مقاله پژوهشی

اثر القای پلی‌پلوئیدی با کلشی‌سین بر تغییرات مورفوفیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و عملکرد اسانس اسطوخودوس افراشته (*Lavandula stricta*)

حبیبه نوری داشلی‌برون[۱]، سارا خراسانی‌نژاد*[۱]، سیدجواد موسوی‌زاده[۱] و محمدحسین میرجلیلی[۲]

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

[۲] گروه مهندسی کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۱۲/۱۹)

چکیده

در این پژوهش برای بررسی اثر تغییر سطح پلوییدی بر صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و میزان اسانس در گیاه اسطوخودوس افراشته، گیاه دارویی و بومی ایران، از کلشی‌سین استفاده شد. در این آزمایش ژل حاوی کلشی‌سین در غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد در مدت زمان‌های ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در مریستم انتهایی در مرحله رشدی چهاربرگی گیاه گلدانی در شرایط گلخانه‌ای استفاده شد. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که اندازه ژنوم در کلیه نمونه‌های دیپلویید و تیمارشده با کلشی‌سین در یک محدوده (به‌ترتیب ۰/۵۵ و ۰/۵۷ پیکوگرم) قرار داشتند ولی اندازه ژنوم در گیاهان تیمارشده با غلظت ۰/۴ درصد در ۴۸ ساعت، ۰/۷۳ پیکوگرم شد و تصاویر SEM هم، افزایش تراکم کرک‌های غده‌ای و اندازه روزنه را در آن‌ها نشان داد. همچنین، نتایج نشان داد که غلظت کلشی‌سین و مدت زمان اعمال تیمار بر کلروفیل کل و کاروتنوئید تأثیر معنی‌داری نداشت ولی افزایش غلظت و مدت زمان اعمال کلشی‌سین باعث افزایش وزن هزاردانه بذر، وزن پوشینه با بذر، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، کاتالاز و درصد و عملکرد اسانس گردیده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان داشت کلشی‌سین با غلظت ۰/۴ درصد و مدت زمان ۴۸ ساعت قابلیت القا پلی‌پلوئیدی و تولید گیاهانی با افزایش ارزش دارویی را دارد.

واژه‌های کلیدی: اسطوخودوس افراشته، پلی‌پلوییدی، کلشی‌سین، فلوسایتومتری، اسانس

مقدمه

اسطوخودوس افراشته (*Lavandula stricta* Del.)، با نام‌های مترادف شاهی (Sanginabadi *et al.*, 2016)، راست (Eivazi *et al.*, 2015) و لارستانی (Mozaffarian, 1996)، از گونه‌های بومی ایران است که در جنوب ایران، رویشگاه‌های کوهستانی مناطق گنو و آب گرم گنو به‌صورت خودرو می‌روید (Mozaffarian, 2004). در استان هرمزگان از برگ، گل و ساقه اسطوخودوس برای درمان درد مفاصل، دل‌پیچه و زکام استفاده شده و به‌صورت خام به کشورهای حاشیه خلیج‌فارس صادر می‌شود (Soltanipour, 2005). به‌علت علاقه وافر مردم به مصرف روزافزون داروهای گیاهی این بخش از منابع طبیعی ایران از نظر اقتصادی و درمانی، اهمیت وافری یافته است (Yaghoobi *et al.*, 2016).

پلی‌پلوئیدها به‌واسطه عوامل ضدمیتوزی مانند کلشی‌سین،

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: skhorasaninejad@yahoo.com; khorasaninejad@gau.ac.ir

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

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.4.0]

تری‌فلورالین و اوریزالین القا می‌شود (Salma *et al.*, 2017). کلشی‌سین استخراج‌شده از بذر و پداژه گیاه گل حسرت (*Colchicum antummale*)، ماهیت آلکالوئیدی داشته که معادل سنتزشده این ماده به‌صورت صنعتی و تجاری، کلمید (Colemid) نامیده می‌شود (Shahriari Ahmadi *et al.*, 2008). مراحل کلی دوبرابرکردن کروموزوم شامل مرحله القایی، مرحله رشد مجدد و یک روش تأییدیه برای ارزیابی میزان تغییرات است. مرحله القایی بستگی به عوامل مختلفی از قبیل نوع آزمایش، ماده ضدمیتوزی، غلظت‌های مختلف آن و مدت زمان قرار گرفتن در معرض آن دارد (Salma *et al.*, 2017).

اغلب گیاهان پلی‌پلوئید به لحاظ ویژگی‌های مورفولوژیکی، بزرگ‌تر یا متفاوت از اجداد دیپلوئید خود هستند (Salma *et al.*, 2017) و در واقع تغییر سطوح پلوئیدی با تأثیر بر فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، بر مسیرهای فتوسنتزی متابولیت‌های ثانویه اثر می‌گذارد. افزایش سطح پلوئیدی غالباً باعث افزایش مواد مؤثره در گیاهان دارویی شده به‌طوری‌که گیاهان با سطوح پلوئیدی بالاتر، دارای سلول‌های بزرگ‌تر، برگ‌های ضخیم‌تر، رشد کندتر، میزان آب بیشتر بوده که طول دوره رشد در آنها طولانی‌تر شده و گلدهی به تأخیر می‌افتد (Thao *et al.*, 2003; Kondorosi *et al.*, 2000). همچنین در گیاهان با سطح پلوئیدی بالاتر، مقاومت به خشکی و سایر تنش‌ها، مقاومت به آفات گزارش شده است (Ramsey and Schemske, 1998; Soltis *et al.*, 2004; Comai, 2005; Lu *et al.*, 2006; Ranney, 2006; Dhooghe *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2015). در این دسته گیاهان میزان فتوسنتز، تنفس، انتقال الکترون‌های فتوسنتزی، فعالیت ژن‌ها، تولید آنزیم‌ها و بیان ایزوزایم‌ها تغییر می‌یابد (Hosseini and Javanbakht, 2017).

در ارقام پلی‌پلوئید برنج (*Oryza sativa*) وزن هزاردانه، طول و عرض دانه افزایش یافته است (Zhou *et al.*, 2007). در تحقیقی روی سورگوم (*Sorghum bicolor*) گزارش شد که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در گیاهان تتراپلوئید افزایش معنی‌داری را نشان داده است (Ardabili *et al.*, 2014) و در گیاه زنیان پاکستانی (*Carum copticum*) با افزایش سطح پلوئیدی فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز نیز افزایش یافته است (Akbari *et al.*, 2019). میزان کارتنوئید و کلروفیل در گیاهان ریحان (*Ocimum basilicum* L.) تتراپلوئید به‌طور معنی‌داری بالاتر از دیپلوئیدها بود (Ardabili *et al.*, 2014). در مقابل در پژوهشی روی شنبلیله (*Trigonellafoenum graecum*)، نشان داده شد که میزان کلروفیل در گیاه تتراپلوئید و دیپلوئید تغییر معنی‌داری ندارد. لذا چنین استنباط می‌شود که میزان کلروفیل در سطوح متفاوت پلوئیدی، بسته به نوع گیاه مورد مطالعه، می‌تواند متفاوت باشد (Birami Kohi *et al.*, 2016). در نوروزک (*Salvia leriifolia* Bent.)، غلظت ۰/۰۵ درصد و زمان ۴۸ ساعت تیمار مریستم انتهایی با کلشی‌سین در مرحله چهاربرگی به‌عنوان بهترین تیمار شناسایی گردید که سبب افزایش وزن تر و خشک، میزان کلروفیل، میزان فتوسنتز و کاهش ارتفاع گیاهان گردیده و تغییرات قابل‌توجهی در ترکیب اسانس ایجاد نمود (Estaji *et al.*, 2017). همچنین در آزالیا (*Rhododendron simsii*)، کلشی‌سین یک درصد، علی‌رغم عدم تغییر در سطح پلوئیدی نمونه‌های تیمارشده، سبب ایجاد اختلاف رشدی ظاهری بسیار زیادی در نمونه‌های تیمارشده، گردید (Salahi Sadr *et al.*, 2018). در جنس اسطوخودوس نیز تحقیقات مشابه بر روی اسطوخودوس انگلیسی *Lavandula angustifolia* انجام شده به‌طوری‌که بذرهای این گیاه در حضور کلشی‌سین با غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر نشان داد که اوتتراپلوئیدها دارای پایه‌های ضخیم‌تر، گل‌های بزرگتر و دانه‌های بزرگتر از دیپلوئیدها بوده و نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که تریکوم‌های غده پلاته در تتراپلوئیدها نسبت به دیپلوئیدها بزرگتر بودند (Urwin *et al.*, 2007).

اسطوخودوس افراشته از گیاهان دارویی بومی و ارزشمند عرصه طبیعی ایران بوده که مطالعه‌ای در حوزه اصلاح و القا پلی‌پلوئیدی آن انجام نشده است. این پژوهش به‌منظور مطالعه امکان‌سنجی القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه اسطوخودوس افراشته و تولید گیاهانی با تغییر در قابلیت تولید میزان اسانس و خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی انجام شد.

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

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.4.0]

مواد و روش‌ها

به‌منظور القای پلی‌پلوئیدی در گیاه دارویی اسطوخودوس افراشته (*Lavandula stricta*) از ماده کلشی‌سین (Sigma®-Lot#STBC2027V) در پنج غلظت (صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ درصد) و چهار مدت زمان اعمال تیمار (۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت)، با سه تکرار به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط گلخانه‌ای استفاده شد. این تحقیق در سال‌های ۹۷-۱۳۹۶ در گلخانه و آزمایشگاه‌های فیزیولوژی و نانوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و آزمایشگاه سیتوژنتیک دانشگاه تربیت مدرس تهران اجرا گردید.

تهیه مواد گیاهی و کاشت: بذور اسطوخودوس افراشته از پایه‌های مادری در رویشگاه‌های طبیعی از منطقه حفاظت‌شده گنو (۲۹ـ ۲۷ ۱۸ـ۲۷ عرض شمالی و ۱۸ـ ۵۶ ۵۶ ـ۵۵ طول شرقی، ارتفاع ۲۲۰ متر از سطح دریا) واقع در شهرستان بندرعباس، استان هرمزگان جمع‌آوری گردید. پس از بوجاری، بذرها در بستر خاکی در گلدان‌های بزرگ (قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر) با مخلوط خاک، ورمی‌کمپوست و پرلیت (۴:۱:۱) در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت شدند.

اعمال تیمارها: سه هفته بعد از جوانه‌زنی بذرها (اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۶)، در مرحله چهار تا شش برگی، تیمار کلشی‌سین با غلظت‌های ذکرشده به‌مدت ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در محیط تاریک روی مریستم قرار داده شد. برای اعمال تیمار، ترکیبی از غلظت موردنظر کلشی‌سین و ژل آگارز در سرنگ (بدون نوک) آماده شد و سپس به‌صورت قطره (حدود ۰/۵ میلی‌لیتر)، روی انتهای مریستم قرار داده شد برای جلوگیری از خشک‌شدن تیمار اعمالی در مدت زمان مدنظر، اسپری آب استفاده شد تا رطوبت نسبی کابین گلخانه در حد ۱۰۰ درصد حفظ شود. در مدت چهارماه تا زمان رسیدن به مرحله زایشی (مردادماه ۱۳۹۶)، مراحل نگهداری از قبیل آبیاری به‌طور مرتب انجام شد. سعی شد دمای گلخانه در تمام مدت به‌صورت دمای روزانه ۲۶ و دمای شبانه ۲۰ درجه سانتی‌گراد حفظ گردد. صفات مورفوفیزیولوژیکی (ویژگی‌های اپیدرم پائینی برگ، رنگیزه‌های کلروفیل و کارتنوئید)، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و کاتالاز)، درصد و عملکرد اسانس در زمان گلدهی کامل، اندازه‌گیری شدند و شمارش بذر بعد از رسیدن بذر انجام شد. به‌طوری‌که برای سنجش وزن هزاردانه بذر و پوشینه حاوی بذر، به‌صورت تصادفی بذرها و پوشینه‌ها انتخاب شدند و توسط ترازو با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری و مقدار آن ثبت شد.

ویژگی‌های اپیدرم پائینی برگ با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی: پس از رشد رویشی کامل گیاه برای ارزیابی ساختار سطحی اپیدرمی برگ، از برگ‌های بالغ (بزرگ‌ترین دسته از برگ‌های جوان) عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM؛ مدل PS230 ساخت شرکت Pemtron) صورت گرفت. به این منظور، ابتدا برگ‌ها جهت پاکسازی به‌مدت ۶۰ ثانیه در ۵۰ میلی‌لیتر کلروفرم در دمای اتاق غوطه‌ور شده، پس از پوشش‌دار شدن با لایه نازکی طلا جهت عکس‌برداری آماده گردیدند. جهت بررسی کرک و روزنه برگ گیاه، شمارش از سطح بزرگ‌نمایی ۱۰۰ میکرومتر صورت پذیرفت (Khorasaninejad *et al.*, 2018).

اندازه‌گیری رنگیزه‌های کلروفیل و کاروتنوئید: برای تعیین غلظت محتوای رنگدانه‌های فتوسنتز از روش Barnes و همکاران (۱۹۹۲) استفاده شد. حدود چهار ماه بعد از اعمال تیمارها و در زمان گلدهی، ابتدا از هر تکرار هر تیمار، نیم گرم برگ تازه، در پنج میلی‌لیتر از دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت چهار ساعت قرار داده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه برداشته و دو میلی‌لیتر DMSO مجدداً به آن اضافه شد. نمونه‌ها توسط طیف‌سنجی خوانده شد و از DMSO خالص نیز استفاده شد. اندازه‌گیری کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید به‌ترتیب در طول‌موج‌های ۶۴۵، ۶۲۳، ۴۸۰ و ۵۱۰ نانومتر انجام شد، اعداد به‌دست آمده در روابط ۱تا ۴ که به‌ترتیب کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید است قرار گرفتند:

رابطه (۱)

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

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.4.0]

Chlo a (mg/g.F.W) = 12.7 (A663) − 2.69 (A645) × V/1000 × W

رابطه (۲)

Chlo b (mg/g.F.W) = 22.9 (A645) − 4.68 (A663) × V/1000 × W

رابطه (۳)

Chlo total (mg/g.F.W) = 20.2 (A645) + 8.02 (A663) × V/1000 × W

رابطه (۴)

Car (mg/g.F.W) = 7.6 (A480) − 1.49 (A510) × V/1000 × W

سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: حدود چهار ماه بعد از اعمال تیمارها و در زمان گلدهی، نیم گرم برگ تازه، با کمک نیتروژن مایع در هاون چینی له شد و پس از آن به بافت له‌شده یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA نیم‌مولار و پلی‌وینیل پلی پیرولیدین (PVP) دو درصد افزوده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز استفاده شد (Nakano and Asada, 1981).

تعیین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز: برای اندازه‌گیری مقدار فعالیت این آنزیم، ابتدا ۳۳ میکرولیتر از عصاره استخراج با یک میلی‌لیتر از محلول پراکسیداز که شامل ۱۳ میلی‌مولار گوایکول، ۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) آمیخته شده و به‌مدت یک دقیقه با فاصله‌های ۱۰ ثانیه در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر جذب آن‌ها خوانده شد (رابطه ۵). برای ساختن ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم، ۳۹ میلی‌لیتر فسفات پتاسیم مونوبازیک ۵۰ میلی‌مولار با ۶۱ میلی‌لیتر فسفات پتاسیم دی‌بازیک ۵۰ میلی‌مولار آمیخته شد (Holy, 1972).

رابطه (۵)

Peroxidase (μM/g) = (A 530 /26.6) × 0.5 × 10000

سنجش میزان آنزیم پلی‌فنل اکسیداز: جهت بررسی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز از عصاره آنزیمی استخراج‌شده برای فعالیت پراکسیداز استفاده شد. جهت انجام آزمایش ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH ۷/۶ با ۰/۴ میلی‌لیتر پیروگالل ۰/۰۲ مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی مخلوط و در بن‌ماری ۲۸ درجه به‌مدت سه دقیقه قرار گرفته، سپس تغییرات جذب در طول‌موج ۴۳۰ نانومتر خوانده شد (رابطه ۶) (Amako *et al.*, 1994).

رابطه (۶)

PPO (μM/g) = (A 430 /6.2) × 0.5 × 10000

تعیین میزان آنزیم کاتالاز: برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج با یک میلی‌لیتر محلول اندازه‌گیری کاتالاز که شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) و ۱۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن آمیخته شد. پس از گذشت یک دقیقه جذب آن در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (رابطه ۷) (Abei, 1981).

رابطه (۷)

Catalase (μM/g) = (شیب خط کاتالاز /40) × 60

استخراج اسانس: برای استخراج اسانس قسمت‌های رویشی گیاه را که قبلاً در محیط سایه، خشک شده بود را توسط دستگاه آسیاب به‌صورت پودر در آورده و میزان ۲۰ گرم از هر نمونه برای استخراج اسانس وزن شد. در ادامه جهت استخراج اسانس گیاه نمونه‌های گیاهی از روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر اقدام به اسانس‌گیری گردید. برای تعیین درصد و عملکرد اسانس با اندازه‌گیری مقدار وزن خشک نمونه گیاهی مورد استفاده برای اسانس‌گیری به‌وسیله دستگاه کلونجر و سپس محاسبه مقدار اسانس حاصل از استخراج و با استفاده از رابطه‌های ۸ و ۹ مربوطه اقدام به محاسبه درصد و عملکرد اسانس در گیاه گردید.

رابطه (۸)

$$\text{EO (\%)} = \frac{\text{Mass of EO obtained (g)}}{\text{Mass of dry matter}} \times 100$$

رابطه (۹)

EO (yield) = EO (%) × Mass of dry matter

فلوسایتومتری: در این پژوهش اندازه ژنوم گیاهان اسطوخودوس افراشته تیمارشده با دستگاه فلوسایتومتری در آزمایشگاه فلوسایتومتری دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس اندازه‌گیری شد. ابتدا تقریباً ۲۵ میلی‌گرم برگ (۴-۵ برگ) از گیاهان تیمارشده و ۲۵ میلی‌گرم برگ گیاه استاندارد را درون پتری قرار گرفت. پس از خردکردن گیاه نمونه و گیاه

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

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.4.0]

استاندارد تربچه (*Raphanus Sativus* (2c = 1.11 pg DNA ev. Sexa در یک میلی‌لیتر از بافر WPB (Woody Plant Buffer)، سوسپانسیون هسته‌های حاصل با استفاده از سمپلر ۱۰۰۰ بافر از فیلتر نایلون مش ۵۰ و ۳۰ میکرومتری جهت حذف قطعات بزرگ و بقایای بافت‌ها عبور داده شد. سپس ۵۰ ماکرولیتر RNase (برای جلوگیری از رنگ‌آمیزی RNA) و سپس ۵۰ ماکرولیتر پروپیدیم یدید (PI) برای رنگ‌آمیزی هسته‌ها اضافه می‌گردد (Loureiro *et al.*, 2005). سوسپانسیون هسته در دستگاه فلوسایتومتری مدل BD FACSCantoTM-KE با مشخصات BD: Biosciences, Bedford, MA, USA تحلیل شد. برروی صفحه مانیتور هیستوگرام‌های محتوای اسطوخودوس افراشته و گیاه استاندارد تربچه مشاهده شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج‌درصد انجام شد. نتایج فلوسایتومتری با نرم‌افزار فلومکس تجزیه و تحلیل شد.

نتایج و بحث

نتایج تأثیر القا پلی‌پلوئیدی در گیاه اسطوخودوس افراشته با کاربرد کلشی‌سین در زمان‌های مختلف به‌صورت کیفی شامل نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی و نتایج کمی که شامل دیگر صفات اندازه‌گیری شده که نشان‌دهنده اثرپذیری این گیاه از تیمارهای اعمال شده است، در بخش‌های مجزا در ذیل آورده شده است.

عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی- نوع و تراکم کرک‌ها: کرک‌ها در این گیاه به دو صورت کرک غده‌ای و کرک ساده دو تا پنج سلولی هستند که وظیفه کرک‌های ساده، حفاظت از سطح برگ بوده و کرک‌های غده‌ای با دو تیپ تشریحی مختلف شامل کرک سردار پایه کوتاه و کرک غده‌ای بدون پایه تک‌سلولی بوده که محل تجمع اسانس هستند و از اهمیت به‌سزایی در افزایش عملکرد اسانس دارند. به‌طوری‌که تحت تیمار کلشی‌شین با غلظت ۰/۴ درصد در مدت زمان ۴۸ ساعت نسبت به شاهد از تراکم کرک‌های ساده کاسته و بر تراکم کرک‌های غده‌ای افزوده شده است (شکل a-d ۱).

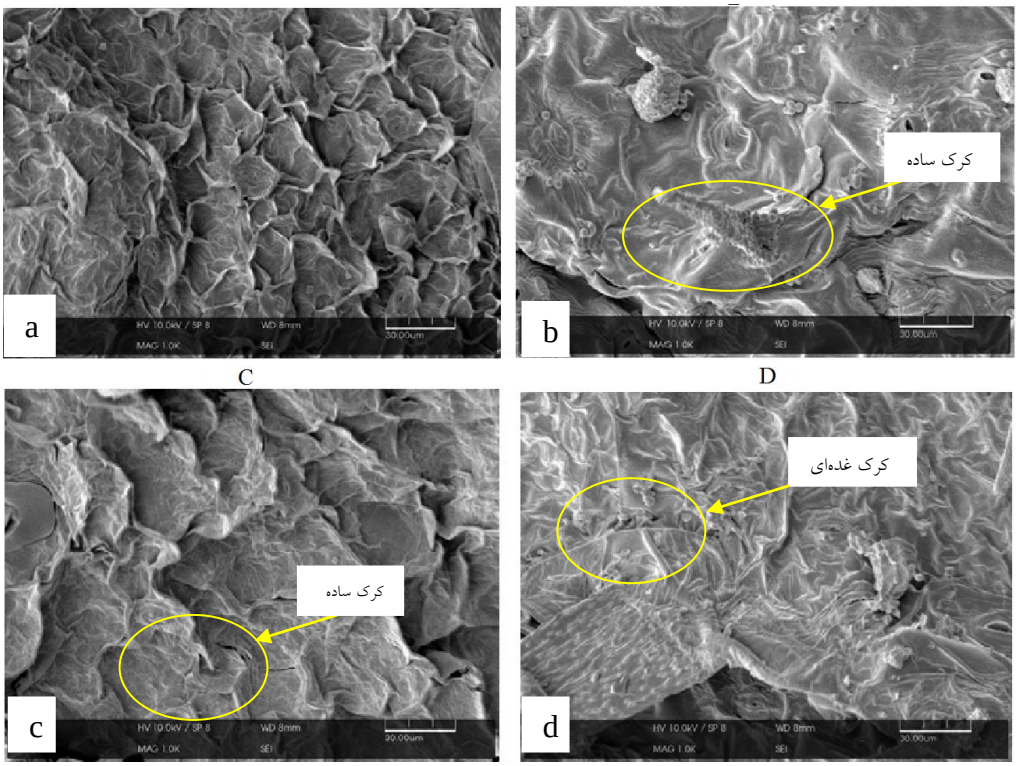
تراکم روزنه‌ها: یکی از تغییراتی که معمولاً در اثر القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان ایجاد می‌شود تغییر در تراکم، اندازه روزنه و سلول نگهبان روزنه هستند. به‌طوری‌که تحت تیمار کلشی‌شین با غلظت ۰/۴ درصد در مدت زمان ۴۸ ساعت نسبت به شاهد تراکم روزنه‌ها کاهش و اندازه آنها افزایش یافت (شکل a-d ۲).

اندازه دهانه روزنه به‌وسیله طول سلول‌های نگهبان روزنه مشخص می‌شود (Dhooghe *et al.*, 2011). در مطالعاتی که روی گیاه آجاوان (*Trachyspermum ammi* L.) انجام شد، طول و عرض روزنه در گیاهان تتراپلوئیدی افزایش یافته، درحالی‌که تراکم روزنه کاهش یافته بود (Noori *et al.*, 2017). در گیاه خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum* Lindl.) تحت تیمار کلشی‌سین، افزایش اندازه و کاهش تراکم روزنه گزارش شده است (Madani *et al.*, 2019).

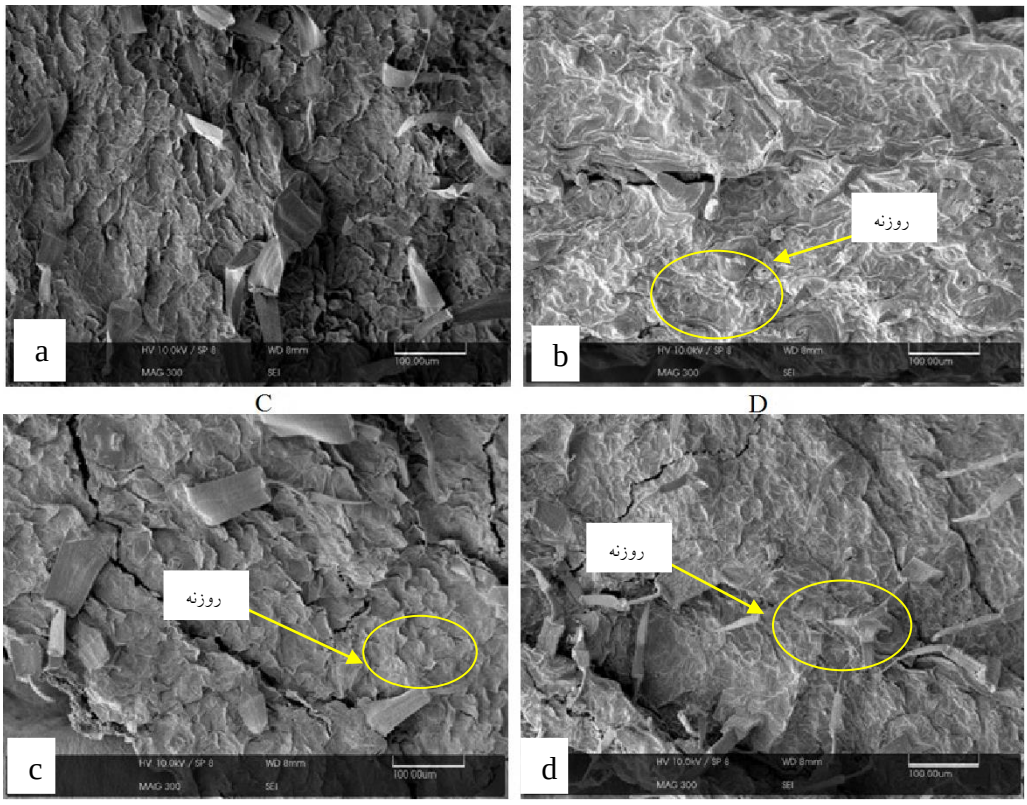
کرک‌های غده‌ای به دو تیپ تشریحی مختلف شامل کرک سپری و کرک‌سرسان تعلق دارند که به‌عنوان آرایش مشترک کرک‌های غده‌ای در خانواده نعناعیان مطرح شده‌اند (Arab zadeh Ghahyazi and Zarinkamar, 2015). نتایج تغییر سطح پلوئیدی به تتراپلوئیدی در گیاه آویشن ایرانی (*Thymus persicus*) مشخص کرد که تعداد کرک‌های غده‌ای (سپری شکل و سرمانند) افزایش یافته است (Tavan *et al.*, 2015). این پژوهش‌ها نشان می‌دهد که کلشی‌سین اثر یکسان و یکنواختی بر گونه‌های گیاهی مختلف و بخش‌های مختلف یک گیاه نیز ندارد (Salahi Sadr *et al.*, 2018). از آنجایی که مریستم‌های گیاهی از تعداد زیادی سلول تشکیل شده‌اند، بنابراین احتمال دستیابی به بافت‌های میکسوپلوئید (بافت ناهمسان هسته‌ای حاوی بافت دیپلوئید و تتراپلوئید) پس از تیمار با کلشی‌سین وجود دارد. به‌دلیل اینکه این ماده به‌طور مؤثری فقط روی سلول‌های در حال تقسیم اثر می‌گذارد، بنابراین پلی‌پلوئیدی عموماً به‌طور یکسان در تمام سلول‌های ریزنمونه اتفاق نمی‌افتد، درنتیجه باعث بافت ناهمسانی و میکسوپلوئیدی می‌گردد (Borgheei *et al.*, 2010). از طرفی در

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

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.4.0]



شکل ۱– a. کرک و روزنه گیاه شاهد؛ b. کرک گیاه با غلظت ۰/۴درصد در مدت زمان ۴۸ ساعت؛ c. کرک گیاه با غلظت ۰/۴ درصد در زمان ۲۴ ساعت؛ d. کرک گیاه در زمان ۴۸ ساعت در غلظت ۰/۱ درصد (با بزرگنمایی ۱۰۰ میکرون)



شکل ۲–a. کرک و روزنه گیاه شاهد؛ b. روزنه گیاه با غلظت ۰/۴ درصد در مدت زمان ۴۸ ساعت؛ c. روزنه گیاه با غلظت ۰/۴ درصد در زمان ۲۴ ساعت؛ d. روزنه گیاه با غلظت ۰/۱ درصد در مدت زمان ۴۸ ساعت (با بزرگنمایی ۲۰ میکرون)

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

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.4.0]

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر متقابل غلظت کلشی‌سین و زمان کاربرد آن بر صفات اندازه‌گیری شده در اسطوخودوس افراشته

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		وزن هزار بذر	وزن هزار پوشینه حاوی بذر	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید
غلظت	۴	۰/۰۶**	۰/۱۵**	۰/۰۰۰۶^{ns}	۰/۰۰۱^{ns}	۰/۰۰۸^{ns}	۰/۰۰۲^{ns}
زمان	۳	۰/۰۱**	۰/۶۰**	۰/۰۰۲*	۰/۰۰۴^{ns}	۰/۰۰۷^{ns}	۰/۰۰۸^{ns}
غلظت× زمان	۱۲	۰/۰۵**	۰/۱۵**	۰/۰۰۲*	۰/۰۰۷*	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۰۵^{ns}
خطا	۴۰	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۱	۰/۰۲۵	۰/۰۰۳
ضریب‌تغییرات		۶	۱۸	۱۲	۱۱	۳۲	۱۲

***،** و ns: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد و عدم معنی‌داری**

ادامه جدول ۱-

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		پراکسیداز	کاتالاز	پلی‌فنل اکسیداز	درصد اسانس	عملکرد اسانس در بوته
غلظت	۴	۱۰۹۸**	۰/۱۱**	۸۹۷۶۷**	۰/۰۰۵^{ns}	۰/۰۰۰۳**
زمان	۳	۳۷۸**	۰/۰۷**	۱۸۶۱۸۸**	۰/۰۴^{ns}	۰/۰۰**
غلظت× زمان	۱۲	۱۶۱**	۰/۰۵**	۲۸۷۰۹**	۰/۰۴*	۰/۰۰**
خطا	۴۰	۶	۰/۰۱	۲۳۴	۰/۰۱	۰/۰۰
ضریب‌تغییرات		۵	۲۰	۱۱	۱۳	۲۵

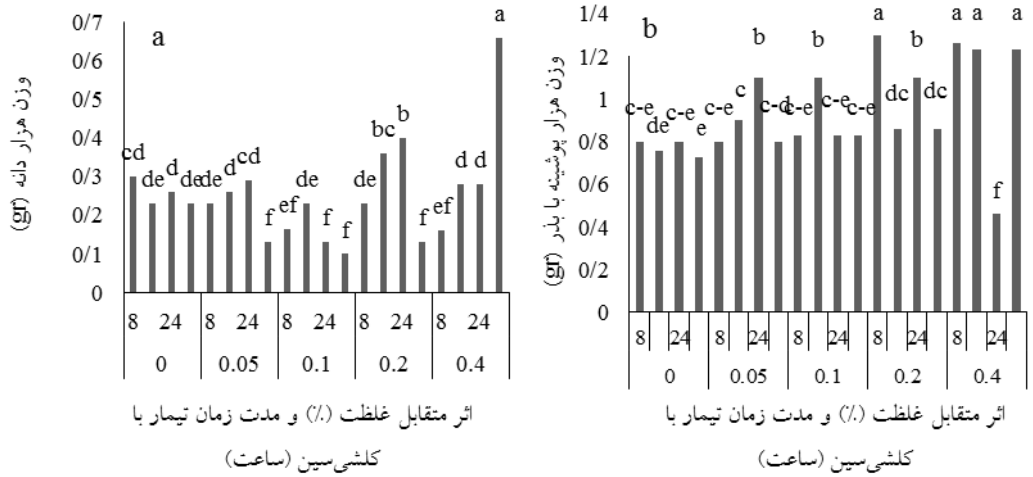
***،** و ns: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد و عدم معنی‌داری**

تحقیقی روی بررسی غلظت کلشی‌سین در گیاه ارکیده (*Phalaenopsis amabilis*) مشخص شد که غلظت‌های ۰/۱۵ و ۰/۲ درصد باعث القای بیشترین درصد پلی‌پلوئیدی شده و همبستگی بعضی صفات مورفولوژیک با سطح پلی‌پلوئیدی نشان داد که بعد از فلوسایتومتری بررسی خصوصیات روزنه و تعیین تراکم آن به تشخیص پلی‌پلوئیدی کمک می‌کند (Zaker Tavallaie and Kolahi, 2017).

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلشی‌سین و مدت زمان کاربرد، بر کلروفیل کل و کاروتنوئید تأثیرگذار نبوده و اختلاف معنی‌داری نداشته است درحالی‌که کلروفیل a، کلروفیل b و درصد اسانس اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد نشان دادند و بر وزن هزاردانه بذر، وزن هزار پوشینه با بذر، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و عملکرد اسانس در بوته اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان داد (جدول ۱).

وزن هزاردانه بذر و وزن هزارپوشینه با بذر: جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده غلظت و زمان و اثر متقابل غلظت در زمان بر وزن هزار عدد بذر و وزن هزار پوشینه با بذر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است (جدول ۱). با توجه به شکل ۳a وزن هزاردانه بذر در غلظت ۰/۴ درصد در مدت زمان ۴۸ ساعت بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده است. با توجه به شکل ۳b وزن پوشینه در غلظت ۰/۴ درصد در زمان‌های ۸، ۱۶ و ۴۸، غلظت ۰/۲ درصد در مدت زمان ۸ ساعت بیشترین مقادیر را به خود

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.4.0]



شکل ۳- اثر غلظت و زمان اعمال تیمار کلشی‌سین بر وزن هزاردانه (a) و وزن هزارپوشینه با بذر (b)

در مورد همه نمودارها میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.

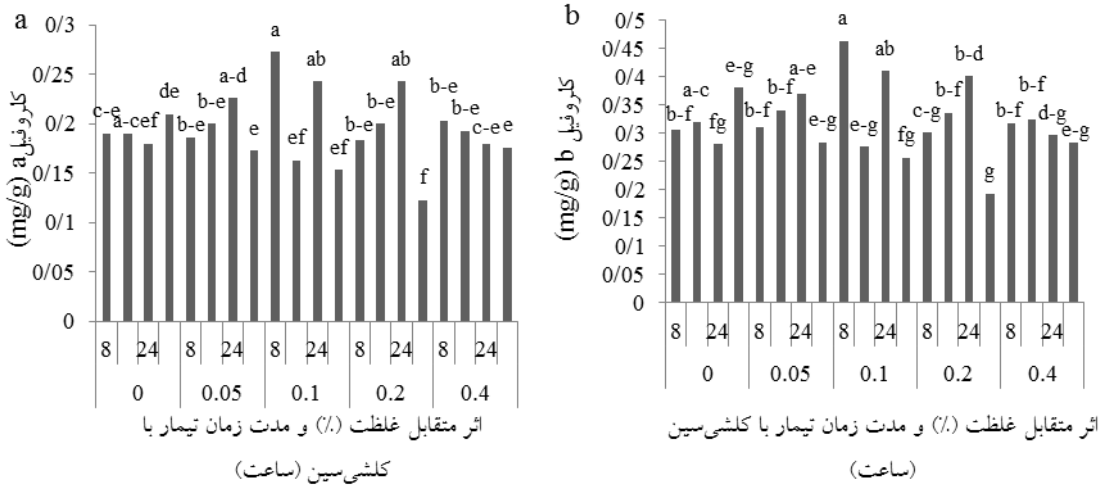
اختصاص داده‌اند.

با توجه به نتایج پژوهش در گیاه اسطوخودوس افراشته مقدار وزن هزاردانه و هزارپوشینه با بذر در گیاه اسطوخودوس نسبت به گیاهان شاهد افزایش داشته است. مشابه با نتایج این پژوهش در تحقیقی که در گیاه آندروگرافیس پانیکولاتا (*Andrographis paniculata* L.) معروف به گیاه نائین هاوندی در ایران، وزن هزاردانه افزایش یافته است (Qi-Qing *et al.*, 2018). همچنین در گیاه میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) نیز با افزایش سطح پلوئیدی به تتراپلوئید، افزایش در وزن بذر گزارش گردیده است (Roychowdhury *et al.*, 2011). بذرهایی که در گیاهان پلی‌پلوئید تولید می‌شوند، اغلب از بذر گیاهان دیپلوئید بزرگ‌تر و سنگین‌تر هستند. که احتمالاً به‌دلیل افزایش اندازه سلول درنتیجه القا پلی‌پلوئید است (Munzbergova, 2017). همچنین در تحقیقی روی گونه‌های Lolium مشخص شد با افزایش سطح پلوئیدی، اندازه و تعداد سلول‌ها افزایش یافت (Mirzaie-Nodoushan and Nadarkhani, 2000).

کلروفیل a: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل زمان و غلظت بر کلروفیل a در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار است (جدول ۱). با توجه به نمودار دو غلظت ۰/۰۵ درصد و ۰/۲ درصد از مدت زمان ۸ ساعت به ۲۴ ساعت یک روند افزایشی دارد و برای زمان ۴۸ ساعت کاهش می‌یابد، که این کاهش در زمان ۴۸ ساعت در غلظت ۰/۲ درصد به کمترین مقدار رسیده است. در غلظت ۰/۴ درصد یک روند کاهشی جزئی از زمان ۸ ساعت به ۴۸ ساعت وجود دارد. در غلظت ۰/۱ درصد در زمان ۸ ساعت میزان کلروفیل a به بیشترین مقدار رسیده است و سپس در زمان ۱۶ ساعت کاهش زیادی داشته است و مجدداً برای زمان ۲۴ ساعت افزایش داشته و برای ۴۸ ساعت دوباره کاهش یافته است (شکل ۴a).

کلروفیل b: نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرهای ساده غلظت و زمان اختلاف معنی‌داری نداشتند اما اثر متقابل غلظت و زمان بر میزان کلروفیل b در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شده است (جدول ۱). با توجه به شکل ۴b در دو غلظت ۰/۰۵ و ۰/۲ درصد یک روند افزایشی از زمان ۸ ساعت تا ۲۴ ساعت دارد که دوباره کاهش می‌یابد. در غلظت ۰/۱ درصد در زمان ۸ ساعت، کلروفیل b در بیشترین مقدار خود قرار دارد و در زمان ۱۶ ساعت کاهش می‌یابد و برای زمان ۲۴ ساعت افزایش یافته و برای ۴۸ ساعت دوباره کاهش می‌یابد. در غلظت ۰/۴ درصد تیمارها در مدت زمان‌های

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.4.0]



شکل ۴- اثر متقابل غلظت و زمان اعمال تیمار کلشی‌سین بر کلروفیل a (a) و کلروفیل b (b)

مختلف تقریباً با یکدیگر برابرند و یک روند کاهشی جزئی در زمان ۱۶ ساعت به ۴۸ ساعت وجود دارد.

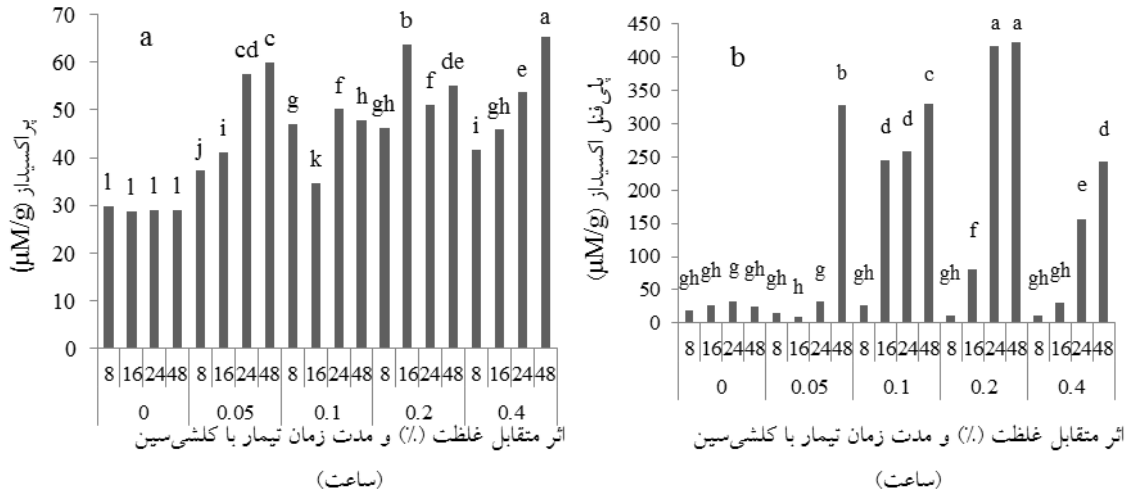
در این پژوهش میزان کلروفیل کل و کاروتنوئید اختلاف معنی‌داری را نشان نداده است ولی میزان کلروفیل a و کلروفیل b در گیاهان تحت تیمار با غلظت ۰/۱ درصد افزایش نشان داده است. Akbari و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیقی گزارش کردند که با افزایش سطح پلوئیدی در گیاه زنیان (*Carum carvi* L.) میزان کلروفیل a و کلروفیل b به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در مطالعه‌ای روی ریحان (*Ocimum basilicum*) گیاهان تیمارشده با کلشی‌سین میزان کاروتنوئید بیشتری نسبت به گیاهان شاهد (دیپلوئید) داشتند و میزان کلروفیل در گیاهان تتراپلوئید به‌طور معنی‌داری بالاتر از دیپلوئیدها بود (Ardabili *et al.*, 2014). البته در پژوهشی که روی لیموترش (*Citrus ourantifolia*) انجام شد، نشان داد که میزان کلروفیل در گیاه تتراپلوئید و دیپلوئید تفاوت معنی‌داری نداشت (Afshar *et al.*, 2012). لذا چنین استنباط می‌شود که سطوح متفاوت پلوئیدی بسته به نوع گیاه مورد مطالعه می‌تواند در میزان کلروفیل تأثیر داشته باشد (Birami Kohi *et al.*, 2016).

آنزیم پراکسیداز: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد آنزیم پراکسیداز تحت تأثیر اثر ساده غلظت، زمان و اثر متقابل غلظت در زمان در سطح احتمال یک درصد معنی‌داری شد (جدول ۱). در شاهد کمترین مقدار ثبت شد درحالی‌که در مدت زمان ۴۸ ساعت در غلظت ۰/۴ درصد بیشترین مقدار ثبت شد (شکل ۵a). در دو غلظت ۰/۰۵ درصد و ۰/۴ درصد یک روند رو به رشد از مدت زمان ۸ ساعت به ۴۸ ساعت وجود دارد اما در غلظت ۰/۱ درصد ابتدا از زمان ۸ ساعت به ۱۶ ساعت یک روند رو به کاهش مشاهده می‌شود درحالی‌که از زمان ۱۶ ساعت به ۲۴ ساعت افزایش در میزان آنزیم و مجدداً تا ۴۸ ساعت روند کاهشی مشاهده می‌شود. در غلظت ۰/۲ درصد روندی معکوسی نسبت به غلظت ۰/۱ درصد داشته است یعنی ابتدا از زمان ۸ ساعت به ۱۶ ساعت افزایش داشته و برای ۲۴ ساعت دوباره کاهش یافته و سپس برای مدت زمان ۴۸ ساعت یک افزایش جزئی وجود داشته است (شکل ۵a).

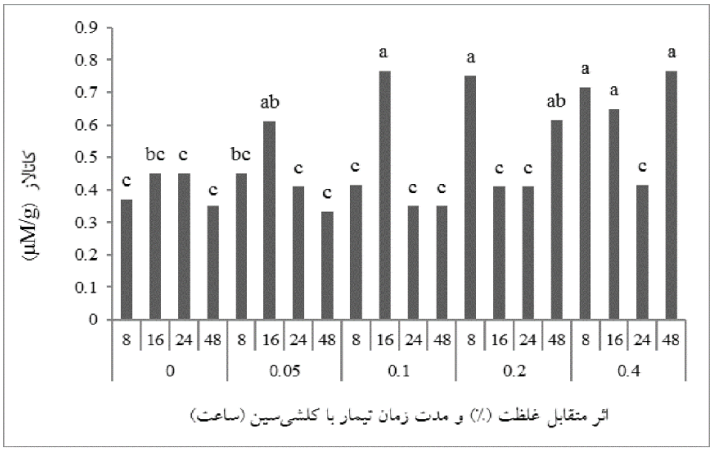
آنزیم پلی‌فنل اکسیداز: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار زمان، غلظت و اثر متقابل غلظت و زمان روی آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در سطح احتمال یک درصد است (جدول ۱). در غلظت ۰/۲ درصد برای دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بیشترین مقدار آنزیم پلی‌فنل اکسیداز ثبت شده است (شکل ۵b).

کاتالاز: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار زمان، غلظت و اثر متقابل غلظت و زمان روی آنزیم کاتالاز در سطح احتمال یک درصد پلی‌فنل اکسیداز است

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.4.0]



شکل ۵- اثر غلظت و زمان اعمال تیمار کلشی‌سین بر آنزیم پراکسیداز (a) و آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (b)



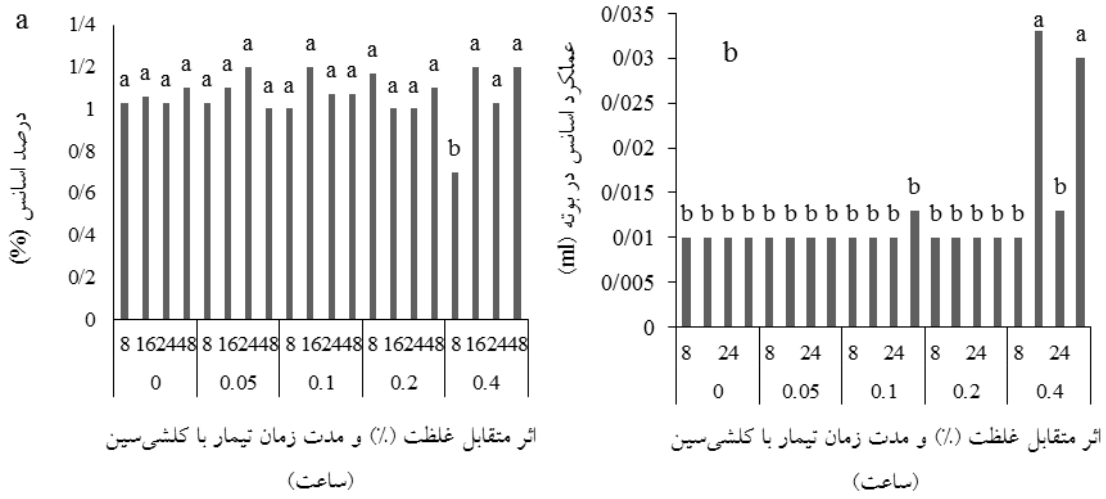
شکل ۶- اثر غلظت و زمان اعمال تیمار کلشی‌سین بر آنزیم کاتالاز

(جدول ۱). با توجه به شکل ۶ میزان این آنزیم در غلظت ۰/۱ درصد در مدت زمان ۱۶ ساعت، غلظت ۰/۲ درصد در مدت زمان ۸ ساعت و در غلظت ۰/۴ درصد در زمان‌های ۸، ۱۶ و ۴۸ ساعت به بیشترین مقدار خود رسیده است.

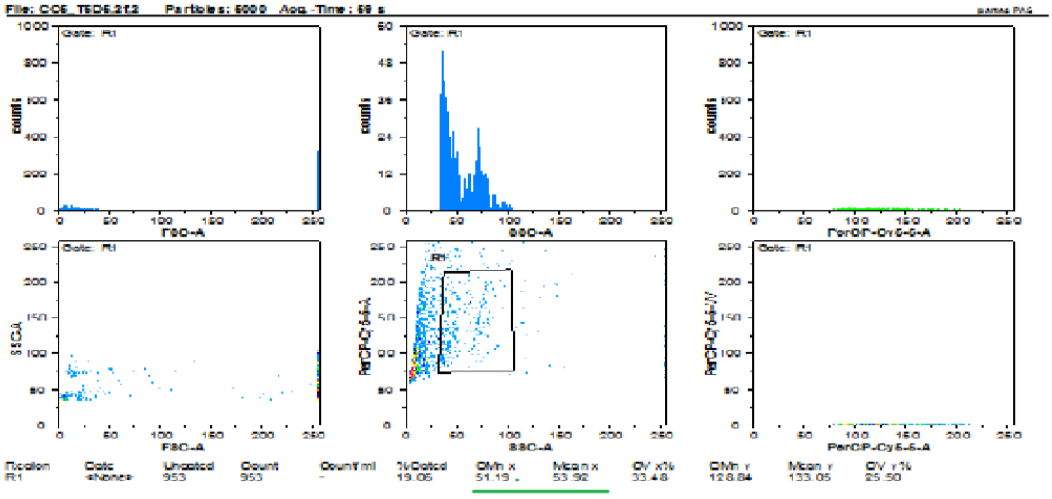
در تحقیقی که در سورگوم (*Sorghum bicolor*) (Ardabili *et al.*, 2014) و گیاه زنیان پاکستانی (*Carum copticum*) (Akbari *et al.*, 2019) انجام شد گزارش گردید که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با افزایش سطح پلوئیدی افزایش یافته است. فعالیت آنزیمی در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئید می‌تواند درنتیجه افزایش سطوح پلوئیدی باشد. روش دو برابر کردن تعداد کروموزوم‌ها می‌تواند با افزایش فعالیت ژنی و درنتیجه افزایش فعالیت آنزیم‌های مختلف، نسبت فتوسنتز افزایش می‌یابد (Liu and Davis, 2011). در تحقیقی که به اثر کلشی‌سین در گیاه مارچوبه انجام شد افزایش سطح پلوئیدی باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز شده بود (Chen *et al.*, 2020).

کمیت اسانس: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد زمان، غلظت و اثر متقابل غلظت و زمان روی عملکرد اسانس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است و اثر متقابل زمان و غلظت بر درصد اسانس در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار است، ولی اثر ساده غلظت و اثر ساده زمان بر درصد اسانس معنی‌دار نبوده است (جدول ۱) به‌طوری‌که غلظت ۰/۴ درصد در مدت زمان ۱۶ و ۴۸ ساعت بیشترین مقدار را داشته است ولی در مورد عملکرد اسانس تقریباً تمامی تیمارها درصد اسانس

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.4.0]



شکل ۷- اثر غلظت و زمان اعمال تیمار کلشی‌سین بر درصد اسانس (a) و عملکرد اسانس (b)

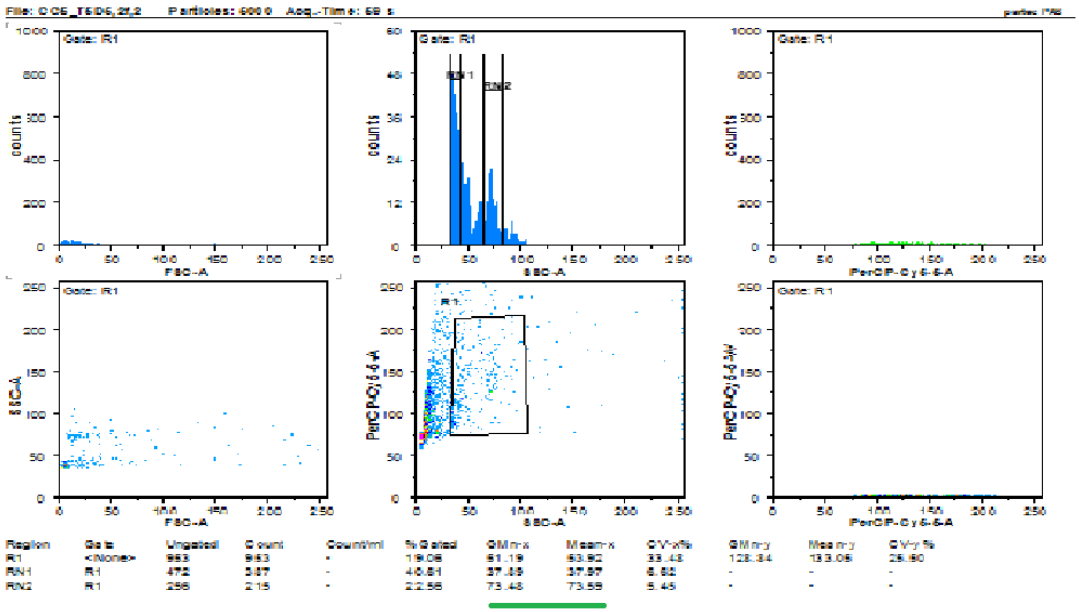


شکل ۸- نمونه‌ای از هیستوگرام فلوسایتومتری گیاهان (شاهد و گیاه استاندارد تربچه *Raphanus sativus* cv. Sexa) اسطوخودوس افراشته خط سبز مشخص‌کننده میانگین هسته‌های رنگ‌آمیزی شده، است.

یکسانی در محدوده یک درصد نشان داد (شکل ۷). نتایج نشان داد درصد و عملکرد اسانس تحت تیمارهای اعمال‌شده نسبت به تیمار شاهد، افزایش داشته است که این نتایج با تحقیقی که روی گیاه ویتور *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash انجام شده و نتایج بیانگر افزایش ۴۳ درصدی مواد مؤثره تحت تیمارها بوده است، مطابقت دارد. در همین راستا در تحقیق مشابهی روی گیاه *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hieron، افزایش ۶۰ درصدی مواد مؤثره گزارش گردیده است (Iannicelli *et al.*, 2020).

نتایج فلوسایتومتری: اعداد حاصل از نرم‌افزار فلومکس میانگین اندازه ژنوم نمونه‌های شاهد دیپلوئید را برابر ۰/۵۵ پیکوگرم و میانگین اندازه ژنوم نمونه تیمارشده با کلشی‌سین را در غلظت ۰/۴ درصد در مدت زمان ۴۸ ساعت ۰/۷۳ پیکوگرم مشخص کرد (شکل ۸ و ۹) و بقیه گیاهان تیمارشده در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.4.0]



شکل ۹- هیستوگرام فلوسایتومتری گیاهان تیمارشده اسطوخودوس افراشته (غلظت ۰/۴ درصد در زمان ۴۸ ساعت) و گیاه استاندارد تربچه (*Raphanus sativus* cv. Sexa) خط سبز مشخص‌کننده میانگین هسته‌های رنگ‌آمیزی شده، است.

غلظت‌های متفاوت میانگین اندازه ژنوم ۰/۵۷ را نشان می‌داد. در هر هیستوگرام پیک‌ها نشان‌دهنده اندازه ژنوم است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این آزمایش می‌توان نتیجه گرفت مناسب‌ترین تیمار کلشی‌سین برای گیاه اسطوخودوس افراشته غلظت ۰/۴ درصد به‌مدت زمان ۴۸ ساعت است چرا که منجر به تولید گیاهانی با تراکم غده‌های اسانسی بیشتر و حاوی اسانس بیشتری شد. همچنین فعالیت بالای آنزیم‌ها در این گیاه مطلوب به‌نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای دکتر قاسم کریم‌زاده که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند صمیمانه تشکر می‌نماییم.

منابع

Abei, H. (1984) Catalase in vitro. Methods in Enzymology 105: 121-126.

Afshar, M. M., Pourakbari, K. R., Omidi, Z., Ghanati, F. and Tarang, A. (2012) Morphologic and physiologic effects on polyploidy induction in *Citrus ourantifolia*. Iranian Journal of Plant Biology 4: 13-23.

Akbari, R., Fahmideh, L. and Fazeli-Nasab, B. (2019) Investigating the possibility of polyploidy production and its effect on phenolic content and antioxidant enzymes of *Carum copticum* of Pakistani population. Journal Plant Process and Function 8: 311-324.

Arab zadeh Ghahyazi, N. and Zarinkamar, F. (2015) Investigating the structure of leaf Trichomes of *Mentha pulegium* L. First Iranian Scientific Research Conference on Biology and Horticultural Sciences.

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

Amako, A., Chen, K. and Asada, K. (1994) Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozyme of ascorbate peroxidase in plants. Plant Cell Physiology 32: 497-504.

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

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.4.0]

Barnes, J. D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S. and Davison, A. W. (1992) A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophyll a and b in lichens and higher plants. Environmental and Experimental Botany 32: 85-100.

Birami Kohi, A., Fahmideh, L. and Mehrnaz Riasat, M. (2016) Evaluation of morphologic and physiologic traits of Sistan's Native Fenugreek (*Trigonellafoenum graecum*) under colchicine treatments. Journal of Crop Breeding 8: 153-159.

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

Comai, L. (2005) The advantages and disadvantages of being polyploidy. Nature Reviews Genetics 6: 836-846.

Chen, H., Lu, Z., Wang, J., Chen, T., Gao, J., Zheng, J. and Yi, K. (2020) Induction of new tetraploid genotypes and heat tolerance assessment in *Asparagus officinalis* L. Scientia Horticulturae 264: 109-168.

Eivazi, Sh., Khorasaninejad, S. and Alizadeh, M. (2015) Optimization of plant growth regulators for callus motivation and positioning in *Lavandula stricta* Del. First National Conference on Organic Cultivation and Propagation of Medicinal Plants.

Estaji, A., Hosseini, B., Ravandi, E. G., Dehghan, E. and Sefidkon, F. (2017) The effects of colchicine-induced autotetraploidy on selected characteristics of Nuruozak (*Salvia leriifolia*). Cytology and Genetics 51: 74-81.

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 Organ Culture 104: 359-373.

Hosseini, B. and Javanbakht, S. (2017) Effects of in vitro polyploidy induction on some morphological, physiological and biochemical traits of *Salvia leriifolia* Benth. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 25.

Holy, M. C. (1972) Indole acetic acid oxidase: A dual catalytic enzyme. Plant Physiology 50: 15-18.

Khorasaninejad, S., Alizadeh Ahmadabadi, A. and Hemmati, K. (2018) The effect of humic acid on leaf morphophysiological and phytochemical properties of *Echinacea purpurea* L. under water deficit stress. Scientia Horticulturae 239: 314-323.

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

Iannicelli, J., Guarinielloa, J., Tossibc, V. E., Regaladob, J. J., Di Ciaccio, L., van Barene, C. M., Pitta Alvarezb, S. I. and Escandona, A. S. (2020) The "polyploid effect" in the breeding of aromatic and medicinal species. Scientia Horticulturae 260: 108854.

Liu, B. and Davis, T. M. (2011) Conservation and loss of ribosomal RNA gene sites in diploid and polyploid fragaria (Rosaceae). BMC Plant Biology 11: 157.

Loureiro, J., Pinto, G., Lopes, T., Dolezel, J. and Santos, C. (2005) Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. Planta 221: 815-822.

Lu, B., Ding, R., Zhang, L., Yu, X., Huang, B. and Chen, W. (2006) Molecular cloning and characterization of a novel calcium-dependent protein kinase gene IiCPK2 responsive to polyploidy from tetraploid *Isatis indigotica*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 39: 607.

Madani, H., Hosseini, B., Karimzadeh, G. and Rahimi, A. (2019) Enhanced thebaine and noscapine production and modulated gene expression of tyrosine/dopa decarboxylase and salutaridinol 7-O-acetyltransferase genes in induced autotetraploid seedlings of *Papaver bracteatum* Lindl. Acta Physiologiae Plantarum 41: 194.

Mirzaie-Nodoushan, H. and Nadarkhani, H. (2000) Karytypic investigation of tetraploid populations of *Lolium* sp. ranian. Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 4: 87-116.

Mozaffarian, V. (1996) A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser, Tehran.

Mozaffarian, V. (2004) A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser, Tehran.

Munzbergova, Z. (2017) Colchicine application significantly affects plant performance in the second generation of synthetic polyploids and its effects vary between populations. Annals of Botany 120: 329-339.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology 22: 867-880.

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 (PCTOC) 130: 543-551.

Qi-Qing, L. I., ZHANG, J., Ji-Hua, L. I. U. and Bo-Yang, Y. U. (2018) Morphological and chemical studies of artificial *Andrographis paniculata* polyploids. Chinese Journal of Natural Medicines 16: 81-89.

Ramsey, J. and Schemske, D. W. (1998) Pathways, mechanisms and rates of polyploidy formation in flowering plants. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 29: 467-501.

Ranney, T. G. (2006) Polyploidy: From evolution to new plant development. International Plant Propagators' Society 56: 137-142.

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

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.4.0]

Roychowdhury, R., Sultana, P. and Tah, J. (2011) Morphological architecture of foliar stomata in M2 Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) genotypes using scanning electron microscopy (SEM). Electronic Journal of Plant Breeding 2: 583-588.

Salahi Sadr, S., Zakizadeh, H., Naghavi, M. R. and Olfati, J. A. (2018) In vitro effect of colchicine on growth and cytological characteristics of *Fritillaria raddeana.* Agricultural Biotechnology Journal 10: 85-103.

Sanginabadi, H., Khorasaninejad, S., Hemmati, Kh. and Ghasemnejad, A. (2016) A study on propagation methods of *Lavandula stricta* Del. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 32: 417-427.

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.

Shahriari-Ahmadi, F., Dehghan, E., Farsi, M. and Azizi, M. (2008) Tetraploid induction of *Hyoscyamus muticus* L. using colchicine treatment. Pakistan Journal of Biological Sciences 11: 2653.

Soltanipour, M. A. (2005) Medicinal plants of the Geno protected area. Pajouhesh and Sazandegi 68: 27-37.

Soltis, D. E., Soltis, P. S., Pires, J. C., Kovarik, A., Tate, J. A. and Mavrodiev, E. (2004) Recent and recurrent polyploidy in Tragopogon (Asteraceae): Cytogenetic, genomic and genetic comparisons. Biological Journal of the Linnean Society 82: 485-501.

Tavan, M., Mirjalili, M. H. and Karimzadeh, G. (2015) In vitro polyploidy induction: Changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 122: 573-583.

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.

Tan, F. Q., Tu, H., Liang, W. J., Long, J. M., Wu, X. M., Zhang, H. Y. and Guo, W. W. (2015) Comparative metabolic and transcriptional analysis of a doubled diploid and its diploid citrus rootstock (*C. junos* cv. Ziyang xiangcheng) suggests its potential value for stress resistance improvement. BMC Plant Biology 15: 89.

Urwin, N., Horsnell, J. and Moon, Th. (2007) Generation and characterization of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. Euphytica 156: 257-266.

Yaghoobi, K., Kaka, G. R., Davoodi, Sh. and Ashayeri, H. (2016) Therapeutic effects of *Lavandula angustifolia*. Journal of Gorgan University of Medical Sciences 17: 1-9.

Zaker Tavallaie, F. and Kolahi, H. (2017) Induction of in vitro polyploidy in ornamental flowers of orchid species (*Phalaenopsis amabilis*). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 25: 259-270.

Zhou, L. J., Wang, L., Wei, Q., Ao, G. H., Wu, X. J. and Li, S. G. (2007) Utilizing early generation stability characteristic to breed restorer line of hybrid rice. Chinese Journal of Rice Science 21: 265-269.

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

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.4.0]

The effect of polyploid induction on morphophysiological changes and essential oil yield of *Lavandula stricta*

Habibeh Nouri dashlibroon[1], Sarah Khorasaninejad[1], Seyed javad Mousavizadeh[1], Mohammad hossein Mirjalili[2]

[1]Horticultural Sciences Department, Plant Production Faculty, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[2]Department of Agricultural Engineering, Research Institute of Plants and Medicinal Raw Materials,Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

(Received: 01/08/2020, Accepted: 09/03/2021)

Abstract

In this study, colchicine was used to investigate the effect of ploidy level changing on morphological and physiological traits and the amount of essential oil of *Lavandula stricta* as a Iranian native medicinal plant. In this experiment, we used gel containing colchicine at five concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, and 0.4 %) and four times (8, 16, 24 and 48 h) in the final meristem in the four-leaf growth stage of the potted plant under greenhouse conditions. The results of flow cytometry showed that the genome size in all diploid and treated plants with colchicine were in the same range (0.55 and 0.57 pg, respectively), but, it was obtained 0.73 pg for treated plant with 0.4% colchicine in 48 hours and SEM images showed an increase in the density of glandular trichomes and stomata size. Also, the results showed that the concentration of colchicine and the time of treatment had no significant effect on chlorophyll and carotenoid, but increasing the concentration of colchicine and the application time increased the weight of 1000-seed, weight of seed with cover, peroxidase, polyphenol oxidase, catalase and percentage as well as yield of essential oil. According to the obtained results, it can be stated that the application of colchicine at 0.4% for 48 hours has the ability to increase ploidy level of *Lavandula stricta* plant and increase medicinal value of this plant.

Keywords: Colchicine, Essential oil, Flow cytometry, *Lavandula stricta*, Polyploidy

Corresponding author, Email: skhorasaninejad@yahoo.com

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

[DOR: 20.1001.1.23222727.1400.10.44.4.0]