

القا اتوتراپلوئیدی در گل پروانش (*Catharanthus roseus* Don.) رقم روزنا به منظور ایجاد تنوع در ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی و فنولوژیکی با استفاده از تیمار کلشی سین

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 اتوتراپلوئیدی و تغییر در ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی و فنولوژی گل پروانش (*Catharanthus roseus* Cv. *rosea*) آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار غلظت کلشی سین (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 مورفولوژیکی نشان داد که تیمارهای ۰/۲ و ۰/۴ درصد کلشی سین تاثیر معنی‌داری ($P < 0/01$) بر همه صفات مورد ارزیابی، درصد تراپلوئیدی و مرگ و میر داشت. بیشترین درصد تراپلوئیدی مربوط به غلظت ۰/۴ درصد (۴۲ درصد) بود. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر افزایش معنی‌دار ($P < 0/01$) 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 تراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید بود. قطر گل در گیاه دیپلوئید و تراپلوئید 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 تراپلوئید به ترتیب ۶/۸ و ۱۷۸ روز بود. برخی صفات مانند تعداد میوه و تعداد بذر در بوته در گیاهان دیپلوئید نسبت به گیاهان تراپلوئید به طور معنی‌داری بیشتر بود. تیمار با محلول ۰/۲ درصد کلشی سین 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:

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

انگیزش پلی‌پلوئیدی در گیاهان زینتی با تأثیر بر ویژگی‌های مورفولوژیکی 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

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

(دیپلوئید) شد (Sarathum et al., 2010). تیمار کلشی سین در گیاهچه‌های درختچه توری (*Lagerstroemia indica*) سبب تغییرات مورفولوژیکی 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 روزنا (*rosea*) بود.

مواد و روش‌ها:

این پژوهش در سال ۹۱-۱۳۹۰ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار سطح تیمار کلشی سین (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. کلشی سین 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 روز 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و میزان رطوبت نسبی 70 ± 5 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 کلشی سین قرار گرفتند. به منظور القاتوتتراپلوئیدی، مرستم انتهایی ۳۰۰ گیاهچه (در هر تیمار) با غلظت‌های مختلف کلشی سین (صفر، ۰/۱، ۰/۲، و ۰/۴ درصد و با pH=۶) طی هفت روز متوالی تیمار شدند. از محلول توئین ۲۰ (به

زیتتی چند ساله و به‌صورت دیپلوئید ($2n=2x=16$) است (Verma, 2011). این خانواده شامل ۱۱۴ جنس و ۴۶۵۰ گونه می‌باشد که بسیاری از آنها زیتتی‌اند و ارزش دارویی دارند (امیدیگی، 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 زیتتی 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 وارته این گیاه که بر اساس رنگ گل متمایز می‌شوند شامل روزنا (*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 به‌طور کلی 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 کلشی سین، سدیم آزید، اوریزالین و غیره انجام می‌شود. به عنوان مثال، کلشی سین 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 tetragonoloba*) شد (Velu et al., 2008). پس از تحقیقاتی که روی گل دندروبیوم تیمار شده با کلشی سین 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

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).

$$\text{Total Chl} = 17.76(A_{645}) + 7.34(A_{663}) \times V/W$$

V: حجم عصاره (میلی لیتر) و W: وزن بافت (میلی گرم)
 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 دیجیتال (با دقت ۰/۰۱) اندازه‌گیری شد. پس از نگهداری نمونه‌ها در آن به مدت ۴۸ ساعت با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد وزن خشک آنها نیز با ترازوی دیجیتال 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 دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم و در نهایت با دو برابر کردن عدد به دست آمده وزن هزار دانه هر ژنوتیپ تعیین شد. به منظور بررسی و مقایسه خصوصیات و ویژگی‌های فوق در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید تعداد شش نمونه به طور تصادفی از هر کدام 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 خصوصیات از قبیل: مرگ و میر، تتراپلوئیدی، طول دوره رویشی، تعداد شاخه اصلی، تعداد برگ، قطر گل، 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 ($P < 0/01$) تحت تأثیر تیمارهای مختلف کلشی‌سین قرار گرفتند (جدول ۱).

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 به طور 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 میکروگرم به عنوان گیاه استاندارد در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله گل‌دهی کامل، سطح پلوئیدی گیاهان به وسیله دستگاه فلوسایتومتری و روش‌های سیتوژنتیکی تعیین شد. تجزیه و تحلیل سطح پلوئیدی (محتوای DNA) با استفاده از نسبت (میانگین پیک ۲/ میانگین پیک ۱) 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 ساییده شد و به صورت مخلوطی یکنواخت و همگن در

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

منابع تغییرات	درجه	مرگ و میر	تتراپلوئیدی	طول دوره	تعداد شاخه	تعداد گل	قطر گل	دوام گل	کلروفیل
آزادی	مرگ و میر	تتراپلوئیدی	رویشی	اصلی	برگ	برگ	قطر گل	دوام گل	کلروفیل
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 معنی داری و معنی داری در سطح احتمال خطای ۱ درصد

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

منابع تغییرات	درجه	سطح برگ	تعداد میوه	طول دوره	تعداد بذر	وزن هزار	وزن تر اندام	وزن خشک اندام
آزادی	سطح برگ	تعداد میوه	در بوته	زایشی	در بوته	دانه	هوایی	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 معنی داری و معنی داری در سطح احتمال خطای ۱ درصد.

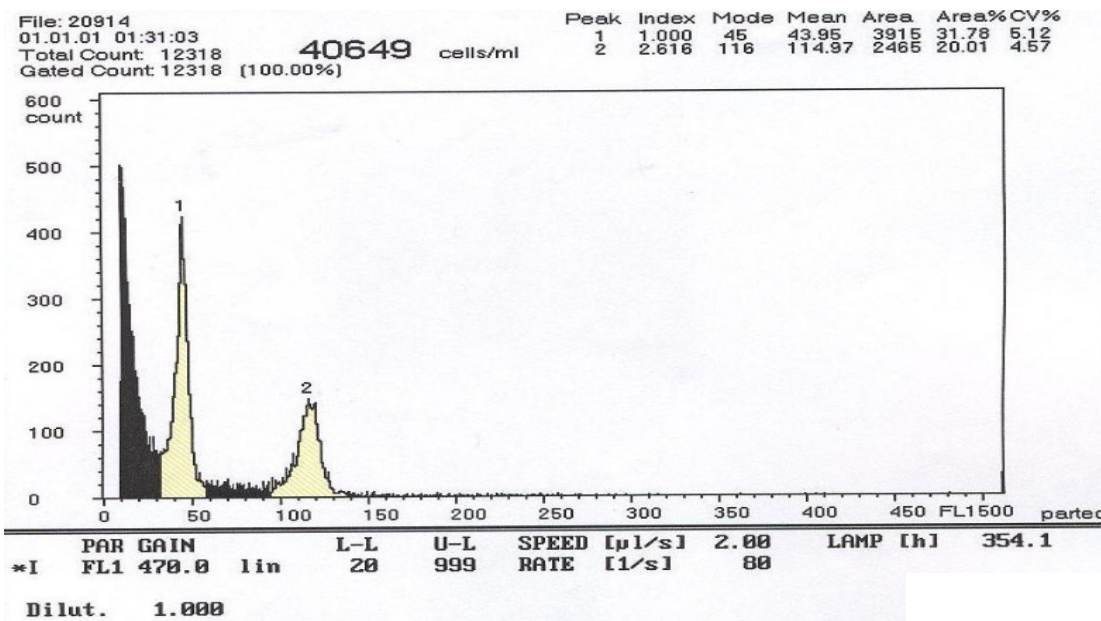
جدول ۲- درصد گیاهان باقی مانده پس از تیمار، درصد گیاهان تتراپلوئید و میکس پلوئید حاصل از تیمار گیاهچه‌های گل پروانش رقم روزنا (rosea) با کلشی سین

غلظت کلشی سین (درصد)	گیاهان باقی مانده 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

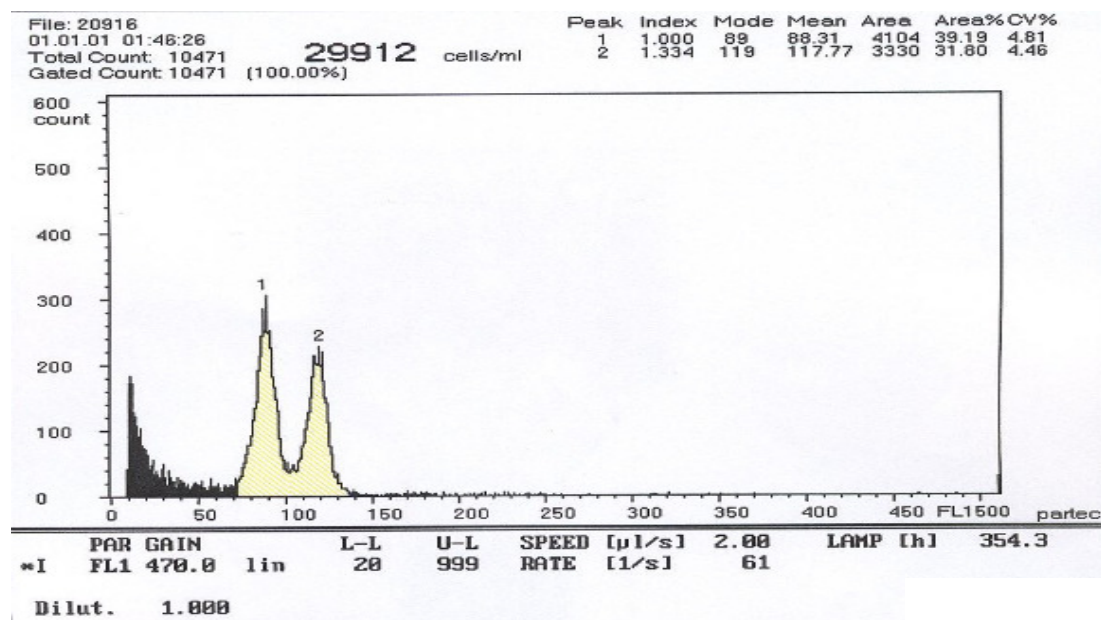
± خطای استاندارد (SE)، حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار آزمون t در سطح معنی دار ۱ درصد می‌باشند.

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 کلشی سین به عنوان مرحله مناسب و بهترین غلظت به منظور تحریک پلی‌پلوئیدی در این گیاه شناخته شد (سرخیز و همکاران، ۱۳۸۵). علت اصلی مرگ و میر گیاهان در این روش، مرحله رشد گیاه به هنگام اعمال تیمار با کلشی سین و سمیت حاصل از کلشی سین برای سلول‌های مرستمی بود، زیرا

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، سیتورژنتیکی و مورفولوژیکی نشان داد بیشترین میزان اتوتتراپلوئیدی مربوط به غلظت ۰/۴ درصد (۴۲ درصد) بود. بیشترین 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 کلشی سین با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد (به روش قطره



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



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

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 پیک ۱/۲ (میانگین

کلشی سین 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).

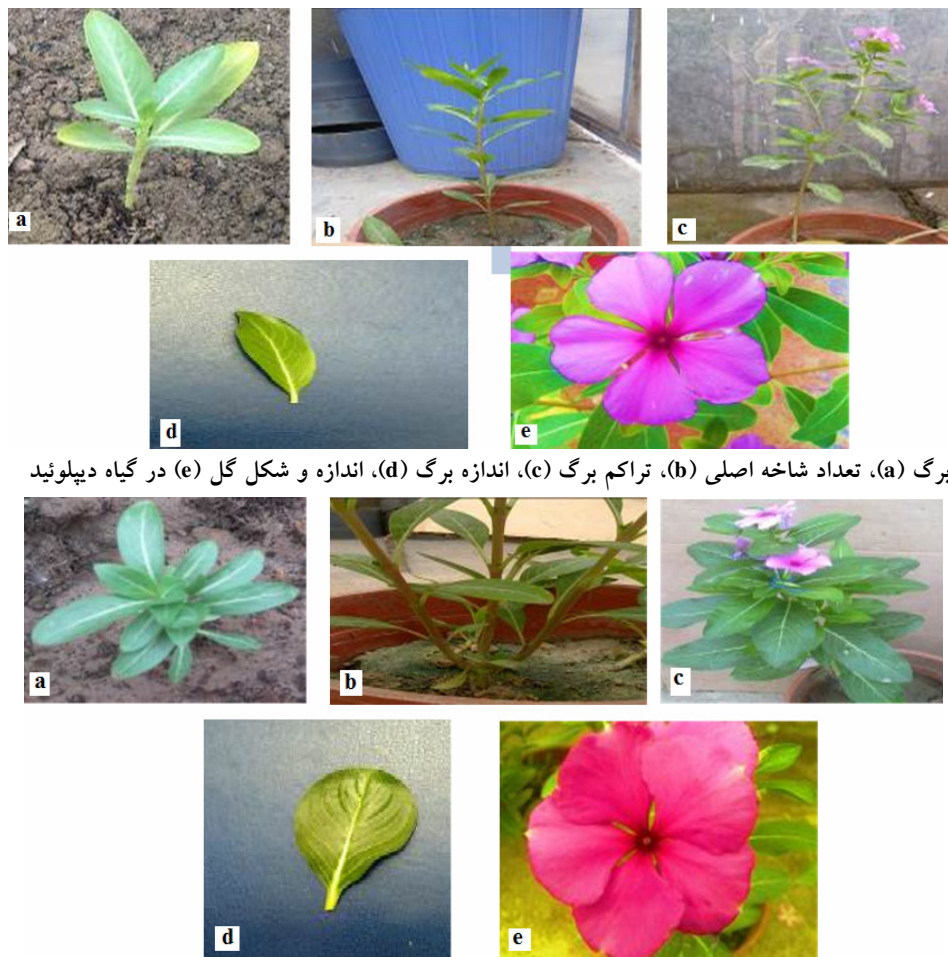
شدن سلول، نه به خاطر افزایش طول دوره بزرگ شدن آنها تحقق می‌یابد (Sugiyama, 2005). در این تحقیق قطر گل در گیاهان تتراپلوئید بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود. رنگ گل در گیاهان تتراپلوئید از بنفش به صورتی تغییر یافت (شکل ۴). بیشترین قطر گل (با میانگین ۵۲/۳ میلی‌متر) در گیاهان تتراپلوئید مشاهده شد. گیاهان دیپلوئید 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 برگ‌ری 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 بیوستز 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 با 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).

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 سفارودی 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. به طوری 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 (Dijkstra 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

جدول ۳- مقایسه میانگین ویژگی‌های مورفولوژیکی در ژنوتیپ‌های پروانش رقم روزنا (*rosea*)

گیاهان تتراپلوئید	گیاهان دیپلوئید	ویژگی‌های مورد بررسی
$211/4 \pm 3/5^a$	$170/1 \pm 3/4^b$	طول دوره رویشی (روز)
$2/8 \pm 0/4^a$	1 ± 0^b	تعداد ساقه
$97/2 \pm 4/4^a$	$65/3 \pm 4/3^b$	تعداد برگ
70926 ± 1618^a	38860 ± 1517^b	سطح برگ (mm^2)
$52/3 \pm 0/2^a$	$43/1 \pm 0/2^b$	قطر گل (mm)
$1/3 \pm 0/1^a$	$0/85 \pm 0/1^b$	کلروفیل کل (mg/ml)
$6/8 \pm 0/3^a$	$3/2 \pm 0/13^b$	دوام گل روی بوته (روز)
$177/9 \pm 4^a$	$150/4 \pm 3^b$	طول دوره گلدهی (روز)
$22/7 \pm 1/7^b$	$40/8 \pm 3^a$	تعداد میوه در بوته
$135/2 \pm 4^b$	$250/4 \pm 7^a$	تعداد بذر در بوته
$1/9 \pm 0/05^a$	$1/2 \pm 0/01^b$	وزن هزار دانه (g)
$61/9 \pm 3/4^a$	$46/7 \pm 3^b$	وزن تر شاخساره (g)
$11/3 \pm 0/7^a$	$6/4 \pm 0/4^b$	وزن خشک شاخساره (g)

± 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

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.

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 بالای از بوته‌های تتراپلوئید، افزایش قطر ساقه، تعداد برگ و همچنین اندازه و سطح برگ آن‌ها باشد. طی آزمایشی بر روی گیاه بذرنج انجام شد، افزایش سطح

منابع:

- امیدبگی، 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، امیدبگی، 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 سفارودی، س.، غنی، ع.، حبیبی، م. و امیری، ا. (۱۳۹۰). بررسی امکان القا پلی‌پلوئیدی 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.
- Dijkstra, 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-driven 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

- 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., Tantivivat, 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.