نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰ ، ص. ۴۶۹-۴۶۱
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 25, No. 4, Winter 2012, P. 461-469
ISSN: 2008 - 4730

بررسی امکان القاء پلی پلوئیدی در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) با استفاده از کلشی سین

سعید ملک زاده شفارودی[1*]- عسکر غنی[2]- مازیار حبیبی[3]- اکرم امیری[4]

تاریخ دریافت:۹۰/۵/۴
تاریخ پذیرش:۹۰/۱۰/۶

چکیده

به منظور بررسی القاء پلی پلوئیدی در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.)، دو آزمایش مستقل به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا" تصادفی با دو فاکتور غلظت کلشی سین و مدت زمان تیمار با ۴ تکرار انجام شد. غلظت کلشی سین با چهار سطح (صفر، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) و مدت زمان تیمار در سه سطح (۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت) بود. در آزمایش اول تیمارهای فوق روی بذر و در آزمایش دوم روی مریستم انتهایی اعمال شد. در آزمایش اول کلیه گیاهان غیر از شاهد از بین رفتند. در آزمایش دوم اعمال تیمارها در مرحله ۸-۶ برگی با استفاده از روش آغشته نمودن نوک مریستم انتهایی توسط گلوله پنبه ای انجام شد. پس از مشاهده تغییرات ظاهری، از هر تیمار تعدادی نمونه توسط فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین مطالعات روزنه ای جهت بررسی تغییرات روزنه ای انجام شد. نتایج حاصل از بررسی‌های فلوسایتومتری، مورفولوژیک و روزنه ای در رابطه با القای پلوئیدی نشان داد که غلظت تیمار تاثیر معنی داری بر این فاکتور داشته است به طوری که بیشترین میزان احتمال پلوئیدی (۳/۶۳ درصد) مربوط به غلظت ۰/۰۵ درصد کلشی سین می باشد و زمان تیمار و اثرات متقابل تاثیر معنی داری بر این فاکتور نداشتند. از طرف دیگر اثرات ساده غلظت کلشی سین و مدت زمان تیمار و اثر متقابل آنها بر درصد زنده مانی گیاهان معنی دار بود به طوری که پس از تیمار شاهد (غلظت صفر) بیشترین زنده مانی (۴۷/۴) مربوط به غلظت ۰/۰۵ بود. غلظتهای بالاتر باعث از بین رفتن درصد بالاتری از گیاهان شدند. در میان زمانهای مختلف تیمار نیز بیشترین زنده مانی (۶۰/۵ درصد) مربوط به تیمار ۱۲ ساعت بود. نتایج کلی نشان داد که غلظت ۰/۰۵ درصد و مدت زمان ۶ ساعت بهترین تیمار جهت القاء پلوئیدی در گیاه ریحان می باشند.

واژه‌های کلیدی: ریحان، سطح پلوئیدی، فلوسایتومتری، کلشی سین

مقدمه

ریحان (*Ocimum basilicum* L.) یکی از گیاهان مهم متعلق به خانواده نعناع (Lamiaceae) است که به عنوان گیاه دارویی، ادویه‌ای و همچنین به صورت سبزی تازه مورد استفاده قرار میگیرد (۱ و ۲۱). ریحان حاوی اسانس بوده و پیکر رویشی آن اشتها آور است و برای معالجه نفخ شکم و کمک به هضم غذا و برای معالجه برخی ناراحتیهای قلبی استفاده میگردد. اسانس ریحان خاصیت ضد قارچی و باکتریایی دارد و نیز در صنایع غذایی، آرایشی، بهداشتی و عطر سازی استفاده میشود (۱، ۶ و ۲۱).

دست ورزی سطح پلوئیدی، ابزار توانمندی در اصلاح ژنتیکی بسیاری از گیاهان است (۱۷). القاء پلی‌پلوئیدی در گیاهان اغلب موجب تولید واریانتهایی جدید با کیفیت متمایز می‌شود و از سوی دیگر از طریق دو برابر شدن سطح کروموزومی، افزایش تعداد نسخه-های ژنی بیان کننده ترکیبات مواد موثره و افزایش جثه گیاه، موجب بیشتر شدن ترکیبات ثانویه و دارویی آن می‌شود (۲۷). تغییر سطوح پلوئیدی با تاثیر بر فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، بر مسیرهای فتوسنتزی متابولیت‌های ثانویه اثر می گذارد. افزایش سطح پلوئیدی غالبا" باعث افزایش مواد موثره در گیاهان دارویی شده است. میزان اسانس گیاهان تتراپلوئید زیره[5] ۳۵/۶ درصد بیشتر از گیاهان دیپلوئید

۱و۳- استادیار و دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email: malekzadeh-s@um.ac.ir
۲و۴- دانشجوی دکتری و دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

5- *Carum carvi*

بوده است (۸). در گونه ای علف لیمو[1] افزایش سطح پلوئیدی موجب افزایش مواد موثره گردید (۱۴). ماده موثره آرتمیزین در گیاهان تتراپلوئید آرتمیزیا[2] ۶ برابر بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود (۱۱). در گیاه شابیزک، بنگدانه و داتوره آلکالوئیدهای تروپانی در اثر افزایش سطح پلوئیدی افزایش یافته اند (۷). گیاهان تتراپلوئید بابونه آلمانی، گونه اطلسی و گونه ای مریم گلی فلاونوئیدها و ترپنوئیدهای بیشتری را در بافت خود نسبت به گیاهان دیپلوئید تولید نمودند (۹، ۱۲ و ۲۶). البته همیشه افزایش سطح پلوئیدی باعث افزایش مواد موثره نمی شود و در برخی موارد حتی کاهش مواد موثره را به دنبال دارد که علت آن سرکوبی برخی ژنهای موجود در گیاهان دیپلوئید در اثر پلی پلوئید شدن می باشد. این امر در مکانیسم‌های متابولیکی که بیوسنتز مواد موثره را تنظیم می کنند اختلال ایجاد می کند. در پونه دشتی *Mentha arvensis* در مقایسه با والدین دیپلوئید، ۳۰ درصد افزایش اسانس داشته ولی در گونه *M. spicata* میزان اسانس کاهش یافته است (۴). همچنین در گل انگشتانه ارغوانی، مواد گلیکوزیدی آن تا حدی کاهش یافته است (۷).

کلشی سین یک ترکیب آلکالوئیدی است که از غده گل حسرت پاییزه[3] برای اولین بار توسط Zeisle در سال ۱۸۸۳ استخراج شد. این ترکیب دارای ساختار شیمیایی سه حلقه ای با فرمول $C_{22}H_{25}O_6N$ می باشد (۲۵). این ترکیب مانع از تشکیل دوک در هنگام تقسیم سلولی شده، کروموزوم ها را در مرحله متافاز متوقف می کند و مانع وقوع آنافاز شده، در نتیجه منجر به دو برابر شدن تعداد کروموزوم ها در سلول می شود. تیمار کلشی‌سین یکی از رایجترین روشهایی است که اغلب برای القای پلی پلوئیدی در گیاهان از آن استفاده می‌شود و نسبت به مواد جهش زای دیگر تغییرات مورفولوژیک بیشتر و کثرت موتاسیون بالاتری ایجاد می کند (۱۸). در بیشتر گیاهان، پلی‌پلوئیدی مصنوعی اغلب با افزایش اندازه سلول که موجب افزایش جثه اندام-های رویشی و زایشی می‌شود، همراه است (۵). القاء پلی پلوئیدی در گیاهان توسط کلشی‌سین به روش‌های مختلفی انجام می‌شود مانند تیمار بذر (۲۲)، تیمار جوانه گل (۲۹)، تیمار مریستم انتهایی (۳)، تکنیکهای کشت بافت (۵ و ۱۰). مطالعات نشان داده است که بهترین روش تیمار و نیز غلظت کلشی‌سین بر حسب نوع گونه گیاهی تغییر می‌کند.

هرچند پلی‌پلوئیدی طبیعی در برخی از گیاهان خانواده لامیاسه مانند آویشن (۱۶) و اسطوخودوس (۲۸) به اثبات رسیده است، اما ریحان گیاهی دیپلوئید با ۴۸ عدد کروموزوم است (۲n =۲x =۴۸) (۱۹).

این مطالعه با هدف امکان ایجاد بوته‌های تتراپلوئید در گیاه ریحان با استفاده از غلظت‌های مختلف و زمان‌های مختلف تیمار با کلشی‌سین و تعیین بهترین تیمار برای این منظور انجام شد. هدف از تولید گیاهان تتراپلوئید، دستیابی به واریانتی جدید با جثه بزرگتر نسبت به همتایان دیپلوئید و به تبع آن تولید سطوح بالاتری از اسانس و مواد موثره گیاهی و داشتن خصوصیات مرفولوژیک و فیزیولوژیک برتر بوده است.

مواد و روش‌ها

بذور مورد استفاده در این تحقیق بذر ریحان محلی مشهد بود. برای انجام تیمار بذری، آزمایشی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور غلظت کلشی سین (چهار سطح صفر، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) و مدت زمان تیمار (سه سطح ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت) با چهار تکرار انجام شد. در این آزمایش جهت اعمال تیمار بذری، تعداد۴ گروه ۲۵ تایی بذر برای هر تیمار در نظر گرفته شد و در غلظت‌های مورد نظر در زمان‌های مختلف بر روی شیکر با دور ۲۰۰ دور در دقیقه (rpm) غوطه ور بودند.

جهت انجام آزمایش دوم تیمارهای فوق روی مریستم انتهایی ساقه در مرحله ۸-۶ برگی انجام شد. کشت اولیه بذور درون سینی‌های نشاء انجام شد و در مرحله ۸-۶ برگی گیاهان یکنواخت انتخاب شدند و به گلدانهای بزرگ (با قطر دهانه ۳۰ سانتی متر) انتقال یافتند و درون هر گلدان به طور متوسط ۱۵ عدد گیاه انتقال داده شد. پس از گذشت یک هفته و اطمینان از سازگار شدن نشاها جهت اعمال تیمارها از روش آغشته نمودن نوک مریستم انتهایی توسط گلوله پنبه ای استفاده شد. جهت جلوگیری از تبخیر کلشی سین، روی گلدانها توسط پلاستیک‌های پلی اتیلنی پوشانده شد و در تیمارهای زمان ۱۲ ساعت یکبار و تیمار ۲۴ ساعت ۲ بار آغشته نمودن مجدد گلوله پنبه ای نوک مریستم تکرار شد و پس از پایان زمان تیمار، نوک مریستم به طور کامل شسته شد. پس از مشاهده تغییرات ظاهری، از هر تیمار تعدادی نمونه به روش فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین مطالعات روزنه ای جهت بررسی تغییرات روزنه ای انجام شد.

آنالیز سطح پلوئیدی گیاهان توسط دستگاه فلوسایتومتر (Partec pA, Germany) مجهز به لامپ arc-UV طبق روش گا و همکاران (۱۳) با تغییراتی جزئی انجام پذیرفت. در این بررسی از برگ‌های کاملا رشد یافته (حدودا یک ماهه) و همچنین سایر اندام‌ها مقاطعی به اندازه تقریبا ۰/۵ سانتیمتر مربع تهیه گردید. سپس ۳۰۰ میکرو لیتر از بافر استخراج هسته (محلول A کیت دستگاه، Partec) روی آنها ریخته شد و با تیغ تیز به نحوی که از له شدگی بافت جلوگیری شود، مقطع مورد نظر به خوبی خرد گردید. محلول حاصله از

1- *Cymbopogon flexuosus*
2- *Artemisia annua*
3- *Colchicum autumnale*

فیلترهای مخصوص دستگاه با قطر منافذ ۳۰ میکرومتر عبور داده شد و ۱۲۰۰ میکرو لیتر محلول رنگ آمیزی هسته 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 داده شد. برای هر نمونه تعداد حداقل ۵۰۰۰ هسته توسط دستگاه بررسی و پیک‌های بدست آمده توسط نرم افزار Mode Fit LT 3.1 تفسیر گردیدند (۲ و ۱۳). گیاهان تیمار شده تحت شرایط گلخانه تا زمان رسیدن به بلوغ و پایان دوره رشد نگهداری شدند.

تجزیه واریانس داده ها با نرم افزار MINITAB و مقایسه میانگین ها با نرم افزار MSTAT-C ، انجام شد. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

در آزمایش اول به جز تیمار شاهد در تیمارهای دیگر جوانه زنی صورت نگرفت که ممکن است به علت تولید موسیلاژ در اطراف بذر باشد. در خانواده نعنائیان، بذر پس از دریافت آب تولید لعاب می کند که در این آزمایش وجود محلول کلشی سین احتمالا باعث کشته شدن جنین در مراحل اولیه رشد شده است. در تحقیقات گذشته نیز در گیاهانی مانند بابونه کبیر (۳) و ریحان (۱۹) عدم نتیجه مثبت در کاربرد روش تیمار بذری گزارش شده بود که علت آن را حساسیت در مرحله جوانه زنی ذکر کرده اند.

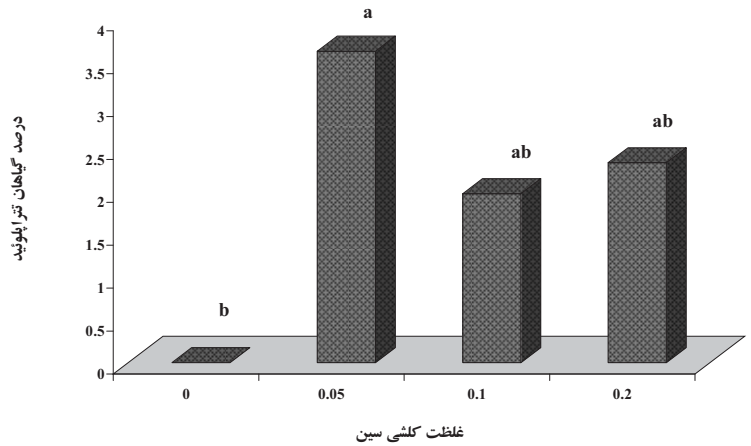
نتایج آنالیز واریانس در رابطه با اثر تیمارهای مختلف نشان دهنده اثر معنی دار غلظت کلشی سین بر درصد احتمالی گیاهان تتراپلوئید بود (جدول ۱). بیشترین میزان پلی پلوئیدی (۳/۶۳ درصد) در غلظت ۰/۰۵ درصد کلشی سین مشاهده شد (شکل شماره ۱) و غلظت‌های بالاتر تاثیر کمتری بر این فاکتور داشتند. زمان تیمار و اثرات متقابل تاثیر معنی داری بر این فاکتور نداشتند. به نظر می رسد در غلظت‌های بیشتر از ۰/۰۵ درصد محلول کلشی سین باعث از بین رفتن کامل مریستم انتهایی و عدم رشد ساقه‌های تتراپلوئید از قسمت پایین دست بخش تیمار شده و در نتیجه از بین رفتن گیاهان این تیمار شده است. بررسی اثرات متقابل غلظت کلشی سین و مدت زمان تیمار بطور معنی داری نشان داد که بیشترین میزان درصد احتمالی پلی پلوئیدی (۵/۱ درصد) مربوط به تیمار غلظت ۰/۰۵ درصد و مدت زمان ۶ ساعت بود (نتایج آورده نشده است). از طرف دیگر اثرات ساده غلظت کلشی سین و مدت زمان تیمار و اثر متقابل آنها بر درصد زنده مانی گیاهان معنی دار بود (جدول ۱) به طوری که پس از تیمار شاهد (غلظت صفر) بیشترین زنده مانی (۴۷/۴) مربوط به غلظت ۰/۰۵ بود. غلظت‌های بیشتر باعث از بین رفتن درصد بالاتری از گیاهان شدند (شکل ۲) و در زمان‌های مختلف تیمار نیز بیشترین زنده مانی (۶۰/۵ درصد) مربوط به تیمار ۱۲ ساعت بود (شکل ۳). بیشتر بودن درصد زنده مانی در این تیمار نسبت به تیمار ۶ ساعت ممکن است به این علت باشد که در تیمار زمان ۶ ساعت چون درصد گیاهان تتراپلوئید بیشتری تولید شده است در نتیجه گیاهان بیشتری نیز از بین رفته اند. نتایج مربوط به اثرات متقابل غلظت و زمان در شکل شماره ۴ نمایش داده شده است. در غلظت صفر به علت عدم تیمار کلشی سین، کلیه گیاهان به رشد عادی خود ادامه دادند. در غلظت ۰/۰۵ درصد بین زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت تفاوت معنی داری وجود نداشت ولی در تیمار ۲۴ ساعت، درصد زنده مانی کاهش یافت. در تیمار غلظت ۰/۱ درصد بیشترین زنده مانی مربوط به تیمار ۱۲ ساعت بود و بین تیمارهای ۶ و ۲۴ ساعت تفاوت معنی داری وجود نداشت. در غلظت ۰/۲ درصد بین تیمارهای زمان، تفاوت معنی داری وجود نداشت و به نظر می رسد اثر غلظت زیاد امکان تفکیک اثر زمان را منتفی کرد و سبب کاهش درصد زنده مانی شده است.

همچنین در سایر تحقیقات نیز غلظت موثر برای القای پلوئیدی را در گیاهان مختلف بین ۰/۰۰۰۶ تا ۳ درصد گزارش کرده اند و غلظت موثر بسته به نوع گیاه، روش تیمار و مدت زمان تیمار متفاوت می‌باشد (۴).

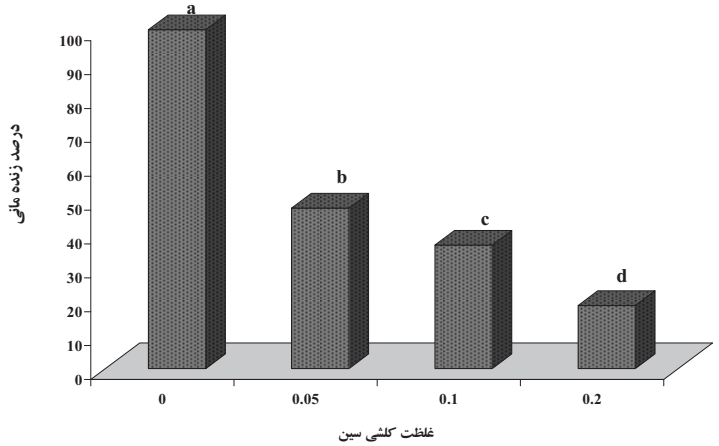
جدول ۱- آنالیز واریانس اثر غلظت‌های مختلف کلشی سین و مدت زمان تیمار بر خصوصیات اندازه گیری شده در گیاه ریحان (میانگین مربعات)

	درجه آزادی	درصد احتمالی گیاهان تتراپلوئید	درصد زنده مانی گیاهان
غلظت کلشی سین	۳	۲۷/۱**	۱۴۷۰۲/۶**
مدت زمان تیمار	۲	۱۳/۲ns	۱۷۲۰/۴**
غلظت× زمان	۶	۶/۹ns	۷۴۱/۱**

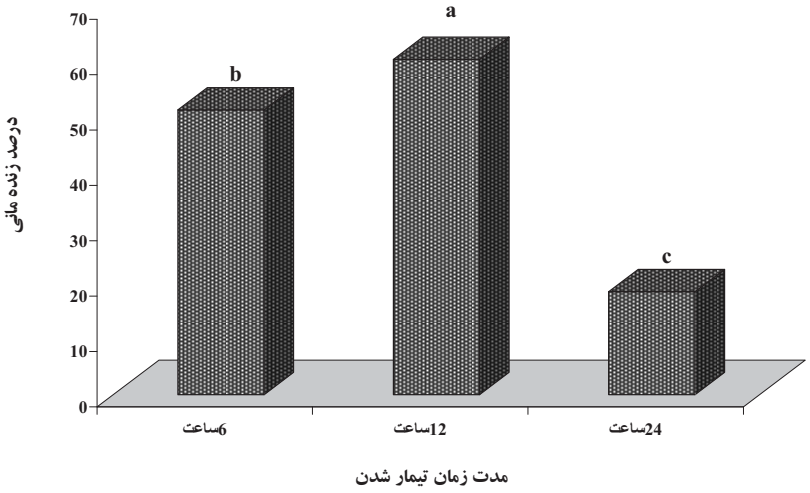
*: اختلاف معنی دار در سطح معنی داری ۵٪ **: اختلاف معنی دار در سطح معنی داری ۱٪ ns: عدم وجود اختلاف معنی دار



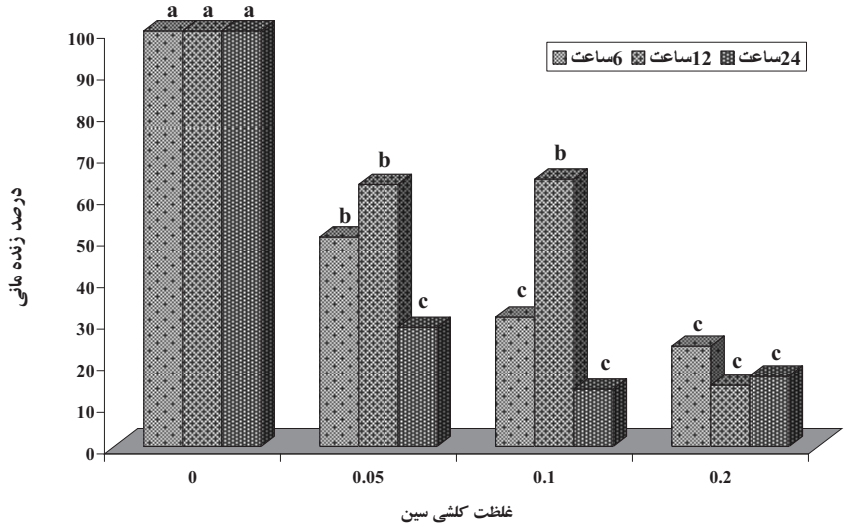
شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف کلشی سین بر درصد احتمالی گیاهان تتراپلوئید در گیاه ریحان



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف کلشی سین بر درصد زنده مانی گیاه ریحان



شکل ۳- اثر زمان‌های مختلف تیمار کلشی سین بر درصد زنده مانی گیاه ریحان



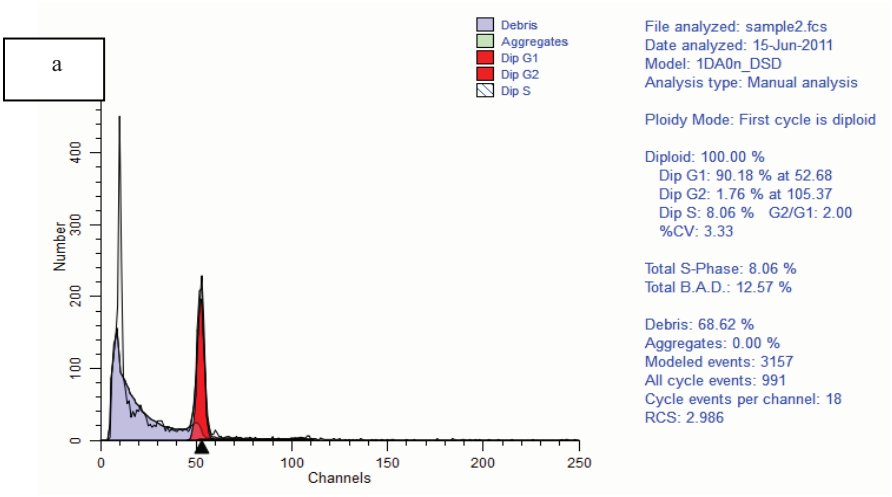
شکل ٤- اثرات متقابل تیمار کلشی سین و زمان تیمار بر درصد زنده مانی گیاه ریحان

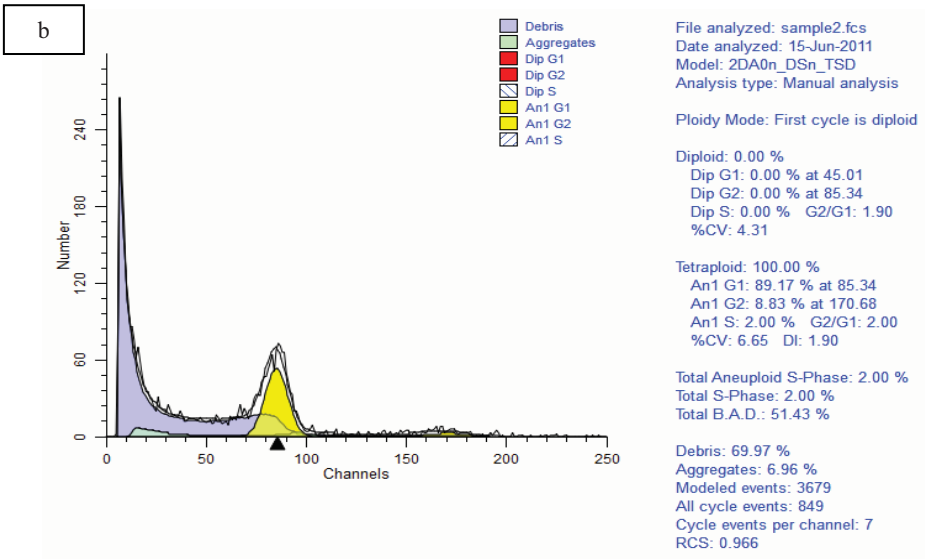
غلظت موثر برای القاء پلی پلوئیدی در گیاهان مختلف متفاوت می باشد برای مثال در گیاه بابا آدم[1] بذور در غلظت‌های ۰/۰۵ ، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد، به مدت ۱ تا ۴ روز تیمار شدند. در این تحقیق با افزایش غلظت کلشی سین و زمان اعمال تیمار، شدت مرگ و میر و ناهنجاری افزایش یافت (۲۲). همچنین در گیاه بابونه کبیر در مراحل ظهور برگهای لپه ای و ظهور دو برگ حقیقی غلظت‌های مختلف ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد به مدت دو روز متوالی استفاده شد و نتایج نشان داد که تیمار گیاهان در مرحله تولید دو برگ حقیقی با استفاده از محلول ۰/۲ درصد کلشی سین بهترین روش برای این گیاه می باشد (۳). امید بیگی و همکاران (۱۹) در تیمار ریشه گیاه ریحان (بذور تهیه شده از دانشگاه کورووینوس مجارستان) با غلظت‌های مختلف صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد در مرحله ۴ تا ۶ برگی، بالاترین درصد گیاهان تتراپلوئید (۸ درصد) را در تیمار غلظت ۰/۵ درصد گزارش کردند. همچنین در گیاه بادرشبی[2] با کاربرد غلظت‌های فوق در دو مرحله ظهور برگهای لپه ای و ظهور دو برگ حقیقی بر روی مریستم انتهایی، بیشترین درصد گیاهان تتراپلوئید (۷/۲ درصد) را در غلظت ۰/۱ درصد گزارش نمودند (۴ و ۲۰). نتایج تحقیقات فوق نیز نشان می دهد که در بسیاری از گیاهان، تیمار مریستم انتهایی در القاء پلی پلوئیدی به طور موثری تاثیر گذار بوده است.

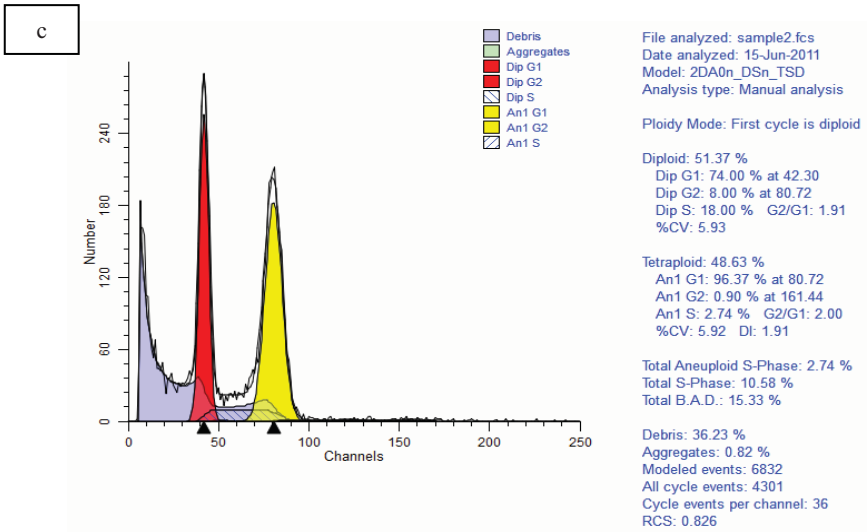
تایید وقوع پلی پلوئیدی به کمک فلوسایتومتری امکان پذیر است. قله منحنی های حاصل مطابق شکل ۵ در مرحله G1 از تقسیم سلولی مقدار ماده وراثتی را به نسبت تعداد سلول های تفکیک یافته و مورد بررسی نشان داده و موقعیت نسبی آنها در مقایسه، سطح پلوئیدی را تایید می نماید. شکل 5a مربوط به گیاهان دیپلوئید، شکل 5b مربوط به گیاهان تتراپلوئید و شکل 5c مربوط به بافتهایی است که به طور جزیی دچار تتراپلوئیدی شده و به همین دلیل مخلوطی از سلول های دیپلوئید و تتراپلوئید را دارا هستند.

بررسی‌های انجام شده در رابطه با تغییرات مورفولوژیک در گیاهان تتراپلوئید ریحان در این تحقیق به صورت کاهش ارتفاع بوته، پر برگ شدن گیاه، ضخیم شدن برگها و کاهش ارتفاع گل آذین و تعداد برگ نمود پیدا کرد (شکل شماره ۶). انگیزش پلوئیدی در گیاه دارویی بنگدانه[3] نیز سبب تولید گیاهان اوتوتتراپلوئید دارای برگهای دفرمه، قطور و به رنگ سبز تیره شد (۱۵). ویژگی‌های مورفولوژیک و ریختی نظیر اندازه گل، طول و قطر ساقه، گل، بذر و ... به عنوان روش شناسایی غیر مستقیم، روشی آسان، سریع و قابل استناد ذکر شده است ولی مستلزم گذشت زمان برای رشد گیاه بوده و قاطعیت کمتری نسبت به روش‌های مستقیم داشته است (۲۴). مورفولوژی گیاه، اندازه و شکل دانه‌های گرده، میزان رنگ پذیری آنها و اندازه بذور روش موثری برای تشخیص سطح پلوئیدی در گیاه زیره گزارش شده است. در گیاه کنجد، درصد جوانه زنی دانه گرده و میزان رنگ پذیری آن را به عنوان روشی مناسب جهت ارزیابی گیاهان تتراپلوئید معرفی کرده اند (۱۸).

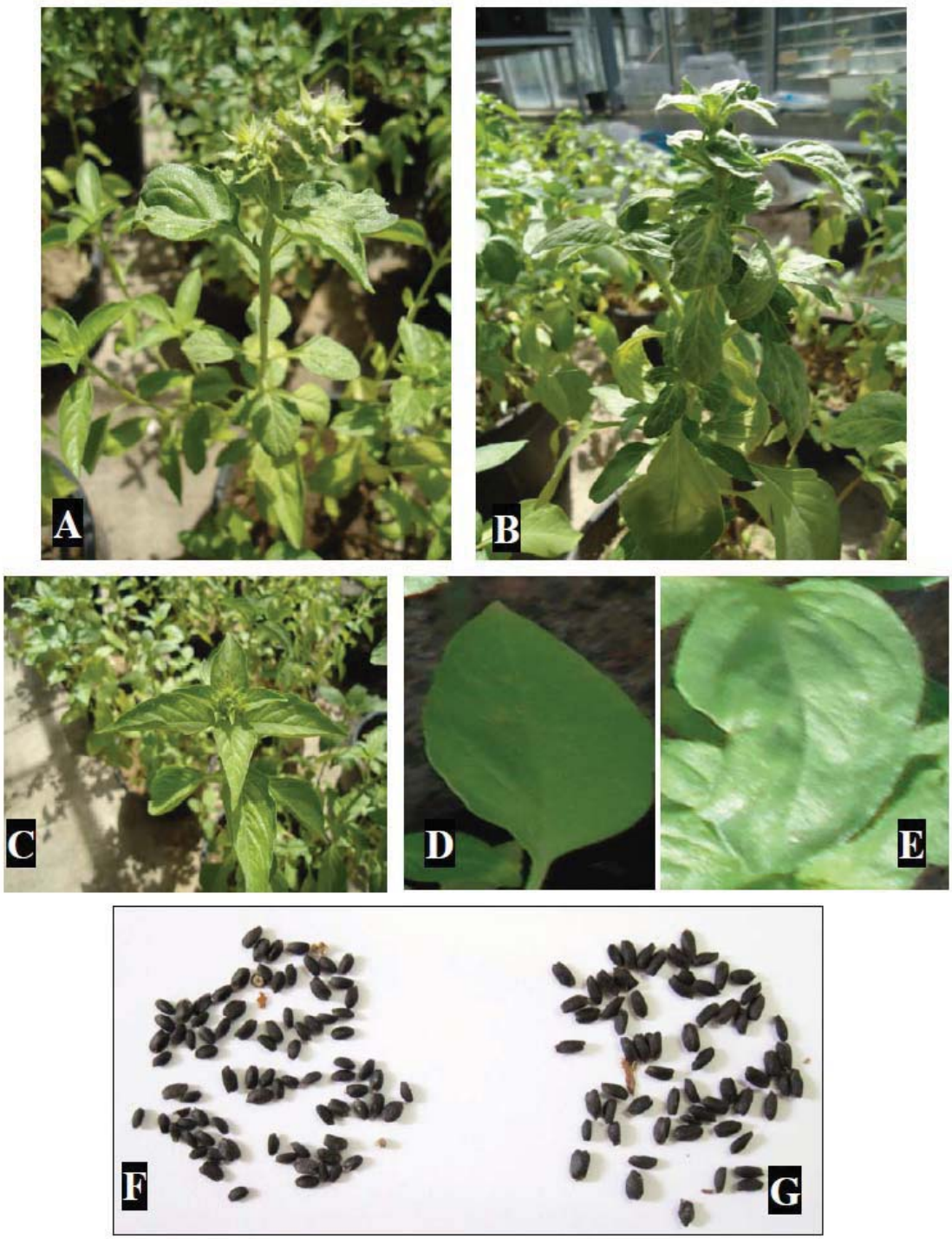
1- *Arctium lappa*
2- *Dracocephalum moldavica* L.
3- *Hyoscyamus niger* L.





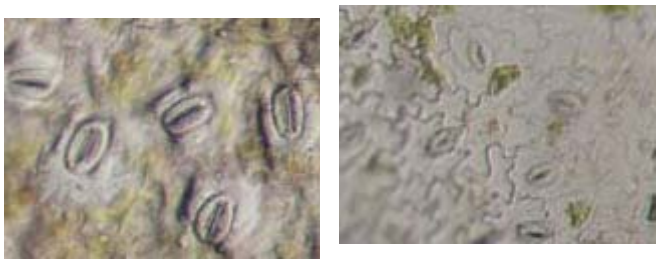


شکل ۵- هیستوگرام فلوسایتومتری مربوط به گیاهان دیپلوئید (a)، تترا پلوئید (b) و میکس پلوئید (c)



شکل ٦- تصاویر مربوط به تغییرات مرفولوژیک ایجاد شده در گیاهان تیمار شده. A: کوتاه شدن گل آذین B: پر برگ شدن گیاه E: ضخیم شدن برگ در گیاهان تغییرات یافته G: بذور گیاهان تتراپلوئید C: گیاه دیپلوئید (شاهد) D: برگ گیاه شاهد F: بذر گیاه دیپلوئید شاهد

در این تحقیق تغییرات اندازه روزنه نیز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در شکل شماره ۷ نشان داده شده است. در اکثر گزارشات افزایش سطوح پلوئیدی باعث کاهش تعداد سلول‌های روزنه و در عین حال افزایش اندازه آنها می گردد. بررسی این فاکتور در برخی گیاهان به عنوان روشی مناسب ارزیابی گردیده است (۱۰، ۲۰ و ۲۷). در گیاه رازک، طول و عرض روزنه ها به عنوان پارامترهای مناسبی برای شناسایی گیاهان تتراپلوئید معرفی شده است (۲۳).



شکل ۷- نمایی از تغییر اندازه سلول های روزنه ای در گیاه دیپلوئید (سمت چپ) و تتراپلوئید. بزرگنمایی مشابه در هر دو تصویر (۴۰۰ برابر) رعایت شده است.

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت ۰/۰۵ درصد و مدت زمان ۶ ساعت بهترین تیمار جهت القاء پلوئیدی در گیاه ریحان می باشد. همچنین جهت بررسی‌های بیشتر و مقایسه بین خصوصیات مرفولوژیک، بیوشیمیایی، فنولوژیک و سیتولوژیک گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید و تثبیت تتراپلوئیدی در نسل‌های بعدی از گیاهان مذکور بذرگیری شده و در تحقیقات بعدی این خصوصیات مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

سپاسگزاری

این پژوهش در قالب طرح شماره ۲ به شماره ۳۸۷پ (۱۳۸۸/۱۰/۱۳) و با حمایت معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی انجام شده است و بدینوسیله نویسندگان این مقاله از حمایت حوزه پژوهشی دانشکده کشاورزی و دانشگاه فردوسی مشهد کمال تشکر خود را اعلام می‌دارند.

منابع

۱- امید بیگی ر. ۱۳۸۴ ب. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد دوم، انتشارات به نشر، مشهد، ۴۳۸ صفحه.

۲- دهقان ا. ۱۳۸۸. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد. بررسی تاثیر تتراپلوئیدی بر ریشه‌های مویین بذرالبنج مصری.۱۲۰ صفحه.

۳- سحرخیز م.ج. ۱۳۸۵. اثرات برخی از عوامل محیطی و سطح پلوئیدی بر خصوصیات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه دارویی و زینتی بابونه کبیر (*Tanacetum parthenium* L.). رساله دوره دکتری گروه علوم باغبانی دانشگاه تربیت مدرس تهران. ۱۷۳ صفحه.

۴- یاوری ص. ۱۳۸۶. بررسی تاثیر کلشی سین بر ویژگی‌های مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مواد موثره گیاه دارویی بادرشبی (*Dracocephalum moldavica* L.). پایان نامه کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی دانشگاه تربیت مدرس تهران. ۱۴۰ صفحه.

5- Adaniya S., and Shira D. 2001. In vitro induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinali* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. Science Horticulture, 88: 277-287.

6- Adigzel A., Gulluce M., Sengul M., Ogutcu H., and Karaman I. 2005. Antimicrobial Effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) Extract. Turkish Journal of Biology, 29: 155-160.

7- Dhawan O.P., and Lavania U.C. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. Euphytica. 87: 81-89.

8- Dijkstra H., and 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- Galbraith D.W., Harkins K.R., Maddox J.M., Ayres N.M., Sharma D.P., Gao S.L., Zhu D.N., and Xu D.R. 1983. Autotetraploid plants from colchicines treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Beg. Plant Cell Tissue Organ Culture, 47: 73-77.

10- Gao S.L., Chen B.J., and Zhu D.N. 2002. In vitro production and identification of autotetraploids of *Scutellaria baicalensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 70: 289-293.

11- Gonzalez L.D.J., and Weathers P.J. 2003. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. Plant Cell Rep., 21: 809-813.

12- Griesbach R.J., and Kamo K.K. 1996. The effect of induced poliploidy on the flavonids of *Petunia mitchell*. Phytochemistry, 42: 361-363.

13- GU X.F., Yang A.F., Meng H., and Zhang J.R. 2005. In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus*

jujube Mill. cv. Zhanhua. Plant Cell Rep., 24: 671–676.
14- Lavania U.C. 1998. Enhanced productivity of the essential oil in the artifical autotertraploid of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash). Euphytica. 38: 271-276.
15- Lavania U.C., and Srivastava S. 1991. Enhanced productivity of tropane alkaloids and fertility in artificial autotetraploids of *Hyoscyamus niger* L. Euphytica. 52: 73-77.
16- Lo´pez-Pujol J., Bosch M., Simon J., and Blanche´ C. 2004. Allozyme diversity in the tetraploid endemic *Thymus loscosii* (Lamiaceae). Ann Bot. 93: 323-332.
17- Madon M., Clyde M.M., Hashim H., Mohd yusuf Y., Mat H., and Saratha S. 2005. Polyploidy induction of oil palm through Colchicine and oryzalin treatments. Journal of Oil Palm Research, 17: 110-123.
18- Mensha J.K., Obadoni B.O., Akomeah P.A., Ikhajiagbe B., and Ajibolu J. 2007. The effects of sodium azida and colchicines treatments on morphological and yield traits of sesame seed (*Sesame indicum* L.). African Journal of Biotechnology, 6: 534-538.
19- Omidbaigi R., Mirzaee M., Hassani M.E., and Sedghi Moghadam M. 2010. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal of Plant Production 4 (2): 87-98.
20- Omidbaigi R., Yavari S., Hassani M.E., and Yavari S. 2010. Induction of autotetraploidy in Dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicines treatment. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18(1): 23-35
21- Ozcan M., Derya A.M., and Unver A. 2005. Effect of drying methods the mineral content of Basil (*Ocimum basilicum*). Journal of Food Engineering, 69: 375-379.
22- Quan K., Guolu L., Qigao G., and Xiaolin L. 2004. Polyploid induction of Arctium lappa by colchicine. Plant Physiology Communication, 40: 157-158.
23- Roy A.T., Leggett G., and Koutoulis A. 2001. In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Rep., 20: 489- 495.
24- Sari N., Abak K., and Pitrat M. 1999. Comparison of ploidy level screening methods in Watermelon. Science Horticulture, 82: 265-277.
25- Sharma A.K., and Sharma A. 1990. Chromosome techniques theory and practice. Archan. 3th edn. Kailsh Baloni. India. Pp.312.
26- Svehlikova V., and Repcak M. 2000. Variation of epigenic quantity in diploid and tetraploid *Chamomilla recutita* L. Rauschert. Plant Biology, 2: 403-407.
27- Thao N.T.P., Ureshino K., Miyajima I., Ozaki Y., and Okubo H. 2003. Induction of tetraploids in ornamental Alocasia through colchicine and oryzalin treatments. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 72: 19-25.
28- Upson T., and Andrews S. 2004. The genus Lavandula, 1st edn. Timber press, Portland, Oregon.
29- Wu H.Z., Zheng S., He Y., Yan G., Bi Y., and Zhu Y. 2007. Diploid female gametes induced by colchicine in oriental Lilies. Scientia Horticulture, 114: 50-53.