دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۵، شماره ۲، صفحه ۲۷۰-۲۵۹ (۱۳۹۶)

القای پلی‌پلوئیدی در گیاه زینتی ارکیده گونه *Phalaenopsis amabilis* در شرایط درون‌شیشه‌ای

فاطمه ذاکر تولایی[1*] و حمیده کلاهی[2]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، بیوتکنولوژی کشاورزی، مجتمع آموزش عالی شیروان

پست الکترونیک: **f.zaker.t@um.ac.ir**

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد واحد شیروان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۱۴

چکیده

گیاه ارکیده گونه *Phalaenopsis amabilis* یکی از بهترین و شناخته شده‌ترین گونه‌های ارکیده است که به آسانی رشد کرده و قابلیت سازگاری خوبی دارد. این پژوهش به‌منظور القای پلی‌پلوئیدی در گونه *Phalaenopsis amabilis* در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. پژوهش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و هر تکرار حاوی ۳ ریزنمونه جوانه جانبی به اندازه تقریبی ۳ میلی‌متر دارای ۲ برگ با استفاده از هفت غلظت مختلف کلشی‌سین شامل: صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ ، ۰/۲ و ۰/۲۵ درصد در دو تیمار زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. ریزنمونه‌ها پس از تیمار با کلشی‌سین روی محیط کشت MS بدون هورمون کشت شدند. پس از گذشت ۱۰ هفته صفات مورفولوژیکی تحت تأثیر پلی‌پلوئیدی ازجمله تعداد و اندازه برگ، تعداد و اندازه ریشه، طول و عرض سلول‌های نگهبان روزنه، تعداد کلروپلاست و همچنین میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مشاهدات سیتولوژیکی برگ‌های جدید کاملاً رشد کرده به‌منظور بررسی تعداد کروموزوم‌های گیاهان به‌روش فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرارگرفت. غلظت‌های ۰/۱۵ درصد و ۰/۲ درصد کلشی‌سین در گیاه ارکیده باعث القای بیشترین درصد پلی‌پلوئیدی شد. همبستگی بعضی صفات مورفولوژیک با سطح پلی‌پلوئیدی نشان داد که بعد از فلوسایتومتری بررسی خصوصیات روزنه و تعیین تراکم آن به تشخیص پلی‌پلوئیدی کمک می‌کند. اندازه سلولهای نگهبان در گیاهان پلی‌پلوئید افزایش و تراکم آنها کاهش یافت. بر اساس این نتایج می‌توان از کلشی‌سین برای تولید گیاهان پلی‌پلوئید در ارکیده زینتی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: ارکیده، کلشی‌سین، صفات مورفولوژیکی، فلوسایتومتری.

مقدمه

ارکیده‌ها گروهی منحصر به‌فرد از گیاهان در علم رده-بندی محسوب می‌شوند و از لحاظ رویشی به‌طور گسترده‌ای با هم متفاوتند. با وجود این، تمام گونه‌های آن به‌دلیل خصوصیات گل‌ها به‌هم وابسته و خانواده بزرگی را به‌وجود می‌آورند. خانواده ارکیده بیش از ۸۸۰ جنس و فراتر از ۲۵ هزار گونه شناخته شده و ۱۴۸۴۶۰ رقم ثبت شده تک‌لپه‌ای علفی دائمی را شامل می‌شود (Chen *et al*,. 2006). در میان جنس‌های ارکیده، جنس *Phalaenopsis* از همه مهمتر بوده و بیش از ۸۰ درصد ارکیده‌های تولید شده در جهان از هیبریدهای این جنس است. هلند، چین، تایوان، آمریکا و ژاپن بزرگ‌ترین تولید کننده‌های این گیاه هستند. گونه

Archive of SID

www.SID.ir

Phalaenopsis amabilis یکی از بهترین و شناخته‌شده‌ترین گونه‌های ارکیده فالانوپسیس می‌باشد، این گونه به آسانی رشده کرده و قابلیت سازگاری خوبی دارد (Rodica *et al*,. 2011).

یکی از روش‌های بررسی تنوع در ارقام و گونه‌های مختلف گیاهی، انجام مطالعات سیتوژنتیکی و کاریوتایپی می‌باشد. برای اینکه به‌طور دقیق مرزهای بین گونه‌ای در یک جنس مشخص شود، شمارش تعداد کروموزوم‌ها و مشاهده تشابهات کروموزومی و تهیه کاریوتایپ ضرورت پیدا می‌کند. مطالعات سیتولوژیکی از این جهت مهم می‌باشد که کروموزوم‌ها حاوی ژن‌هایی هستند که اطلاعات قابل توارث مربوط به فنوتیپ گیاه را شامل می‌شوند (Hesamzadeh Hejazi & Ziyaeenasab, 2008). بدیهی است گونه‌هایی که از لحاظ شاخص‌های سیتوژنتیکی و خواص کروموزومی به‌هم شبیه هستند در بحث روابط بین گونه‌ای قرابت بیشتری داشته و در صورت وجود صفات مطلوب در این گونه‌ها، امکان تلاقی بین گونه‌ای، برای جمع‌آوری ژن‌های مطلوب در گیاه وجود خواهد داشت. در تعیین روابط خویشاوندی بین گونه‌های یک جنس، تعداد کروموزوم‌ها کفایت نمی‌کند بلکه باید اطلاعاتی مانند اندازه، شکل، تنوع در رنگ‌پذیری، محل سانترومر و رفتار کروموزوم‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرد. یک تاکسونومیست با کمک اطلاعات مورفولوژیکی و آگاهی از اطلاعات سیتوژنتیکی یک گونه، به مطالعه روابط بین گیاهان می‌پردازد و به‌نژادگر گیاهی با اطلاعات سیتوژنتیکی تصمیم می‌گیرد در یک برنامه تلاقی بین گونه‌ای از کدام گونه‌ها استفاده کند تا نتاج بارور تولید کند و یا اینکه کدام کروموزوم گیاه واجد ژن دلخواه است (Aalishah & Omidi, 2008). دست‌ورزی سطح پلوئیدی، ابزار توانمندی در اصلاح ژنتیکی بسیاری از گیاهان است (Madon *et al.*, 2005). دست‌کاری و القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان اغلب موجب تسهیل تولید واریانت‌های جدید با فنوتیپ جدید و با کیفیت متمایز نسبت به انواع دیپلوئید می‌شود (Thao *et al.*, 2003; Shahriyari Ahmadi *et al*., 2008). از سوی دیگر از طریق دو برابر کردن سطح کروموزومی، افزایش تعداد نسخه‌های ژنی بیان کننده ترکیبات مؤثره و افزایش جثه گیاهان موجب افزایش ترکیبات ثانویه آن می‌شود. تغییر سطح پلوئیدی در گیاهان با تأثیر بر فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بر مسیرهای فتوسنتزی متابولیت‌های ثانویه اثر می‌گذارد و افزایش سطح پلوئیدی اغلب با افزایش مواد مؤثره در گیاهان دارویی همراه است (Thao *et al.*, 2003). مؤثرترین ماده شیمیایی به‌کار رفته در مطالعات به‌منظور القای پلی‌پلوئیدی کلشی‌سین است. کلشی‌سین یک ترکیب آلکالوئیدی است که از بذر و غدد گل حسرت (*Colchicum autumnale* L.) در سال ۱۸۸۳ توسط Zeisle استخراج شد (Shahriyari Ahmadi *et al.*, 2008). کلشی‌سین از منابع گیاهی به‌دست می‌آید و روی پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها اثر می‌گذارد. کلشی‌سین اغلب به واحدهای توبولینی آزاد وصل می‌شود و از پلیمریزاسیون آنها جلوگیری می‌کند. دوک میتوزی در حضور کلشی‌سین به‌سرعت ناپدید شده و سلول در اواسط میتوز متوقف می‌شود، به‌طوری‌که می‌توان کروموزوم‌ها را در مرحله متافاز مورد مشاهده قرار داد.

در شرایط درون‌شیشه‌ای، گیاهان تتراپلوئید ارکیده (*Rhynchostylis gigantean* var. rubrumSagarik) میزان رشد، شکل، اندازه برگ و تعداد کلروپلاست کمتری نسبت به گیاهان دیپلوئید دارند و بین تعداد کلروپلاست و سطح پلوئیدی ارتباط منفی وجود دارد (Kerdsuwan & Te-chato, 2012). در مطالعه Atichart (۲۰۰۷) تیمار کلشی‌سین با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۱۵، ۰/۱ و ۰/۰۵ درصد برای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ روز در گیاه *Dendrobium secundum* مورد استفاده قرار گرفت و بالاترین میزان پلوئیدی در گیاهان باززایی شده در شرایط کشت بافت، با تیمار ۰/۰۵ کلشی‌سین به‌مدت یک روز به‌دست آمد. طبق اطلاعات به‌دست‌آمده تاکنون در ایران پژوهشی در زمینه تغییر سطح پلوئیدی و اصلاح گل زینتی ارکیده (*Phalaenopsis amabilis*) از این روش انجام نشده است.

هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر کلشی‌سین در

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت‌های مختلف در القای پلی‌پلوئیدی و ویژگی‌های سیتولوژیکی ارکیده (از گونه *Phalaenopsis amabilis*) و دستیابی به‌روش مناسبی برای اصلاح آن و به‌دست آوردن خصوصیات مورفولوژی و گل‌های زیباتر در این گیاه است. امید است بتوان از نتایج این پژوهش در اصلاح این گیاه با ارزش بهره گرفت و پس از تکمیل آزمایش‌های لازم در آینده گیاهان زیباتر و با خصوصیات بهتر تولید کرد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش برای القاء پلی‌پلوئیدی در گل زینتی ارکیده گونه *Phalaenopsis amabilis* در شرایط درون شیشه از طریق کاربرد غلظت‌های مختلف کلشی‌سین در دو تیمار زمانی در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی شیروان انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و هر تکرار حاوی ۳ ریزنمونه جوانه جانبی به اندازه ۳ میلی‌متر حاوی ۲ برگ و با استفاده از هفت غلظت مختلف ماده کلشی‌سین (صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲و ۰/۲۵ درصد) و نیز به‌کار بردن دو تیمار زمانی (۲۴ و ۴۸ ساعت) در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. ریزنمونه‌ها از گیاهان پرورش یافته در شرایط درون شیشه‌ای تهیه شدند. تیمارهای شاهد بدون کلشی‌سین، تنها درون محیط MS جامد قرار گرفتند. پس از گذشت زمان مورد نظر تیمار (۲۴ و ۴۸ ساعت)، گیاهچه‌ها با آب مقطر سترون‌شده به‌مدت ۲ تا ۳ دقیقه شستشو داده شدند و پس از آن در محیط کشت فاقد هورمون در شرایط دمایی ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد نگهداری شدند. پس از گذشت حدود ۱۰ هفته و تأثیر تیمارها بر گیاهان در طی دوران رشد مشاهدات ثبت شد و سطح پلوئیدی گیاهان تیمار شده ابتدا با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک و بعد با استفاده از فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. مشاهدات سیتولوژیکی برگ‌های جدید کاملاً رشد کرده (با اندازه تقریبی ۰/۵ تا یک سانتی‌متر مربع) به‌منظور بررسی تعداد کروموزومی گیاهان تحت تیمار به‌روش فلوسایتومتری و رنگ آمیزی با استفاده از ۴ و ۶ دی آمیدینو ۲-فنیل ایندول، ارزیابی شد. در نهایت هیستوگرام‌های حاصل از فلوسایتومتری برای تعیین میزان ژنوم و تغییر سطح پلوئیدی بررسی شد.

شناسایی مقدماتی گیاهان تغییریافته: بررسی مقدماتی سطح پلوئیدی کلیه گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین ابتدا از طریق بررسی و مقایسه مشخصات و ویژگی‌های مورفولوژیکی با گیاهان شاهد (تیمار نشده) انجام شد. بدین ترتیب که گیاهان مشکوک به پلی‌پلوئیدی با ویژگی‌های تأخیر بسیار در رشد پس از اعمال تیمار، تفاوت در اندازه برگ به‌صورت بزرگ‌تر یا کوچک‌تر شدن، تغییر در ضخامت، شکل و رنگ برگ (که معمولاً تیره‌تر از گیاهان شاهد بودند) در مقایسه با گیاهان شاهد گزینش شده و این ویژگی‌ها اندازه‌گیری شدند.

بررسی خصوصیات روزنه

گیاهانی که در مرحله اول از طریق بررسی صفات مورفولوژیکی گزینش شده بودند، در مرحله دوم با استفاده از روش میکروسکوپی بررسی و غربال شدند. به‌منظور مشاهده روزنه‌ها سه برگ بالغ کاملاً توسعه یافته و تا حد ممکن هم سن و هم اندازه از قسمت میانی از هریک از گیاهان مشکوک به پلی‌پلوئیدی در مقایسه با گیاهان دیپلوئید انتخاب و جدا شدند. سپس با استفاده از تکنیک لاک ناخن، از اپیدرم سطح زیرین آنها نمونه‌برداری شد. به این منظور بخشی از برگ (10mm×5mm) که ترجیحاً فاقد رگبرگ اصلی بوده با استفاده از لاک ناخن پوشانده پس از ۵ دقیقه که خشک شد، با استفاده از یک تیغ تیز حاشیه‌های نمونه را چهارگوش بریده و نوار چسبی شفاف روی آن چسبانده و با انگشت شصت فشار داده تا اپیدرم کاملاً به چسب ملحق شود. سپس چسب که اپیدرم به‌صورت لایه شفاف بسیار نازکی به آن چسبیده جدا و روی لام چسبانده شد. ویژگی‌های روزنه همه نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ بررسی شد. از آن جا که در مطالعات مربوط

Archive of SID

www.SID.ir

به پلی‌پلوئیدی از شاخص طول و عرض روزنه و تراکم روزنه‌ها به‌عنوان روشی مناسب برای شناسایی گیاهان پلی-پلوئیداستفاده شده است، به‌منظور تعیین تراکم روزنه‌ها در واحد سطح با بزرگنمایی 40X و به‌منظور ارزیابی ابعاد روزنه (طول و عرض روزنه) بزرگ‌نمایی 100X انجام شد. با توجه به اینکه در یک نمونه ابعاد روزنه و تراکم آنها کاملاً یکسان نیست و روزنه‌های اطراف رگبرگ‌ها کوچک‌تر و کمتر از نقاط دیگر برگ هستند، از این‌رو با چرخاندن نمونه در زیر میکروسکوپ از چند قسمت آن عکس‌برداری انجام شد. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد و رسم نمودارها نیز بوسیله برنامه Excel و SPSS انجام گردید.

تجزیه‌وتحلیل فلوسایتومتری

به‌منظور تعیین سطح پلوئیدی نمونه‌ها و شاهد با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری از هر جمعیت در سه تا چهار زمان مختلف نمونه‌برداری شد و پس از تزریق به دستگاه و تجزیه‌وتحلیل پیک‌های مربوط به چرخه سلولی در نهایت نتایج به‌صورت جدول جمع‌بندی و بعد تجزیه‌وتحلیل شد.

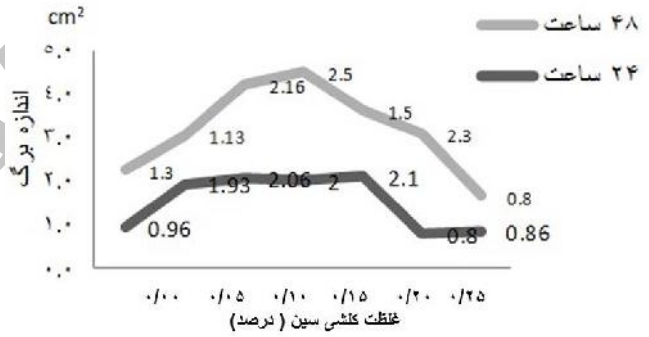
نتایج

بررسی مورفولوژیکی گیاه ارکیده، گونه *Phalaenopsis amabilis*

برخی از تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده در گیاهان شامل تعداد و اندازه برگ (به‌ویژه عرض برگ)، تیرگی برگ، طول و تعداد ریشه بررسی شده و گیاهان مشکوک به پلی-پلوئیدی برای سایر آزمایش‌ها به‌منظور تأیید سطح پلوئیدی انتخاب شدند.

اندازه برگ

نتایج نشان داد که با افزایش میزان غلظت کلشی‌سین اندازه برگ (طول و سطح برگ) گیاهچه‌های تیمارشده نسبت به گیاهچه‌های شاهد افزایش یافت (شکل ۱). البته در غلظت ۰/۲۵ درصد کاهش داشته که احتمالاً علت آن سوختگی ناشی از غلظت بالای کلشی‌سین بود. با افزایش مدت زمان تیمار، اندازه برگ نسبت به گیاهان شاهد افزایش چشم‌گیری را نشان داد. بالاترین اندازه برگ ۲/۵ سانتی‌متر مربع مربوط به تیمار ۰/۱ درصد و ۲/۳ سانتی‌متر مربع مربوط به تیمار ۰/۲ درصد و میانگین اندازه برگ در گیاهان شاهد ۱/۳ سانتی‌متر مربع بود (شکل ۱).

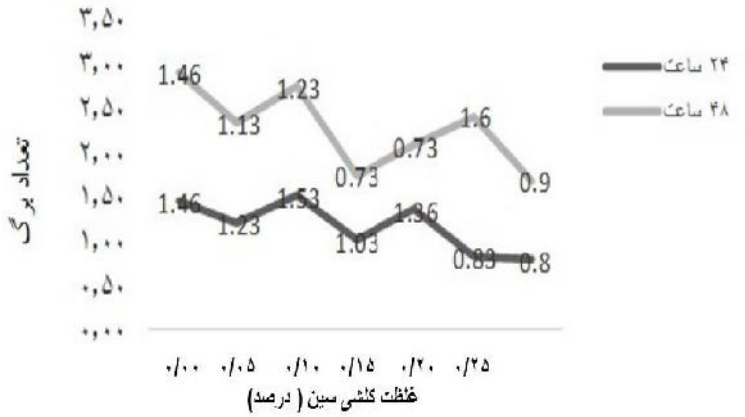


شکل ۱– تأثیر تیمار کلشی‌سین در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت بر اندازه برگ

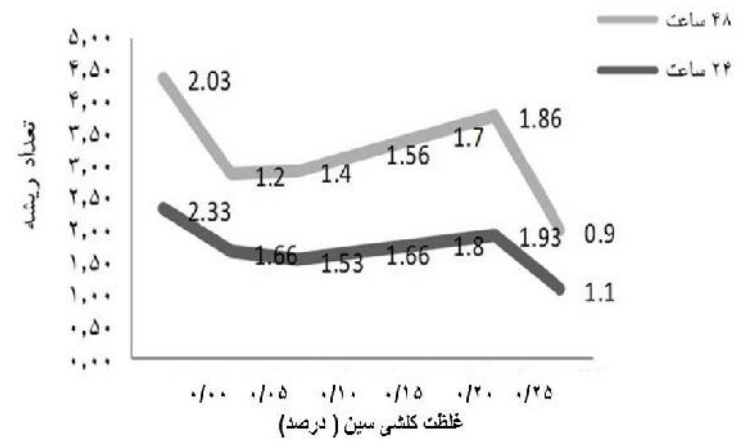
تعداد برگ

با افزایش غلظت کلشی‌سین تعداد برگ هر گیاهچه نیز نسبت به گیاهان شاهد کاهش نشان داد. کمترین تعداد برگ در غلظت‌های ۰/۱ درصد و ۰/۲ درصد مشاهده شد (شکل ۲).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲- تأثیر تیمار کلشی‌سین در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت بر تعداد برگ



شکل ۳- تأثیر تیمار کلشی‌سین در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت بر تعداد ریشه

تعداد ریشه

با افزایش غلظت کلشی‌سین تعداد ریشه در گیاهچه‌ها نسبت به گیاهچه‌های شاهد کاهش شدیدی را نشان داد. بیشترین کاهش در تیمار ۰/۲۵ درصد و ۰/۰۵ درصد کلشی‌سین مشاهده شد. با افزایش غلظت کلشی‌سین تعداد ریشه‌ها افزایش یافت، اما این افزایش در مقابل تیمار شاهد (غلظت صفر کلشی‌سین) کاهش محسوب می‌شود (شکل ۳).

طول ریشه

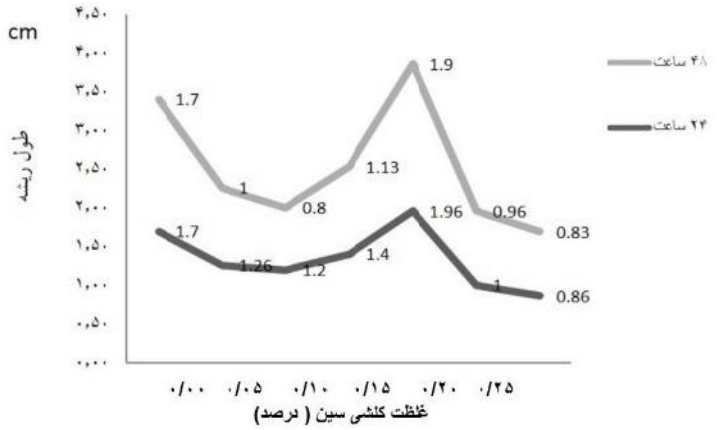
با افزایش غلظت کلشی‌سین تا ۰/۰۵ درصد طول ریشه در گیاهچه‌ها نسبت به گیاهچه‌های شاهد کاهش نشان داد. به‌طوری‌که بیشترین کاهش در تیمار ۰/۱ درصد و ۰/۲ درصد مشاهده شد. پس از آن تا غلظت ۰/۱۵ درصد روند افزایشی بود و بعد با بیشتر شدن غلظت کلشی‌سین دوباره روند کاهشی شد (شکل ۴).

درصد زنده‌مانی

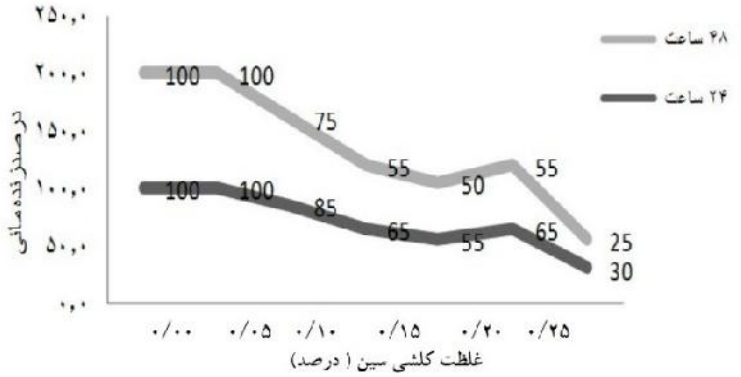
با افزایش مدت زمان تیمار کلشی‌سین درصد زنده‌مانی گیاهان در مقایسه با تیمار شاهد کاهش نشان داد. در این پژوهش در غلظت ۰/۲۵٪ کلشی‌سین کمترین میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها مشاهده شد. درصد زنده‌مانی در غلظت‌های صفر و ۰/۰۱ درصد حدودا ثابت بود، سپس با افزایش غلظت تا ۰/۱۵ درصد کاهش یافت (شکل ۵).

Archive of SID

www.SID.ir



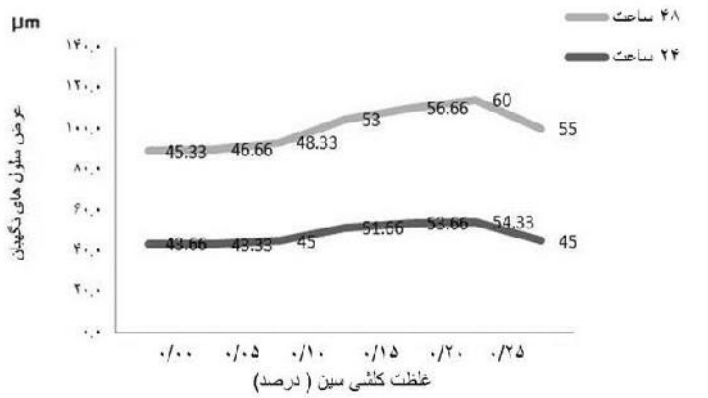
شکل ۴- تأثیر تیمار کلشی‌سین در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت بر اندازه ریشه



شکل ۵- تأثیر تیمار کلشی‌سین بر درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت

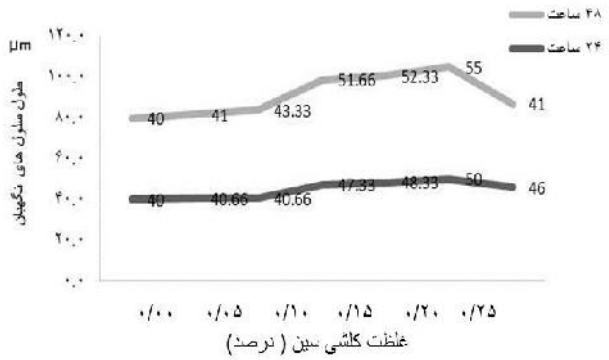
خصوصیات روزنه (عرض و طول سلول‌های نگهبان)

گیاهان گزینش شده اول از طریق بررسی صفات مورفولوژیکی، طی مرحله دوم برای تأیید سطح پلوئیدی با استفاده از روش‌های میکروسکوپی بررسی شدند و تمامی خصوصیات مربوط به سلول‌های روزنه تحت تأثیر سطح پلوئیدی قرار گرفتند (شکل ۶ و ۷).



شکل ۶- تأثیر تیمار کلشی‌سین بر عرض سلول‌ها نگهبان در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت

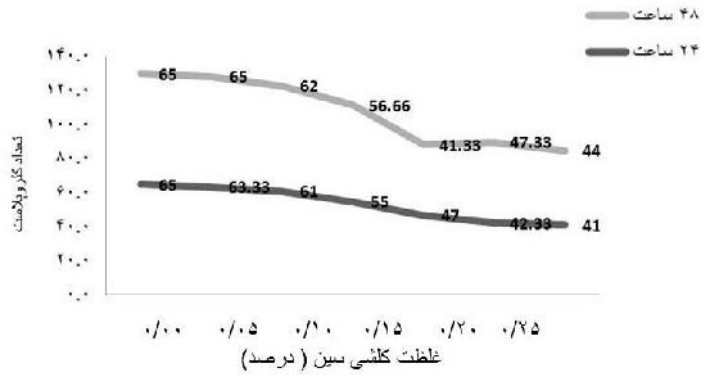
Archive of SID
www.SID.ir



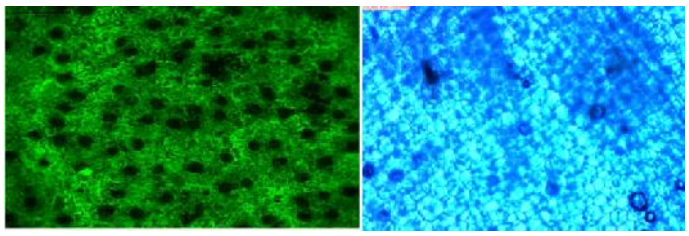
شکل ۷- تأثیر تیمار کلشی‌سین در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت بر طول سلول‌های نگهبان

با افزایش غلظت کلشی‌سین عرض و طول سلول‌های نگهبان افزایش یافت. بیشترین عرض سلول‌های نگهبان در غلظت ۰/۲ درصد با میانگین ۶۰ میکرومتر و بعد ۰/۱ درصد با میانگین ۵۳ میکرومتر مشاهده شد. با افزایش مدت زمان تیمار کلشی‌سین از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت نیز عرض سلول‌های نگهبان افزایش یافت. با افزایش غلظت کلشی-سین و مدت زمان تیمار طول سلول‌های نگهبان روزنه نیز افزایش یافت. بیشترین طول سلول‌های نگهبان ۵۵ میکرومتر در تیمار ۰/۲ درصد مشاهده شد.

تعداد کلروپلاست: با افزایش غلظت کلشی‌سین، در مقایسه با گیاهان شاهد تعداد کلروپلاست کاهش یافت (شکل ۸ و ۹).



شکل ۸- تأثیر تیمار کلشی‌سین در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت بر تعداد کلروپلاست



شکل ۹- نمایش تعداد کلروپلاست‌ها در گیاه شاهد (سمت چپ) و پلی‌پلوئید (سمت راست)

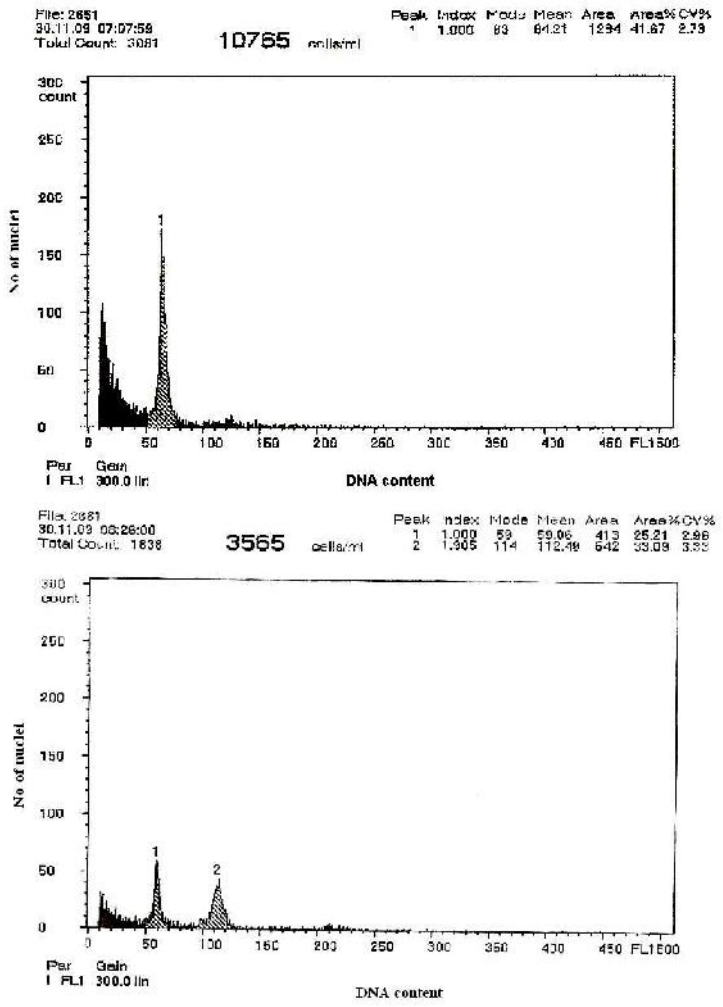
Archive of SID

www.SID.ir

تجزیه‌وتحلیل فلوسایتومتری

هیستوگرام‌های بررسی وضعیت DNA هسته‌ای، دو برابر شدن مقدار DNA را در برخی سلول‌ها گزارش کردند، تعدادی از گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین یک پیک را نشان دادند که با مقایسه این پیک با گیاهان دیپلوئید، یکسان بودن مقدار DNA را نشان دادند و این گیاهان به‌عنوان گیاهان دیپلوئید بدون تغییر در تعداد کروموزوم ارزیابی شدند. تعدادی از گیاهچه‌ها نیز دو پیک را نشان دادند، پیک اول که مانند پیک شاهد در همان میزان بود که مربوط به سلول‌های دیپلوئید است و پیک دوم که دارای محتوای DNA دو برابر است، مربوط به سلول‌های تتراپلوئید است، در واقع این گیاهچه‌ها میکسوپلوئید هستند که به‌عنوان گیاهان با بافت ناهمسان هسته ارزیابی شدند. پیک دوم گیاهان میکسوپلوئید میزان DNA هسته را دو برابر گیاهان دیپلوئید نشان داد (شکل ۱۰).

با توجه به نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیکی و همچنین نتایج حاصل از فلوسایتومتری بیشترین بازده تولید پلی-پلوئیدی در تیمار ۰/۲ درصد کلشی‌سین به‌مدت ۴۸ ساعت مشاهده گردید، همچنین تیمارهای ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ درصد کلشی‌سین نیز تعدادی گیاهان پلی‌پلوئید تولید کردند (شکل ۱۰).

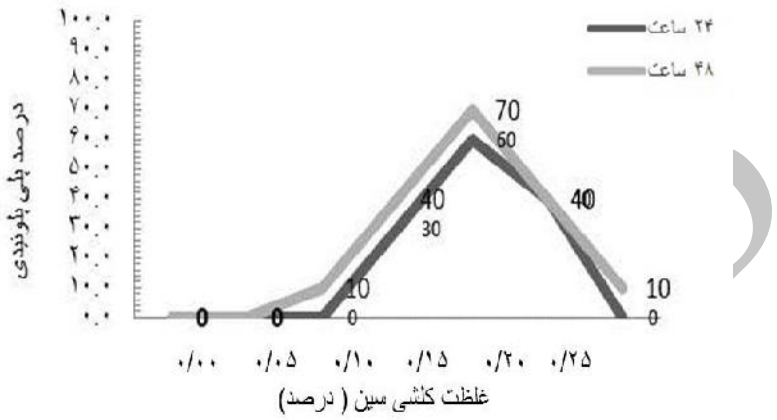


شکل ۱۰- هیستوگرام‌های حاصل از فلوسایتومتری

www.SID.ir

درصد پلی‌پلوئیدی

با توجه به نتایج به‌دست آمده از فلوسایتومتری و بررسی خصوصیات روزنه، با افزایش غلظت کلشی‌سین تعداد گیاهان پلی‌پلوئید نیز افزایش یافت. همچنین با افزایش مدت زمان تیمار کلشی‌سین نیز افزایش تعداد گیاهان پلی‌پلوئید مشاهده شد. بیشترین درصد پلوئیدی در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ درصد کلشی‌سین مشاهده شد (شکل ۱۱).



شکل ۱۱- تأثیر تیمار کلشی‌سین در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت بر درصد پلی‌پلوئیدی

با توجه به نتایج فلوسایتومتری، تیمارهای استفاده شده در غلظت بیش از ۰/۲ درصد کلشی‌سین به‌مدت ۲۴ ساعت و نیز ۴۸ ساعت به‌منظور القای پلی‌پلوئیدی مناسب نبودند و زنده‌مانی کمتری داشتند.

نتایج حاصل از بررسی سطح پلوئیدی گیاهان تیمار شده با سطوح مختلف کلشی‌سین (صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲ و ۰/۲۵ درصد) با استفاده از مشاهدات مورفولوژیک و نتایج حاصل از دستگاه فلوسایتومتری نشان داد که غلظت ۰/۲ درصد کلشی‌سین در گیاه ارکیده بیشترین درصد پلی‌پلوئیدی را تولید کردند.

بحث

افزایش چشمگیر در اندازه برگ با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار کلشی‌سین، و درنتیجه افزایش پلی‌پلوئیدی احتمالاً در نتیجه سازگاری بیشتر گیاهان پلی‌پلوئید با محیط می‌باشد که با نتایج Escandon و همکاران (۲۰۰۷) روی گیاه دارویی بنگدانه که انگیزش پلوئیدی منجر به برگ‌های بزرگتر شد هماهنگی دارد. کاهش زنده‌مانی گیاهان با افزایش مدت زمان تیمار کلشی‌سین ممکن است در اثر سوختگی گیاهچه‌ها در غلظت بالا باشد. این مشاهدات با یافته‌های Kerdsuwan (۲۰۱۲) در رابطه با افزایش زنده‌مانی در غلظت‌های پایین کلشی‌سین تا حدی مشابهت دارد.

مزیت تغییراندازه اندام‌های گیاهی در اثر القای پلی‌پلوئیدی، سازگاری بیشتر گیاهان با محیط است؛ در واقع پلی‌پلوئیدها ممکن است قدرت زنده‌مانی بیشتری نسبت به اجداد دیپلوئید خود در برابر عوامل نامساعد محیطی داشته باشند، زیرا با کاهش سطح برگ و افزایش اندازه سلول روزنه توانایی گیاه در حفظ آب و ایجاد تعادل آبی بیشتر است.

با افزایش غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار، عرض و طول سلول‌های نگهبان افزایش یافت. این یافته‌ها با نتایج Atichart و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارند. البته در گیاه رازک، طول و عرض سلول‌های نگهبان روزنه به‌عنوان پارامترهای مناسبی برای شناسایی گیاهان تتراپلوئید معرفی شده است (Roy *et al.*, 2001).

در این مطالعه با افزایش غلظت کلشی‌سین، در مقایسه

Archive of SID

www.SID.ir

با گیاهان شاهد تعداد کلروپلاست کاهش یافت.

با توجه به اینکه دستگاه فلوسایتومتری با اندازه‌گیری شدت نسبی فلورسانس، مقدار نسبی DNA را نشان می‌دهد، سطح پلوئیدی یک نمونه ناشناخته تنها پس از ترکیب با هسته‌های استاندارد گیاه شاخص با سطح پلوئیدی و محل پیک در مقایسه با استاندارد مشخص می‌شود. با توجه به نتایج فلوسایتومتری تیمارهای استفاده شده در غلظت بیش از ۰/۲ درصد کلشی‌سین به‌مدت ۲۴ ساعت و نیز ۴۸ ساعت به‌منظور القای پلی‌پلوئیدی مناسب نبودند و زنده‌مانی کمتری نیز داشتند.

در این تحقیق، با افزایش غلظت کلشی‌سین تا حدودی روند افزایشی رشد گیاهان کاهش یافت ولی افزایش اندازه برگ و ریشه و تعداد کلروپلاست در هر گیاهچه مشاهده شد. تیمار کلشی‌سین در گیاهان زینتی با افزایش پلی-پلوئیدی سبب افزایش اندازه برگ و تا حدودی افزایش اندازه ریشه، افزایش عرض و طول سلول‌های نگهبان روزنه شد. همچنین با افزایش درصد پلی‌پلوئیدی، درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها نیز کاهش یافته و میزان بیشتری از مرگ و میر در گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین در مقایسه با گیاهان شاهد مشاهده شد. به‌طوری‌که با افزایش سطح تیمار کلشی‌سین، افزایش پلوئیدی در گیاهان تیمار شده مشاهده شد که نتایج فلوسایتومتری نیز گویای این مسئله بود. در پژوهش Malekzadeh Shafaroodi و همکاران (۲۰۱۱) با تیمار ریشه ریحان با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین، بالاترین درصد گیاهان تتراپلوئید در تیمار ۰/۵ درصد گزارش شد. همچنین در گیاه بادرنجبویه نتایج مشابهی به‌دست آمد (Borghai *et al.*, 2010).

در این پژوهش تیمار با کلشی‌سین باعث کاهش درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها شد که این نتایج با بررسی‌های انجام شده روی زرشک که با افزایش غلظت از ۰/۰۲ درصد به ۰/۲ درصد میزان بذرهای زنده کاهش یافت (Thao *et al.*, 2003) و همچنین تیمار کلشی‌سین در گل نرگس که باعث کاهش زنده‌مانی گیاهچه‌ها در شرایط درون شیشه شد (Ahmadi Majd *et al.*, 2012)، مطابقت دارد. نتایج به‌دست آمده در رابطه با تغییرات مورفولوژیکی به‌صورت افزایش اندازه برگ، کاهش تعداد برگ و کاهش تعداد و طول ریشه با نتایج بررسی اثر غلظت‌های کلشی‌سین در ریحان (Malekzadeh Shafaroodi *et al.*, 2011) و لیموترش (Afshar Mohammadian *et al.*, 2013) تا حدودی مطابقت داشت.

در این تحقیق افزایش سطح پلوئیدی باعث کاهش تعداد روزنه و در عین حال افزایش اندازه آنها شد که با نتایج مطالعات Omidbeigi و همکاران (2010) روی گیاه ریحان مطابقت داشت. البته تولید گیاهان پلی‌پلوئید پس از تیمار با کلشی‌سین در موارد بسیاری مانند پیاز (Alan *et al.*, 2007) و نوعی گون (Chen *et al.*, 2007) هم گزارش شده است.

نتایج حاصل از بررسی سطح پلوئیدی گیاهان تیمار شده با سطوح مختلف کلشی‌سین نشان داد که غلظت ۰/۲ درصد و ۰/۱۵ درصد کلشی‌سین در گیاه ارکیده بیشترین درصد پلی‌پلوئیدی را تولید کردند. نتایج فلوسایتومتری در۳۰ درصد گیاهان زنده‌مانده پیک دو برابر شدن میزان DNA را نشان داد. در این پژوهش مؤثرترین غلظت کلشی‌سین در تغییر پلوئیدی ۰/۲ درصد تشخیص داده شد.

کلشی‌سین یکی از مواد ضد میتوزی است که به‌طور وسیعی برای القاء پلی‌پلوئیدی در بسیاری از گونه‌ها استفاده شده است و در این آزمایش نیز تأثیر مثبت این ماده القاءکننده پلوئیدی مشاهده شد، همچنین کلشی‌سین باعث دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌های برخی از سلول‌ها و در نهایت میزان DNA هسته‌ای گردید. همچنین بهترین روش برای تشخیص گیاهان پلی‌پلوئید بعد از فلوسایتومتری در این گیاه بررسی خصوصیات روزنه و تعیین تراکم آن تشخیص داده شد. در این آزمایش اندازه سلولهای نگهبان در گیاهان پلی‌پلوئید افزایش و تراکم آنها کاهش یافت.

بنابراین به نظر می‌رسد افزایش سطح پلوئیدی و مقدار کروماتین در گیاهان می‌تواند گیاه را نسبت به تنش‌های محیطی متحمل‌تر و سازگارتر کند. به گزارش رافضی و همکاران (۲۰۰۹) ژنوتیپ‌های گیاه *Agropyron elongtum*

Archive of SID

www.SID.ir

L. که اندازه کروماتین بزرگتری نسبت با سایر ژنوتیپ‌ها داشتند در شرایط نامساعد محیطی سازگاری بیشتری از خود نشان دادند (Rafezi *et al*., 2009).

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولان محترم آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیروان که امکان انجام این پژوهش را در این دانشگاه فراهم کردند، سپاسگزاری می-کنیم.

منابع مورد استفاده

- Aalishah, A. and Omidi, M., 2008. Cytogenetics Laboratory Methods. Tehran University Press. (In Farsi)
- Ahmadi Majd, M., Sarikhani, H., Chaiechi, M. and Kashi, A.K., 2012. Investigation of micropropagation and effect of colchicine to induce *in vitro* polyploidy in *Narcissus tazetta*. Plant Production, 35: 93-103 (In Farsi).
- Afshar Mohammadian, M., Omidi, Z., Poorakbari, R. and Asadi Abkenar, A., 2013. Investigation of effect of polyploidy on some anatomical characteristics and antioxidant components of *Citrus ourantifolia*. Journal of Plant Researches, 26: 238-246. (In Farsi).
- Alan, A.R., Lim, W., Mutschler, M.A. and Earle, E.D., 2007. Complementary strategies for ploidy manipulations in gynogenic onion (*Allium cepa* L.). Plant Science, 173: 25-31.
- Atichart, P., 2007. Polyploid induction in *Dendrobium secundum* (Bl.) Lind. by *in vitro* techniques. Thai Journal of Agricultureal Science, 40: 91-95.
- Borghai, S.F., Sarikhani, H., Chaiechi, M. and Kashi, A.K., 2010. Induction of *in vitro* polyploidy in medicinal plant of *Melissa officinalis* L. Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants. 26: 259-283. (In Farsi)
- Chen, L.L. and Gao, S.H.L., 2007. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploid *Astragalus memberanaceus*. Scientia Horticulture, 112: 339-344.
- Chen, W.L. and Yeh, D.M. 2006. Elimination of *in vitro* contamination shoot multiplication, and ex vitro rooting of *Aglaonma*. Horticulture Science. 42: 629-632.
- Escandon, A.S., Alderet, L.M. and Hagwara, J.C., 2007. *In vitro* polyploidization of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America. Science Horticulture, 115: 56-61.
- Hesamzadeh Hejazi, S.M. and Ziyaeinasab, M., 2008. Cytogenetic analysis of some of diploid populations of *Onobrychis* genus in Natural Resources Gene Bank of Iran. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 16: 158-171. (In Farsi).
- Kerdsuwan, N. and Te- chato, S., 2012. Effects of colchicine on survival rate, morphological, physiological and cytological characters of Changdaeng orchid (*Rhynchostylis gigantean* var. *rubrum* Sagarik) *In Vitro*. Journal of Agricultural Technology 8: 1451-1460.
- Madon, M., Clyde, M.M., Hashim, H., Mohd yusuf, Y., Mat, H. and Saratha, S., 2005. Polyploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. Journal of Oil Palm Research 7: 110-123.
- Malekzadeh Shafaroodi, S., Gani, A., Habibi, M. and Amiri, A., 2011. The possibility polyploidy induction in basil (*Ocimum basilicum* L.) using colchicine. Journal of Horticultural Science, 25: 461-469. (In Farsi).
- Omidbaigi, R., Mirzaee, M., Hassani, M.E. and Sedghi Moghadam, M., 2010. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal of Plant Production, 4: 87-98.
- Rafezi, A., Farshadfar, M. and farshadfar, E., 2009. Determination of intra-specific karyotypic variation in 17 genotypes of *Agropyron elongatum* L., Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and genetic Research, 17: 61-69.
- Rodica, B., Bavaru, A. and Broască, L. 2011. Anatomical aspects of *Phalaenopsis amabilis* L. Blume. Annals of the Romanian Society for Cell Biology, 16:102-109.
- Roy, A.T., Leggett, G. and Koutoulis, A., 2001. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Reports, 20: 489- 495.
- Shahriari Ahmadi, F., Dehghan, E., Farsi, M. and Azizi, M., 2008. Tetraploid induction of *Hyoscyamus muticus* L. using colchicines treatment. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11: 2653-2659.
- Thao, N.T.P., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y. and Okuba, H., 2003. Induction of tetraploids in ornamental Alocasia through colchicines and oryzaline treatments. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 72:19-25.

Archive of SID

www.SID.ir

Induction of in vitro polyploidy in ornamental flowers of orchid species (*Phalaenopsis amabilis*)

F. Zaker Tavallaie[1*] and H. Kolahi[2]

1*- Assis. Prof. of Biotechnology, Complex of Higher Education of Shirvan, Shirvan, I.R. Iran
E-mail: f.zaker.t@um.ac.ir
2- M.Sc., Azad University of Shirvan, Shirvan, I.R. Iran

Received: 01.03.2017 Accepted: 03.04.2017

Abstract

Phalaenopsis amabilis is one of the best and well-known orchid species that is easy to grow and has good compatibility. This study was done for induction of polyploidy in *Phalaenopsis amabilis* by *in vitro* conditions. The study was conducted as factorial based on a completely randomized design with three replicates and each replicate including three explants of auxiliary buds (approximately 3 mm) containing two leaves using seven different concentrations of colchicine (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 and 0.25 percent) in two time periods (24 and 48 hours). Explants were cultured on MS medium without hormones after treatment with colchicine. After 10 weeks sevral morphological traits that were under influence of polyploidy, including number and size of leaves, number and size of roots, length and width of stomata guard cells, number of chloroplast, and survival rate of seedlings were evaluated. Cytological observations of new developed leaves were evaluated by flow cytometry to assess the number of chromosomes in plants. The results showed that the highest percentage of polyploidy was obtained using 0.15 and 0.2 percent of colchicine concentrations. Correlation of some morphological traits with polyploidy levels showed that in addition to flow cytometry method, some important morphological traits such as stomata characteristics and its density can be used to recognize polyploidy in orchid plant. Polyploidy was resulted to enhancement in size and reduction in density of guard cells. Colchicine is usable to produce ornamental polyploid orchid.

Keywords: Colchicine, flow cytometry, morphological traits, orchid.

Archive of SID

www.SID.ir