثر دادن کلشیسین، دانه‌ها و دانه رست‌ها در گلخانه درون خاک کشت شدند. بسیاری از دانه‌ها و دانه رست‌های کلشیسین دیده توانایی رویش و رشد خود را از دست داده و تنها تعداد معدودی رشد کرده و به مرحله گلدهی رسیدند. برای مشاهده اثر کلشیسین روی القای پلی پلوئیدی از گل‌های نارس تثبیت شده در محلول الکل اتیلیک – اسید استیک به نسبت ۳ به۱ برای ۴۸ ساعت و نگهداری چند ماهه در الکل اتیلیک ۷۰٪ استفاده شد. از این گل‌ها بساک‌های نارس جدا و بعد از هیدرولیز با اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال برای رنگ آمیزی، دیدن تقسیم و شمارش کروموزوم‌ها از استوکارمن ۲٪(۲گرم کارمن مرک ۱۰۰ میلی لیتر در اسید استیک ۵۵٪ جوش) استفاده شد(۹). با استفاده از نرم افزارSPSS و تست دانکن مقایسه میانگین‌ها انجام و تفاوت‌های معنی‌دار بین داده‌ها مشخص گردید.

نتایج

الف-تیمار دانه با غلظت‌های ۰- ۰/۱ درصد کلشیسین در مدت زمان‌های متفاوت

۱- اثر کلشیسین روی بقای گیاه

– مدت زمان ۶ ساعت: در هر دو رقم و یک ایزولاین

www.SID.ir

Archive of SID

ذرت خوشه‌ای با افزایش درصد کلشیسین تعداد گیاهان باقی مانده که به مرحله گلدهی رسیدند به شدت کاهش یافت. این کاهش در Keller شدیدتر بوده و تعداد گیاهان زنده مانده از ۹۶/۲ در غلظت صفر(شاهد) به ۷/۶٪ در غلظت ۰/۱٪ کلشیسین رسید.

– مدت زمان ۴۸ ساعت: با افزایش زمان از ۶ ساعت به ۴۸ ساعت شدت اثر کلشیسین با افزایش غلظت افزایش یافته و در رقم RIO نسبت به زمان ۶ ساعت خیلی شدیدتر بود. دراین رقم درصد گیاهان باقی مانده از ۹۶٪ در شاهد به ۸٪ در ۰/۱٪ کلشیسین رسید. دو تای دیگر هم با افزایش زمان کاهش بقا داشتند. برای مثال در Kellerو IS۴۵۴۶ بقا در غلظت ۰/۱٪ کلشیسین از ۸/۹ و ۷/۶٪ در زمان ۶ ساعت به ۵/۵ و ۵/۷ در زمان۴۸ ساعت تنزل یافت.

– در زمان ۷۲ ساعت، شدت اثر کلشیسین ازکمترین غلظت(۰/۰۱٪) زیاد بود ولی روی IS۴۵۴۶، بیشترین اثر را در غلظت ۰/۱٪ داشت (۲/۹٪ بقا).

نتایج کلی نشان می‌دهد که تیماردانه با کلشیسین باعث جوانه نزدن و رشد نکردن درصد زیادی از دانه‌ها و دانه رست‌های حاصل می‌شود. با افزایش غلظت کلشیسین و افزایش مدت زمان تیمار، مرگ و میر دانه‌ها و دانه رست‌ها بیشتر و تعداد گیاهان حاصل از رویش دانه‌های کلشیسین دیده کاهش می‌یابد. آنالیزهای آماری نشان می‌دهد که اختلاف بین گیاهان باقی مانده معنی دار بوده و با مقایسه میانگین‌ها می‌توان آن‌ها را به پنج گروه، برای هر زمان تیمار دهی، تقسیم کرد(جدول ۱).

۲- اثر کلشیسین روی تتراپلوئیدی سلول‌های مادر گرده

بررسی کروموزوم‌ها در سلول‌های مادر گرده گیاهان شاهد نشان داد که کروموزوم‌ها کوچک بوده و در هر سه نوع ذرت خوشه‌ای تعداد کروموزوم‌ها در حالت دیپلوئید ۲۰ تا(۲n=۲x=۲۰)است.

– مدت زمان ۶ ساعت: در هرسه ذرت خوشه‌ای با افزایش درصد کلشیسین، افزایش درالقای دست کرومو زومی‌ازدیپلوئید(۲n=۲x=۲۰)به تتراپلوئید(۲n=۴x=۴۰) مشاهده شد ولی این افزایش خیلی کم بود. اگر چه با آنالیزهای آماری و مقایسه میانگین‌ها، بین ۴ گروه حاصل تفاوت معنی دار بوده ولی در واقع در غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۲ در حد شاهد بودند. به نظر می‌آید رقم RIO برای القای تتراپلوئیدی در دانه‌ها در ۶ ساعت مستعدتر باشد، چون بیشترین درصد تتراپلوئیدی(۳/۶٪) را در غلظت ۰/۱٪ نشان داد.

– مدت زمان ۴۸ ساعت: با افزایش زمان از ۶ ساعت به ۴۸ ساعت شدت اثر کلشیسین با افزایش غلظت افزایش یافته و بیشترین تتراپلوئیدی در RIO و IS۴۵۴۶ در غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱٪ کلشیسین مشاهده گردید. در هردو غلظت، تتراپلوئیدی در IS۴۵۴۶ (۱۱ و۱۲/۲۵٪) نسبت به رقم RIO(۹ و ۱۰/۵٪) بیشتر بود(شکل ۱). درغلظت‌های ۰/۰۱

جدول ۱- درصد گیاهان زنده مانده تا مرحله گلدهی بعد از تیمار دانه‌ها با غلظت‌های مختلف کلشیسین طی۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت

درصد کلشی	٪رویش دانه(۶ ساعت)			٪رویش دانه (۴۸ساعت)			٪رویش دانه (۷۲ساعت)		
	RIO	IS۴۵۴۶	Keller	RIO	IS۴۵۴۶	Keller	RIO	IS۴۵۴۶	Keller
۰	۹۶/۶e	۹۵/۴e	۹۶/۲e	۹۵/۹e	۹۳/۲e	۹۵/۹e	۹۶e	۹۵/۲e	۹۶/۹d
۰/۰۱	۶۶/۵d	۴۵/۷d	۳۵/۲d	۳۷/۲d	۳۲/۸d	۳۲/۳d	۲۲/۸d	۱۶/۴d	۱۴/۴c
۰/۰۲	۳۰c	۲۲/۴c	۱۷/۳c	۱۸/۵c	۱۵c	۱۴/۶c	۱۴/۷c	۶/۳ b	۱۲/۶c
۰/۰۵	۲۱/۲b	۱۰/۳b	۸/۷ ba	۱۲b	۸/۵ b	۸/۵b	۱۰/۸b	۵/۶b	۹/۴b
۰/۱	۱۸/۴a	۸/۹ a	۷/۶a	۸a	۵/۵a	۵/۷a	۵/۸a	۲/۹a	۴/۸a

www.SID.ir

Archive of SID

و ۰/۰۲ در RIO و IS۴۵۴۶ تتراپلوئیدی از همه غلظت‌ها در زمان ۶ ساعت بیشتر بود ولی برای رقم Keller با کمی‌تفاوت فرق چندانی نداشت. به نظر می‌آید این رقم نسبت به تغییرات کروموزومی مقاوم‌تر باشد.

– در زمان ۷۲ ساعت، شدت اثر کلشیسین در بعضی از غلظت‌ها (۰/۰۱ و ۰/۰۲٪) کمی افزایش داشت ولی در کل اثر آن کمتربود. فقط در رقم Keller افزایش اثر، کمی بهترشد (جدول ۲).

با توجه به یافته‌های می‌توان گفت برای به دست آوردن تتراپلوئیدی از طریق دانه، تیمار ۰/۱٪ کلشیسین در مدت ۴۸ ساعت برای RIO و IS۴۵۴۶، به ترتیب با ۱۰/۵ و ۱۲/۲۵٪ تتراپلوئیدی، بهترین باشد. ولی برای رقم Keller تیمار ۰/۱٪ کلشیسین در مدت ۷۲ ساعت با ۵٪ تتراپلوئیدی بهتر است.

ب- تیمار دانه رست با غلظت‌های ۰-۰/۱درصد کلشیسین در مدت زمان‌های متفاوت.

۱- اثر کلشیسین روی بقای گیاه

– مدت زمان ۶ ساعت: در هرسه نوع ذرت خوشه‌ای با افزایش درصد کلشیسین به ۰/۱٪ تعداد گیاهان باقی مانده(به مرحله گلدهی رسیده) به یک سوم کاهش یافته است. این کاهش در سه غلظت اولیه، تقریباً نامحسوس است.

– مدت زمان ۴۸ ساعت: با افزایش زمان از ۶ ساعت به ۴۸ ساعت، مرگ و میر دانه رست‌ها به شدت با زیاد شدن کلشیسین افزایش یافته و درصد کمی از دانه رست‌های تیمار شده تا رسیدن به مرحله گلدهی زنده ماندند.

– در زمان ۷۲ ساعت، شدت اثر کلشیسین ازکم‌ترین غلظت(۰/۰۱٪) هم زیاد بود و در غلظت ۰/۰۵ و ۰/۱٪ بقا به صفر رسید. تغییرات با افزایش غلظت معنی‌دار بود (جدول ۳).

۲- اثر کلشیسین روی تتراپلوئیدی سلول‌های مادر گرده

جدول۲-درصد سلول‌های مادر گرده(pmc's) با کروموزوم‌های دو برابر(تتراپلوئید(۲n=٤x=٤٠)) از تیمار دانه‌ها

درصد کلشی	٤ x=pmc's٪(٦ ساعت)			٤ x=pmc's٪(٤٨ساعت)			٤ x=pmc's٪(٧٢ساعت)		
	RIO	IS۴۵۴۶	Keller	RIO	IS۴۵۴۶	Keller	RIO	IS۴۵۴۶	Keller
۰	۰a	۰/۰۱a	۰/۰۵a	۰/۰۱a	۰/۰۲a	۰/۰۶a	۰/۰۲a	۰/۰۵a	۰/۰۵a
۰/۰۱	۰a	۰/۰۲a	۰/۰۵a	۳/۵b	۴/۲۵b	۰/۲۵b	۳/۸b	۵/۲۵b	۰/۷۵b
۰/۰۲	۰/۲b	۰/۳b	۰/۷c	۵/۲۵c	۶c	۰/۵c	۸/۲۵c	۷/۷۵c	۱/۵c
۰/۰۵	۳c	۱/۴b	۰/۳۵b	۹d	۱۱ d	۰/۷۵d	۴/۵b	۶/۴۵b	۳/۷۵d
۰/۱	۳/۶c	۳/۱c	۰/۴۳ab	۱۰/۵d	۱۲/۲۵d	۳e	۱۰/۵d	۵/۲۵b	۵d

جدول۳- درصد گیاهان زنده مانده تا مرحله گل دهی بعد از تیما ر دانه رست‌ها با غلظت‌های مختلف کلشیسین طی ٦، ٤٨ و ٧٢ ساعت

درصد کلشی	٪رویش دانه(٦ ساعت)			٪رویش دانه (٤٨ساعت)			٪رویش دانه (٧٢ساعت)		
	RIO	IS۴۵۴۶	Keller	RIO	IS۴۵۴۶	Keller	RIO	IS۴۵۴۶	Keller
۰	۱۰۰c	۹۷c	۱۰۰c	۹۴e	۹۶e	۹۶/۸ e	۷۳d	۶۳/۵d	۶۹/۲d
۰/۰۱	۹۵ c	۹۶/۵c	۹۷/۷ c	۵۲/۷d	۵۵/۴d	۵۸/۶d	۱۵/۱c	۱۸/۷c	۱۷/۶c
۰/۰۲	۸۵b	۸۵/۸b	۹۶/۸c	۲۶/۳c	۲۶/۳c	۳۲/۲c	۳/۸b	۴/۵b	۱b
۰/۰۵	۸۶/۵b	۸۹b	۸۸/۸ b	۱۸/۵B	۱۸/۵b	۲۲/۲b	۰a	۰a	۰a
۰/۱	۲۶/ ۶a	۲۹/۷a	۳۵/۵a	۱۴/۸a	۱۳/۴ a	۱۷/۲ a	۰a	۰a	۰a

www.SID.ir

Archive of SID

– مدت زمان ۶ ساعت: در هرسه رقم ذرت خوشه‌ای با افزایش درصد کلشیسین افزایش تتراپلوئیدی مشاهده شد ولی این افزایش در رقم Keller خیلی بیشتر ودر غلظت ۰/۱٪ کلشیسین به ۸٪ رسید.

– مدت زمان ۴۸ ساعت: با افزایش زمان از ۶ ساعت به ۴۸ ساعت شدت اثر با افزایش غلظت افزایش یافته و بیشترین تتراپلوئیدی در غلظت ۰/۱٪ کلشیسین، در Keller،IS۴۵۴۶ و RIO به ترتیب۱۳، ۱۸/۲۵ و۱۲/۵٪ شد. ایزولاین IS۴۵۴۶ دارای بالاترین درصد تتراپلوئیدی (۱۸/۲۵٪) بود. در رقم Keller پلی پلوئیدی به شکل هپتالوئیدی(۲n=۷x=۲۰) و اکتاپلوئیدی (۲n=۸x=۸۰) نیز مشاهده شد (شکل۲).

– در زمان ۷۲ ساعت: شدت اثر کلشیسین در دوغلظت (۰/۰۱ و ۰/۰۲٪) به شدت افزایش داشت و اثر آن بیشتر از غلظت ۰/۰۵٪ در ۴۸ ساعت بود. در رقم Keller چون فقط یک گیاه باقی مانده بود (که تعداد کمی هم گل داد) و در غلظت ۰/۰۵ و ۰/۱ هیچ گیاهی زنده نماند، تتراپلوئیدی صفر شد(جدول۴).

ج– تیمارمریستم دانه رست با غلظت‌های ۰– ۰/۱ درصد کلشیسین در مدت زمان‌های متفاوت

۱– اثر کلشیسین روی بقای گیاه

– مدت زمان ۶ ساعت: در هرسه رقم ذرت خوشه‌ای با افزایش درصد کلشیسین تا ۰/۰۲٪ بقا در حدود شاهد ولی درگروه بندی آماری با تفاوت معنی‌دار بود. در ۰/۰۵٪ گیاهان زنده مانده به نصف و در ۰/۱٪ به یک دهم رسید.

– مدت زمان ۴۸ ساعت: با افزایش زمان از ۶ ساعت به ۴۸ ساعت، در غلظت‌های ۰/۰۱– ۰/۰۵ مرگ و میر دانه رست‌ها به شدت با زیاد شدن کلشیسین افزایش یافته و درصد کمی از دانه رست‌های تیمار شده تا مرحله گلدهی زنده ماندند. در غلظت ۰/۱٪ بقا برای هرسه رقم صفر شد.

– در زمان ۷۲ ساعت: در کم‌ترین غلظت (۰/۰۱٪) تعداد کمی گیاه زنده ماند ولی در غلظت‌های بالاتر (۰/۰۲–

جدول٤–درصد سلول‌های مادر گرده(pmc's) با کروموزوم‌های دو برابر(تتراپلوئید(۴۰=٤x=۲n)) از تیمار دانه رست‌ها

درصد کلشی	٪ x=pmc's٤ (٦ ساعت)			٪ x=pmc's٤ (٤٨ساعت)			٪ x=pmc's٤ (٧٢ساعت)		
	RIO	IS۴۵۴۶	Keller	RIO	IS۴۵۴۶	Keller	RIO	IS۴۵۴۶	Keller
۰	۰ a	۰/۰۱a	۰/۰۵a	۰/۰۱a	۰/۰۲a	۰/۰۶a	۰/۰۲a	۰/۰۵a	۰/۰۵a
۰/۰۱	۰/۲۵b	۰/۵b	۰/۱ba	۴/۲۵ b	۵/۷۵b	۰/۷۵b	۵/۵b	۶/۲۵ b	۱۲/۵b
۰/۰۲	۲/۵c	۲/۷۵c	۶/۵c	۵/۵b	۶/۲۵b	۱/۲۵b	۱۱/۲۵c	۹/۷۵c	۰a
۰/۰۵	۳dc	۲/۴۵c	۷/۵cd	۵b	۷d	۰/۷۵b	۰a	۰a	۰a
۰/۱	۴/ ۴۵d	۵/۲۵dc	۸d	۱۲/۵c	۱۸/۲۵ c	۱۳c	۰a	۰a	۰a

جدول۵–درصد گیاهان زنده مانده تا مرحله گلدهی بعد از تیمار مریستم ساقه‌ای دانه رست‌های۷ روزه با غلظت‌های مختلف کلشیسین طی ٦، ٤٨ و ٧٢ ساعت

درصد کلشی	٪رویش دانه(٦ ساعت)			٪رویش دانه (٤٨ساعت)			٪رویش دانه (٧٢ساعت)		
	IS۴۵۴۶	Keller	RIO	IS۴۵۴۶	Keller	RIO	IS۴۵۴۶	Keller	RIO
۰	۹۷ /۲d	۹۸d	۱۰۰c	۸۷d	۸۳d	۸۹d	۸۷c	۶۹c	۷۶c
۰/۰۱	۹۳c	۹۶cd	۱۰۰c	۶۹/۶c	۶۶/۶c	۶۵/۷c	۴b	۳۵ b	۸/۱b
۰/۰۲	۹۰ c	۸۹c	۹۸c	۱۴cb	۱۲/۴b	۸/۸b	۰a	۰a	۰a
۰/۰۵	۴۵/۵b	۳/۴b	۵۱/۵b	۱۲b	۱۲/۲b	۸/۵b	۰a	۰a	۰a
۰/۱	۱۲a	۹a	۱۰/۵a	۰a	۰/۲a	۱a	۰a	۰a	۰a

www.SID.ir

Archive of SID

جدول٦-درصد سلول‌های مادر گرده(pmc's) با کروموزوم‌های دو برابر(تتراپلوئید(٢n=٤x=٤٠)) از تیمار مریستم دانه رست‌ها

درصد کلشی	٪ ٤x=pmc's (٦ ساعت)			٪ ٤ x=pmc's(٤٨ساعت)			٪ ٤ x=pmc's(٧٢ساعت)		
	RIO	IS۴۵۴۶	Keller	RIO	IS۴۵۴۶	Keller	RIO	IS۴۵۴۶	Keller
۰	۰a	۰/۰۱a	۰/۰۵a	۰/۰۱a	۰/۰۲a	۰/۰۶a	۰/۰۲a	۰/۰۵a	۰/۰۵a
۰/۰۱	۲/۲۵b	۳/۵b	۴/۲۵b	۳/۵b	۵/۵b	۱/۷۵b	۱۵/۵b	۱۵/۲۵b	۱۳/۵b
۰/۰۲	۷/۵c	۹/۷۵c	۷/۵c	۶/۵c	۸/۵c	۷/۲۵c	۰a	۰a	۰a
۰/۰۵	۹/۲۵dc	۱۲/۵d	۹/۲۵ dc	۶/۵c	۱۵d	۹/۷۵d	۰a	۰a	۰a
۰/۱	۱۵/۵e	۱۵/۵e	۱۸e	۱۶/۵d	۰ a	۰a	۰a	۰a	۰a

۰/۱٪) هیچ گیاهی زنده نماند و بقا صفر شد(جدول۵).

۲- اثر کلشیسین روی تتراپلوئیدی سلول‌های مادر گرده

- مدت زمان ۶ ساعت: در هرسه رقم ذرت خوشه‌ای با افزایش درصد کلشیسین افزایش تتراپلوئیدی مشاهده شد و نسبت به دو روش قبلی القای پلی پلوئیدی در این روش در زمان ۶ ساعت بالا بود و حتی در ۰/۱٪ کلیشیسین، در Keller، IS۴۵۴۶ و RIO به ترتیب به ۱۸، ۱۵/۵ و ۱۵/۵٪ رسید.

- مدت زمان ۴۸ ساعت: با افزایش زمان به ۴۸ ساعت شدت اثر با افزایش غلظت کلشیسین افزایش یافته ولی نسبت به زمان۶ ساعت تفاوت چشم گیری نداشت. فقط در غلظت ۰/۱٪ که یک گیاهان مورد آزمایش رقم RIO باقی مانده بود، تتراپلوئیدی به ۱۶/۵٪ رسید که ۱٪ بیشتر از غلظت مشابه در زمان ۶ ساعت بود.

- در زمان ۷۲ ساعت: کلشیسین درغلظت ۰/۰۱٪ افزایش تتراپلوئیدی۱۳/۵تا ۱۵/۵ درصدی را نشان داد که مشابه ۰/۱ و زمان ۶ ساعت بود. فقط در رقم Keller کمی کمتر بود. در غلظت‌های بالاتر هیچ گیاهی زنده نماند و در نتیجه تتراپلوئیدی صفر شد(جدول۶).

با انجام آنالیزهای آماری و مقایسه میانگین‌ها، گروه‌های دارای تفاوت‌های معنی‌دار در غلظت‌های ۰-۰/۱٪ کلشیسین در هر تیمارو هر رقم نشان داده و نتایج کلی نشان می‌دهد که:

روش استفاده از مریستم دانه رست برای به دست آوردن سورگوم تتراپلوئید در زمان ۶ساعت مناسب بوده ولی با افزایش زمان تیمارمرگ و میر گیاهان بالا می‌رود.

۲- القای تتراپلوئیدی و مرگ و میر گیاهان تیمار شده به رقم هم بستگی دارد.

۳- غلظت ماده مؤثره نیز نقش مهمی در القای تتراپلوئیدی دارد.

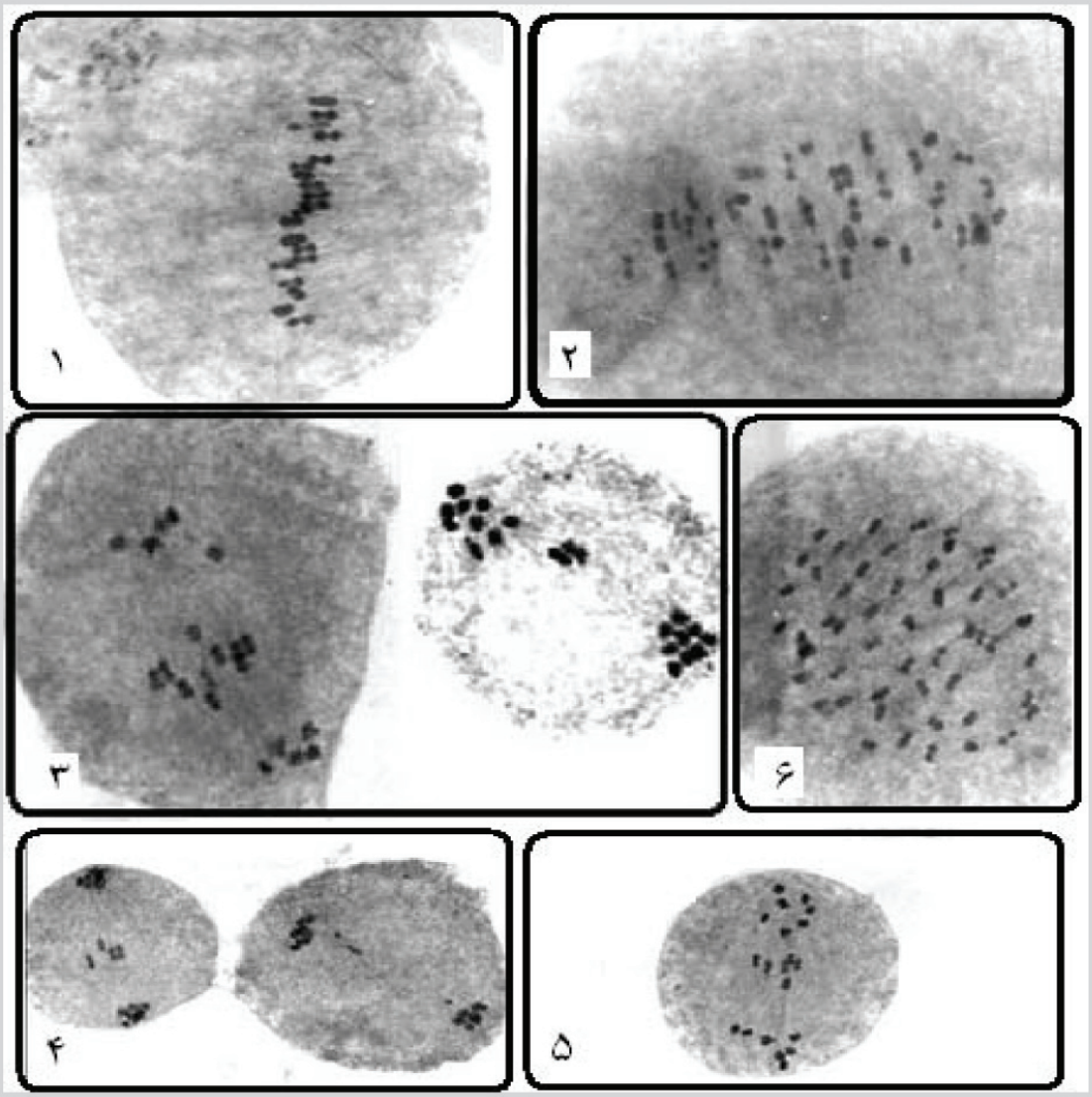
در مطالعه سلول‌های مادر گرده گیاهان حاصل از تیمار مریستم ساقه‌ای دانه رست، نتایج دیگری هم به دست آمد که شامل موارد زیر است:

-کلشیسین سبب به تأخیر افتادن برخی از کروموزوم‌ها طی تقسیم میوز می‌شود در این پژوهش درغلظت ۰/۰۵٪ زمان ۴۸ ساعت، ۲ تا ۱۰ کروموزوم در برخی از سلول‌ها نسبت به بقیه تأخیر داشتند. عقب ماندگی کروموزوم در IS۴۵۴۶ و RIO به ترتیب ۱۵و۲۸٪ بود(شکل۳چپ و راست و۵).

- ادغام سیتوپلاسمی کروموزوم‌های دو یا چند سلول از طریق مجاری سیتوپلاسمی ایجاد شده بین سلول‌های مجاور که در نهایت منجر به افزایش تعداد کروموزوم‌ها و حجیم شدن سلول می‌شود، سیتومیکسیس نامیده می‌شود. سیتومیکسیس در Keller، IS۴۵۴۶ و RIO در ۰/۰۱٪ کلشیسین و زمان ۷۲ ساعت مشاهده شد که به ترتیب در هر یک ۷،۲ و ۵٪ بود(شکل۴). در این گیاهان سیتومیکسیس با ادغام سیتوپلاسمی ۳،۲ و ۵ سلول مادر

www.SID.ir

Archive of SID



اشکال تعدادکروموزوم‌های گونه‌های ذرت خوشه ای۱ تیمار شده با غلظت‌های مختلف کلشیسین ۱ -یک سلول مادر گرده اتوتتراپلوئید (۲n=٤x=٤٠) در رقم IS٤٥٤٦. ۲۰ کروموزوم هومولوگ دوتایی (بیوالان) در صفحه متافازی در حال جدا شدن هستند.۲- پلی پلوئیدی در یک سلول مادر گرده رقم Keller با چهل جفت کروموزوم که ۳ تای آن‌ها به صورت مجموعه‌های چهارتایی مشاهده می‌شود (در غلظت ۰/۱٪ کلشیسین و مدت زمان ٦ ساعت).۳- عقب افتادگی و جدا نشدن دو بی والان (۹+۲+۹) یا ٤ کروموزوم (راست) و ۱۰ بی والان (۵+۱۰+۵) یا ۲۰کروموزوم (چپ)، در رقم RIO در۰۵ /۰٪ کلشیسین و زمان ٤۸ ساعت. ٤- سیتومیکسیس با تأخیر۳ کروموزوم در سلول بالایی و تأخیر٤ بی والان یا ۸ کروموزوم در سلول پائینی، در ۰/۰۱٪ کلشیسین و زمان ۷۲ ساعت. ۵- تأخیر٦ بی والان یا ۱۲ کروموزوم در IS٤٥٤٦، در ۰/۰۱٪کلشیسین و زمان ۷۲ ساعت. ٦- سیتومیکسیس بین ۵ سلول مادر گرده و حاصل شدن سلول ۵۰ بی والانی (۱۰۰کروموزومی) درسلول‌های رقم IS٤٥٤٦ در ۰/۰۱٪ کلشیسین و زمان ۷۲ ساعت.

گرده همراه بود که منجر به افزایش بی والان‌ها ۳۰ تا ۵۰ عدد (۶۰-۱۰۰ کروموزوم) در هر سلول مادر گرده سیتومیکسی گردید(شکل۶).

-آنی پلوئیدی نیز مشاهده شد که شامل ۱۶، ۱۸، ۲۱، ۲۲،۳۰، ۴۱، ۵۶ و ۱۰۴ کروموزوم در ۸ درصد سلول‌های IS4546 در ۰/۰۱٪ کلشیسین و زمان ۷۲ ساعت بود.

www.SID.ir

Archive of SID

احتمال می‌رود که آنی پلوئیدی‌های بالای ۲۰ کروموزوم ناشی از سیتومیکسیس باشد.

بحث و نتیجه گیری

پلی پلوئیدی یکی از ساده‌ترین و بهترین روش‌ها برای تولید گیاهان جدید با ویژگی‌های متفاوت از گیاه اولیه است. در طبیعت با تغییر شرایط محیطی در گیاهان پلی پلوئیدی القا می‌شود که به آن خود پلی پلوئیدی(اتو پلی پلوئیدی) می‌گویند . معمولاً گیاهان حاصل از این فرآیند بخش‌های رویشی و دانه‌های بزرگ‌تری تولید می‌کنند. در برخی گیاهان فرآیند پلی پلوئیدی به طور مصنوعی با موادی مثل کلشیسین قابل القا است(۱۶). ما دراین پژوهش با استفاده از غلظت‌های مختلف کلشیسین موفق به القای تتراپلوئیدی در ذرت‌های خوشه‌ای Keller، IS۴۵۴۶ و RIO شدیم. در این مسیر تیمار مریستم ساقه‌ای دانه رست‌های ۷روزه با غلظت ۰/۱٪ کلشیسین و زمان ۶ ساعت برای هر سه رقم خوب بود ولی برای IS۴۵۴۶تیمار دانه رست‌ها با غلظت ۰/۱٪ کلشیسین و زمان ۴۸ ساعت کمی بهتر بود.

به طور کلی تیمار با کلشیسین سبب افزایش مرگ و میر گیاهان تیمار شده شد که این اثر روی نمونه‌های حاصل از تیمار مریستم در غلظت بالای کلشیسین وافزایش مدت زمان تیمار چشم گیرتر بود. این نتایج با نتایج به دست آمده از تیمار مریستم نوع دیگری ذرت خوشه‌ای (*S. vulgar*) با کلشیسین توسط میراندا و همکاران(۱۶) و سیدیپ(۲۶) مطابقت می‌کند. این اثر احتمالاً ناشی از اتصال کلشیسین با مولکول‌های پروتئینی فرآیندهای زیستی سلول‌ها است(۶). القای پلی پلوئیدی در غلات مشکل است چون تیمار فقط روی سلول‌های بخشی از گیاه اثر می‌کند. به طور مثال سالمون(۲۲) از طریق وارد کردن ۱٪ کلشیسین به محیط کشت آگار و از طریق تزریق۰/۵٪ کلشیسین به کلئوپتیل موفق به ایجاد تتراپلوئیدی در نوعی ذرت خوشه ای(*S. sudanese*) شد. ولی داگت(۸) با قرار دادن بخش هوایی دانه رست‌ها در محلول ۰/۱٪کلشیسین برای ۵ ساعت، آتکینسون(۱) با تیمار دانه رست‌های کشت شده درماسه با ۰/۵٪ کلشیسین برای ۴-۶ ساعت و شورتز(۲۵) با غوطه ور کردن دانه رست‌ها در محلول آبی۰/۱٪ کلشیسین، تعداد زیادی تتراپلوئید از نوعی ذرت خوشه ای(*S. vulgar*) به دست آوردند. در این پژوهش هم ما با القای ۰-۰/۱٪ کلشیسین روی دانه، دانه رست و مریستم ساقه‌ای دانه رست هر سه نوع ذرت خوشه‌ای (*S. bicolor*) یعنی Keller، IS۴۵۴۶ و RIO موفق به ایجاد سطح بالایی از تتراپلوئیدی(۱۸/۲۵٪) در سلول‌های مادر گرده شدیم. تیمار مریستم ساقه‌ای دانه رست هر سه نوع ذرت خوشه‌ای (*S. bicolor*) یعنی Keller،IS۴۵۴۶ وRIO منجر به فرآیندهای دیگری مثل عقب افتادگی کروموزوم‌ها در تقسیم میوز، سیتومیکسیس و آنی پلوئیدی در سلول‌های مادر گرده نیز شد که هر یک از این فرآیندها می‌تواند منجر به جهش و ایجاد گیاهان نوپدید شود(۲۲،۲۰،۱۷،۱۵،۱۰،۲). در نمونه IS۴۵۴۶ با سیتومیکسیس بین ۵ سلول تعداد بی والان‌ها به ۵۰ (برابر ۱۰۰ کروموزوم) رسید.

سپاس‌گزاری

از جناب آقای دکتر سید محمود غفاری که در انجام بخشی از این پژوهش ما را یاری نمودند، کمال تشکر را داریم.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1.Atkinson, G.F, Ross, J.G. , Franzke, C.J. (1956). Differential of two varieties of *Sorghum* to colchicines treatment. Genetics, 4;633-634.

2.Birchler, J.A. (1993). Dosage analyses of maze endosperm development . Ann. Re. Genet, 27; 181-204.

3.Cheng, K.C., Nieh, H.W., Yang, C.L., Wang, I.M., Chou, I.S., Chen, J.S. (1975). Light and electron microscopical observations on cytomixis and the study of its relation to evolution. Acta Bot Sin, 17;60-69.

4.Cooper, D.D. (1952). The transfer of deoxyribose nucleic acid from the tapetum to the microsporocytes at onset of meiosis. Am Nat, 86;219-229.

5.De wet, J.M. J. (1978).Systematic of *Sorghum*. Am. J. Bot, 65(4); 477-484.

6.Deysson, G.(1968). Antimitotic substances. International review of cytology, cytology, 24; 99-148.

7.Dilkova, M. , Bingham, E. T. (2000). Microsporogenesis and fertility of vernal Alfalfa. Agronomy, Univ, Wis, 1575-1578 .

8.Doggett, H. (1957). Tetraploid varieties of *Sorghum vulgar*. Nature, Land, 179:786.

9.Ebrahimzadeh, H. , Ataei Azimi, A. (1994). Studies on the caryology of some species suaeda in Iran. J. Sci. I. R. Iran, 5(3); 81-88.

10. Goldblatt, P. , Manning, J. (2006). Radiation of pollination systems in the iridaceae of sub-saharan Africa. Annals of Botany, 97(3);317-344.

11. Gottschalk, W. (1970). Chromosome and nucleus migration during microsporogenesis of *Pisum sativum*. Nucleus, 13;1-9.

12. House, L. R. (1985). A Guide to *Sorghum breeding* . IcRtsat, 1-200.

13. Kornicke, M. (1901). Über Ortsveränderung von Zellkärnern. S.B. Niederrhein, Ges Natur – U Heilkunde Bonn A, 14–25.

14. Koul, K.K. (1990). Cytomixis in pollen mother cells of *Alopecurus arundinaceus*. Poir Cytologia, 55;169-173.

15. Lattoo, S. K., Khan, S., Bamotra, S., Dhar, A. K. (2006). Cytomixis impairs meiosis and infl uences reproductive success in Chlorophytum comosum, (Thunb) Jacq. – an additional strategy and possible implications. J. Biosci, 31; 629–637.

16. Miranda, J. H., George, M. K., Mery, S. T. (1979). The effects of colchicines and the induction of polyploidy in *Sorghum*. Agri, Res. J. Kerala, 17(2); 208-216.

17. Nettancourt, D., Grant, W.F. (1964). La cytogénétique de *Lotus* (Leguminosae) III. Un cas de cytomixie dans un hybride interspécifique. Cytologia, 29;191-195.

18. Omara, M.K. (1976). Cytomixis in *Lolium perenne*. Chromosoma, 55;267-271.

19. Quinby, T. R. (1974). *Sorghum provement* and the genetics of growth, TX(USA). Texas A & M university press, 1-108.

20. Salesses, G.(1970). Sur le phénomène de cytomixie chez des hybrides triploïdes de prunier. Conséquences génétiques possibles. Ann Amélior Plant, 20;383-388.

21. Salomon, E. S. (1940). *Sorghum* sudanese tetraploid obtained por colchicines. Anal. Inst. Fitotech. Santa Catalina , 2;13-16.

22. Sapre, A.B.(1978). Cytomixis in Trilobachne cookei (Stapf) Schenck (Poaceae). Indian. J. Bot, 1;(1/2) 29-33.

www.SID.ir

Archive of SID

23. Semyarkhina, S.Y.A., Kuptsou, M.S. (1974). Cytomixis in various forms of sugar-beet. Vests I ANBSSE Ser Biyal, 4;43-47.

24. Siddiq, E. A. (1967). Autotetraploids in *Sorghum vulgar*. Ind. J. Gen and plant Breed, 27(3); 442-449.

25. Wall, J. S. ,Ross, W. M. (1970). *Sorghum* production. Westport, ct, Au, 1-702.

26. Schertz, K. F.(1962). Cytology, fertility and gross morphology of induced polyploidy of *Sorghum vulgar*. Canada,T. Genet. Cytol, 4; 179-86.

www.SID.ir