

## تأثیرات مورفولوژیک و فیزیولوژیک القای پلی‌پلوئیدی در گیاه لیموترش (*Citrus ourantifolia*)

منصور افشارمحمدیان<sup>۱\*</sup>، رقیه پورا کبری کسمایی، زینب امیدی، فائزه قناتی<sup>۲</sup> و علیرضا ترنگ<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

<sup>۲</sup> گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

<sup>۳</sup> مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، رشت، ایران

### چکیده

میوه مرکبات دارای ارزش غذایی، دارویی و اقتصادی فراوان است. پُر دانگی به عنوان عامل منفی در انتخاب گونه‌های با کیفیت بالا در میوه مرکبات در نظر گرفته می‌شود. در میان پلی‌پلوئیدها، تریپلوئیدها میوه‌های بی‌دانه تولید می‌کنند. از آنجایی که برای تولید میوه‌های تریپلوئید، وجود گیاه تتراپلوئید ضروری است، تولید گیاه تتراپلوئید در لیموترش با روش قطره چکان و با استفاده از ماده شیمیایی کلشی‌سین، هدف این پژوهش قرار گرفت. ۶۰ روز پس از اعمال تیمار کلشی‌سین با غلظت ۰/۲، ۰/۶، ۱/۰ و ۱/۴ درصد، بررسی فلوسایتمتریک بر گیاهان تیمار شده انجام گرفت. گیاهان تتراپلوئید حاصل، از نظر ویژگی‌های مورفولوژیک و آناتومیک بررسی شدند. مقایسه برگ‌های گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نشان داد که برگ‌های گیاهان دیپلوئید از نظر اندازه، طول و عرض بیشتری نسبت به گیاهان تتراپلوئید دارند. ارتفاع گیاهان تتراپلوئید به طور معنی‌داری نسبت به دیپلوئید کمتر بود. بررسی تراکم روزنه، ابعاد روزنه و همچنین کیسه‌های ترش‌چی برگ‌ها نشان داد که در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئید تراکم روزنه و کیسه‌های ترش‌چی کاهش، اما ابعاد روزنه و ابعاد کیسه‌های ترش‌چی افزایش یافت. میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید افزایش معنی‌داری نداشت.

**واژه‌های کلیدی:** لیموترش، تتراپلوئیدی، کلشی‌سین، خصوصیات مورفولوژیک و آناتومیک

### مقدمه

دورگ ناشی از تلاقی لایم و بالنگ هستند

(فتوحی قزوینی و فتاحی مقدم، ۱۳۸۹) که در صنایع

غذایی، داروسازی، عطرسازی و آرایشی کاربردهای

درختان لیموترش با عدد کروموزومی  $2n=18$ ،

بومی شرق هیمالیا و هند بوده، عقیده بر این است که

همتاهاى دیپلوئید خود بودند (Urwin and Horsnell, 2007). القای پلی‌پلوئیدی در مرکبات سبب تولید گیاهان مرکبات تتراپلوئید و تریپلوئید می‌شود (Lee, 1988). گیاهان تری‌پلوئید، بی‌دانه هستند و از آنجا که اغلب مرکبات پُر دانه هستند، پُر دانگی عاملی منفی در کیفیت آنها محسوب می‌شود (Geraci et al., 1975; Esen et al., 1978; Navarro et al., 2002). علاقه روز افزون پرورش دهندگان مرکبات با دستکاری پلوئیدی، استراتژی‌های هدف برای تولید ارقام بی‌دانه تریپلوئید شده است (Vardi, 1996).

برای تعیین سطح پلوئیدی از روش‌های مستقیم (شمارش کروموزوم و فلوسایتومتری) و همچنین، روش‌های غیر مستقیم (مانند اندازه‌گیری طول و عرض سلول‌های روزنه، تراکم سلول‌های روزنه در واحد سطح و مشاهدات مورفولوژیک) استفاده می‌شود (Sari et al., 1999). تعیین میزان کلروفیل نیز به عنوان ابزاری برای تشخیص سطوح پلوئیدی در گونه‌های مختلف با میزان موفقیت‌های متفاوت همراه بوده است (Timco et al., 1981; Joseph and Randall, 1981; Mathura et al., 2006). میزان کلروفیل در گیاهان اتوتتراپلوئید نوعی آکاسیا (*Acacia mearnsii*) ۴۰ درصد بیشتر از میزان کلروفیل هم‌تای دیپلوئید آنها گزارش شده است (Mathura et al., 2006). به علت افزایش مستقیم میزان ترکیبات ثانویه در بافت و همچنین، افزایش زیتوده در گیاهان پلی‌پلوئید به ویژه گیاهان دارویی که از اندام رویشی (ساقه، برگ و گل) برای به دست آوردن متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شود، دو برابر کردن تعداد کروموزوم‌ها در این

فراوانی دارند. در طب سنتی نیز موارد استفاده زیادی دارند (Owhe-Ureghe et al., 2010) به عنوان مثال، برای درمان دردهای معده و سرفه کاربرد دارند (Oyagade et al., 1999). علاوه بر این، لیموترش خاصیت ضد باکتریایی (باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی) نیز دارد (Aibinu et al., 2007).

روش دو برابر کردن کروموزوم با استفاده از کلشی‌سین، به طور وسیعی در برنامه‌های اصلاحی گیاهان استفاده می‌شود (Hancock, 1997; Hartwell et al., 2004). بیشتر گیاهان حاصل از پلی‌پلوئیدی مصنوعی اغلب با افزایش اندازه سلول همراه هستند که به تولید اندام‌های رویشی و زایشی بزرگتر منجر می‌شود (Byrne et al., 1981). القای پلی‌پلوئیدی ممکن است با افزایش عملکرد و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به والدین دیپلوئید همراه باشد (Dhawan and Lavania, 1996). برای مثال، میزان اسانس در گیاهان اتوتتراپلوئید گونه‌ای از نعناع (*Mentha arevensis* L.) به میزان ۳۰ درصد (Janaki Amal and Sobti, 1962) و در گیاه زیره (*Carum carvi* L.) به میزان ۳۵ تا ۸۵ درصد (Dijkstra and Speckmann, 1980) نسبت به گیاهان دیپلوئید شاهد افزایش نشان داده است. همچنین، در بسیاری از گیاهان افزایش سطح پلوئیدی با برخی تغییرات مورفولوژیک و فیزیولوژیک همراه بوده است (Randall et al., 1977). برای مثال، در گیاه دارویی اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*)، گیاهان اتوتتراپلوئید دارای گل‌ها و بذرهاى بزرگتر، دمگل ضخیم‌تر و پرزهای سپری بزرگتر روی برگ نسبت به

### القای تتراپلوئیدی در گیاه لیموترش

در این پژوهش، برای القای تتراپلوئیدی از روش تیمار مریستم انتهایی ۱۸۰ گیاهچه با غلظت‌های مختلف کلشی سین استفاده شد. به این منظور، مریستم انتهایی رشد گیاهچه‌ها در مراحل دو برگ حقیقی اولیه در ۳ روز متوالی، با استفاده از غلظت‌های مختلف محلول آبی کلشی سین (۰/۲، ۰/۶، ۱ و ۱/۴ درصد) و توئین ۲۰ (برای افزایش تماس سطحی)، با روش قطره‌چکان با استفاده از سمپلر هر روز به میزان ۵ میکرولیتر تیمار شدند.

### شناسایی گیاهان تتراپلوئید با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری

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. در این تحقیق، برای تخمین صحیح سطح پلوئیدی گیاهان تتراپلوئید مورد نظر توسط دستگاه فلوسایتومتری، از گیاه جعفری به عنوان گیاه استاندارد استفاده شد. برای آنالیز سطح پلوئیدی، برگ‌های دوم گیاهان ۶۰ روز پس از اعمال تیمار جدا شده، توسط دستگاه فلوسایتومتری مدل PA ساخت شرکت Partec کشور آلمان بررسی شدند. شیوه تهیه نمونه برای آنالیز فلوسایتومتری به این شکل است که برای تهیه سوسپانسیون هسته‌ای، به مقدار مساوی بافت برگ‌ها از برگ‌های دوم و ترجیحاً قسمت‌های بدون رگبرگ از گیاه نمونه (گیاهانی که با غلظت‌های مختلف کلشی سین تیمار شده بودند)، گیاهان شاهد

گیاهان موجب افزایش عملکرد متابولیت‌های ثانویه شده است (Gonzalez and Weathers, 2003). هدف از این پژوهش، بررسی امکان استفاده از پلی‌پلوئیدی به عنوان روشی اصلاحی برای مقایسه و همچنین، بررسی برخی ویژگی‌های رشدی و ویژگی‌های کمی و کیفی بین گیاهان تتراپلوئید ایجاد شده از گیاهان دیپلوئید در گیاه لیموترش است.

### مواد و روش‌ها

#### مواد گیاهی

میوه‌های لیموترش از باغ مؤسسه تحقیقات مرکبات واقع در شهرستان تنکابن تهیه شد. پوسته خارجی و پوسته داخلی بذرها جدا شد، سپس بذره‌های نوسلار (بذرهایی با بیش از دو لپه و دارای شکل نامتقارن) از جنسی (بذرهایی با لپه‌های متقارن) جدا شد. بذره‌های نوسلار در پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی که در اتوکلاو استریل شده بودند، قرار داده شده، و مراحل رشد اولیه را در داخل انکوباتور با دمای ۲۵-۲۷ درجه سانتیگراد گذراندند. پس از ۲ هفته و نمایان شدن ریشه‌چه، بذرها به گلدان‌هایی به ارتفاع ۱۰ و قطر ۶/۵ سانتی‌متر منتقل شدند. گلدان‌ها با نسبت برابر از کود حیوانی، خاک و ماسه (با نسبت ۱:۱:۱) پر شد. گیاهان پس از کشت در گلدان، در گلخانه با دمای روزانه ۲۵ درجه سانتیگراد و دمای شبانه ۱۸ درجه سانتیگراد نگهداری شد. به منظور ایجاد جمعیت تتراپلوئید، گیاهچه‌ها در مراحل دو برگ حقیقی اولیه برای اعمال تیمار کلشی سین استفاده شدند. این پژوهش طی سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۹۰ در گلخانه مؤسسه بیوتکنولوژی شمال کشور (رشت) انجام گرفت.

تناسبی) سطح هر برگ محاسبه و مقایسه شد (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۵).

### اندازه‌گیری کیسه‌های ترش‌گی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید

برای سنجش تراکم کیسه ترش‌گی و تعداد آنها در واحد سطح، برگ‌های دوم از رأس ساقه گیاهان مورد نظر جدا شد و برای بررسی تراکم آنها در واحد سطح از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴ و برای سنجش طول آنها از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰ استفاده شد.

### سنجش کلروفیل و کاروتنوئید

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئید کل از برگ دوم، دیسک‌های برگ‌گی تهیه، در ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی همگن شد. با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتیگراد و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه محلول جداسازی شد. سپس شدت جذب محلول در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۶/۸ و ۶۶۳/۲ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV visible از شرکت Pharmacia biotech در مقابل شاهد خوانده، با قرار دادن در روابط زیر میزان کلروفیل a و b و کاروتنوئید کل در  $\text{cm}^2$  سطح برگ محاسبه شد (Lichtenthaler, 1983).

$$\text{Chl}_a = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$$

$$\text{Chl}_b = 21.50 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2}$$

$$\text{Chl}_T = \text{Chl}_a + \text{Chl}_b$$

$$\text{Car} = (1000 A_{470} - 1.82 \text{Chl}_a - 85.02 \text{Chl}_b) / 198$$

### ارزیابی ویژگی‌های روزنه در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید

#### تتراپلوئید

بدین منظور، پس از تعیین سطح پلوئیدی گیاهان مورد آزمایش با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری، برگ

(فاقد تیمار) و گیاه استاندارد، به اندازه تقریبی  $1 \text{ cm}^2$  برداشته شد. بافت برگ در یک پتری‌دیش پلاستیکی ۵۵ میلی‌متری حاوی ۴۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج هسته متعلق به شرکت Partec قرار داده، با استفاده از یک تیغ تیز خرد شد. سپس به این نمونه‌ها ۱۶۰۰ میکرولیتر محلول فلوروکروم DAPI که نوعی رنگ مخصوص آنالیز فلوسایتومتری است، اضافه شد. سپس نمونه توسط فیلتر نایلونی فیلتر گردید. نمونه صاف شده به داخل لوله پلاستیکی متعلق به دستگاه فلوسایتومتری منتقل و آنالیز شد. پس از آن، هیستوگرام DNA به دست آمد. مقدار DNA هر نمونه با بررسی حداقل ۱۰۰۰۰ سلول بررسی شد. همچنین، برای اطمینان از نتایج حاصل، پس از تهیه لام از بافت مربوطه شمارش کروموزومی با استفاده از میکروسکوپ نیز انجام شد.

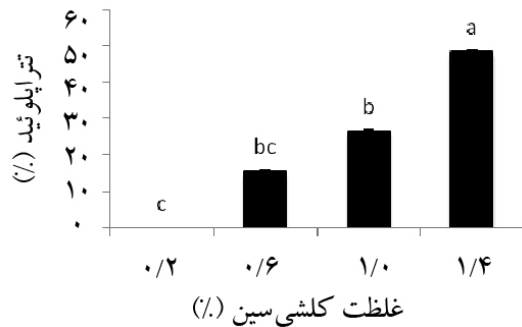
### مقایسه ویژگی‌های کمی و کیفی بین گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید

پس از شناسایی گیاهان تتراپلوئید توسط آنالیز فلوسایتومتری، گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید از نظر سطح برگ، شکل برگ، اندازه روزنه، تراکم روزنه، ارتفاع، میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و میزان کاروتنوئید با هم مقایسه شدند.

### محاسبه سطح برگ گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید

برای مقایسه سطح برگ گیاه شاهد با گیاهان تحت تیمار، برگ‌های دوم از رأس ساقه گیاه هر گل‌دان جدا شد. از برگ‌های جدا شده، کپی کاغذی تهیه و وزن کپی مورد نظر با ترازو اندازه‌گیری شد. یک سانتی‌متر مربع از کادر کاغذ نیز جدا وزن شد، با محاسبه نسبت وزن برگ به وزن یک سانتی‌متر مربع از کاغذ (رابطه

نتایج از طریق شمارش کروموزومی نیز تأیید شد (شکل ۱).



شکل ۱- اثر تیمارهای مختلف کلشی سین بر تولید گیاهان تتراپلوئید لیموترش با استفاده از آزمون توکی. مقادیر، میانگین  $\pm$  SE تکرار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.01$  است.

#### مقایسه شکل و سطح برگ

بررسی شکل برگ (شکل ۲) در گیاه لیموترش نشان داد که برگ‌های گیاهان تتراپلوئید از نظر اندازه (جدول ۱) دارای طول و عرض کمتری نسبت به گیاهان دیپلوئید بودند. علاوه بر این، برگ‌های گیاهان تتراپلوئید چین‌خورده و ناصاف بودند. مقایسه سطح برگ (جدول ۱) نشان داد که گیاهان تتراپلوئید به طور معنی‌داری سطح برگ کمتری نسبت به گیاهان دیپلوئید دارند.



شکل ۲- شکل برگ (۱: گیاه شاهد، ۲: گیاه تیمار شده)

دوم هر گیاه جدا و سپس اپیدرم زیرین برگ با استفاده از لاک ناخن جدا شد. به این منظور بخشی از برگ (۱۰ mm × ۵ mm) که ترجیحاً فاقد رگبرگ اصلی بود، با استفاده از لاک ناخن پوشانده، پس از ۱۰ تا ۱۵ دقیقه خشک شد. سپس با استفاده از یک تیغ تیز حاشیه‌های نمونه را به شکل چهار گوش در آورده، نوار چسبی شفاف روی آن چسبانده و با انگشت شست فشار داده تا اپیدرم کاملاً به چسب ملحق شد. سپس چسب که اپیدرم به صورت لایه شفاف بسیار نازکی به آن چسبیده است، جدا و روی لام چسبانده شد. ویژگی‌های روزنه همه نمونه‌ها با استفاده از یک میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰ بررسی شد (Smith et al., 1989).

#### مطالعات آماری

مراحل مختلف آزمایش با ۳ تکرار انجام شد و سپس آنالیزهای آماری با استفاده از آزمون آماری t در نرم‌افزار SPSS و آزمون توکی در نرم‌افزار SAS صورت گرفت. نمودارهای مربوط به تغییرات در نرم‌افزار Excel رسم شد. طرح مورد استفاده در آزمایشات طرح کاملاً تصادفی بود.

#### نتایج

##### القا تتراپلوئیدی در گیاه لیموترش

نتایج حاصل از بررسی سطح پلوئیدی گیاهان تیمار شده با سطوح مختلف کلشی سین (۰/۲، ۰/۶، ۱/۰ و ۱/۴ درصد) با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری نشان داد که غلظت ۱/۴ درصد در گیاه لیموترش بیشترین درصد گیاهان تتراپلوئید (۴۸/۶ درصد) و غلظت ۰/۲ درصد کمترین گیاهان تتراپلوئید (۰ درصد) را تولید کرد. این

### مقایسه طول، عرض و تراکم روزنه

نتایج حاصل از اندازه‌گیری طول و عرض روزنه در گیاهان تتراپلوئید لیموترش افزایش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) را نسبت به گیاهان دیپلوئید نشان داد (جدول ۱). بررسی تراکم روزنه نیز نشان داد که با افزایش سطوح پلوئیدی تراکم روزنه به طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) نسبت به گیاه دیپلوئید کاهش می‌یابد (جدول ۱).

### مقایسه تراکم و مساحت کیسه ترش‌چی

اندازه‌گیری تراکم کیسه ترش‌چی در نمونه‌های گیاهی تتراپلوئید و دیپلوئید نشان داد که تراکم آنها در گیاهان دیپلوئید نسبت به گونه تتراپلوئید به طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بیشتر بود (جدول ۱ و شکل ۳) در حالی که مساحت کیسه ترش‌چی در گیاهان تتراپلوئید افزایش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) نسبت به گیاهان دیپلوئید داشت (جدول ۱).

### مقایسه ارتفاع گیاهان

نتایج حاصل از مقایسه ارتفاع گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید نشان داد که ارتفاع گیاهان تتراپلوئید به طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) نسبت به دیپلوئید کاهش یافت (جدول ۱).

### مقایسه میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل و کاروتنوئید کل

نتایج حاصل از مقایسه میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل و کاروتنوئید کل بین گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید تفاوت معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) را نشان نداد (جدول ۱).

### بحث

#### تولید گیاهان تتراپلوئید

در این پژوهش، به منظور تولید گیاهان تتراپلوئید از

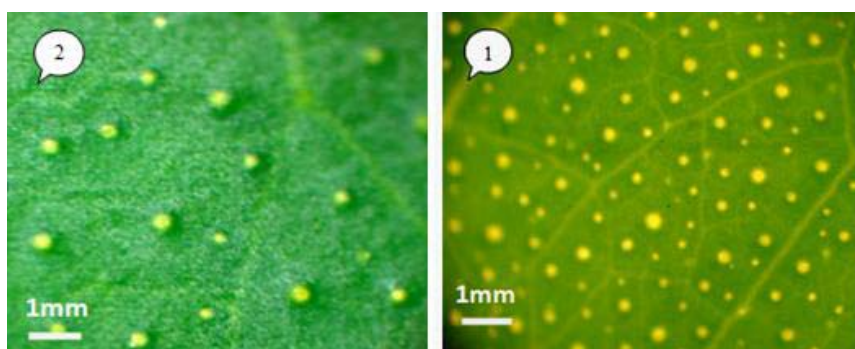
روش تیمار کلشی‌سین به صورت قطره‌چکان استفاده شد. نتایج حاصل از این تیمار نشان داد که در غلظت ۱/۴ درصد کلشی‌سین، ۴۸/۶ درصد از گیاهان لیموترش تتراپلوئید شدند که برتری روش فوق را نسبت به روش‌هایی که اساس آنها تیمار گیاهان با استفاده از کلشی‌سین در مراحل تولید بذر، برگ‌های لپه‌ای و یا روش‌های کشت درون شیشه‌ای است، نشان می‌دهد. برای مثال، در مطالعه‌ای که توسط Dutt و همکاران (۲۰۱۰) روی *Citrus reticulata* انجام شد، از روش تیمار بر سوسپانسیون سلولی که روش جدیدی محسوب می‌شود، استفاده شد که بیشینه راندمان تولید تتراپلوئید در این روش ۳۵ درصد بود. در پژوهشی دیگر راندمان تولید گیاهان تتراپلوئید حاصل از تیمار بذرهای آبیگری شده گونه‌ای از بنفشه در نسل اول ۰/۷۳ درصد گزارش شد و در روش تیمار مریستم انتهایی در مرحله تولید برگ‌های لپه‌ای، راندمان ۲/۱۶ درصد گزارش گردید (Ajalin et al., 2002). همچنین، در پژوهشی که توسط Roy و همکاران (۲۰۰۱) گزارش شد، راندمان تولید گیاهان تتراپلوئید در گیاه رازک از طریق باززایی گیاهان تتراپلوئید از گیاهان میکسوپلوئید در شرایط کشت درون شیشه‌ای، ۳۳ درصد گزارش شد.

#### سطح برگ

نتایج حاصل از این پژوهش در ارتباط با سطح برگ با القای پلی‌پلوئیدی در گیاه *Spathiphyllum wallisii* مشابه بود که سبب کاهش سطح برگ و نسبت طول به عرض گیاه تتراپلوئید نسبت به گیاه دیپلوئید شد (Van Laere, et al., 2010). کاهش سطح برگ و همچنین کوتاه‌تر شدن گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید، می‌تواند سبب افزایش مقاومت این

برخی از ژن‌هایی شود که دو برابر شده‌اند. البته الگوی تغییر بیان ژن در سلول‌ها و اندام‌های مختلف و حتی در ژنوتیپ‌های مختلف یک گیاه می‌تواند متفاوت باشد (Adams and Wendel, 2005).

گیاهان در برابر عوامل نامساعد محیطی از جمله نور و بادهای شدید، خصوصاً در مناطق کوهستانی شود. پلی‌پلوئیدی آثار قابل توجهی بر تغییر نحوه بیان ژن‌ها دارد که ممکن است شامل خاموش یا روشن شدن



شکل ۳- مقایسه کیسه ترش‌چی گیاهان لیموترش (۱: گیاه شاهد، ۲: گیاه تحت تیمار) با بزرگنمایی ۴۰

جدول ۱- مقایسه میانگین برخی ویژگی‌های کمی و کیفی در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید لیموترش. مقادیر، میانگین ۳ تکرار  $\pm SE$  است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  است.

ویژگی‌های کمی و کیفی بررسی شده	گیاهان تتراپلوئید ( $\pm SE$ میانگین)	گیاهان دیپلوئید ( $\pm SE$ میانگین)
طول روزنه ( $\mu m$ )	$48/62 \pm 1/4^a$	$29/4 \pm 0/8^b$
عرض روزنه ( $\mu m$ )	$42/8 \pm 1/3^a$	$22/8 \pm 0/6^b$
کلروفیل a (mg/ml)	$4/6 \pm 0/09^a$	$4/6 \pm 0/02^a$
کلروفیل b (mg/ml)	$1/5 \pm 0/02^a$	$1/4 \pm 0/1^a$
کلروفیل کل (mg/ml)	$6/1 \pm 0/01^a$	$5/9 \pm 0/1^a$
ارتفاع گیاه (cm)	$3/7 \pm 0/09^b$	$14/4 \pm 0/09^a$
مساحت کیسه ترش‌چی ( $\mu m^2$ )	$1884 \pm 169/8^a$	$471 \pm 64/09^b$
تراکم کیسه ترش‌چی ( $\mu m^2$ )	$0/04 \pm 0/01^b$	$0/09 \pm 0/04^a$
طول برگ (cm)	$3/2 \pm 0/1^b$	$6/8 \pm 0/2^a$
عرض برگ (cm)	$1/1 \pm 0/05^b$	$3/1 \pm 0/1^a$
سطح برگ ( $cm^2$ )	$8/9 \pm 0/15^b$	$22/7 \pm 0/2^a$
تراکم روزنه ( $\mu m^2$ )	$0/0004 \pm 0/08^b$	$0/003 \pm 0/2^a$
کاروتنوئید (mg/ml)	$1/2 \pm 0/1^a$	$1/4 \pm 0/05^a$

### مقایسه طول، عرض و تراکم روزنه

نتایج حاصل از طول و عرض روزنه در این تحقیق، با نتایج پژوهش‌هایی که افزایش سطح پلوئیدی سلول‌ها با افزایش طول و عرض روزنه ارتباط داشتند، منطبق است. Heping و همکاران (۲۰۰۸) مشاهده کردند که میانگین طول روزنه در گیاه تتراپلوئید زنجبیل ۵۰/۸ میکرومتر و در گیاهان دیپلوئید ۳۶/۷ میکرومتر بود. Omidbaigi و همکاران (۲۰۱۰) مشاهده کردند که اندازه عرض روزنه در گیاهان تتراپلوئید ریحان به طور غیرمنتظره‌ای بیشتر از گیاهان دیپلوئید است، به طوری که عرض روزنه در گیاهان تتراپلوئید بیش از ۳ برابر گیاهان دیپلوئید بود. علت تغییر اندازه اندام‌های گیاهی در اثر القای پلی‌پلوئیدی، سازگاری بیشتر گیاهان با محیط است. در واقع پلی‌پلوئیدها ممکن است قدرت زنده ماندن بیشتری نسبت به اجداد دیپلوئید خود در برابر عوامل نامساعد محیطی داشته باشند، زیرا با کاهش سطح برگ و از طرف دیگر افزایش اندازه سلول روزنه، توانایی گیاه در حفظ آب و ایجاد تعادل آبی بیشتر می‌شود (Grant, 1981; Stebbins, 1971). همچنین، نتایج این پژوهش با نتایج پژوهش‌هایی که نشان دادند با افزایش سطح پلوئیدی، تراکم روزنه در واحد سطح برگ کاهش می‌یابد، منطبق است. در همین راستا، Omidbaigi و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که وابستگی بین تراکم روزنه و سطح پلوئیدی در ریحان منفی است و تراکم روزنه مشاهده شده در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاه دیپلوئید کمتر است، به طوری که فراوانی روزنه در گیاهان دیپلوئید ۶۳ درصد بیشتر از گیاهان تتراپلوئید بود. Verna و Joshi (۲۰۰۴) نیز در پژوهشی گزارش کردند که افزایش سطح

پلوئیدی در نمونه‌های تتراپلوئید لوبیا به علت افزایش اندازه سلول‌ها، سبب افزایش اندازه روزنه‌ها، در نتیجه کاهش تعداد آنها در واحد سطح در مقایسه با نمونه‌های دیپلوئید می‌شود.

### ارتفاع

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، کلسی‌سین بر ارتفاع گیاهان تیمار شده تأثیر دارد. به طوری که با افزایش غلظت تیمار، ارتفاع کاهش بیشتری نشان می‌دهد که این کاهش ارتفاع، یک روش آسان در تشخیص گیاهان دیپلوئید از تتراپلوئید است. سحرخیز (۱۳۸۵) نیز در گیاه بابونه کبیر مشاهده کرد که با افزایش غلظت کلسی‌سین، میزان ارتفاع گیاهان بابونه کبیر کاهش می‌یابد. کاهش ارتفاع ممکن است به علت پلی‌پلوئیدی شدن باشد، زیرا گیاهان پلی‌پلوئید مناطق کوهستانی که کوتاه‌تر از گیاهان معمول هستند، سازگاری بیشتری با محیط خود دارند. بررسی اثر کلسی‌سین روی گیاه دارویی *Astragalus memberanaceus* نشان داد که رشد آهسته گیاهان تتراپلوئید ممکن است به علت تخریب فیزیولوژیک ایجاد شده توسط کلسی‌سین باشد که در نتیجه باعث کاهش سرعت تقسیم سلولی می‌شود (Chen and Gao, 2007).

### کلروفیل

نتایج حاصل از این پژوهش که عدم تغییر محتوای کلروفیل در گیاه لیموترش را نشان داد، با مطالعات انجام شده توسط حسنی و همکاران (۱۳۸۹) مغایر بود. آنها گزارش کردند که با افزایش سطح پلوئیدی در گیاه ریحان میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل نیز به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. البته در پژوهشی دیگر که روی گیاه *Urgenia indica* انجام شد، نشان



ارتفاع بین گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید نشان داد که ارتفاع گیاهان تتراپلوئید به طور معنی داری نسبت به دیپلوئید کمتر بود. بررسی تراکم و ابعاد روزنه و همچنین کیسه ترش‌حی نیز نشان داد که در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئید تراکم روزنه کاهش یافته، اما ابعاد روزنه افزایش می‌یابد. همچنین، بررسی میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل و کاروتنوئید کل گیاهان لیموترش تیمار شده با کلشی‌سین افزایش معنی داری نداشت.

### تشکر و قدردانی

از زحمات ارزشمند کارکنان محترم پژوهشگاه بیوتکنولوژی شمال، به ویژه آقای دکتر اسد اسدی آبکنار و آقای مهندس علی صیاد رضانی و کارشناسان محترم دانشکده علوم دانشگاه گیلان به ویژه آقای مهندس سید ابوالقاسم ناصر علوی و خانم‌ها مهندس فاطمه جمال امید، مهوش هادوی و زهرا شایگان تشکر و قدردانی می‌شود.

سلطانی، ف.، قربانلی، م. و منوچهری کلانتری، خ. (۱۳۸۵) اثر کادمیوم بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، قندها و مالون‌دی‌آلدئید در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.). مجله زیست‌شناسی ایران ۱۹: ۱۳۶-۱۴۵.

فتوحی قزوینی، ر. و فتاحی مقدم، ج. (۱۳۸۹) پرورش مرکبات در ایران. ویرایش دوم، چاپ سوم، انتشارات دانشگاه گیلان، رشت.

داد که میزان کلروفیل در گیاه تتراپلوئید و دیپلوئید تغییر معنی داری نمی‌کند (Phulari, 2011). لذا، چنین استنباط می‌شود که نوع گونه و رقم مورد مطالعه نیز می‌تواند در میزان کلروفیل در سطوح متفاوت پلوئیدی تأثیر داشته باشد (Andersson, 2009).

### کاروتنوئید

نتایج پژوهش حاضر که عدم تغییر کاروتنوئید در گیاه لیموترش را نشان داد، با نتایج انجام شده توسط Randolph و Hand (۱۹۴۰) مغایر بود که گزارش کردند گیاهان ذرت تیمار شده با کلشی‌سین میزان کاروتنوئید بیشتری نسبت به گیاهان دیپلوئید داشتند. البته دما، شدت پرتو و میزان آب در دسترس در طول فصل رشد نیز بر میزان کاروتنوئید تأثیر می‌گذرانند (Andersson, 2009).

### جمع‌بندی

مقایسه برگ‌های گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید نشان داد که برگ‌های گیاهان تتراپلوئید از نظر اندازه دارای طول و عرض کمتری نسبت به دیپلوئید بودند. مقایسه

### منابع

حسنی، م. ا.، میرزایی، م.، امیدبگی، ر. و فتحی قره بابا، م. (۱۳۸۹) مجله علوم باغبانی ایران ۴۱(۲): ۱۱۱-۱۱۸.

سحرخیز، م. ج. (۱۳۸۵) تأثیر برخی از عوامل اقلیمی و سطح پلوئیدی بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه دارویی زینتی بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium* L.) پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

- Adams, K. and Wendel, J. F. (2005) Novel patterns of gen expression in polyploidy plants. *Trends in Genetics* 21(3): 539-543.
- Aibinu, I., Adenipekun, T., Adelowotan, T., Ogunsanya, T. and Odugbemi, T. (2007) Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of *Citrus aurantifolia* (lime fruit) as used locally. *African Journal of Biotechnology* 4(2): 185-195.
- Ajalín, I., Kobza, F. and Dolezel, J. (2002) Ploidy identification of doubled chromosome number plants in *Viola × witrockiana* Gams. M 1-generation. *Horticulture Science (Prague)* 29(1): 35-40
- Andersson, S. C. (2009) Carotenoids, tocochromanols and chlorophylls in sea buckthorn berries (*Hippophae rhamnoides*) and rose hips (*Rosa* sp.). Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, Sweden.
- Byrne, M. C., Nelson, C. J. and Randall, D. D. (1981) Ploidy effects on anatomy and gas exchange of tall fescue leaves. *Plant Physiology* 68: 891-893.
- Chen, L. L. and Gao, Sh. L. (2007) *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus memberanaceus*. *Scientia Horticulturae* 112: 339-344.
- Dhawan, O. P. and Lavania, U. C. (1996) Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy. *Euphytica* 87: 81-89.
- Dijkstra, H. and Speckmann, G. I. (1980) Autotetraploidy in caraway (*Carum carvi* L.) for the increase of the aetheric oil content of the seed. *Euphytica* 29: 89-96.
- Dutt, M., Vasconcellos, M., Song, K. J., Gmitter Jr, F. G. and Grosser, J. W. (2010) *In vitro* production of autotetraploid ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures. *Euphytica* 173: 235-242.
- Esen, A., Soost, R. K. and Geraci, G. (1978) Seed set, size and development after 4x-2x and 4x-4x crosses in *Citrus*. *Euphytica* 27: 283-293.
- Geraci, G., Esen, A. and Soost, R. K. (1975) Triploid progenies from 2x-2x crosses of *Citrus* cultivars. *Journal of Hered* 66: 177-178.
- Gonzalez, L. D. J. and Weathers, P. J. (2003) Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. *Plant Cell Reports* 21: 809-811.
- Grant, V. (1981) *Plant Speciation*. Columbia University Press, New York.
- Hancock, J. F. (1997) The colchicine story. *Hortscience* 32: 1011-1012.
- Hartwell, L. H., Hood, L., Goldberg, M. L., Reynolds, A. E., Silver, L. M. and Veres, R. C. (2004) *Genetics from genes to genomes*. 2<sup>nd</sup> Ed, McGraw-Hill Companies, Inc., New York.
- Heping, H., Shanlin, G., Lanlan, C. and Xiaoke, J. (2008). *In vitro* induction and identification of autotetraploids of *Dioscorea zingiberensis*. *In Vitro Cell Development Biology Plant* 44: 448-455.
- Janaki Amal, E. R. and Sobti, S. M. (1962) The origin of the Jammu Mint. *Current Science* 31: 387-388.
- Joseph, M. C. and Randall, D. D. (1981) Photosynthesis in polyploidy tall fescue. *Plant physiology* 68: 894-898.
- Joshi, P. and Verna, R. C. (2004) High frequency production of induced autotetraploids in Faba Bean (*Vicia Faba* L.). *Cytologia* 69(2): 141-147.
- Lee, L. S. (1988) *Citrus* polyploidy: origins and potential for cultivar improvement. *Australian Journal Agriculture* 39: 735-747.
- Lichtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. (1983) Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf in different solvents. *Journal of Biology and Society* 11: 591-592.
- Mathura, S., Fossey, A. and Beck, S. (2006) Comparative study of chlorophyll content

- in diploid and tetraploid black wattle (*Acacia mearnsii*). Forestry 79(4): 381-388.
- Navarro, L., Juárez, J., Aleza, P. and Pina, J. A. (2002) Recovery of triploid seedless mandarin hybrids from  $2n \times 2n$  and  $2n \times 4n$  crosses by embryo rescue and flow cytometry. In: Proceedings of the 10<sup>th</sup> IAPTC and B Congress, plant biotechnology 2002 and beyond, Orlando.
- 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. Plant Production 4(2): 87-98.
- Owhe-Ureghe, U. B., Ehwareme, D. A. and Eboh, D. O. (2010) Antibacterial activity of garlic and lime on isolates of extracted carious teeth. African Journal of Biotechnology 9(21): 3163-3166.
- Oyagade, J. O., Awotoye, O. O., Adewunmi, J. T. and Thorpe, H. T. (1999) Antimicrobial activity of some nigerian medicinal plants. Bioscience 11: 193-197.
- Oyagade, J. O., Awotoye, O. O., Adewunmi, J. T. and Thorpe, H. T. (1999) Antimicrobial Activity of some Nigerian medicinal plants. I. Screening for Antibacterial Activity. Bioscience Research Communications 11(3): 193-197.
- Phulari, S. S. (2011) Polyploidy breeding in *Urgenia indica* - to study the effect of colchicines treatment on morphological character of *Urgenia indica*. Botany 1: 207-210.
- Randall, D. D., Nelson, C. J. and Asay, K. H. (1977) Ribulose bisphosphate carboxylase altered genetic expression in tall fescue. Plant physiology 59: 38-41.
- Randolph, L. F. and Hand D. B. (1940) Relation between carotenoid content and number of genes per cell in diploid and tetraploid corn. Journal of Agriculture Res 60: 51-64.
- 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 20: 489-495.
- Sari, N., Abak, K. and Pitrat, M. (1999) Comparison of ploidy level screening methods in watermelon. Journal of Scientia of Horticulturae 82: 265-277.
- Smith, S., Weyers, J. D. B. and Berry, W. G. (1989) Variation in stomatal characteristics over the lower surface of *Commelina communis* leaves. Journal of Plant Cell and Enviroment 12: 653-654.
- Stebbins, G. L. (1971) Chromosomal evolution in higher plants. Columbia University Press, New York.
- Timco, M. P., Vasconcelos, A. C. and Fairbrother, D. E. (1981) Euploidy in ricinus I. euploidy and genen dosage effects on cellular proteins. Biochemistry Genetica 18: 171-183.
- Urwin, N. A. R. and Horsnell, J. (2007) Generation and characterisation of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. Euphytica 156: 257-266.
- Van Laere, K., Franca, S. C., Vansteenkiste, H., Van Huylenbroeck, J., Steppe, K. and Van Labeke, M. C. (2010) Influence of ploidy level on morphology, growth and drought susceptibility in *Spathiphyllum wallisii*. Acta Physiologiae Plantarum 33: 1149-1156.
- Vardi, A. (1996) Strategies and consideration in mandarin improvement programmes. Proceedings of International Society of Citriculture 1: 109-120.

## Morphologic and physiologic effects on polyploidy induction in *Citrus ourantifolia*

Mansour Afshar Mohammadian<sup>1\*</sup>, Roghayeh Pourakbari Kasmaei<sup>2</sup>, Zeinab Omid<sup>3</sup>  
Faezeh Ghanati<sup>4</sup> and Alireza Tarang<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

<sup>2</sup>Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Rasht, Iran

### Abstract

Citrus fruit has high nutritious, medical and economical values. Seediness is considered as a weakness in selecting high quality citrus fruits. Among polyploids, triploids produce seedless fruits. In order to produce triploid fruits, there must be a tetraploid plant, therefore, in this research; the production of tetraploid plant was highlighted in *Citrus ourantifolia* using a chemical material named colchicine through dropping method. 60 days after treatment by 0.2, 0.6, 1.0 and 1.4% concentrations of colchicines, the flow cytometric investigation on treatment plants were conducted. The morphological and anatomical characteristics of tetraploid plants were investigated. Comparison of the leaves of tetraploid with diploid plants indicated that the leaves of tetraploid plants in length and width were smaller than the diploid ones. The height of tetraploid plants was reduced significantly compared with that of the diploid ones. Comparison of the density and the size of stomata and secretory sacs showed that the density of stomata and secretory sacs in tetraploid plants decreased but, the size of stomata and secretory sacs increased, significantly, compared with the diploid ones. The amounts of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids in treatment plants showed no significant increase in tetraploid and diploid plants.

**Key words:** *Citrus ourantifolia*, Tetraploidy, Colchicine, Morphological and anatomical characteristics

\* Corresponding Author: afshar@guilan.ac.ir