

## مقایسه استفاده کلشی سین بر روی بذر و سرشاخه آویشن دنایی (*Thymus daenensis Celak*) از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی روزن و محتوای DNA در گیاهچه‌های درون شیشه‌ای

فرزانه اصلانی<sup>۱</sup>، فرانسوآز برنارد<sup>۲\*</sup>، فاطمه میرزا جانی<sup>۲</sup> و جواد هادیان<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، <sup>۲</sup>گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران و <sup>۳</sup>گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۰۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۹۲/۰۷/۳۰)

### چکیده:

تیمار کلشی سین به عنوان ماده القاء کننده پلی‌پلوئیدی روی بخش‌های مختلف گیاه نتایج متفاوتی نشان می‌دهد. هدف این پژوهش بررسی و مقایسه تأثیر کلشی سین بر روی بذر و سرشاخه آویشن دنایی (*Thymus daenensis Celak*) از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی روزن و محتوای DNA در شرایط درون شیشه‌ای است. بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی روزن و محتوای DNA با روش اسپکتروفوتومتری روش‌های غیرمستقیم اما سریع برای تعیین سطح پلوئیدی هستند. بدین منظور بذر و سرشاخه‌های گیاه در غلظت‌های مختلف کلشی سین شامل ۰٪-۰/۰۵٪-۰/۰۸٪-۰/۱٪-۰/۰۳٪-۰/۰۰۵٪-۰/۰۰۸٪-۰/۰۱٪-۰/۰۰۳٪ (وزنی/حجمی) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند و درصد زنده‌مانی سرشاخه و جوانه‌زنی بذرها محاسبه گردید. تعداد کلروپلاست، تراکم روزن در واحد سطح و میزان جذب محتوای DNA به منظور بررسی تأثیر کلشی سین مطالعه شد. در هر دو روش تیمار، درصد جوانه‌زنی و زنده‌مانی نسبت به گروه شاهد کمتر بود اما تیمار سرشاخه میانگین درصد زنده‌مانی بالاتری را نسبت به تیمار بذر نشان داد. تعداد کلروپلاست و محتوای DNA در گیاهچه‌های حاصل از بذر در تیمار ۰/۰۰۸٪-۰/۰۲۴٪ ساعت نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت و تراکم روزن نیز در این تیمار به طور معنی‌دار کاهش یافت. در روش تیمار سرشاخه تیمارهای ۰/۰۳٪-۰/۰۲۴٪ ساعت و ۰/۰۰۸٪ ساعت نتایج مشابه را ایجاد نمودند، اما تنها نتایج مربوط به کلروپلاست در هردو تیمار معنی‌دار بود. بنابراین بخشی از گیاه که برای تیمار با کلشی سین انتخاب می‌شود در نتایج حاصل تأثیرگذار است و با وجود کاهش جوانه‌زنی بذر تحت تیمار کلشی سین، روش تیمار بذر با غلظت ۰/۰۰۸٪ (وزنی/حجمی) و با زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با تیمار سرشاخه، روش مناسب تری برای دستیابی به گیاهی با سطح پلوئیدی بالاتر است.

واژه‌های کلیدی: آویشن دنایی (*Thymus daenensis Celak*), پلی‌پلوئیدی، روزن، کلروپلاست، کلشی سین، محتوای DNA

### مقدمه:

آویشن دنایی (*Thymus daenensis Celak*) گیاهی است از رفع سرماخوردگی و سرفه از خواص مهم پزشکی و دارویی این گیاه محسوب می‌شود (Tirhe ناعیان که سرشاخه‌های آن حاوی تانن‌ها، ساپونین‌ها Prajapati et al., 2004).

شمارش تعداد کلروپلاست در سلول‌های نگهبان را برای شناسایی سریع تترابلوبئیدها در تعدادی از گیاهان مورد استفاده قرار دادند و تفاوت معنی‌داری را در میانگین کلروپلاست‌ها بین گیاهچه‌های دیبلوبئید و تترابلوبئید شاهد بودند. برای گیاهان تترابلوبئید، تعداد کلروپلاست دو برابر تعداد آن در دیبلوبئیدها بود (Ewald *et al.*, 2009). اسپکتروفوتومتری نیز روش سریع و آسانی برای تشخیص پلی‌بلوبئیدی است. به دلیل اینکه در پلی‌بلوبئیدی تعداد کروموزوم افزایش می‌یابد محتوی کل DNA سلول پلی‌بلوبئید (تترابلوبئید، هگزاپلوبئید، غیره) در مقایسه با سلول دیبلوبئید بیشتر است. مقدار پرتو ماوراء بنفش جذب شده به وسیله محلول DNA به طور مستقیم نسبتی از مقدار ای موجود در نمونه می‌باشد. بنابراین، مقدار مشخصی از بافت دیبلوبئید، محتوی کل DNA متفاوتی از همان مقدار بافت پلی‌بلوبئید خواهد داشت که این را می‌توان با استفاده از روش‌های اسپکتروفوتومتری و در طول موج ۲۶۰ نانومتر مشخص نمود (Raza *et al.*, 2003) (Bernard و همکاران ۲۰۱۲) بذرهای *Glycyrrhiza glabra* را با غلظت‌های کلشی‌سین تیمار دادند و مشاهده نمودند جذب محتوی DNA در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت ۰/۰۸٪ و ۱/۰٪ کلشی‌سین با زمان ۲۴ ساعت دو برابر میزان آن در گروه کنترل بوده است و این نشان دهنده ایجاد تترابلوبئید در سلول‌ها می‌باشد. نتایج حاصل از فلوسایتمتری و مطالعه ویژگی‌های مورفو‌لوزیکی نیز افزایش سطح پلوبئیدی در تیمارهای فوق را تأیید کرد. بنابراین، می‌توان روش اسپکتروفوتومتری را به عنوان روشی سریع و کم هزینه اما دقیق و با کارایی بالا برای تعیین سطح پلوبئیدی به کار برد. هدف از این مطالعه تیمار بخش‌های مختلف گیاه با کلشی‌سین و بررسی تأثیر آن در نتایج مربوط به تغییرات سطح پلوبئیدی و تعیین مناسب‌ترین بخش گیاه آویشن دنایی برای تیمار با کلشی‌سین است. لذا بدین منظور بذرها و سرشاخه‌های آویشن دنایی به عنوان دو بخش مختلف از گیاه با کلشی‌سین تیمار شدند. با محاسبه درصد جوانهزنی و زنده‌مانی بذرها و سرشاخه‌ها و همچنین با بررسی ویژگی‌های

القاء پلی‌بلوبئیدی در گیاه منجر به افزایش بیوماس و افزایش غلظت و یا تغییرات کیفی در ترکیبات مؤثره گیاه شده، و احتمال انتخاب آنها را برای کشاورزی افزایش می‌دهد (Osborn *et al.*, 2003). پلی‌بلوبئیدی اغلب تغییرات قابل مشاهده در مورفو‌لوزی و متابولیسم ثانویه را به دنبال دارد. در جایی که اندام‌های رویشی منبع متابولیت‌های ثانویه است، دستکاری‌های پلوبئیدی ابزاری سریع برای افزایش تولید مواد داروئی گیاهی می‌باشد (Lavania, 2005).

کلشی‌سین برای افزایش سطح پلوبئیدی در سلول‌ها در شرایط برون شیشه‌ای (*in vivo*) و همچنین در شرایط درون شیشه‌ای (*in vitro*) کاربرد دارد (Bennici *et al.*, 2006). القاء پلی‌بلوبئیدی به کمک کلشی‌سین می‌تواند با تیمار بخش‌های مختلف گیاه مانند ریشه مؤئنه (De Jesus, 2003)، کالوس و سرشاخه (Zhang *et al.*, 2010)، مریستم انتهایی (Chen and Bernard *et al.*, 2012) (Gao, 2007) و دانه رست (Campos *et al.*, 2009) انجام گیرد. جهت بررسی سطح پلوبئیدی روش‌های غیرمستقیم از جمله، تراکم روزن، شمارش تعداد کلروپلاست سلول‌های نگهبان روزن و روش اسپکتروفوتومتری (Spectrophotometry) که در مقایسه با سایر روش‌ها مانند فلوسایتمتری و تعیین محتوی کروموزوم سلول‌ها، سریعتر و ارزانتر می‌باشد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Raza *et al.*, 2003; Winarto *et al.*, 2010). از طول و فراوانی روزن در سطح برگ به عنوان روشی سریع برای شناسایی سطح پلوبئیدی در *Aegilops neglecta* Req استفاده گردیده و مشاهده شده است که تفاوت معنی‌داری در فراوانی روزن بین دو فرم تترابلوبئید و هگزاپلوبئید این گیاه وجود دارد. نشان داده شده که میانگین فراوانی روزن برای تترابلوبئید بین ۵۴/۸۰-۵۰/۲۴ به ازای هر متر مربع سطح و برای هگزاپلوبئید بین ۴۰/۵۰-۳۹/۲۴ به ازای هر متر مربع سطح متغیر است (Aryavand *et al.*, 2003). همچنین، تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزن ارتباط معنی‌دار مثبتی با سطح پلوبئیدی دارد و می‌تواند به عنوان معیاری در جداسازی بین گیاهان دیبلوبئید و تترابلوبئید استفاده شود (Winarto *et al.*, 2010).

دقیقه انجام گرفت. برگهای رنگ آمیزی شده بر روی اسلاید شیشه‌ای قرار گرفته و بعد از قرار گرفتن لامل روی آن، اسکواش شد. اسلایدها با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهر به دوربین انتقال تصویر بررسی و عکسبرداری شدند و پارامترهای روزنه از روی تصاویر تهیه شده مطالعه گردید.

استخراج DNA نیز با استفاده از CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) انجام گرفت

(Murray and Thompson, 1980)

شمارش تعداد کلروپلاست برای هر تیمار در ۳۶ روزنه و محاسبه تراکم روزنه در ۱۸ منطقه برگی به وسعت ۱میلی‌متر مربع انجام گرفت. آزمایش با ۳ تکرار صورت گرفته و آنالیز آماری داده‌ها به کمک نرم افزار SPSS 16، آزمون ANOVA و با ضریب اطمینان ۹۵٪ انجام شد. نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردید.

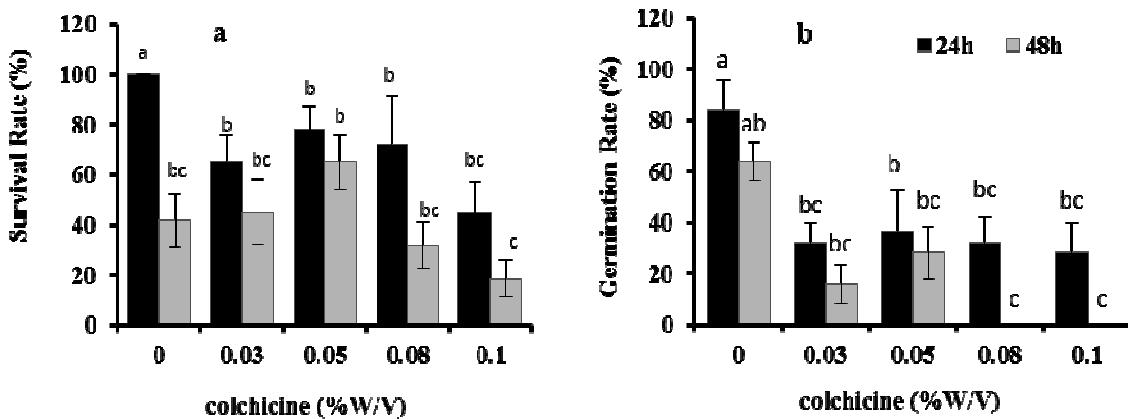
#### نتایج:

تأثیر تیمار کلشی سین بر درصد جوانه‌زنی و زنده‌مانی: در تیمار بذر مشاهده شد که درصد جوانه‌زنی در بذرهای تحت تیمار نسبت به گروه شاهد کمتر بود. در حالی که جوانه‌زنی بین غلظت‌های مختلف کلشی سین در هر دو زمان تیماردهی ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. زمان تیمار ۴۸ ساعت تغییر معنی‌داری در جوانه‌زنی نسبت به تیمار ۲۴ ساعت ایجاد نمود و غلظت‌های  $0.01\%$  و  $0.08\%$  با زمان تیمار ۴۸ ساعت جوانه‌زنی را نسبت به تیمار  $0.08\%$  و  $0.1\%$  ،  
۲۴ ساعت به شدت کاهش دادند. نتایج تیمار سرشاخه نشان داد که در همه تیمارهای کلشی سین به جز  $0.08\%$  ساعت ۲۴-٪-۰.۰۵٪ و  $0.05\%$ -٪-۰.۰۵٪ ساعت نسبت به گروه شاهد کاهش نرخ زنده-مانی سرشاخه‌ها مشاهده شد؛ اما بین غلظت‌های مختلف کاهش معنی‌دار زنده‌مانی وجود نداشت. دو زمان مختلف تیمار نیز تفاوت معنی‌داری را در نرخ زنده‌مانی ایجاد نمودند و در گروه شاهد زنده‌مانی در تیمار ۴۸ ساعت کمتر بود؛ همچنین تیمارهای  $0.08\%$  و  $0.1\%$  ساعت  $0.08\%$ -٪-۰.۰۱٪ ساعت در مقایسه با دیگر تیمارها کاهش زنده‌مانی بیشتری را نشان دادند

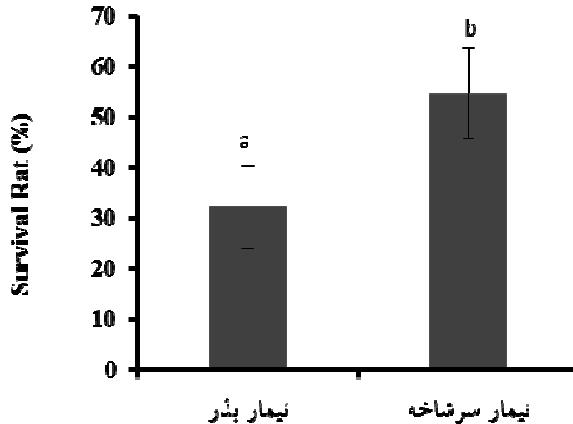
مورفولوژیکی روزنه (فراوانی و تعداد کلروپلاست سلول محافظه روزنه) و سنجش محتوی DNA سلول با روش اسپکتروفوتومتری در طول موج  $260$  نانومتر تغییرات سطح پلولئیدی در گیاهچه‌های آویشن دنایی بررسی شد. تأثیر کاربرد کلشی سین بر روی بذر و سرشاخه آویشن دنایی مقایسه گردید.

#### مواد و روش‌ها:

بذرهای گیاه *Thymus daenensis* با شماره هرباریومی MPH-660 از پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهیه گردید. بذرها بعد از ضد عفونی شدن در محیط (Murashige and Skoog, 1962) جامد موراشیگ - اسکوگ (Murashige and Skoog, 1962) حاوی  $0.08\%$  ( وزنی / حجمی ) آگار و  $30$  گرم بر لیتر سوکروز و pH برابر  $5.8$  قرار گرفتند. پس از  $4$  هفتگه سرشاخه‌هایی به طول  $1$  سانتی‌متر که دارای  $4$  تا  $6$  برگ بودند در شرایط استریل از گیاهچه‌های در حال رشد جدا شده و برای تیمار استفاده شدند. بذرها و سرشاخه‌ها به طور جداگانه در محیط MS مایع حاوی غلظت‌های  $0.03\%$  ،  $0.05\%$  و  $0.08\%$  ( وزنی / حجمی ) کلشی سین، به مدت  $24$  ساعت در شرایط *in vitro* بر روی شیکر اریتال با سرعت  $100$  دور در دقیقه، در اتاق کشت دارای دوره نوری  $16$  ساعت روشنایی و  $8$  ساعت تاریکی، دمای  $25$  درجه سانتی‌گراد و شدت نوری  $2200$  لوکس قرار گرفته و سپس به محیط کشت گیاهچه یعنی محیط جامد MS حاوی  $0.01\%$  Benzyl adenine (Benzyl adenine) انتقال یافتند. بعد از گذشت  $4$  هفتگه تعداد بذرهای جوانه زده در هر تیمار و نیز تعداد سرشاخه‌هایی که زنده مانده و رشد کرده‌اند شمارش شده و به صورت کاهش معنی‌دار زنده‌مانی وجود نداشت. در هر آزمایش  $5$  بطری تیماردهی و در هر بطری  $5$  بذر کشت داده شد. بررسی‌های روزنه‌ای با استفاده از روش Zhang و همکاران (Zhang and coworkers, 2010) انجام شد. بدین منظور برگهای گیاهان تیمار شده به مدت  $8$  ساعت در محلول کاربنوی ( $1:3$  اتانول و استیک اسید) رنگبری شده و پس از آن به مدت  $10$  دقیقه در آب مقطر شستشو داده شدند. سپس رنگ آمیزی با محلول  $1$  درصد یدید یدور پتابسیم (KI-I<sub>2</sub>) به مدت  $15$



شکل ۱- مقایسه زنده مانی سرشاخه (a)، مقایسه جوانهزنی بذر(b) آویشن دنایی در محیط حاوی هورمون بتزیل آدنین ( $1\text{mg.L}^{-1}$ ) در غلظت‌های کلشی سین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت.

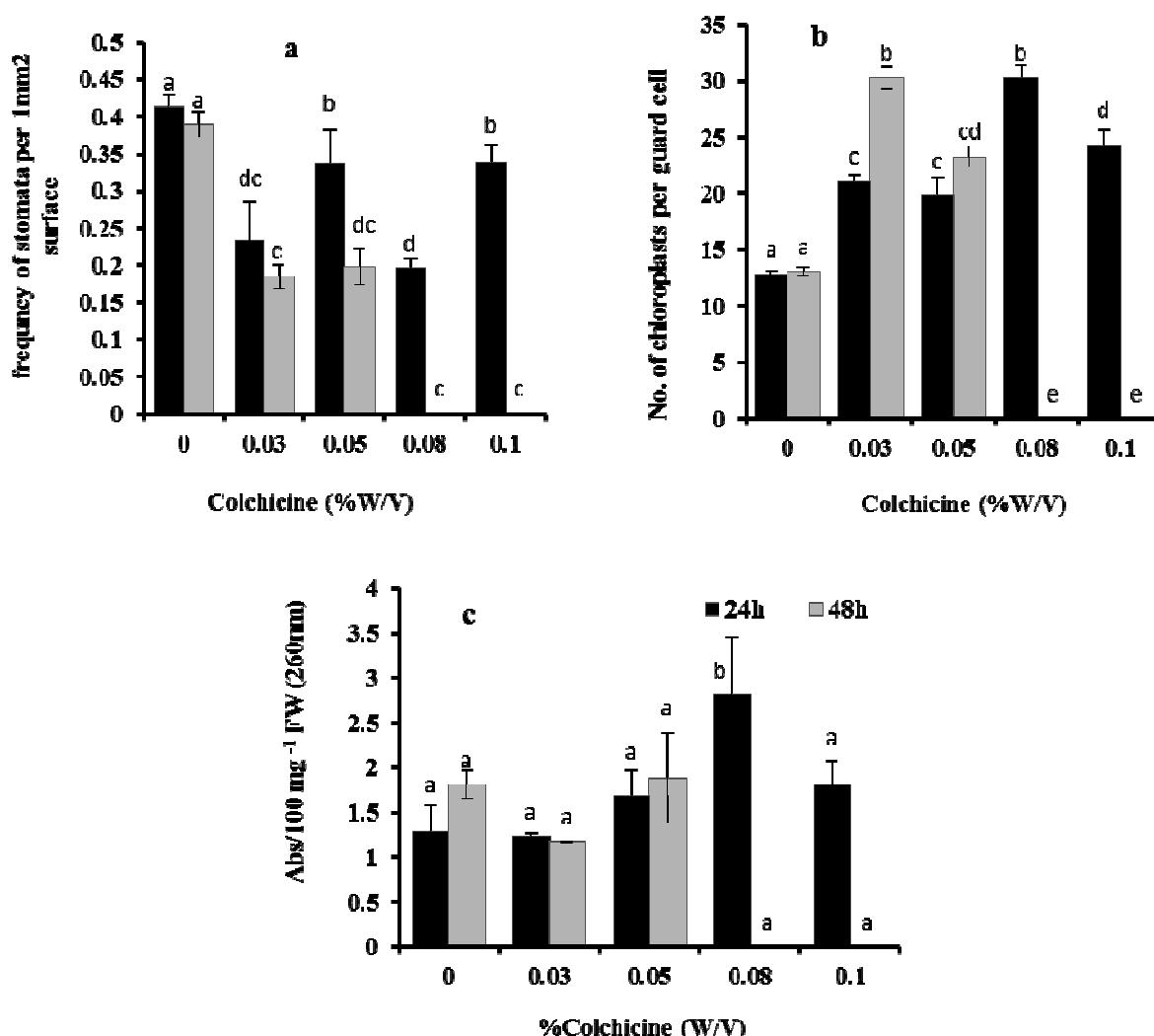


شکل ۲- مقایسه تیمار کلشی سین بر روی بذر و سرشاخه آویشن دنایی از نظر میانگین درصد زنده‌مانی

تیمارها کاهش معنی داری نشان داد. همچنین تیمار ۰/۰۸٪- ۲۴ ساعت منجر به افزایش معنی دار محتوی DNA در گیاهچه های آویشن نسبت به گروه شاهد و نیز دیگر تیمارها شد (شکل ۳). این درحالی است که در تیمار سرشاخه تعداد کلروپلاست در تیمار ۰/۰۳٪- ۲۴ ساعت و ۰/۱٪- ۴۸ ساعت کلشی سین (با تعداد به ترتیب ۱۸۷۳۰ و ۱۹۵۸۱) نسبت به دیگر تیمارها و تیمار شاهد افزایش معنی دار نشان داد. تراکم روزنے در واحد سطح نیز در هر دو تیمار ذکر شده نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت اما این کاهش برای تیمار ۰/۰۳٪- ۲۴ ساعت معنی دار نبود. محتوی DNA در هیچکدام از تیمارهای سرشاخه نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی دار نداشت (شکل ۴).

(شکل ۱). در مقایسه نتایج دو بخش تیمار شده مشاهده می شود که میانگین زنده‌مانی در تیمار سرشاخه نسبت به میانگین آن در تیمار بذر بالاتر است (شکل ۲).

**تأثیر تیمار کلشی سین بر روی ویژگی‌های روزنے و محتوی DNA:** در شرایط تیمار بذر گیاهچه‌های تحت تیمار ۰/۰۳٪- ۴۸-٪- ۲۴ ساعت و ۰/۰۸٪- ۴۸-٪- ۲۴ ساعت با تعداد کلروپلاست را در ترتیب ۳۰/۲۷ و ۳۰/۲۵ بیشترین تعداد کلروپلاست را در سلول‌های محافظ روزنے خود داشتند که این تعداد حدود دو برابر گروه شاهد است درحالی که میانگین تراکم روزنے در تیمارهای ۰/۰۳٪- ۴۸ ساعت و ۰/۰۸٪- ۴۸ ساعت (به ترتیب ۰/۱۸۵ و ۰/۱۹۶ روزنے در واحد سطح) نسبت به دیگر

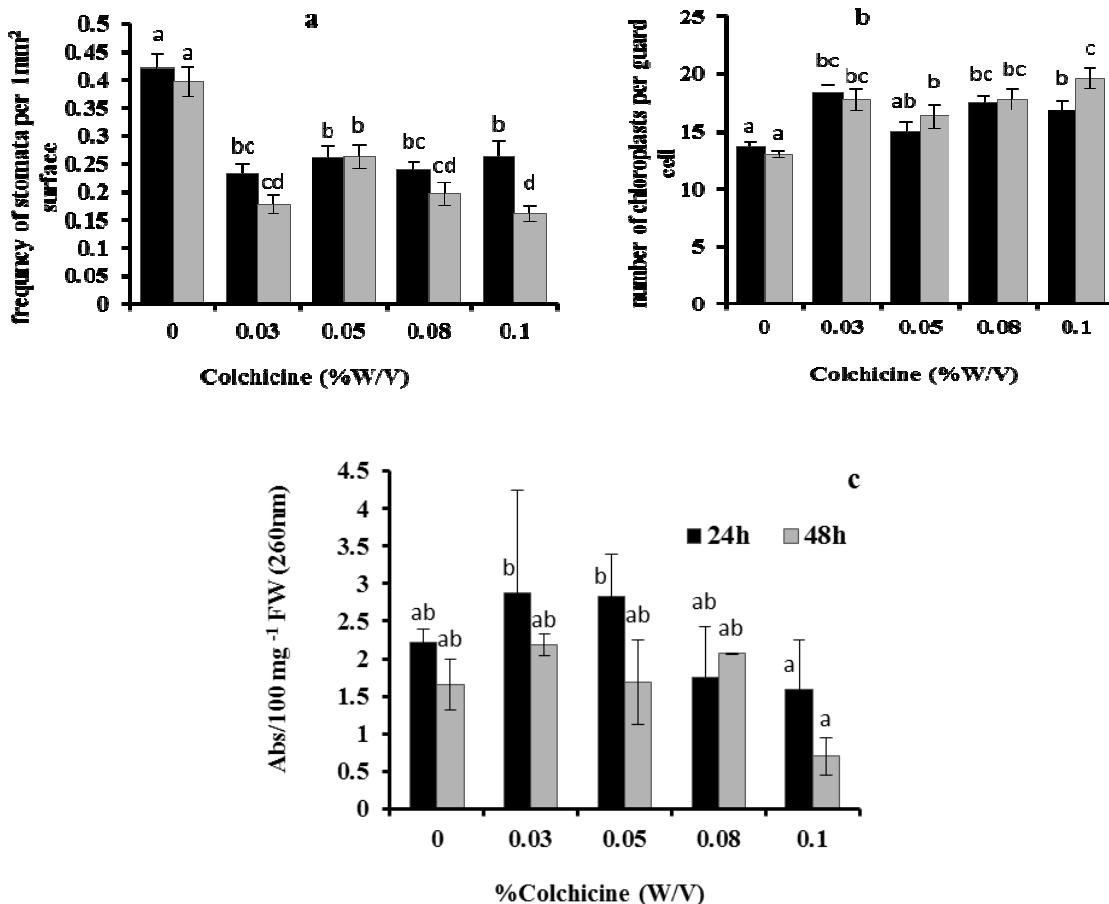


شکل ۳- تراکم روزنه (a)، تعداد کلروپلاست در سلول‌های محافظ (b) و میزان جذب محتوى DNA (c) در گیاهچه‌های حاصل از بذر آویشن دنایی در محیط حاوی هورمون بتزیل آدنین ( $1\text{mg.l}^{-1}$ ) در غلظت‌های کلشی سین.

را به دنبال دارد (Kerdsuwan *et al.*, 2012). در مطالعه حاضر، تیمار کلشی سین با هر دو روش، کاهش جوانه‌زنی بذرها و زنده‌مانی سرشاخه‌های آویشن دنایی را نسبت به گروه شاهد به دنبال داشت. این اثر در مطالعات انجام شده بر روی بخش‌های مختلف چند گیاه دارویی مانند تیمار بذرهای جوانه‌های انتهایی (*Ocimum basilicum* Omidbaigi *et al.*, 2010) و تیمار جوانه‌های انتهایی (*Melissa officinalis* (برقعی و همکاران، ۱۳۸۹) نیز عنوان شده است. در گزارش ارائه شده توسط امیدبیگی و همکاران (۲۰۱۰) بذرهای گیاه ریحان

#### بحث:

مقاومت بذرها و سرشاخه‌ها نسبت به تیمار کلشی سین: کلشی سین یک ترکیب القاء کننده پلی‌پلوبیدی است که به طور موفقیت آمیزی برای افزایش سطح پلوبیدی به کار می‌رود از سوی دیگر طی این عمل ممکن است گیاه به شدت آسیب دیده، رشد نرمال آن متوقف شود و یا از بین برود که این مسئله به غلاظت کلشی سین و مدت زمان تیماردهی بستگی دارد (Zhang *et al.*, 2010). در حقیقت غلاظت بالا و مدت طولانی مواجه با آن کاهش درصد زنده‌مانی و رشد گیاهچه‌ها



شکل ۴- تراکم روزنه (a)، تعداد کلروپلاست در سلول‌های محافظه (b) و میزان جذب محتوی DNA (c) در گیاهچه‌های حاصل سرشاخه آویشن دنایی در محیط حاوی هورمون بنزیل آدنین ( $1\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) در غلظت‌های کلتشی سین.

می‌مانند؛ همچنین در صورت از بین رفتن مریستم انتهایی جوانه‌های جانبی شروع به فعالیت نموده و گیاه کامل را ایجاد می‌کنند. بنابراین می‌توان گفت تیمار کلتشی سین بر روی سرشاخه‌های آویشن روش مناسب تری از نظر زنده‌مانی گیاهچه‌هاست. دو زمان تیمار نیز تفاوت معنیداری از نظر زنده‌مانی ایجاد نمودند و زمان ۴۸ ساعت تیمار به ویژه وقتی با غلظت بالای کلتشی سین همراه شد باعث کاهش زنده‌مانی گردید که این مسئله با نتایج ارائه شده توسط برقی و همکاران (۱۳۸۹) مطابقت دارد.

**تغییرات ویژگی‌های روزنه و محتوی DNA:** القاء پلی‌پلوبیڈی به کمک کلتشی سین می‌تواند با تیمار بر روی بخش‌های مختلف گیاه انجام گیرد که در نتایج حاصل از آن

(*Ocimum basilicum*) به کلتشی سین حساس بودند و بیشتر گیاهچه‌های حاصل از بذور تیمار شده با این ماده در مرحله جوانه‌زنی و برخی در مرحله دانه رست از بین رفتند. درصد جوانه‌زنی بذرهای تحت تیمار کلتشی سین در مقایسه با درصد زنده‌مانی سرشاخه‌های آویشن کاهش بیشتری را نشان داد. به طوری که میانگین جوانه زنی و ادامه رشد بذرهای تحت تیمار تنها ۳۲٪ بود. این در حالی است که به طور میانگین ۵۷٪ از سرشاخه‌ها توانستند با حضور کلتشی سین زنده مانده و رشد نمایند. به نظر می‌رسد در بذر تحت تیمار اکثر سلول‌های جنبینی در حال رشد و یا دانه‌رست‌های حاصل از بذر تحت تأثیر سمیت کلتشی سین قرار گرفته و می‌میرند در حالی که در سرشاخه‌ها سلول‌های بیشتری از تأثیر این ماده سمی در امان

حالی که در میکسپلولوئیدها سطوح پلوئیدی مختلفی در سلول های لایه های مختلف وجود دارد (Jones *et al.*, 2008). فقط یک بار کاربرد کلشی سین می تواند تنها بر روی درصد مشخصی از سلول های مریستمی رأس ساقه اثر بگذارد (Eiselein, 1994) و در حقیقت همزمان نبودن چرخه سلولی در سلول های مریستم منجر به دوبل شدن کروموزومها به صورت جزئی در مریستم می شود (Jones *et al.*, 2008). بنابراین غلظت ها و تعداد دفعات کاربرد کلشی سین در حد کافی نبوده تا بتواند بر روی تمام سلول های ناحیه مریستمی سرشاخه اثر گذار باشد و گیاهچه پلی - پلوئید خالص ایجاد کند. اما به نظر می رسد از آنجایی که در بذر تعداد سلول های جنینی محدود هستند پس بیشتر آنها تحت تأثیر کلشی سین قرار می گیرند و دو برابر شدن کروموزوم به احتمال زیاد در اکثریت سلول ها اتفاق می افتد. این سلول ها در طی تقسیمات متوالی و با تولید بافت ها و اندام هایی که دو برابر تعداد معمول کروموزوم دارند، منجر به ایجاد یک گیاه با سطح پلوئیدی بالاتر می شوند. بنابراین می توان نتیجه گیری نمود که علاوه بر غلظت کلشی سین، مدت زمان تیمار و ژنتوپ، نوع بخشی از گیاه که برای تیمار با کلشی سین انتخاب می شود در نتایج مربوط به افزایش سطح پلوئیدی مؤثر است و باید برای تیمار هر یک از بخش های گیاه جهت القاء پلی پلوئیدی غلظت خاصی از کلشی سین و نیز تعداد دفعات تیمار مناسب مورد استفاده قرار گیرد. به عنوان نتیجه گیری کلی می توان گفت که علیرغم کاهش درصد جوانه زنی بذر آویشن دنایی تحت تیمار کلشی سین و بالاتر بودن زنده مانع سرشاخه ها، تیمار بذر با غلظت ۰/۰۸٪ و با زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با تیمار سرشاخه، راه مناسب تری برای دست یابی به گیاهی با سطح پلوئیدی بالاتر است.

### سپاسگزاری:

نگارندگان برخود واجب می دانند از مساعدت ها و همکاری های سرکار خانم دکتر جمیله پازوکی و نیز دانشجویانشان و همچنین کمک های علمی و عملی عزیزانی چون خانم مهندس فاطمه شجاعی و خانم مهندس نرگس نواب مقدم تشکر و قدردانی نمایند.

تأثیرگذار است. در حقیقت برای مشخص شدن بهترین جدا کشت از گیاه برای این کار، باید چندین بخش مختلف از یک گونه گیاهی مورد آزمایش قرار گیرد. موقفیت و کارایی القاء پلی پلوئیدی تا حد زیادی به نوع جدا کشت بستگی دارد (Dhooghe *et al.*, 2011). چهار روش تیمار کلشی سین بر روی بذر، مریستم انتهایی دانه رست در مرحله پیدایش لپه های برگی و در مرحله پیدایش برگ های حقیقی و ریشه برای ایجاد جمعیت های تترالپوئید ریحان (*Ocimum basilicum*) استفاده کردند. بذرها به کلشی سین حساسیت نشان داده و بیشتر گیاهچه های حاصل از آنها از بین رفتند و چند دانه رست حاصل از تیمار بذر با غلظت ۰/۰۵٪ نیز دیپلولوئید بودند. تنها برخی از گیاهان حاصل از تیمار مریستم رأسی دانه رست در مرحله پیدایش لپه های برگی حاصل از تیمار ۰/۰۵٪ بر اساس ویژگی های ظاهری برای بررسی سطح پلوئیدی استفاده شدند (Omidbaigi *et al.*, 2010). در مطالعه حاضر بر روی گیاه *Thymus daenensis* نیز دو بخش مختلف گیاهی یعنی بذر و سرشاخه در محیط حاوی کلشی سین و بنزیل آدنین تیمار شدند و مشاهده شد که بخش های مختلف تیمار شده با کلشی سین نتایج متفاوتی را نشان می دهند به طوری که گیاهچه های حاصل از بذر در تیمار ۰/۰۸٪ ۲۴ ساعت شواهدی از افزایش سطح پلوئیدی را در ویژگی های مورفولوژیکی روزنه و محتوی DNA سلول های خود نشان دادند. این در حالی است که در تیمار سرشاخه، تیمارهای ۰/۰۳٪ ۲۴ ساعت و ۰/۱٪ ۴۸ ساعت کلشی سین چنین تغییراتی را ایجاد نمودند اما این تفاوت ها از نظر آماری در سطح معنی دار نبود. در توضیح این امر می توان گفت که مریستم رأسی ساقه از چند منطقه تشکیل شده است. منطقه مرکزی مریستم سلول هایی را شامل می شود که به عنوان سلول های آغازگر عمل نموده و سلول های جدید، نواحی دیگر مریستم و انتهای ساقه را ایجاد می کنند. در این منطقه چند لایه بافت زا وجود دارد که انواع سلول ها و بافت ها را به وجود می آورند. ایجاد پلی پلوئیدی خالص نیازمند دو برابر شدن موفق کروموزومها در تمام لایه های بافت زا، در منطقه مرکزی مریستم رأسی است در

- منابع:**
- برقعي، ف.، ساري خاني، ح.، چايي چي، م.، کاشي، ع. (۱۳۸۹) القاء درون شيشه‌ای پليپلويدي در گياه دارويي بادرنجبويه (*Melissa officinalis* L.), فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران جلد ۲۶: ۲۸۳-۲۹۵.
- ولادگ، ژ. و استدولا، ژ. (۱۳۸۲) گیاهان دارویی، روش های کشت، برداشت و شرح مصور رنگی ۲۵۶ گیاه. ترجمه ساعد زمان. نشر ققنوس. چاپ پنجم. صفحه ۳۶۷.
- Aryavand, A., Ehdaie, B., Tran, B., Waines, J. G. (2003) Stomatal frequency and size differentiate ploidy levels in *Aegilops neglecta*. Genetic Resources and Crop Evolution 50: 175–182.
- Bennici, A., Schiff, S., Mori, B. (2006) Morphogenic effect of colchicine in *Cichorium intybus* L. root explant cultured *in vitro*. Caryologia 3:284-290.
- Bernard, F., Moghbeld, N., Hassannejad, S. (2012) Treatment of licorice seeds with colchicines: changes in seedling DNA levels and anthocyanin and glycyrrhizic acid contents of derived callus cultures. Natural Product Communications 7: 1457-1460.
- Campos, J. M. S., Davide, L. C., Salgado, C. C., Santos, F. C., Costa, P. N., Silva, P. S., Alves, C. C. S., Viccini, L. F., Pereira, A. V. (2009) In vitro induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*. Plant Breed 128:101-104.
- Chen, L. L., Gao, S. L. (2007) In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. Scientia Horticulturae 112:339–344.
- De Jesus-Gonzalez, L., Weathers, P. J. (2003) Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. Plant Cell Rep 21:809–813.
- Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., Van Huylenbroeck, J. (2011) Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 104:359–373.
- Eiselein, J. E. (1994) A study of chromosome yields and growth responses in colchicine treated rhododendrons. Journal American Rhododendron Society 48:205-209.
- Ewald, D., Ulrich, K., Naujoks, G., Schroder, M. (2009) Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicine: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 99:353–357.
- Jones, J. R., Ranney, T. G., Eaker, T. A. (2008) A novel method for induction polyploidy in rhododendron seedlings. Journal American Rhododendron Society 62:130-135.
- Kerdsuwan, N., Te-chato, S. (2012) Effects of Colchicine on Survival Rate, Morphological, Physiological and Cytological Characters of Chang Daeng Orchid (*Rhynchostylis gigantean* var. rubrum Sagarik) In Vitro. Journal of Agricultural Technology 8: 1451- 1460.
- Lavania, U. C. (2005) Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. Plant Genetic Resources 3:170–177.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Murray, M. G., Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 19: 4321-4325.
- Omidbaigi, R., Mirzaee, M., Hassani, M. E., SedghiMoghadam, M. (2010) Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal of Plant Production 4: 87-98.
- Osborn, T. C., Pires, J. C., Birchler, J. A., Auger, D. L., Chen, Z. J., Lee, H. S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R. W., Colot, V., Martienssen, R. A. (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. Trends in Genetics 19: 141–147.
- Prajapati, N. D., Purohit, S. S., Sharma, A. K., Kumar,T. (2004) A hand book of medicinal plants. Agrobios India. pp. 554.
- Raza, H., JafarJaskani, M., Mumtaz khan, M., Malik Tanvir, A. (2003) *In vitro* induction of polyploids in watermelon and estimation based on dna content. International Journal of Agriculture and Biology 5: 298–302.
- Winarto, B., Mattjik, N. A., Silva, J. A. T., Purwito, A., Marwoto, B. (2010) Ploidy screening of anthurium (*Anthurium andeanum* Linden ex Andre) regenerants derived from another culture. Scientia Horticulturae 127:86-90.
- Zhang, Q., Luo, F., Liu, L., Guo, F. C. (2010) *In vitro* induction of tetraploids in crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 101:41–47.