مقاله پژوهشی

اثر تیمار کلشی‌سین و القای پلی‌پلوئیدی بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی رقم کاشف چای (*Camellia sinensis* cv. Kashef)

صنم صفائی چایی‌کار* و کوروش فلک‌رو

پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران

(تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۳/۲۲، تاریخ پذیرش نهایی:۱۴۰۱/۰۶/۲۲)

چکیده

چای (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze) متعلق به خانواده تئاسه و به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان اقتصادی جهان دارای خواص درمانی فراوانی بوده و به‌عنوان نوشیدنی مفرح مورد مصرف قرار می‌گیرد. القا پلی‌پلوئیدی با استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا یکی از روش‌های به‌نژادی گیاهان دارویی به‌منظور افزایش قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه است. به‌منظور بررسی تأثیر تیمار کلشی‌سین بر القا پلی‌پلوئیدی و مقایسه تغییرات صفات مختلف در گیاهان تتراپلوئید حاصله و دیپلوئید (شاهد) رقم کاشف چای، پژوهشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور غلظت‌های مختلف کلشی‌سین (صفر، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد) و مدت زمان (۳ و ۶ روز متوالی) در سه تکرار انجام شد. برای تعیین سطح پلوئیدی، بررسی‌های مورفولوژیکی، میکروسکوپی و شمارش کروموزوم انجام شد. تعداد کروموزوم در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید به ترتیب برابر با ۳۰ (2n=2x=30) و ۶۰ (2n=4x=60) ثبت گردید. نتایج بررسی‌ها نشان داد که غلظت ۰/۵ ٪ کلشی‌سین در مدت زمان شش روز متوالی با بازدهی ۱۲/۸۲٪ مناسب‌ترین تیمار برای تولید گیاهان تتراپلوئید است. القای پلی‌پلوئیدی باعث ایجاد تغییرات معنی‌دار در اندازه برگ، محتوی کلروفیل و کاروتنوئید و افزایش ترکیب‌های فیتوشیمیایی مانند پلی‌فنل، کافئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شاخساره‌های تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید گردید. همچنین شاخص تراکم روزنه در گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید کاهش معنی‌داری را نشان داد. براساس نتایج این آزمایش، افزایش سطح پلوئیدی موجب افزایش ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی و برخی ترکیبات فیتوشیمیایی در گیاه دارویی چای گردید.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان، چای، پلی‌فنل، تتراپلوئیدی، کافئین

مقدمه

چای با نام علمی *Camellia sinensis* L. O. Kuntze گیاهی است چند ساله و همیشه سبز از خانواده Theaceae که دارای خواص دارویی فراوانی بوده و به‌عنوان نوشیدنی مفرح مورد مصرف قرار می‌گیرد (Lv *et al*., 2021). چای به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان اقتصادی جهان، نقش مهمی در توسعه روستایی، کاهش فقر و امنیت غذایی کشورهای در حال توسعه ایفا می‌کند. در ایران، چای در استان‌های شمالی کشور (گیلان و مازندران) به دلیل جایگاه و اهمیت بالایی که در بخش کشاورزی، صنعت و بازرگانی داراست، از جمله محصولات استراتژیک به شمار می‌رود (غلامی و همکاران، ۱۳۸۵). میزان تولید چای در کشور، سالانه حدود ۳۰ هزار تن چای خشک

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: s.safaie@areeo.ac.ir; safaei.sanam@gmail.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]

است و با توجه به اینکه مصرف سرانه چای خشک در کشور ایران ۱/۲ کیلوگرم است، این میزان تولید، بخشی از مصرف سرانه کشور را تأمین می‌کند (بی‌نام، ۱۳۹۹). چای دارای ترکیبات پلی‌فنلی (فلاونوئید) است، پلی‌فنل‌ها ۳۵-۳۰ درصد ماده خشک چای را شامل می‌شوند (Chaturvedula and Prakash, 2011). مهم‌ترین ترکیبات پلی‌فنلی موجود در چای کاتچین‌ها هستند (Labbe and Bazinet, 2006)، که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدسرطانی و ضدجهش‌زایی بوده و اثرات مفیدی در بدن انسان دارند (Hara, 2001; Banon *et al*., 2007). کافئین موجود در چای از فاکتورهای مهمی است که در کنترل کیفیت نوشیدنی چای (خصوصیات چشایی چای) در سطح ملی و بین‌المللی مورد بررسی قرار می‌گیرد و دارای اهمیت ویژه‌ای است (Sinija and Mishra, 2009). نتایج مطالعات سیتوژنتیکی انجام شده روی گونه *Camellia sinensis* نشان داده که تعداد کروموزوم‌ها برابر 2n=2x=30 است (Chaudhuari, 1992).

القا مصنوعی پلی‌پلوئیدی، ابزار توانمندی در به‌نژادی بسیاری از گیاهان از جمله گیاهان دارویی است (Niazian and Nalousi, 2020). روش القای پلی‌پلوئیدی با استفاده از کلشی‌سین باعث افزایش محتوی DNA گیاهان می‌شود و پتانسیل تولید متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد (Dhawan and Lavania, 1996). به دلیل اهمیت گیاهان دارویی و افزایش تقاضا برای داروهای مبتنی بر متابولیت‌های ثانویه گیاهی، پلی‌پلوئیدی می‌تواند ابزار مفیدی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی باشد (Madani *et al*., 2021). میزان متابولیت‌های ثانویه در ژنوتیپ‌های پلی‌پلوئید گیاهان دارویی بیشتر از والدین دیپلوئیدشان گزارش شده است (Salma *et al*., 2017; Pradhan *et al*., 2018). پلی‌پلوئیدی در بسیاری از گیاهان دارویی از جمله آب بشقابی (*Centella asiatica*)، بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*)، نعنا هندی (*Pogostemon cablin*)، پرتقال ماندارین (*Citrus reticulata*) و سیب‌زمینی وحشی (*Solanum commersonni*) منجر به افزایش متابولیت‌های ثانویه شده است (Kaensaksiri *et al*., 2011; Madani *et al*., 2015; Widoretno, 2016; Fasano *et al*., 2016; Tan *et al*., 2017). پلی‌پلوئیدی مصنوعی به‌طور موفقیت‌آمیزی منجر به افزایش محتوی فنل در گیاهان مختلف گردیده است (Madani *et al*., 2021). شواهد به‌دست آمده از آنالیزهای شیمیایی پلی‌پلوئیدها نشان می‌دهد که از لحاظ ترکیبات فنولی غنی‌تر بوده و تنوع آنزیمی بیشتری نشان می‌دهند. تغییرات در پروفیل متابولیتی پلی‌پلوئیدها را می‌توان به‌خاطر برهم خوردن مکانیسم‌های تنظیم‌کننده بیوسنتز ترکیبات منفرد، توجیه نمود (Chen and Gao, 2007). به عنوان مثال پلی‌پلوئیدی موجب افزایش میزان فنیل پروپانوئید در سیب‌زمینی وحشی (*Solanum commersonii*) شده است (Caruso *et al*., 2011). Ghotbi Ravandi و همکاران (۲۰۱۳) افزایش معنی‌دار در محتوی کل اسید فنولیک و کلروژنیک در برگ‌های تتراپلوئید کاسنی (*Cichorium intybus*) را گزارش نمودند. القای پلی‌پلوئیدی در خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum* Lindl.) سبب افزایش ترکیب‌های فیتوشیمیایی مانند فنل کل، فلاونوئید کل و آنتی‌اکسیدان کل در گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید شد (Madani *et al*., 2019).

شناخته‌شده‌ترین اثر پلی‌پلوئیدی در گیاهان، بزرگ شدن اندازه سلول است. با توجه به افزایش اندازه سلول، پلی‌پلوئیدها از نظر مورفولوژیکی و ریخت‌شناسی با دیپلوئیدها تفاوت دارند. به‌عنوان مثال در پلی‌پلوئیدها اندازه اندام‌هایی نظیر برگ‌ها، گل‌ها و میوه‌ها از همتای دیپلوئیدشان بزرگ‌تر است (Ovrebo and Edgar, 2018). اتوپلی‌پلوئیدها روزنه بزرگ‌تری نسبت به دیپلوئیدها دارند و به‌عنوان یکی از شاخص‌های اصلی تغییرات در سطوح پلوئیدی استفاده می‌شوند (Salma *et al*., 2017). اخیراً Corneillie و همکاران (۲۰۱۹) با تحقیقی که روی (*Arabidopsis thaliana*) انجام دادند، به این نتیجه دست یافتند که پلی‌پلوئیدی منجر به تغییر دیواره سلولی و ترکیب قندی می‌شود. این تغییرات می‌تواند بر ساختارهای درگیر در تولید، ترشح و ذخیره‌سازی اسانس‌ها، مستقل از اندازه آنها تأثیر بگذارد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]

پلی‌پلوئیدی در گونه‌های *Camellia* ممکن است منجر به تنوع فنوتیپی گردد. به‌طورکلی در چای، تری‌پلوئیدها نسبت به دیپلوئیدها قوی‌تر، سخت‌تر و متحمل به سرما هستند (Simura and Osone, 1956). مطالعات مورفولوژیک و آناتومیک پلی‌پلوئیدهای چای، محدوده وسیعی از تنوع فنوتیپی و خصوصیات آناتومیکی نظیر فراوانی و اندازه روزنه را نشان داده است (Chaudhuari, 1992). میانگین تعداد روزنه در گیاهان تتراپلوئید، تری‌پلوئید و دیپلوئید چای به ترتیب ۲۱/۹، ۳۲/۵ و ۴۱/۴ گزارش گردیده است (Ahmed and Singh, 1993). طبق گزارش Shiyan و Depeng (۱۹۸۹) تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ گونه‌های دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید چای به ترتیب، ۱۶، ۲۴ و ۳۲ بیان گردید. در اکثر موارد نشان داده شده که پلی‌پلوئیدی در چای میزان عملکرد را افزایش می‌دهد (Jayasuriya and Govindarajulu, 1975; Sharma and Ranganathan, 1986; Gunasekera and Ranatunga, 2003; Alam and Razaq, 2015) ولی این مورد همیشه صدق نمی‌کند و مواردی وجود دارد که افزایش پلی‌پلوئیدی منجر به کاهش تولید گردیده است (Banerjee, 1992b; Wachira, 1994). هر چند، تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها در سطوح پلوئیدی مشابه از لحاظ عملکرد می‌تواند وجود نداشته باشد. در موارد خاص، که تریپلوئیدها عملکرد بالاتری از دیپلوئیدها دارند، به پتانسیل برای گزینش و یا توسعه ارقام پلی‌پلوئید با عملکرد بالا دلالت دارد. با این اوصاف، توانایی ریشه‌دهی، اندازه برگ و وزن خشک برگ تریپلوئیدها و تتراپلوئیدها بیشتر از دیپلوئیدها است درحالی‌که در پنتاپلوئیدها و آنیوپلوئیدهای چای کمتر است (Baberjee, 1992b). سطوح مختلف پلوئیدی، اثرات متفاوتی را بر فیزیولوژی گیاه چای می‌گذارد. گیاهان تتراپلوئید و تری‌پلوئید چای به دلیل افزایش اندازه سلول، قدرت و سختی بیشتری دارند، حال آن‌که، گیاهان تری‌پلوئید به دلیل افزایش اندازه سلول‌ها و عقیمی، می‌توانند قدرت بیشتری داشته باشند. القا پلی‌پلوئیدی با استفاده از مواد شیمیایی ابزار مهمی برای بهبود فیزیولوژی و تولید گیاهان شناخته شده است، بنابراین، گیاهان پلی‌پلوئید چای باید برای غلبه بر مشکل عملکرد پایین و بارندگی محدود در مناطق چای‌کاری تولید شوند (Alam and Razaq, 2015).

در رابطه با القای پلی‌پلوئیدی و تأثیر آن بر برخی خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی چای ایران اطلاعاتی در دسترس نیست. این تحقیق با هدف بررسی امکان‌سنجی القای پلی‌پلوئیدی در رقم کاشف چای و در نهایت بهره‌گیری آن برای تولید گیاهان تتراپلوئید با ویژگی‌های فیتوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی بالاتر اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی، طرح آزمایشی و اعمال تیمارها: نهال‌های دو ساله (تکثیر غیرجنسی) رقم کاشف چای از ایستگاه تحقیقات چای شهید افتخاری فشالم به ستاد پژوهشکده چای انتقال و در گلدان‌های پلاستیکی کشت و گلدان‌ها در فضای مخصوص (سایه‌بان) نهال‌های چای نگهداری گردیدند. در مرحله ۲ تا ۳ برگی شاخساره‌های فعال، تیمار کلشی‌سین با غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد (وزنی/حجمی) و زمان‌های ۳ و ۶ روز متوالی با اعمال بر مریستم انتهایی شاخساره‌های فعال توسط تکنیک گلوله پنبه‌ای انجام گردید (Sebasthiampillai, 1976; Goswami and Sharma; 1979) (شکل ۱). به‌منظور استقرار و جذب بهتر کلشی‌سین در محل مریستم، به تمامی تیمارهای مورد استفاده مقدار ۵-۴ قطره توئین ۲۰ افزوده شد. پس از تیمار، به‌منظور جلوگیری از تبخیر کلشی‌سین و خشک شدن گلوله‌های پنبه‌ای، شاخساره‌های مورد نظر با پاکت‌های پلاستیکی مشبک پوشانده شد و در پایان دوره تیمار، پاکت‌ها برداشته شدند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۳۹۹ انجام شد.

شناسایی مقدماتی شاخساره‌های تغییریافته: پس از رشد جوانه‌های زنده و رسیدن به مرحله ۵-۴ برگی، بررسی مقدماتی سطح پلوئیدی کلیه شاخساره‌های تیمارشده با کلشی‌سین ابتدا از طریق بررسی و مقایسه مشخصات و ویژگی‌های ظاهری با شاخساره‌های شاهد (تیمار نشده) انجام

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]

شکل ۱- تیمار مریستم انتهایی شاخساره‌های فعال با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین توسط تکنیک گلوله پنبه‌ای

شد. بدین‌ترتیب که گیاهان مشکوک به پلی‌پلوئیدی با ویژگی-های تأخیر در رشد پس از اعمال تیمار، تفاوت در اندازه برگ به‌صورت بزرگ‌تر یا کوچک‌تر شدن، شکل و رنگ برگ (که معمولاً تیره‌تر از گیاهان شاهد بودند) در مقایسه با گیاهان شاهد گزینش شده (Ng'etich and Wachira, 1992; Banerjee, 1992) و ویژگی‌های مختلف اندازه‌گیری شدند.

بررسی خصوصیات روزنه: گیاهانی که در مرحله اول از طریق بررسی صفات ظاهری گزینش شده بودند، در مرحله دوم با استفاده از روش میکروسکوپی بررسی و غربال شدند. برای مشاهده روزنه‌ها، برگ سوم هر یک از گیاهان مشکوک به پلی‌پلوئیدی انتخاب و جدا و سپس اپیدرم زیرین برگ با استفاده از لاک ناخن جدا شد. به‌این منظور بخشی از برگ (10 mm×5 mm) که ترجیحاً فاقد رگبرگ اصلی هستند، با استفاده از لاک‌ناخن پوشانده، پس از ۵ تا ۱۰ دقیقه خشک شده، سپس با استفاده از یک تیغ تیز حاشیه‌های نمونه را به شکل چهارگوش درآورده، نوار چسبی شفاف روی آن چسبانده، و با انگشت شست فشار داده تا اپیدرم کاملاً به چسب متصل شود. سپس چسب که اپیدرم به‌صورت لایه شفاف بسیار نازکی به آن چسبیده است، جدا و روی لام چسبانده شد (Smith *et al.*, 1989). ویژگی‌های روزنه نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری (Nikon eclipse 50i) با بزرگنمایی 40 x بررسی شدند. با استفاده از این روش تعدادی از گیاهان مشکوک به پلی‌پلوئیدی تفکیک شدند.

ارزیابی سطح پلوئیدی از طریق سیتوژنتیک: ابتدا حدود ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر از جوانه شاخساره فعال، جدا و در داخل ظرف نمونه‌گیری حاوی مخلوط آب‌مقطر و یخ قرار داده و پس از انتقال به آزمایشگاه، قسمت انتهایی مریستم توسط تیغ اسکالپل جدا و برای مدت ۸ ساعت به محلول پیش‌تیمار آلفا برومونفتالین منتقل شدند (عاشوری، ۱۳۸۷؛ عاشوری و همکاران، ۱۳۹۷). پس از خارج کردن جوانه‌ها از محلول پیش‌تیمار، شستشو و در محلول تثبیت‌کننده کارنوی (۱ قسمت اسید استیک و سه قسمت اتانول) در یخچال نگهداری گردیدند و با گذشت ۲۴ ساعت برای مدت ۳۰ دقیقه در آب جاری شستشو داده شدند (عاشوری، ۱۳۸۷؛ عاشوری و همکاران، ۱۳۹۷). جوانه‌ها در محلول اسید کلریدیک (HCl) یک نرمال به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی ۶۰ درجه سانتی‌گراد هیدرولیز و پس از شستشو رنگ‌آمیزی با رنگ استواورسئین ۱/۵ درصد صورت گرفت (عاشوری، ۱۳۸۷؛ عاشوری و همکاران، ۱۳۹۷). در مرحله آخر نمونه‌ها روی لام قرار داده شد و بعد از اسکواش، شمارش کروموزوم توسط میکروسکوپ نوری (Nikon eclipse 50i) با بزرگنمایی 100 x انجام شد.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]

عکس‌برداری از نمونه‌های تهیه‌شده با استفاده از دوربین Nikon مدل E-100 که بر روی میکروسکوپ نوری مدل Nikon eclipse 50i نصب شده بود به مانیتور منتقل و ذخیره شد. از هر تیمار تعداد ۱۵ اسلاید و از هر اسلاید تعداد پنج سلول انتخاب و شمارش کروموزوم آنها انجام شد و به این صورت در دو گروه طبقه‌بندی شدند: ۱- سلول‌های دیپلوئید که تغییر تعداد کروموزوم را نشان ندادند و ۲- سلول‌های تتراپلوئید که تعداد کروموزوم آنها دو برابر تعداد کروموزوم سلول‌های دیپلوئید بود. در ادامه داده‌های هر گروه دیپلوئید و تتراپلوئید براساس درصد محاسبه شد (اکبری و همکاران، ۱۳۹۸).

ارزیابی برخی خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی: پس از تعیین بهترین غلظت و مدت زمان اعمال کلشی‌سین (غلظت ۰/۵ درصد و مدت زمان شش روز متوالی) برای القا پلی‌پلوئیدی که با انجام عمل اسکواش و شمارش کروموزومی حاصل شد، برخی صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی در نهال‌های تکثیری، مورد بررسی قرار گرفتند.

طول و عرض برگ سوم: طول و عرض برگ سوم با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری کلروفیل و کاروتنوئید: اندازه‌گیری کلروفیل‌های a و b به روش آرنون (Arnon, 1949) و کاروتنوئید کل به روش Price و Hendry (۱۹۹۱) انجام گرفت. به ۰/۲ گرم نمونه برگی ساییده در ازت مایع، ۱۰ میلی‌لیتر استون سرد ۸۰٪ اضافه گردید، سپس ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. قسمت رویه شناور نمونه‌ها به آرامی با سمپلر برداشته و به تیوپ‌های درب‌دار منتقل و پس از افزودن ۹ میلی‌لیتر استون سرد ۸۰ ٪ به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Hanon ساخت چین میزان جذب در طول‌موج‌های ۴۸۰ (کاروتنوئید)، ۶۴۵ (کلروفیل b) و ۶۶۳ (کلروفیل a) نانومتر خوانده شدند. برای تنظیم دستگاه، از استون سرد ۸۰ ٪ به عنوان بلانک استفاده شد.

اندازه‌گیری مقدار پلی‌فنل: ۰/۲ گرم برگ سبز خشک آسیاب شده توزین و در لوله آزمایش در بن‌ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و با ۵ میلی‌لیتر متانول که قبلاً تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد گرم شده است، مخلوط گردید. مخلوط حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده و در این مدت دو بار عمل هم‌زدن در ۵ و ۱۰ دقیقه تکرار شد. پس از خنک شدن، فاز رویی از کاغذ صافی عبور و به لوله مدرج ۱۰ میلی‌لیتری انتقال یافت. این عملیات مجدداً تکرار شده و عصاره حاصل از دو مرحله با محلول متانول در دمای اتاق به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. یک میلی‌لیتر از این عصاره با آب‌مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید. یک میلی‌لیتر از عصاره استخراج‌شده چای، ۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتوفنل و ۴ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم در مدت ۳ تا ۸ دقیقه در لوله آزمایش مخلوط شدند. جذب محلول تهیه شده و استاندارد گالیک اسید پس از یک ساعت نگهداری در دمای اتاق در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Hanon ساخت کشور چین خوانده شد (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۵). با استفاده از رابطه ۴ درصد پلی‌فنل کل به‌دست آمد (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۵)

رابطه ۴

$$\text{درصد پلی‌فنل کل} = A_{sample} \times V_{sample} \times d \times 100 / (S_{std} \times m_{sample} \times 1000000)$$

A_{sample}: میزان جذب نمونه در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر؛ V_{sample}: حجم نمونه؛ d: ضریب رقت؛ S_{std}: شیب خط منحنی استاندارد و m_{sample}: جرم نمونه

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: ۰/۱ گرم برگ سبز خشک آسیاب شده با ۱۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از رسیدن به دمای محیط، از کاغذ صافی عبور داده شد. یک میلی‌لیتر از محلول رویی صاف شده با متانول به نسبت ۱:۱۰ رقیق شد. محلول ۰/۰۰۳ درصد DPPH (در متانول) تهیه شده و جذب آن بلافاصله در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد.۳۰۰ میکرولیتر از محلول صاف‌شده اصلی و ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق‌شده با ۳ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۰۳ درصد DPPH (در متانل) به شدت مخلوط شده

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]

و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق باقی ماند. عصاره‌ها در ۵۱۷ نانومتر در مقابل شاهد متانول خوانده شدند. درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رابطه ۵ به دست آمد (Pripdeevech and Machan, 2011).

رابطه ۵

درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی = 100 × ($A_{DPPH\ 0}$ - A_{sample}) / $A_{DPPH\ 0}$

$A_{DPPH\ 0}$: میزان جذب محلول DPPH؛ A_{sample}: میزان جذب نمونه در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر

اندازه‌گیری میزان کافئین: برای اندازه‌گیری درصد کافئین، یک گرم برگ سبز خشک در دکانتور با ۵ میلی‌لیتر آمونیاک مخلوط شد. استخراج با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال کلروفرم در چهار مرتبه انجام شد. با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر محلول پتاس در دکانتور ناخالصی‌ها از عصاره جدا گردید. سپس عصاره حاصل با عبور از یک گرم سولفات سدیم خشک صاف شد. پس از تهیه رقت از عصاره حاصل، میزان جذب محلول در طول‌موج ۲۷۶ نانومتر با اسپکتروفتومتر تعیین گردید. درصد کافئین نمونه از طریق مقایسه با منحنی استاندارد کافئین محاسبه شد (Lakin, 1989).

نتایج با استفاده از نرم افزار SAS 9.4 (SAS-Institute-Inc, 2014) تجزیه و میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند، مقایسه صفات مختلف بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید با استفاده از آزمون آماری t انجام گرفت.

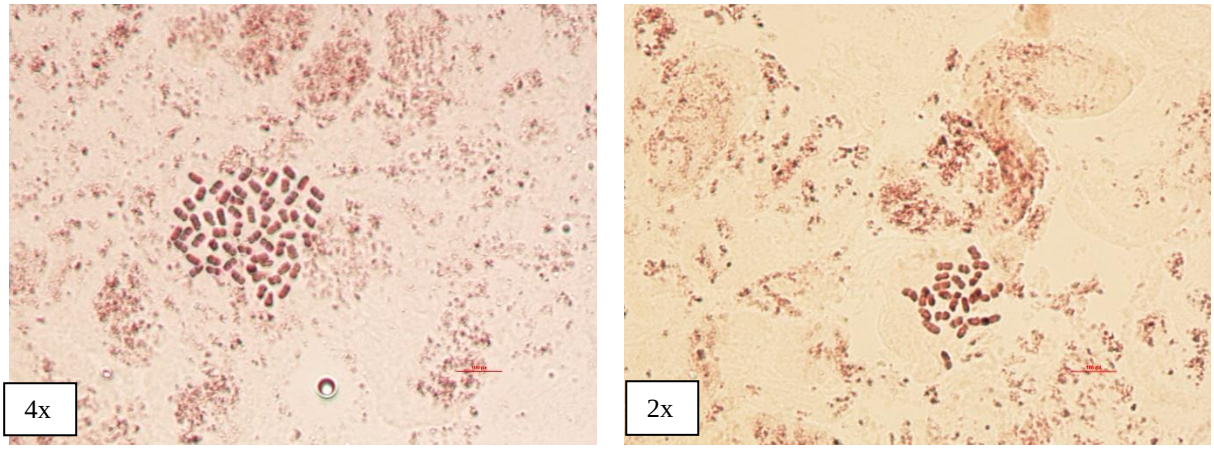
نتایج و بحث

ارزیابی تغییرات پلوئیدی به روش سیتوژنتیکی: نتایج حاصل از بررسی سطح پلوئیدی گیاه تیمارشده با سطوح مختلف کلشی‌سین در دو زمان مختلف با استفاده از شمارش کروموزومی بررسی شد. پس از مطالعه و عکس‌برداری از اسلاید نمونه شاهد، عدد کروموزومی در رقم کاشف چای 2n=2x=30 به‌دست آمد (شکل ۲) که مشابه با نتایج سایر محققین (غلامی و همکاران، ۱۳۸۵؛ عاشوری و همکاران، ۱۳۹۷) است. تعداد کروموزوم‌های سلول‌های سوماتیکی در نمونه‌های تتراپلوئید 2n=4x=60 به‌دست آمد (شکل ۲). نتایج تجزیه واریانس در رابطه با اثرات ساده تیمارهای مختلف نشان‌دهنده اثر معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار بر درصد احتمالی گیاهان تتراپلوئید برای رقم مورد مطالعه بود (جدول ۱). همچنین اثر متقابل غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار نیز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین میزان تتراپلوئیدی برای رقم کاشف (شکل ۳)، در غلظت ۰/۵ درصد کلشی‌سین و مدت زمان شش روز متوالی مشاهده شد. Heo و همکاران (۲۰۱۶) به این نتیجه دست یافتند که در *Lilium leichtlinii* طولانی‌ترین مدت تیمار همراه با کم‌ترین غلظت کلش‌سین در القای پلی‌پلوئیدی مؤثر است. بسیاری از پژوهشگران دیگر نیز نشان دادند که تیمار با کلشی‌سین یک روش کارآمدتری جهت مضاعف‌سازی کروموزوم در گیاهان است اما واکنش به کلشی‌سین بسته به گونه‌های گیاهی متفاوت است (Sarathum *et al*., 2010; Blasco *et al*., 2015; Zhang *et al*., 2008).

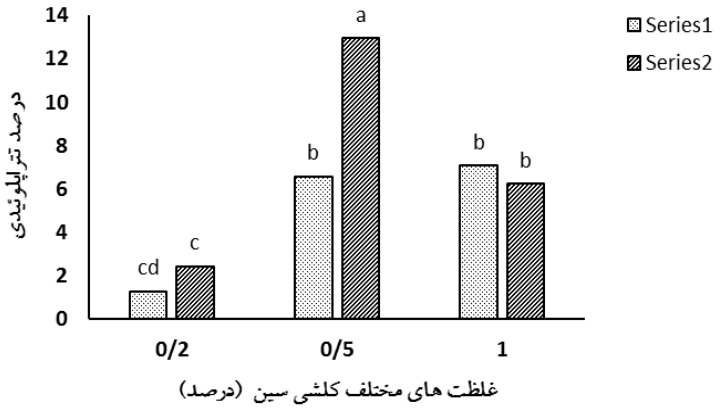
Sebasthiampillai (۱۹۷۶) از طریق تیمار جوانه‌های انتهایی با محلول آبی ۰/۲ و ۰/۵ درصد کلشی‌سین و مدت زمان ۶–۵ روز متوالی موفق به تولید ۱۳/۵ درصدی گیاهان تتراپلوئید چای گردید. Goswami و Sharma (۱۹۷۹) با استفاده از غلظت‌های ۱ و ۲ درصد کلشی‌سین به مدت ۷– ۵ روز به روش غوطه‌ور نمودن جوانه‌های انتهایی در محلول کلشی‌سین به موفقیت ۱۷– ۶ درصدی دست یافتند. غلظت مؤثر برای القا پلی‌پلوئیدی در گیاهان مختلف متفاوت است. از آنجایی که منطقه مرکزی مریستم مسئول تولید سلول‌های انتهایی ساقه است، دو برابر کردن کرموزوم‌های این ناحیه، باعث ایجاد بافت پلی‌پلوئید انتهایی در منطقه تیمارشده می‌گردد. از این رو به‌نظر می‌رسد گیاهان پلی‌پلوئید خالص در نتیجه دو برابر شدن موفق و مناسب سلول‌های تیمار شده در تمام لایه‌های بافتی منطقه مرکزی در ناحیه مریستمی بوجود می‌آیند که در نهایت گیاهانی با سلول‌های تتراپلوئید تولید می‌شود (Jones *et al*., 2008). تحقیقات نشان می‌دهد که در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]



شکل ۲- تعداد کروموزوم در نمونه‌های دیپلوئید (2n=2x=30) و تتراپلوئید (2n=4x=60) رقم کاشف چای



شکل ۳- اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار کلشی‌سین بر درصد تتراپلوئیدی در رقم کاشف چای

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس القا تتراپلوئیدی پس از تیمار با کلشی‌سین در رقم کاشف چای

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد تتراپلوئیدی
غلظت	۳	۱۱۸/۹۵**
مدت زمان	۱	۱۶/۵۷**
غلظت × مدت زمان	۳	۱۵/۷۰**
اشتباه آزمایشی	۱۶	۰/۲۸
ضریب تغییرات (٪)		۱۱/۷۰

ns و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.

بسیاری از گیاهان، تیمار مریستم انتهایی به‌طور مؤثری در به وجود آمدن گیاه تتراپلوئید مؤثر است (Malekzade *et al.*, 2010).

تأثیر تتراپلوئیدی بر خصوصیات مورفولوژیکی و آناتومیکی: نتایج بررسی‌های خصوصیات مورفولوژیکی و آناتومیکی گیاهان شاهد و تحت تیمار غلظت کلشی‌سین نشان

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]

جدول ۲- مقایسه میانگین برخی از ویژگی‌های مورفولوژیکی و آناتومیکی در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید رقم کاشف چای

ویژگی‌های بررسی‌شده	میانگین گیاهان تتراپلوئید	میانگین گیاهان دیپلوئید
طول برگ (mm)	۱۴۵/۴[a]	۱۱۱/۳[b]
عرض برگ (mm)	۵۷/۵۶[a]	۴۵/۱۴[b]
تراکم روزنه (mm^2)	۸۱/۲۳[b]	۱۲۹/۹۴[a]
طول روزنه (µm)	۵۸/۳۰[a]	۴۷/۷۰[b]
عرض روزنه (µm)	۴۸/۲۱[a]	۳۹/۱۴[b]

میانگین‌هایی که در هر ردیف حروف غیرمشابه دارند از لحاظ آماری در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار هستند (آزمون t).

داد که از نظر برخی خصوصیات دارایی تفاوت‌هایی به شرح زیر هستند:

طول و عرض برگ: بررسی شکل برگ در رقم کاشف چای نشان داد که برگ‌های گیاهان تتراپلوئید از نظر اندازه (جدول ۲) دارای طول و عرض بیشتری نسبت به گیاهان دیپلوئید بودند که با نتایج ارائه‌شده توسط Shafaroodi Malekzadeh و همکاران (۲۰۱۱)، در ریحان،Afshar Mohammadian و همکاران (۲۰۱۳) در لیموترش و Chen (۲۰۱۶) در گیاه دارویی درخت چای مشابهت دارد. افزایش چشمگیر در اندازه برگ با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار کلشی‌سین، و در نتیجه افزایش پلی‌پلوئیدی احتمالاً در نتیجه سازگاری بیشتر گیاهان پلی‌پلوئید با محیط است که با نتایج Escandon و همکاران (۲۰۰۷) روی گیاه دارویی بنگدانه که انگیزش پلوئیدی منجر به برگ‌های بزرگتر شد هماهنگی دارد. علاوه بر این برگ‌های گیاهان تتراپلوئید چین خورده و نا صاف بودند و از لحاظ ضخامت، ضخیم‌تر از گیاهان دیپلوئید بودند (شکل ۴). در 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 تأثیر می‌گذارد. بنابراین به‌نظر 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. در کل القای پلی‌پلوئیدی ضمن افزایش میزان DNA الگو، با تحریک مکانیسم‌هایی در سلول، نسخه‌برداری و ترجمه را تحت تأثیر قرار داده و با افزایش یا کاهش بیان و یا حتی خاموش شدن ژن‌ها، بسیاری از صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک گیاه را تغییر می‌دهد (Adams and Wendel, 2005).

خصوصیات روزنه: در مقایسه تراکم روزنه در یک میلی-متر مربع از نقاط مختلف موجود در سطح پشت برگ در ۱۰ نمونه از گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید در مرحله توسعه کامل برگ‌ها، نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ ٪ در تعداد روزنه در واحد سطح برگ بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید وجود دارد (جدول ۲ و شکل ۴). نمونه‌های تتراپلوئید دارای تراکم روزنه‌ای کمتری (۸۱/۲۳ در هر میلی‌متر مربع) بودند در حالی‌که نمونه‌های دیپلوئید تراکم روزنه بیشتری ۱۲۹/۹۴ در هر میلی‌متر مربع داشتند (جدول ۲). افزایش سطح پلوئیدی هسته اغلب موجب تغییرات ساختاری نظیر تراکم روزنه، افزایش اندازه سلول‌های روزنه و تعداد کلروپلاست در سلول‌های نگهبان می‌گردد (Hassanzadeh *et al.*, 2020). تراکم روزنه تحت تأثیر عوامل خارجی مانند دما و محتوای آب بافت‌ها قرار نمی‌گیرد و شمارش روزنه روشی مناسب، آسان و قابل اعتماد است که می‌تواند برای تعیین سطح پلوئیدی استفاده شود (Silva *et al.*, 2000). تراکم روزنه همبستگی منفی شدیدی با افزایش سطح پلوئیدی دارد و این همبستگی منفی می‌تواند به‌عنوان ابزار متمایزکننده‌ای در گیاهان با سطوح پلوئیدی متفاوت مورد استفاده قرار گیرد (ایزدی جلودار و همکاران، ۱۴۰۰). کاهش تراکم روزنه ممکن است

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]

شکل ۴- مقایسه اندازه و تراکم روزنه‌ها و تغییرات مورفولوژیکی بعد از اعمال تیمار کلشی‌سین در رقم کاشف چای (2x) دیپلوئید و (4x) تتراپلوئید (بزرگنمایی 40x)

به دلیل افزایش اندازه سلول در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید باشد (Hassanzadeh *et al*., 2020). کاهش تراکم روزنه در گیاهان تتراپلوئید سورگوم دو رنگ (*Sorghum bicolor*) و جعفری گزارش شده است (Ardabili *et al*., 2015; Nasirvand *et al*., 2018). گیاهان تتراپلوئید از لحاظ طول و عرض روزنه بزرگ‌تر از همتای دیپلوئید خود بودند و اختلاف بین آنها معنی‌دار بوده است (جدول ۲). دلیل افزایش اندازه روزنه‌ها و کاهش تعداد آنها را می‌توان با افزایش سطح ژنوم و تعداد کروموزوم مرتبط دانست. در تحقیقی که روی گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi* L.) انجام شده نتایج

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]

حاکی از آن است که افزایش طول و عرض روزنه در گیاهان تتراپلوئید ناشی از افزایش سطح برگ بوده است (Sadat Noori *et al*., 2017). نتایج این تحقیق با یافته‌های به‌دست آمده در ریحان (Omidbaigi *et al*., 2010a)، آرابیدوپسیس (Miller *et al*., 2012)، پونه کوهی (Ghani *et al*., 2014)، مارچوبه (Shiga, 2009)، گل جعفری (Sajjad *et al*., 2013) و بابونه کبیر (سحرخیز، ۱۳۸۵) که نشان دادند گیاهان تتراپلوئید دارای تعداد روزنه کمتر و اندازه روزنه بزرگتری نسبت به گیاهان دیپلوئید هستند، مطابقت دارد. مزیت تغییر اندازه اندام‌های گیاهی در اثر القای پلی‌پلوئیدی، سازگاری بیشتر گیاهان با محیط است؛ در واقع پلی‌پلوئیدها ممکن است قدرت زنده‌مانی بیشتری نسبت به اجداد دیپلوئید خود در برابر عوامل نامساعد محیطی داشته باشند، زیرا با افزایش اندازه سلول روزنه، توانایی گیاه در حفظ آب و ایجاد تعادل آبی بیشتر است.

تأثیر تتراپلوئیدی بر خصوصیات فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی، محتوای کلروفیل: نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد (جدول ۳) که میزان کلروفیل a و b در برگ نمونه‌های تتراپلوئید (به ترتیب ۲/۴۳ و ۰/۲۷۸۰ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) نسبت به نمونه‌های دیپلوئید (به ترتیب ۱/۰۶ و ۰/۱۷۰ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) بیشتر و همچنین میزان کاروتنوئید در برگ نمونه‌های تتراپلوئید (۰/۸۳۱۸ میلی‌گر در گرم وزن تر برگ) نسبت به نمونه‌های دیپلوئید (۰/۳۵۷۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) بیشتر بود. از آنجا که فرض بر آن است که با دوبرابر شدن ژنوم فعالیت متابولیکی سنتز rRNA و نسخه‌برداری افزایش می‌یابد، این افزایش می‌تواند بر میزان تنفس، فعالیت ژنی، تنوع و میزان فعالیت آنزیم‌ها و انتقال الکترون در فتوسنتز تأثیر داشته باشد (Ravandi *et al*., 2014; Nagymihaly *et al*., 2017). در تحقیقی گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید آکاسیا از نظر میزان کلروفیل با یکدیگر مقایسه شدند، مشاهده شد که میزان کلروفیل در گیاهان تتراپلوئید آکاسیا به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان دیپلوئید است (Mathura *et al*., 2006). مطالعه انجام شده بر روی *Lablab purpureus* نشان داد که میزان کلروفیل در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید افزایش می‌یابد (Dheer *et al*., 2014). افزایش کلروفیل ناشی از افزایش تعداد کلروپلاست در سلول‌های نگهبان است (Bagheri and Mansouri, 2015).

محتوای پلی‌فنل، کافئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی: در رقم کاشف چای افزایش سطح پلوئیدی تأثیر معنی‌داری را در میزان پلی‌فنل، کافئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی شاخساره‌های تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید داشت. بر این اساس، بیشترین میزان پلی‌فنل در شاخساره‌های تتراپلوئید با میزان ۱۶/۷۹ درصد نسبت به ۱۴/۶۱ درصد در گیاهان دیپلوئید بوده است (جدول ۳). سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل به روش DPPH در نمونه‌های حاصل نشان داد که شاخساره‌های تتراپلوئید دارای بالاترین فعالیت با میزان ۹۷/۲۴ درصد در مقایسه با همتای دیپلوئید خود با میزان ۹۵/۱۸ درصد بوده است (جدول ۳). محتوی کافئین در شاخساره‌های تتراپلوئید ۳/۳۶ درصد نسبت به ۲/۶۸ درصد در شاخساره‌های دیپلوئید بود (جدول ۳). به دلیل افزایش تعداد کروموزم‌ها و ژن‌های وابسته و در نتیجه میزان بیان ژن‌ها، طی افزایش سطح پلوئیدی، در بسیاری موارد غلظت متابولیت‌های ثانویه و مواد فیتوشیمیایی دفاعی در گیاه افزایش می‌یابد (Ayyobi *et al*., 2017). زمانی که مانند اکثر گیاهان دارویی، اندام‌های رویشی گیاه منبع متابولیت‌های ثانویه باشند، دست‌ورزی سطح پلوئیدی مانند مضاعف‌سازی مستقیم کروموزومی اتوپلی‌پلوئیدی یا آلوپلی‌پلوئیدی روشی سریع در بهبود و تولید ترکیب‌های ارزشمند دارویی است (Lavania, 1998; Ayyobi *et al*., 2017). Das و همکاران (۲۰۱۳) به منظور بررسی کیفیت ارقام تریپلوئید چای، میزان کافئین و کاتچین ۹۷ نتاج در حال تفرق، والدین تتراپلوئید و دیپلوئید را مورد بررسی قرار دادند. سطح کافئین و کاتچین نتاج تریپلوئید با والدین دیپلوئیدشان مقایسه شدند. بعضی از نتاج نسبت به والدین دیپلوئیدشان، کلون‌های با کیفیت بهتری بودند. اکثر نتاج حاصل از تلاقی گونه دیپلوئید *C. sinensis* و گونه تتراپلوئید، هتروزیس بالایی را از لحاظ کافئین و کاتچین

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]

جدول ۳- مقایسه میانگین برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید رقم کاشف چای

ویژگی‌های بررسی شده	میانگین گیاهان تتراپلوئید	میانگین گیاهان دیپلوئید
کلروفیل a (mg/g FW)	۲/۴۳[a]	۱/۰۶[b]
کلروفیل b (mg/g FW)	۰/۲۷۸۰[a]	۰/۱۷۰ [b]
کاروتنوئید (mg/g FW)	۰/۸۳۱۸[a]	۰/۳۲۷۵ [b]
پلی فنل (درصد)	۱۶/۷۹ [a]	۱۴/۶۱ [b]
فعالیت آنتی اکسیدانی (درصد)	۹۷/۲۴ [a]	۹۵/۱۸ [b]
کافئین (درصد)	۳/۳۶ [a]	۲/۶۷ [b]

میانگین‌هایی که در هر ردیف حروف غیرمشابه دارند از لحاظ آماری در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار هستند (آزمون t).

نشان دادند. در تحقیقی که بر روی گیاه خشخاش (*Papaver somniferum*) انجام شده القای پلی‌پلوئیدی باعث ایجاد تغییرات معنی‌دار در افزایش ترکیب‌های فیتوشیمیایی مانند فنل، فلاوونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدان کل در گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به دیپلوئید گردید (Madani *et al.*, 2019). به‌طورکلی اتوپلی‌پلوئیدی در بسیاری از گیاهان دارویی از قبیل پیچ امین‌الدوله (*Lonicera japonica*) (Kong *et al.*, 2017) و اطلسی (Griesbach and Kam, 1995) سبب افزایش فنل کل، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان کل شد. در گیاه دارویی *Camellia sasanqua* افزایش سطح پلوئیدی، افزایش در غلظت کاتچین‌ها، اگزتراکین‌ها و کافئین‌ها را در پی داشته است (Jesus-Gonzalez and Weathers, 2003). افزایش تعداد کروموزوم‌ها و مقدار ژن‌های وابسته می‌تواند در بعضی موارد بیان و غلظت متابولیت‌های ثانویه و مواد شیمیایی دفاعی را افزایش دهد، با این حال این مورد در همه گیاهان صادق نیست و ممکن است در بعضی موارد ارتباط مشخصی بین مقدار، تعداد کپی ژن، خاموش شدن ژن و بیان متابولیت‌های ثانویه وجود نداشته و مکانیسم مولکولی دقیق که مشخص کند القای پلی‌پلوئیدی دقیقاً در کدام بخش متابولیت‌های ثانویه اثر می‌گذارد مبهم است (Buggs *et al.*, 2009).

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت ۰/۵ درصد کلشی‌سین به مدت شش روز متوالی بهترین تیمار جهت القا پلی‌پلوئیدی در رقم کاشف چای است. همچنین بررسی‌های بیشتر و مقایسه بین خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نشان داد که گیاهان تتراپلوئید از نظر صفات اندازه برگ، اندازه روزنه، میزان کلروفیل a، b، کاروتنوئید، پلی‌فنل، کافئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به گیاهان دیپلوئید برتری داشتند، لذا روش اصلاحی مبتنی بر پلی‌پلوئیدی رقم کاشف چای 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 که می‌تواند کاربردهای بالقوه برای اصلاح گیاهان دارویی به خصوص آن دسته از گیاهانی که از اندام رویشی آنها به‌طور تجاری استفاده می‌شود، داشته باشد.

منابع

اکبری، ر.، فهمیده، ل. و فاضلی‌نسب، ب. (۱۳۹۸) بررسی امکان تولید پلی‌پلوئیدی و اثر آن بر محتوای فنلی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی زنیان جمعیت پاکستان. فرآیند و کارکرد گیاهی ۳۲: ۳۲۳-۳۱۱.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]

ایزدی جلودار، ن.، چمنی، ا.، شکوهیان، ع. ا. و اصغری زکریا، ر. (۱۴۰۰) القا پلی‌پلوئیدی با استفاده از کلشی‌سین و شناسایی آن از طریق ویژگی‌های سیتولوژیکی در گل سوسن (*Lilium dandie*). مجله پژوهش‌های تولید گیاهی ۲۸: ۴۴-۳۳.

بی‌نام. (۱۳۹۹) اطلاعات تولید و تجارت چای در سال ۱۳۹۹. در دسترس https://www.irantea.org

سحرخیز، م. ج. (۱۳۸۵) تأثیر برخی از عوامل اقلیمی و سطح پلوئیدی بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه دارویی زینتی بابونه کبیر (*Tanacetum partenium* L.). پایان نامه دکتری تخصصی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

عاشوری، ذ. (۱۳۸۷) مطالعه سیوژنتیکی کلون‌های انتخابی چای (*Camellia sinensis*) در ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران.

عاشوری، ذ.، صفایی چایی کار، ص. و فلکرو، ک. (۱۳۹۷) بررسی سیتوژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های چای (*Camellia sinensis*) در ایران. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۳: ۲۶۳-۲۴۵.

غلامی، م.، فلک‌رو، ک. و گمار، م. (۱۳۸۵) بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های چای به کمک مطالعه سیوژنتیک. نهمین کنگره ژنتیک ایران، تهران، ایران.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. (۱۳۸۵) چای سبز و سیاه – اندازه‌گیری مواد اختصاصی آن قسمت اول: تعیین مقدار کل پلی‌فنل‌ها – روش رنگ‌سنجی با استفاده از معرف. شماره ۸۹۸۶-۱.

Adams, K. L. and Wendel, J. F. (2005) Novel patterns of gene expression in polyploid plants. TRENDS in Genetics 21: 539-543.

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

Ahmed, N. and Singh, I. D. (1993) A technique for rapid identification of ploidy level in tea. Two and a Bud 40: 31-33.

Alam, H. and Razaq, M. (2015) Induced polyploidy as a tool for increasing tea (*Camellia sinensis* L.) production. Journal of Northeast Agricultural University 22: 43-47.

Ardabili, G. S., Zakaria, R. A. and Zare, N. (2015) In vitro induction of polyploidy in *Sorghum bicolor* L. Cytologia 80: 495-503.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15.

Ayyobi, N., Hosseini, B. and Fattahi, M. (2017) Induction effects of colchicine and chitosan on rosmarinic acid production in hairy root cultures of Zarrin-Giah (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.). Journal of Molecular and Cellular Research (Iranian Journal of Biology) 30: 1-30.

Bagheri, M. and Mansouri, H. (2015) Effect of induced polyploidy on some biochemical parameters in *Cannabis sativa* L. Applied Biochemistry and Biotechnology 175: 2366-2375.

Banerjee, B. (1992) Selection and breeding of tea. In: Tea Cultivation to Consumption. (eds. Willson, K. C. and Clifford, M. N.) Pp. 53-86. Chapman and Hall, London.

Banon, S., Diaz, P., Rodriguez, M., Garrido, M. D. and Price, A. (2007) Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. Meat science 77: 626-633.

Blasco, M., Badenes, M. L. and Naval, M. (2015) Colchicine-induced polyploidy in loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 120: 453-461.

Buggs, R. J. A., Doust, A. N., Tate, J. A., Koh, J., Soltis, K., Feltus, F. A. and Soltis, D. E. (2009) Gene loss and silencing in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae): Comparison of natural and synthetic allotetraploids. Heredity 103: 73-81.

Corneillie, S., De Storme, N., Van Acker, R., Fangel, J. U., De Bruyne, M., De Rycke, R., ... and Boerjan, W. (2019) Polyploidy affects plant growth and alters cell wall composition. Plant Physiology 179: 74-87.

Caruso, I., Lepore, L., De Tommasi, N., Dal Piaz, F., Frusciante, L., Aversano, R. and Carputo, D. (2011) Secondary metabolite profile in induced tetraploids of wild *Solanum commersonii* Dun. Chemistry and biodiversity 8: 2226-2237.

Chaturvedula, V. S. P. and Prakash, I. (2011) The aroma, taste, color and bioactive constituents of tea. Journal of Medicinal Plants Research 5: 2110-2124.

Chaudhuari, T. C. (1992) Chromosomal complexes in tea (aneuploids and polyploids). In: Proceedings of the National Symposium on Tea Culture, Processing and Marketing. Hlrf-Upasi, Coonor, India.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]

Chen, B., Li, J., Zhang, J., Fan, H., Wu, L. and Li, Q. (2016) Improvement of the tissue culture technique for *Melaleuca alternifolia*. Journal of Forestry Research 27: 1265-1269.

Chen, L. L. and Gao, Sh. L. (2007) In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus memberanaceus*. Scientia Horticulture 112: 339-344.

Das, S. K., Sabhapondit, S., Ahmed, G. and Das, S. (2013) Biochemical evaluation of triploid progenies of diploid× tetraploid breeding populations of *Camellia* for genotypes rich in catechin and caffeine. Biochemical Genetics 51: 358-376.

Dhawan, O. P. and Lavania, U. C. (1996) Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: A review. Euphytica 87: 81-89.

Dheer, M., Sharma, R. A., Gupta, V. P. and Punia, S. S. (2014) Cytomorphological investigations in colchicine-induced polyploids of *Lablab purpureus* (L.) Sweet. Indian Journal of Biotechnology 13: 347-355.

Escandon, A. S., Alderete, L. M. and Hagiwara, J. C. (2007) In vitro polyploidization of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America. Scientia Horticulturae 115: 56-61.

Fasano, C., Diretto, G., Aversano, R., D'Agostino, N., Di Matteo, A., Frusciante, L. and Carputo, D. (2016) Transcriptome and metabolome of synthetic Solanum autotetraploids reveal key genomic stress events following polyploidization. New Phytologist 210: 1382-1394.

Ghani, A., Neamati, S. H., Azizi, M., Saharkhiz, M. J. and Farsi, M. (2014) Artificial autotetraploidy induction possibility of two Iranian endemic mint (*Mentha mozaffarianii*) ecotypes. Notulae Scientia Biologicae 6: 185-191.

Ghotbi Ravandi, E., Rezanejad, F., Zolala, J. and Dehghan, E. (2013) The effects of chromosome-doubling on selected morphological and phytochemical characteristics of *Cichorium intyb*us L. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 88: 701-709.

Goswami, L. C. and Sharma, P. C. (1979) Colchicine-induced autotetraploids of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). Current Science.

Griesbach, R. J. and Kamo, K. K. (1996) The effect of induced polyploidy on the flavonols of Petunia 'Mitchell'. Phytochemistry 42: 361-363.

Gunasekera, M. T. K. and Ranatunga, M. A. B. (2003) Polyploidy in tea (*camellia sinensis* L.) and its applicatioon in tea breeding: A review. Tea Science 68: 14-26.

Hara, Y. (2001) Green Tea: Health Benefits and Applications. CRC Press, New York.

Hassanzadeh, F., Zakaria, R. A. and Azad, N. H. (2020) Polyploidy induction in *Salvia officinalis* L. and its effects on some morphological and physiological characteristics. Cytologia 85: 157-162.

Heo, J. Y., Jeong, S. H., Choi, H. R. and Park, S. M. (2016) Polyploid production in *Lilium leichtlinii* var. Maximowiczii using colchicine. JAPS: Journal of Animal and Plant Sciences 26.

Jayasuriya, P. and Govindarajulu, V. (1975) Chromosome Numbers in Some Tea Clones. Planters' Chronicle.

Jesus-Gonzalez, D. and Weathers, P. J. (2003) Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. Plant Cell Reports 21: 809-813.

Jones, J. R., Ranney, T. G. and Eaker, T. A. (2008) A Novel Method for Inducing Poyploidy in *Rhododendron* Seedlings. North Carolina State University, Fletcher, North Carolina.

Kaensaksiri, T., Soontornchainaksaeng, P., Soonthornchareonnon, N. and Prathanturarug, S. (2011) In vitro induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 107: 187-194.

Kong, D., Li, Y., Bai, M., Deng, Y., Liang, G. and Wu, H. (2017) A comparative study of the dynamic accumulation of polyphenol components and the changes in their antioxidant activities in diploid and tetraploid *Lonicera japonica*. Plant Physiology and Biochemistry 112: 87-96.

Labbe, D. and Bazinet, L. (2006) Effect of membrane type on cation migration during green tea electromigration and equivalent mass transported calculation. Journal of Membrane Science 275: 220-228.

Lakin, A. (1989) Food Analysis. Practical Handout. Reading University, UK.

Lavania, U. C. (1998) Enhanced productivity of the essential oil in the artificial autotertraploid of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash). Euphytica 38: 271-276.

Lv, Z., Zhang, C., Shao, C., Liu, B., Liu, E., Yuan, D. and Shen, C. (2021) Research progress on the response of tea catechins to drought stress. Journal of the Science of Food and Agriculture 101: 5305-5313.

Madani, H., Escrich, A., Hosseini, B., Sanchez-Munoz, R., Khojasteh, A. and Palazon, J. (2021) Effect of polyploidy induction on natural metabolite production in medicinal plants. Biomolecules 11: 899.

Madani, H., Hosseini, B., Dehghan, E. and Rezaei-chiyaneh, E. (2015) Enhanced production of scopolamine in induced autotetraploid plants of *Hyoscyamus reticulatus* L. Acta Physiologiae Plantarum 37: 1-11.

Madani, S. H., Hosseini, B., Karimzadeh, Gh. and Rahimi, A. (2019) Effects of polyploidy induction on antioxidant capacity and some phytochemical and morphological characteristics of Iranian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research 35: 170-181.

Malekzade Shafarodi, S., Ghani, A. and Habibi, M. (2010) The study of induction of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum*) plant. Journal of Horticulture 25: 469-461.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]

Malekzadeh Shafaroodi, S., Gani, A., Habibi, M. and Amiri, A. (2011) The possibility polyploidy induction in basil (*Ocimum basilicum* L.) using colchicine. Journal of Horticultural Science 25: 461-469.

Mathura, S., Fossey, A. and Beck, S. L. (2006) Comparative study of chlorophyll content in diploid and tetraploid black wattle (*Acacia mearnsii*). Forestry 79: 381-388.

Miller, M., Zhang, C. and Chen, Z. J. (2012) Ploidy and hybridity effects on growth vigor and gene expression in *Arabidopsis thaliana* hybrids and their parents. G3: Genes| Genomes| Genetics 2: 505-513.

Nagymihaly, M., Veluchamy, A., Gyorgypal, Z., Ariel, F., Jegu, T., Benhamed, M. and Kondorosi, E. (2017) Ploidy-dependent changes in the epigenome of symbiotic cells correlate with specific patterns of gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences 114: 4543-4548.

Nasirvand, S., Zakaria, R. A., Zare, N. and Esmaeilpoor, B. (2018) Polyploidy induction in parsley (*Petroselinum crispum* L.) by colchicine treatment. Cytologia 83: 393-396.

Ng'etich, W. K. and Wachira, F. N. (1992) Use of a non-destructive method of leaf area estimation in triploid and diploid tea plants (*Camellia sinensis*). Tea 13: 11-17.

Niazian, M. and Nalousi, A. M. (2020) Artificial polyploidy induction for improvement of ornamental and medicinal plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 142: 447-469.

Omidbaigi, R., Mirzaee, M., Hassani, M. E. and Sedghi Moghadam, M. (2010a) Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal of Plant Production 4: 87-98.

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

Ovrebo, J. I. and Edgar, B. A. (2018) Polyploidy in tissue homeostasis and regeneration. Development 145: dev156034.

Pradhan, S. K., Gupta, R. C. and Goel, R. K. (2018) Differential content of secondary metabolites in diploid and tetraploid cytotypes of *Siegesbeckia orien*talis L. Natural Product Research 32: 2476-2482.

Price, A. H. and Hendry, G. A. F. (1991) Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. Plant, Cell and Environment 14: 477-484.

Pripdeevech, P. and Machan, T. (2011) Fingerprint of volatile flavor constituents and antioxidant activities of teas from Thailand. Food Chemistry 125: 797-802.

Ravandi, E. G., Dehghan, E., Estaji, A. R. and Badi, H. N. (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 13: 11-26.

Sadat Noori, S. A., 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.

Sajjad, Y. A. S. A. R., Jaskani, M. J., Mehmood, A., Ahmad, I. and Abbas, H. A. I. D. E. R. (2013) Effect of colchicine on in vitro polyploidy induction in African marigold (*Tagetes erecta*). Pakistan Journal of Botany 45: 1255-1258.

Salma, U., Kundu, S. and Mandal, N. (2017) Artificial polyploidy in medicinal plants: Advancement in the last two decades and impending prospects. Journal of Crop Science and Biotechnology 20: 9-19.

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.

SAS-Institute-Inc. (2014) Base SAS 9.4 Procedures Guide: Statistical Procedures. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Sebasthiampillai, A. R. (1976) A simple technique for the induction of polyploids in tea. Tea Quarterly 46: 12-15.

Sharma, V. S. and Ranganathan, V. (1986) Present status and future needs of tea research. Plantation Crops 2: 37-50.

Shiga, I., Uno, Y., Kanechi, M. and Inagaki, N. (2009) Identification of polyploidy of in vitro anther-derived shoots of *Asparagus officinal* L. by flow cytometric analysis and measurement of stomatal length. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 78: 103-108.

Shiyan, C. and Depeng, Y. (1989) Relation between the chloroplast number in each guard cell and the ploidy of tea. Journal of Tea Science (China).

Silva, P. A. K. X. D. M., Callegari-Jacques, S. and Bodanese-Zanettini, M. H. (2000) Induction and identification of polyploids in *Cattleya intermedia* Lindl.(Orchidaceae) by in vitro techniques. Ciencia Rural 30: 105-111.

Simura, T. and Osone, K. I. (1956) Studies on the fertilization of tea plant. Japanese Journal of Breeding 6: 111-114.

Sinija, V. R. and Mishra, H. N. (2009) FT-NIR spectroscopy for caffeine estimation in instant green tea powder and granules. LWT- Food Science and Technology 42: 998-1002.

Smith, S., Weyers, J. D. B. and Berry, W. G. (1989) Variation in stomatal characteristics over the lower surface of *Commelina communis* leaves. Plant, Cell and Environment 12: 653-659.

Tan, F. Q., Tu, H., Wang, R., Wu, X. M., Xie, K. D., Chen, J. J. and Guo, W. W. (2017) Metabolic adaptation following genome doubling in citrus doubled diploids revealed by non-targeted metabolomics. Metabolomics 13: 1-12.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]

Wachira, F. N. (1994) Triploidy in tea (*Camellia sinensis*): Effect on yield and yield attributes. Journal of Horticultural Science 69: 53-60.

Widoretno, W. (2016) In vitro induction and characterization of tetraploid Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) plant. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 125: 261-267.

Zhang, Z., Dai, H., Xiao, M. and Liu, X. (2008) In vitro induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. Euphytica 159: 59-65.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]

Effect of colchicine treatment and polyploidy induction on some morphological, physiological and phytochemical characteristics of *Camellia sinensis* cv. Kashef

Sanam Safaei Chaeikar* and Korosh Falakro

Tea Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran
(Received: 12/06/2022, Accepted: 13/09/2022)

Abstract

Tea (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze) belongs to the Theaceae family and as one of the most important economic plants in the world, it has many medicinal properties and is consumed as a fun drink. Induction of polyploidy using mutagenic chemicals is one of the methods of breeding medicinal plants in order to increase the ability to produce secondary metabolites. In order to investigate the effect of colchicine treatment on the induction of polyploidy and to compare the changes of different traits in tetraploid and diploid plants (control) of Kashef cultivar, an experiment was carried out as a factorial in the form of a completely randomized design with two factors contains different concentrations of colchicine (0, 0.2, 0.5 and 1%) and duration times (3 and 6 consecutive days) with three replications. Morphological, microscopic and chromosomal counts were used to determine the ploidy level. The number of chromosomes in diploid and tetraploid plants was recorded as 30 (2n=2x=30) and 60 (2n=4x=60), respectively. The results showed that the concentration of 0.5 % colchicine in a period of 6 consecutive days with an efficiency of 12.82 % is the most suitable treatment for the production of tetraploid plants. Induction of polyploidy caused significant changes in the leaf size, chlorophyll and carotenoid contents and increased phytochemical compounds such as polyphenol, caffeine and antioxidant activity in tetraploid shoots compared to diploid. Based on the results of this experiment, increasing the ploidy level caused an increase in antioxidant compounds and some phytochemical compounds in tea medical plant.

Keywords: Antioxidant, Caffeine, Polyphenol, Tea, Tetraploid

Corresponding author, Email: safaei.sanam@gmail.com; s.safaie@areeo.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1402.12.54.13.3]