فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۶، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۲۹۵-۲۸۳ (۱۳۸۹)

القاء درون شیشه‌ای پلی‌پلوئیدی در گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)

سیده فاطمه برقعی[۱]، حسن ساری‌خانی[۲*]، مهرداد چایی‌چی[۳] و عبدالکریم کاشی[٤]

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، پست الکترونیک: sarikhani@basu.ac.ir
۳- مربی پژوهشی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان
٤- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۸ تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸۸

چکیده

امروزه القاء پلی‌پلوئیدی با استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا، به‌عنوان یکی از روشهای اصلاح گیاهان دارویی به منظور افزایش قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این پژوهش، برای القای پلوئیدی در گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) از تیمار کلشی‌سین روی جوانه‌های انتهایی باززایی شده در شرایط درون شیشه‌ای بهره گرفته شد. کلشی‌سین با غلظت‌های ۰/۰۰، ۰/۰۵، ۰/۱۰ و ۰/۲۰٪ (وزنی به حجمی)، در دو زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت مورد استفاده قرار گرفت و سطح پلوئیدی در ریزنمونه‌های زنده مانده از طریق شمارش کروموزوم‌ها در نمونه‌های نوک ریشه و فلوسایتومتری نمونه‌های برگی بررسی شد. ۱۰ روز پس از اعمال تیمارها، ریزنمونه‌های شاهد بیشترین درصد زنده‌مانی را با میانگین ۱۰۰٪ نشان دادند، درحالی‌که با مقایسه بین سه تیمار ۰/۰۵، ۰/۱۰ و ۰/۲۰٪ کلشی‌سین، بالاترین میانگین بقاء ریزنمونه‌ها در تیمار ۰/۰۵٪ کلشی‌سین به‌مدت ۲٤ ساعت برابر با ٦۳/۸٪ مشاهده گردید. در مقابل؛ بالاترین میزان مرگ و میر در اثر کاربرد این ماده روی شاخه‌های انتهایی در غلظت ۰/۲۰٪ به‌مدت ٤۸ ساعت مشاهده شد. نتایج حاصل از شمارش کروموزوم و تجزیه فلوسایتومتری نشان دادند که تیمار شاخه‌های انتهایی با غلظت ۰/۰۵٪ کلشی‌سین به‌مدت ۲٤ و ٤۸ ساعت و همچنین غلظت ۰/۱۰٪ پس از ۲٤ ساعت، تیمارهای مؤثر در القاء پلی‌پلوئیدی و تولید میکسوپلوئید در این گیاه بودند. در مجموع تیمار ۰/۰۵٪ کلشی‌سین به‌مدت ٤۸ ساعت با بازدهی ۳۳/۳٪ تولید گیاهان پلی‌پلوئید، مناسبترین تیمار بکارگرفته شده برای القای پلوئیدی در این گیاه بود.

واژه‌های کلیدی: بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)، کشت درون شیشه‌ای، تغییر سطح پلوئیدی، کلشی‌سین، میکسوپلوئید، فلوسایتومتری.

مقدمه

بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* L. از خانواده Lamiaceae ازجمله پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی مورد استفاده در سراسر دنیاست که به‌علت داشتن اسانس و ترکیب‌های با ارزش دارویی در صنایع مختلف کاربرد فراوانی دارد (Sari & Ceylan, 2002). این گیاه بومی جنوب اروپا، آسیای صغیر و بخش‌های جنوبی آمریکای شمالی است. جمعیت‌های بادرنجبویه در تمام

کشورهای مدیترانه‌ای شامل مناطق ساحلی ترکیه و شمال ایران پراکندگی دارند (Adinee *et al.*, 2008). برای این گیاه سه زیرگونه Officinalis، Inodora و Altissima معرفی شده است. از بین زیرگونه‌های این جنس، فقط زیرگونه افیسینالیس دارای ارزش اقتصادی بوده و رایحه‌ای شبیه لیموی تازه از خود متصاعد می‌کند (Sari & Ceylan, 2002؛ Bahtyarca Bagdat & Cosge, 2006). اسانس موجود در برگ این گیاه دارای اثرهای ضد میکروبی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی و هضم‌کنندگی است و در درمان اختلالات و ناراحتی‌های عصبی و بی‌نظمی‌های مربوط به معده و روده در سطح وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Fialova *et al.*, 2008).

باتوجه به اینکه کشت و کار گیاهان دارویی به هزاران سال پیش باز می‌گردد، اما تاکنون در مورد اصلاح آنها پیشرفت قابل ملاحظه‌ای صورت نگرفته است. در حال حاضر تعداد ارقام بدست آمده از طریق اصلاح گیاهان دارویی بسیار کم و ناچیز است (امیدبیگی، ۱۳۸٦). گیاهان دارویی و معطر در مقایسه با سایر گروه‌های گیاهی کشت شده از سطح کشت و کار بسیار کمی برخوردار هستند، درحالی‌که این گروه از گیاهان دربرگیرنده تعداد زیادی از گونه‌های قابل استفاده با ویژگی‌های زیستی مختلفی هستند (Pank, 2006). به‌نژادی گیاهی ازجمله مهمترین روشها در جهت بهبود گیاهان دارویی و معطر است که فرصتی را در جهت سازگاری ژنوتیپ‌های مختلف به‌منظور رفع احتیاجات خاص مصرف‌کنندگان در چرخه تولید ایجاد نموده و در تولید محصولاتی با کیفیت بالا، قابل کاربرد و پایدار نقش عمده‌ای دارد. بهره‌برداری از توانمندی ژنتیکی گیاهان دارویی هنوز در مراحل اولیه خود قرار دارد. به‌طوری که در کارهای اصلاحی، استفاده از تغییرپذیری ژنتیکی و تغییر در عکس‌العمل‌های کنترل شده ژنتیکی یک ژنوتیپ، به سمت مسیرهای بالاتر به‌منظور بهبود میانگین عملکرد و پایداری اکولوژیکی قابل انجام است (Pank, 2006).

دستکاری پلی‌پلوئیدی به صورت موفقیت‌آمیزی در برنامه‌های به‌نژادی گیاهان به منظور تسهیل تولید واریته‌های برتر در بسیاری از گونه‌های گیاهی استفاده شده است. گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به انواع دیپلوئید اغلب فنوتیپ جدیدی را نشان می‌دهند و از محدوده صفات اجداد دیپلوئید خود در ویژگی‌هایی نظیر افزایش مقاومت به‌خشکی، آپومیکسی، مقاومت در برابر حشرات، افزایش بیوماس و تغییر در کیفیت و غلظت ترکیب‌های فعال گیاهی فراتر رفته و در نتیجه این عمل، شانس انتخاب آنها در کشاورزی افزایش می‌یابد (Shahriari Ahmadi *et al.*, 2008).

مؤثرترین ماده شیمیایی بکار رفته در مطالعات جهت القاء پلی‌پلوئیدی کلشی‌سین است که یک آلکالوئید استخراج شده از بذر و پداژه گیاه *Colchicum autumnale* می‌باشد. معادل سنتز شده این ماده کلمید (colemid) نامیده می‌شود (Shahriari Ahmadi *et al.*, 2008). کلشی‌سین به‌عنوان یک بازدارنده طبیعی میتوز، از طریق ایجاد حالت بازدارندگی در تشکیل فیبرهای دوکی و در نتیجه ممانعت از مهاجرت قطبی کروموزوم‌ها و تقسیم سلولی منجر به ایجاد سلولی با تعداد کروموزوم دو برابر شده می‌گردد (Pickens, 2004؛ Shahriari Ahmadi *et al.*, 2008). استفاده از کلشی‌سین به منظور دو برابر کردن تعداد کروموزوم‌ها در تعداد معدودی از گیاهان دارویی مانند بابونه (سحرخیز، ۱۳۸٦)، *Artemisia annua* L. (Jesus, 2003) و *Astragalus memberanaceus*

(Chen & Gao, 2007) گزارش شده است. در آزمایش‌های مختلف محدوده غلظت‌های کلشی‌سین مورد استفاده به‌منظور القاء پلوئیدی بین مقادیر ۰/۰۱ تا ۰/۵٪ گزارش شده است.

به طور معمول گیاهان پلی‌پلوئید در مقایسه با انواع دیپلوئید عملکرد محصول بالاتری را نشان می‌دهند (Shahriari Ahmadi *et al.*, 2008). 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.

اسانس عمده‌ترین ترکیب فعالیست که در مطالعات انجام شده روی بادرنجبویه مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. با این حال محتوی کل این ترکیب در داروهای گیاهی بدست آمده از این گیاه در مقایسه با سایر گیاهان تیره نعناعیان نسبتاً پایین است (۰/۰۵-۰/۲٪ حجمی به وزنی). از بین صفات موجود در بادرنجبویه تولید رایحه‌ای شبیه لیمو به‌عنوان مهمترین معیار جهت ارزیابی تجاری این گیاه در نظر گرفته می‌شود. مهمترین ترکیب‌های شیمیایی موجود در اسانس بادرنجبویه سیترال A و B (ژرانیال و نرال)، سیترونلال و بتا-کاریوفیلین هستند. مطالعات متعددی روی کل محتوی اسانس گیاهان با منشأهای مختلف و ترکیب‌های آنها انجام شده است. یک تغییرپذیری قابل توجه در هر دو عامل ذکر شده می‌تواند به اندازه تأثیر فاکتورهای بیرونی و درونی مؤثر بر کیفیت دارو مورد انتظار باشد (Toth *et al.*, 2003). ازجمله عوامل تأثیرگذار روی عملکرد اسانس این گیاه می‌توان به همبستگی صفات طول برگ، عرض برگ، وزن خشک برگ، وزن خشک ساقه، عملکرد سرشاخه گلدار و بازده اسانس اشاره نمود. بر این اساس، با توجه به بررسیهای انجام شده مشخص گردید که عملکرد سرشاخه‌های گل‌دار بیشترین اثر مستقیم را بر عملکرد اسانس دارند، درحالی‌که طول و عرض برگ و وزن خشک ساقه کمترین اثر مستقیم را بر عملکرد اسانس نشان دادند (طالع و همکاران، ۱۳۸۷).

مطالعات درون شیشه‌ای مختلفی نیز به منظور بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر ریزازدیادی (Tavares *et al.*, 1996)، تغییر متابولیت‌های ثانویه (Da Silva *et al.*, 2005) و تولید کالوس به منظور انجام کارهای اصلاحی (آدینه، ۱۳۸۱) در این گیاه انجام شده است. با توجه به اهمیت و نقش اسانس گیاه دارویی بادرنجبویه و با توجه به این موضوع که تاکنون گزارشی در مورد استفاده از کلشی‌سین و القاء پلی‌پلوئیدی با استفاده از تکنیک درون شیشه‌ای در این گیاه ارائه نگردیده است، انتظار می‌رود القاء پلوئیدی منجر به ایجاد تغییراتی در صفات مورفولوژیک و عملکرد اسانس این گیاه گردد. بنابراین، این پژوهش با هدف بررسی امکان تولید گیاه پلی‌پلوئید بادرنجبویه در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از کلشی‌سین انجام گردید.

مواد و روشها

تهیه مواد گیاهی و کشت درون شیشه‌ای

این پژوهش در سالهای ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ در آزمایشگاه کشت بافت، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان به اجرا درآمد. ریزنمونه‌های گیاه دارویی بادرنجبویه جهت انجام آزمایش از گیاهچه‌های رشد یافته این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای تهیه گردیدند.

به منظور دستیابی به تعداد گیاهچه مورد نظر جهت القاء پلوئیدی، ریزنمونه‌های اولیه این گیاه در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی به همراه ۸ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم ساکارز در لیتر واکشت شدند. نمونه‌های کشت شده به مدت ٤ 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 همراه با دو برگ انتهایی استفاده شد (شکل ۱). بدین‌منظور جوانه‌های انتهایی با طول یکنواخت یک سانتی‌متر در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف کلشی‌سین ۰، ۰/۰۵، ۰/۱۰ و ۰/۲۰٪ (وزنی به حجمی) کشت شدند. پس از گذشت زمان مورد نظر تیمار (٢٤ و ٤٨ 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 ۲±۲٤ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک 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 ۱۰ روز از واکشت در محیط کشت MS انجام شد. تجزیه واریانس داده‌های مربوط به درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها توسط نرم‌افزار SAS انجام شد. میانگین‌ها نیز با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ مورد مقایسه قرار گرفتند.

تعیین سطح پلوئیدی

ریزنمونه‌های تیمار شده توسط ماده کلشی‌سین پس از انجام واکشت‌های متوالی و رشد مناسب، جهت تخمین و تعیین سطح پلوئیدی به دو روش شمارش کروموزوم و فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای شمارش کروموزوم از نمونه‌های نوک ریشه استفاده شد و شمارش کروموزوم به روش استواورسین (بخشی خانیکی، ١٣٨٤) اندکی تغییر یافته انجام گردید. ابتدا نمونه‌های نوک ریشه به طول ۲ میلی‌متر در پیش‌تیمار کلشی‌سین ۰/۰۵٪ به مدت ۲ تا ٤ ساعت تیمار شدند. پس از تثبیت نمونه‌ها در محلول فارمر، هیدرولیز نمونه‌ها به‌وسیله اسیدکلریدریک ۱ نرمال در دمای اتاق به مدت یک ساعت انجام شد و برای رنگ‌آمیزی از استواورسین ۱٪ استفاده گردید. درنهایت نمونه‌های تهیه شده زیر میکروسکوپ قرار گرفته و شمارش کروموزوم انجام شد.

به منظور فلوسایتومتری، برگ تازه گیاهان شاهد و همچنین گیاهچه‌های تیمار شده با کلشی‌سین در شرایط درون شیشه‌ای پس از رشد کافی مورد استفاده قرار گرفت. در این روش از نمونه‌های برگی از بخش‌های انتهایی در ابعاد یک سانتی‌متر مربع استفاده گردید. بدین‌منظور برگ‌ها درون پتری‌دیش‌های مجزا قرار داده شدند و به آنها ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رنگ‌آمیزی ٤-٦ دی آمیدینو ۲- فنیل ایندول (DAIP)[1] اضافه گردید و نمونه‌ها همراه با محلول مورد نظر توسط تیغه اسکالپل کاملاً ریز شدند. در مرحله بعد مجدداً ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رنگ‌آمیزی به نمونه‌ها اضافه و به‌مدت ٤ تا ۵ دقیقه در این محلول نگهداری شدند. پس از گذشت زمان مورد نظر، نمونه‌های تهیه شده توسط قیف مخصوص درون تیوب‌های ۳۰ میکرولیتری دستگاه فلوسایتومتری ریخته شدند و تیوب‌های حاوی محلول تهیه شده در داخل دستگاه فلوسایتومتر (Partec PA، ساخت کشور

1. 1-4-6-Diamidino-2-Phenylindole (DAIP)

آلمان) قرار داده شدند. پس از این مرحله هیستوگرام‌های بدست آمده از آنالیز نمونه‌های شاهد و تیمار شده جهت تعیین میزان ژنوم و تغییر سطح پلوئیدی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

زنده‌مانی ریزنمونه‌ها پس از اعمال تیمار

اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین بر درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. بین غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱۰ و ۰/۲۰٪ حجمی به وزنی کلشی‌سین در مقایسه با عدم استفاده از آن تفاوت معنی‌داری در زنده ماندن ریزنمونه‌ها وجود داشت و بیشترین درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها در تیمار شاهد (۹۸/۶٪) مشاهده گردید (جدول ۱). همچنین بین غلظت ۰/۰۵٪ با غلظت‌های ۰/۱۰ و ۰/۲۰٪ در زنده‌مانی نمونه‌ها تفاوت معنی‌دار بود، به‌طوری که بیشترین درصد بقاء ریزنمونه‌ها پس از اعمال تیمار کلشی‌سین در غلظت ۰/۰۵٪ با میانگین بیش از ۴۰٪ زنده‌مانی مشاهده گردید و کمترین میانگین زنده‌مانی با مصرف ۰/۲۰٪ کلشی‌سین برابر با ۴/۱٪ دیده شد. هر چند بین دو غلظت ۰/۱۰ و ۰/۲۰٪ کلشی‌سین در این صفت اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (جدول ۱). به‌طور کلی افزایش غلظت مورد استفاده کلشی‌سین سبب کاهش محسوس درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها گردید.

اثر زمان تیمار کلشی‌سین بر درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در سطح ۱٪ معنی‌دار شد. زمان تیمار ۲۴ ساعت در مقایسه با ۴۸ ساعت تأثیر معنی‌داری بر میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها داشت. این میزان در تیمار زمانی ۲۴ ساعت ۵۱/۳٪ و پس از ۴۸ ساعت به ۳۰/۵٪ کاهش یافت (جدول ۱).

اثر متقابل غلظت ماده کلشی‌سین و زمان تیمار با این ماده در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. با افزایش غلظت کلشی‌سین و طولانی کردن مدت تیمار آن به‌طور مشخصی درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها کاهش یافت. بیشترین زنده‌مانی گیاهچه‌ها در تیمار شاهد در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده شد. به‌طوری که در بین نمونه‌های تیمار شده با کلشی‌سین، بالاترین درصد بقاء ریزنمونه‌ها در تیمار ۰/۰۵٪ به‌مدت ۲۴ ساعت با میانگین ۶۳/۸٪ مشاهده گردید و کمترین درصد زنده‌مانی در تیمار کلشی‌سین ۰/۲۰٪ به‌مدت ۴۸ ساعت با زنده‌مانی ۲/۷٪ دیده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای کلشی‌سین ۰/۲۰٪ به‌مدت ۲۴ ساعت، ۰/۱۰٪ به‌مدت ۴۸ ساعت و ۰/۰۵٪ به‌مدت ۴۸ ساعت نشان نداد (جدول ۱).

در تمام غلظت‌های بکار رفته کلشی‌سین، جوانه دو برگی اولیه پس از خشک شدن کامل ریزنمونه تیمار شده و پس از تأخیر در رشد اولیه باززایی شد. گیاهچه‌های بدست آمده در ابتدای رشد دارای دو برگ اولیه با ظاهر غیرعادی و نامناسب بودند، درحالی که پس از باززایی ریزنمونه‌ها برگ‌های بعدی از رشد و نمو عادی و معمولی همانند گیاهان شاهد برخوردار شدند (شکل ۲).

ارزیابی تغییرات پلوئیدی

نتایج شمارش کروموزوم نمونه‌های نوک ریشه در گیاهان شاهد تعداد ۳۲ کروموزوم (۲x=۳۲) را در این سلول‌ها نشان داد که نشان‌دهنده دیپلوئید بودن آنهاست (شکل ۳). همچنین با بررسی تعداد کروموزوم در تعدادی

از نمونه‌های تیمار شده با کلشی‌سین، تعدادی از سلول‌ها دارای ۳۲ عدد کروموزوم و تعدادی از سلول‌ها دارای تعداد دو برابر شده کروموزوم (۲x=٦٤) بودند.

براساس پیک‌های بدست آمده از دستگاه فلوسایتومتری، در سلول‌های برگی گیاهان شاهد، سلول‌هایی با سطح کروموزومی دیپلوئید مشاهده گردید (شکل ٤)، در این شکل پیک شماره ۲ مربوط به سلول‌های دیپلوئید می‌باشد. درحالی‌که در گیاهان تیمار شده توسط کلشی‌سین پیک‌های حاصل از فلوسایتومتری بیانگر وجود سلول‌هایی با دو سطح کروموزومی متفاوت شامل، سلول‌های دیپلوئید و تتراپلوئید بودند (شکل ۵). این سلول‌ها با داشتن دو سطح کروموزومی مختلف از هسته‌های دیپلوئید و تتراپلوئید، به‌عنوان گیاهان میکسوپلوئید در نظر گرفته شدند. پیک شماره ۲ در شکل ۵ نشان‌دهنده سلول‌های دیپلوئید و پیک شماره ۳ بیانگر سلول‌های تتراپلوئید است. در این گیاهان با آنالیز فلوسایتومتری، سلول‌هایی با سطح پلوئیدی تتراپلوئید خالص مشاهده نگردید.

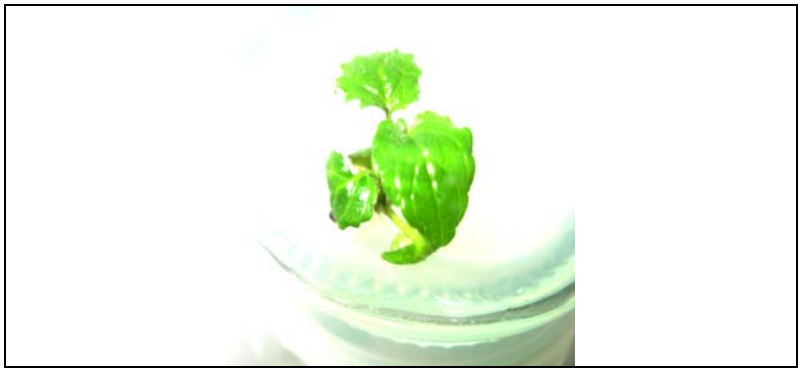
براساس پیک‌های بدست آمده از دستگاه فلوسایتومتری، تیمارهای استفاده شده در غلظت بیش از ۰/۱۰٪ کلشی‌سین به‌مدت ٤٨ ساعت جهت القاء پلی‌پلوئیدی مناسب نبودند. به‌طوری که در تیمارهای ۰/۱۰٪ (٤٨ ساعت) و ۰/۲۰٪ کلشی‌سین (٢٤ و ٤٨ ساعت) ریزنمونه‌ها تحت تأثیر قرار نگرفته بودند و سلول‌ها در سطح دیپلوئید اولیه قرار داشتند. بیشترین بازدهی تولید میکسوپلوئیدی در تیمار ۰/۰۵٪ کلشی‌سین به‌مدت ٤٨ ساعت (۳۳/۳٪) مشاهده گردید. همچنین در دو تیمار ۰/۰۵ و ۰/۱۰٪ کلشی‌سین (٢٤ ساعت) تعدادی گیاه میکسوپلوئید تولید شد.

شکل ۱- گیاهچه‌های رشدیافته در شرایط درون شیشه‌ای تیمار شاهد

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین و مدت زمان تیمار بر تولید گیاهان پلی‌پلوئید در گیاه بادرنجبویه (در سطح معنی‌دار ۵٪)

تیمار	تعداد گیاهچه تیمار شده	میانگین زنده‌مانی (٪)	تعداد گیاهان با سطح پلوئیدی (٪)		
			دیپلوئید (۲x)	میکسوپلوئید (۴x+۲x)	تتراپلوئید (۴x)
غلظت کلشی‌سین (٪)					
۰/۰۰	۷۲	۹۸/۶a	۷۱ (۱۰۰/۰)	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)
۰/۰۵	۷۲	۴۰/۲b	۲۴ (۸۵/۷)	۴ (۱۴/۳)	۰ (۰/۰)
۰/۱۰	۷۲	۲۰/۸c	۱۳ (۸۶/۷)	۲ (۱۳/۳)	۰ (۰/۰)
۰/۲۰	۷۲	۴/۱c	۳ (۱۰۰/۰)	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)
زمان تیمار					
۲۴ ساعت	۱۴۴	۵۱/۳a	۶۹ (۹۴/۵)	۴ (۵/۵)	۰ (۰/۰)
۴۸ ساعت	۱۴۴	۳۰/۵b	۴۲ (۹۵/۵)	۲ (۴/۵)	۰ (۰/۰)
اثر متقابل غلظت کلشی‌سین × زمان					
۰/۰۰٪ و ۲۴ ساعت	۳۶	۱۰۰/۰a	۳۶ (۱۰۰/۰)	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)
۰/۰۰٪ و ۴۸ ساعت	۳۶	۹۷/۲a	۳۵ (۱۰۰/۰)	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)
۰/۰۵٪ و ۲۴ ساعت	۳۶	۶۳/۸b	۲۰ (۹۰/۹)	۲ (۹/۱)	۰ (۰/۰)
۰/۰۵٪ و ۴۸ ساعت	۳۶	۱۶/۶cd	۴ (۶۶/۷)	۲ (۳۳/۳)	۰ (۰/۰)
۰/۱۰٪ و ۲۴ ساعت	۳۶	۳۶/۱c	۱۱ (۸۴/۶)	۲ (۱۵/۴)	۰ (۰/۰)
۰/۱۰٪ و ۴۸ ساعت	۳۶	۵/۵d	۲ (۱۰۰/۰)	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)
۰/۲۰٪ و ۲۴ ساعت	۳۶	۵/۵d	۲ (۱۰۰/۰)	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)
۰/۲۰٪ و ۴۸ ساعت	۳۶	۲/۷d	۱ (۱۰۰/۰)	۰ (۰/۰)	۰ (۰/۰)

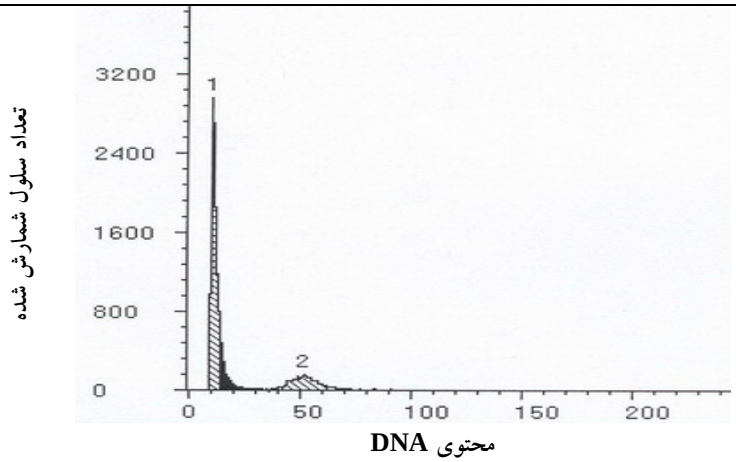
حروف مشابه به معنی عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۲- گیاهچه میکسوپلوئید باززایی شده در شرایط درون شیشه‌ای پس از تیمار ۰/۰۵٪ کلشی‌سین به مدت ۲۴ ساعت

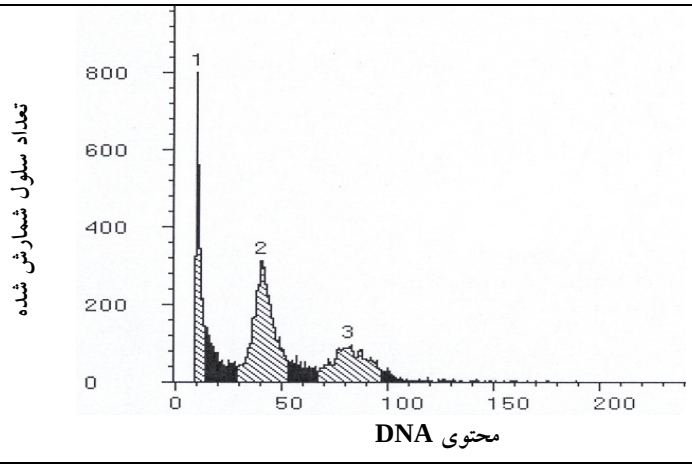
شکل ۳- کروموزوم شمارش شده از نمونه‌های نوک ریشه

(الف) گیاه دیپلوئید با تعداد ۳۲ کروموزوم و (ب) گیاه میکسوپلوئید با سلول دارای ٦٤ کروموزوم



شکل ٤- هیستوگرام محتوی DNA هسته‌ای استخراج شده از برگ گیاهچه‌های دیپلوئید (۲x)

پیک شماره ۲ نشان‌دهنده سلول‌های دیپلوئید است.



شکل ٥- هیستوگرام محتوی DNA هسته‌ای استخراج شده از برگ گیاهچه‌های میکسوپلوئید (۲x+٤x)

پیک شماره ۲ نشان‌دهنده وجود سلول‌هایی با سطح پلوئیدی دیپلوئید و پیک شماره ۳ نشان‌دهنده وجود سلول‌هایی با سطح پلوئیدی تتراپلوئید است.

بحث

زنده‌مانی و رشد گیاهچه‌های تیمارشده با کلشی‌سین

اثر کلشی‌سین بر روی رشد و نمو و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها پس از گذشت ۱۰ روز از اعمال تیمارها مورد ارزیابی قرار گرفت. کلشی‌سین یک ماده شیمیایی بسیار سمی است که غلظت بالا و مدت طولانی مواجه‌سازی با آن با درصد بالای مرگ و میر و ممانعت از رشد ریزنمونه‌ها همراه است (Pickens, 2004). بیشتر ریزنمونه‌ها در تیمار فاقد کلشی‌سین زنده بودند، درحالی که در تیمارهای کلشی‌سین درصد بالایی از مرگ و میر ریزنمونه‌ها مشاهده گردید، به‌طوری‌که این میزان در تیمارهای ۰/۲۰٪ کلشی‌سین به بیش از ۹۵٪ رسید. در واقع رابطه معکوس بین غلظت کلشی‌سین 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 memberanaceus* مطابقت داشت (Chen & Gao, 2007). همچنین در گزارش‌های ارائه شده توسط Gu و همکاران (۲۰۰۵)، مشاهده شد که با افزایش غلظت ماده کلشی‌سین در گیاهان تیمار شده جوجوبا (*Zizyphus jujuba*) درصد مرگ و میر افزایش یافت. به‌طوری که در غلظت ۰/۳۰٪ این ماده به‌مدت ٤٨ ساعت و بیشتر، همه گیاهان تیمار شده از بین رفتند.

اولین اثر قابل مشاهده کلشی‌سین تأخیر در رشد ریزنمونه‌های تیمار شده بود. آغاز رشد جوانه‌ها در ریزنمونه‌های شاهد پس از گذشت ٤ تا ٥ روز اتفاق افتاد، درحالی‌که در ریزنمونه‌های تیمار شده توسط کلشی‌سین رشد اولیه پس از گذشت ۱۰ تا ۱۵ روز از واکشت مشاهده گردید. این اثر در مطالعات انجام شده روی چند گیاه دارویی ازجمله *Astragalus memberanaceus* (Chen & Gao, 2007) و بنگ‌دانه (*Hyoscyamus muticus*) (Shahriari Ahmadi *et al.*, 2008) نیز گزارش شده است. پس از گذشت یک ماه از رشد، تمام گیاهچه‌های تیمار شده توسط کلشی‌سین به‌طور مشخصی دارای شاخه‌های کوتاهتر و تعداد گره کمتری در هر گیاهچه در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد بودند. این نتایج با مشاهده‌های Pickens (۲۰۰٤)، روی گیاه بنت‌القنسول (*Euphorbia pulchurrima*) مطابقت داشت.

Chen و Gao (۲۰۰۷)، با بررسی اثر کلشی‌سین روی گیاه دارویی *Astragalus memberanaceus* به این نتیجه رسیدند که رشد آهسته ممکن است به‌دلیل تخریب فیزیولوژیکی ایجاد شده به وسیله این ماده باشد که در نتیجه باعث کاهش سرعت تقسیم سلولی می‌گردد. هر دو ریزنمونه‌های بدون تیمار و تیمار شده با کلشی‌سین با واکشت‌های بعدی به‌طور تقریباً مساوی رشد کردند. به‌نظر می‌رسد کلشی‌سین منجر به یک تأخیر اولیه در رشد می‌شود و پس از این مرحله، رشد ریزنمونه‌ها به‌صورت عادی و همانند گیاهان شاهد ادامه خواهد یافت. بدین ترتیب نتایج این تحقیق با نتایج Chen و Gao (۲۰۰۷) همخوانی داشت.

ارزیابی سطح پلوئیدی در گیاهچه‌های تیمار شده توسط کلشی‌سین

گیاهان دیپلوئید بادرنجبویه دارای تعداد ۳۲ کروموزوم (۲n=۳۲) بودند که این نتایج با نتایج بدست آمده از شمارش کروموزوم توده‌های بادرنجبویه ایران که در آن تعداد کروموزوم این گیاه ۳۲ عدد گزارش شده است

مطابقت دارد (طالع، ۱۳۸٦). وجود سلول‌هایی با دو سطح پلوئیدی در کنار هم نشان‌دهنده نوعی بافت ناهمسانی است. این گیاهان به‌عنوان گیاهان بافت ناهمسان هسته‌ای (میکسوپلوئید) در نظر گرفته شدند. به نحوی که شمارش کروموزوم سلول‌های قسمت انتهایی ریشه در این گیاه، نتایج بدست آمده از تعیین سطح پلوئیدی گیاهان میکسوپلوئید از طریق فلوسایتومتری را تأیید نمود.

مریستم انتهایی شاخه از دو منطقه مشخص و مجزا تشکیل شده است. ناحیه اول ناحیه خارجی یا محیطی است که باعث تولید سلول‌های جدید به منظور ایجاد پریموردیای اندام‌ها می‌شود و دیگری منطقه مرکزی مریستم است که شامل سلول‌های تقسیم شونده ساقه جهت تولید قسمت‌های انتهایی شاخه‌ها می‌باشد. این مناطق از لایه‌های بافتی متعددی تشکیل شده‌اند. 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. به‌نظر می‌رسد گیاهان پلی‌پلوئید خالص در نتیجه دو برابر شدن موفق و مناسب سلول‌های تیمار شده در تمام لایه‌های بافتی منطقه مرکزی بوجود می‌آیند که در نهایت گیاهانی با سلول‌های تتراپلوئید همگن تولید می‌شود (Jones *et al.*, 2008).

از آنجایی که مریستم‌های گیاهی از تعداد زیادی سلول تشکیل شده‌اند، بنابراین احتمال دستیابی به بافت‌های میکسوپلوئید (بافت ناهمسان هسته‌ای حاوی بافت دیپلوئید و تتراپلوئید) پس از تیمار با کلشی‌سین وجود دارد. به‌دلیل اینکه این ماده به‌طور مؤثری فقط روی سلول‌های در حال تقسیم اثر می‌گذارد، بنابراین پلی‌پلوئیدی عموماً به‌طور یکسان در تمام سلول‌های ریزنمونه اتفاق نمی‌افتد، در نتیجه باعث ظهور بافت ناهمسانی و میکسوپلوئیدی می‌گردد (Shahriari Ahmadi *et al.*, 2008). گیاهان میکسوپلوئید توده‌ای از سلول‌ها با سطوح پلوئیدی مختلف در بین یا داخل لایه‌های بافتی هستند که در نتیجه دو برابر شدن ناقص کروموزوم‌ها در برخی سلول‌ها ایجاد می‌شوند (Jones *et al.*, 2008). در گیاهان میکسوپلوئید به نظر می‌رسد سلول‌های ۲n=٤x غالب بوده و احتمالاً در اثر جذب کلشی‌سین توسط سلول‌های مختلف بوجود آمده‌اند (Tambong *et al.*, 1998). نتایج این تحقیق با نتایج Tambong و همکاران (۱۹۹۸) و Silva و همکاران (۲۰۰۰) که با اعمال ماده کلشی‌سین در شرایط درون شیشه‌ای علاوه بر گیاهان تتراپلوئید موفق به تولید گیاهان میکسوپلوئید شدند همخوانی داشت. در گزارش‌های ارائه شده توسط Silva و همکاران (۲۰۰۰)، استفاده از غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱۰ و ۰/۲۰٪ کلشی‌سین به‌مدت ٤ روز در گیاه *Cattleya intermedia* LINDL. منجر به تولید گیاهانی با سطح پلوئیدی میکسوپلوئید گردید. از این رو عدم تولید گیاهان تتراپلوئید خالص در گیاه *Watsonia* توسط Ascough (۲۰۰۸) نیز گزارش شده است. در این بررسی با بکارگیری چهار غلظت مختلف کلشی‌سین (۲۵، ۵۰، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکرومولار) و سه زمان ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت، هیچ گیاه تتراپلوئیدی تولید نگردید. در گیاه *Echinaceae purpurea* L. نیز بکارگیری غلظت‌های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلشی‌سین به‌مدت یک تا پنج روز در شرایط درون شیشه‌ای منجر به تولید گیاهان میکسوپلوئید بدون دستیابی به گیاهان تتراپلوئید خالص گردید (Nilanthi *et al.* 2009).

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان چنین بیان کرد که با توجه به درصد بالای میزان مرگ و میر ریزنمونه‌ها در غلظت‌های بالای کلشی‌سین، بهترین تیمار کلشی‌سین جهت القاء پلوئیدی و تغییر سطح پلوئیدی در گیاه بادرنجبویه، غلظت ۰/۰۵٪ به‌مدت ٤٨ ساعت است و کلشی‌سین به‌طور مؤثری قابلیت القای پلوئیدی در این گیاه را دارد.

منابع مورد استفاده

- آدینه، ج.، ۱۳۸۱. مطالعه کشت بافت و تغییرات کیفی و کمی مواد مؤثره سیترول و ژرانیول در اسانس گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) در شرایط in vitro و in vivo در منطقه همدان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.
- امیدبیگی، ر.، ۱۳۸٦. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد، ۳٤۷ صفحه.
- بخشی خانیکی، غ.ر.، ۱۳۸٤. سیتوژنتیک گیاهی(ترجمه). انتشارات دانشگاه پیام‌نور، تهران، ۳۸۹ صفحه.
- سحرخیز، م.، ۱۳۸٦. انگیزش پلی‌پلوئیدی در گیاه دارویی زینتی بابونه‌کبیر. خلاصه مقالات پنجمین کنگره علوم باغبانی، دانشگاه شیراز، ۱۵-۱۲ شهریور: ۱۲۲.
- طالع، ب.، ۱۳۸٦. بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.). پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد رشته زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.
- طالع، ب.، درویش، ف.، محمدی، ع.، عباس‌زاده، ب. و صفری، پ.، ۱۳۸۷. بررسی روابط بین صفات مؤثر بر عملکرد اسانس در توده‌های گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) با استفاده از تجزیه علیت. خلاصه مقالات دهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ۳۰- ۲۸ مرداد: ۹٦.
- Adinee, J., Piri, Kh. and Karami, O., 2008. Essential oil component in flower of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 4: 277-278.
- Ascough, G.D., 2008. Micropropagation and *in vitro* manipulation of *Watsonia*. Ph.D. Thesis, University of KwaZulu-Natal, Piertermartzburg.
- Bahtyarca Bagdat, R. and Cosge B., 2006. The essential oil of lemon balm *Melissa officinalis* L., its components and using fields. Journal of Faculty of Agriculture, Ondokuz Mayis University (OMU), 21(1): 116-121.
- Chen, L.L. and Gao, Sh. L., 2007. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus memberanaceus*. Scientia Horticulturae, 112: 339-344.
- Da Silva, S., Sato, A., Salgueiro Lage, C.L., Da Silva San Gil, R.A., Azevedo, D.D.A. and Esquibel, M.A., 2005. Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. In vitro produced under the influence of growth regulators. Journal of Brazilian Chemical Society, 16: 1387-1390.
- Fialova, S., Tekelova, D. Mrlianova, M. and Grancai, D., 2008. The determination of phenolics compounds and antioxidant activity of mints and balms cultivated in Slovakia. Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae Tomus LV, 96-102.
- Gu, X.F., Yang, A.F., Meng, H. and Zhang, J.R., 2005. *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua. Plant Cell Reports, 24: 671-676.
- Hamill, S.D., Smith, M.K. and Dodd, W.A., 1992. *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploid. Australian Journal of Botany, 40: 887-896.
- Jesus, D.L., 2003. Effect of artificial polyploidy in transformed roots of *Artemisia annua* L. A Thesis Submitted to the Faculty of Worcester Polytechnic Institut, 111p.
- Jones, J.R., Ranney, T.G. and Eaker, T.A., 2008. A novel method for induction polyploidy in *rhododendron* seedlings. Journal American Rhododendron Society, 62(3):130-135.
- Nilanthi, D., Chen X.L., Zhao, F., Yang, Y. and Wu, H., 2009. Induction of tetraploids from petiole explants through colchicine treatments in *Echinaceae purpurea* L. Journal of Biomedicine and Biotechnology, vol. 2009: article no. 343485, 7p.
- Pank, F., 2006. Adaptation of medicinal and aromatic plants to contemporary quality and technological demands by breeding: aims, methods and trends. Brazilian Journal of Medicinal Plants, Botucatu, 39-42.
- Pickens, K.A., 2004. *In vitro* propagation, regeneration attempted tetraploid induction, and agrobacterium-mediated transformation of *Euphorbia pulchurrima*

- Silva, P. A., Callegari-Jacques, S. and Bodanese-Zanettini, M. H., 2000. Induction and identification of polyploidy in *Cattleya intermedia* LINDL. (Orchidaceae) by *in vitro* techniques. Ciencia Rural, 30(1): 105-111.
- Tambong, J.T., Sapra V.T. and Garton, S., 1998. In vitro induction of tetraploids in colchicine-treated cocoyam plantlets. Euphytica, 104: 191-197.
- Tavares, A.C., Pimenta, M.C. and Goncalves, M.T., 1996. Micopropagation of *Melissa officinalis* L. through proliferation of axillary shoots. Plant Cell Reports, 15: 441-444.
- Toth, J., Mrlianova, M., Tekelova, D. and Korenova, M., 2003. Rosmarinic acid an important phenolic active compound of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). ACTA Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae, 139-146.
'winter rose'. Ph.D. Thesis, University of Tennessee, Knoxville.
- Sari, A.O. and Ceylan, A., 2002. Yield characteristics and essential oil composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) grown in the Aegean region of Turkey. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 26: 217-224.
- Shahriari Ahmadi, F., Dehghan, E., Farsi, M. and Azizi, M., 2008. Tetraploid induction of *Hyoscyamus muticus* L. using colchicine treatment. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11: 2653-2659.
- Shao, J., Chen, Ch. and Deng, X., 2003. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 75: 241-246.

In vitro induction of polyploidy in lemon balm (*Melissa officinalis* L.)

S.F. Borgheei[1], H. Sarikhani[2*], M. Chaichi[3] and A. Kashi[4]

1- MSc Student, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad Univesrity, Karaj Branch, Iran
2*- Corresponding author, Department of Horticultural Science, Bu- Ali Sina University, Hamedan, Iran
E-mail: sarikhani@basu.ac.ir
3- Research Center of Agriculture and Natural Resources of Hamedan, Hamedan, Iran
4- Islamic Azad Univesrity, Karaj Branch, Iran

Received: November 2009 Revised: January 2010 Accepted: March 2010

Abstract

In vitro induction of polyploidy using mutation agents is one of the medicinal plant breeding methods which has been employed to increase potential of secondary metabolites production. In this research, in order to induce polyploidy in lemon balm (*Melissa officinalis* L.), *in vitro* regenerated explants were treated by colchicine at 4 different concentrations 0.00, 0.05, 0.1 and 0.2% for 24 and 48 h. Level of ploidy were identified in survival explants through root tip chromosome counting and leaf sample flow cytometry. Ten days after treatments, all colchicine-free treated explants were survived. Among the colchicine treatments (0.05, 0.1 and 0.2%), the highest explants survival rate were observed in the 0.05% colchicine application for 24 h (63.8%). On the contrary, 0.2% colchicine treatment for 48 h showed the highest rate of explants lethality. Results of chromosome counting and flow cytometry analysis indicated both diploid and mixoploid plants in colchicines treated explants. More effective treatment of colchicine for induction of ploidy was observed in 0.05% colchicine treatment for 48 h as high as 33.3% mixoploid plants.

Key words: Lemon balm (*Melissa officinalis* L.), *in vitro*, colchicine, mixoploid, flow cytometery.