# تاثیر تیمارکلشی سین بر برخی خصوصیات مورفولوژیک پایه ولکامریانا در شرایط کشت درون شیشه‌ای

**اعظم امیری [۱*]، موسی موسوی [۲]**

۱-دانشجوی دکتری باغبانی دانشگاه شهید چمران اهواز ۲- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه شهید چمران اهواز

*نویسنده مسئول: Amiriazam23@yahoo.com

## چکیده

تیمار کلشی‌سین موجب تغییرات مورفولوژیک ودرنهایت تولید یک رقم اصلاح شده می‌گردد.کلشی سین باعث ایجاد اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی سلول می‌شود که این امر سرعت تقسیم سلولی و در نتیجه سرعت رشد و نمو گیاه را در مراحل اولیه تحت تاثیر قرار می‌دهد. به همین منظور آزمایشی در محیط کشت درون شیشه‌ای با سه سطح کلشی سین (۰، ۰/۱ و ۰/۳ درصد حجمی – وزنی) و دو زمان (۲۴ و ۴۸ ساعت) در پایه ولکامریانا انجام شد. نتایج نشان داد با افزایش غلظت کلشی سین ارتفاع، سطح برگ، طول و عرض برگ و وزن تر گیاه کاهش می‌یابد. و همینطور با افزایش سطح کلشی سین درصد زنده مانی گیاه کاهش می‌یابد. اما زمان تاثیر معنی‌داری بر پارامترهای فوق نداشت. گیاهان تیمار شده دارای برگ‌های ضخیم و شکل دفرمه بودند.

**کلید واژه ها:** کلشی سین، ولکامریانا، این ویترو

## مقدمه

استفاده از کلشی سین بعنوان روش اصلاحی مورد استفاده قرار می‌گیرد.کلشی‌سین آلکالوئیدی است که از بذرها و پیازهای گل حسرت استخراج می‌شود. کلشی‌سین با جلوگیری از مرحله متافاز مانع وقوع آنافاز می‌گردد در نتیجه تقسیم سلولی بدون تشکیل دیواره سلولی رخ می‌دهد و منجر به دو برابر شدن کروموزوم‌ها در سلول می‌شود(Gu.et. al. 2005). القای پلی پلوئیدی ضمن افزایش میزان الگو، با تحریک مکانیسم‌هایی در سلولDNA نسخه برداری 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(حسینی، ۱۳۹۱). افزایش سطح پلوئیدی در گیاهان سبب ایجاد تغییرات آناتومی و ساختمانی در آن‌ها می‌شود 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 افزایش می‌یابد(Omidbaigi. et. al. 2010) انگیزش پلی‌پلوئیدی علاوه بر اندازه برگ در بسیاری از موارد بر رنگ، شکل، ضخامت، تعداد و اندازه دندانه‌های برگ تاثیر می‌گذارد (حسینی، ۱۳۹۱). تغییر صفات مورفولوژیک در مرکبات به منظور تولید ارقام مقاوم به استرس‌های محیطی و همینطور جهت تولید پایه‌های با کارایی بالا جهت پیوند می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد به همین سبب در این پژوهش اثر کلشی سین بر صفات مورفولوژیک در پایه لیموی ولکامریانا بعنوان پایه متداول مرکبات در جنوب غرب کشور در شرایط کشت درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

این پژوهش در بهار۱۳۹۳ در آزمایشگاه کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شد. این آزمایش بصورت فاکتوریل(۳×۳) بصورت کرت‌های موهومی در سه سطح کلشی‌سین و سه زمان انجام گردید. پس از ضدعفونی بذور در فضای زیر هود استریل، پوشش‌های خارجی و داخلی بذور برداشته و درون شیشه حاوی محیط موراشیگ- اسکوک، کشت گردیدند. بذور پس از جوانه زدن از محیط اولیه خارج و غلظت کلشی‌سین بر آن‌ها اعمال شد. تیمار کلشی‌سین شامل غلظت‌های ۰، ۰/۱ و ۰/۳ درصد وزنی- حجمی بود. برای استریل کردن محلول استوک کلشی‌سین از سرنگ از فیلتر ۲۲ صدم میکرون رد شد. برای زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نیز بذور در

غلظت‌های مختلف کلشی سین روی شیکر با ۱۰۰ دور در دقیقه به منظور بهبود فرآیند آبگیری قرار گرفت و در محیط اصلی کاشته شده-اند. سه ماه پس از کشت گیاهان رشد کرده در شرایط این ویترو جمع آوری و صفات زیر در آن‌ها مورد بررسی قرا ر گرفت. طول شاخساره بر حسب میلی متر و با استفاده از خط کش میلی‌متری از قسمت طوقه تا انتهای ساقه در هنگام برداشت اندازه‌گیری شد. وزن تر با ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. سطح برگ بر حسب میلی‌متر و با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ ساخت ژاپن اندازه‌گیری شد. طول و عرض برگ با خط کش میلی‌متری اندازه گیری شد.

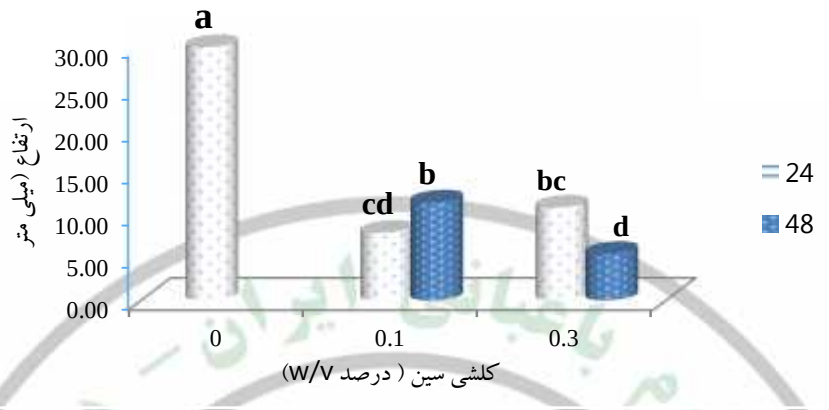
## نتایج و بحث

بررسی شکل برگ (شکل۱) نشان داد برگ‌های گیاهان تیمار شده از نظر اندازه دارای طول و عرض کمتری نسبت به گیاهان تیمار نشده بودند. علاوه بر این، برگ‌های گیاهان تیمار شده چین خورده، ضخیم‌تر و ناصاف بودند. با نتایج تیمار کلشی سین در لیموترش مطابقت داد (افشار محمدیان و همکاران، ۱۳۹۲). انگیزش پلوئیدی در گیاه دارویی بنگدانه نیز سبب تولید گیاهان دارای برگ‌های دفرمه، قطور و به رنگ سبز تیره شد(Meng. et. al., 2011).سلول‌های تتراپلوئید با داشتن حجم بیشتر نسبت به سلول‌های دیپلوئید، باعث ضخیم‌تر شدن بافت‌ها و بزرگ شدن اندازه اندام‌های گیاه می‌شوند(Reforgiato., et. al. 2005).

شکل۱ : الف: گیاه شاهد ب: گیاه تیمار شده

نمونه‌ها در تیمار فاقد کلشی سین زنده بودند درحالیکه در تیمارهای کلشی سین درصد بالایی از مرگ و میر نمونه‌ها مشاهده گردید، به طوری که این میزان در۰/۳ درصد کلشی سین به حدود ۷۰ درصد رسید. در تیمارهای واقع رابطه معکوس بین غلظت کلشی سین و بقاء ریزنمونه‌ها در این آزمایش مشاهده شد که با سایر بررسی های انجام شده روی گیاهان مختلف در شرایط طبیعی و درون شیشه‌ای مطابقت داشت(Chen & Gao, 2007). همچنین در گزارش‌های ارائه شده توسط Gu و همکاران (۲۰۰۵) مشاهده شد که با افزایش غلظت ماده کلشی سین در گیاهان تیمار شده جوجوبا درصد مرگ و میر افزایش یافت. کلشی سین یک ماده شیمیایی بسیار سمی است که غلظت بالا و مدت طولانی مواجه سازی با آن با درصد بالای مرگ و میر و ممانعت از رشد بیشتر ریزنمونه‌ها همراه است ( Jain & Srivastava, 2007). مقایسه میانگین‌ها نشان داد با افزایش غلظت کلشی سین ارتفاع گیاه به طور معنی‌داری کاهش یافت. اثر متقابل کلشی سین و مدت زمان کاربرد نیز نشان داد اگرچه بیش‌ترین ارتفاع در غلظت ۰/۳ درصد کلشی‌سین در زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد. در غلظت ۰/۱ درصد بیش‌ترین ارتفاع در زمان ۴۸ ساعت مشاهده گردید (شکل ۱). تیمار کلشی سین در گیاهان لیموترش سبب کاهش معنی‌دار ارتفاع نسبت به گیاهان دیپلوئید گردید. کاهش ارتفاع در گیاهان به علت سمیت بالای کلشی سین و احتمالاً تأثیر منفی آن روی فعالیت‌های فیزیولوژیکی ازجمله تولید و فعالیت هورمون‌های رشد گیاه گزارش شده است(Chen & Gao, 2007). مقایسه میانگین‌ها نشان داد با افزایش غلظت کلشی سین وزن‌تر اندام هوایی به طور معنی‌داری کاهش یافت. به گونه‌ای که کمترین وزن تر اندام

هوایی مربوط به غلظت ۰/۳ درصد (۰/۱۷ گرم ) بود که نسبت به تیمار شاهد (۰/۷۲ گرم )کاهش نشان داد ( جدول ۱) نتایج همچنین نشان داد مدت زمان کاربرد اثر معنی‌داری بر وزن تر اندام هوایی داشت به طوریکه بیش‌ترین وزن تر اندام هوایی مربوط به زمان ۲۴ ساعت (۰/۳۸ گرم) بود(جدول۱).




شکل ۱: اثر کاربرد کلشی سین بر ارتفاع در لیموی ولکامریانا در زمان‌های مختلف

جدول۱- اثر کاربرد کلشی سین برصفات مورفولوژیک در لیموی ولکامریانا در زمان‌های مختلف

| کلشی سین (درصد) | زمان (ساعت) | درصد زنده مانی | وزن تر(گرم) | سطح برگ ($mm^2$) | عرض برگ (mm) | طول برگ (mm) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ۲۴ | ۶۶/۷$^{a}$ | ۰/۷۶$^{a}$ | ۳۸۸۶$^{a}$ | ۲۵$^{a}$ | ۳۸$^{a}$ |
| ۰ | ۴۸ | – | – | – | – | – |
| ۰/۱ | ۲۴ | ۵۵/۵۷$^{ab}$ | ۰/۲۱$^{b}$ | ۵۵۶/۱$^{b}$ | ۸$^{b}$ | ۱۹/۳$^{b}$ |
| | ۴۸ | ۵۵/۵۰$^{ab}$ | ۰/۱۳$^{b}$ | ۵۱۳/۵$^{b}$ | ۷/۶$^{b}$ | ۱۷/۵$^{b}$ |
| ۰/۳ | ۲۴ | ۴۴/۴۰$^{ab}$ | ۰/۱۸$^{b}$ | ۱۷۲/۳$^{b}$ | ۴/۸$^{b}$ | ۱۵$^{bc}$ |
| | ۴۸ | ۳۳/۳۰$^{b}$ | ۰/۱۵$^{b}$ | ۱۰۹/۸$^{c}$ | ۳/۰$^{b}$ | ۸/۶$^{c}$ |
| | | | میانگین کلشی سین | | | |
| ۰ | | ۶۶/۷$^{A}$ | ۰/۷۲$^{A}$ | ۴۴۵۱/۰$^{A}$ | ۲۲/۵$^{A}$ | ۳۶/۸$^{A}$ |
| ۰/۱ | | ۵۵/۵$^{AB}$ | ۰/۱۷$^{B}$ | ۵۳۴/۸$^{B}$ | ۷/۸۳$^{B}$ | ۱۸/۴$^{B}$ |
| ۰/۳ | | ۳۸/۸$^{B}$ | ۰/۱۷$^{B}$ | ۱۴۱/۶$^{C}$ | ۳/۹$^{B}$ | ۱۱/۸$^{B}$ |
| | | | میانگین زمان | | | |
| | ۲۴ | ۵۵/۵$^{A}$ | ۰/۳۸$^{A}$ | ۱۶۴۶$^{A}$ | ۱۲/۶$^{A}$ | ۲۴/۱۱$^{A}$ |
| | ۴۸ | ۵۱/۸$^{A}$ | ۰/۳۲$^{B}$ | ۱۵۰۳$^{A}$ | ۱۰/۲$^{AB}$ | ۲۰/۱۱$^{A}$ |

در هر ستون و ردیف میانگین‌هایی با حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ آزمون حداقل اختلاف معنی داری (LSD) ندارند.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد با افزایش غلظت کلشی سین سطح برگ به طور معنی‌داری کاهش یافت. به گونه‌ای که کمترین سطح برگ مربوط به غلظت ۰/۳ درصد (۱۴۱/۶ میلی‌متر مربع) بود که نسبت به تیمار شاهد (۴۴۵۱ میلی‌مترمربع) کاهش سه برابری نشان داد (جدول

۱). نتایج حاصل از این پژوهش در ارتباط با سطح برگ با تیمار کلشی‌سین در گیاه لیموترش مشابه بودکه سبب کاهش سطح برگ و نسبت طول عرض گیاه تیمار شده نسبت به گیاه شاهد شد (افشارمحمدیان و همکاران.، ۱۳۹۲). کاهش سطح برگ و همچنین کوهتاتر شدن گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان دیپلوئید، می‌تواند سبب افزایش مقاومت این گیاهان در برابر عوامل نامساعد محیطی از جمله نور و بادهای شدید، خصوصاً در مناطق کوهستانی می‌شود (حسینی، ۱۳۹۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد با افزایش غلظت کلشی سین طول برگ به طور معنی‌داری کاهش یافت. به گونه‌ای که کمترین طول برگ مربوط به غلظت ۰/۳ درصد (۱۱/۸ میلی‌متر) بود که نسبت به تیمار شاهد (۳۶/۸ میلی‌متر) کاهش نشان داد(جدول ۱). نتایج تجزیه واریانس برای عرض برگ نیز مشابه به طول برگ بود (جدول ۱). بطوریکه با افزایش غلظت کلشی سین عرض برگ نیز کاهش یافت. و کمترین عرض برگ در غلظت ۰/۳ درصد کلشی سین (۳/۹ میلی‌متر) بود که نسبت به تیمار شاهد (۲۲/۵ میلی‌متر) کاهش نشان داد (جدول ۱). در لیمو ترش نیز تیمار کلشی سین باعث تولید برگ گیاهانی با طول و عرض کمترشده است (افشار محمدیان وهمکاران، ۱۳۹۲). اما در پایه‌های مرکبات بررسی شده برگ گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید طول و عرض بیشتری نشان دادند(.Allario.et. al., 2011).

**منابع**


۱. افشار محمدیان، م.، امیدی، ز. پوراکبری، ر. و اسدی آبکنار، ا. ۱۳۹۲ بررسی تأثیر پلی‌پلوئیدی بر برخی ویژگی‌های آناتومیکی و ترکیبات آنتی اکسیدانی گیاه لیموترش. مجله پژوهش‌های گیاهی. ۲۶ (۳).۲۳۸-۲۴۶.

۲. حسینی، ح، ر.، چهرازی، م. محمودی سروستانی ، م. و نباتی احمدی، ا. ۱۳۹۱. مطالعه اثر تیمار کلشی سین بر القاء اتوپلوئیدی در گل پروانش *(Catharanthus reseus)* ارقام rosea و alba. پایانامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز. ۱۵۰ صفحه.

3. :Allario. T., Brumos, J. Colmenero- flores, J.M. Tadeo, F. Froelicher, Y. Talon, M. Navarro, L. Ollitrault, P. and 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, v.62, p.2507-2519.
4. 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.
5. Gu. X.F. Yang, A.F. Meng, H. and Zhang, J.R. 2005. In vitro induction of tetraploid plants from diploid Zizyphus jujuba Mill. cv. Zhanhua. Plant Cell Reports, 24: 671-676.
6. Jain. R. C. and Srivastava, R. 2007. Factorial experiments – some variations. I.A.S.A.I. Library Avenue, New Delhi- 110012. pp: 389- 392.
7. Lavania. U. C. and Srivastava, S. 1991. Enhanced productivity of tropane alkaloids and fertility in artificial autotetraploids of Hyoscyamus niger L. Euphytica. 52: 73-77.
8. Meng. HB, Jiang, S. Hua, SJ. Lin, XY. Li, YL. Guo, WL. Jiang, LX. 2011. Comparison between a tetraploid Turnip and its diploid progenitor (Brassica rapa L.): The adaptation to salinity stress. Agr Sci China 10(3): 363-375.
9. Reforgiato Recupero. G., Russo, G. and Recupero, S. 2005. New promising citrus triploid hybrids selected from crosses between monoembryonic diploid female and tetraploid male parents. Horticulture Science 40: 516-520.
10. Omidbaigi. R., Mirzaeea, M. Hassani, ME. and Yavari.S. 2010. Induction of autotetraploidy in dragonhead (Dracocephalum moldavica L.) by colchicine treatment. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research 18 (1):23-35.

# Effect of Colchicine Treatment on Morphologic characteristics in (citrus volkameriana) in vitro conditions

**A. Amiri[1*], M. Mousavi[2]**

1:PhD student of Horticultural Science, Shahid Chamran University of Ahvaz. 2: Associate Professor, Shahid Chamran University of Ahvaz.

*Corresponding author: Amiriazam23@yahoo.com

**Abstract**

Chromosome duplication and polyploidization may affect plant morphology and breeding systems, ultimately enabling the production of improved genotypes.Colchicine can disrupt the physiological processes which result in cell growth and cell division and thus affects plant development in the early stages. An experiment Done in the in vitro with colchicine levels (0, 1.0 and 0.3% v/w) and two times (24 and 48) in order to allow in volkameriana. The results showed that with increasing concentration of colchicine height, leaf area, leaf length and width and plant fresh weight decreases. As well as plant survival rate decreases with increasing levels of colchicine. But time did not have a significant impact on the above parameters.

**Key words:** colchicine, volkameriana, in vitro