Archive of SID

دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2017.14974.1353
جلد ۳۳، شماره ۴، صفحه ۵۷۸-۵۶۳ (۱۳۹۶)

بررسی تأثیر تیمار کلشی‌سین بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مواد مؤثره در نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.)

علیرضا استاجی[۱]، بهمن حسینی[۲*]، اسماعیل دهقان[۳] و اصغر استاجی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران، پست الکترونیک: b.hosseini@urmia.ac.ir

۳- دانش‌آموخته دکتری، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۴- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۳ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۴

چکیده

نوروزک (*Salvia leriifolia* Bent.) گیاهی علفی، چندساله، متعلق به تیره نعناع و بومی استان خراسان و سمنان می‌باشد که در سال‌های اخیر خواص مختلف دارویی این گیاه شناخته شده است. القاء پلی‌پلوئیدی به‌عنوان یک تکنیک مهم و کاربردی در اصلاح گیاهان دارویی و معطر است. به همین منظور برای بررسی تأثیر کلشی‌سین بر ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و ترکیب‌های شیمیایی گیاه نوروزک آزمایشی انجام شد. القاء پلی‌پلوئیدی به‌وسیله تیمار مریستم انتهایی در مرحله چهار برگ حقیقی و هر یک در غلظت‌های مختلف کلشی‌سین (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد) همراه با سه سطح زمانی مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) انجام گردید. شناسایی سطح پلوئیدی گیاهان تیمار شده با بررسی‌های مورفولوژیکی، میکروسکوپی (نوری و الکترونی)، فلوسایتومتری و شمارش کروموزومی تعیین شد. شناسایی ترکیب‌های اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی انجام شد. آنالیز نتایج نشان داد که غلظت ۰/۰۵٪ با زمان ۴۸ ساعت در مرحله چهار برگ حقیقی، به‌عنوان بهترین تیمار برای انگیزش تتراپلوئیدی (۲۳/۳٪) در گیاه نوروزک می‌باشد. القاء تتراپلوئیدی در نوروزک سبب تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، سیتولوژیکی و ترکیب‌های شیمیایی از قبیل، افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک، میزان کلروفیل، میزان فتوسنتز، همچنین کاهش ارتفاع گیاهان شد. همچنین، افزایش سطح پلوئیدی سبب تغییرات قابل توجهی در ترکیب‌های موجود در اسانس شد.

واژه‌های کلیدی: نوروزک (*Salvia leriifolia* Bent.)، کلشی‌سین، پلی‌پلوئیدی، فلوسایتومتری.

مقدمه

گیاه دارویی نوروزک با نام علمی *Salvia leriifolia* Bent. متعلق به تیره نعناع و بومی استان خراسان و سمنان می باشد که در سالهای اخیر خواص مختلف دارویی این گیاه مانند کاهش وابستگی به مورفین، کاهش قند خون، ضد درد، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان، ضد انعقاد خون، ضد تشنج، جلوگیری از ایجاد و توسعه زخم های معده، فعالیت های ضد باکتری و اثرات آنتی موتاژنیک آن شناخته شده است (Hosseinzadeh *et al.*, 2003). ارزش دارویی گیاه نوروزک وابسته به متابولیت‌های ثانویه‌ای ازجمله

www.SID.ir

Archive of SID

ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و آلکالوئیدها می‌باشد (Tabatabaei Yazdi, 1996). امروزه تأکید اصلی و هدف اختصاصی متخصصان یافتن گونه‌های جدید گیاهی، توسعه استعدادهای ژنتیکی و همچنین یافتن شیوه هایی برای افزایش مواد مؤثره گیاهان دارویی است (Yavari, 2008). کشت و کار گیاهان دارویی به هزاران سال پیش باز می گردد، اما تاکنون در مورد اصلاح آنها پیشرفت قابل ملاحظه‌ای انجام نشده است (Omidbeigi, 2008). یکی از روش های اصلاح گیاهان دارویی، انگیزش گیاهان تتراپلوئید از گیاهان دیپلوئید و منشأ آنهاست که می‌تواند در رشد و نمو و عملکرد و همچنین بر کمّیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان دارویی تأثیر داشته باشد. بدیهی است که تنوع ناشی از افزایش سطح پلوئیدی، امکان گزینش گیاهان دارای صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و اگرونومیکی برتر را فراهم می‌آورد. پلی‌پلوئیدها اغلب سلول های بزرگتر، برگ های ضخیم‌تر، رشد کندتر، میزان آب بیشتر و تأخیر در گلدهی و افزایش دوره آن را نشان می‌دهند (Kondorosi *et al*., 2000). سازگاری اکولوژیکی بیشتر در پلی‌پلوئیدها، آنها را مستعد می‌سازد که بتوانند شرایط سخت را نسبت به دیپلوئیدها بهتر تحمل کنند و در طی تغییر محیط که در طی تکامل ایجاد می‌شود، بهتر استقرار پیدا کنند. افزایش مقاومت به فاکتورهای محیطی سخت، اغلب پل رقابتی است که به یک گونه خاص اجازه می‌دهد تا جمعیت غالب در یک ناحیه شود (Levin, 1983). امروزه القاء پلی‌پلوئیدی با استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا، به‌عنوان یکی از روش های اصلاح گیاهان دارویی به‌منظور افزایش قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مواردی که اندام‌های رویشی گیاه منبع مواد مؤثره هستند، مانند برخی گیاهان دارویی، تغییر سطح کروموزومی مانند دو برابر کردن مستقیم کروموزوم‌ها، می‌تواند به‌عنوان روشی ارزشمند و سریع برای افزایش تولید ترکیب های دارویی مورد توجه قرار گیرد (Dhawan & Lavania, 1996). استفاده از روش پلی‌پلوئیدی به طریق دو برابر کردن کروموزومی، یکی از روش های اصلاحی است که نقش بسیار مهمی در افزایش ماده مؤثره گیاهان دارویی دارد و سودمندی آن به اثبات رسیده است (Stoskopf *et al*., 1993). پلی‌پلوئیدی به روش مصنوعی ممکن است راهی برای رسیدن به بهبود سریع ژنتیکی گیاه باشد و به‌عنوان یک روش افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. پلی‌پلوئیدی می‌تواند بر ویژگی‌های مورفولوژیکی (ضخامت، اندازه و شکل اندام‌های رویشی و زایشی گیاه)، میکروسکوپی (اندازه و تراکم روزنه و سلول‌های محافظ روزنه، تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه)، فرایندهای فیزیولوژیکی (زمان و طول مدت گلدهی، تأثیر در باروری گیاه، ویژگی‌های دانه، قدرت باروری گرده، فتوسنتز، تأثیر بر مقاومت در برابر تنش‌ها و غیره) و فرایندهای بیوشیمیایی گیاه (کیفیت و کمّیت مواد مؤثره) تأثیر گذار باشد. افزایش در سطح پلوئیدی هسته اغلب باعث تغییرات آناتومیکی و ساختاری از قبیل تراکم روزنه، اندازه سلول و تعداد کلروپلاست در سلول می‌گردد (Jellings & Leech, 1984). تحقیقات نشان داده که اندازه سلول‌های محافظ روزنه بیشتر از سلول‌های دیگر گیاه متأثر از عوامل ژنتیک بوده و کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد (Blakeslee & Avery ,1937). به‌طوری که با افزایش سطوح پلوئیدی سلول ها، طول و عرض روزنه‌ها افزایش می‌یابد، در نتیجه تراکم روزنه کاهش می‌یابد (Cukrova & Avratovscukova, 1968).

پلی‌پلوئیدی می‌تواند بر فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه اثر گذاشته و طی آن میزان فتوسنتز، تنفس، انتقال الکترون‌های فتوسنتزی، فعالیت ژن‌ها و آنزیم‌ها و بیان ایزوزیم‌ها را تغییر دهد (Dhawan & Lavania, 1996). در اثر افزایش سطح پلوئیدی میزان تنفس کاهش یافته ولی فتوسنتز، فعالیت ژن و تنوع آنزیم‌ها افزایش می‌یابد. این امر بر کمّیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه گیاه اثر می‌گذارد (Dhawan & Lavania, 1996؛ Lavania & Srivastava, 1991). از آنجا که پلی‌پلوئیدها نتیجه چند برابر شدن مستقیم ژنوم مشابه هستند و در آنها ماده ژنتیکی اصلی و پایه و به‌دنبال آن تعداد ژن نیز چند برابر شده است، بنابراین

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش تولید متابولیت‌ها نیز انجام می‌شود (Dhawan & Lavania , 1996).

پلی‌پلوئیدی دارای اثرات قابل توجه‌ای در بیان ژن‌های دو برابرشده است، به‌طوری که سبب خاموش شدن، کاهش و یا افزایش بیان یک ژن می‌شود. این تغییرات می‌تواند با شروع پلی‌پلوئیدی و یا با گذشت چند نسل پس از ایجاد آن، رخ دهد. همچنین تغییرات مذکور می‌توانند تحت تأثیر عوامل اپی‌ژنتیکی نیز قرار گیرند (Xiuyan *et al*., 2011).

انگیزش پلی‌پلوئیدی با تأثیر بر فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. پلی‌پلوئیدی اغلب تولید مواد مؤثره را در گیاهان دارویی افزایش می‌دهد (Dhawan & Lavania, 1996). از مثال‌های برجسته در پدیده پلی‌پلوئیدی در آزمایشی که بر روی گیاه دارویی پونه دشتی انجام شد سطح متوسط ماده مؤثره آرتمیزینین در گیاهان تتراپلوئید ۳۸٪ بالاتر از گیاهان دیپلوئید بود و عملکرد آرتیمیزنین (Artemisinin) در کلون‌های تتراپلوئید ۵-۲ برابر، در مقایسه با همتای دیپلوئید افزایش یافت (Gonzalez & Weathers, 2003). همچنین میزان اسانس در گیاهان اوتوتتراپلوئید گونه‌ای از نعناع (*Mentha arvensis* L.)، به میزان ۳۰٪ (Janaki Amal & Sobit, 1962) و در زیره (*Carum carvi* L.) به میزان ۳۵٪ تا ۸۵٪ (Dijkstra & Spekmann, 1980) نسبت به گیاهان دیپلوئید شاهد افزایش نشان داده است. به‌منظور تعیین سطح پلوئیدی از روش‌های غیرمستقیم مانند ویژگی‌های مورفولوژیکی و ریختی (اندازه برگ‌ها، طول و قطر ساقه، اندازه گل‌ها، بذرها و دانه‌های گرده) و ویژگی‌های میکروسکوپی (اندازه‌گیری طول و عرض سلول‌های روزنه، تراکم سلول‌های روزنه در واحد سطح، تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه در اپیدرم برگ) و همچنین از روش‌های مستقیم (شمارش تعداد کروموزوم و فلوسایتومتری) استفاده می‌شود (Sari *et al*., 1999). در بسیاری از گونه‌های گیاهی مضاعف کردن کروموزومی با تغییرات چشمگیر در تولید متابولیت‌های ثانویه به‌مانند متابولیت‌های اولیه همراه است. چنین قابلیت اساسی را می‌توان برای تجاری کردن تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی که به افزایش سطح پلوئیدی جواب مثبت می‌دهند بکار برد. از آنجا که تحقیقات انجام شده در زمینه اصلاح گیاهان دارویی و ازجمله گیاه دارویی نوروزک، بسیار محدود است، این پژوهش به‌منظور مطالعه القاء تتراپلوئیدی در گیاه دارویی نوروزک و امکان‌سنجی ایجاد گیاهانی با قابلیت تولید میزان اسانس بیشتر و خصوصیات مورفولوژیکی بهتر انجام شد.

مواد و روش‌ها

بذرهای رسیده نوروزک در خرداد ماه ۱۳۹۰ از مزرعه ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی سبزوار (منطقه آبخوانداری در شمال‌غرب سبزوار)، واقع در استان خراسان رضوی جمع‌آوری شدند. این تحقیق از فروردین ماه ۱۳۸۹ شروع و تا پایان تیر ماه ۱۳۹۱ ادامه یافت. انجام این تحقیق در گلخانه تحقیقاتی گروه باغبانی دانشگاه ارومیه انجام شد. مطالعات سیتوژنتیکی و تعیین سطح پلوئیدی گیاهان حاصل از تیمار توسط دستگاه فلوسایتومتری در گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. اندازه‌گیری فتوسنتز خالص با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری فتوسنتز در گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه انجام گردید. همچنین مطالعات میکروسکوپی شامل تعیین اندازه و تراکم روزنه‌ها و کرک‌های ترشحی با میکروسکوپ الکترونی در دانشکده فنی مهندسی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. استخراج اسانس با استفاده از حلال و توسط دستگاه اولتراسوند و شناسایی ترکیب‌های اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS)، در آزمایشگاه مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور انجام شد.

تهیه محلول کلشی‌سین

کلشی‌سین مورد استفاده در این تحقیق از شرکت سیگما (Sigma Company) تهیه شد. برای انجام این تحقیق محلول‌های کلشی‌سین با غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و

www.SID.ir

Archive of SID

۰/۵ درصد مورد نیاز بودند. بنابراین به‌منظور تهیه این محلول‌ها ابتدا یک محلول پایه با بیشترین غلظت مورد نیاز یعنی ۰/۵٪ با حجم مورد نیاز که قبلاً محاسبه شده بود، تهیه گردید. سپس با رقیق‌کردن محلول پایه به نسبت‌های مختلف، غلظت‌های مختلف کلشی‌سین بدست آمد. لازم به ذکر است که برای جذب بهتر محلول کلشی‌سین توسط گیاه، به هر یک از محلول‌های تهیه شده چند قطره دی‌متیل‌سولفواکسید (DMSO) ۲٪ و توئین ۲۰ (Tween 20) افزوده شد.

تیمار مریستم انتهایی با کلشی‌سین به روش پد یا گلوله‌های پنبه‌ای (Pad technique or cotton plug) انجام شد. در این روش پوشش‌های جاذب مانند پنبه که با محلول کلشی‌سین خیس شده بودند، روی قسمت انتهایی شاخساره قرار گرفته و پس از طی مدت‌زمانی مشخص برداشته شدند. این روش طی تیمار گیاهچه‌ها در مرحله ظهور چهار برگ حقیقی انجام شد (شکل ۱). آزمایش با پنج غلظت مختلف کلشی‌سین (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد) همراه با سه سطح زمانی مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) و با بکارگیری سه تکرار (هر تکرار ۱۰ گیاه) برای هر تیمار (۳۰ گیاه) انجام شد. طی این آزمایش ۳۰ گیاهچه برای هر تیمار در نظر گرفته شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه اجرا گردید.

شکل ۱- تیمار مریستم انتهایی با کلشی‌سین به روش پد در مرحله چهار برگ حقیقی در گیاه نوروزک

شاخص‌های مورد مطالعه در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید شامل: ارتفاع بوته، اندازه‌گیری وزن تر و خشک ریشه و برگ، اندازه‌گیری تراکم و شاخص روزنه‌ای، اندازه‌گیری رنگیزه‌های کلروفیل، اندازه‌گیری میزان نرخ فتوسنتز خالص، مقایسه مواد مؤثره در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید بودند.

شناسایی گیاهان تغییریافته به واسطه ویژگی‌های مورفولوژیکی

به‌منظور بررسی مقدماتی سطح پلوئیدی کلیه گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین، ابتدا از طریق بررسی و مقایسه مشخصات و ویژگی‌های مورفولوژیکی با گیاهان شاهد (تیمار نشده)، گیاهان مشکوک به پلی‌پلوئیدی (به‌طور کلی تأخیر در رشد بعد از اعمال تیمار یا گیاهان دارای دو یا سه نقطه رشدی، تفاوت در مساحت، ضخامت، شکل و رنگ برگ با گیاهان شاهد، همانند برگ‌های تیره، تغییر شکل یافته، چروک و ضخیم پس از اعمال تیمار) گزینش شدند.

مطالعات میکروسکوپی (نوری و الکترونی)

گیاهانی که در مرحله اول از طریق بررسی صفات مورفولوژیکی گزینش شده بودند، طی مرحله دوم تعیین سطح پلوئیدی با استفاده از روش‌های میکروسکوپی بررسی و غربال شدند. برای مشاهده روزنه‌ها، سه‌برگ بالغ و کاملاً توسعه یافته و تا حد ممکن برگ‌های هم‌سن و هم‌اندازه از قسمت میانی از هر یک از گیاهان مشکوک به پلی‌پلوئیدی در مقایسه با گیاهان دیپلوئید انتخاب و از هر گیاه جدا شد. سپس با استفاده از تکنیک لاک ناخن، از اپیدرم سطح زیرین آنها نمونه‌برداری انجام گردید. مشاهده نمونه و عکس‌برداری از آن توسط دستگاه میکروسکوپ نوری انجام شد. در مرحله دوم برای گیاهان مشکوک به پلی‌پلوئیدی از میکروسکوپ الکترونی استفاده شد.

آزمایش‌های فلوسایتومتری

پس از مراحل فوق گیاهان احتمالی که از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی و روزنه‌ای غربال شده بودند، در

www.SID.ir

Archive of SID

طی مرحله سوم برای اثبات نتایج فوق، سطح پلوئیدی گیاهان مذکور با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (partec pA,Germany) تعیین شد. گیاهان شاهد نیز برای مقایسه اثرات کلشی‌سین مورد استفاده قرار گرفتند و پیک بدست‌آمده از آنها مبنای کار مقایسات حجم هسته قرار گرفت. برای این منظور مراحل آماده‌سازی نمونه به‌منظور تزریق به دستگاه فلوسایتومتری و تعیین وضعیت پلوئیدی به‌شرح ذیل انجام شد: از برگ‌های کاملاً جوان و رشد کرده (در حدود دو ماهه) قطعاتی به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر مربع تهیه و ۴۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج هسته (محلول A کیت دستگاه، partec) به روی آنها اضافه شد و با تیغ تیز به‌نحوی که از له‌شدگی بافت جلوگیری شود، مقطع برگی به خوبی خرد گردید. سپس محلول حاصل از فیلترهای مخصوص دستگاه عبور داده شد و ۱۶۰۰ میکرولیتر محلول رنگ‌آمیزی هسته حاوی ۴ و ۶-دی آمیدینو-۲ فنیل ایندول (DAPI، محلول B کیت) به آن اضافه گردید و پس از ۶۰-۳۰ ثانیه برای شمارش به دستگاه داده شد. به‌طور معمول برای هر نمونه حجم حداقل ۵۰۰۰ هسته توسط دستگاه اندازه‌گیری و پیک‌های بدست آمده توسط نرم‌افزار Mode Fit تفسیر گردید.

استخراج اسانس

در این آزمایش گیاهان مربوط به هر سطح پلوئیدی پس از خشک کردن (در سایه) و آسیاب کامل، پنج نمونه ۰/۲ گرمی از برگ هر گیاه تتراپلوئید و پنج نمونه ۰/۲ گرمی از برگ هر گیاه دیپلوئید با دقت توزین شد. سپس نمونه‌های مربوط به هر سطح پلوئیدی با همدیگر مخلوط شدند. نمونه ها در ارلن های ۵۰CC قرار داده شدند. در مرحله بعد ۲۰ میلی‌لیتر N-هگزان به هر نمونه اضافه شد. به‌دنبال آن نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در داخل دستگاه اولتراسوند به‌منظور لرزش بسیار ملایم نمونه در حلال قرار گرفتند. در نهایت پس از این زمان، نمونه ها به یخچال و دمای ۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۸ ساعت منتقل شدند. پس از زمان مذکور با استفاده از یک میکروپیپت فیلتردار، ۵۰ میکرولیتر از قسمت بالای هر نمونه برداشته شد و داخل ظرف های شیشه ای کوچکی ریخته و درب شیشه را محکم بسته و به‌منظور تعیین بازدهی اسانس و ترکیب‌های آن به آزمایشگاه مرکزی تجزیه اسانس منتقل و با استفاده از دستگاه GC و GC-MS آنالیزهای لازم انجام شد. شناسایی ترکیب‌های اسانس با استفاده از اندیس بازداری کواتس و بررسی طیف‌های جرمی و مقایسه با طیف‌های جرمی پیشنهادی توسط کتابخانه رایانه دستگاه کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی انجام گردید. برای آنالیز اسانس از دستگاه GC مدل Shimadzu-9A، ستون DB-5 به طول ۳۰ سانتی‌متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت لایه ساکن دی‌متیل سیلوکسان (dimethylsiloxane) ۰/۲۵ میکرومتر و ۵٪ فنیل (Phenyl) استفاده گردید. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از دمای اولیه ۶۰ درجه سانتی گراد تا دمای ۲۱۰ درجه سانتی گراد انجام شد، که در هر دقیقه ۳ درجه سانتی‌گراد به آن افزوده شد. نوع آشکارساز با دمای ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد، گاز حامل هلیوم با درجه خلوص ۹۹/۹۹۹٪ با فشار ورودی ۳ کیلوگرم بر هر سانتی‌متر مربع بود. از کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج از نوع Saturm مدل ۳۴۰۰، ستون DB-5 به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میکرومتر استفاده گردید. همچنین برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۵۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی گراد با افزایش دمای ۴ درجه در دقیقه، دمای محفظه تزریق ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و گاز حامل هلیم ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون SNK و آزمون t انجام گردید و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2007 انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

تأثیر تیمار کلشی‌سین در مرحله چهاربرگ حقیقی بر سطوح پلوئیدی

نتایج حاصل از آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که اعمال تیمار در غلظت‌های مختلف کلشی‌سین (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد) همراه با سه سطح زمانی مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با استفاده از تکنیک گلوله‌های پنبه‌ای در مرحله رشدی چهار برگ حقیقی به‌طور چشمگیری سبب تحریک پلی‌پلوئیدی (تتراپلوئیدی و میکس‌پلوئیدی) در گیاه نوروزک می‌گردد. با افزایش غلظت کلشی‌سین تعداد گیاهچه‌های تتراپلوئید کمتر و تعداد گیاهچه‌های میکس‌پلوئید (به‌جز تیمار ۰/۵٪) افزایش یافت. به‌طوری که در غلظت ۰/۰۵٪ کلشی‌سین بیشترین تعداد گیاهچه تتراپلوئید (۱۴ گیاهچه) مشاهده شد. در حالیکه غلظت ۰/۵٪ کلشی‌سین کمترین تعداد گیاهچه تتراپلوئید (۱ گیاهچه) و غلظت ۰/۲٪ کلشی‌سین بیشترین تعداد گیاهچه میکس‌پلوئید (۱۳ گیاهچه) را داشتند. اثر زمان تیمار کلشی‌سین بر تولید گیاهچه‌های پلی‌پلوئیدی نشان داد که افزایش سطح زمانی تیمار با کلشی‌سین باعث افزایش تعداد گیاهان میکس‌پلوئید شد. به‌طوری که در تیمار ۲۴ ساعت ۱۱ (۷/۳٪)، تیمار ۴۸ ساعت ۱۵ (۱۰/۰٪) و تیمار ۷۲ ساعت ۱۷ (۱۱/۳٪) گیاهچه میکس‌پلوئید مشاهده گردید. اما بیشترین تعداد گیاهچه تتراپلوئید در زمان ۴۸ ساعت (۲۰ گیاهچه) و کمترین گیاهچه تتراپلوئید در زمان ۲۴ ساعت (۱ گیاهچه) مشاهده شد. براساس پیک‌های بدست آمده از دستگاه فلوسایتومتری، بیشترین بازدهی تولید تتراپلوئیدی در تیمار ۰/۰۵٪ کلشی‌سین به مدت ۴۸ ساعت با میانگین ۷ (۲۳/۳٪) گیاهچه مشاهده گردید. بیشترین بازدهی میکس‌پلوئیدی در تیمار ۰/۲٪ کلشی‌سین به مدت ۴۸ ساعت با میانگین ۶ (۲۰/۰٪) گیاهچه مشاهده شد.

مطالعات مورفولوژیک به‌منظور تعیین سطح پلوئیدی گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین

ویژگی‌های مورفولوژیک گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید به‌منظور امکان استفاده از این شاخص‌ها در تعیین تتراپلوئیدهای احتمالی مورد ارزیابی قرار گرفت. در اغلب گیاهان تتراپلوئید و میکس‌پلوئید برگ‌های اولیه دارای ظاهری نابهنجار بودند اما برگ‌های بعدی ایجاد شده در محل تیمار ظاهر طبیعی داشتند. پس از شناسایی گیاهچه‌هایی که از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی احتمال پلی‌پلوئید بودن آنها وجود داشت، تعیین سطح پلوئیدی آنها طی مراحلی انجام شد.

نتایج مقایسه ارتفاع بوته گیاهان دیپلوئید با تتراپلوئید نوروزک

نتایج حاصل از مقایسه ارتفاع بوته‌ها یک ماه پس از اعمال تیمار و قبل از حالت رزت شدن این گیاه بین ۱۰ گیاه دیپلوئید و ۱۰ گیاه تتراپلوئید با استفاده از آزمون آماری t نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ در ارتفاع بوته‌ها وجود داشت (جدول ۱)، به‌طوری که میانگین ارتفاع بوته‌ها در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۳/۰۱ سانتی‌متر و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۲/۴۱ سانتی‌متر بود.

نتایج مقایسه وزن تر و خشک بین گیاهان دیپلوئید با تتراپلوئید نوروزک

نتایج حاصل از مقایسه وزن تر و خشک ریشه و شاخساره و درصد ماده خشک آنها بین ۱۰ بوته دیپلوئید و ۱۰ بوته تتراپلوئید نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ در وزن تر و خشک ریشه و شاخساره و درصد ماده خشک شاخساره بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید وجود داشت. میانگین وزن تر شاخساره در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۱۳/۱۳ گرم و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۳۹/۸۶ گرم بود. همراه با افزایش وزن تر شاخساره، وزن خشک شاخساره نیز روند افزایشی نشان داد، به‌طوری که میانگین وزن خشک در گیاهان تتراپلوئید ۸/۹۱ گرم در مقایسه با همتای دیپلوئید ۳/۳۹ گرم بدست آمد. در حالیکه درصد ماده خشک شاخساره در گیاهان تتراپلوئید (۲۲/۳۴٪) روند نزولی در مقایسه با گیاهان شاهد دیپلوئید (۲۵/۷۸٪) نشان داد (جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مقایسه میانگین برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نوروزک

شاخص‌ها	دیپلوئید	تتراپلوئید
	خطای استاندارد ± میانگین	خطای استاندارد ± میانگین
ارتفاع بوته (cm)	۳/۰۱ ± ۰/۱۲ a	۲/۴۱ ± ۰/۰۶ b
تعداد جوانه‌های جانبی	۱/۳ ± ۰/۲۱ b	۳/۲ ± ۰/۴۱ a
میانگین تعداد برگ	۱۲/۱ ± ۰/۸۲ b	۱۹/۶ ± ۰/۸۰ a
میانگین طول برگ (cm)	۱۶/۵۹ ± ۰/۴۷ a	۱۳/۹۶ ± ۰/۴۰ b
میانگین عرض برگ (cm)	۲/۹۲ ± ۰/۲۵ b	۴/۰۴ ± ۰/۳۳ a
میانگین مساحت برگ (cm^2)	۴۵/۸۴ ± ۴/۰۲ a	۵۲/۸۹ ± ۳/۷۲ a
میانگین ضخامت ساقه (cm)	۲/۰۱ ± ۰/۱۴ a	۳/۵۵ ± ۰/۲۰ b
میانگین ضخامت برگ (cm)	۰/۳۲ ± ۰/۳۸ b	۰/۵۲ ± ۰/۲۹ a
میانگین ضخامت دمبرگ (cm)	۰/۸۳ ± ۰/۰۰۸ b	۱/۶۹ ± ۰/۰۲ a

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ردیف، در سطح احتمال ۵٪ آزمون SNK فاقد تفاوت معنی‌داری می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه عملکرد در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نوروزک

شاخص‌ها	دیپلوئید	تتراپلوئید
	خطای استاندارد ± میانگین	خطای استاندارد ± میانگین
وزن تر شاخساره (گرم)	۱۳/۱۳ ± ۰/۲۴ b	۳۹/۸۶ ± ۰/۵۷ a
وزن خشک شاخساره (گرم)	۳/۳۹ ± ۰/۰۵ b	۸/۹۱ ± ۰/۱۳ a
درصد ماده خشک شاخساره	۲۵/۷۸ ± ۰/۱۳ a	۲۲/۳۴ ± ۰/۰۲ a
وزن تر ریشه (گرم)	۱۰/۰۳ ± ۰/۳۱ b	۲۵/۴۶ ± ۰/۵۳ a
وزن خشک ریشه (گرم)	۲/۸۵ ± ۰/۰۹ b	۷/۲۰ ± ۰/۰۸ a
درصد ماده خشک ریشه	۲۸/۶۳ ± ۱/۱۴ a	۲۸/۲۹ ± ۰/۱۸ a

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ردیف، در سطح احتمال ۵٪ آزمون SNK فاقد تفاوت معنی‌داری می‌باشد.

مطالعات میکروسکوپی شاخص‌های روزنه‌ای گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین

این مطالعات نیز نشان داد که بیشتر گیاهان غربالی از مرحله قبل دارای سلول‌های محافظ روزنه بزرگتر و تراکم کمتری نسبت به نمونه‌های دیپلوئید بودند. از میکروسکوپ الکترونی تنها در مورد گیاهان تتراپلوئید حاصل از تیمار با کلشی‌سین در مقایسه با گیاهان دیپلوئید کنترل، اطلاعات ثبت گردید. به این منظور در این پژوهش مقایسه طول، عرض و تراکم سلول‌های روزنه‌ای و همچنین طول سلول‌های محافظ روزنه در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید انجام شد که در ادامه به نتایج بدست آمده پرداخته می‌شود.

مقایسه طول و عرض روزنه در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نوروزک

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اندازه طول و عرض روزنه‌ها در سطح پشتی برگ‌های کاملاً توسعه یافته در

www.SID.ir

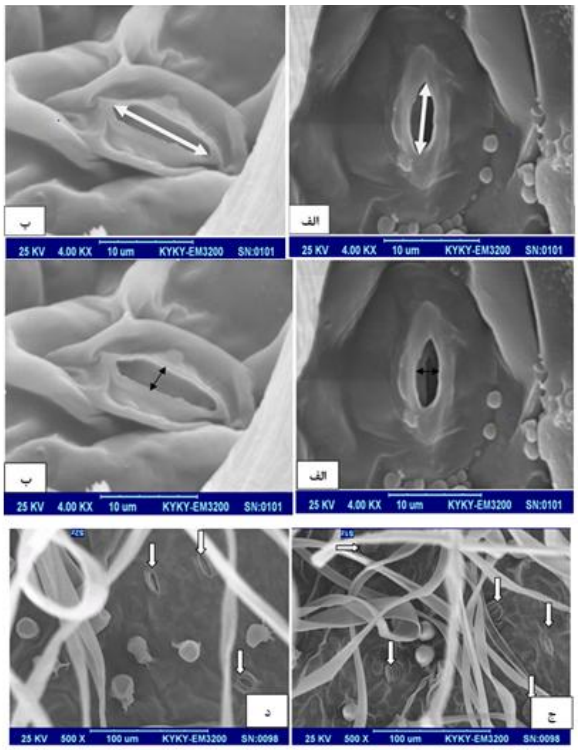
Archive of SID

۱۰ نمونه از گیاهان دیپلوئید و ۱۰ نمونه از گیاهان تتراپلوئید با استفاده از آزمون آماری t نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ هم در طول و هم در عرض روزنه‌ها در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید وجود داشت (جدول ۳). به‌طوری که میانگین طول روزنه در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۶/۲۱ میکرومتر و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۹/۸ میکرومتر بود. همچنین میانگین عرض روزنه‌ها در حالت باز در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۲/۷۰ میکرومتر و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۵/۱۳ میکرومتر بود. شکل ۲، طول و عرض روزنه یک نمونه دیپلوئید و یک نمونه تتراپلوئید را با بزرگنمایی ۴۰۰۰x نمایش می‌دهد.

جدول ۳- مقایسه میانگین اندازه، طول، عرض و تراکم روزنه‌ها در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نوروزک

سطح پلوئیدی	تعداد نمونه	خطای استاندارد ± میانگین طول روزنه (µm)	خطای استاندارد ± میانگین عرض روزنه (µm)	خطای استاندارد ± میانگین طول روزنه (µm)
دیپلوئید (۲x)	۱۰	۶/۲۱ ± ۰/۱۰ b	۲/۷۰ ± ۰/۰۵ B	۱۵۲/۵ ± ۵/۸۳ a
تتراپلوئید (۴x)	۱۰	۹/۸ ±۰/۲۴ a	۵/۱۳ ± ۰/۰۶ a	۷۷/۵ ± ۵/۸۳ b

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون، در سطح احتمال ۵٪ آزمون SNK فاقد تفاوت معنی‌داری می‌باشد.



شکل ۲- مقایسه اندازه طول و عرض روزنه‌ها در گیاه دیپلوئید (الف) و تتراپلوئید (ب) با بزرگنمایی ۴۰۰۰x و مقایسه تراکم روزنه و کرک‌های ترشحی اسانس در گیاه دیپلوئید (ج) و تتراپلوئید (د) با بزرگنمایی ۵۰۰x

www.SID.ir

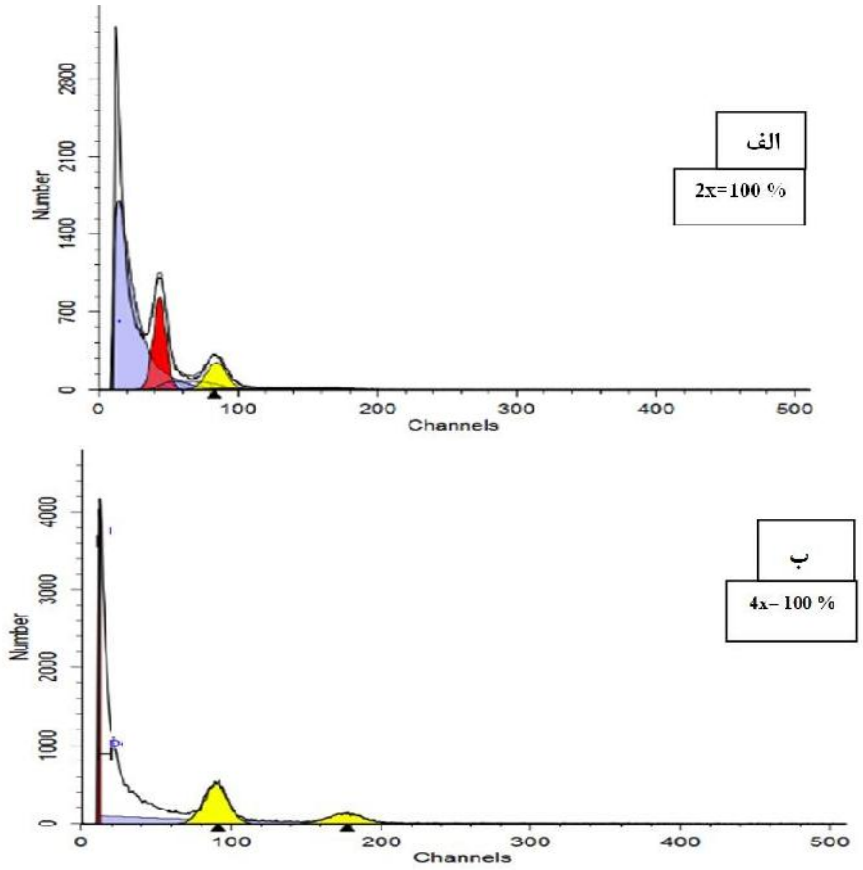
Archive of SID

مقایسه تراکم روزنه در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نوروزک

نتایج حاصل از آزمون آماری t در مورد مقایسه تراکم روزنه در یک میلی‌متر مربع از نقاط مختلف موجود در سطح پشت برگ در ۱۰ نمونه از گیاهان دیپلوئید و ۱۰ نمونه از گیاهان تتراپلوئید در مرحله توسعه کامل برگ‌ها، نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ در تعداد روزنه در واحد سطح برگ بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید وجود داشت (جدول ۳)، به‌طوری که میانگین تراکم روزنه در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۱۵۲/۵ عدد در یک میلی‌متر مربع و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۷۷/۵ عدد در یک میلی‌متر مربع بود. شکل ۲، میزان تراکم روزنه را در یک نمونه دیپلوئید و یک نمونه تتراپلوئید در یک میلی‌متر مربع در سطح پشت برگ با بزرگنمایی ۵۰۰x نمایش می‌دهد.

آزمایش‌های فلوسایتومتری گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین

پس از مراحل فوق گیاهان احتمالی که از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی و روزنه‌ای غربال شده بودند، در طی مرحله سوم برای اثبات نتایج آزمایش‌های قبل، سطح پلوئیدی گیاهان مذکور با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (Partec pA, Germany) تعیین شد. براساس پیک‌های بدست‌آمده از فلوسایتومتری، گیاهان در سه دسته دیپلوئید، میکس‌پلوئید و تتراپلوئید قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود پیک G۱ گیاهان تتراپلوئید روی کانال ۴۵ قرار دارد، در حالیکه پیک G۱ نمونه شاهد کانال ۹۰ را نشان می‌دهد. نمونه‌های دیپلوئید دارای پیک G۲ روی کانال ۹۰ بودند که بیانگر هسته‌های با DNA مضاعف شده می‌باشد، در حالیکه وجود پیک G۲ گیاهان تتراپلوئید بر روی کانال ۱۸۰ حکایت از مقدار DNA دو برابر آنها نسبت به نمونه‌های دیپلوئید دارد.



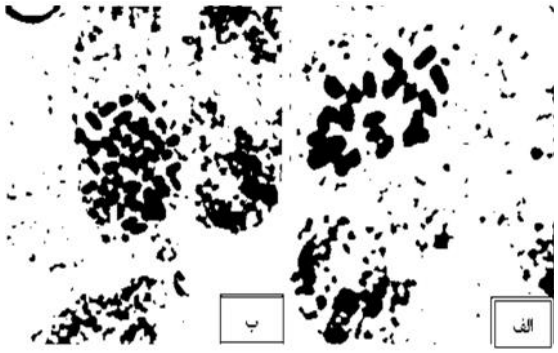
شکل ۳- پیک‌های بدست‌آمده از فلوسایتومتری گیاهان دیپلوئید (الف) و تتراپلوئید (ب) در نوروزک

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش مشاهده و شمارش کروموزوم‌ها پس از تعیین سطح پلوئیدی

در مرحله چهارم برای حصول اطمینان کافی از تتراپلوئیدی و عدم وجود آنیوپلوئیدی، کروموزم‌های سلول‌های گیاهان دیپلوئید و گیاهانی که با استفاده از روش فلوسایتومتری تتراپلوئید بودن آنها مشخص شده بود طی بررسی‌های سیتوژنتیکی مشاهده و شمارش شدند. برای مشاهده کروموزوم از نوک و قسمت‌های جانبی برگ‌های جوان و رشدکرده استفاده شد. طی این بررسی مشخص شد که تعداد کروموزوم‌های سلول‌های سوماتیکی در گیاهان تتراپلوئید نوروزک در مقایسه با گیاهان دیپلوئید دو برابر شده است (شکل ۴).



شکل ۴- کروموزوم‌های سلول‌های گیاه دیپلوئید (الف) و تتراپلوئید (ب) نوروزک

نتایج مقایسه میزان کلروفیل و فتوسنتز خالص در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نوروزک

نتایج حاصل از آزمون آماری t در مورد میزان کلروفیل برگ در گیاهچه‌های شش ماهه نوروزک، نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید وجود دارد. مقایسه میزان کلروفیل a در برگ نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۳۰/۱۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ ($mg\ g^{-1}FW$) و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۳۹/۰۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ بود. همراه با افزایش میزان کلروفیل a در گیاهان تتراپلوئید میزان کلروفیل b نیز روند افزایشی نشان داد، به‌طوری که میانگین میزان کلروفیل b در برگ نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۱۶/۶۴ میلی‌گرم و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۲۳/۰۸ میلی‌گرم به‌ازاء گرم وزن تر برگ بود. همچنین میزان کلروفیل کل در برگ نمونه‌های دیپلوئید برابر ۴۶/۸۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۶۲/۱۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ بود. مطابق با روند افزایشی میزان کلروفیل، میزان فتوسنتز خالص در گیاهچه‌های شش ماهه نوروزک در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۱۱/۶۱ میکرومول دی‌اکسیدکربن بر متر مربع در ثانیه ($\mu molCO_2\ m^{-2}S^{-1}$) و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۱۵/۶۵ میکرومول دی‌اکسیدکربن بر متر مربع در ثانیه بدست آمد (جدول ۴).

نتایج مقایسه نوع و مقدار ترکیب‌های اسانس در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نوروزک

در مجموع ۱۵ ترکیب در اسانس نمونه‌های دیپلوئید و ۲۱ ترکیب در اسانس نمونه‌های تتراپلوئید نورزوک شناسایی شدند که میزان بیشتر این ترکیب‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سطح پلوئیدی قرار گرفت (جدول ۵).

جدول ۴- مقایسه میزان کلروفیل و فتوسنتز خالص در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید

شاخص‌ها	دیپلوئید خطای استاندارد ± میانگین	تتراپلوئید خطای استاندارد ± میانگین
میانگین کلروفیل **a** برگ (میلی‌گرم کلروفیل در گرم وزن تر برگ)	۳۰/۱۸ ±۰/۲۵ b	۳۹/۰۸ ± ۰/۰۸ a
میانگین کلروفیل **b** برگ (میلی‌گرم کلروفیل در گرم وزن تر برگ)	۱۶/۶۴ ± ۱/۲۲ b	۲۳/۰۸ ± ۰/۷۱ a
میانگین کلروفیل کل برگ (میلی‌گرم کلروفیل در گرم وزن تر برگ)	۴۶/۸۲ ± ۰/۷۹ b	۶۲/۱۶ ± ۱/۰۷ a
میانگین فتوسنتز هر گیاه (میکرومول دی‌اکسید کربن بر مترمربع در ثانیه)	۱۱/۶۱ ± ۰/۱۰ b	۱۵/۶۵ ± ۰/۳۱ a

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ردیف، در سطح احتمال ۵٪ آزمون SNK فاقد تفاوت معنی‌داری می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

میانگین میزان برخی از ترکیب‌ها با افزایش سطح پلوئیدی افزایش یافت. به‌طوری که میزان ۸،۱-سینئول، سیپرن، بتا-کاریوفیلن، جرماکرن دی، گاما-اودسمول و گوایول در نمونه‌های تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید بیشتر بود. همچنین ترکیب‌های آلفا-اودسمول، میرسنول، آلفا-کوپائن، آرومادندرن، گاما-مورولن، سیس-بتا-گواین و آلفا-کادینن در نمونه‌های تتراپلوئید وجود داشتند. در حالیکه نمونه‌های دیپلوئید به‌طور کلی فاقد این ترکیب‌ها بودند. از طرفی افزایش سطح پلوئیدی سبب شد که میزان برخی دیگر از ترکیب‌های اسانس به‌طور معنی‌داری کاهش یابد. این ترکیب‌ها شامل آلفا-پینن، بتا-پینن، بورنئول، آلفا-هینسول، آلفامورولول و گوایول استات می‌باشد که میانگین میزان آنها در گیاهان دیپلوئید کمتر از گیاهان تتراپلوئید می‌باشد. همچنین ترکیب‌های کامفن، آلفا و گاما-کادینن فقط در نمونه‌های دئپلوئید وجود داشتند. در حالیکه نمونه‌های تتراپلوئید به‌طور کلی فاقد این ترکیب‌ها بودند.

جدول ۵- مقایسه میانگین مقدار ترکیب‌های اسانس در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نوروزک

ردیف	نام ترکیب‌ها	ترکیب‌های اسانس دیپلوئید (٪)	ترکیب‌های اسانس تتراپلوئید (٪)
۱	α-eudesmol	۰ ± ۰/۰ b	۱/۰۴۸ ±۰/۰۰۵ a
۲	α-pinene	۴/۸۶۷ ±۰/۰۰۵ a	۳/۹۷۹ ±۰/۰۰۵ b
۳	β-pinene	۸/۶۲۳ ±۰/۰۰۵ a	۶/۶۱۹ ±۰/۰۰۵ b
۴	1,8-cineole	۵/۵۲۱ ±۰/۰۰۵ b	۷/۸۲۷ ±۰/۰۰۵ a
۵	borneol	۱/۴۸۹ ±۰/۰۰۵ a	۰/۲۴۷ ±۰/۰۰۵ b
۶	myrcenol	۰ ± ۰/۰ b	۰/۳۶۵ ±۰/۰۰۵ a
۷	α-copaene	۰ ± ۰/۰ b	۰/۷۳۸ ±۰/۰۰۵ a
۸	cyperene	۳/۲۸۹ ±۰/۰۰۵ b	۳/۹۲۷ ±۰/۰۰۵ a
۹	E-caryophyllene	۲/۰۱۹ ±۰/۰۰۵ b	۴/۰۱۴ ±۰/۰۰۵ a
۱۰	aromadendrene	۰ ± ۰/۰ b	۰/۷۱۶ ±۰/۰۰۵ a
۱۱	γ-muurolene	۰ ± ۰/۰ b	۰/۷۳۱ ±۰/۰۰۵ a
۱۲	germacren D	۳/۱۶۷ ±۰/۰۰۵ b	۵/۳۴۲ ±۰/۰۰۵ a
۱۳	cis-β-guaiene	۰ ± ۰/۰ b	۱/۱۳۲ ±۰/۰۰۵ a
۱۴	γ-cadinene	۰ ± ۰/۰ b	۴/۲۳۶ ±۰/۰۰۵ a
۱۵	trans-β-guaiene	۰ ± ۰/۰ b	۰/۹۵۷ ±۰/۰۰۵ a
۱۶	α-cadinene	۰ ± ۰/۰ b	۵/۶۴۳ ±۰/۰۰۵ a
۱۷	γ-eudesmol	۱/۰۶۱ ±۰/۰۰۵ b	۲/۴۲ ±۰/۰۰۵ a
۱۸	hinesol	۱/۷۹۴ ±۰/۰۰۵ a	۱/۵۷۲ ±۰/۰۰۵ b
۱۹	α-muurolol	۱/۶۸۸ ±۰/۰۰۵ a	۱/۲۷۷ ±۰/۰۰۵ b
۲۰	guaiol acetate	۵۵/۳۱۴ ±۰/۰۰۵ a	۳۷/۷۲۶ ±۰/۰۰۵ b
۲۱	camphene	۱/۰۸۸ ±۰/۰۰۵ a	۰ ± ۰/۰ b
۲۲	γ-cadinene	۲/۲۶۶ ±۰/۰۰۵ a	۰ ± ۰/۰ b
۲۳	δ-cadinene	۳/۲۶۴ ±۰/۰۰۵ a	۰ ± ۰/۰ b
۲۴	guaiol	۰/۶۸۹ ±۰/۰۰۵ b	۰/۸۳۵ ±۰/۰۰۵ a

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

بررسی تأثیر تیمار کلشی‌سین در مرحله چهاربرگ حقیقی بر سطوح پلوئیدی

پس از تعیین وضعیت پلوئیدی گیاهان مورد آزمایش، با طی مراحلی مانند بررسی تغییرات مورفولوژیکی و میکروسکوپی و در نهایت تجزیه فلوسایتومتریک، نتایج حاصل از آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که در این مرحله رشد غلظت و زمان کلشی‌سین بکار برده شده در این مطالعه به خوبی توانسته بود بیشتر گیاهچه‌های تیمار شده را تحت تأثیر قرار دهد. به همین دلیل درصد قابل ملاحظه‌ای گیاه پلی‌پلوئیدی (میکس‌پلوئید و تتراپلوئید) مختلف ایجاد شد. ازجمله عوامل تأثیرگذار در دو برابر شدن کروموزوم‌ها می‌توان به خصوصیات ژنتیکی، نوع ریزنمونه (Kermani *et al*., 2003؛ Petersen *et al*., 2003)، عامل ضدمیتوزی، مدت زمان تیمار، غلظت عامل ضدمیتوزی، شرایط کشت و سن ریزنمونه اشاره کرد (Dhooghe *et al*., 2010). موفقیت در دو برابر شدن کروموزوم بستگی به نفوذپذیری بافت و قابلیت انتقال عامل‌های ضدمیتوزی به بخش‌های مریستم دارد (Allum *et al*., 2007). از آنجایی که منطقه مرکزی مسئول تولید سلول‌های انتهایی ساقه است، بنابراین دو برابر کردن کروموزوم‌ها در این ناحیه باعث ایجاد بافت پلی‌پلوئید انتهایی در منطقه تیمار شده می‌گردد. از این‌رو به نظر می‌رسد گیاهان پلی‌پلوئید خالص در نتیجه دو برابر شدن موفق و مناسب سلول‌های تیمار شده در تمام لایه‌های بافتی منطقه مرکزی به‌وجود می‌آیند که در نهایت گیاهانی با سلول‌های تتراپلوئید همگن تولید می‌شود (Jones *et al*., 2008). ایجاد گیاهان میکس‌پلوئید از این نظر که مریستم گیاهان از سلول‌های زیادی تشکیل شده و ممکن است تمایل جذب کلشی‌سین نیز در آنها متفاوت باشد دور از انتظار نیست (Tambong *et al*., 1998؛ Koutoulis *et al*., 2005). از عوامل دخیل دیگر که می‌تواند در تولید گیاهان میکس‌پلوئید نقش داشته باشد، تأثیر انحصاری کلشی‌سین بر سلول‌های در حال تقسیم است. بنابراین پلی‌پلوئیدی به‌طور مساوی در تمام سلول‌های نمونه رخ نداده و میکس‌پلوئیدی را به‌همراه خواهد داشت (Wan *et al*., 1989). به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی استفاده از این روش در مرحله چهاربرگ حقیقی به‌طور چشمگیری سبب تحریک پلی‌پلوئیدی (تتراپلوئیدی و میکس‌پلوئیدی) در گیاه نوروزک گردید و در این مرحله به‌طور مؤثری سبب القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه مورد آزمایش شد. نتایج بررسی پژوهش‌های سایر محققان نشان داد که حداکثر بازدهی انگیزش گیاهان تتراپلوئید برابر با ۵۰٪ و مربوط به تیمار بذرهای آبگیری شده گیاه لوبیا با استفاده از محلول ۰/۰۰۵٪ کلشی‌سین بوده است (Joshi & Verma, 2004). در پژوهشی دیگر بازدهی تولید گیاهان تتراپلوئید ناشی از تیمار بذرهای آبگیری شده گونه‌ای از بنفشه (*Viola wittrockiana*) در نسل اول برابر با ۰/۷۳٪ گزارش شد و در روش تیمار مریستم انتهایی در مرحله تولید برگ‌های لپه‌ای، بازدهی ۲/۱۶٪ گزارش گردید (Ajalin *et al*., 2002). اندازه‌گیری ابعاد سلول روزنه به‌عنوان یک پارامتر مهم در تشخیص گیاهان تتراپلوئید از گیاهان دیپلوئید بکار می‌رود. افزایش در سطح پلوئیدی هسته اغلب باعث تغییرات آناتومیکی و ساختاری از قبیل تراکم روزنه و اندازه سلول روزنه می‌گردد (Jellings & Leech, 1984). نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش سطوح پلوئیدی سلول‌ها، طول و عرض روزنه‌ها افزایش و در نتیجه تراکم روزنه کاهش یافت. تحقیقات نشان داده که اندازه سلول‌های روزنه بیشتر از سلول‌های دیگر گیاه متأثر از عوامل ژنتیک بوده و کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد (Blakeslee & Avery ,1937). نتایج این پژوهش منطبق با نتایج پژوهش‌هایی است که گزارش کردند با افزایش سطح پلوئیدی سلول‌ها، طول و عرض روزنه برگ‌ها افزایش و در نتیجه تراکم روزنه‌ها در واحد سطح برگ کاهش می‌یابد. در همین راستا Omidbaigi و همکاران (۲۰۱۰a) گزارش کردند که میانگین اندازه طول روزنه در انواع دیپلوئید ریحان ۸/۷۰ میکرومتر و در انواع تتراپلوئید آن برابر با ۱۶/۴۵ میکرومتر بود. این محققان میانگین اندازه عرض روزنه‌ها را در گیاهان دیپلوئید برابر با ۲/۹۷ میکرومتر و در گیاهان تتراپلوئید برابر با ۱۱/۹۹ میکرومتر و میانگین تراکم روزنه‌ها را در نمونه‌های دیپلوئید ۲۰/۸ عدد در یک میلی‌متر مربع و در نمونه‌های تتراپلوئید برابر با ۷/۵۸ عدد در یک میلی‌متر گزارش کردند.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی مقایسه ارتفاع بوته گیاهان دیپلوئید با تتراپلوئید نوروزک

مطابق نتایج (جدول ۱) میانگین رشد گیاهان تتراپلوئید یک ماه پس از اعمال تیمار نسبت به انواع دیپلوئید کمتر و دارای رشد بوته‌ای متراکم‌تری بودند. این نتایج مطابق با نتایج پژوهش Omidbaigi و همکاران (۲۰۱۰a,b) روی ریحان و بادرشبی و Dijkstra و Speckmann (۱۹۸۰) روی زیره اتوتتراپلوئید، که گزارش کردند گیاهان ریحان و بادرشبی اتوتتراپلوئید در مرحله جوانی دارای رشد کمتری نسبت به همتای دیپلوئید بودند، بود. در حقیقت یک نتیجه معمول پلی‌پلوئیدی در گیاهان، کاهش تعداد تقسیمات سلولی در طی مراحل اولیه رشد و نمو است. به همین علت گیاهان تتراپلوئید سرعت رشد کمتری از انواع دیپلوئید دارند.

بررسی مقایسه وزن تر و خشک در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نوروزک

القاء تتراپلوئیدی با افزایش مقدار وزن تر و خشک شاخساره و ریشه همراه بود (جدول ۲). هر چند که در این مطالعه افزایش وزن تر چشمگیرتر است اما افزایش حدود ۵ درصدی وزن خشک شاخساره و ریشه در گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید با گزارش Lavania (۱۹۸۶) و Omidbaigi و همکاران (۲۰۱۰a) تقریباً مطابقت دارد. افزایش میانگین وزن تر و خشک شاخساره در گیاهان تتراپلوئید نوروزک نسبت به انواع دیپلوئید می‌تواند به‌دلیل دو یا سه شاخه بودن درصد بالایی از بوته‌های تتراپلوئید، بیشتر بودن میانگین تعداد، مساحت و ضخامت برگ‌ها و همچنین تغییر در نوع ترکیب آنها و افزایش میانگین وزن تر و خشک ریشه در گیاهان تتراپلوئید نوروزک نسبت به انواع دیپلوئید باشد و می‌تواند به‌دلیل افزایش فتوسنتز در اثر افزایش کارایی آن و افزایش تعداد برگ‌های گیاه، بهبود روابط آبی و هورمونی باشد که باعث افزایش مواد ذخیره‌ای بالاتر در ریشه شده است. البته کاهش درصد ماده خشک در تتراپلوئیدها با توجه به افزایش بیشتر وزن تر نسبت به وزن خشک دور از انتظار نمی‌باشد. یک مدل رایج برای توجیه تغییرات ناشی از القاء تتراپلوئیدی ازجمله افزایش میزان آب سلولی (به عبارتی افزایش وزن تر) و تولید بیوماس به این صورت است که با توجه به دو برابر شدن حجم کروماتین در سلول‌های تتراپلوئید و عدم توسعه غشای هسته به همان اندازه، میزان تماس غشای هسته با کروماتین بیشتر شده، در نتیجه افزایش فعالیت ژنی، بهبود روابط آبی، وضعیت هورمونی و افزایش سرعت فتوسنتز را به‌همراه دارد (Levin, 2002). باوجود این، درصد ماده خشک ریشه در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید تفاوت چندانی نداشته است. احتمالاً با وجود افزایش میزان وزن تر و خشک، درصد ماده خشک در قسمت ریشه بدلیل عدم تفاوت سطح پلوئیدی در این قسمت و مشابه بودن خصوصیات فیزیولوژیکی و سیتوژنتیکی تغییرات چندانی با همتای دیپلوئید نداشت.

بررسی مقایسه میزان کلروفیل و فتوسنتز خالص در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نوروزک

افزایش میزان کلروفیل در نتیجه افزایش سطح پلوئیدی که در این پژوهش مشاهده گردید در پژوهش‌های دیگر نیز مورد تأیید قرار گرفته است. به‌عنوان مثال در گیاه *Atriplex confertifolia* میزان کلروفیل در سطح پلوئیدی 4x (تتراپلوئید) بیشتر از سطح پلوئیدی 2x (دیپلوئید) برآورد شد (Warner & Gerald, 1989). همچنین در تحقیق دیگری که گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید آکاسیا (*Acacia mearnsii*) از نظر میزان کلروفیل با یکدیگر مقایسه شدند، مشاهده شد که میزان کلروفیل در گیاهان تتراپلوئید آکاسیا به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان دیپلوئید است (Mathura *et al*., 2006). از آنجا که فرض بر آن است با دو برابر شدن ژنوم فعالیت متابولیکی، سنتز rRNA و نسخه‌برداری افزایش می‌یابد، این افزایش می‌تواند (Kondorosi *et al*., 2000) بر میزان تنفس (Byrne *et al*., 1981)، فعالیت ژنی، تنوع و میزان فعالیت آنزیم‌ها و انتقال الکترون در فتوسنتز تأثیر داشته باشد (Randall *et al*., 1997). در اثر افزایش سطح پلوئیدی میزان تنفس کاهش یافته ولی فتوسنتز، فعالیت ژن و تنوع آنزیم‌ها افزایش می‌یابد (Dhawan & Lavania, 1996؛ Lavania & Strivastava, 1991). در گیاهان

www.SID.ir

Archive of SID

پلی‌پلوئید میزان فتوسنتز در هر سلول با مقدار DNA در سلول، مرتبط است. از طرفی میزان فتوسنتز به‌ازای واحد سطح برگ، حاصل تعداد سلول‌های فتوسنتزی در واحد سطح است. بنابراین چنانچه در سطوح پلوئیدی بالاتر افزایش نسبی در حجم سلول کمتر اتفاق بیفتد و نحوه قرارگیری سلول‌ها به صورتی باشد که سلول‌های بیشتری در واحد سطح قرار گیرند، میزان فتوسنتز به‌ازای واحد سطح برگ افزایش خواهد یافت (Warner & Dwards, 1993).

بررسی مقایسه نوع و مقدار ترکیب های اسانس دیپلوئید و تتراپلوئید

با توجه به نتایج بدست‌آمده مشخص شد که تغییر سطح پلوئیدی در گیاه نوروزک نسبت ترکیب‌های موجود را در اسانس تغییر داد. این امر به دلیل دو برابر شدن تعداد کروموزم‌ها و تغییر بیان ژن‌ها اتفاق افتاد. نتایج برخی از پژوهش‌ها نشان می‌دهد که افزایش سطح پلوئیدی همیشه سبب افزایش ماده مؤثره و ترکیب‌های موجود در آن نمی‌شود و در برخی مواقع کاملاً بی‌اثر بوده و یا حتی کاهش مواد مؤثره را نیز به‌دنبال داشته است. علت این پدیده می‌تواند سرکوبی برخی از ژن‌های موجود در گیاهان دیپلوئید در اثر پدیده پلی‌پلوئید شدن باشد که می‌تواند در سازوکارهای متابولیکی که بیوسنتز مواد مؤثره را تنظیم می‌کنند، اختلال ایجاد کند. به‌عنوان مثال گزارش شده است در حالی که گیاهان تتراپلوئید پونه دشتی در مقایسه با انواع دیپلوئید، ۳۰٪ افزایش اسانس داشته‌اند، در گونه‌ای دیگر از پونه با دو برابر شدن تعداد کروموزم‌ها محتوای اسانس کاهش یافت. همچنین طی آزمایش‌هایی مشخص شد که انگیزش پلی‌پلوئیدی در گیاه گل‌انگشتانه ارغوانی، محتوای گلیکوزیدهای آن را تغییر نداد و حتی تا حدی باعث کاهش میزان آنها شد (Dhawan & Lavania, 1996). در مطالعه Dehghan و همکاران (۲۰۱۲) افزایش حدود ۳۰۰ درصدی اسکوپولامین در نسل پنجم گیاهان تتراپلوئید بذرالبنج مصری مشهود بود. به عبارتی پلی‌پلوئیدی با افزایش تبدیل هیوسیامین به اسکوپولامین در این گیاه همراه بود. البته افزایش سطح پلوئیدی در کشت‌های ریشه مویین این گیاه نیز تغییر الگوی تولید این ترکیب‌ها را به‌همراه داشت.

منابع مورد استفاده

- Ajalin, I., Kobza, F. and Dolezel, J., 2002. Ploidy identification of doubled chromosome number plants in *Viola* × *witrockiana* Gams. M_1-generation. Horticultural Science, 29(1): 35-40.
- Allum, J.F., Bringloe, D.H. and Roberts, A.V., 2007. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of in vitro nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. Plant Cell Reports, 26: 1977-1984.
- Blakeslee, A.F. and Avery, A.G., 1937. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants by treatment with colchicines. Journal of Heredity, 29: 393-411.
- Byrne, M.C., Nelson, C.J. and Randall, D.D., 1981. Ploidy effects on anatomy and gas exchange of tall fescue leaves. Plant Physiology, 68: 891-893.
- Cukrova, V.N. and Avratovscukova, N., 1968. Photosynthetic activity, chlorophyll content and stomata characteristics in diploid and polyploidy types of *Datura stramonium* L. Photosynthetica, 2(4): 227-237.
- Dehghan, E., Hakkinen, S., Oksman-Caldentey, M. and Shahriari Ahmadi, F., 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.
- Dhawan, O.P. and Lavania, U.C., 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. Euphytica, 87: 81-89.
- Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, V. and Van Huylenbroeck, J., 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. Journal Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104: 359-373.
- Dijkstra, H. and Speckmann, G.I., 1980. Autotetrapliody in caraway (*carum carvi* L.) for the increase of the aetheric oil content of the seed. Euphytica, 29(1): 89-96.
- Gonzalez, L.D.J. and Weathers, P.J., 2003. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. Plant Cell Reports, 21: 809-811.
- Hosseinzadeh. H., Hadadkhodaparast, M.H. and Arash, A., 2003. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Salvia leriifolia* Benth.

www.SID.ir

Archive of SID

- Omidbaigi, R., Yavari, S., Hassani, M. E. and Yavari, S., 2010b. Induction of autotetraploidy in Dragonh (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatments. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18(1): 23-35.
- Petersen, K.K., Hagberg, P. and Kristiansen, K., 2003. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. Plant Cell Tissue Organ Culture, 73: 137-146.
- Randall, D.D., Nelson, C.J. and Asay, K.H., 1977. Ribulose bisphophate carboxylase altered expression in tall fescue. Pant Pysiology. 59: 38-41.
- Sari, N., Abak, K. and Pitrat, M., 1999. Comparison ploidy level screening methods in watermelon. Scientia Horticulturae, 82: 265-277.
- Stoskopf, N.C., Tomes, D.T. and Chrisite, B.R., 1993. Plant Breeding, Theoroy and Practice. Westview Press, Boulder USA, 533p.
- Tabatabaei Yazdi, F., 1996. Study the effects of anti-oxidant *Salvia leriifolia* essential and leaf extracts as well as identification of phytochemical that. Master Thesis Chemistry, College of Science, Ferdosi Mashhad University.
- Tambong, J.T., Sapra, V.T. and Garton, S., 1998. In vitro induction of tetraploids in colcchicine-treated cocoyam plantlets. Euphytica, 104: 191-197.
- Wan, Y., Petolino, J.F. and Widholm J.M., 1989. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. Theoretical and Applied Genetics, 77: 889-892.
- Warner, D.A and Gerald, E.E., 1989. Effects of Polyploidy on Photosynthetic Rates, Photosynthetic Enzymes, Contents of DNA, Chlorophyll, and Sizes and Numbers of Photosynthetic Cells in the C4 Dicot *Atriplex confertifolia*. Plant Physiology, 91: 1143-1151.
- Warner, D. and Dwards, G.E.E., 1993. Effects of polyploidy on photosynthesis. Photosynthesis Research, 34(2): 135-147.
- Xiuyan, L., Yin, Z., Jianjun, Z., Xu, L., Fangyuan, Z., Qian, Sh., Shaoyan, W., Yunfei, Ch. and Tao, W., 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: 50-57.
- Yavari, S., 2008. Study the effect of colchicine on morphological, physiological and essential oil active ingredients traits in *Dracocephalum moldavica*. Master Thesis, Tarbiat Modares University.

seed extract in mice and rats. Phytotherapy Research, 17: 422-425.
- Janaki Amal, E.R. and Sobti, S.M., 1962. The origin of the Jammu Mint. Current Science, 31: 387-388
- Jellings, A.J. and Leech, R.M., 1984. Anatomical variation in first leaves of nine *Triticum* genotypes, and its relationship to photosynthetic capacity. New Phytologist, 96: 371-382.
- Jones, J.R., Ranney, T.G. and Eaker, T.A., 2008. A novel method for induction polyploidy in rhododendron seedlings. Journal American Rhododendron Society, 62(3): 130-135.
- Joshi, P. and verma, R.C., 2004. High freguency production of colchicine induced autotetraploids in faba bean (*Vicia faba* L.). Cytologia, 69(2): 144-147.
- Kermani, M.J., Sarasan, V., Roberts, A.V., Yokoya, K., Wentworth, J. and Sieber, V.K., 2003. *Oryzalin-induced* chromosome doubling in Rosa and its effect on plant morphology and pollen viability. Theoretical Applied Genetics, 107(7): 1195-1200.
- Kondorosi, E., Roudier, F. and Gendrau, E., 2000. Plant cell-size: growing by ploidy? Current Opinion in Plant Biology, 3(6): 488-492.
- Koutoulis, A., Roy, A.T., Price, A., Sherriff, L. and Leggett, G., 2005. DNA ploidy level of colchicines-treated hops (*Humulus lupulus* L.). Scientia Horticulturae, 105(2): 263-268.
- Lavania, U.C. and Strivastava, S., 1991. Enhanced productivity of tropane alkaloids and fertility in artificial autotetraploids of (*Hyoscyamus niger* L). Euphytica, 52(2): 73-77.
- Lavania, U.C., 1986. Enhanced productivity of the essential oil in the artificial autotetraploid of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.). Euphytica, 38(3): 271-276.
- Levin, D.A., 2002. The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution. Oxford University Press,450p.
- Levin, D.A., 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. American Naturalist, 122: 1-25.
- Mathura, S., Fossey, A. and Beck, S., 2006. Comperative study of chlorophyll content in diploid and tetraploid black Wattle (*Acacia mearnsii*). Forestry, 79(4): 381-388.
- Omidbeigi, R, 2008. Production and Processing Medicinal Plants (Vol. 1). Astan Ghodes Mashhad, Mashhad, 348p.
- Omidbaigi, R., Mirzaee, M., Hassani, M.E. and Sedghi Moghadam, M., 2010a. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal of Plant Production, 4(2): 87-98.

www.SID.ir

Archive of SID

Study on colchicine treatment effects on some morphological and physiological characteristics and active substances in *Salvia leriifolia* Benth.

A.R. Estaji[1], B. Hosseini[2*], E. Dehghan[3] and A. Estaji[4]

1- M.Sc. gratuate, Department of Horticulture, Faculity of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2*- Corresponding author, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
E-mail: b.hosseini@urmia.ac.ir
3- Ph.D. gratuate, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
4- Ph.D. Student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Received: January 2015 Revised: December 2015 Accepted: January 2016

Abstract

Salvia leriifolia Bent., belonging to Lamiaceae family, is a perennial herbaceous plant, which is endemic to Khorasan and Semnan provinces of Iran. Different pharmacological activities of this plant have been evaluated in recent years. Induction of polyploidy is an important technique for breeding of medicinal and aromatic plants. In the present study, we studied the effects of colchicine on morphological and physiological characteristics and chemical compositions of *Salvia leriifolia*. Polyploidy induction was carried out in the four-leaf stage. Apical meristem was treated by colchicine at concentrations of 0, 0.05, 0.1, 0.2, and 0.5%, and three different time levels of 24, 48 and 72 hours. Morphological, microscopic (light and electron), flow cytometric analysis and chromos counting were used for ploidy induction analysis and selection of induced tetraploids. Identification of essential oil compounds was carried out by gas chromatograph and gas chromatography mass spectrometry methods. According to the results, colchicines at a concentration of 0.05% for 48 hours at four-true-leave stage was the best treatment for induction of autotetraploidy (23.3%) in *Salvia leriifolia.* Tetraploid induction in *Salvia leriifolia* caused significant changes in morphological, cytological, physiological and physiochemical characteristics such as increased dry and fresh weight, chlorophyll content, photosynthesis, and decreased plant height. In addition, an increase in ploidy level caused significant changes in essential oil composition.

Keyword: *Salvia leriifolia* Bent., colchicine, polyploidy, flow cytometry.

www.SID.ir