

## القای پلی پلوئیدی در محیط درون شیشه ای و تاثیر آن بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی و سیتولوژیکی گیاه بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus* L.)

سیدهادی مدنی<sup>۱\*</sup>، بهمن حسینی<sup>۲</sup>، اسماعیل رضائی<sup>۳</sup>، اسماعیل دهقان<sup>۴</sup>، علی اکبر زاهدی<sup>۱</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان داروئی گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه. ۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه

ارومیه. ۳- استادیار گروه زراعت، دانشگاه ارومیه. ۴- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

\*نویسنده مسئول: madani75@gmail.com

چکیده:

بذرالبنج مشبک *Hyoscyamus reticulatus* L. گیاهی دو ساله از خانواده سولاناسه است که بعنوان یک گیاه داروئی مهم حاوی ترکیبات تروپانی از جمله هیوسيامین و اسکوپولامین می باشد. امروزه استفاده از تکنیک القاء پلی پلوئیدی در شرایط درون شیشه ای با استفاده از مواد شیمیایی القاء کننده جهش مانند کلشی سین، به عنوان یکی از روش های اصلاح گیاهان داروئی بطور وسیعی مورد استفاده قرار می گیرد. در این مطالعه تأثیر غلظت های مختلف کلشی سین (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ درصد) در محیط حاوی MS<sup>۱</sup> فاقد هورمون و در سه دوره زمانی (۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت) بررسی گردید. نتایج آنالیز مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و سیتوژنتیکی نشان داد که در غلظت ۰/۱ درصد و دوره القای ۴۸ ساعت حداکثر گیاهان پلوئید تولید می شود. صفات متعددی نظیر اندازه سطح برگ، میزان کلروفیل، طول و عرض روزنه در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان شاهد تفاوت معنی داری را نشان دادند. حداکثر زنده مانگی گیاهچه ها در غلظت ۰/۰۵ درصد و دوره زمانی ۲۴ ساعت مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: بذرالبنج مشبک، پلی پلوئیدی، کلشی سین، محیط درون شیشه ای، میزان کلروفیل

مقدمه:

گیاهان بعنوان اولین حلقه تشکیل دهنده زنجیره اکولوژیکی نقش مهمی را در زندگی ایفا می کنند. استفاده از گیاهان داروئی به منظور درمان با تاریخ زندگی انسان هم زمان بوده است (۳). هیوسيامین و اسکوپولامین از آلکالوئیدهای تروپانی بسیار مهم داروئی محسوب می شوند، به خاطر نقش درمانی آنها مانند مدری، آنتی اسپاسمودیکی، آنتی کولینرژیکی، مسکن و آرام بخشی مورد استفاده قرار می گیرند (۴). دستکاری پلوئیدی در برنامه اصلاحی بسیاری از گیاهان بطور موفقیت آمیزی استفاده شده و منجر به افزایش بازدهی ترکیبات مهم بسیاری از گونه های گیاهی شده است (۲). دو برابر کردن تعداد کروموزوم ها با تغییرات مهمی در متابولیسم ثانویه گیاهان همراه است (۲). پلی پلوئیدی اغلب فنوتیپ های جدیدی را در رفتار نسبت به گونه های اجدادی خود، مانند افزایش مقاومت به خشکی و تحمل تنش های زیستی و غیر زیستی، افزایش قابلیت رشدی و ایجاد تنوع نشان می دهد. مؤثرترین ماده شیمیایی بکار رفته در مطالعات جهت القاء پلی پلوئیدی کلشی سین است که یک آلکالوئید استخراج شده از بذر و پدازه گیاه سورنجان (*autumnal Colchicum*) می باشد معادل سنتز شده این ماده کلسمید (*colcemid*) نامیده می شود (۲). کلشی سین به عنوان یک بازدارنده طبیعی میتوز، از طریق ایجاد حالت بازدارندگی در تشکیل فیبرهای دوکی و در نتیجه ممانعت از مهاجرت قطبی کروموزوم ها و تقسیم سلولی منجر به ایجاد سلولی با تعداد کروموزوم دو برابر شده می گردد (۲). استفاده از کلشی سین به منظور دوبرابر کردن کروموزوم در تعداد معدودی از گیاهان داروئی مانند بابونه گزارش شده است (۱). همچنین گزارش شده است که گیاهان تتراپلوئید *Hyoscyamus muticus* محصولات تولیدی با ارزش اقتصادی ۱/۵ برابری نسبت به اجداد دیپلوئیدشان نشان داده اند (۴).

<sup>1</sup> Murashig and Skoog, 1962

از آنجایی که برگ، ساقه و ریشه از مهمترین اندام‌های مورد استفاده در گیاهان دارویی محسوب می‌شوند، بنابراین القاء پلی‌پلوئیدی مصنوعی باعث افزایش تولید ترکیب‌های مهم دارویی و همچنین افزایش اندازه این اندام‌ها در مقایسه با انواع دیپلوئید گونه مورد نظر می‌گردد. از آنجائی که تاکنون هیچ گزارشی در مورد القاء پلی‌پلوئیدی در محیط درون شیشه در این گیاه گزارش نشده است و با توجه به اهمیت و نقش آلکالوئید بذرالبنج مشبک، انتظار می‌رود القاء پلوئیدی منجر به ایجاد تغییراتی در صفات مورفولوژیک و عملکرد این گیاه گردد. بنابراین، این پژوهش با هدف بررسی امکان تولید گیاه پلی‌پلوئید بذرالبنج مشبک در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از کلشی‌سین انجام گردید.

مواد و روش‌ها:

مواد گیاهی و کشت در محیط درون شیشه‌ای:

این پژوهش در سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۹۰ در آزمایشگاه کشت بافت، گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه اورمی انجام گردید. بذور این گیاه از کوهپایه‌های منطقه سلطان یعقوب شهرستان نغده از توابع استان آذربایجان غربی جمع آوری شدند و ریزنمونه های گیاهی جهت انجام آزمایش از نقاط انتهایی ساقه این گیاه در شرایط درون شیشه ای تهیه گردیدند. نمونه‌های کشت شده به مدت ۳ هفته در این محیط استقرار یافتند.

مرحله القاء پلی‌پلوئیدی در شرایط درون شیشه‌ای:

جهت القاء پلوئیدی از سرشاخه‌های رشد یافته این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای بدون برگ استفاده شد. بدین منظور جوانه‌های انتهایی با طول یکنواخت یک سانتی متر در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف کلشی‌سین ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ درصد (وزنی به حجمی) کشت شدند. پس از گذشت زمان مورد نظر تیمار (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) گیاهچه‌ها با آب مقطر استریل به مدت ۲ تا ۳ دقیقه شستشو داده شدند و پس از آن در محیط کشت فاقد هورمون، جهت رشد واکشت شده و در شرایط دمایی  $24 \pm 2$  درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاق کشت نگهداری شدند. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. بررسی صفت درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها پس از تیمار با کلشی‌سین، بعد از گذشت ۱۵ روز از واکشت در محیط کشت MS انجام شد. جهت اثبات تغییرات پلوئیدی از دستگاه فلو سایتومتری استفاده گردید. تجزیه واریانس داده‌های توسط نرم افزار SAS مدل ۹/۱ انجام شد. میانگین داده‌ها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۰/۵ مورد مقایسه قرار گرفتند.

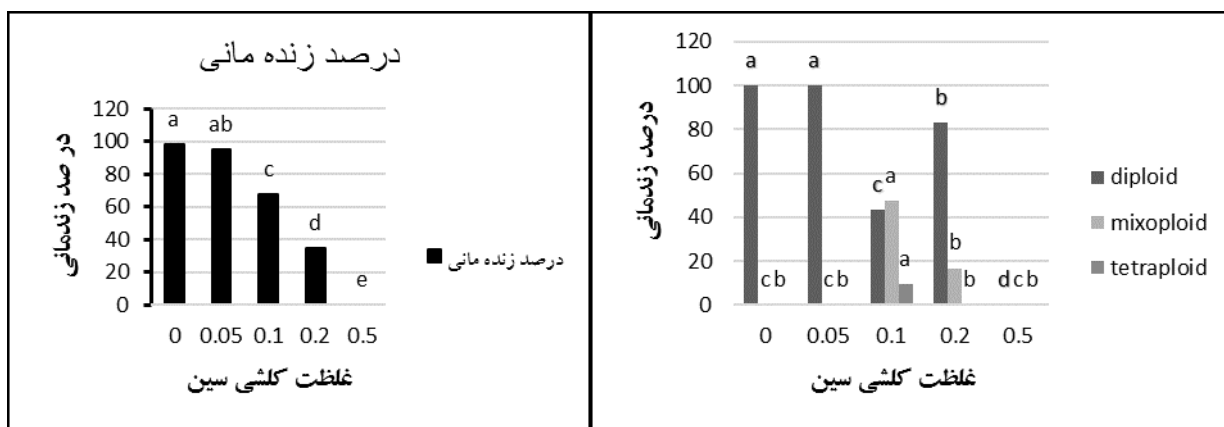
اندازه گیری تعدادی از خصوصیات مورفولوژیکی:

مشخصات گیاهان تیمار شده و اجداد آنها با گیاهان بدون تیمار (شاهد) مورد مقایسه قرار گرفتند. مشخصات قابل مشاهده در گیاهان شامل مساحت سطح برگ توسط دستگاه سطح سنج دیجیتالی، میزان کلروفیل به روش شیمیایی و همچنین طول و عرض روزنه‌ها و سلولهای محافظ روزنه نیز با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به لنز مشبک و با تهیه اسلاید میکروسکوپی از سطح برگ زیر میکروسکوپ صورت گرفت.

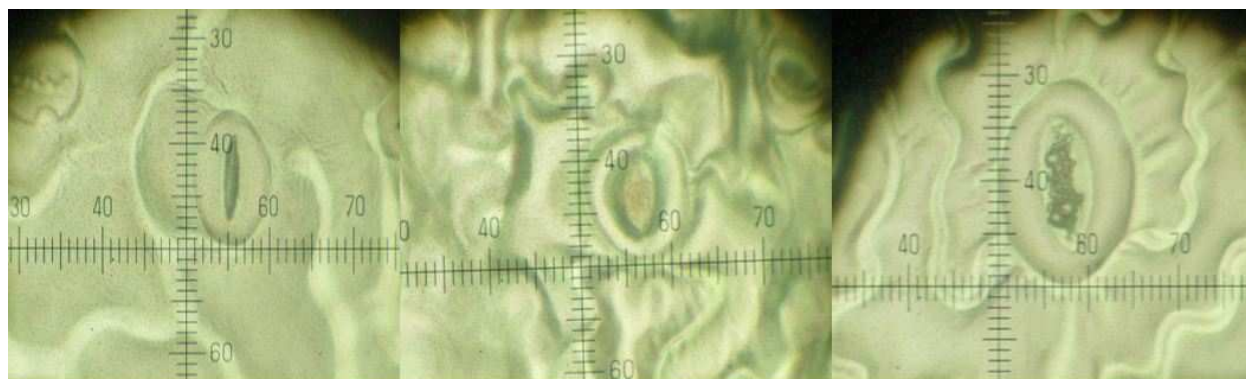
نتایج و بحث:

اثر کلشی‌سین بر روی رشد، نمو و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها پس از گذشت ۱۵ روز از اعمال تیمارها مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین بر درصد زنده مانی ریزنمونه در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. بین غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵

حجمی به وزنی کلسی سین در مقایسه با عدم استفاده از آن تفاوت معنی داری در زنده ماننی ریزنمونه‌ها وجود داشت (شکل ۱ و ۲). در واقع رابطه معکوس بین غلظت کلسی سین و بقاء ریزنمونه‌ها در این آزمایش مورد انتظار بود که با سایر بررسی‌های انجام شده روی گیاهان مختلف در شرایط طبیعی و درون شیشه‌ای مانند گیاه *Astragalus membranaceus* مطابقت داشت (۲).



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف کلسی سین بر درصد احتمالی تغییرات پلوئیدی شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف کلسی سین بر درصد زنده ماننی گیاه بذرالبنج اندازه سطح برگ و میزان کلروفیل در گیاهان پلی پلوئیدی در مقایسه با گیاهان شاهد تفاوت معنی داری نشان دادند (جدول ۱). طول و عرض روزنه در گیاهان پلی پلوئید بزرگتر و کشیده تر از گیاهان شاهد بود و اختلاف معنی داری رو نشان دادند (شکل ۱). پلی پلوئیدی اثرات قابل توجهی بر تغییر نحوه بیان ژن‌ها دارد که ممکن است شامل خاموش شدن یا روشن شدن برخی از ژن‌هایی شود که دو برابر شده‌اند (۲). الگوی تغییر بیان ژن در سلول‌ها و اندام‌های مختلف و حتی در ژنوتیپ‌های مختلف یک گیاه می‌تواند متفاوت باشد (۲). نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات Zhang و همکاران (2008) بر روی گیاه *Phlox subulata* و نتایج Tang و همکاران (2010) بر روی گیاه *Paulownia tomentosa* و همچنین نتایج Allum و همکارانش بر روی گیاه *Rosa rugosa* مشابه بود (۴).



ج) گیاه دیپلوئید (2X)

ب) گیاه میکسو پلوئید (2X + 4X)

الف) گیاه تتراپلوئید (4X)

شکل ۱) مقایسه طول و عرض روزنه بین گیاهان شاهد و پلی پلوئیدی (اندازه بزرگنمایی میکروسکوپ نوری ۴۰ برابر)

صفات	دیپلوئید (2x)	میکسو پلوئید (2x+4x)	تترا پلوئید (4x)
اندازه سطح برگ (سانتی متر مربع)	۳۵/۹۹ <sup>c</sup>	۴۰/۶۴ <sup>b</sup>	۴۹/۲۷ <sup>a</sup>
کلروفیل a	۳۵/۳۳ <sup>c</sup>	۴۵/۴۰ <sup>b</sup>	۵۲/۰۸ <sup>a</sup>
کلروفیل b	۱۸/۰۳ <sup>b</sup>	۱۹/۲۳ <sup>b</sup>	۳۰/۶۰ <sup>a</sup>
کلروفیل کل	۳۷/۰۸ <sup>b</sup>	۴۰/۵۱ <sup>b</sup>	۵۸/۸۴ <sup>a</sup>

جدول ۱ مقایسه صفات مورفولوژیکی بین گیاهان با سطوح پلوئیدی در گیاه بذرالبنج مشک

منابع:

- 1- Saharkhiz M. J., Davies, N., Omidbaigi R and Karimzadeh, Gh. 2007. The effect of ploidy level on the parthenolide content of flower and leaf samples of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.) 3rd Congress of Medicinal Plants. Shahed University, Tehran. Iran.
- 2- Borgheei, S.F., Sarikhani, H., Chaichi, M and Kashi, A. 2010. In vitro induction of polyploidy in lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, Vol. 26, No. 3
- 3- Nasooti, N., Arab, M., Saharkhiz M.J and Dianati, Sh. 2009. The effect of different treatments of colchicine on morphological and ploidy level of *Lavandula angustifolia* L. Proceeding of 6 th Iranian Horticultural Sciences Congress. Guilan, Rasht, I. R. Iran.
- 4- Shahriari-Ahmadi, F., Dehgan, E., Farsi, M and Azizi, M. 2008. Tetraploid induction of *Hyoscyamus muticus* L. using colchicine Treatment. Pakistan journal of biological sciences, 24: 2653-2659.

### ***In vitro* induction of polyploidy on some morphological and cytological traits of lattice henbane (*Hyoscyamus reticulatus* L.)**

Hadi Madani<sup>\*1</sup>, Bahman Hosseini<sup>1</sup>, Esmail Rezaei<sup>2</sup>, Esmail Dehghan<sup>4</sup>, Ali Akbar Zahedi<sup>1</sup>

- 1- Dept. of Horticultural Sciences, College of Agriculture, Urmia University, Orumieh, Iran
  - 2- Dept. of Agronomy Sciences, College of Agriculture, Urmia University, Orumieh, Iran
  - 3- Dept. of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
- Corresponding author Email address: [madani75@gmail.com](mailto:madani75@gmail.com)

Abstract

*Hyoscyamus reticulatus* L. is a biennial plant of the family solanaceae, is an important medicinal plant known to contain tropane compounds such as hyoscyamine and scopolamine. Today using *In vitro* induction of polyploidy techniques by used chemical mutagen such as colchicine, as a widely used medicinal plant breeding. In this study the effect of different concentrations of colchicine (0, 0.5, 0.1, 0.2, and 0.5 %) and three duration times (24, 48, 72 hours) in the medium containing MS without hormone was investigated. The morphological, physiological and cytogenetic results showed that highest percentage of ploidy induction was obtained in 0.1% and 48-hours. Several traits such as leaf surface area, chlorophyll content and the length and width of the stomata in tetraploid plants compared with control plants showed a significant differences. The maximum plantlets viability was observed at concentration of 0.05% and 24-hour period.

Keywords: *Hyoscyamus reticulatus* L., polyploidy, colchicine, *In vitro*, chlorophyll content.