تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۵ شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱

بررسی کاریوتایپ و سطوح پلوئیدی برخی از ژنوتیپ های گل نرگس بومی و غیر بومی ایران

مهرانگیز چهرازی[۱]، روح انگیز نادری[۲]، علی اکبر شاه نجات بوشهری[۳]، محمد اسماعیل حسنی[۴] و عیسی ظریفی[۵]

۱*- **نویسنده مسؤول:** استادیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران (chehrazi_m@yahoo.com)

۲ و۴ - به ترتیب دانشیار و استادیار گروه علوم باغبانی. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۳- دانشیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۵- مربی بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۱۳

چکیده

بررسی کاریوتایپ و سطوح پلوئیدی گل نرگس *Narcissus* sp. و تعداد کروموزوم، بر روی ژنوتیپ های بومی جمع آوری شده از استان های خراسان جنوبی، خوزستان، کهگیلویه و بویراحمد، فارس، مازندران و گلستان و همچنین ژنوتیپ های غیر بومی صورت گرفت. ابتدا جهت شمارش کروموزوم، از مریستم نوک ریشه حاصل از سوخ های ریشه دار شده با مقایسه دو تیمار آب یخ و ۸، هیدروکسی کینولین جهت توقف تقسیم سلولی به عنوان پیش تیمار استفاده گردید سپس در محلول اتانول و اسید استیک (۱:۳) تثبیت، با اسید کلریدریک هیدرولیز و با استوارسئین رنگ آمیزی شد. از هر ژنوتیپ سه صفحه متافازی جهت آنالیز پارامتر های کاریوتایپ مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد ژنوتیپ های مورد بررسی از نظر سطوح پلوئیدی متفاوت بودند؛ بدین صورت که پایه کروموزومی در گل های نرگس بومی ۱۰ و در هلندی ها ۷ بود. در بین ژنوتیپ های بومی، مسکینک بهبهان و اهواز دارای ۲۰ کروموزوم ۲n=۲x=۲۰، دیپلوئید با فرمول کاریوتایپی ۴m+۵sm+۱st (دسته های دو تایی) و بقیه تریپلوئید ۲n=۳x=۳۰ با فرمول کاریوتایپی ۷m+۳sm (دسته های سه تایی) بودند و در بین ژنوتیپ های غیر بومی، نرگس هلندی با گل کرم رنگ، تتراپلوئید با ۲۸ کروموزوم ۲n=۴x=۲۸ و فرمول کاریوتایپی ۲m+4sm+۱st (دسته های چهار تایی) قرار داشتند؛ در حالی که سه ژنوتیپ دیگر نرگس هلندی با ۲۱ کروموزوم ۲n=۳x =۲۱ تریپلوئید با فرمول کاریوتایپی ۱m +۵sm +۱st(دسته های سه تایی) بودند. در بررسی کاریوتایپی شامل شناسایی کروموزوم ها از لحاظ شکل، اندازه و محل قرار گرفتن سانترومر، بین ژنوتیپ ها اختلاف مشاهده گردید. همزمان با استفاده از روش فلوسایتومتری سطوح پلوئیدی گل های نرگس تأئید شدند.

کلید واژه: تعداد کروموزوم، سطوح پلوئیدی، فلوسایتومتری، کاریوتایپ، گل نرگس، .Narcissus sp

مقدمه

گل نرگس *Narcissus* sp.، یکی از گیاهان مهم خانواده Amarillidaceae با بیش از ۶۵ گونه است که در سطح وسیعی از مناطق گرمسیر و سردسیر دنیا پراکنده اند (بلانچارد[۱]، ۱۹۹۰). این گل با داشتن بیش از ۲۰۰۰۰ رقم یکی از گل های بریدنی مهم تجاری دنیا محسوب می شود. در ایران گل های نرگس از تنوع خاصی برخوردارند و از زمان های قدیم به طور خودرو سطح وسیعی از مناطق جنوبی کشور را به خود اختصاص داده اند. این گونه گیاهان غالباً به اندازه کافی با محیط و تحمل به آفات منطقه سازگاری داشته اند؛ بنابراین پایه های والدینی مناسبی جهت انجام تلاقی می باشند (مامقانی، ۱۳۷۳). علاوه بر ژنوتیپ های بومی ژنوتیپ

1- Blanchard

های وارداتی که ارزش اقتصادی بالایی دارند نیز در سطح وسیعی از ایران کشت و کار می گردند. در ایران تحقیقی توسط فرهمند و خوشخوی[1]، ۲۰۰۷، بر روی دو ژنوتیپ گل نرگس صورت گرفته است و نتایج به دست آمده از این مطالعات سیتوژنتیکی و شمارش کروموزوم، در نرگس شهلا شیراز و نرگس مسکین کازرون، نشان داد که هر دو جمعیت دارای ۳۰ کروموزوم و تریپلوئید (۲n= ۳x =۳۰) بودند، همچنین تشکیل نشدن بذر در گیاهان نرگس در نرگس زارهای مطالعه شده در استان های فارس و خوزستان تا حدودی این سطح پلوئیدی را تأیید کرد. پژوهش های کروموزومی، تعداد کروموزوم های اکثر گونه های نرگس را معلوم نموده اند (گراهام و برت[2]، ۲۰۰۴، فرناندز[3]، ۱۹۴۲، برندهام[4]، ۱۹۸۶و جفرسون براون[5]، ۱۹۹۱). تعداد کروموزوم گونه های نرگس بسیار متنوع هستند : ۲n =۱۰، ۲n= ۱۴ و ۴x = ۵۶ = ۲n (وب[6]، ۱۹۸۰). تعداد کروموزوم پایه در گونه های نرگس ۷ ، ۱۰ و ۱۱ بوده و از این تعداد به نظر می رسد تعداد ۷، پایه برخی گونه ها و ۱۰ و ۱۱ فقط برای *N. tazetta* L. می باشد (دارلینگتون، ۱۹۶۱). تنوع کاریوتایپ های یک واریتهٔ چینی (ژو و همکاران[7]، ۱۹۸۶) و سه واریتهٔ تحت کشت دیگر گل نرگس (*N.tazetta* L.) مورد مطالعه قرار گرفتند. در تحقیق دوم هرسه واریته 'Grand Soleil d'Or'، 'Cypri' و 'Chinese Sacred lily' تریپلوئید با تعداد پایهٔ کروموزومی x=۱۰ بودند. یکی شامل سه دسته کروموزوم هومومورفیک و دو واریته دیگر با کروموزوم های هترومورفیک بودند (کاریهالو[8]، ۱۹۸۷). تعداد کروموزوم های هاپلوئید گونه های وحشی ۷ و تعداد کروموزوم های دیپلوئید گونه های وحشی و تحت کشت از ۱۴ تا ۵۰ دیده شده است؛ همچنین تعدادی از ارقام جدید تتراپلوئید بودند (جفرسون براون، ۱۹۹۱). در تحقیقی سیتوژنتیکی گیاهچه های حاصل از کشت بافت بساک گل نرگس *N. tazetta* var. Chinensis Roem مورد مطالعه قرار گرفت؛ نوک ریشه ها با آب سرد پیش تیمار شده در محلول اتانول- اسید استیک (۱: ۳) تثبیت و در محلول اسید کلریدریک ۱ نرمال هیدرولیز شدند؛ سپس با استوکارمین ۲ ٪ رنگ آمیزی و بعد از عمل له کردن، زیر میکروسکپ نوری مشاهده گردیدند؛ تعداد کروموزوم در مرحله متافاز شمارش و همه گیاهچه ها دارای ۳۰ کروموزوم بودند (چنو همکاران[9]، ۲۰۰۵).

سطح پلوئیدی در گل نرگس به صورت دیپلوئید، تری پلوئید و تتراپلوئید بیان شده است (جی و همکاران[10]، ۲۰۰۵). این مطالعات معلوم کرده که پلی پلوئیدی نقش مهم و گاهی غالب را در گیاهان دارد. به طور طبیعی، در گل نرگس (برندهام، ۱۹۸۶) و بسیاری از گیاهان دیگر از جمله *Alstroemeria* sp. هیبریداسیون بین گونه ای دور از هم انجام شده است و نیز با استفاده از گامت های ۲n بارور ارقام پلی پلوئیدی به سادگی به دست آمده است(رامانا و جکوبسن[11]، ۲۰۰۳). این پدیده در هیبرید های OA و LA گل سوسن نیز مشاهده شد. از طرفی، بعضی از این هیبریدهای تریپلوئید بارور شده اند؛ بنابراین نقش به نژادی در این گیاهان تریپلوئید ارزشمند و انتقال بخش هایی از کروموزوم های ترکیبی برای نسل های بعدی مفید هستند(باربا گنزالز و همکاران[12]، ۲۰۰۵).

هدف از انجام این آزمایش تعیین سطح پلوئیدی با استفاده از بافت های مریستمی گیاه و شمارش کروموزوم و همچنین کاربرد روش فلوسایتومتری است که در جهت تعیین تنوع و روابط ژنتیکی بین برخی گل های نرگس بومی و غیر بومی ایران می باشد.

1- Farahmand & Khosh khui
2- Graham & Barret
3- Fernandes
4- Brandham
5- Jefferson-brown .
6- Webb
7- Zhu *et al.*
8- Karihaloo
9- Chen *et al.*
10- Ge *et al.*
11- Ramanna & Jacobsen
12- Barba-Gonzalez *et al.*

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

جمع آوری سوخ های ژنوتیپ های وحشی گل نرگس از نرگس زارهای طبیعی شامل استان های خوزستان (بهبهان، اهواز)، کهگیلویه و بویراحمد (گچساران، دیل آرو، برم الوان، کوه سفید)، فارس (شیراز، کازرون) و خراسان جنوبی (بیرجند) انجام گرفت. سوخ ژنوتیپ های تجاری از استان های تهران، گلستان و مازندران جمع آوری گردید. اسامی ژنوتیپ های گل نرگس در جدول ۱ آمده است.

برای تخمین سطح پلوئیدی به روش فلوسایتومتری از دستگاه فلوسایتومتری موجود در آزمایشگاه سیتوژنتیک بخش بانک ژن سازمان تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج استفاده شد. سطح پلوئیدی با نمایش منحنی بر روی مانیتور مشخص می شود. موقعیت نسبی پیک که نشان دهنده مرحله یا سطح پلوئیدی است، با یک گیاه منبع و شناخته شده از نظر سطح پلوئیدی مقایسه می شود. گیاه منبع یا استاندارد بهتر است با پیک نزدیک به پیک گونه هدف انتخاب شود. در این آزمایش از گیاه جعفری که دیپلوئید می باشد به عنوان شاهد استفاده گردید.

روش شمارش کروموزوم

پیش تیمار: دو تیمار آب یخ و ۸ هیدروکسی کینولین جهت توقف تقسیم سلولی و منقبض و کوتاه تر شدن کروموزوم ها با هم مقایسه شدند.

الف- آب یخ: نوک ریشه‌ها بعد از قطع، در شیشه‌های کوچک در دار حاوی مقداری آب مقطر صفر درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند؛ سپس در حمام آب یخ به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگه داری شدند.

جدول۱- اسامی ژنوتیپ های گل نرگس

شماره	ژنوتیپ	کد	شماره	ژنوتیپ	کد
۱	شهلا اهواز	SA	۱۴	مسکینک بهبهان	MKB
۲	شهلا برم الوان	SBA	۱۵	مسکینک کازرون	MKK
۳	شهلا بهبهان	SB	۱۶	پنجه گربه ای اهواز	PGA
۴	شهلا بیرجند	SBI	۱۷	پنجه گربه ای بهبهان	PGB
۵	شهلا دیل آرو	SD	۱۸	پر پر بهبهان	PPB
۶	شهلا شمال	SSO	۱۹	پر پر شمال	PPSO
۷	شهلا شیراز ۱	SS1	۲۰	پر پر شیراز	PPS
۸	شهلا شیراز ۲	SS2	۲۱	پر پر گچساران	PPG
۹	شهلا کازرون	SK	۲۲	نرگس هلندی ۱	NH1
۱۰	شهلا کوه سفید	SKO	۲۳	نرگس هلندی ۲	NH2
۱۱	شهلا گچساران	SG	۲۴	نرگس هلندی ۳	NH3
۱۲	مسکین بهبهان	MB	۲۵	نرگس هلندی ۴	NH4
۱۳	مسکینک اهواز	MKA			

ب- ۸، هیدروکسی کینولین ۰/۰۰۲ مولار:
نمونه ها در این محلول به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه سپس در یخچال برای ۱۶ ساعت نگهداری شدند (بوچان و حسین[1]، ۱۹۹۸). نگهداری شکل سلول ها و محتویات آن ها، از جمله کروموزوم ها، و ممانعت از تغییرات احتمالی آن ها استفاده شد.

هیدرولیز: نمونه ها با اسید کلریدریک یک نرمال، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه (۲۴-۲۲ درجه سانتی گراد) هیدرولیز شدند.

رنگ آمیزی: برای رنگ آمیزی ماده رنگی استوارسئین آزمایش شد؛ بدین ترتیب که ریشه ها بعد از هیدرولیز از اسید کلریدریک خارج شده و با آب مقطر شستشو داده شدند و به مدت حداقل ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه در محلول رنگ آمیزی قرار گرفتند.

روش له کردن و تهیه نمونه های متافازی:
بر اساس روش اسکواش بعد از رنگ آمیزی یکی از ریشه ها را بر روی لام انتقال داده و یک قطره اسید استیک ۴۵ درصد به آن اضافه کرده و از قسمت نوک ریشه حدود ۱ الی ۲ میلی متر برش داده، سپس لامل را با زاویه ۴۵ درجه روی نمونه قرار دادیم با زدن چند ضربه برای ایجاد یک لایه سلولی، نمونه بین لام و لامل له گردید. سپس زیر میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. از هر ژنوتیپ، سه سلول متافازی تهیه و مطالعه شد.

بر اساس پیشنهاد لوان و همکاران[2]، (۱۹۶۴) شکل های مختلف کروموزوم ها به صورت زیر تعیین گردیدند:

کروموزوم متاسنتریک (m): نسبت بازوی بلند به کوتاه ۱/۰۵ الی ۱/۶۹

کروموزوم ساب متاسنتریک (sm): نسبت بازوی بلند به کوتاه ۱/۷۰ الی ۳/۰۰

کروموزوم ساب تلوسنتریک (st): نسبت بازوی بلند به کوتاه ۳/۰۱ الی ۷/۰۰

کروموزوم تلوسنتریک (t): نسبت بازوی بلند به کوتاه ۷/۰۱ الی ۳۹/۰۰

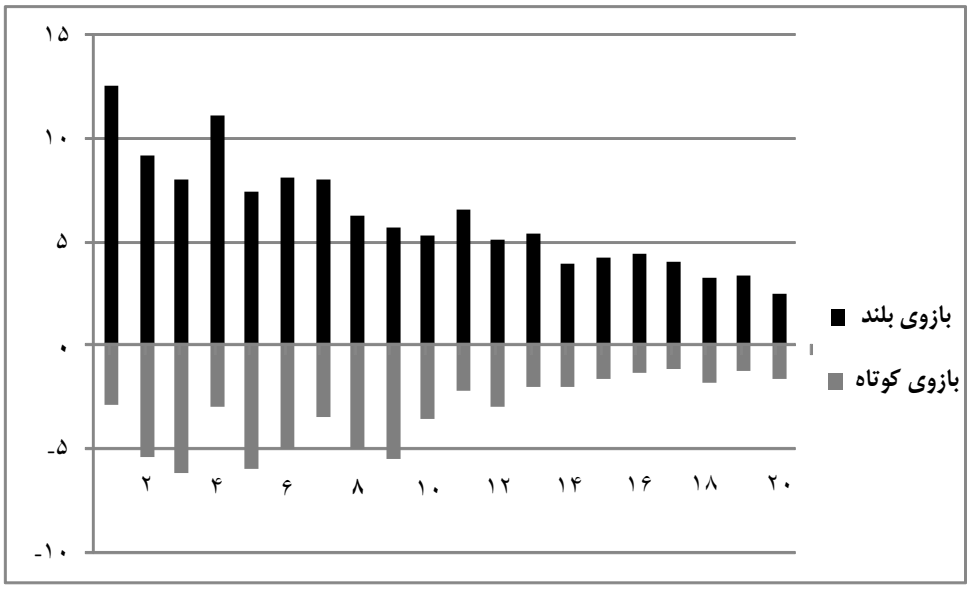
در دستگاه فلوسایتومتری برگ تازه روییده هر یک از ژنوتیپ های گل نرگس به طور جداگانه با گیاه شاهد جعفری مورد بررسی قرار گرفت. برگ ها به میزان کمتر از یک میلی گرم در بافر جدا کننده هسته سلولی، خرد شده و با استفاده از فلوروکروم (DAPI) (4′,6,diamidino- 2- phenylindole) رنگ آمیزی شدند. سپس سطح پلوئیدی تخمین زده شد.

نتایج و بحث

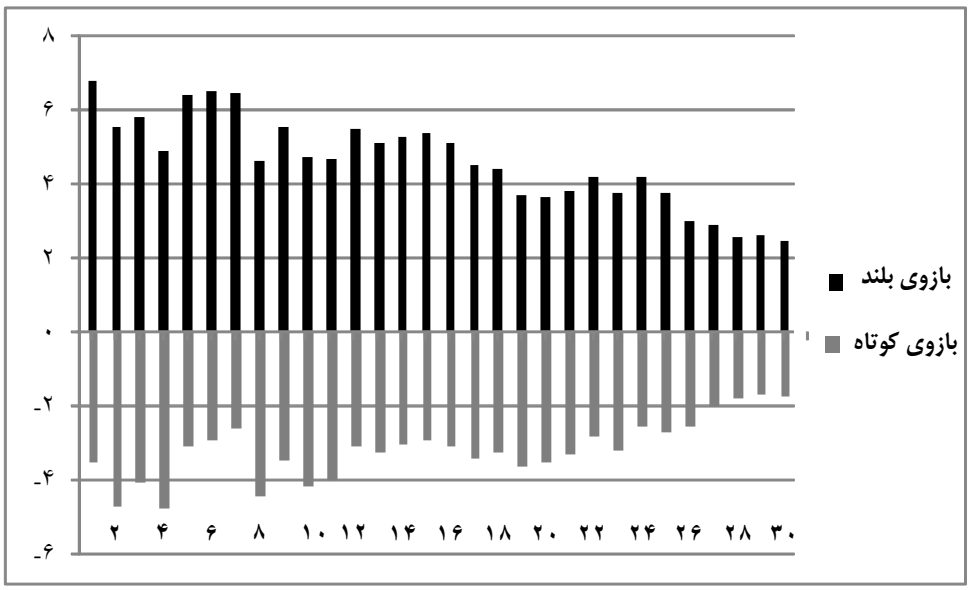
در شمارش کروموزوم در مرحله متافاز برای گل های نرگس، نتایج به دست آمده از مقایسه دو پیش تیمار"آب سرد" و"۸، هیدروکسی کینولین" جهت توقف تقسیم سلولی، تفاوت چندانی مشاهده نگردید و در هر دو تیمار، توقف تقسیم سلولی به خوبی صورت پذیرفت. در این مقایسه مواردی از قبیل جدا بودن کروموزوم ها از هم، بالا بودن شاخص متافازی و غیره مورد توجه بود.کاریوتایپ شامل شکل و اندازه کروموزوم ها بین ژنوتیپ ها تفاوت هایی را نشان داد. در بین کروموزوم های گل نرگس های بومی اختلافاتی مشاهده گردید. دو ژنوتیپ مسکینک بهبهان و اهواز دارای کروموزوم هایی با طول های متفاوت بودند. از نظر تعداد نیز این دو ژنوتیپ با بقیه ژنوتیپ ها اختلاف داشتند. در این دو ژنوتیپ تعداد کروموزوم ۲۰ عدد بوده و با توجه به پایه کروموزومی ۱۰، دیپلوئید (۲n=۲x=۲۰) می باشند (شکل ۱) که این مورد تا کنون در ایران گزارش نشده است. در ژنوتیپ های گل نرگس شهلا تعداد کروموزوم ۳۰ عدد بوده و سطح پلوئیدی تریپلوئید (۲n=۳x=۳۰) می باشد (شکل ۲). ژنوتیپ های گل نرگس پرپر نیز مشابه شهلاها، با این تفاوت که از نظر اندازه متفاوت ولی از نظر تعداد کروموزوم ۳۰ عدد و تریپلوئید بودند. ژنوتیپی که گل نرگس مسکینک

1- Bauchan & Hossain
2- Levan *et al.*

کازرون نام دارد نیز دارای کروموزوم هایی با اندازه متفاوت و بالغ بر ۳۰ عدد بوده و تریپلوئید (۲n=۳x=۳۰) می باشد. فرهمند و همکاران (۲۰۰۷) این ژنوتیپ را منسوب به مسکین کازرون دانسته اند که به زبان محلی به آن مسکین یا مسکینک گفته می شود. آن ها نیز این ژنوتیپ را تریپلوئید معرفی کردند. در چهار ژنوتیپ هلندی، کروموزوم ها از نظر اندازه و همچنین از نظر تعداد با هم اختلاف داشتند. سه نرگس هلندی گل زرد با ۲۱ کروموزوم تریپلوئید با پایه کروموزومی ۷ و نرگس هلندی گل سفید با ۲۸ کروموزوم تتراپلوئید بودند. آن ها با ژنوتیپ های بومی نیز تفاوت داشتند. کروموزوم ها در یک سلول از نظر اندازه از بزرگ به کوچک دسته بندی و بدین ترتیب کاریوتایپ ژنوتیپ ها تعیین شد.



شکل ۱- ایدیوگرام (میکرون) گل نرگس مسکینک (دیپلوئید)



شکل ۲- ایدیوگرام (میکرون) گل نرگس شهلا (تریپلوئید)

مشخصات مرفولوژیکی نشان می دهد که اندام زایشی گیاهان، بیشترین تنوع را بین ژنوتیپ ها داشته اند به طوری که با توجه به وضعیت گل به راحتی می توان اکثر آن ها را تشخیص داد. نرگس های هلندی را با داشتن یک گل بر روی شاخه گل دهنده از بومی ها که بیش از یک گل دارند می توان متمایز نمود. چهار ژنوتیپ مذکور نیز با اختلافاتی که در اندازه و رنگ تاج دارند، قابل تشخیص می باشند.

سطوح پلوئیدی با دستگاه فلوسایتومتری تأئید گردیدند (شکل های ۳ و۴).

شکل های مختلف کروموزوم ها بر اساس پیشنهاد لوان و همکاران مشخص شدند (جدول ۲):

در این آزمایش در ژنوتیپ‌های بومی دیپلوئید، چهار جفت متاسنتریک، پنج جفت ساب متاسنتریک و یک جفت ساب تلوسنتریک مشاهده گردید و فرمول کاریوتایپی آن به صورت ۴m+۵sm+۱st بود که در جمع ۲۰ کروموزوم شد. در ژنوتیپ‌های بومی تریپلوئید، هفت دسته کروموزوم سه تایی متاسنتریک و سه دسته کروموزوم سه تایی ساب متاسنتریک مشاهده گردید و فرمول کاریوتایپی آن به صورت ۷m+۳sm بود و در جمع ۳۰ شامل کروموزوم شد. (جدول ۲).

در ژنوتیپ تریپلوئید غیربومی(شکل ۵)، یک دسته کروموزوم سه تایی متاسنتریک، پنج دسته کروموزوم سه تایی ساب متاسنتریک و یک دسته کروموزوم سه تایی ساب تلوسنتریک مشاهده گردید و فرمول کاریوتایپی آن به صورت ۱m+۵sm+۱st بود و در جمع ۲۱ کروموزوم شد (شکل ۶).

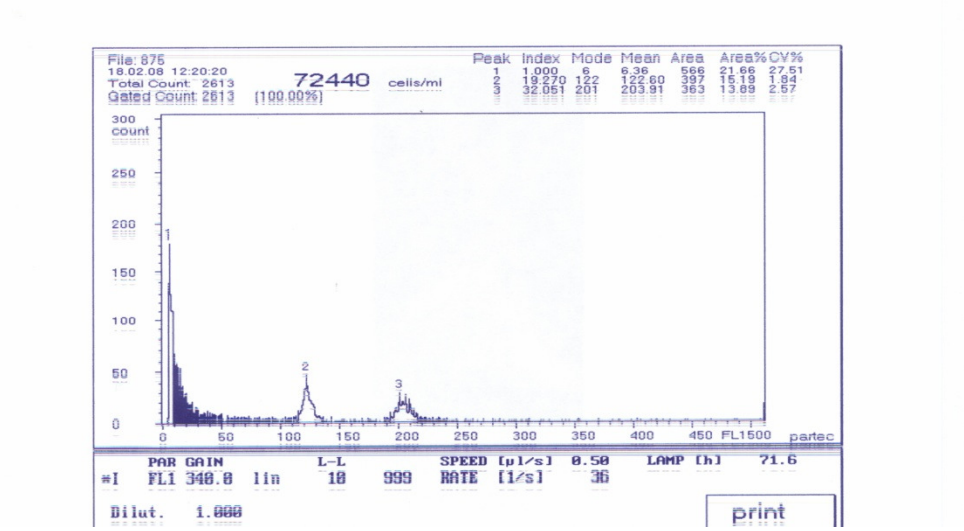
در ژنوتیپ تتراپلوئید غیر بومی(شکل ۷)، دو دسته چهار تایی متاسنتریک، چهار دسته چهار تایی ساب متاسنتریک و یک دسته چهار تایی ساب تلوسنتریک مشاهده گردید و فرمول کاریوتایپی آن (شکل ۸) به صورت ۱st + ۴sm + ۲m بود که در جمع ۲۸ کروموزوم شد.

ارزیابی سطوح پلوئیدی در ژنوتیپ های جمع آوری شده از مناطق بومی (استان های خراسان جنوبی، خوزستان، کهگیلویه و بویر احمد و فارس) و مناطق کشت تجاری (استان های تهران، گلستان و مازندران) ایران، نشان از تنوع سطوح پلوئیدی در بین آن ها دارد و می توان آن ها را در سه گروه قرار داد؛ به طوری که ژنوتیپ های مسکینک بهبهان و اهواز در گروه دیپلوئید، دیگر ژنوتیپ های بومی و سه ژنوتیپ نرگس های هلندی گل زرد در گروه تریپلوئید واقع شدند. تنها یکی از نرگس های هلندی با گل کرم رنگ معروف به نرگس سفید، تتراپلوئید بود. اطلاعات به دست آمده از این بررسی می تواند در پروژه های مختلف ارزیابی گونه های نرگس به کار رود. همچنان که در نرگس (برت و همکاران[1]، ۲۰۰۴)، کوکب (گت و همکاران[2]، ۱۹۹۹) و درمنه معمولی (ظریفی و همکاران، ۱۳۸۵) نیز انجام شده است. نتایج همچنین نشان داد که بین ژنوتیپ ها از نظر سیتوژنتیکی اختلاف زیادی وجود دارد. ژنوتیپ های هلندی در مقایسه با ژنوتیپ های بومی کشورمان دارای ساختار کروموزومی متفاوتی بودند که نشان دهنده فاصله ژنتیکی قابل ملاحظه ای در بین آن هاست؛ ولی از نظر سطح پلوئیدی با اکثر ژنوتیپ های بومی مشابه اند و این برای به نژاد گر منبع اطلاعاتی مهمی محسوب می شود.

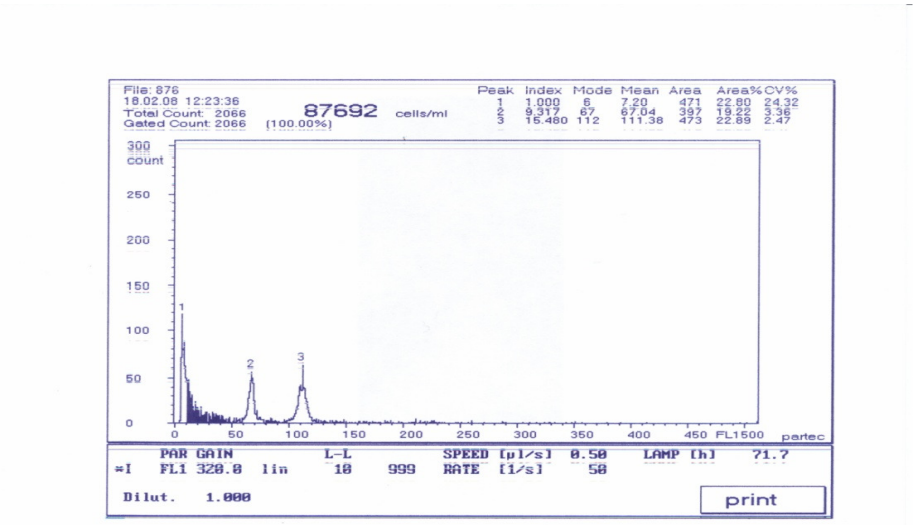
تعداد کروموزوم پایه در تعیین موقعیت سیستماتیک یک تاکسون در سطوح طبقه بندی از اهمیت خاصی برخوردار است (راون[3]، ۱۹۷۵). ارزیابی تشکیل بذر نیز در بین ژنوتیپ ها صورت گرفت و نشان داد که ژنوتیپ های مسکینک بهبهان و اهواز بذر تولید کردند (شکل ۹)؛ در حالی که بقیه ژنوتیپ ها تشکیل بذر ندادند. ژنوتیپ های مذکور که دیپلوئید می باشند از نظر اندازه کروموزوم نسبت به بقیه، دارای کروموزوم های کوچک تر می باشند و از نظر صفات مرفولوژیکی مثل اندازه و وزن

1- Barrett *et al.*
2- Gatt *et al.*
3- Raven

سوخ (شکل ۱۰)، تعداد و سطح برگ، طول شاخه گل دهنده و قطر تاج گل کمترین اندازه ها را داشتند (شکل های۱۱ الی ۱۵). در آزمایش مولکولی با نشانگر های RAPD توسط چهرازی و همکاران (۱۳۸۶) نیز این دو ژنوتیپ در یک گروه قرار گرفتند.



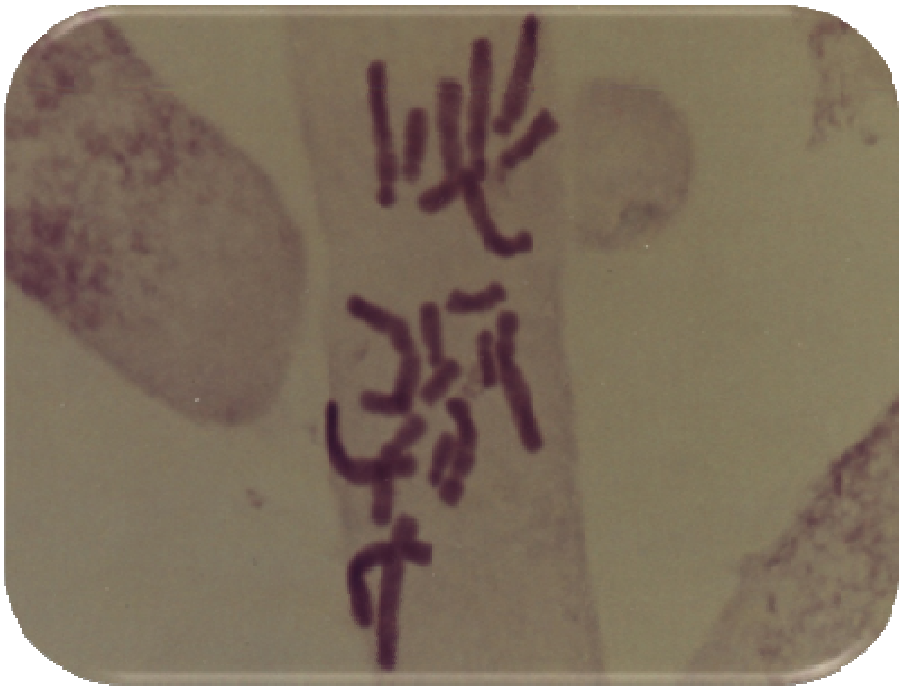
شکل۳- منحنی حاصل از گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئید



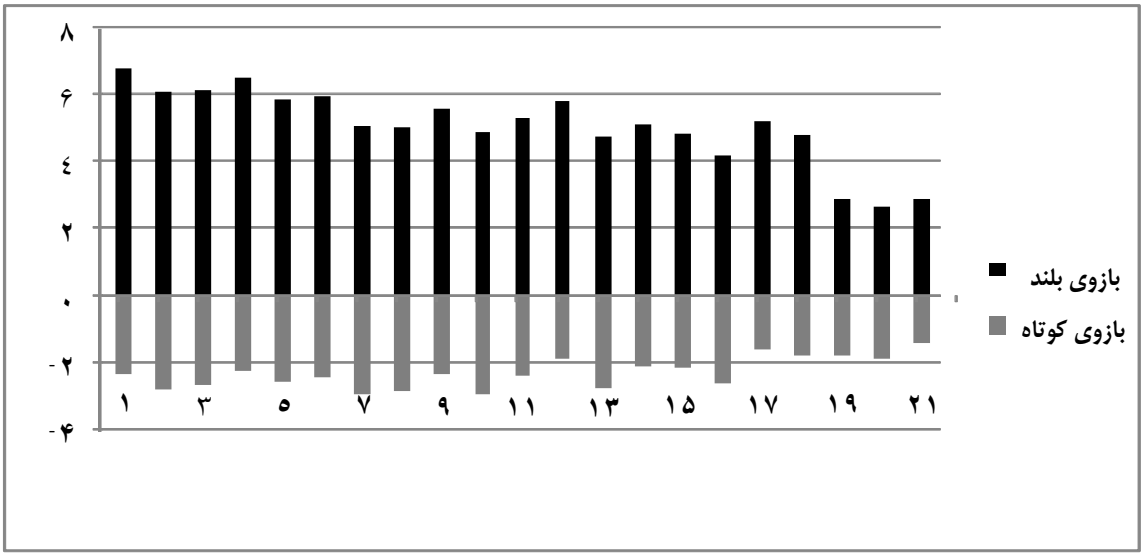
شکل ۴- منحنی حاصل از گیاهان تریپلوئید در مقایسه با دیپلوئید

جدول ۲- شکل های مختلف کروموزوم ها در ژنوتیپ های گل نرگس بر اساس پیشنهاد لوان و همکاران

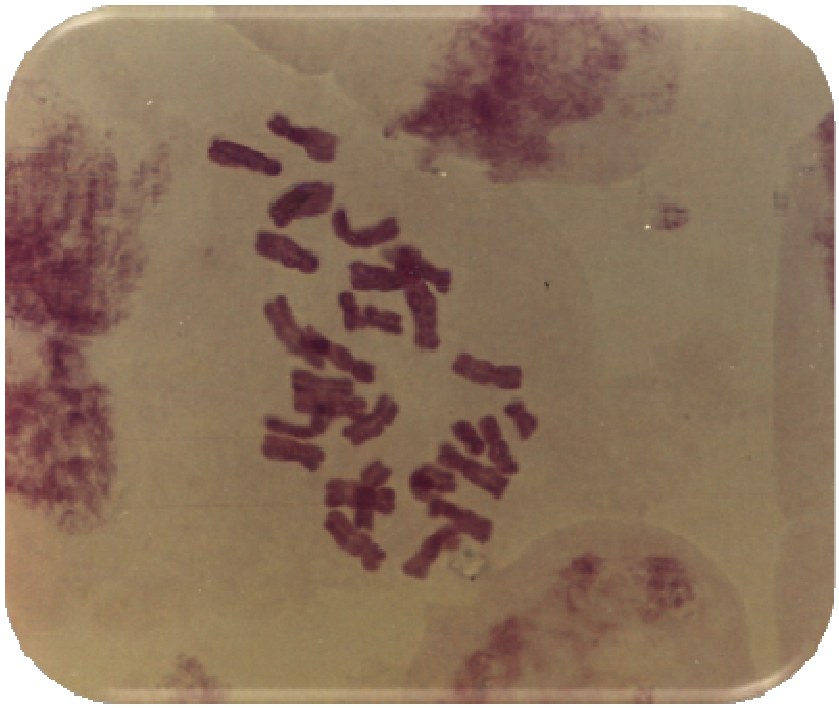
ژنوتیپ شکل کروموزوم	دیپلوئید (دسته کروموزوم دو تایی)	تریپلوئید (دسته کروموزوم سه تایی)	تریپلوئید (دسته کروموزوم سه تایی)	تتراپلوئید (دسته کروموزوم چهار تایی)
متاسنتریک	۴	۷	۱	۲
ساب متاسنتریک	۵	۳	۵	۴
ساب تلوسنتریک	۱	۰	۱	۱
جمع تعداد کروموزوم	۲۰	۳۰	۲۱	۲۸



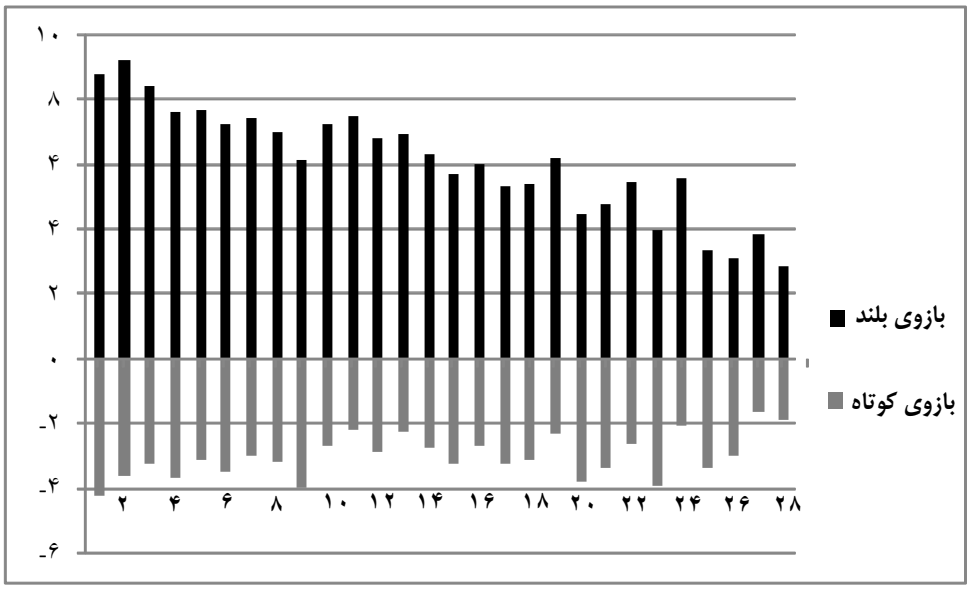
شکل ۵- کاریوتایپ گل نرگس ژنوتیپ های هلندی (تریپلوئید)



شکل ۶- ایدیوگرام (میکرون) گل نرگس ژنوتیپ های هلندی (تریپلوئید)



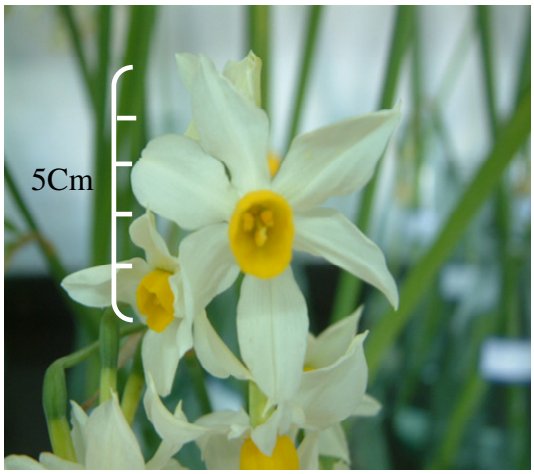
شکل ۷- کاریوتایپ گل نرگس ژنوتیپ های هلندی (تتراپلوئید)



شکل ۸- ایدیوگرام (میکرون) گل نرگس ژنوتیپ های هلندی (تتراپلوئید)

شکل ۹- میوه و بذرگل نرگس مسکینک

شکل ۱۰- اندازه سوخ، سمت راست: سوخ گل نرگس شهلا، سمت چپ: سوخ نرگس مسکینک

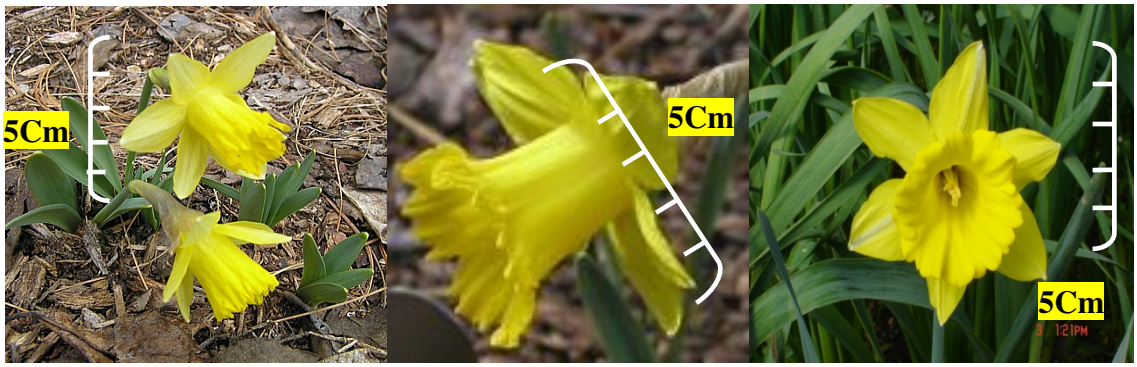


شکل ۱۱- نرگس مسکینک (دیپلوئید)

شکل ۱۳- نرگس شهلا (تریپلوئید)

شکل ۱۲- نرگس پرپر (تریپلوئید)

شکل ۱۴- نرگس هلندی گل سفید (تتراپلوئید)



شکل ۱۵- سه ژنوتیپ نرگس هلندی (تریپلوئید)

در گیاهان دیگر مانند گل سوسن (باربا گنزالز و همکاران، ۲۰۰۴)، ریحان (امیدبیگی و همکاران[1]، ۲۰۱۰)، بادرشبی (امیدبیگی و همکاران، ۲۰۱۰) و هپاتیکا گیاهی از خانواده آلاله (زونولد[2]، ۲۰۱۰) نیز با بالا رفتن سطوح پلوئیدی، بزرگ شدن اجزاء گیاه مشاهده شده است. از آن جایی که گیاهان تریپلوئید عقیم هستند تکثیر آن ها از طریق غیر جنسی صورت می گیرد که در نرگس تکثیر از طریق سوخ انجام می شود، به نژادگر با دو برابر کردن تعداد کروموزوم ها قادر است گیاهان بارور آمفی پلوئید تولید کند و با تلاقی بین آن ها هیبریدهای جدید به وجود آورد. اطلاعات به دست آمده می تواند امکان روش های جدید را جهت تولید گیاهان زراعی جدید ایجاد کند. سطوح پلوئیدی و مطالعات سیتوژنتیکی مثل اندازه و شکل کروموزوم ها می تواند در تلاقی های بین و درون گونه ای کاربرد داشته باشد (دی هرتو و لی نارد[3]، ۲۰۰۵) و در تغییر دیپلوئید ها به سطوح بالاتر احتمال امکان آن را فراهم کند.

ژنوتیپ های هلندی به عنوان ارقام تجاری از گونه *N.pseudonarcissus* هستند و ژنوتیپ های بومی از گونه *N. tazetta* می باشند (رشینگر[4]، ۱۹۷۰).

گونه های بومی که به طور خودرو در طبیعت می رویند، می توانند در تأمین ژن های لازم برای ایجاد صفات مطلوب از نظر مقاومت به شرایط محیطی و آفات نقش مهمی داشته باشند. همچنین از نظر کیفی مثلاً عطر که در ژنوتیپ های بومی وجود دارد برای به نژادگر منابع ژنتیکی ارزشمندی هستند. دی هرتو و لی نارد (۱۹۹۸) بیان کردند که در گل نرگس امکان مطلوبی برای اصلاح از طریق تلاقی بین گونه ای به صورت مطلوبی وجود دارد. هیبریداسیون بین گونه ای برای توسعه ارقام جدید نقش مهمی داشته و به طور مداوم انجام می شود. ارزیابی سطوح پلوئیدی در گل نرگس با اندازه، ساختار، نوع کروموزوم و محل سانترومر می تواند اطلاعاتی را برای به نژادگر فراهم آورد که نشان دهد، نحوه تکامل گیاه نرگس در رویشگاه های کشور ایران به چه صورت بوده و تفاوت آن ها با توده های خارجی چگونه می باشد؛ بنابراین بررسی تعداد و مرفولوژی کروموزوم ها و سطح پلوئیدی به عنوان مدرکی برای تلاقی های بین گونه ای و هیبریدهای سوماتیکی حاصل از ادغام سلولی به کار می رود. ژنوتیپ های بومی اکثراً تریپلوئید بوده و با نظریه فرناندز (۱۹۴۲)، وب (۱۹۸۰) و فرهمند و خوشخوی (۲۰۰۷) مطابقت دارد و با توجه به وجود دو ژنوتیپ دیپلوئید، تنوع در سطح پلوئیدی به خوبی مشهود می باشد؛ علاوه بر آن بین ساختار واندازه کروموزوم ها نیز تفاوت هایی دیده شد. تنها کروموزوم های دو ژنوتیپ مسکینک بهبهان و مسکینک اهواز از هر نظر به هم شبیه بودند. در بین ژنوتیپ های بومی که تریپلوئید می باشند، تنوع مشاهده شده در اندازه کروموزوم ها قادر است بین پرپرها ،شهلاها و مسکینک کازرون به راحتی آن ها را در سه گروه قرار دهد. کرامر[5](۱۹۹۹)، تعیین سطح پلوئیدی را یک عمل ضروری در ژنتیک و اصلاح گیاهان بیان نموده و معتقد است که اختلافات مرفولوژیکی میکروسکپی بین دو فرم پلوئیدی، تشخیص آن ها را از هم بسیار ساده می کند.

1- Omidbaigi *et al.*
2- Zonneveld
3- De Hertogh & Le Nard
4- Rechinger
5- Cramer

منابع

۱. چهرازی، م.، نادری، ر.، شاه نجات بوشهری ع. ا. و حسنی، م. ا. ۱۳۸۶. بررسی تنوع ژنتیکی گل های نرگس (*Narcissus sp.*) بومی و غیر بومی با استفاده از نشانگرهای RAPD . مجله علوم و فنون باغبانی ایران. ۸ (۴): ۲۳۶- ۲۲۵

۲. ظریفی، ع.، آقایوف، ی.، قنواتی، ف. و امینی زاده، ز. ۱۳۸۵. سیتوژنتیک و تکامل کاریوتایپ در گیاه درمنه معمولی *Artemisia vulgaris L.* نهال و بذر، ۲۲ : ۱-۱۳.

۳. مامقانی، ر. ۱۳۷۳. دورگه گیری در گیاهان زراعی. جلد اول: کلیات و غلات. ترجمه. انتشارات دانشگاه شهید چمران (اهواز). ۵۰۸ ص.

4. Barba-Gonzalez, R., Lokker, A.C., Lim, K.B., Ramanna, M.S., and Van Tuyl, J.M. 2004. Use of 2*n* gametes for the production of sexual polyploids from sterile Oriental × Asiatic hybrids of lilies (*Lilium*). Theor. Appl. Genet, 109: 1125–1132.

5. Barba-Gonzalez, R., Lim, K.B., Ramanna, M.S., Visser, R.G.F., and Van Tuyl. J.M. 2005. Occurrence of *2n* gametes in the F1 hybrids of Oriental × Asiatic lilies (*Lilium*): relevance to intergenomic recombination and backcrossing. Euphy, 143: 67–73.

6. Barba-Gonzalez, R., Ramanna, M.S., Van Tuyl. J.M., and Visser, R.G.F. 2005. Intergenomic recombination in F1 lily hybrids (*Lilium*) and its significance for genetic variation in the BC1 progenies as revealed by GISH and FISH. Genome, 48: 884–894.

7. Barrett, S.C.H., Cole, W.W., and Herrera, C.M. 2004. Mating patterns and genetic diversity in the wild daffodil *Narcissus longispathus* (Amaryllidaceae). Heredity, 92: 459-465.

8. Bauchan, G.R., and Hossain. M.A. 1998. Karyotypic analysis of N-banded chromosomes of diploid alfalfa: Medicago sativus spp. Caerulea and Palcata and their hybrid. Journal of Heredity, 98: 191-193.

9. Blanchard, J.W. 1990. *Narcissus*: a guide to wild daffodils. Alpine Garden Society. Surrey. UK.

10. Brandham, P.E. 1986. Evolution of polyploidy in cultivated *Narcissus* subgenus *Narcissus*. Genet, 68: 161–167.

11. Chen, L.J., Xue, Y.Z., Li, G., and Jian. W. 2005. Efficient callus induction and plant regeneration from anther of Chinese narcissus (*Narcissus tazetta* L. var. Chinensis Roem). Plant Cell Rep., 24: 401-407.

12. Cramer, C.S. 1999. Laboratory Techniques for Determining Ploidy in Plants. New Mexico State University. Las Cruces.

13. Darlington, C.D., and Wylie, A.P. 1961. Chromosome Atlas of Flowering Plants. George Allen and Unwin LTD London UK., 519 p.

14. De Hertogh, A., and LeNard, M. 1998. The physiology of flower Bulbs. North Carollina. U.S.A.

15. Dolezel, J., and J. Bartoz. 2005. Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. Annals of Botany, 95:99-110.

16. Farahmand, H., and Khosh-Khui, M. 2007. Micropropagation of Fars endemic *Narcissus* populations. Shiraz University. Ph.D. Thesis. 156p.

17. Fernandes, A. 1942. Summary of work on cytology of *Narcissus tazetta* L. *Herbertia* , 9: 126-133.

18. Gatt, M., Hammett, K., and Mui-iay, B. 1999. Confirmation of ancient polyploidy in *Dahlia* (Asteraceae) species using genonlic in situ hybridization. Annals of Botany, 84: 39-48.

19. Ge, Lili,. Wu, Jian. Chen, Linjiao. Wang, Rui., and Tian, Huiqiao. 2005. Embryological Studies on *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. Natural Science, 44 (1).

20. Graham, S.W., and Barrett, S.C.H. 2004. Phylogenetic Reconstruction of the Evolotion of Stylar Polymorphisms in *Narcissus* (Amaryllidaceae). Am. J. Botany, 91(7): 1007–1021.

21. Jefferson-brown, M. 1991. *Narcissus*. Timber Press, Portland, Oregon, USA.

22. Karihaloo, J.L. 1987. Variation in the karyotype of three cultivar of *Narcissus tazetta* L. (Amaryllidaceae). Genetica, 73: 217-221.

23. Levan, A., Fredga, K., and Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52: 201-220.

24. Omidbaigi, R., Mirzaei M., Hasani, M.E., Sedighi Moghadam, M. 2010. Induction and Identification of Polyploidy in basil (*Ocimum basilicum*L.), medicinal plant by colchicines treatment. International journal of plant production; 4(2): 87-98.

25. Omidbaigi, R., Yavari, S., Hassani, M.E., Yavari, S. 2010. Induction of autotetraploidy in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatment, Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18(1): 25-35.

26. Ramanna, M.S., and Jacobsen, E. 2003. Relevance of sexual polyploidization for crop improvement - a review. Euphy, 133: 3–18.

27. Raven, P.H. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: cytology. Ann. Missouri Bot. Gard, 62: 724-764.

28. Rechinger, K.H. 1970. Flora Iranica. Amaryllidaceae, 67:323-330.

29. Webb, D.A. 1980. *Narcissus*. In: Flora Europea, (eds.). T.G. Tutin., V.H.

Heywood, N. A. Burges, D. M. Moore, D. H. Valentine, S.M. Walters and D.A. Webb. Cambridge University Press, Camridge, UK. 78-84.

30. Zhu, X.W., Xu, J.L., and Yang, G.R. 1986. Karyotype studies of Narcissus tazetta var. chinensis. Journal Wuhan Bot. Research, 4:119-122.

31. Zonneveld, B.J.M. 2010. Genome Sizes in *Hepatica* sp. Mill., (Ranunculaceae) Show a Loss of DNA, Not a Gain, in Polyploidy, Journal of Botany. ID 758269