زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال ششم، شماره بیست و دوم، زمستان ۱۳۹۳، صفحه ۱۱۷-۱۲۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۶/۰۹
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۲/۱۲/۱۲
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۷/۳۰

تأثیر القای تتراپلوئیدی بر ویژگی‌های مورفولوژیک و ساختاری گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa* L.)

مهسا باقری و حکیمه منصوری *
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده

القای تتراپلوئیدی در گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) با روش قطره چکان در غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد کلشی‌سین در مدت زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. به منظور تعیین سطح پلوئیدی، آنالیز فلوسایتومتری انجام شد و صفات مورفولوژیک و ساختاری گیاهان تتراپلوئید القایی و دیپلوئید بررسی شد. بر اساس نتایج به دست آمده بهترین غلظت کلشی سین جهت القای تتراپلوئیدی ۰/۲ درصد بود. با افزایش مدت زمان تیمار، درصد گیاهان تتراپلوئید و درصد زنده مانی کاهش یافت. همچنین، شاخص برگ (عرض/طول) و ارتفاع گیاهان تتراپلوئید کاهش معنی داری در مقایسه با گیاهان دیپلوئید نشان داد. اندازه روزنه اپیدرم برگ گیاهان تتراپلوئید بزرگتر از گیاهان دیپلوئید بود در حالی که این گیاهان تراکم روزنه ای کمتری داشتند. مقدار کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید تفاوت معنی‌داری نداشت. همچنین، برش عرضی ساقه این گیاهان تفاوت‌هایی از نظر ساختار تشریحی نشان داد. نتایج نشان داد که شاخص‌های روزنه‌ای راه مؤثر و آسانی برای تشخیص گیاهان تتراپلوئید است در حالی که برای تشخیص درصد پلوئیدی، آنالیز فلوسایتومتری توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تتراپلوئیدی، صفات مورفولوژیک، فلوسایتومتری، کلشی‌سین، گیاه شاهدانه

مقدمه

شاهدانه (*Cannabis sativa*) از قدیمی‌ترین گیاهانی است که به دلیل داشتن فیبر و ویژگی های دارویی در صنعت نساجی و طب سنتی به وفور استفاده می شود. کانابینوئیدها گروهی از ترکیبات ترپنوفنولیک ۲۱ کربنه هستند که فقط در گیاه شاهدانه شناسایی شده‌اند (Mechoulam and Gaoni, 1967). پس از پیشرفت‌هایی که در سنتز کانابینوئیدهایی نظیر نابیلون (nabilone) (Ward and Holmes, 1985) و آجولمیک اسید (ajulemic acid) (Burstein *et al*., 1992) به دست آمد، واژه فیتوکانابینوئید برای ترکیبات ویژه شاهدانه پیشنهاد شد (Pate, 1999). تجمع

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: h_mansouri@mail.uk.ac.ir، شماره تماس: ۰۴۳۳۳۲۲۲۰۳۲

کانابینوئیدها بیشتر در تریکوم‌های غده‌ای گیاه شاهدانه مشاهده شده است (Hammond and Mahlberg, 1977). ترکیبات اصلی به صورت رزین در تریکوم‌های غده‌ای پایه‌های ماده فراوان‌تر هستند و از زمان نخستین ظهور گل‌ها تا زمان بالغ شدن دانه‌ها تولید می‌شوند (Duke, 2001). بر پایه میزان تتراهیدروکانابینوئید، گیاه شاهدانه دارای انواع فیبر و دارویی است.

دستکاری پلی‌پلوئیدی به طور موفقیت‌آمیز در برنامه‌های به‌نژادی گیاهان، به منظور تسهیل تولید واریته‌های برتر در بسیاری از گونه‌های گیاهی استفاده شده است. گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به انواع دیپلوئید همان گونه اغلب فنوتیپ جدیدی را نشان می‌دهند و از محدوده صفات اجداد دیپلوئید خود در ویژگی‌هایی نظیر: افزایش مقاومت به خشکی، آپومیکسی، مقاومت در برابر حشرات، افزایش بیوماس و تغییر در کیفیت و غلظت ترکیبات فعال برتر از گیاهان دیپلوئید هستند؛ در نتیجه، احتمال انتخاب آنها در کشاورزی افزایش می‌یابد (Zargari, 1998).

تمام گونه‌های طبیعی و هیبرید جنس شاهدانه دیپلوئید هستند و نوع پلی‌پلوئید آن به طور طبیعی بسیار نادر است. بنابراین، تولید تتراپلوئید در شاهدانه نیازمند القای مصنوعی لاین‌های تتراپلوئید است. دو برابر کردن عدد کروموزومی می‌تواند با استفاده از مهارکننده‌های دوک میتوزی به دست آید. ترکیبات شیمیایی جهش‌زا با جلوگیری از پلیمریزه شدن میکروتوبول‌ها و به دنبال آن مهاجرت قطبی کروموزوم‌ها در آنافاز، میتوز را مختل می‌کنند. استفاده از کلشی‌سین، آلکالوئید استخراج شده از دانه و ساقه گیاه سورنجان پاییزی (*Colchicum autumnale* L.) امکانات وسیعی در القای پلی‌پلوئیدی ایجاد کرده است (Hassawi and Liang, 1991).

تغییر در سطح پلوئیدی، تعدادی از صفات تشریحی و مورفولوژیک نظیر: ضخامت برگ، ساقه‌ها و ریشه‌ها، نسبت طول به عرض برگ، اندازه روزنه، اندازه و بافت گل، دوره گل دهی و قطر دانه گرده را تغییر می‌دهد (Gao *et al*., 1996). به علاوه، گیاهان پلی‌پلوئید پایه ژرم‌پلاسم وسیع‌تری برای مهندسی ژنتیک ایجاد می‌کنند (Thao *et al*., 2003).

القای پلی پلوئیدی راهکاری مناسب برای اصلاح صفات دلخواه و روش به‌نژادی مؤثر برای ایجاد تنوع زیستی است (Griesbach and Bhat, 1990؛ Nakano *et al*., 2006؛ Chakraborti *et al*., 1998). القای تتراپلوئیدی می‌تواند روش مؤثری برای افزایش بیوماس و بهبود صفات دارویی و تزیینی باشد. برگ، ساقه و ریشه که اندام های مفید در گیاهان دارویی به شمار می‌آیند، در گیاهان تتراپلوئید معمولا نسبت به گیاهان دیپلوئید بزرگتر هستند (Gao *et al*., 1996).

در پژوهش حاضر، تتراپلوئیدی توسط کلشی سین القای شد، همچنین ویژگی‌های مورفولوژیک و ساختاری گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید القایی و تأثیر تتراپلوئیدی بر برش عرضی ساقه وگستردگی فیبرها مطالعه شد.

کاشت گیاه: دانه‌های ضد عفونی شده شاهدانه در گلدان‌هایی پر شده با پرلیت با قطر ۱۰ سانتی متر کشت شد. پس از رویش، تعداد گیاهان به یک گیاه در هر گلدان کاهش یافت. گیاهان تا آغاز گل دهی (حدود ۱۲۰ روز) در فیتوترون گلخانه با حرارت روشنایی و

تاریکی ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتیگراد و دوره روشنایی ۱۶ ساعت و تاریکی ۸ ساعت قرار گرفتند و یک روز در میان با محلول هوگلند ۱/۲ آبیاری شدند (Hoagland and Arnon, 1950).

برای القای تتراپلوئیدی در گیاه شاهدانه، مریستم رأسی ۱۸۰ گیاهچه در مرحله رشد دو برگی اولیه (۷ روزه) با ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ درصد از محلول آبی کلشی‌سین به همراه ۰/۵ درصد دی متیل سولفوکسید و توین ۲۰ به عنوان سورفاکتانت، با روش قطره چکان در دو مدت زمان تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعتی با فواصل زمانی به ترتیب ۶ و ۱۲ ساعت تیمار شد. در زمان اعمال تیمار، گیاهچه های تیمار شده با پلاستیک پوشیده شدند تا از زود خشک شدن محلول کلشی‌سین جلوگیری شود.

تعیین سطح پلوئیدی با دستگاه فلوسایتومتری: دستگاه فلوسایتومتر برای برآورد صحیح میزان DNA هسته‌ای گیاهانی که از نظر ظاهری تتراپلوئید شناخته شدند استفاده شد. گیاهان شاهد نیز برای مقایسه استفاده شدند و قله به دست آمده از آنها مبنای مقایسه میزان ژنوم هسته قرار گرفت. در این پژوهش، برای آنالیز سطح پلوئیدی، از برگ های دوم گیاهان، ۵۰ روز پس از اعمال تیمار، قطعاتی به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر مربع تهیه شد، ۴۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج هسته (محلول A کیت دستگاه) روی آنها ریخته شد و مقاطع برگ با تیغ تیز (به منظور جلوگیری از له‌شدگی بافت) کاملا له شد. سپس محلول به دست آمده از صافی‌های دستگاه عبور داده شد، ۱۶۰۰ میکرولیتر محلول رنگ‌آمیزی هسته DAPI (محلول B کیت) به آن افزوده و پس از گذشت یک دقیقه برای شمارش به دستگاه داده شد. به طور معمول، برای هر نمونه حجم حداقل ۵۰۰۰ هسته توسط دستگاه اندازه‌گیری و پیک‌های به دست آمده با نرم‌افزار Mode Fit تفسیر گردید.

مقایسه ویژگی‌های ظاهری بین گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید: پس از شناسایی گیاهان تتراپلوئید ۱۰۰ درصد (خالص) از طریق آنالیز فلوسایتومتری، گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید از نظر شکل برگ، سطح برگ، شاخص‌های روزنه‌ای، ارتفاع، وزن تر ساقه و ریشه، میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید با هم مقایسه شدند.

ارزیابی شاخص‌های روزنه‌ای در گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید: بدین منظور، برگ دوم از گیاهان تتراپلوئید ۱۰۰ درصد (خالص) و دیپلوئید در مرحله ۶ جفت برگی حقیقی جدا شد. سپس طرحی از لایه اپیدرم زیری برگ توسط لاک ناخن بی‌رنگ برداشته شد. بدین منظور بخشی از برگ (۵×۱۰ سانتی‌متر) که ترجیحا فاقد رگبرگ اصلی بود توسط لاک پوشانده و پس از ۱۲ دقیقه خشک شد. لاک خشک شده توسط یک انبرک تیز از گوشه برداشته شد، روی لام گذاشته و با لامل پوشیده شد و با میکروسکوپ نوری در دو بزرگ‌نمایی ۱۰ و ۴۰ برای محاسبه شاخص‌های روزنه‌ای بررسی شد. برای هر نمونه سه اسلاید تهیه شد و طول و عرض ۲۰ نمونه در هر اسلاید با عدسی میکرومتری اندازه‌گیری شد (Hamill *et al*., 1992). برای تعیین تراکم روزنه‌ای در اسلایدهای تهیه شده از گیاهان شاهد و تتراپلوئید، ۵ میدان دید میکروسکوپی برای هر نمونه محاسبه گردید.

تهیه برش عرضی ساقه: برای بررسی ساختار تشریحی ساقه، از میان گره سوم ساقه گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید پس از ۷۵ روز به طور دستی برش گیری شد. قطعه یک سانتی‌متری از میان گره سوم در بین دو قطعه یونولیت قرار گرفت و برش نازک توسط اسکالپل گرفته شد. برش تهیه شده روی لام قرار گرفت و با میکروسکوپ نوری مدل زایس با بزرگ‌نمایی ۱۰ مطالعه شد.

محاسبه سطح برگ گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید: برای مقایسه سطح برگ در گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید، برگ سوم از رأس ساقه هر گیاه جدا شد. از برگ‌های جدا شده کپی کاغذی تهیه و وزن کپی مورد نظر با ترازو اندازه‌گیری شد. یک سانتی‌متر مربع از کادر کاغذ نیز جداگانه وزن شد، با محاسبه نسبت وزن برگ به وزن یک سانتی‌متر مربع از کاغذ (رابطه تناسبی) سطح هر برگ محاسبه و مقایسه شد.

سنجش کلروفیل و کاروتنوئید: برای سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئید از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استفاده شد. ۰/۲ گرم از برگ‌های تازه گیاه در هاون چینی همراه با ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد و پس از صاف کردن، جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible (مدل Cary-50، شرکت Varian، استرالیا) در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. برای تنظیم دستگاه از استون ۸۰ درصد به عنوان شاهد استفاده گردید. غلظت رنگیزه‌های گیاهی با استفاده از رابطه‌های ۱ تا ۴ محاسبه گردید. Chl.a، Chl.b، Chl.T و Car به ترتیب: غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (شامل کاروتن و گرانتوفیل) است (Lichtenthaler, 1987). نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی بر حسب گرم/میلی‌گرم وزن تر محاسبه و ارایه گردید.

رابطه ۱: $Chl.a=(12.25A_{663.2}-2.79A_{646.8})$

رابطه ۲: $Chl.b=(21.51A_{646.8}-5.1\ A_{663.2})$

رابطه ۳: $Chl.T=Chl.a+Chl.b$

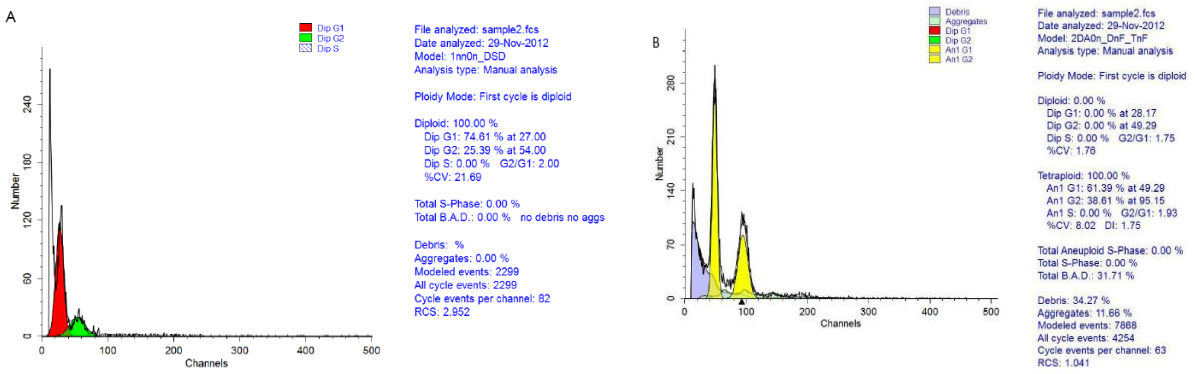
رابطه ۴:

$Car=[(1000A_{470}-1.8\ Chl.a-85.02\ Chl.b)/198]$

تحلیل آماری: تمامی مراحل آزمایش با ۳ تکرار انجام شد، میانگین‌ها با آزمون توکی در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ در سطح احتمال ۰/۰۵ مقایسه شدند.

نتایج

القای تتراپلوئیدی در گیاه شاهدانه: شدت فلورسانس هسته گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید توسط دستگاه فلوسیتومتر مشخص شد. در نمایه‌های رسم شده توسط فلوسیتومتر، محور Y نشان دهنده تعداد هسته‌های شمارش شده و محور X نشان دهنده شدت فلورسنس نسبی DNA است که بیانگر حجم DNA هسته‌ها است. در نمایه‌های فلوسیتومتری هسته‌هایی که دارای مقادیر مساوی DNA هستند، یک قله (پیک) را تشکیل می‌دهند. یک قله G1 و قله دیگر (با میزان دو برابر) فاز G2/M سیکل سلولی را مشخص می‌سازد. قله G1 و قله G2 نمونه دیپلوئید به ترتیب شدت فلورسنس ۲۷ و ۵۴ را نشان دادند در حالی که قله G1 و قله G2 نمونه تتراپلوئید به ترتیب شدت فلورسنس ۴۸/۳۳ و ۹۴/۵۶ را نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱- هیستوگرام محتوای DNA استخراج شده از برگ گیاهان دیپلوئید (A) و تتراپلوئید (B) گیاه شاهدانه

مدت زمان تیمار بر درصد زنده مانی و تعداد گیاه تتراپلوئید خالص تأثیر معنی داری داشت. با افزایش مدت زمان تیمار درصد گیاهان تتراپلوئید و درصد زنده‌مانی کاهش یافت. به طوری که در گیاه شاهدانه اعمال غلظت ۰/۲ درصد کلشی‌سین به مدت ۲۴ ساعت بیشترین درصد گیاهان تتراپلوئید خالص (۱۶/۳۶درصد) با زنده مانی ۸۱/۱۰۰ درصد را تولید کرد و دو غلظت دیگر در دو مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت هیچ گیاه تتراپلوئیدی را تولید نکرد.

مقایسه شکل و سطح برگ: بررسی شکل برگ (شکل ۲) نشان داد که سطح برگ گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید شاهدانه به طور معنی داری افزایش یافته است (جدول ۱). علاوه بر این، برگ گیاهان تتراپلوئید چین‌خورده و ناصاف بودند. همچنین، گیاهان تتراپلوئید برگ‌های کوتاه‌تر با عرض بیشتری داشتند و شاخص برگ (عرض/طول برگ) از ۴/۴۷ به ۲/۶۸ کاهش داشت (جدول ۲). در برخی از برگ‌های گیاهان تتراپلوئید تعداد برگچه‌ها از ۵ به ۴ کاهش یافت (شکل ۲).

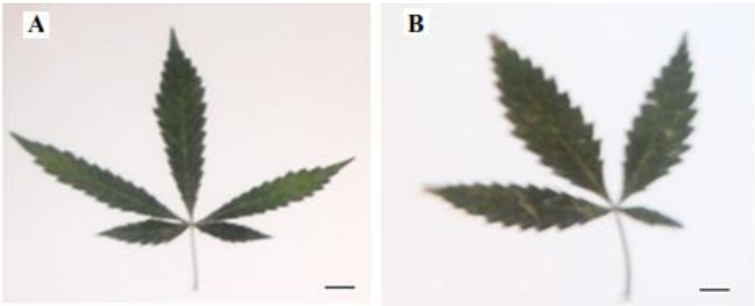
مقایسه طول، عرض و تراکم روزنه: تغییرات معنی‌داری در شاخص‌های روزنه‌ای برگ (شکل ۳) بین گیاهان تتراپلوئید و گیاهان دیپلوئید مشاهده شد (جدول ۱). نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری طول و عرض روزنه در گیاهان تتراپلوئید شاهدانه افزایش معنی‌داری را نسبت به گیاهان دیپلوئید نشان دادند. بررسی تراکم روزنه‌ای نیز نشان داد که افزایش سطح پلوئیدی، تراکم روزنه‌ای نسبت به گیاهان دیپلوئید را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. به طور کلی، گیاهان تتراپلوئید روزنه بزرگتر با تراکم کمتری نسبت به گیاهان دیپلوئید داشتند. در این پژوهش، اندازه روزنه (طول×عرض) در گیاهان دیپلوئید برابر با ۱۱/۲±۰/۰۰۱۰۷ × ۱۹/۲±۰/۰۰۰۸۴ و برای گیاهان تتراپلوئید برابر با ۳۳/۶±۰/۰۰۳۲×۳۸/۴±۰/۰۰۱۶۸ میکرومتر بود.

مقایسه ارتفاع: نتایج حاصل از مقایسه ارتفاع (شکل ۴) نشان داد که ارتفاع گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (جدول ۱).

مقایسه میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید: نتایج حاصل از مقایسه میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل و کاروتنوئید کل بین گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید تفاوت معنی‌داری را نشان

نداد (جدول ۱).

مقایسه برش عرضی: در برش عرضی ساقه گیاهان تتراپلوئید مشاهده شد که بافت آوند چوبی در مقایسه با گیاه دیپلوئید توسعه بیشتری نشان می‌دهد (شکل ۵). در مقابل، فیبر اولیه و ثانویه در گیاه دیپلوئید توسعه بیشتری نشان داد.



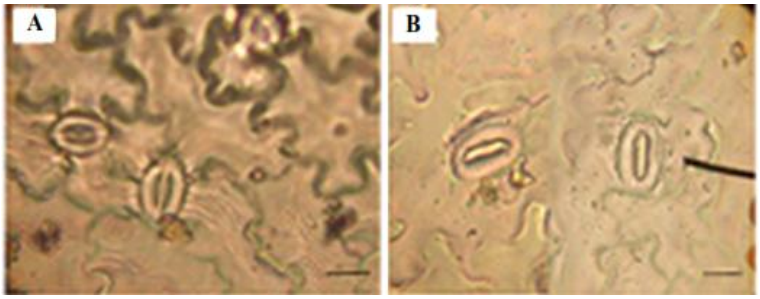
شکل ۲- مقایسه شکل برگ در گیاه دیپلوئید (A) و تتراپلوئید (B) شاهدانه (مقیاس = ۲ سانتی‌متر)

جدول ۱- مقایسه برخی از ویژگی‌های مورفولوژیک و ساختاری گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید خالص شاهدانه. مقادیر میانگین ۵ تکرار ±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ درصد با استفاده از آزمون توکی است.

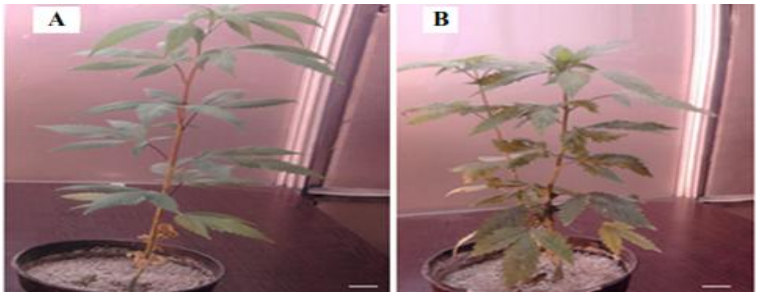
ویژگی‌های مورفولوژیک و ساختاری بررسی شده	تتراپلوئید	شاهد
طول روزنه (میکرومتر)	۳۸/۴±۰/۰۰۱۶۸a*	۱۹/۲±۰/۰۰۰۸۴b
عرض روزنه (میکرومتر)	۳۳/۶±۰/۰۰۳۲a	۱۱/۲±۰/۰۰۱۰۷b
تراکم روزنه (میلی‌متر مربع)	۱۳/۸±۰/۷۵۷b	۲۳/۳±۰/۸۷a
سطح برگ (سانتی‌متر مربع)	۶/۴۳±۰/۰۷۸۹۴a	۵/۴۳±۰/۰۷۸۹۵b
ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	۳۰/۸۵±۰/۴۲۱۹۷b	۳۵/۶±۰/۳۹۲۹۹a
کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۱۰/۲۰۳۰±۰/۵۹۱۸a	۹/۸۴۱±۰/۱۸۴۳a
کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۵/۱۹۶±۰/۱۹۶۰۳a	۴/۷۹۹±۰/۱۶۶۵۴a
کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۱۶/۱۹±۰/۷۰۱۰۴a	۱۴/۶۵۲±۰/۲۶۲۸۲a
کاروتنوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۲/۰۸±۰/۱۲۸۳a	۲/۱۲۳±۰/۰۷۶۹a

جدول ۲- مقایسه برخی از ویژگی‌های مورفولوژیک برگ در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید خالص شاهدانه. * حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ درصد با استفاده از آزمون t دوجفتی است.

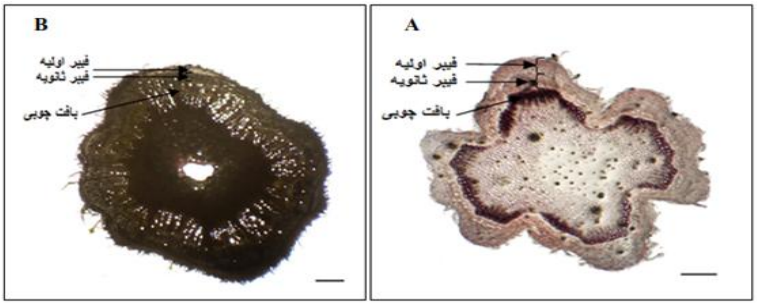
سطح پلوئیدی	طول برگ (سانتی‌متر)	عرض برگ (سانتی‌متر)	شاخص برگ (عرض/طول)
دیپلوئید	۶/۹۵±۰/۰۸۸۵۱a	۱/۵۷±۰/۰۶۱۵۵b	۴/۴۷±۰/۱۵۴۱۳a
تتراپلوئید	۶/۲۱±۰/۱۵۵۲۴b	۲/۳۲±۰/۰۷۸۶a	۲/۶۸±۰/۰۷۹۷۲b
معنی‌داری *	*	*	*



شکل ۳- مقایسه شاخص‌های روزنه‌ای در گیاه دیپلوئید (A) و تتراپلوئید (B) شاهدانه (مقیاس = ۲۵ میکرومتر)



شکل ۴- مقایسه ارتفاع در گیاه دیپلوئید (A) و تتراپلوئید (B) شاهدانه (مقیاس = ۵ سانتی‌متر)



شکل ۵- مقایسه ساختار تشریحی ساقه در گیاه دیپلوئید (A) و تتراپلوئید (B) شاهدانه (مقیاس = ۵ میکرومتر)

بحث

القای پلی پلوئیدی نقش مهمی در به‌نژادی گیاهان دارد و روش سودمندی برای ایجاد تنوع است.

گیاهان تتراپلوئید به دلیل دارا بودن ویژگی های برتر در مقایسه با نوع دیپلوئیدشان بیشتر در زراعت و باغبانی مورد توجه قرار می‌گیرند. برای نمونه، گیاهان تتراپلوئید دارای ساقه وریشه ضخیم‌تر، گل‌ها و برگ‌های بزرگتر، عادت رویشی منظم‌تر و مقاومت بیشتر در برابر تنش‌های زیستی هستند (Kermani *et al.*, 2003). از سوی دیگر، پلی‌پلوئیدی می‌تواند دارای آثار مضری نظیر افزایش اندازه سلولی که به ناهماهنگی‌های ساختاری منجر می‌شود نیز باشد. آثار زیان‌بار دیگر می‌تواند شامل عقیمی، شکنندگی چوب و آبکی شدن میوه باشد (Sanford, 1983). در پژوهش حاضر، القای تتراپلوئیدی با غلظت ۰/۲ درصد کلشی‌سین و روش قطره چکان موجب القای

تتراپلوئیدی خالص شد. در زمان برداشت گیاه، وضعیت روزنه‌ها برای اطمینان از حالت پلوئیدی مجددا بررسی شد. در پژوهش‌های پیشین نیز دیده شده است که ایجاد گیاه دارویی تتراپلوئید خالص امری دشوار است و معمولاً شیمر ایجاد می‌شود برای نمونه، در تیمار مریستم رأسی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) در شرایط کشت درون شیشه‌ای، استفاده از غلظت‌های مختلف کلشی سین در مدت زمان‌های مختلف گیاه تتراپلوئیدی تولید نکرد (Sarikhani *et al*., 2010).

رشد اولیه گیاهان تتراپلوئید خالص شاهدانه در مقایسه با گیاهان شاهد در ماه نخست پس از تیمارکندتر بود، در نتیجه گیاهان تتراپلوئید ارتفاع کمتری نشان می‌دادند. موافق با نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، القای پلی‌پلوئیدی در گیاه بابونه (Saharkhiz, 2007) و گیاه *Platanus acerifolia* (Guofeng *et al*., 2007) با کاهش رشد همراه بود. رشد کمتر گیاهان پلی پلوئید می‌تواند به علت کاهش سرعت تقسیم سلولی (Eigsti, 1947)، کاهش هورمون‌های رشد (Larsen and Mintung, 1950) و فعالیت کمتر متابولیت‌ها در این گیاهان باشد. با توجه به مشاهدات Joshi و Verma (۲۰۰۴) گیاهان لوبیای اتوتتراپلوئید در ابتدا رشدکمتری داشتند اما به علت تولید محصول بیشتر، اهمیت دارند. القای پلی‌پلوئیدی موجب کاهش نسبت طول به عرض برگ‌ها می‌شود (Pryor and Frazier, 1968). در تحقیق حاضر نیز القای پلی‌پلوئیدی در گیاه شاهدانه به کاهش شاخص برگ منجر شد. القای پلی پلوئیدی در گیاه *Phlox Subulata* L. نیز نتیجه مشابهی نشان داده است (Zhihong *et al*., 2008).

گیاه شاهدانه دو واریته فیبری و دارویی دارد. مطالعه ساختار تشریحی ساقه نشان داد که آوند چوبی پسین در گیاه تتراپلوئید نسبت به گیاه دیپلوئید توسعه بیشتری داشته است و برعکس فیبر اولیه و ثانویه توسعه کمتری داشته‌اند که احتمالا علت هورمونی دارد. بنابراین، نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که القای تتراپلوئیدی برای واریته فیبری شاهدانه سودمند نیست.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر در ارتباط با محتوای کلروفیل با القای پلی‌پلوئیدی در گیاه *Citrus ourantifolia* مشابه بود و از این نظر تغییر معنی‌داری بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید مشاهده نشد (Afshar Mohamadian *et al*., 2012).

با توجه به معنی‌دار نبودن تغییر ترکیباتی نظیر کلروفیل و کاروتنوئید، می‌توان عنوان کرد که این شاخص‌ها برای تشخیص گیاهان تتراپلوئید دقیق و قابل اطمینان نیستند (Phulari, 2011). معمولا از شاخص‌های روزنه‌ای که آسان و غیر مخرب است و نیازی به وسایل گران قیمت ندارد به عنوان شاخص سطح پلوئیدی در گیاهان استفاده می‌شود (Kadota and Niimi, 2002؛ Thao *et al*., 2003). با استفاده از این روش در پژوهش حاضر، جمعیت گیاهی از ۱۲۰ گیاه تیمار شده به ۱۰ گیاه تتراپلوئید کاهش یافت و آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که ۴ گیاه تتراپلوئید ۱۰۰ درصد و ۱ گیاه شیمر است. همچنین برگ تمامی گیاهان تتراپلوئید خالص، ظاهری چروکیده نشان دادند که می‌تواند برای شناسایی اولیه گیاهان تتراپلوئید شاهدانه در نظر گرفته شود. در نتیجه، شاخص‌های روزنه‌ای راهی مؤثر و سریع برای تشخیص گیاهان تتراپلوئید است در حالی که برای تشخیص درصد سلول‌های شیمری آنالیز فلوسایتومتری مؤثر است.

جمع‌بندی

نتایج حاضر اطلاعات اولیه در ارتباط با القای تتراپلوئیدی در گیاه شاهدانه با استفاده از تیمار جوانه رأسی با کلشی‌سین و تأثیرآن بر برخی صفات مورفولوژیک و ساختاری را فراهم آورده است. این اطلاعات می‌تواند در مراحل بعدی در پژوهش‌های اصلاحی و به‌نژادی این گیاه دارویی ارزشمند توسط محققان استفاده شود.

سپاسگزاری

نگارندگان از جناب آقای دکتر عباس‌نژاد مدیر گروه محترم بخش زیست‌شناسی و حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه باهنر کرمان سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

Afshar Mohamadian, M., Pourakbari Kasmaei, R., Omidi, Z. Ghanati, F. and Tarang, A. (2012) Morphologic and physiologic effects on polyploidy induction in *Citrus ourantifolia*. Iranian Journal of Plant Biology 5(17): 15-30 (in Persian).

Burstein, S. H., Audette, C. A. and Breuer, A. (1992) Synthetic non psychotropic cannabinoids with potent anti-inflammatory, analgesic and leukocyte antiadhesion activities. Journal of Medicinal Chemistry 35: 3135-3141.

Chakraborti, S. P., Vijayan, K., Roy, B. N. and Qadri, S. M. H. (1998) *In vitro* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). Plant Cell Reports 17: 799-803.

Duke, J. A. (2001) Handbook of medicinal herbs. CRC Press, New York.

Eigsti, O. J. (1947) The pollen tube method for making comparisons of differences in mitotic rates between diploid and tetraploid. Genetics 1: 32-85.

Gao, S. L., Zhu, D. N., Cai, Z. H. and Xu, D. R. (1996) Autotetraploid plants from colchicine treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47: 73-77.

Griesbach, R. J. and Bhat, R. N. (1990) Colchicine-induced polyploidy in *Eustoma grandiflorum*. Horticultural Science 25: 1284-1286.

Guofeng, L., Zhineng, L. and Manzhu, B. (2007) Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. Euphytica 157: 145-154.

Hamill, S. D., Smith, M. K. and Dodd, W. A. (1992) *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. Australian Journal of Botany 40: 887-896.

Hammond, C. T. and Mahlberg, P. G. (1977) Morphogenesis of breeding of cannabis: determination of cannabinoids by capitate glandular hairs of *Cannabis sativa* (Cannabinaceae). American Journal of Botany 64: 1023-1031.

Hassawi, S. D. and Liang, G. H. (1991) Antimitotic agents: effects of double haploid production in wheat. Crop Science 31: 723-726.

Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. (1950) The water-culture method for growing plants without soil. University of California, Berkeley.

Joshi, P. and Verma, R. C. (2004) High frequency production of colchicine induced autotetraploids in faba bean (*Vicia faba* L.). Cytologia 69: 141-147.

Kadota, M. and Niimi, Y. (2002) *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear

cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). Plant Cell Reports 21: 282-286.

Kermani, M. J., Sarasan, V., Roberts, A. V., Yokoya, K., Wentworth, J. and Sieber, V. K. (2003) Oryzalin-induced chromosome doubling in rosa and its effect on plant morphology and pollen viability. Theoretical and Applied Genetics 107: 1195-1200.

Larsen, P. and Mintung, S. (1950) Growth promoting and growth retarding substances in pollen from 2*n* and 3*n* apple varieties. In: Polyploidy and biological relevance (Ed. Lewis, W. H.) 436-444. Plenum Press, New York.

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.

Mechoulam, R. and Gaoni,Y. (1967) Recent advances in the chemistry of hashish. Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe 25: 175-213.

Nakano, M. T., Nomizu, K., Mizunashi, M., Suzuki, S., Mori, S., Kuwayama, M., Hayashi, H., Umehara, E., Kobayashi, H., Asano, M., Sugawara, S., Takagi, H., Saito, H., Nakata, M., Godo, T., Hara, Y. and Amano, J. (2006) Somaclonal variation in *Tricyrtis hirta* plants regenerated from 1-year-old embryogenic callus cultures. Horticultural Science 110: 366-371.

Pate, D. (1999) Anandamide structure-activity relationships and mechanisms of action on intraocular pressure in the normotensive rabbit model. PhD thesis, University of Kuopio, Kuopio, Finland.

Phulari, S. S. (2011) Polyploidy breeding in *Urgenia indica* to study the effect of colchicines treatment on morphological character of *Urgenia indica*. Botany 1(3): 207-210.

Pryor, R. L. and Frazier, L. C. (1968) Colchicine-induced tetraploid azaleas. Horticultural Science 3(4): 283-286.

Saharkhiz, M. J. (2007) Effects of some environmental factors and ploidy level on some morphology and also potology properties of medicinal and ornamental *Tanacetum Parthenium* plant. PhD thesis, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (in Persian).

Sanford, J. C. (1983) Ploidy manipulations. In: Methods in fruit breeding (Eds. Moore, J. N. and Janick, J.) 100-123. Purdue University Press, West Lafayette.

Sarikhani, H., Borgheei S. F., Chaichi, M. and Kashi A. (2010) *In vitro* induction of polyploidy in lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 26(3): 283-295 (in Persian).

Thao, N. T. P., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y. and Okubo, H. (2003) Induction of tetraploids inornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell Tissue and Organ Culture 72: 19-25.

Ward, A. and Holmes, B. (1985) Nabilone, a preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic use. Drugs 30: 127-144.

Zargari, A. (1998) Medicinal plants. Tehran University Press, Tehran (in Persian).

Zhihong, Z., Hongyan, D., Min, X. and Xin, L. (2008) *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L.. Euphytica 159: 59-65.

The effect of tetraploidy induction on morphology and anatomy characteristics of *Cannabis sativa* L.

Mahsa Bagheri and Hakimeh Mansouri *

Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Abstract

The production of tetraploid plant was studied in *Cannabis sativa* L. with colchicine at three different concentrations (i.e., 0.0, 0.1 and 0.2%) for about 24 and 48 h through dropping method. Flow cytometry analyses were used to confirm the ploidy level. Morphologic and anatomic characteristics between tetraploid and diploid control plants were compared. The results showed that 0.2% colchicine for 24 h had the best effect. The percentage of tetraploid plants and the survival rate were lowered by increasing the treatment time. In addition, the leaf index and height of tetraploid plants exhibited a significant decrease compared to the diploid plants. The size of leaves' epidermis stomata were larger in tetraploid plant compared to the diploid ones, in spite of their less density of stomata. However, the amount of total chlorophyll and carotenoids were almost the same in both of tetraploid and diploid plants. In addition, some differences were also observed in the cross section of stem of these plants from the descriptive structure point of view. On the whole, the results introduced usage of the stomata parameters as an effective and convenient method for detecting the tetraploid plants; however, the flow cytometry analysis was more effective in assessing the ploidy percentage.

Key words: Tetraploidy, Morphological characteristics, Flow cytometry, Colchicine, Cannabis plant

* Corresponding Author: h_mansouri@mail.uk.ac.ir