دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۲، صفحه ۳۵۹-۳۴۶ (۱۳۹۵)

القای درون‌شیشه‌ای تتراپلوئیدی در گیاه دارویی کتان سفید (*Linum album* Kotschy ex Boiss.) در تیمار اوریزالین

ندا جوادیان[۱]، قاسم کریم‌زاده[۲*]، مظفر شریفی[۳]، احمد معینی[۴] و ژاله تحصیلی[۵]

۱- دانشجو دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پست الکترونیک: karimzadeh_g@modares.ac.ir

۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۵- دانش‌آموخته دکتری، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۳ تاریخ اصلاح نهایی: فروردین ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۴

چکیده

کتان سفید (*Linum album* Kotschy ex Boiss.) گیاهی چندساله و دیپلوئید (۲*n*=۲*x*=۲۶) و یکی از گونه‌های بومی ایران و از خانواده کتان (Linaceae) است که دارای ماده مؤثره پودوفیلوتوکسین می‌باشد. این ماده یک محصول طبیعی مهم دارویی است که به گروه شیمیایی لیگنان‌ها تعلق دارد. به‌عنوان یک پیش‌ماده برای سنتز داروهای ضدسرطانی استفاده می‌شود. تولید صنعتی این ترکیب به‌دلیل ساختار شیمیایی پیچیده، از لحاظ اقتصادی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، از روش‌های مختلفی برای افزایش تولید پودوفیلوتوکسین در گیاه استفاده می‌شود. در این تحقیق، القای تتراپلوئیدی با استفاده از غلظت‌های متفاوت اوریزالین ۰، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ µM به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت روی جوانه جانبی این گیاه انجام شد. نتایج نشان داد درصد زنده‌مانی و تعداد تولید نوساقه در هر جوانه جانبی در این گیاه با افزایش غلظت‌ها و زمان‌های اوریزالین کاهش یافت. گیاهان تتراپلوئید به‌وسیله آنالیز فلوسایتومتری شناسایی شدند، همچنین مقدار 2C DNA برای گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید به‌ترتیب ۴/۳۴ و ۸/۳۶pg برآورد شد. بیشترین درصد بازدهی القای تتراپلوئیدی (۱۹٪) تحت تیمار اوریزالین در غلظت ۲۵µM در ۴۸ ساعت بدست آمد. القای تتراپلوئیدی باعث افزایش مقدار پودوفیلوتوکسین در برگ و ساقه تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید خود به‌ترتیب ۱/۶۶ و ۱/۴۸ برابر شد. نتایج این تحقیق نشان داد که القای تتراپلوئیدی می‌تواند روش مؤثری برای افزایش این ماده ارزشمند در گیاه کتان سفید باشد.

واژه‌های کلیدی: کتان سفید (*Linum album* Kotschy ex Boiss.)، تتراپلوئیدی، اوریزالین، پودوفیلوتوکسین، 2C DNA، فلوسایتومتری.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

کتان سفید (*Linum album*) گیاهی علفی چندساله با خاصیت دارویی از خانواده کتان (Linaceae) و گونه بومی ایران است. این گونه دارای مقادیر قابل توجهی پودوفیلوتوکسین (Podophyllotoxin) می‌باشد. این ماده محصول طبیعی مهم دارویی است که به گروه شیمیایی لیگنان‌ها تعلق دارد که گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهان را تشکیل می‌دهند. گیاهان حاوی لیگنان در طب سنتی مردم چین، ژاپن و دنیای شرق برای هزاران سال مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این ترکیب‌ها فعالیت‌های زیستی بسیار متنوعی مانند خاصیت ضدسرطانی از خود نشان می‌دهند (Mohagheghzadeha *et al*., 2006). لیگنان‌ها از دیمریزه شدن فنیل‌آلانین جایگزین شده در الکل‌های سینامیک (سینامیک اسید) به نام مونولیگنول‌ها به دی‌بنزیل بوتان حاصل می‌شوند. پودوفیلوتوکسین به‌عنوان یک پیش‌ماده برای سنتز داروهای ضدتومور سرطانی مهم مانند Etoposide، Teniposide و Etopophos استفاده می‌شود. انسان از گذشته‌های دور از گیاهان در طب سنتی و درمان بیماری‌های خود استفاده کرده‌است و در حال حاضر یک چهارم از تمام داروهای تجویز شده در کشورهای صنعتی حاوی ترکیب‌های مشتق شده از گیاهان به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم می‌باشند (Yousefzadi *et al*., 2010b). مسیر بیوسنتزی پودوفیلوتوکسین و لیگنان‌های مشابه هنوز به‌طور کامل مشخص نشده‌است اما مطالعات دقیقی به علت اهمیت بالینی آنها انجام شده‌است. تولید صنعتی این ترکیب به‌دلیل ساختار شیمیایی پیچیده، از لحاظ اقتصادی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، از روش‌های مختلفی برای افزایش تولید پودوفیلوتوکسین در گیاه استفاده می‌شود (Yousefzadi *et al*., 2010b).

پلی‌پلوئیدی براساس منشأ خود به دو دسته آلوپلوئیدی و اتوپلوئیدی تقسیم می‌شوند. آلوپلی‌پلوئیدها از هیبریداسیون بین گونه‌ای و بعد دو برابر شدن ژنوم‌های غیرهومولوگ (AABB) به‌وجود می‌آیند. اتوپلی‌پلوئیدها از دو برابر شدن ژنوم‌های هومولوگ یک گونه و از لحاظ ساختاری مشابه (AAAA) به‌وجود می‌آیند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که ژنوم‌های پلی‌پلوئید می‌توانند بسیار پویا باشند و تغییرات ساختاری و عملکردی سریع را تحمل کنند (Parisod *et al*., 2010). ارقام پلی‌پلوئید دارای سطح تحمل به خشکی، مقاومت به آفات، دوره گلدهی، حجم و اندام زیست‌توده (Biomass) بیشتری می‌باشند (Osborn *et al*., 2003). در گیاهان دارویی، پلی‌پلوئیدی معمولاً باارزش می‌باشد، زیرا افزایش زیست‌توده و غلظت ترکیب‌های مؤثر را ایجاد می‌کند. از آنجایی که پلی‌پلوئیدی در تمام جنس‌های گیاهی وجود ندارد و به‌دلیل اثرات مفید آن، پلی‌پلوئیدی به‌صورت مصنوعی در محصولات مهم اقتصادی در دهه اخیر القاء شده‌است (Dhooghe *et al*., 2011). دو برابر شدن کروموزوم‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند به‌وسیله مداخله در چرخه سلولی ایجاد شود. چرخه سلولی به‌وسیله مواد شیمیایی مختلف تخریب می‌شود (Caperta *et al*., 2006). کلشی‌سین (Colchicine) برای افزایش سطح پلوئیدی استفاده می‌شود اما این ماده تمایل بیشتری برای اتصال به میکروتوبول‌های حیوانی دارد و به‌طور ضعیف به توبولین‌های گیاهی متصل می‌شود (Planchais *et al*., 2000). در بعضی از گونه‌های گیاهی کلشی‌سین اثرات جانبی مضری مانند عقیمی و رشد غیرنرمال به‌دلیل بازآرایی کروموزومی دارد. همچنین به علت تمایل بالای کلشی‌سین به میکروتیوبول‌های سلول حیوانی، برای انسان بسیار سمّی می‌باشد. مطالعات نشان داد که تقریباً ۲۵٪ علف‌کش‌ها بر میتوز تأثیر می‌گذارند. علف‌کش‌ها تمایل بیشتری برای اتصال به دایمرهای تیوبولین گیاهی نسبت به کلشی‌سین دارند. بنابراین، در غلظت پایین استفاده می‌شوند و برای انسان خطرناک نمی‌باشند. از بین علف‌کش‌های ضدمیکروتیوبولین متعلق به کلاس‌های شیمیایی مختلف، Dinitroanilines (Oryzalin و Trifluralin) به‌طور خاص جایگزین بسیار مناسبی برای کلشی‌سین در نظر گرفته شده است (Dhooghe *et al*., 2011). تحقیقات اولیه در مورد تأثیر القای پلی‌پلوئیدی بر نوسان تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی، در گیاه

Archive of SID

www.SID.ir

Datura stramonium گزارش شد که نشان داد تحت تأثیر القای تتراپلوئیدی به‌وسیله کلشی‌سین مقدار آلکالوئید در ساقه‌ها، برگ‌ها و ریشه‌ها نسبت به دیپلوئید به بیش از دو برابر افزایش یافت که نتایج این تحقیق در مجله Nature آن زمان منتشر شد (Rowson, 1944). Levy (۱۹۷۶) در تحقیق خود، تعداد ۱۵ رقم اوتوتتراپلوئید مصنوعی *Phlox drummondi* تولید کرد و در نیمرخ‌های پروفایل‌های گلیکوفلاون ۱۴ گیاه اوتوتتراپلوئید تفاوت‌ها را شناسایی کرد که نشان داد ۱۴ فلاونوئید جدید در اوتوتتراپلوئیدها تولید شدند که در اجداد دیپلوئید آنها وجود نداشت، همچنین هشت فلاونوئید منحصراً در گیاهان دیپلوئید تولید شدند. محقق دیگری با القای اوتوتتراپلوئیدی در گیاه *Vetiver* افزایشی در بهبود کیفی ارزش اسانس ایجاد کرد (Lavania, 1988). همچنین القای پلی‌پلوئیدی مصنوعی می‌تواند در افزایش تولیدات ترکیب‌های دارویی مهم در برخی گیاهان مانند *Datura tubula*، *Papaver somniferum*، *Artemisia annua*، *Tanacetum parthenium*، *Hyoscyamus muticus* و *Echinacea purpurea* سودمند باشد (Lavania, 2005؛ Majdi *et al*., 2010؛ Kaensaksiri *et al*., 2011؛ Dehghan *et al*., 2012؛ Abdoli *et al*., 2013). در این تحقیق، القای تتراپلوئیدی با استفاده از ماده اوریزالین (Oryzalin) در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف بر جوانه جانبی ساقه گیاه کتان سفید به‌منظور بررسی مقدار ماده باارزش دارویی پودوفیلوتوکسین در ساقه و برگ این گیاه انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و پرآوری مواد گیاهی

گیاه کتان سفید (*Linum album* Kotschy ex Boiss.) از منطقه طالقان در استان البرز (N ۲۹ ' ۷ ° ۳۶، E ۴۳" ۳۵ ' ۵۰ °) در ارتفاع ۱۸۷۰ متر بالاتر از سطح دریا جمع‌آوری شد. اندام هوایی از بوته به‌طور جداگانه به مدت ۵ دقیقه به منظور شستشوی سطحی در معرض آب جاری قرار گرفت. برگ‌ها از ساقه‌ها جدا شدند و ساقه‌ها به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت‌سدیم ۲٪ (v/v) قرار گرفتند، سه بار با آب‌مقطر استریل آبکشی شدند و بعد ۱ دقیقه در الکل ۷۰٪ (v/v) قرار گرفتند و با آب مقطر استریل آبکشی شدند. ساقه‌های استریل هر بوته به‌طور جداگانه به قطعات حاوی دو جوانه جانبی تقسیم شدند و بعد برای پرآوری در محیط کشت MS جامد حاوی $0/4 mg\ l^{-1}$ کینتین کشت داده شدند و در دمای ۲۵°C و دوره ۱۶/ ۸ ساعت (روز/شب) قرار گرفتند. به‌منظور تولید همگروه (Clone)، شاخساره‌های جدید هر بوته جداگانه بعد از ۸ هفته به قطعاتی حاوی چند جوانه جانبی تقسیم شدند و به محیط کشت MS جامد حاوی $0/4\ mg\ l^{-1}$ کینتین جدید انتقال یافتند. زیرکشت شاخساره‌ها هر هشت هفته یک‌بار انجام شد و به این صورت تعداد کافی از شاخساره‌ها در شرایط درون شیشه تولید شدند.

القای تیمار تتراپلوئیدی بر جوانه جانبی ساقه

نوساقه‌ها بعد از هشت هفته قرارگیری در محیط کشت MS جامد حاوی $0/4 mg\ l^{-1}$ کینتین به قطعاتی حاوی یک یا دو جوانه جانبی (با طولی در حدود ۰/۷-۰/۴cm) تقسیم شدند و در ارلن حاوی محیط کشت مایع MS حاوی $0/4 mg\ l^{-1}$ کینتین با غلظت‌های متفاوت اوریزالین ۰ µM، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ به مدت ۱، ۲، ۳، ۴ روز بر روی شیکر در دمای ۲۵°C در تاریکی قرار داده شدند. همچنین ریزنمونه‌ها در محیط کشت مایع ذکرشده بدون افزودن اوریزالین به‌عنوان تیمار شاهد در مدت زمان‌های مورد نظر قرار داده شدند (به‌دلیل اینکه اوریزالین محلول در DMSO (Dimethyl sulfoxide) می‌باشند، در تیمار شاهد به ریزنمونه‌ها DMSO به اندازه مقدار موجود در محیط‌های تحت القای تتراپلوئیدی اضافه شد). بعد از زمان‌های ذکرشده قطعات حاوی جوانه جانبی سه بار با آب استریل شسته شده و بعد بر کاغذ صافی استریل به‌منظور آب‌گیری منتقل شدند. بعد از آب‌گیری در محیط کشت MS جامد حاوی $0/4 mg\ l^{-1}$ کینتین در دمای ۲۵°C و دوره ۱۶h/ ۸ (روز/ شب) قرار گرفتند. در هر ارلن حدود ده قطعه جوانه جانبی قرار داده

Archive of SID

www.SID.ir

شد و بعد این قطعات بعد از تیماردهی به یک شیشه مربا حاوی محیط کشت MS جامد حاوی ۰/۴mg l^{-1} کینتین جامد منتقل شدند. هر شیشه مربا حاوی ده قطعه جوانه جانبی به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. درصد کارایی القای تتراپلوئیدی طبق فرمول زیر محاسبه شد (Majdi *et al.*, 2010).

القای تتراپلوئیدی (٪) × زنده‌مانی پس از تیمار القای تتراپلوئیدی (٪) =بازدهی القای تتراپلوئیدی (٪)

آنالیز فلوسایتومتری

برگ‌های نوساقه‌های تحت تیمار تتراپلوئیدی کتان سفید برای تشخیص سطح پلوئیدی به‌وسیله فلوسایتومتری آنالیز شدند. گیاه سویا (*Glycine max* cv. Merr. Polanka) با مقدار DNA ژنومی مشخص ۲C=۲/۵pg (Doležel *et al.*, 2007) به‌عنوان گیاه مرجع استاندارد استفاده شد. نمونه‌ای از برگ کتان سفید تقریباً در حدود (۱cm^2) و سویا (۱cm^2) در یک پتری‌دیش قرار داده شدند و ۱ml بافر استخراج هسته سلولی WPB (Woody Plant Buffer) (Loureiro *et al.*, 2007) اضافه شد و به‌وسیله یک تیغ تیز نمونه‌ها خرد (Chop) شدند و سوسپانسیون هسته‌های آزاد شده به‌ترتیب از فیلتر نایلونی سبز (Partec) ۳۰µm عبور داده و درون یخ قرار داده شدند. به سوسپانسیون هسته ابتدا ۵۰µl از RNase با غلظت ۱mg ml^{-1} برای حذف RNA و بعد ۵۰µl از PI (Propidium Iodide) با غلظت ۱mg ml^{-1} برای رنگ‌آمیزی اضافه شد (PI، ماده خطرناک و حساس به نور می‌باشد). نمونه آماده شده به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری (BD FACS Canto™, USA) آنالیز و نتایج بدست‌آمده با نرم‌افزار FloMax تجزیه و تحلیل شدند. پیک‌ها دارای CV کمتر از ۵٪ بودند. مقدار ۲DNA C هسته کتان با توجه به فرمول زیر محاسبه شد:

مقدار ۲DNA C هسته نمونه (pg) = میانگین پیک G_1 نمونه / میانگین پیک G_1 استاندارد × مقدار ۲DNA C هسته استاندارد (Doležel & Bartoš, 2005؛ Doležel *et al.*, 2007)

بررسی برخی تغییرات مورفولوژی در گیاه دیپلوئید و تتراپلوئید

پس از ظهور و رشد نوساقه‌های جدید خصوصیات مورفولوژی متفاوتی میان گیاه دیپلوئید و تحت تیمار تتراپلوئیدی مشاهده شد. خصوصیاتی مانند طول و عرض برگ و قطر ساقه اندازه‌گیری شدند. بررسی این خصوصیات فقط برای گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید که به‌وسیله فلوسایتومتری تأیید شده بودند، گزارش شد.

استخراج پودوفیلوتوکسین و سنجش آن به‌وسیله HPLC

استخراج و سنجش ماده پودوفیلوتوکسین از برگ و ساقه گیاه دیپلوئید و تتراپلوئید تأییدشده به‌وسیله فلوسایتومتری کتان سفید براساس استاندارد موجود و به‌وسیله دستگاه (Knauer, UV Detector 2500, HPLC (Germany شناسایی شدند. بخش متحرک دستگاه شامل استونیتریل و آب بود که از سیستم گرادیان استفاده شد و ستون مورد استفاده از نوع C_{18}-ODS3 دارای طول ۲۵۰mm و قطر ۴/۶mm بود. جذب این ترکیب‌ها با استفاده از دتکتور UV در طول موج ۲۹۰nm بررسی شد (Yousefzadi *et al.*, 2010a). حضور پودوفیلوتوکسین با کروماتوگرافی مایع و طیف‌سنجی جرمی (LC/MS) تأیید شد (Esmaeilzadeh, 2011 ؛Yousefzadi, 2010).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها، در بخش القای تتراپلوئیدی براساس آزمایش فاکتوریل دو عاملی بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ابتدا نرمال بودن خطای آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار Minitab16 انجام شد و خطای آزمایشی

Archive of SID

www.SID.ir

تمامی صفات مورد مطالعه در این بخش نرمال بوده و تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار Minitab16 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) با نرم‌افزار SAS محاسبه شدند. آنالیز خصوصیات مورفولوژی و مقدار پودوفیلوتوکسین در برگ و ساقه تتراپلوئید و دیپلوئید با استفاده از روش t استیودنت انجام شد. ابتدا یکنواختی واریانس‌ها آزمایشی و نرمال بوده و داده‌های آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار Minitab16 و SPSS 19 انجام شد و بعد آنالیز t استیودنت با نرم‌افزار SPSS 19 انجام گردید.

نتایج

اثر اوریزالین در القای تتراپلوئیدی

به‌منظور القای تتراپلوئیدی بر جوانه جانبی نوساقه کتان سفید، شاخساره‌های همگروه با مواد ژنتیکی یکسان مورد نیاز بود. به‌دلیل دگرگشن بودن کتان سفید (Sharifnia & Assadi, 2001)، یک کلون از این گیاه تهیه شد. القای تیمار تتراپلوئیدی بر روی جوانه‌های جانبی ساقه کتان سفید با استفاده از غلظت‌ها و زمان‌های مختلف اوریزالین در شرایط درون شیشه انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که بین غلظت‌ها و مدت زمان‌های مختلف القای تتراپلوئیدی تحت تیمار اوریزالین در بین تمامی صفات بررسی شده (درصد زنده‌مانی جوانه جانبی، درصد القای تتراپلوئیدی، درصد بازدهی القای تتراپلوئیدی و تولید تعداد نوساقه از هر جوانه جانبی) اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت. در اثر متقابل غلظت اوریزالین در مدت زمان از نظر صفت زنده‌مانی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، اما بین صفات درصد القای تتراپلوئیدی، درصد بازدهی القای تتراپلوئیدی و تولید تعداد نوساقه اختلاف معنی‌داری به‌ترتیب در سطوح احتمال ۱٪، ۰/۱٪ و ۰/۱٪ مشاهده شد.

جدول ۱- میانگین مربعات تجزیه واریانس برای صفات مختلف تحت تیمار اوریزالین برای القای تتراپلوئیدی در کتان سفید

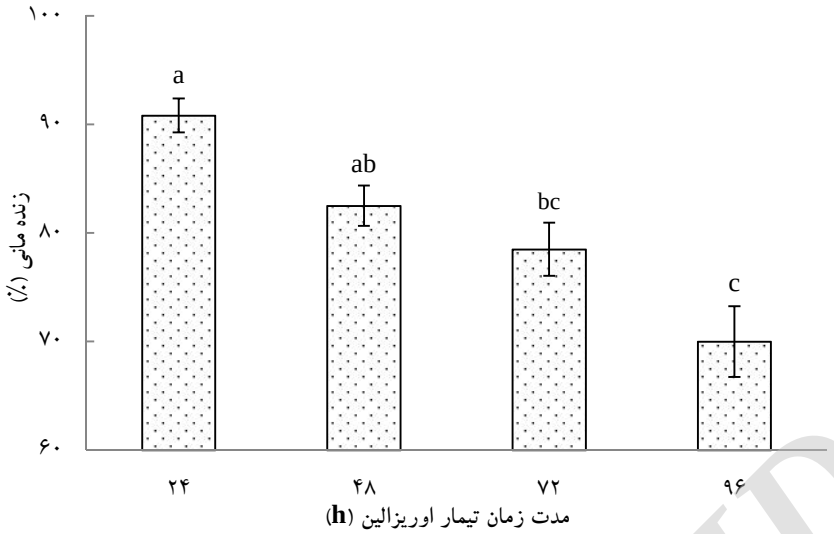
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		زنده‌مانی (٪)	تتراپلوئیدی (٪)	بازدهی القاء (٪)	نوساقه‌زایی (No.)
غلظت اوریزالین	۲	۲۸۹۱/۶۷ ***	۳۲۵/۰۰ ***	۲۰۱/۸۳ ***	۹/۸۲ ***
زمان	۳	۹۰۲/۷۸ ***	۱۱۹/۴۴ ***	۷۲/۰۵ ***	۱/۶۲ ***
غلظت × زمان	۶	۱۰۴/۶۳ ns	۱۰۲/۷۸ **	۶۳/۴۴ ***	۰/۱۳۱ ***

ns، ** و ***: به‌ترتیب وجود اختلاف غیرمعنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال ۱٪ و ۰/۱٪

بیشترین درصد زنده‌مانی (۹۸/۳٪) در تیمار شاهد (µM صفر اوریزالین) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری بین مدت زمان‌های مختلف در این تیمار وجود نداشت. مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اوریزالین نشان داد با افزایش غلظت اوریزالین درصد زنده‌مانی کاهش یافت، به‌طوری که کمترین درصد زنده‌مانی (۶۱/۶۷٪) در تیمار ۵۰ µM اوریزالین مشاهده شد (شکل ۱). همچنین مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی در زمان‌های مختلف تیمار اوریزالین نشان داد با افزایش مدت زمان تیمار، درصد زنده‌مانی کاهش یافت و مقدار این صفت در ۲۴ ساعت پس از القای تتراپلوئیدی ۹۳/۹٪ بود و به مقدار ۷۰٪ در مدت زمان ۹۶ ساعت تیمار القای تتراپلوئیدی کاهش یافت (شکل ۲).

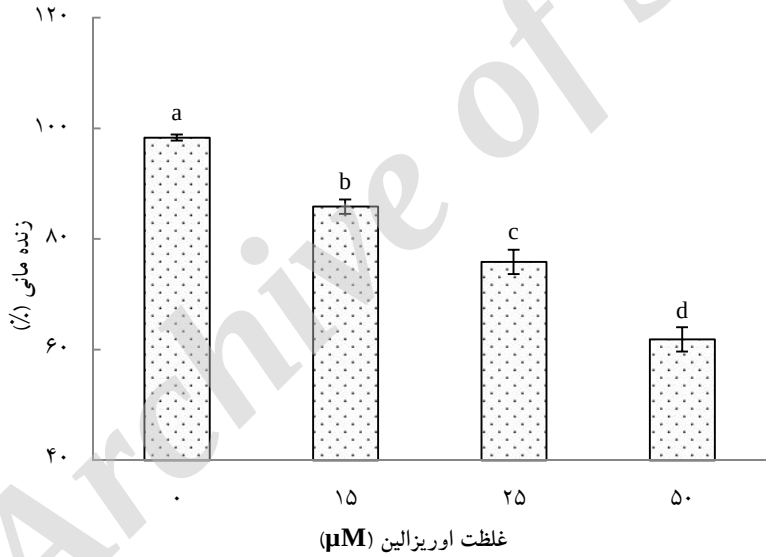
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- درصد زنده‌مانی جوانه جانبی در مدت زمان مختلف تیمار اوریزالین در کتان سفید

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۹٪ با آزمون LSD با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.
هر ستون نشان‌دهنده میانگین ± خطای استاندارد می‌باشد.



شکل ۲- درصد زنده‌مانی جوانه جانبی در غلظت‌های مختلف تیمار اوریزالین در کتان سفید

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۹٪ با آزمون LSD با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.
هر ستون نشان‌دهنده میانگین ± خطای استاندارد می‌باشد.

مقایسه میانگین‌های اثر متقابل غلظت اوریزالین در زمان در صفت القای تتراپلوئیدی نشان داد که در غلظت ۱۵µM با افزایش مدت زمان تیماردهی مقدار درصد القای تتراپلوئیدی افزایش یافت، در حالی که فقط بین ۲۴ ساعت با ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تیماردهی اختلاف معنی‌داری وجود داشت و بین سایر زمان‌ها در این غلظت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در غلظت‌های ۲۵µM و ۵۰ تا ۴۸ ساعت پس از تیماردهی درصد القای تتراپلوئیدی افزایش یافت و بعد در روزهای بعدی مقدار این صفت کاهش یافت، به‌طوری که در ۷۲ و ۹۶ ساعت در غلظت ۵۰µM گیاه

Archive of SID

www.SID.ir

تتراپلوئید مشاهده نشد. بیشترین درصد القای تتراپلوئیدی (۲۳/۳۴) در غلظت ۲۵µM در ۴۸ ساعت با ۲۳/۳۴٪ مشاهده شد که با سایر ترکیبات تیماری اختلاف معنی‌داری داشت.

بررسی تغییرات بازدهی القای تتراپلوئیدی نشان داد که روند تغییرات این صفت در غلظت‌ها و مدت زمان‌های مختلف همانند صفت القای تتراپلوئیدی بود. بیشترین درصد بازدهی القای تتراپلوئیدی (۱۹٪) در غلظت ۲۵µM در ۴۸ ساعت مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر ترکیب‌های تیمار داشت. بیشترین مقدار تولید نوساقه در جوانه جانبی در تیمار شاهد مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری بین زمان‌های مختلف این تیمار وجود نداشت. تولید نوساقه با افزایش غلظت و زمان تیماردهی روند کاهشی نشان داد. بیشترین کاهش در تولید نوساقه در غلظت ۲۵µM و ۵۰ به‌ترتیب از ۴۸ به ۷۲ ساعت و از ۲۴ به ۴۸ ساعت مشاهده شد که با سایر زمان‌ها در هر غلظت اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین تولید نوساقه در غلظت ۵۰µM در ۹۶ ساعت مشاهده شد اما با ۴۸ و ۷۲ ساعت این غلظت و ۷۲ و ۹۶ ساعت غلظت ۲۵µM اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات مختلف تحت تیمار اوریزالین برای القاء تتراپلوئیدی در کتان سفید

غلظت اوریزالین (µM)	مدت تیمار (h)	زنده‌مانی (٪)	القاء تتراپلوئیدی (٪)	بازدهی القاء (٪)	نوساقه‌زایی (No.)
شاهد	۲۴	۱۰۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰ d±۰/۰۰	۰/۰۰ c±۰/۰۰	۴/۲۰ a±۰/۱۵
	۴۸	۹۶/۶۷±۳/۳۳	۰/۰۰ d±۰/۰۰	۰/۰۰ c±۰/۰۰	۳/۸۹ a±۰/۰۶
	۷۲	۱۰۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰ d±۰/۰۰	۰/۰۰ c±۰/۰۰	۳/۹۰ a±۰/۱۱
	۹۶	۹۶/۶۷±۳/۳۳	۰/۰۰ d±۰/۰۰	۰/۰۰ c±۰/۰۰	۳/۹۶ a±۰/۰۶
۱۵	۲۴	۹۶/۶۷±۳/۳۳	۰/۰۰ d±۰/۰۰	۰/۰۰ c±۰/۰۰	۳/۳۷ b±۰/۰۷
	۴۸	۸۶/۶۷±۳/۳۳	۶/۶۷ bcd±۳/۳۳	۵/۶۷ bc±۲/۸۲	۳/۰۵ bc±۰/۱۲
	۷۲	۸۳/۳۳±۳/۳۳	۱۰/۰۰ bc±۰/۰۰	۸/۳۳ bc±۰/۳۳	۲/۷۵ cde±۰/۰۴
	۹۶	۷۶/۶۷±۳/۳۳	۱۳/۳۴ b±۳/۳۳	۱۰/۰۰ b±۲	۲/۳۹ ef±۰/۰۹
۲۵	۲۴	۹۰/۰۰±۵/۷۰	۱۰/۰۰ bc±۰/۰۰	۹/۰۰ b±۰/۵۷	۲/۹۴ bcd ±۰/۰۸
	۴۸	۸۰/۰۰±۵/۷۰	۲۳/۳۴ a±۳/۳۳	۱۹/۰۰ a±۴/۰۴	۲/۴۹ de±۰/۱۳
	۷۲	۷۰/۰۰±۵/۷۰	۱۳/۳۳ b±۳/۳۳	۹/۰۰ b±۱/۵۳	۱/۹۵ fg±۰/۰۵
	۹۶	۶۳/۳۳±۸/۸۲	۳/۳۴ cd±۳/۳۳	۲/۰۰ bc±۲/۰۰	۱/۶۹ g±۰/۰۶
۵۰	۲۴	۷۶/۶۷±۳/۳۳	۶/۶۷ bcd±۳/۳۳	۵/۳۳ bc±۲/۶۷	۲/۴۹ de±۰/۰۴
	۴۸	۶۶/۶۷±۳/۳۳	۱۳/۳۳ b±۳/۳۳	۹/۰۰ b±۲/۵۲	۱/۷۶ g±۰/۰۸
	۷۲	۶۰/۶۷±۵/۷۷	۰/۰۰ d±۰/۰۰	۰/۰۰ c±۰/۰۰	۱/۷۱ g±۰/۰۶
	۹۶	۴۳/۳۳±۸/۸۲	۰/۰۰ d±۰/۰۰	۰/۰۰ c±۰/۰۰	۱/۵۸ g±۰/۰۸
LSD			LSD1%=۸/۵۳	LSD0.1%=۸/۹۳	LSD0.1% =۰/۴۶

میانگین‌هایی که با حرف لاتین یکسان نشان داده شده‌اند، در سطوح احتمال ذکرشده برای هر صفت تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

داده‌های هر ستون نشان‌دهنده میانگین ± خطای استاندارد می‌باشد.

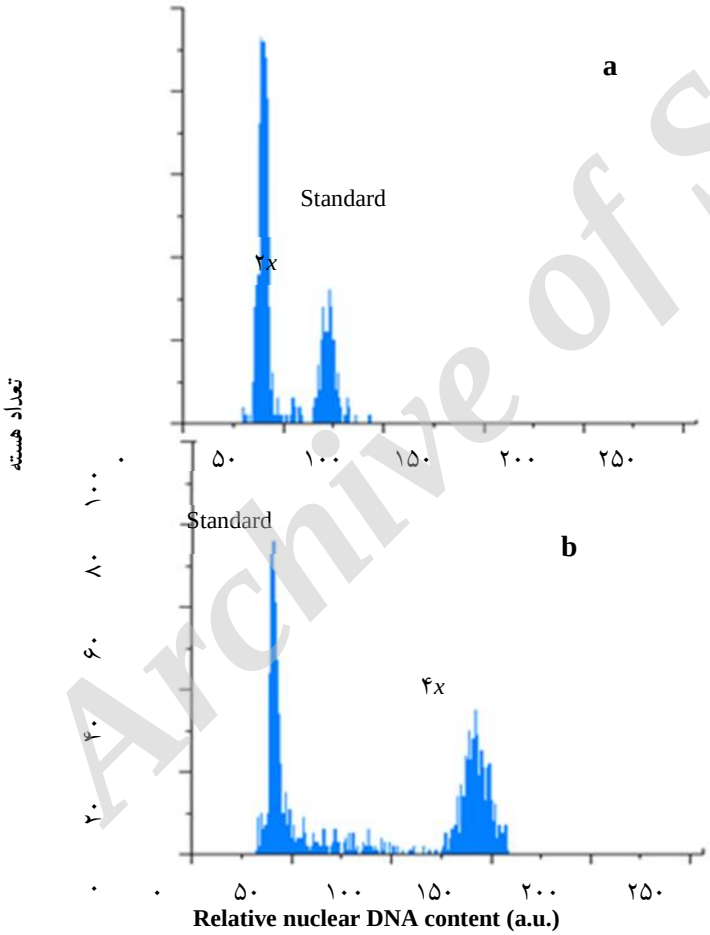
Archive of SID

www.SID.ir

آنالیز فلوسایتومتری

برگ‌های نوساقه‌های رشد کرده پس از تیمار تتراپلوئیدی به‌منظور تأیید تولید گیاه تتراپلوئید به وسیله آنالیز فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۳a). هیستوگرام‌های مربوط به این آنالیز نشان داد که نسبت موقعیت پیک G_1 گیاه تتراپلوئید نسبت به پیک G_1 نمونه استاندارد (*Glycine max* cv. Merr. Polanka دارای مقدار ۲C DNA=۲/۵ pg) تقریباً دو برابر نسبت موقعیت پیک G_1 دیپلوئید به پیک G_1 گیاه نمونه استاندارد می باشد که نشان‌دهنده دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌ها در نتیجه القای تیمار تتراپلوئیدی است (Mahdavi & Karimzadeh, 2010؛ Shariat *et al.*, 2013).

مقدار DNA ۲C برای کتان سفید دیپلوئید و تتراپلوئید به‌ترتیب برابر با ۴/۳۴±۰/۰۸pg و ۸/۳۶±۰/۱۲pg با میانگین ضریب تغییرات ۵/۷٪ محاسبه شد.



شکل ۳- هیستوگرام‌های فلوسایتومتری در برگ کتان سفید

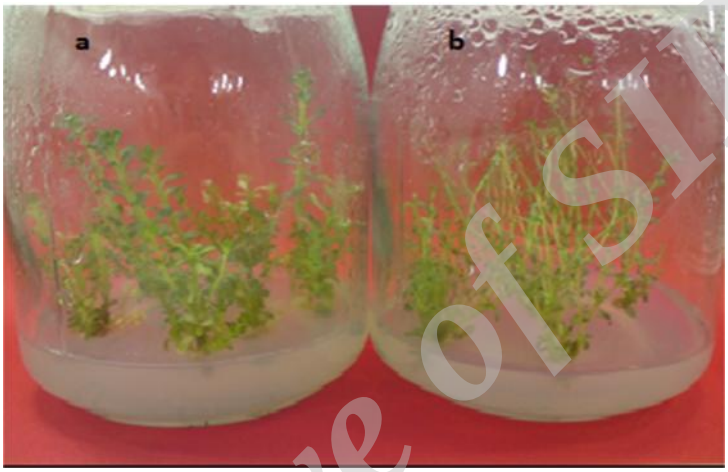
پیک استاندارد: پیک G_1 گیاه (*Glycine max* cv. Merr. Polanka)

a: پیک G_1 گیاه دیپلوئید کتان سفید b: پیک G_1 گیاه تتراپلوئید کتان سفید

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی برخی تغییرات مورفولوژی در گیاه دیپلوئید و تتراپلوئید

تولید نوساقه جدید از جوانه جانبی تحت تیمار تتراپلوئیدی نسبت به گیاه دیپلوئید در حدود ۷ روز تأخیر نشان داد. پس از ظهور و رشد نوساقه‌های جدید خصوصیات مورفولوژی متفاوتی میان گیاه دیپلوئید و تحت تیمار تتراپلوئیدی وجود داشت. خصوصیاتی مانند طول و عرض برگ و قطر ساقه اندازه‌گیری شدند. آنالیز این خصوصیات فقط برای گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید که به‌وسیله فلوسایتومتری تأیید شده بودند، گزارش شد. نتایج آنالیز نشان داد که در گیاه تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید ضخامت ساقه، طول و عرض برگ افزایش معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۱٪ مشاهده شد (شکل ۴). در گیاه تتراپلوئید افزایش طول و عرض برگ (۸۸/۵٪ و ۸۷/۸٪) و قطر ساقه (۹۰/۸٪) نسبت به گیاه دیپلوئید مشاهده شد (جدول ۳).



شکل ۴- گیاه کتان سفید. a: تتراپلوئید و b: دیپلوئید

جدول ۳- مقایسه خصوصیات مورفولوژی بین گیاه دیپلوئید و تتراپلوئید کتان سفید

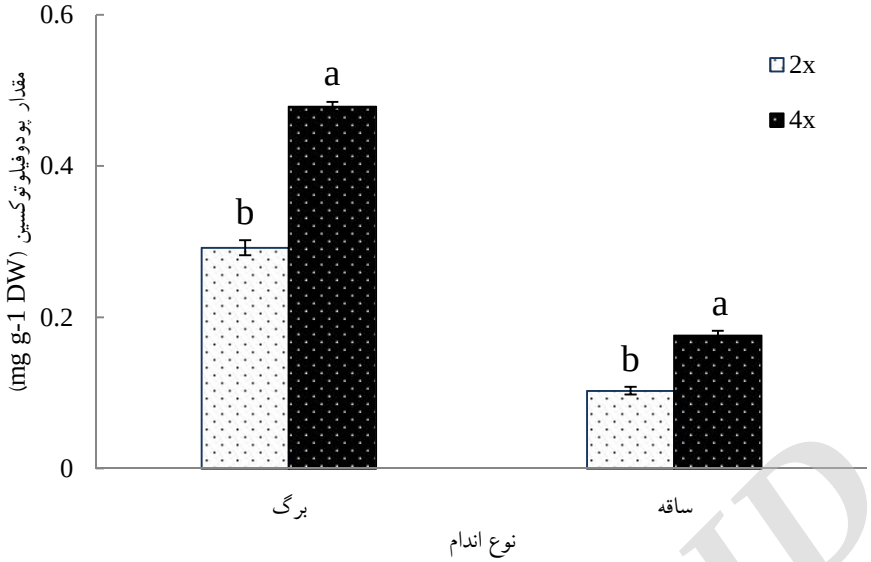
نوع گیاه	ضخامت ساقه (Mm)	عرض برگ (mm)	طول برگ (mm)
۲x	۰/۸۲ b±۰/۲۱	۱/۶۴ b±۰/۰۳۸	۴/۵۲ b±۰/۱۰
۴x	۱/۴۹ a±۰/۲۲	۲/۸۸ a±۰/۰۸۵	۸/۰۱ a±۰/۱۵

در هر ستون، میانگین‌هایی که با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده‌اند، دارای تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۱٪ می‌باشند.

بررسی مقدار پودوفیلوتوکسین در برگ و ساقه گیاه دیپلوئید و تتراپلوئید کتان سفید

مقدار پودوفیلوتوکسین در ساقه و برگ نوساقه‌های تتراپلوئید بدست‌آمده بعد از تیمار القای تتراپلوئید و تأیید آنها به‌وسیله فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد. شناسایی پودوفیلوتوکسین براساس مقایسه زمان بازداری با استاندارد آن، نشان‌دهنده وجود ترکیب پودوفیلوتوکسین در برگ و ساقه کتان سفید بود.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۵- مقدار پودوفیلوتوکسین در سطح دیپلوئید و تتراپلوئید در اندام ساقه و برگ کتان سفید

در هر سطح پلوئیدی، مقایسه میانگین‌های دو اندام با آزمون t-test در سطح احتمال ۵٪ انجام شده است. هر ستون نشان‌دهنده میانگین ± خطای استاندارد می‌باشد.

آنالیز مقدار پودوفیلوتوکسین در ساقه و برگ نوساقه‌ها نشان داد که مقدار پودوفیلوتوکسین در برگ گیاه دیپلوئید و تتراپلوئید اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ داشت و مقدار این ماده در برگ تتراپلوئید ۱/۶۶ برابر بیشتر از برگ دیپلوئید بود. در ساقه نیز از نظر این ماده بین گیاه دیپلوئید و تتراپلوئید در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری وجود داشت و افزایش ۱/۴۸ برابری در مقدار پودوفیلوتوکسین در تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید مشاهده شد (شکل ۵).

بحث

حدود ۳۰٪ تا ۷۰٪ از گونه‌های نهاندانگان اجداد پلی‌پلوئید دارند (Parisod *et al.*, 2010). بسیاری از گل‌ها و درختان میوه با تکثیر رویشی به‌علاوه محصولات زراعی کشت شده، پلی‌پلوئید می‌باشند. از آنجایی که پلی‌پلوئیدی در تمام جنس‌های گیاهی وجود ندارد، به‌دلیل برخی اثرات سودمند آن، در دهه اخیر به‌صورت مصنوعی در محصولات مهم از لحاظ اقتصادی القاء شده‌است. برای محصولات کشاورزی، دو برابر کردن کروموزوم‌ها در شرایط طبیعی (*in vivo*) به‌طور موفقیت‌آمیزی برای چغندر علوفه‌ای و قندی و شبدر چمنی انجام شد اما فراوانی گیاهان پلی‌پلوئید القاء شده پایین بودند. Murashige و Nakano (۱۹۶۶) اولین القای پلی‌پلوئیدی را در شرایط درون شیشه (*in vitro*) در گیاه توتون گزارش کردند. تکثیر در شرایط درون شیشه باعث بهبود بازدهی دو برابر کردن کروموزومی می‌شود، زیرا محیط کنترل شده بهتری در این شرایط وجود دارد (Dhooghe *et al.*, 2011). زمانی‌که اندام رویشی منبع تولیدات اقتصادی مانند متابولیت‌های ثانویه در گیاه باشد، پلی‌پلوئیدی مصنوعی می‌تواند موقعیت فوق‌العاده‌ای برای انجام اصلاح ژنتیکی سریع در گیاهان بوجود آورد. در این تحقیق، القای تتراپلوئیدی روی جوانه جانبی ساقه با ماده القاءکننده پلی‌پلوئیدی اوریزالین در غلظت‌ها و مدت زمان‌های مختلف انجام شد. درصد زنده‌مانی و تولید نوساقه از جوانه جانبی در این گیاه با افزایش غلظت و زمان کاهش یافت، در حالی که در گیاهان شاهد اختلافی از نظر این صفات در زمان‌های مختلف وجود نداشت که این روند تغییرات در بسیاری از گیاهان تحت تیمار القای تتراپلوئیدی مانند *Alocasia* (Thao *et al.*, 2003)، *Watsonia lepida* (Ascough *et al.*, 2008)، برخی گونه‌های جنس

Archive of SID

www.SID.ir

Tanacetum ،(Dhooghe *et al*., 2009) *Hellebores* *parthenium* (Majdi *et al*., 2010) و *Echinacea* *purpurea* (Abdoli *et al*., 2013) گزارش شده‌است. درصد زنده‌مانی و تولید نوساقه در نمونه پس از تیمار القای پلی‌پلوئیدی وابسته به نوع ماده القاکننده پلی‌پلوئیدی، غلظت و مدت زمان تیماردهی می‌باشد (Gantait *et al*., 2011). در غلظت‌های بالای ماده القاءکننده پلی‌پلوئیدی جوانه جانبی این گیاه پس از تیمار قهوه‌ای شده و از بین می‌رود، احتمالاً غلظت و مدت زمان بیشتر تیماردهی باعث اختلالاتی در سرعت رشد می‌شود؛ به‌علاوه اینکه غلظت بالای ماده القاءکننده پلی‌پلوئیدی ممکن است بر بافت‌های غیرتقسیم‌شونده احاطه کننده سلول‌های مریستمی دو برابر شده تأثیر نامطلوب بگذارد (Ascough *et al*., 2008). در این مطالعه، برای اولین بار مقدار 2C DNA در گیاه کتان سفید (*Linum album*) دیپلوئید ۴/۳۴±۰/۰۸pg گزارش می‌شود. مقدار 2C DNA در گونه‌های دیگر جنس *Linum* مانند *Linum capitatum* (Siljak-Yakovlev *et al*., 2010) و*Linum usitatissimum* (Evans *et al*., 1972) به‌ترتیب برابر ۳/۵۲pg و ۱/۴pg گزارش شده‌است. حداکثر درصد القای تتراپلوئیدی اوریزالین (۲۳/۲۴٪) به‌ترتیب تحت تیمار در غلظت ۲۵µM در زمان ۴۸ ساعت بدست آمد. غلظت و زمان تیماردهی عوامل مهمی برای القای پلی‌پلوئید می‌باشند، همچنین برهم‌کنش آشکاری میان آنها وجود دارد. القای پلی‌پلوئیدی در غلظت کم مؤثر نیست اما غلظت‌های بسیار زیاد نیز کشنده می‌باشد (Dhooghe *et al*., 2011). القای تتراپلوئیدی روی برخی گیاهچه‌های در حال جوانه زدن گونه‌های مختلف *Linum* شامل *L. usitatissimum*، *L. narbonense* و *L. angustifolium* تحت تیمار کلشی‌سین انجام شد که غلظت ۰/۱٪ به مدت ۶ ساعت با ۴۲/۵٪ القای تتراپلوئیدی مؤثرترین ترکیب تیماری گزارش شد. بازدهی القای تتراپلوئیدی یک شاخص مناسب برای تعیین بهترین تیمار تتراپلوئیدی می‌باشد، زیرا این فاکتور هر دو مورد زنده‌مانی گیاهچه و میزان تولید تتراپلوئیدی را مورد توجه قرار می‌دهد (Lehrer *et al*., 2008) به عبارت دیگر، موفقیت پلی‌پلوئیدی میتوزی وابسته به تعادل بین میزان دو برابر شدن کروموزومی و درصد بقاء می‌باشد (Dhooghe *et al*., 2009). در این تحقیق، بازدهی القای تتراپلوئیدی با اوریزالین در کتان سفید مشابه برخی گیاهان مانند *Bixa orellana* (de Carvalho *et al*., 2005)؛ *Gerbera* (Tosca *et al*., 1995)؛ *Rhododendron* (Väinölä, 2000) مؤثر بوده‌است. البته بازدهی القای پلی‌پلوئیدی به نوع گونه گیاهی، غلظت و نوع ماده القاءکننده، مدت زمان تیماردهی و اثر متقابل غلظت در زمان وابسته می‌باشد (Yermanos & Gill, 1967).

افزایش مقدار ژن در گیاهان باعث بروز تغییرات فیزیولوژی متفاوت نسبت به دیپلوئید می‌شود. در کتان سفید تتراپلوئید طول و عرض برگ و قطر ساقه نسبت به دیپلوئید افزایش معنی‌داری نشان داد. البته تغییرات مورفولوژی مشابه در بسیاری از گیاهان مانند برخی گونه‌های *Linum* (Yermanos & Gill, 1967)، *Gerbera jamesonii* (Gantait *et al*., 2011)، *Punica granatum* (Shao *et al*., 2003) و*Astragalus membranaceus* (Chen & Gao, 2007) بعد از القای مصنوعی تتراپلوئید مشاهده شده‌است. به‌طوری که یک رابطه مثبتی میان مقدار DNA ژنومی (اندازه ژنوم) و اندازه برگ، دانه گرده و بذر گزارش شده‌است (Majdi *et al*., 2010).

تأثیر القای تتراپلوئیدی بر مقدار پودوفیلوتوکسین یکی از محصولات نهایی با ارزش دارویی در این مسیر می‌باشد که بررسی شد. به‌منظور بررسی دقیق تغییرات القای تتراپلوئیدی بر مقدار متابولیت‌های ثانویه و همچنین به‌دلیل تفاوت در مقدار پودوفیلوتوکسین در برگ و ساقه این گیاه (Mohagheghzadeha *et al*., 2006)، مقدار پودوفیلوتوکسین در دو اندام در گیاه تتراپلوئید و دیپلوئید جداگانه اندازه‌گیری شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که مقدار پودوفیلوتوکسین در برگ و ساقه تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید افزایش معنی‌داری داشت. گزارش‌هایی مبنی بر افزایش مقدار برخی متابولیت‌های ثانویه در اثر دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌های تحت تیمار با ماده‌های القاءکننده

Archive of SID
www.SID.ir

پلی‌پلوئیدی نسبت به دیپلوئید خود وجود دارد، مانند افزایش مقدار آرتمیزینین در درمنه (*Artemisia annua*)، پارتنوئید در بابونه کبیر (*Tanacetume parthenium*) و برخی از مشتقات کافئیک اسید در سرخارگل (*Echinacea purpurea*) (De Jesus-Gonzalez & Weathers, 2003؛ Majdi *et al*., 2010؛ Abdoli *et al*., 2013). افزایش برخی متابولیت‌های ثانویه در نتیجه القای تتراپلوئیدی احتمالاً به‌دلیل افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیمی درگیر در مسیر بیوسنتزی این متابولیت‌ها می‌باشد. پلی‌پلوئیدی نقش مهمی در اصلاح گیاهان به‌عنوان یک روش ارزشمند برای القای تنوع و تولید گیاهان برتر دارد. گیاهان تتراپلوئید اغلب به دلیل بهبود خصوصیات دارویی و آرایشی از طریق گل‌ها و برگ‌های بزرگتر، افزایش متابولیت‌های ثانویه و ماده خشک (بیوماس) مورد توجه می‌باشند (Majdi *et al*., 2010).

نتایج این تحقیق نشان داد که القای تتراپلوئیدی با اوریزالین می‌تواند به‌عنوان روشی مناسب برای افزایش مقدار ماده باارزش دارویی پودوفیلوتوکسین در گیاه کتان سفید باشد، همچنین برای اولین بار مقدار ۲C DNA در این گیاه دیپلوئید کتان سفید گزارش شد.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم دانشگاه تربیت مدرس به‌دلیل حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Abdoli, M., Moieni, A. and Naghdi Badi, H., 2013. Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicine-induced tetraploid plants of *Echinacea purpurea* (L.). Acta Physiologiae Plantarum, 35(7): 2075-2083.
- Ascough, G.D., Van Staden, J. and Erwin, J.E., 2008. Effectiveness of colchicine and oryzalin at inducing polyploidy in *Watsonia lepida* NE Brown. HortScience, 43(7): 2248-2251.
- Caperta, A.D., Delgado, M., Ressurreição, F., Meister, A., Jones, R.N., Viegas, W. and Houben, A., 2006. Colchicine-induced polyploidization depends on tubulin polymerization in c-metaphase cells. Protoplasma, 227: 147-153.
- Chen, L.L. and Gao, Sh.L., 2007. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. Scientia Horticulturae, 112: 339-344.
- de Carvalho, J.F.R.P., de Carvalho, C.R. and Otoni, W.C., 2005. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 80: 69-75.
- Dehghan, E., Häkkinen, S.T., Oksman-Caldentey, K.M. and Ahmadi, F.Sh., 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: 35-44.
- De Jesus-Gonzalez, L. and Weathers, P.J., 2003. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. Plant Cell Report, 21: 809-813.
- Dhooghe, E., Grunewald, W., Leus, L. and Van Labeke, M.C., 2009. *In vitro* polyploidisation of *Helleborus* species. Euphytica, 165: 89-95.
- Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L. and Van Huylenbroeck, L., 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 104: 359-373.
- Doležel, J. and Bartoš, J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. Annals of Botany, 95: 99-110.
- Doležel, J., Greilhuber, J. and Suda, J., 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. Nature Protocols, 2: 2233-2244.
- Esmailzadeh, S., 2011. Investigation of fungal elicitors effect on podophyllotoxin content, gene expression and enzymatic activity of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol-dehydrogenase in *Linum album*. Ph.D. Thesis, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
- Evans, G.M., Rees, H., Snell, C.L. and Sun, S., 1972. The relationship between nuclear DNA amount and the duration of the mitotic cycle. Chromosomes Today, 3: 24-31.
- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S. and Das, P.K., 2011. Induction and identification of tetraploids using *in vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 106: 485-493.
- Kaensaksiri, T., Soontornchainaksaeng, P., Soonthornchareonnon, N. and Prathanturarug, S., 2011. *In vitro* induction of polyploidy in *Centella*

Archive of SID

www.SID.ir

- Rowson, J.M., 1944. Increased Alkaloidal Contents of Induced Polyploids of Datura. Nature, 154: 81-82.
- Shao, J., Chen, C. and Deng, X., 2003. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 75: 241-246.
- Shariat, A., Karimzadeh, G. and Asareh, M.H., 2013. Karyology of Iranian endemic *Satureja* (Lamiaceae) species. Cytologia, 78(3): 305-312.
- Sharifnia, F. and Assadi, M., 2001. Flora of Iran (Linaceae). Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, 181p.
- Siljak-Yakovlev, S., Pustahija, F., Solic, E. M., Bogunic, F., Muratovic, E., Basic, N., Catrice, O. and Brown, S. C., 2010. Towards a genome size and chromosome number database of Balkan flora: C-values in 343 taxa with novel values for 242. Advanced Science Letters, 3: 190-213.
- Thao, N., 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.
- Tosca, A., Pandoifi, R., Citterio, S., Fasoli, A. and Sgorbati, S., 1995. Determination by flow cytometry of the chromosome doubling capacity of colchicine and oryzalin in gynogenetic haploids of *Gerbera*. Plant Cell Report, 14: 455-458.
- Väinölä, A., 2000. Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. Euphytica, 112: 239-244.
- Yermanos, D.M. and Gill, K.S., 1967. Induction of polyploidy in *Linum* species. Crop Science, 7: 423-427.
- Yousefzadi, M., 2010. The influence of Tyrosine, Trypthophan, Light and Salicylic acid on production of Podophyllotoxin and some genes expression and enzymatic activity in biosynthetic pathway of Podophyllotoxin in *Linum album*. Ph.D. Thesis, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
- Yousefzadi, M., Sharifi, M., Ahmadian Chashmi, N., Behmanesh, M. and Ghasempour, A., 2010a. Optimization of podophyllotoxin extraction method from *Linum album* cell cultures. Pharmaceutical Biology, 12: 1421-1425.
- Yousefzadi, M., Sharifi, M., Behmanesh, M., Moyano, E., Bonfill, M., Cusido, R.M. and Palazon, J., 2010b. Podophyllotoxin: Current approaches to its biotechnological production and future challenges. Engineering in Life Sciences, 10: 281-292.

asiatica (L.) Urban. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 107: 187-194.
- Lavania, U.C., 1988. Enhanced productivity of the essential oil in the artificial autopolyploid of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash). Euphytica, 38: 271-276.
- Lavania, U.C., 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phytopharmaceuticals. Plant Genetic Resources, 3: 170-177.
- Lehrer, J.M., Mark, H.B. and Jessica, D., 2008. Lubell induction of tetraploidy in meristematically active seeds of Japanese barberry (*Berberis thunbergii* var. Atropurpurea) through exposure to colchicine and oryzalin. HortScience, 119: 67-71.
- Levy, M., 1976. Altered glycoflavone expression in induced autotetraploids of *Phlox drummondi*. Biochemical Systematics and Ecology, 4: 249-259.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležel, J. and Santos, C., 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry, Annual of Botany, 100: 875-888.
- Mahdavi, S. and Karimzadeh, G., 2010. Karyological and nuclear DNA content variation in some Iranian endemic *Thymus* species (Lamiaceae). Journal of Agricultural Science and Technology (JAST), 12: 447-458.
- Majdi, M., Karimzadeh, G., Malboobi, M.A., Omidbaigi, R. and Mirzaghaderi, G., 2010. Induction of tetraploidy to feverfew (*Tanacetum parthenium* Schulz-Bip.): morphological, physiological, cytological, and phytochemical changes. HortScience, 45: 16-21.
- Mohagheghzadeha, A., Hemmatia, Sh. and Alfermann, A.W., 2006. Quantification of aryltetralin lignans in *Linum album* organs and *in vitro* cultures. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2: 47-56.
- Murashige, T. and Nakano, R., 1966. Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants. Journal of Heredity, 57: 114-118.
- Osborn, T.C., Pires, J.C., Birchler, J.A., Auger, D.L., Chen, Z.J., Lee, H.S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R.W., Colot, V. and Martienssen, R.A., 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. Trends in Genetics, 19: 141-147.
- Parisod, C., Holderegger, R. and Brochmann, C., 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy. New Phytologist, 186: 5-17.
- Planchais, S., Glab, N., Inzé, D. and Bergounioux, C., 2000. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. FEBS Letters, 476: 78-83.

Archive of SID
www.SID.ir

In vitro induction of tetraploidy in *Linum album* Kotschy ex Boiss. using oryzalin treatment

N. Javadian[1], Gh. Karimzadeh[2*], M. Sharifi[3], A. Moeini[4] and Zh. Tahsili[3]

1- Ph.D. Student, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University,Tehran, Iran, E-mail: karimzadeh_g@modares.ac.ir
3- Plant Biology Department, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4- Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: January 2015 Revised: March 2015 Accepted: April 2015

Abstract

Linum album Kotschy ex Boiss. is one of the endemic species of Linaceace family in Iran, having podophyllotoxin (PTOX) metabolite. This substance is a pharmaceutically important natural product belonging to the lignans group. It is used as a precursor for the synthesis of important anti-cancer drugs. Industrial production of this component is not economically feasible because of its complex chemical structure. Therefore, various strategies have been used to increase the production of PTOX in plants. In this study, tetraploidy was induced in nodal segments with different concentrations of oryzalin (0, 15, 25, 50 µM) for 24, 48, 72 and 96 h. The results indicated that the viability and the number of produced shoots in each nodal segment were reduced by increasing concentrations and times of oryzalin. Tetraploid plants were identified by flow cytometry, and 2C DNA content of diploids and tetraploids were estimated to be 4.34 and 8.36 pg, respectively. The highest induction efficiency percentage (19%) of tetraploidy was achieved from 25 µM of oryzalin for 48 h. Tetraploid induction caused 1.66 and 1.48 fold-increase in PTOX content in the leaves and stems of tetraploids compared with those of diploids, respectively. The results of this study indicated that the induction of tetraploidy could be an effective technique to increase this valuable metabolite in *Linum album.*

Keywords: *Linum album* Kotschy ex Boiss., tetraploidy, oryzalin, podophyllotoxin, 2C DNA, flow cytometry.

Archive of SID

www.SID.ir