

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

راحله اکبری<sup>۱</sup>، لیلا فهمیده<sup>\*۱</sup> و بهمن فاضلی نسب<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

<sup>۲</sup> 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 ۶، 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 تتراپلوئید شده  $2n=4x=36$  بود. بالاترین درصد القاء تتراپلوئیدی (۸۰ درصد)، به‌دنبال غوطه‌وری گیاهچه‌ها در غلظت ۰/۵ گرم در لیتر کلشی‌سین در مدت زمان ۶ ساعت به‌دست آمد. در ادامه پس از تیمار بذره‌های گیاه با کلشی‌سین و کشت بذور تیمار شده و شاهد در گلدان، گیاهچه‌های رشد یافته در مرحله گلدهی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مشخص نمود که گیاهان تتراپلوئید (تیمار شده) 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

(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 ضد میکروبی، ضداسپاسم و قارچ‌کش است

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

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

آلکالوئیدی است که از بذر پدازه 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 در نتیجه منجر به دو برابر شدن 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, 2006; 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 نمو گیاهان تأثیر منفی داشته باشد و گاه این تأثیر در بعضی از گونه‌ها چنان است که نه تنها ممکن است منظور اولیه استفاده از این ماده به دست 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 نمو 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 فلوسایتمتری پیک دو برابر شدن مقدار DNA را نشان داد

(Fazeli-nasab and Fooladvand, 2016). خاصیت ضد میکروبی 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 که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بوده و در نتیجه 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 برابر شدن سطح کروموزومی، افزایش تعداد نسخه‌های ژنی بیان‌کننده، ترکیبات مؤثره و افزایش جثه گیاه موجب بیشتر شدن 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، بنه (درشتی اندام رویشی)، انجام وظیفه متفاوت نسخه‌های تکراری ژن در اندام مختلف و حتی تأثیر در نحوه تولید مثل را به‌عنوان توجیه برتری پلی‌پلوئید 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

(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 ضد میکروبی، به شدت مورد نیاز است. با این وجود می‌توان از فلاونوئیدها به عنوان نسل جدید و کارا در این زمینه نام برد. فلاونوئیدها به طور طبیعی در سلسله گیاهان به ویژه 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، مورفوژن 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 محتوای 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. به منظور به دست آوردن مریستم انتهایی ریشه، بذرها به ظروف پتری‌دیش حاوی کاغذ صافی مرطوب منتقل و پس از افزودن آب مقطر، در ژرمیناتور تحت شرایط کنترل رطوبت ۳۸ درصد، دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۴ 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 ۶، ۱۲ و ۱۸ ساعت استفاده شد. به منظور مشاهده و شمارش کروموزوم‌ها، به ترتیب مراحل: ۱- پیش تیمار با استفاده از محلول (۰/۰۲ میکرومولار) ۸-هیدروکسی کینولین به مدت ۵ ساعت، ۲- تثبیت با محلول کارنوی ۲ (مرکب از اتانول ۹۶ درصد، کلروفرم ۱۰ درصد و اسیداستیک ۳۰ درصد به نسبت ۶: ۳: ۱) به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق، ۳- هیدرولیز با اسید کلریدریک ۱ نرمال به مدت ۲۰ دقیقه و سپس ۴- رنگ‌آمیزی ریشه‌ها با استوارسین انجام شد. پس از قراردادن نمونه‌های آماده‌شده (قسمت انتهایی نوک ریشه) روی لام، یک قطره استیک اسید ۴۵ 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، به طوریکه 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 ۶ ساعت) برای القاء پلی‌پلوئیدی که با انجام عمل اسکواش و شمارش کروموزومی حاصل شد، بذور با کلشی‌سین تیمار شدند پس از کشت بذور تیمارشده و تیمارنشده (شاهد) و تولید گیاهچه برخی صفات مورفولوژیکی و

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 به مدت ۶ ساعت در جایی تاریک منتقل گردید. پس از اعمال تیمار مورد نظر، بذرها در دو گروه بذره‌های تیمارنشده (شاهد) و بذره‌های تیمار شده با کلشی‌سین با استفاده از آب مقطر استریل شستشو 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 تولید شده 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  $\text{pH} = 7$  (برای تهیه محلول پتاسیم فسفات از دو نمک  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (جرم حجمی ۱۷۴/۲) و  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (جرم حجمی ۱۳۶/۰۸۶) 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  $\text{pH}$  آن روی ۷ تنظیم شد. ۲۰ میکرولیتر ۰/۱ mM EDTA 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 ۴ سی‌سی بافر Ice-cold در هاون سرد کاملاً ساییده و به صورت همگن درآورده شدند. مخلوط همگن از کاغذ صافی عبور و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۶۰۰۰ 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).

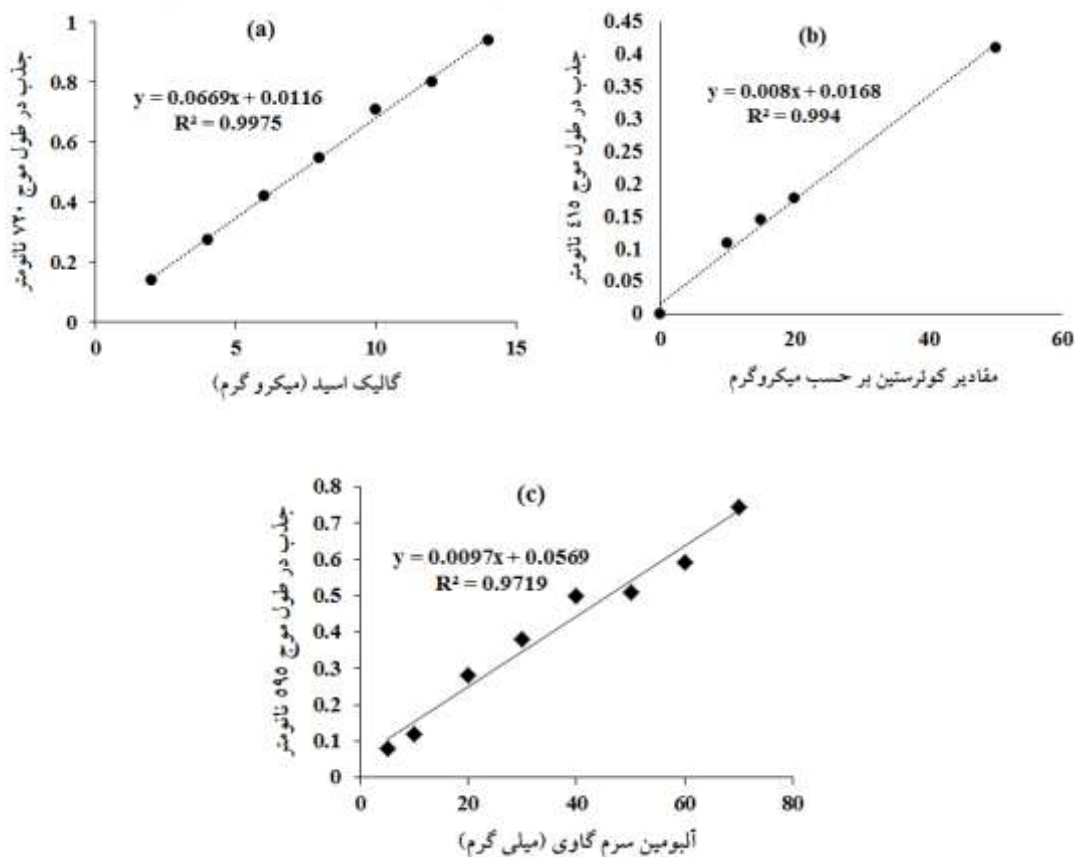
**آنزیم کاتالاز:** به این منظور مخلوط واکنش شامل ۷۵۰

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 ۲۴۰ نانومتر به مدت ۶۰ 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  $36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  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  $\text{pH} = 7$ ، ۲۵۰ میکرولیتر آسکوربات یک میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۴ میلی‌مولار، ۱۹۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۱۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید، ۱۰ میلی‌مولار و ۴۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده بود. جذب کمپلکس واکنشی در طول موج ۲۹۰ نانومتر یادداشت و با استفاده از ضریب خاموشی  $2/8 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  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 به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در تاریکی به‌منظور سنجش ترکیبات فنلی کل و فلاونوئید کل نگهداری و سپس در ۴۰۰۰ دور به مدت 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 آب مقطر 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 به مدت یک ساعت در تاریکی نگهداری شد و سپس جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید (شکل ۱ a)، غلظت ترکیبات فنلی کل برحسب میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه گردید. رسم منحنی



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)

کوماسی بریلیانت بلو G250 در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ 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 آب مقطر 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 به مدت ۱۵ دقیقه در

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 آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط بعد از گذشت ۴۰ دقیقه در طول موج ۴۱۵ نانومتر نسبت به بلانک اندازه‌گیری گردید. بلانک حاوی تمام ترکیبات ذکر شده 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

کروموزومی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و پس از اتمام داده برداری 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 به دست آمده در این تحقیق براساس درصد بودند، برای اینکه داده‌ها دارای توزیع نرمال باشند، از تبدیل داده جذری  $X_1 = \sqrt{X_2}$  استفاده شد. در مواردی هم که صفر وجود داشت از تبدیل  $X_1 = \sqrt{X_2 + 0.5}$  استفاده گردید.

#### نتایج و بحث

**نتایج تتراپلوئیدی حاصل از تیمار با کلشی‌سین:** پس از مطالعه و عکس برداری از اسلاید نمونه شاهد، عدد کروموزومی در زینان  $2n=18$  به دست 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 تیمار شده 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 ۶ ساعت مشاهده شد و غلظت‌های پایین‌تر و بالاتر تأثیر کمتری بر این فاکتور داشتند. Birami و همکاران (۲۰۱۶) اعلام نمودند که غلظت و مدت زمان تیمار کلشی‌سین و اثر متقابل آنها به صورت معنی‌داری بر اتو تتراپلوئید شدن شبلیله تأثیر داشت و غلظت ۰/۵ گرم در لیتر با مدت تیمار ۱۲ ساعت

سانتریفیوژ یخچال‌دار در  $g$  ۱۴۰۰۰ و دمای ۴ 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 طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین گاوی (شکل ۱ c) محاسبه و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

**اندازه‌گیری آنتوسیانین:** جهت اندازه‌گیری آنتوسیانین ۰/۱ از بافت برگ‌گی 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 سربچ‌دار ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و جذب محلول رویی در طول موج ۵۵۰nm اندازه‌گیری شد. غلظت با استفاده از فرمول زیر و با در نظر گرفتن 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 مقدار ۰/۱۲۵ گرم از بافت برگ با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد خرد شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ 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 اسپکتروفتومتری انجام گرفت و برای کلروفیل a, b و کارتنوئید به ترتیب در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. جهت تنظیم دستگاه از استون ۸۰ درصد به عنوان کنترل استفاده شد. غلظت رنگیزه با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردید (Khalili and Baghbani-arani, 2017).

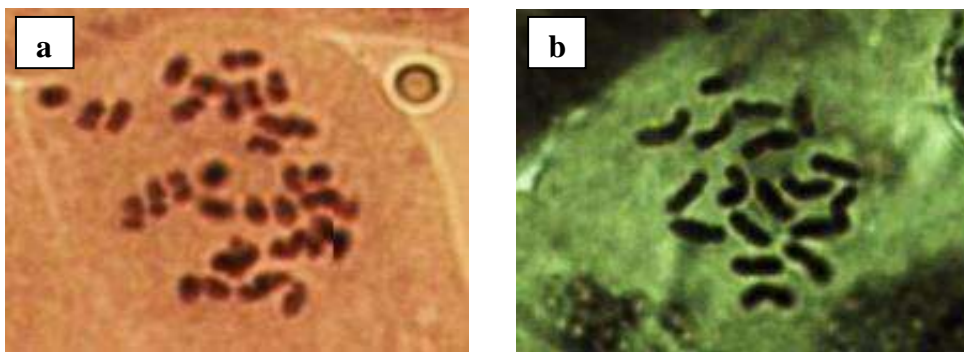
$$\begin{aligned} \text{Chla} &= (19.3 \times A663 - 0.86 \times A645) \times V \\ \text{Chlb} &= (19.3 \times A645 - 3.6 \times A663) \times V \\ \text{Cartenooid} &= [(100 \times A470) - 3.27 \times (\text{mg chla}) - 104 \times (\text{mg chlb})] / 227 \\ (V) & \text{ضخامت کووت می باشد.} \end{aligned}$$

**تجزیه آماری:** برای تجزیه داده‌های حاصله از بررسی‌های

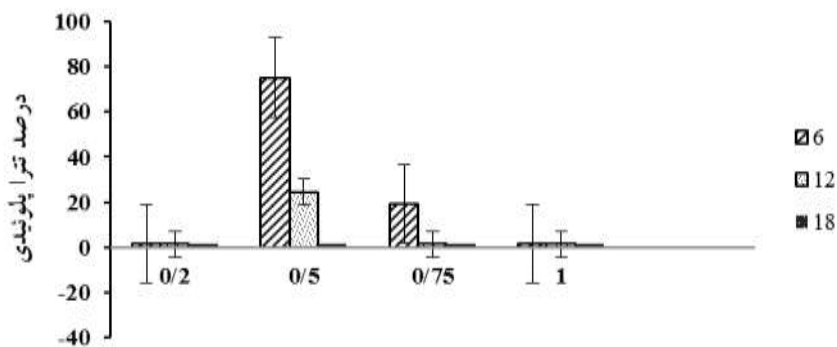
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس القاء تتراپلوئیدی پس از تیمار با کلشی‌سین جمعیت پاکستان

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد تتراپلوئیدی
زمان	۴	۲۳/۶۳**
غلظت	۲	۱۷/۶۰**
زمان × غلظت	۸	۸/۶۴۰**
خطا آزمایشی	-	۰/۱۱۴
ضریب تغییرات	-	۲۰/۳۰

\*\* 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

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 برابر کردن کروموزوم‌ها تعداد گل کاهش یافته است (Hasanzadeh *et al.*, 2010) که با

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

**نتایج بررسی خصوصیات مورفولوژیکی گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده:** نتایج بررسی خصوصیات مورفولوژیکی

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 خشک	وزن خشک
شاهد	۱۸۴ <sup>a</sup>	۶/۳۳ <sup>b</sup>	۲۶/۳ <sup>b</sup>	۲۱/۳ <sup>b</sup>	۱/۴ <sup>a</sup>	۰/۹ <sup>a</sup>	۰/۵ <sup>a</sup>	۲/۷۶ <sup>a</sup>	۱۶/۳ <sup>a</sup>	۱/۳۳ <sup>b</sup>	۰/۸۱ <sup>b</sup>
۰/۵ گرم بر لیتر	۱۳۷/۳ <sup>b</sup>	۸ <sup>a</sup>	۳۹/۶ <sup>a</sup>	۲۸ <sup>a</sup>	۰/۷۳ <sup>b</sup>	۰/۷۶ <sup>a</sup>	۰/۳۶ <sup>a</sup>	۲/۹۳ <sup>a</sup>	۳/۵ <sup>a</sup>	۲/۰۳ <sup>a</sup>	۰/۹۷ <sup>a</sup>

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت غیر معنی‌دار

(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، بیشتر بودن میانگین سطح و ضخامت برگ‌ها و یا به دلیل 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 به طور معنی‌داری وزن تر و خشک اندام هوایی را در گیاهان تتراپلوئید پروانش 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

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 *Rubuluzia et al.* انجام شده بود (Rubuluzia 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 ایجاد شده 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.,

میزان کلروفیل b در برگ نمونه‌های دیپلوئید (۲۱۳/۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) نسبت به نمونه‌های تتراپلوئید (۱۴۲/۲ میلی‌گرم در وزن تر برگ) بیشتر بود. از آنجا که فرض بر آن است با دو برابر شدن ژنوم فعالیت متابولیکی، سنتز rRNA و نسخه‌برداری افزایش می‌یابد در نتیجه 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 تیمار شده با کلشی‌سین نسبت به گیاهان شاهد تأثیر داشت (جدول ۳). با مقایسه گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید برای میزان فنل کل، گیاهان دیپلوئید با میانگین ۲/۶۲ 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.

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 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 به دلیل 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 قوتورتر 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 به مدت ۱۴ 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 تیمار شده:** 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 (۱۳۳/۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) بیشتر بود.

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 <sup>b</sup>	۲۱۳/۱ <sup>a</sup>	۹۳/۸۳ <sup>b</sup>	۰/۰۰۲ <sup>b</sup>	۰/۰۰۳ <sup>b</sup>	۰/۰۰۰۸ <sup>b</sup>	۲/۶۲ <sup>a</sup>	۱/۴۱ <sup>b</sup>	۰/۰۴ <sup>b</sup>
۰/۵ گرم بر لیتر	۱۸۳/۳ <sup>a</sup>	۱۴۲/۲ <sup>b</sup>	۱۵/۱۳ <sup>a</sup>	۰/۰۰۴ <sup>a</sup>	۰/۰۰۰۵ <sup>a</sup>	۰/۰۰۱ <sup>a</sup>	۲/۳۷ <sup>a</sup>	۱/۴۵ <sup>a</sup>	۳/۰۲ <sup>a</sup>

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 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

#### 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.

کلشی‌سین از جمله عوامل ضدستز 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 ۶ ساعت به دست 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. به‌طور کلی 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 زینان مفید و قابل توصیه است. ضمن اینکه پلی‌پلوئیدی با تغییرات ساختاری، نمودی، فیزیولوژیکی 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.

- Afshar Mohammadian, M., Omid, Z., Purakbari kasmaei, R. and Asadi Abkenar, A. (2013) The effect of polyploidy on some anatomical and antioxidant characteristics of *Citrus aurantifolia* A. Journal of Plant Researches 26: 238-246.
- Afshar Mohammadian, M., Pour Akbari, R., Omid, 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 sistian's native fenugreek (*Trigonella foenum 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 Huylbroeck, 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 7<sup>th</sup> 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., Omid, M. and Azimzadeh, M. (2015) the chemical assessment of seed essence of three native medicinal plants of Yazd province (*Bunium Premium*, *Cuminum Cuminum*, *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 lerifolia* Benth. Scientific Journal Management System 25: 24-42.
- Hosseini, H., Chehrizi, M., Nabati Ahmadi, D. and Mahmoodi Soresani, M. (2012) Polyploidy stimulation in *catharanthus roseus* cv. alba and changes in phenotypic characteristics. In: Proceeding of the 1<sup>th</sup> National Conference on Sustainable Development Strategies. Tehran, Iran.

- Hosseini, H., Chehrizi, M., Nabati Ahmadi, D. and Mahmoodi Soresani, 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., Hossyinfard, 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., Shirkoool, K. and Niaziyan, 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 biphosphate 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.) using 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 some 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.

- 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.

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

Raheleh Akbari<sup>1</sup>, Leila fahmideh<sup>1\*</sup> and Bahman Fazeli-Nasab<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran

<sup>2</sup> 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 Ajowan (*Trachyspermum ammi*) plant.

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

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