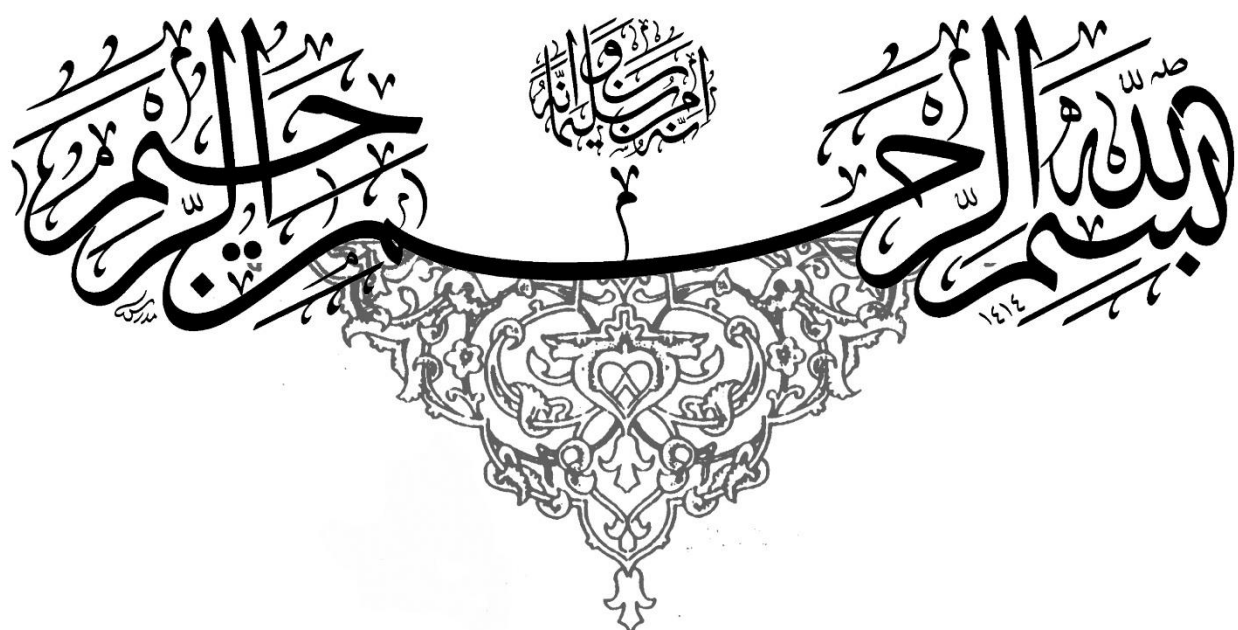






دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

مطالعه القاء پلی پلوئیدی در گیاه انیسون (*Pimpinella anisum* L)

نگارنده: هانیه احمدی نیا

اساتید راهنما

دکتر پرویز حیدری

اسفند ۱۴۰۰

شماره: ۸
تاریخ: ۱۴۰۱/۲۷-۴
ویرایش:

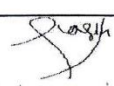
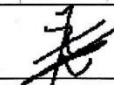
باسمه تعالی
فرمهای ارزیابی پایان نامه کارشناسی ارشد
مربوط به ورودی‌های ۹۴ به بعد

مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم هانیه احمدی نیا با شماره دانشجویی ۹۷۰۲۰۰۴ رشته کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی تحت عنوان مطالعه القاء پلی پلوئیدی در گیاه انیسون (*Pimpinella anisum* L.) که در تاریخ ۱۴۰۰/۱۲/۹ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار شد به شرح ذیل اعلام می گردد:

الف) درجه عالی: نمره ۱۹-۲۰ ☐ (ب) درجه خیلی خوب: نمره ۱۸-۱۸/۹۹ ☒
 ج) درجه خوب: نمره ۱۶-۱۷/۹۹ ☐ (د) درجه متوسط: نمره ۱۴-۱۵/۹۹ ☐
 ه) کمتر از ۱۴ غیر قابل قبول و نیاز به دفاع مجدد دارد ☐
 نوع تحقیق: نظری ☐ عملی ☒

عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	آقای دکتر پرویز حیدری	دانشیار	
۲- استاد راهنمای دوم	-	-	-
۳- استاد مشاور	-	-	-
۴- استاد داور اول	آقای دکتر امین ابراهیمی	استادیار	
۵- استاد داور دوم	خانم دکتر مهدیه پارساییان	استادیار	
۶- نماینده تحصیلات تکمیلی	آقای دکتر شاهرخ قرنچیک	استادیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: آقای دکتر علی درخشان شادمهری

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:





خدایا....!

از خیمه گاه رحمت بیرونان مکن. از آستان مهرت نومیدان مساز

آرزو و انتظارهایمان را به حرمان مکنشان. از درگاه خوشت ما را مران. خدای من....!

چگونه ناامید باشم، در حالی که تو امید منی!

چگونه سستی بگیرم، چگونه خواری پذیرم که تو تکیه گاه منی!

ای آنکه با کمال زیبایی و نورانیت خویش، آسپهان تجلی کرده ای که عظمت بر تمامی ماسیه افکنده

نگاه خود را از ما بگیر...

اکنون که به یاری خدای متعال موفق به اتمام این مقطع تحصیلی شده ام، بر خود لازم می دانم از زحمات استادان بزرگوارم جناب آقای دکتر پرویز

حیدری که مرا از خوان بی دریغ اندوخته های خویش محروم نگذاشته اند و من انجام این رساله را مدیون دانش و فضل این بزرگواران، بسم تشکر نمایم.

تشکر از تمامی دوستان دلسوز و بزرگوارم که وجودشان مایه دلگرمی در این مسیر بوده؛ که در سختی ها همراه و به کام بودند و از خداوند متعال آرزوی سلامتی و توفیق روز افزون را دارم.

نایه احمدی نیا

بهمن ۱۴۰۰

تعهد نامه

اینجانب هانیه احمدی نیا دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی

دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه **مطالعه القاء پلی پلوئیدی در گیاه انیسون (Pimpinella**

anisum L) تحت راهنمایی دکتر پرویز حیدری متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « **Shahrood University of Technology** » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .

چکیده

دست‌ورزی در محتوای کروموزوم گونه‌های گیاهی به علت تاثیر آن در برخی از ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی و ایجاد تنوع ژنتیکی، یکی از روش‌های توانمند اصلاح نباتات محسوب می‌شود. کلشی‌سین یک ترکیب القاء‌کننده پلی‌پلوئیدی است که به طور موفقیت آمیزی برای افزایش سطح پلوئیدی به کار می‌رود. به منظور بررسی تاثیر تیمار کلشی‌سین بر القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه دارویی آنیسون (*Pimpinella anisum L.*) اثرات غلظت مختلف کلشی‌سین (۰/۰۰۱، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۵) در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. جهت القاء پلی‌پلوئیدی، بذرها و جوانه انتهایی گیاهچه‌های آنیسون بصورت جداگانه با کلشی‌سین تیمار شدند. نتایج نشان داد که کاربرد کلشی‌سین در مرحله بذری، یک روش مناسب جهت تولید گیاهان اتوپلی‌پلوئید نمی‌باشد. صفات مولکولی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در گیاهان شاهد (دیپلوئید) و القاء شده (اتوتتراپلوئید) که توسط روش تیمار جوانه انتهایی ایجاد شده بودند مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که غلظت ۰/۰۰۱ کلشی‌سین اثر معناداری بر روی گیاهچه‌ها نداشته است در حالیکه در غلظت ۰/۰۰۵ و ۰/۰۵ اثرات معناداری مشاهده شد. اندازه روزنه بزرگتر و تراکم روزنه ای کمتر و رنگ برگ تیره‌تر در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های بیشتر از ۰/۰۰۵ کلشی‌سین مشاهده شد. همچنین محتوی DNA، RNA و پروتئین کل در این گیاهچه‌ها افزایش یافت. در کل یافته‌های این پژوهش حاکی از آن بود که کلشی‌سین می‌تواند در غلظت ۰/۰۰۵ و ۰/۰۵ سطح پلوئیدی آنیسون را تغییر دهد و سبب افزایش ابعاد برگ و رنگدانه‌های مرتبط به فتوسنتز و در نتیجه تولید گیاهان قویتر شود. نتایج این تحقیق اولین گزارش در زمینه تولید گیاهچه‌های اتوتتراپلوئید در آنیسون است که این یافته‌ها می‌تواند در برنامه های آینده اصلاح این گیاه مفید واقع شود.

کلمات کلیدی: القاء پلی‌پلوئیدی، بنیه گیاه، گیاهان دارویی، کلشی‌سین، سطح پلوئیدی.

فهرست مطالب

فصل اول : مقدمه	۱
۱-۱-مقدمه	۲
۲-۱-ضرورت تحقیق	۴
۳-۱-اهداف تحقیق	۵
فصل دوم: کلیات و مرور منابع	۷
۱-۲-رده بندی و مشخصات گیاهی	۸
۲-۲-پراکنش انیسون	۱۱
۳-۲-ترکیبات و اثرات دارویی انیسون	۱۱
۱-۳-۲-ترکیبات	۱۱
۲-۳-۲-اثرات دارویی انیسون	۱۲
۴-۲-سایر اثرات و کاربردهای انیسون	۱۳
۵-۲-کشف و تاریخچه پلی پلوئیدی	۱۴
۱-۵-۲-پلی پلوئیدی	۱۴
۲-۵-۲-القای پلی پلوئیدی	۱۶
۳-۵-۲-مزیت‌های پلی پلوئیدی	۱۷
۴-۵-۲-مراحل دوبرابرشدن کروموزوم	۲۰
۵-۵-۲-پارامترهای ایجاد پلی پلوئیداسیون کارآمد	۲۰
۶-۲-متابولیت‌های ثانویه	۲۱
۷-۲-ارتباط پلی پلوئیدی و متابولیت‌های ثانویه	۲۲
۸-۲-کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی	۲۵
۹-۲-بازدارنده‌های میتوزی	۲۸
۱-۹-۲-کلشی سین	۲۸
۲-۹-۲-مکانیسم عمل کلشی سین	۳۰
۱-۲-۹-۲-کمپلکس توبولین-کلشی سین	۳۰
۱۰-۲-روش‌های تعیین سطح پلوئیدی	۳۱

۳۲	۲-۱۰-۱-شمارش مستقیم
۳۲	۲-۱۰-۱-شمارش کروموزوم
۳۵	۲-۱۰-۲-فلوسایتومتری
۳۶	۲-۱۰-۲-برآورد غیر مستقیم صفات
۳۶	۲-۱۰-۲-مشاهدات مورفولوژیکی
۳۸	۲-۱۰-۲-تعداد کلروپلاست‌ها در سلولهای نگهبان روزنه
۳۹	۲-۱۰-۳-ویژگی‌های ساختار روزنه
۳۹	۲-۱۰-۴-کلروفیل
۳۹	۲-۱۱-پیشینه‌ی تحقیق
۴۷	فصل سوم: مواد و روش‌ها
۴۸	۳-۱-زمان و محل آزمایش
۴۸	۳-۲-نحوه‌ی اجرای آزمایش
۴۸	۳-۲-۱-کاشت مواد گیاهی
۵۰	۳-۲-۲-تهیه محلول کلشی‌سین
۵۰	۳-۳-اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی
۵۰	۳-۳-۱-اندام‌های هوایی گیاه
۵۱	۳-۳-۲-اندازه‌گیری روزنه گیاه
۵۱	۳-۳-۳-سنجش میزان کلروفیل
۵۲	۳-۴-استخراج DNA
۵۲	۳-۵-استخراج RNA کل
۵۲	۳-۵-۱-تهیه‌ی بافر استخراج
۵۲	۳-۵-۲-مراحل انجام کار
۵۳	۳-۵-۲-۱-حذف نمک‌ها
۵۴	۳-۵-۳-بررسی کمیت و کیفیت DNA و RNA استخراج شده
۵۴	۳-۵-۳-۱-نانودراپ
۵۴	۳-۶-استخراج پروتئین
۵۵	۳-۶-۱-تهیه‌ی محلول برادفورد
۵۵	۳-۶-۲-تهیه‌ی تریس HCL
۵۵	۳-۶-۳-تهیه محلول اصلی

۵۵	۳-۶-۴-مراحل انجام کار
۵۶	۳-۷-کاربوتایپ (شمارش کروموزومی به روش اسکواش)
۵۶	۳-۷-۱-تهیه محلول ها
۵۶	۳-۷-۱-۱-تهیه محلول کارنوی-۱
۵۷	۳-۷-۱-۲-اسیدکلریدریک ۱ نرمال
۵۷	۳-۷-۱-۳-تهیه اسیداستیک ۴۵٪
۵۷	۳-۷-۱-۴-استوکارمن ۱ درصد
۵۷	۳-۷-۲-مراحل انجام کار
۵۸	۳-۷-۱-آزمایش اول
۶۱	۳-۷-۲-آزمایش دوم
۶۲	۳-۸-آنالیز داده ها
۶۳	فصل چهارم: نتایج و بحث
۶۴	۴-۱- تیمار بذری
۶۵	۴-۲- اثرات پلی پلوئیدی بر روی خصوصیات مورفولوژیکی
۶۵	۴-۲-۱- نتایج مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی
۶۵	۴-۲-۱-۱- طول برگ
۶۶	۴-۲-۱-۲- فاصله میانبرگچه ای اول
۶۷	۴-۲-۱-۳- فاصله میانبرگچه ای دوم
۶۷	۴-۲-۱-۴- طول و عرض برگچه انتهایی
۶۸	۴-۲-۱-۵- طول گیاهچه
۶۹	۴-۲-۱-۶- قطر دمبرگ
۷۱	۴-۳- شکل برگ
۷۲	۴-۴- شکل بذر و باروری گیاهان القاء شده
۷۴	۴-۵- روزنه
۷۶	۴-۶- اثرات القای پلی پلوئیدی بر صفات فیزیولوژیکی
۷۷	۴-۶-۱- کلروفیل a
۷۸	۴-۶-۲- کلروفیل b
۷۸	۴-۶-۳- کارتنوئید
۸۰	۴-۶-۴- محتوی پروتئین

۸۱	 RNA-۵-۶-۴ کل
۸۳	 ۷-۴-کارتایپ (شمارش کروموزومی به روش اسکواش)
۸۴	 ۸-۴- نتیجه گیری
۸۵	 ۹-۴-پیشنهادهات
۸۶	 فهرست منابع

فهرست اشکال

- شکل ۱-۲ ریخت شناسی گیاه انیسون، گل آذین و بذر آن ۱۰
- شکل ۲-۲ ساختار مولکولی و فرمول شیمیایی کلشی سین ۳۰
- شکل ۱-۳ کشت‌های گلدانی گیاه انیسون ۴۹
- شکل ۲-۳ کولیس دیجیتال ۵۱
- شکل ۳-۳ کشت و ریشه دار کردن نمونه ۱ (الف) و نمونه ۲ (ب) ۵۸
- شکل ۱-۴ اثرات تیمار بذری کلشی سین بر درصد جوانه زنی بذرهای انیسون. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است. ۶۴
- شکل ۲-۴ مقایسه میانگین بین سطوح مختلف کلشی سین صفت طول برگ گیاهچه‌های انیسون. ۶۶
- شکل ۳-۴ مقایسه میانگین برای فاصله میانبرگچه‌ای اول تحت تاثیر سطوح مختلف کلشی سین. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است. ۶۶
- شکل ۴-۴ مقایسه میانگین برای صفت فاصله میانبرگچه‌ای دوم گیاهچه‌های انیسون تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کلشی سین. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است. ۶۷
- شکل ۵-۴ مقایسه میانگین برای صفت طول برگچه انتهایی (الف) و عرض برگچه انتهایی (ب) گیاهچه‌های انیسون تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کلشی سین. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است. ۶۸
- شکل ۶-۴ نتایج مقایسه میانگین برای صفت طول گیاهچه تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کلشی سین. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است. ۶۸
- شکل ۷-۴ نتایج مقایسه میانگین برای صفت قطر دمبرگ تحت تیمارهای مختلف کلشی سین. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است. ۶۹
- شکل ۸-۴ تغییر شکل ظاهری برگهای جدید گیاه انیسون پس از اعمال تیمار کلشی سین (الف)، و مقایسه بین نمونه‌های شاهد (ب) و تیمار شده با کلشی سین ۰/۰۰۵ (ج). ۷۲
- شکل ۹-۴ شکل ظاهری گل و بذر ایجاد شده در گیاهان تیمار شده با کلشی سین (الف) و اندازه بذرهای گیاهان تیمار شده (ب) و تفاوت بذرهای تیمار شده با بذرهای شاهد (ج). ۷۳
- شکل ۱۰-۴ تصاویر روزنه ای برای تراکم و اندازه روزنه در گیاهچه های تیمار شده و کنترل (شاهد). ۷۴

شکل ۴-۱۱ نتایج مقایسه میانگین برای صفت تعداد روزنه تحت تیمارهای مختلف کلشی سین(الف) حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است و شمارش تعداد روزنه(ب) ۷۵.....

شکل ۴-۱۲ نتایج مقایسه میانگین برای محتوی کلروفیل a تحت تاثیر تیمار های کلشی سین. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است. ۷۷.....

شکل ۴-۱۳ نتایج مقایسه میانگین محتوی کلروفیل b تحت تاثیر تیمار های مختلف کلشی سین . حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است. ۷۸.....

شکل ۴-۱۴ نتایج مقایسه میانگین محتوی کارتنوئید تحت تاثیر تیمارهای مختلف کلشی سین . حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است ۷۹.....

شکل ۴-۱۵ نتایج مقایسه میانگین برای محتوی پروتئین کل تحت تیمارهای مختلف کلشی سین. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است ۸۰.....

شکل ۴-۱۶ نتایج مقایسه میانگین برای محتوی RNA کل تحت تیمار کلشی سین. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است. ۸۱.....

شکل ۴-۱۷ نتایج مقایسه میانگین برای محتوی DNA برگ بین گیاهچه های تیمار شده با غلظت ۰/۰۵ کلشی سین و نمونه شاهد. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است. ۸۲.....

شکل ۴-۱۸ مقایسه کاریوتیپ سلول های ریشه گیاهچه های انیسون تحت تیمار غلظت های مختلف کلشی سین. ۸۳.....

فهرست جداول

- جدول ۱-۴ نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی در انیسون تحت تاثیر تیمار کلشی سین. اعداد بر اساس میانگین مربعات ارائه شده است. ۶۵
- جدول ۲-۴ نتایج تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی و مولکولی در گیاه انیسون تحت تیمار کلشی سین..... ۷۷

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه

قرن هاست که گیاهان دارویی به عنوان غذا و اهداف دارویی مورد استفاده قرار می گیرند (Ciftci et al., 2005). گیاهان دارویی پیشینه‌ی باورنکردنی از لحاظ خدمت به بشریت تقریباً در تمام قاره‌های جهان دارند. درمانگران طب سنتی این دانش باورنکردنی را از نسلی به نسل دیگر منتقل کرده‌اند. حتی مدرنیته یا انقلاب‌های فرهنگی تغییری در آگاهی عمیق الگوی طب طبیعی ایجاد نکرده‌اند. منطق دارویی در پرتو کاربردهای سنتی و به دنبال آن مطالعات فیتوشیمیایی می تواند منجر به یک انقلاب جدید در درمان بیماری‌ها شود (Khan, 2014). گیاهان دارویی به عنوان منابع غنی از داروهای سنتی در نظر گرفته می‌شوند و از این گیاهان بسیاری از داروهای جدید تولید می‌شود. هزاران سال است که از گیاهان دارویی برای درمان اختلالات سلامتی، اضافه کردن چاشنی و نگه داشتن مواد غذایی و جلوگیری از همه‌گیری بیماری‌ها استفاده می‌شوند. پایه‌های سیستم‌های سنتی پزشکی برای هزاران سال است که وجود آن‌ها از گیاهان شکل گرفته است (Dar et al., 2017). سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که بیش از ۸۰ درصد از مردم هنوز عمدتاً به درمان‌های سنتی مانند گیاهان دارویی برای درمان خود تکیه می‌کنند. تخمین زده می‌شود که تقریباً یک چهارم از داروهای تجویز شده حاوی عصاره‌های گیاهی یا برگرفته شده از مواد گیاهی یا از ترکیبات گیاهی مدل‌سازی شده‌اند (Tripathi & Tripathi, 2003). گیاهان آروماتیک مشخصات بوی خوشایند و مطبوعی دارند. رایحه این گیاهان در بخش اسانس (روغن ضروری) حمل می‌شود. بسیاری از گیاهان معطر ادویه (چاشنی غذا) هستند. مواد موثره گیاهان دارویی و معطر را می‌توان در ریشه، برگ، ساقه، گل یا پوست یافت و با استفاده از روش‌های عصاره‌گیری مناسب استخراج کرد (Okigbo et al., 2009). اسانس‌های بدست آمده از گیاهان به‌عنوان عطر یا طعم‌دهنده در غذاها و نوشیدنی‌ها و همچنین به‌عنوان داروی گیاهی مدت‌هاست که مورد استفاده قرار می‌گیرند (Shibamoto et al., 2010).

امروزه گیاهان دارویی معطر جایگاه ویژه‌ای در سطح جهانی به خود اختصاص داده‌اند (Askari et al., 1998). انیسون یا بادیان‌رومی با نام علمی *Pimpinella anisum L.* از خانواده‌ی Apiaceae به عنوان گیاه آروماتیک مشهور از قدیم مورد استفاده بوده و در اروپا، کشورهای آسیایی و آمریکای لاتین مورد کشت قرار

می‌گرفته است (Samojlik et al., 2012). Anise، یک گیاه علفی سالانه با گل سفید و بذر کوچک سبز تا زرد در ایران، ترکیه، هند، مصر و سایر مناطق گرم در سراسر جهان رشد می‌کند که در داروسازی، تولید عطر و صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Besharati-Seidani et al., 2005; Gülçın et al., 2003). همچنین بذرها و روغن‌های اساسی این گیاه دارای اثرات ضد اسپاسم، آنتی اکسیدانتی، ضد میکروبی، حشره‌کشی و ضد قارچی هستند (Özcan & Chalchat, 2006; Tepe et al., 2006). روغن اساسی آنیسون عمدتاً توسط آنتول، ماده‌ای معطر که به عنوان ترکیب اصلی روغن ظاهر می‌گردد، تشکیل می‌شود و معمولاً مطابق با بیش از ۸۰٪ (درصد وزنی) روغن است (Samojlik et al., 2012). علاوه بر این، اسانس بذر آنیسون حاوی مقدار کمی از استراگول، آنیس آلدئید و سیس آنتول می‌باشد (R Omidbaigi et al., 2003; Tabanca et al., 2005).

ابزارهای بیوتکنولوژیکی برای انتخاب، تکثیر و حفظ ژنوتیپ‌های مهم گیاهان دارویی از اهمیت زیادی برخوردارند. این ابزارها با استفاده از تکنیک‌هایی مانند بازسازی در شرایط آزمایشگاهی و تحولات ژنتیکی برای تکثیر و تقویت ژنتیکی گیاهان دارویی مهم هستند. همچنین می‌تواند برای تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از گیاهان به عنوان بیوراکتور مورد استفاده قرار گیرد (Tripathi & Tripathi, 2003). افزایش سطح پلوئیدی (پلی‌پلوئیدی) نیز یک بعنوان یک روش مؤثر برای تولید ژنوتیپ‌های جدید و افزایش عملکرد گیاهان شناخته شده است (Chung et al., 2017; Nilanthi et al., 2009). پلی‌پلوئیدی شرایطی است که در آن یک موجود دیپلوئید یک یا چند مجموعه کامل اضافی از کروموزوم‌ها را کسب می‌کند. سه دسته کلی از پلی‌پلوئید وجود دارد: اتوپلی - پلوئیدها، آلوپلی‌پلوئیدها و آلوپلی‌پلوئیدها قطعه ای (Zaman et al., 2019). این فرآیند می‌تواند به طور طبیعی یا از طریق دستکاری انسان رخ دهد (Kushwah et al., 2018). پلی‌پلوئیداسیون گیاهان در طبیعت اتفاق می‌افتد اما این یک روند آهسته و تدریجی است که تکامل و گونه‌زایی را در طول اعصار (سالیان) ایجاد می‌کند. از آنجا که زمان مهم است، می‌توان با استفاده از ترکیبات شیمیایی همچون کلشی سین که در میتوز سلول‌ها تداخل ایجاد می‌کند، در مدت کوتاه‌تری پلی‌پلوئیداسیون ایجاد شود (Eng & Ho, 2019). کلشی سین به طور عمده به

عنوان یک عامل ضد میتوزی به کار گرفته می‌شود که یک آکالوئید سمی است که از *Colchicum autumnale* بدست می‌آید (Nilanthi et al., 2009). کلشی‌سین باعث دپلیمریزاسیون اسکلت سلولی میکروتوبول‌ها در مراحل اولیه متافاز، مانع جدایی کروموزوم‌ها در میتوزها و در نتیجه منجر به پلی‌پلوئیداسیون سلول‌ها می‌شود (Caperta et al., 2006).

پلی‌پلوئیدی نقش اساسی در گونه‌زایی، پویایی تنوع زیستی و سازگاری چندین گونه گیاهی مانند گندم، کلزا، یونجه، سیب‌زمینی، کاساوا، موز، سیب و چغندر قند داشته است (Aïnouche et al., 2009). پلی‌پلوئیدی همچنین از نظر کمیت و تنوع شیمیایی می‌تواند بر متابولیت‌های ثانویه تأثیر بگذارد. این تغییرات به دلیل اصلاحات ساختاری و عملکردی ناشی از افزایش سطح آلی می‌باشد (Šedivá et al., 2019). گیاهان پلی‌پلوئیدی شده بعلت بنیه نسبتاً قویتر دارای تحمل بیشتری نسبت به شرایط نامساعد محیطی هستند (Fang et al., 2019). همچنین پلی‌پلوئیدی از طریق افزایش میزان کلروفیل بر افزایش میزان فتوسنتز تأثیر می‌گذارد و در نتیجه گیاهان پلی‌پلوئید شده دارای بنیه قویتری نسبت به اجداد خود هستند (Zahumenická et al., 2018). برای ارزیابی موفقیت انجام پلی‌پلوئیداسیون، مشاهدات ریخت‌شناسی یا آناتومیکی به عنوان یک روش سریع ثبت می‌شود. با این حال، شمارش کروموزوم و بررسی محتوی ژنوم برجسته‌ترین روش برای تأیید مطلق است. با وجود چشم اندازهای قابل توجه پلی‌پلوئیداسیون، تحقیقات کمی در مورد گیاهان دارویی انجام شده است (Salma et al., 2017).

۱-۲- ضرورت تحقیق

باتوجه به اینکه محصولات گیاهی در مقایسه با مواد سنتتیک به مقدار زیادی کم‌خطرتر و مناسب‌تر هستند. انیسون به عنوان یک گیاه آروماتیک که از قدیم مورد توجه و استفاده بوده و ظرفیت دارویی بسیار زیادی دارد که از آثار دارویی آن می‌توان به اثر ضدانگلی، ضد سرفه، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروس، ضد آنتی اکسیدانی اشاره کرد در سال‌های اخیر تلاش‌های قابل ملاحظه‌ای برای توسعه‌ی جایگزین‌های آنتی بیوتیک صورت گرفته و گیاهان و عصاره‌های آن‌ها بویژه گیاهان آروماتیک برای درمان بسیاری از بیماری‌ها پیشنهاد شده است.

باتوجه به اهمیت این گیاه در سلامت جامعه بررسی عوامل موثر بر عملکرد کمی و کیفی آن بسیار حائز اهمیت است. گیاهان دارویی بعنوان کارخانه‌های تولیدکننده بیوداروها نقش مهمی در سلامت انسان دارند و افزایش راندمان این گیاهان از اهداف محققین است. القای پلی‌پلوئیدی با استفاده از مواد شیمیایی همچون کلشی‌سین به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌تواند یکی از روش‌های اصلاح گیاهان دارویی همچون انیسون باشد. بر این اساس، هدف از این مطالعه تیمار بخش‌های مختلف گیاه انیسون با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین، جهت تولید گیاهان اتوتتراپلوئید می‌باشد.

۱-۳- اهداف تحقیق

- تعیین بهترین غلظت کلشی‌سین در القاء اتوتتراپلوئید انیسون
- تعیین بهترین روش اعمال تیمار در القاء اتوتتراپلوئید انیسون
- مطالعه تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی بین گیاهان اتوتتراپلوئید و دیپلوئیدها

فصل دوم: کلیات و مرور منابع

۲-۱- رده بندی و مشخصات گیاهی

گیاه انیسون یا بادیان رومی *Pimpinella anisum* L از تیره *Pimpinella* یکی از بزرگترین جنس‌های زیرخانواده *Apioideae* در *Apiaceae* است که تقریباً ۱۵۰ گونه در آسیا، اروپا و آفریقا پراکنده شده است (Fereidounfar et al., 2016).

گیاه انیسون از خانواده *Umbelliferae* است، گیاهی علفی و یک ساله، که قسمت عمده آن میوه‌های سبز، گلابی شکل و ریز است (Al-Bayati, 2008). این گیاه دارای ساقه‌ای ایستاده (قائم)، تا ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر، درشت و منشعب است. برگ‌ها متناوب و ناهمگن هستند. گل‌آذین یک چتر انتهایی است که از گل‌های سفید کوچک هرمافروdit تشکیل شده است. این میوه که به دلیل ابعاد کوچک خود به طور نامناسب "بذر" خوانده می‌شود، یک اسکیزوکارپ خاکستری مایل به سبز است، شبیه دانه برنج، قطر ۴ میلی‌متر، بوی مطبوعی دارد که در جولای-آگوست، فقط یک ماه پس از گلدهی، رسیده می‌شود (شکل ۱-۱) (Tabanca et al., 2006).

خانواده *Apiaceae* به طور گسترده در مناطق دمایی هر دو نیمکره شمالی و جنوبی توزیع شده است و تنوع زیادی را در آسیای مرکزی نشان می‌دهد (Heywood et al., 1993). در فلور چین ۱۰۰ جنس (۱۰ جنس بومی) و ۶۱۴ گونه (۳۴۰ گونه بومی) از خانواده *apiaceae* گزارش شده است. به دلیل اسانس یا اولئورزین، گیاهان این خانواده دارای بوی تند یا معطر مشخصی هستند. پیمنوف و لئونوف (۱۹۹۳)، به طور سنتی جنس *Pimpinella* را از خانواده *apiaceae* در تبار *Apiaceae* طبقه بندی کردند (Pimenov & Leonov, 1993). به گفته داوونی و همکاران (۲۰۱۰)، قبیله *Pimpinelleae* به عنوان یک گروه پارافیلتیک یا پلی‌فیلتیک در *Apioideae* (شوکران) شناخته می‌شود (Downie et al., 2010).

جنس *Pimpinella* توسط De Candole (۱۸۲۷) به سه بخش تقسیم شد (De Candole, 1827):

۱. *Tragoselinum*: ریشه‌های چند ساله و میوه‌های بدون کرک از ویژگی‌های بارز این بخش بود.

۲. *Tragium*: ریشه‌های چند ساله (به ندرت دوساله)، برگ‌های رادیکال پینه‌دار تا دوپایه با قطعات بیضی شکل و میوه‌های کرک‌دار از ویژگی‌های اصلی این بخش بود.

۳. *Anisum*: این بخش با داشتن گونه‌های با میوه‌های یکساله پوشیده از کرک مشخص می‌شود. جنس *Pimpinella* با توجه به مورفولوژی میوه و برگ و رویشگاه گیاه توسط بنتام و هوکر (۱۸۶۷) به شش بخش طبقه‌بندی شد و شامل ۶۵-۷۰ گونه بوده است (Bentham and Hooker, 1867).

تعداد کروموزوم پایه جنس *Pimpinella* $x = 8$ تا ۱۱ است. با این حال، تغییرات کمی نیز در سطح پلوئیدی گزارش شده است ($2n = 2x = 18$ and $2n = 4x = 36$) و برخی از گونه‌های آنیوپلوئید نیز برای این جنس گزارش شده‌اند (Ghahremaninejad et al., 2013; Shner et al., 2004). انیسون معمولاً در مکان‌های خشک سنگی، شکاف‌های صخره‌ای، مزارع، علفزارها، مراتع کوهستانی و چمنزارها می‌روید و جوانه زنی بذر آن در طبیعت بسیار ضعیف است (Sirisha & Sujathamma, 2018). جنس *Pimpinella* L شامل حدود ۱۵۰ گونه است که در آفریقا، آسیا و اروپا یا در سرتاسر جهان پراکنده هستند، چند گونه از این جنس نیز در آمریکای جنوبی و بخش غربی آمریکای شمالی پراکنده هستند (Pimenov & Leonov, 1993) و به عنوان یکی از بزرگترین جنس‌های خانواده *Apiaceae* شناخته می‌شود (Downie et al., 2010). مظفریان (۲۰۰۷) گزارش کرد که پیمپینلا در اکثر نقاط ایران به ویژه در شمال و غرب پراکنده است و شامل ۲۲ گونه است (Mozaffarian, 2007) در حالی که گونر و همکاران (۲۰۱۲) ۲۵ گونه، ۵ زیرگونه و ۴ واریته را در فلور ترکیه گزارش کرد که هفت گونه آن بومی شناخته شدند (Güner et al., 2012).

Pimpinella anisum در کشورهای مختلف دارای نام‌های عامیانه‌ای از جمله: *Anis vert* (فرانسه)، دانه انیسون (ژاپن)، انیسون و انیسون ستاره‌ای (ایالات متحده آمریکا)، *Annesella* (ایتالیا)، آنیسا، بادیان، کوپی، موهوری، Sop و Saunf (ایران و هند)، انیس بوکج، انیسون پتیت (آفریقای شمالی) و انیسون (انگلیس) می‌باشد (Khare, 2007; Ross, 2001).



شکل ۱-۲ ریخت شناسی گیاه انیسون، گل آذین و بذر آن

۲-۲-پراکنش انیسون

این گیاه علفی و یکساله بومی ایران، هند، ترکیه و دیگر مناطق گرمسیر جهان است و موطن نخست آن حوزه مدیترانه می‌باشد (Ciftci et al., 2005). در ایران در نواحی شمال غربی و جنوب غربی یافت می‌شود (Haghir et al., 2010). در حال حاضر انیسون همه ساله در سطح وسیعی در اسپانیا، ایتالیا، ترکیه، هند، ژاپن، چین و رومانی کشت می‌شود. تولید جهانی انیسون همراه با انیسون ستاره‌ای و رازیانه در سال ۲۰۰۰ در سطح زیر کشتی برابر با ۵۰۵۶۴۵ هکتار و تولید ۲۹۵۸۲۴ تن بوده است (زهتاب سلماسی، ۱۳۸۰).

۲-۳-ترکیبات و اثرات دارویی انیسون

۲-۳-۱-ترکیبات

آنتول مهمترین ماده تشکیل‌دهنده انیسون است (Tuncturk & Yildirim, 2006). عملکرد و محتوی آنتول انیسون تحت تأثیر ژنوتیپ، شرایط اکولوژیکی و به ویژه تحت تأثیر عملیات‌های کشاورزی مانند آبیاری، جمعیت گیاه، کود و تاریخ کاشت قرار دارد (Acimovic et al., 2014; Oezel, 2009). به غیر از آنتول، انیسون به خاطر اسانس آن بسیار شناخته شده است که به آن بو و رایحه می‌بخشد. اگرچه جز اصلی روغن انیسون ترانس-آنتول (۷۵٪ تا ۹۰٪) است، اما سایر ترکیبات دیگر همچون کومارین‌ها (آمبلیفرون، آمبلی پرین، برگاپتن و اسکوپولتین)، لیپیدها (اسیدهای چرب، بتاآمیرین، استیگماسترول و نمک‌های آن)، فلاونوئیدها (فلاونول، فلاون، گلیکوزیدها، روتین، ایزورینتین و ایزوویتکسین)، پروتئین و کربوهیدرات در این گیاه شناسایی شده‌اند (Picon et al., 2008; Yamini et al., 2010). روغن انیسون دارای آنتول به عنوان مواد فعال و همچنین اوژنول، متیل چاویکول، آنیسالدهید و استراگل است (Ciftci et al., 2005). آنالیز فیتوشیمیایی عصاره آبی این وجود آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، تانن‌ها، ترپنوئیدها، ترکیبات فنلی و گلیکوزیدهای قلبی را نشان داد (Islam et al., 2016).

دانه‌ی انیسون منبع خوبی برای بسیاری از ویتامین‌های ضروری B کمپلکس مانند پیریدوکسین، نیاسین، ریبوفلاوین و تیامین است. دانه‌ها همچنین منبع مهمی از مواد معدنی مانند کلسیم، مس، پتاسیم، آهن، منگنز،

منیزیم و روی هستند. ویتامین‌های آنتی اکسیدانی مانند ویتامین C و A نیز می‌توانند در ادویه جات حاصل از این گیاه پیدا شوند (Sun et al., 2019). میوه‌های این گیاه حاوی روغن چرب، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و فیبرهای سلولزی است (Ullah et al., 2014).

۲-۳-۲- اثرات دارویی انیسون

جنس *pimpinella* به دلیل اهمیت طبی و دارویی گیاه انیسون معروف و شناخته شده است. دانه انیسون هم در طب سنتی و مرسوم و البته در صنعت داروسازی دارای کاربرد طولانی مدت هستند (Sun et al., 2019). از دانه‌های انیسون به عنوان مسکن در میگرن و همچنین به عنوان داروهای ضدنفخ، معطر، ضد عفونی کننده و ادرار آور در طب سنتی استفاده می‌شود (Amin, 2005). در برخی از متون سنتی، از انیسون برای مالیخولیا، کابوس و همچنین در درمان صرع و تشنج نام برده شده است (Mirheydar, 2001). همچنین انیسون یک ماده ضدپراکسیداسیون و ضد دیابت قوی است و از این رو دارای طیف وسیعی از کاربردها و بهره‌برداریه‌ها در صنایع غذایی و دارویی است (Shobha et al., 2013).

مطالعات اخیر نشان داده است که دانه‌های انیسون و روغن اساسی آن دارای فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد تشنج، ضد التهاب، ضد درد (مسکن)، محافظت از دستگاه گوارش، ضد دیابت و ضد ویروس هستند. از دیگر مزایای مهم دانه‌های انیسون می‌توان به محرک، ضدنفخ، خلط آور، حشره کش، کرم زدا، هضم کننده، ضد اسپاسم، ضد رماتیسم، ضد عفونی کننده، ضد صرع، ضد هیستریک، اهمیت آشپزی اشاره کرد، با توجه به نقش مهمی که در کنترل فشار خون دارد قلب را قوی نگه می‌دارد، یکی از بهترین عامل‌های رهاسازی گاز معده، بسیاری از مشکلات هورمونی را در زنان کاهش می‌دهد، دارای فوایدی برای پوست و مو و ممکن است علائم افسردگی را کاهش دهد (Sun et al., 2019). از عصاره‌های انیسون به عنوان دارو برای اثر ادرار آور و ملین، عمل خلط آور و ضد اسپاسم و توانایی آنها در تسکین درد و نفخ معده استفاده می‌شود (Kreydiyyeh et al., 2003). ابراهیم و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کرد که باقیمانده زائد انیسون و انیسون ستاره‌ای منابع جدیدی

از ترکیبات ضد میکروبی فنلی هستند که فرصت‌های تجاری جدیدی را به صنعت داروسازی ارائه می‌دهند. آنها پیشنهاد کرده‌اند که ترکیب عصاره‌های زائد انیسون با برخی آنتی بیوتیک‌ها منجر به انتخاب جدیدی در درمان بیماری‌های عفونی می‌شود و عصاره‌های زائد ممکن است به عنوان فعالیتی که عامل تغییرآنتی بیوتیک‌ها است عمل کنند (Ibrahim et al., 2017).

۲-۴- سایر اثرات و کاربردهای انیسون

- ترکیبات فرار اسانس به دست آمده از دانه‌ها فعالیت اینویترورا در برابر ساکارومایسس سرویزیه و برخی از مخمرهای کلینیکی جدا شده نشان دادند (Fujita & Kubo, 2004; Kosalec et al., 2005).
- یکی از ادویه‌ها و گیاهان دارویی مهمی است که برای صنایع داروسازی، عطرسازی، غذا و نوشیدنی استفاده می‌شود (ARSLAN et al., 2004).
- گزارش شده است که روغن انیسون به شدت مهارکننده کپک و قارچ در برنامه‌های غذایی است (Elgayyar et al., 2001; Soliman & Badeaa, 2002).
- دانه انیسون و عصاره آن هم در زمان‌های باستان و هم امروزه در غذاهای شور، کالاهای پخته شده و نوشیدنی‌های مختلف استفاده می‌شود (Sun et al., 2019).
- عصاره انیسون عملکرد خوبی به عنوان مهارکننده خوردگی ۱ M HCl نشان می‌دهد و همچنین عصاره انیسون با جذب شدن در سطح فلز پیرو جذب سطحی ایزوترم لانگمویر، از خوردگی جلوگیری می‌کند (Fouda et al., 2014).
- عصاره انیسون بر روی سه باکتری باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس و استرپتوکوک پنومونا اثرات ضد باکتریایی مثبت نشان داده است (Islam et al., 2016).
- روغن بادیان پتانسیل خوبی برای جلوگیری از رشد *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* و *Penicillium sp* نشان داد (Matan & Matan, 2008).

۲-۵-کشف و تاریخچه پلی پلوئیدی

کشف پلی پلوئیدی در سال ۱۹۰۷ یک رویداد مهم در تکامل یوکاریوتی بود که در بسیاری از گیاهان، حیوانات و قارچها اتفاق افتاد. بلاکسلی و اوری (۱۹۳۷) رویکرد روش پلی پلوئیداسیون میتوزی مصنوعی را آغاز کردند و به طور موثری در کشاورزی در دهه ۱۹۳۰ به کار برده شد (Salma et al., 2017). با این حال، اولین عمل پلی پلوئیداسیون در شرایط آزمایشگاهی در تنباکو گزارش شد (MURASHIGE & NAKANO, 1966).

۲-۵-۱-پلی پلوئیدی

گیاهان پلی پلوئید دارای سه یا چند مجموعه کروموزوم همولوگ هستند. افزایش تعداد کروموزوم در این گیاهان نتیجه یک رویداد تکثیر ژنوم است (Corneillie et al., 2019). بسته به منشأ رویداد تکثیر ژنوم، دو نوع مختلف پلی پلوئید در نظر گرفته می شود: اتوپلی پلوئیدها، که مشتق شده از تکثیر ژنوم دیپلوئید (درون گونه ای) و آلوپلی پلوئیدها، که نتیجه هیبریداسیون و به دنبال آن دو برابر شدن ژنوم هاپلوئید (بین گونه ای) هستند (Comai, 2005). پلی پلوئیداسیون نقش مهمی در تکامل و گونه زایی گیاه داشته است. پلی پلوئیدها به طور معمول در آلوپلی پلوئیدها و اتوپلی پلوئیدها دسته بندی می شوند، وقتی چندین مجموعه کروموزوم از گونه های مختلف و گونه های مشابه به ترتیب مشتق می شوند جمعیت های طبیعی آلوپلی - پلوئیدها نسبت به اتوپلی پلوئیدها شیوع بیشتری دارند. بنابراین، آلوپلی پلوئیدها در غلبه بر محدودیت های پلی پلوئیدی موفق شده اند و ممکن است مزایای انتخابی از خود نشان دهند، احتمالاً تا حدی به هتروزیزگوزیستی و افزونگی ژن نسبت داده می شود (Cheng et al., 2015). پلی پلوئیدی در سراسر قلمرو گیاهان وجود دارد، گفته می شود که نزدیک به ۷۰٪ از کل آنژیوسپرم ها یک یا چند قسمت از پلی پلوئیدی را در اصل و نسب خود تجربه کرده اند (D. E. Soltis et al., 2009). دلایل واضح این شیوع زیاد این است که پلوئیدی مزایای زیادی نسبت به اجداد دیپلوئید خود در محیط های نامطلوب می دهد (Te Beest et

(al., 2012). گزارش شده است که در برخی موارد افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا می‌تواند با پلی‌پلوئیدی مرتبط باشد (Hias et al., 2018).

جالب توجه است که بسیاری از محصولات مهم، دارای مجموعه‌ای از ژنوم‌های پلی‌پلوئید به طور طبیعی هستند که پرورش دهندگان گیاهان را به استفاده از آنها به عنوان وسیله‌ای برای القا غیرطبیعی برای معرفی صفات مهم و مطلوب جذب می‌کند. عدم وجود پلی‌پلوئیدی طبیعی در اکثر جنس‌ها و با توجه به تأثیرات شدید پلی‌پلوئیدی، این روش در بسیاری از گیاهان مهم دارویی طی دو دهه گذشته انتخاب و اعمال شده است (Salma et al., 2017). در مقایسه با گونه‌های دیپلوئید، اثبات شد که پلی‌پلوئیدها مورفولوژی پیشرفته و توانایی مقاومت بالایی در برابر تنش‌های محیطی را نشان می‌دهند (Kaensaksiri et al., 2011). علاوه بر این، تکثیر ژنومی ظاهراً تولید متابولیت‌های ثانویه را چه از نظر کمی و همچنین از نظر کیفی در گیاهان دارویی مهم فارماکولوژیک افزایش می‌دهد (Mohammad Majdi et al., 2010; Zahedi et al., 2014). و همچنین منجر به بیان بالاتر ژن‌ها در مقایسه با دیپلوئیدهای آنها می‌شود (M Majdi et al., 2014). پس از پلی‌پلوئیداسیون، ساختار سلول تغییر می‌یابد، سلول باید با محتوای DNA هسته جدید و با مقدار تغییر در همسانی کروموزوم‌ها، بیان ژن و اپی‌ژنتیک سازگار شود (Barker et al., 2016; Comai, 2005; Husband et al., 2013). تغییر در بیان ژن و فرآیندهای رشد به دلیل تکثیر ژنوم می‌تواند به طور بالقوه تغییراتی را در مورفولوژی، تولید مثل و فیزیولوژی فرد پلی‌پلوئید ایجاد کند (Levin, 2002). استقرار روش‌ها در خصوصیات پلی‌پلوئید به پرورش دهنده گیاه کمک کرده تا فنوتیپ برتر را در بین پلی‌پلوئیدها ارزیابی کند که می‌تواند برای اهداف تجاری مفید باشد (Eng & Ho, 2019).

تعدادی از عوامل وجود دارد که بسیاری از آنها پلی‌پلوئیدهایی با مزایای سازگاری و تکاملی فراهم می‌کنند. شاید از همه مهمتر، پلی‌پلوئیدی می‌تواند به طور قابل توجهی هتروزیگوت تر از هم‌تاهای دیپلوئیدش باشد. پلی‌پلوئیدها می‌توانند چهار ژن مختلف (آلل) داشته باشند که در هر مکان مشخص (محل قرارگیری در

یک کروموزوم) وجود دارد. درجه هتروزیگوزیتی ممکن است یک عامل کلیدی در رشد، عملکرد و سازگاری یک پلی پلوئیدی باشد. دو برابر شدن سوماتیکی هیچ ماده ژنتیکی جدیدی را معرفی نمی کند، بلکه نسخه-های اضافی از کروموزوم های موجود را تولید می کند. این DNA اضافی باید با هر بار تقسیم سلولی تکرار شود (Kushwah et al., 2018).

۲-۵-۲- القای پلی پلوئیدی

سرعت سریع نوآوری در ژنتیک مولکولی باعث ایجاد تغییرات انقلابی در استراتژی های معمول دستکاری ژنوم می شود (Zaman et al., 2019). دست ورزی در محتوای کروموزوم و اندازه ژنوم گونه ها به علت تاثیر آن در برخی از ویژگی های اکوفیزیولوژیک ابزاری توانمند در مطالعات گیاهی بوده و در تکامل ژنتیکی بسیاری از گیاهان موثر شناخته شده است (Ochatt et al., 2011). القای پلی پلوئیدی می تواند به عنوان ابزاری برای ایجاد و انتخاب نژادهای جدید و بهتر و برای کاربرد بیشتر مورد استفاده قرار گیرد (Kushwah et al., 2018).

پلی پلوئیدها می توانند به طور طبیعی وجود داشته باشند اما می توانند نتیجه القای مصنوعی با استفاده از عوامل ضد میتوزی نیز باشند. پلی پلوئیدهای طبیعی به واسطه هیبریداسیون بین گونه هایی با سطوح پلوئیدی مختلف یا اتحاد گامت ها و گامت های کاهش نیافته از هر دو نوع یا درون گونه ای یا بین گونه ای، به آرامی تشکیل می شوند (Guo et al., 2014; Sattler et al., 2016). تخمین زده می شود که فقط ۱۵٪ از گونه های آنژیوسپرم در نتیجه پلی پلوئیداسیون تشکیل می شوند (Wood et al., 2009) این نشان می دهد که تشکیل پلی پلوئید طبیعی جدید نادر است. در مقابل، پلی پلوئیداسیون مصنوعی می تواند سریعتر و با اطمینان بیشتر با عوامل ضد میتوزی مانند کلشی سین، اوریزالین، تری فلاورالین، پرونامید و آمپرو فوسمتیل (APM) ایجاد شود (Germanà, 2012). از این رو، کلشی سین معمولاً در مطالعات بیوتکنولوژیک و اکولوژیکی مورد استفاده قرار می گیرد (Castro et al., 2018).

پلی‌پلوئیداسیون طبیعی و مصنوعی بطور قابل توجهی قدرت گونه‌ها را افزایش می‌دهد، به ویژه در عصر تغییرات آب و هوایی که منجر به گرم شدن کره زمین می‌شود. تغییرات آب و هوایی، تنش‌های زیستی و غیرزیستی گیاهان را که منجر به عدم تولید محصولات زراعی می‌شود که نتیجه آن به فقر، ناامنی غذایی و مسائل اقتصادی - اجتماعی می‌شود، تشدید کرده است (Challinor et al., 2010; Rosenzweig et al., 2001). بنابراین، پلی‌پلوئیداسیون ناشی از آن باید به عنوان یک استراتژی برای بهبود سازگاری گیاه با ایجاد تنوع ژنتیکی در پاسخ به تغییرات محیطی در نظر گرفته شود (Godfree et al., 2017; Hollister, 2015).

۲-۵-۳- مزیت‌های پلی‌پلوئیدی

پلی‌پلوئیداسیون مصنوعی به طور فزاینده‌ای به یک استراتژی برجسته در پرورش جهش گیاهان تبدیل شده است، زیرا شامل جهش ژنوم در مقایسه با سایر انواع اصلی تولید جهش به عنوان مثال جهش ژنی است. جهشی که شامل ژنوم باشد در مقایسه با جهش ژن منجر به تغییر بیشتر فنوتیپ‌ها می‌شود (Eng & Ho, 2019). به طور طبیعی، گیاهان از طریق پلی‌پلوئیداسیون که منجر به تکامل و گونه‌زایی می‌شود، با تغییرات محیطی سازگار می‌شوند. با افزایش تعداد آلل‌های غالب در حالی که اثرات مضر آلل‌های مغلوب کاهش می‌یابد، می‌توان از طریق پلی‌پلوئیداسیون سازگاری یک گونه را بهبود بخشید (Comai, 2005; P. S. Soltis et al., 2015).

پرورش‌دهندگان گیاهی گیاهان پلی‌پلوئید را به منظور بهبود صفات زراعی خود انتخاب می‌کنند، که برخی از آن‌ها توسط اتوپلیمریزیشن (در درون گونه‌ها) و یا توسط آلوپلیمریزیشن گونه‌های مختلف (هیبریدهای بین گونه‌ای) توسعه داده شده‌اند (Rêgo et al., 2011). در مقایسه با آلوپلی‌پلوئیدها که در طبیعت رایج‌تر هستند، اتوپلی‌پلوئیدها مزیت بزرگی دارند زیرا این موجودات تعداد ژن‌ها و انواع آلل را به حداکثر می‌رسانند. برخی از صفات مانند تحمل به خشکی، مقاومت به آفات، زمان گلدهی، اندازه اندام، آپومیکسیس و زیست توده شانس انتخاب گیاهان پلی‌پلوئید برای کشاورزی یا ورود به سوله‌های جدید را افزایش می‌-

دهند (Mishra et al., 2010). توانایی گیاهان پلی‌پلوئید برای استقرار خود در گستره وسیعی از زیستگاه‌ها و زنده ماندن در شرایط محیطی نامطلوب، آنها را در برابر اجداد دیپلوئید خود موفق می‌کند، به دلیل وجود آلل‌های اضافی که هتروزیگوسیتی آنها را افزایش می‌دهد (Alam & Razaq, 2015). تغییرات فنوتیپی و ژنتیکی در گیاهان ناشی از پلی‌پلوئیدی ممکن است به دلیل افزایش اندازه سلول، تنوع آللی (سطح هتروزیگوسیتی)، خاموشی ژن و اثر دوز ژن یا به دلیل تعاملات اپی ژنتیکی و ژنتیکی رخ دهد (Dewitte et al., 2012).

گامت‌های کاهش نیافته ($2n$) با تعداد کروموزوم‌های سوماتیک عوامل اصلی القای پلی‌پلوئیدی در طبیعت هستند (Dewitte et al., 2012). پلی‌پلوئیدی پایه ژنتیکی را از طریق توسعه لاین‌های اصلاحی در یک بازه زمانی کوتاه و بازیابی باروری هیبریدی در تلاقی‌های بین گونه‌ای و بین پلوئیدی افزایش می‌دهد. سه مزیت آشکار قابل توجه پلی‌پلوئیدی شامل هتروزیس، افزونگی ژن و تولیدمثل غیرجنسی است. هتروزیس در مقایسه با والدین دیپلوئید آنها باعث ایجاد گیاهان پلی‌پلوئید قوی می‌شود در حالی که افزونگی ژن گیاهان پلی‌پلوئید را از اثرات مضر جهش محافظت می‌کند. افزونگی ژن همچنین باعث ایجاد یک اثر بافری می‌شود که در آن کپی‌های اضافی از آلل‌های نوع وحشی اثر آلل‌های مضر را درک می‌کنند. به این ترتیب، نسخه‌های اضافی از ژن‌ها، محافظتی در برابر کاهش تولیدمثل و اثرات مضر منفرد ایجاد می‌کنند. یکی دیگر از مزایای مهم افزونگی ژن در رابطه با جفت‌های ژنی تکراری است که در آن یک عضو جهش می‌یابد و عملکرد جدید خاصی را بدون تأثیر بر عملکردهای اساسی به دست می‌آورد (Sattler et al., 2016). تولیدمثل غیرجنسی به گیاهان پلی‌پلوئیدی اجازه می‌دهد که حتی در غیاب جفت جنسی خود تولید مثل کنند (Comai, 2005).

برای اهداف زراعی، برخی از پلی‌پلوئیدها به طور آشکاری اندام‌های بزرگتری مانند گل، میوه، دانه، برگ، ساقه و ریشه تولید می‌کنند. این پدیده در مواردی که اندازه سلول‌ها در نتیجه دو برابر شدن کروموزوم

افزایش می‌یابد، به عنوان اثرات "گیگا" نامیده می‌شود (Sattler et al., 2016) پرورش‌دهندگان گیاهان برای تولید محصول بیشتر در دراز مدت، هزینه کمتری را صرف نهاده‌ها (تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، کود شیمیایی و غیره) می‌کنند که این امر همچنین می‌تواند پسماندهای شیمیایی مضر را کاهش دهد. در نتیجه، میوه‌کاری، گل‌کاری، جنگل‌داری که تا حد زیادی به ویژگی‌های زراعی بهبود یافته مربوط به پایداری و آرایش ساختار میکروتوبول‌ها (پلیمریزاسیون توبولین‌ها) در طول چرخه سلولی و تحرک درون سلولی به ویژه کروموزوم‌ها بستگی دارد (Hammond et al., 2008). گیاهان دارویی همچنین از اثرات زراعی "گیگا" که به بیوسنتز آنزیمی بیشتری تبدیل می‌شود و متابولیت‌های ثانویه را از نظر کمی و کیفی تغییر می‌دهد، سود می‌برند (Salma et al., 2017). در نتیجه، پلی‌پلوئیدها از نظر مورفولوژی و بیوشیمیایی بهره‌وری را افزایش می‌دهند. در برخی از گونه‌های زینتی، پلی‌پلوئیداسیون باعث کوتاه شدن میانگرم‌های *Mercadonia* (Escandón et al., 2007) *tenella* و *Lobularia maritima* (Huang et al., 2015) و اطلسی (Ning et al., 2009; Regalado González et al., 2017) شد. در مورد گل اطلس، تغییر در قطر گل مشاهده نشده است (Ning et al., 2009; Regalado González et al., 2017). در اصلاح نباتات، تنوع ژنوتیپ منبع اصلی تولید گیاهانی با صفات ارزش اقتصادی بالاتر است. با این حال، برخی از گیاهان نابارور هستند و به دلیل سطح مختلف پلوئیدی و عدم عبور از گونه‌های دیگر، بذر تولید نمی‌کنند (Sattler et al., 2016). تا به امروز، حداقل ۳،۲۸۱ رقم جهش یافته از محصولات عمده زراعی ثبت شده است. در میان آنها، ۴۶ پلی‌پلوئید ناشی از کلشی‌سین هستند (FAO/IAEA, 2018).

پلی‌پلوئیدی بیشترین اهمیت را در باغداری برای تولید گونه‌های زینتی جدید با صفات مورفولوژیکی مطلوب با توجه به اندازه و قدرت گیاه، ضخامت برگ، گل‌های بزرگتر با گلبرگ‌های ضخیم‌تر، رنگ تیره برگ و گل، گل‌های پایا، غلظت، کوتاهی و باروری بازیابی شده دارد. پلی‌پلوئیدی ممکن است به طور طبیعی به دلیل

تشکیل گامت‌های کاهش نیافته رخ دهد یا با دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌های سلول‌های سوماتیک به طور مصنوعی ایجاد شود (Manzoor et al., 2019).

اثرات پلی‌پلوئیدی بر روی صفات گیاهی نیز برای باغداران و پرورش‌دهندگان گیاهان مهم هستند. پلی‌پلوئیدی یکی از روش‌های موفقیت‌آمیز در بهبود برخی گیاهان مانند سیب، باقلا و گل فلوکس و غیره می‌باشد (Kushwah et al., 2018). پیش از این گزارش شده بود که گیاهان پلی‌پلوئید مزیت‌هایی در ایجاد بافت و اندام نشان می‌دهند، به طور کلی اندازه بافت رویشی، شکل گل بزرگ و مقاومت به تنش‌های محیطی را در مقایسه با گونه‌های دیپلوئید بهبود می‌بخشند و علاوه بر این، دو برابر شدن کروموزوم گیاهان دارویی باعث افزایش عناصر فعال شد (Liu et al., 2011; Meng et al., 2011).

۲-۵-۴- مراحل دوبرابر شدن کروموزوم

در مجموع روش دو برابر شدن کروموزوم‌های القایی شامل یکسری مراحل از جمله یک مرحله القایی، مرحله رشد مجدد و یک روش تأیید برای ارزیابی میزان موفقیت است. مرحله القایی به عوامل مختلفی از جمله انواع ریزنمونه، عوامل ضد میتوزی، غلظت‌های مختلف آن و مدت زمان در معرض قرار گرفتن آن بستگی دارد. برای ارزیابی موفقیت انجام پلی‌پلوئیداسیون، مشاهدات ریخت‌شناسی یا آناتومیکی به عنوان یک روش سریع ثبت می‌شود با این حال، شمارش کروموزوم و فلوسایتومتری برجسته‌ترین روش برای تأیید مطلق است (Salma et al., 2017).

۲-۵-۵- پارامترهای ایجاد پلی‌پلوئیداسیون کارآمد

استفاده از کلشی‌سین که در میتوز سلول‌ها تداخل ایجاد می‌کند، در مدت کوتاه‌تری پلی‌پلوئیداسیون ایجاد می‌کند. برای توسعه‌ی یک پروتکل پلی‌پلوئیداسیون کارآمد از یک گونه، تحقیقات به روز از اهمیت بالایی برخوردار است. کارایی سیستم القای پلی‌پلوئیداسیون به پیشرفت تکنیک‌های تکثیر گونه‌هایی بستگی دارد که از سیستم‌های *in vitro*، *ex vitro* و *in vivo* تشکیل شده است. در حین القای پلی‌پلوئیداسیون،

می‌توان چندین پارامتر را دستکاری کرد تا بالاترین درصد پلی‌پلوئید به دست آید. این پارامترها شامل غلظت کلشی‌سین، مدت تیمار و نوع ریزنمونه هستند. چندین عامل دیگر که این پارامترها را تقویت می‌کنند شامل استفاده از شیکر، DMSO (دی متیل سولفوکسید) و محیط کشت است. پلی‌پلوئیدهای قلمداد شده القایی به طور غیرمستقیم بر اساس پارامترهای مورفولوژیکی، پارامترهای تشریحی و فلوسایتومتری انتخاب می‌شوند. پلی‌پلوئید قلمداد شده را می‌توان با استفاده از شمارش کروموزوم به طور مستقیم و عیناً تأیید کرد (Eng & Ho, 2019).

۲-۶- متابولیت‌های ثانویه

گیاهان موجوداتی بی‌حرکت (ساکن) هستند و به منظور دفاع از خود در برابر محدودیت‌های بیولوژیکی بیرونی، مجموعه‌ای از متابولیت‌های ثانویه را که دارای اثرات مهم فیزیولوژیکی و اکولوژیکی هستند، سنتز می‌کنند (Guerriero et al., 2018). متابولیسم ثانویه گیاه همانطور که از متابولیسم اولیه متمایز است و اولین بار به کوسل (Kossel, 1891) نسبت داده می‌شود، یک اصطلاح برای مسیر و محصولات مولکولی کوچک متابولیسم تعریف می‌شود که برای بقای ارگانیسم غیرضروری هستند (Yang et al., 2018).

در طبیعت، انواع مسیرهای متابولیسم ثانویه مجموعه‌ای از ترکیبات دفاعی گیاه را به نام متابولیت‌های ثانویه (SMs) ایجاد می‌کنند. علاوه بر مواد مغذی اساسی مانند پروتئین‌ها، چربی‌ها یا کربوهیدرات‌ها، گیاهان می‌توانند ترکیبات دیگری از جمله تاکسونوئیدها (سموم)، پلی‌ساکاریدها، فلاون‌ها و غیره را تولید کنند. SMs ها مولکول‌هایی هستند که برای رشد و متابولیسم گیاهان غیرضروری هستند، در حالی که تنوع گسترده و زیاد محصولات ثانویه از اجزاء کلیدی گیاهان جهت تعامل با محیط در سازگاری با هر دو شرایط تنش زیستی و غیرزیستی هستند. در واقع، متابولیت‌های ثانویه در محافظت در برابر گیاهخواران، باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و حتی سایر گیاهان رقیب نقش دارند. بعلاوه، برخی از گیاهان از متابولیت‌های

ثانویه به عنوان سیگنال‌هایی برای ارتباط بین گیاهان و میکروارگانیسم‌های همزیست و همچنین برای جذب گرده افشان‌ها و پخش‌کنندگان بذر استفاده می‌شدند (Wink, 2003, 2008).

متابولیت‌های ثانویه گیاهی را می‌توان در چهار طبقه اصلی طبقه‌بندی کرد: ترپنوئیدها، ترکیبات فنلی، آلکالوئیدها و ترکیبات حاوی گوگرد. این مواد شیمیایی گیاهی می‌توانند ضد میکروبی باشند، به عنوان مواد جاذب / دفع کننده یا بازدارنده در برابر گیاهخواران عمل کنند. سنتز چنین تنوع غنی از مواد فیتوشیمیایی نیز در سلول‌های گیاهی تمایز نیافته تحت شرایط آزمایشگاهی مشاهده می‌شود و می‌تواند بیشتر با الیستورها یا با تغذیه مواد پیش ساز ایجاد شود (Guerriero et al., 2018).

متابولیت‌های ثانویه گیاهی (SMs) نه تنها مجموعه مفیدی از محصولات طبیعی هستند بلکه همچنین بخش مهمی از سیستم دفاع گیاه در برابر حملات بیماری‌زا و تنش‌های محیطی هستند. با فعالیت‌های بیولوژیکی قابل توجه، SMs گیاهی به طور فزاینده‌ای به عنوان ترکیبات دارویی و افزودنی‌های غذایی برای اهداف درمانی، معطر و آشپزی مورد استفاده قرار می‌گیرند. فاکتورهای مختلف ژنتیکی، آنتوژنیک، مورفوژنتیکی و محیطی می‌توانند در بیوسنتز و تجمع SMs تأثیر بگذارند. باتوجه به گزارشات مقالات، به عنوان مثال، تجمع SMs به شدت به عوامل مختلفی از قبیل نور، دما، آب، خاک، حاصلخیزی و شوری خاک بستگی دارد و برای اکثر گیاهان، تغییر در یک فاکتور منفرد ممکن است محتوای SMs را تغییر دهد حتی اگر عوامل دیگر ثابت بمانند (Yang et al., 2018).

۲-۷- ارتباط پلی‌پلوئیدی و متابولیت‌های ثانویه

اتوپلی‌پلوئیداسیون همراه با تغییرات سیتولوژی، مورفولوژیکی و متابولیکی نقش مهمی در تکامل گیاه و کشاورزی دارد. همچنین ممکن است بین محتوای DNA، صفات مورفولوژیکی (مانند روزنه، گرده، اندازه میوه) و متابولیت‌های ثانویه همبستگی مثبتی وجود داشته باشد. کاملاً مشهور است که گیاهان انواع مختلفی از ترکیبات طبیعی را تولید می‌کنند و روش‌های زیادی برای بالابردن تولید آنها پیشنهاد شده است.

روش‌های مختلف برای افزایش ترکیبات متابولیک ثانویه ممکن است گران باشد و به راحتی در آزمایشات انجام نشود، اما دوبرابر شدن کروموزوم‌ها روشی است که بسیار موثر و به‌صرفه و انجام آن نیز آسان است (S. Kumar, 2021).

تکثیر مجدد ژنوم افزایش بنیه و بهره‌وری گیاه را از طریق بهبود وضعیت فعالیت سلولی با افزایش اندازه سلول، اندازه و تعداد روزنه، اندازه و فعالیت هسته‌ای (Gantait et al., 2011; Moghbel et al., 2015)، برهمکنش و بیان ژن، بازده رونویسی، تنظیم هماهنگی پس از ترجمه ژن‌ها منجر به افزایش متابولیسم و از آن به بعد تولید بیشتر آلکالوئیدها، فلاون‌ها، فنولیک‌ها و در مجموع متابولیت‌های ثانویه را مشخص می‌کند (Iannicelli et al., 2020; Umesh C Lavania et al., 2012). در نتیجه، کیفیت و کمیت تولید متابولیت ثانویه افزایش قابل توجهی دریافت می‌کند (Salma et al., 2017). چنین پیشرفتی را می‌توان به صورت متناسب در بین تریپلوئیدها، تتراپلوئیدها و سایر سطوح پلوئیدی بالاتر به دلیل اثرات دوزهای چندگانه ژنتیکی به دست آورد (Niazian & Nalousi, 2020). با این حال، چنین تغییرات دستکاری شده، نیز تابع ویژگی‌های ژنوتیپ است (Iannicelli et al., 2020; Salma et al., 2017). علی‌رغم اینکه پیشرفت‌های ژنتیکی گیاهان دارویی و معطر عمدتاً بر توسعه کمی اسانس‌ها و متابولیت‌های ثانویه متمرکز است. تقریباً سه دهه قبل، کاربرد پلی‌پلوئیدهای القا شده برای افزایش بهره‌وری متابولیت‌های ثانویه برجسته شده بود (Dhawan & Lavania, 1996). با این حال، بیش از ۱۵ سال طول کشید تا استفاده همه جانبه از این فناوری آغاز شود، به طوری که از سال ۲۰۱۱ تا ۲۰۲۰، بیش از ۶۰ مقاله تحقیقاتی منتشر شده است که عمدتاً بر روی استفاده از عوامل ضد میتوزی (مانند کلشی سین، اوریزالین و/یا تری فلورالین. و غیره) به منظور تکثیر سطوح پلوئیدی برای دستیابی به تولید بالا متابولیت‌های ثانویه متمرکز شدند (S. Kumar, 2021).

گزارش شده است که پلی‌پلوئیدی ممکن است از نظر کمیت و تنوع متابولیت‌ها و همچنین ساختار شیمیایی آنها بر متابولیت‌های ثانویه تأثیر بگذارد. یکی از دلایل احتمالی تغییر متابولیک یا تغییر شکل در فعالیت متابولیکی یک پلی‌پلوئید برای ایجاد تغییرات در متابولیت‌های ثانویه ممکن است به دلیل تنظیم انواع مختلف ژنوم‌ها در شرایط آب و هوایی جدید برای بقا و عملکرد طبیعی آنها مطرح شود. ژنوم پلی‌پلوئید ترکیبی یا مخلوطی از اجداد مختلف است که در طول پلی‌پلوئیداسیون تحت تغییرات مختلف ساختاری و عملکردی قرار گرفته و در شکل‌گیری آن گونه پلی‌پلوئید در طول تکامل دخیل است. همچنین گزارش شده است که دوبرابر شدن‌های کروموزومی باعث تغییرات متابولیکی می‌شود و در تعداد کمی از گونه‌ها با هدف متابولیت‌های ثانویه خاص مانند آلکالوئیدها و فلاونوئیدها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، اما فاقد تغییرات متابولیکی کامل در گونه‌ها که با اتوپلی‌پلوئیداسیون همراه است، هستند (S. Kumar, 2021). علاوه بر این، تکثیر ژنومی ظاهراً تولید متابولیت‌های ثانویه را چه از نظر کمی و همچنین از نظر کیفی در گیاهان دارویی مهم فارماکولوژیک افزایش می‌دهد (Mohammad Majdi et al., 2010; Zahedi et al., 2014) و همچنین منجر به بیان بالاتر ژن‌ها در مقایسه با دیپلوئیدهای آنها می‌شود (M Majdi et al., 2014).

بطورمثال علاوه بر این، گزارش شده است که دو برابر شدن کروموزوم (پلی‌پلوئیدی) تأثیرات مهمی نه تنها بر عملکرد متابولیت‌های ثانویه (به عنوان مثال روغن ضروری) بلکه پروفایل متابولیت ثانویه در انواع مختلف از جمله گل اطلسی، بابونه وحشی، گندواش یا خاراگوش چینی دارد (Griesbach & Kamo, 1996).

اثر پلی‌پلوئیداسیون بر روی پروفایل متابولیکی برگ و تتراپلوئیدهای القا شده ($2n=4x=48$) از گونه‌های دیپلوئید وحشی سیب‌زمینی مشاهده شده است، در مقایسه با گونه‌های سیب‌زمینی دیپلوئید وحشی، مقدار کمتری از متابولیت‌های ثانویه مانند فنیل پروپانوئیدها، تریپتوفان، تیروزین و آلفا-چاکونین ($2n=2x=24$)

سولانوم بولبوکستانوم تولید کرد (Abdoli et al., 2013; Mohammad Majdi et al., 2010; Tavan et al., 2015).

به عنوان مثال، *Cannabis sativa* L. ($2n=2x=20$) از دوران باستان برای فیبر، غذا و متابولیت‌های ثانویه با خواص درمانی و تفریحی کشت می‌شد (Van Bakel et al., 2011). دو برابر شدن کروموزوم از طریق اتوپلی‌پلوئیداسیون می‌تواند در بهبود ترکیب کانابینوئید (یک متابولیت ثانویه) مفید باشد، اما بسیاری از مطالعات پاسخ متفاوتی را پیشنهاد می‌کنند (Lata et al., 2016; Van Bakel et al., 2011).

تقاضا برای گیاهان دارویی با ارزش برای معالجه و بهبودی بیماری‌های مختلف در سراسر جهان افزایش یافته است. از این رو، با در نظر گرفتن تحقق تجاری و علمی، بهبود تولید متابولیت‌های زیستی ثانویه از طریق اتوپلی‌پلوئیدی القا شده در شرایط آزمایشگاهی به عنوان یک استراتژی سازنده برای بهبود محصولات مورفوفیزیولوژیک - ژنتیکی محصول ظاهر می‌شود (Gantait & Mukherjee, 2021).

۲-۸- کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی

کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی (GC-MS) استانداردترین روش در متابولومیکس است، با تقریباً ۵۰ سال پروتکل تأیید شده برای تجزیه و تحلیل متابولیت‌هایی مانند قندها، اسیدهای آمینه، استرول‌ها، هورمون‌ها، کاتکول آمین‌ها، اسیدهای هیدروکسیل، اسیدهای چرب، معطرها، و بسیاری از واسطه‌های دیگر متابولیسم اولیه است (Fiehn, 2016). در واقع، توانایی ترکیب چنین تجزیه و تحلیل هدفمند از کلاسهای ترکیبی خاص به سنجش پروفایل برای بخش‌های بزرگی از متابولیسم ابتدا با استفاده از GC-MS در دهه ۱۹۷۰ انجام شد، از جمله استفاده از چنین پروفایل‌هایی برای بهبود تشخیص بیماری‌های انسانی (Thompson & Markey, 1975)، با استفاده از ۱۴۰ موضوع یا بیشتر بود. امروزه چنین پروفایل‌هایی متابولومیک نامیده می‌شود تا بر نیاز به شناسایی و تعیین کمیت تمام مولکول‌های کوچک موجود

در یک موقعیت بیولوژیکی معین و استفاده از چنین پروفایل هایی به عنوان خروجی ساختارسلولی در پاسخ به اختلالات ژنتیکی یا محیطی استفاده شود (Fiehn, 2016).

GC-MS یک تکنولوژی کامل است که نه تنها از آشکارسازهای کلاسیک (چهار قطبی) بلکه از طیف سنج های جرمی (چهار قطبی سه گانه) و ابزارهای جرمی دقیق (زمان چهار قطبی-زمان پرواز) نیز استفاده می کند. این واحد آماده سازی نمونه از نمونه های پستانداران، جمع آوری داده ها، کنترل کیفیت و پردازش داده ها را پوشش می دهد. با تکمیل تفسیر پایگاه داده با استفاده از کتابخانه های طیفی بزرگ و روش های عملیاتی استاندارد معتبر، GC-MS می تواند بیش از ۲۰۰ ترکیب از مایعات بدن انسان (به عنوان مثال، پلاسما، ادرار یا مدفوع) را در هر مطالعه شناسایی و کمی کند (Fiehn, 2016).

کروماتوگرافی اصطلاحی است که برای توصیف تکنیک جداسازی استفاده می شود که در آن یک فاز متحرک که مخلوط را حمل می کند در تماس با یک فاز ساکن جاذب انتخابی حرکت می کند. همچنین نقش اساسی را به عنوان یک تکنیک تحلیلی برای کنترل کیفیت و استانداردسازی گیاه درمانی نشان می دهد (Al-Rubaye et al., 2017). کروماتوگرافی گازی کاربردهای وسیعی دارد اما، اولین و اصلی ترین زمینه استفاده از آن در جداسازی و آنالیز مخلوط های چند جزیی مانند روغن های اساسی، هیدروکربن ها و حلال ها است (Kadhim et al., 2016; Vital & Rivera, 2009). برنامه های دمایی مختلف می توانند برای معنی دار کردن خوانش ها مورد استفاده قرار گیرند، به عنوان مثال، تمایز بین موادی که در طول فرآیند GC رفتار مشابهی دارند. اساساً، با استفاده از آشکارساز یونیزاسیون شعله و آشکارساز جذب الکترون (که حساسیت های بسیار بالایی دارند) کروماتوگرافی گازی می تواند مواد موجود در غلظت های بسیار کم را به صورت کمی تعیین کند. گیاهان منبع غنی از متابولیت های ثانویه با فعالیت های بیولوژیکی جالب هستند. به طور کلی، این متابولیت های ثانویه منبع مهمی با انواع ویژگی های ساختاری و خواص هستند (Al-Rubaye et al., 2017).

از این رو، دومین حوزه کاربردی مهم در مطالعات آلودگی، کار پزشکی قانونی و تجزیه و تحلیل کلی آثار است. کروماتوگرافی گازی به دلیل سادگی، حساسیت و اثربخشی در جداسازی اجزای مخلوط، یکی از مهمترین ابزارهای علم شیمی است. به طور گسترده ای برای تجزیه و تحلیل کمی و کیفی مخلوطها، برای تصفیه ترکیبات و برای تعیین چنین ثابت‌های ترمو شیمیایی به عنوان گرمای محلول و تبخیر، فشار بخار و ضرایب فعالیت استفاده می‌شود (Marston, 2007; Vyas, 1999). آگاهی از ترکیبات شیمیایی گیاهان نه تنها برای کشف عوامل درمانی مطلوب است، بلکه به این دلیل که چنین اطلاعاتی ممکن است در افشای منابع جدید فیتوترکیبات اقتصادی برای سنتز مواد شیمیایی پیچیده و کشف اهمیت واقعی داروهای گیاهی ارزشمند باشد. گیاهان عالی به عنوان منابع ترکیبات زیست فعال همچنان نقش مهمی در حفظ سلامت انسان ایفا می‌کنند. گزارشات موجود در مورد گیاهان سبز نشان دهنده مخزن داروهای شیمی درمانی موثر است، این‌ها فیتوتوکسیک نیستند، بیشتر سیستمیک هستند و به راحتی تجزیه پذیر می‌شوند. از این رو تأیید کامل داروهای گیاهی به عنوان شاخه جدیدی از علم با تاکید و اولویت بندی استانداردسازی داروها و محصولات طبیعی پدیدار شده است زیرا چندین ماده شیمیایی دارای مکانیسم عملکرد مکمل و همپوشانی هستند. در سال‌های اخیر مطالعات GC-MS به طور فزاینده‌ای برای تجزیه و تحلیل گیاهان دارویی مورد استفاده قرار گرفته است زیرا این تکنیک یک روش ارزشمند برای تجزیه و تحلیل اجزای غیر قطبی و اسانس فرار، اسیدهای چرب، لیپیدها و آلکالوئیدها است (Al-Tameme et al., 2015; Hameed et al., 2016).

در خانواده روش‌های مبتنی بر کروماتوگرافی، کروماتوگرافی گازی (GC) یکی از رایج‌ترین تکنیک‌ها است. GC-MS به یک ابزار بسیار توصیه شده برای نظارت و ردیابی آلاینده‌های آلی در محیط زیست تبدیل شده است. GC-MS منحصراً برای تجزیه و تحلیل استرها، اسیدهای چرب، الکل‌ها، آلدئیدها، ترپن‌ها و غیره استفاده می‌شود. این ابزار کلیدی است که در آزمایشگاه‌های ضد دوپینگ ورزشی مورد آزمایش قرار می‌گیرد.

گیرد تا نمونه‌های ادرار ورزشکار را برای داروهای افزایش دهنده ممنوع مانند استروئیدهای آنابولیک آزمایش کند. چندین GC-MS زمین را برای مطالعات شیمی فضایی ترک کرده‌اند. GC-MS به عنوان یک تکنولوژی منحصر به فرد و قدرتمند فرصتی نادر برای انجام تجزیه و تحلیل ترکیبات جدید برای توصیف و شناسایی ترکیبات سنتز شده یا مشتق شده ایجاد می‌کند (Fiehn, 2016).

۹-۲- بازدارنده‌های میتوزی

استفاده از بازدارنده‌های میتوزی به منظور تغییر سطوح پلوئیدی از گذشته مورد استفاده قرار گرفته و تا حد زیادی در تولید محصولات دارای صفات مطلوب موثر بوده است (Dhooghe et al., 2011). معمولاً گیاهان پلی‌پلوئید طبیعی در دسترس نیستند، بنابراین پلی‌پلوئیدی به کمک بازدارنده‌های میتوزی به صورت مصنوعی القا می‌شود (Manzoor et al., 2019). القای مصنوعی پلی‌پلوئیدی با استفاده از عوامل بازدارنده میتوزی مختلفی مانند کلشی‌سین، اوریزالین و تریفلورالین انجام شده است (Dhooghe et al., 2011).

۹-۲-۱- کلشی‌سین

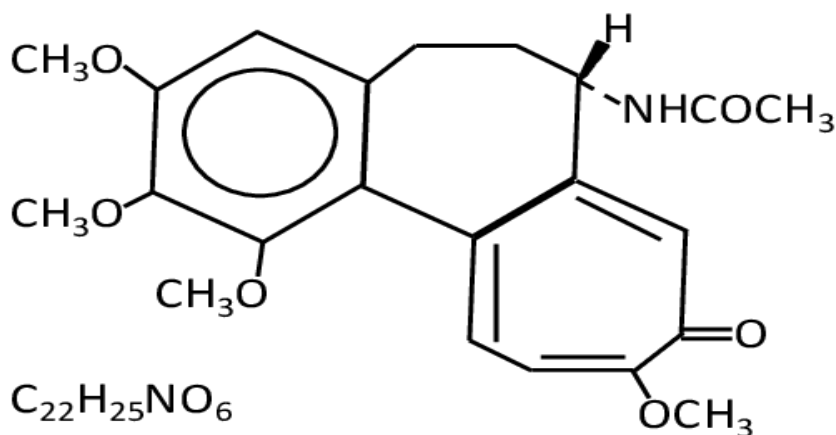
به نظر می‌رسد اهمیت پلی‌پلوئیدی در اصلاح نباتات زمانی که بازدارنده میتوز (کلشی‌سین) برای اولین بار در دهه ۱۹۳۰ کشف شد مورد توجه قرار گرفت (Marzougui et al., 2011). این ترکیب دارای ساختار شیمیایی سه حلقه ای با فرمول ($C_{22}H_{25}O_6N$) به عنوان یک ماده محرک و با هدف ایجاد تتراپلوئیدی در گیاهان، تهیه شده از فرآورده‌های زعفران مرغزار *Colchicum autumnale*، بیش از ۲۰۰۰ سال است که به عنوان سم و به عنوان درمانی برای بیماری نقرس مورد استفاده قرار می‌گیرد (Dhooghe et al., 2011; Wedeen, 1984). با این حال، پیکربندی کامل کلشی‌سین تنها در سال ۱۹۵۵ زمانی مشخص شد که به عنوان یک آلکالوئید سه حلقه ای چربی دوست خنثی شناخته شد، ویژگی‌های اصلی آن شامل یک حلقه تری متوکسی فنیل، یک حلقه ۷ عضوی با استامید در موقعیت هفت و یک حلقه تروپولونیک است

(Corrodi & Hardegger, 1955) (شکل ۲-۲). کلشی‌سین برای مصرف خوراکی (کپسول/قرص/مایع) و در حال حاضر برای پیشگیری و درمان عود نقرس در بزرگسالان مبتلا به نقرس و تب مدیترانه‌ای خانوادگی (FMF) مورد تأیید FDA است ([https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drugsafety-information-\(patients-and-providers/colchicinemarketed-colcrys-information\)](https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drugsafety-information-(patients-and-providers/colchicinemarketed-colcrys-information))).

کلشی‌سین از پیاز (۰.۵-۰.۱٪) و دانه (۰.۲٪ تا ۰.۸٪) از زعفران پاییزی یا زعفران چمنزاری (*Colchicum autumnale*) استخراج می‌شود و دارای ویژگی آکالوئیدی بسیار سمی است. به راحتی در آب سرد، کلروفرم یا الکل حل می‌شود اما در آب گرم حلالیت کمی دارد (M. K. Kumar & Rani, 2013). کلشی‌سین یک مهار کننده میتوزیک است که به طور گسترده‌ای برای القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان در طول تقسیم سلولی آنها با مهار (جلوگیری) تفکیک کروموزوم استفاده می‌شود. از اندام‌های مختلف گیاهی مانند دانه‌ها، مریستم‌های انتهایی، جوانه‌های گل و ریشه‌ها می‌توانند برای القای پلی‌پلوئیدی از طریق بسیاری از روش‌های کاربردی مانند غوطه‌وری/خیساندن، ریختن یا قراردادن پنبه استفاده شوند (Manzoor et al., 2019).

کلشی‌سین یک موتازن مهم است که با جلوگیری از تشکیل میکروتوبول‌ها عمل می‌کند و تعداد کروموزوم‌ها را دو برابر می‌کند. معمولاً برای رشد گیاهان پلی‌پلوئید استفاده می‌شود و با ایجاد اثرات جهش‌زا بر روی گیاهان به عنوان یک سم میتوزی عمل می‌کند (El-Nashar & Ammar, 2016). از آنجایی که میکروتوبول‌ها در جداسازی کروموزوم‌ها عمل می‌کنند، کلشی‌سین با جلوگیری از جداسازی کروموزوم‌ها در طول تقسیم سلولی، پلی‌پلوئیدی را القا می‌کند که باعث می‌شود نیمی از گامت‌ها (سلول‌های جنسی) حاوی دو برابر تعداد کروموزوم‌های معمولی باشند. در حالی که نیمی از گامت‌ها فاقد کروموزوم هستند و چنین‌هایی با تعداد کروموزوم‌های دو برابر تولید می‌کنند (Ade & Rai, 2010). کلشی‌سین نه تنها به دو برابر شدن کروموزوم‌ها کمک می‌کند، بلکه باعث ایجاد جهش در گیاهان نیز می‌شود. گیاهانی که از طریق کلشی‌سین جهش یافته‌اند به عنوان کلچی جهش یافته شناخته می‌شوند (Ari et al., 2015). از آنجایی که

کلشی‌سین برای گیاهان بسیار سمی است، بنابراین دوزهای پایین با دوره مواجهه طولانی مدت برای کاهش اثر سمی آن و افزایش نرخ تولید پلی‌پلوئید قابل اعتماد در نظر گرفته می‌شود (Sajjad et al., 2013).



شکل ۲-۲ ساختار مولکولی و فرمول شیمیایی کلشی‌سین

۲-۹-۲- مکانیسم عمل کلشی‌سین

۲-۹-۲-۱- کمپلکس توبولین-کلشی‌سین

کلشی‌سین یک مهارکننده میتوز و مجموعه ریز لوله‌ها است. این ماده به هتروداایمرهای محلول و پلیمریزاسیون نشده توبولین متصل می‌شود و یک کمپلکس محکم توبولین-کلشی‌سین را ایجاد می‌کند (Niel & Scherrmann, 2006). در دوزهای پایین‌تر، کلشی‌سین با تشکیل و طویل شدن میکروتوبول‌ها تداخل دارد و در دوزهای بالاتر، کلشی‌سین باعث بالابردن پلیمریزاسیون ریز لوله‌ها می‌شود (Bhattacharyya et al., 2008). علاوه بر این، پلیمریزاسیون توبولین متصل به کلشی‌سین به شیوه‌ای نزدیک با مجموعه ریز لوله‌ها اتفاق می‌افتد و در نتیجه پلیمری با مورفولوژی متفاوت ایجاد می‌شود و باعث تحریف در پلیمریزاسیون معمولی توبولین و تولید میکروتوبول می‌شود (Andreu & Timasheff, 1982). از آنجایی که ریز لوله‌ها در انواع فرآیندهای سلولی مانند تقسیم سلولی، حفظ شکل سلول، سیگنال دهی

سلول، انتقال سیگنال، مهاجرت سلولی و انتقال سلولی نقش دارند، کلشی‌سین می‌تواند این عملکردها و همچنین کموتاکسی نوتروپیل را مهار کند. کلشی‌سین نه تنها به توبولین بلکه به پروتئین‌های غشای لکوسیت‌ها نیز متصل می‌شود که اغلب محل‌هایی را برای اتصال ریز لوله‌ها و در نتیجه سازماندهی مجدد اسکلت سلولی فراهم می‌کند (Borron et al., 1996). با این حال، بیشتر اثرات ضد التهابی کلشی‌سین به احتمال زیاد به دلیل اختلال در عملکرد ریز لوله‌ها است. بنابراین، سلول‌های با نرخ تکثیر بالا به طور نامتناسب تحت تأثیر کلشی‌سین قرار می‌گیرند (Niel & Scherrmann, 2006).

کلشی‌سین با توجه به گونه‌های مورد مطالعه با طیف وسیعی از غلظت‌ها با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است (به عنوان مثال از غلظت بسیار کم، با 0.00001% در *Lychnis* (L. Chen et al., 2006) تا غلظت‌های بسیار بالا، با 1.5% در *Chaenomeles japonica* (Stanys et al., 2006) پژوهش‌ها نشان می‌دهد در حالی که درمان‌های مبتنی بر غلظت بالاتر کلشی‌سین و یا مدت طولانی در معرض قرار گرفتن برای موفقیت در پلی‌پلوئیداسیون ضروری هستند، همچنین تأیید شد که این روش‌های درمانی بسیار تهاجمی هستند، در بسیاری از موارد برای ریزنمونه‌ها کشنده است (L. Chen et al., 2006; Lam et al., 2014; Stanys et al., 2006). در نتیجه، پروتکل ایده آل باید تعادلی بین بقا و پلی‌پلوئیداسیون موفق را در نظر بگیرد (Castro et al., 2018).

۲-۱۰- روش‌های تعیین سطح پلوئیدی

یک مرحله مهم در پلی‌پلوئیدی شدن، تعیین سطوح پلوئیدی به روشی سریع و ساده است. روش‌های اندازه‌گیری به دو دسته مستقیم و غیرمستقیم طبقه‌بندی می‌شوند. روش مستقیم، روش کلاسیک شمارش کروموزوم در سلول‌های میتوزی نوک ریشه است. این روش دقیق، اما زمان‌بر است و نیاز به تجربه زیادی دارد (Aleza et al., 2012; Dhooghe et al., 2011; Doležel & Binarová, 1989). بنابراین، روش‌های غیرمستقیم برای تعیین پلوئیدی توسعه داده شده است. ویژگی‌های سیتولوژیک مانند اندازه سلول‌های

روزنه، تراکم روزنه، قطر دانه گرده و تعداد کلروپلاست‌ها در سلول‌های نگهبان می‌توانند به عنوان روش‌های غیرمستقیم برای تعیین پلی‌پلوئیدها استفاده شوند (Dhooghe et al., 2011; Jaskani et al., 2005). محتوای DNA همچنین می‌تواند نشانگر خوبی برای سطح پلوئیدی باشد، زیرا با دو برابر شدن کروموزوم که در پلی‌پلوئیدی اتفاق می‌افتد افزایش می‌یابد. بنابراین، چگالی نوری DNA استخراج شده، اندازه‌گیری شده توسط اسپکتروفتومتری، نیز افزایش خواهد یافت. این روش همچنین فرآیند تعیین پلوئیدی گیاهان باززایی شده در شرایط آزمایشگاهی را سرعت می‌بخشد و تخمین تقریبی از تغییرات پلوئیدی پس از القای پلوئیدی را ارائه می‌دهد (Raza et al., 2003). روش دیگر برای اندازه‌گیری محتوای DNA فلوسایتومتری (FCM) است (Moghbel et al., 2015).

۲-۱۰-۱- شمارش مستقیم

۲-۱۰-۱-۱- شمارش کروموزوم

استفاده از کروموزوم‌ها به منظور طبقه‌بندی گیاهان و کمک به حل مسائل و مشکلات تاکسونومی کلاسیک می‌تواند مفید واقع شود. در تعیین روابط خویشاوندی بین گونه‌های یک جنس، تنها تعداد کروموزوم‌ها کفایت نمی‌کند، بلکه باید اطلاعاتی مانند اندازه، مورفولوژی، تنوع در رنگ‌پذیری، محل سانترومر و رفتار کروموزوم‌ها را نیز به دست آورد. بنابراین، یک تاکسونومیست با کمک اطلاعات مورفولوژیکی و آگاهی از وضعیت کروموزوم‌های گیاهان داخل یک گونه، به مطالعه‌ی روابط بین گیاهان مورد علاقه خود می‌پردازد و به‌نژادگر گیاهی با اطلاعاتی که از مطالعات سیتوژنتیکی به دست می‌آورد به راحتی تصمیم می‌گیرد که در یک برنامه‌ی تلاقی بین گونه‌ای، از کدام گونه‌ها استفاده نماید تا نتاج بارور تولید کند و یا اینکه کدام کروموزوم گیاه واجد ژن دلخواه است (G. L. Stebbins, 1971).

یکی از روش‌های بررسی تنوع در ارقام و گونه‌های مختلف گیاهی، انجام مطالعات سیتوژنتیکی و کاریوتایپی است. برای اینکه دقیقاً مرزهای بین گونه‌ای در یک جنس مشخص شود، شمارش تعداد کروموزوم‌ها،

مشاهده تشابهات کروموزومی و تهیه کاریوتایپ، ضرورت پیدا می‌کند (Alishah & Omid, 2008). یکی از مباحث مهم در مطالعات سیتوژنتیکی، بحث تکامل کاریوتایپی است، به طور کلی عامل‌های اندازه طول کل کروموزوم‌ها، تعداد کروموزوم‌ها و شکل کروموزوم‌ها به عنوان سه عامل مهم در بررسی تکامل هستند. عقیده بر این است که کاریوتایپ‌های متقارن درجه تکاملی ابتدایی‌تری نسبت به کاریوتایپ‌های نامتقارن دارند (G. L. Stebbins, 1971). تعداد کروموزوم‌ها و اندازه ژنوم گونه‌های گیاهی اطلاعات معتبری را ارائه می‌دهد که در اصول، تکامل و حفاظت از گیاهان مفید است (Bennett & Leitch, 2005; Guerra, 2008).

شمارش کروموزوم‌ها اطلاعات ضروری را در مورد ناپیوستگی‌های ژنتیکی در درون و بین گونه‌ها فراهم می‌کند و به درک ما از روابط فیلوژنتیکی در تمام سطوح طبقه‌بندی کمک می‌کند (Lamo & Rao, 2014). شمارش کروموزوم تنها راه مستقیم برای تعیین تعداد کروموزوم‌های یک گونه است. این مطالعه اغلب پیش پا افتاده تلقی می‌شود که به ندرت به تفصیل توضیح داده شده و مورد بحث قرار می‌گیرد. بنابراین، بدیهی است که پروتکل شمارش کروموزوم باید قبل از از بین رفتن آن تجدید نظر و بازبینی شود (Wei-Seng et al., 2021).

شمارش کروموزوم‌ها روشی مستقیم، بدون ابهام و معمول برای تعیین تعداد کروموزوم در سلول‌های گیاهی است. این روش در مطالعات سیستماتیک گیاهی، طبقه‌بندی و اصلاح نژاد بسیار حیاتی است. در مطالعه سیستماتیک گیاهی کلاسیک، داده‌های شمارش کروموزوم برای دسته‌بندی گیاهان و شناسایی ارتباط بین گونه‌ها در یک خانواده استفاده می‌شود (Lee, 1979; Puangsomlee & Puff, 2001). در اصلاح نباتات، از شمارش کروموزوم‌ها برای تشخیص وقوع پلی پلوئیدی (Martin et al., 2019)، هاپلوئیدهای مضاعف (Kim et al., 2019) و گاهی اوقات اینترپلوئید (de Alencar et al., 2020) استفاده می‌شود. اگرچه پروتکل شمارش کروموزوم ده‌ها سال پیش ایجاد شد، اما هنوز عمدتاً به صورت دستی از طریق آماده

سازی نمونه و مشاهده میکروسکوپی انجام می شود. این پروتکل اغلب به عنوان کار فشرده، وقت گیر و در نتیجه چالش برانگیز برای به دست آوردن میکروگراف‌های مطلوب مورد انتقاد قرار می گیرد (Ochatt et al., 2011).

روش شمارش کروموزوم اغلب به عنوان یک روش سه مرحله‌ای ساده و تعمیم می‌یابد، یعنی پیش‌درمان، تثبیت و رنگ‌آمیزی می‌باشد (Ochatt et al., 2011; Singh, 2016, 2017). این روش مراحل اساسی کلی را در آماده سازی نمونه برای شمارش کروموزوم ارائه می‌دهد. با این حال، تعداد زیادی از گیاهان متنوع در قلمرو گیاهان از نظر اندازه سلول، ترکیب سیتوپلاسم، تعداد و اندازه کروموزوم، ضخامت دیواره سلولی و غیره متفاوت است. این تغییرات انجام اصلاحات را در مراحل کار، مانند غلظت معرف‌ها، مدت زمان درمان و روش‌های له کردن برای به دست آوردن نتیجه دقیق دشوار می‌سازد (de Alencar et al., 2020; Jiang et al., 2020). بیشتر معرف‌ها و رنگ‌ها در مطالعات شمارش کروموزوم‌ها چندین دهه پیش ساخته شده‌اند. بنابراین، اطلاعاتی در مورد منشاء، ویژگی‌ها و واکنش‌های این مواد شیمیایی در انتشارات اخیر به راحتی در دسترس نیست. تاکنون، تنها شارما و شارما (۱۹۸۰) مجموعه عظیمی از مواد شیمیایی شمارش کروموزوم را با اطلاعات دقیق منتشر کرده‌اند. بر اساس جزئیات واکنش شیمیایی، تیمار شیمیایی را می‌توان بر این اساس اصلاح کرد تا نتیجه مطلوب حاصل شود (Wei-Seng et al., 2021). مطالعات کاربوتیپی معمولاً در سلول‌های متافازی مریستم انتهایی ریشه صورت می‌گیرد. در این مطالعات، علاوه بر تعیین تعداد و خصوصیات مورفولوژیکی کروموزوم‌ها، تقارن کاربوتیپی گونه‌ها نیز مورد سنجش قرار می‌گیرد (هوشمند، ۱۳۷۸).

در حال حاضر، اتوماتیک کردن (خودکار سازی) کامل در شمارش کروموزوم‌ها برای سریع‌تر کردن شمارش کروموزوم‌ها هنوز در دسترس نیست. مطالعه شمارش کروموزوم اخیراً به دلیل اختراع آنالیز فلوسایتومتری (FCM) کمتر مورد توجه قرار گرفته است. FCM به نحوی اهمیت شمارش کروموزوم‌ها را در علوم گیاهی

تحت الشعاع قرار داده است زیرا FCM به صورت دیجیتالی با حداقل آماده سازی نمونه انجام می شود. با این حال، FCM به دلیل هزینه آن هنوز در بسیاری از آزمایشگاه ها در دسترس نیست (Wei-Seng et al., 2021).

۲-۱۰-۱-۲-فلوسایتومتری

فلوسایتومتری یک تکنیک گسترده و قدرتمند است که در شمارش سلولی، تشخیص بیومارکر و مرتب سازی سلولی به کار می رود. پس از اینکه اصل کولتر در سال ۱۹۵۳ کشف شد و فولویلر این اصل را برای مرتب سازی سلول ها در سال ۱۹۶۵ به کار برد، تشخیص های نوری به زودی توسط فلوسایتومتری و سیستم های مرتب کننده سلول فعال شده با فلورسانس (FACS) از اواخر دهه ۱۹۶۰ مورد استفاده قرار گرفتند (Fulwyler, 1965; Hulett et al., 1969).

فلوسایتومتری جمع آوری داده های ساده، سریع و دقیق را از مخلوط مایع ناهمگن که حاوی سلول ها یا ذرات سلولی است، فراهم می کند. کمی سازی محتوای DNA هسته ای توسط فلوسایتومتری اطلاعاتی در مورد وضعیت پلوئیدی، شاخص DNA و درصد کسر فاز S ارائه می دهد (Bergers et al., 1996; Fernö et al., 1992). سلول های تازه، نمونه های منجمد، سلول های تثبیت شده با اتانول یا فرمالین، و بافت های تثبیت شده با فرمالین، همگی برای این متغیرها قابل بررسی هستند (Frierson Jr, 1991; Martinez-Arribas et al., 2002). فلوسایتومتری مرسوم به دلیل توان عملیاتی بالا و تجزیه و تحلیل چندپارامتری، با پشتیبانی از تشخیص ویژگی های تک سلولی با سرعت های بین صدها تا ۱۰۰۰۰۰ سلول در ثانیه، زمانی که مطالعه جمعیت ها و زیرجمعیت های سلولی با حجم بالا نیاز دارد، ابزار سیتولوژیک غیرقابل جایگزینی است (Cho et al., 2010; Laerum & Farsund, 1981).

فلوسایتومتری ابزاری قدرتمند برای اندازه گیری محتوای DNA است و به محققان اجازه می دهد تا سطح پلوئیدی را با مقایسه با استانداردهای شناخته شده تخمین بزنند. این روش زمان بر کمتر، ارزان تر است و

کارایی آن در علف‌هایی که در آن‌ها برای محاسبه محتوای DNA و تخمین سطوح پلوئیدی در بلوگراس تگزاس (*Poa arachnifera* Torr)، بوفالوگراس [*Bouteloua dactyloides* (Nutt.) Engelm.]، پرنیال رگراس و (*Lolium perenne* L.) و فسیکو، استفاده می‌شود ثابت شده است (Arumuganathan & Earle, 1991; Goldman, 2015; Huff & Palazzo, 1998; Johnson et al., 1998, 2001; Qiu et al., 2019). و همچنین بررسی استفاده از فلوسایتومتری برای اهداف بالینی ارائه شده است. در دهه گذشته کاربرد اصلی بالینی این تکنیک اندازه‌گیری محتوای DNA سلولی برای تخمین توزیع چرخه سلولی و مطالعات پلوئیدی بوده است. در حال حاضر حجم زیادی از داده‌ها در مورد وجود آنیوپلوئیدی در بیماری‌های بدخیم مختلف در دسترس است (Laerum & Farsund, 1981).

۲-۱۰-۲- برآورد غیر مستقیم صفات

۲-۱۰-۲-۱- مشاهدات مورفولوژیکی

پلی‌پلوئیدی با داشتن بیش از دو مجموعه کروموزوم، نقش مهمی در تکامل و اکولوژی گیاهان دارد (Edger et al., 2016; D. E. Soltis et al., 2015; McAllister et al., 2015) و آگاهی رو به رشدی وجود دارد که پلی‌پلوئیدی شایع‌تر از آنچه قبلاً تصور میشد وجود دارد (Otto & Whitton, 2000; Rice et al., 2015; Wood et al., 2009). اتوپلی‌پلوئیدها یا پلی‌پلوئیدهایی که از والدین یک گونه تشکیل می‌شوند، علیرغم تحقیقات اخیر مبنی بر ثبت تنوع سیتوتیپی گسترده در بسیاری از گونه‌ها، اغلب با تقسیم‌بندی جغرافیایی پیچیده و پلوئیدی‌های متعدد، مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند (Etterson et al., 2016; Laport et al., 2012; McAllister et al., 2015). یکی از اثرات پلی‌پلوئیدی در گیاهان، تغییرات مورفولوژیکی است به ویژه در اندازه سلول (Beaulieu et al., 2008; Otto & Whitton, 2000)، و همچنین در سایر صفات کمی می‌باشد (Laport & Ramsey, 2015; Ståhlberg, 2009). بسیاری از اثرات پلی‌پلوئیدی ژنومی هستند (Gallagher et al., 2010; Parisod et al., 2016; et al., 2016) اما درک ارتباط بین پلی‌پلوئیدی و مورفولوژی مهم است زیرا تفاوت‌های

مورفولوژیکی بین پلوئیدی‌ها می‌تواند پیامدهای تکاملی و اکولوژیکی داشته باشد (Khazaei et al., 2010; Zozomová-Lihová et al., 2015). داده‌های مورفولوژیکی همچنین می‌توانند به حل مسائل طبقه‌بندی در سیستم‌های اتوپلی‌پلوئید کمک کنند (Laport & Ramsey, 2015; Mráz et al., 2011). به این دلایل، مطالعاتی برای پیشبرد درک ما از اثرات پلی‌پلوئیدی بر تغییرات مورفولوژیکی صفات رویشی و زایشی در سراسر پراکنش گونه‌ها و در گونه‌هایی با پلوئیدی‌های چندگانه مورد نیاز است (Balao et al., 2011; Laport & Ramsey, 2015).

به طور معمول، پلی‌پلوئیدی اندازه سلول‌ها، اندام‌ها یا حتی روند کلی را افزایش می‌دهد. همبستگی مثبت بین اندازه ژنوم و اندازه سلول به خوبی ثابت شده است. در گیاهان پلی‌پلوئید، این ارتباط مثبت معمولاً با اندازه‌گیری سلول‌های نگهبان (یا روزنه‌ها) و دانه‌های گرده اثبات می‌شود (Beaulieu et al., 2008; Otto & Whitton, 2000). از آنجایی که سلول‌ها در پلی‌پلوئیدها بزرگ‌تر هستند، نتیجه می‌شود که معیارهای مرتبط با تراکم سلولی یا فرکانس در واحد سطح با پلی‌پلوئیدی، مانند روزنه در واحد سطح، همبستگی منفی دارند (G. Chen et al., 2009; Levin, 2002). صفات پیچیده‌تر مانند ابعاد برگ و گل و همچنین رفتار کلی می‌توانند در پلی‌پلوئیدها افزایش پیدا کنند (Balao et al., 2011; Etterson et al., 2016; Laport & Ramsey, 2015). بسیاری از انواع مختلف صفات مورفولوژیکی کمی می‌توانند با پلی‌پلوئیدی متفاوت باشند، و اگرچه استثنائاتی وجود دارد ارتباط به طور کلی مثبت است (Tate & Simpson, 2004; Tunbridge et al., 2011). با افزایش پلوئیدی، افزایش متناظری در اندازه سلول‌ها و ساختارها وجود دارد. تنوع مورفولوژیکی بین جمعیت‌ها معمولاً در گیاهان مشاهده می‌شود (Antonovics & Bradshaw, 1970; Schwaegerle et al., 1986) و باید هنگام مشخص کردن تنوع مورفولوژیکی پلی‌پلوئیدها در نظر گرفته شود. نمونه‌برداری از یک یا چند جمعیت از پلوئیدی‌های مختلف ممکن است تفاوت‌های مرتبط با محیط یا تمایز ژنتیکی را با تفاوت‌های مرتبط با پلی‌پلوئیدی، به‌ویژه در شرایطی که پلوئیدی یکنواخت است، یا

تقریباً در داخل جمعیت‌ها، که اغلب در بسیاری از گونه‌های مختلف متفاوت است متغیر است (Laport et al., 2012; Y. Liu et al., 2015). نیروهای تکاملی پس از شکل‌گیری ممکن است اثرات مورفولوژیکی پلی‌پلوئیدی را در برخی موارد پنهان کنند (Henery et al., 2010; Jordan et al., 2015) با این حال، درک تنوع مورفولوژیکی در جمعیت‌های پلی‌پلوئید طبیعی می‌تواند بینش‌های مهمی در مورد تأثیرات بالقوه یا واقعی انتخاب بر آن صفات ارائه دهد (Chansler et al., 2016).

درک بهتر رابطه بین پلی‌پلوئیدی و مورفولوژی به بحث در مورد اینکه چگونه اتوپلی‌پلوئیدها باید طبقه‌بندی شوند کمک می‌کند. سیستم‌شناسان تمایلی به شناسایی اتوپلی‌پلوئیدها از نظر طبقه‌بندی به عنوان گونه‌ها ندارند، اگر از نظر مورفولوژیکی متمایز نباشند (Laport & Ramsey, 2015; Španiel et al., 2008). صرف نظر از اینکه معیارهای دیگر برای شناسایی گونه‌ها ممکن است وجود داشته باشد یا خیر. از سوی دیگر، زمانی که تمایز مورفولوژیکی در میان گیاهان با پلوئیدی متفاوت آشکار است، می‌توان از آن برای حمایت از تشخیص طبقه‌بندی اتوپلی‌پلوئیدها استفاده کرد (Judd et al., 2007; Sosa & Dematteis, 2014).

۲-۱۰-۲- تعداد کلروپلاست‌ها در سلول‌های نگهبان روزنه

ویژگی‌های سیتولوژیک مانند اندازه سلول‌های روزنه، تراکم روزنه، قطر دانه‌گرده و تعداد کلروپلاست‌ها در سلول‌های نگهبان می‌توانند به عنوان روش‌های غیرمستقیم برای تعیین پلی‌پلوئیدها استفاده شوند (Dhooghe et al., 2011; Jaskani et al., 2005). تعداد کلروپلاست در سلول‌های نگهبان را برای شناسایی سریع تتراپلوئیدها در تعدادی از گیاهان مورد استفاده قرار دادند و تفاوت معنی‌داری را در میانگین کلروپلاست‌ها بین گیاهچه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید شاهد بودند. برای گیاهان تتراپلوئید، تعداد کلروپلاست دو برابر تعداد آن در دیپلوئیدها بود (Winarto et al., 2010).

۲-۱۰-۳-ویژگی‌های ساختار روزنه

از طول و فراوانی روزنه در سطح برگ به عنوان روشی سریع برای شناسایی سطح پلوئیدی در *Aegilops neglecta* استفاده گردیده و مشاهده شده است، که تفاوت معنی‌داری در فراوانی روزنه بین دو فرم تتراپلوئید و هگزاپلوئید این گیاه وجود دارد. نشان داده شده که میانگین فراوانی روزنه برای تتراپلوئید بین ۵۴/۸۰-۵۰/۲۴ به ازای هر متر مربع سطح و برای هگزاپلوئید بین ۴۰/۵۰-۳۹/۲۴ به ازای هر متر مربع سطح متغیر است. همچنین تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه ارتباط معنی‌دار مثبتی با سطوح پلوئیدی دارد و می‌تواند به عنوان معیاری در جداسازی بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید استفاده شود (Aryavand et al., 2003).

۲-۱۰-۴-کلروفیل

تعیین میزان کلروفیل نیز ابزاری برای تشخیص سطوح پلوئیدی در گونه‌های مختلف با میزان موفقیت‌هایی همراه بوده است. میزان کلروفیل در گیاهان تتراپلوئید نوعی آکاسیا ۴۰ درصد بیشتر از میزان کلروفیل‌های همتای دیپلوئید آنها گزارش گردید (Mathura et al., 2006).

۲-۱۱-پیشینه‌ی تحقیق

در آزمایشی که ستوده و همکاران (۱۳۹۲) به منظور بررسی القا پلی‌پلوئیدی و اثرات آن بر گیاه سورگوم، به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور غلظت کلشی‌سین (۰، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵ و ٪ ۰/۱) و مدت زمان تیمار (۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت) با سه تکرار و به صورت تیمار بر روی گیاهچه انجام دادند. گیاهان دیپلوئید (شاهد) و پلی‌پلوئید از نظر صفاتی مانند، تعداد روزنه‌های سطح و پشت برگ، میزان کلروفیل برگ، میانگین ضخامت برگ، طول و عرض برگ و میانگین فواصل میانگره با یکدیگر مورد مقایسه قرار دادند. نتایج بدست آمده از این تحقیق افزایش معنی‌دار میزان کلروفیل برگ، ضخامت برگ، طول برگ و فواصل میانگره و همچنین کاهش تعداد روزنه و عرض برگ در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئیدی در ازای افزایش سطح پلوئیدی نشان داد.

در مطالعه‌ای که بر روی افزایش سطح پلوئیدی اسفناج (*Spinacia oleracea L*) با استفاده از بازدارنده‌های میتوزی انجام گرفت، بذور جوانه نزده اسفناج در محلول‌های آبی کلشی‌سین (۱.۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر)، تری فلورالین (۲/۵، ۵، ۷/۵ میلی گرم بر لیتر) و سه مدت زمان ۱۶، ۲۴ و ۳۲ ساعت و اوریزالین (۰/۰۱، ۰.۰۵ و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر) برای ۶ و ۱۲ و ۲۴ ساعت غوطه ور شدند. نتایج نشان داد علی‌رغم عدم تفاوت معنی‌داری بین مواد شیمیایی ضد میتوزی، هر سه ماده شیمیایی ضد میتوزی در افزایش سطح پلوئیدی موثر بودند. بنابراین می‌توان آنها را بر اساس در دسترس بودن، هزینه کم و ایمنی انتخاب کرد. با توجه به ایمنی این مواد شیمیایی ضد میتوزی، LD50 کلشی‌سین بسیار بالاتر از سایرین بود، اما تری فلورالین و اوریزالین در محدوده مشابه بودند. با این حال، هزینه اوریزالین بسیار کمتر از تری فلورالین است، در نتیجه اوریزالین با توانایی افزایش سطح پلوئیدی در غلظت‌های پایین مفیدتر است (Roughani et al., 2017).

در پژوهشی که هانگ چانگ و همکاران (۲۰۱۷) به منظور ایجاد یک سیستم کارآمد و قابل اعتماد برای القای پلی پلوئیدی در یک ارکیده دارویی (*Anoectochilus formosanus*) انجام دادند. از ریز نمونه‌های ساقه گره برای آزمایش اثر کلشی‌سین بر القای پلی پلوئیدی استفاده شد. غلظت‌های مختلفی از کلشی‌سین (به عنوان مثال ۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر) برای القای پلی پلوئیدی به BM مایع اضافه شد. پس از سه روز القاء، کشت‌ها به سه محیط مختلف شامل ۰/۵ میلی گرم در لیتر BA بدون هورمون و BM جامد حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر TDZ که فاقد کلشی‌سین بود، برای القای رشد شاخساره منتقل شدند. پس از شش هفته، تمام کشت‌ها به BM جامد حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر اسید H₁-ایندول-۳-بوتانوئیک (ایندول-۳-بوتیریک اسید، IBA) برای به دست آوردن گیاهچه‌ها منتقل شدند. تتراپلوئید به دست آمده افزایش قابل توجهی در صفات مختلف زراعی از جمله وزن خشک، وزن تر، طول ساقه، طول ریشه، عرض برگ، اندازه روزه و تعداد کلروپلاست در هر روزه نشان داد. نسبت طول به عرض در روزه‌ها

و برگهای تتراپلوئید کاهش و در نتیجه آن تغییر شکل اندام مشاهده شد. ترکیبات فعال زیستی اصلی، فلاونوئید کل و گاسترودین، به ترتیب با روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم و طیف سنجی جرمی پشت سر هم کروماتوگرافی مایع فوق عملکرد (UPLC MS/MS) تعیین شدند. تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئید محتویات بیشتری از کل فلاونوئید و گاسترودین را در برگ، ساقه و کل گیاه تولید کرد. تتراپلوئیدهای حاصل در این مطالعه به عنوان مواد اولیه مناسب در صنعت داروسازی برای افزایش بهره‌وری و کاهش هزینه پیشنهاد شدند (Chung et al., 2017).

در مطالعه‌ای که زاهومنیکا و همکاران در سال ۲۰۱۸ به منظور القای پلی‌پلوئیدی بر روی *Anemone sylvestris* L (شقایق جنگلی) انجام دادند. از بازدارنده‌ی میتوزی اوریزالین مستقیماً به محیط القایی در غلظت‌های ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار برای ۸، ۱۰ یا ۱۲ هفته کشت استفاده کردند. سه تتراپلوئید گیاهان ($2n = 4x = 32$)، ۰.۸٪ (بازده پلی‌پلوئیدی)، از گیاهان دیپلوئیدی ($2n=2x=16$) در سه تیمار (۱) میکرومولار برای ۱۰ هفته، ۵ میکرومولار برای ۸ هفته و ۸ میکرومولار برای ۱۰ هفته) به دست آمد. بین خصوصیات مورفولوژیکی (به عنوان مثال قطر گل، ارتفاع کل گیاه، سطح برگ) و محتوای کلروفیل دیپلوئید و تتراپلوئیدهای *A. sylvestris* همراه با محتوای پلی فنل و فعالیت آن‌تی اکسیدانی تفاوت مشاهده کردند. در نتیجه، یک ژنوتیپ جدید (گیاهان تتراپلوئید) *A. sylvestris* با ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیولوژیکی متفاوت با دو برابر شدن کروموزوم القایی آزمایشگاهی با استفاده از اوریزالین ایجاد شد. ژنوتیپ‌های جدید با ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیولوژیکی متفاوت از طریق پلی‌پلوئیدسازی سوماتیک به دست آمدند. گیاهان تتراپلوئید قوی‌تر، تنومندتر (شاداب تر) و گلدهی زودرس بودند که برای استفاده از آن به عنوان یک گیاه زینتی ضروری است (Zahumenická et al., 2018).

در تحقیقی بووانسواری و تیروگننا سمپندان (۲۰۲۰) به منظور ایجاد تتراپلوئیدی در لیمو شیرین (*Citrus limon* (L.) از چهار غلظت مختلف کلشی‌سین (۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ درصد؛ وزنی بر حجم) و سه

مدت زمان قرار گرفتن (۱۲ و ۲۴ ۴۸) ساعته استفاده کردند. نتایج موفقیت‌آمیز با حداکثر فراوانی تتراپلوئیدی در گیاهچه‌های تولید شده از بذرهای تیمار شده با کلشی‌سین ۰/۰۲۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت مشاهده شد. نتایج خصوصیات مورفولوژیکی و روزنه‌ای نشان داد که تتراپلوئیدها بلندتر با افزایش طول برگ و ریشه بودند. از طرف دیگر، برگ‌های تتراپلوئیدها در مقایسه با دیپلوئیدها، روزنه‌های کمتر و بزرگ‌تری با تعداد کلروپلاست بیشتر در سلول‌های نگهبان داشتند. تجزیه و تحلیل GC-GC/MS نشان داد که مونوترپن حلقوی، لیمونن به طور قابل توجهی در تتراپلوئیدها افزایش یافته بود و با کمی سازی HPLC تأیید شد. تجزیه و تحلیل RT-PCR بیان بدون تغییر مونوترپن سنتاز، سسکوئی ترپن سنتاز و فلاون سنتاز و تنظیم مثبت ژن‌هایی مانند لیمونن سنتاز، کالکون سنتاز و فنیل آلانین آمونیاک لیاژ در تتراپلوئیدها را نشان داد. فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس تتراپلوئیدها در هر پنج سیستم آزمایشی مورد مطالعه بیشتر از دیپلوئید بود (Bhuvaneswari et al., 2020).

در تحقیقی باسو و لوده (۲۰۱۸) نهال‌های سریع‌الرشد آندروگرافیکس پانیکولاتا *Andrographis paniculata* به روش سواب پنبه‌ای تیمار کردند (حداقل ۲۵ نهال در هر تیمار). آزمایش‌ها برای سه سال متوالی تکرار شد. القای موفقیت‌آمیز پلی‌پلوئیدی با شمارش کروموزومی از سلول‌های سوماتیک نوک شاخساره کلچی‌پلوئیدی خام تأیید شد بنابراین کاربرد موفقیت‌آمیز کلچی‌پلوئیدی در *Andrographis paniculata* منجر به ویژگی‌های گیگاس و افزایش محتوای متابولیت برگ در کلچی‌پلوئید شد که نشان دهنده نقش دستکاری پلوئیدی در بهبود گیاه تجزیه و تحلیل‌های آماری نشان دهنده تأثیر قابل توجه دستکاری پلوئیدی تجربی بر اندام‌های تعیین شده گیاه، کارایی متابولیک و ساختار ژنتیکی گیاه است. افزایش رشد و بنیه گیاه و همچنین افزایش کارایی متابولیک نشان دهنده موفقیت اصلاح پلی‌پلوئید است (Basu & Lodh, 2018).

تحقیقات پلیانکونگ و همکاران (۲۰۱۷) در مورد اثر کلسی سین و اوریزالین در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف تیمار بر روی فلفل قرمز نتایج مثبتی را نشان داد. در این آزمایش بذرهای ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر در کلسی سین یا با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم در لیتر در اوریزالین در شرایط تاریکی در دمای اتاق به مدت ۶ ساعت قبل از جوانه زنی غوطه ور شدند. نتایج نشان داد که ۳۰۰ میلی گرم در لیتر کلسی سین می‌تواند بالاترین میزان پلی پلوئیدی را در *Capsicum frutescens* L با ۷۰ درصد القا کند، در حالی که ۲۰ و ۳۰ میلی گرم در لیتر اوریزالین می‌تواند پلی پلوئیدی را با همان سرعت (میزان) ۴۰ درصد القا کند. اندازه سلول محافظ روزنه ای و اندازه میوه گیاهان پلی پلوئید بزرگتر از شاهد بود مشخص شد که میوه های دانه های تیمار شده با کلسی سین ۳۰۰ میلی گرم در لیتر بیشترین مقدار کپسایسین را با وزن خشک ۴/۵۵ میلی گرم در گرم در مقایسه با گروه شاهد با وزن خشک ۳/۳۲ میلی گرم در گرم تولید کردند. در حالی که ، میوه های حاصل از بذرهای تیمار شده با ۳۰ میلی گرم در لیتر اوریزالین در مقایسه با شاهدانی که در وزن خشک ۳/۲۵ میلی گرم در گرم تولید می کردند ، کپسایسین با وزن ۴/۴۴ میلی گرم در گرم تولید می کردند. نتایج ارائه شده در اینجا نشان می دهد که القای پلی پلوئیدی در *Capsicum frutescens* L توسط کلسی سین به طور موثرتری از اوریزالین بود. اندازه میوه پلی پلوئید از میوه دیپلوئید بزرگتر بود و میوه های پلی پلوئید می توانند کپسایسین بیشتری نسبت به دیپلوئید تولید کنند (Pliankong et al., 2017).

در پژوهشی که اصلانی و همکاران (۱۳۹۳) به منظور بررسی و مقایسه تأثیر کلسی سین بر روی بذر و سرشاخه آویشن دناپی در شرایط درون شیشه‌ای انجام دادند. در هردو روش تیمار درصد جوانه زنی و زنده مانی نسبت به گروه شاهد کمتر بود اما تیمار سرشاخه درصد زنده‌مانی بالاتری نسبت به بذر نشان داد. اما نتایج مربوط به کلروپلاست هردو تیمار معنی‌دار بود. نتیجه‌گیری کلی نشان داد که علیرغم کاهش درصد جوانه زنی بذر آویشن دناپی تحت تیمار کلسی سین و بالاتر بودن زنده‌مانی سرشاخه‌ها، تیمار بذر با غلظت

0.08% و با مدت زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با تیمار سرشاخه، راه مناسب‌تری برای دستیابی به گیاهی با سطوح پلوئیدی بالاتر است.

در مطالعه‌ای هوی و همکاران (۲۰۱۹) که به جهت القای پلی پلوئیدی مصنوعی در *Paphiopedilum villosum* (پافیوپدیوم ویلسوم) گونه‌ای ارکیده انجام دادند. از شاخساره‌های جوان در شرایط آزمایشگاهی برای ایجاد و القای پلی پلوئیدی در محلول کلشی سین در غلظت‌ها و مدت زمان‌های مختلف استفاده کردند. نتایج نشان داد میزان القای پلی پلوئید ۱۹/۸۸ درصد در تیمار ۵۰ میلی مولار کلشی سین در ۶ روز بدست آمد. از بین گیاهان پلی پلوئیدی به دست آمده، تتراپلوئیدها (۸۸/۲۴ درصد) و میکسوپلوئیدها با آنالیز فلوسایتومتری و شمارش کروموزومی اسکواشهای بافت نوک ریشه شناسایی شدند. در نتیجه، از طریق استفاده از ریزنمونه‌های گره‌ای به دست آمده از روش ازدیاد طول ساقه در همراهی با تیمار کلشی سین، یک پروتکل مؤثر در تولید گیاهچه‌های پلی پلوئید *P. villosum* برای اهداف اصلاحی ایجاد کردند (Huy et al., 2019).

در بررسی مارو و همکاران (۲۰۲۱) که به منظور افزایش سطح پلوئیدی در گونه‌های پنبه‌ی دیپلوئید (*Gossypium herbaceum*) با استفاده از کلشی سین انجام دادند، تغییرات رشد قابل توجهی در طول القای پلی پلوئیدی در گیاهان پنبه بسته به غلظت کلشی سین، مدت زمان تیمارها و ژنوتیپ‌های گرفته شده مشاهده شد. افزایش غلظت کلشی سین یا مدت زمان تیمار اثر کندی بر زنده ماندن بذر در *G. herbaceum* داشت. مشخص شد که هیپوکوتیل‌ها با طول بین ۴ تا ۸ میلی متر بیشتر به درمان کلشی سین پاسخ دادند. مریستم ریشه *G. herbaceum* تیمار شده با کلشی سین ۰/۲ و ۰/۴ درصد بیشترین تعداد سلول‌های تتراپلوئید را در طول ۱۶ ساعت درمان نشان داد در نتیجه، سرعت رشد نهال‌های پنبه به دلیل افزایش غلظت کلشی سین، در آزمایش حاضر کاهش یافت. در پنبه، طی روش سواپینگ (سواب چوب پنبه) جوانه گل، ۰/۲ درصد از غلظت کلشی سین منجر به پلی پلوئیدی سلولی نشد. ممکن است به این دلیل

باشد که؛ کلشی سین قادر به رسیدن به لایه‌های داخلی جوانه های گل نبود. در حالی که غلظت های بالاتر کلشی سین (۰/۶ درصد) جوانه ها را تحت تأثیر قرار داد روش خیساندن بذر با ۰/۲ درصد کلشی سین بهترین پاسخ را نشان داد در حالی که در روش سواب پنبه ای ۰/۴ درصد کلشی سین در حد یکسان بود.. مقدار متوسطی از کلشی سین در القای پلی پلوئیدی در ژنوتیپ‌های پنبه مؤثر بود. ژنوتیپ های پنبه، -V 797 و G cot 25 پاسخ بهتری را برای زنده ماندن گرده در طول پلی پلوئیدی نشان دادند. مرحله بهینه برای بدست آوردن سلول های پلی پلوئید طول ریشه ۵-۸ میلی متر است. درصد بقای گیاهان در غلظت کم کلشی سین بیشتر بود. روش خیساندن بذر در مقایسه با روش پتری پلیت و روش پنبه کشی مؤثرتر بود (Maru et al., 2021).

بیرامی و همکاران (۱۳۹۳) پژوهشی به منظور ارزیابی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی شنبلیله (*Trigonella foenum graecum*) توده بومی سیستان تحت تیمار کلشی سین انجام دادند. در این آزمایش ۱۹ صفت مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی اندازه گیری شد و نتایج نشان داد که تغییر سطح پلوئیدی به صورت معنی داری بر کلیه صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی شنبلیله (به جز وزن تر و خشک گیاه) اثر داشت. یوناس و همکاران (۲۰۱۸) آزمایشی با هدف بررسی تأثیر کلشی سین بر خصوصیات مورفولوژیکی و القای پلی پلوئیداسیون در گیاه درمنه انجام دادند. القای پلی پلوئید بر روی دانه های *Artemisia annua* L. با خیساندن بذرهای *Artemisia* در کلشی سین (۰٪، ۰.۰۵٪، ۰.۱٪ و ۰.۲٪؛ بر اساس غلظت) به مدت ۲ ساعت انجام شد. طرح آزمایشی کاملاً تصادفی، یک فاکتور، ۴ تیمار کلشی سین و در هر تیمار ۷ تکرار بود. نتایج نشان داد که پلی پلوئید در گیاهان تیمار شده با ۰/۰۵ درصد غلظت کلشی سین مشاهده شد و خصوصیات مورفولوژیکی گیاه با ارتفاع ۸۹/۴ سانتی متر، تعداد شاخه های ۳۰، مقدار کلروفیل ۱۵/۹ CCI، قطر ساقه ۰/۷۸ سانتی متر و تعداد کروموزوم های $2n=27$ نشان داده شد. تراکم روزنه در گیاهان پلی پلوئید

نشان داده شده با تیمار ۰/۰۵ درصد غلظت کلشی‌سین دارای تراکم ۱۳۰ عدد در میلی‌مترمربع با قطر روزنه ۲۲/۸ میکرومتر است (Yunus et al., 2018).

تحقیقات تائو و همکاران (۲۰۰۳) در مورد اثر کلشی‌سین و اوریزالین در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف تیمار بر آلوکازیا زینتی نشان داد که موثرترین تیمار برای القای پلی‌پلوئیدی غلظت ۰/۰۱ درصد اوریزالین به مدت ۲۴ ساعت می‌باشد. این تیمارها ۲۲ گیاهچه تتراپلوئید و ۲۲ گیاهچه شیمری را تولید کردند. اشکال مختلف برگ در گیاهان پلی‌پلوئید یافت شد، چنانچه برگهای گیاهان دیپلوئید کشیده، قلبی شکل ولی برگهای تتراپلوئیدها متمایل به کروی بودند (Thao, Ozaki, et al., 2003).

حسینی و جوانبخت (۱۳۹۵) با استفاده از غلظت‌های مختلف کلشی‌سین در سطح زمانی متفاوت القای پلی‌پلوئیدی را در جوانه‌های انتهایی گیاهچه‌های باززایی شده نوروزک مطالعه کردند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تاثیر تیمارهای مختلف کلشی‌سین بر درصد زنده‌مانی گیاهچه‌های حاصل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. بالاترین میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در تیمار ۰/۰۵ برابر با ۸۴/۴۴ بود و بالاترین مرگ گیاهچه هم در غلظت ۰/۵ درصد کلشی‌سین ثبت کردند. در نتیجه القا تتراپلوئیدی سبب تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، سیتولوژیکی و ترکیبات شیمیایی شد و همچنین باعث کاهش طول برگ و تراکم روزنه گردید.

ملک‌زاده شفارودی و همکاران (۱۳۹۰) بررسی به منظور القای پلی‌پلوئیدی در گیاه ریحان در دو آزمایش مستقل، تیمار بذری و مریستم انتهایی انجام دادند، در تیمار بذری تمام گیاهان به غیر از شاهد از بین رفتند. نتایج حاصل از بررسی‌های فلوسایتومتری، مورفولوژیکی و روزنه ای نشان داد که غلظت تیمار تاثیر معناداری بر این فاکتور داشته بطوریکه بیشترین میزان القای پلی‌پلوئیدی (۳/۶۳) درصد مربوط به غلظت کلشی‌سین می‌باشد. و زمان تیمار و اثرات متقابل تاثیر معناداری بر این فاکتور نداشتند. نتایج کلی نشان داد که غلظت ۰/۰۵ و مدت زمان ۶ ساعت بهترین تیمار جهت القای تتراپلوئیدی در گیاه ریحان می‌باشد.

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- زمان و محل آزمایش

به منظور انجام مطالعات پلی‌پلوئیدی در گیاه انیسون (*Pimpinella anisum* L) در شرایط آزمایشگاهی، بذرهای این گیاه از توده‌های بومی تهیه شد. کشت گیاه انیسون و اعمال تیمارهای مورد آزمایش در شرایط قابل کنترل در سال ۱۴۰۰-۱۳۹۹ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود صورت گرفت.

۳-۲- نحوه‌ی اجرای آزمایش

به منظور اجرای این تحقیق دو آزمایش مستقل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در آزمایش اول اعمال تیمارها بر روی بذرهای صورت گرفت و در آزمایش دوم جوانه‌انتهایی گیاهچه‌های انیسون مورد تیمار قرار گرفت. تیمار اصلی این تحقیق غلظت‌های کلشی‌سین بود.

۳-۲-۱- کاشت مواد گیاهی

در آزمایش اول بذرهای انیسون جهت ضدعفونی شدن به محلول هیپوکلریت سدیم ۳٪ به مدت زمان ۱۵ دقیقه انتقال داده شدند، سپس شستشوی بذرهای سه بار با آب مقطر برای زدودن بقایای محلول مورد استفاده انجام گرفت. بذرهای انیسون بعد از ضدعفونی شدن بین دولایه کاغذ صافی به تعداد تقریبی ۳۰ عدد بذر در ۶ عدد پتری قرار داده شدند و با استفاده از آب مقطر استریل آبیاری شدند. پس از یک هفته آب درون پتری دیش‌ها خالی شده و نمونه‌ها با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین (۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۵) در مدت زمان (۶، ۲۴ و ۴۸) ساعت تیمار شدند. پس از اعمال تیمارها بذرهای (بذرهای زنده) بصورت مجزا در درون گلدان کشت شد. به هرکدام از پتری‌ها ۱۰ سی سی از محلول کلشی‌سین اضافه شد. در نهایت پس از هفت روز تعداد گیاهچه‌های رشد یافته شمارش شدند و بعنوان معیار زنده‌مانی مورد آنالیز قرار گرفتند.

در آزمایش دوم بذرهای استریل شده انیسون در گلدان‌ها کشت شدند. بدین صورت که ابتدا خاک مناسب و یکنواخت پرلیت و پیت ماس اتوکلاو شده به نسبت (۲:۱) تهیه و باهم مخلوط شدند، سپس به طور مساوی نیمی از همه‌ی گلدان‌ها از خاک پر شده و به این ترتیب حجم یکسانی از خاک درون گلدان‌ها ریخته شد. در هرگلدان

۷ بذر کشت داده شد (در نهایت جهت تیمار ۴ گیاهچه در هر گلدان باقی ماند) که پس از پنج هفته جوانه انتهایی گیاهچه‌ها با غلظت‌های مختلف (۰/۰۰۰۱ ، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۵) کلشی‌سین تیمار شدند، این کار را تا سه روز متوالی انجام دادیم شکل (۳-۱). همچنین طبق مرور منابع صورت گرفته، بهترین زمان اعمال تیمار ساعت ۱۰ تا ۱۱ صبح تعیین شد.



شکل ۳_۱ کشت‌های گلدانی گیاه انیسون

۳-۲-۲-تهیه محلول کلشی سین

کلشی سین مورد استفاده در این پژوهش از شرکت سیگما تهیه شد. درآزمایش اول تیمار پتری دیش ها با محلول های کلشی سین با غلظت ۰/۰۰۵ و ۰/۰۰۱ درصد صورت گرفت. برای تهیه ی محلول ۰/۰۰۵ درصد ۱۰۰ میلی گرم کلشی سین را وزن کرده باتوجه به اینکه حلال کلشی سین الکل می باشد به آن یک سی سی الکل اضافه کرده تا کامل حل شود سپس به آن ۲۰ سی سی آب اضافه کردیم. لازم به ذکر می باشد که برای جذب و نفوذ پذیری بهتر محلول کلشی سین توسط نمونه ها، به محلول پایه تهیه شده چند قطره از محلول تووین ۲۰ افزوده گردید. برای تهیه ی محلول کلشی سین ۰/۰۰۱ درصد ۲۰ میلی گرم کلشی سین وزن شد با یک سی سی الکل ۹۶ درصد به طور کامل حل گردید سپس ۱۹ سی سی آب به آن اضافه شد.

تهیه محلول برای آزمایش دوم نیز به همین منوال صورت گرفت بدین صورت که به هر گیاهچه مقدار ۶/۵ میکرو از محلول به مدت سه روز متوالی بر روی جوانه انتهایی گیاهچه ها اضافه شد.

۳-۳-اندازه گیری صفات مورفولوژیکی

تعیین سطح پلوئیدی در گیاهان تیمار شده، ابتدا براساس تغییرات مورفولوژیکی در مراحل مختلف رشد و نمو و پس از مشاهده ی گیاهان مشکوک به پلی پلوئیدی در مقایسه با گیاهان دیپلوئید صورت گرفت.

۳-۳-۱-اندام های هوایی گیاه

برای اندازه گیری صفات طول گیاهچه، طول برگ، فاصله میان برگچه ای اول ، فاصله میان برگچه ای دوم ، طول و عرض برگچه ی انتهایی و قطر دم برگ از هر تیمار دو تکرار (دو گلدان) و از هر تکرار سه گیاه بصورت تصادفی انتخاب شد و برای اندازه گیری دقیق صفات از کولیس دیجیتال برحسب واحد میلی متر به جز طول گیاهچه که از خط کش مدرج برحسب سانتی متر استفاده شد، به کار برده شد (شکل ۳-۲).



شکل ۳-۲ کولیس دیجیتالی

۳-۳-۲- اندازه‌گیری روزنه گیاه

به منظور تعیین تعداد روزنه‌های سطح برگ، لایه‌ی فوقانی برگ با قشر نازکی از لاک بی‌رنگ معمولی پوشانیده شد. پس از خشک شدن، با استفاده از نوار چسب لایه‌ی فوق روی یک لام تمیز قرار داده شد، و با میکروسکوپ نوری مدل OLYMPUS CH2 و با استفاده از عدسی (10x) و (40x) تعداد و اندازه روزنه‌ها شمارش گردید.

۳-۳-۳- سنجش میزان کلروفیل

محتوای کلروفیل به عنوان یکی از شاخص‌های مقاومت گیاه در برابر تنش‌های محیطی پذیرفته شده است. برای اندازه‌گیری رنگیزه‌های کلروفیل از روش لیچتن تالر و والبراون (۱۹۸۳) استفاده شد.

برای بدست آوردن مقدار کلروفیل برگ به طور تصادفی از برگ‌ها نمونه‌برداری انجام گرفت. اندازه‌گیری کلروفیل و کارتنوئید به روش بدون لهیدگی انجام گرفت. برای این کار ۵۰ میلی‌گرم بافت برگ را با ۵ میلی‌لیتر از دی متیل سولفوکسید مخلوط کرده و در آن با دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت قرار دادیم. بعد از آن با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر، مقدار جذب در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۵ نانومتر ثبت شد و با استفاده از روابط زیر میزان کلروفیل a و b و کارتنوئید به دست آمد.

$$Chla = (12.19 A_{665}) - (3.45 A_{645})$$

$$Chlb = (21.99 A_{645} - 5.32 A_{665})$$

$$Chlt = Chla + Chlb$$

Cartenoeid= (1000 A470-2.14Chla-70.16Chlb)/200

۳-۴-استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB صورت گرفت (حسینی و همکاران، ۱۳۹۵). جهت کاهش خطا، مقدار ۱۰۰ میلی گرم از برگهای جوان از تیمار ۰.۰۵ و شاهد انتخاب و مورد استخراج قرار گرفت.

۳-۵-استخراج RNA کل

استخراج RNA با استفاده از کیت Samzol و باتوجه به دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. که جهت این کار بافر استخراج تهیه سپس استخراج انجام گرفت.

۳-۵-۱-تهیهی بافر استخراج

به منظور تهیهی بافر استخراج، از بافر استخراج آمادهی Samzol که از شرکت ambio خریداری شده بود استفاده گردید. همچنین قبل از شروع کار الکل ۷۵٪، کلروفرم، و ایزوپروپانول سرد تهیه و در دمای ۲۰- قرار داده شد.

۳-۵-۲-مراحل انجام کار

مراحل استخراج RNA به شرح زیر انجام گرفت:

- مقداری از بافت برگ (۱۰۰ میلی گرم) در هاون چینی ریخته سپس توسط نیتروژن مایع پودر گردید و به میکروتیوبهای ۲ میلی لیتری انتقال داده شد.
- به هر میکروتیوب ۷۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج Samzol ریخته و چند بار به آرامی تکان داده سپس ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد.
- سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم سرد شده که از قبل در یخچال ۲۰- قرار داده شده بود اضافه گردید سپس نمونه ها به سانتریفیوژ در به مدت زمان ۱۵ دقیقه ، و در ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتیگراد انتقال داده شدند.

- بعد از اتمام مرحله‌ی سانتریفیوژ نمونه‌ها به آرامی روی یخ قرار داده شد سپس فاز بالایی (مایع شفاف) را برداشته (حدود ۴۰۰ میکرولیتر) و به میکروتیوب ۱/۵ انتقال داده شد.
- اضافه کردن ۵۰۰ تا ۸۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد (ما ۸۰۰ میکرولیتر اضافه کردیم)، چندبار بار به آرامی سروته کرده و به مدت ۱۰ تا ۲۵ دقیقه در یخچال ۲۰- قرار می‌دهیم.
- سپس ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد در سانتریفیوژ با ۱۳۰۰۰ rpm قرار داده شد.
- بعد از اتمام مرحله‌ی سانتریفیوژ، محلول بالایی دور ریخته شد و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر الکل ۷۵٪ اضافه و چندین بار به آرامی نمونه سروته گردید سپس، در سانتریفیوژ برای مدت زمان ۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد در ۸۰۰۰ rpm قرار می‌دهیم (این مرحله دو بار تکرار شد).
- بعد از تمام شدن مرحله‌ی فوق، محلول داخل میکروتیوب دور ریخته شد سپس میکروتیوب‌ها به صورت برعکس روی دستمال کاغذی قرار داده شدن تا الکل آن کاملاً خارج شود.
- مقدار ۵۰-۲۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر (D.W) اضافه کرده و به مدت ۱۰ ثانیه نمونه‌ها سروته کرده و بعد در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری قرار داده شدند.

۳-۵-۲-۱- حذف نمک‌ها

به منظور حذف نمک‌های باقی‌مانده در RNA استخراج شده، از پروتکل زیر استفاده شد:

- ۱۰ میلی لیتر آمونیوم استات ۲/۵ مولار به محلول استخراج شده اضافه گردید.
- ۱۵۰ میلی لیتر اتانول ۱۰۰٪ سرد به آن اضافه و به مدت ۳ ساعت در فریزر ۸۰- انکوبه گردید.
- بعد از آن به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد.
- سوپرناتانت دور ریخته شد و ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ سرد اضافه گردید و ورتکس شد.
- پس از آن، به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد.

۳-۵-۳- بررسی کمیت و کیفیت DNA و RNA استخراج شده

۳-۵-۳-۱- نانودراپ

به منظور اندازه‌گیری غلظت‌های پروتئین، نوکلئیک‌اسید، RNA، DNA در حجم نمونه‌های بسیار کوچک (میکرولیتتر) از نانودراپ استفاده می‌کنند. نانودراپ یک دستگاه اسپکتروفتومتر آزمایشگاهی رایج است. این یک دستگاه اسپکتروفتومتری است که شما می‌توانید چندین نمونه را در کمتر از یک دقیقه اندازه بگیرید که با دقت و قابلیت تکرار بالا نمونه‌های ۰.۵-۲ میلی لیتری را اندازه‌گیری می‌کند. نانودراپ بر اساس قانون Beer عمل می‌کند. وقتی نور تک‌رنگ (نور با طول موج خاص) از یک محلول عبور می‌کند، معمولاً بین غلظت املح و شدت نور منتقل شده رابطه کمی وجود دارد، یعنی هرچه نمونه غلظت بیشتری داشته باشد، نور کمتری نیز از طریق آن منتقل می‌شود. سیستم نگهداری نمونه در اسپکتروفتومتری NanoDrop از کشش سطحی استفاده می‌کند تا نمونه را در جای خود بین دو فیبر نوری نگه دارد. این امکان اندازه‌گیری نمونه‌های بسیار غلیظ بدون نیاز به رقت را فراهم می‌کند. نسبت OD260 به OD280 درجه خلوص را مشخص می‌کند که این نسبت (A260/280) تقریباً بایستی در محدوده ۲-۱/۸ باشد، که در صورت وجود آلودگی‌های پروتئینی این نسبت کاهش می‌یابد.

نسبت OD260 به OD230 میزان آلودگی به مواد فنلی و پلی‌ساکارید را نشان می‌دهد. در این مطالعه با استفاده از دستگاه نانودراپ Implen NanoPhotometer غلظت و کیفیت RNA و DNA استخراج شده تعیین گردید.

۳-۶- استخراج پروتئین

برای سنجش مقدار پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976). روش برادفورد یک روش رنگ سنجی سریع، ساده، دقیق و حساس است که برای اندازه‌گیری غلظت کل پروتئین در نمونه‌های بیولوژیکی به کار می‌رود. اساس این روش اتصال مولکول‌های پروتئین به رنگ Coomassie در شرایط اسیدی است که منجر به تغییر رنگ از قهوه‌ای به آبی می‌شود و در نتیجه تغییر جذب نوری اتفاق می‌افتد. درواقع باید گفت اتصال رنگ Coomassie blue به پروتئین و تولید رنگ آبی که در طول موج ۵۹۵ نانومتر قابل اندازه‌گیری است.

▪ جهت استخراج پروتئین، ابتدا محلول برادفورد و سپس محلول تریس HCL تهیه شد.

۳-۶-۱-تهیه‌ی محلول برادفورد

برای تهیه‌ی معرف این روش ۱۰۰ میلی گرم کوماکسی بریلیانت بلو را وزن کرده سپس در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد حل شد و ۱۰۰ میلی لیتر اسید ارتوفسفریک ۸۵٪ را بصورت قطره قطره به آن اضافه کردیم و پس از حل شدن کامل رنگ محلول به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. و سپس توسط آب مقطر حجم نهایی به ۱ لیتر رساندیم. در نهایت عمل فیلتر کردن محلول با استفاده از کاغذ صافی واتمن به منظور حذف ذرات آبی رنگ معرف، انجام شد. نگهداری آن در یک ظرف تیره رنگ و در یخچال انجام شد.

۳-۶-۲-تهیه‌ی تریس HCL

برای تهیه بافر استخراج، مقدار ۲/۴۴ گرم تریس وزن کرده، سپس ۱۰۰ سی سی آب مقطر به اضافه می کنیم و pH آن با استفاده از محلول هیدروکلریدریک (HCL)، بر روی ۷/۸ تنظیم شد. به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار دادیم، و مجدد روز بعد اندازه گرفته که PH باید همان میزان باشد. در نهایت ۲۰ سی سی گلیسرول به آن اضافه می کنیم.

۳-۶-۳-تهیه محلول اصلی

برای تهیه محلول اصلی ۵۰ میلی گرم آلبومین سرم گاوی به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس برای تهیه‌ی محلول کاری، ۱۰ میلی لیتر از محلول استوک حاصل، به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد (هر میلی لیتر از محلول حاصل شامل ۲۰۰ میکروگرم پروتئین است)، سپس غلظت های ۰ تا ۴۰۰ میکروگرم پروتئین آماده شدند (هر کدام از این ترکیبات شامل مخلوطی از محلول کار آب مقطر و محلول برادفورد معادل ۳ میلی لیتر بود). نمونه های حاصل به منظور اطمینان از مخلوط شدن ورتکش شده و پس از ۲۰ دقیقه با دستگاه خوانش شدند.

۳-۶-۴-مراحل انجام کار

مراحل انجام استخراج پروتئین به شرح زیر انجام دادیم:

- ۱۰۰ میلی گرم بافت گیاهی در هاون چینی ریخته سپس توسط نیتروژن مایع به طور کامل پودر گردید و به فالكون انتقال داده شد.
- سپس به هر فالكون ۲/۵ سی سی بافر تریس HCL اضافه شد.
- نمونه ها به سانتریفیوژ در دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.
- بعد از اتمام مرحله ی فوق مایع رویی فالكون را برداشته و به میکروتیوب ۱/۵ منتقل کردیم.
- به هر میکروتیوب که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر عصاره برگ است ۲/۹ سی سی محلول برادفورد اضافه شد، سپس نمونه ها ورتکس شد. پس از ۲۰ دقیقه خوانش نمونه ها انجام گردید.
- خوانش نمونه ها بوسیله ی دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۹۵ نانومتر انجام شد.

۳-۷- کاربوتایپ (شمارش کروموزومی به روش اسکواش)

کاربوتایپ فرآیند به تصویر کشیدن مجموعه کروموزوم های موجود در سلول های یک موجود زنده به منظور بررسی محتوای کروموزومی، وضعیت کروموزوم ها، تعداد آنها و بررسی اختلال و ناهنجاری های کروموزومی است. در این مرحله، ابتدا محلول های مورد نیاز تهیه شد و سپس مراحل تهیه کاربوتایپ بهینه شد.

۳-۷-۱- تهیه محلول ها

به منظور انجام کاربوتایپ تهیه و آماده سازی محلول های زیر به جهت انجام مراحل کار که شامل جمع آوری، تثبیت، و رنگ آمیزی بود صورت گرفت.

۳-۷-۱-۱- تهیه محلول کارنوی-۱

این محلول به صورت یک جزء استیک اسید خالص (۱۰۰٪) و سه جزء اتانول (۹۵-۱۰۰٪) به نسبت ۳:۱ تهیه شد. این محلول بهتر است که به صورت تازه تهیه و استفاده شود.

۳-۷-۱-۲-اسید کلریدریک ۱ نرمال

باتوجه به اینکه غلظت اسید کلریدریک تجارتي ۳۷٪ است که نرماليتهاي آن ۱۰.۱۳ می باشد. ما برای تهیهی ۱۰۰ سی سی اسید کلریدریک نرمال، ۹/۸۷ سی سی اسید کلریدریک تجارتي (۳۷٪) با اضافه کردن آب مقطر به حجم ۱۰۰ سی سی رساندیم.

۳-۷-۱-۳-تهیه اسیداستیک ۴۵٪

ابتدا ۵۵ میلی لیتر آب مقطر داخل یک ظرف ریخته سپس ۴۵ میلی لیتر اسیداستیک خالص به آن اضافه کردیم و بدین صورت اسیداستیک ۴۵٪ تهیه شد.

۳-۷-۱-۴-استوکارمن ۱ درصد

برای تهیهی ۵۰ سی سی استوکارمن ۱ درصد، ۰/۵ گرم پودرکارمن را وزن کرده سپس ۵۰ سی سی استیک اسید ۴۵٪ به آن اضافه کرده (حلال کارمن استیک اسید می باشد) سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن محلول را به جهت حذف ذرات صاف کرده و دریک ظرف تیره ریخته و در یخچال نگهداری شد.

نکته: همهی محلول های فوق در یخچال نگهداری شدند.

۳-۷-۲-مراحل انجام کار

جهت انجام کاریوتیپ گیاهی این آزمایش در ۲ مرحله آزمایش مجزا بذرهای جوانه زده در ظروف پتری و بذرهای رشد یافته در خاک گلدان انجام گرفت.

اصول بررسی کلی کروموزوم ها در هردو آزمایش به ترتیب به صورت زیر است :

۱. جمع آوری بافت (ریشه)

۲. پیش تیمار

۳. تثبیت

۴. هیدرولیز

۵. رنگ آمیزی

۶. اسکواش

۳-۷-۱-آزمایش اول

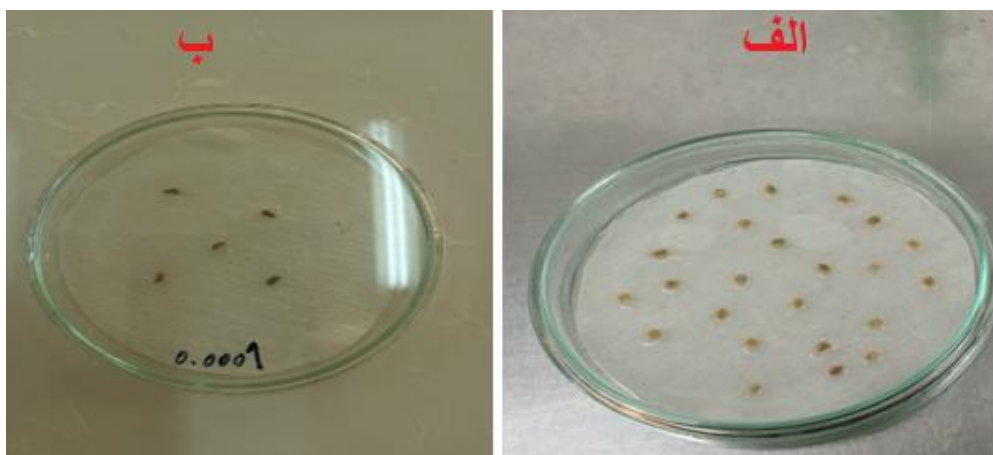
تهیه کاربوتایپ از بذور تیمار نشده

این آزمایش بر روی دو سری بذر انجام گرفت :

۱. بذرهای آماده (نمونه ۱)

۲. بذرهایی که حاصل کشت‌های گلدانی که با غلظت ۰/۰۰۰۱ تیمار شده بودن (نمونه ۲)

در آزمایش اول که از بذرهای جوانه زده در ظروف پتری استفاده شد. نحوه‌ی ریشه‌دار کردن بذور بدین صورت انجام شد که بذرو کاملاً رسیده و سالم انیسون جمع‌آوری سپس آنها را به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۳٪ ضدعفونی و در نهایت با استفاده از آب مقطر استریل سه بار شست‌شو انجام دادیم. بذرها درون پتری‌دیش‌های اتوکلاو شده که کاغذ صافی در آن قرار داده و توسط آب مقطر استریل کاغذ مرطوب شده با فاصله قرار داده شدند. پتری‌دیش‌ها در دمای اتاق و در مکان تاریک برای جوانه زنی سریع قرار داده شدند. معمولاً بین ۵ تا ۶ روز بذرهای جوانه زدند (همه‌ی مراحل در هردو سری بذر یکسان بود) (شکل ۳-۳).



شکل ۳-۳ کشت و ریشه دار کردن نمونه ۱ (الف) و نمونه ۲ (ب)

مراحل انجام آزمایش اول

○ جمع آوری ریشه

در این مرحله ریشه های در حال رشد از بذرو جوانه زده در پتری دیش ها به طول نیم تا یک سانتی متر به وسیله ی اسکالپل برش داده شدن (نوک ریشه ها باید سالم بوده و قهوه ای نشده باشد) سپس با آب مقطر چندبار شست شو داده شدند و با کاغذ صافی آب آنها گرفته شد.

○ پیش تیمار

این مرحله برای مشاهده کروموزوم های سوماتیکی مرحله ای مهم و اساسی محسوب می شود. ما از کلشی سین ۰.۰۰۰۱ درصد به عنوان پیش تیمار استفاده کردیم. این مرحله از تشکیل میکروتوبولها جلوگیری می کند و کروموزومها در متافاز به دام می افتند. ریشه ها به مدت یک ساعت در محلول کلشی سین قرار گرفتن سپس در دمای محیط قرار می دهیم و بعد از یک ساعت ریشه ها از محلول خارج و بوسیله ی آب مقطر شست شو داده شدند.

○ تثبیت

گام بعدی فیکسیشن است. برای این کار ما از محلول کارنوی-۱ استفاده کردیم. در این مرحله ما یکبار ریشه ها را به مدت ۲۴ ساعت و یکبار به مدت ۲ ساعت در کارنوی قرار دادیم. بهترین نتیجه در مدت زمان دوساعت به دست آمد. تثبیت کننده سلول را در مرحله ی مناسبی از تقسیم سلولی متوقف و ثابت نگه می دارد بدون اینکه تغییری در ساختار و شکل کروموزوم ایجاد شود. بعد از پایان کار ریشه ها سه بار با آب مقطر شست شو داده شدند.

○ هیدرولیز

برای تهیه ی نمونه مناسب باید بافت ریشه به منظور اسکوایش و له کردن آماده شود. از این رو، ریشه ها در اسید کلریدریک نرمال (HCL N1) در دمای ۶۰ درجه بن ماری به مدت ۸ دقیقه قرار داده شدند، مثل مراحل قبلی بعد خروج نمونه از محلول شست شو با آب مقطر صورت گرفت و آب اضافه توسط کاغذ صافی گرفته شد. مدت قرار گیری نمونه ها در محلول اسید کلریدریک در مدت زمان های مختلفی آزمایش شد و بهترین بازه زمانی و حصول نتیجه بین ۱۰-۸ دقیقه بدست آمد.

○ رنگ آمیزی

نمونه ها پس از طی مراحل فوق، به مدت ۴۵ دقیقه تا یک ساعت در استو کارمن ۰/۱ درصد قرار داده شدند. استوکارمن به منظور رنگ آمیزی کروموزوم ها و هسته سلول ها استفاده می شود. برای رنگ پذیری بهتر بافت ها ظرف شیشه ای (حاوی استوکارمن) در سطح شعله (بصورت غیرمستقیم) حرارت داده شدند (دراین مرحله نیز مدت قرار گرفتن نمونه در یک زمان ۲۴ ساعته در دمای اتاق و ۴۵ دقیقه تا یک ساعته تحت حرارت غیر مستقیم شعله بررسی شدند که بهترین نتیجه در زمان ۴۵ دقیقه تا یک ساعت بدست آمد).

○ اسکوایش

در این مرحله نمونه های ریشه از داخل رنگ خارج کردیم، یک نمونه روی لام قرار داده، نوک ریشه توسط اسکالپل برش دادیم، سپس چند قطره استیک اسید ۴۵٪ درصد به آن اضافه کردیم تا رنگ اضافی خارج شود لامل را روی نمونه قرار داده به طوریکه حباب زیر لامل ایجاد نشود و نمونه توسط یک مداد ته گرد له و اسکوایش شد. سپس لام جهت مشاهده و عکس برداری کروموزوم به زیر میکروسکوپ نوری مدل OLYMPUS CH2 منتقل شدند.

۳-۷-۲-۲-آزمایش دوم

تهیه کاریوتایپ از ریشه‌های گیاهان تیمار شده

این آزمایش بر روی ریشه‌های رشد یافته در خاک گلدان انجام شد. ابتدا بذرها در لیوان‌های یکبار مصرف به تعداد یک عدد در هر لیوان که به وسیله خاک (پیت ماس) اتوکلاو شده تا نیمه پر شده بودند، کشت شدند. سپس حدود تقریباً ۵ هفته بعد از رشد گیاهچه‌ها با کلشی سین در سه غلظت (۰/۰۰۱، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۵) به صورت سه روز متوالی و جوانه انتهایی هر گیاهچه به مقدار ۳/۵ ماکرو کلشی سین تیمار شدند. بعد از مشاهده تغییرات مورفولوژیکی در گیاهچه‌های تیمار شده، تهیه نمونه‌های ریشه به منظور تهیه کاریوتایپ انجام شد. در این آزمایش نیز مراحل جمع‌آوری ریشه، پیش تیمار، تثبیت، هیدرولیز، رنگ‌آمیزی و اسکواش انجام گرفت.

مراحل انجام آزمایش دوم

○ جمع‌آوری ریشه

در این مرحله گیاهچه داخل لیوان به آرامی از لیوان خارج و در در مجاورت جریان آب معمولی قرار داده شد تا خاک آن نرم و به منظور مشاهده‌ی ریشه‌ها خاک از ریشه جدا شود (از کندن خاک از روی ریشه‌ها اجتناب شد تا به بافت ریشه آسیب وارد نشود). سپس بوسیله‌ی اسکالپل مریستم نوک ریشه‌ها برش داده شدند چندبار توسط آب مقطر شست شو صورت گرفت و آب اضافی بوسیله‌ی کاغذ صافی گرفته شد.

○ پیش تیمار

این مرحله همانند آزمایش اول انجام گردید.

○ تثبیت

در این مرحله ما به یکسری نمونه‌ها کارنوی_۱ اضافه و یکسری نمونه‌های دیگر بدون اضافه کردن کارنوی_۱ مستقیم وارد مرحله‌ی بعدی یعنی (هیدرولیز) شدند (اضافه کردن یا نکردن مرحله‌ی کارنوی_۱ تاثیر خاصی در روند آزمایش نداشت).

○ هیدرولیز

هیدرولیز نمونه‌ها توسط اسید کلریدریک نرمال صورت گرفت. به دلیل بافت ضخیم ریشه‌ها که اسکواش آنها به راحتی انجام نمی‌شد، مدت زمان‌های مختلف قرار گرفتن در اسید بررسی شد و در نهایت مدت زمان ۳۰-۳۵ دقیقه بهترین زمان انتخاب شد.

○ رنگ‌آمیزی و اسکواش

این دو مرحله نیز مانند آزمایش اول انجام شد.

۳-۸- آنالیز داده‌ها

آنالیز داده‌ها توسط نرم افزار Minitab 17 انجام شد و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. گراف‌ها بر اساس میانگین تکرار و انحراف معیار برای هر تیمار توسط نرم افزار Prism ترسیم شدند.

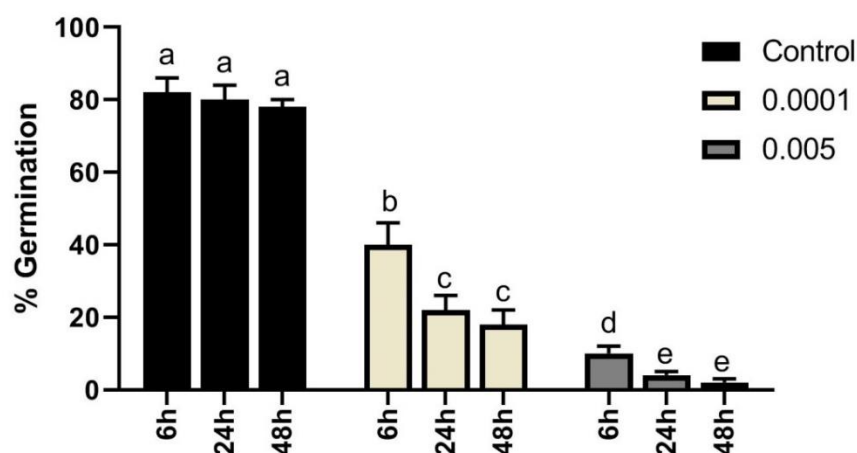
فصل چہارم: نتیجہ و بحث

۴- نتایج

پس از انجام تیمارها، گیاهچه‌ها تحت شرایط آزمایشگاهی رشد یافتند و بر اساس صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج هر بخش در جداول و نمودارهای زیر نمایش داده شده است.

۴-۱- تیمار بذری

نتایج کلی نشان داد که تیمار بذری با کلشی‌سین باعث عدم جوانه زنی و عدم رشد تعداد زیادی از بذرهای جوانه زده و گیاهچه‌های حاصل از آنها می‌شود (شکل ۴-۱). بیشترین درصد زنده‌مانی گیاهان در تیمار شاهد (عدم استفاده از کلشی‌سین) به دست آمد. در غلظت‌های مورد استفاده کلشی‌سین با افزایش مدت زمان تیمار درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها (جوانه‌زنی) کاسته و بیشترین درصد زنده‌مانی مربوط به مدت زمان ۶ ساعت در غلظت ۰/۰۰۱ و کمترین درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها مربوط به غلظت ۰/۰۰۵ به مدت ۴۸ ساعت بود. این نتایج حاکی از آنست که کلشی‌سین اثرات سمی بر روی جنین‌ها گذاشته و تیمار بذری برای القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه انیسون پیشنهاد نمی‌شود.



شکل ۴-۱ اثرات تیمار بذری کلشی‌سین بر درصد جوانه زنی بذرهای انیسون. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

۴-۲- اثرات پلی پلوئیدی بر روی خصوصیات مورفولوژیکی

اثرات القاء پلی پلوئیدی بر روی صفات مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار کلشی سین بر صفات مورفولوژیکی در جدول ۴-۱ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد اثر تیمار (استفاده از کلشی سین) در سطح یک درصد بر فاصله میان برگچه‌ای اول و عرض برگچه انتهایی و در سطح ۵ درصد بر روی صفات فاصله میان برگچه‌ای دوم و طول برگچه انتهایی معنی دار بوده است. هرچند که بر روی صفاتی همچون طول برگ و گیاهچه و قطر دمبرگ، تیمار کلشی سین اثرات معنادار ایجاد نکرد.

جدول ۴-۱ نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی در انیسون تحت تاثیر تیمار کلشی سین. اعداد بر اساس میانگین مربعات ارائه شده است.

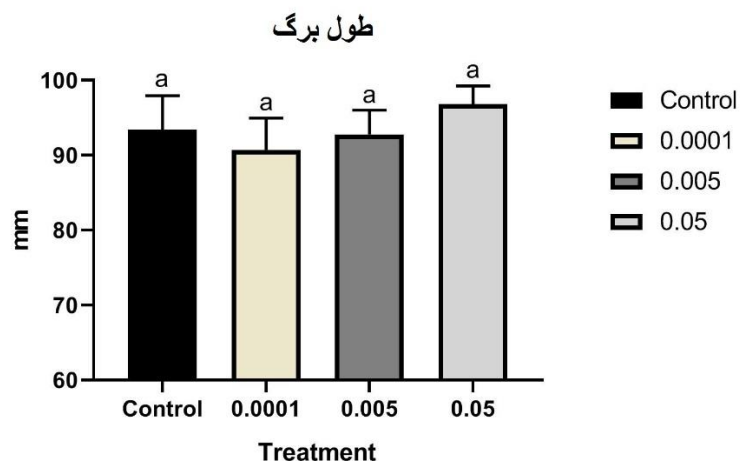
منابع تغییرات	درجه آزادی	طول برگ	فاصله میانبرگچه ای اول	فاصله میانبرگچه ای دوم	طول برگچه انتهایی	عرض برگچه انتهایی	طول گیاهچه	قطر دمبرگ	تعداد روزنه
تیمار	۳	۱۹/۳۷ ^{ns}	۷۰/۶۷ ^{**}	۴۷/۸۴ [*]	۳۵/۴۰ [*]	۸۹/۳۰ ^{**}	۸/۸۵ ^{ns}	۰/۰۹۲ ^{ns}	۲۸۰/۸۳ ^{**}
خطا	۸	۱۸/۷۲	۵/۴۰۰	۷/۲۵	۶/۴۸	۸/۸۱	۲/۳۰	۰/۰۴۵	۴/۵۵
CV%		۲۰/۳۳	۱۴/۶۷	۱۶/۸۱	۱۶/۷۴	۱۲/۵۹	۱۸/۴۷	۱۸/۹۲	۸/۱۷

ns، ** و * بترتیب معناداری در سطح پنج و یک درصد و عدم معناداری است.

۴-۲-۱- نتایج مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی

۴-۲-۱-۱- طول برگ

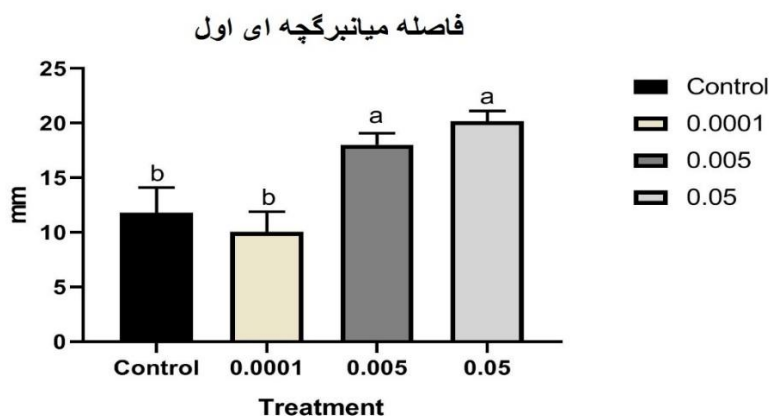
نتایج تجزیه واریانس تیمار غلظت‌های مختلف کلشی سین بر طول برگ از نظر آماری اثرات معناداری نشان نداد (جدول ۴-۱). نتایج حاصل از مقایسه میانگین بین غلظت‌های مختلف کلشی سین نیز نشان داد که طول برگ گیاه تحت تاثیر تیمار غلظت‌های مختلف قرار نمی‌گیرد. اگرچه تیمار با غلظت ۵ درصد کلشی سین تا حدودی طول برگ را افزایش داده بود (شکل ۴-۲).



شکل ۲-۴ مقایسه میانگین بین سطوح مختلف کلشی سین صفت طول برگ گیاهچه‌های انیسون.

۲-۱-۲-۴-۲-۴ فاصله میانبرگچه‌ای اول

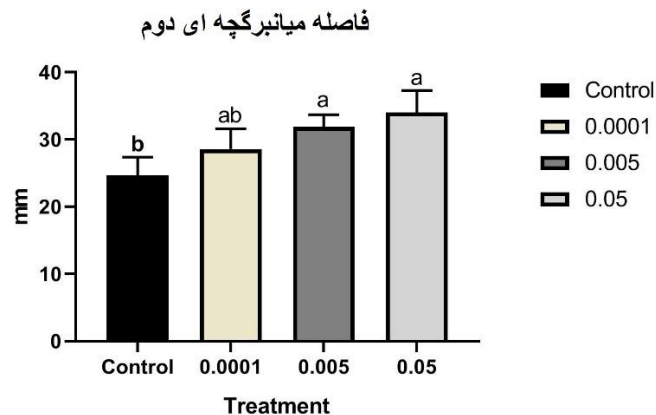
نتایج مقایسه میانگین فاصله میانبرگچه‌ای اول گیاه انیسون تحت غلظت‌های مختلف کلشی سین نشان داد که این فاصله در تیمار با غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۰۰۵ کلشی سین بصورت معناداری نسبت به غلظت ۰/۰۰۰۱ و کنترل، افزایش می‌یابد (شکل ۳-۴). این نتایج نشان می‌دهد که اثرات غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۰۰۵ کلشی سین مشابه هم هستند و احتمال توانسته‌اند در ژنوم گیاهچه‌ها تغییراتی ایجاد کنند.



شکل ۳-۴ مقایسه میانگین برای فاصله میانبرگچه‌ای اول تحت تاثیر سطوح مختلف کلشی سین. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

۴-۲-۱-۳-فاصله میانبرگچه‌ای دوم

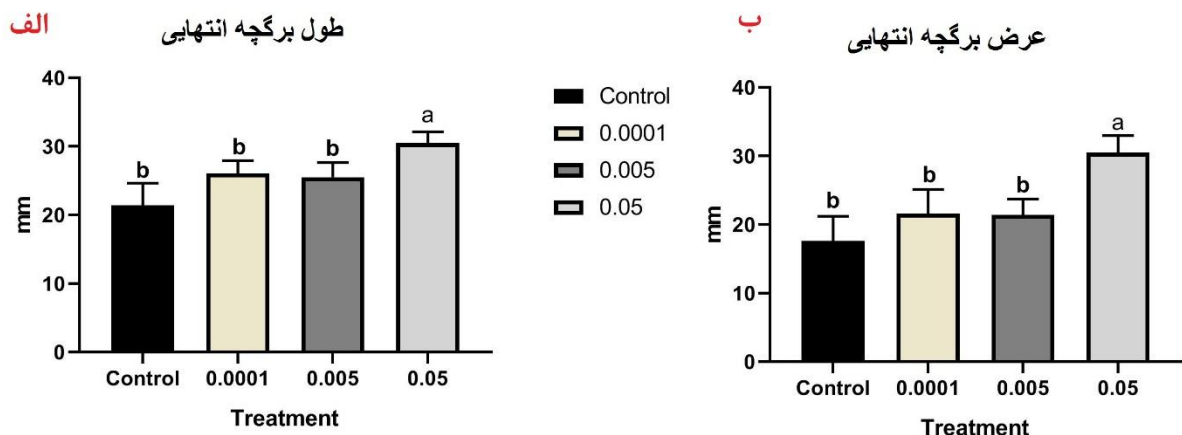
نتایج مقایسه میانگین برای فاصله میانبرگچه‌ای دوم گیاهچه‌های انیسون نشان داد که اختلاف معناداری بین غلظت‌های مورد استفاده کلشی سین با کنترل وجود دارد. فاصله میانبرگچه‌ای دوم در گیاهچه‌های انیسون تیمار شده با غلظت‌های (۰.۰۰۵ و ۰.۰۵) کلشی سین نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل ۴-۴).



شکل ۴-۴ مقایسه میانگین برای صفت فاصله میانبرگچه‌ای دوم گیاهچه‌های انیسون تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کلشی سین. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

۴-۲-۱-۴-طول و عرض برگچه انتهایی

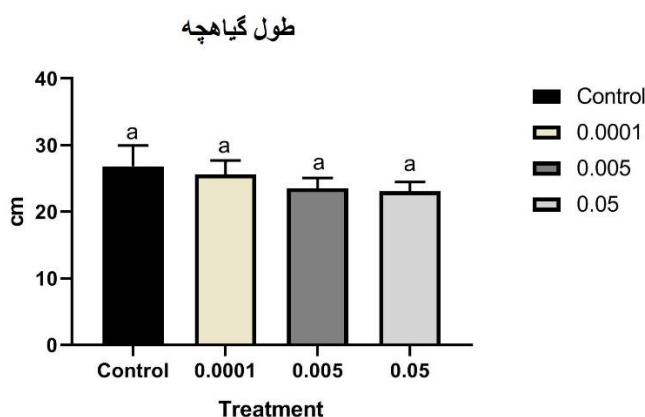
نتایج مقایسه میانگین برای صفت طول برگچه انتهایی نشان داد که اختلاف معناداری بین استفاده از غلظت ۰/۰۵ کلشی سین با سایر غلظت‌ها و کنترل وجود دارد (شکل ۴-۵ الف). همچنین عرض برگچه انتهایی بصورت معناداری در تیمار غلظت ۰/۰۵ افزایش نشان داد (۴-۵ ب).



شکل ۴-۵ مقایسه میانگین برای صفت طول برگچه انتهایی (الف) و عرض برگچه انتهایی (ب) گیاهچه‌های انیسون تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

۴-۲-۱-۵- طول گیاهچه

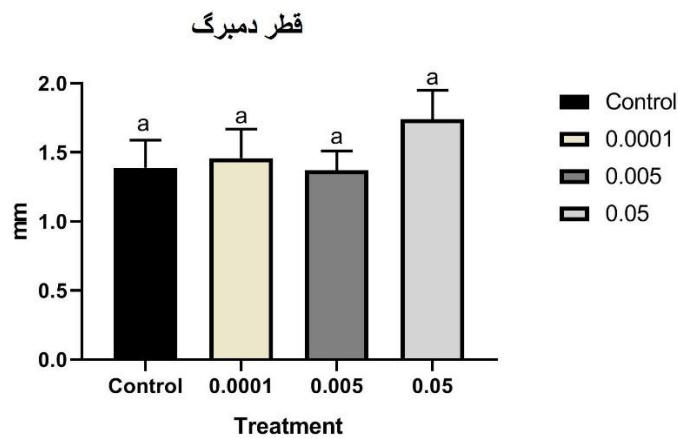
نتایج تجزیه واریانس برای صفت طول گیاهچه انیسون نشان داد که اثر تیمار بر طول گیاهچه معنی دار نبوده است (جدول ۴-۱). همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌های طول گیاهچه نیز نشان داد که بین غلظت‌های مختلف تیمار کلشی‌سین و کنترل تفاوت معنی داری وجود ندارد. اگرچه میزان طول گیاهچه‌ها در غلظت ۰/۰۵ درصد نسبت به کنترل کاهش نشان داد (شکل ۴-۶).



شکل ۴-۶ نتایج مقایسه میانگین برای صفت طول گیاهچه تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

۴-۲-۱-۶- قطر دمبرگ

نتایج تجزیه واریانس برای قطر دمبرگ نشان داد که تیمارهای آزمایشی نتوانسته‌اند اثرات معنی دار بر روی این صفت داشته باشند (جدول ۴-۱). نتایج مقایسه میانگین قطر برگ نیز نشان داد که تفاوت معنی داری بین تیمارهای مختلف کلشی‌سین با کنترل وجود ندارد هرچند که قطر دمبرگ در غلظت ۰/۰۵ نسبت شاهد افزایش نشان داد (شکل ۴-۷).



شکل ۴-۷ نتایج مقایسه میانگین برای صفت قطر دمبرگ تحت تیمارهای مختلف کلشی‌سین. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

در کل بر حسب نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیکی، می‌توان بیان داشت که تیمار جوانه انتهایی گیاهچه‌های انیسون با غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۰۰۵ کلشی‌سین توانسته تغییراتی در فاصله میانبرگچه‌ها و ابعاد برگ‌ها داشته باشد. این نتایج حاکی از آنست که احتمالاً تغییراتی در سطح ژنومی رخ داده است که منجر به تغییر مورفولوژیک برگ‌های جدید پس از اعمال تیمار شده است. علاوه بر ناسازگاری‌های ژنتیکی با گونه‌های مادری، افزایش تعداد کروموزوم‌ها و مواد ژنتیکی در افراد پلی‌پلوئید منجر به تغییرات فوری در ویژگی‌های مورفولوژیکی، تشریحی و فیزیولوژیکی نسبت به گونه‌های مادری می‌شود (Comai et al., 2000; Hancock & Bringhurst, 1981). گیاهان اتوپلی‌پلوئید و اندام‌های آن‌ها اغلب بزرگ‌تر از هم‌تایان دیپلوئیدی خود هستند که آن‌ها را برای اصلاح‌کنندگان گیاهان جذاب می‌کند (Dai et al., 2015). با توجه به اینکه در اکثر

گیاهان دارویی، اندام‌های رویشی منبع اصلی ترکیبات فعال هستند، افزایش سطح کروموزومی می‌تواند به عنوان یک راه ارزشمند و سریع برای افزایش تولید دارو در نظر گرفته شود (Dhawan & Lavania, 1996). در موارد زیادی گزارش شده است که گیاهان تتراپلوئید از نظر اندازه و ارتفاع کوچکتر و یا مساوی با گیاهان دیپلوئید بوده‌اند (Lavania, 2005).

در بررسی‌های صورت گرفته در نتیجه مقایسه برگ‌های گیاهان احتمالا تتراپلوئید و دیپلوئید برگ‌های اولیه از لحاظ ساختمانی و ریختی و حاشیه برگ دارای وضعیت نامناسب و ناهماهنگ بودند. طول برگ در گیاهان تتراپلوئید بالاتر از دیپلوئیدها بود اگرچه از لحاظ آماری این مقدار معنی دار نبود (جدول ۴-۱). برای انتخاب پلی پلوئیدی افزایش اندازه برگ یک شاخص مورفولوژیکی مفید است (Chung et al., 2017; Gantait et al., 2011). سوگیاما نشان داد که ارقام لولیوم تتراپلوئید دارای برگ‌های بلندتر با سلول‌های بالغ طولانی‌تر به دلیل نرخ سریع‌تر ازدیاد طول سلول نسبت به دیپلوئیدها هستند (Sugiyama, 2005).

در نتایج تحقیق حاضر ما صفات فاصله میانبرگچه‌ای اول و دوم از لحاظ آماری و مقایسه میانگین معنادار بودند. همچنین در این پژوهش برگچه در گیاهان تتراپلوئید با افزایش غلظت دارای طول و عرض بیشتر نسبت به هم‌تایان دیپلوئیدی خود شدند. نتایج تحقیق ما با یافته‌های پژوهش پلی‌پلوئیدی در گیاه مریم گلی (*Salvia miltiorrhiza*) که برگچه دچار تغییرات طول و عرض بیشتر نسبت به دیپلوئیدها شد مطابقت دارد (Chen et al., 2018).

یکی دیگر از نتایج معمول پلی‌پلوئیدی در گیاهان، کاهش رشد به دلیل کاهش و کم شدن تقسیم سلولی می‌باشد که در نتیجه اختلال در محتوای اکسین سلولها رخ می‌دهد. در این راستا میزان تنفس و فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌ها نیز کاهش می‌یابد (Stebbins, 1984). در نتایج ما کاهش ارتفاع و طول گیاهچه را با افزایش غلظت تیمار کلشی‌سین مشاهده شد، که با نتایجی که از ارتفاع گیاهان آنتوریم مشاهده شد مبنی بر کاهش ارتفاع گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین نسبت به دیپلوئیدها مطابقت نشان داد (Chen et al., 2011). همچنین

القای پلی پلوئیدی در گیاه بابونه (Saharkhiz, 2007) و گیاه *Platanus acerifolia* (Liu et al., 2007) با کاهش رشد همراه بود. رشد کمتر گیاهان پلی پلوئید به علت کاهش سرعت تقسیم سلولی (Eigsti, 1947)، کاهش هورمون‌های رشد و فعالیت‌های کمتر متابولیت‌ها در گیاهان می‌باشد (Larsen & Tung, 1950). کاهش ارتفاع در گیاهان تتراپلوئید احتمالاً به علت سمیت بالای کلشی‌سین و احتمالاً تأثیر منفی آن روی فعالیت‌های فیزیولوژیکی از جمله تولید و فعالیت هورمون‌های رشد گیاه است. در مطالعات انجام شده روی چند گیاه دارویی از جمله *Astragalus membranaceus* دلیل رشد آهسته گیاهان تتراپلوئید را اثر تخریبی فیزیولوژیکی کلشی‌سین در کاهش سرعت تقسیم سلولی دانسته‌اند (Chen & Gao, 2007).

۴-۳- شکل برگ

مشاهدات نشان داد که گیاهچه‌ها پس از تیمار با کلشی‌سین کاهش رشد پیدا می‌کنند بخصوص در تیمارهای ۰/۰۵ و ۰/۰۰۵ کلشی‌سین و برگ‌های جدید بصورت فشرده تری ایجاد می‌شوند (شکل ۴-۸ الف). همچنین تفاوت‌های در حاشیه برگ‌ها و شکل ظاهری برگ بین گیاهچه‌های القاء شده و گیاهچه‌های دیپلوئید مشاهده شد (شکل ۴-۸ ب-ج). ایجاد برخی از بی‌نظمی‌های مشاهده شده در اندازه برگ، شکل، بافت و رنگ گیاهچه‌ها شاید به علت اختلالات ایجاد شده اولیه توسط کلشی‌سین باشد و عنوان یک نتیجه از متابولیسم سلولی گیاهان پلی پلوئیدی تمایل به رشد و نمو آهسته دارند. برگ‌های گیاهان تتراپلوئید به دلیل داشتن پارانشیم نرده‌ای و پارانشیم اسفنجی ضخیم و سلول‌های اپیدرمی و فضاهای بین سلولی بزرگ در پارانشیم اسفنجی بطور قابل توجهی ضخیم‌تر از برگ‌های گیاهان دیپلوئید هستند (Allario et al., 2011) در تحقیق و بررسی شکل برگ‌ها در گیاهچه‌های انیسون تتراپلوئید و دیپلوئید برگ گیاهان تتراپلوئید دارای سطحی چین خورده، ناصاف، پهن تر و با ضخامت بیشتر مشاهده شده در برگ و رگبرگ‌ها و رنگ تیره‌تر نسبت به هم‌تایان دیپلوئید خود داشتند (شکل ۴-۸). همچنین گزارش شده است که برگ‌های گیاهان تتراپلوئید لیموترش بطور قابل توجهی ضخیم‌تر از برگ‌های گیاهان دیپلوئید هستند. همچنین بافت اسفنجی و بافت نرده‌ای برگ گیاهان تتراپلوئید لیموترش بطور معنی‌داری

ضخیمتر از برگ‌های گیاهان دیپلوئید بوده‌اند (Allario et al., 2011). سلول‌های تتراپلوئید با داشتن حجم بیشتر نسبت به سلول‌های دیپلوئید، باعث ضخیمتر شدن بافتها و بزرگ شدن اندازه اندامهای گیاه میشوند (Rauf et al., 2006) در مطالعات القاء پلی‌پلوئیدی بر روی سپیدار و نوعی افاقیا سیاه، تغییرات مورفولوژیکی در برگ گیاهان پلی‌پلوئید مانند کاهش رشد، ضخیمتر شدن برگ‌ها، رگبرگ‌ها، تغییرات در حاشیه و نامتقارن شدن برگ‌ها و تیره تر شدن رنگ برگ‌ها مشاهده شده است (Ewald et al., 2009) در کل نتایج تحقیقات ما با نتایج ذکر شده مطابقت نشان داد.



شکل ۴-۸ تغییر شکل ظاهری برگ‌های جدید گیاه انیسون پس از اعمال تیمار کلشی سین (الف)، و مقایسه بین نمونه‌های شاهد (ب) و تیمار شده با کلشی سین ۰/۰۰۵ (ج).

۴-۴- شکل بذر و باروری گیاهان القاء شده

گیاهان پلی‌پلوئید به طور معمول بذرهای بزرگتر با تعداد کمتر نسبت به گیاهان دیپلوئید تولید میکنند (Dhawan & Lavania, 1996). در بررسی‌های صورت گرفته بر روی بذر بدست آمده از گیاهان القاء شده با کلشی سین و گیاهان شاهد، تغییراتی در مورفولوژی و اندازه بذر آنها مشاهده شد (شکل ۴-۹). بذرهای بدست آمده دارای ظاهری نامناسب تر و ناصاف تر و اندازه بزرگتر نسبت به شاهد بودند ولی درصد

جوانه زنی ضعیفتری نسبت به همتایان دیپلوئید خود بودند. نتایج ما با نتایج گیاهان اتوتتراپلوئید بذرالبنج مصری که دارای بذره‌های درشتتری نسبت به نمونه‌های دیپلوئید خود داشتند مطابقت داشت (Dehghan et al., 2012). درصد جوانه زنی بذر تتراپلوئیدها نیز بر حسب گونه متفاوت می‌باشد (G. Stebbins, 1950) در گیاه بادرشبی و و ریحان با افزایش سطح پلوئیدی اندازه بذرها درشت‌تر و میزان تشکیل و درصد جوانه زنی آنها کاهش یافت (Omidbaigi et al., 2010) مطابقت دارد.

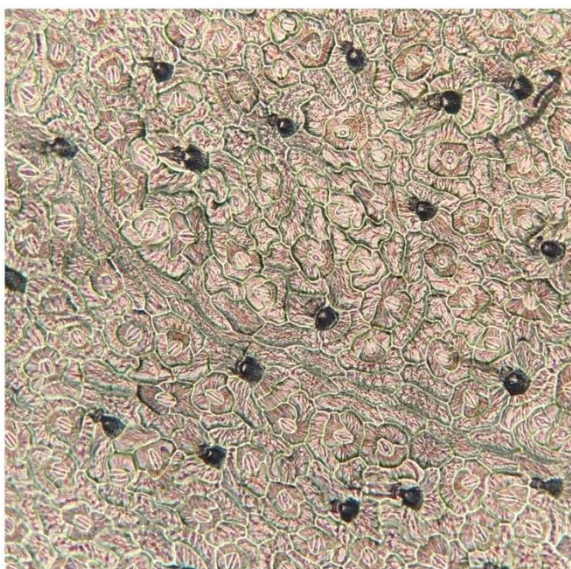


شکل ۴-۹ شکل ظاهری گل و بذر ایجاد شده در گیاهان تیمار شده با کلشی سین (الف) و اندازه بذره‌های گیاهان تیمار شده (ب) و تفاوت بذره‌های تیمار شده با بذره‌های شاهد (ج).

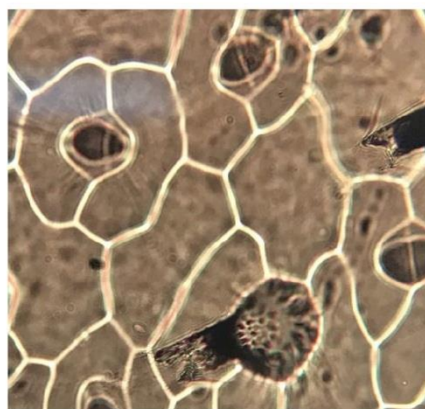
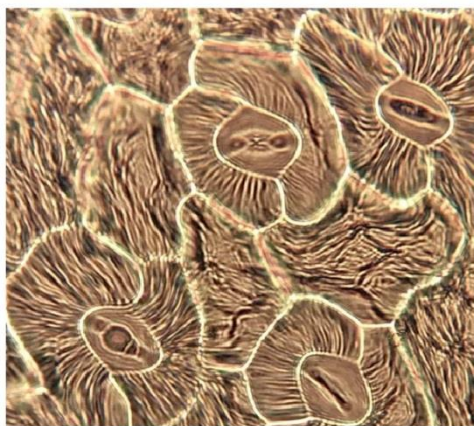
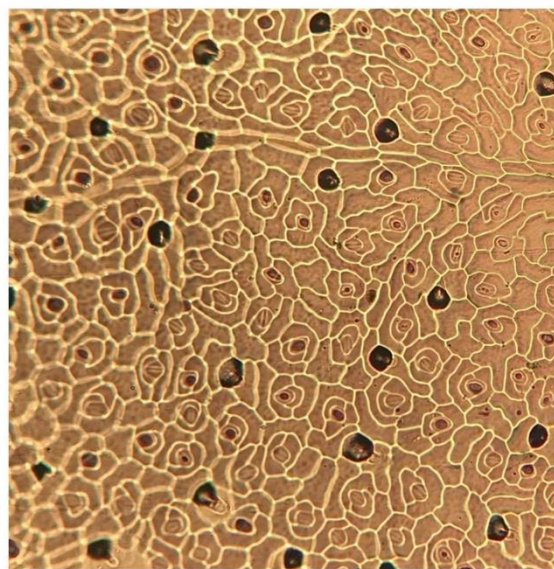
۴-۵-روزنه

براساس نتایج حاصل از آزمایش‌های میکروسکوپی ما بر روی خصوصیات روزنه‌ای برگ در گیاهان تحت تیمار کلشی‌سین (تتراپلوئید) در مقایسه با همتایان دیپلوئید خود تراکم و اندازه روزنه در برگ‌های جدید تحت تاثیر القای پلی‌پلوئیدی قرار گرفت. کاهش تراکم روزنه‌ای و افزایش اندازه روزنه در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت ۰/۰۵ و ۰/۰۵ کلشی‌سین مشاهده شد. اندازه و تراکم روزنه از جمله صفات مهم مرتبط با سطح پلی‌پلوئیدی می‌باشند که می‌توان از آن بعنوان یک بیومارکر استفاده کرد (شکل ۴-۱۰).

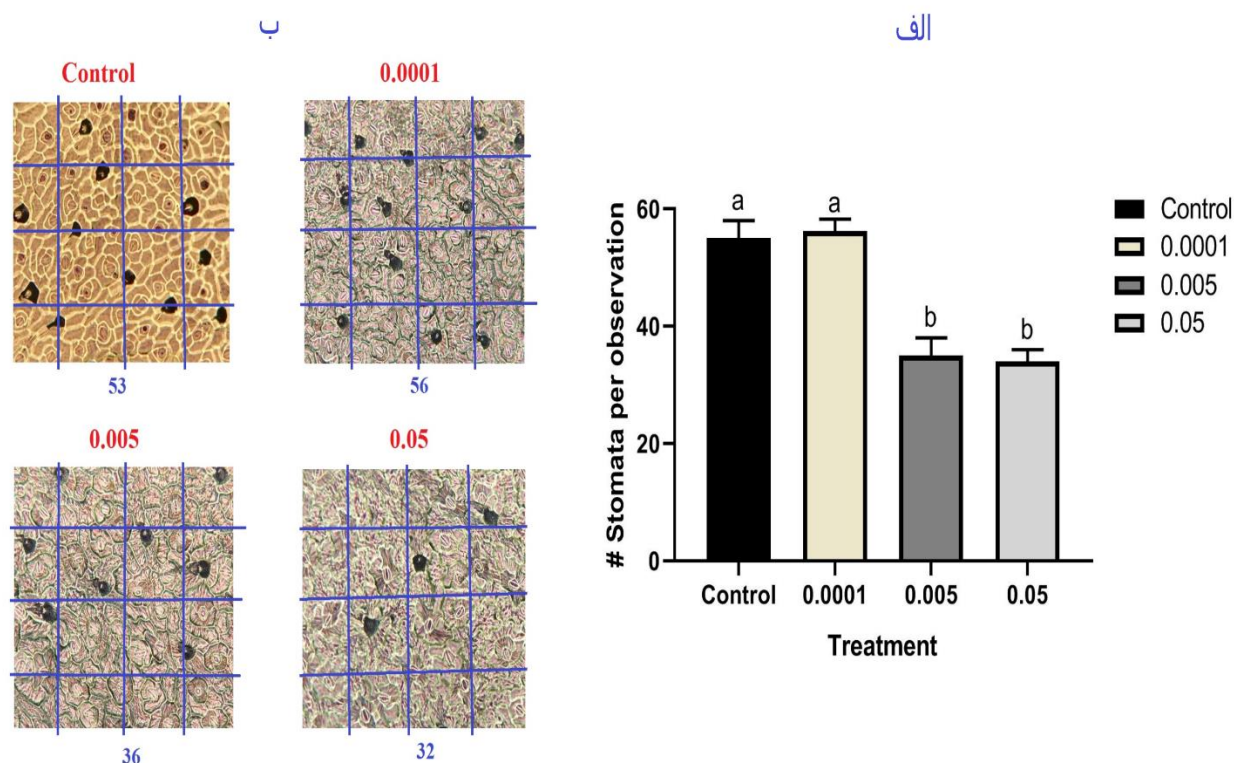
تیمار 0.005



شاهد



شکل ۴-۱۰ تصاویر روزنه ای برای تراکم و اندازه روزنه در گیاهچه های تیمار شده و کنترل (شاهد).



شکل ۴-۱۱ نتایج مقایسه میانگین برای صفت تعداد روزنه تحت تیمارهای مختلف کلشی سین(الف) حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است و شمارش تعداد روزنه(ب)

همچنین نتایج مقایسه میانگین برای صفت تعداد روزنه کاهش تعداد در واحد سطح با افزایش غلظت تیمار کلشی سین را نشان داد (شکل ۴-۱۱). در میان صفات مورفولوژی، روزنه‌ها ساختارهای اپیدرمی تخصص یافته‌ای هستند که تبادل آب و دی اکسید کربن بین گیاه و محیط را کنترل می‌کنند. حفظ و نگهداری سرعت طبیعی تبادلات گازی و در نتیجه فتوسنتز حاصل از جمله خصوصیات مهمی است که در عملکرد بالا در شرایط دیم نقش دارد (Muchow & Sinclair, 1989). بنا بر نظر محققین هدایت روزنه از صفات اساسی در فتوسنتز بوده و نقش بسیار مهمی در تشکیل عملکرد بخصوص در شرایط تنش دارد (Knapp, 1993). افزایش سطح پلوئیدی هسته، اغلب باعث تغییرات ساختاری از قبیل تراکم روزنه، افزایش اندازه سلول‌های روزنه‌ای و تعداد کلروپلاست در سلول می‌شود. تحقیقات نشان داده که اندازه سلول‌های نگهبان روزنه بیشتر از سلول‌های دیگر گیاه متأثر از عوامل ژنتیکی بوده و کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد (Watrous & Wimber, 1988). همچنین در اکثر

گزارشات افزایش سطح پلوئیدی باعث کاهش تعداد سلول‌های روزنه و در عین حال افزایش اندازه‌ی آنها می‌شود (Omidbaigi et al., 2010; Thao, Ureshino, et al., 2003). با افزایش سطح پلوئیدی، طول و عرض روزنه‌ها افزایش یافته و در نتیجه تراکم روزنه‌ای کاهش می‌یابد. افزایش سطح پلوئیدی بر تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه نیز می‌افزاید. مطالعات روی کاسنی و بذربالنج مصری نشان داد که تعداد کلروپلاست‌ها در سلول‌های نگهبان روزنه گیاهان تتراپلوئید بیشتر از انواع دیپلوئید است (Ghotbi Ravandi et al., 2013). در مقابل در گیاهان تتراپلوئید رازک به رغم افزایش اندازه‌ی روزنه، تفاوت معنی‌داری در تراکم روزنه‌ها در واحد سطح در نمونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید مشاهده نشده است (Roy et al., 2001). بنابراین چنین استنباط می‌شود که نوع گونه مورد مطالعه نقش مهمی در شاخص‌های روزنه‌ای در تعیین سطوح مختلف پلوئیدی داشته باشد.

۴-۶- اثرات القای پلی پلوئیدی بر صفات فیزیولوژیکی

در این مطالعه اثرات القای پلی پلوئیدی بر صفات فیزیولوژیکی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج تجزیه واریانس حاصل از داده‌های این صفات در جدول ۴-۲ ارائه شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات تیمار بر محتوی کلروفیل a معنی دار بوده است. هرچند که تیمار آزمایشی بر روی محتوی کلروفیل b و کارتنوئید اثرات غیر معنی دار را نشان داد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر تیمار آزمایشی برای محتوای پروتئین کل و RNA کل معنی دار بود (جدول ۴-۲).

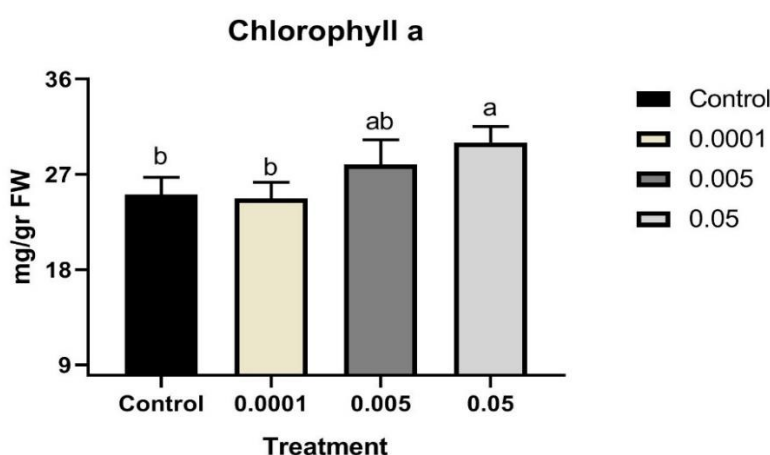
جدول ۴-۲ نتایج تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی و مولکولی در گیاه انیسون تحت تیمار کلشی سین

منابع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئید	پروتئین	RNA
تیمار	۳	۱۰/۵۶*	۴/۵۲ ^{ns}	۱/۰۵ ^{ns}	۰/۰۲**	۱۳۸۵۱۸۰**
خطا	۴	۰/۹۱	۲/۶۶	۰/۲۶	۰/۰۰۱	۱۸۸۷۸
CV%		۱۲/۵۲	۱۷/۳۸	۱۸/۷۹	۵/۸۴	۷/۵۵

*, **, ns و بترتیب معناداری در سطح پنج و یک درصد و عدم معناداری است.

۴-۶-۱-کلروفیل a

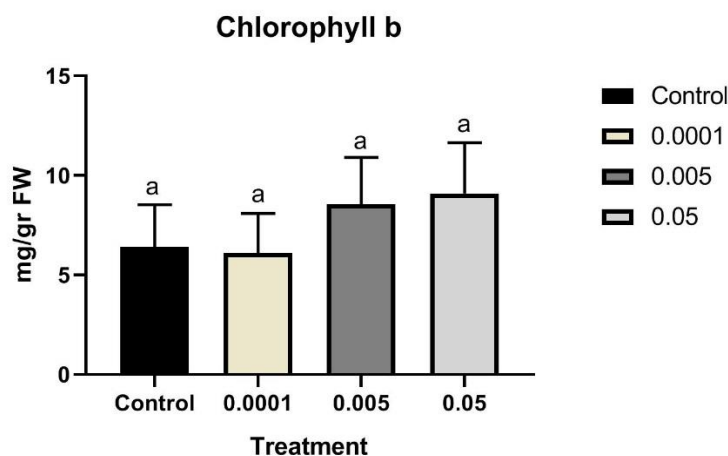
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات تیمار کلشی سین برمحتوی کلروفیل a در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار است (جدول ۴-۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین برای محتوی کلروفیل a نشان داد که تفاوت معناداری بین تیمار ۰/۰۵ با ۰/۰۰۰۱ کلشی سین و کنترل وجود دارد. هرچند که تیمار ۰/۰۵ تفاوت معناداری با تیمار ۰/۰۰۵ ایجاد نکرد (شکل ۴-۱۲). بنظر می رسد محتوی کلروفیل a در گیاهچه های القاء شده افزایش می یابد.



شکل ۴-۱۲ نتایج مقایسه میانگین برای محتوی کلروفیل a تحت تاثیر تیمار های کلشی سین. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

۴-۶-۲- کلروفیل b

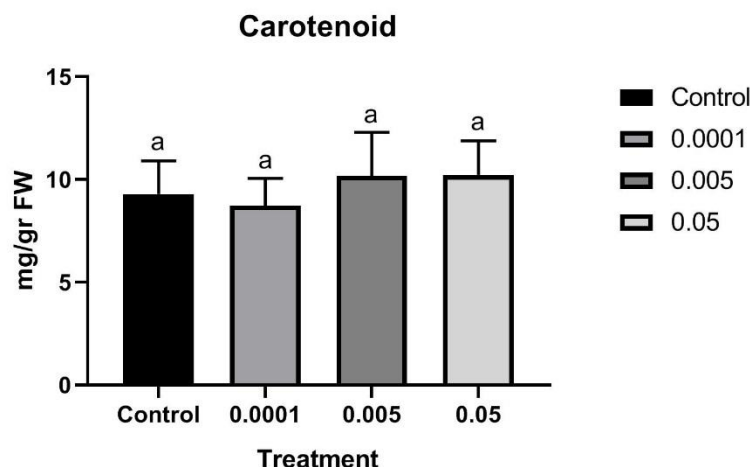
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمارهای مختلف کلشی سین بر محتوی کلروفیل b اثرات معناداری ایجاد نکرد (جدول ۴-۲). نتایج مقایسه میانگین برای محتوی کلروفیل b حاکی از آن بود که تفاوت معناداری بین تیمارهای مختلف کلشی سین و کنترل وجود ندارد هرچند که تا حدودی مقدار این کلروفیل در گیاهان القاء شده افزایش یافته بود (شکل ۴-۱۳).



شکل ۴-۱۳ نتایج مقایسه میانگین محتوی کلروفیل b تحت تاثیر تیمارهای مختلف کلشی سین. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

۴-۶-۳- کارتنوئید

نتایج تجزیه واریانس بر روی محتوی کارتنوئید اثرات معناداری نشان نداد (جدول ۴-۲). همچنین نتایج مقایسه میانگین برای کارتنوئید حاکی از عدم تفاوت معنادار بین تیمارهای مختلف و کنترل بود (شکل ۴-۱۴).



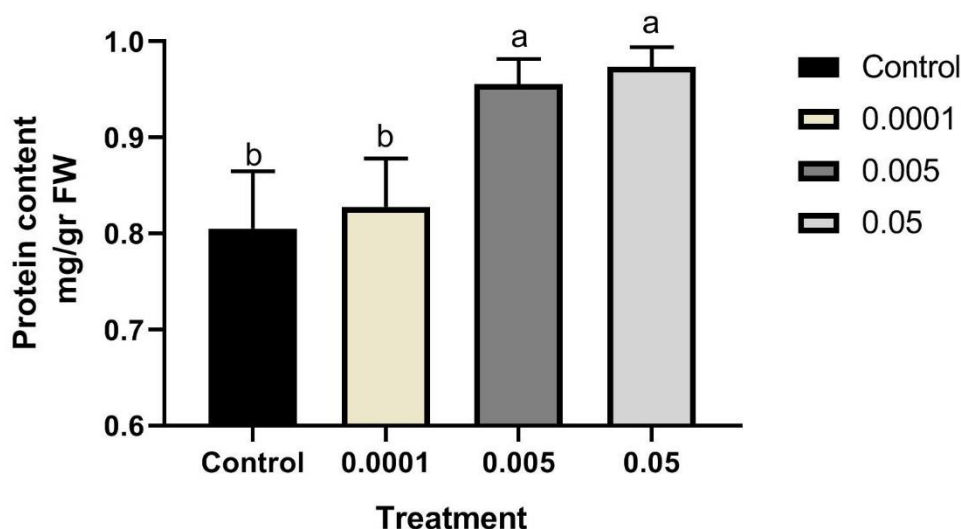
شکل ۴-۱۴ نتایج مقایسه میانگین محتوی کارتنوئید تحت تاثیر تیمارهای مختلف کلشی سین . حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است

در اثر افزایش سطح پلوئیدی، میزان تنفس کاهش یافته، ولی فتوسنتز، فعالیت ژن و تنوع آنزیمها افزایش می یابد. این امر بر کیفیت و کمیت متابولیت های ثانویه گیاه اثر می گذارد. از آنجا که پلی پلوئیدها نتیجه چند برابر شدن مستقیم ژنوم مشابه هستند و در آنها ماده ژنتیکی اصلی و پایه و به دنبال آن تعداد ژن نیز چند برابر شده است، بنابراین افزایش تولید متابولیتها نیز انجام می شود (Dhawan & Lavania, 1996). فتوسنتز بیشتر انرژی و کربوهیدرات مورد نیاز برای رشد رویشی گیاهان را به همراه دارد (Evans, 2013). پلی پلوئیدها ویژگی های فتوسنتزی منحصر به فردی را نشان می دهند که با دیپلوئیدها متفاوت است زیرا تغییرات پیچیده در صفات تشریحی و پاسخ های بیوشیمیایی رخ می دهد (Evans, 2013; Offermann & Peterhansel, 2014). در اغلب موارد، برگ های پلی پلوئیدها حجم بیشتری از سلول های مزوفیل با کلروپلاست و کلروفیل بیشتر را در مقایسه با دیپلوئیدها نشان می دهند که در نتیجه نرخ فتوسنتز بالاتری در هر سلول ایجاد می شود (Coate et al., 2012). تحقیقات پیشین نشان می دهد که پلی پلوئیدی شدن باعث افزایش تعداد کلروپلاست و فتوسنتز در هر سلول می شود که ممکن است به دلیل افزایش محتوی ژنوم و اندازه سلول ها باشد (Warner & Edwards, 1993). نتایج پژوهش حاضر بر محتوای کلروفیل و کارتنوئید نشان داد که تیمار کلشی سین فقط بر محتوای

کلروفیل a تاثیر معناداری داشته است. در پژوهشی که Liao و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی درخت پوپلوس انجام دادند نرخ فتوسنتزی و محتوای کلروفیل در تتراپلوئیدها به طور قابل توجهی بالاتر از گروه دیپلوئید بود (Liao et al., 2016). در پژوهشی Abdoli و همکاران گزارشی در سال ۲۰۱۳ مبنی بر افزایش سطوح پلویدی که سبب افزایش تعداد کلروپلاست‌ها در برگ و در نتیجه باعث افزایش فتوسنتز می‌شود را ارائه کردند (Abdoli et al., 2013). با توجه به معنادار نبودن تغییر ترکیباتی نظیر کلروفیل و کارتنوئید، می‌توان عنوان کرد که این شاخص‌ها برای تشخیص گیاهان تتراپلوئید دقیق و قابل اطمینان نیستند (Phulari, 2011).

۴-۶-۴-محتوی پروتئین

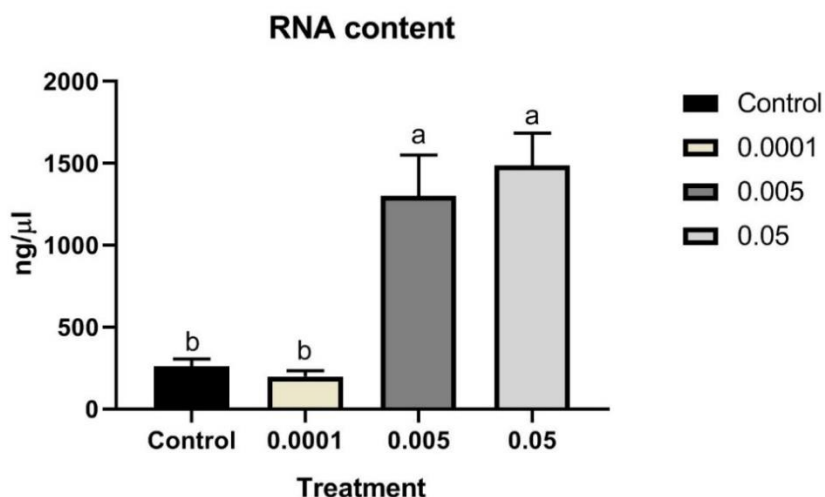
نتایج تجزیه واریانس برای محتوای پروتئین کل افزایش معنی‌داری را در سطح احتمال یک درصد نشان داد (جدول ۴-۲). نتایج مقایسه میانگین برای محتوای پروتئین کل تفاوت‌های معناداری بین تیمارهای مختلف کلشی‌سین و کنترل ایجاد کرد که بالاترین محتوای پروتئین نسبت به کنترل، غلظت ۰/۰۵ بود (شکل ۴-۱۵).



شکل ۴-۱۵ نتایج مقایسه میانگین برای محتوای پروتئین کل تحت تیمارهای مختلف کلشی‌سین. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است

۵-۶-۴-RNA کل

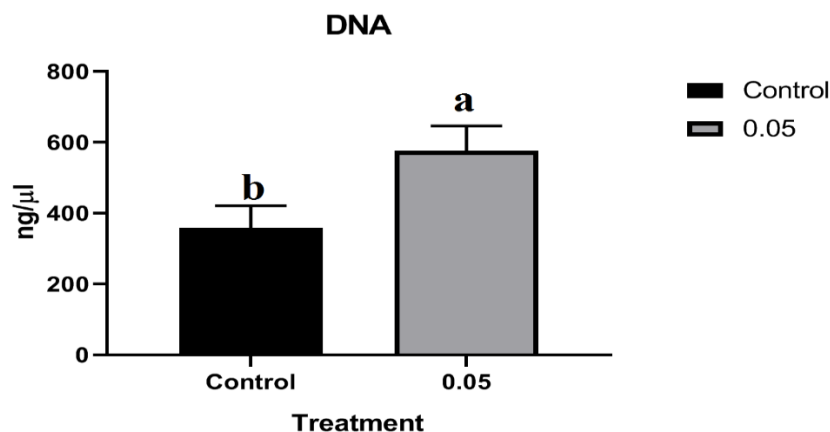
تجزیه واریانس برای محتوای RNA کل در سطح احتمال یک درصد نتایج بسیار معنی داری را نشان داد (جدول ۲-۴). نتایج مقایسه میانگین برای محتوای RNA کل تفاوت‌های بسیار معناداری با افزایش غلظت تیمارهای کلشی سین با کنترل نشاد داد که بالاترین تفاوت بین تیمار ۰/۰۵ با کنترل و کمترین مقدار با غلظت ۰/۰۰۱ مشاهده شد شکل (۴-۱۶).



شکل ۴-۱۶ نتایج مقایسه میانگین برای محتوای RNA کل تحت تیمار کلشی سین. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

محتوی DNA

نتایج بررسی محتوی DNA در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت ۰/۰۵ کلشی سین و گیاهچه‌های شاهد در شکل ۴-۱۷ ارائه شده است. بنظر می‌رسد که تیمار کلشی سین توانسته سطح ژنومی گیاهچه‌های تیمار شده انیسون را نسبت به گیاهچه‌های شاهد افزایش دهد.



شکل ۴-۱۷ نتایج مقایسه میانگین برای محتوی DNA برگ بین گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت ۰/۰۵ کلشی سین و نمونه شاهد. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معناداری در سطح ۵٪ بین تیمارهای آزمایشی است.

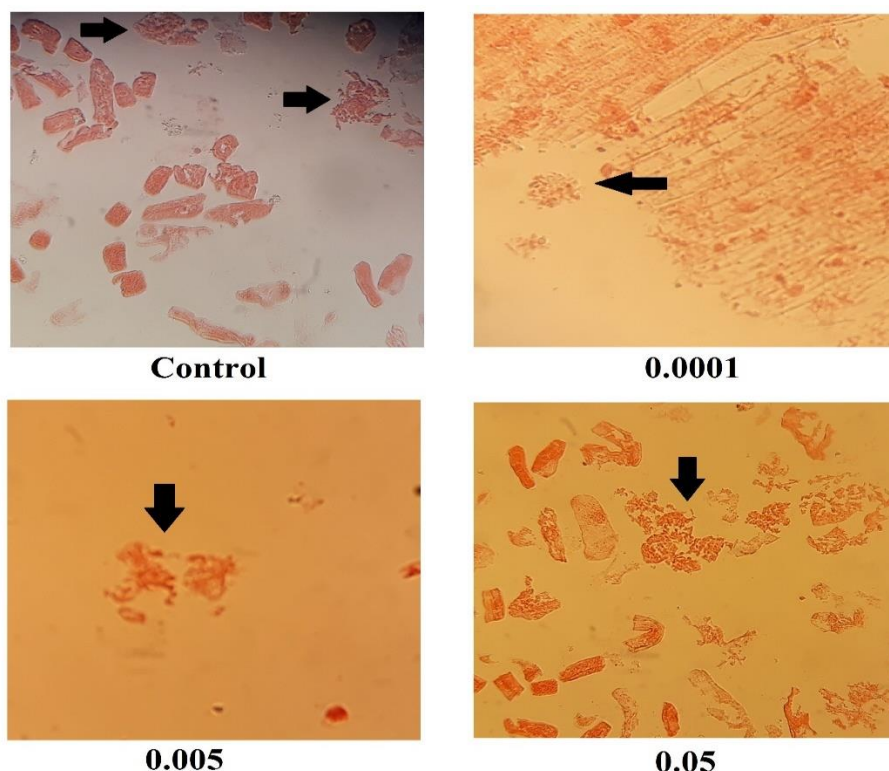
افزایش تعداد کپی ژن باعث افزایش تعداد رونوشت‌ها و مقدار پروتئین می‌شود که به نوبه خود بر روی حجم سلول و بنیه گیاه اثر می‌گذارد (Tsukaya, 2008). نتایج این تحقیق تایید داشت که محتوی ماده ژنومی و میزان RNA کل در گیاهان تیمار شده با غلظت ۵ درصد کلشی سین افزایش می‌یابد و در نتیجه محتوی پروتئین کل نیز در سلول افزایش نشان داد. همچنین یان و همکاران (۲۰۱۴) افزایش تقریباً دو برابری پروتئین کل در گیاهان القاء یافته نیلوفر پیچ و تربچه گزارش کرده‌اند (Yan et al., 2014).

هر چند که گاهی یک رابطه مستقیم بین محتوی RNA و پروتئین وجود ندارد که عوامل مختلفی بر میزان ترجمه و پایداری پروتئین‌ها اثر گذار هستند. عواملی همچون دآستیل شدن، متیله شدن و سایر تغییراتی که در هیستون‌ها رخ می‌دهد می‌تواند سبب خاموشی ژن‌های دوبرابر شده در پلی‌پلوئیدها شود (Adams & Wendel, 2005). به نظر می‌رسد که RNAهای کوچک مانند miRNAs، ta-siRNAs و siRNAs و در تنظیم بیان ژن و تغییرات اپی‌ژنتیکی ناشی از پلی‌پلوئیدی نقش مهمی دارند (Adams et al., 2004). از مجموع مباحث بالا استنباط می‌شود که پلی‌پلوئیدی مکانیسم‌هایی را در سلول فعال کرده که در نتیجه آن میزان DNA الگو و به دنبال آن نسخه‌برداری و ترجمه نیز تحت تاثیر قرار گرفته و منجر به افزایش، کاهش و یا حتی خاموشی ژن می‌شود و به این صورت بسیاری از صفات فیزیولوژیک و ریخت‌شناسی گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Adams & Wendel, 2005).

بررسی همزمان DNA، RNA و پروتئین می‌تواند درک بهتری از اثرات پلی‌پلوئیدی ارائه دهد و میزان اعتبار کار را افزایش می‌دهد که در این مطالعه نتایج این صفات القاء پلی‌پلوئیدی را نشان می‌دادند.

۷-۴- کاربوتایپ (شمارش کروموزومی به روش اسکواش)

جهت بررسی اثرات تیمار کلشی سین بر سطح پلی‌پلوئیدی گیاهچه‌های تیمار شده، سلول‌های نوک ریشه مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. بر اساس روش صورت گرفته، امکان شمارش دقیق کروموزوم‌ها فراهم نشد اما نتایج تا حدودی تغییرات در سلول‌های گیاهان تیمار شده با غلظت ۵ درصد کلشی سین را نشان داد (شکل ۴-۱۸). بعلت طولانی شدن دوره رشد گیاهچه‌ها و کاهش باروری آنها در نسل اول امکان بذرگیری و انجام مطالعات بر روی بذرها تولید شده فراهم نشد.



شکل ۴-۱۸ مقایسه کاربوتایپ سلول‌های ریشه گیاهچه‌های انیسون تحت تیمار غلظت‌های مختلف کلشی سین.

۴-۸- نتیجه گیری

در کل بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که کلشی سین بعنوان یک اختلالگر در تقسیم میتوز، توانایی القاء پلی پلوئیدی در گیاهچه‌های انیسون را دارد. تیمار جوانه انتهایی مناسب‌تر از تیمار بذری تشخیص داده شد. بنظر می‌رسد که غلظت‌های بیشتر از ۰/۰۰۵ کلشی سین جهت افزایش سطح پلوئیدی در انیسون مناسب است هرچند افزایش غلظت سبب کاهش زنده‌مانی گیاهچه‌ها و کاهش باروری آنها خواهد شد. براساس چهار صفت مهم مرتبط با پلی پلوئیدی شامل محتوی DNA، محتوی RNA کل، میزان پروتئین و اندازه و تراکم روزنه، این نتیجه حاصل شد که امکان تولید گیاهان اتوتتراپلوئید انیسون با کاربرد کلشی سین وجود دارد. افزایش میزان محتوی ژنومی باعث تغییر در شکل ظاهری گیاهچه‌های انیسون شد بطوریکه این گیاهان دارای برگ‌های بزرگ‌تر بودند. همچنین میزان کلروفیل در گیاهان پلی پلوئید شده نسبت به شاهد افزایش یافت. افزایش در اندازه برگ و میزان کلروفیل می‌تواند میزان فتوسنتز و کارایی مصرف آب در گیاهان را افزایش دهد و در نتیجه میزان تولید ارتقاء یابد. در پایان می‌توان غلظت ماده القاء کننده، انتخاب مرحله‌ی رشدی جهت تیمار و روش اعمال تیمار را بعنوان عوامل مهم تاثیر گذار بر موفقیت در تولید گیاهان اتوپلوئید معرفی کرد.

۴-۹-پیشنهادات

با توجه به نتایج بدست آمده برخی پیشنهادات جهت ادامه این کار و یا مطالعات مشابه ارائه می شود:

- آزمایش سایر مواد اختلالگر میتوزی و تعیین میزان کارایی آنها
- بررسی سایر غلظت های کلشی سین
- بررسی میزان مقاومت گیاهان اتوتتراپلوئید در برابر تنش های محیطی
- تعیین میزان متابولیت های ثانویه در گیاهان اتوتتراپلوئید

فهرست منابع

اصلانی، ف.، برنارد، ف.، میرزاجانی، ف.، هادیان، ج. ۱۳۹۳. مقایسه استفاده کلشی سین بر روی بذر و سرشاخه آویشن دنیایی (*Thymus daenensis Celak*) از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی روزنه و محتوای DNA در گیاهچه‌های درون شیشه‌ای. فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۳، شماره ۱۰، زمستان ۱۳۹۳.

بیرامی، ا.، فهمیده، ل.، ریاست، م. ۱۳۹۳. ارزیابی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی شنبليله (*Trigonella foenum graecum*) توده بومی سیستان تحت تیمار کلشی سین. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی / سال هشتم / شماره ۱۸ / تابستان ۱۳۹۵.

حسینی، س الف، و همکاران ۱۳۹۵، مقایسه‌ی کمی و کیفی روشهای CTAB و SDS برای تخلیص DNA از گیاه دارویی ماریتیغال (*Silybum marianum L.*) مجله‌ی علمی پزشکی جندی‌شاپور، دوره ۱۵، شماره ۳، ۱۳۹۵.

حسینی، ب.، جوانبخت، س. ۱۳۹۵. اثرات القاء پلی‌پلوئیدی در شرایط درون شیشه‌ای بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia Benth*). دو فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. جلد ۲۵، شماره ۱، صفحه ۴۲-۲۴ (۱۳۹۶).

زهتاب سلماسی، س. ۱۳۸۰. بررسی اثرات اکوفیزیولوژیک آبیاری و تاریخ کاشت بر روی رشد، عملکرد، اسانس و آنتول در گیاه دارویی انیسون. پایان نامه دکتری زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تبریز.

ستوده اردبیلی، گ.، اصغری زکریا، ر. و زارع، ن. ۱۳۹۳. اثر القای پلی‌پلوئیدی بر صفات مورفو فیزیولوژیک سورگوم (*Sorghum bicolor cv. KFS2*). مجله علوم زراعی ایران. جلد شانزدهم، شمار ۲، تابستان ۱۳۹۳.

ملک‌زاده شفارودی، س.، غنی، ع.، حبیبی، م.، امیری، ا. ۱۳۹۰. بررسی امکان القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) با استفاده از کلشی‌سین. نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)، جلد ۲۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، ص. ۴۶۹-۴۶۱، شاپا: ۴۷۳۰-۲۰۰۸.

هوشمند، م. ۱۳۷۸. بررسی سیتوژنتیکی و مورفومتری برخی از ارقام گلرنگ. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

- Abdoli, M., Moieni, A., & Naghdi Badi, H. (2013). Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicine-induced tetraploid plants of *Echinacea purpurea* (L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(7), 2075–2083.
- Acimovic, M. G., Korac, J., Jacimovic, G., Oljaca, S., Djukanovic, L., & Vesna, V.-J. (2014). Influence of ecological conditions on seeds traits and essential oil contents in anise (*Pimpinella anisum* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42(1), 232–238.
- Adams, K. L., Percifield, R., & Wendel, J. F. (2004). Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics*, 168(4), 2217–2226.
- Adams, K. L., & Wendel, J. F. (2005). Novel patterns of gene expression in polyploid plants. *TRENDS in Genetics*, 21(10), 539–543.
- Ade, R., & Rai, M. K. (2010). Colchicine, current advances and future prospects. *Nusantara Bioscience*, 2(2).
- Aïnouche, M. L., Fortune, P. M., Salmon, A., Parisod, C., Grandbastien, M.-A., Fukunaga, K., Ricou, M., & Misset, M.-T. (2009). Hybridization, polyploidy and invasion: lessons from *Spartina* (Poaceae). *Biological Invasions*, 11(5), 1159–1173.
- Al-Bayati, F. A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3), 403–406.
- Al-Rubaye, A. F., Hameed, I. H., & Kadhim, M. J. (2017). A Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, 9(01). <https://doi.org/10.25258/ijtp.v9i01.9042>
- Al-Tameme, H. J., Hadi, M. Y., & Hameed, I. H. (2015). Phytochemical analysis of *Urtica dioica* leaves by fourier-transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 7(10), 238–252.
- Alam, H., & Razaq, M. (2015). Induced polyploidy as a tool for increasing tea (*Camellia sinensis* L.) production. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 22(3), 43–47.

- Aleza, P., Juárez, J., Cuenca, J., Ollitrault, P., & Navarro, L. (2012). Extensive citrus triploid hybrid production by $2x \times 4x$ sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. *Plant Cell Reports*, 31(9), 1723–1735.
- Alishah, A., & Omid, M. (2008). *Laboratory methods in plant cytogenetics*. Tehran University Press (In Persian).
- Allario, T., Brumos, J., Colmenero-Flores, J. M., Tadeo, F., Froelicher, Y., Talon, M., Navarro, L., Ollitrault, P., & Morillon, R. (2011). Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2507–2519.
- Amin, G. R. (2005). Popular medicinal plants of Iran, vice chancellorship of research. *Tehran University of Medical Science Press, Tehran, Iran*.
- Andreu, J. M., & Timasheff, S. N. (1982). Tubulin bound to colchicine forms polymers different from microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(22), 6753–6756.
- Antonovics, J., & Bradshaw, A. D. (1970). Evolution in closely adjacent plant populations. VIII. Clinal patterns at a mine boundary. *Heredity*, 25, 349–362.
- Ari, E., Djapo, H., Mutlu, N., Gurbuz, E., & Karaguzel, O. (2015). Creation of variation through gamma irradiation and polyploidization in *Vitex agnus-castus* L. *Scientia Horticulturae*, 195, 74–81.
- ARSLAN, N., Gürbüz, B., Sarihan, E. O., Bayrak, A., & GÜMÜŞÇÜ, A. (2004). Variation in essential oil content and composition in Turkish anise (*Pimpinella anisum* L.) populations. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28(3), 173–177.
- Arumuganathan, K., & Earle, E. D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3), 208–218.
- Aryavand, A., Ehdaie, B., Tran, B., & Waines, J. G. (2003). Stomatal frequency and size differentiate ploidy levels in *Aegilops neglecta*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(2), 175–182.
- Askari, F., Sefidkan, F., & Mirza, M. (1998). Quality and quantity of compounds in anise oil (*Pimpinella anisum*). *Research and Development*, 11, 64–74.
- Balao, F., Herrera, J., & Talavera, S. (2011). Phenotypic consequences of polyploidy and genome size at the microevolutionary scale: a multivariate morphological approach. *New Phytologist*, 192(1), 256–265.
- Barker, M. S., Arrigo, N., Baniaga, A. E., Li, Z., & Levin, D. A. (2016). On the relative abundance of autopolyploids and allopolyploids. *New Phytologist*, 210(2), 391–398.
- Basu, S., & Lodh, D. (2018). Artificial induction of polyploidy in *Andrographis paniculata* (Burm. F.) wall. ex nees. *The Journal of Indian Botanical Society*, 97(1and2), 21–28.
- Beaulieu, J. M., Leitch, I. J., Patel, S., Pendharkar, A., & Knight, C. A. (2008). Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. *New Phytologist*, 179(4), 975–986.

- Bennett, M. D., & Leitch, I. J. (2005). Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects. *Annals of Botany*, 95(1), 45–90.
- Bergers, E., Diest, P. J. van, & Baak, J. P. A. (1996). Cell cycle analysis of 932 flow cytometric DNA histograms of fresh frozen breast carcinoma material: Correlations between flow cytometric, clinical, and pathologic variables. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 77(11), 2258–2266.
- Besharati-Seidani, A., Jabbari, A., & Yamini, Y. (2005). Headspace solvent microextraction: a very rapid method for identification of volatile components of Iranian Pimpinella anisum seed. *Analytica Chimica Acta*, 530(1), 155–161.
- Bhattacharyya, B., Panda, D., Gupta, S., & Banerjee, M. (2008). Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Medicinal Research Reviews*, 28(1), 155–183.
- Bhuvaneswari, G., Thirugnanasampandan, R., & Gogulramnath, M. (2020). Effect of colchicine induced tetraploidy on morphology, cytology, essential oil composition, gene expression and antioxidant activity of Citrus limon (L.) Osbeck. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(2), 271–279.
- Borron, S. W., Scherrmann, J. M., & Baud, F. J. (1996). Markedly altered colchicine kinetics in a fatal intoxication: examination of contributing factors. *Human & Experimental Toxicology*, 15(11), 885–890.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Caperta, A. D., Delgado, M., Ressurreição, F., Meister, A., Jones, R. N., Viegas, W., & Houben, A. (2006). Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. *Protoplasma*, 227(2), 147–153.
- Castro, M., Castro, S., & Loureiro, J. (2018). Production of synthetic tetraploids as a tool for polyploid research. *Web Ecology*, 18(2), 129–141.
- Challinor, A. J., Simelton, E. S., Fraser, E. D. G., Hemming, D., & Collins, M. (2010). Increased crop failure due to climate change: assessing adaptation options using models and socio-economic data for wheat in China. *Environmental Research Letters*, 5(3), 34012.
- Chansler, M. T., Ferguson, C. J., Fehlberg, S. D., & Prather, L. A. (2016). The role of polyploidy in shaping morphological diversity in natural populations of Phlox amabilis. *American Journal of Botany*, 103(9), 1546–1558.
- Chen, C., Hou, X., Zhang, H., Wang, G., & Tian, L. (2011). Induction of Anthurium andraeanum “Arizona” tetraploid by colchicine in vitro. *Euphytica*, 181(2), 137–145.
- Chen, E. G., Tsai, K.-L., Chung, H.-H., & Chen, J.-T. (2018). Chromosome doubling-enhanced biomass and dihydrotanshinone I production in Salvia miltiorrhiza, a traditional Chinese medicinal plant. *Molecules*, 23(12), 3106.
- Chen, G., SUN, W., & Sun, H. (2009). Morphological characteristics of leaf epidermis and size

- variation of leaf, flower and fruit in different ploidy levels in *Buddleja macrostachya* (Buddlejaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, 47(3), 231–236.
- Chen, L.-L., & Gao, S.-L. (2007). In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. *Scientia Horticulturae*, 112(3), 339–344.
- Chen, L., Wang, Y., & Zhao, M. (2006). In vitro induction and characterization of tetraploid *Lychnis senno* Siebold et Zucc. *HortScience*, 41(3), 759–761.
- Cheng, S., Zhu, X., Liao, T., Li, Y., Yao, P., Suo, Y., Zhang, P., Wang, J., & Kang, X. (2015). Gene expression differences between high-growth *Populus* allotriploids and their diploid parents. *Forests*, 6(3), 839–857.
- Cho, S. H., Godin, J. M., Chen, C.-H., Qiao, W., Lee, H., & Lo, Y.-H. (2010). Recent advancements in optofluidic flow cytometer. *Biomicrofluidics*, 4(4), 43001.
- Chung, H.-H., Shi, S.-K., Huang, B., & Chen, J.-T. (2017). Enhanced agronomic traits and medicinal constituents of autotetraploids in *Anoectochilus formosanus* Hayata, a top-grade medicinal orchid. *Molecules*, 22(11), 1907.
- Ciftci, M., Guler, T., Dalkiliç, B., & Ertas, O. N. (2005). The effect of anise oil (*Pimpinella anisum* L.) on broiler performance. *International Journal of Poultry Science*, 4(11), 851–855.
- Coate, J. E., Luciano, A. K., Seralathan, V., Minchew, K. J., Owens, T. G., & Doyle, J. J. (2012). Anatomical, biochemical, and photosynthetic responses to recent allopolyploidy in *Glycine dolichocarpa* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 99(1), 55–67.
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 836–846.
- Comai, L., Tyagi, A. P., Winter, K., Holmes-Davis, R., Reynolds, S. H., Stevens, Y., & Byers, B. (2000). Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed *Arabidopsis* allotetraploids. *The Plant Cell*, 12(9), 1551–1567.
- Corneillie, S., De Storme, N., Van Acker, R., Fangel, J. U., De Bruyne, M., De Rycke, R., Geelen, D., Willats, W. G. T., Vanholme, B., & Boerjan, W. (2019). Polyploidy affects plant growth and alters cell wall composition. *Plant Physiology*, 179(1), 74–87.
- Corrodi, H., & Hardegger, E. (1955). Die konfiguration des colchicins und verwandter verbindungen. *Helvetica Chimica Acta*, 38(7), 2030–2033.
- Dai, F., Wang, Z., Luo, G., & Tang, C. (2015). Phenotypic and transcriptomic analyses of autotetraploid and diploid mulberry (*Morus alba* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 22938–22956.
- Dar, R. A., Shah Nawaz, M., & Qazi, P. H. (2017). General overview of medicinal plants: A review. *The Journal of Phytopharmacology*, 6(6), 349–351.
- de Alencar, L. D., Azevedo, P., & Latado, R. R. (2020). Mothers' command: phenotypes changes resulting from reciprocal interploidy crosses. *Euphytica*, 216(2), 1–11.
- De Candolle, A. P. (1827). Dictionnaire classique d'histoire naturelle 11. *Rey et Gravier, Libraries-Editeurs (Ed.)*, 406.

- Dehghan, E., Ghotbi Ravandi, E., Naghdi Badi, H., Tanhaeian, A., & Hosseini Khalifani, B. (2012). Increasing the Conversion of Hyoscyamine to Scopolamine in Stable Autotetraploid Plants of Egyptian Henbane (*Hyoscyamus muticus*). *Journal of Medicinal Plants*, 11(42), 57–67.
- Dewitte, A., Van Laere, K., & Van Huylenbroeck, J. (2012). Use of 2n gametes in plant breeding. *Plant Breeding*, 59–86.
- Dhawan, O. P., & Lavania, U. C. (1996). Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. *Euphytica*, 87(2), 81–89.
- Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., & Van Huylenbroeck, J. (2011). Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(3), 359–373.
- Doležel, J., & Binarová, P. (1989). The effects of colchicine on ploidy level, morphology and embryogenic capacity of alfalfa suspension cultures. *Plant Science*, 64(2), 213–219.
- Downie, S. R., Spalik, K., Katz-Downie, D. S., & Reduron, J.-P. (2010). Major clades within Apiaceae subfamily Apioideae as inferred by phylogenetic analysis of nrDNA ITS sequences. *Plant Diversity and Evolution*, 128(1), 111.
- Edger, P. P., Heidel-Fischer, H. M., Bekaert, M., Rota, J., Glöckner, G., Platts, A. E., Heckel, D. G., Der, J. P., Wafula, E. K., & Tang, M. (2015). The butterfly plant arms-race escalated by gene and genome duplications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(27), 8362–8366.
- Eigsti, O. J. (1947). The pollen tube method for making comparisons of differences in mitotic rates between diploid and tetraploid. *Genetics*, 32, 85.
- El-Nashar, Y. I., & Ammar, M. H. (2016). Mutagenic influences of colchicine on phenological and molecular diversity of *Calendula officinalis* L. *Genetics and Molecular Research*, 15(2), 1–15.
- Elgayyar, M., Draughon, F. A., Golden, D. A., & Mount, J. R. (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*, 64(7), 1019–1024.
- Eng, W.-H., & Ho, W.-S. (2019). Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review. *Scientia Horticulturae*, 246, 604–617.
- Escandón, A. S., Alderete, L. M., & Hagiwara, J. C. (2007). In vitro polyploidization of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America. *Scientia Horticulturae*, 115(1), 56–61.
- Etterson, J. R., Toczydlowski, R. H., Winkler, K. J., Kirschbaum, J. A., & McAulay, T. S. (2016). *Solidago altissima* differs with respect to ploidy frequency and clinal variation across the prairie-forest biome border in Minnesota. *American Journal of Botany*, 103(1), 22–32.
- Evans, J. R. (2013). Improving photosynthesis. *Plant Physiology*, 162(4), 1780–1793.
- Ewald, D., Ulrich, K., Naujoks, G., & Schröder, M.-B. (2009). Induction of tetraploid poplar and

- black locust plants using colchicine: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 99(3), 353–357.
- Fang, C., Fernie, A. R., & Luo, J. (2019). Exploring the diversity of plant metabolism. *Trends in Plant Science*, 24(1), 83–98.
- Fereidounfar, S., Ghahremaninejad, F., & Khajehpiri, M. (2016). Phylogeny of the Southwest Asian *Pimpinella* and related genera based on nuclear and plastid sequences. *Genetics and Molecular Research*, 15(4), 1–17.
- Fernö, Mår., Baldetorp, B., Borg, Åk., Olsson, Håk., Sigurdsson, H., & Killander, D. (1992). Flow cytometric DNA index and S-phase fraction in breast cancer in relation to other prognostic variables and to clinical outcome. *Acta Oncologica*, 31(2), 157–165.
- Fiehn, O. (2016). Metabolomics by gas chromatography–mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*, 114(1), 30–34.
- Fouda, A. S., Elewady, G. Y., Shalabi, K., & Habouba, S. (2014). Anise extract as green corrosion inhibitor for carbon steel in hydrochloric acid solutions. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3(4), 11210–11228.
- Frierson Jr, H. F. (1991). Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive adenocarcinomas of the breast. *The American Journal of Surgical Pathology*, 15(4), 358–367.
- Fujita, K.-I., & Kubo, I. (2004). Potentiation of fungicidal activities of trans-anethole against *Saccharomyces cerevisiae* under hypoxic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98(6), 490–492.
- Fulwyler, M. J. (1965). Electronic separation of biological cells by volume. *Science*, 150(3698), 910–911.
- Gallagher, J. P., Grover, C. E., Hu, G., & Wendel, J. F. (2016). Insights into the ecology and evolution of polyploid plants through network analysis. *Molecular Ecology*, 25(11), 2644–2660.
- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., & Das, P. K. (2011). Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(3), 485–493.
- Gantait, S., & Mukherjee, E. (2021). Induced autopolyploidy—a promising approach for enhanced biosynthesis of plant secondary metabolites: an insight. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1–13.
- Germanà, M. A. (2012). Use of irradiated pollen to induce parthenogenesis and haploid production in fruit crops. *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*, 411–421.
- Ghahremaninejad, F., Falatoury, A. N., & Mahmoodi, M. (2013). *Plant chromosome book of Iran*. House of Biology.
- Ghotbi Ravandi, E., Rezanejad, F., Zolala, J., & Dehghan, E. (2013). The effects of chromosome-doubling on selected morphological and phytochemical characteristics of *Cichorium intybus*

- L. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(6), 701–709.
- Godfree, R. C., Marshall, D. J., Young, A. G., Miller, C. H., & Mathews, S. (2017). Empirical evidence of fixed and homeostatic patterns of polyploid advantage in a keystone grass exposed to drought and heat stress. *Royal Society Open Science*, 4(11), 170934.
- Goldman, J. J. (2015). DNA contents in Texas bluegrass (*Poa arachnifera*) selected in Texas and Oklahoma determined by flow cytometry. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 62(5), 643–647.
- Griesbach, R. J., & Kamo, K. K. (1996). The effect of induced polyploidy on the flavonols of *Petunia* ‘Mitchell.’ *Phytochemistry*, 42(2), 361–363.
- Guerra, M. (2008). Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research*, 120(3–4), 339–350.
- Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J. A., Apone, F., Abdel-Salam, E. M., Qahtan, A. A., Alatar, A. A., Cantini, C., Cai, G., & Hausman, J.-F. (2018). Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. *Genes*, 9(6), 309.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83(3), 371–382.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., & Babaç, M. T. (2012). Türkiye bitkileri listesi (Damarlı bitkiler)[Turkey plant list (Vascular plants)]. *Istanbul, Turkey: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırma Derneği Yayını*.
- Guo, W. W., Liang, W. J., Xie, K. D., Xia, Q. M., Fu, J., Guo, D. Y., Xie, Z. Z., Wu, X. M., Xu, Q., & Yi, H. L. (2014). Exploitation of polyploids from 39 citrus seedling populations. *III International Symposium on Citrus Biotechnology* 1135, 11–16.
- Haghir, H., Gorji, A., & Hami, J. (2010). Effects of *Pimpinella anisum* on spreading depression in rat neocortical tissue. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*, 17(3), 180–188.
- Hameed, I. H., Altameme, H. J., & Idan, S. A. (2016). *Artemisia annua*: Biochemical products analysis of methanolic aerial parts extract and anti-microbial capacity. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 7(2), 1843–1868.
- Hammond, J. W., Cai, D., & Verhey, K. J. (2008). Tubulin modifications and their cellular functions. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(1), 71–76.
- Hancock Jr, J. F., & Bringham, R. S. (1981). Evolution in California populations of diploid and octoploid *Fragaria* (Rosaceae): a comparison. *American Journal of Botany*, 68(1), 1–5.
- Henery, M. L., Bowman, G., Mraz, P., Treier, U. A., Gex-Fabry, E., Schaffner, U., & Müller-Schärer, H. (2010). Evidence for a combination of pre-adapted traits and rapid adaptive change in the invasive plant *Centaurea stoebe*. *Journal of Ecology*, 98(4), 800–813.
- Heywood, V. H., Moore, D. M., Richardson, I. B. K., & Stearn, W. T. (1993). *Flowering plants of the world* (Issue 582.13 F644). Oxford university press.
- Hias, N., Svara, A., & Keulemans, J. W. (2018). Effect of polyploidisation on the response of apple

- (*Malus* × *domestica* Borkh.) to *Venturia inaequalis* infection. *European Journal of Plant Pathology*, 151(2), 515–526.
- Hollister, J. D. (2015). Polyploidy: adaptation to the genomic environment. *New Phytologist*, 205(3), 1034–1039.
- Huang, R., Liu, D., Zhao, M., Li, Z., Li, M., & Sui, S. (2015). Artificially induced polyploidization in *Lobularia maritima* (L.) Desv. and its effect on morphological traits. *HortScience*, 50(5), 636–639.
- Huff, D. R., & Palazzo, A. J. (1998). Fine fescue species determination by laser flow cytometry. *Crop Science*, 38(2), 445–450.
- Hulett, H. R., Bonner, W. A., Barrett, J., & Herzenberg, L. A. (1969). Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science*, 166(3906), 747–749.
- Husband, B. C., Baldwin, S. J., & Suda, J. (2013). The incidence of polyploidy in natural plant populations: major patterns and evolutionary processes. In *Plant genome diversity volume 2* (pp. 255–276). Springer.
- Huy, N. P., Luan, V. Q., Tung, H. T., Hien, V. T., Ngan, H. T. M., Duy, P. N., & Nhut, D. T. (2019). In vitro polyploid induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine. *Scientia Horticulturae*, 252, 283–290.
- Iannicelli, J., Guariniello, J., Tossi, V. E., Regalado, J. J., Di Ciaccio, L., van Baren, C. M., Álvarez, S. I. P., & Escandón, A. S. (2020). The “polyploid effect” in the breeding of aromatic and medicinal species. *Scientia Horticulturae*, 260, 108854.
- Ibrahim, M. K., Mattar, Z. A., Abdel-Khalek, H. H., & Azzam, Y. M. (2017). Evaluation of antibacterial efficacy of anise wastes against some multidrug resistant bacterial isolates. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 10(1), 34–43.
- Islam, Z. M., Khan, K., Rakhshanda, S., Mahdi, R., & Chowdhury, I. M. (2016). Antibacterial and phytochemical screening of *Pimpinella anisum* through optimized extraction procedure. *Asian Journal of Science and Technology*, 7(11), 3912–3918.
- Jaskani, M. J., Kwon, S. W., & Kin, D. H. (2005). Flow cytometry of DNA contents of colchicine treated watermelon as a ploidy screening method at MI stage. *Pakistan Journal of Botany*, 37(3), 685.
- Jiang, Y., Liu, S., Hu, J., He, G., Liu, Y., Chen, X., Lei, T., Li, Q., Yang, L., & Li, W. (2020). Polyploidization of *Plumbago auriculata* Lam. in vitro and its characterization including cold tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140(2), 315–325.
- Johnson, P. G., Kenworthy, K. E., Auld, D. L., & Riordan, T. P. (2001). Distribution of buffalograss polyploid variation in the southern Great Plains. *Crop Science*, 41(3), 909–913.
- Johnson, P. G., Riordan, T. P., & Arumuganathan, K. (1998). Ploidy level determinations in buffalograss clones and populations. *Crop Science*, 38(2), 478–482.
- Jordan, G. J., Carpenter, R. J., Koutoulis, A., Price, A., & Brodribb, T. J. (2015). Environmental

- adaptation in stomatal size independent of the effects of genome size. *New Phytologist*, 205(2), 608–617.
- Judd, W. S., Soltis, D. E., Soltis, P. S., & Ionta, G. (2007). *Tolmiea diplomenziesii*: A new species from the Pacific Northwest and the diploid sister taxon of the autotetraploid *T. menziesii* (Saxifragaceae). *Brittonia*, 59(3), 217–225.
- Kadhim, M. J., Sosa, A. A., & Hameed, I. H. (2016). Evaluation of anti-bacterial activity and bioactive chemical analysis of *Ocimum basilicum* using Fourier transform infrared (FT-IR) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) techniques. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 8(6), 127–146.
- Kaensaksiri, T., Soontornchainaksaeng, P., Soonthornchareonnon, N., & Prathanturug, S. (2011). In vitro induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 107(2), 187–194.
- Khan, H. (2014). Medicinal plants in light of history: recognized therapeutic modality. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 19(3), 216–219.
- Khare, C. P. (2007). *Carica papaya* Linn. *Indian Medicinal Plants (An Illustrated Dictionary)* Springer, New York, NY, USA, 122–123.
- Khazaei, H., Monneveux, P., Hongbo, S., & Mohammady, S. (2010). Variation for stomatal characteristics and water use efficiency among diploid, tetraploid and hexaploid Iranian wheat landraces. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57(2), 307–314.
- Kim, J. S., Seo, M.-S., Moon, M.-S., Won, S. Y., & Kwon, S.-J. (2019). Insight on doubled haploid production with an amphidiploid Species ‘Dolsangat’ in *Brassica juncea*. *Korean Society of Breeding Science*, 51(4), 341–350.
- Knapp, A. K. (1993). Gas Exchange Dynamics in C^3 and C^4 Grasses: Consequence of Differences in Stomatal Conductance. *Ecology*, 74(1), 113–123.
- Kosalec, I., Pepeljnjak, S., & KUŠTRAK, D. (2005). Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). *Acta Pharmaceutica*, 55(4), 377–385.
- Kossel, A. (1891). Ueber die chemische Zusammensetzung der Zelle. *Du Bois-Reymond's Archiv/Arch Anat Physiol Physiol Abt*, 278, 181–186.
- Kreydiyyeh, S. I., Usta, J., Knio, K., Markossian, S., & Dagher, S. (2003). Aniseed oil increases glucose absorption and reduces urine output in the rat. *Life Sciences*, 74(5), 663–673.
- Kumar, M. K., & Rani, M. U. (2013). Colchiploidy in Fruit Breeding-A review KEYWORDS: Colchiploidy, Colchicine. *Horticulture*, 2(6).
- Kumar, S. (2021). Impact of ploidy changes on secondary metabolites productions in plants. In *Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules* (pp. 29–46). Elsevier.
- Kushwah, K. S., Verma, R. C., Patel, S., & Jain, N. K. (2018). Colchicine induced polyploidy in *Chrysanthemum carinatum* L. *J Phylogenetics Evol Biol*, 6(193), 2.
- Laerum, O. D., & Farsund, T. (1981). Clinical application of flow cytometry: a review. *Cytometry*:

The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 2(1), 1–13.

- Lam, H. K., Harbard, J. L., & Koutoulis, A. (2014). Tetraploid induction of *Acacia crassicaarpa* using colchicine and oryzalin. *Journal of Tropical Forest Science*, 347–354.
- Lamo, J. M., & Rao, S. R. (2014). Chromosome counts in two species of *Curcuma* Linnaeus (Zingiberaceae) from North-East India. *Pleione*, 8(2), 435–438.
- Laport, R. G., Minckley, R. L., & Ramsey, J. (2012). Phylogeny and cytogeography of the North American creosote bush (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae). *Systematic Botany*, 37(1), 153–164.
- Laport, R. G., & Ramsey, J. (2015). Morphometric analysis of the North American creosote bush (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae) and the microspatial distribution of its chromosome races. *Plant Systematics and Evolution*, 301(6), 1581–1599.
- Larsen, P., & Tung, S. M. (1950). Growth-promoting and growth-retarding substances in pollen from diploid and triploid apple varieties. *Botanical Gazette*, 111(4), 436–447.
- Lata, H., Chandra, S., Techen, N., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2016). In vitro mass propagation of *Cannabis sativa* L.: a protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(1), 18–26.
- Lavania, U C. (2005). Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. *Plant Genetic Resources*, 3(2), 170–177.
- Lavania, Umesh C, Srivastava, S., Lavania, S., Basu, S., Misra, N. K., & Mukai, Y. (2012). Autopolyploidy differentially influences body size in plants, but facilitates enhanced accumulation of secondary metabolites, causing increased cytosine methylation. *The Plant Journal*, 71(4), 539–549.
- Lee, Y.-S. (1979). Remarks on chromosome numbers in Rubiaceae. *Korean Journal of Plant Taxonomy*, 9(1), 57.
- Levin, D. A. (2002). *The role of chromosomal change in plant evolution*. Oxford University Press.
- Liao, T., Cheng, S., Zhu, X., Min, Y., & Kang, X. (2016). Effects of triploid status on growth, photosynthesis, and leaf area in *Populus*. *Trees*, 30(4), 1137–1147.
- Liu, G., Li, Z., & Bao, M. (2007). Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. *Euphytica*, 157(1), 145–154.
- Liu, S., Chen, S., Chen, Y., Guan, Z., Yin, D., & Chen, F. (2011). In vitro induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance. *Scientia Horticulturae*, 127(3), 411–419.
- Liu, Y., Li, D., Yan, L., & Huang, H. (2015). The microgeographical patterns of morphological and molecular variation of a mixed ploidy population in the species complex *Actinidia chinensis*. *PloS One*, 10(2), e0117596.
- Majdi, M, Karimzadeh, G., & Malboobi, M. A. (2014). Spatial and developmental expression of key genes of terpene biosynthesis in *Tanacetum parthenium*. *Biologia Plantarum*, 58(2), 379–

- Majdi, Mohammad, Karimzadeh, G., Malboobi, M. A., Omidbaigi, R., & Mirzaghaderi, G. (2010). Induction of tetraploidy to feverfew (*Tanacetum parthenium* Schulz-Bip.): Morphological, physiological, cytological, and phytochemical changes. *HortScience*, 45(1), 16–21.
- Manzoor, A., Ahmad, T., Bashir, M. A., Hafiz, I. A., & Silvestri, C. (2019). Studies on colchicine induced chromosome doubling for enhancement of quality traits in ornamental plants. *Plants*, 8(7), 194.
- Marston, A. (2007). Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry*, 68(22–24), 2786–2798.
- Martin, C., Viruel, M., Lora, J., & Hormaza, J. I. (2019). Polyploidy in fruit tree crops of the genus *Annona* (Annonaceae). *Frontiers in Plant Science*, 99.
- Martinez-Arribas, F., Nunez, M. J., Piqueras, V., Lucas, A. R., Sanchez, J., Tejerina, A., & Schneider, J. (2002). Flow cytometry vs. Ki67 labelling index in breast cancer: a prospective evaluation of 181 cases. *Anticancer Research*, 22(1A), 295–298.
- Maru, B., Parihar, A., Kulshrestha, K., & Vaja, M. (2021). Induction of polyploidy through colchicine in cotton (*Gossypium herbaceum*) and its conformity by cytology and flow cytometry analyses. *Journal of Genetics*, 100(2), 1–10.
- Marzougui, N., Boubaya, A., Thabti, I., Elfalleh, W., Guasmi, F., & Ferchichi, A. (2011). Polyploidy induction of Tunisian *Trigonella foenumgraecum* L. populations. *African Journal of Biotechnology*, 10(43), 8570–8577.
- Matan, N., & Matan, N. (2008). Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(1), 75–78.
- Mathura, S., Fossey, A., & Beck, S. L. (2006). Comparative study of chlorophyll content in diploid and tetraploid black wattle (*Acacia mearnsii*). *Forestry*, 79(4), 381–388.
- McAllister, C., Blaine, R., Kron, P., Bennett, B., Garrett, H., Kidson, J., Matzenbacher, B., Glotzbach, A., & Miller, A. J. (2015). Environmental correlates of cytotype distribution in *Andropogon gerardii* (Poaceae). *American Journal of Botany*, 102(1), 92–102.
- Meng, H.-B., Jiang, S.-S., Hua, S.-J., Lin, X.-Y., Li, Y.-L., Guo, W.-L., & Jiang, L.-X. (2011). Comparison between a tetraploid turnip and its diploid progenitor (*Brassica rapa* L.): the adaptation to salinity stress. *Agricultural Sciences in China*, 10(3), 363–375.
- Mirheydar, H. (2001). Herbal information: usage of plants in prevention and treatment of diseases. *Tehran, Iran: Islamic Culture Press Center*, 12–19.
- Mishra, B. K., Pathak, S., Sharma, A., Trivedi, P. K., & Shukla, S. (2010). Modulated gene expression in newly synthesized auto-tetraploid of *Papaver somniferum* L. *South African Journal of Botany*, 76(3), 447–452.
- Moghbel, N., Borujeni, M. K., & Bernard, F. (2015). Colchicine effect on the DNA content and stomata size of *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera* and *Carthamus tinctorius* L. cultured in

- vitro. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(1), 1–6.
- Mozaffarian, V. (2007). Umbelliferae in flora of Iran no. 54. *Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran*, 596p.
- Mráz, P., Bouchier, R. S., Treier, U. A., Schaffner, U., & Müller-Schärer, H. (2011). Polyploidy in phenotypic space and invasion context: a morphometric study of *Centaurea stoebe* sl. *International Journal of Plant Sciences*, 172(3), 386–402.
- Muchow, R. C., & Sinclair, T. R. (1989). Epidermal conductance, stomatal density and stomatal size among genotypes of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant, Cell & Environment*, 12(4), 425–431.
- MURASHIGE, T., & NAKANO, R. (1966). Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants. *Journal of Heredity*, 57(4), 115–118.
- Niazian, M., & Nalousi, A. M. (2020). Artificial polyploidy induction for improvement of ornamental and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142(3), 447–469.
- Niel, E., & Scherrmann, J.-M. (2006). Colchicine today. *Joint Bone Spine*, 73(6), 672–678.
- Nilanthi, D., Chen, X.-L., Zhao, F.-C., Yang, Y.-S., & Wu, H. (2009). Induction of tetraploids from petiole explants through colchicine treatments in *Echinacea purpurea* L. *BioMed Research International*, 2009.
- Ning, G.-G., Shi, X.-P., Hu, H.-R., Yan, Y., & Bao, M.-Z. (2009). Development of a range of polyploid lines in *petunia hybrida* and the relationship of ploidy with the single-/double-flower trait. *HortScience*, 44(2), 250–255.
- Ochatt, S. J., Patat-Ochatt, E. M., & Moessner, A. (2011). Ploidy level determination within the context of in vitro breeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(3), 329–341.
- Oezel, A. (2009). Anise (*Pimpinella anisum*): changes in yields and component composition on harvesting at different stages of plant maturity. *Experimental Agriculture*, 45(1), 117–126.
- Offermann, S., & Peterhansel, C. (2014). Can we learn from heterosis and epigenetics to improve photosynthesis? *Current Opinion in Plant Biology*, 19, 105–110.
- Okigbo, R. N., Anuagasi, C. L., & Amadi, J. E. (2009). Advances in selected medicinal and aromatic plants indigenous to Africa. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(2), 86–95.
- Omidbaigi, R., Hadjiakhoondi, A., & Saharkhiz, M. (2003). Changes in content and chemical composition of *Pimpinella anisum* oil at various harvest time. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 6(1), 46–50.
- Omidbaigi, Reza, Yavari, S., Hassani, M. E., & Yavari, S. (2010). Induction of autotetraploidy in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatment. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 18(1), 23–35.
- Otto, S. P., & Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, 34(1), 401–437.

- Özcan, M. M., & Chalchat, J. C. (2006). Chemical composition and antifungal effect of anise (*Pimpinella anisum* L.) fruit oil at ripening stage. *Annals of Microbiology*, 56(4), 353–358.
- Parisod, C., Holderegger, R., & Brochmann, C. (2010). Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist*, 186(1), 5–17.
- Phulari, S. S. (2011). Polyploidy breeding in *Urgenia indica*– to study the effect of colchicines treatment on morphological character of *Urgenia indica*. *Indian Streams Res. J*, 1, 207–210.
- Picon, P. D., Picon, R. V, Costa, A. F., Sander, G. B., Amaral, K. M., Aboy, A. L., & Henriques, A. T. (2010). Randomized clinical trial of a phytotherapeutic compound containing *Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*, *Sambucus nigra*, and *Cassia augustifolia* for chronic constipation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 1–9.
- Pimenov, M. G., & Leonov, M. V. (1993). *The genera of the Umbelliferae: a nomenclator*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Pliankong, P., Suksa-Ard, P., & Wannakrairoj, S. (2017). Effects of Colchicine and Oryzalin on Polyploidy Induction and Production of Capsaicin in *Capsicum frutescens* L. Pawnsipirun. *Thai Journal of Agricultural Science*, 50(2), 108–120.
- Puangsomlee, P., & Puff, C. (2001). Chromosome numbers of Thai Rubiaceae. *Nordic Journal of Botany*, 21(2), 165–176.
- Qiu, Y., Hirsch, C. D., Yang, Y., & Watkins, E. (2019). Towards improved molecular identification tools in fine fescue (*Festuca* L., Poaceae) turfgrasses: nuclear genome size, ploidy, and chloroplast genome sequencing. *Frontiers in Genetics*, 1223.
- Rauf, S., Munir, H., Abdullojon, E., & Basra, S. M. (2006). Role of colchicine and plant growth regulators to overcome interspecific incompatibility. *Gen. Appl. Plant Physiol*, 32(3–4), 223–232.
- Raza, H., Jaskani, M. J., Khan, M. M., & Malik, T. A. (2003). In vitro induction of polyploids in watermelon and estimation based on DNA content. *Int. J. Agri. Biol*, 5(3), 298–302.
- Regalado González, J. J., Carmona Martín, E., Querol, V., Vélez, C. G., Encina, C. L., & Pitta-Alvarez, S. I. (2017). *Production of compact petunias through polyploidization*.
- Rêgo, M. M. do, Rêgo, E. R., Bruckner, C. H., Finger, F. L., & Otoni, W. C. (2011). In vitro induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 107(3), 451–459.
- Rice, A., Glick, L., Abadi, S., Einhorn, M., Kopelman, N. M., Salman-Minkov, A., Mayzel, J., Chay, O., & Mayrose, I. (2015). The Chromosome Counts Database (CCDB)—a community resource of plant chromosome numbers. *New Phytologist*, 206(1), 19–26.
- Rosenzweig, C., Iglesias, A., Yang, X.-B., Epstein, P. R., & Chivian, E. (2001). *Climate change and extreme weather events-Implications for food production, plant diseases, and pests*.
- Ross, I. A. (2001). *Chemical Constituents, Traditional, and Modern Medicinal Uses*. Humana Press.
- Roughani, A., Miri, S. M., Kashi, A. K., & Khiabani, B. N. (2017). Increasing the ploidy level in

- spinach (*Spinacia oleracea* L.) using mitotic inhibitors. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 18(3&4), 124–130.
- Roy, A., Leggett, G., & Koutoulis, A. (2001). In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Reports*, 20(6), 489–495.
- 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. *Tarbiat Modares University, Tehran.[in Farsi]*.
- Sajjad, Y., Jaskani, M. J., Mehmood, A., Ahmad, I., & Abbas, H. (2013). Effect of colchicine on in vitro polyploidy induction in African marigold (*Tagetes erecta*). *Pak. J. Bot*, 45(3), 1255–1258.
- Salma, U., Kundu, S., & Mandal, N. (2017). Artificial polyploidy in medicinal plants: advancement in the last two decades and impending prospects. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 20(1), 9–19.
- Samojlik, I., Mijatović, V., Petković, S., Škrbić, B., & Božin, B. (2012). The influence of essential oil of aniseed (*Pimpinella anisum*, L.) on drug effects on the central nervous system. *Fitoterapia*, 83(8), 1466–1473.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2016). The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, 243(2), 281–296.
- Schwaegerle, K. E., Garbutt, K., & Bazzaz, F. A. (1986). Differentiation among nine populations of *Phlox*. I. Electrophoretic and quantitative variation. *Evolution*, 40(3), 506–517.
- Šedivá, J., Mrázková, M., Zahumenická, P., Cusimamani, E. F., & Zahradník, D. (2019). Identification of *Phytophthora* tolerance in the *Anemone sylvestris* tetraploid. *Scientia Horticulturae*, 256, 108579.
- Shibamoto, K., Mochizuki, M., & Kusuhaara, M. (2010). Aroma therapy in anti-aging medicine. *Anti-Aging Medicine*, 7(6), 55–59.
- Shner, J. V., Pimenov, M. G., Kljuykov, E. V., Alexeeva, T. V., Ghahremani-nejad, F., & Mozaffarian, V. (2004). Chromosome numbers in the Iranian Umbelliferae. *Chromosome Science*, 8(1), 1.
- Shobha, R. I., Rajeshwari, C. U., & Andallu, B. (2013). Anti-peroxidative and anti-diabetic activities of aniseeds (*Pimpinella anisum* L.) and identification of bioactive compounds. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 1(5), 516–527.
- Singh, R. J. (2016). *Plant cytogenetics*. CRC press.
- Singh, R. J. (2017). *Practical manual on plant cytogenetics*. CRC press.
- Sirisha, K. B., & Sujathamma, P. (2018). In vitro propagation of few *Pimpinella* species, a review. *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 4(5), 337–344.
- Soliman, K. M., & Badeaa, R. I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on

- different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40(11), 1669–1675.
- Soltis, D. E., Albert, V. A., Leebens-Mack, J., Bell, C. D., Paterson, A. H., Zheng, C., Sankoff, D., de Pamphilis, C. W., Wall, P. K., & Soltis, P. S. (2009). Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany*, 96(1), 336–348.
- Soltis, D. E., Visger, C. J., Marchant, D. B., & Soltis, P. S. (2016). Polyploidy: pitfalls and paths to a paradigm. *American Journal of Botany*, 103(7), 1146–1166.
- Soltis, P. S., Marchant, D. B., Van de Peer, Y., & Soltis, D. E. (2015). Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Genetics & Development*, 35, 119–125.
- Sosa, M. M., & Dematteis, M. (2014). *Stemodia diplohyptoides* (Plantaginaceae, Gratiolae): a new diploid species from South America. *Phytotaxa*, 186(5), 271–278.
- Španiel, S., Marhold, K., Hodálová, I., & Lihová, J. (2008). Diploid and tetraploid cytotypes of *Centaurea stoebe* (Asteraceae) in Central Europe: morphological differentiation and cytotype distribution patterns. *Folia Geobotanica*, 43(2), 131–158.
- Ståhlberg, D. (2009). Habitat differentiation, hybridization and gene flow patterns in mixed populations of diploid and autotetraploid *Dactylorhiza maculata* sl (Orchidaceae). *Evolutionary Ecology*, 23(2), 295–328.
- Stanys, V., Weckman, A., Staniene, G., & Duchovskis, P. (2006). In vitro induction of polyploidy in Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84(3), 263–268.
- Stebbins, G. (1950). *Variation and Evolution in Plants* Columbia University press New York Google Scholar.
- Stebbins, G. L. (1971). Chromosomal evolution in higher plants. *Chromosomal Evolution in Higher Plants*.
- Sugiyama, S.-I. (2005). Polyploidy and cellular mechanisms changing leaf size: comparison of diploid and autotetraploid populations in two species of *Lolium*. *Annals of Botany*, 96(5), 931–938.
- Sun, W., Shahrajabian, M. H., & Cheng, Q. (2019). Anise (*Pimpinella anisum* L.), a dominant spice and traditional medicinal herb for both food and medicinal purposes. *Cogent Biology*, 5(1), 1673688.
- Tabanca, N., Demirci, B., Kirimer, N., Baser, K. H. C., Bedir, E., Khan, I. A., & Wedge, D. E. (2005). Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella aurea*, *Pimpinella corymbosa*, *Pimpinella peregrina* and *Pimpinella puberula* gathered from Eastern and Southern Turkey. *Journal of Chromatography A*, 1097(1–2), 192–198.
- Tabanca, N., Demirci, B., Ozek, T., Kirimer, N., Baser, K. H. C., Bedir, E., Khan, I. A., & Wedge, D. E. (2006). Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey. *Journal of Chromatography A*, 1117(2), 194–205.
- Tate, J. A., & Simpson, B. B. (2004). Breeding system evolution in *Tarasa* (Malvaceae) and

- selection for reduced pollen grain size in the polyploid species. *American Journal of Botany*, 91(2), 207–213.
- Tavan, M., Mirjalili, M. H., & Karimzadeh, G. (2015). In vitro polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(3), 573–583.
- Te Beest, M., Le Roux, J. J., Richardson, D. M., Brysting, A. K., Suda, J., Kubešová, M., & Pyšek, P. (2012). The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany*, 109(1), 19–45.
- Tepe, B., Akpulat, H. A., Sokmen, M., Daferera, D., Yumrutas, O., Aydin, E., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2006). Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chemistry*, 97(4), 719–724.
- Thao, N. T. P., Ozaki, Y., & Okubo, H. (2003). Callus induction and plantlet regeneration in ornamental *Alocasia micholitziana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73(3), 285–289.
- Thao, N. T. P., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y., & Okubo, H. (2003). Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(1), 19–25.
- Thompson, J. A., & Markey, S. P. (1975). Quantitative metabolic profiling of urinary organic acids by gas chromatography-mass spectrometry. Comparison of isolation methods. *Analytical Chemistry*, 47(8), 1313–1321.
- Tripathi, L., & Tripathi, J. N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2(2), 243–253.
- Tsukaya, H. (2008). Controlling size in multicellular organs: focus on the leaf. *PLoS Biology*, 6(7), e174.
- Tunbridge, N. D., Sears, C., & Elle, E. (2011). Variation in floral morphology and ploidy among populations of *Collinsia parviflora* and *Collinsia grandiflora*. *Botany*, 89(1), 19–33.
- Tuncturk, M., & Yildirim, B. (2006). Effect of seed rates on yield and yield components of anise (*Pimpinella anisum*). *Indian Journal of Agricultural Science*, 76(11), 679–681.
- Ullah, H., Mahmood, A., & Honermeier, B. (2014). Essential oil and composition of anise (*Pimpinella anisum* L.) with varying seed rates and row spacing. *Pakistan Journal of Botany*, 46(5), 1859–1864.
- Van Bakel, H., Stout, J. M., Cote, A. G., Tallon, C. M., Sharpe, A. G., Hughes, T. R., & Page, J. E. (2011). The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. *Genome Biology*, 12(10), 1–18.
- Vital, P. G., & Rivera, W. L. (2009). Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Chromolaena odorata* (L. f.) King and Robinson and *Uncaria perrottetii* (A. Rich) Merr. Extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(7), 511–518.
- Vyas, G. D. (1999). Soil fertility deterioration in crop land due to pesticide. *Journal of the Indian*

- Botanical Society*, 78(1–2), 177–178.
- Warner, D. A., & Edwards, G. E. (1993). Effects of polyploidy on photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 35(2), 135–147.
- Watrous, S. B., & Wimber, D. E. (1988). Artificial induction of polyploidy in *Paphiopedilum Lindleyana*, 3(4), 177–183.
- Wedeen, R. P. (1984). *Poison in the pot: the legacy of lead*. Southern Illinois University Press Carbondale.
- Wei-Seng, H. O., Wee-Hiang, E. N. G., & Kwong-Hung, L. (2021). Cytogenetic, chromosome count optimization and automation of *Neolamarckia cadamba* (Rubiaceae) root tips derived from in vitro mutagenesis. *Notulae Scientia Biologicae*, 13(3), 10995.
- Winarto, B., Mattjik, N. A., da Silva, J. A. T., Purwito, A., & Marwoto, B. (2010). Ploidy screening of anthurium (*Anthurium andreaeanum* Linden ex André) regenerants derived from anther culture. *Scientia Horticulturae*, 127(1), 86–90.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3–19.
- Wink, M. (2008). Evolution of secondary plant metabolism. *ELS*.
- Wood, T. E., Takebayashi, N., Barker, M. S., Mayrose, I., Greenspoon, P. B., & Rieseberg, L. H. (2009). The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 13875–13879.
- Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkon, F., Saharkhiz, M. J., & Salamifar, E. (2008). Extraction of essential oil from *Pimpinella anisum* using supercritical carbon dioxide and comparison with hydrodistillation. *Natural Product Research*, 22(3), 212–218.
- Yan, P. A. N., XU, Y., ZHU, X., Zhe, L. I. U., GONG, Y., Liang, X. U., GONG, M., & LIU, L. (2014). Molecular characterization and expression profiles of myrosinase gene (RsMyr2) in radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Integrative Agriculture*, 13(9), 1877–1888.
- Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y.-X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762.
- Yunus, A., Hikam, M. P., & Widyastuti, Y. (2018). Polyploid response of *Artemisia annua* L. to colchicine treatment. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 142(1), 12020.
- Zahedi, A. A., Hosseini, B., Fattahi, M., Dehghan, E., Parastar, H., & Madani, H. (2014). Overproduction of valuable methoxylated flavones in induced tetraploid plants of *Dracocephalum kotschy* Boiss. *Botanical Studies*, 55(1), 1–10.
- Zahumenická, P., Fernández, E., Šedivá, J., Žiarovská, J., Ros-Santaella, J. L., Martínez-Fernández, D., Russo, D., & Milella, L. (2018). Morphological, physiological and genomic comparisons between diploids and induced tetraploids in *Anemone sylvestris* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 132(2), 317–327.
- Zaman, Q. U., Li, C., Cheng, H., & Hu, Q. (2019). Genome editing opens a new era of genetic

improvement in polyploid crops. *The Crop Journal*, 7(2), 141–150.

Zozomová-Lihová, J., Malánová-Krásná, I., Vít, P., Urfus, T., Senko, D., Svitok, M., Kempa, M., & Marhold, K. (2015). Cytotype distribution patterns, ecological differentiation, and genetic structure in a diploid–tetraploid contact zone of *Cardamine amara*. *American Journal of Botany*, 102(8), 1380–1395.

Abstract

Plant chromosome manipulation is one of the powerful methods of plant breeding due to its effect on some genetic traits and diversity. Besides, colchicine is a polyploidy inductive compound that has been used successfully to increase ploidy levels in plant species. In order to investigate the effect of polyploidy induction in anise (*Pimpinella anisum* L.), two different concentrations of colchicine (0.0001, 0.005 and 0.05) were investigated. In this study, the seeds and terminal buds of the five-week-old seedlings were separately treated with the mentioned colchicine concentrations and were repeated for three consecutive days. Besides, molecular, physiological and morphological traits in control (diploid) and induced (auto-tetraploid) plants, which were created by terminal bud treatment, were investigated. The results showed that colchicine at 0.001 had no significant effect on seedlings, while significant effects were observed in 0.005 and 0.05 concentrations. Larger stomatal size, lower stomatal density and darker leaf color were observed in seedlings treated with concentrations higher than 0.005 colchicine concentrations. The content of DNA, RNA and total protein in these seedlings also increased. In general, the findings of this study indicated that colchicine can change the ploidy level of anise at 0.005 and 0.05 and increase the leaf size and pigments associated with photosynthesis and thus produce stronger plants. The results of this study are the first report on the production of auto--tetraploid seedlings in Anise, and these findings could be useful in future plant breeding programs related to this plant species.

Keywords: Polyploidy induction, plant vigor, medicinal plants, colchicine, ploidy levels.



Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis Plant biotechnology

The study of polyploidy induction on *Anise (Pimpinella anisum L)*

By: Hanyeh Ahmadinia

Supervisor:

Dr. Parviz Heidari

February 2022