मोरस एसपीपी के साइटोटाइप्स.

Cytotypes of *Morus* spp.

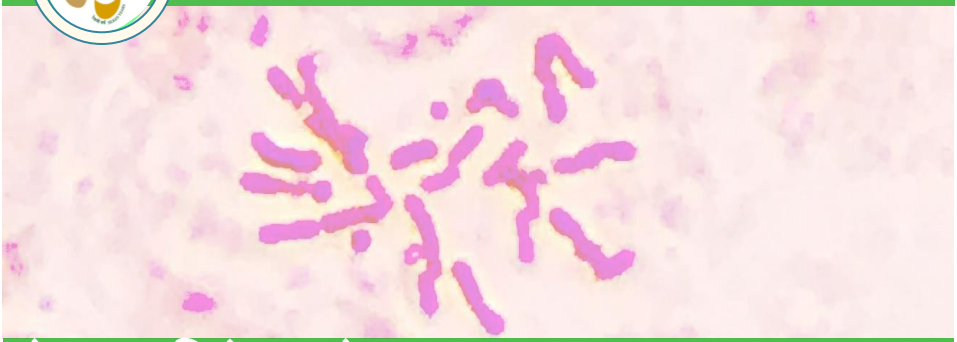
केरेबो - केन्द्रीय रेशम जननद्रव्य संसाधन केन्द्र
केन्द्रीय रेशम बोर्ड, वस्त्र मंत्रालय, भारत सरकार
पी.बी.नः44,थली रोड, होसूर-635 109 कृष्णगिरि जिला, तमिलनाडु।
CSB-Central Sericultural Germplasm Resources Centre
Central Silk Board, Ministry of Textiles, Govt. of India
Hosur, Tamil Nadu-635109

द्वारा संपादित / Edited by
राजू मंडल, वैज्ञानिक-सी/ Raju Mondal, Scientist-C
डॉ. एन. शक्तिवेल, वैज्ञानिक-डी/ Dr. N. Sakthivel, Scientist-D
डॉ. वी. निशिता नाइक, निदेशक, केरेजसंके/ Dr. V. Nishitha Naik, Director

राजू मंडल, वैज्ञानिक-सी
द्वारा संकलित
Compiled by
Raju Mondal, Scientist-C

डॉ. वी. निशिता नाइक, निदेशक, केरेजसंके द्वारा प्रकाशित
Published by
Dr. V. Nishitha Naik, Director, CSGRC

सितम्बर 2024 / September 2024

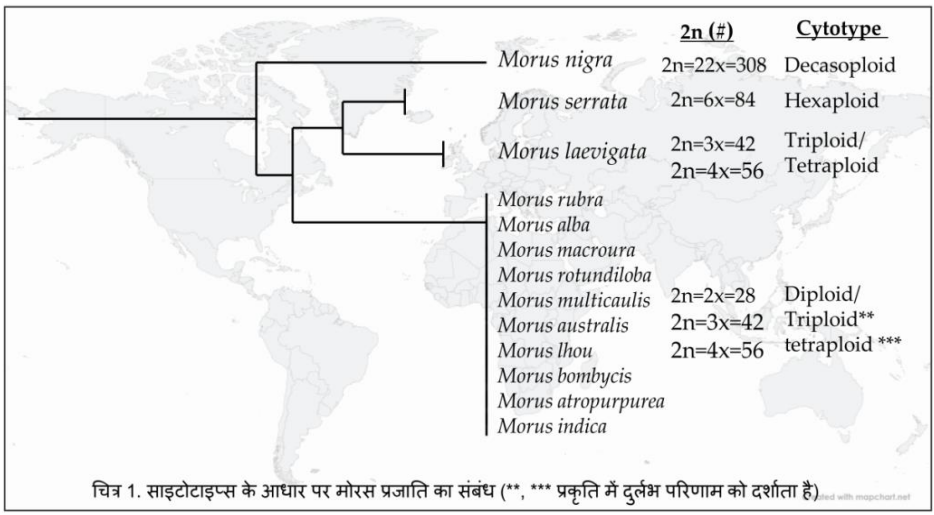


मोरस प्रजाति के साइटोटाइप्स

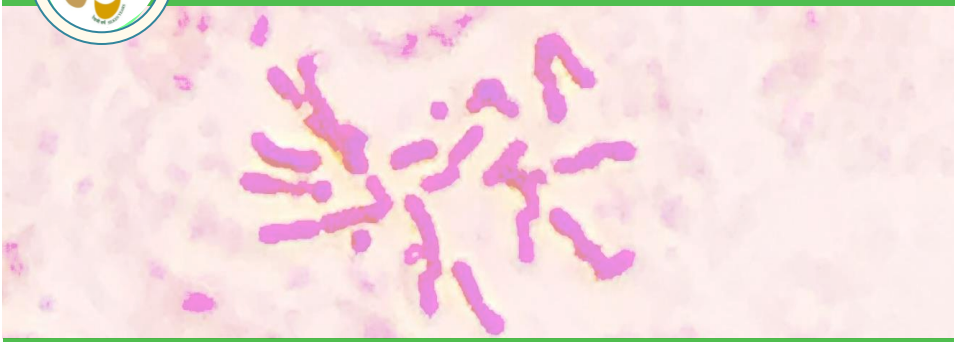
साइटोटाइप पहचान पौधे के कोशिकानुवंशिकी के साथ-साथ प्रजनन का भी मूलभूत पहलू है, क्योंकि गुणसूत्रों की संख्या, आकार और आकृति में परिवर्तन पौधे के शरीरक्रिया विज्ञान/प्रदर्शन पर प्रभाव डालते हैं।

प्रजातिकरण पर बहुगुणीकरण का प्रभाव

साइटोटाइप भिन्नता अर्थात डिप्लोइड,, (2n=2x=28), ट्राइप्लोइड (2n=3x=42), टेट्राप्लोइड (2n=4x=56) हेक्साप्लोइड (2n=6x=84) तथा डेकासोप्लोइड (2n=22x=308) मोरस प्रजाति की आठ प्रजातियों से संबंधित हैं (**चित्र 1**)।



चित्र 1. साइटोटाइप्स के आधार पर मोरस प्रजाति का संबंध (**, *** प्रकृति में दुर्लभ परिणाम को दर्शाता है)



Cytotypes of *Morus* spp.

Cytotype is the fundamental aspect of plant cytogenetics as well as in breeding, as changes in the number, size, and shape of chromosomes act on plant physiology/performance.

Impact of Polyploidization on Speciation

Cytotype variation *viz*. diploid, (2n=2x=28), triploid (2n=3x=42), tetraploid (2n=4x=56), hexaploid (2n=6x=84) and decasoploid (2n=22x=308) belong to different species of *Morus* (**Fig 1**).

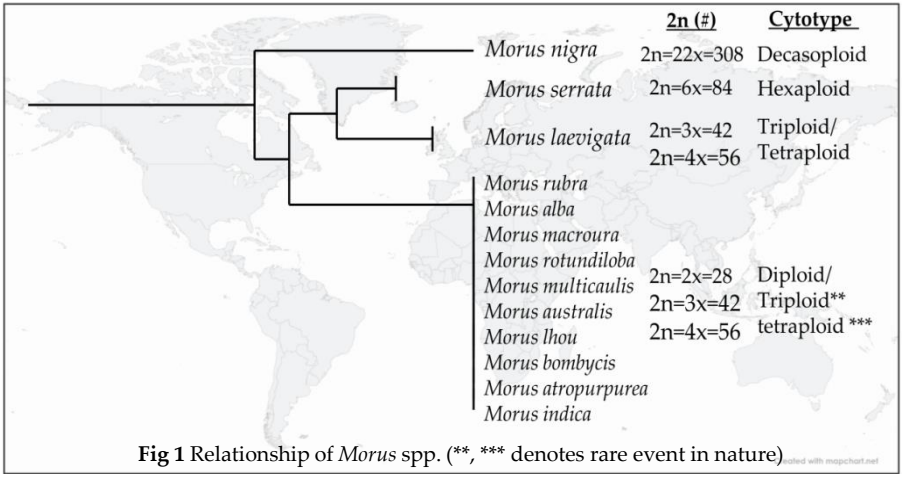
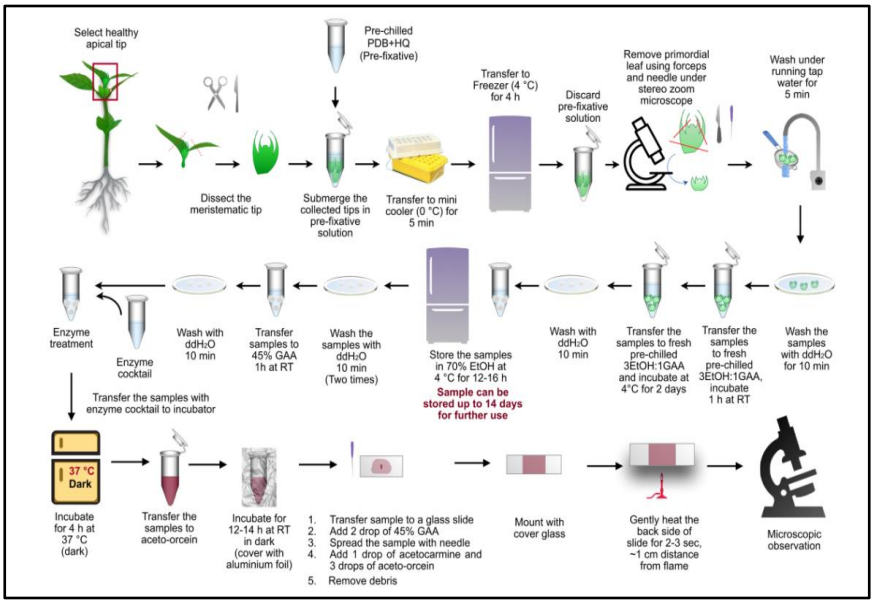


Fig 1 Relationship of *Morus* spp. (**, *** denotes rare event in nature)

प्रोटोकॉल

- ✓ 1.5 एमएल एपेंडॉर्फ ट्यूब में 20 µl मुख्यालय के साथ संतृप्त पीडीबी के 1 मिलीलीटर में 3-5 एपिकल शूट मेरिस्टेमेटिक टिप (0.5-1 सेमी) का अलगाव।
- ✓ प्ररोह शीर्ष युक्त एपेन्ड्रोफ ट्यूबों को तत्काल 5 मिनट के लिए 0 ºC मिनी कूलर में स्थानांतरित करें, तत्पश्चात 3-4 घंटे के लिए 4 ºC पर इन्क्यूबेशन करें।
- ✓ स्टीरियो ज़ूम माइक्रोस्कोप के तहत नुकीली चिमटी और सुई की मदद से आदिम पत्ती को हटाने के लिए वॉच ग्लास में पूर्व उपचारित शूट मेरिस्टेम का संग्रह (**चित्र 2**)।
- ✓ बहते नल के पानी के नीचे 5 मिनट तक धोएं, तत्पश्चात ddH2O से 10 मिनट तक धोएं। कटे हुए छोटे आकार के मेरिस्टेम को बर्फ के ठंडे 3EtOH:1GAA पर 1 घंटे तक रखें।
- ✓ नमूनों को 2 दिनों के लिए 4 ºC पर ताजा तैयार 3EtOH:1GAA में स्थानांतरित करें।
- ✓ नमूनों को 70% EtOH में 4 °C पर 12-16 घंटे तक स्टोर करें (नमूनों को आगे उपयोग के लिए 14 दिनों तक स्टोर किया जा सकता है)।
- ✓ नमूनों को 1 घंटे के लिए आर.टी. पर 45% जी.ए.ए. में स्थानांतरित करें। 10 मिनट के लिए डी.डी.एच.2.ओ. से धोएँ। नमूनों को एंजाइम कॉकटेल में स्थानांतरित करें और 37°C पर 4 घंटे के लिए इनक्यूबेट करें।
- ✓ नमूनों को अंधेरे में 12-14 घंटे के लिए 1% ओर्सीन दाग में स्थानांतरित करें। नमूने को एक ग्लास स्लाइड में स्थानांतरित करें।
- ✓ 45% GAA की दो बूँद डालें। नमूने को सुई से फैलाएँ और एसिटोकारमाइन की एक और एसिटोओर्सीन की तीन बूँद डालें। मलबा हटाए। कवर ग्लास के साथ माउंट करें. स्लाइड के पिछले हिस्से को आंच से ~1 सेमी की दूरी पर 2-3 सेकंड के लिए धीरे से गर्म करें।



चित्र 2. मेटाफ़ेज़ गुणसूत्र अध्ययन के लिए विस्तृत चरण (स्रोत डीओआई: DOI: 10.21769/BioProtoc.4643)।

Protocol

- ✓ Isolation of 3-5 apical shoot meristematic tips (0.5-1 cm) in 1 ml of saturated PDB with 20 µl of HQ in a 1.5 mL Eppendrof tube.
- ✓ Immediate transfer of the Eppendrof tubes containing shoot tips to a 0°C mini cooler for 5 min, followed by incubation at 4°C for 3-4 h.
- ✓ Collection of pretreated shoot meristems in a watch glass to remove primordial leaf with the help of a pointed forceps and needle under microscope (**Fig 2**).
- ✓ Wash under running tap water for 5 min followed by ddH_2O for 10 min Incubate the meristems on ice cold 3EtOH:1GAA for 1 h.
- ✓ Transfer samples to freshly prepared 3EtOH:1GAA at 4°C for 2 days.
- ✓ Store samples in 70% EtOH at 4 °C for 12-16 h.
- ✓ Transfer samples to 45% GAA for 1h at RT. Wash with ddH_2O for 10 min. Transfer samples to enzyme cocktail and incubate for 4 h at 37 °C.
- ✓ Transfer the samples to 1% orcein stain for 12-14 h at RT in dark.
- ✓ Transfer the sample to a glass slide. Add two drops of 45% GAA. Spread the sample with needle and add one drop of acetocarmine and three drops of aceto orcein. Mount with cover glass and heat the back side of slide for 2-3 sec, ~1 cm distance from flame.

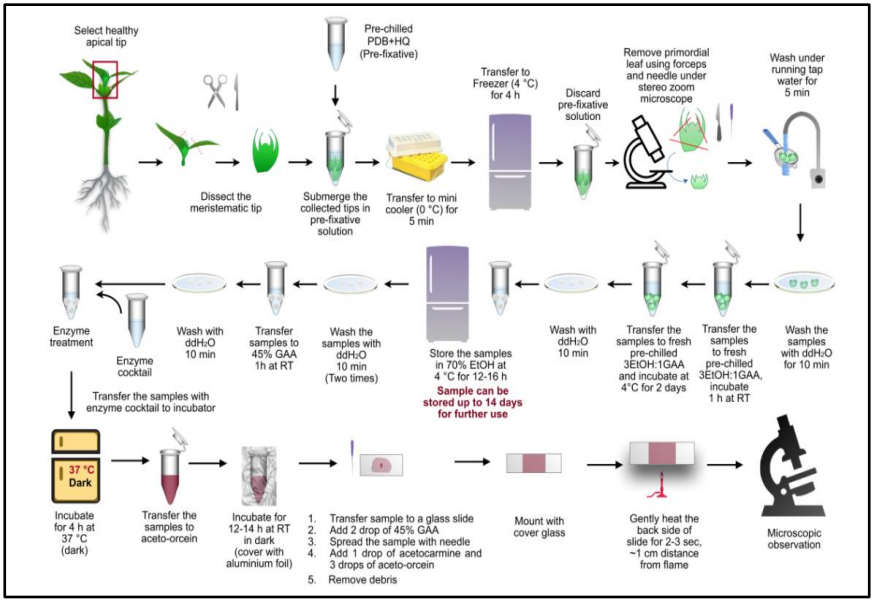
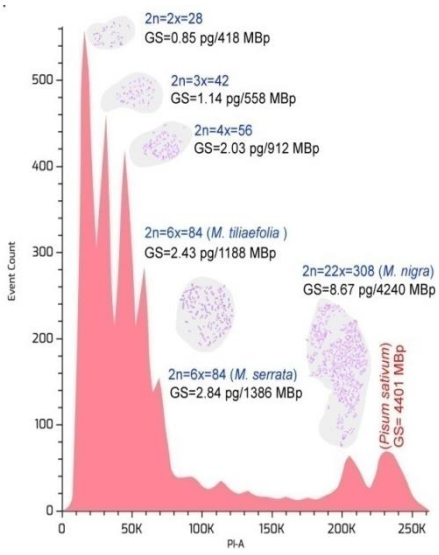


Fig 2. Detailed steps for metaphase chromosome study (Source DOI: 10.21769/BioProtoc.4643).

परिणाम

- कुल 200 अभिगमों के लिए मेटाफ़ेज़ गुणसूत्र संख्या की गणना की गई।
- साइटोटाइप परिवर्तन - डिप्लोइड, (2n=2x=28), ट्राइप्लोइड (2n=3x=42), टेट्राप्लोइड (2n=4x=56) हेक्साप्लोइड (2n=6x=84) और डेकासोप्लोइड (2n=22x=308) प्रजातियों के स्तर पर पहचाने गए।
- डेकासोप्लोइड एक दुर्लभ परिणाम है, जो केवल एम. निग्रा में ही पहचानी जाती है।
- साइटोटाइप्स का मान्यकरण फ्लो साइटोमेट्री (FCM) विश्लेषण का उपयोग करके किया जाता है (**चित्र 3**)।
- साइटोटाइप जानकारी का उपयोग करते हुए आगे का अध्ययन शुरू किया गया है पीआईजी 06010SIC)। विशेष रूप से पॉलीप्लॉइड-प्रेरित विशेषता की पहचान करने के लिए।



चित्र 3. फ्लो साइटोमेट्री विश्लेषण का उपयोग करके साइटोटाइप का सत्यापन (स्रोत डीओआई: DOI: 10.21769/BioProtoc.4643)। GS, जीनोम आकार; x= मूल गुणसूत्र संख्या; MBp, मेगाबेस जोड़ी.

भविष्य

- वर्तमान शोध परिणाम भविष्य के प्रजनन के लिए उपयोगी हो सकते हैं
- पॉलीप्लॉइड का संरक्षण
- उत्पन्न की गई जानकारी शहतूत पॉलीप्लॉइड के कार्यात्मक नेटवर्क विश्लेषण उत्पन्न करने के लिए उपयोगी हो सकती है।

अभिस्वीकृति : लेखक केन्द्रीय रेशम बोर्ड, MoT, भारत सरकार द्वारा वित्त पोषित परियोजनाओं पीआईजी 06004एसआई और पीआईजी 06010एसआईसी के लिए आभारी हैं।

Outcome

- Metaphase chromosome number counted for a total of 200 accessions.
- Cytotype variation -diploid, (2n=2x=28), triploid (2n=3x=42), tetraploid (2n=4x=56) hexaploid (2n=6x=84) and decasoploid (2n=22x=308) identified across species level.
- Decasoploid is a rear event, only identified in *M. nigra*.
- Cytotypes are validated using flow cytometry (FCM) analysis (**Fig 3**).
- Further study has initiated under the project PIG06010SIC to identify polyploid-induced attribute.

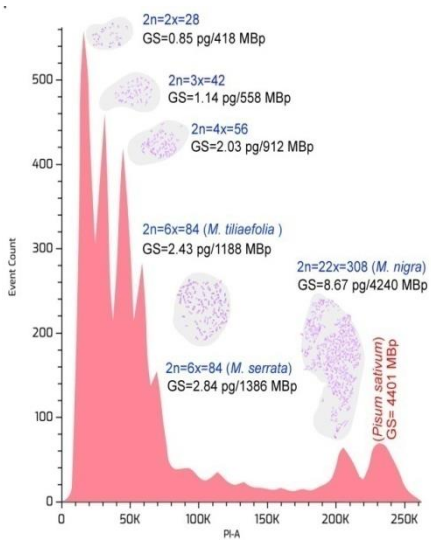


Fig 3. Validated of cytotypes using flow cytometry analysis (Source DOI: 10.21769/BioProtoc.4643). GS, genome size; x= basic chromosome number; MBp, Megabase pair.

Future use

- Present research outcome can be useful for future breeding
- Conservation of polyploid
- Generated information can be useful to generate functional network analysis of mulberry polyploid.

Acknowledgement: Authors are thanks for the Central Silk Board, MoT, GoI funded projects PIG06004SI and PIG06010SIC.

केरेबो - केन्द्रीय रेशम जननद्रव्य संसाधन केन्द्र
केन्द्रीय रेशम बोर्ड, वस्त्र मंत्रालय, भारत सरकार
पी.बी.नः44,थली रोड, होसूर-635 109 कृष्णगिरि जिला, तमिलनाडु।

CSB-Central Sericultural Germplasm Resources Centre
Central Silk Board, Ministry of Textiles, Govt. of India
Hosur, Tamil Nadu-635109