دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی اثرات القای پلی‌پلوئیدی در شرایط درون شیشه بر گیاهچه‌های باززاشده بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.)

سید هادی مدنی[1]، بهمن حسینی[2]، اسماعیل دهقان[3] و اسماعیل رضائی چیانه[4]

۱ و ۴- دانشجوی دکتری و استادیار، دانشگاه ارومیه
۲- دانشیار، دانشگاه ارومیه، (نویسنده مسوول: b.hosseini@urmia.ac.ir)
۳- دکتری، دانشگاه فردوسی مشهد
تاریخ دریافت: ۹۲/۰۹/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۲/۱

چکیده

بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی متعلق به تیره بادنجانیان بوده که به دلیل دارا بودن آلکالوئیدهای تروپانی در صنایع داروسازی کاربرد فراوانی دارد. در سال‌های اخیر باززایی، پرآوری و پلی‌پلوئیدی درون شیشه‌ای گیاهان دارویی، یکی از موضوعات جالب توجه در بیوتکنولوژی و کشت بافت گیاهی می‌باشند. آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با تیمار هورمون بنزیل آمینوپورین (BAP) در سه سطح (۰، ۴/۴ و ۸/۸ میکرومولار) و ایندول استیک اسید (IAA) در سه سطح (۰، ۱/۱ و ۲/۲ میکرومولار) و در سه تکرار انجام شد. در ادامه القای پلی‌پلوئیدی در شرایط درون شیشه‌ای روی گیاهچه‌های باززایی شده با تیمار کلشی‌سین در ۵ غلظت (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد) و سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مورد مطالعه قرار گرفتند. برای تعیین سطح پلوئیدی گیاهان، بررسی‌های میکروسکوپی، فلوسایتومتری و شمارش کروموزومی انجام شد. نتایج نشان داد که پس از شش ماه رشد، تیمار هورمونی ۸/۸ میکرومولار BAP به همراه ۲/۲ میکرومولار IAA با میانگین۱۳/۱۳ گیاهچه در هر ریز نمونه، شاخه‌زایی بهترین تیمار هورمونی برای باززایی شناخته شد. نتایج بررسی‌های فلوسایتومتری نشان داد که تیمار ۰/۱ درصد کلشی‌سین در زمان ۴۸ ساعت با راندمان ۷۲ درصد تولید گیاهان پلی‌پلوئیدی مناسب‌ترین تیمار شناخته شد. القای پلی‌پلوئیدی با تغییرات معنی‌دار در ویژگی‌های مختلف گیاه همراه بود. تعداد کروموزوم گیاهان دیپلوئید برابر با ۳۴ عدد (2n=2x=34) و درگیاهان تتراپلوئید برابر ۶۸ (2n=2x=68) بود. بنابراین می‌توان گفت کلشی‌سین بطور مؤثری قابلیت القای پلی‌پلوئید در این گیاه را دارد.

واژه‌های کلیدی: بذرالبنج مشبک، تتراپلوئیدی، فلوسایتومتری، کلشی‌سین، کشت درون شیشه‌ای

مقدمه

بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.) گیاهی یک‌ساله یا دوساله متعلق به تیره بادنجانیان بوده (Solanaceae) که در مناطقی از جهان از جمله مصر، جنوب غرب آسیا، ایران و ترکیه رشد می‌کند. تمام اندام گیاه حاوی ماده مؤثره‌ای از نوع آلکالوئیدی[1] است که مهم‌ترین ترکیبات آن را هیوسیامین[2]، آتروپین[3] و اسکوپولامین[4] تشکیل می‌دهند که در صنایع داروسازی کاربرد فراوانی دارند (۳۵). به واسطه عملکرد متفاوت در سیستم عصبی، فعالیت فیزیولوژیکی بالاتر و عوارض کمتر، تقاضای جهانی برای اسکوپولامین در حدود ۱۰ برابر بیشتر از هیوسیامین و فرم راسمیک آن (آتروپین) است که در این زمینه تلاش‌های زیادی برای بهینه‌سازی تولید آن انجام شده است (۲۱). در سال‌های اخیر استفاده از تکنیک کشت بافت برای باززایی گیاهان دارویی نتایج امیدوارکننده‌ای را در تولید داروهای گیاهی با کمیت و کیفیت بالا ایجاد کرده است (۵۰). نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که عوامل مختلفی مانند ژنوتیپ، محیط کشت، نوع و غلظت مواد هورمونی در میزان باززایی گیاهان موثر می‌باشند (۵۰). پرآوری شاخساره و افزون‌گری آن بیشتر تحت تأثیر هورمون سیتوکینین در محیط کشت است و هورمون‌های اکسینی بدون توجه به غلظت هورمون بنزیل آمینوپورین (BAP) تأثیری در پرآوری شاخساره ندارند (۳۷). تحقیقات در مورد باززایی و پرآوری درون شیشه‌ای از سوی محققان مختلفی در ستال‌های اخیر در گیاهانی هم‌چون ریحان (*Ocimum basilicum* L.) (۵)، *Oroxylum indicum* (۷)، افسنطین (*Artemisia absinthium* L.) (۵۹) و ریحان سلیمان (*Ocimum gratissimum* L.) (۱۸) گزارش شده است. دو برابرسازی ژنوم‌ها (پلی پلوئیدی ابزار تکاملی مهم در گیاهان گل‌دار شناخته شده است (۴۳). بر طبق مطالعات تخمین زده شده که پلی‌پلوئیدی بین ۳۰ تا ۷۰ درصد در گیاهان وقوع می‌یابد (۵۵). گیاهان با سطوح پلوئیدی بالاتر اغلب تولید سلول‌های بزرگ‌تر، برگ‌های ضخیم‌تر، رشد کندتر، میزان آب بیشتر و تأخیر در گلدهی بیشتر و افزایش دوره رشد بیشتر می‌نمایند (۲۵). در برنامه‌های

1- Alkaloid 2- Hyoscyamine 3- Atropine 4- Scopolamine

اصلاح نباتات گیاهان پلی‌پلوئیدی می‌توانند برای توسعه واریته‌های برتر مورد استفاده قرار گیرند (۵۶،۲،۱۹).

کلشی‌سین مؤثرترین ماده شیمیایی مورد استفاده در مطالعات القاء پلی‌پلوئیدی است، که یک آلکالوئید استخراج شده از بذر پداژه و گل‌های گیـــاه گل حسرت (*Colchicum autumnale*) می‌بـاشد (۴). با توسعه تکنیک‌های کشت بافت، القـــای پلی‌پلوئیدی در محیط درون شیشه‌ای که یکی از روش‌های اصلی محسوب می‌شود برای القای گیاهان پلی‌پلوئیدی مطرح است (۵۸). به طوری که برای القای درون شیشه‌ای پلی‌پلوئیدی از کلشی‌سین در بسیاری از گیاهان مانند بذرالبنج سیاه (*Hyoscyamus niger*) (۵۳)، بذرالبنج مصری (*Hyoscyamus muticus*) (۴۰)، داتوره (*Datura stramonium*) (۳۸)، درمنه (۵۱)، مریم گلی (*Salvia miltiorrhiza*) (۱۷)، توری (*Lagerstroemia indica*) (۵۷)، پالونیا (*Paulownia tomentosa*) (۴۸)، استفاده شده است.

از آنجایی که در رابطه با باززایی، پرآوری و القای پلی‌پلوئیدی در محیط درون شیشه‌ای و واکشت گیاهان تتراپلوئیدی اطلاعات کمی در دسترس است، این تحقیق با هدف تکمیل یک پروتکل آزمایشگاهی برای بهینه‌سازی باززایی گیاه بذرالبنج مشبک و القای درون شیشه‌ای پلی‌پلوئیدی آن که زمینه‌ای برای مطالعات بعدی است، اجرا شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و کشت

این تحقیق در سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۱ در آزمایشگاه تحقیقاتی کشت بافت گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه اجرا شد. بذور بذرالبنج مشبک از کوهپایه‌های اطراف شهرستان نقده واقع در استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شدند. با توجه به مشکلاتی که در رابطه با جوانه‌زنی طبیعی بذرهای بذرالبنج وجود دارد، برای شکست خواب فیزیولوژیکی بذور به مدت ۱۲ ساعت در تیمار جیبرلین ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در شرایط تاریکی قرار گرفتند. سپس بذرهای بذرالبنج در محلول هیپو کلریت سدیم یک درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شد و پس از شست‌وشو با آب مقطر، در محیط کشت MS جامد حاوی ۰/۷ درصد آگارکشت شدند. پس از کشت بذور، فلاسک‌های حاوی بذور در اتاقک‌های رشد با شرایط دمای روز ۲±۲۵ و دمای شب ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، نور سفید فلورسنت و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. در حدود دو هفته بعد از رشد بذور، نقاط رأسی گیاهچه‌ها به صورت ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی اثر تیمارهای هورمونی BAP و IAA بر میزان باززایی درون شیشه‌ای بذرالبنج مشبک

این آزمایش به منظور بررسی اثرات نوع و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی نقاط انتهایی ساقه آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گردید. فاکتورهای آزمایش شامل ترکیب هورمون ایندول استیک اسید در سه سطح (۰، ۱/۱ و ۲/۲ میکرومولار) و بنزیل آمینوپورین در سه سطح (۰، ۴/۴ و ۸/۸ میکرومولار) بود. در پایان واکشت‌ها به تعداد دوبار در فاصله زمانی ۲۰ روز یکبار برای فراهم کردن محیط جدید و جدا کردن گیاهچه‌های تازه ایجاد شده انجام پذیرفت، میانگین باززایی در تیمارها یادداشت گردید.

استقرار گیاهان باززایی شده بذرالبنج مشبک

همه شاخه‌های باززایی شده در محیط ½ MS ریشه‌زایی همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید قرار گرفتند. گیاهان ریشه‌دار شده در شرایط دمایی اتاق سازگاری و در میزان رطوبت ۸۵-۷۰ درصد برای دو هفته قرار گرفتند و سپس به محیط گلخانه منتقل شدند.

القای پلی‌پلوئیدی در گیاهچه‌های درون شیشه‌ای

آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار (هر تکرار ۲۵ ریزنمونه) برای هر تیمار (۷۵ ریزنمونه) انجام شد. سرشاخه‌های منظم و یکسان به طول یک سانتی‌متر در این آزمایش ریزنمونه انتخاب شدند. این سرشاخه‌ها در محیط MS نیمه جامد حاوی ۲ درصد دی متیل سولفوکسید و کلشی‌سین فیلتر شده (با غلظت‌های نهایی ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد) برای مدت زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط تاریکی قرار گرفتند. سپس سرشاخه‌ها ۳ بار (۲-۳ دقیقه) با آب استریل شسته شده و سپس به محیط MS بدون هورمون حاوی ۳ درصد ساکارز، ۷/۲ گرم بر لیتر آگار و pH برابر با ۵/۷ قرار گرفتند. اثر کلشی‌سین روی رشد، نمو و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها پس از گذشت ۱۵ روز از اعمال تیمارها مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری SAS 9.1 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام گرفت.

مطالعات میکروسکوپی

برای مشاهده تراکم روزنه‌ها، سه برگ بالغ و توسعه یافته و تا حد ممکن برگ‌های هم‌سن و هم‌اندازه از قسمت میانی هر یک از گیاهان مشکوک به پلی‌پلوئیدی در مقایسه با گیاهان دیپلوئید انتخاب و از هر بوته جدا شدند. سپس با استفاده از تکنیک لاک ناخن، از اپیدرم سطح زیرین آن‌ها نمونه‌برداری صورت گرفت. مشاهده

نمونه و عکس‌برداری با دستگاه میکروسکوپ نوری مجهز به لنز مشبک با بزرگ‌نمایی ۴۰x در واحد سطح انجام شد، به نحوی که تعدادی از گیاهان مشکوک به پلی‌پلوئیدی با استفاده از این روش تفکیک شدند.

تعیین سطح پلوئیدی

برای تعیین سطح پلوئیدی گیاهان مذکور از دستگاه فلوسایتومتر مدل (Partec pA, Germany) استفاده شد. گیاهان شاهد نیز برای مقایسه اثرات کلشی‌سین مورد استفاده قرار گرفتند و پیک به‌دست آمده از آن‌ها مبنای کار مقایسات حجم هسته قرار گرفت. برای این منظور مراحل آماده‌سازی نمونه برای تزریق به دستگاه فلوسایتومتری و تعیین وضعیت پلوئیدی به شرح زیر انجام شد: از برگ‌های جوان و رشد یافته (حدوداً دو ماهه) قطعاتی به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر مربع تهیه سپس ۴۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج هسته (محلول A کیت دستگاه، Partec) به این نمونه‌ها اضافه شد و با تیغ به نحوی که از له‌شدگی بافت جلوگیری شود، مقطع برگی به خوبی خرد گردید. سپس محلول سوسپانسیون حاوی DNA گیاهی تهیه شده از فیلترهای مخصوص دستگاه عبور داده شد و ۱۶۰۰ میکرولیتر محلول رنگ آمیزی هسته حاوی ۴ و ۶-دی آمیدینو-۲ فنیل ایندول (DAPI، محلول B کیت) به آن اضافه گردید و پس از ۶۰-۳۰ ثانیه برای شمارش به دستگاه تزریق شد. به طور معمول برای هر نمونه حجم حداقل ۵۰۰۰ هسته با دستگاه اندازه‌گیری و پیک‌های به‌دست آمده با نرم‌افزار Mode Fit تفسیر گردید (۱۲). کروموزم‌های سلول‌های گیاهان دیپلوئید و گیاهانی که با استفاده از روش فلوسایتومتری تتراپلوئید بودن آن‌ها مشخص شده بود، طی بررسی‌های سیتوژنتیکی به صورت زیر مشاهده و شمارش شدند. برای مشاهده کروموزم از نمونه‌های قسمت‌های نوک ریشه‌های جوان استفاده شد. ابتدا یک سانتی‌متر از ریشه‌های جوان گیاهان جدا گردید و در محلول ۲ میلی‌مول ۸-هیدروکسی‌کینولین به مدت ۴-۳/۵ ساعت در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به دنبال آن برای تثبیت سلول‌ها در مراحل تقسیم از محلول کارنوی حاوی سه قسمت الکل اتیلیک خالص و یک قسمت استیک اسید گلاسیال استفاده گردید. برای انجام هیدرولیز نمونه‌های ریشه، نمونه‌ها درون ظرف حاوی اسید کلریدریک یک نرمال به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد درون حمام آب گرم قرار داده شدند. برای رنگ‌آمیزی، نمونه‌های هیدرولیز شده به مدت ۵۰ دقیقه درون محلول هماتوکسیلین در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد درون حمام آب گرم قرار داده شدند و در نهایت در زیر میکروسکوپ شمارش کروموزوم‌ها انجام شد (۱۰).

نتایج و بحث

اثر غلظت‌های مختلف BAP و IAA بر میانگین باززایی شاخه

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل بنزیل آدنین و ایندول استیک اسید بر میانگین باززایی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین مربوط به اثر غلظت‌های مختلف BAP و IAA نشان داد که کمترین میانگین باززایی با ۱/۵ گیاهچه در هر ریزنمونه در محیط MS بدون هورمون و بیشترین میانگین باززایی با ۱۳/۱۳ گیاهچه در هر ریز نمونه در تیمارهای ۸/۸ میکرومولار BAP در ترکیب با ۲/۲ میکرومولار IAA با ۱۳/۱۳ گیاهچه مشاهده شد. از نظر میانگین باززایی شاخه بین تیمار ۴/۴ میکرومولار BAP در ترکیب با ۱/۱ میکرومولار IAA با تیمار ۴/۴ میکرومولار BAP اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل‌های ۱ و ۳).

تکثیر درون شیشه‌ای به وسیله عوامل متعددی از قبیل نوع، غلظت و نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد مانند اکسین یا سیتوکنین و تلفیق هر دو که به هدف افزایش و تسریع رشد به محیط کشت اضافه می‌شوند، تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۶). ولی نسبت مناسب اکسین به سیتوکنین به نوع گونه و ریزنمونه بستگی دارد. معمولاً تکثیر و ازدیاد گیاهان دولپه‌ای نسبت به تک‌لپه‌ای‌ها بهتر می‌باشد. در میان دولپه‌ای‌ها، خانواده‌های سولاناسه (Solanaceae)، بگونیاسه (Begoneaceae)، کراسولاسه (Crussulaceae) و کروسیفره (Cruciferaceae) خیلی راحت‌تر، تکثیر می‌شوند. بین گیاهان یک گونه نیز تفاوت‌های زیادی در تقسیم سلولی و توان تولید مثلی وجود دارد (۶). نتایج آزمایش حاضر تاییدی بر نقش مؤثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در پاسخ ریزنمونه‌ها بود. نتایج برخی از تحقیقات قبلی نیز مؤید این مطلب است که استفاده از هورمون سیتوکنین در ریزازدیادی درون شیشه‌ای بیشتر گیاهان کاربرد فراوانی دارد، به طوری که در گیاه افسنطین غلظت ۲/۲ میکرومولار BAP و ۰/۵ میکرومولار NAA بیشترین باززایی را ایجاد کرد (۵۹). در گیاه ریحان محیط کشت MS حاوی ۲/۲ میکرومولار BAP و ۱/۴ میکرومولار IAA مناسب‌ترین محیط برای باززایی مستقیم گزارش شده است (۱۸). همانند نتایج گزارش شده از سایر پژوهشگران روی گیاهانی مانند ریحان *Ocimum basilicum* (۵)، افسنطین (*Artemisia absinthium* L) (۵۹)، *Oroxylum indicum* (۷) در این پژوهش نیز تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در باززایی گیاه بذرالبنج مشبک معنی‌دار بوده و با نتایج آن‌ها مطابقت دارد.

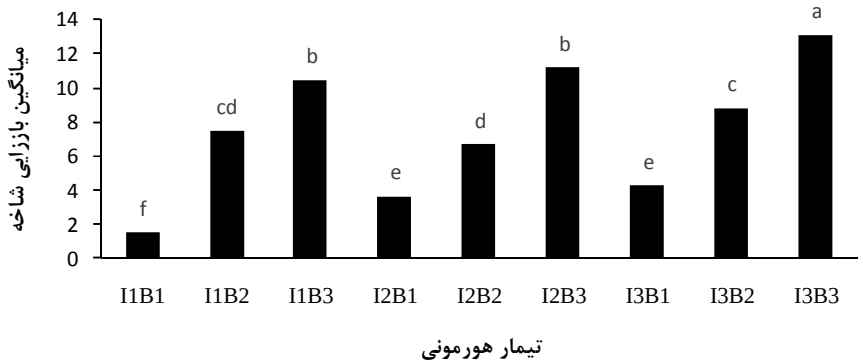
زنده‌مانی ریزنمونه‌ها پس از اعمال تیمار

اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین بر درصد زنده‌مانی ریزنمونه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). بین غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ حجمی/ وزنی کلشی‌سین در مقایسه با تیمار فاقد آن تفاوت معنی‌داری در زنده‌مانی ریزنمونه‌ها وجود نداشت.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعهٔ باززایی در گیاه بذرالبنج مشبک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات میانگین باززایی شاخه
ایندول استیک اسید (IAA)	۲	۱۲/۰۳**
بنزیل آمینو پورین (BAP)	۲	۱۶۰/۸۴**
(IAA×BAP)	۴	۱/۸۱*
اشتباه آزمایشی	۱۸	۰/۳۹
ضریب تغییرات (درصد)		۸/۳۷

* و **: به‌ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح به ترتیب ۵ و ۱ درصد می‌باشند.

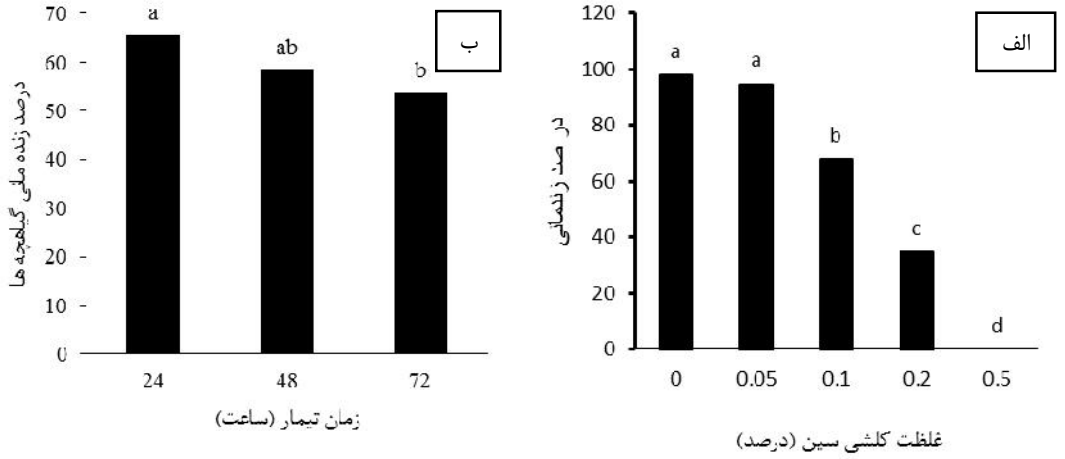


(میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر شکل، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد ندارند)

I1= 0 µM IAA B1= 0 µM BAP
I2= 1.1 µM IAA B2= 4.4 µM BAP
I3= 2.2 µM IAA B3= 8.8 µM BAP

شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف BAP و IAA بر میانگین باززایی شاخه بذرالبنج مشبک

بیشترین درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها (۹۸/۶۷ درصد) در تیمار شاهد و کمترین آن در غلظت ۰/۵درصد (صفر درصد) مشاهده گردید. بین تیمار شاهد و تیمار ۰/۰۵ درصد از لحاظ زنده‌مانی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، ولی تیمار شاهد با تیمارهای ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ تفاوت معنی‌داری را نشان داد (شکل ۲- الف). اثر زمان تیمار با کلشی‌سین بر درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). تأثیر تیمار کلشی‌سین در ۷۲ ساعت روی عدم زنده‌مانی گیاه نسبت به ۲۴ درصد معنی‌دار بود. بین زمان‌های ۲۴ ساعت با زمان ۴۸ ساعت در این صفت اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل ۲- ب). میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها در تیمار زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۶۵/۶، ۵۸/۴ و ۵۳/۶ درصد کاهش یافت. به طور کلی نتایج آزمایش حاکی از آن بود که با افزایش غلظت کلشی‌سین و طولانی کردن زمان تیمار درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها به طور معنی‌داری به دلیل افزایش سمیت کاهش می‌یابد. گیاهان تتراپلوئید در ابتدای رشد دارای دو برگ اولیه با ظاهر غیرعادی و نامناسب بودند، در حالی که پس از باززایی ریزنمونه‌ها برگ‌های بعدی از رشد و نمو عادی و معمولی همانند گیاه شاهد برخوردار بودند. طبق نظر پژوهشگران سلول‌های بزرگ‌تر تمایل به ایجاد سطح کوچک‌تری به نسبت حجم دارند. تصور می‌شود این پدیده به کاهش نرخ رشد سلول‌های پلی پلوئیدی منجر گردد و تأثیر هندسه سلول بر نرخ رشد به محیط رشد آن‌ها بستگی دارد (۲۹،۱). برخی از بی‌نظمی‌های مشاهده شده در اندازه برگ، شکل، بافت و رنگ به نسبت تعداد تقسیمات سلولی همراه با اختلالات فیزیولوژیکی در ریزنمونه‌های تیمار شده نسبت داده شده است. چنین بی‌نظمی معمولاً در جمعیت‌های تحت تیمار با کلشی‌سین مشاهده می‌شود (۴۲،۱۵). شاید به عنوان یک نتیجه از متابولیسم سلولی گیاهان پلی‌پلوئیدی به رشد و نمو آهسته‌تر تمایل نشان می‌دهند (۲۸).



شکل ۲- اثر (الف) غلظت و (ب) زمان تیمارهای مختلف کلشی‌سین بر درصد زنده‌مانی گیاه بذرالبنج مشبک.
میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر شکل، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد ندارند.

کاهش رشد پلی‌پلوئیدها پس از تیمار با مواد ضدمیتوزی به دلیل کاهش و کم شدن تقسیم سلولی است که در نتیجه ایجاد اختلال در میزان اکسین در سلول‌های در حال تقسیم مریستمی است. بدین منظور میزان تنفس و فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌ها کاهش می‌یابد (۴۴). مواد ضد میتوزی 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 کاهش می‌دهد (۳۹). بسیاری از محققین از جمله کاسترو و همکاران (۹) طی بررسی‌های خود کلشی‌سین را یک ماده جهش‌زا معرفی کردند و تأثیرات آن را روی ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه چچم (*Lolium temulentum*) به اثبات رساندند. مطابق با مشاهدات حاضر در این پژوهش و در این باره، منش و همکاران (۳۱) از طریق تیمار بذرهای کنجد با کلشی‌سین توانستند از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی و هم‌چنین از نظر ویژگی‌های فیزیولوژیکی در گیاهان حاصله در مقایسه با گیاهان دیپلوئید تفاوت ایجاد کنند.

مقایسه تراکم روزنه در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید

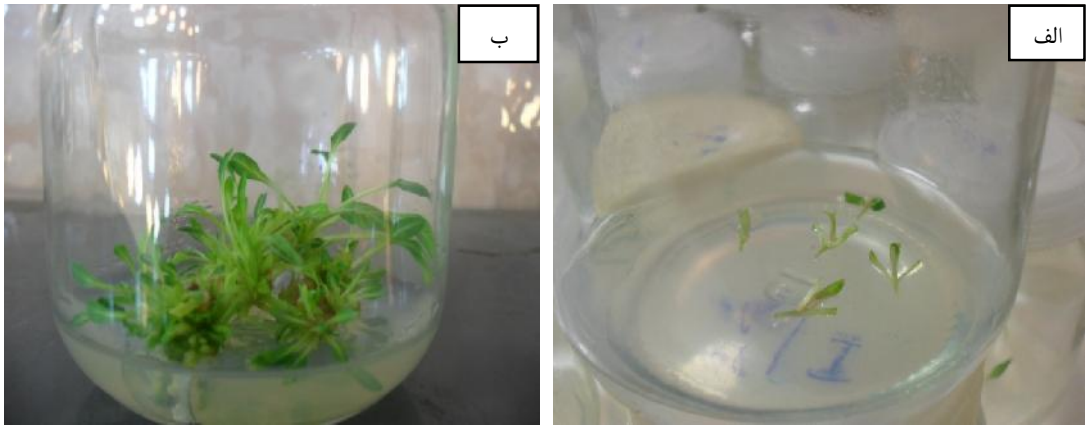
نتایج حاصل از مقایسه تراکم روزنه در یک میلی‌متر مربع از نقاط مختلف موجود در سطح پشت برگ (آباکسیال) در ۱۰ نمونه از گیاهان دیپلوئید و ۱۰ نمونه از گیاهان تتراپلوئید درمرحله توسعه کامل برگ‌ها، نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد در تعداد روزنه در واحد سطح برگ بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید وجود داشت (جدول ۳)، به طوری که میانگین تراکم روزنه در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۱۸۱/۸ عدد در یک میلی‌متر مربع و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۵۲ عدد در یک میلی‌متر مربع بود (جدول ۳). شکل ۴ میزان تراکم روزنه در یک نمونه دیپلوئید و یک نمونه تتراپلوئید در میلی‌متر مربع از واحد سطح پشت برگ با بزرگ‌نمایی ۴۰x را نمایش می‌دهد. پلی‌پلوئیدی اثرات قابل توجهی در بیان ژن‌های دو برابر شده دارد. به طوری‌که سبب خاموش شدن، کاهش و یا افزایش بیان یک ژن می‌شود. این تغییرات می‌تواند با شروع پلی‌پلوئیدی و یا با گذشت چند نسل پس از ایجاد آن، رخ دهد (۱). افزایش سطح پلوئیدی در هسته اغلب باعث تغییرات آناتومیکی و ساختاری از قبیل تراکم روزنه، اندازه سلول و تعداد کلروپلاست در سلول می‌گردد (۲۲). تراکم روزنه‌ها ابزار متمایزکننده به شمار می‌رود در گیاهان با سطوح مختلف پلوئیدی در انواع گیاهان دیگر مورد استفاده قرار گرفته است، که کاهش در تراکم روزنه‌ها در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید به وسیله یافته‌های چندین محقق مانند گائو و همکاران (۱۶) در *Scutellaria baicalensis*، تائو و همکاران (۴۷) در آلوکاسیای زینتی (*Alocasia Amazonica*)، شهریاری احمد و همکاران (۴۰) در بذرالبنج مصری (*Hyoscyamus muticus* L.) گزارش شده است. در تحقیق حاصل نیز میزان تراکم روزنه در هر میلی‌متر مربع نسبت به گیاهان دیپلوئید کاهش معنی‌داری داشت. امید بیگی و همکاران (۳۳) گزارش نمودند که میانگین تراکم روزنه‌ها در نمونه‌های دیپلوئید گیاه ریحان ۲۰/۸ عدد در یک میلی‌متر مربع و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۷/۵۸ عدد در میلی‌متر می‌باشد. هم‌چنین در مطالعاتی که روی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید بادرشبی (*Dracocephalum moldavica* L.) انجام گرفت مشخص شد که میانگین تراکم روزنه‌ها در نمونه‌های

دیپلوئید ۳۹۵/۶۳ عدد در در تحقیق حاصل نیز میزان تراکم روزنه در هر میلی‌متر مربع نسبت به گیاهان دیپلوئید کاهش معنی‌داری داشت. امید بیگی و همکاران (۳۳) گزارش نمودند که میانگین تراکم روزنه‌ها در نمونه‌های دیپلوئید گیاه ریحان ۲۰/۸ عدد در یک میلی‌متر مربع و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۷/۵۸ عدد در میلی‌متر می‌باشد. هم‌چنین در مطالعاتی که روی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید بادرشبی (*Dracocephalum moldavica* .L) انجام گرفت مشخص شد که میانگین تراکم روزنه‌ها در نمونه‌های دیپلوئید ۳۹۵/۶۳ عدد در یک میلی‌متر مربع و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۱۹۵/۶۸ عدد در یک میلی‌متر می‌باشد (۳۴). همانند نتایج گزارش شده از سایر پژوهشگران در این تحقیق نیز تأثیر پلی‌پلوئیدی بر میزان تراکم روزنه گیاه بذرالبنج مشبک معنی‌دار بود و با نتایج محققیان قبلی مطابقت دارد.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس زنده‌مانی گیاهچه‌های تیمار شده با کلشی‌سین بذرالبنج مشبک

		میانگین مربعات
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین گیاهچه باقی‌مانده
غلظت	۴	۲۶۹۶۸**
زمان	۲	۹۱۲**
(غلظت×زمان)	۸	۱۹۲^{ns}
اشتباه آزمایشی	۶۰	۱۱۲
ضریب تغییرات (درصد)	۱۷/۸۷	

ns و **: به ترتیب نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشند.



شکل ۳- مراحل باززایی (الف) مرحله اعمال تیمار روی سرشاخه‌ها برای باززایی (ب) باززایی گیاه بذرالبنج مشبک.

ارزیابی گیاهچه‌های تغییر یافته بعد از تیمار توسط کلشی‌سین

اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین بر درصد گیاهچه‌های تغییر یافته نشان داد بیشترین درصد گیاهچه‌های تغییر یافته در تیمار ۰/۱ درصد با میانگین ۳۰ گیاهچه (۴۰ درصد) و کمترین گیاهچه غیرطبیعی در تیمار شاهد (صفر درصد) به دست آمد. به جز تیمارهای شاهد، ۰/۰۵ درصد و ۰/۵ درصد (که سبب مرگ همه گیاهچه‌ها گردید) بقیه تیمارها سبب ایجاد گیاهچه‌های تغییر یافته شدند. شناسایی گیاهچه‌های تغییر یافته با بررسی مشخصات و ویژگی‌های مورفولوژیکی از قبیل تأخیر در رشد، تفاوت در مساحت، ضخامت، شکل و رنگ برگ، همچون برگ‌های تیره، تغییر شکل یافته، چروک و ضخیم پس از اعمال تیمار همراه بود. اثر متقابل غلظت کلشی‌سین و زمان تیمار نشان داد که در بین گیاهچه‌های تیمار شده با کلشی‌سین بیشترین تغییر در گیاهچه‌ها در تیمار با ۰/۱درصد کلشی‌سین و زمان ۴۸ ساعت با میانگین ۱۸ گیاهچه (۷۲ درصد) مشاهده گردید و کمترین تغییر در گیاهچه‌ها در غلظت ۰/۲درصد در زمان‌های ۷۲ ساعت با میانگین ۱ گیاهچه (۴ درصد) به‌دست آمد. اثر زمان تیمار کلشی‌سین بر گیاهچه‌های تغییر یافته نشان داد که با افزایش زمان تیمار از ۲۴ به ۴۸ ساعت درصد گیاهان تغییر یافته افزایش یافت، اما با افزایش زمان تیمار و رسیدن به ۷۲ ساعت، تعداد گیاهان تغییر یافته به طور چشم‌گیری کاهش یافتند، به طوری‌که تعداد گیاهان تغییر یافته در زمان ۴۸ ساعت ۲۱ گیاهچه (۱۶/۸ درصد) و زمان ۷۲ ساعت ۱۳ گیاهچه (۱۰/۴ درصد) بودند. البته شمارش تعداد گیاهان تغییر یافته پس از شمارش بقاء گیاهچه‌ها (۱۵ روز بعد از تیمار با کلشی‌سین) صورت پذیرفت. به این ترتیب برخی از گیاهچه‌های تغییر یافته‌ای که در غلظت‌های بالا (۰/۵

درصد) تیمار با محلول کلشی‌سین در اثر مرگ و میر ناشی از سمیت در این تیمارها از بین رفتند، شمارش نشدند. به همین دلیل به ظاهر اثر زمان‌های ۴۸ ساعت و غلظت‌های ۰/۱ درصد بر میزان این شاخص افزونی یافته است.

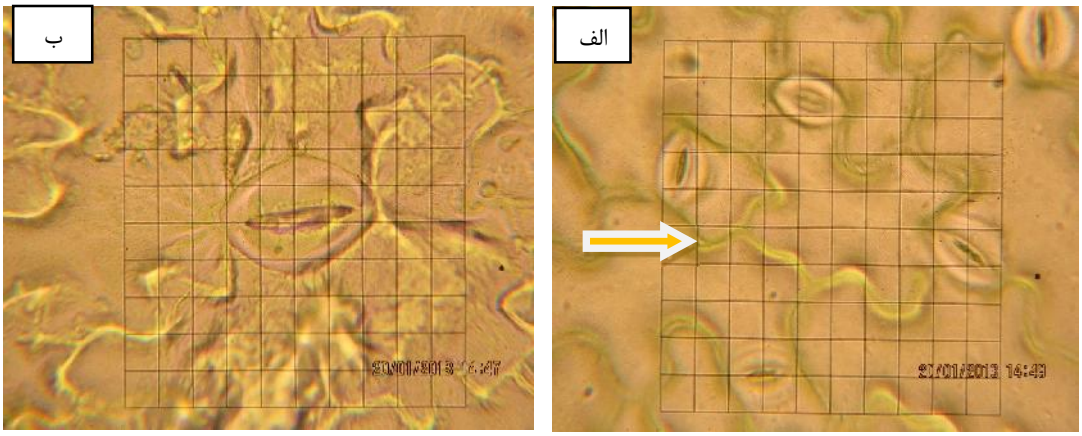
ارزیابی تغییرات پلوئیدی

در این بررسی، برای مشاهده کروموزم از نوک ریشه‌های جوان و رشد یافته استفاده شد. نتایج نشان داد که تعداد کروموزم‌های سلول‌های سوماتیکی در گیاهان تتراپلوئید (۲x=۶۸) بذرالبنج مشبک در مقایسه با گیاهان دیپلوئید (۲x=۳۴) دو برابر شده است (شکل۵). براساس پیک‌های به‌دست آمده از دستگاه فلوسایتومتری، گیاهان در دو دسته دیپلوئید و تتراپلوئید قرار گرفتند، همانطور که در نتایج فلوسایتومتری دیده می‌شود موقعیت پیک فاز G_1 سلول‌های گیاهان تتراپلوئید در کانال ۷۲ قرار دارد (شکل ۷). در حالی که در گیاهان شاهد این پیک در کانال ۳۶ می‌باشد. در ادامه همان‌طور که در شکل۷ دیده می‌شود، در گیاهان تتراپلوئید پیک فاز G_2 در کانال ۱۴۴ قرار دارد که حاکی از مقدار DNA دو برابر آن‌ها نسبت به نمونه‌های دیپلوئید است در حالی‌که این پیک در گیاهان شاهد در کانال ۷۲ قرار دارد که بیانگر هسته‌های با DNA مضاعف شده می‌باشد (شکل ۶).

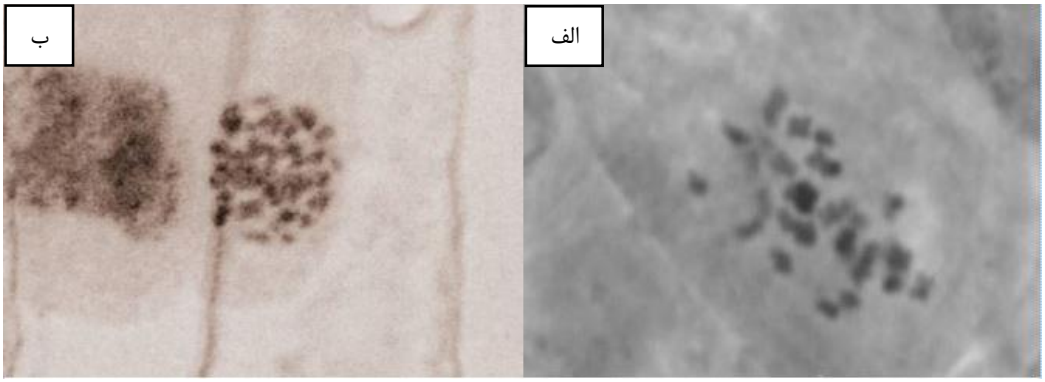
جدول ۳- مقایسهٔ میانگین تراکم روزنه در یک میلی‌متر مربع در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید بذرالبنج مشبک

سطح پلوئیدی	تعداد نمونه	خطای استاندارد ± میانگین تراکم روزنه (mm^2)
دیپلوئید (۲x)	۱۰	۱۸۱/۸ ± ۲۴/۳۳[a]
تتراپلوئید (۴x)	۱۰	۵۲ ± ۹/۴۸[c]

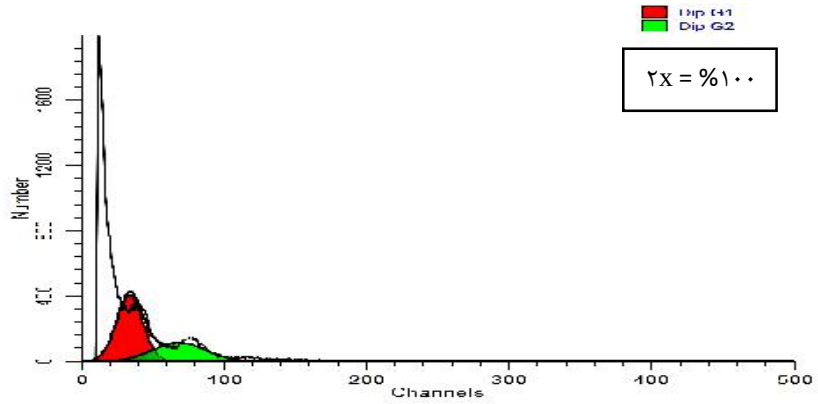
میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون، در سطح احتمال ۱ درصد آزمون DMRT فاقد تفاوت معنی‌داری می‌باشد.



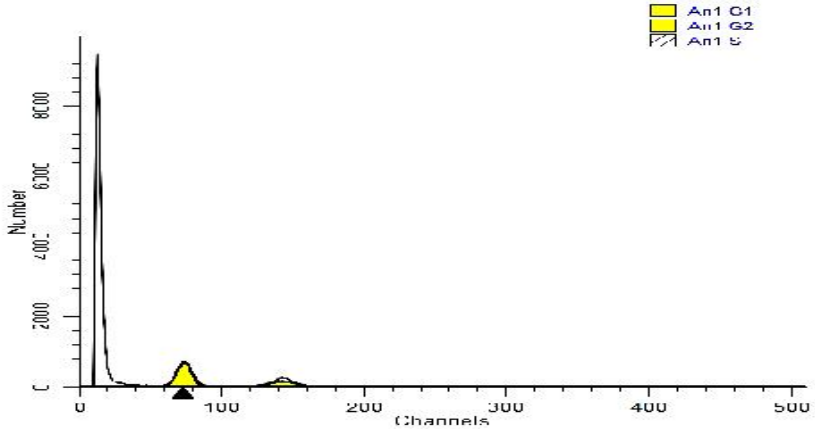
شکل ۴- مقایسه اندازه تراکم روزنه‌ها در گیاه (الف) دیپلوئید (ب) تتراپلوئید بذرالبنج مشبک (شمارش به صورت تصادفی از چند منطقه به تکرار ۱۰ نمونه توسط میکروسکوپ نوری مجهز به لنز مشبک با زوم ۴۰x شمارش شدند).



شکل ۵- شمارش کروموزومی از قسمت نوک ریشه در گیاهان دیپلوئید (الف) و تتراپلوئید (ب) بذرالبنج مشبک.



شکل ۶- پیک‌های بدست آمده از فلوسایتومتری مربوط به گیاهان الف) دیپلوئید (۲x) بذرالبنج مشبک.



شکل ۷- پیک‌های بدست آمده از فلوسایتومتری مربوط به گیاهان تتراپلوئید (۴x) بذرالبنج مشبک.

در آزمایش حاضر گیاهان دیپلوئید بذرالبنج دارای ۳۴ عدد کروموزوم (۲n=۳۴) بودند که این نتایج با نتایج به‌دست آمده از تحقیق شیدایی و همکاران (۴۱) که شمارش کروموزومی این گیاه که را ۳۴ عدد گزارش کرده‌اند، مطابقت دارد.

نتایج حاصل از آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که در این مطالعه تیمار کلشی‌سین به خوبی توانست اکثر گیاهچه‌های تیمار شده را متاثر نماید. به همین سبب درصد قابل ملاحظه‌ای گیاه پلی‌پلوئیدی (میکسوپلوئید و تتراپلوئید) مختلف ایجاد گردید. از جمله عوامل تأثیرگذار در دو برابر شدن کروموزم‌ها می‌توان به خصوصیات ژنتیکی، نوع ریز نمونه، عامل ضد میتوزی، مدت زمان تیمار، غلظت عامل ضد میتوزی، شرایط کشت، سن ریزنمونه اشاره نمود (۳۶،۲۴،۱۳). موفقیت در دو برابر شدن کروموزم بستگی به نفوذپذیری بافت و قابلیت انتقال عامل‌های ضد میتوزی به بخش‌های مریستم دارد (۳). از آنجایی که منطقه مرکزی مسئول تولید سلول‌های انتهایی ساقه است، بنابراین دو برابر کردن کروموزوم‌ها در این ناحیه باعث ایجاد بافت پلی‌پلوئید انتهایی در منطقه تیمار شده می‌گردد. به نظر می‌رسد گیاهان پلی‌پلوئید خالص در نتیجه دو برابر شدن موفق و مناسب سلول‌های تیمار شده در تمام لایه‌های بافتی منطقه مرکزی در ناحیه مریستمی بوجود می‌آیند که در نهایت گیاهانی با سلول‌های تتراپلوئید همگن تولید می‌شود (۲۳). گوپتا (۲۰) گزارش کرد که در واقع کلشی‌سین با جلوگیری از تشکیـــل رشته‌های دوک در هنگام تقسیم سلولی سبب می‌شود که سلول‌ها در مرحلهٔ متافاز متوقف شده و وارد مرحلهٔ آنافاز نشوند و در نهایت با توجه به این‌که مراحل آنافاز و تلوفاز در فرآیند تقسیم سلولی حذف شدند، این فرآیند باعث تجمع تمامی کروموزم‌هایی که در مرحله سنتز چرخه سلولی دو برابر شده بودند در یک سلول گردید. ایجاد گیاهان میکسوپلوئید از این نظر که مریستم گیاهان از سلول‌های زیادی تشکیل شده و ممکن است تمایل جذب کلشی‌سین نیز در آن‌ها متفاوت باشد دور از انتظار نمی‌باشد (۴۵،۲۶). از عوامل دیگر دخیل در تولید گیاهان میکسوپلوئید، تأثیر به سزای کلشی‌سین بر سلول‌های در حال تقسیم است. پلی‌پلوئیدی به دلیل این‌که به طور مساوی در تمام سلول‌های نمونه رخ

نمی‌دهد میکسوپلوئیدی را نیز به همراه خواهد داشت (۵۲). نتایج آزمایش حاضر نشان داد که باتوجه به درصد بالای میزان مرگ و میر ریزنمونه‌ها در غلظت‌های بالای کلشی‌سین، بهترین تیمار کلشی‌سین برای القاء پلوئیدی و تغییر سطح پلوئیدی در گیاه برای به دست آوردن میزان بالایی از گیاهان پلی‌پلوئیدی تیمار ۰/۱ درصد به مدت ۴۸ ساعت است و کلشی‌سین به طور مؤثری قابلیت القای پلی‌پلوئید در این گیاه را دارد. این گیاهان تتراپلوئیدی یک ابزار جدید برای برنامه‌های اصلاحی با هدف افزایش تولیدات ترکیبات دارویی در این گونه‌ها محسوب می‌شود.

منابع

1. Adams, J. and P.E. Hansche. 1974. Population studies in microorganisms I. Evolution of diploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 76: 327-338.
2. Adaniya, S. and D. Shira. 2001. *In vitro* induction of tetraploid Ginger (*zinger officinalis Roscoe*) and its pollen fertility germ inability. Horticultural Science, 88: 277-287.
3. Allum, J.F., D.H. Bringloe and A.V. Roberts. 2007. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. Hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. Plant Cell Reports, 26: 1977-1984.
4. Arzani, A. 2001. Breeding Field Crops. (Authored Pullman and Aysplar). Second edition. Isfahan University Publication Center, 606 pp (In Persian).
5. Asghari, F. 2010. Effect of genotype, explant and hormone compounds in basil plant regeneration (*Ocimum basilicum*). Master's thesis. Department of Horticulture, University of Urmia, 93 pp (In Persian).
6. Bagheri, A.R. and S. Vesal. 2000. Operation of herbal Tissue Culture. Translation. Publication of Astan Quds Razavi, 200 pp (In Persian).
7. Bansal, Y.K. and M. Gokhala. 2009. Direct *in vitro* regeneration of a medicinal tree *Oroxylum indicum* L. Vent. Through tissue culture. African Journal of Biotechnology, 8: 3777-3781.
8. Bouvier, L., P. Guerif, M. Djulbic, C.E. Durel, E. Chevreau and Y. Lespinasse. 2002. Chromosome doubling of pear haploid plants and homozygosity assessment using isozyme and microsatellite markers. Euphytica, 123: 255-262.
9. Castro, C.M., A.C. oliveira and F.I.F. De Carvalho. 2003. Changes oin allele frequencies in colchicines-Treated ryerass populations with RAPD markers. *R. bras*. Agrociencia, 9: 107-112.
10. Dart, S., P. Kron and B.K. Mable. 2004. characterizing polyploidy in *Arabidopsis lyrata* using chromosome counts and flow cytometry. Canadian Journal of Botany, 82: 185-197.
11. Dhawan, O.P. and U.C. Lavania. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. Euphytica, 87: 81-89.
12. Dehghan, E., S. Hakkinen, M. Oksman-Caldentey and F. Shahriari Ahmadi. 2012. Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and *in vitro* hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 110: 35-44.
13. Dhooghe, E., K. Van Laere, T. Eeckhaut, V. Leus and J. Van Huylenbroeck. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104: 359-373.
14. Dijkstra, H. and G.I. Speckmann. 1980. Autotetrapliody in Caraway (*carum carvi* L.) for the increase of the aetheric oil content of the seed. Euphytica journal, 29: 89-96.
15. Dwivedi, N.K., B.N. Susheelamma, A.K. Sikdar, N. Suryanarayana, M.S. Jolly and K. Sengupta. 1989. Induced tetraploidy in mulberry III. Morphological and hybridization studies in cultivars S30 and S36. Indian Journal Series, 28: 131-138.
16. Gao, S.L., B.J. Chen and D.N. Zhu. 2002. *In vitro* production and identification of autotetraploids of *Scutellaria baicalensis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 70: 289-293.
17. Gao, S., D. Zhu, Z. Cai and D. Xu. 1996. Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 47: 73-77
18. Gopi, C., Y. NatarajaSekhar and P. Ponmurugan. 2006. *In vitro* multiplication of *Ocimum gratissimum* L. through direct regeneration. African Journal of Biotechnology, 59: 723-726.
19. Griesbach, R.J. 1990. Colchicine-induced polyploidy in *Eustoma grandiflorum*. Horticulture-Science, 25: 1284-1286.
20. Gupta, P.K. 2002. Cytology Genetics and Evolution. Rastogi publications, India, 864 pp.
21. Hashimoto, T. and Y. Yamada. 1994. Alkaloid biogenesis: molecular aspects. Annual Review of Plant Biology, 45: 257-285.
22. Jellings, A.J. and R.M. Leech. 1984. Anatomical variation in first leaves of nine *Triticum* genotypes and its relationship to photosynthetic capacity. New Phytologist, 96: 371-382.
23. Jones, J.R., T.G. Ranney and T.A. Eaker. 2008. A novel method for induction polyploidy in rhododendron seedlings. Journal American Rhododendron Society, 62: 130-135.
24. Kermani, M.J., V. Sarasan, A.V. Roberts, K. Yokoya, J. Wentworth and V.K. Sieber. 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. Theoretical and Applied Genetics, 107: 1195-1200.
25. Kondorosi, E., F. Roudier and E. Gendrau. 2000. Plant cell-size: growing by ploidy. Current Opinion in Plant Biology, 3: 488-492.
26. Koutoulis, A., A.T. Roy, A. Price, L. Sherriff and G. Lcggett. 2005. DNA ploidy level of colchicines-treated hops (*Humulus lupulus* L.). Scientia Horticulture, 105: 263-265.
27. Kutchan, T.M. 1995. Alkaloid biosynthesis. The basis for metabolic engineering of medicinal plants. Plant Cell, 7: 1059-1070.

28. Levin, D.A. 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. American Naturalist, 122: 1-25.
29. Mable, B.K. 2001. Ploidy evolution in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A test of the nutrient limitation hypothesis. Journal of Evolutionary Biology, 14: 157-170.
30. Malik, A., A. Kamal, K. Saxena and K. Praveen. 1991. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L. Promotive role of N^6-benzylaminopurine in cultures from juvenile leaves. Planta, 184: 148-150.
31. Mensah, J.K., B.O. Obadoni, P.A. Akomeah, B. Ikhajiagbe and J. Ajibolu. 2007. The effects of sodium azide and colchicines treatments on morphologicaj and yield traits of sesame seed (*Sesame indicum L.*). African Journal of Biotechnology, 6: 534-538.
32. Mirhaydar, H. 1993. Herbal sciences (plants used for preventing and treating disease), Volume V, Office of Islamic culture, pp: 43-46 (In Persian).
33. Omidbaigia, R., M. Mirzaee, M.E. Hassani and M. Sedghi Moghadam. 2010. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal of Plant Production, 4: 1735-8043.
34. Omidbaigi, R., S. Yavari, M.E. Hassani and S. Yavari. 2010. Induction of autotetraploidy in Dragonh (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatments. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18: 23-35.
35. Omidbaigi, R. 2009. Production and processing of medicinal plants. (Volume II). Fifth edition, Astan Quds Razavi Publication, 93 pp (In Persian).
36. Petersen, K.K., P. Hagberg and K. Kristiansen. 2003. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73: 137-146.
37. Rout, G.R., S. Samantaray, J. Mottley and P. Das. 1999. Biotechnology of the rose a review of recent progress. Science Horticulture, 81: 201-228.
38. Rowson, J.M. 1949. Increased alkaloid contents of induced polyploid of *Datura*. Nature Reviews Genetics, 154: 81-82.
39. Roy, A.T., G. Leggett and A. Koutoulis. 2001. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant cell reports, 20: 489-495.
40. Shahriari Ahmadi, F., E. Dehghan, M. Farsi and M. Azizi. 2008. Tetraploid induction of *Hyoscyamus muticus* L. using colchicine treatment. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11: 2653-2659.
41. Sheidai, M., M. Nosallanejad and M. Khatamsaz. 1999. Karyological studies in *Hyoscyamus* species of Iran. Nordic Journal of Botany, 3: 369-374.
42. Sikdar, A.K., N.K. Dwiwedi, S.B. Dandin, R. Kumar and K. Giridhar. 1986. Stomatal chloroplast count technique as a tool to ascertain different ploidy level in mulberry. Indian Journal of series, 25: 88-90.
43. Soltis, D.E. and P.S. Soltis. 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evaluation of domesticated plants. American Journal of Botany, 80: 1491-1499.
44. Stebbins, G.L.Jr. 1950. Variation and Evolution in plants. Columbia University press, New York. 112: 764-766
45. Tambong, J.T., V.T. Sapra and S. Garton. 1998. *In vitro* induction of tetraploids in colcchicine-treated *cocoyam* plantlets. Euphytica, 104: 191-197.
46. Tamura, M., R. Tao and A. Sugiura. 1996. Production of dodecaploid plants of Japanese persimmon (*Dioapyros kaki* L.) by colchicines treatment of protoplasts. Plant Cell Reports, 15: 470-473.
47. Thao, N.T.P., I. Miyajima, K. Ureshino, Y. Ozaki and H. Okubo. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell Tissue Organ Culture, 72: 19-25.
48. Tang, Z.Q., D.L. Chen, Z.J. Song, Y.C. He and D.T. Cai. 2010. *In vitro* induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 102: 213-220.
49. Trease, G.E. and W.C. Evans. 1989. Pharmacognosy, 13th Edition, Bailliere and T indall, London, 548-564.
50. Tripathi, L. and J.N. Tripathi. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2: 243-253.
51. Wallaart, T.E., N. Pras and W.J. Quax. 1999. Seasonal variations of artemisinin and its biosynthetic precursors in tetraploid *Artemisia annua* plants compared with the diploid wild-type. Planta medica, 65: 723-728
52. Wan, Y., J.F. Petolino and J.M. Widholm. 1989. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. Theoretical and Applied Genetics, 77: 889-892.
53. Weber, J., V. Georgiev, A. Pavlov and T. Bley. 2008. Flow cytometric investigations of diploid and tetraploid plants and *in vitro* cultures of *Datura stramonium* and *Hyoscyamus niger*. Cytometry Part a, 73: 931-939.
54. Wendel, J.F. 2000. Genome evolution in polyploids. Plant Molecular Biology, 42: 225-249.
55. Wolfe, K.H. 2001. Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. Nature Reviews Genetics, 2: 333-341.
56. Zeng, S.H., C.W. Chen, H. Liu, J.H. Liu and X.X. Deng. 2006. *In vitro* induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in *Citrus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 87: 85-93.
57. Zhang, Q., F. Luo, L. Liu and F. Guo. 2010. *In vitro* induction of tetraploids in crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 101: 41-47
58. Zhang, Z., H. Dai, M. Xiao and X. Liu. 2008. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. Euphytica, 159: 59-65.
59. Zia, M., R. Rehman and M.F. Chaudhary. 2007. Hormonal regulation for call genesis and organgenesis of *Artemisia absinthium* L. African Journal of Biotechnology, 6: 1874-1878.

Effects of *in Vitro* Polyploidy Induction on Regenerated Plantlets of Lattice Henbane (*Hyoscyamus reticulatus* L.)

Seyyed Hadi Madani[1], Bahman Hosseini[2], Esmail Dehghan[3] and Esmail Rezaei Chiyaneh[4]

1 and 4- Ph.D. Student and Assistant Professor, Urmia University
2- Associate Professor, Urmia University (Corresponding authors: b.hosseini@urmia.ac.ir)
3- Ph.D., Ferdowsi University of Mashhad
Received: December 21, 2013 Accepted: April 21, 2014

Abstract

Henbane lattice (*Hyoscyamus reticulatus* L.), is one of the most important medicinal herbs of the solanaceae family which due to having Tropane alkaloids, frequently used in medicinal industry. Medicinal plant Regeneration, proliferation and *In vitro* ploidy induction are one of the interesting issues in biotechnology and plant tissue culture. This study was arranged as a completely randomized factorial design with Two Factors, BAP in three levels (0, 4.4, 8.8 µM) and IAA in three levels (0, 1.1, 2.2 µM) with three replications. Then, *In vitro* polyploidy induction in regenerated plants was surveyed by 5 different concentrations of colchicine at (0.00, 0.05, 0.1and 0.2 %) at various exposure times (24, 48 and 72 h). in order to determining plant ploidy level, microscopic, flow cytometry and chromosome counting were performed. The results showed that after six months; the best results (13.13 plantlet in each explants) were obtained in 8.8 µM BAP combined with 2.2 µM IAA. Flow cytometry study results showed that highest polyploid plants (72%) were obtained in 0.1% colchicine with 48 h exposure times. Polyploidy induction was associated with significant changes in plant characteristics. The chromosome number of diploid plants was 2n = 2x = 34 and in tetraploid plants was 2n= 4x =68. Therefore, can say that colchicine effectively induce polyploidy in the plant.

Keywords: Colchicine, Flow Cytometry, *Hyoscyamus reticulatus* L., *In vitro*, Tetraploidy