بررسی تأثیر پلی‌پلوئیدی بر برخی ویژگیهای آناتومیکی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاه لیموترش

منصور افشار محمدیان[۱،*]، زینب امیدی[۱]، رقیه پوراکبری[۱] و اسد اسدی آبکنار[۲]

[۱] رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

[۲] رشت، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی استان گیلان

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۵

چکیده

القای پلی‌پلوئیدی در حالت تری‌پلوئید منجر به تولید میوه‌های بی‌دانه می‌شود. تری‌پلوئیدها حاصل ترکیب گیاهان دیپلویید و تتراپلویید هستند. تعداد بیش از حد دانه در میوه مرکبات سبب کاهش استقبال در بازار مصرف می‌شود. گیاهان تتراپلوئید یک پیش نیاز مهم برای تولید انواع مرکبات تری‌پلوئید بی‌دانه هستند. به‌منظور تولید گیاهان تتراپلوئید در لیموترش از روش قطره چکان کلشی‌سین در غلظتهای ۰/۲، ۰/۶، ۱ و ۱/۴ درصد بر روی مریستم انتهایی در مرحله دو برگ حقیقی استفاده شد. جهت تعیین سطوح پلوئیدی در گیاهان لیموترش از دو روش فلوسایتومتری و بررسی اندازه و تراکم روزنه استفاده شد. همچنین ویژگی‌هایی نظیر ارتفاع، ضخامت برگ، میزان فنل و فلاونوئید کل بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید اندازه‌گیری و مقایسه شدند. بالاترین بازدهی انگیزش پلوئیدی در گیاه لیموترش برابر ۴۸/۶ در غلظت ۱/۴ درصد کلشی‌سین بود. مقایسه تعداد روزنه‌ها و کیسه‌های ترشحی برگ نشان داد که تعداد آنها در برگ گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید کاهش یافته، درحالی‌که اندازه روزنه ها و کیسه ترشحی در گیاهان تتراپلوئید به طور معنی‌داری بزرگتر بود. دو برابر کروموزومها سبب افزایش ضخامت برگ، بافت نرده‌ای و اسفنجی شد. در گیاه لیموترش افزایش سطح پلوئیدی تأثیر معنی‌داری در میزان فنل و فلاونوئید تام در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید نداشت.

واژه‌های کلیدی: پلی‌پلوئیدی، کلشی‌سین، لیموترش

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۲۳۲۳۶۷۹، پست‌الکترونیکی: afshar@guilan.ac.ir

مقدمه

گیاه لیموترش (*Citrus aurantifolia* L.) متعلق به خانواده Rutaceae **است**، پراکندگی این گونه در مناطق خشک و نیمه‌خشک در نواحی نیمه گرمسیری با دمای زمستان بالاتر از ۴- درجه سانتی‌گراد مشاهده می‌شود (۲۵). روش دو برابر کردن کروموزوم (پلی‌پلوئیدی) با استفاده از کلشی‌سین، به طور وسیعی در برنامه‌های اصلاحی گیاهان مورد استفاده قرار می گیرد، در گیاهان پلی‌پلوئید حاصل، اغلب اندازه گلها، برگها، میوه‌ها و بذرها افزایش می‌یابد (۱۲ و۱۳). افزایش اندازه سلول در بیشتر گیاهان حاصل از پلی‌پلوئیدی مصنوعی، منجر به تولید اندام‌های رویشی و زایشی بزرگ‌تر می‌شود (۴). درختان میوه پلی‌پلوئید به دلیل داشتن خصوصیات مطلوب باغبانی، مانند اندازه بزرگ میوه، تنه تنومند، بهره‌وری بیشتر، مقاومت به بیماریها و اغلب بی‌دانه یا کم دانه بودن، ازجمله رقم‌های موفق تجاری محسوب می‌شوند (۱۷ و ۲۰). در سالهای اخیر، در بازار مرکبات جهان، توجه ویژه‌ای به میوه‌های بی‌دانه مرکبات می‌شود. ارقام جهشی و تولید ارقام تری‌پلوئید روشهای مرسوم تولید مرکبات بی‌دانه هستند (۱۹). در

مرکبات، معمولاً ارقام بی‌دانه تری‌پلوئید از تلاقی رقم‌های دیپلوئید و تراپلوئید حاصل می‌شوند و این روش بسیار مؤثر می‌باشد (۹). گیاهان تراپلوئید یک پیش نیاز مهم برای تولید انواع مرکبات تری‌پلوئید بی‌دانه هستند. با این حال تولید گیاهان تراپلوئید به‌عنوان مانع در آمیزش اینترپلوئیدی محسوب می‌شوند (۲۷). القای پلی پلوئیدی در گیاهان به‌عنوان وسیله‌ای برای افزایش سازش‌پذیری محسوب می‌شود. دو برابر کردن تعداد کروموزومها و ژنهای مرتبط در بعضی موارد بیان ژنها و غلظت متابولیت-های ثانویه و مواد دفاعی شیمیایی را افزایش می‌دهد (۲۴). همچنین دو برابر کردن کروموزومها در گیاهان منجر به افزایش ضخامت برگ، افزایش نسبت عرض به طول برگها، تیره‌تر شدن و بزرگتر شدن گلها در گیاهان، (۸) *Spathiphyllum*، *Pyrus communis* (۲۱) می‌شود. چندین روش برای تعیین سطح پلی پلوئیدی در گیاهان وجود دارد که از آن جمله می‌توان به شمارش کروموزومی، فلوسایتومتری و اندازه‌گیری پارامترهای آناتومیکی و مورفولوژیکی اشاره کرد (۶). معمولاً برای اثبات دو برابر شدگی 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 تراپلوئید خود دارند. هدف از انجام این تحقیق، تولید گیاهان تراپلوئید لیموترش با فراوانی بالا و بررسی برخی خصوصیات آناتومیکی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاهان تراپلوئید تولید شده در مقایسه با گیاهان دیپلوئید می‌باشد که نویسندگان با بررسی منابع گزارشی در این مورد پیدا نکردند.

مواد و روشها

تهیه مواد گیاهی: به‌منظور تهیه بذرهای گیاهان لیموترش (*Citrus aurantifolia*)، میوه این گیاهان از باغ تحت کنترل مؤسسه تحقیقات مرکبات واقع در شهرستان تنکابن تهیه شد. پوسته داخلی و خارجی بذرها جدا شد. بذرهای نوسلار (بیش از دو لپه و نامتقارن) از بذرهای جنسی (لپه‌های متقارن) تفکیک و فقط بذرهای نوسلار در داخل پتری‌دیش اتوکلاو شده حاوی دو لایه کاغذ صافی و آب مقطر گذاشته شد. پتری دیشهای حاوی بذرها در انکوباتور در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته قرار داده شدند. پس از گذشت ۱۴ روز، با ظهور ریشه‌چه، بذرهای جوانه زده به گلدانهایی با نسبت برابر از کود حیوانی، خاک و ماسه (۱:۱:۱) انتقال یافتند.

القای تتراپلوئیدی در گیاهان لیموترش: در این پژوهش به‌منظور القای تتراپلوئیدی، از روش تیمار مریستم انتهایی گیاهچه‌ها با غلظتهای مختلف کلشی‌سین استفاده شد. به این منظور، مریستم انتهایی ۱۸۰ گیاهچه در مراحل دو برگ حقیقی اولیه در ۳ روز متوالی و با استفاده از غلظت‌های مختلف محلول آبی کلشی‌سین (۱/۴، ۱، ۰/۶ و ۰/۲ درصد)، با روش قطره چکان با استفاده از سمپلر اواسط هر روز که از نظر چرخه سلولی زمان مناسبی به‌منظور اعمال تیمار می‌باشد، به میزان ۵ میکرولیتر تیمار شدند. لازم به ذکر است، به‌منظور استقرار و جذب بهتر کلشی‌سین در محل مریستم، به تمامی غلظتهای کلشی‌سین ۱ تا ۲ قطره توین ۲۰ افزوده شد.

شناسایی گیاهان تراپلوئید: تجزیه فلوسایتومتریک هسته-های سلولی به منظور تشخیص گیاهان تراپلوئید و میکسوپلوئید از گیاهان دیپلوئید، ۶۰ روز پس از تیمار با کلشی‌سین انجام شد. سطح پلوئیدی یک نمونه ناشناخته تنها پس از ترکیب با هسته‌های استاندارد گیاه شاخص با سطح پلوئیدی و محل پیک مشخص می‌شود. در این تحقیق برای تشخیص صحیح سطح پلوئیدی گیاهان تراپلوئید توسط دستگاه فلوسایتومتر، از گیاه جعفری به‌عنوان گیاه استاندارد استفاده شد. برای آنالیز سطح پلوئیدی از دستگاه فلوسایتومتر مدل PA ساخت شرکت Partec کشور آلمان استفاده شد. نحوه تهیه نمونه برای آنالیز سطوح پلوئیدی به این صورت است که جهت تهیه

سوسپانسیون هسته‌ای، به مقدار مساوی بافت از برگهای کوچک قسمتهای جوان گیاه تیمار شده با کلشیسین و گیاه استاندارد به اندازه تقریبی ۱ سانتی‌متر مربع برداشته شد. ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (به ازای هر ۱۰ میلی لیتر بافر استخراج ۱۰۰ میلی گرم PVP) به برگها افزوده شده و بعد برگها با استفاده از یک تیغ تیز خرد شدند. پس از این مرحله ۱۶۰۰ میکرولیتر رنگ مخصوص آنالیز فلوسایتومتری DAPI اضافه شد. سپس نمونه از فیلترهای مخصوص به‌منظور حذف تجمع سلولی و قطعات درشت عبور داده شد. نمونه صاف شده به دستگاه تزریق و پس از انجام فرایند تجزیه، هیستوگرام DNA به‌دست آمد. مقدار DNA هر نمونه با بررسی حداقل ۱۰۰۰۰ سلول مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به اینکه نمونه تهیه شده تزریقی به دستگاه مخلوطی از عصاره گیاه مورد آزمایش و گیاه جعفری بود با داشتن محل پیک ثابت گیاه استاندارد، سطح پلوئیدی نمونه تعیین شد.

مقایسه برخی ویژگیهای کمی و کیفی بین گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید: پس از شناسایی گیاهان تتراپلوئید حاصل از تیمار گیاهان دیپلوئید با کلشی‌سین توسط دستگاه فلوسایتومتر، خصوصیات روزنه، ارتفاع گیاهان، ضخامت برگها، ویژگیهای کیسه های ترشحی، میزان فنل و فلاونوئید کل بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید مقایسه و ارزیابی شد.

استخراج فنل و فلاونوئید کل: به‌منظور استخراج عصاره بافت برگی در سنجش آنتی‌اکسیدانهای غیر آنزیمی شامل فنل و فلاونوئید، برگ دوم نمونه‌های گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید جداگانه در هاون چینی با نیتروژن مایع سابیده و خرد شدند. ۰/۲۵ گرم از هر نمونه همگن شده با ۵ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد مخلوط و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سنجش مقدار فنل کل با استفاده از معرف Folin-Ciocalteu و استاندارد گالیک اسید انجام شد (۲۲). برای این منظور ۲۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج داخل لوله فالکون ریخته شد. سپس ۱۲۵۰ میکرولیتر فولین به نسبت ۱ به ۱۰ (به‌ترتیب آب دیونیزه و فولین) و ۱۰۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد در غیاب نور اضافه شد. در نهایت نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار و دمای ۴ درجه با دور ۴۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. کنترل نیز به همین ترتیب با ۲۵۰ میکرولیتر متانول ۸۰ درصد به جای عصاره آماده شد. پس از ۲۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. برای سنجش فلاونوئید کل عصاره‌های برگی استخراج شده، از روش رنگ‌سنجی و استاندارد کاتچین استفاده شد (۲۳). برای این منظور، ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده در داخل لوله فالکون ریخته شد. سپس ۱۲۵۰ میکرو لیتر آب دیونیزه و ۷۵ میکرولیتر نیتریت سدیم ۵ درصد به آن اضافه شد. پس از ۶ دقیقه ورتکس و اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، لوله‌ها مجدداً به مدت ۵ دقیقه ورتکس شدند. با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر سود ۱ مولار و رساندن آن به حجم ۲۵۰۰ میکرولیتر با آب دیونیزه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۰ نانومتر خوانده شد.

تحلیل آماری: مراحل مختلف آزمایش با ۳ تکرار انجام و بعد تحلیل‌های آماری مربوطه با استفاده از آزمون آماری t در SPSS و آزمون توکی در SAS انجام شد.

جدول ۱- میزان مرگ و میر پس از تیمار گیاهان تتراپلوئید و میکسوپلوئید (درصد) حاصل از تیمار گیاهچه‌های لیموترش

گیاهان میکسوپلوئید (٪)	گیاهان تتراپلوئید (٪)	میزان مرگ و میر (٪)	غلظت کلشی‌سین (٪)
۱۹/۴۴	۰	۰/۷۳	۰/۲
۲۲/۶۴	۱۵/۴۴	۱/۷۴	۰/۶
۲۴/۶۶	۲۶/۶۶	۱۱/۱۱	۱
۰	۴۸/۶	۴۸/۱۴	۱/۴

نتایج

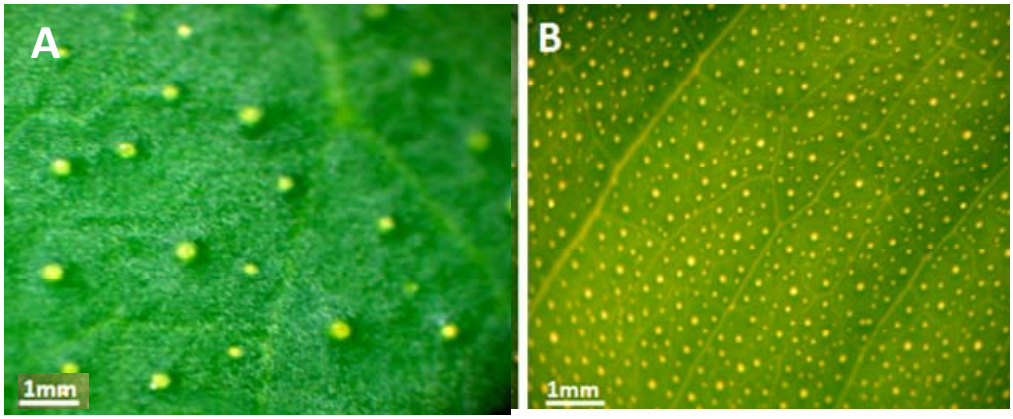
القای تتراپلوئیدی در گیاه لیموترش: نتایج حاصل از تجزیه فلوسایتومتری در گیاه لیموترش نشان داد که غلظتهای ۰/۶، ۱ و ۱/۴ درصد محلول کلشی‌سین به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد سبب تولید گیاهان لیموترش تتراپلوئید می‌شوند. غلظت ۱/۴ درصد کلشی‌سین دارای بیشترین اثر در تحریک پلی‌پلوئیدی و تولید گیاهان تتراپلوئید در لیموترش بود (جدول ۱).

تأثیر تتراپلوئیدی بر میزان فنل و فلاونوئید کل: براساس نتایج حاصله، در گیاه لیموترش، افزایش سطح پلوئیدی تأثیر معنی‌داری ($P \leq 0.05$) در میزان فنل و فلاونوئید کل گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید نداشت (جدول ۲).

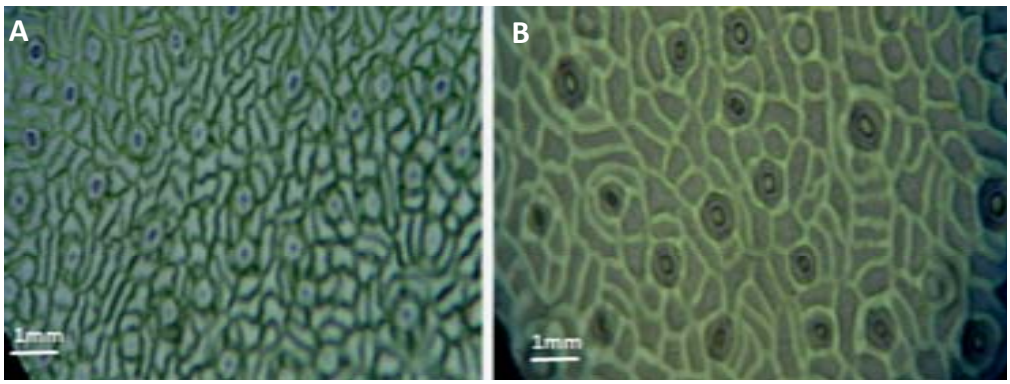
جدول ۲- مقایسه میانگین برخی از ویژگیها در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید گیاه لیموترش (میانگین و خطای استاندارد (SE) برای هر یک از صفات مشخص شده است). حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد است.

ویژگیهای بررسی شده	گیاهان تتراپلوئید	گیاهان دیپلوئید
	میانگین ± SE	میانگین ± SE
طول روزنه(μm)	۱۹/۴۴±۰/۵۵[a]	۱۱/۶±۰/۳۳[b]
عرض روزنه(μm)	۱۷/۱±۰/۶۳[a]	۹/۱±۰/۲۳[b]
تراکم روزنه(μm^2)	۰/۰۰۰۴±۰/۲۴[b]	۰/۰۰۳±۰/۴[a]
ضخامت کلی برگ(μm)	۲۲۰/۸±۲/۱[a]	۱۶۶/۴±۱/۱[b]
ضخامت بافت اسفنجی(μm)	۱۶۳/۴±۱/۵۶[a]	۱۳۷/۹±۱/۶[b]
ضخامت بافت نرده‌ای(μm)	۵۶/۱±۰/۶۷[a]	۲۷/۳±۰/۶۱[b]
مساحت کیسه ترشحی(μm)	۱۸۸۴±۱۶۹/۸[a]	۴۷۱±۶۴/۰۹[b]
تراکم کیسه ترشحی (μm^2)	۰/۰۴±۰/۰۱[b]	۰/۰۹±۰/۰۴[a]
میانگین ارتفاع(cm)	۳/۶±۰/۰۹[b]	۱۴/۴±۰/۰۹[a]
میزان فلاونوئید کل(μg/ml)	۲۹/۴±۱/۵[a]	۲۶/۲±۰/۵[a]
میزان فنل کل (mg/l)	۱۰۲/۹±۳/۹[a]	۱۰۲/۷±۵/۱[a]

تأثیر تتراپلوئیدی بر سایر خصوصیات ارزیابی شده: بررسی و مقایسه خصوصیات گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید لیموترش در سطح احتمال ۰/۰۵ درصد ($P \leq 0.05$) نشان داد که افزایش سطح پلوئیدی سبب افزایش ضخامت کلی برگ، بافت اسفنجی و بافت نرده‌ای در گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید شد. همچنین دو برابر کردن کروموزومها سبب افزایش مساحت کیسه ترشحی و کاهش تراکم آن در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید شد (شکل-۱). در برگ گیاهان تتراپلوئید به طور معنی‌داری اندازه طول و عرض روزنه افزایش ولی تراکم روزنه کاهش یافت (شکل ۲). در بررسی و مقایسه ارتفاع بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید مشاهده شد که گیاهان تتراپلوئید به طور معنی‌داری کوتاهتر از گیاهان دیپلوئید بودند (جدول ۲).



شکل ۱- مقایسه اندازه و تراکم کیسه‌های ترشحی برگ گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید: A- گیاه دیپلوئید B- گیاه تتراپلوئید.



شکل ۲- مقایسه اندازه و تراکم روزنه گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید: A- اندازه و تراکم روزنه گیاه دیپلوئید B- اندازه و تراکم روزنه گیاه تتراپلوئید

بحث

تولید گیاهان تتراپلوئید: در مطالعه توسط Dutt و همکاران (2009) روی *Citrus reticulate* با روش تیمار بر روی سوسپانسیون سلولی به‌عنوان یک روش جدید، حداکثر بازدهی ۳۵ درصد مشاهده گردید (۷). همچنین در مطالعه Sun و همکاران (2009) روی گلابی، با استفاده از روش‌های کشت درون شیشه، حداکثر تولید گیاهان تتراپلوئید ۶/۱ درصد گزارش شد (۶). در پژوهش حاضر، از روش تیمار بر روی مریستم انتهایی در مرحله دو برگ حقیقی استفاده شد که براساس نتایج حاصله، بالاترین بازدهی انگیزش پلوئیدی در لیموترش برابر ۴۸/۶ درصد بود. درصد بالای تولید گیاهان تتراپلوئید در این مطالعه نشان‌دهنده برتری این روش بر روش‌هایی است که اساس آنها تیمار گیاهان با استفاده از کلشی‌سین در مراحل تولید بذر، برگهای لپه‌ای و یا روش‌های کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. بازدهی تولید گیاهان تتراپلوئید در گیاه بابونه کبیر که از روش تیمار مریستم انتهایی در مرحله برگهای حقیقی انجام شد، ۸۸/۱ درصد بود (۱).

بررسی میزان فنل و فلاونوئید کل در گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید: گیاهان پلی‌پلوئید توانایی افزایش تولید و انباشتگی متابولیت‌های ثانویه را دارند (۳) که این عمل سبب افزایش مقاومت در برابر تنش‌های غیر زیستی در گیاهان می‌شود (۱۵). در گیاه لیموترش افزایش سطح پلوئیدی تأثیری در میزان فنل و فلاونوئید گیاهان تتراپلوئید

نسبت به گیاهان دیپلوئید نداشت. بنابراین می‌توان گفت افزایش تعداد کروموزومها بر روی میزان فنل و فلاونوئید لیموترش اثری نداشته است. این نتیجه مطابق با نتایج لوی (۱۹۷۶) در گیاه *Phlox drummondii,* می‌باشد که نشان داد میزان فلاونوئید در گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید تفاوت معنی‌داری نداشت (۱۴). در گیاه گل اطلسی القای پلوئیدی سبب افزایش دو نوع فلاونول شد، اما میزان فلاونوئید کل بین گیاه تتراپلوئید و دیپلوئید این گونه نیز تفاوت معنی-داری نداشت (۱۰). بنابراین می‌توان استدلال کرد که گیاه مورد تیمار و گونه آن در میزان تغییر متابولیتهای ثانویه در اثر القای پلوئیدی مؤثر است. افزایش تعداد کروموزومها و مقدار ژنهای وابسته می‌تواند در بعضی موارد بیان و غلظت متابولیت‌های ثانویه و مواد شیمیایی دفاعی را افزایش دهد، با این حال این مورد در همه گیاهان صادق نیست و ممکن است در بعضی موارد ارتباط مشخصی بین مقدار ژن، خاموش شدن ژن و بیان متابولیتهای ثانویه وجود نداشته باشد (۲۴).

تأثیر تتراپلوئیدی بر سایر صفات ارزیابی شده: در پژوهشی که موریلون و همکاران (۲۰۱۱) بر روی *Citrus limonia Osbeck* انجام دادند، دریافتند که برگهای گیاهان تتراپلوئید به دلیل داشتن پارانشیم نرده‌ای و پارانشیم اسفنجی ضخیم، و سلول‌های اپیدرمی و فضاهای بین سلولی بزرگ در پارانشیم اسفنجی بطور قابل توجهی ضخیم‌تر از برگهای گیاهان دیپلوئید بودند (۱۶). در پژوهش حاضر نیز برگهای گیاهان تتراپلوئید لیموترش بطور قابل توجهی ضخیم‌تر از برگهای گیاهان دیپلوئید بودند. همچنین بافت اسفنجی و بافت نرده‌ای برگ گیاهان تتراپلوئید لیموترش بطور معنی‌داری ضخیم‌تر از برگهای گیاهان دیپلوئید بود. سلولهای تتراپلوئید با داشتن حجم بیشتر نسبت به سلولهای دیپلوئید، باعث ضخیم‌تر شدن بافت‌ها و بزرگ شدن اندازه اندام‌های گیاه می‌شوند (۱۸).

براساس نتایج حاصل از این پژوهش، طول و عرض روزنه گیاهان لیموترش تتراپلوئید به طور میانگین دو برابر طول و عرض روزنه گیاهان لیموترش دیپلوئید بود. همچنین تراکم روزنه بطور معنی‌داری در گیاهان تتراپلوئید لیموترش کمتر از گیاهان دیپلوئید لیموترش بود که این می‌تواند به علت افزایش اندازه سلولها در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید و در نتیجه کاهش تراکم روزنه در واحد سطح باشد. این نتایج مشابه با نتایج Ye و همکاران (۲۰۰۹) روی گیاه *Lagerstroemia indica L.* است که گزارش کردند میانگین اندازه طول و عرض روزنه در گیاهان تتراپلوئید به طور معنی‌داری بیشتر از میانگین اندازه طول و عرض روزنه در گیاهان دیپلوئید بود (۲۶). بررسی کیسه‌های ترشحی نشان داد که کیسه‌های ترشحی گیاهان تتراپلوئید بزرگتر از دیپلوئید بوده و تراکم آنها در برگ گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید کاهش یافت. از آنجایی‌که کیسه‌های ترشحی از طریق تحلیل رفتن یک یا چند سلول در لابه‌لای سلولها ایجاد می‌شود، بزرگتر بودن کیسه‌های ترشحی گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید، می‌تواند ناشی از بزرگتر بودن سلولهای گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید باشد. البته افزایش اندازه کیسه‌های ترشحی و کاهش تراکم آنها در گیاهان تتراپلوئید برای اولین بار گزارش می‌شود.

در پژوهش حاضر القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان لیموترش سبب کاهش معنی‌دار ارتفاع نسبت به گیاهان دیپلوئید شده است که مطابق با نتایجی است که در انگیزش پلی‌پلوئیدی در *Zizyphus jujuba* بدست آمد، به‌طوری‌که گیاهان تتراپلوئید بصورت معنی‌داری کوتاهتر از گیاهان دیپلوئید بودند(۱۱). کاهش ارتفاع در گیاهان تتراپلوئید احتمالاً به علت سمیت بالای کلشی‌سین و احتمالا تأثیر منفی آن روی فعالیت‌های فیزیولوژیکی ازجمله تولید و فعالیت هورمونهای رشد گیاه است. در مطالعات انجام شده روی چند گیاه دارویی از جمله *Astragalus memberanaceus* دلیل رشد آهسته گیاهان تتراپلوئید را اثر تخریبی

فیزیولوژیکی کلشی‌سین در کاهش سرعت تقسیم سلولی دانسته‌اند (۵). القای پلی‌پلوئیدی ضمن افزایش میزان DNA الگو، با تحریک مکانیسم‌هایی در سلول نسخه‌برداری و ترجمه را تحت تأثیر قرار داده و با افزایش یا کاهش بیان و یا حتی خاموشی ژنها، بسیاری از صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک گیاه را تغییر می‌دهد (۲). البته برای اطمینان از تأثیرات مذکور، تحقیقات بیشتری در این رابطه ضروریست. بنابراین، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تیمار کلشی‌سین سبب افزایش معنی‌دار ضخامت برگ، بافت نرده‌ای و اسفنجی، افزایش اندازه و کاهش تراکم روزنه در گیاهان تتراپلوئید لیموترش در مقایسه با گیاهان دیپلوئید شد. همچنین افزایش سطح پلوئیدی بطور معنی‌داری سبب کاهش ارتفاع گیاهان و افزایش اندازه کیسه‌های ترشحی برگ و کاهش تراکم آنها در واحد سطح شد. گرچه افزایش سطح پلوئیدی، تأثیر معنی‌داری در میزان فنل و فلاونوئید کل در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید لیموترش نداشت.

سپاسگزاری

از زحمات ارزشمند سرکار خانم دکتر فائزه قناتی (دانشیار محترم دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس)، کارکنان محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال، به‌ویژه آقای دکتر علیرضا ترنگ و آقای مهندس علی صیاد رمضانی و کارشناسان محترم دانشکده علوم دانشگاه گیلان به‌ویژه آقای مهندس سید ابوالقاسم ناصر علوی و خانم‌ها مهندس فاطمه جمال امیدی، مهوش هادوی و زهرا شایگان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱. سحرخیز، م. ج.(۱۳۸۵) تأثیر برخی عوامل اقلیمی و سطوح پلوئیدی بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه داورویی و زیتنی بابونه کبیر، رساله دکترا، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

2. Adams, K. L and Wendel, J.F. (2005). Novel patterns of gene expression in polyploidy plants. Trends in Genetics, 10 (21): 539-543.
3. Berkow S. (2001) Size and alkaloid content of seeds in induced autotetraploids of Datura innoxia, Datura stramonium and *Hyoscyamus niger*. Pharmaceutical Biology, 39(5): 329–331.
4. 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.
5. 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.
6. Dhooghe, E. (2010). Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ culture, 104 (3): 359-373.
7. Dutt M. (2010). In vitro production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures. Euphytica, 173: 235-242.
8. Eeckhaut T, Werbrouck S, Leus L, Van Bockstaele E, Debergh P. (2004). Chemically induced polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ culture, 78:241–246.
9. Esen A, Soost RK (1973). Seed development in Citrus with special reference to 29 9 49 crosses. American Journal of Botany 60: 448–452.
10. Griesbach. R, Kam. K, (1995). The effect of inducted polyploidy on the flavonols of Petunia 'Mitchell. Phytochemistry, 42 (2): 361-363.
11. Gu XF, Yang AF, Meng H, Zhang JR (2005). In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. Cv. Zhanhua. Plant Cell Report, 24: 671–676.
12. Hancock, J. F. (1997). The Colchicine story. Hortscience, 32: 1011–1012.
13. Hartwell, L. H., Hood, L., Goldberg, M. L., Reynolds, A. E., Silver, L. M. & Veres, R. C. (2004).Genetics from genes to genomes, (2nd ed.). McGraw Hill, Boston. Pp. 324.
14. Levy, M. (1976). Altered glycoflavone expression in induced autotetraploids of *Phlox drummondii*. Biochemical Systematics and Ecology. 4 (4): 249 - 254.
15. Liu H, Zhang S, Wang H. (2002). Breeding an autotetraploid hybrid non-heading Chinese cabbage cultivar Shuyou No. 11 with green

stalk, high quality and heat- resistance. Journal of Nanjing Agricultural University, 25: 22–26.

16. Morillon R, (2011). Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. Journal of Experimental Botany, 62: 2507–2519.
17. Predieri S (2001). Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell Tissue Organ Culture, 64: 185–210.
18. Rauf, S., H.E. Munir, J. Abdullo and S.M. Basra, (2006).Role of colchicine and plant growth regulators to overcome interspecific incompatibility. General and Applied Plant Physiology, 32: 223-232.
19. Reforgiato Recupero G, Russo G, Recupero S (2005). New promising citrus triploid hybrids selected from crosses between monoembryonic diploid female and tetraploid male parents. Horticulture Science 40: 516–520.
20. Sanford JC (1983). Ploidy manipulations. In: Moore JN, Janick J (eds) Methods in fruit breeding. Purdue University Press, West Lafayette, pp 100–123.
21. Sun QR, Sun HS, Li LG, Bell RL (2009). In vitro colchicine-induced polyploid plantlet production and regeneration from leaf explants of the diploid pear (*Pyrus communis* L.) cultivar 'Fertility'. Journal Horticultural Science and Biotechnology, 84 (5): 548–552.
22. Ting, S.V., and Attaway, J.A. (1971). Citrus fruits. In 'The biochemistry of fruits and their products.' Vol. 2. A.C. Hulme ed., Academic Press, New York. pp. 107–179.
23. Ting, S.V., and Deszyck, E.J. (1961). The carbohydrates in the peel of oranges and grapefruit. J. Food Science. 26: 146–152.
24. Thomas G. Ranney. (2006). Polyploidy: From Evolution to New Plant Development. Combined Proceedings International Plant Propagators Society, 56: 137-142.
25. Yelenosky, G. (1985). Cold hardiness in Citrus. Horticultural Reviews, 7: 201–238.
26. Ye. Y.M. (2009). Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Scientia Horticulturae, 124 (1): 95–101.
27. Zhang J, Zhang M, Deng X (2007). Obtaining autotetraploids in vitro at a high frequency in *Citrus sinensis*. Plant Cell, Tissue and Organ culture, 89:211–216.

The effect of polyploidy on some anatomical and antioxidant characteristics of *Citrus ourantifulia*

Afshar Mohammadian M.[1], Omidi Z.[1], Purakbari kasmaei R.[1] and Asadi Abkenar A.[2]

[1] Biology Dept., Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, I.R. of Iran

[2] Institute of Biotechnology, Guilan, Rasht, I.R. of

Abstract

Among polyploids, triploids produce seedless fruits. Triploids are produced through combining diploid and tetraploid plants. Reduction of seeds in citrus fruits will increase the customer's tendency. Tetraploids are the important prerequisite to create seedless triploid citrus fruits. In this research, colchicine was used to generate tetraploid lemon which is necessary for triploid production. The effect of colchicine at 0.2, 0.6, 1 and 1.4 percent were examined at apical meristem of lemon seedlings. To determine the ploidy level of the plants, two methods are used including flow cytometriy, and analysis of size and density of stomata. In addition, some characteristics such as plant height, secretory sacs size and density, leaf area and thickness, spongy parenchyma thickness, as well as the level of total phenol and flavonoid among tetraploid and diploid seedling of *Citrus aurantifolia* have been compared. The highest ploidy level in *C. aurantifolia* was 48.6 percent. Ploidy induction led to decrease the height of *C. aurantifolia*. Comparison of secretory sac and stomata of treated plants showed that the density of secretory sac and stomata decreased in tetraploid plants compared with diploid ones. However, in tetraploid plants the size of secretory sacs and stomata were significantly larger than diploid ones. Doubling of chromosom increased the thickness of leaves, spongy and palisade parenchyma. Increasing ploidy level had no significant effect on total phenol and flavonid content of tetraploid *C. aurantifolia*.

Keywords: Polyploidy, Colchicine, *Citrus aurantifolia*