

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

فرزانه اصلانی^۱، فرانسواز برنارد^{۱*}، فاطمه میرزا جانی^۲ و جواد هادیان^۳

^۱گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ^۲گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران و ^۳گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.
(تاریخ دریافت: ۹۲/۰۷/۳۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۴/۰۲)

چکیده:

تیمار کلشی سین به عنوان ماده القاءکننده پلی‌پلوئیدی روی بخش‌های مختلف گیاه نتایج متفاوتی نشان می‌دهد. هدف این پژوهش بررسی و مقایسه تأثیر کلشی سین بر روی بذر و سرشاخه آویشن دناهی (*Thymus daenensis Celak*) از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی روزنه و محتوای DNA در شرایط درون شیشه‌ای است. بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی روزنه 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، ۰/۰۳، ۰/۰۵، ۰/۰۸، ۰/۱، ۰/۱۰ (وزنی/حجمی) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند و درصد زنده‌مانی سرشاخه و جوانه‌زنی بذرها محاسبه گردید. تعداد کلروپلاست، تراکم روزنه 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 ۰/۰۸ - ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت و تراکم روزنه نیز در این تیمار به طور معنی‌دار کاهش یافت. در روش تیمار سرشاخه تیمارهای ۰/۰۳، ۰/۰۵، ۰/۰۸ و ۰/۱ - ۴۸ ساعت نتایج مشابه را ایجاد نمودند، اما تنها نتایج مربوط به کلروپلاست در هر دو 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 ۰/۰۸ (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 دناهی (*Thymus daenensis Celak*)، پلی‌پلوئیدی، روزنه، کلروپلاست، کلشی سین، محتوای DNA.

مقدمه:
(ولاگ و استودلا، ۱۳۸۲). میکروبوکشی، رفع اسپاسم، رفع سرماخوردگی و سرفه از خواص مهم پزشکی و دارویی این گیاه محسوب می‌شود (Prajapati et al., 2004).

آویشن دناهی (*Thymus daenensis Celak*) گیاهی است از تیره نعنائیان که سرشاخه‌های آن حاوی تانن‌ها، ساپونین‌ها و اسانس روغنی (شامل تیمول و کارواکرول) است

القاء پلی‌پلوئیدی 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). پلی‌پلوئیدی اغلب تغییرات قابل مشاهده در مورفولوژی و متابولیسم ثانویه را به دنبال دارد. در جایی که اندام‌های رویشی منبع متابولیت‌های ثانویه است، دستکاری‌های پلوئیدی ابزاری سریع برای افزایش تولید مواد دارویی گیاهی می‌باشد (Lavania, 2005).

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

شمارش تعداد کلروپلاست در سلول‌های نگهبان را برای شناسایی سریع تتراپلوئیدها در تعدادی از گیاهان مورد استفاده قرار دادند و تفاوت معنی‌داری را در میانگین کلروپلاست‌ها بین گیاهچه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید شاهد بودند. برای گیاهان تتراپلوئید، تعداد کلروپلاست دو برابر تعداد آن در دیپلوئیدها بود (Ewald *et al.*, 2009). اسپکتروفوتومتری نیز روش سریع و آسانی برای تشخیص پلی‌پلوئیدی است. به دلیل اینکه در پلی‌پلوئیدی تعداد کروموزوم افزایش می‌یابد محتوی کل DNA سلول پلی‌پلوئید (تتراپلوئید، هگزاپلوئید، غیره) در مقایسه با سلول دیپلوئید بیشتر است. مقدار پرتو ماوراء بنفش جذب شده به وسیله محلول DNA به طور مستقیم نسبتی از مقدار DNA موجود در نمونه می‌باشد. بنابراین، مقدار مشخصی از DNA دیپلوئید، محتوی کل DNA متفاوتی از همان مقدار بافت پلی‌پلوئید خواهد داشت که این را می‌توان با استفاده از روش‌های اسپکتروفوتومتری و در طول موج ۲۶۰ نانومتر مشخص نمود (Raza *et al.*, 2003). در مطالعه انجام شده توسط Bernard و همکاران (۲۰۱۲) بذرهاى *Glycyrrhiza glabra* را با غلظت‌های کلشی‌سین تیمار دادند و مشاهده نمودند جذب محتوی DNA در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت ۰/۰۸٪ و ۰/۱٪ کلشی‌سین با زمان ۲۴ ساعت دو برابر میزان آن در گروه کنترل بوده است و این نشان دهنده ایجاد تتراپلوئیدی در سلول‌ها می‌باشد. نتایج حاصل از فلوسایتومتری و مطالعه ویژگی‌های مورفولوژیکی نیز افزایش سطح پلوئیدی 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 پلوئیدی به کار برد.

هدف از این مطالعه تیمار بخش‌های مختلف گیاه با کلشی‌سین و بررسی تأثیر آن در نتایج مربوط به تغییرات سطح پلوئیدی و تعیین مناسب‌ترین بخش گیاه آویشن دناپی برای تیمار با کلشی‌سین است. لذا بدین منظور بذرها و سرشاخه‌های آویشن دناپی 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

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 مجهز 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 برگگی به وسعت ۱ میلی‌متر 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.

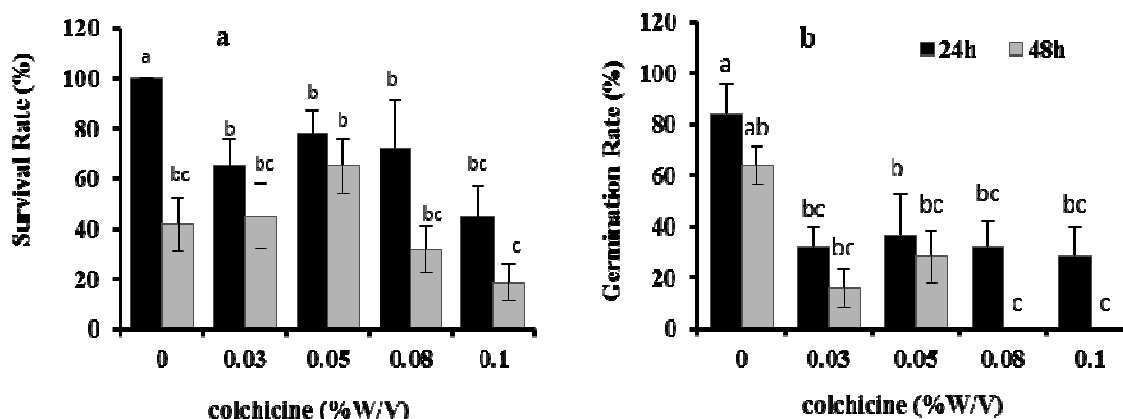
نتایج:

تأثیر تیمار کلشی سین بر درصد جوانه‌زنی و زنده‌مانی: در تیمار بذر مشاهده شد که درصد جوانه زنی 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 ۰/۰۸٪ و ۰/۱٪ با زمان تیمار ۴۸ ساعت جوانه‌زنی را نسبت به تیمار ۰/۰۸٪ و ۰/۱٪، ۲۴ ساعت به شدت کاهش دادند. نتایج تیمار سرشاخه نشان داد که در همه تیمارهای کلشی سین به جز ۰/۰۸٪-۲۴ ساعت و ۰/۰۵٪-۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد کاهش نرخ زنده‌مانی 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 زنده مانی در تیمار ۴۸ ساعت کمتر بود؛ همچنین تیمارهای ۰/۰۸٪-۴۸ ساعت و ۰/۱٪-۴۸ ساعت در مقایسه با دیگر تیمارها کاهش زنده مانی بیشتری را نشان دادند

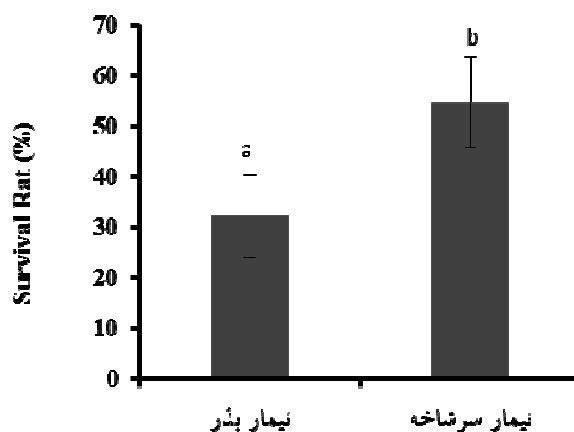
مورفولوژیکی روزنه (فراوانی و تعداد کلروپلاست سلول محافظ روزنه) و سنجش محتوی DNA سلول با روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر تغییرات سطح پلئیدی در گیاهچه‌های آویشن دنايي بررسی شد. تأثیر کاربرد کلشی سین بر روی بذر و سرشاخه آویشن دنايي مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها:

بذرهای گیاه *Thymus daenensis* با شماره هرباریومی MPH-660 از پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهیه گردید. بذرهای بعد از ضد عفونی شدن در محیط جامد موراشیگ - اسکوگ (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۰/۰۸٪ (وزنی/حجمی) آگار و ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز و pH برابر ۵/۷-۵/۸ قرار گرفتند. پس از ۴ هفته سرشاخه‌هایی به طول ۱ سانتیمتر که دارای ۴ تا ۶ برگ بودند در شرایط استریل از گیاهچه‌های در حال رشد جدا شده و برای تیمار استفاده شدند. بذرهای و سرشاخه‌ها به طور جداگانه در محیط های MS مایع حاوی غلظت‌های ۰/۰۰۳٪، ۰/۰۰۵٪، ۰/۰۰۸٪، ۰/۰۱٪ (وزنی/حجمی) کلشی سین، به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در شرایط *in vitro* بر روی شیکر ارییتال با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه، در اتاق کشت دارای دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شدت نوری ۲۲۰۰ لوکس قرار گرفته و سپس به محیط کشت گیاهچه یعنی محیط جامد MS حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر هورمون بنزیل آدنین (Benzyl adenine) انتقال یافتند. بعد از گذشت ۴ هفته تعداد بذرهای جوانه زده در هر تیمار و نیز تعداد سرشاخه‌هایی که زنده مانده و رشد کرده‌اند شمارش شده و به صورت درصد محاسبه شد. در هر آزمایش ۵ بطری تیماردهی و در هر بطری ۵ بذر کشت داده شد. بررسی‌های روزنه‌ای با استفاده از روش Zhang و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. بدین منظور کارنوی (۱:۳ اتانول و استیک اسید) رنگبری شده و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر شستشو داده شدند. سپس رنگ آمیزی با محلول ۱ درصد دیدید یدور پتاسیم (KI-I₂) به مدت ۱۵



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

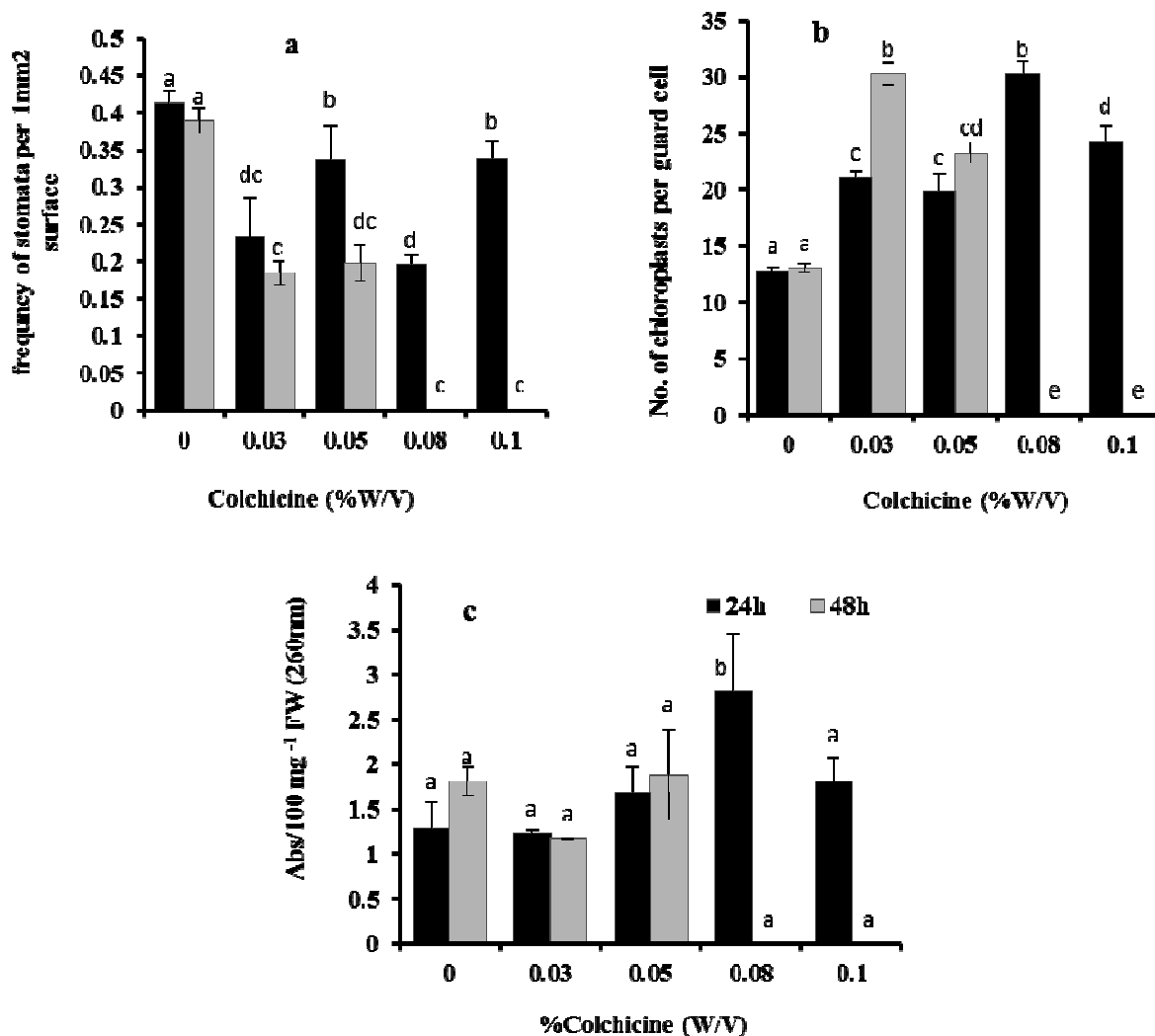


شکل ۲- مقایسه تیمار کلشی سین بر روی بذر و سرشاخه آویشن دنایی از نظر میانگین درصد زنده مانی

تیمارها کاهش معنی داری نشان داد. همچنین تیمار 0.08% - 24 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 0.03% - 24 ساعت و 0.1% - 48 ساعت کلشی سین (با تعداد به ترتیب $18/30$ و $19/58$) نسبت به دیگر تیمارها و تیمار شاهد افزایش معنی دار نشان داد. تراکم روزنه در واحد سطح نیز در هر دو تیمار ذکر شده نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت اما این کاهش برای تیمار 0.03% - 24 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 زنده مانی در تیمار سرشاخه نسبت به میانگین آن در تیمار بذر بالاتر است (شکل ۲).

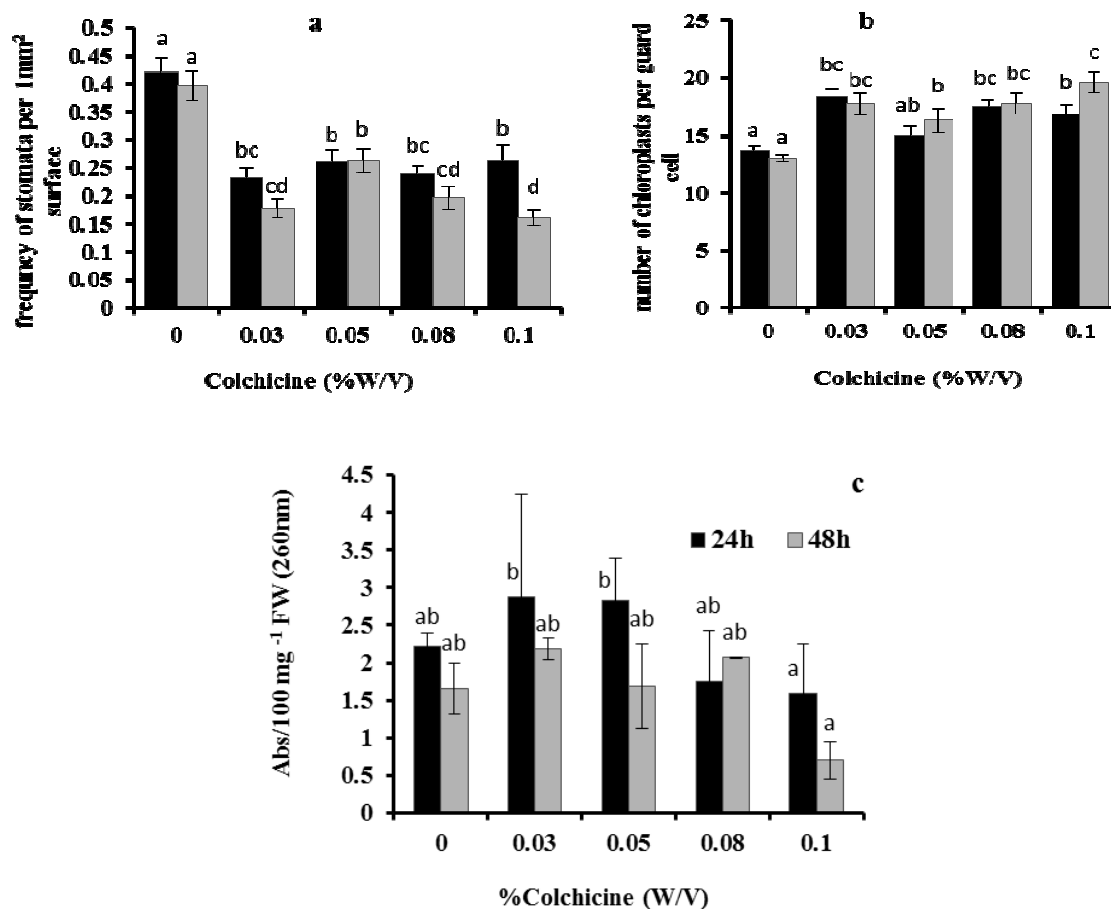
تأثیر تیمار کلشی سین بر روی ویژگی های روزنه و محتوی DNA: در شرایط تیمار بذر گیاهچه های تحت تیمار 0.03% - 48 ساعت و 0.08% - 24 ساعت با تعداد به ترتیب $30/27$ و $30/25$ بیشترین تعداد کلروپلاست را در سلول های محافظ روزنه خود داشتند که این تعداد حدود دو برابر گروه شاهد است درحالی که میانگین تراکم روزنه در تیمارهای 0.03% - 48 ساعت و 0.08% - 24 ساعت (به ترتیب 0.185 و 0.196 روزنه در واحد سطح) نسبت به دیگر



شکل ۳- تراکم روزنه (a)، تعداد کلروپلاست در سلول‌های محافظ (b) و میزان جذب محتوی DNA (c) در گیاهچه‌های حاصل از بذر آویشن دنايي در محیط حاوی هورمون بنزیل آدنین (1mg.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 دنايي را نسبت به گروه شاهد به دنبال داشت. این اثر در مطالعات انجام شده بر روی بخش‌های مختلف چند گیاه دارویی مانند تیمار بذرهای *Ocimum basilicum* (Omidbaigi *et al.*, 2010) و تیمار جوانه‌های انتهایی *Melissa officinalis* (برقی و همکاران، ۱۳۸۹) نیز عنوان شده است. در گزارش ارائه شده توسط امیدبیگی و همکاران (۲۰۱۰) بذرهای گیاه ریحان

مقاومت بذرها و سرشاخه‌ها نسبت به تیمار کلشی سین: کلشی سین یک ترکیب القاء کننده پلی‌پلوئیدی است که به طور موفقیت آمیزی برای افزایش سطح پلوئیدی 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 غلظت کلشی سین و مدت زمان تیماردهی بستگی دارد (Zhang *et al.*, 2010). در حقیقت غلظت بالا و مدت طولانی مواجه با آن کاهش درصد زنده‌مانی و رشد گیاهچه‌ها



شکل ۴- تراکم روزنه (a)، تعداد کلروپلاست در سلول‌های محافظ (b) و میزان جذب محتوی DNA (c) در گیاهچه‌های حاصل سرشاخه آویشن دنبابی در محیط حاوی هورمون بنزیل آدنین (1mg.l^{-1}) در غلظت‌های کلشی سین.

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

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

(*Ocimum basilicum*) به کلشی 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 کلشی سین در مقایسه با درصد زنده مانگی سرشاخه‌های آویشن کاهش بیشتری را نشان داد. به طوری که میانگین جوانه زنی و ادامه رشد بذرهای تحت تیمار تنها ۳۲٪ بود. این درحالی است که به طور میانگین ۵۴/۵۷٪ از سرشاخه‌ها توانستند با حضور کلشی سین زنده مانده و رشد نمایند. به نظر می‌رسد در بذر تحت تیمار اکثر سلول‌های جنینی در حال رشد و یا دانه‌رست‌های حاصل از بذر تحت تأثیر سمیت کلشی سین قرار گرفته و می‌میرند در حالی که در سرشاخه‌ها سلول‌های بیشتری از تأثیر این ماده سمی در امان

حالی که در میکسوپلوئیدها 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 درحقیقت همزمان نبودن چرخه سلولی در سلول های مریستمی منجر به دویل 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 ژنوتیپ، 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 دنايي تحت تیمار کلشی سین و بالاتر بودن زنده مانی سرشاخه ها، تیمار بذر با غلظت ۰/۰۸٪ و با زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با تیمار سرشاخه، راه مناسب تری برای دستیابی به گیاهی با سطح پلوئیدی بالاتر است.

سپاسگزاری:

نگارندگان برخورد 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. موفقیت 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 برگ و در مرحله پیدایش برگ های حقیقی و ریشه برای ایجاد جمعیت های تتراپلوئید 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 دیپلوئید بودند. تنها برخی از گیاهان حاصل از تیمار مریستم رأسی دانه رست در مرحله پیدایش لپه های برگ 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 درحالی است که در تیمار سرشاخه، تیمارهای ۰/۰۳٪ - ۲۴ ساعت و ۰/۱٪ - ۴۸ ساعت کلشی سین چنین تغییراتی را ایجاد نمودند اما این تفاوتها 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 بافتها را به وجود می آورند. ایجاد پلی پلوئیدی خالص نیازمند دو برابر شدن موفق کروموزومها در تمام لایه های بافتزا، در منطقه مرکزی مریستم رأسی است در

- 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 Tanwir, 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 andreaeanum* 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.
- منابع:
برقعی، ف.، ساری خانی، ح.، چایی چی، م.، کاشی، ع. (۱۳۸۹) القاء درون شیشه‌ای پلی‌پلوئیدی در گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)، فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران جلد ۲۶: ۲۸۳–۲۹۵.
ولاگ، ژ و استدولا، ژ. (۱۳۸۲) گیاهان دارویی، روش های کشت، برداشت و شرح مصور رنگی ۲۵۶ گیاه. ترجمه ساعد زمان. نشرققنوس. چاپ پنجم. ۳۶۷ صفحه.
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., Moghbel, 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.