مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۱، شماره ۲، ۱۳۸۹ (۱۱۸-۱۱۱)

بررسی تأثیر اتوتتراپلوئیدی بر میزان اسانس و برخی ویژگی‌های کمی و کیفی گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum* L.)

محمد اسماعیل حسنی[1]*، مریم میرزایی[2]، رضا امیدبیگی[3] و محمد فتحی قره بابا[4]
۱، محقق دانشکده کشاورزی، غذا و منابع طبیعی، پارک تکنولوژی استرالیا، دانشگاه سیدنی
۲، ۳، دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
۴، کارشناس مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کرج
(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۱۷-تاریخ تصویب: ۸۹/۴/۱۲)

چکیده

در گیاه دارویی ریحان، با استفاده از تیمار مریستم انتهایی گیاهچه‌ها با غلظت‌های مختلف محلول کلشیسین (۶ =pH ,(w/v) ٪۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰)، اتوتتراپلوئیدی به دست آمد. میزان اسانس در گیاهان اتوتتراپلوئید حاصل، در مقایسه با گیاهان دیپلوئید شاهد، افزایش معنی‌داری نشان داد و ۶۹ درصد بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود. بررسی اثرات اتوتتراپلوئیدی بر ویژگی‌های کمی و کیفی ریحان با کاشت گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید در مزرعه انجام شد و ویژگی‌هایی نظیر سطح برگ، وزن تر و خشک، میزان کلروفیل، تعداد شاخه‌های فرعی، تعداد و طول خوشه، ضخامت برگ، طول و عرض برگ، ارتفاع گیاه، قطر گل و ساقه و دوره گلدهی بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید اندازه‌گیری و مقایسه گردیدند. نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک، میزان کلروفیل، ضخامت و عرض برگ، قطر ساقه اصلی و تعداد شاخه‌های فرعی و همچنین کاهش در طول برگ، تعداد خوشه، درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید، در ازای افزایش سطح پلوئیدی بود.

واژه‌های کلیدی: **کلشیسین، خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی، ماده موثره.**

مقدمه

گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) ۲n=۲x=۴۸، یکساله و از گیاهان دارویی ارزشمندی است که نه تنها در صنایع غذایی، داروسازی، دندانپزشکی، عطرسازی و صنایع آرایشی و بهداشتی کاربردهای فراوانی دارد (Omidbaigi, 2005) بلکه در طب سنتی و مدرن نیز موارد استفاده بسیاری دارد (Simon et al., 1984). همچنین اسانس ریحان شامل ترکیبات بیولوژیکی فعالی است که اثرات حشره‌کشی (Chavan, & Nikam, 1982; Chogo & Crank, 1981)، ضد نماتد (Chatterje et al., 1982)، ضد قارچ (Reuveni et al., 1984) و ضد باکتری (Ntezurubanz et al., 1984) دارند. پیکر رویشی گیاه ریحان حاوی اسانس بوده و میزان اسانس آن ۰/۵ تا ۱/۱ درصد گزارش شده است (Bernath, 2000; Omidbaigi, 2005).

روش دو برابر کردن کروموزوم با استفاده از کلشیسین، به طور وسیعی در برنامه‌های اصلاحی گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است در گیاهان پلی‌پلوئید حاصل اغلب اندازه گل‌ها، برگ‌ها، میوه و بذر افزایش می‌یابند (Hartwell et al., 2004; Hancock, 1997). بیشتر گیاهان حاصل از پلی پلوئیدی مصنوعی، اغلب با افزایش اندازه سلول همراه هستند که منجر به تولید اندام‌های رویشی و زایشی بزرگ‌تر می‌شود (Byrne et al., 1981). القاء پلی‌پلوئیدی ممکن است با

* نویسنده مسئول: محمداسماعیل حسنی تلفن: ۴۳۲۰۴۲۲۸۳ ۶۱+ E-mail: mehassani@ut.ac.ir

افزایش تولید ترکیبات دارویی مهم و مفید همراه شود. افزایش عملکرد و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به والدین دیپلوئید آنها گزارش شده است. در مواردی که اندام‌های رویشی گیاه منبع مواد موثره هستند، مانند برخی گیاهان دارویی، تغییر سطح کروموزومی، مانند دو برابر کردن مستقیم کروموزوم‌ها، می‌تواند به عنوان روشی ارزشمند و سریع جهت افزایش تولید ترکیبات دارویی، مورد توجه قرار گیرد (Dhawan & Lavania,1996). برای مثال میزان اسانس در گیاهان اتوتتراپلوئید گونه‌ای از نعناع (*Mentha arvensis* L.)، به میزان ۳۰ درصد (Janaki Amal & Sobti, 1962) و در گیاه زیره (*Carum carvi* L.) به میزان ۳۵ تا ۸۵ درصد (Dijkstra & Speckmann, 1980) نسبت به گیاهان دیپلوئید شاهد افزایش نشان داده است. همچنین در بسیاری از گیاهان افزایش سطح پلوئیدی با برخی تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی همراه بوده است (Randall et al., 1977). به عنوان مثال در گیاه دارویی اسطوخودوس *Lavandula angustifolia*، گیاهان اتوتتراپلوئید دارای گل‌ها و بذرهای بزرگ‌تر، دمگل ضخیم‌تر و پرزهای سپری بزرگ‌تر بر روی برگ، نسبت به همتاهای دیپلوئید خود بودند (Urwin & Horsnell, 2007).

به منظور تعیین سطح پلوئیدی از روش‌های مستقیم (شمارش تعداد کروموزوم و فلوسایتومتری) و همچنین از روش‌های غیر مستقیم (مانند اندازه‌گیری طول و عرض سلول‌های روزنه، تراکم سلول‌های روزنه در واحد سطح، بررسی شکل و اندازه دانه گرده، تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه و مشاهدات مورفولوژیکی)، استفاده می‌گردد (Sari et al., 1999). تعیین میزان کلروفیل نیز به عنوان ابزاری جهت تشخیص سطوح پلوئیدی در گونه‌های مختلف با میزان موفقیت‌های متفاوت همراه بوده است (Joseph & Randall, 1981; Timco et al., 1981; Mathura et al., 2006). میزان کلروفیل درگیاهان اتوتتراپلوئید نوعی آکاسیا (*Acasia mearnsii*) ۴۰ درصد بیشتر از میزان کلروفیل همتای دیپلوئید آنها گزارش گردید (Mathura et al., 2006). به دلیل افزایش مستقیم میزان ترکیبات ثانویه در بافت و همچنین افزایش بیوماس در گیاهان دارویی تتراپلوئید که از اندام‌های رویشی (ساقه، برگ و گل) جهت استحصال متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌گردد، دو برابر کردن تعداد کروموزوم‌ها در این گیاهان باعث افزایش عملکرد متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Gonzalez & Weathers, 2003). هدف ازپژوهش حاضر، بررسی امکان استفاده از پلی پلوئیدی به عنوان یک روش اصلاحی در جهت افزایش عملکرد ماده خشک و میزان اسانس و همچنین مقایسه و بررسی برخی خصوصیات رشدی و ویژگی های کمی و کیفی بین گیاهان تتراپلوئید حاصله و گیاهان دیپلوئید در گیاه دارویی ریحان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذرهای گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) از بخش گیاهان دارویی و معطر دانشگاه کوروینوس[1] مجارستان، تهیه گردید و به منظور ایجاد جمعیت اتوتتراپلوئید، در شرایط گلخانه کشت و گیاهچه‌ها در مراحل دو برگ لپه‌ای و دو برگ حقیقی جهت اعمال تیمار کلشیسین مورد استفاده قرار گرفتند. این پژوهش طی سالهای ۸۷-۱۳۸۶ در گلخانه و مزرعه تحقیقاتی دانشگاه تهران واقع در کرج، با عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۴۸ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۵۷ دقیقه شرقی و ارتفاع ۱۳۱۲/۵ متر از سطح دریا، انجام گرفت.

القاء تتراپلوئیدی در گیاه ریحان

در این پژوهش به منظور القاء تتراپلوئیدی، از روش تیمار مریستم انتهایی گیاهچه‌ها با غلظت‌های مختلف کلشیسین استفاده گردید. به این منظور، نقطه انتهایی رشد ۵۰۰ گیاهچه در هر یک از مراحل دو برگ لپه‌ای و دو برگ حقیقی در ۳ روز متوالی و با استفاده از غلظت‌های مختلف محلول آبی کلشیسین (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد (W/V)، pH= ۶)، دی متیل سولفوکسید[2] ۲٪ و توئین[3] ۲۰، به منظور افزایش تماس سطحی، در دمای ۲۷°C و رطوبت نسبی ۹۰ درصد، تیمار شدند.

1. Corvinus
2. DMSO
3. Tweeen 20

شناسایی گیاهان تتراپلوئید با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر

با توجه به اینکه دستگاه فلوسایتومتر با اندازه‌گیری شدت نسبی فلورسانس مقدار نسبی DNA را نشان می‌دهد، سطح پلوئیدی یک نمونه ناشناخته تنها پس از ترکیب با هسته‌های استاندارد گیاه شاخص با سطح پلوئیدی و محل پیک مشخص، تخمین زده می‌شود. در این تحقیق جهت تخمین صحیح سطح پلوئیدی گیاهان تتراپلوئید مفروض توسط دستگاه فلوسایتومتر، از نوعی گیاه رز تتراپلوئید از دسته هیبرید چای و از گروه رزهای هلندی، رقم آکیتو[1]، (*Rosa hybrida* cv. ۲n=۴x=۲۸) (Akitto به عنوان گیاه استاندارد استفاده گردید. برای آنالیز سطح پلوئیدی، نمونه‌های برگ از گیاهچه‌های ۲ ماهه تهیه شدند و دستگاه فلوسایتومتر (PAI, Partec Gmbh, Germany) مجهز به لامپ (HBO – lamp) و لیزر آرگون مورد بررسی قرار گرفتند. نحوه تهیه نمونه برای آنالیز فلوسایتومتریک به این صورت است که به منظور تهیه سوسپانسیون هسته‌ای، به مقدار مساوی بافت برگی از برگ‌های جوان و تازه و ترجیحاً قسمتهای بدون رگبرگ از گیاه مورد آزمون (گیاهانی که با غلظت‌های مختلف کلشیسین تیمار شده بودند) و گیاه استاندارد، به اندازه تقریبی ۱ cm^2، برداشته شد. بافت برگ را در یک پتری دیش پلاستیکی ۵۵ mm شامل µl ۴۰۰ (۰/۵ میلی‌لیتر) از بافر تجاری استخراج هسته[2] متعلق به شرکت Partec (CyStain UV Precise P) قرار داده و با استفاده از یک تیغ تیز خرد شد. این نمونه با با µl ۱۶۰۰ (۱/۵ میلی‌لیتر) محلول فلوروکروم DAPI[3]، که نوعی رنگ مخصوص آنالیز فلوسایتومتری است، مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس نمونه را توسط فیلتر نایلونی ۵۰ µm فیلتر کرده و نمونه صاف شده به داخل لوله شیشه‌ای کوچک متعلق به دستگاه فلوسایتومتر ریخته شد و مورد آنالیز قرار گرفت و هیستوگرام DNA به دست آمد. یک سوسپانسیون نیز از گیاه شاهد (گیاه ریحان تیمار نشده که دیپلوئید ۲n=۲x=۴۸ است) آماده گردید، به عنوان کنترل به کار رفت. برای مقایسه سطح پلوئیدی و به دست آوردن هیستوگرام DNA گیاه دیپلوئید و تتراپلوئید، قطعه کوچکی از نمونه برگ گیاه استاندارد و گیاه دیپلوئید و گیاه تتراپلوئید با هم خرد شدند و سایر مراحل استخراج هسته با استفاده از بافر مخصوص و رنگ‌آمیزی هسته‌های استخراج شده توسط رنگ DAPI، انجام گرفت و به این ترتیب هیستوگرام DNA گیاه دیپلوئید و تتراپلوئید و گیاه استاندارد در کنار هم رسم شد. مقدار DNA هر نمونه با بررسی حداقل ۱۰۰۰۰ سلول بررسی گردید. نمونه‌هایی که در مرتبه اول و دو ماه پس از تیمار توسط دستگاه فلوسایتومتر به عنوان گیاهان تتراپلوئید شناخته شدند، ۳ ماه بعد مجدداً توسط این دستگاه چک شدند و تنها گیاهانی که تتراپلوئید بودن آنها مجدداً مورد تایید قرار گرفت، برای بررسی و مقایسه با گیاهان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند.

مقایسه ویژگی‌های کمی و کیفی بین گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید

پس از شناسایی گیاهان اتوتتراپلوئید حاصل از تیمار گیاهان دیپلوئید با کلشیسین، توسط دستگاه فلوسایتومتر، گیاهان مذکور به مزرعه منتقل شدند و شرایط مطلوب رشدی در مزرعه برای این گیاهان فراهم گشت تا به مرحله تولید بذر رسیدند. بذرهای حاصل از آنها در گلدان کاشته شده و پس از رسیدن به مرحله ۴ برگی همراه گیاهان شاهد به مزرعه منتقل شدند. مطالعات مزرعه‌ای جهت بررسی تاثیر اتوتتراپلوئیدی بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی و میزان ماده موثره در گیاه دارویی ریحان، انجام شد. گیاهان در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۵ کرت کاشته شدند. در هر کرت ۴ ردیف گیاه و فاصله ردیف‌ها از هم ۳۰ سانتی متر و فاصله گیاهان بر روی ردیف نیز ۳۰ سانتی متر در نظر گرفته شد. پس از استقرار گیاهان در مزرعه و در دوره رشد، گیاهان تتراپلوئید و گیاهان شاهد از نظر میزان کلروفیل، سطح برگ، تعداد شاخه‌های فرعی، تعداد و طول خوشه، ضخامت و طول و عرض برگ، ارتفاع گیاه، قطر ساقه اصلی، دوره گلدهی و وزن تر و خشک، مورد مقایسه و ارزیابی واقع شدند. برای مقایسه خصوصیات کمی و کیفی گیاهان دیپلوئید و

1. Akitto
2. Nuclei Extraction Buffer
3. 4´, 6´,- Diamido - 2 - Phenylindole

تتراپلوئید، تعداد ۲۰ گیاه به صورت تصادفی از هر یک از جمعیت‌های دیپلوئید و تتراپلوئید به صورت تصادفی انتخاب شدند و در تجزیه و تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

ارزیابی میزان کلروفیل

به منظور بررسی تاثیر تتراپلوئیدی بر میزان کلروفیل برگ‌ها، تعداد ۴۰ برگ توسعه یافته از هر یک از جمعیت‌های تتراپلوئید و گیاهان شاهد، به صورت تصادفی نمونه‌گیری شد و از هر برگ ۲ دیسک برگی به قطر ۱ cm تهیه گردید و وزن تر دیسک‌های برگی با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم، به دست آمد. کلروفیل این نمونه‌ها توسط حلال دی متیل سولفوکسید استخراج شده و میزان جذب نور (A) در دو طول موج ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV/VIS 6505 اندازه‌گیری شد. سپس میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل از رابطه‌های زیر (Richardson et al., 2002) و بر اساس میلی گرم کلروفیل در گرم وزن تر برگ ($mg\ g^{-1}FW$) به دست آمد:

میزان کلروفیل a ($g\ l^{-1}$) = $(۰/۰۱۲۷ \times A_{663}) - (۰/۰۰۲۶۹ \times A_{645})$

میزان کلروفیل b ($g\ l^{-1}$) = $(۰/۰۲۲۹ \times A_{645}) - (۰/۰۰۴۶۸ \times A_{663})$

میزان کلروفیل کل ($g\ l^{-1}$) = $(۰/۰۲۰۲ \times A_{645}) + (۰/۰۰۸۰۲ \times A_{663})$

استخراج اسانس

استخراج اسانس با استفاده از ۲۰ گرم پیکر رویشی خشک شده (شامل برگ‌ها و سرشاخه‌های گلدار خشک شده) در ۵ تکرار، به روش تقطیر با آب و توسط دستگاه کلونجر، به مدت ۳ ساعت انجام گرفت.

ارزیابی سایر ویژگی‌ها

اندازه‌گیری سطح برگ به وسیله دستگاه تعیین سطح برگ Delta T Devices ساخت انگلستان و ضخامت برگ، قطر گل و ساقه توسط کولیس دیجیتال با دقت ۰/۰۱ mm انجام شد. نرم‌افزار آماری SPSS برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. تفاوت‌های آماری در خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و اسانس بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید، با استفاده از آزمون t انجام گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪) صورت گرفت.

نتایج

القاء تتراپلوئیدی در گیاه ریحان

نتایج حاصل از بررسی سطح پلوئیدی گیاهان تیمار شده با سطوح مختلف کلشیسین (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد (w/v) با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر نشان داد که در بین گیاهان تیمار شده در مرحله دو برگ حقیقی هیچ گیاه تتراپلوئیدی تولید نشده اما در بین گیاهان تیمار شده در مرحله دو برگ لپه‌ای، در دو سطح ۰/۱ و ۰/۵ درصد، گیاهان تتراپلوئید ایجاد شدند (جدول ۱).

جدول ۱- تعداد گیاهان باقی مانده پس از تیمار، گیاهان تتراپلوئید و میکسپلوئید (٪) حاصل از تیمار گیاهچه‌های ریحان با کلشیسین در مرحله دو برگ لپه‌ای

غلظت کلشیسین (w/v) (٪)	گیاهان باقیمانده پس از تیمار (٪)	گیاهان تتراپلوئید (٪)	گیاهان میکسپلوئید (٪)
۰	۹۲	۰	۰
۰/۰۵	۷۶	۰	۱۶
۰/۱	۵۳	۳	۳۸
۰/۲	۴۹	۰	۴۱
۰/۵	۲۱	۸	۱۱
۰/۷۵	۹	۰	۵

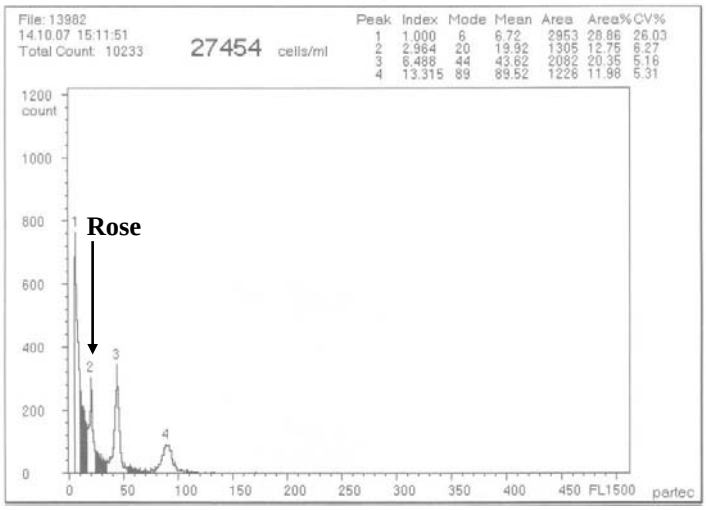
شناسایی گیاهان تتراپلوئید با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر

در بررسی سطح پلوئیدی گیاهانی که پس از تیمار باقی‌مانده و به رشد خود ادامه دادند، توسط دستگاه فلوسایتومتر، سه گروه: گیاهان تتراپلوئید، میکسپلوئید و دیپلوئید، شناسایی شدند (شکل ۱).

تاثیر اتوتتراپلوئیدی بر میزان اسانس

میزان اسانس در گیاهان تتراپلوئید به طور معنی‌داری (در سطح احتمال ۱٪) از اسانس تولید شده توسط گیاهان دیپلوئید بیشتر بود به طوریکه میزان

اسانس در گیاهان دیپلوئید ،بر اساس وزن خشک، ۰/۹۷ درصد (w/w) و در گیاهان تتراپلوئید ۱/۶۴ درصد (w/w) ارزیابی شد و اسانس تولید شده توسط گیاهان تتراپلوئید ۶۹/۰۷ درصد بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود (جدول ۲).



شکل ۱- هیستوگرام مربوط به تجزیه فلوسایتومتریک هسته‌های گیاه ریحان در حالت دیپلوئید (پیک شماره۳) و تتراپلوئید (پیک شماره۴) به همراه گیاه شاخص (پیک شماره۲) قابل ذکر است که پیک شماره ۱، پیک حاصل از سلول‌های شکسته است و به عنوان Noise محسوب می‌گردد و جزء پیک گیاه در نظر گرفته نمی‌شود.

جدول ۲- مقایسه میانگین برخی ویژگی‌های کمی و کیفی در گیاهان دیپلوئید و اتوتتراپلوئید ریحان
(میانگین و خطای استاندارد (SE) برای هر یک از صفات مشخص شده است.)

ویژگی های کمی و کیفی مورد بررسی مشخصات رشدی	گیاهان تتراپلوئید SE ± میانگین	گیاهان دیپلوئید SE ± میانگین
طول برگ (cm)	۵/۱۱±۰/۰۷ b	۵/۳۸± ۰/۰۹۴ a
عرض برگ (cm)	۳/۹۷±۰/۱۹ a	۳/۰۵±۰/۰۳ b
وزن هزار دانه (g)	۲/۰۹±۰/۰۰۲ a	۱/۵۳±۰/۰۰۱ b
سرعت جوانه زنی (روز/ بذر)	۴۹/۳۶±۰/۲۸ b	۸۵/۲۴±۱ a
جوانه زنی (٪)	۳۴/۴±۱/۳۶ b	۹۶±۰/۳۱ a
ارتفاع گیاه (cm)	۴۶/۶۱±۱/۲۸ a	۴۴/۷±۱/۱۱ a
وزن تر (g)	۴۶۴/۴۶±۱۵/۳ a	۳۵۰/۱۴±۱۶/۴ b
وزن خشک (g)	۴۸/۱۶±۳/۸۸ a	۳۱/۵۶±۵/۱۴ b
تعداد شاخه جانبی	۱۷±۱/۰۹ a	۱۱/۸۰±۰/۲۸ b
ضخامت برگ (mm)	۰/۴۵±۰/۰۰۵ a	۰/۲۸±۰/۰۱ b
قطر ساقه اصلی (mm)	۳/۳۶±۰/۲۸ a	۳/۱۲±۰/۰۳۷b
سطح برگ $(cm)^2$	۱۲/۵۸±۳۰/۳۰ a	۱۲/۷۸±۲/۹۲ a
تعداد خوشه	۱۱۵±۱۳/۸۷ b	۱۹۵/۲±۱۲/۴۴ a
طول خوشه (cm)	۱۳/۲۷±۱/۰۷ a	۱۵/۵۴±۰/۹۱ a
قطر گل (mm)	۴/۹۱±۰/۳۲ a	۴/۵±۰/۱۸ a
میزان اسانس (%)	۱/۶۴±۰/۰۳۵ a	۰/۹۷± ۰/۰۰۱ b
دوره گلدهی (روز)	۱۰۴±۲/۹۱ a	۷۹±۷/۸۱ b
میزان کلروفیل a $(mg\ g^{-1}FW)$	۱/۶۴۴۰ ±۰/۰۳۶ a	۱/۳۵۰۷±۰/۰۳۲b
میزان کلروفیل b $(mg\ g^{-1}FW)$	۰/۹۸۸۱± ۰/۰۷۴a	۰/۴۶۲۷± ۰/۰۰۱b
میزان کلروفیل کل $(mg\ g^{-1}FW)$	۲/۵۵۳۷ ±۰/۰۹۳ a	۱/۹۳۴۳±۰/۰۴۹ b

* میانگین های با حروف مشابه در هر ردیف، در سطح ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن فاقد تفاوت معنی دار آماری می‌باشند.

تاثیر اتوتتراپلوئیدی بر میزان کلروفیل

مقایسه میانگین‌های میزان کلروفیل در گیاهان دیپلوئید شاهد و گیاهان اتوتتراپلوئید نشان داد که میزان کلروفیل در گیاهان اتوتتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید افزایش معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد داشت و میانگین میزان کل کلروفیل در گیاهان تتراپلوئید ۳۲ درصد بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود.

تاثیر اتوتتراپلوئیدی بر سایر ویژگی‌های کمی و کیفی ارزیابی شده

در بررسی و مقایسه ویژگی‌های کمی از قبیل: عرض و ضخامت برگ، وزن هزاردانه، وزن تر و خشک، تعداد شاخه جانبی، قطر ساقه، طول دوره گلدهی (روز) گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید برتر بودند. از طرفی در برخی دیگر از صفات کمی ارزیابی شده مانند: طول برگ، تعداد خوشه و درصد جوانه زنی بذر، گیاهان دیپلوئید نسبت به گیاهان تتراپلوئید دارای برتری بودند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین برخی صفات کمی نظیر: ارتفاع گیاه، سطح برگ، طول خوشه، قطر گل در بین گیاهان هر سطح پلوئیدی مورد بررسی (دیپلوئید و تتراپلوئید) تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال پنج درصد، نشان ندادند (جدول ۲). در بررسی و مقایسه صفت کیفی سرعت جوانه‌زنی (روز/ بذر) بین گیاهان دیپلوئید و اتوتتراپلوئید مشاهده گردید که سرعت جوانه‌زنی در گیاهان اتوتتراپلوئید به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از گیاهان دیپلوئید بود.

بحث

تاثیر اتوتتراپلوئیدی بر میزان اسانس

افزایش در میزان اسانس (۶۹/۰۷ درصد) گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید، که در این تحقیق حاصل گردید را می‌توان در نتیجه تغییر عوامل و فاکتورهای متعددی که تحت تأثیر افزایش سطح پلوئیدی ایجاد می‌شوند و هر یک به نحوی در تولید اسانس دخیل می‌باشند، دانست. از جمله این عوامل می‌توان به تغییر بیان برخی از آنزیم‌های کلیدی (Warner & Edwards, 1993) تنوع و بیان ایزوآنزیم‌ها، تغییراتی که دو برابر شدن کروموزوم‌ها در افزایش میزان نسخه‌برداری و بیان ژن و همچنین افزایش محصولات ژنی و تولید بیوماس بیشتر (Janaki Amal & Sobti, 1962) ایجاد می‌نمایند، اشاره کرد که تمام این عوامل می‌توانند توجیه کننده افزایش و یا تغییر میزان اسانس باشند. افزایش اندازه سلول‌ها که در نتیجه افزایش سطح پلوئیدی می‌تواند ایجاد شود، خود می‌تواند عاملی برای افزایش میزان مواد ذخیره‌ای در سلول‌ها، رنگ و رایحه (Kondorosi et al., 2000) باشد. افزایش میزان وزن تر و خشک در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید نیز می‌تواند به عنوان یک توجیه منطقی برای افزایش میزان اسانس در گیاهان تتراپلوئید، مورد توجه قرار گیرد. استفاده از روش تحریک پلی‌پلوئیدی در برخی دیگر از گیاهان دارویی نیز موجب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گردیده است. در گیاه دارویی عطر مازندران (*Artemisia annua* L.)، ماده موثره آرتمیزینین[1] در گیاهان تتراپلوئید بیش از ۶ برابر، در مقایسه با همتای دیپلوئید، افزایش یافت (Gonzalez & Weathers, 2003) و همچنین در مورد گیاه خس دارویی (*Vetiveria zizaniodes* L.)، گزارش گردیده است که دو برابر کردن کروموزوم باعث افزایش اسانس به میزان ۶۲/۵ درصد در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید گردید (Lavania, 1988).

تاثیر اتوتتراپلوئیدی بر میزان کلروفیل

از آنجا که فرض بر آن است با دو برابر شدن ژنوم فعالیت متابولیکی، سنتز rRNA و نسخه‌برداری افزایش می‌یابد، این افزایش می‌تواند (Kondorosi et al., 2000) بر میزان تنفس (Byrne et al., 1981) و فعالیت ژنی و تنوع و میزان فعالیت آنزیم‌ها و انتقال الکترون در فتوسنتز می‌تواند تاثیر داشته باشد (Randall et al., 1977). افزایش میزان کلروفیل گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید که در این تحقیق مشاهده گردید، در گونه‌های گیاهی دیگر نیز گزارش شده است (Urwin & Horsnell, 2007; Mathura et al., 2006).

در گیاه ریحان می‌توان از روش تعیین میزان کلروفیل نیز برای شناسایی و غربال اولیه گیاهان دیپلوئید از تتراپلوئید استفاده کرد. در گیاه ریحان به دلیل زیاد بودن تعداد کروموزوم‌ها (۴۸= ۲x= ۲n، و

1. Artemisinin

اندازه کوچک آنها (Ryding, 1994; Xing-Hua et al., 1984). استفاده از روش‌هایی مانند روش شمارش تعداد کروموزوم دشوار است به خصوص در مواردی که تعداد جمعیت مورد ارزیابی زیاد است و در این شرایط استفاده از دستگاه فلوسایتومتر نیز به دلیل زیاد بودن تعداد نمونه‌های مورد بررسی، پر هزینه است. اما به دلیل اینکه استفاده از این روش در تمام موارد ممکن است نتایج قابل اعتمادی نداشته باشد نمونه‌هایی که تتراپلوئید بودن آنها از طریق آزمون تعیین میزان کلروفیل اثبات گردیده است باید به وسیله دستگاه فلوسایتومتر نیز تایید شوند.

تاثیر اتوتتراپلوئیدی بر سایر ویژگی‌های کمی و کیفی ارزیابی شده

پلی‌پلوئیدی اثرات قابل توجهی بر تغییر نحوه بیان ژن‌ها دارد که ممکن است شامل خاموش شدن، روشن شدن برخی از ژن‌هایی شود که دو برابر شده‌اند و الگوی تغییر بیان ژن در سلول‌ها و اندام‌های مختلف و حتی در ژنوتیپ‌های مختلف یک گیاه می‌تواند متفاوت باشد (Adams & Wendel, 2005). افزایش قطر ساقه اصلی که در گیاهان تتراپلوئید مشاهده گردید با نتیجه‌ای که Sari et al. (1999) در بررسی و مقایسه قطر ساقه اصلی در گیاهان هاپلوئید و دیپلوئید هندوانه[1] به آن دست یافتند، مطابق است. آنها گزارش نمودند که در گیاهان دیپلوئید هندوانه، که با دو برابر کردن کروموزوم گیاهان هاپلوئید به دست آمده بود، سطح برگ، قطر ساقه اصلی و ارتفاع گیاه در مقایسه با گیاهان هاپلوئید افزایش یافته است. همچنین مطابق پژوهش انجام شده روی گیاه آفتابگردان[2]، وزن بذر گیاهان اتوپلی‌پلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید بیشتر بود (Strivastava & Strivastava, 2002). افزایش وزن خشک که در نتیجه افزایش سطح پلوئیدی در این آزمایش مشاهده گردید در پژوهشی دیگر نیز که بر روی گیاه بذرالبنج[3] انجام گرفت، مشاهده شد (Lavania & Strivastava, 1991). افزایش وزن تر و خشک، ضخامت ساقه اصلی و تعداد ساقه‌های جانبی، میزان کلروفیل و ضخامت برگ در گیاهان اتوتتراپلوئید حاصل، در مجموع بیانگر افزایش قدرت رشد در گیاهان ریحان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید می‌باشد و همانطور که توسط برخی از محققان گزارش گردیده است، تکنیک دو برابر کردن کرموزوم‌ها می‌تواند با افزایش فعالیت ژنی و در نتیجه افزایش تنوع آنزیم‌ها، افزایش نسبت فتوسنتز، کاهش میزان تعرق و سرعت رشد کمتر گیاه باعث مقاومت بیشتر نسبت به تنش‌های تغذیه‌ای و معدنی و شرایط محیطی گردد (Dhawan & Lavania, 1996) و همچنین در تحقیقات زیادی نشان داده شده است که محتوا و عملکرد متابولیت‌های ثانویه توسط این تکنیک افزایش می‌یابد (Saharkhiz, 2007; Dhawan & Lavania, 1996; Lavania, 1988; Gonzalez & Weathers, 2003).

1. *Citrulus lanatus* L.

2. *Helianthus annuus* L.
3. *Hyoscyamus niger* L.

REFRENCES

1. Adams, K. & Wendel, J. F. (2005). Novel paterns of gen expression in polyploidy plants. *Trends in genetics*, 21(3), 539-543.
2. Bernath, J. (2000). *Medicinal and aromatic plants*. Mezo. Publ. Budapest, Pp. 667.
3. Byrne, M. C., Nelson, C. J. & Randall, D. D. (1981). Ploidy effects on anatomy and gas exchange of tall fescue leaves. *Plant Physiology*, 68, 891-893.
4. Chatterje, A., Sukul, N. C., Laskal, S. & Ghoshmajumdar, S. (1982). Nematicidal principles from two species of *Lamiaceae*. *Journal of Nematology*, 14, 118-120.
5. Chavan, S. R. & Nikam, S. (1982). Mosquito larvicidal activity of *Ocimum basilicum* Linn. *Indian Journal of Medicinal Research*, 72, 220-222.
6. Chogo, J. B. & Crank, G. (1981). Chemical composition and biological activity of the Tanzanian plant *Ocimum suave*. *Journal of Natural Products*, 44 (3), 308-311.
7. Dhawan, O. P. & Lavania, U. C. (1996). Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. *Euphytica*, 87, 81-89.
8. Dijkstra, H. & Speckmann, G. I. (1980). Autotetrapliody in Caraway (*carum carvi* L.) for the increase of the aetheric oil content of the seed. *Euphytica*, 29, 89-96.
9. Gonzalez, L. D. J. & Weathers, P. J. (2003). Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. *Plant Cell Reports*, 21, 809-811.

10. Hancock, J. F. (1997). The colchicine story. *Hortscience*, 32, 1011–1012.
11. Hartwell, L. H., Hood, L., Goldberg, M. L., Reynolds, A. E., Silver, L. M. & Veres, R. C. (2004). *Genetics from genes to genomes*, (2nd ed.). McGraw Hill, Boston. Pp. 324.
12. Janaki Amal, E. R. & Sobti, S. M. (1962). The origin of the Jammu Mint. *Current Science*, 31, 387-388.
13. Joseph, M. C. & Randall, D. D. (1981). Photosynthesis in polyploidy tall fescue. *Plant physiology*, 68, 894-898.
14. Kondorosi, E., Roudier, F. & Gendreau, E. (2000). Plant cell size control: growing by ploidy? *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 488-492.
15. Lavania, U. C. (1988). Enhanced productivity of the essential oil in the artificial autotetraploid of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.). *Euphytica*, 38, 271-276.
16. Lavania, U. C. & Strivastava, S. (1991). Enhanced productivity of tropane alkaloids and fertility in artificial autotetraploids of *Hyoscyamus niger* L. *Euphytica*, 52, 73-77.
17. Mathura, S., Fossey, A. & Beck, S. (2006). Comperative study of chlorophyll content in diploid and tetraploid black Wattle *(Acacia mearnsii*). *Forestry*, 79(4), 381-388.
18. Ntezurubanz, L., Soheffer, J. J. C., Looman, A. & Baerhiem Svendsen, A. (1984). Composition of essential oil of *Ocimum kilimandscharicum* grown in Rwanda. *Planta Medica*. Pp. 385-388.
19. Omidbaigi, R. (2005). *Production and processing of medicinal plants*. Vol. 3. Astane Quds Publ. Tehran, pp. 347. (In Farsi).
20. Randall, D. D., Nelson, C. J. & Asay, K. H. (1977). Ribulose bisphosphate carboxylase altered genetic expression in tall fescue. *Plant physiology*, 59, 38-41.
21. Richardson, A. D., Duigan, S. P. & Berlyn, G. P. (2002). An evaluation of noninvasive methods to estimate foliare chlorophyll content. *New Phytologist*, 153, 185- 194.
22. Ryding, O. (1994). Notes on the sweet basil and its wild relatives (*Lamiaceae*). *Economic Botany*, 48(1), 65-67.
23. Reuveni, R., Fleisher, A. & Putievsky, E. (1984). Fungi static activity of essential oils from *Ocimum basilicum* chemo types. *Phytopath*, 110, 20-22.
24. Saharkhiz, M. J. (2007). *The effects of some environmental factors and ploidy level on morphological and physiological characteristics of feverfew (Tanacetum parthenium L.) medicinal ornamental plant*. Ph. D. thesis. Faculty of Agriculture. Tarbiat Modares University, Iran.
25. Sari, N., Abak, K. & Pitrat, M. (1999). Comparison of ploidy level screening methods in Watermelon. *Scientia. Horticulturae*, 82, 265- 277.
26. Simon, J. E., Craker, L. E. & Chadwick, A. (1984). *Herbs: an indexed bibliography, 1971- 1980. The scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the temperate zone*. Archon Books, Hamden CT. Pp. 215.
27. Strivastava, R. & G. Strivastava, K. (2002). Autopolyploids of *Helianthus annuus* L. Var. morden. *Cytologia*, 67 (2), 213-220.
28. Timco, M. P., Vasconcelos, A. C. & Fairbrother, D. E. (1981). Euploidy in Ricinus I. Euploidy and gene dosage effects on cellular proteins. *Biochemistry Genetica*, 18, 171-183.
29. Urwin, N. A. R. & Horsnell, J. (2007). Generation and characterisation of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. *Euphytica*, 156, 257–266.
30. Xing-Hua, M., Ruo-Lin, Q. & Wen-Bing, X. (1984). Chromosome Observations of Some Medical Plants in Xinjiang. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 22 (3), 243-249.
31. Warner, D. A. & Edwards, G. E. (1993). Effects of polyploidy on photosynthetic rates, photosynthetic enzymes, contents of DNA, chlorophyll and sizes and numbers of photosynthetic cells in the c_4 dicot *Atriplex confertifolia*. *Plant physiology*, 91, 1143-1151.