اثر القای پلی‌پلوئیدی بر برخی از پارامترهای رشد در گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa* L.)

مهسا باقری و حکیمه منصوری*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

(تاریخ دریافت: ٩٣/٠٢/٢٤، تاریخ پذیرش نهایی: ١٣٩٣/١٠/١٣)

چکیده:

در این مطالعه گیاهان شاهدانه با سطح پلوئیدی متفاوت از نظر برخی از پارامترهای رشد و ترکیبات بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند. گیاهان پلی‌پلوئید و میکسوپلوئید حاصل از آزمایش قبلی ما با استفاده از تیمار کلشی‌سین بدست آمدند. آنالیز فلوسایتومتری به منظور تعیین سطح پلوئیدی انجام شد. نتایج نشان داد که وزن تر ریشه و اندام هوایی در گیاهان پلی‌پلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید به طور معنی داری افزایش یافت. میزان قندهای احیاکننده، قندهای محلول، نشاسته و پروتئین کل در گیاهان میکسوپلوئید در مقایسه با گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید افزایش معنی‌داری پیدا کرد. همچنین در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید، پروتئین کل و نشاسته افزایش معنی‌داری نشان داد. قند محلول و احیا کننده در برگ و ریشه گیاهان تتراپلوییید کمتر از دیپلوئید بود. نیمرخ پروتئینی ریشه و اندام هوایی گیاهان با سطوح پلوئیدی متفاوت، تغییرات واضحی را در میزان بیان پروتئین های خاص، مثل روبیسکو در اندام هوایی و پروتئین هایی با وزن مولکولی ٦٨ و ١٧٥ کیلو دالتون در ریشه مشاهده شد. بنابراین پلی پلوئیدی علاوه بر اثرات مورفولوژیکی، روی صفات بیوشیمیایی گیاه نیز تأثیر داشت.

کلمات کلیدی: تتراپلوئیدی، میکسوپلوئیدی، پروتئین، قند.

مقدمه:

شاهدانه با نام علمی *Cannabis sativa* L. از خانواده‌ی *Cannabaceae* در اصل بومی مناطق معتدل آسیا است و اکنون به میزان وسیعی در تمام جهان گسترده است. در زیستگاه های متنوعی در نواحی هم سطح دریا در مناطق استوایی تا تپه های بلند هیمالیا رشد می کند. کاشت شاهدانه به دلیل اهمیت اقتصادی آن برای مصارف گوناگون از جمله غذایی، دارویی و تولید فیبر که از ساقه‌ی آن گرفته می‌شود، تاریخچه ی طولانی دارد (Ware and Tawfik, 2005).

شاهدانه ترکیبات ثانویه ی گوناگونی مانند کانابینوئیدها، فلاوونوئیدها، آلکالوئیدها، لیگنانامیدها و آمیدهای فنولی تولید می‌کند (Flores-Sanchez and Verpoorte, 2008b). این گیاه در اوایل قرن نوزدهم در اروپای غربی به عنوان دارو برای درمان صرع، تشنج، روماتیسم، میگرن، آسم، درد عصب سه قلو، خستگی و بیخوابی شناخته شد (Spencer, 2002).

مدت زمان زیادی است که پلی پلوئیدی کردن برخی محصولات ارزشمند انجام می‌شود (Lewis, 1980; Zhang *et al.*, 2003) و تا حد زیادی به تولید محصولات واجد ویژگی‌های سودمند کمک کرده است (Gu *et al.*, 2003; Alishah and Bagherieh, 2008).

به عنوات مثال، در *Setaria tomentosa* مشخص گردید که اتوتتراپلوئیدها حاوی میزان زیادی از نشاسته، قندهای محلول کل و لیپید هستند (Shashi and Saehdeva, 1990). تغییر در پروفایل متابولیت که در اتوتترا پلوئیدها در اثر تکثیر پایه‌ی ژنومی رخ می‌دهد، بر اساس مداخله‌ی مکانیسم‌های متابولیکی

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: h_mansouri@mail.uk.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.10.2]

که بیوسنتز ترکیبات اولیه را تنظیم می‌کنند، تفسیر می‌شود. یکی از دلایل کم بودن مقدار متابولیت‌ها در گیاهان دیپلوئید نسبت به گیاهان پلی پلوئید، سرکوب ژن‌های ساختاری در گیاهان دیپلوئید عنوان شده است، در حالی که در گیاهان پلی پلوئید این ممانعت برداشته شده است (Levy, 1976). افزایش متابولیت‌های ثانویه و افزایش زیتوده در نتیجه ی القای پلی پلوئیدی برای بعضی از گیاهان دارویی گزارش شده است (Adaniya and Shira, 2001). یک موجود اتوپلی پلوئید، از دو برابرشدن ژنوم درون یک گونه به وجود می‌آید. از آنجا که اتوپلی پلوئیدی در نتیجه‌ی مضاعف شدگی مستقیم ژنومی ایجاد می‌شود، ژنوم پایه، ثابت باقی مانده و مواد ژنتیکی دو یا چند برابر می‌شود. بنابراین افزایش فعالیت آنزیمی و مقدار متابولیت در اتوپلی پلوئید ها قابل انتظار می‌باشد (Lavania, 2005). بر اساس یک فرضیه، نسبت پایین‌تر غشای هسته ای به کروماتین، منجر به ارتباط بیشتر کروماتین با غشای هسته‌ای شده و بنابراین فعالیت ژن و در نتیجه روابط آبی، پایه ی هورمونی و میزان فتوسنتز در هر سلول افزایش می‌یابد (Levin, 2002). دو برابر کردن کروموزوم دیپلوئید با استفاده از بازدارنده‌های تشکیل دوک میتوزی امکان پذیر می‌باشد. این ترکیبات شیمیایی جهش زا، میتوز را با جلوگیری از پلیمریزاسیون میکروتوبول و بنابراین مهاجرت قطبی کروموزوم‌ها طی فاز آنافاز مختل می سازد. ارزش و اهمیت گیاهان پلی پلوئید در کشاورزی نشان داده شده است (lewis, 1980).

هدف از اجرای این طرح، بررسی برخی ار پارامترهای شیمیایی مانند قند کل، نشاسته، پروتئین و سلولز و تغییر آنها با افزایش سطح پلوئیدی در گیاه شاهدانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

گیاهانی که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند، گیاهانی بودند که در فاز اول این تحقیق بوسیله تیمارهای مختلف کلشی‌سین تیمار شده بودند. سطح پلوئیدی این گیاهان بوسیله آنالیز فلوسایتومتری تعیین شد و بر اساس نتایج بدست آمده گیاهان به سه گروه دیپلوئید، میکسوپلوئید (که ژنوم آنها دیپلوئید و تتراپلوئید بود) و تتراپلوئید تقسیم شدند. گیاهان ۷۵ روزه جهت انجام آنالیزهای مورد نظر استفاده شدند. برگ سوم گیاهان در آنالیزهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت.

مقایسه‌ی وزن‌تر اندام هوایی و ریشه گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید: برای مقایسه‌ی وزن‌تر گیاهان، وزن اندام هوایی و ریشه‌ی آنها بطور جداگانه با ترازو با دقت ۰/۰۰۱ به دقت وزن گردید.

اندازه گیری مقدار قندهای محلول (TSC) و احیا کننده: محتوای قند محلول با استفاده از معرف آنترون و بر اساس روش Roe (۱۱۹۵) تعیین گردید. سنجش میزان قندهای احیا کننده‌ی (از قبیل گلوکز و فروکتوز) برگ و ریشه در گیاهان دیپلوئید، میکسوپلوئید و تتراپلوئید خالص از روش سوموگی استفاده شد (Somogy,1952). برای محاسبه مقدار قند از منحنی استاندارد گلوکز استفاده شد.

استخراج و اندازه گیری نشاسته: به منظور حذف سایر قند ها، ۰/۵ گرم بافت تر برگ در ۵ سی سی اتانول سائیده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۷۰ درجه قرار گرفت. محلول حاصل سانتریفیوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد. رسوب حاصل با اتانول ۸۰ درصد شسته شد؛ این عمل سه بار تکرار شد. رسوب حاصل به خوبی خشک گردید و به آن ۵ میلی لیتر آب و ٦/۵ میلی لیتر پرکلریک اسید ۵۲ درصد اضافه گردید. استخراج نشاسته در دمای صفردرجه و به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. محلول حاصل سانتریفیوژ شد و محلول رویی نگه داشته شد. ۰/۲ میلی لیتر از محلول رویی برداشته شد و با آب مقطر به حجم یک میلی لیتر رسانده شد. ٤ میلی لیتر معرف آنترون به هر لوله اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند. لوله‌ها به سرعت سرد شدند و شدت جذب نمونه‌های رنگ سبز تیره تا سبز روشن در ٦۳۰ نانومتر خوانده شد. مقدار گلوکز نمونه با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز به دست آمد و برای تعیین مقدار نشاسته عدد بدست آمده در فاکتور ۰/۹ ضرب شد (Thayumanavan and Sadasivam, 1984).

استخراج و اندازه گیری سلولز: استخراج و اندازه گیری

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.10.2]

سلولز با استفاده از روش Updegroff (۱۹۶۹) انجام شد. به یک گرم بافت تر برگ در لوله‌های آزمایش ۳ میلی لیتر معرف استیک/ نیتریک اضافه شد و لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب داغ با دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. لوله‌ها سرد شد و سپس به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شد. رسوب با آب مقطر شستشو داده شد. به هر نمونه ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ٦۷ درصد اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای محیط قرار گرفت. یک میلی لیتر از محلول رویی با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. به یک میلی لیتر از این محلول رقیق شده ۱۰ میلی لیتر معرف آنترون اضافه شد و کاملاً مخلوط گردید. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند. پس از سرد شدن لوله ها، جذب نمونه‌ها در ٦۳۰ نانومتر خوانده شد.

اندازه گیری پروتئین کل: به منظورسنجش پروتئین کل برگ و ریشه در گیاهان دیپلوئید، میکسوپلوئید وتتراپلوئید خالص از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976).

سنجش کیفی پروتئین‌های برگ و ریشه با الکتروفورز عمودی: برای انجام الکتروفورز از تکنیک SDS_PAGE در سیستم بافری ناپیوسته استفاده شد.

روش تهیه‌ی ژل آگارز: درصد ژل بالایی (ژل متراکم کننده) ۵ درصد و ژل پایینی (ژل تفکیک کننده) ۱۲/۵ درصد مناسب تشخیص داده شد. ۱۵ میکرولیتر از عصاره‌ی پروتئین استخراج شده از برگ و ریشه‌ی گیاهان شاهد، شیمر (شیمر متشکل از هر دو یا چند سلول دیپلوئید و تتراپلوئید می باشد و ممکن است به علت بی نظمی‌های میوزی، ادغام هسته ای یا سلولی و یا حتی فرایند های آمیوتیک (ناهنجاری میتوزی) ایجاد شود.)، تیمار و پروتئین استاندارد (مارکر) با ۵ میکرولیتر بافر نمونه (شامل ۰/۹۲ گرم SDS، ۲ گرم بتامرکاپتو اتانول، ٤ میلی لیترگلیسرول، ۰/۳ گرم تریس و ۲ میلی لیتر محلول برموفنل بلو ۱ درصد در حجم ۲۰ میلی لیتر (pH=٦/۸) مخلوط گردید. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش گذاشته شد. در این حالت پروتئینها به دلیل وجود دو مرکاپتواتانول ازمحل پیوندهای دی سولفید باز شده، زیرواحد های آنها ازهم جدا می‌گردند و به SDS متصل می‌شوند. قبل از تزریق عصاره‌های پروتئینی، مقدار پروتئین موجود در عصاره‌ها موازنه شد. به این منظور نمونه‌ای که دارای کم‌ترین مقدار پروتئین است، تعیین گردید و برای آن حجمی متناسب با چاله (۲٤ میکرولیتر) در نظر گرفته شد و بقیه نمونه‌ها به گونه‌ای با بافر استخراج رقیق شد که از نظر مقدار پروتئین با آن یکسان باشد. بدین ترتیب درون هر چاهک ۲۰ میکرولیتر پروتئین بارگیری (load) شد. از شدت جریان ۱۰۰ ولت برای ژل فوقانی و تحتانی استفاده شد. در پایان برای رنگ آمیزی، ژل به مدت ٦۰ دقیقه در رنگ غلیظ کوماسی برلیانت بلو و بر روی لرزاننده قرار گرفت.

محلول رنگ بر ژل: به منظور تهیه‌ی محلول رنگ بر ژل، ۱۰ میلی لیتر استیک اسید با ۳۰ میلی لیتر متانول ۹۵ درصد مخلوط گردید و حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. ژل به مدت ۲٤ ساعت در محلول قرار گرفت.

تجزیه آماری: این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مراحل مختلف آزمایش با ۳ تکرار انجام شد. از نرم افزار SPSS برای آنالیز آماری و از نرم افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده شد. اختلاف میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح P<۰/ ۰۵ بررسی شد. برای تمام داده ها میانگین و انحراف معیار(SD) محاسبه شد.

نتایج:

وزن تر ریشه و اندام هوایی در گیاه تتراپلوئید در مقایسه با گیاه دیپلوئید افزایش معنی داری به ترتیب ۱/٤۳ و ۱/۷۹ برابری نشان داد (جدول۱). گیاهان میکسوپلوئید بیشترین افزایش را در وزن تر ریشه و اندام هوایی نشان دادند. همچنین مشخص شد که این افزایش در اندام هوایی بیشتر از ریشه بود.

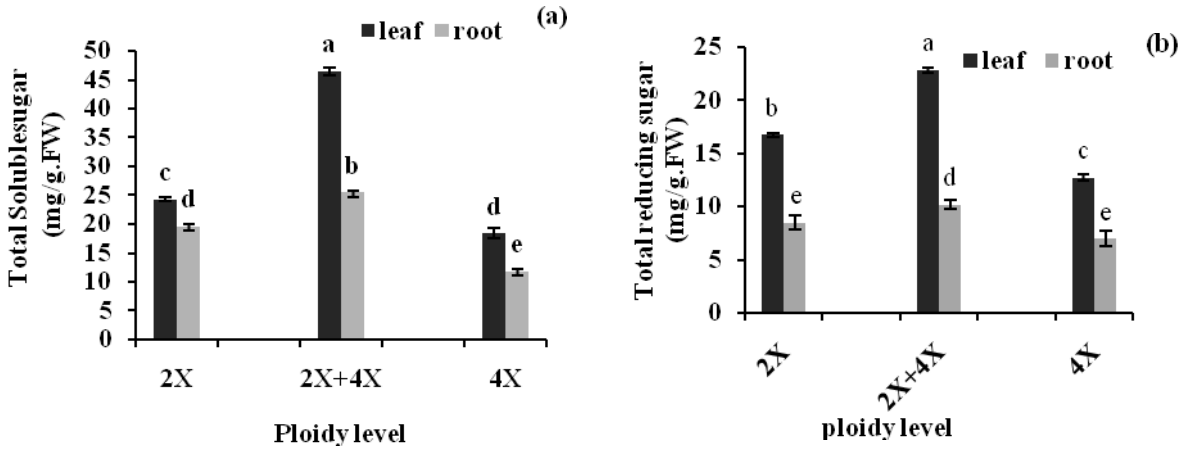
نتایج حاصل از آنالیزهای بیوشیمیایی: در اغلب تحقیقاتی که در مورد گیاهان پلی پلوئیدی انجام شده است تنها تغییرات مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفته است و کمتر تغییرات بیوشیمیایی گیاه که نشان دهنده تغییرات در متابولیسم گیاه هستند بررسی شده است. به همین دلیل برای درک بهتر اثرات

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.10.2]

جدول ۱- مقایسه وزن تر ریشه و اندام هوایی در گیاهان دیپلوئید، میکسوپلوئید و تتراپلوئید خالص شاهدانه. مقادیر میانگین ۳ تکرار ±SE است. میانگین هایی که با حروف متفاوت نشان داده شده اند در سطح P≤0.05 بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنی دار دارند.

خصوصیات مورفولوژیکی و سیتولوژیکی بررسی شده	دیپلوئید	میکسوپلوئید	تتراپلوئید
وزن‌تر اندام هوایی (g)	۵/۸۳۷±۰/۱۸۷۷^{c}	۱٤/۲۳±۰/۵۳٤۹^{a}	۱۰/٤۷۸۰±۰/٤۸۱۲٤^{b}
وزن‌تر ریشه (g)	۵/۳۵۳±۰/۱۷۰۲٦^{c}	۸/۷۵٦±۰/۱۵۰۳^{a}	۷/٦٦۹±۰/٤٤۱٦۵^{b}



شکل۱- اثر سطح پلوئیدی بر مقدار قندهای محلول (a)و قندهای احیاکننده (b) در گیاه شاهدانه. داده‌ها میانگین ۳ تکرار±خطای استاندارد می‌باشند. مقایسه‌ی میانگین تیمارها بر اساس آزمون دانکن و با حدود اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

پلوئیدی بر متابولیسم گیاه پارامترهای بیوشیمی گیاه نیز مورد بررسی قرار گرفت.

بر اساس نتایج این تحقیق، میزان قندهای محلول برگ گیاهان تتراپلوئید خالص کاهش معنی داری (٤۵ درصدی) را نسبت به گیاهان دیپلوئید نشان داد. اما محتوای قند محلول در برگ گیاهان میکسوپلوئید افزایش قابل توجهی (حدوداً دو برابری) را نشان داد. روند کاهش قند های محلول در ریشه با برگ مشابه بود، به نحوی که میزان قند در ریشه ی گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید کاهش ٤۱ درصدی را نشان داد. بیشترین محتوای قند در برگ و ریشه ی گیاهان میکسوپلوئید مشاهده شد (شکل-a ۱).

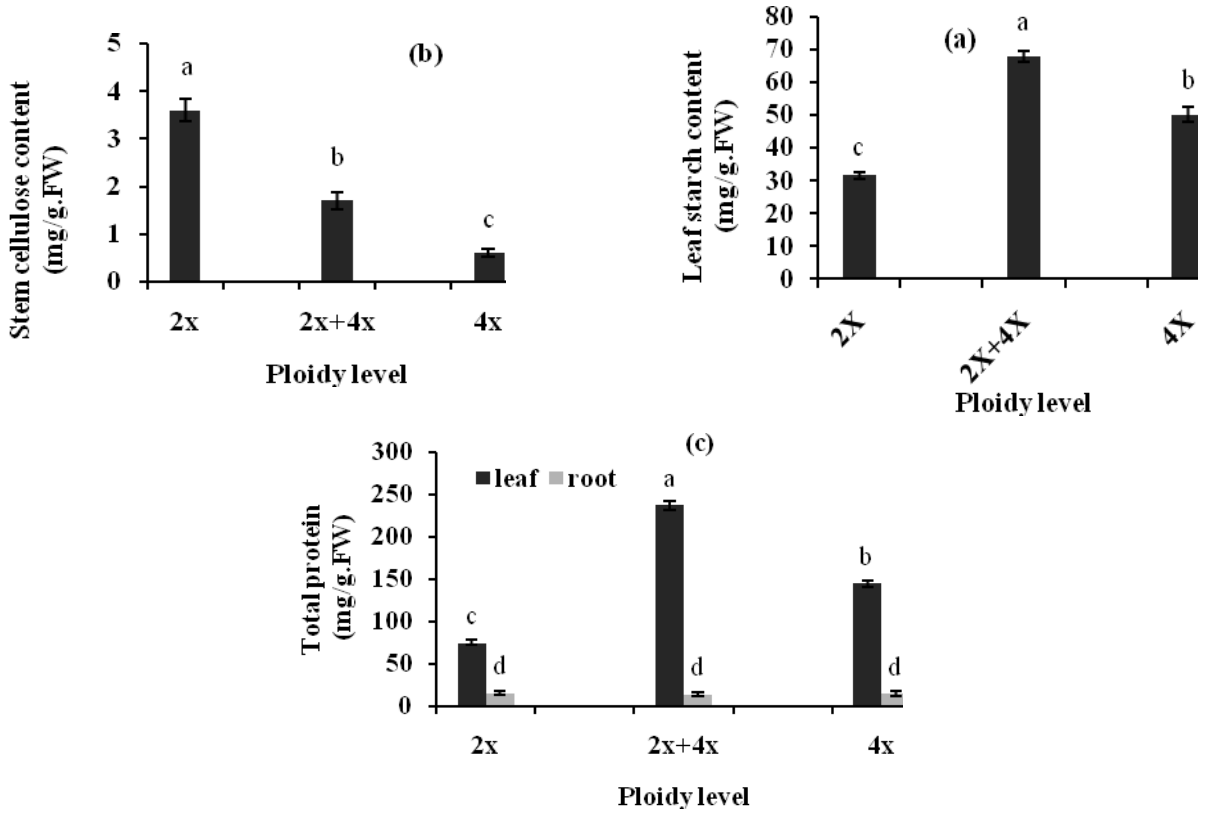
القای تتراپلوئیدی در شاهدانه، اثر معنی‌داری بر میزان قند احیاکننده در این گیاه داشت، به طوری که میزان این ترکیبات در برگ و ریشه‌ی گیاهان تتراپلوئید به ترتیب کاهش ۲٤/۱٤ و ۱۵/۷۵ درصدی را نسبت به نمونه‌های دیپلوئید نشان داد، در حالی که ریشه و برگ گیاهان میکسوپلوئید افزایش معنی داری در میزان قند احیا کننده در مقایسه با گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نشان دادند (شکل-۱b). تغییرات در قندهای احیا کننده مشابه تغییرات مشاهده شده در قند کل بود.

میزان نشاسته در گیاهان میکسوپلوئید و گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان شاهد به ترتیب افزایش معنی دار ۲ و ۱/۳۷ برابری را نشان داد (شکل۲-a).

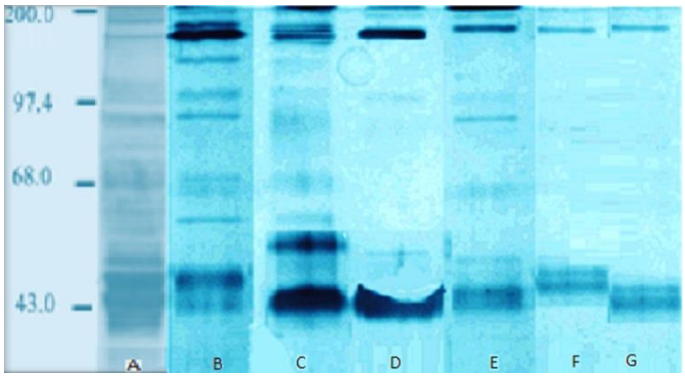
پلی پلوئیدی شدن گیاه اثر شدیدی بر مقدار سلولز گیاه نشان داد. محتوای سلولز در گیاهان میکسوپلوئید وگیاهان تتراپلوئید به ترتیب نسبت به گیاهان دیپلوئید کاهش معنی دار ۵۳ و ۸۰ درصدی را نشان داد. همچنین گیاهان تتراپلوئید دارای کم‌ترین میزان سلولز در مقایسه با دو نمونه‌ی دیگر بودند (شکل ۲- b).

میزان پروتئین کل در برگ گیاهان میکسوپلوئید نسبت به گیاهان تتراپلوئید و گیاهان دیپلوئید بیشترین افزایش را نشان داد. مقدار پروتئین در برگ گیاهان تتراپلوئید افزایش دو برابری را نسبت به گیاهان دیپلوئید نشان داد. محتوای پروتئین ریشه،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.10.2]



شکل۲- اثر سطح پلوئیدی بر مقدار نشاسته (a) ، مقدارسلولز ساقه (b) و مقدارپروتئین کل (c) در گیاه شاهدانه. داده‌ها میانگین ۳ تکرار±خطای استاندارد می‌باشند. مقایسه‌ی میانگین تیمارها بر اساس آزمون دانکن و با حدود اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.



شکل۳- تأثیر پلی پلوئیدی بر باندهای الکتروفورزی پروتئین‌های برگ و ریشه. استاندارد (A)، برگ تتراپلوئید (B)، برگ دیپلوئید (C)، برگ میکسوپلوئید (D)، ریشه ی تتراپلوئید (E)، ریشه ی دیپلوئی د(F)، ریشه‌ی میکسوپلوئی د(G).

تفاوت معنی داری بین سطوح پلوئیدی مختلف نشان نداد (شکل ۲- c).

نتایج حاصل ازبررسی کیفی پروتئین های برگ و ریشه ی گیاهان تتراپلوئید، دیپلوئید و میکسوپلوئید، نشان داد که در برگ و ریشه ی گیاه تتراپلوئید باند مولکولی جدیدی با وزن مولکولی ٦٨ کیلودالتون اضافه شده است. باندی با وزن مولکولی ۱۷۵ کیلو دالتون در برگ گیاهان پلی پلوئید و ریشه ی تتراپلوئید در مقایسه با گیاه دیپلوئید، پر رنگ تر ظاهر شده است. همچنین باندی با وزن ۵۵ کیلودالتون در برگ گیاه دیپلوئید در مقایسه با برگ گیاه تتراپلوئید و میکسوپلوئید پررنگ تر است (شکل ۳). یک باند ٤۳ کیلودالتونی در برگ گیاهان دیپلوئید و میکسوپلوئید بسیار پررنگ تر از برگ گیاه

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.10.2]

تتراپلوئید مشاهده شد. این باند احتمالا مربوط به زیر واحد بزرگ روبیسکو است.

بحث:

مطالعه روی گیاهان پلی پلوئید و مقایسه آنها با گیاهان دیپلوئید از جهات مختلفی حائز اهمیت است. هر چند که در اکثر موارد خصوصیات مفید این گیاهان گزارش شده است، ولی بهتر است قبل از توصیه به تولید گیاهان پلی پلوئید و استفاده از آنها، تمام تغییرات آنها نسبت به گیاه دیپلوئید مورد بررسی قرار گیرد. مطالعه حاضر قسمتی از نتایج کار تحقیقاتی انجام شده روی تغییرات ایجاد شده بوسیله پلی پلوئیدی القا شده توسط کلشی سین در گیاه پر اهمیت شاهدانه است. در آزمایشات قبلی مشاهده شده است که تیمار گیاهان با کلشی سین منجر به ایجاد گیاهان تتراپلوئید و میکسوپلوئید می شود (ملک زاده شفارودی و همکاران، ۱۳۹۰؛ ساری خانی و همکاران، ۱۳۸۹). دلیل ایجاد گیاهان میکسوپلوئید این است که تعدادی از سلول های مریستم انتهایی تحت تاثیر تیمار کلشی سین پلی پلوئیدی نمی شوند و در نتیجه بافتهای تشکیل شده از این مریستم ها دارای سلولهای دیپلوئید و تتراپلوئید هستند. اگرچه به طور کلی نمی توان اثرات فیزیولوژیکی پلی پلوئیدی را پیش بینی کرد و معمولاً نتایج خاص گونه هستند، ولی دو برابر کردن تعداد کروموزومی در یک گیاه، تعداد ژن ها را افزایش می دهد و منجر به تغییراتی در فعالیت آنزیم و تنوع ایزوآنزیم ها می شود. این امر می تواند بر مسیرهای بیوسنتز متابولیت ها مؤثر باشد (Tanksley and Orton, 1986).

در تحقیق قبلی ما، تولید گیاهان تتراپلوئید خالص و گیاهان میکسوپلوئید با درصد زنده مانی قابل توجه با تیمار کلشی سین ۰/۲ درصد و ۰/۱ درصد امکان پذیر شد (چاپ نشده) که می تواند زمینه رابرای تولید گیاهان تریپلوئید که ممکن است محصولات فراوان تری داشته باشند ایجاد کند.

مقایسه‌ی وزن‌تر اندام هوایی و ریشه گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید: پیامد بلافصل القای تتراپلوئیدی افزایش اندازه ی سلولی است. این امر می تواند بطور بالقوه متابولیسم و سرعت رشد را در پلی پلوئید ها به علت زمان همانند سازی طولانی تر کاهش دهد (Bennett and leitch, 2005). افزایش زیتوده در گیاهان پلی پلوئید می تواند به دلیل افزایش تعداد شاخسار زایی و افزایش سطح برگ در این گیاهان باشد. در عین به عدم تغییر سطح پلوئیدی ریشه با القای پلی پلوئیدی در تحقیق حاضر، افزایش وزن ریشه ی گیاهان تتراپلوئید متناسب با افزایش وزن اندام هوایی بود که نشان دهنده تاثیر اندام هوایی بر ریشه است.

اندازه گیری مقدار قندهای محلول (TSC) و احیا کننده و نشاسته: نتایج نشان داد که مقدار قند های احیا کننده و قند های محلول در برگ گیاهان تتراپلوئید کاهش می یابد. از آنجا که نتایج قبلی عدم تغییر مقدار کلروفیل و افزایش سطح برگ را نشان می دهد (چاپ نشده)، بنابراین می توان نتیجه گرفت که کاهش مقدار قند ها ممکن است به دلیل استفاده از سوبسترای مورد نیاز در مسیرهای دیگر یا کاهش فعالیت یا مقدار آنزیم های درگیر در بیوسنتز قند ها باشد که باید برای دستیابی به نتایج بهتر مورد بررسی قرار گیرد. از طرفی الکتروفورز پروتئین های برگ گیاهان تتراپلوئید نشان دهنده کاهش مقدار آنزیم روبیسکو و در نتیجه دلیلی دیگر برای کاهش مقدار قندها در گیاه است. از طرفی مقدار نشاسته در برگ افزایش نشان داد که می تواند نشان دهنده آشفتگی هایی در متابولیسم قندها تحت این شرایط باشد.

افزایش مقدار پروتئین کل در گیاهان تتراپلوئید و میکسوپلوئید در نتیجه ی تغییر سطح پلوئیدی و تعداد رونوشت های DNA می باشد که باعث افزایش سنتز پروتئین ها می شود (omezzine *et al.*, 2012).

استخراج و اندازه گیری سلولز:در این پژوهش، پلی پلوئیدی شدن منجر به کاهش ۵۳ درصدی در میزان سلولز گردید (چاپ نشده) درگیاهان پلی پلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید، به دلیل افزایش حجم سلول ها و کاهش نسبت سطح به حجم بافت ها، کاهش مقدار سلولز که ترکیب اصلی دیواره سلولی را تشکیل می دهد قابل پیش بینی است. در این رابطه گزارشی در مورد سایر گیاهان پلی پلوئید مشاهده نشد. کاهش

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.10.2]

مقدار سلولز مورد نیاز گیاه می تواند اثرات قابل توجهی در مسیرهای متابولیسمی گیاه بگذارد و سوبسترای لازم را برای سنتز بیشتر ترکیبات دیگر فراهم کند (Lee *et al.*, 2011).

سنجش کیفی پروتئین‌های برگ و ریشه با الکتروفورز عمودی: در این پژوهش، پروفایل پروتئین کل شاهدانه بررسی شد. تا حدودی این امکان وجود دارد که بر اساس تغییرات کمی پروتئین که بر روی ژل آگارز قابل مشاهده هستند، تغییرات مثبت و منفی بیان برخی از پروتئین های خاص را در سطوح پلوئیدی مختلف مورد بررسی قرار داد. پروفایل پروتئین کل در گونه ها و واریته های نیلوفر پیچ (Pragati *et al.*, 2013)، باقلا (Ling and Assman, 1992)، گون (El-Sahhar *et al.*, 2013)، تربچه (Pan *et al.*, 2013) و مادر گندم (Kharazian, 2008)، به خوبی آزمایش شد و پاسخ های مشابهی مشاهده گردید. بعضی تحقیقات بیان بیشتر تمامی پروتئین ها را در تتراپلوئید گزارش کردند، اما در اکثریت آنها تفاوت های اصلی در کمیت پروتئین های بیان شده در دو سطح پلوئیدی بود (Nakai, 1977). تحقیقات بسیاری نشان داده است که با القای پلی پلوئیدی، فعالیت آنزیمی در هر واحد پروتئینی تحت تأثیر قرار می گیرد. همچنین در بعضی گونه ها پروتئین کل بیش از دو برابر افزایش یافته است (Tanksley and Orton, 1986).

نتیجه‌گیری کلی:

در گیاهان تتراپلوئید شاهدانه در مقایسه با گیاهان دیپلوئید، کاهش محتوای قند های محلول و احیا کننده در برگ و ریشه مشاهده شد و میزان نشاسته برگ افزایش و سلولز سلول ها کاهش یافت، در حالی که میزان پروتئین تا دو برابر افزایش نشان داد. در این بین، گیاهان میکسوپلوئیدی تفاوت چشمگیری را نشان دادند به نحوی که میزان قند های محلول و احیا کننده، پروتئین در برگ و ریشه ی آنها نسبت به تتراپلوئید و دیپلوئید افزایش معنی داری را نشان داد. همچنین میزان نشاسته نیز در مقایسه با دو سطح پلوئیدی دیگر افزایش مقدار را نشان داد. از این رو، بررسی دقیق تر مسیر متابولیکی گیاهان میکسوپلوئید برای شناسایی بیشتر این گیاه ارزشمند از لحاظ دارویی و اقتصادی بهتر است در برنامه ی به نژادی قرار گیرد. همچنین، با توجه به این امر، می توان در گیاه شاهدانه، میکسوپلوئید را از تتراپلوئید خالص از لحاظ خصوصیات بیو شیمیایی نیز مجزا نمود.

منابع:

ساری خانی، حسن.، برقعی، س. ف.وچایی چی، م. (۱۳۸۹) فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۲۶: ۲۹۵-۲۸۳.

ملک زاده شفارودی، س.، غنی، ع. و حبیبی، م. (۱۳۹۰) بررسی امکان القاء پلی پلوئیدی در ریحان (*Ocimum basilicum* L.) با استفاده ازکلشی سین، نشریه علوم باغبانی، ۲۵: ۴۶۹-۴۶۱.

Adaniya, S. and Shirai, D. (2001) *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) and its pollen fertility and germinability. Scientia Horticulturae 88:277–287.

Alishah, O. and Bagherie-Najjar M. B. (2008) Polyploidization effect in two diploid cotton (*G. herbaceum* L and G. *arboretum* L) species by colchicine treatments. African Journal of Biotechnology 7:102-108.

Bennett, M. D. and Leitch, I. J. (2005) Genome size evolution in plants. In: The evolution of the genome (ed. Gregory, T. R.) Pp.89-162. Elsevier Academic Press, Amsterdam.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive me thod for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

El-Sahhar, K. F., Emara, Kh. S. and Ali, W. A. (2013) Comparative systematic studies of *Astragalus* in flora of arab republic of egypt and syrian arab republic: plant morphology, sem of lamina surface and sds-page of proteins. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 9: 271-286.

Flores-Sanchez, I. J. and Verpoorte, R. (2008b) Secondary metabolism in cannabis. Phytochem.The Radio Electronics Association of Vietnam 7: 615–639.

Gu, H. H., Lou, J. and Zhou, W. J. (2003) Advances of colchicine application on microspore culture technology in rapeseed. Chinese Journal of Chemical Engineering at Science Direct 25: 103-106.

Kharazian, N. (2008) Chemotaxonomic Studies on *Aegilops* L. (*Poaceae*) In Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences.

Lavania, U .C. (2005) Genomic and ploidy manipulation

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.10.2]

proteins by SDS-PAGE. International Research Journal of Biological Sciences 2:64-67.

Roe, J. H. (1955) The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. The Journal of Biological Chemistry 212: 335-343.

Shashi, B. and Saehdeva, S.K. (1990) Biochemical variability in cytotypes of Setaria tomentosa (Roxb.) Acta Botanica Indica 18: 216-221.

Somogy, M. (1952) Notes on sugar determi-nation. Journal of Biological Chemistry. 195: 19-29.

Spencer, C., Castle, D. and Michie P.T. (2002) Motivations that maintain substance use among individuals with psychotic disorders. Schizophrenia Bulletin 28: 233–247.

Tanksley, S. D. and Orton, T. J. (1986) Isozymea in plant genetics and breeding. 2nd Ed. Elsevier science publishers B. V. Amsterdam.

Thayumanavan, B. and Sadasivam, S. (1984) Qual Plant Foods for Human Nutrition 34, p. 253.

Updegroff, D. M. (1969) Semi micro determination of cellulose in biological materials. Methods of Biochemical Analysis.

Ware, M. A. and Tawfik, V. L. (2005) Safety issues concerning the medical use of cannabis and cannabinoids. Pain Research & Management 10: 31-37.

Zhang, G. Q., Zhou, W. J., Gu, H. H., Song, W. J. and Momoh, E. J. J.(2003) Plant regeneration from the hybridization of Brassica juncea and B. napus through embryo culture. Journal of Agronomy and Crop Science 189: 347-350.

for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. Plant Genetic Resource 3: 170-177.

Lee, Y., Chen, F. and Dixon, R. (2011) Integrative Analysis of Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.) suggests new metabolic control mechanisms for monolignol biosynthesis. PLoS computational biology. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002047.

Levin, D. A. (2002) The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution. Oxford University Press, New York.

Levy, M. (1976) Altered glycofavone expression in induced autotetraploids of Phlox drummondii. Biochemical Systematics and Ecology 4: 249-259.

Lewis, W. H. (1980) Polyploidy in species populations. In: Polyploidy: biological relevance (ed. Lewis, W.H.) Pp. 103-144. Plenum Press, New York.

Ling, V. and Assmann, S. M. (1992) Cellular distribution of calmodulin and calmodulin-binding proteins in *Vicia faba* l. Plant physiology 100:970-978.

Nakai, U. (1977) Variations of esterase isozymes and some soluble proteins in diploids and their induced autotetraploids in plants. Japanese Journal of Genetics 52: 171-181.

Omezzine, F., Ladhari, A. and Nefzi, F. (2012) Induction and flow cytometry identification of mixoploidy through colchicine treatment of *Trigonella foenum graecum* L. African Journal of Biotechnology.

Pan, Y., Xu Y., ZHU, X., Liu, Z., Gong, Y., Xu, L., Gong, M. and Liu L. (2013) Molecular Characterization and Expression Profiles of Myrosinase Gene (RsMyr2) in Radish (*Raphanus sativus* L.). Journal of Integrative Agriculture 13:267-298.

Pragati, V., Parameshwar G. and Sreenath K. P. (2013) Phylogenetic relationship of some ipomoea seed

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.13.10.2]