بررسی امکان تولید پلی‌پلوئیدی و اثر آن بر محتوای فنلی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی زنیان جمعیت پاکستان

راحله اکبری[۱]، لیلا فهمیده*[۱] و بهمن فاضلی نسب[۲]

[۱] گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

[۲] گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۰۹، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۶/۰۳)

چکیده

امروزه القای مضاعف‌نمودن تعداد کروموزوم‌ها (پلی‌پلوئیداسیون) با استفاده از کلشی‌سین به‌عنوان یکی از روش‌های اصلاح گیاهان دارویی به‌منظور افزایش تولید محصول آنها جایگاه ویژه‌ای به خود اختصاص داده است. در این پژوهش از کلشی‌سین به‌منظور القاء پلی‌پلوئیدی و بررسی تأثیر آن بر میزان القای تتراپلوئیدی و برخی صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک جمعیت پاکستان گیاه دارویی زنیان استفاده شد. کلشی‌سین با غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ گرم در لیتر در سه زمان ٦، ۱۲ و ۱۸ ساعت روی مریستم انتهایی ریشه زنیان به‌کار برده شد. بدین منظور از آزمایش فاکتوریل بر مبنای طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد. بررسی کروموزومی با روش اسکواش و با استفاده از روش تحلیل تصویری انجام شد. نتایج نشان داد که تعداد کروموزوم پایه در گونه مورد بررسی 2n=2x=18 و در گیاهان تتراپلوئیدشده 2n=4x=36 بود. بالاترین درصد القاء تتراپلوئیدی (۸۰ درصد)، به‌دنبال غوطه‌وری گیاهچه‌ها در غلظت ۰/۵ گرم در لیتر کلشی‌سین در مدت زمان ٦ ساعت به‌دست آمد. در ادامه پس از تیمار بذرهای گیاه با کلشی‌سین و کشت بذور تیمارشده و شاهد در گلدان، گیاهچه‌های رشدیافته در مرحله گلدهی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مشخص نمود که گیاهان تتراپلوئید (تیمارشده) از نظر صفات فیزیولوژی (کلروفیل a، آنتوسیانین، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و فلاونوئید) و مورفولوژی (تعداد شاخه جانبی، ارتفاع گیاه، تعداد برگ، طول و عرض برگ و وزن تر و خشک) نسبت به گیاهان شاهد برتری داشتند لذا روش اصلاحی مورد مطالعه می‌تواند برای گیاه زنیان مفید و قابل استفاده باشد.

واژه‌های کلیدی: تتراپلوئیدی، شمارش کروموزومی، کلشی‌سین، فنل، فلاونوئید

مقدمه

زنیان (*Carum copticum*) متعلق به تیره چتریان (Apiaceae) گیاهی است علفی، یک‌ساله و بی‌کرک به ارتفاع ۳۰ تا ۹۰ سانتی‌متر (کمتر از یک متر) پر شاخ و برگ که به‌طور عمده در مناطق خشک و نیمه‌خشک شرق هند، بخش شمال غربی، مرکزی و شرقی ایران و همچنین در مصر رشد می‌کند (Sargazi *et al.*, 2016). تعداد کروموزوم موجود در این گیاه 2n=18 است (Fazeli-Nasab, 2018). میوه زنیان دارای اسانس روغنی بوده که میزان آن برحسب مناطق مختلف رویش گیاه متفاوت و مهم‌ترین ترکیبات آن تیمول، پاراسیمن، آلفاپینن و کارواکرول که حدود ۵۰ درصد اسانس آن از تیمول تشکیل شده و دارای اثرات ضدمیکروبی، ضداسپاسم و قارچ‌کش است

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: leila.fahmideh@uoz.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.16.4]

(Fazeli-nasab and Fooladvand, 2016). خاصیت ضدمیکروبی زنیان مربوط به ترکیب تیمول و خاصیت ضداسپاسم آن مربوط به اسانس فرار آن است (Haghiroalsadat *et al.*, 2015). بیشتر اجزای این اسانس از ترکیبات فنلی هستند کـه دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بوده و درنتیجه قابلیت استفاده به‌عنوان نگه‌دارنده در مواد غذایی را دارند. همچنین اسانس این گیاه کاربردهای متنوعی در پزشکی و صنایع داروسازی دارد (Tohidi *et al.*, 2017).

امروزه تأکید اصلی و هدف اختصاصی متخصصان، یافتن گونه‌های جدید گیاهی، توسعه استعدادهای ژنتیکی و همچنین یافتن شیوه‌هایی برای افزایش مواد مؤثره گیاهان دارویی است (Naghavi *et al.*, 2004). یکی از روش‌های به‌نژادی مورد استفاده در بسیاری از گیاهان القاء پلی‌پلوئیدی مصنوعی است (Adelanwa *et al.*, 2011). دست‌ورزی سطح پلوئیدی ابزار توانمندی در اصلاح ژنتیکی بسیاری از گیاهان است(Madon *et al.*, 2005). القاء پلی‌پلوئیدی موضوع اصلی برنامه‌های اصلاحی است که در گیاهان اغلب موجب تولید واریانت‌هایی جدید با کیفیت متمایز می‌شود و از سوی دیگر از طریق دو برابرشدن سطح کروموزومی، افزایش تعداد نسخه‌های ژنی بیان‌کننده، ترکیبات مواد مؤثره و افزایش جثه گیاه موجب بیشترشدن ترکیبات ثانویه و دارویی آن می‌شود(Thao *et al.*, 2003). علاوه بر این، پلی‌پلوئیدی موجب افزایش سازگاری گیاه به شرایط محیطی نامطلوب از جمله خشکی و شوری می‌شود ضمناً افزایش در ویژگی‌های سطح ژنومی (نسخه‌های ژنی)، انعطاف‌پذیری، تنوع فنوتیپی، هتروزیس، بنیه (درشتی اندام رویشی)، انجام وظیفه متفاوت نسخه‌های تکراری ژن در اندام مختلف و حتی تأثیر در نحوه تولید مثل را به‌عنوان توجیه برتری پلی‌پلویید نسبت به دیپلوئید دانست(Mansouri and Bagheri, 2015).

ماده شیمیایی کلشی‌سین ($C_{22}H_{25}O_6N$) به‌عنوان یک ماده محرک و با هدف ایجاد تتراپلوئیدی در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Dhooghe *et al.*, 2011). کلشی‌سین یک ترکیب آلکالوئیدی است که از بذر پداژه و گل‌های گیاه گل حسرت (*Colchicum autumnale*) استخراج می‌شود (Fathi *et al.*, 2011). کلشی‌سین مانع از تشکیل رشته‌های دوکی در طی تقسیم سلولی از طریق جلوگیری از پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها با پیوند به زیر واحدهای پروتئینی توبولین و تغییر شکل آنها شده و درنتیجه منجر به دو برابرشدن تعداد کروموزوم‌ها در سلول می‌شود (Arzani and Darvey, 2001). همچنین گزارش شده است که این ترکیب نسبت به مواد جهش‌زای دیگر تغییرات مورفولوژیک بیشتر و کثرت موتاسیون بالاتری را ایجاد می‌کند (Alishah and Bagherieh-Najjar, 2008; Rauf *et al.*, 2006). استفاده از کلشی‌سین برای ایجاد پلی‌پلوئیدی در گیاهان دارویی کمتر گزارش شده است (Alishah and Bagherieh-Najjar, 2008). نوع پاسخ همه گونه‌های گیاهی به کلشی‌سین یکسان نیست و این ماده به خاطر سمیتی که دارد می‌تواند بر ویژگی‌های رشد و نموی گیاهان تأثیر منفی داشته باشد و گاه این تأثیر در بعضی از گونه‌ها چنان است که نه‌تنها ممکن است منظور اولیه استفاده از این ماده به‌دست نیاید، بلکه ممکن است که ویژگی‌های رشد و نمو گیاه نیز تحت تأثیر منفی قرار گیرند (Chakraborti *et al.*, 1998). به‌ویژه گیاهان دارویی چون شرایط رشد و نموی این گیاهان متفاوت از گیاهان زراعی است بنابراین ممکن است که حساسیت آنها زیادتر باشد (Alishah and Bagherieh-Najjar, 2008).

نتایج تحقیقات مختلف در پدیده پلی‌پلوئیدی نشان داد که در گیاه بابونه (*Salvia miltiorrhiza* Bge)، افزایش سطح پلوئیدی منجر به افزایش قطر و وزن گل‌های آن می‌شود (Gao *et al.*, 1996) همچنین در گیاه بادرشبو (*Dracocephalum moldavica* L.) افزایش سطح پلی‌پلوئیدی سبب ایجاد گیاهانی با برگ‌های درشت‌تر و تیره‌تر شد (Omidbaigi *et al.*, 2010). در بررسی القاء پلی‌پلوئیدی گیاه اسفناج تفاوت معنی‌داری بین مواد القاءکننده وجود نداشت و تیمار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر با تیمار زمانی ۳۲ ساعت با توجه به هیستوگرام‌های فلوسایتومتری پیک دو برابرشدن مقدار DNA را نشان داد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.16.4]

(Roughani *et al.*, 2017). امروزه مقاومت به داروها موضوع مهم و کلیدی است که سلامت عموم را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین کلاس جدید داروهای ضدمیکروبی، به‌شدت مورد نیاز است. با این وجود می‌توان از فلاونوئیدها به‌عنوان نسل جدید و کارا در این زمینه نام برد. فلاونوئیدها به‌طور طبیعی در سلسله گیاهان به‌ویژه سلول‌های فتوسنتزکننده وجود دارند که نقش ویژه‌ای در فعالیت‌های حیاتی گیاهان ایفا می‌کند (Havsteen, 1983) و در سلول‌های فتوسنتزکننده، ساقه گیاهان، گل‌ها و میوه‌ها و غیره یافت می‌شود. فلاونوئیدها در فتوسنتز، انتقال انرژی، فعالیت هورمون رشد گیاه و تنظیم‌کننده‌های رشد، کنترل تنفس و فتوسنتز، مورفوژنز و تعیین جنسیت نیز نقش دارند (Skibola and Smith, 2000).

در این مطالعه امکان ایجاد گیاهان تتراپلوئید زنیان با استفاده از غلظت‌های مختلف و زمان‌های مختلف تیمار با کلشی‌سین و تعیین بهترین تیمار برای رسیدن به این منظور بررسی شد و در ادامه تغییرات کروموزومی و همچنین تغییرات ظاهری و برخی خصوصیات فیزیولوژیکی گیاهان حاصله با گیاهان شاهد مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت تا امکان دستیابی و تولید گیاهان تتراپلوئید دارای خصوصیات ظاهری و میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و محتوی فنل و فلاونوئیدی برتر نسبت به همتایان دیپلوئید فراهم شود.

مواد و روش‌ها

تیمار با کلشی‌سین و بررسی سطح پلوئیدی: مطالعات سیتوژنتیکی گیاه زنیان در سال ۹۵-۹۶ در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه زابل انجام شد. بذر جمعیت پاکستان گیاه زنیان از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. به‌منظور به دست‌آوردن مریستم انتهایی ریشه، بذرها به ظروف پتری‌دیش حاوی کاغذ صافی مرطوب منتقل و پس از افزودن آب‌مقطر، در ژرمیناتور تحت شرایط کنترل رطوبت ۳۸ درصد، دمای ۲٤ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ١٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی قرار داده شدند. پس از چهار روز بذرهای جوانه‌زده با ریشه‌هایی به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر آماده تیمارشدن بودند. برای تیمارکردن از محلول کلشی‌سین با غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ گرم در لیتر و در سه مدت زمان ٦، ۱۲ و ۱۸ ساعت استفاده شد. به‌منظور مشاهده و شمارش کروموزوم‌ها، به‌ترتیب مراحل: ۱- پیش‌تیمار با استفاده از محلول (۰/۰۰۲ میکرومولار) ۸-هیدروکسی کینولین به‌مدت ۵ ساعت، ۲- تثبیت با محلول کارنوی ۲ (مرکب از اتانول ۹٦ درصد، کلروفرم ۱۰ درصد و اسیداستیک ۳۰ درصد به نسبت ٦ :۳ :۱) به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای اتاق، ۳- هیدرولیز با اسید کلریدریک ۱ نرمال به‌مدت ۲۰ دقیقه و سپس ٤- رنگ‌آمیزی ریشه‌ها با استواورسئین انجام شد. پس از قراردادن نمونه‌های آماده‌شده (قسمت انتهایی نوک ریشه) روی لام، یک قطره استیک اسید ٤٥ درصد روی اسلاید گذاشته و لامل روی آن قرار داده شد تا ضمن خروج رنگ‌های اضافی، سلول‌های مریستمی نیز در یک سطح پخش شوند.

عکس‌برداری از نمونه‌های تهیه‌شده با استفاده از روش تحلیل تصویری با بزرگنمایی ۱۸۷۷ برابر انجام شد، به‌طوریکه تصاویر کروموزومی از طریق Color Video Camera که بر روی میکروسکوپ نوری مدل Olympus نصب شده بود به مانیتور منتقل و ضبط شد. تصاویر تهیه‌شده به برنامه Photoshop (Version 1.04) منتقل شد. از هر تیمار تعداد ۱۰ اسلاید و از هر اسلاید تعداد ۵ سلول انتخاب شد و شمارش کروموزوم آنها انجام شد. و به این صورت در دو گروه طبقه‌بندی شدند: ۱-سلول‌های دیپلوئید که تغییر تعداد کروموزوم نشان ندادند ۲- سلول‌های تتراپلوئید که تعداد کروموزوم آنها دو برابر تعداد کروموزوم دیپلوئید بود. در ادامه داده‌های هر گروه دیپلوئید و تتراپلوئید براساس درصد محاسبه شد.

کشت بذور تیمارشده با کلشی‌سین و بررسی برخی صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی: بعد از تعیین بهترین دز و زمان اعمال کلشی‌سین (غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر در مدت زمان ٦ ساعت) برای القاء پلی‌پلوئیدی که با انجام عمل اسکواش و شمارش کروموزومی حاصل شد، بذور با کلشی سین تیمار شدند پس از کشت بذور تیمارشده و تیمارنشده (شاهد) و تولید گیاهچه برخی صفات مورفولوژیکی و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.16.4]

فیزیولوژیکی زنیان اندازه‌گیری شد. در این تیمار ابتدا بذور پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد، در پتری‌دیش حاوی ۰/۵ گرم در لیتر کلشی‌سین روی کاغذ صافی به‌مدت ٦ ساعت در جایی تاریک منتقل گردید. پس از اعمال تیمار مورد نظر، بذرها در دو گروه بذرهای تیمارنشده (شاهد) و بذرهای تیمارشده با کلشی‌سین با استفاده از آب‌مقطر استریل شستوشو داده شده و در گلدان حاوی خاک مناسب (یک قسمت ماسه بادی، یک قسمت خاک معمولی و یک قسمت کود دامی) و در شرایط گلخانه کشت شدند. سپس گیاهچه‌های تولیدشده مورد بررسی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی: ارتفاع گیاه، طول و عرض برگ (با خط‌کش مدرج و برحسب سانتی‌متر)، تعداد شاخه جانبی، تعداد گل، تعداد برگ، وزن تر و خشک بوته، قطر ساقه اصلی و فرعی، قطر ریشه (توسط کولیس برحسب میلی‌متر) اندازه‌گیری شد.

تهیه بافر Ice–Cold: این محلول شامل ۲۰۰۰ میکرولیتر محلول بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH= ۷ (برای تهیه محلول پتاسیم فسفات از دو نمک K_2HPO_4 (جرم حجمی ۱۷٤/۲) و KH_2PO_4 (جرم حجمی ۱۳٦/۰۸٦) استفاده و به این صورت که ابتدا محلول ۱ مولار از هر کدام از این نمک‌ها تهیه شد. سپس ۱۰ سی‌سی از هر کدام برداشته، مخلوط و به حجم ۱۰۰ سی‌سی رسانده شد و pH آن روی ۷ تنظیم شد.)، ۲۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ mM و سپس ۱۹۸۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر بود (Davari *et al.*, 2018).

استخراج عصاره آنزیمی: جهت اندازه‌گیری آنزیم‌ها، ۰/۱ گرم از بافت سبز برگ برداشت و با ٤ سی‌سی بافر Ice – cold در هاون سرد کاملاً ساییده و به‌صورت همگن درآورده شدند. مخلوط همگن از کاغذ صافی عبور و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱٦۰۰۰ دور با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار سانتریفیوژ شدند. سپس فاز بالایی به‌عنوان عصاره آنزیمی (پروتئینی) برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده گردید (de Azevedo Neto *et al.*, 2006).

آنزیم کاتالاز: به این منظور مخلوط واکنش شامل ۷۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۱۵۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر به کووت کوارتز اضافه شد و به هنگام اندازه‌گیری آنزیم، ۷۵۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۷۰ میلی‌مولار به مخلوط واکنش اضافه گردید. تغییرات جذب در ۲٤۰ نانومتر به‌مدت ٦۰ ثانیه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. تغییرات جذب به‌دست آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر $۳٦\ mM^{-1}cm^{-1}$ است تقسیم شد و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد در گرم وزن تر بیان شد (Beers and Sizer, 1952; Panahi *et al.*, 2016).

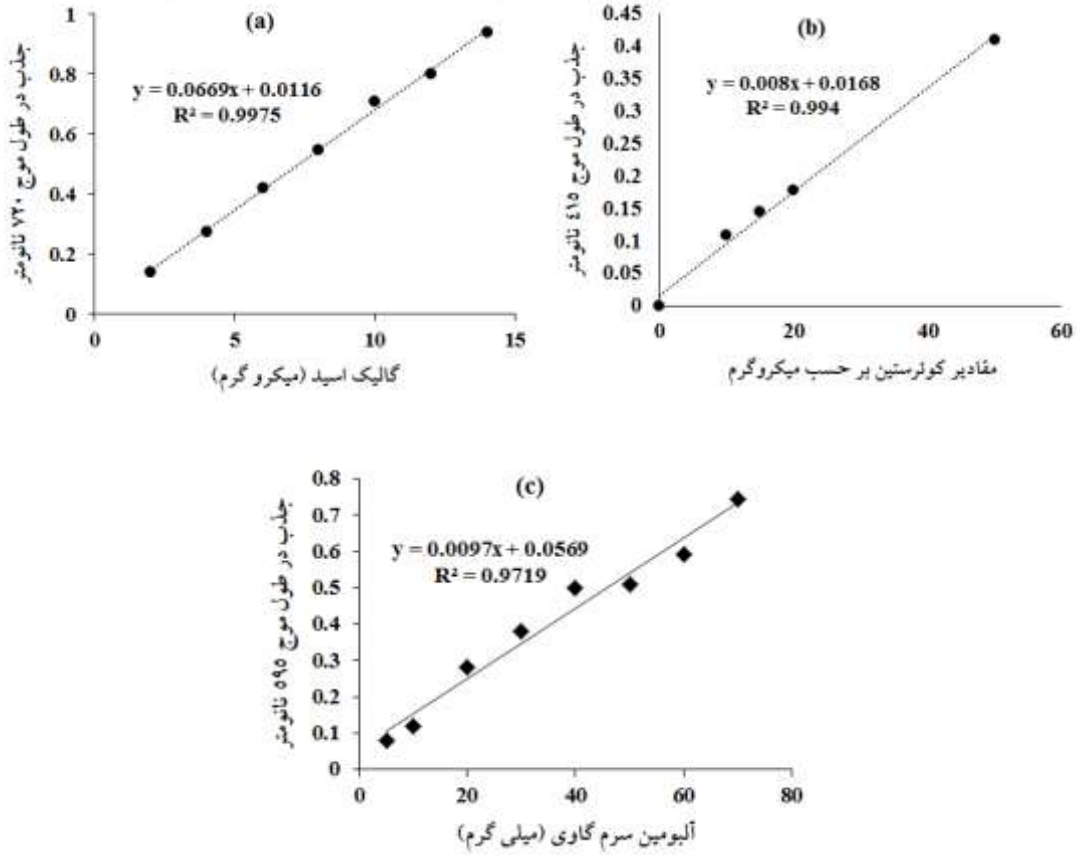
آنزیم آسکوربات پراکسیداز: جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، کمپلکس واکنشی (یک میلی‌لیتر) شامل ۲۵۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار pH= ۷، ۲۵۰ میکرولیتر آسکوربات یک میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/٤ میلی‌مولار، ۱۹۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۱۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید، ۱۰ میلی‌مولار و ٤۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده بود. جذب کمپلکس واکنشی در طول موج ۲۹۰ نانومتر یادداشت و با استفاده از ضریب خاموشی $۲/۸\ mmol^{-1}cm^{-1}$ میزان فعالیت آنزیم محاسبه گردید (Sairam *et al.*, 2002).

اندازه‌گیری میزان فنل کل و فلاونوئید: ۰/۱ گرم اندام هوایی در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد سائیده و به‌مدت ۷۲–۲٤ ساعت در تاریکی به‌منظور سنجش ترکیبات فنلی کل و فلاونوئید کل نگه‌داری و سپس در ٤۰۰۰ دور به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

برای سنجش میزان فنل کل به یک میلی‌لیتر محلول رویی سانتریفیوژ شده، یک میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه گردید و با آب‌مقطر حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و یک میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد به آن اضافه گردید. مخلوط حاصل به‌مدت یک ساعت در تاریکی نگهداری شد و سپس جذب هر نمونه در طول‌موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید (شکل a ۱)، غلظت ترکیبات فنلی کل برحسب میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه گردید. رسم منحنی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.16.4]



شکل ۱- منحنی استاندارد گالیک اسید جهت اندازه‌گیری مقادیر فنل (a)، کوئرستین جهت اندازه‌گیری مقادیر فلاونوئید (b) و آلبومین سرم گاوی جهت اندازه‌گیری مقادیر پروتئین کل (c)

استاندارد فنل کل در غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر صورت گرفت (Meda *et al.*, 2005).

برای سنجش میزان فلاونوئید کل به ۵۰۰ میکرولیتر از هر عصاره ۱/۵ میلی‌لیتر متانول (۸۰٪)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلرید (۱۰٪)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب‌مقطر اضافه شد. جذب مخلوط بعد از گذشت ٤٠ دقیقه در طول‌موج ٤١٥ نانومتر نسبت به بلانک اندازه‌گیری گردید. بلانک حاوی تمام ترکیبات ذکرشده در بالا بود اما به‌جای عصاره همان حجم متانول ۸۰٪ به آن اضافه شده بود. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد (شکل b ۱). میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها براساس میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد (Chang *et al.*, 2002).

تهیه معرف بیوره: به‌منظور تهیه معرف بیوره، ۰/۱ گرم کوماسی بریلیانت بلو G250 در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹٦ درجه به مدت یک ساعت با کمک همزن مغناطیسی (مگنت) در تاریکی به‌خوبی حل گردد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۸۵ درصد قطره قطره به آن افزوده شود. در پایان حجم کل محلول به کمک آب‌مقطر به یک لیتر رسانده شود و محلول حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردد(Davari *et al.*, 2018).

سنجش پروتئین استاندارد و ارزیابی میزان پروتئین کل: برای ارزیابی و تعیین میزان فعالیت آنزیم لازم است ارزیابی دقیقی از میزان کل پروتئین موجود در عصاره مورد آزمایش صورت گیرد. بدین منظور از روش برادفورد (Bradford, 1976) به شرح زیر استفاده گردید. یک گرم بافت تر در یک هاون چینی محتوی سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷/۲ سائیده شد. عصاره حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.16.4]

سانتریفیوژ یخچال‌دار در g ۱۴۰۰۰ و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی (محلول رویی) به لوله‌های آزمایش منتقل و پنج میلی‌لیتر معرف بیوره افزوده و سریعاً ورتکس شد. پس از دو دقیقه و قبل از یک ساعت جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین گاوی (شکل c ۱) محاسبه و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

اندازه‌گیری آنتوسیانین: جهت اندازه‌گیری آنتوسیانین ۰/۱ از بافت برگی تازه را در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و کلریدریک اسید خالص به نسبت حجمی ۱: ۹) کاملاً ساییده و عصاره در لوله آزمایش سرپیچ‌دار ریخته شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و جذب محلول رویی در طول‌موج ۵۵۰nm اندازه‌گیری شد. غلظت با استفاده از فرمول زیر و با در نظرگرفتن ضریب خاموشی (ε) ۳۳۰۰۰ سانتی‌متر بر مول و نتایج بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر ارائه شد (Nadernejad *et al.*, 2013).

اندازه‌گیری کلروفیل و کارتنوئید: جهت اندازه‌گیری کلروفیل و کارتنوئید مقـدار ۰/۱۲۵ گرم از بافت تر برگ با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد خرد شد. مخلوط به‌دست آمده به‌مدت ۱۰ دقیقه در ٦۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و در نهایت قسمت بالایی عصاره جدا و حجم آن به ۸ میلی‌لیتر رسانده شد. اندازه‌گیری با استفاده از روش اسـپکتروفتومتری انجام گرفت و برای کلروفیل a، b و کاروتنوئید به‌ترتیب در طول‌موج‌های ٦٦۳ و ٦٤۵ و ٤۷۰ نانومتر خوانده شد. جهت تنظیم دستگاه از استون ۸۰ درصد به‌عنوان کنترل استفاده شد. غلظت رنگیزه با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردید (Khalili and Baghbani-arani, 2017).

$$Chla = (19.3 \times A663 - 0.86 \times A645) \times V$$
$$Chlb = (19.3 \times A645 - 3.6 \times A663) \times V$$
$$Cartenoeid = [(100 \times A470) - 3.27 \times (mg\ chla) - 104 \times (mg\ chlb)] / 227$$

(V ضخامت کووت می‌باشد).

تجزیه آماری: برای تجزیه داده‌های حاصله از بررسی‌های کروموزومی به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و پس از اتمام داده‌برداری برای داده‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی حاصله دو گروه شاهد و تیمار براساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تجزیه واریانس و سپس مقایسه میانگین با روش LSD انجام شد. جهت انجام تجزیه‌ها و رسم شکل از نرم‌افزارهای SAS (نسخه ۹/۱) و Excel استفاده شد. با توجه به اینکه اکثر داده‌های حاصل از شمارش تتراپلوئیدی به‌دست آمده در این تحقیق براساس درصد بودند، برای اینکه داده‌ها دارای توزیع نرمال باشند، از تبدیل داده جذری $X1=\sqrt{X2}$ استفاده شد. در مواردی هم که صفر وجود داشت از تبدیل $X_1=\sqrt{X2+0.5}$ استفاده گردید.

نتایج و بحث

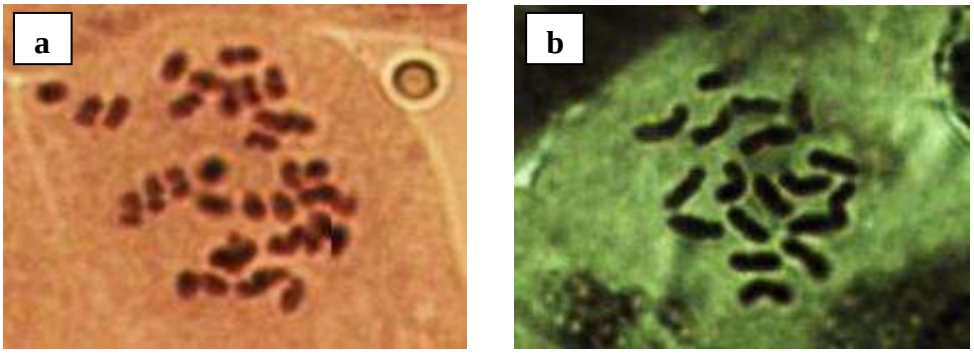
نتایج تتراپلوئیدی حاصل از تیمار با کلشی‌سین: پس از مطالعه و عکس‌برداری از اسلاید نمونه شاهد، عدد کروموزومی در زنیان 2n=18 به‌دست آمد (شکل ۲) که مشابه با نتایج تعدادی از محققان است (Chattopadhyay and Sharma, 1990; Noori *et al.*, 2017). نتایج حاصل از بررسی سطح پلوئیدی گیاه تیمارشده با سطوح مختلف کلشی‌سین در سه زمان مختلف با استفاده از شمارش کروموزومی بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس در رابطه با اثرات ساده تیمارهای مختلف نشان‌دهنده اثر معنی‌دار در سطح ۱ درصد غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار بر درصد احتمالی گیاهان تتراپلوئید برای جمعیت مورد مطالعه بود (جدول ۱). اثرات متقابل غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار نیز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میزان تتراپلوئیدی برای جمعیت پاکستان مورد مطالعه (شکل ۳)، در سطح غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر در مدت زمان ٦ ساعت مشاهده شد و غلظت‌های پایین‌تر و بالاتر تأثیر کمتری بر این فاکتور داشتند. Birami و همکاران (۲۰۱٦) اعلام نمودند که غلظت و مدت زمان تیمار کلشی‌سین و اثر متقابل آنها به‌صورت معنی‌داری بر اتو تتراپلوئید شدن شنبلیله تأثیر داشت و غلظت ۰/۵ گرم در لیتر با مدت تیمار ۱۲ ساعت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.16.4]

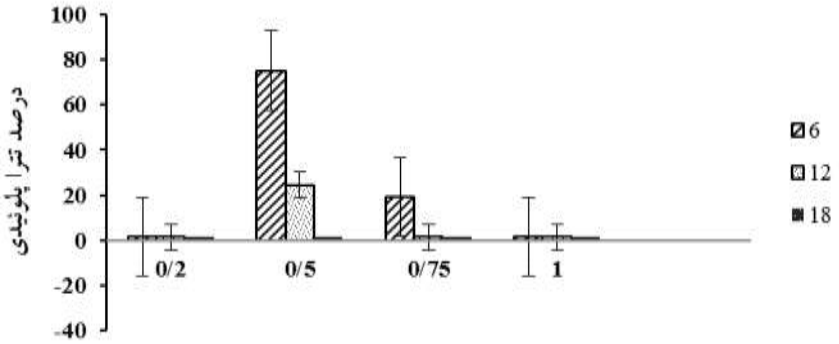
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس القاء تتراپلوئیدی پس از تیمار با کلشی‌سین جمعیت پاکستان

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد تتراپلوئیدی
زمان	٤	٢٣/٦٣ **
غلظت	٢	١٧/٦٠ **
زمان × غلظت	٨	٨/٦٤٠ **
خطا آزمایشی	-	٠/١١٤
ضریب تغییرات	-	٢٠/٣٠

**** اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد**



شکل ۲- تصاویر کروموزومی قبل و بعد از تیمار با کلشی‌سین: a. دیپلوئید b. تتراپلوئید



شکل ۳- اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار کلشی‌سین جمعیت پاکستان زنیان

بهترین نتیجه را داشت همچنین نتایج نشان داد که تغییر سطح پلوئیدی با کلشی‌سین از دیپلوئیدی به تتراپلوئیدی به‌صورت معنی‌داری بر کلیه صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی شنبلیله (به‌جز وزن تر و خشک گیاه) اثر داشت(Birami kohi *et al.*, 2016).

نتایج بررسی خصوصیات مورفولوژیکی گیاهان شاهد و گیاهان تیمارشده: نتایج بررسی خصوصیات مورفولوژیکی گیاهان شاهد و تحت تیمار غلظت کلشی‌سین نشان داد که از نظر برخی خصوصیات فنوتیپی دارای تفاوت‌هایی به شرح زیر می‌باشند:

تعداد گل: طی آزمایش، کاهش تعداد گل در گیاه تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید مشاهده گردید (جدول ۲). گزارش شده که در گیاه ریحان با دو برابرکردن کروموزوم‌ها تعداد گل کاهش یافته است (Hasanzadeh *et al.*, 2010) که با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.16.4]

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات مورفولوژی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید

سطح پلوئیدی	تعداد گل	تعداد شاخه جانبی	ارتفاع گیاه	تعداد برگ	قطر ریشه	قطر ساقه اصلی	قطر ساقه فرعی	طول برگ	عرض برگ	وزن تر	وزن خشک
شاهد	۱۸٤ a	٦/۳۳ b	۲٦/۳ b	۲۱/۳ b	۱/٤ a	۰/۹ a	۰/۵ a	۲/۷٦ a	۱٦/۳ a	۱/۳۳ b	۰/۸۱ b
۰/۵ گرم بر لیتر	۱۳۷/۳b	۸ a	۳۹/٦ a	۲۸ a	۰/۷۳ b	۰/۷٦ a	۰/۳٦ a	۲/۹۳ a	۳/۵ a	۲/۰۳ a	۰/۹۷ a

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت غیر معنی‌دار

نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. توجیه این صفت می‌تواند به این دلیل باشد که مرحله گلدهی در گیاهان پلی‌پلوئید در مقایسه با انواع دیپلوئید دیرتر آغاز شده اما طول مدت گلدهی در آنها بیشتر است (Ghotbi Ravandi *et al.*, 2014).

تعداد شاخه جانبی: گیاهان تتراپلوئید از نظر تعداد شاخه جانبی بالاتر از گیاهان شاهد بودند (جدول ۲). افزایش تعداد شاخه فرعی در این تحقیق نیز در اثر افزایش سطح پلوئیدی حاصل شد که با نتایج پژوهشی که بر روی گیاه *Colophospermum mopan* انجام شده بود (Rubuluza *et al.*, 2007) مطابقت داشت.

ارتفاع: براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، تیمار با کلشی‌سین روی ارتفاع گیاه تأثیرگذار بود و با افزایش سطح پلوئیدی ارتفاع گیاه افزایش یافت (جدول ۲)؛ که مطابق با نتایجی است که در انگیزش پلی‌پلوئیدی در *Carom coptium* به‌دست آمد، به‌طوریکه گیاهان تتراپلوئید به‌صورت معنی‌داری بلندتر از گیاهان دیپلوئید بودند(Noori *et al.*, 2017). تأثیر پلی‌پلوئیدی بر اندازه نهایی گیاه متفاوت است. در برخی موارد انگیزش پلی‌پلوئیدی در گیاهان ارتفاع بوته را افزایش، اما در برخی موارد سبب کاهش ارتفاع گیاهان شده است (Hosseini *et al.*, 2012).

طول و عرض برگ: در اغلب گیاهان تتراپلوئید برگ‌های اولیه دارای ظاهری نابه‌هنجار بودند اما برگ‌های بعدی ایجادشده ظاهر طبیعی داشتند. طول و عرض برگ در گیاهان تتراپلوئید بالاتر از گیاهان دیپلوئید بود اما از نظر آماری اختلاف معنی‌دار نبود (جدول ۲). در گیاه شقایق (Milo *et al.*, 1987) و گیاه بادرشبو (Omidbaigi *et al.*, 2010) گزارش شده انگیزش تتراپلوئیدی علاوه بر تعداد برگ در بسیاری از موارد بر رنگ، شکل، ضخامت و افزایش عرض و اندازه دندانه‌های برگ این گیاهان تأثیر می‌گذارد. بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش سطح پلوئیدی هسته اغلب باعث تغییرات آناتومی و ساختاری در گیاهان می‌گردد و هر یک با توجه به نوع گونه با یک فنوتیپ بروز می‌کند. افزایش سطح برگ با وجود کاهش طول برگ در نمونه‌های تتراپلوئید را می‌توان به افزایش عرض برگ در گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید نسبت داد.

وزن تر و خشک بوته: در این پژوهش با ایجاد تتراپلوئیدی، وزن تر و خشک بوته گیاهان تتراپلوئید در سطح بالاتر از گیاهان دیپلوئید قرار گرفت (جدول ۲). افزایش وزن تر و خشک گیاهان تتراپلوئید نسبت به گروه شاهد می‌تواند به دلیل دو یا سه شاخه‌بودن درصد بالایی از گیاهان تتراپلوئید، بیشتربودن میانگین سطح و ضخامت برگ‌ها و یا به‌دلیل افزایش فتوسنتز و افزایش کارایی آن، بهبود روابط آبی و هورمونی باشد که باعث افزایش مواد ذخیره‌ای بالاتر در برگ‌ها شد (Hosseini and Javanbakht, 2017) و همچنین گزارش شده (Hosseini *et al.*, 2015) که افزایش سطح پلوئیدی به‌طور معنی‌داری وزن تر و خشک اندام هوایی را در گیاهان تتراپلوئید پراونش افزایش داده است.

قطر ساقه اصلی و فرعی: نتایج حاصل از مقایسه قطر ساقه اصلی و فرعی در بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نشان داد که گیاهان شاهد بالاتر از گیاهان تتراپلوئید بودند اما

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.16.4]

اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). در بررسی و مقایسه ویژگی‌های کمی گیاهان تتراپلوئید با تیمار کلشی‌سین با گیاهان دیپلوئید، برخی صفات کمی به لحاظ اینکه این صفات توسط تعداد زیادی ژن کنترل و این صفات تحت تأثیر محیط بوده لذا نتایج متفاوتی در تحقیقات مختلف به‌دست آمده است به طوریکه نتایج تحقیقاتی که بر روی گیاهچه پروانه (*Colophospermum mopane*) (Rubuluza *et al.*, 2007) و هندوانه (Sari *et al.*, 1999) انجام شده بود که با تحقیق حاضر مغایرت داشت.

قطر ریشه: براساس نتایج مقایسه میانگین، قطر ریشه گیاه با افزایش سطح پلوئیدی کاهش یافت که ممکن است به‌دلیل کاهش تقسیم سلولی در مراحل رشد و نمو باشد. ضمناً در تحقیقات مختلف (Lin *et al.*, 2011; Piromya and Kermanee, 2013) گزارش شده که ریشه‌های گیاهان پلی‌پلوئید قطورتر از گیاهان دیپلوئید می‌باشند.

تعداد برگ: در این مطالعه افزایش سطح پلوئیدی باعث افزایش تعداد برگ در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید شد. پس از تحقیقاتی که روی گل دندروبیوم تیمار شده با کلشی‌سین در محیط‌کشت بافت انجام شد، بهترین غلظت ۰/۷۵ درصد به‌مدت ۱٤ ساعت معرفی گردید که سبب کاهش زاویه برگ و افزایش عرض و رنگ برگ‌ها و همچنین افزایش تعداد برگ در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان شاهد شد (Sarathum *et al.*, 2010).

نتایج بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی گیاهان شاهد و گیاهان تیمارشده: پس از بررسی نتایج خصوصیات فیزیولوژیکی گیاهان شاهد و گیاهان تحت تیمار کلشی‌سین، مشاهده شد که از نظر برخی خصوصیات فنوتیپی دارای تفاوت‌هایی به شرح زیر می‌باشند:

محتوای کلروفیل: نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد (جدول ۳) که میزان کلروفیل a در برگ نمونه‌های تتراپلوئید (۱۸۳/۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) نسبت به نمونه‌های دیپلوئید (۱۳۳/۱میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) بیشتر بود. میزان کلروفیل b در برگ نمونه‌های دیپلوئید (۲۱۳/۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) نسبت به نمونه‌های تتراپلوئید (۱٤۲/۲میلی‌گرم در وزن تر برگ) بیشتر بود. از آنجا که فرض بر آن است با دو برابرشدن ژنوم فعالیت متابولیکی، سنتز rRNA و نسخه‌برداری افزایش می‌یابد درنتیجه این افزایش می‌تواند بر میزان تنفس، فعالیت ژنی، تنوع و میزان فعالیت آنزیم‌ها و انتقال الکترون در فتوسنتز تأثیر داشته باشد (Byrne *et al.*, 1981; Kondorosi *et al.*, 2000; Randall *et al.*, 1977). حتی گزارش شده (Abdoli *et al.*, 2013) افزایش سطح پلوئیدی موجب افزایش تعداد کلروپلاست در برگ و در نهایت افزایش فتوسنتز می‌شود.

میزان فنل و فلاونوئید کل: براساس نتایج حاصله در گیاه زنیان افزایش سطح پلوئیدی بر میزان فنل و فلاونوئید کل گیاهان تیمارشده با کلشی‌سین نسبت به گیاهان شاهد تأثیر داشت (جدول ۳). با مقایسه گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید برای میزان فنل کل، گیاهان دیپلوئید با میانگین ۲/٦۲ مشابه گیاهان تتراپلوئید خود بودند. میزان فلاونوئید در تتراپلوئیدها بالاتر از گیاهان دیپلوئید بود (جدول ۳). در بابونه (Chamomilla *recutita*) محتوای فلاونوئید بیشتر به‌عنوان یک نتیجه از پلی‌پلوئیدی عنوان شده است (Svehlikova and Repcak, 2000) و در تحقیق دیگری (Afshar Mohammadian *et al.*, 2013) نیز گزارش شده که افزایش سطح پلوئیدی تأثیری در میزان فنل و فلاونوئید گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید نداشته و افزایش تعداد کروموزوم بر روی میزان فنل و فلاونوئید لیموترش بی‌اثر بوده است.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: تجزیه داده‌های حاصل از اثر تیمار با کلشی‌سین بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اختلاف نشان داد (جدول ۳) به‌طوریکه با افزایش سطح پلوئیدی میزان فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت. در گیاه سورگوم گزارش شده (Sotude Ardabili *et al.*, 2014) آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تتراپلوئید افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان دیپلوئید داشته‌اند.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.16.4]

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات فیزیولوژی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید

سطح پلوئیدی	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئید	آنتوسیانین	آسکوربیک پراکسیداز	کاتالاز	فنل کل	پروتئین کل	فلاونوئید
شاهد	۱۳۳/۱ b	۲۱۳/۱ a	۹۳/۸۳ b	۰/۰۰۲ b	۰/۰۰۰۳ b	۰/۰۰۰۸ b	۲/۶۲ a	۱/۴۱ b	۰/۰۴ b
۰/۵ گرم بر لیتر	۱۸۳/۳ a	۱۴۲/۲ b	۱۵/۱۳ a	۰/۰۰۴ a	۰/۰۰۰۵ a	۰/۰۰۱ a	۲/۳۷ a	۱/۴۵ a	۳/۰۲ a

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت غیر معنی‌دار

محتوای پروتئین کل و کارتنوئید: نتایج نشان داد که با افزایش سطح پلوئیدی میزان پروتئین کل در گیاهان تتراپلوئید افزایش یافت ولی از نظر آماری اختلاف معنی‌دار نبود (جدول ۳). همچنین افزایش سطح پلوئیدی تأثیر معنی‌داری در احتمال یک درصد روی میزان کارتنوئید گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید نشان داد (جدول ۳). در بعضی گونه‌ها مانند نیلوفر پیچ و تربچه (Yan *et al.*, 2014) پروتئین کل بیش از دو برابر افزایش یافته است و در تحقیقی دیگر (Afshar Mohammadian *et al.*, 2012) گزارش شده که گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین میزان کارتنوئید بیشتری نسبت به گیاهان دیپلوئید داشته اما شرایطی مانند دما، شدت پرتو و میزان آب در دسترس در طول فصل رشد نیز بر میزان کارتنوئید تأثیر گذار بوده است.

آنتوسیانین: با افزایش سطح پلوئیدی محتوای آنتوسیانین در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید افزایش یافت (جدول ۳). گزارشی مبنی بر کاهش یا افزایش میزان آنتوسیانین با تیمار با کلشی‌سین در گیاه تتراپلوئید نسبت به گیاه دیپلوئید یافت نشد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق مشابه اغلب گزارش‌های قبلی ثابت شد که کلشی‌سین از جمله عوامل ضدسنتز میکروتوبول‌ها و پلی‌پلوئیدکننده است (KliMa *et al.*, 2008). در این آزمایش بهترین تیمار جهت القاء تتراپلوئیدی از غلظت ۰/۵ گرم در لیتر کلشی‌سین در مدت زمان ٦ ساعت به‌دست آمد. در بررسی و مقایسه صفات کمی از قبیل ارتفاع گیاه، تعداد شاخه جانبی، تعداد برگ، وزن تر و خشک و همچنین از نظر کلروفیل a، محتوای آنتوسیانین، آسکوربیک پراکسیداز و فلاونوئید گیاهان تتراپلوئید نسبت به گروه شاهد برتری داشتند. به‌طورکلی با توجه به تیمار گیاهان با کلشی‌سین و تولید گیاهان تتراپلوئید، این گیاهان از نظر صفات مورفولوژیکی در سطح بالاتری نسبت به گیاهان دیپلوئید بودند و از نظر صفات فیزیولوژی نیز اغلب تتراپلوئیدها نسبت به دیپلوئیدها برتری نشان دادند. لذا روش اصلاحی مبتنی بر پلی‌پلوئیداسیون گیاه زنیان مفید و قابل توصیه است. ضمن اینکه پلی‌پلوئیدی با تغییرات ساختاری، نموی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گسترده‌ای در گیاهان همراه است که نتیجه آن ایجاد تنوع گسترده برای انتخاب به‌ویژه برای سازگاری بیشتر به تنش‌های محیطی است (Arzani and Ashraf, 2016)، که می‌تواند کاربردهای بالقوه برای اصلاح گیاهان دارویی به‌خصوص آن دسته از گیاهانی که از اندام رویشی آنها به‌طور تجاری استفاده می‌شود، داشته باشد.

منابع

Abdoli, M. J., Moieni, A. and Badi, H. N. (2013) Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicine-induced tetraploid plants of *Echinacea purpurea* (L.). Acta Physiologiae Plantarum 35: 2075-2083.

Adelanwa, M., Habeeb, M. and Adelanwa, E. (2011) Morphological studies of the effect of colchicine and paradichlorobenzene on tomato (*Lycopersicon esculentum*). Journal of Environmental Issues and Agriculture in Developing Countries 3: 122-127.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.16.4]

Afshar Mohammadian, M., Omidi, Z., Purakbari kasmaei, R. and Asadi Abkenar, A. (2013) The effect of polyploidy on some anatomical and antioxidant characteristics of *Citrus ourantifulia* A. Journal of Plant Researches 26: 238-246.

Afshar Mohammadian, M., Pour Akbari, R., Omidi, Z., Ghanati, F. and Torang, A. (2012) The effect of induced polyploidy on morphological and physiological traits of lemon (*Citrus aurantifolia* L.). Plant Biology Journal 12: 13-24.

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

Arzani, A. and Ashraf, M. (2016) Smart engineering of genetic resources for enhanced salinity tolerance in crop plants. Critical Reviews in Plant Sciences 35: 146-189.

Arzani, A. and Darvey, N. L. (2001) The effect of colchicine on triticale anther-derived plants: Microspore pre-treatment and haploid-plant treatment using a hydroponic recovery system. Euphytica 122: 235-241.

Beers, R. F. and Sizer, I. W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. Journal of Biological Chemistry 195: 133-140.

Birami kohi, A., Fahmideh, L. and Riasat, M. (2016) Evaluation of morphologic and physiologic traits of sistan's native fenugreek (T*rigonellafoenum graecum*) under colchicine treatments. Journal of Crop Breeding 8: 153-159.

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: 248-254.

Byrne, M. C., Nelson, C. J. and Randall, D. D. (1981) Ploidy effects on anatomy and gas exchange of tall fescue leaves. Plant Physiology 68: 891-893.

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

Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. and Chern, J. C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis 10.

Chattopadhyay, D. and Sharma, A. (1990) Chromosome studies and microspectrophotometric estimation of nuclear DNA in different strains of *Coriandrum sativum* L. Cytobios 64: 43-51.

Davari, A., Solouki, M. and Fazeli-Nasab, B. (2018) Effects of jasmonic acid and titanium dioxide nanoparticles on process of changes of phytochemical and antioxidant in genotypes of *Satureja hortensis* L. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants 5: 1-20.

De Azevedo Neto, A. D., Prisco, J. T., Eneas-Filho, J., De Abreu, C. E. B. and Gomes-Filho, E. (2006) Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environmental and Experimental Botany 56: 87-94.

Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L. and Van Huylenbroeck, J. (2011) Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 104: 359-373.

Fathi, S., Masiha, S. and Panahandeh, J. (2011) Duplication of L3-layer chromosomes of *solanum commersonii* diploid cultivars and *S. aureus* strain hybrids (*S. acaule* × *S. phureja*) using different doses of colchicine. In: Proceeding of the 7th Iranian Horticultural Science Congress.Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

Fazeli-Nasab, B. (2018) The effect of explant, BAP and 2,4-D on callus induction of *trachyspermum ammi*. Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences 12: 578-586.

Fazeli-nasab, B. and Fooladvand, Z. (2016) A review on iranian *Carum copticum* (L.): composition and biological activities. European Journal of Medicinal Plants 12: 1-8.

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

Ghotbi Ravandi, E., Dehghan, E., Estaji, A. and Naghdi Badi, H. (2014) Increasing the production of valuable phytopharmaceutical compounds by chromosome manipulation: perspectives and techniques of induction and selection of polyploid plants. Journal of Medicinal Plants 2: 11-26.

Haghiroalsadat, F., Azhdari, M., Oroojalian, F., Omidi, M. and Azimzadeh, M. (2015) the chemical assessment of seed essence of three native medicinal plants of Yazd province (*Bunium Premium*, *Cuminum Cyminum*, *Trachyspermum Copticum*) and the comparison of their antioxidant properties. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences 22: 1592-1603.

Hasanzadeh, E., Rezazadeh, S., Shamsa, S., Dolatabadi, R. and Zarringhalam, J. (2010) Review on phytochemistry and therapeutic properties of fenugreek (*Trigonella foenum-graceum*). Journal of Medicinal Plants 2: 1-18.

Havsteen, B. (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. Biochemical Pharmacology 32: 1141-1148.

Hosseini, B. and Javanbakht, S. (2017) Effects of in vitro polyploidy induction on some morphological, physiological and biochemical traits of *Salvia leriifolia* Benth. Scientific Journal Management System 25: 24-42.

Hosseini, H., Chehrazi, M., Nabati Ahmadi, D. and Mahmoodi Sorestani, M. (2012) Polyploidy stimulation in *catharanthus roseus* cv. alba and changes in phenotypic characteristics. In: Proceeding of the 1th National Conference on Sustainable Development Strategies.Tehran, Iran.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.16.4]

Hosseini, H., Chehrazi, M., Nabati Ahmadi, D. and Mahmoodi Sorestani, M. (2015) Induction of autotetraploidy in Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* cv. Rosea) by colchicine treatment in order to induce diversity of morph-physiological and phenology traits. Journal of Plant Process and Function 3: 1-10.

Khalili, H. and Baghbani-arani, F. (2017) Green synthesized of silver nanoparticles using *artemisia tschernieviana* extract and evaluation of cytotoxicity effects on human colon cancer (HT29) and normal (HEK293) cell lines. Journal of Ilam University of Medical Sciences 25: 91-100.

KliMa, M., VyVadiloVa, M. and Kucera, V. (2008) Chromosome doubling effects of selected antimitotic agents in *Brassica napus* microspore culture. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 44: 30-36.

Kondorosi, E., Roudier, F. and Gendreau, E. (2000) Plant cell-size control: growing by ploidy? Current Opinion in Plant Biology 3: 488-492.

Lin, M., Wu, Q., Zheng, S. and Tian, H. (2011) Tissue culture and polyploidy induction of *Morinda officinalis*. China Journal of Chinese Materia Medica 36: 2325-2328.

Madon, M., Clyde, M., Hashim, H., Mohd, Y., Mat, H. and Saratha, S. (2005) Polyploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. Journal of Oil Palm Research 17: 110-123.

Mansouri, H. and Bagheri, M. (2015) The effect of polyploidy induction on some growth parameters in *Cannabis sativa* L. Journal of Plant Process and Function 4: 113-120.

Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J. and Nacoulma, O. G. (2005) Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry 91: 571-577.

Milo, J., Levy, A., Palevitch, D. and Ladizinsky, G. (1987) Thebaine content and yield in induced tetraploid and triploid plants of *Papaver bracteatum* Lindl. Euphytica 36: 361-367.

Nadernejad, N., Ahmadimoghadam, A., Hossyinifard, J. and Poorseyedi, S. (2013) Study of the rootstock and cultivar effect in PAL activity, production of phenolic and flavonoid compounds on flower, leaf and fruit in pistachio (*Pistacia vera* L.). Iranian Journal of Plant Biology 5: 95-109.

Naghavi, M. R., Mardi, M., Ramshini, H. A. and Fazeli-Nasab, B. (2004) Comparative analyses of the genetic diversity among bread wheat genotypes based on RAPD and SSR markers. Iranian Journal of Biotechnology 2: 195-202.

Noori, S. A. S., Norouzi, M., Karimzadeh, G., Shirkool, K. and Niazian, M. (2017) Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 130: 543-551.

Omidbaigi, R., Yavari, S., Hassani, M. E. and Yavari, S. (2010) Induction of autotetraploidy in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatment. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research 18: 23-35.

Panahi, Y., Alishiri, G. H., Parvin, S. and Sahebkar, A. (2016) Mitigation of systemic oxidative stress by curcuminoids in osteoarthritis: results of a randomized controlled trial. Journal of Dietary Supplements 13: 209-220.

Piromya, R. and Kermanee, P. (2013) Occurrence of tetraploidy in colchicine-treated physic nut (*Jatropha curcas* Linn.). Kasetsart Journal 47: 23-29.

Randall, D. D., Nelson, C. J. and Asay, K. H. (1977) Ribulose bisphosphate carboxylase: altered genetic expression in tall fescue. Plant Physiology 59: 38-41.

Rauf, S., Khan, I. A. and Khan, F. A. (2006) Colchicine-induced tetraploidy and changes in allele frequencies in colchicine-treated populations of diploids assessed with RAPD markers in *Gossypium arboreum* L. Turkish Journal of Biology 30: 93-100.

Roughani, A., Miri, S. M., Kashi, A. K. and Khiabani, B. N. (2017) Increasing the ploidy level in spinach (*Spinacia oleracea* L.) unsing mitotic inhibitors. Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology 18: 24-130.

Rubuluza, T., Nikolova, R., Smith, M. and Hannweg, K. (2007) In vitro induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicine. South African Journal of Botany 73: 259-261

Sairam, R. K., Rao, K. V. and Srivastava, G. (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Science 163: 1037-1046.

Sarathum, S., Hegele, M., Tantiviwat, S. and Nanakorn, M. (2010) Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. European Journal of Horticultural Science 75: 123-127.

Sargazi, A., Fakheri, B., Soloki, M. and Fazeli-Nasab, B. (2016) Genetic diversity of som population of medicinal ajowan (*Carum copticum*) using RAPD marker. Journal of Medicinal Plants Biotechnology 2: 22-36.

Sari, N., Abak, K. and Pitrat, M. (1999) Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai. Scientia Horticulturae 82: 265-277.

Skibola, C. F. and Smith, M. T. (2000) Potential health impacts of excessive flavonoid intake. Free Radical Biology and Medicine 29: 375-383.

Sotude Ardabili, G., Asgari Zakaria, R. and Zare, N. (2014) Polyploidy induction and its effects on some morpho-physiologic characteristics in sorghum (*Sorghum bicolor* cv. KFS2). Iranian Journal of Crop Sciences 16: 151-164.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.16.4]

Svehlikova, V. and Repcak, M. (2000) Variation of apigenin quantity in diploid and tetraploid *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. Plant Biology (Stuttg) 2: 403-407.

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

Tohidi, B., Rahimmalek, M. and Arzani, A. (2017) Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. Food Chemistry 220: 153-161.

Yan, P., Xu, Y. Y., Zhu, X. W., Zhe, L., Gong, Y. Q., Liang, X., Gong, M. Y. and Liu, L. W. (2014) Molecular characterization and expression profiles of myrosinase gene (RsMyr2) in radish (*Raphanus sativus* L.). Journal of Integrative Agriculture 13: 1877-1888.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.16.4]

Investigating the possibility of polyploidy production and Its effect on phenolic content and antioxidant enzymes of *Carum copticum* of Pakistani population

Raheleh Akbari[1], Leila fahmideh[1*] and Bahman Fazeli-Nasab[2]

[1]Department of Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran
[2] Lecturer, Research Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran
(Received: 29/04/2018, Accepted: 25/08/2018)

Abstract

Nowadays, the induction of chromosome doubling (polyploidization) using colchicine is regarded as one of promising methods for improving of medicinal plants in order to increase their production. In this research, colchicine was used for the induction of polyploidy and examining its effect on the amount of polyploidy and some morphological and physiological traits of Pakistani population of the Ajowan medical plant. Colchicine with concentrations of 0, 0.2, 0.5, 0.75 and 1 g/L, and for time durations of 6, 12 and 18 hours was used on the root apical meristem (RAM). A factorial experiment in completely randomized design (CRD) with three replications was used. Chromosomal analysis was carried out using squash technique and visual analysis method. The results showed that the number of somatic chromosomes in the examined species was either in diploid (2n = 2x = 18) or tetraploid (2n = 4x = 36) status. The highest percentage of polyploidy induction (80%) was obtained after dipping the seedlings at a concentration of 0.5 g/L colchicine for 6 hours. Then, after the treatment of the plant with colchicine and cultivating the treated and control seeds in the pot, the grown seedlings were studied at flowering stage. The results showed that tetraploid plants (treated) were superior to the control group plants with regard to physiological (chlorophyll a, anthocyanin, ascorbate peroxidase, catalase and flavonoid) and morphological (number of lateral branches, plant height, number of leaves and fresh and dry weight) traits, therefore, the studied breeding method can be useful and applicable for the Ajwain (*Trachyspermum ammi*) plant.

Keywords: Tetraploid, Chromosomal count, Colchicine, Phenol, Flavonoids

Corresponding author, Email: leila.fahmideh@uoz.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1398.8.32.16.4]