القا اتوتتراپلوئیدی در گل پروانش (*Catharanthus roseus* Don.) رقم روزئا به منظور ایجاد تنوع در ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی و فنولوژیکی با استفاده از تیمار کلشی‌سین

حمیدرضا حسینی[۱]، مهرانگیز چهرازی [*۲]، داریوش نباتی احمدی[۳] و محمد محمودی سورستانی[۲]

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، [۲] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، [۳] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

(تاریخ دریافت:۱۳۹۲/۱۰/۰۹ ، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۳/۲۰)

چکیده:

به منظور القا اتوتتراپلوئیدی و تغییر در ویژگی‌های مرفوفیزیولوژیکی و فنولوژی گل پروانش (*Catharanthus roseus* Cv. rosea) آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار غلظت کلشی‌سین (صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد) در مرحله دو برگ حقیقی به صورت اسپری در شش تکرار انجام شد. نتایج حاصل از بررسی‌های فلوسایتومتری، سیتوژنتیکی و مرفولوژیکی نشان داد که تیمارهای ۰/۲ و ۰/۴ درصد کلشی‌سین تاثیر معنی‌داری (P <۰/۰۱) بر همه صفات مورد ارزیابی، درصد تتراپلوئیدی و مرگ و میر داشت. بیشترین درصد تتراپلوئیدی مربوط به غلظت۰/۴ درصد (۴۲ درصد) بود. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر افزایش معنی‌دار (P <۰/۰۱) طول دوره رویشی، تعداد شاخه، سطح برگ، تعداد برگ، قطر گل، طول دوره گل‌دهی، دوام گل روی بوته، میزان کلروفیل، وزن هزار دانه، وزن تر و خشک شاخساره در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید بود. قطر گل در گیاه دیپلوئید و تتراپلوئید به ترتیب ۴۱ و ۵۲ میلی‌متر بود. همچنین دوام گل و طول دوره گلدهی در گیاهان دیپلوئید به ترتیب ۳/۲ و ۱۵۰/۴ روز و در گیاهان تتراپلوئید به ترتیب ۶/۸ و ۱۷۸ روز بود. برخی صفات مانند تعداد میوه و تعداد بذر در بوته در گیاهان دیپلوئید نسبت به گیاهان تتراپلوئید به طور معنی‌داری بیشتر بود. تیمار با محلول ۰/۲ درصد کلشی‌سین به دلیل پایین بودن درصد مرگ و میر در مقایسه با تیمار ۰/۴ درصد به عنوان بهترین غلظت جهت تحریک پلی‌پلوئیدی در گیاه پروانش شناخته شد.

واژه‌های کلیدی: گل پروانش، سطح پلوئیدی، فلوسایتومتری، فنولوژی، کلشیسین.

مقدمه:

انگیزش پلی‌پلوئیدی در گیاهان زینتی با تأثیر بر ویژگی‌های مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی آنها، ضمن ایجاد تنوع در جمعیت‌های گیاهی، در بسیاری از موارد سبب بهبود صفات می‌شود. از پلی‌پلوئیدی در باغبانی نیز به عنوان یک ابزار اصلاحی در صفاتی از قبیل اندازه گیاه، ضخامت برگ، افزایش نسبت طول به عرض برگ و اندازه گل استفاده شده است (Shao *et al.*, 2003). افزایش سطح پلوئیدی در گیاهان سبب ایجاد تغییرات آناتومی و ساختمانی در آنها می‌شود (Dhawan and Lavania, 1996). گل پروانش (*Catharanthus roseus* Don.) گیاهی از خانواده خرزهره (Apocynaceae) بوده که دارای جنبه‌های زینتی و دارویی می‌باشد. این گیاه

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: chehrazi_m@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

زینتی چند ساله و به‌صورت دیپلوئید (۲n=۲x=۱۶) است (Verma, 2011). این خانواده شامل ۱۱۴ جنس و ۴۶۵۰ گونه می‌باشد که بسیاری از آنها زینتی‌اند و ارزش دارویی دارند (امیدبیگی، ۱۳۸۸). پروانش گیاه گرمسیری و حساس به سرما می‌باشد که با فراهم کردن شرایط مناسب می‌توان آن را به مدت طولانی نگهداری کرد. این گیاه زینتی در بهار به عنوان گل حاشیه‌ای در باغچه کشت می‌شود و در پاییز در اثر سرما از بین می‌رود (قاسمی قهساره و کافی، ۱۳۸۸). در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری به صورت گل چندساله و در مناطق سردسیر به صورت گل یک ساله می‌باشد. به‌طور کلی در باغبانی به عنوان گل یک ساله کشت می‌شود (خلیقی، ۱۳۸۷). دو واریته این گیاه که بر اساس رنگ گل متمایز می‌شوند شامل روزئا (Rosea) با گل‌های بنفش و آلبا (Alba) با گل‌های سفید می‌باشد. همچنین پروانش به عنوان یک گیاه دارویی شناخته شده است که دارای تعداد زیادی ترپنوئید ایندول‌آلکالوئید با بیش از ۱۳۰ ترکیب جداسازی و شناسایی شده می‌باشد (Hejden *et al.*, 2004; Cordell, 1997). در بسیاری از گونه‌های گیاهی، انگیزش پلی‌پلوئیدی سبب افزایش اندازه سلول‌ها و متعاقباً افزایش اندازه گل، گل آذین و برگ‌ها شده و در نتیجه اندام‌های رویشی و زایشی و به طورکلی اندام‌های حاوی مواد مؤثره در مقایسه با گیاهان دیپلوئید والدینی بزرگ‌تر شده و در نهایت تولید ترکیبات دارویی مهم افزایش می‌یابد(Adaniya and Shirai, 2001). انگیزش پلی‌پلوئیدی در گیاهان با استفاده از کلشی‌سین، سدیم آزید، اوریزالین و غیره انجام می‌شود. به عنوان مثال، کلشی‌سین و سدیم‌آزید سبب تغییر صفاتی از جمله جوانه‌زنی، زمان گلدهی، ارتفاع گیاه، تعداد برگ، تعداد خوشه، تعداد غلاف، طول غلاف، عرض غلاف و وزن تر و خشک گیاه لوبیا خوشه‌ای (*Cyamopsis tetregonoloba*) شد (Velu *et al.*, 2008). پس از تحقیقاتی که روی گل دندروبیوم تیمار شده با کلشی‌سین در محیط کشت بافت انجام شد، بهترین غلظت ۰/۰۷۵٪ به مدت ۱۴ ساعت معرفی گردید که سبب کاهش زاویه برگ‌ها، افزایش عرض، تراکم و رنگ برگ‌ها و همچنین افزایش قطر ریشه و ساقه در گیاهان تیمار شده (تتراپلوئید) نسبت به گیاهان شاهد (دیپلوئید) شد (Sarathum *et al.*, 2010). تیمار کلشی‌سین در گیاهچه‌های درختچه توری (*Lagerstroemia indica*) سبب تغییرات مرفولوژیکی و سیتوژنتیکی از جمله: افزایش شاخص سطح برگ، طویل و ضخیم شدن و هم‌چنین تیره رنگ شدن برگ‌ها، افزایش اندازه روزنه‌ها، کاهش تعداد روزنه‌ها و اپیدرم برگ‌ها، افزایش تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه، افزایش قطر گل، قطر دانه گرده، طول گلبرگ، اندازه کپسول و بذور، دو برابر شدن کروموزم‌ها نسبت به گیاهان شاهد گردید. تیمار ۰/۲٪ به مدت ۹۶ ساعت و تیمار ۰/۵٪ به مدت ۴۸ ساعت اثر مشابهی بر القا پلی‌پلوئیدی در درختچه گل توری رقم *Yin wei* داشتند (Ye *et al.*, 2009). هدف از این پژوهش، امکان استفاده از پلی‌پلوئیدی به عنوان روشی اصلاحی برای مقایسه و همچنین بررسی برخی ویژگی‌های کمی و کیفی بین گیاهان تتراپلوئید ایجاد شده نسبت به گیاهان دیپلوئید در گل پروانش رقم روزئا (rosea) بود.

مواد و روش‌ها:

این پژوهش در سال ۹۱-۱۳۹۰ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با چهار سطح تیمار کلشی‌سین (صفر، ۰/۱، ۰/۲، و ۰/۴ درصد و با pH=۶) و شش تکرار انجام شد. بذور گل پروانش از بانک ژن گیاهی ملی ایران واقع در موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر شهرستان کرج تهیه شد. کلشی‌سین مورد استفاده در این تحقیق از شرکت سیگما تهیه گردید. بذور در سینی با محیط کشت کوکوپیت کشت گردید. درون هر سلول سینی ، یک عدد بذر قرار گرفت. سینی‌های کشت در شرایط گلخانه و با دمای روز۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و میزان رطوبت نسبی ۵±۷۰ درصد نگهداری شدند. بذور پس از چهارده روز جوانه زدند. پس از جوانه‌زدن بذور، گیاهچه‌ها در مرحله ظهور کامل دو برگ حقیقی به صورت اسپری تحت تیمار کلشی‌سین قرار گرفتند. به منظور القااتوتتراپلوئیدی، مریستم انتهایی ۳۰۰ گیاهچه (در هر تیمار) با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین (صفر، ۰/۱، ۰/۲، و ۰/۴ درصد و با pH=۶) طی هفت روز متوالی تیمار شدند. از محلول توئین ۲۰ (به

Archive of SID

www.SID.ir

میزان ۰/۲ میلی‌لیتر) به منظور افزایش تماس سطحی محلول کلشی‌سین با برگ استفاده شد. در مرحله ۴ تا ۶ برگ حقیقی، نشاها به گلدان‌های حاوی ماسه، رس و کود دامی پوسیده (به نسبت ۱: ۱: ۱) منتقل شدند. در هر گلدان تعداد سه بوته قرار داده شد. تا پایان پروژه تمام گلدان‌ها با محلول غذایی هوگلند کامل به‌طور یکسان تغذیه شدند. آبیاری گلدان‌ها با فاصله سه روز انجام شد و گیاهان در شرایط گلخانه رشد و نمو یافتند. در مرحله گل‌دهی کامل (۱۵ هفته پس از انتقال نشا) گیاهان تیمار شده توسط دستگاه فلوسایتومتری جهت تعیین سطوح پلوئیدی مورد ارزیابی قرار گرفتند. این عمل با دستگاه فلوسایتومتری (مدل PA, Partec, Germany D-48161)، مجهز به لامپ HBO و لیزر اشعه ماوراءبنفش در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران طبق روش Gue و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد. محلول بافر استخراج هسته و رنگ ۴ و ۶ دی آمیدو -۲-فنیل ایندول با نام .Cystain UV Persices DAPI (4,6,-Diamido-2-Phenylindole) از شرکت پارتک تهیه شده بودند. گیاه جعفری با وزن هسته ۴/۴۶ پیکوگرم به عنوان گیاه استاندارد در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله گل‌دهی کامل، سطح پلوئیدی گیاهان به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری و روش‌های سیتوژنتیکی تعیین شد. تجزیه و تحلیل سطح پلوئیدی (محتوای DNA) با استفاده از نسبت(میانگین پیک۲/میانگین پیک۱) محاسبه گردید (Valente *et al*, 1998).

جهت اندازه‌گیری قطر گل از کولیس دیجیتالی (با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر) استفاده شد. اندازه‌گیری مراحل فنولوژی شامل: طول دوره رشد رویشی از زمان انتقال نشاء تا زمان رسیدن بذر به صورت تعداد روز شمارش شد و طول دوره زایشی از زمان شروع گلدهی تا رسیدن بذر در نظر گرفته شد. دوام گل روی بوته نیز به صورت تعداد روز مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد میوه در بوته و تعداد دانه در هر بوته نیز به دقت شمارش شد. برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل، ۰/۱ گرم از برگ گیاه وزن شد و در هاون چینی با ۲ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ به آرامی بافت برگ سابیده شد و به صورت مخلوطی یکنواخت و همگن در آمد سپس با استون ۸۰٪ به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ (دور در دقیقه) به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Shimadzo Japan UV-1201) در طول موج ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر میزان جذب برای کلروفیل قرائت گردید. با استفاده از فرمول زیر محتوای کلروفیل کل محاسبه شد (Arnon, 1949).

$$\text{Totall Chl}=17.76(A645)+7.34(A663)\times V/W$$

V: حجم عصاره (میلی لیتر) و W: وزن بافت (میلی‌گرم)

سطح برگ با دستگاه Leaf Area Meter (DELTA-T SCAN مدل CV-S 3200) ساخت کشور ژاپن بر حسب (cm^2) اندازه گیری شد. وزن تر نمونه‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۱) اندازه‌گیری شد. پس از نگهداری نمونه‌ها در آون به مدت ۴۸ ساعت با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد وزن خشک آنها نیز با ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد. پس از شمارش پانصد عدد بذر از هر کدام از گیاهان تتراپلوئید و گیاهان شاهد با شش تکرار، و سپس توزین آنها با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم و در نهایت با دو برابر کردن عدد به دست آمده وزن هزار دانه هر ژنوتیپ تعیین شد. به‌منظور بررسی و مقایسه خصوصیات و ویژگی‌های فوق در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید تعداد شش نمونه به‌طور تصادفی از هرکدام از جمعیت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم افزارهای SAS 9.1 و SPSS، مقایسه میانگین‌ها با آزمون t در سطح معنی‌دار ۱ درصد و رسم نمودار با استفاده از نرم افزار Excel انجام گرفت.

نتایج و بحث:

نتایج جدول تجزیه واریانس در این آزمایش نشان داد خصوصیاتی از قبیل: مرگ و میر، تتراپلوئیدی، طول دوره رویشی، تعداد شاخه اصلی، تعداد برگ، قطرگل، دوام گل، میزان کلروفیل کل، سطح برگ، تعداد میوه، طول دوره زایشی، تعداد بذر در بوته، وزن هزار دانه، وزن تر و خشک اندام هوایی به طور معنی‌داری ($P <$ ۰/۰۱) تحت تأثیر تیمارهای مختلف کلشی‌سین قرار گرفتند (جدول ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱-نتایج جدول تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در گل پروانش رقم روزئا (rosea) تحت سطوح مختلف تیمار کلشی‌سین

منابع تغییرات	درجه آزادی	مرگ و میر	تتراپلوئیدی	طول دوره رویشی	تعداد اصلی	شاخه	تعداد برگ	قطر گل	دوام گل	کلروفیل کل
بلوک	۲	۶۷/۵۴^{ns}	۵۸/۵^{ns}	۲/۶^{ns}	۰/۳^{ns}		۶۹^{ns}	۰/۰۶^{ns}	۰/۸^{ns}	۱۷^{ns}
تیمار کلشیسین	۳	۲۸۵۳/۷**	۳۱۲۳**	۱۲۰**	۱/۸**		۲۲۷**	۰/۷**	۸**	۵۵ **
خطا	۶	۵۴/۵	۷۲/۷	۳/۴	۰/۲۲		۳۵	۰/۱	۰/۳۳	۸
ضریب تغییرات		۶/۵	۶/۳	۵/۷	۳/۲		۵/۴	۲/۶	۱/۳	۲/۷

^{ns} و ** به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال خطای ۱ درصد

ادامه جدول ۱-نتایج جدول تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در گل پروانش رقم روزئا (rosea) تحت سطوح مختلف تیمار کلشی‌سین

منابع تغییرات	درجه آزادی	سطح برگ	تعداد میوه در بوته	طول دوره زایشی	تعداد بذر در بوته	وزن هزار دانه	وزن تر اندام هوایی	وزن خشک اندام هوایی
بلوک	۲	۲۰۶۲۹۳۹ ^{ns}	۴/۸^{ns}	۱۰۵^{ns}	۵۳۴^{ns}	۰/۰۰۵^{ns}	۴/۲^{ns}	۰/۰۵^{ns}
تیمار کلشیسین	۳	۱۰۷۸۴۴۵۸۷۲**	۹۴۷**	۵۴۰**	۷۵۱۲**	۰/۴**	۱۱۱۸**	۲۷**
خطا	۶	۵۸۳۴۲۸۴۹	۲۰/۵	۴۷	۳۰۸	۰/۰۳	۱۸	۰/۰۳
ضریب تغییرات		۱/۳	۲/۵	۵/۵	۴/۸	۲/۶	۴/۵	۳/۸

^{ns} و ** به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال خطای ۱ درصد.

جدول ۲- درصدگیاهان باقی مانده پس از تیمار، درصد گیاهان تتراپلوئید و میکس پلوئید حاصل از تیمار گیاهچه‌های گل پروانش رقم روزئا (rosea) با کلشی‌سین

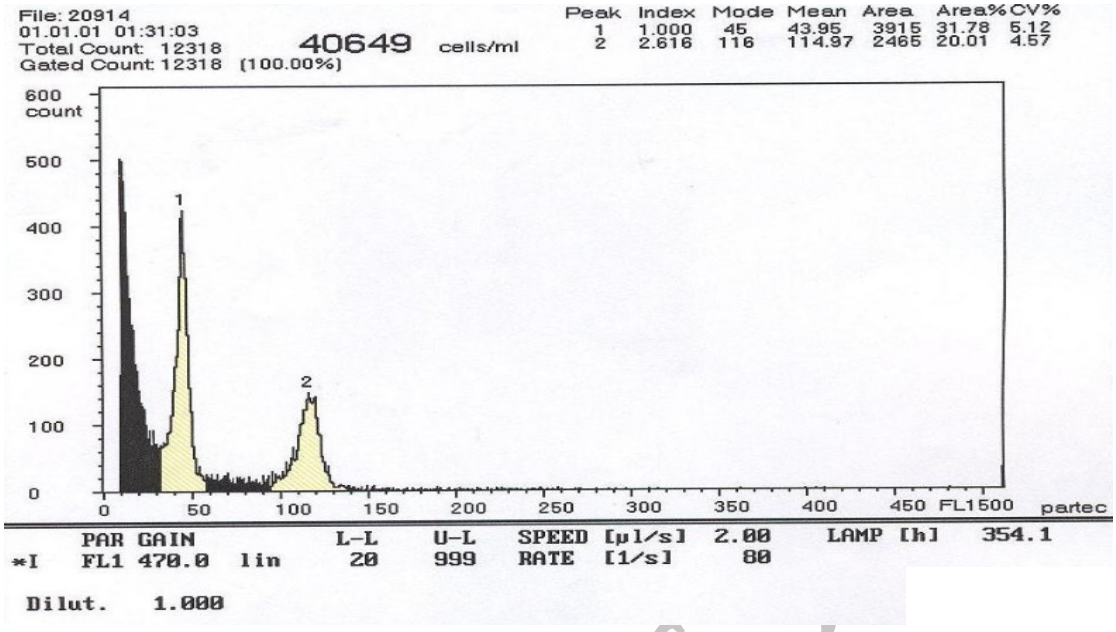
غلظت کلشی‌سین(درصد)	گیاهان باقی‌مانده پس از تیمار(درصد)	گیاهان تتراپلوئید(درصد)
۰	۹۷ ±۲ ^{a}	۰ ±۰ ^{c}
۰/۱	۹۴ ±۴ ^{a}	۰ ±۰ ^{c}
۰/۲	۸۳ ±۳ ^{b}	۳۱ ±۲ ^{b}
۰/۴	۵۲ ±۳ ^{c}	۴۲ ±۳ ^{a}

± خطای استاندارد (SE) ، حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار آزمون t در سطح معنی‌دار ۱ درصد می‌باشند.

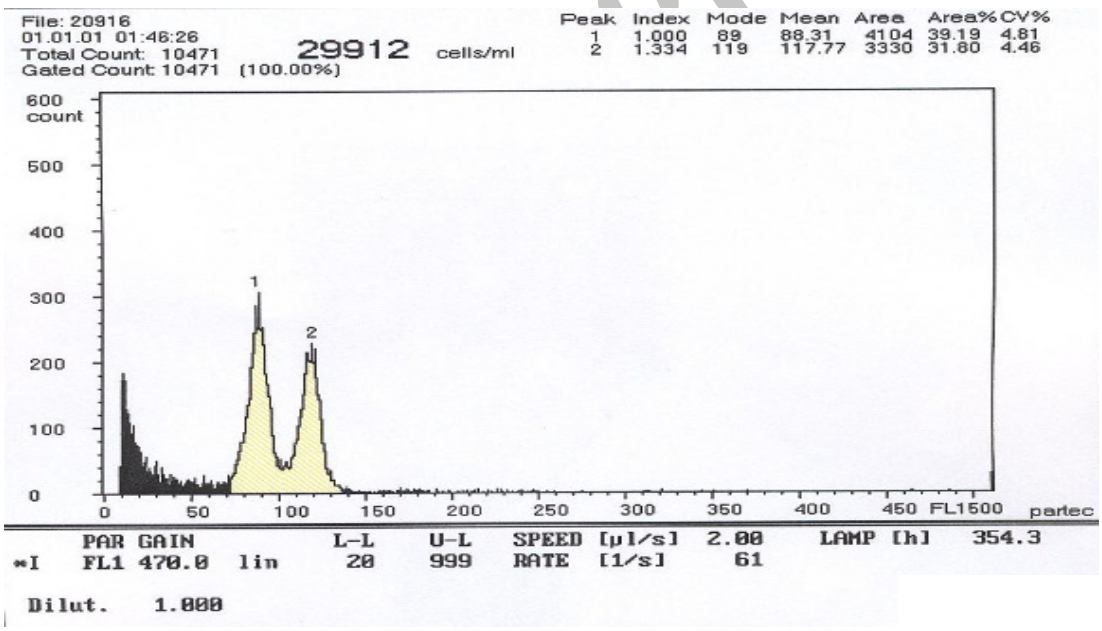
در بین گیاهان تیمار شده در مرحله دو برگ حقیقی، در دو غلظت ۰/۲ و ۰/۴ درصد گیاهان تتراپلوئید ایجاد شدند. نتایج حاصل از بررسی‌های فلوسایتومتری، سیتوژنتیکی و مورفولوژیکی نشان داد بیشترین میزان اتوتتراپلوئیدی مربوط به غلظت ۰/۴ درصد (۴۲ درصد) بود. بیشتربن میزان مرگ و میر نیز در تیمار ۰/۴ مشاهده شد (جدول ۲). طی آزمایشی به منظور القا تتراپلوئیدی در گیاه بابونه کبیر از محلول کلشی‌سین با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد (به روش قطره چکان) در مرحله دو برگ لپه‌ای و دو برگ حقیقی به مدت دو روز متوالی استفاده شد. تیمار گیاهچه‌های بابونه کبیر در مرحله تولید دو برگ حقیقی با استفاده از محلول ۰/۲ درصد کلشی‌سین به عنوان مرحله مناسب و بهترین غلظت به منظور تحریک پلی‌پلوئیدی در این گیاه شناخته شد (سحرخیز و همکاران، ۱۳۸۵). علت اصلی مرگ و میر گیاهان در این روش، مرحله رشد گیاه به هنگام اعمال تیمار با کلشی‌سین و سمیت حاصل از کلشی‌سین برای سلول‌های مریستمی بود، زیرا

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱-تجزیه فلوسایتومتری هسته‌های سلولی گیاه پروانش رقم روزئا (rosea) در حالت دیپلوئید(پیک ۱) و گیاه شاخص جعفری در حالت دیپلوئید (پیک ۲)



شکل۲- تجزیه فلوسایتومتری هسته‌های سلولی گیاه پروانش رقم روزئا (rosea) در حالت تتراپلوئید(پیک ۱) و گیاه شاخص جعفری در حالت دیپلوئید (پیک ۲)

کلشی‌سین به عنوان یک ماده جهش‌زا و در عین حال سمی برای گیاه محسوب می‌شود که حتی غلظت‌های بسیار پائین آن نیز می‌تواند سبب گیاه‌سوزی و مرگ گیاه گردد (Han *et al,* 1999).

نتایج آنالیز سطح پلوئیدی با دستگاه فلوسایتومتری در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل سطح پلوئیدی (محتوای DNA) از طریق نسبت میانگین پیک۲/میانگین پیک۱ (میانگین

www.SID.ir

پیک گیاه مجهول (پیک ۱) به میانگین پیک گیاه شاخص (پیک ۲)) مورد محاسبه قرار گرفت (Valente *et al*, 1998). این نسبت در گیاه دیپلوئید ۰/۳۵-۰/۴۵ و در گیاه تتراپلوئید ۰/۷- ۰/۹ بود. یکی از روش‌های تأیید وقوع پلی‌پلوئیدی، آنالیز فلوسایتومتری است. به طوری که پیک‌های حاصل مطابق شکل‌های ۱ و ۲ در مرحله G1 تقسیم سلولی، مقدار ماده وراثتی را نشان داده و موقعیت نسبی آنها سطح پلوئیدی را تأیید می‌نماید (Valente *et al.*, 1998). این نتایج با نتایج آزمایش محققان بر روی گیاه ریحان مطابقت دارد (ملک‌زاده شفارودی و همکاران، ۱۳۸۷). روش فلوسایتومتری با توجه به این که در زمان بسیار کوتاه و تنها با استفاده از یک نمونه بسیار کوچک از برگ می‌تواند با دقت بالایی سطح پلوئیدی گیاه مورد آزمایش را مشخص کند بسیار کارآمد است (Sari *et al.*, 1999).

نتایج مقایسه میانگین آزمون t (سطح احتمال ۱ درصد) بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نشان می‌دهد که افزایش سطح پلوئیدی باعث افزایش معنی‌دار طول دوره رشد رویشی شد. به‌طوری که طول دوره رویشی در گیاهان دیپلوئید ۱۷۰ روز و در گیاهان تتراپلوئید ۲۱۱/۴ روز بود (جدول ۳). در آزمایشی بر روی گیاهان زیره نشان داده شد که در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئید، رشد رویشی طولانی‌تر شده و گل‌دهی در این گیاهان چند روز دیرتر اتفاق می‌افتد و رسیدن میوه نیز در حدود ده روز با تأخیر صورت می‌گیرد (Dijkestra and Speckman, 1980). با افزایش سطح پلوئیدی تعداد شاخه اصلی به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. میانگین تعداد شاخه در گیاهان دیپلوئید به تعداد ۱ عدد و در گیاهان تتراپلوئید به تعداد ۳ عدد بود (جدول ۳، شکل ۳ و ۴). گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید دارای تعداد برگ‌های بیشتر و سطح برگ بالاتری بودند (شکل ۳ و ۴). میانگین تعداد برگ در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید به ترتیب برابر ۶۵/۳ و ۹۷/۲ بود (جدول ۳). محققان از طریق تحریک پلی‌پلوئیدی در درخت چای (Zhang, 2000)، و انگیزش اتوتتراپلوئیدی در گیاه بابونه کبیر (سحرخیز و همکاران، ۱۳۸۵). به این نتایج دست یافتند. افزایش اندازه برگ از طریق افزایش اندازه سلول‌ها در گیاهان تتراپلوئید به دلیل افزایش سرعت بزرگ شدن سلول، نه به خاطر افزایش طول دوره بزرگ شدن آنها تحقق می‌یابد (Sugiyama, 2005) . در این تحقیق قطر گل در گیاهان تتراپلوئید بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود. رنگ گل در گیاهان تتراپلوئید از بنفش به صورتی تغییر یافت (شکل ۴). بیشترین قطر گل (با میانگین ۵۲/۳ میلی‌متر) در گیاهان تتراپلوئید مشاهده شد. گیاهان دیپلوئید دارای قطر گل کمتری (با میانگین ۴۱ میلی‌متر) بودند (جدول ۳). افزایش قطر گل در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید ممکن است به دلیل افزایش طول و عرض گلبرگ باشد. در آزمایشی تیمار کلشی‌سین به صورت برگی روی گیاه میخک سبب افزایش اندازه گل و کاهش بذر نسبت به گیاه شاهد شد (Roychowdhury and Taha., 2011). با افزایش سطح پلوئیدی کلروفیل کل نیز افزایش یافت (جدول ۳). در پژوهش دیگری که در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید آکاسیا (*Acacia mearnsii*) انجام شد، میزان کلروفیل در گیاهان تتراپلوئید به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود (Mathura *et al*, 2006). در این آزمایش طول مدت گلدهی و دوام گل روی بوته در گیاهان تتراپلوئید پروانش بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود. دوام گل روی بوته و طول مدت گلدهی در گیاهان دیپلوئید به ترتیب برابر با ۳/۲ و ۱۵۰/۴ روز و در گیاهان تتراپلوئید به ترتیب برابر با ۶/۸ و ۱۷۷/۹ روز بود (جدول ۳). یکی از دلایل افزایش دوام گل روی بوته ممکن است به دلیل اثر کلشی‌سین بر بیوسنتز اتیلن و یا عمل آن باشد که از طریق ایجاد اختلال در فرآیند تقسیم میوز و گرده افشانی گل‌ها حاصل می‌شود. به طور کلی مرحله گل‌دهی در گیاهان پلی‌پلوئید در مقایسه با انواع دیپلوئید دیرتر آغاز می‌شود اما طول مدت گل‌دهی در آنها بیشتر است (Lavania and Srivastava., 1991). افزایش سطح پلوئیدی تعداد میوه و تعداد بذر در بوته را به میزان قابل توجهی کاهش داد. تعداد میوه و تعداد بذر در گیاهان دیپلوئید به ترتیب برابر ۴۰/۸ و تعداد ۲۵۰/۴ عدد و در گیاهان تتراپلوئید به ترتیب ۲۲/۷ و ۱۳۵/۲ عدد بود (جدول ۳). اما وزن هزار دانه در گیاهان تتراپلوئید به دلیل افزایش اندازه آنها افزایش یافت. به طوریکه در گیاهان دیپلوئید وزن هزار دانه ۱/۲ گرم و در گیاهان تتراپلوئید ۱/۹ گرم بود (جدول ۳).

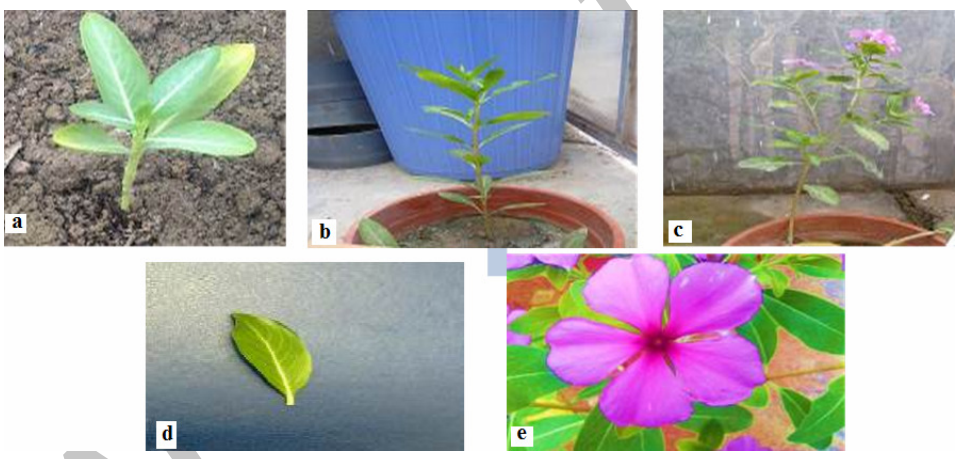
Archive of SID

www.SID.ir

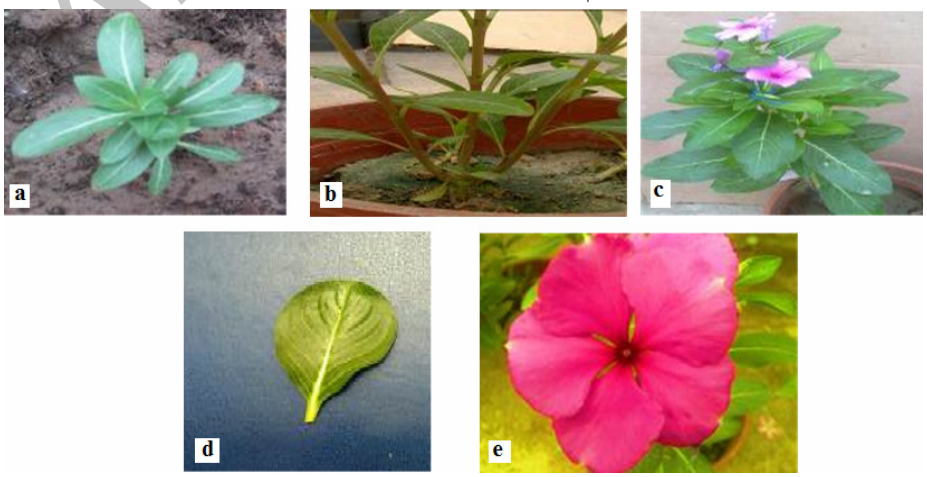
جدول ۳- مقایسه میانگین ویژگی‌های مرفولوژیکی در ژنوتیپ‌های پروانش رقم روزئا (rosea)

ویژگی‌های مورد بررسی	گیاهان دیپلوئید	گیاهان تتراپلوئید
طول دوره رویشی (روز)	۱۷۰/۱ ± ۳/۴ b	۲۱۱/۴ ±۳/۵ a
تعداد ساقه	۱ ±۰ b	۲/۸ ±۰/۴ a
تعداد برگ	۶۵/۳ ±۴/۳ b	۹۷/۲ ±۴/۴ a
سطح برگ(mm^2)	۳۸۸۶۰ ±۱۵۱۷ b	۷۰۹۲۶ ±۱۶۱۸ a
قطرگل(mm)	۴۳/۱ ±۰/۲ b	۵۲/۳ ±۰/۲ a
کلروفیل کل(mg/ml)	۰/۸۵ ±۰/۱ b	۱/۳ ±۰/۱ a
دوام گل روی بوته(روز)	۳/۲±۰/۱۳ b	۶/۸±۰/۳ a
طول دوره گلدهی(روز)	۱۵۰/۴±۳ b	۱۷۷/۹±۴ a
تعداد میوه در بوته	۴۰/۸±۳ a	۲۲/۷±۱/۷ b
تعداد بذر در بوته	۲۵۰/۴±۷ a	۱۳۵/۲±۴ b
وزن هزار دانه (g)	۱/۲±۰/۰۱ b	۱/۹±۰/۰۵ a
وزن تر شاخساره(g)	۴۶/۷ ±۳ b	۶۱/۹ ±۳/۴ a
وزن خشک شاخساره(g)	۶/۴ ±۰/۴ b	۱۱/۳ ±۰/۷ a

± خطای استاندارد (SE) - حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار آزمون t در سطح معنی‌دار ۱ درصد می‌باشند.



شکل ۳- تعداد برگ (a)، تعداد شاخه اصلی (b)، تراکم برگ (c)، اندازه برگ (d)، اندازه و شکل گل (e) در گیاه دیپلوئید



شکل ۴- تعداد برگ (a)، تعداد شاخه اصلی (b)، تراکم برگ (c)، اندازه برگ (d)، اندازه و شکل گل (e) در گیاه تتراپلوئید

www.SID.ir

کاهش باروری و قدرت جوانه‌زنی دانه‌های گرده در گیاهان تتراپلوئید به دلیل ایجاد اختلال در تقسیمات میتوزی می‌باشد. در گیاهان پلی‌پلوئید معمولاً اندازه بذور بزرگ‌تر اما تعداد آنها کم‌تر است. این تغییرات در بذور گیاهان زیره اتوتتراپلوئید گزارش شد. به طوری که میزان تشکیل بذر در گیاهان اتو تتراپلوئید ۷۵ درصد گیاهان دیپلوئید بود. در حالی‌که وزن هزار دانه گیاهان پلی‌پلوئید ۴ گرم بیشتر از گیاهان دیپلوئید گزارش شد (Adaniya and Shirai., 2001). افزایش سطح پلوئیدی به طور معنی‌داری وزن تر و خشک اندام هوایی را در گیاهان تتراپلوئید افزایش داد (جدول ۳). افزایش میانگین وزن تر و خشک شاخساره در گیاهان تتراپلوئید پروانش نسبت به گیاهان دیپلوئید ممکن است به دلیل دو یا سه شاخه بودن درصد بالایی از بوته‌های تتراپلوئید، افزایش قطر ساقه، تعداد برگ و هم‌چنین اندازه و سطح برگ آن‌ها باشد. طی آزمایشی بر روی گیاه بذرالبنج انجام شد، افزایش سطح پلوئیدی گیاهان(از دیپلوئید به تتراپلوئید) وزن خشک گیاهان را افزایش داد (Lavania and Srivastava, 1991).

نتیجه‌گیری کلی:

به طور کلی کلشی‌سین در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ درصد موجب ایجاد گیاهان تتراپلوئید از گیاهان دیپلوئید شد. با توجه به این‌که با افزایش غلظت کلشی‌سین درصد تتراپلوئیدی و میزان مرگ و میر در گیاهان تیمار شده افزایش یافت، مناسب‌ترین تیمار غلظت ۰/۲ درصد معرفی گردید. در این آزمایش گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید دارای طول دوره رشد رویشی، تعداد شاخه اصلی، قطر ساقه، تعداد برگ، قطرگل، دوام گل، میزان کلروفیل، سطح برگ، طول دوره زایشی، وزن هزار دانه، وزن تر و خشک اندام هوایی بالاتری بود.

منابع:

امیدبیگی، ر. (۱۳۸۸) تولید و فرآوری گیاهان دارویی، جلد دوم. انتشارات آستان قدس رضوی.

خلیقی، ا. (۱۳۸۷) پرورش گیاهان زینتی ایران . انتشارات روزبهان.

سحرخیز، م. ج.، امیدبیگی، ر.، نوئل، د. (۱۳۸۵) اثرات برخی از عوامل محیطی و سطح پلوئیدی بر خصوصیات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه دارویی و زینتی بابونه کبیر *(Tanacetum parthenium)*.رساله دکتری. دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.

قاسمی قهساره، م. و کافی، م. (۱۳۸۸) گل‌کاری علمی و عملی. انتشارات دوم مؤلف.

ملک‌زاده شفارودی، س.، غنی، ع.، حبیبی، م. و امیری، ا. (۱۳۹۰). بررسی امکان القا پلی پلوئیدی در گیاه ریحان با استفاده از کلشی‌سین. علوم باغبانی ایران. ۴: ۴۶۹-۴۶۱

Adaniya, S. and Shirai, D. (2001) *In-vitro* induction of tetraploid ginger *(Zinger officinalis* Roscoe) and its pollen fertility germinability. Science Horticulture 88: 277-287.

Arnon. D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15.

Cordell, G. A. (1997) The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology. In: biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cells. (eds. Verpoorte, R., Hejden, R. V. D. and Moreno, P. R. H.) Pp. 221-299. San Diego, Academic Press 49:

Dhawan, O. P. and Lavania, U. C. (1996) Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. Euphytica 87: 81-89.

Dijkestra, H. and Speckmann, G. J. (1980) Autotetraploidy in Caraway (*Carum carvi* L.) for the increase of aetheric oil content of the seed. Euphytica 29: 89-96.

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 Reports 24: 671-676.

Han, D. S., Niimi, Y, and Nakamo, M. (1999) Production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-drived haploid calli in *Asiatic hybrid lilly*. Journal of Japanese society of Horticultural Sciences 68: 979-983.

Hejden, R. V. D., Jabos D. J., Snoeijer, W., Hallard, D. and Verpoorte, R. (2004) The *Catharanthus* alkaloids*: Pharmacognosy biotechnol.* Current Medicinal Chemistry 11: 607-628.

Lavania, U. C. and Srivastava, S. (1991) Enhanced productivity of tropane alkaloids and fertility in

Archive of SID

www.SID.ir

Valente, P., Tao, W. and Verbelen, J. P. (1998) Auxins and cytokinins control DNA endoreduplication and deduplication in single cells of Tobacco. Plant Science 134: 207-215.

Velu, S., Mullainathan, L., Arulbalachandran, D., Dhanavel, D. and Poongkuzhali, R. (2008) Studies on effect of chemical mutagensin cluster bean (*Cyamopsis tetragonoloba* (L) Taub). Plant Archives 12: 265-266.

Verma, A. K., Singh, R. R. and Singh, S. (2011) Cytogenetic effect of EMS on root meristem cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don Var. Nirmal. Biological Sciences 2: 20-24.

Ye, Y. M., Tong, J., Shi, X.P., Yuan, w. and Li, G. R. (2009) Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica L.*). Scientia Horticultural 124: 95-101.

Zhang, Y. X. (2000) Rapid propagation and polyploidy induction in *Melaleuca alternifolia*. Journal of South West Agricultural Unit 22: 507-509.

artificial autotetraploids of *Hyoscyamus niger* L. Euphytica 52: 73-77.

Roychowdhury, R. and Tah, J. (2011) Mutation breeding in *Dianthus caryophyllus* for economic traits. Electronic Journal of Plant Breeding 2: 282-286

Sarathum, S., Hegele, M., Tantiviwat, S. and Nanakorn, M. (2010) Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. European Journal of Horticulture Science 75: 123–127.

Sari, N., Abak, K. and Pitrat, M. (1999) Comparison of ploidy level screening methods in Watermelon. Science Horticulture 82: 265-277.

Shao, J., Chen, C. and Deng, X. (2003) *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture Journal 75: 241-246.

Sugiyama, S. I. (2005) Polyploidy and cellular mechanisms changing leaf size: Comparison of diploid and autotetraploid populations in two species of *Lolium* Life. Sciences 96: 931-938.

Archive of SID

www.SID.ir