تأثیر سطوح مختلف کلشی‌سین بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه دارویی زرین‌گیاه

علی اکبر زاهدی[۱]، بهمن حسینی[۲]* و محمد فتاحی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناس ارشد گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲-*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (b.hosseini@urmia.ac.ir)
۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۴

چکیده

القای پلی‌پلوئیدی یکی از ابزارهای مهم اصلاح گیاهان دارویی می‌باشد. چند برابر شدن کروموزوم‌ها در اثر پلی‌پلوئیدی باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و سیستم پرورش گیاهان شده و در نهایت موجب تولید یک ژنوتیپ جدید می‌گردد. در این تحقیق، تیمار مریستم انتهایی با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین (صفر، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۰/۲ و ۰/۵ درصد وزنی به حجمی) در دو مرحله دو و چهار برگی گیاه دارویی زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.)، مورد استفاده قرار گرفت. مطالعات سیتولوژیکی با استفاده از فلوسایتومتری افزایش تعداد کروموزوم از سطح دیپلوئید (2n=2x=20) به تتراپلوئیدی (2n=4x=40) را اثبات کرد. از مجموع ۱۶۵ دانهال بازمانده، ۷/۲۷ درصد تتراپلوئید، ۱۳/۳ درصد میکسوپلوئید و بقیه دیپلوئید بودند. در گیاهان تتراپلوئید روزنه‌ها به‌طور قابل توجهی بزرگتر و شاخص روزنه بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود. همبستگی منفی و معنی‌داری بین اندازه روزنه و ارتفاع گیاه، تعداد برگ و تعداد شاخه‌های جانبی به‌دست آمد. محتوای فلاونوئید کل در گیاهان دیپلوئید ۱۵۸۳/۲۸ و در گیاهان تتراپلوئید ۱۸۹۰/۰۷ میکروگرم بر گرم وزن خشک بود. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد تیمار ۰/۵ درصد کلشی‌سین می‌تواند به‌عنوان یک تیمار مؤثر در القای پلی‌پلوئیدی در *D. kotschyi* باشد.

کلید واژه‌ها: تتراپلوئید، زانتومیکرول، فلاونوئید ، فلوسایتومتری، HPLC

مقدمه

زرین گیاه با نام علمی *Dracocephalum kotschyi* Boiss. گیاهی علفی و بومی ایران از خانواده نعناع می‌باشد. فلاونوئیدهای متوکسی موجود در قسمت‌های مختلف گیاه خاصیت ضدسرطانی دارد (Moghaddam *et al.*, 2012). عصاره برگ آن دارای اثرات ضد درد[۱]، اثرات سیتوتوکسیک[۲] و تأثیر روی سیستم ایمنی[۳] بدن می باشد. دست‌ورزی سطح پلوئیدی، ابزار توانمندی در اصلاح ژنتیکی بسیاری از گیاهان است (Madon *et al.*, 2005). پلی‌پلوئیدی دارای اثرات قابل توجه در بیان ژن‌ها می‌باشد به‌طوری‌که می‌تواند سبب خاموشی، کاهش و یا افزایش بیان یک ژن شود. این تغییرات می‌تواند با شروع پلی‌پلوئیدی و یا با گذشت چند نسل پس از ایجاد آن، رخ دهد. ژن‌های خاصی در جریان پدیده پلی‌پلوئیدی به‌طور مستقل و دائم می‌توانند خاموش باشند در حالی‌که الگوی فعالیت سایر ژن‌ها بسیار تصادفی است (Adams *et al.*, 2004). در تحقیقی که در گیاه درمنه (*Artemisia annua* L.) انجام گردید، نتایج نشان داد که در گیاهان تتراپلوئید،

1- Antinociceptive
2- Cytotoxic
3- Immunomodulatory

آرتمیزین بالاتر ممکن است در اثر تنظیم مثبت بیان برخی از ژن‌های آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتز آرتمیزین باشد (Lin *et al.*, 2011). القاء پلی‌پلوئیدی در گیاهان اغلب موجب تولید واریانتهایی جدید با کیفیت متمایز می‌شود و از سوی دیگر از طریق دو برابر شدن سطح کروموزومی، افزایش تعداد نسخه های ژنی بیان‌کننده ترکیبات مواد مؤثر و افزایش جثه گیاه، موجب افزایش ترکیبات ثانویه و دارویی آن می‌شود (Thao *et al.*, 2003). مؤثرترین ماده‌ای که به منظور تحریک پلی‌پلوئیدی شناخته شده است، کلشی‌سین است. انگیزش پلی‌پلوئیدی در بسیاری از گیاهان دارویی موجب افزایش مواد مؤثره آنان شده است. ماده مؤثره آرتمیزین در گیاهان تتراپلوئید *Artemisia annua* شش برابر بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود (De Jesus-Gonzalez and Weathers, 2003). در گیاه شابیزک، بنگ‌دانه و داتوره آلکالوئیدهای تروپانی در اثر افزایش سطح پلوئیدی افزایش یافته‌اند (Dhawan and Lavania, 1996). این مطالعه به منظور بررسی اثر غلظتهای مختلف کلشی‌سین در دو مرحله دو و چهار برگی بر افزایش سطوح پلوئیدی و تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی احتمالی بر زرین گیاه انجام گردید تا اقدامات اولیه جهت اصلاح این گیاه دارویی مهم انجام پذیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این مطالعه در سال ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ در آزمایشگاه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه انجام گردید. بذور مورد استفاده از شهرستان گچسر[1] از ارتفاع ۲۲۸۰ متری از سطح دریا در تیرماه جمع‌آوری و توسط اسید سولفوریک غلیظ ۹۸ درصد به مدت ۱۰ دقیقه جهت شکستن خواب بذر و حداکثر جوانه‌زنی (۹۵ درصد) تیمار شدند (Fattahi *et al.*, 2011). این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور غلظت تیمار کلشی‌سین (غلظت صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد وزنی به حجمی) به‌عنوان فاکتور اول و دو مرحله رشدی (دو برگ لپه‌ای و دو برگ حقیقی) به‌عنوان فاکتور دوم با ۱۰ تکرار (جمعاً ۱۰۰ گلدان) به مدت ۴۸ ساعت، با خاک لومی و دور آبیاری ۳ روز با میانگین دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه در روز و ۱۸ تا ۱۹ درجه در شب، در گلخانه تحقیقاتی گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه انجام گردید. به منظور افزایش سطوح پلوئیدی در این گیاه از روش گلوله پنبه‌ای آغشته به کلشی‌سین استفاده شد. مرحله اول تعیین سطح پلوئیدی گیاهان حاصل از تیمار شامل شناسایی گیاهانی بود که در مراحل اولیه رشد و نمو از نظر صفات موفولوژیکی با گیاهان شاهد تفاوت داشتند. مرحله دوم شامل تعیین سطح پلوئیدی با استفاده از شاخص های روزنه‌ای (تراکم روزنه و طول و عرض محافظ روزنه) بود. لازم به ذکر است که گیاهان شاهد زرین گیاه به عنوان شاخص جهت مقایسه با گیاهان تغییر شکل‌یافته مورد استفاده قرار گرفت و در آخر گیاهان دیپلوئید با گیاهان تتراپلوئید حاصله از نظر برخی صفات با یکدیگر مقایسه شدند.

به منظور تعیین وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و شاخساره پس از برداشت گیاه بعد از مرحله گلدهی، ریشه و برگ گیاهان مربوط به هر سطح پلوئیدی جدا و با آب شستشو داده شد. پس از خشک شدن سطحی بلافاصله وزن تر آن‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شدند. سپس نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اتاق به مدت ۱۰ روز در سایه قرار داده شدند. پس از مدت زمان ذکر شده وزن خشک نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید. طول و عرض بذور به وسیله کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد. آنالیز سطح پلوئیدی گیاهان توسط دستگاه فلوسایتومتری (PA, Partec, Germany) مجهز به لامپ HBO و لیزر اشعه ماوراء بنفش انجام پذیرفت (Dehghan *et al.*, 2012). پس از استخراج عصاره متانولی از برگ گیاه، جداسازی و شناسایی ترکیبات فلاونوئید انجام شد. برای این منظور از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با آشکارساز دیود اری دتکتور (HPLC-DAD)، در آزمایشگاه تجزیه دانشکده شیمی دانشگاه اصفهان استفاده شد. جداسازی

۱- از توابع آسارای شهرستان کرج، در مسیر جاده کرج به چالوس

کروماتوگرافی با استفاده از سیستم Agilent1100HPLC مجهز به ستون (C8, 3.9 × 150mm) (Waters Corporation, Milford, MA, USA) با جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه انجام شد. فاز متحرک مخلوط یکسان از ۶۰ درصد A (۲ درصد اسیداستیک در آب) و ۴۰ درصد از B(استونیتریل) در طول ۳۲ دقیقه بود. دیود اری دتکتور در طول موج ۳۳۳ نانومتر به ارائه کروماتوگرام های زمان واقعی و طیف UV از ۲۲۰ تا ۴۰۰ نانومتر برای شناسایی اجزای فلاونوئید تنظیم گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی (اختلاف معنی‌دار حقیقیHSD) انجام گرفت.

نتایج و بحث

نرخ زنده‌مانی و رشد گیاهچه‌های تیمارشده با کلشی‌سین

اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین در مرحله برگ‌های لپه‌ای بر درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار گردید (جدول ۱). بین غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد وزنی به حجمی کلشی‌سین در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری در زنده ماندن گیاهچه‌ها مشاهده گردید. بیشترین درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها در تیمار شاهد (۱۰۰ درصد) و کمترین درصد زنده‌مانی (۲۰ درصد) در تیمار ۰/۵ درصد کلشی‌سین مشاهده گردید (شکل ۱).

نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین بیانگر آن است که با افزایش غلظت کلشی‌سین، درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها کاهش می‌یابد، اما میزان زنده‌مانی در مرحله دو برگ حقیقی نسبت به مرحله ظهور برگ‌های لپه‌ای بیشتر است.

در القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان فاکتورهای بسیار متنوعی دخالت دارد که از این فاکتورها می‌توان به نوع مواد جهش‌زا، غلظت آن‌ها، زمان تیمار، نوع ژنوتیپ و ریزنمونه و عوامل متعدد دیگر اشاره کرد. غلظت بهینه جهت القای پلی‌پلوئیدی در ژنوتیپ‌های مختلف و در مراحل مختلف رشد متنوع می‌باشد. در این مطالعه بسته به غلظت و مرحله رشد نتایج متفاوتی به‌دست آمد به نحوی که در مرحله دو برگ حقیقی نسبت به دو برگ لپه‌ای نتایج القاء پلی‌پلوئیدی افزایش یافت. به نظر می‌رسد در مرحله دو برگ حقیقی نسبت به مراحل اولیه رشد با جلوگیری از ورود کلشی‌سین به سلول گیاه و تداخل با محصول DNA اثر سمی کمتری داشته و در نتیجه سبب کاهش مرگ و میر گیاهچه‌ها در این مرحله رشدی گردید (Mensah *et al.*, 2007). در واقع رابطه معکوس بین غلظت کلشی‌سین با بقاء ریزنمونه‌ها در این آزمایش مورد انتظار بود که با سایر بررسی‌های انجام شده روی گیاهان مختلف در شرایط طبیعی مانند گیاه شبدر (*Trifolium alexandrinum* L.) مطابقت داشت (Abd El-Naby *et al.*, 2012).

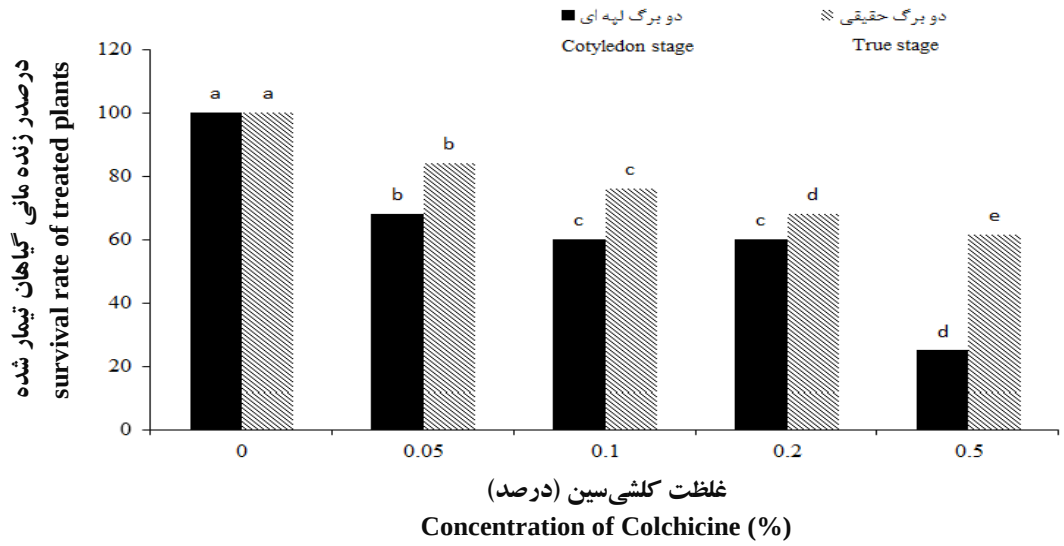
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس درصد زندمانی، گیاهان تغییریافته و مریستم خشک شده در غلظت‌های مختلف کلشی‌سین و مراحل رشدی زرین گیاه

Table 1. ANOVA results of survival rate and dried meristem in different colchicine concentrations and growth stage of *Dracocephalum kotschyi*

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	درصد زندمانی Survival rate (%)	درصد گیاهان تغییریافته Modified of plants rate (%)	درصد مریستم خشک‌شده Dried Meristem rate (%)
غلظت Concentration	4	2194.72**	3990.31**	4625.78**
تیمار Treat	1	1460.64**	454.50**	1642.50**
تیمار × غلظت Concentration × Treat	4	237.90**	1478.42**	197.78**
خطا Error	90	3.20	0.36	0.52
ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)	4	5.2	2.03	1.63

ns، *، ** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح ۵ درصد و ۱ درصد.

ns, ** ,* non-significant, significant at P <0.05 and significant at p <0.01 respectively.



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین بر نرخ زندمانی در مرحله ظهور برگ‌های لپه‌ای در زرین‌گیاه
Figure 2. Effect of different concentrations of colchicine on survival rate in cotyledon stage of *D. kotschyi*

تأثیر تیمار کلشی‌سین بر خشک شدن مریستم انتهایی و گیاهچه‌های تغییریافته

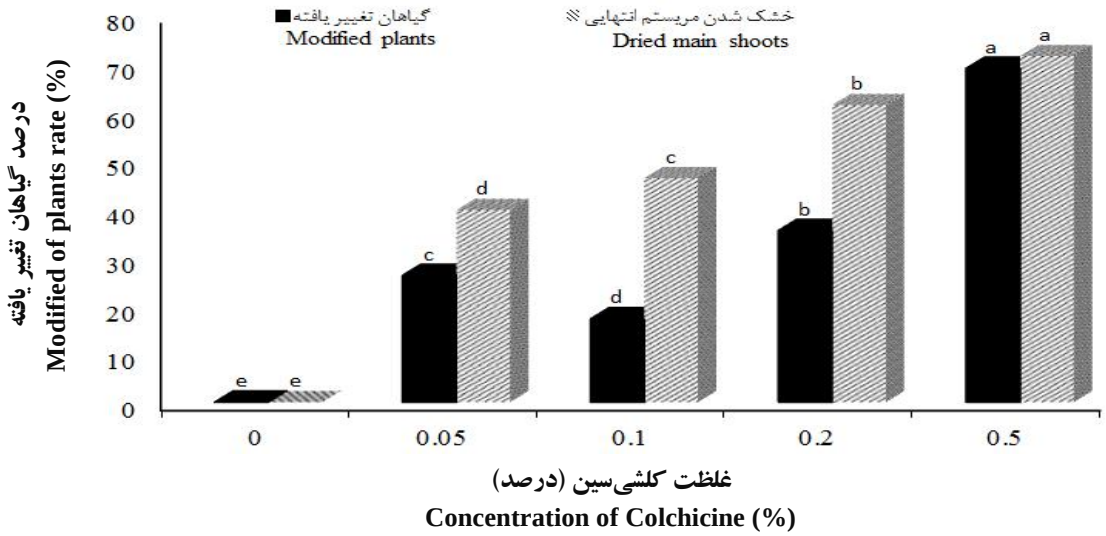
نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از این روش در زرین‌گیاه به‌جز تیمار شاهد و در تمامی غلظت‌ها سبب ایجاد گیاهچه‌های تغییر یافته پس از اعمال تیمار و خشک شدن مریستم انتهایی گیاهچه‌ها گردید (شکل ۲). با افزایش غلظت کلشی‌سین درصد خشک شدن مریستم انتهایی پس از تیمار افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین و کمترین درصد خشک شدن مریستم انتهایی (۸۰ و صفر درصد) به‌ترتیب در غلظت ۰/۵ درصد و شاهد ثبت گردید. اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین بر درصد گیاهچه‌های تغییر یافته نشان داد بیشترین درصد گیاهچه‌های تغییر یافته در تیمار ۰/۵ درصد و تیمار ۰/۲ درصد مشاهده گردید. کلشی‌سین یک عامل ضد میتوزی است که به‌طور مؤثر مانع از تشکیل الیاف دوکی شکل در مرحله متافاز می‌شود که در نهایت منجر به پلی‌پلوئیدی می‌شود و به‌طور گسترده‌ای برای القاء پلی‌پلوئیدی در اصلاح نباتات استفاده می‌شود (Abdoli *et al.*, 2013). همچنین در گزارش‌های ارائه شده مشاهده شد که با افزایش غلظت کلشی‌سین در گیاهان تیمار شده آب بشقابی (*Centella asiatica* L.) درصد مرگ و میر گیاهان افزایش یافت (Kaensaksiri *et al.*, 2011). به‌طوری‌که در غلظت ۰/۲۰۰ و ۰/۴۰۰ درصد کلشی‌سین در بین ۳۲۴ گیاه فقط ۳ گیاه زنده ماندند و بقیه خشک شدند. علت اصلی مرگ و میر گیاهان در این روش، مرحله رشد گیاه به هنگام اعمال تیمار با کلشی‌سین و سمیت حاصل از کلشی‌سین برای سلول‌های مریستمی بود چرا که کلشی‌سین به عنوان یک ماده جهش‌زا و در عین حال سمی برای گیاه محسوب می‌شود که حتی در غلظت‌های بسیار پایین نیز می‌تواند سبب گیاه سوزی و مرگ گیاه گردد (Han *et al.*, 1999). با این حال القای تیمار کلشی‌سین در مرحله ظهور برگ‌های لپه‌ای به دلیل تولید گیاهان تتراپلوئید بیشتر نسبت به مرحله دو برگ حقیقی مناسب‌تر می باشد. در برخی از پژوهش‌ها نیز مرحله ظهور برگ‌های لپه‌ای توصیه شده است (Hanzelka and Kobza, 2001؛ Omidbaigi *et al.*, 2010a). با این حال طبق برخی از گزارشات، اعمال تیمار در مرحله ظهور برگ‌های لپه‌ای مؤثر نبوده است (Pundir *et al.*, 1983؛ Omidbaigi *et al.*, 2010؛ Saharkhiz, 2007).

اولین اثر قابل مشاهده از کلشی‌سین، تاخیر در رشد گیاهان تحت تیمار بود. با توجه به تغییرات فیزیولوژیکی که باعث کاهش سرعت تقسیم سلولی یا باقی‌ماندن اثرات کلشی‌سین که به جوانه‌های تازه روئیده صدمه می‌زند، بیشتر گیاهچه‌های تحت تیمار با کلشی‌سین در ماه اول پس از

تیمار رشد کندی داشتند. کاهش اولیه در نرخ رشد ناشی از پلی‌پلوئیدی در گیاهان دیگر نیز گزارش شده است (Majdi *et al.*, 2010). Chen and Gao (2007) با بررسی اثر کلشی‌سین در گیاه دارویی *Astragalus memberanaceus* گزارش نمودند که رشد آهسته ممکن است به دلیل تخریب فیزیولوژیکی ایجاد شده با این ماده باشد که در نتیجه باعث کاهش سرعت تقسیم سلولی می‌گردد. رشد مجدد از محل مریستم انتهایی سبب تغییر و تنوع در شکل ظاهری قسمت‌های مریستمی و اندام‌های در حال رشد گیاه گردید. این اثر در مطالعات انجام شده روی چند گیاه دارویی از جمله *Astragalus memberanaceus* و بنگدانه (*Hyoscyamus muticus*) ثابت شده است (Chen and Gao, 2007؛ Shahriari Ahmadi *et al.*, 2008).

مطالعات میکروسکوپی (شاخص‌های روزنه‌ای) گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین

نتایج حاصل از مقایسه میانگین با استفاده از آزمون آماری HSD نشان داد که در سطح احتمال ۱ درصد از نظر طول و عرض سلول نگهبان روزنه و تراکم روزنه‌ها در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند (جدول ۲).



شکل ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین برخشک شدن شاخه اصلی و گیاهان تغییر یافته بعد از تیمار در زرین‌گیاه
Figure 1. Effect of different concentrations of colchicine on dried main shoots and modified plants of *D. kotschyi*

جدول ۲- خصوصیات میکروسکوپی و بذری گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید زرین‌گیاه
Table 2. Microscopic and seed characteristics of diploid and tetraploid plants of *D. kotschyi.*

سطح پلوئیدی Ploidy level	طول محافظ روزنه (میکرومتر) Length (mµ)	عرض محافظ روزنه (میکرومتر) Width Guard stomata (mµ)	تراکم روزنه (میلی‌متر مربع) Stomata Density (mm^2)	طول بذر (میلی‌متر مربع) Length Seed (mm)	عرض بذر (میلی‌متر مربع) Width Seed (mm)
دیپلوئید (2x) Diploid	28.26±1.89[b]	19.76±1.85[b]	188.4±22.64[a]	3.24±0.27[a]	1.408±0.076[b]
تتراپلوئید (4x) Tetraploid	49.26±7.68[a]	31.76±5.12[a]	66.60±18.64[b]	4.16±0.33[a]	1.942±0.055[a]

میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه در ستون، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد در آزمون توکی می‌باشند.
Different letters within the column indicate a highly significant difference of mean (±SD) tested by Tukey's Studentized Range (HSD) at $p \leq 0.01$.

میانگین تراکم روزنه در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۱۸۸/۴۰ عدد در یک میلی‌متر مربع و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۶۶/۶۰ عدد در یک میلی‌متر مربع بود. نتایج آنالیز تجزیه واریانس بررسی طول و عرض بذور دیپلوئید و تتراپلوئید در زرین گیاه نشان داد که کلشی‌سین در سطح احتمال ۱ درصد سبب تغییر در عرض بذر گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید شده که این به منزله افزایش اندازه بذر می‌باشد اما تأثیر معنی‌داری بر طول بذرهای تتراپلوئید نداشته است (جدول ۲). مریستم انتهایی شاخه از دو منطقه مشخص و مجزا تشکیل شده است. ناحیه اول ناحیه خارجی یا محیطی است که باعث تولید سلول‌های جدید به منظور ایجاد پریموردیای اندام‌ها می‌شود و دیگری منطقه مرکزی مریستم است که شامل سلول‌های تقسیم‌شونده ساقه جهت تولید قسمت‌های انتهایی شاخه‌ها می‌باشد (Jones *et al.*, 2008). در زمان تیمار کلشی‌سین، سلول‌های واقع در منطقه مرکزی مریستم که دارای فعالیت میتوزی پایین می‌باشند، ممکن است کمتر تحت تأثیر کلشی‌سین قرار بگیرند، بنابراین احتمالاً القای پلی‌پلوئیدی در این سلول‌ها کاهش می‌یابد. سلول‌های منطقه محیطی مریستم از لحاظ فعالیت میتوزی فعال هستند از این رو بیشتر مستعد تیمار کلشی‌سین می‌باشند (Ghotbi Ravandi *et al.*, 2013). سلول‌های جدید در منطقه مرکزی به منطقه محیطی مریستم اضافه می‌شوند، احتمالاً تفاوت در زمان‌های مورد نیاز برای کامل شدن چرخه سلولی بین این دو فاز سلول‌هاست که بدین گونه می‌توانند تظاهر کنند که نسبت سلول‌های پلی‌پلوئیدی به دیپلوئید تغییر کرده است. در نتیجه با گذشت زمان سلول‌های 2x غالب و برگ‌های دیپلوئید تولید می‌شود. در تتراپلوئیدهای پایدار، این گونه می‌توان فرض کرد که بکار بردن تیمار کلشی‌سین در مریستم انتهایی سلول‌های منطقه مرکزی در زمانی که فعالیت میتوزی فعالی دارند، سلول‌های این منطقه محیطی بیشتر تحت تأثیرکلشی‌سین قرار می‌گیرند (Estaji, 2012). به‌طورکلی اندازه سلول‌های نگهبان روزنه از فاکتورهای بسیار مناسب در شناسایی گیاهان تتراپلوئید از دیپلوئید می‌باشد ولی فاکتور صددرصد مطمئن، مخصوصاً در شناسایی نمونه‌های شیمر (مخلوط دیپلوئید و تتراپلوئید) از تتراپلوئید خالص نمی‌باشد. افزایش اندازه سلولی یکی از سریع‌ترین و گسترده‌ترین پیامدهای پلی‌پلوئیدی می‌باشد (Lavania and Lavania, 2005). حجم سلول‌های تتراپلوئید معمولاً حدود دو برابر و سطح غشای آن‌ها حدود یک و نیم برابر سلول‌های دیپلوئید می‌باشد که این باعث بزرگتر شدن جثه گیاهان در پاسخ به پلی‌پلوئیدی می‌شود (Masterson, 1994). در مطالعه Yavari (2007) گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید بادرشبی مشخص شد که میانگین طول نگهبان روزنه در انواع دیپلوئید این گیاه برابر با ۲۱/۷۴ میکرومتر و در انواع تتراپلوئید آن برابر با ۳۱/۳ میکرومتر گزارش شد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

بررسی اثر تیمار کلشی‌سین بر وزن تر و خشک بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید

نتایج حاصل از مقایسه وزن‌تر و خشک ریشه و شاخساره و درصد ماده خشک آن‌ها بین ۱۰ بوته دیپلوئید و ۱۰ بوته تتراپلوئید (بدون در نظر گرفتن غلظت مورد استفاده) نشان داد که بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد مشاهده نگردید. میانگین وزن تر شاخساره در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۱۰/۸۳۸ گرم و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۱۰/۵۶۸ گرم بود (جدول ۳).

وزن تر و وزن خشک شاخساره و ریشه در گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید اختلاف معنی‌داری نشان نداد، که با سایرگزارش‌های چاپ شده مطابقت ندارد (Estaji, 2012؛ Lavania, 1988؛ Omidbaigi *et al.*, 2010b). در این مطالعه، تفاوت معنی‌دار بین گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید مشاهده نگردید اما با توجه به افزایش تولید فلاونوئیدها در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید، ارزش دارویی گیاهان تتراپلوئید بیشتر میباشد زیرا عملکرد نهایی نتیجه میزان فلاونوئید در ماده خشک زیست توده خواهد بود. بنابراین، عملکرد نهایی بالا در گیاهان تتراپلوئید قابل مشاهده می‌باشد. با وجود این درصد ماده خشک موجود

در ریشه گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید تفاوت چندانی نداشته است، احتمالاً با وجود افزایش میزان وزن تر و خشک، درصد ماده خشک موجود در قسمت ریشه بخاطر عدم تفاوت سطح پلوئیدی در این قسمت و مشابه بودن خصوصیات فیزیولوژیکی (اندازه سلول، میزان آب سلول و غیره) و سیتوژنتیکی تغییرات چندانی با همتای دیپلوئید نداشت.

آزمایشات فلوسایتومتری گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین

امروزه از قلوسایتومتری جهت تأیید تغییر سطح پلوئیدی گیاهان استفاده می‌شود. نتایج حاصل از آنالیز فلوسایتومتری ثابت نمود که اعمال تیمار در غلظت‌های مختلف کلشی‌سین با استفاده از تکنیک گلوله‌های پنبه‌ای در مرحله دو برگ لپه‌ای باعث تولید ۹ گیاه تتراپلوئید شده است. ولی در مرحله رشدی دو برگ حقیقی تولید گیاهان تتراپلوئید کاهش و میزان القای گیاهان میکسوپلوئید نسبت به مرحله ظهور برگهای لپه‌ای در زرین‌گیاه افزایش می‌یابد.

نتایج آنالیز فلوسایتومتری نمونه‌های تیمار شده و شاهد نشان داد که میزان ژنوم در گیاهان تتراپلوئید دو برابر نمونه‌های دیپلوئید می‌باشد. گیاهان شاهد نیز برای مقایسه با گیاهان غربال شده از مراحل قبل استفاده شدند و پیک به‌دست آمده از آن‌ها مبنای کار مقایسات حجم هسته قرار گرفت. در گیاهان دیپلوئید اوج پیک در کانال ۳۰ می‌باشد که مربوط به G1 گیاهان دیپلوئید است، در حالی که اوج پیک تتراپلوئیدها در حدود ۶۰ بود که حاکی از دو برابر شدن مقدار DNA نسبت به نمونه‌های دیپلوئید است.

بررسی مقایسه نوع و مقدار ترکیبات فلاونوئید در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید

نتایج تجزیه HPLC ترکیبات فلاونوئیدی نشان داد، در حالی که محتوی هیدروکسی فلاون‌ها (آپیژنین، کاسموسین و ایزوکامپفرید) در تتراپلوئید ها نسبت به دیپلوئیدها تغییر معنی‌داری نکرده بود، نتایج نشان داد که محتوی هیدروکسی فلاون‌های متوکسی (پندولیتین، زانتومیکرول و کالیکوپترین) در گیاهان تتراپلوئید به شدت افزایش یافته است (جدول ۴).

با افزایش سطح پلوئیدی درصد کالیکوپترین، زانتومیکرول، پندولیتئین، لوتئولین، لوتئولین ۳ گلوکورنوئید، رزمارینیک اسید و لوتئولین ۷ گلوکوپیرانوزید در محتوای فلاونوئید کل افزایش یافته بودند، در حالی که مقدار نسبی کاسموسین، آپیژنین، سیرسیماریتین و ایزوکامپفرید کاهش یافته بود. در گیاهان تتراپلوئید، زانتومیکرول و کالیکوپترین به‌ترتیب حدود ۲ و ۲۱ برابر در مقایسه با انواع دیپلوئید خود افزایش یافتند. افزایش در محتوی متوکسی فلاون‌ها در تتراپلوئیدها نشان می دهد که القای تتراپلوئیدی در زرین‌گیاه می‌تواند محتویات متابولیت‌های ثانویه ذکر شده را افزایش دهد. پلی‌پلوئیدی مصنوعی اغلب باعث افزایش غلظت متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Levin, 2002).

جدول ۳- مقایسه عملکرد گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید زرین‌گیاه

Table 3. Comparative performance of diploid and tetraploid plants of *D. kotschyi*

سطح پلوئیدی Ploidy level	وزن تر شاخساره (گرم) Shoot Fresh Weight (gr)	وزن خشک شاخساره (گرم) Shoot Dry Weight (gr)	درصد ماده خشک شاخساره Aerial dry matter	وزن تر ریشه (گرم) Root Fresh Weight (gr)	وزن خشک ریشه (گرم) Root Dry Weight (gr)	درصد ماده خشک ریشه Root dry matter
دیپلوئید (2x) Diploid	10.838±1.91[a]	5.0462±0.94[b]	47831±12.88[a]	1.1852±0.32[a]	0.6666±0.19[b]	58.785±19.40[a]
تتراپلوئید (4x) Tetraploid	10.568±1.85[a]	4.8132±1.02[a]	45.456±5.95[a]	1.9764±1.03[a]	1.0888±054[a]	58.220±13.05[a]

میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه در ستون، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد در آزمون توکی می‌باشند.

Different letters within the column indicate a highly significant difference of mean (±SD) tested by Tukey's Studentized Range (HSD) at p≤0.01.

جدول ٤-کمیت و کیفیت برخی از ترکیبات فلاونوئیدی زرین‌گیاه توسط تجزیه HPLC

Table 4. Quality and Quantity of Prevailing Flavonoid of *D. kotschyi* analyzed by HPLC

تتراپلوئید Tetraploid	دیپلوئید Diploid	ترکیبات قابل سنجش (µg/g DW) Measurable compounds µg/g DW	پیک Peak
93.82	64.92	Luteolin-7-O-β-D- glucopyranoside	1
26.63	32.72	Apigenin 7-O-glucoside (cosmosiin)	2
952.33	938.82	Rosmarinic acid	3
252.05	246.48	Luteolin 3'-O-.β.-D-glucuronide	4
24.97	20.96	Luteolin	5
35.86	43.15	Apigenin	6
36.48	45.87	Cirsimaritin	7
54.35	54.86	Isokaempferide	8
80.21	44.69	Penduletin	9
140.17	81.75	Xanthomicrol	10
193.20	9.06	Calycopterin	11

مکانیسم برای توضیح این تغییرات بر این فرض متکی است که دو برابر شدن کروموزوم‌ها باعث افزایش در اندازه سلول می‌شود، میزان ماده ژنتیکی در هسته نسبت به غشاء هسته‌ای کاهش می‌یابد، در نتیجه مواد ژنتیکی (کروماتین) در تماس با غشاء هسته‌ای قرار می‌گیرد، که این منجر به افزایش فعالیت ژن، افزایش سطوح هورمونی و سرعت فتوسنتز در هر سلول که همه این عوامل منجر به افزایش در اندازه سلول می‌گردد که این عوامل ممکن است با کروماتین بیشتر در تماس با غشای هسته‌ای و یا به دلیل نسبت پایین‌تر دوز ژن غشای هسته‌ای پس از پلی‌پلوئیدی موجب فعالیت بالای ژن شود (Levin, 2002؛ Lavania and Lavania, 2005). تغییر در پروفیل متابولیتی در اتوپلی پلوئیدها را می‌توان به خاطر برهم خوردن مکانیسم‌های متابولیک تنظیم‌کننده بیوسنتز ترکیبات منفرد توجیه نمود (Dehghan *et al*., 2012).

نتیجه‌گیری

در زرین‌گیاه بهترین روش تیمار با کلشی‌سین جهت ایجاد تنوع مورفولوژیکی و تولید گیاهان تتراپلوئید، تیمار مریستم انتهایی به روش گلوله پنبه‌ای و در مرحله ظهور برگ‌های لپه‌ای با غلظت ۰/۵ درصد محلول کلشی‌سین می‌باشد. ولی تیمار گیاهان در مرحله دو برگ حقیقی به عنوان روش تیماری مناسب شناخته نشد. به دلیل وجود تفاوت معنی‌دار بین گیاهان دیپلوئید و انواع تتراپلوئید زرین‌گیاه از نظر اندازه و تراکم روزنه ها و سلول‌های نگهبان روزنه، بررسی‌های روزنه ای به‌عنوان روش مناسبی جهت شناسایی گیاهان تتراپلوئید شناخته شد. نتایج نشان داد که محتوی هیدروکسی فلاون‌های متوکسی (پندولیتین، زانتومیکرول و کالیکوپترین) در گیاهان تتراپلوئید به شدت افزایش یافته است.

References

Abd El-Naby, Z., Mohamed, N. A., Radwan, K. H. and El-Khishin, D. A. (2012). Colchicine induction of polyploidy in Egyptian clover genotypes. Journal of American Science, 8, 221-227.

Abdoli, M., Moieni, A. and Badi, H. N. (2013). Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicine-induced tetraploid plants of *Echinacea purpurea* (L.) *Moench.* Acta Physiologiae Plantarum, 35(7), 2075-2083.

Adams, K. L., Percifield, R. and Wendel, J. F. (2004). Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. Genetics, 168(4), 2217-2226.

Chen, L. L. and Gao, S. L. (2007). *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. Scientia Horticulturae, 112(3), 339-344.

De Jesus-Gonzalez, L. and Weathers, P. (2003). Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. Plant Cell Reports, 21(8), 809-813.

Dehghan, E., Hakkinen, S. T., Oksman-Caldentey, K. M. and Ahmadi, F. S. (2012). Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and *in vitro* hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 110(1), 35-44.

Dhawan, O. and Lavania, U. (1996). Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: A review. Euphytica, 87(2), 81-89.

Estaji, A. (2012). Study on colchicine treatment effects on some morphological and physiological characteristics and active substancesin Nuruozak *(Salvia leriifolia Bent.)* M.Sc. Thesis, Urmia University, Urmia. [In Farsi]

Fattahi, M., Nazeri, V., Sefidkon, F, Zamani, Z. and Palazon, J. (2011) The effect of pre-sowing treatments and light on seed germination of *Dracocephalum kotschyi* Boiss: An endangered medicinal plant in Iran. Horticulture, Environment and Biotechnology, 52(6), 559-566

Ghotbi Ravandi, E., Rezanejad, F., Zolala, J. and Dehghan, E. (2013). The effects of chromosome-doubling on selected morphological and phytochemical characteristics of *Cichorium intybus* L. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 88(6), 701-709

Han, D. S., Niimi, Y. and Nakano, M. (1999). Production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived haploid calli in the Asiatic hybrid lily 'Connecticut King'. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 68(5), 979-983.

Hanzelka, P. and Kobza, F. (2001). Genome induced mutation in Callistephus chinensis Nees-I. Effect of colchicine application on the early plant development. Horticulture Science, 12, 15-20.

Jones, J. R., Ranney, T. G. and Eaker, T. A. (2008). A novel method for inducing polyploidy in *Rhododendron* seedlings. Journal American Rhododendron Society, 62, 130-135.

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, 107, 187-194.

Koul S., Sambyal M., Kitchlu S., Bakshi S. and Kaul M. (2010). Development, micropropagation and characterization of colchiploid of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Indian Journal Biotechnology, 9, 221-224.

Lavania, U. (1988). Enhanced productivity of the essential oil in the artificial autopolyploid of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash). Euphytica, 38(3), 271-276.

Lavania, U. and Lavania, U. (2005). Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. Plant Genetic Resources, 3(2), 170-177.

Levin, D. A. (2002). The role of chromosomal change in plant evolution. USA: Oxford University Press.

Lin, X., Zhou, Y., Zhang, J., Lu, X., Zhang, F., Shen, Q., Wu, S., Chen, Y., Wang, T. and Tang, K. (2011). Enhancement of artemisinin content in tetraploid *Artemisia annua* plants by modulating the expression of genes in artemisinin biosynthetic pathway. Biotechnology and Applied Biochemistry, 58(1), 50-57.

Madon, M., Clyde, M. M., Hashim, H., Mohdyusuf, 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.

Majdi, M., Karimzadeh, G., Malboobi, M. A., Omidbaigi, R. and Mirzaghaderi, G. (2010). Induction of tetraploidy to feverfew (*Tanacetum parthenium* Schulz-Bip.): ferer few Morphological, physiological, cytological and phytochemical changes. HortScience, 45(1), 16-21.

Masterson, J. (1994). Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. Science, 264(5157), 421-424.

Mensah, J., Obadoni, B., Akomeah, P., Ikhajiagbe, B. and Ajibolu, J. (2007). The effects of sodium azide and colchicine treatments on morphological and yield traits of sesame seed (*Sesame indicum* L.). African Journal of Biotechnology, 6(5), 534-538

Moghaddam, G., Ebrahimi, S. A., Rahbar-Roshandel, N. and Foroumadi, A. (2012). Antiproliferative Activity of Flavonoids: Influence of the Sequential Methoxylation State of the Flavonoid Structure. Phytotherapy Research, 26(7), 1023-1028.

Omidbaigi, R., Mirzaee, M., Hassani M. and Moghadam, M. (2010b). Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal Plant Production, 4(2), 87-98.

Omidbaigi, R., Yavari, S., Hassani, M. E. and Yavari, S. (2010a). Induction of autotetraploidy in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatment. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18(1), 23-35.

Pundir, R., Rao, N. and Van Der Maesen, L. (1983). Induced autotetraploidy in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Theoretical and Applied Genetics, 65(2), 119-122.

Saharkhiz, M. J. (2007). The effects of some environmental factors and ploidy level on morphological and physiological characteristics of feverfew *(Tanacetum parthenium* L.) medicinal ornamental plant. Tarbiat Modares University, Tehran. [in Farsi]

Shahriari Ahmadi, F., Farsi, M. and Azizi, M. (2008). Tetraploid Induction of *Hyosyamus muticus* L. using colchicine Treatment. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11(24), 2653-2659.

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(1), 19-25.

Yavari, S. (2007). The effects of some environmental factors and ploidy level on morphological and physiological characteristics of dragonhead *(Dracocephalum moldavica* L.*).* Ph.D. Thesis, Tarbiat Modares University, Tehran. [in Farsi]

Effect of Different Concentration of Colchicine on Some Morphological and Phytochemical Characteristics of *Dracocephalum Kotschyi* Boiss.

A.A. Zahedi[1], B. Hosseini[2]* and M. Fattahi[3]

1- M.Sc. Graduate of Medicinal Plants, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2- ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran (b.hosseini@urmia.ac.ir)
3- Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 28 May, 2016 Accepted: 5 July, 2017

Abstract

Background and Objectives

Dracocephalum kotschyi Boiss. (Labiateae) is an endemic perennial herbaceous plant known in Iran as Zarrin-Giah. Recent pharmacological studies have confirmed some of the methoxylated flavonoids in plant's parts having anti-cancer properties. Excessive harvesting of wild plants and limited distribution areas are the main reasons why *D. kotschyi* is now listed as an endangered plant. Polyploidy induction is an effective tool in medicinal plant breeding. Chromosome duplication and polyploidization may affect plant morphology and breeding systems, ultimately enabling the release of improved genotypes.

Materials and Methods

In this study, an efficient procedure was established for successful induction of tetraploid *D. kotschyi* by treating diploid explants with colchicine in horticulture laboratory of Urmia University during 2014-2015 years. Seedlings apical meristem treatment was carried out in two growth phases including, the two and four-leaf plants through presoaking manner. Colchicine at a concentration of 0, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 % (w/v) was applied in each of these stages. Cytological and morphological evidence confirmed the results of flow cytometry analysis.

Results

Cytological analyses showed the increase of chromosome numbers from 2n=2x=20 to 2n=4x=40. The results of this study demonstrated for the first time that chromosome counting in *D. kotschyi* of a total of 165 surviving seedlings, 7.27% was found to be tetraploids, 13.3% was chimers while the remainder were diploids. Tetraploid plants demonstrated significantly longer stomata and a higher stomatal index compared with diploid control plants. Negative correlation between stomata size, plants height, leaf number and lateral shoot number was obtained in treated plants. The total content of flavonoids increased from 1583.28 in diploids to 1890.07 (µg/g DW) in stable tetraploids.

Discussion

It seems that 0.5% of colchicine can be used as an effective treatment for polyploidy induction in *D. kotschyi*.

Keywords: Dracocephalum Flavonoid, Flow cytometry, HPLC, Kotschyi, Tetraploid, Xantomicrol