

اثرات القاء پلی‌پلوئیدی توسط کلشی‌سین بر صفات مورفولوژیکی پایه ترویر سیترنج (*Citrus sinensis* cv. Troyer citrange)

مهدی غفاری^۱، ایرج توسلیان^{۲*} و مسعود خضری^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲- نویسنده مسئول: استادیار، پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان (itavasoli@uk.ac.ir)
۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۱۶

چکیده

مرکبات از پر مصرف‌ترین و مفیدترین میوه‌ها به شمار می‌آیند و تکثیر آن‌ها بیشتر از طریق پیوند بر روی پایه‌های مناسب مانند ترویر سیترنج انجام می‌گیرد. در درختان میوه القاء پلی‌پلوئیدی سبب تولید گیاهان پاکوتاه‌تر با برگ‌ها و ساقه ضخیم‌تر و مستحکم‌تر شده و نهایتاً سبب افزایش عملکرد پیوندک می‌شود. هدف از انجام این پژوهش بررسی القاء پلی‌پلوئیدی در پایه پاکوتاه‌کننده ترویر سیترنج توسط تیمار کلشی‌سین و بررسی تغییرات مورفولوژیکی حاصل از آن بوده است. این آزمایش به صورت طرح کامل تصادفی دو مشاهده ای با ۴ تکرار و سه غلظت انجام شد. سطوح تیماری شامل کلشی‌سین با غلظت ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد و تیمار شاهد (۰) بود. اعمال تیمارها در دو مرحله صورت گرفت: در مرحله اول غوطه‌وری نیمی از بذور در سطوح مختلف تیمارها به مدت ۳۰ ساعت و مرحله بعد تیمار گیاهچه‌ها در مرحله چهارم برگ‌ها با استفاده از سمپلر بر روی مرستم جوانه انتهایی در سه روز متوالی انجام گرفت. نتایج بررسی گیاهچه‌های تیمار شده بیانگر افزایش طول و عرض روزنه‌ها، افزایش اندازه سلول‌های محافظ روزنه، افزایش اندازه کیسه‌های ترش‌حی بود. ولی کاهش تراکم روزنه‌ها و کیسه‌های ترش‌حی به همراه بروز برخی صفات ظاهری مانند افزایش ضخامت و میزان رنگ برگ‌ها و کاهش ارتفاع گیاهچه‌ها در نمونه‌های تیمار شده بود. هم‌چنین وجود برخی ناهنجاری‌های جزئی در برگ گیاهچه‌های تیمار شده مثل عدم تقارن، عدم وجود برگچه‌های جانبی و وجود برگچه‌های دندان‌دار مشهود بود. تیمار یک درصد کلشی‌سین موثرترین تیمار در القاء پلی‌پلوئیدی بود.

کلید واژه‌ها: پلی‌پلوئیدی، پایه ترویر سیترنج، کلشی‌سین، روزنه‌ها، کیسه‌های ترش‌حی برگ.

مقدمه

شناسایی شده است (Hollister, 2014). پلی‌پلوئیدی، گسترده‌ترین فرآیند سلولی است که تکامل گیاهی را تحت تأثیر قرار داده و سبب ایجاد گونه‌های جدید و تطبیق‌پذیر می‌شود (Levin, 2002). نشان داده شده که گیاهان که تتراپلوئید شده‌اند نسبت به گیاهان طبیعی دیپلوئید در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی بخصوص گرما مقاوم‌تر بوده‌اند (Zhang et al., 2010). پلی‌پلوئیدی بخصوص در گیاهانی که از بخش‌های

به‌نژادی گیاهی فرصتی را برای سازگاری ارقام مختلف به‌منظور رفع نیازمندی‌های خاص مصرف‌کنندگان در چرخه تولید ایجاد نموده و نقش عمده‌ای در تولید محصولات باکیفیت بالا، مناسب و پایدار دارد. یکی از برجسته‌ترین اکتشافات علم ژنتیک شناخت دو برابر شدن ژنوم طی فرآیند تکامل گونه‌هاست. تقریباً یک یا چند بار دو برابر شدن کروموزوم‌ها در همه گونه‌های مهم زیستی

برخی ویژگی‌های آناتومیکی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی گیاه لیموترش مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه تعداد روزنه‌ها و کیسه‌های ترش‌چی برگ نشان داد که تعداد آن‌ها در برگ گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید کاهش یافته، در حالی که اندازه روزنه‌ها و کیسه ترش‌چی در گیاهان تتراپلوئید به‌طور معنی‌داری بزرگتر بود. دو برابر شدن کروموزوم‌ها سبب افزایش ضخامت برگ، بافت مریستم نرده‌ای و اسفنجی شد. در گیاه لیموترش افزایش سطح پلوئیدی تأثیر معنی‌داری در میزان فنل و فلاونوئید کل در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید نداشت (Afshar Mohammadian et al., 2012).

در تحقیقات به عمل آمده در خصوص مقایسه پایه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید مرکبات از لحاظ صفات و ویژگی‌های مورفولوژیکی و سنجش میزان رشد، شاخص‌هایی مثل ارتفاع، طول دمبرگ، طول برگ و پهنای برگچه مرکزی مورد سنجش قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده حاکی از وجود اختلافات قابل ملاحظه در میزان شاخص‌های اندازه‌گیری شده بود. گیاهان تتراپلوئید طول دمبرگ بلندتری از گیاهان دیپلوئید داشتند. گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئیدها دارای برگ‌های پهن‌تر و ضخیم‌تری بودند. گیاهان تتراپلوئید رشد کندتر، شکل متراکم‌تر و جوانه‌زنی با شدت کمتری را نسبت به گیاهان دیپلوئید از خود نشان دادند. رشد کمتر گیاهان تتراپلوئید مربوط می‌شود به کاهش میزان تنفس آن‌ها که خود ناشی از تعداد کمتر روزنه‌ها در برگ این گیاهان است. رنگ برگ گیاهان تتراپلوئید نیز تیره‌تر از برگ گیاهان دیپلوئید بود (Guerra et al., 2014). هدف از انجام این تحقیق بررسی القاء پلی‌پلوئیدی توسط کلشی‌سین بر صفات مورفولوژیکی پایه مرکبات تروریر سیترنج بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این آزمایش در دی ماه ۲۰۱۴ در گلخانه‌های واقع در شهرستان کرمان انجام گرفت. تیمارهای کلشی‌سین با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد به همراه تیمار آب مقطر

رویشی آن‌ها استفاده می‌شود مانند پایه‌های درختان میوه بسیار ارزشمند است. موجودات با بیش از دو سری کروموزومی را پلی‌پلوئید گویند که از جدا نشدن کروموزومی غیرعادی در زمان تقسیم سلولی حاصل می‌شوند (Beck et al., 2003). هر چند که پلی‌پلوئیدی به نوبه خود به عنوان یک ناهنجاری به نظر می‌رسد ولی یکی از سریع‌ترین و گسترده‌ترین اثرات آن در گیاهان افزایش اندازه سلول و درشت‌تر شدن اجزای آن و نهایتاً افزایش بنیه گیاه می‌باشد. القاء پلی‌پلوئیدی در گیاهان اغلب موجب تولید ارقام جدید و باکیفیت متمایز می‌شود. شکست در مکانیسم کشش رشته‌های دوک در حین تقسیم سلولی سبب پلی‌پلوئیدی می‌شود که می‌تواند هم به صورت مصنوعی یا طبیعی انجام گیرد. روش دو برابر کردن کروموزوم (پلی‌پلوئیدی) با استفاده از کلشی‌سین یا اوریزالین، به‌طور وسیعی به‌عنوان یکی از ابزارهای به‌نژادی برای اغلب گیاهان مهم و اقتصادی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Pierce, 2012).

مرکبات از پرمصرف‌ترین و مفیدترین میوه‌ها هستند. در سال ۲۰۱۲ در حدود هشت میلیون هکتار سطح زیر کشت مرکبات بوده و میزان تولید آن به ۱۳۱ میلیون تن رسیده است (Anon, 2014). پایه تروریر سیترنج یکی از مهم‌ترین پایه‌های مرکبات در سطح جهانیست که از تلاقی پرتقال و نارنج سه برگ (Citrus sinensis × Poncirus trifoliata) به‌دست آمده است. این پایه پاکوتاه‌کننده بوده، سرما را تحمل می‌کند، در مقابل اغلب آفات و بیماری‌ها مقاوم است و کیفیت میوه‌های پیوند شده بر روی آن بالاست. از جمله روشهای رایج سنجش پلی‌پلوئیدی اندازه‌گیری طول و تراکم روزنه‌ها است (Beck et al., 2003). برای اثبات دو برابر شدن کروموزوم‌ها، بررسی ویژگی‌های روزنه‌ای مورد توجه قرار می‌گیرد. این ویژگی‌ها شامل اندازه روزنه، اندازه دهانه روزنه و تراکم آن‌ها می‌باشد. گیاهان دیپلوئید، روزنه‌های کوچکتری نسبت به مشتقات تتراپلوئید خود دارند. در مطالعه‌ای تأثیر پلی‌پلوئیدی بر

تیمار، برگ‌های دوم از رأس ساقه گیاه هر گلدان جدا و توسط سطح برگ‌سنج دیجیتال اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری طول و عرض برگچه میانی و طول دم‌برگ از کولیس دیجیتال استفاده گردید. به‌منظور ارزیابی میکروسکوپی ویژگی‌های روزنه شامل طول و عرض روزنه، اندازه سلول‌های محافظ، تراکم روزنه‌ها در واحد سطح، تعداد، تراکم و اندازه کیسه‌های ترش‌حی از هر سطح تیماری ۱۰ گیاه انتخاب شده و از هر گیاه یک برگ کاملاً توسعه یافته جدا شده و سپس اپیدرم فوقانی سطح پشت برگ (آداکسیال^۱) با استفاده از تکنیک نیل وارنیش (لاک ناخن) جدا شد (Hamill et al., 1992). با چرخاندن نمونه در زیر میکروسکوپ از ۵ تا ۷ قسمت آن با استفاده از دوربین دیجیتالی که به میکروسکوپ (X ۴۰ و ۱۰۰) متصل بود عکس‌برداری انجام شد تا در مراحل بعد ابعاد روزنه‌ها و سلول‌های محافظ در واحد سطح و سایر ویژگی‌های ذکر شده مورد ارزیابی قرار گیرد. پس از کاشت، تاریخ سبز شدن هر بذر یادداشت شد و با تعیین میانگین تاریخ سبز شدن بوته‌ها در گلدان، تفاوت تاریخ‌های سبز شدن ارزیابی گردید. هم‌چنین با اندازه‌گیری تعداد بذور سبز شده پس از گذشت یک ماه و مقایسه آن‌ها با تعداد بذور کشت شده در رابطه با بذرها تیمار شده و شاهد، سرعت و درصد بذور تندش یافته تعیین شد (Afshar Mohammadian et al., 2012). تأثیر تیمار کلسی سین بر میزان زنده ماندن یا مرگ و میر بذور تیمار شده قبل از تندش و یا مرگ و میر گیاهچه‌های حاصل از تندش بذور اقدام به سنجش تعداد گیاهچه‌های موجود یک ماه پس از کاشت بذر شد تا به وجود یا فقدان تأثیرات سوء بکارگیری تیمارهای فوق بر میزان تندش بذور و نیز رشد و نمو گیاهچه‌ها پی برد. سنجش صفات بیوشیمیایی مانند رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل a، b، کلروفیل کل، میزان کارتنوئیدها، فنل و فلاونوئیدها نیز انجام گردید که به دلیل معنی دار نشدن مقایسه میانگین آن‌ها از ذکر جزئیات انجام آزمایش خودداری می‌شود.

به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. میوه‌های تازه تروریر سیترنج از مرکز اصلاح و تهیه نهال مرکبات رامسر تهیه و به کرمان ارسال شد. سپس میوه‌ها کاملاً شستشو داده شده و خشک گردیدند. پس از گذشت یک روز میوه‌ها شکافته شده و بذور توسط چاقوی تمیز خارج شدند. بذور در دو مرحله شسته شده یعنی در مرحله اول گوشت آن‌ها کاملاً جدا شد، سپس با آب سرد کاملاً شسته شده و در معرض هوا خشک گردیدند. بذور مورد استفاده توسط قارچکش بنومیل ضدعفونی شدند. ابعاد گلدان‌ها جهت کاشت ۱۵×۲۰ سانتی‌متر بودند. خاک مورد استفاده در این آزمایش شامل خاک رس، ماسه، کود ورمی‌کمپوست به نسبت (۱:۱:۱) بود. ابتدا یک سوم کف گلدان با مخلوط ماسه و کود پر گردید سپس یک سوم روی آن با خاک رس و ماسه پر شد و در انتها روی آن با ماسه پوشانده شد.

القاء پلی‌پلوئیدی

کلشی سین مورد استفاده ساخت کارخانه سیگما آلمان و به‌صورت ویال‌های ۵ گرمی بود. پس از تهیه غلظت‌های کلشی سین (۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) نیمی از بذور (۹۶ عدد) به مدت ۳۰ ساعت در محلول‌ها خوابانده و سپس در گلدان‌ها کشت گردیدند. نیم دیگر بذور پس از ضدعفونی درون گلدان‌ها کاشته و زمانی که به مرحله ۴ برگ حقیقی رسیدند با استفاده از یک سمپلر، کلشی سین به حجم ۵ میکرو لیتر با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد همراه با شاهد (یک قطره آب مقطر) در محل مریستم انتهایی و بین دو برگ حقیقی قرار داده شد. قبل از این کار دو سمت مریستم توسط دو قطعه پنبه محافظت گردید تا از نفوذ محلول به سایر نقاط برگ و ایجاد آسیب جلوگیری شود. عمل تیمار در اواسط روز که از نظر چرخه سلولی زمان مناسبی به‌منظور تیمار می‌باشد انجام پذیرفت. این آزمایش ۳ مرتبه و در طی ۳ روز متوالی تکرار شد.

اندازه‌گیری صفات مرفولوژیکی

برای مقایسه سطح برگ گیاه شاهد با گیاهان تحت

تجزیه و تحلیل آماری

طرح مورد استفاده در آزمایش طرح کامل تصادفی چند مشاهده‌ای با چهار تکرار بود و آنالیزهای آماری با نرم‌افزار SAS انجام گرفت. نمودارهای مربوط به تغییرات در نرم‌افزار Excel رسم شد. مقایسه میانگین با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال پنج و یک درصد انجام شد.

نتایج و بحث

شواهدی وجود دارد که نشان‌دهنده احتمال انقراض کمتر گونه‌های پلی پلوئید و شانس بقاء بیشتر آن‌ها در شرایط بلایای طبیعی است (Fawcett *et al.*, 2009). هم‌چنین مطالعات مختلف نشان داده‌اند که گیاهان پلی پلوئید جذب یون‌های معدنی، مقاومت به شوری و خشکی بیشتری از دیپلوئیدهای همان گونه و رقم دارند (Chao *et al.*, 2013؛ Allario *et al.*, 2013). نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که گیاه ترویر

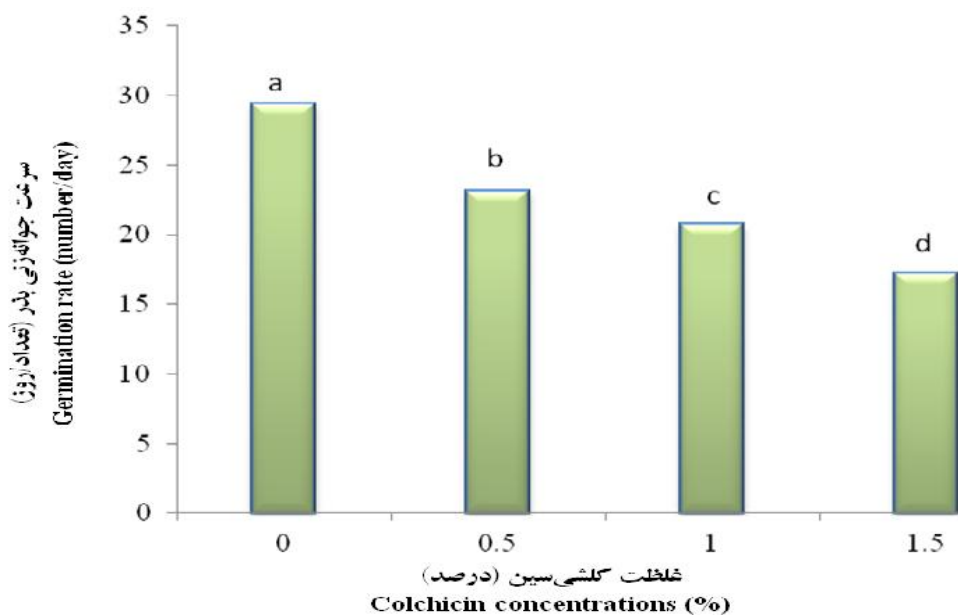
سیترنج به هنگام جوانه‌زنی و به‌ویژه در مرحله تولید ساقه‌چه و ریشه‌چه حساسیت بالایی به تیمار کلشی سین دارد. نتایج تجزیه واریانس حاصل از شمارش روزانه بذور جوانه‌زده نشان داد، بذوری که با غلظت متفاوت کلشی سین تیمار شده بودند با کاهش جوانه‌زنی مواجه بودند به‌طوری‌که با افزایش غلظت تیمار درصد جوانه‌زنی بذرها کاهش یافت (جدول ۱). در این میان تیمارهای ۱/۵ درصد کلشی سین بیشترین کاهش سرعت و درصد جوانه‌زنی بذور را در بین تیمارها نشان دادند (شکل ۱ و ۲). کلشی سین به‌عنوان یک عامل بازدارنده جوانه‌زنی باعث ایجاد ناهنجاری شده و میزان بقاء و جوانه‌زنی رویان‌های بدنی پس از تیمار کلشی سین بستگی به غلظت آن و مدت زمانی تیمار دارد. به‌طور کلی هر چه غلظت و زمان تیمار بیشتر باشد میزان بقاء و جوانه‌زنی کمتر می‌شود (Yang *et al.*, 2006).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثرات سطوح مختلف کلشی سین بر برخی از صفات مورفولوژیکی پایه مرکبات ترویر سیترنج
Table 1. Analysis of variance of the colchicine concentrations effect on some morphological traits of Troyer citrange rootstock

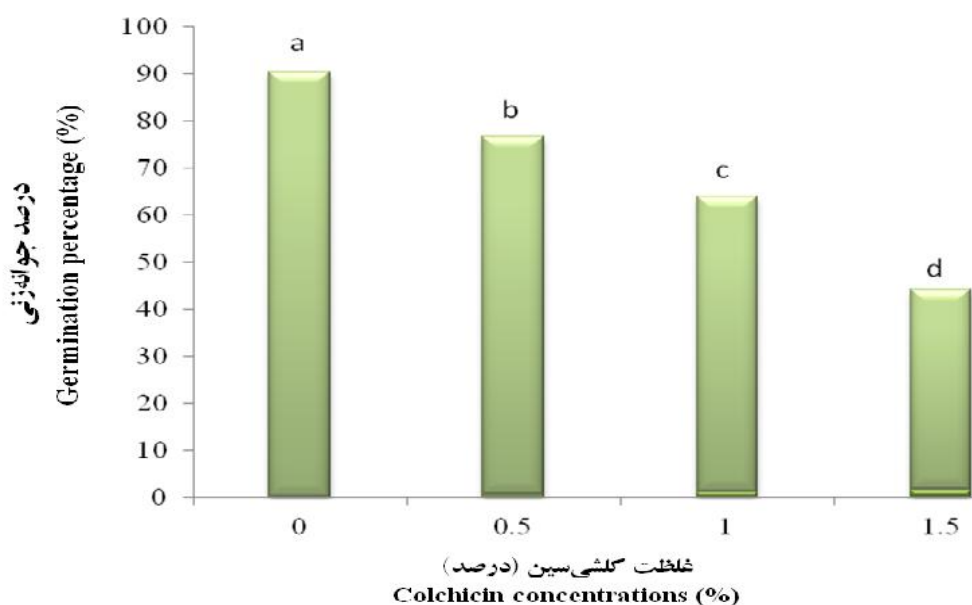
میانگین مربعات Mean squares					df	منابع تغییرات Source of variation
تراکم روزنه (میکرومتر مربع) Stomata density (μm^2)	عرض روزنه (میکرومتر) Stomata width (μm)	طول روزنه (میکرومتر) Stomata length (μm)	ارتفاع گیاهچه (سانتی‌متر) Seedlings height (cm)	درصد جوانه‌زنی بذور Germination percentage (%)		
1.77**	28.92**	37.81**	74.43**	208.84**	3	تیمار Treatments
9.69	0.87	1.06	0.74	0.99	12	خطای آزمایش Experimental error
5.31	0.25	0.38	0.29	0.83	16	خطای نمونه برداری Sampling error
0.85	1.1	1.9	1.1	2.5		ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of variations (%)

* and **: Significant at 5% and 1 % probability level, respectively

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.



شکل ۱- اثر غلظت کلشی سین بر سرعت جوانه زنی پایه بذری ترویر سیترنج
 Figure 1. Effect of colchicine concentrations on germination rate of Troyer citrange seeds (P 0.01)



شکل ۲- اثر غلظت کلشی سین بر درصد جوانه زنی پایه بذری ترویر سیترنج
 Figure 2. Effect of colchicine concentrations on germination percentage of Troyer citrange seeds (P 0.01)

مورد آزمایش شدند. حداکثر میزان زنده مانگی گیاهچه‌ها مربوط به شاهد می‌باشد، در حالی که میزان زنده مانگی در تیمار ۱/۵ درصد کلشی سین ۳۶ درصد است. کلشی سین برای تقسیم میتوز سمی است و با تخریب رشته‌های فیبری

نتایج حاصل از جدول (۱) تجزیه واریانس حاصل از شمارش گیاهان باقیمانده ۵۰ روز پس از اعمال تیمارها نشان داد که تیمارهای اعمال شده نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری ($P < 0.01$) باعث افزایش مرگ و میر گیاهان

به طوری که گیاهان تتراپلوئید به صورت معنی داری کوتاهتر از دیپلوئید بودند (Gu et al., 2005). پژوهشی که Afshar Mohammadian و همکاران (۲۰۱۲) در خصوص تأثیر پلی‌پلوئیدی روی برخی از ویژگی‌های آناتومیکی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی گیاه لیموترش انجام دادند به این نتیجه رسیدند که القاء پلی‌پلوئیدی در لیموترش سبب کاهش معنی دار ارتفاع نسبت به گیاهان دیپلوئید شد. بررسی و مقایسه شکل برگ در گیاهان تیمار شده با شاهد نشان داد که برگ‌های گیاهان تتراپلوئید دارای حاشیه چین‌خورده و ناصاف بوده و عدم تقارن در برگچه‌ها و نیز عدم وجود یک یا دو برگچه کوچک جانبی در برگ‌های تیمار شده با کلشی سین مشهود بود. بذور تیمار شده با سطوح مختلف تیمارهای کلشی سین تولید گیاهچه‌هایی با برگ‌های سبز تیره‌تر از گیاهان شاهد نمودند در حالی که گیاهچه‌های شاهد دارای برگ‌های برنگ روشن‌تر بودند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس و مقایسه اندازه طول روزنه در ۳۲ نمونه از گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید در سطح پشت برگ و در مرحله توسعه کامل برگ‌ها دلالت بر افزایش طول روزنه‌ها در گیاهان تیمار شده (تتراپلوئید) است (شکل ۴).

دوگ سبب تغییر در فرآیند تمایزیابی می‌شود بنابراین کاهش رشد پس از تیمار کلشی سین محتمل است. تیمار جوانه‌های انتهایی آنتوریم (*Anthurium andraeanum*) در محیط کشت بافت با کلشی سین نشان داد که با افزایش غلظت تیمار از ۰/۱ درصد به ۰/۳ درصد میزان بقاء گیاهچه‌ها از ۶۰ درصد به ۲۵ درصد کاهش یافت (Chen et al., 2011).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مربوط به ارتفاع اندازه‌گیری شده گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید نشان داد که ارتفاع گیاهان تتراپلوئید به طور معنی داری ($P < 0.01$) نسبت به گیاهان دیپلوئید کاهش یافت. هم‌چنین با توجه به نتایج مقایسه میانگین صفات مربوط به گیاهان تیمار شده با شاهد مشخص گردید که در تیمار کلشی سین با افزایش سطوح غلظت تیمار، کاهش ارتفاع بیشتر می‌شود و این کاهش ارتفاع یک روش آسان برای تشخیص گیاهان پلی‌پلوئید از دیپلوئید است (شکل ۳). احتمالاً کاهش رشد این گیاهان بدلیل کاهش در سرعت تقسیم سلولی و اثرات کلشیسین بر جوانه‌های تازه و حساس باشد.

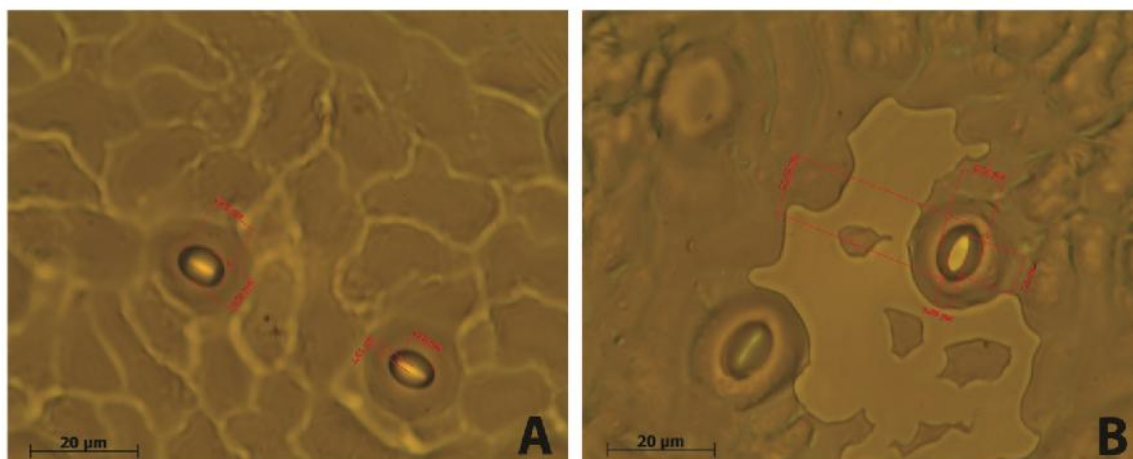
نتایج حاصل مطابق با نتایجی است که در انگیزش پلی‌پلوئیدی گیاه *Ziziphus jujube* به دست آمد،



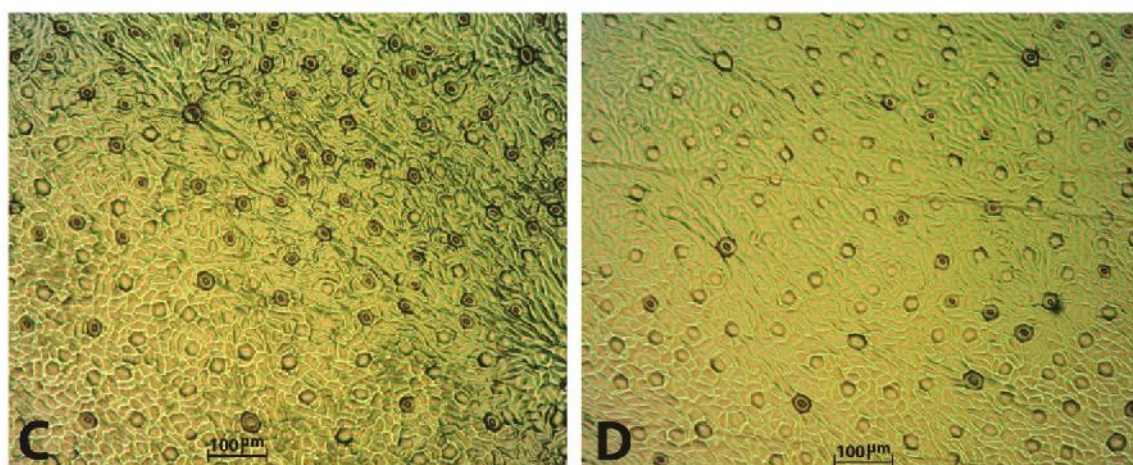
شکل ۳- مقایسه ارتفاع گیاهچه‌های تیمار شده با کلشیسین ۱/۵ درصد (راست) و شاهد (چپ)
Figure 3. Comparison of colchicines induced seedlings (right) with control (left)

افزایش یافت. کمترین طول روزنه در گیاه شاهد مشاهده شد (۲۵/۶۷ میکرومتر) و بیشترین طول روزنه مربوط به غلظت ۱/۵ درصد کلشی سین (۳۲/۳۱ میکرومتر) است (شکل ۴). تفاوت میانگین تعداد و تراکم روزنه‌ها در میان گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید بسیار معنی‌دار بود (شکل ۵). پارامترهای روزنه معمولاً به‌عنوان شاخص برای تعیین سطح پلی‌پلوئیدی در گیاهان به کار برده می‌شود (Kadota and Niimi, 2002; Thao et al., 2003; Masterson, 1994).

در مطالعات القاء پلی‌پلوئیدی بر روی سپیدار و نوعی افاقیا سیاه^۱ تغییرات مورفولوژیکی در برگ گیاهان پلی‌پلوئید مانند کاهش رشد، ضخیم‌تر شدن برگ‌ها، رگبرگ‌ها، تغییرات در حاشیه و نامتقارن شدن برگ‌ها و تیره‌تر شدن رنگ برگ‌ها مشاهده گردید (Ewad et al., 2009). مقایسه میانگین طول روزنه در گیاهان تیمار شده و شاهد با بکارگیری آزمون توکی نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($P < 0.01$) در اندازه طول روزنه در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید وجود دارد. به‌طوری‌که میانگین طول روزنه با افزایش غلظت تیمارهای کلشی سین



شکل ۴- اندازه روزنه در برگ گیاهچه‌های دیپلوئید (A) و تتراپلوئید (B)
Figure 4. Stomata size of leaves in diploid (A) and tetraploid (B) seedlings



شکل ۵- تراکم روزنه در گیاهان دیپلوئید (C) و گیاهان تتراپلوئید (D)
Figure 5. Stomata density in diploid (C) and tetraploid (D) seedlings

1- Black locust

دیپلوئید و تتراپلوئید نشان داد که بیشترین تراکم روزنه‌ها در تیمار شاهد (۰/۲۱۷) و کمترین تراکم روزنه‌ها در غلظت ۱/۵ درصد کلشی سین با تراکم ۰/۱۴۱ در میکرومتر مربع به دست آمد (شکل ۵). در گیاهان سرخارگل تتراپلوئید القاء شده توسط کلشی سین طول، عرض و میزان کلروپلاست روزنه‌ها، گرده، بذور و گل‌ها بزرگتر و مواد مؤثره ثانویه، کلروفیل، کارتنوئید، عرض و ضخامت برگ‌ها نسبت به گیاهان دیپلوئید بیشتر بودند. ولی تراکم روزنه‌ها حدود یک سوم، شاخص برگ و اندازه گیاهچه‌های تتراپلوئید کمتر و رشد این گیاهچه‌ها نیز کندتر بود و گیاهچه‌های تتراپلوئید رنگ تیره‌تری داشتند. در آزمایش Abdoli و همکاران (۲۰۱۳) نتایج حاصل از تجزیه واریانس در مورد اثر تیمارهای کلشی سین بر مساحت کیسه‌های ترش‌چی روی سطح برگ ۳۰ روز پس از اعمال تیمار نشان داد که غلظت‌های مختلف کلشی سین به‌طور معنی‌داری ($P < 0.01$) در مقایسه با شاهد باعث افزایش مساحت و اندازه کیسه‌های ترش‌چی گیاهچه‌های تتراپلوئید (تیمار شده) گردید. مقایسه میانگین مساحت کیسه‌های ترش‌چی با بکارگیری آزمون توکی نشان داد در گیاهانی که تیمار اعمال شده است با افزایش سطوح تیماری، سطح کیسه‌های ترش‌چی نیز افزایش می‌یابد، در این میان اندازه کیسه‌های ترش‌چی در گیاهان شاهد کمترین مقدار را داشته (۴۵۲۵ میکرومتر مربع) و غلظت‌های ۱/۵ درصد کلشی سین بزرگترین کیسه‌های ترش‌چی را دارند (۹۴۹۸ میکرومتر مربع). پژوهش‌های انجام شده توسط Afshar Mohammadian و همکاران (۲۰۱۲) در خصوص اثر پلی پلوئیدی بر برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی گیاه لیموترش، نتایج آزمایش حاضر را تأیید می‌نماید. آنان در تحقیقات خود دریافتند که کیسه‌های ترش‌چی گیاهان تتراپلوئید بزرگتر از دیپلوئید بوده و تراکم آن‌ها در برگ گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید کاهش می‌یابد. از آنجایی که کیسه‌های ترش‌چی توسط تحلیل رفتن یک یا چند سلول در لابلای سلول‌ها ایجاد می‌شود، بزرگتر بودن کیسه‌های ترش‌چی گیاهان تتراپلوئید می‌تواند

روش اندازه‌گیری مشخصات روزنه ساده، تقریباً غیرمخرب و بدون نیاز به تجهیزات گران‌قیمت است. در مطالعه‌ای که به منظور القاء تتراپلوئیدی در انگور انجام شد همبستگی مثبت بین اندازه روزنه‌ها و همبستگی منفی معنی‌دار بین تراکم روزنه‌ها و سطح پلوئیدی به دست آمد. به طور کلی گیاهچه‌های تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئید روزنه‌های بزرگتر ولی با تراکم کمتر داشتند. میانگین تراکم روزنه در گیاهان تتراپلوئید به‌طور معنی‌داری کمتر از گیاهچه‌های دیپلوئید بود (Yang et al., 2006). تراکم روزنه‌ها و اندازه آن‌ها در گیاهان تتراپلوئید آنتوریم ۳۶ درصد کمتر از دیپلوئیدها بودند ولی اندازه آن‌ها حدود ۳۵ درصد بزرگتر بود (Chen et al., 2011). نتایج حاصل از تحقیقات Guerra و همکاران (۲۰۱۴) در خصوص مقایسه صفات مورفولوژیکی و سنجش میزان رشد چهار پایه پاکوتاه دیپلوئید و تتراپلوئید سیتروملو سوئیگل، ترویر سیترنج، فاپاگرو-سی ۱۳ و فاپاگرو-سی ۳۷ از هیبریدهای مرکبات نشان داد که ابعاد روزنه‌های گیاهان تتراپلوئید روزنه شاخص و بزرگتر از گیاهان دیپلوئید بودند. Afshar Mohammadian و همکاران (۲۰۱۲) در رابطه با تأثیر پلی پلوئیدی بر ویژگی‌های آناتومیکی گیاه لیموترش نیز نشان داد که افزایش سطح پلوئیدی سلول‌ها با افزایش طول و عرض روزنه ارتباط دارد. بر این اساس طول و عرض روزنه گیاهان لیموترش تتراپلوئید به‌طور میانگین دو برابر طول و عرض روزنه گیاهان دیپلوئید بود. نتایج آزمایش ما با تحقیقات انجام شده توسط Sahar-Khiz (۲۰۱۰) در خصوص تأثیر سطوح پلوئیدی بر خصوصیات مورفولوژیکی گیاه داروئی بابونه کبیر مطابقت دارد. آن‌ها نشان دادند که اندازه طول سلول‌های محافظ روزنه در روی برگ (آباکسیال^۳) و نیز پشت برگ گیاهان تتراپلوئید اختلاف معنی‌داری (سطح احتمال ۱ درصد) با گیاهان دیپلوئید داشت. غلظت‌های مختلف تیمار کلشی سین به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد سبب کاهش تراکم روزنه‌ها در برگ شدند. مطالعه نمونه‌های برگ گیاهان

یک ماده ضد میتوز می تواند سبب القاء پلی پلوئیدی در پایه پر کاربرد ترویر سیترنج شود و گیاهان پلی پلوئید می توانند در برنامه های اصلاحی آینده به عنوان یکی از والدین در تلاقی ها استفاده شوند. میزان بهینه غلظت کلشی سین باید به صورت تجربی به دست آید چون گونه های گیاهی از نظر ژنتیکی متفاوت اند و حساسیت آن ها نسبت به کلشی سین فرق می کند. بذور و مریستم انتهایی دانه ها توسط کلشی سین تیمار شدند و نتایج بدست آمده مشخص کرد که تیمار مریستم انتهایی از تیمار بذور در القاء پلی پلوئیدی مفیدتر و مؤثرتر است و برای تحقیقات بعدی پیشنهاد می گردد. تغییرات اندازه و تراکم روزنه، شکل برگ و کیسه های ترشحي می توانند روشی ساده و قابل اعتماد برای شناسایی گیاهان پلی پلوئید باشند و به عنوان شاخصی در انتخاب زود هنگام جهت بررسی بیشتر گیاهان پلی پلوئید استفاده شود. تغییراتی که در پایه ترویر سیترنج به دلیل پلی پلوئیدی به وجود می آید می تواند به عنوان مواد گیاهی مفید در برنامه های اصلاحی آینده مرکبات مورد استفاده قرار گیرد.

ناشی از بزرگتر بودن سلول های گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید باشد البته افزایش اندازه کیسه های ترشحي و کاهش تراکم آن ها در گیاهان تتراپلوئید برای اولین بار گزارش می شود. در تحقیق انجام شده، مقایسه برگ های گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید نشان داد که برگ های گیاهان تتراپلوئید از نظر اندازه دارای طول و عرض کمتری نسبت به دیپلوئید بودند مقایسه ارتفاع بین گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید نشان داد که ارتفاع گیاهان تتراپلوئید به طور معنی داری نسبت به دیپلوئید کمتر بود. ارتفاع گیاهان تتراپلوئید شده توسط کلشیسین از دیپلوئیدها کوتاهتر بوده و برخی تغییرات مورفولوژیکی در برگ ها و اسپات گل ها مشاهده شد و برگ ها سبز تیره تر و دمبرگ ها قوی تر بودند (Chen *et al.*, 2011). بررسی تراکم و ابعاد روزنه و هم چنین کیسه های ترشحي نیز نشان داد که در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئید تراکم روزنه ها و کیسه های ترشحي کاهش یافته، اما ابعاد روزنه ها و کیسه های ترشحي افزایش یافت.

نتیجه گیری

نتایج آزمایشات نشان داد که کلشی سین به عنوان

References

- Abdoli, M., Moieni, A., and Naghdi Badi, H. (2013). Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicine-induced tetraploid plants of *Echinacea purpurea* (L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 2075-2083.
- Afshar Mohammadian, M., Pour Akbari, R., Omid, Z., Ghanati, F., and Torang, A. (2012). The effect of induced polyploidy on morphological and physiological traits of lemon (*Citrus aurantifolia* L.). *Plant Biology Journal*, 12: 13-24. [In Farsi]
- Allario, T., Brumos, J., Colmenero-Flores, J., Iglesias, D.J., Pina, J.A., Navarro, L., Talon, M., Ollitrault, P., and Morillon, R. (2013). Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. *Plant, Cell & Environment*, 36: 856-868.
- Anon. (2014). Citrus production. Retrieved from. <http://fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Beck, S.L., Dunlop, R.W., and Fossey, A. (2003). Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141:177-181.
- Chao, D.Y., Dilkes, B., Luo, H., Douglas, A., Yakubova, E., Lahner, B., and Salt, D.E. (2013). Polyploids exhibit higher potassium uptake and salinity tolerance in *Arabidopsis*.

- Science, 341: 658-659.
- Chen, C., Hou, X., Zhang, H., Wang, G., and Tian, L. (2011). Induction of *Anthurium andraeanum* "Arizona" tetraploid by colchicine in vitro. *Euphytica*, 181:137-145.
- Ewad, D., Ulrich, K., Naujoks, G., and Schroder, M.B. (2009). Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicine: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids in vitro. *Plant Cell Tissue, Organ and Culture*, 99: 353-357.
- Fawcett, J.A., Maere, S., and Van de Peer, Y. (2009). Plants with double genomes might have had a better chance to survive the cretaceous-tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 5737-5742.
- Gu, X.F., Yang, A.F., Meng, H., and Zhang, J.R. (2005). In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujube* Mill. Cv. Zhanhua. *Plant Cell Reporter*, 24: 671-676.
- Guerra, D., Wittmann, M.T.S., Schwarz, S.F., de Souza, P.V.D., and Gonzatto, M.P. (2014). Comparison between diploid and tetraploid citrus rootstock: morphological characterization and growth evaluation. *Bragantia*, 73(1): 1-7.
- Hamill, S.D., Smith, M.K., and Dodd, W.A. (1992). In vitro induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. *Australian Journal of Botany*, 40(6): 887-896.
- Hollister, J.D. (2014). Polyploidy: Adaptation to the genomic environment. *New Phytologist*, 1-6.
- Kadota, M. and Niimi, Y. (2002). In vitro induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. *Hosui*). *Plant Cell Reporter*, 21: 282-286.
- Levin, D.A. (2002). The role of chromosomal change in plant evolution. New York, NY: Oxford University Press.
- Masterson, J. (1994). Stomatal size in fossil plants: Evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, 264: 421-423
- Pierce, B.A. (2012). *Genetics: A conceptual approach* (4th ed.), Freeman and Company.
- Sahar Khiz, M.J. (2010). The effect of polyploidy levels and ecological factors on morphological and physiological traits of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.). M.Sc. thesis, Tarbiat Modares University. Tehran, Iran. [In Farsi]
- Thao, N.T.P., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y., and Okubo, H. (2003). Induction of tetraploid in ornamental alocasia through colchicines and oryzalin treatments. *Plant Cell, Tissue, Organ Culture*, 72: 19-25.
- Yang, X.M., Cao, Z.Y., An, L.Z., Wang, Y.M., and Fang, X.W. (2006). In vitro tetraploid induction via colchicines treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica*, 152: 217-224.
- Zhang, X.Y., Hu, C.G., and Yao, J.L. (2010). Tetraploidization of diploid dioscorea results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 167: 88-94.

Effects of Polyploidy Induction by Colchicines on Morphological Traits of Troyer Citrange Rootstock (*Citrus sinensis* cv. Troyer Citrange)

M. Ghafari¹, I. Tavassolian^{2*} and M. Khezri³

- 1- M.Sc. Student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
- 2- ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Research and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran (itavasoli@uk.ac.ir)
- 3- Assistant Professor, Department of Horticultural, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Received: 7 September, 2015

Accepted: 16 November, 2016

Abstract

Background and Objectives

Citrus is one of the most important and useful fruits in the world. They are usually propagated by grafting on suitable rootstocks such as Troyer citrange. In plants especially fruit trees, synthetic induction of polyploidy makes fruit rootstocks more robust, dwarf, with thicker leaves, stems and higher scion yield. The aim of this study was to investigate the best polyploidy induction treatment by colchicine on dwarfing Troyer citrange rootstock and to evaluate its morphological effects.

Materials and Methods

The experiment was conducted in a greenhouse in Kerman. Four concentrations of colchicines (0.5, 1 and 1.5%) and control (0%) were used in two phases. In the first phase, 96 seeds were soaked in different concentrations of colchicines for 30 h and planted in pots. In the second phase, when seeds reached the four leaves stage, meristems were treated by colchicines. The experiment was arranged in completely randomized design (CRD) with four replications.

Results

The results showed that guard cells size, length, width of stomata and secretary vesicles size of colchicine-treated seedlings significantly increased compared to the control. However, lower density of leaves stomata and secretary vesicles in treated plants were observed. Some morphological changes such as leaves thickness, color increase and seedlings dwarfism were detected in treated plants. Moreover, some minor abnormalities on leaves such as asymmetry, lack of lateral leaflets, serrated leaflets existence were evident. The most effective treatment for polyploidy induction was 1% colchicine.

Discussions

Synthetic induction of polyploidy by colchicine is commonly practiced by fruit breeders because it is inexpensive and effective. High concentrations of colchicine are toxic for seeds may be due to prevention of mitosis in the cells. Moreover, larger stomata size can improve efficiency of photosynthesis. Although the treated seeds or seedlings with 1 and 1.5% colchicines had lower height and stomata density, they are more robust and stronger than control which can be very valuable in rootstock breeding.

Keywords: *Polyploidy, Troyer citrange, Colchicine, Stomata size and density, leaf Secretary Vesicles.*