اثر کلشی‌سین بر برخی از صفات بیومورفولوژیکی و سیتوژنتیکی دو ژنوتیپ گل همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.)

سکینه علوی پور جلیعه[1]، مهرانگیز چهرازی[*2]
[1*] دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز
[2] دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز
[*]نویسنده مسئول:chehrazi_m@yahoo.com

چکیده

گل همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) یکی از گیاهان زینتی و دارویی بسیار مهم می‌باشد که افزایش تنوع ژنتیکی در این گیاه امری ضروری به نظر می‌رسد. به منظور ارزیابی تاثیر تیمار کلشی سین بر برخی ویژگی‌های بیومورفولوژیکی و سیتوژنتیکی دو ژنوتیپ گل زرد و نارنجی همیشه‌بهار در طی دوره رشد گیاهی، آزمایش فاکتوریل به صورت کرت‌های موهومی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا گردید. اسپری چهار غلظت مختلف کلشی سین ۰، ۰/۰۲، ۰/۰۴ و ۰/۰۶ در صد، در دو مرحله برگ لپه‌ای و دو برگ حقیقی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که با افزایش غلظت کلشی‌سین، درصد القاء پلی‌پلوئیدی، تعداد برگ، قطر ساقه، میزان کلروفیل a و b و کلروفیل کل (a+b) به طور معنی‌داری افزایش یافت. در حالی که صفاتی همچون طول ریشه، ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، سطح برگ و در صد زنده‌مانی کاهش یافت. بررسی اثر برهمکنش غلظت کلشی سین و مرحله اسپری برگی نشان داد که بالاترین میزان مرگ و میر در مرحله اسپری برگ لپه‌ای و در بالاترین غلظت (۰/۰۶٪) مشاهده شد. با افزایش غلظت کلشی سین آثار سوختگی و مرگ و میر گیاه افزایش یافت. اگرچه اسپری در مرحله دو برگ حقیقی به صورت معنی‌داری بر ویژگی‌های رشدی گیاه مؤثر بود اما اسپری در مرحله برگ‌لپه‌ای باعث کاهش زنده‌مانی و رشد گیاهان تیماری شد. به طور کلی با توجه به مطالعات فلوسایتومتری، غلظت ۰/۰۴ در صد کلشی سین در مرحله دو برگ حقیقی، مناسب‌ترین ترکیب تیماری برای القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه همیشه‌بهار بود.

کلمات کلیدی: مورفولوژیکی، کلروفیل، فلوسایتومتری، کلشی‌سین

مقدمه

گل همیشه‌بهار با نام علمی *Calendula officinalis*L.، گیاهی یک ساله، متعلق به خانواده Asteraceae، به ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر و بومی مناطق مدیترانه‌ای است (Waren, 1997). این گیاه علاوه بر استفاده زینتی به صورت گل بریدنی و حاشیه‌ای و به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی به عنوان گیاهی دارویی بسیار مهم نیز شناخته شده است (Khalid and Silva, 2010). گزارشات حاکی از آن است که یکی از روش‌های به‌نژادی مورد استفاده در بسیاری از گیاهان القای پلی‌پلوئیدی می‌باشد. برای القاء پلی‌پلوئیدی از مواد مختلفی مثل کلشی‌سین استفاده می‌شود. این ترکیب مانع از تشکیل رشته‌های دوک در مرحله متافاز و قبل از آنافاز سلولی شده و در نتیجه منجر به دو برابرشدن تعداد کروموزوم‌ها در سلول می‌شود. کلشی‌سین در مقایسه با مواد جهش‌زای دیگر تغییرات مورفولوژیکی بیشتر و شدت موتاسیون بالاتری ایجاد می‌کند (حسینی و همکاران، ۱۳۹۲). این پژوهش با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین در طی زمان‌های خاص بر مریستم انتهایی ساقه دو ژنوتیپ مختلف گل همیشه‌بهار مورد مطالعه قرار گرفت.

IrHC2019

مواد و روش‌ها

این پژوهش در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز به منظور بررسی اثر چهار غلظت مختلف کلشی‌سین ۰، ۰/۰۲، ۰/۰۴ و ۰/۰۶ درصد (Otto, 1992) در دو مرحله برگ لپه‌ای و دو برگ حقیقی و دو ژنوتیپ گل زرد و نارنجی دیپلوئید (۲n=2x=۲۸) شد. در این بررسی از بذرهای نسل F_1 گل زرد و نارنجی کم‌پر همیشه‌بهار بدست‌آمده استفاده شد. ابتدا بذور هر دو ژنوتیپ در سینی‌های کشت محتوی کوکوپیت کشت شدند. در این آزمایش برای هر تیمار ۱۰۰ بذر کشت گردید. سینی‌های کشت در شرایط گلخانه‌ای و با دمای روز ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و میزان رطوبت نسبی ۵±۷۰ درجه نگه‌داری شدند. پس از جوانه‌زنی بذرها، نیمی از گیاهچه‌ها در مرحله برگ لپه‌ای و نیمی دیگر از گیاهچه‌ها در مرحله تشکیل دو برگ‌حقیقی بوسیله غلظت‌های مختلف کلشی سین اسپری شدند. اعمال تیمار اسپری کلشی سین روزی دو بار و در ساعت ۸ صبح و ۱ بعد از ظهر به مدت ۵ روز متوالی انجام گردید. دو هفته بعد از اعمال تیمار در هر مرحله بصورت جداگانه تعداد گیاهان باقی‌مانده شمارش شده و درصد زنده‌مانی گیاهان بدست آمد. سپس گیاهچه‌ها دو هفته بعد از آخرین تیمار در مرحله تشکیل ۶ برگ حقیقی به گلدان‌هایی با قطر ۲۰ سانتی‌متری و عمق ۲۵ سانتی‌متر حاوی بستر کشت ماسه، کود دامی پوسیده و خاک زراعی (۱:۱:۱) منتقل شدند، به طوری که در هر گلدان سه گیاه منتقل گردید. این پژوهش در قالب آزمایش فاکتوریل بصورت کرت‌های موهومی بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. یک ماه پس از انتقال، فاکتورهای موفولوژیکی و بیوشیمیایی شامل تعداد برگ، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه با استفاده از ترازوی دیجیتالی، طول ریشه و ارتفاع گیاه با استفاده از خط‌کش با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر، قطر ساقه با کولیس‌دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر، سطح برگ با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ (DELTA-T SCAN، ساخت کشور ژاپن) بر حسب سانتی‌متر مربع و همچنین مقدار کلروفیل a و b به منظور ارزیابی تاثیر تیمار کلشی سین بر دو ژنوتیپ گل زرد و نارنجی همیشه‌بهار اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری مقدار کلروفیل a وb از روش Arnon (۱۹۴۹) استفاده شد. در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر میزان جذب برای کلروفیل a وb قرائت شد.

به منظور بررسی و تعیین سطح پلوئیدی از دستگاه فلو سایتومتر (Partac PA، ساخت کشور آلمان) مجهز به لامپ HBO و لیزر اشعه ماوراء بنفش و با توجه به روش تغییر یافته Otto (۱۹۹۲) استفاده شد. پس از ثبت و نرمال سازی توزیع داده‌ها در نرم افزار Excell، تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت.

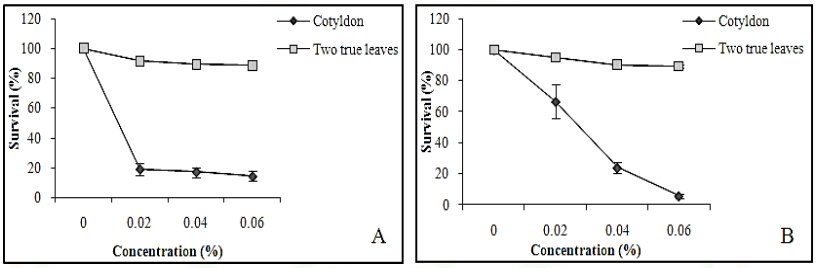
نتایج و بحث

با افزایش غلظت کلشی‌سین در هر دو مرحله برگ لپه‌ای و دو برگ حقیقی، درصد زنده‌مانی گیاهان هر دو ژنوتیپ گل زرد و نارنجی کاهش یافت و در بالاترین غلظت (۰/۰۶ درصد) کمترین درصد زنده‌مانی (۱۴/۲۶ و ۵/۷۱ در مرحله برگ لپه ای و ۸۸/۵۶ و ۸۹/۵۲ در مرحله دو برگ حقیقی به ترتیب در ژنوتیپ های گل زرد و نارنجی) مشاهده شد (شکل ۱).

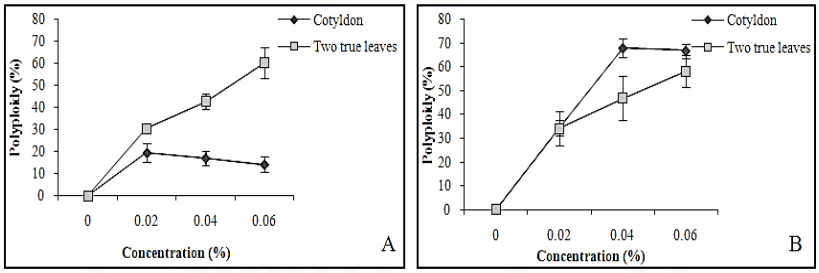
نتایج تجزیه های فلوسایتومتری در این آزمایش نشان داد که با افزایش غلظت کلشی‌سین، درصد القاء پلی‌پلوئیدی نیز به صورت معنی‌داری افزایش یافت، اگرچه در بالاترین غلظت، بیشترین درصد القاء پلی‌پلوئیدی در ژنوتیپ گل زرد (۱۴/۲۶ و ۶۰/۰۷ درصد به ترتیب در مرحله اسپری برگ لپه‌ای و دو برگ حقیقی) بدست آمد (شکل ۲) اما بین غلظت ۰/۰۴ و ۰/۰۶ درصد کلشی‌سین در ژنوتیپ گل نارنجی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و در بالاترین غلظت کلشی‌سین (۰/۰۶ درصد)، درصد القاء پلی‌پلوئیدی ۶۵/۳۳ و ۵۵/۹۸ درصد به ترتیب در مرحله برگ لپه ای و دو برگ حقیقی مشاهده شد (شکل ۲). در مقایسه بین دو مرحله اسپری کلشی سین، اسپری در مرحله دو برگ حقیقی نسبت به مرحله برگ لپه‌ای، درصد زنده‌مانی و القاء پلی‌پلوئیدی بالاتری را نشان داد. مقایسه بین دو ژنوتیپ گل زرد و

IrHC2019

نارنجی نیز حاکی از تفاوت معنی‌دار بین این دو ژنوتیپ در درصد القاء پلی‌پلوئیدی بود (شکل۲). به نظر می‌رسد که اسپری گیاهان در مرحله برگ لپه‌ای به علت حساسیت بالا نسبت به کلشی سین دارای مقاومت کمتری نسبت به مرحله دو برگ حقیقی هستند و این امر باعث از بین رفتن تعداد بسیار زیاد یا توقف رشد شدید بخش وسیعی از جمعیت گیاهی تیمار شده (البته با توجه به غلظت کلشی‌سین میزان مرگ و میر متفاوت بود) در مرحله برگ لپه‌ای شده است، ولی در مرحله دو برگ حقیقی اثر کلشی‌سین تنها بصورت توقف رشد چند هفته‌ای مشاهده شد. بنابراین با توجه به جمعیت باقیمانده گیاهان، ارزیابی سطح پلوئیدی نیز در جمعیتی متفاوتی از تیمارها صورت گرفت و نتایج نشان داد که به صورت همزمان با افزایش غلظت کلشی سین، در صد زنده‌مانی کاهش اما در صد القاء پلی‌پلوئید (4x) افزایش یافته بود. همچنین با توجه به نتایج بدست آمده در دو ژنوتیپ گل زرد و نارنجی می‌توان این گونه اظهار داشت که گیاهان ژنوتیپ گل نارنجی نسبت به ژنوتیپ گل زرد و با توجه به غلظت‌های مختلف کلشی‌سین دارای استعداد القاء پلی‌پلوئیدی بیشتری باشند.



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین بر زنده‌مانی (٪) با توجه به زمان اسپری برگی در ژنوتیپ زرد (A) و ژنوتیپ نارنجی (B)



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین بر القاء پلی‌پلوئیدی (٪) با توجه به زمان اسپری برگی در ژنوتیپ زرد (A) و ژنوتیپ نارنجی (B)

با افزایش غلظت کلشی سین، میزان درصد زنده‌مانی گیاهان کاهش یافت، بدین ترتیب که گیاهان تیمار شده در مرحله برگ لپه‌ای در مقایسه با گیاهان تیمار شده در مرحله دو برگ حقیقی دارای میزان زنده‌مانی بسیار کمتری بودند. این نتایج با یافته‌های بدست آمده توسط دیگر محققان نیز مطابقت داشت (Vatavu *et al.*, 2006؛ Ye *et al.*, 2010). مطابق با نتایج فلوسایتومتری این پژوهش، اسپری در مرحله دو برگ حقیقی و غلظت ۰/۰۶درصد بیشترین میزان درصد پلی‌پلوئیدی را نشان داد. اگر چه تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۰/۰۲، ۰/۰۴ و ۰/۰۶ درصد در صفات بیومورفولوژیکی هر دو ژنوتیپ‌های گل زرد و نارنجی وجود نداشت، اما زمان اسپری کلشی‌سین تفاوت معنی‌داری را سطح ۵٪ نشان داد (جدول ۱).

مطابق با نتایج جدول ۱، گیاهان تیمار شده با اسپری کلشی سین در مرحله برگ لپه‌ای در مقایسه با مرحله دو برگ حقیقی مقاومت کمتری به خاصیت سمی کلشی سین داشتند و این امر باعث از بین رفتن گیاهان تیمار شده در

IrHC2019

غلظت‌های بالا (۰/۰۶٪) اسپری مرحله برگ لپه‌ای شد. با توجه به نتایج این آزمایش به نظر می‌رسد که مرحله اعمال تیمار کلشی‌سین می‌تواند علاوه بر ژنوتیپ گیاهی، به عنوان یک فاکتور موثر در جهت القاء اتوتتراپلوئیدی گیاهان باشد.

با توجه به مرحله رشد گیاهی به نظر می‌رسد که به علت مقاومت بالاتر گیاه همیشه بهار به گیاه سوزی در مرحله دو برگ حقیقی و تنها توقف رشد دو هفته‌ای، باعث کاهش در بسیاری از پارامترهای مورد بررسی از جمله طول ریشه، ارتفاع گیاه، سطح برگ، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، درصد زنده‌مانی و القاء پلی‌پلوئیدی نسبت به گیاه شاهد شد. همان‌گونه که از شکل ۱ استنباط می شود، با افزایش غلظت کلشی سین واکنش‌های تخریبی گیاه افزایش پیدا کرده است، به عبارتی دیگر خاصیت سمیت کلشی‌سین در غلظت‌های بالا باعث از بین رفتن و سوختگی گیاه شد.

جدول ۱- مقایسه میانگین برهمکنش غلظت‌های مختلف کلشی‌سین و زمان اسپری برگی برای صفات بیومورفولوژیکی

صفت مورد بررسی	شاهد	اسپری در مرحله برگ لپه‌ای			اسپری در مرحله دو برگ حقیقی		
		٪۰/۰۲	٪۰/۰۴	٪۰/۰۶	٪۰/۰۲	٪۰/۰۴	٪۰/۰۶
تعداد برگ	۱۱/۴۴c	۷/۵e	۷/۲۵de	۸/۷۵d	۱۲/۵۵b	۱۴/۳۷ab	۱۵/۳۰a
ارتفاع گیاه (cm)	۵/۴۲a	۴/۵۶b	۳/۲۳c	۲/۷۷d	۳/۵۷c	۳/۰۷cd	۲/۶۲d
قطر ساقه (mm)	۳/۵۷b	۴/۱۲bc	۳/۳۲bc	۳/۹۲a	۳/۱۵bc	۳/۴۵b	۴/۱۵a
سطح برگ (cm^2)	۱۵۱/۹a	۱۴۹/۲ab	۱۴۶/۵۶ab	۱۲۹/۵۲ab	۱۵۵/۵۷a	۱۳۸/۸۱ab	۱۲۹/۴۳b
طول ریشه (cm)	۱۹a	۱۰/۹۴b	۷/۶۱c	۷/۱۲c	۱۰/۷۵b	۸/۸۳bc	۸/۳۵c
وزن تر اندام هوایی (g)	۶/۲۶a	۴/۹۱b	۳/۴۱c	۲/۱۵d	۵/۱۷b	۳/۱۹c	۲/۷۴cd
وزن خشک اندام هوایی (g)	۰/۴۴a	۰/۱۹c	۰/۱۸c	۰/۱۶c	۰/۲۸b	۰/۲۵b	۰/۱۹c
وزن تر ریشه (g)	۱/۵۰a	۰/۵۴bc	۰/۴۲c	۰/۳۷c	۰/۶۱b	۰/۵۸bc	۰/۵۰bc
وزن خشک ریشه (g)	۰/۱۶a	۰/۰۵bc	۰/۰۴bc	۰/۰۳c	۰/۰۶b	۰/۰۵b	۰/۰۴b
کلروفیل a (mg/g)	۰/۵۱b	۰/۳۳c	۰/۳۲c	۰/۶۱a	۰/۶۰a	۰/۵۹a	۰/۶a
کلروفیل b (mg/g)	۰/۰۶c	۰/۰۸bc	۰/۰۸b	۰/۱۳a	۰/۰۷bc	۰/۰۸bc	۰/۱۳a
کلروفیل کل (a+b) (mg/g)	۰/۵۷c	۰/۴۱d	۰/۴۱d	۰/۷۹a	۰/۷۵a	۰/۶۷b	۰/۸۰a

حروف مشترک در هر ردیف نشان‌دهنده عدم معنی‌داری در سطح ۵٪ می‌باشد.

با افزایش غلظت کلشی سین، تعداد برگ افزایش یافت و اسپری در مرحله دو برگ حقیقی بالاترین تعداد برگ (۱۵/۳۰) تشکیل شد (جدول ۱). همچنین، افزایش غلظت کلشی‌سین باعث کاهش وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی، ارتفاع و طول ریشه نسبت به تیمار شاهد شد (جدول ۱)، اما میزان کاهش در پارامترهای ریشه به مراتب بیشتر از پارامترهای اندام هوایی گیاه بود. این در حالی است که قطر ساقه با افزایش غلظت کلشی‌سین، افزایش معنی‌داری در مقایسه با گیاهان شاهد داشت (۳/۶۲ و ۴/۱۵ به ترتیب در مرحله اسپری برگ‌لپه‌ای و دو برگ حقیقی). همچنین نتایج جدول ۱ نشان داد که با افزایش غلظت کلشی‌سین، مقدار کلروفیل a و b و کلروفیل کل (a+b) نیز به علت افزایش تعداد گیاهان پلی‌پلوئیدی نسبت به گیاهان شاهد افزایش پیدا کرد و در بالاترین غلظت کلشی‌سین (۰/۰۶٪)، بیشترین مقدار کلروفیل a (۰/۶۱ و ۰/۶۳ به ترتیب در مرحله اسپری برگ لپه‌ای و دو برگ حقیقی) و کلروفیل b (۰/۱۳ در هر دو مرحله اسپری برگ‌لپه‌ای و دو برگ حقیقی) و کلروفیل کل (۰/۷۹ و ۰/۸۰ به ترتیب در مرحله اسپری برگ‌لپه‌ای و دو برگ حقیقی) مشاهده شد. این در حالی است که مشابه با نتایج دیگر صفات مورد بررسی در این آزمایش، مقادیر بالاتری برای میزان کلروفیل با اسپری در مرحله دو برگ حقیقی نسبت به مرحله برگ لپه‌ای بدست آمد.

IrHC2019

منابع

حسینی، ح. ر.، چهرازی، م.، نباتی احمدی، د. و محمودی سورستانی، م. ۱۳۹۲. تاثیر تیمار کلشی‌سین بر القاء اتوتتراپلوئیدی و تغییر صفات مورفوفیزیولوژیک در گل پروانش (*Catharanthus roseus*) رقم alba. فناوری تولیدات گیاهی، ۱۳(۲): ۵۵-۶۱.

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

Khalid, K. A. and Silva, J. A. 2010. Yield, essential oil and pigment content of *Calendula officinalis* L. flower heads cultivated under salt stress conditions. Scientia Horticulturae, 126: 297-305.

Otto, F. J. 1992. Preparation and staining of cells for high-resolution DNA analysis. P: 101-104, In: Radbruch, A. ed. Flow cytometry and cell sorting. Springer – verlag. Berlin.

Vatavu, R., Leonte, C., Robu, T. and Pascal-slabu, C. 2006. Studies concerning the influence of some mutagen agents on the production of inflorescences at *Calendula officinalis* L. species. Lucrari Stiintifice, 51: 41-46.

Warren, W. 1997. Botanica. Gorden cheers, New York, 1250pp.

Ye, Y. M., Tong, j., Shi, X. P., Yuan, W. and Li, G. R. 2010. Morphological and cytological studies of diploid and colchicines - induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Scientia Horticulturae,124: 95-101.

The Effect of Colchicine on Some biomorphological and cytogenetically traits of two genotype of calendula (*Calendula officinalis* L.)

Sakineh Alavipour-Jalieh[1]*, Mehrangiz Chehrazi[2]

[1*] Ph.D. student of Horticulture Department, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz

[2] Associate Professor of Horticultural Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz

[*]*Corresponding Author: chehrazi_m@yahoo.com*

Abstract

Pot marigold (*Calendula officinalis* L.) is one of the more importance ornamental and medicinal plant which increased genetic diversity has been beseemed necessary in this plant. The effect of colchicine on some biomorphological and cytogenetic traits of yellow and orange flower pot marigold genotypes was evaluated as factorial experiment (dummy plot) based on randomized complete block design with three replications. In this experiment, four different concentrations of colchicine including, 0, 0.02, 0.04 and 0.06 (%) were studied in the cotyledon and two true leaves stage. The results were showed that polyploidy rate, number of leaves, stem diameter, chlorophyll a and b and total chlorophyll (a+b) amounts significantly increased, while the root length, plant height, fresh and dry weight of root and shoot, leaf area and survival rate reduced with increasing the concentration of colchicine. Investigation of colchicine concentration and spraying stage interaction effects showed that the highest mortality rate was observed in the cotyledon spray and the highest concentration (%0.06). The effects of burns and deaths of plants enhanced with increasing concentrations of calcification. Although, spraying in two true leaves was significantly affected on plant growing traits, but cotyledon spraying was reduced survival rate and growing treated plants. In general, according to the flow cytometry studies, the most suitable treatment combination for polyploidy inducing in pot marigold plants was %0.04 concentration spray in the two true leaves.

***Keywords*:** morphological, chlorophyll, flow cytometry, colchicine.

IrHC2019