Archive of SID

مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2020.341489.2705

جلد ۳۶، شماره ۴، صفحه ۵۸۹-۵۷۲ (۱۳۹۹) | شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1399.36.572.102.4.1575.101

اثر تیمار کلشی‌سین و القای پلی‌پلوئیدی، بر اجزای عملکرد و برخی ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی *Lavandula stricta* Delile

حبیبه نوری داشلی‌برون[۱]، سارا خراسانی‌نژاد[۲*]، سید جواد موسوی‌زاده[۳] و محمدحسین میرجلیلی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

پست‌الکترونیک: khorasaninejad@gau.ac.ir؛ skhorasaninejad@yahoo.com

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۴- دانشیار، گروه مهندسی کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۸ | تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۹۹ | تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۹

چکیده

اسطوخودوس (*Lavandula stricta* Delile) یکی از گونه‌های بومی ایران می‌باشد که در مناطق جنوبی ایران رشد می‌کند. القاء پلی‌پلوئیدی با استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا مانند کلشی‌سین، به‌عنوان یکی از روش‌های اصلاح گیاهان دارویی است که قابلیت زیادی برای استفاده از این فرایندهای تکاملی طبیعی برای بهبود محصول هدفمند وجود دارد. برای بررسی امکان‌سنجی القای پلی‌پلوئیدی در گیاه دارویی اسطوخودوس افراشته، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو تیمار کلشی‌سین در پنج غلظت (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ درصد) به‌صورت ژل روی مریستم انتهایی گیاه و چهار زمان (۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت) با سه تکرار و ۲۰ واحد آزمایشی، در شرایط گلخانه‌ای اجرا شد. برای مشاهده تأثیر کلشی‌سین بر خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی در زمان گلدهی، طول اندام هوایی، تعداد برگ اصلی، تعداد برگ فرعی، تعداد میانگره ساقه اصلی، تعداد ساقه فرعی، طول سنبله، تعداد سنبله‌ها، تعداد گل در خوشه، وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه، طول ریشه، سطح برگ، طول میانگره، محتوای فنل کل، میزان فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان قند کل و کیفیت کلروفیل اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمارهای مورد بررسی روی تمامی صفات بجز تعداد برگ اصلی و تعداد میانگره ساقه اصلی و طول ریشه اختلاف معنی‌دار داشت. به‌طوری که نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد با افزایش غلظت و مدت زمان اعمال کلشی‌سین، ارتفاع، طول میانگره، تعداد گل و میزان قند کل کاهش و طول سنبله خوشه اصلی و محتوای فنل کل افزایش یافت. بررسی‌های فیلوسایتومتری نشان داد که میانگین اندازه ژنوم ۰/۷۳ پیکوگرم در گیاهان تحت تیمار کلشی‌سین با غلظت ۰/۴٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت بدست آمد، در حالی‌که میانگین اندازه ژنوم در تیمار شاهد ۰/۵۵ پیکوگرم بود. بقیه گیاهان تیمارشده در زمان و غلظت‌های متفاوت میانگین اندازه ژنوم ۰/۵۷ را نشان داد. به‌طور کلی از نتایج این آزمایش برآورد می‌شود که اسطوخودوس افراشته برای القای پلی‌پلوئیدی به کلشی‌سین پاسخ مثبت نشان داده‌است و چشم‌انداز روشنی در اصلاح این گیاه با افزایش سطح پلوئیدی آن به این روش وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: سطح برگ، فلاونوئید کل، فیلوسایتومتری، فنل کل، طول سنبله.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

جنس *Lavandula* spp. یا اسطوخودوس دارای ۳۹ گونه است که موطن اصلی این گیاه اروپا، آسیا، آفریقا، آمریکا، استرالیا و زلاندنو بوده و در ایران برخی گونه‌های این جنس در منطقه وسیعی از نواحی شمالی ایران، تهران، منجیل رودبار و بسیاری نقاط دیگر یافت می‌شود (Golfakhrabadi *et al.*, 2017). این جنس در ایران دو گونه چندساله چوبی به‌نام‌های اسطوخودوس افراشته (*L. stricta* Del.) و اسطوخودوس فلس‌دار (*L. sublepiduta* Rech.) دارد که بومی ایران هستند و در مناطق جنوبی ایران می‌رویند (Mozaffarian, 2004). اسطوخودوس افراشته با نام‌های "اسطوخودوس راست" (Sanginabadi *et al.*, 2016)، "اسطوخودوس شاهی" (Eivazi *et al.*, 2015؛ Mazloomi Abukhyl *et al.*, 2017) و "اسطوخودوس لارستانی" (Mozaffarian, 2004) هم شناخته شده‌است. همچنین این گیاه دارای نام‌های علمی مترادف به‌صورت *Lavandula coronopifolia* Poir و *Isinia laristanica* می‌باشد (Jamzad *et al.*, 2013). از نظر گیاه‌شناسی، دارای بوته‌ای با قاعده چوبی، به ارتفاع ۴۵ تا ۲۰۰ سانتی‌متر و ساقه در قسمت‌های پایینی منشعب، گیاه پوشیده از کرک‌های ساده کوتاه و کرک‌های زگیل مانند غده‌دار و برگ‌ها با بریدگی‌های عمیق می‌باشد (Jamzad *et al.*, 2013). خواص درمانی جنس اسطوخودوس عمدتاً ناشی از فعالیت اسانس این گیاه است، کاربرد دارویی آن به‌عنوان ضدقارچی، ضدویروسی، آنتی‌اکسیدانی و فعالیت‌های آرام‌بخش و ضدافسردگی می‌باشد که می‌تواند جایگزینی برای قرص‌های ضدافسردگی باشد (Nikfarjam *et al.*, 2009). در استان هرمزگان از برگ، گل و ساقه اسطوخودوس افراشته برای درمان درد مفاصل، دل‌پیچه و زکام استفاده می‌شود (Soltanipour, 2005). باتوجه به اهمیت و افزایش کاربرد جهانی گیاهان دارویی در زمینه‌های دارویی، غذایی و آرایشی بهداشتی از یکسو و محدودیت منابع تولید آنها از سوی دیگر، محققان راغب به استفاده از روش‌های اصلاحی شده‌اند که علاوه‌بر افزایش عملکرد، کمّیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه را نیز مطابق اهداف تغییر دهند. دستورزی سطح پلوئیدی، ابزار توانمندی در اصلاح ژنتیکی بسیاری از گیاهان است (Madon *et al.*, 2005) که از گذشته به‌عنوان یک روش مهم در تکامل گونه‌های گیاهی در نظر گرفته شده است و نقش کلیدی در تنوع گونه‌های گیاهی دارد (Mishra *et al.*, 2010). القای پلی‌پلوئیدی امکان دستیابی به ژنوتیپ‌های جدید را با صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی دارد (Shmeit *et al.*, 2010). خواص پلی‌پلوئیدی اغلب صفات فنوتیپی جدید و ارزشمند را در مقایسه با اجداد دیپلوئید خود نشان می‌دهد، القای تتراپلوئیدی به‌عنوان یک روش برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی نیز استفاده می‌شود (Javadian *et al.*, 2017). به‌طوری که در کتان سفید (*Linum album* Kotschy ex Boiss.) القای پلی‌پلوئیدی باعث افزایش ماده مؤثره پودوفیلوتوکسین در این گیاه گردید (Javadian *et al.*, 2017). همچنین گزارش شده‌است برخی خصوصیات مورفولوژیک و میزان تیمول در اسانس در گیاه دارویی زنیان (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague) تتراپلوئید نسبت به نوع دیپلوئید برتر بوده‌است (Sadat Noori *et al.*, 2017). امروزه القای پلی‌پلوئیدی با استفاده از کلشی‌سین مرسوم است، به‌طوری که در تحقیقی برای القا پلی‌پلوئیدی خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum* Lindl.) غلظت ۰/۲٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت بیشترین بازده را نشان داد. همچنین سبب افزایش ترکیب‌های فیتوشیمیایی مانند فنل کل، فلاونوئید کل و آنتی‌اکسیدان کل در گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید گردید (Madani *et al.*, 2019). در تحقیقی که روی لاله واژگون گرگانی (*Fritillaria raddeana* Regel) انجام شد، با وجود تغییراتی که در غلظت ۰/۰۱٪ در تعداد روزنه و سرعت رشد وجود داشت، تعداد کروموزوم‌ها تغییری نکرده و القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان تیمارشده مشاهده نشد (Salahi Sadr *et al.*, 2018)، به‌طوری که حکایت از آن دارد که برای دو برابر کردن کروموزوم‌ها، مواد و

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که ممکن است در برخی گونه‌ها نه‌تنها پلی‌پلوئیدی القاء نشود، بلکه نتیجه‌ای برخلاف نتایج معمول نیز بدست آید (Salahi Sadr *et al.*, 2018). کلشی‌سین، یک آمین‌آلکالوئید سه حلقه‌ای مشتق شده از پیازهای گل حسرت (*Colchicum autumnale* L.) است که مهمترین عامل شیمیایی برای القای پلی‌پلوئیدی است و در سطح وسیعی بکار می‌رود. این ماده از تشکیل و پلیمرشدن میکروتوبول‌ها، از طریق پیوند با زیرواحد پروتئینی میکروتوبولی به نام توبولین ممانعت می‌کند، بنابراین کروموزوم‌ها در مرحله متافاز، یک‌جا وارد سلول می‌شوند که این امر آن را به یک القاءگر فعال پلی‌پلوئیدی تبدیل کرده است (Afshari *et al.*, 2014). در تحقیق دیگری برای القای پلی‌پلوئیدی در سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) از طریق تیمار بذر، بیشترین درصد گیاهان تتراپلوئید در غلظت ۰/۰۵٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت مشاهده شده است که ویژگی‌های مورفولوژیک مانند ارتفاع بوته، فواصل میانگره و طول و عرض کپسول در آنها نسبت به گیاهان شاهد دیپلوئید بالاتر بود (Zishan *et al.*, 2016).

در همین ارتباط در القای پلی‌پلوئیدی گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) بیشترین تغییرات در غلظت ۰/۰۵٪ و در مدت زمان ۱۲ ساعت گزارش گردید (Afshari *et al.*, 2014). باتوجه به اینکه امروزه یکی از اهداف مهم متخصصان یافتن گونه‌های جدید گیاهی، توسعه استعدادهای ژنتیکی و همچنین یافتن شیوه‌هایی برای افزایش مواد مؤثره گیاهان دارویی است (Sadat Noori *et al.*, 2017) و با عنایت به پراکنش محدود، مصرف فراوان و صادرات سنتی اسطوخودوس افراشته به کشورهای حوزه خلیج‌فارس و دریای عمان و برداشت بی‌رویه از رویشگاه‌های طبیعی که موجب فرسایش ژنتیکی و از بین رفتن ذخائر ژنتیکی آن می‌شود (Sanginabadi *et al.*, 2016)، لازم است اقداماتی برای برنامه‌ریزی دقیق در مورد این گونه انجام شود. در همین راستا، این پژوهش در جهت بررسی امکان‌سنجی القای پلی‌پلوئیدی در گیاه اسطوخودوس افراشته با ماده ضدمیتوزی کلشی‌سین و چگونگی ایجاد تغییرات بر اجزای عملکرد و ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشمیایی آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

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

تهیه مواد گیاهی و کاشت

بذرهای اسطوخودوس افراشته از پایه‌های مادری در رویشگاه‌های طبیعی از منطقه حفاظت شده گنو (بین ۲۷ درجه و ۱۸ دقیقه و ۲۷ درجه و ۲۹ دقیقه عرض شمالی و ۵۶ درجه و ۱۸ دقیقه و ۵۵ درجه و ۵۶ دقیقه طول شرقی، ارتفاع ۲۲۰ متر از سطح دریا) واقع در شهرستان بندرعباس، استان هرمزگان در جنوب کشور ایران جمع‌آوری گردید. پس از بوجاری، بذرها در بستر خاکی در گلدان‌های بزرگ (قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر) با مخلوط خاک، ورمی‌کمپوست و پرلیت (۴:۱:۱) در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

طرح آزمایشی و اعمال تیمارها

سه هفته بعد از جوانه‌زنی بذرها (اردیبهشت ماه ۱۳۹۶)، در مرحله چهار تا شش برگی، تیمار کلشی‌سین با غلظت‌های (۰/۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد (وزنی/حجمی) و زمان

www.SID.ir

Archive of SID

(۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸ ساعت) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط تاریک انجام گردید و نحوه اعمال کلشی‌سین به‌صورت تزریق مستقیم ژله حاوی ماده جهش‌زا به قسمت مریستم بود. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح آزمایشی کامل تصادفی با سه تکرار که هر تکرار شامل حداقل ۲۰ بوته بود، انجام شد. در مدت چهار ماه تا زمان رسیدن به مرحله زایشی (مرداد ماه ۱۳۹۶)، مراحل نگهداری از قبیل وجین علف‌های هرز، آبیاری و سله‌شکنی به‌طور مرتب انجام شد. دمای گلخانه در تمام مدت آزمایش به‌صورت دمای روزانه ۲۶ و دمای شبانه ۲۰ درجه سانتی‌گراد حفظ شد. ثبت تمامی اجزای عملکرد و صفات مورفولوژیک و بیوشیمیایی در زمان گلدهی کامل انجام گردید.

ارزیابی اجزای عملکرد و صفات مورفولوژیک

برای ارزیابی صفاتی مانند تعداد برگ، تعداد میانگره ساقه اصلی، تعداد ساقه فرعی، تعداد گل سنبله اصلی و تعداد کل سنبله‌ها با شمارش ثبت گردید. طول میانگره، طول سنبله ساقه اصلی، ارتفاع اندام هوایی و طول ریشه راست با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد. پس از تکمیل رشد گیاه در مرحله گلدهی، بوته‌ها به‌طور کامل به‌همراه ریشه از گلدان‌ها خارج و با آب شسته شدند، سپس طول ریشه و اندام هوایی و وزن تر اندام هوایی و ریشه اندازه‌گیری شد. برای تعیین وزن خشک اندام هوایی و ریشه، این اندام‌ها در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند و بعد وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد (Khorasaninejad *et al.*, 2018). برای اندازه‌گیری شاخص سطح برگ نیز در مرحله تکمیل رشد رویشی و شروع مرحله زایشی، قبل از ظهر از هر تکرار یک گیاه به‌طور تصادفی انتخاب شد و سطح برگ آنها توسط دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ (Delta T Device, Cambridge, UK) اندازه‌گیری و میانگین آنها محاسبه شد.

ویژگی‌های فیتوشیمیایی

برای ارزیابی ویژگی‌های فیتوشیمیایی ابتدا عصاره متانولی تهیه گردید، به‌طوری که پس از سایه خشک شدن نمونه‌ها، آنها با آسیاب برقی به‌صورت پودرشده درآمده و از هر نمونه به مقدار یک گرم در ۱۰ میلی‌لیتر حلال متانول (۸۰٪) حل گردید. سپس نمونه‌ها روی شیکر در دمای اتاق به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. آنگاه محتویات هر نمونه جداگانه توسط کاغذ صافی صاف گردید و در دور ۳۱۰۰ به‌مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شد (Rohloff *et al.*, 2015).

برای اندازه‌گیری فنل کل، ابتدا ۲۰ میکرولیتر از عصاره متانولی (یک گرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪) با ۱۰۰ میکرولیتر فولین‌سیوکالتیو و ۱/۱۶ میلی‌لیتر آب‌مقطر مخلوط شده و پس از ۵ تا ۸ دقیقه استراحت، ۳۰۰ میکرولیتر کربنات‌سدیم یک مولار (۱۰/۶ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر) به آن اضافه شد. محلول یادشده به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و حمام بخار ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای شاهد نیز به‌جای عصاره، از متانول ۸۰٪ استفاده شد و از این محلول برای کالیبره‌کردن دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (USA UVVRS.Spectrophotometr, 2008) استفاده شد و بعد جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های متفاوت استاندارد گالیک اسید، از محلول گالیک اسید در متانول:آب (۵۰:۵۰) استفاده گردید (Barreca *et al.*, 2016).

برای محاسبه محتوای فلاونوئیدی از روش Chang و همکاران (۲۰۰۲) استفاده شد. ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی تهیه شده با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰٪ در اتانول (۱۰ گرم آلومینیوم کلرید در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول و آب مقطر)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات‌پتاسیم یک مولار (۲/۴۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. برای تهیه شاهد به‌جای عصاره متانولی، تنها از متانول خالص استفاده شد. سپس

www.SID.ir

Archive of SID

مخلوط نیم‌ساعت در تاریکی قرار داده شده و بعد بلافاصله در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. میزان فلاونوئید کل براساس منحنی استاندارد کوئرستین تعیین شد. به این منظور غلظت‌های مختلف از استاندارد کوئرستین ساخته شده از رابطه خط بدست‌آمده برای تعیین میزان فلاونوئید درصد گرم ماده خشک استفاده گردید (Chang *et al*., 2002).

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH طبق روش Lalegani و همکاران (۲۰۱۸) با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد. روش کار به این صورت بود که ابتدا عصاره اولیه را با متانول رقیق نموده و بعد ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره و ۹۰۰ میکرولیتر از محلول متانولی ۰/۱ مولار رادیکال DPPH مخلوط شد و به‌مدت نیم‌ساعت در تاریکی قرار داده شد. سپس جذب آن در ۵۱۶ نانومتر قرائت شد. آنگاه توانایی مهار رادیکال‌های DPPH با استفاده رابطه ۱ محاسبه گردید.

رابطه ۱ $\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = \frac{(Ac-As)}{Ac} \times 100$

در این رابطه، As و Ac به‌ترتیب برابر با عدد جذب نمونه و کنترل می‌باشد. اعداد بدست‌آمده برابر با درصد مهار رادیکال‌های آزاد در عصاره آبی نمونه‌هاست (Lalegani *et al*., 2018).

فیلوسایتومتری

برای مطالعات فرایند فلوسایتومتری از گیاه تربچه (*Raphanus sativus*) به‌عنوان گیاه استاندارد مرجع و رنگ‌آمیزی با رنگ پروپیدیم یدید (PI) استفاده شد (Loureiro *et al*., 2007). پس از خرد کردن گیاه نمونه و گیاه استاندارد تربچه در یک میلی‌لیتر از بافر دیبلو پی‌بی، سوسپانسیون هسته‌های حاصل با استفاده از سمپلر ۱۰۰۰ بافر از فیلتر نایلون مش ۵۰ و ۳۰ میکرومتری عبور داده شد، این کار برای حذف قطعات بزرگ و بقایای بافت‌ها استفاده شد، سپس ۵۰ ماکرولیتر آر ان ایز (برای جلوگیری از رنگ‌آمیزی RNA) و بعد ۵۰ ماکرولیتر پروپیدیم یدید (PI) برای رنگ‌آمیزی هسته‌ها اضافه گردید (Loureiro *et al*., 2007). سوسپانسیون هسته در دستگاه فلوسایتومتری دانشگاه تربیت‌مدرس مدل BD FACSCanto™ (Biosciences, Bedford, MA) KE ساخت آمریکا تجزیه‌وتحلیل شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج

اجزای عملکرد و ویژگی‌های مورفولوژیک

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل غلظت و زمان بجز تعداد برگ اصلی، تعداد میانگره ساقه اصلی و طول ریشه راست، بر بقیه صفات یعنی بر طول اندام هوایی، تعداد برگ فرعی، تعداد ساقه فرعی، طول سنبله (ساقه اصلی گل‌دهنده)، تعداد سنبله‌ها (تعداد خوشه گل در کل گیاه، تعداد گل در خوشه (ساقه اصلی)، وزن تر اندام هوایی، وزن تر ریشه، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی، میانگین سطح برگ و میانگین طول میانگره در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد. همچنین اثر متقابل غلظت و زمان بر همه صفات اندازه‌گیری شده بجز طول ریشه راست، تعداد برگ اصلی و تعداد میانگره، بر باقی صفات اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ داشته است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت و مدت اعمال کلشی‌سین بر اجزای عملکرد، ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی اسطوخودوس‌افراشته

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات									
		ارتفاع اندام هوایی	طول میانگره	طول ریشه راست	تعداد برگ اصلی	تعداد برگ فرعی	تعداد میانگره (ساقه اصلی)	تعداد ساقه فرعی	طول سنبله (ساقه اصلی گل‌دهنده)	تعداد سنبله‌ها (تعداد در کل گیاه)	تعداد گل در خوشه (ساقه اصلی)
غلظت	۴	۶۹۱**	۱۲**	۱۵**	۴ns	۳۷۸۱**	۱۹**	۴ns	۲۹**	۰/۳۱ns	۷۳**
زمان	۳	۵۵۱**	۵**	۶*	۲۹ns	۱۴۳۱**	۱۱*	۴۹**	۳۱**	۹**	۱۴۱**
زمان× غلظت	۱۲	۷۷**	۶**	۲ ns	۱۲ ns	۴۴۵**	۳ ns	۷**	۱۳**	۴**	۱۳۲**
خطا	۴۰	۱۴	۰/۶	۱	۱۲	۳۰	۳	۲	۱	۰/۸	۱۱
ضریب تغییرات		۷	۱۶	۱۵	۱۵	۱۰	۱۳	۱۹	۱۹	۲۱	۱۶

ادامه جدول ۱-

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات									
		وزن تر اندام هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه	سطح برگ	فنل کل	فلاونوئید کل	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH)	قند کل	کیفیت کلروفیل (اسپد)
غلظت	۴	۱۱**	۰/۰۳**	۰/۶۹**	۰/۰۰۴**	۱/۱ns	۰/۶**	۰/۲۶ns	۰/۰۰۱*	۰/۰۰۱**	۱/۶ns
زمان	۳	۱۸**	۰/۰۵**	۱/۶**	۰/۰۱**	۴ **	۱/۴**	۱/۵**	۰/۰۰۱*	۰/۰۰۱**	۸**
زمان× غلظت	۱۲	۶**	۰/۰۰۸**	۰/۲۸**	۰/۰۰۱**	۲**	۰/۲**	۰/۲۲ns	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۱**	۲*
خطا	۴۰	۶/۰	۰/۰۰۱	۰/۰۵	۰	۵/۰	۰/۰۴	۰/۱	۰	۰	۰/۸
ضریب تغییرات		۲۰	۱۶	۲۰	۱۴	۱۹	۱۳	۱۶	۱۱	۷	۱۷

**: معنی‌دار بودن در سطح ۱٪، *: معنی‌دار بودن در سطح ۵٪ و ns: عدم معنی‌داری

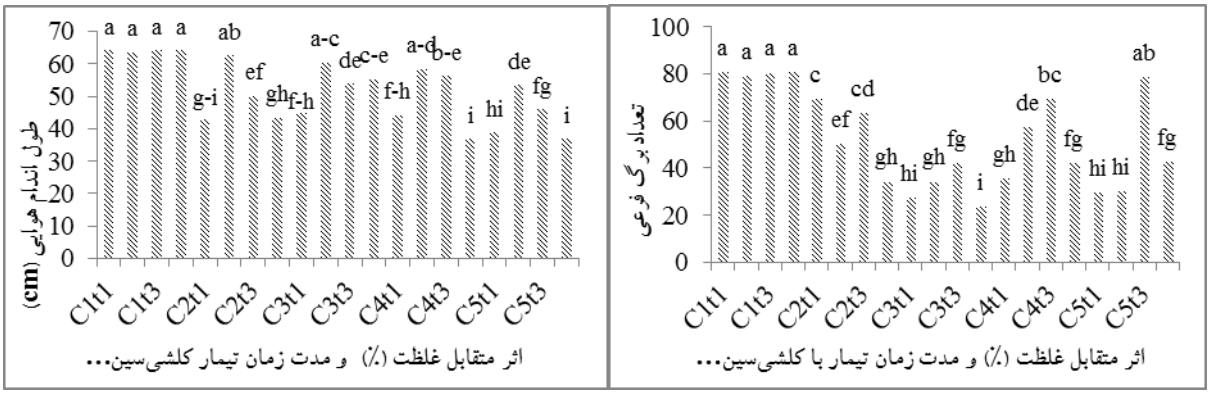
www.SID.ir

Archive of SID

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل غلظت‌های متفاوت کلشی‌سین و مدت زمان اعمال تیمار بر ارتفاع اندام هوایی در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار است. مدت زمان اعمال کلشی‌سین نشان داد که ابتدا با افزایش مدت زمان القاء از ۸ ساعت به ۱۶ ساعت در تمامی غلظت‌ها یک افزایش معنی‌دار در ارتفاع اندام هوایی بوجود می‌آید، سپس برای مدت زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت یک روند کاهش ارتفاع وجود دارد که در مدت زمان ۴۸ ساعت با غلظت‌های ۰/۴٪ و ۰/۲٪ به کمترین مقدار خود رسیده است (شکل ۱).

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثرهای متقابل غلظت‌های متفاوت کلشی‌سین و مدت زمان اعمال تیمار بر تعداد برگ فرعی دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ می‌باشد ولی بر تعداد برگ اصلی اختلاف معنی‌داری نداشته است. اثر متقابل مدت زمان و غلظت‌های متفاوت کلشی‌سین نشان می‌دهد که در غلظت‌های بالاتر با افزایش مدت زمان اعمال کلشی‌سین در غلظت‌های ۰/۱٪، ۰/۲٪ و ۰/۴٪ یک روند افزایشی در تعداد برگ فرعی وجود دارد و در زمان ۲۴ ساعت به بیشترین مقدار خود در غلظت‌های مختلف رسیده و بعد یک روند کاهشی از مدت زمان ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت وجود دارد. به‌نحوی که کمترین مقدار ثبت شده برای این صفت غلظت ۰/۱٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت بوده است (شکل ۱).

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثرهای متقابل غلظت و زمان بر تعداد ساقه فرعی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ می‌باشد. در برخی از تیمارها افزایش تعداد ساقه فرعی نسبت به شاهد وجود دارد که در غلظت ۰/۰۵٪ و غلظت ۰/۴٪ با افزایش مدت زمان اعمال تیمار تعداد ساقه فرعی افزایش یافته است ولی در دو غلظت ۰/۱٪ و ۰/۲٪ با افزایش مدت زمان اعمال تیمار تعداد ساقه فرعی کاهش یافته‌است. همچنین در مدت زمان هشت ساعت در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد در تعداد ساقه فرعی روند کاهشی مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۱– اثر متقابل تیمار کلشی‌سین و مدت زمان اعمال آن بر ارتفاع اندام هوایی (چپ) و تعداد برگ فرعی (راست) اسطوخودوس افراشته

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.

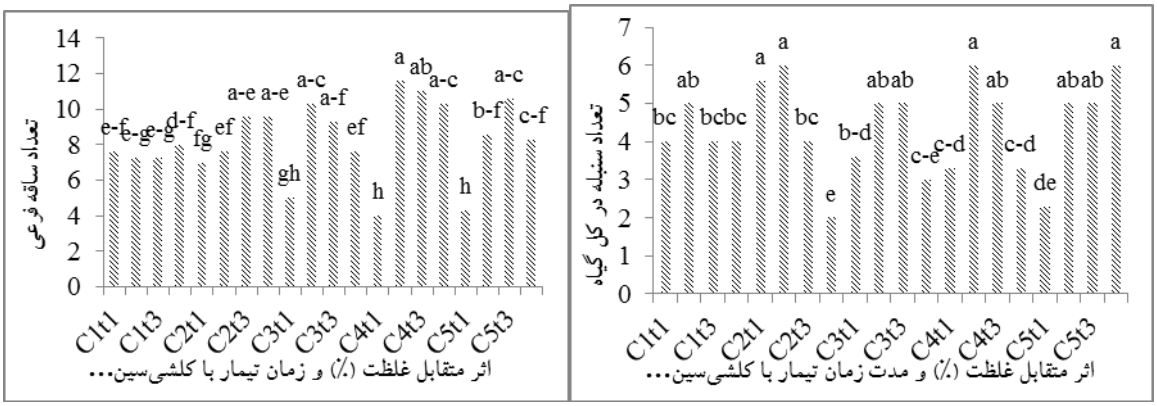
C1: تیمار شاهد (غلظت صفر)، C2: غلظت ۰/۰۵٪، C3: غلظت ۰/۱٪، C4: غلظت ۰/۲٪ و C5: غلظت ۰/۴٪ کلشی‌سین؛

t1: مدت زمان ۸ ساعت، t2: مدت زمان ۱۶ ساعت، t3: مدت زمان ۲۴ ساعت و t4: مدت زمان ۴۸ ساعت

www.SID.ir

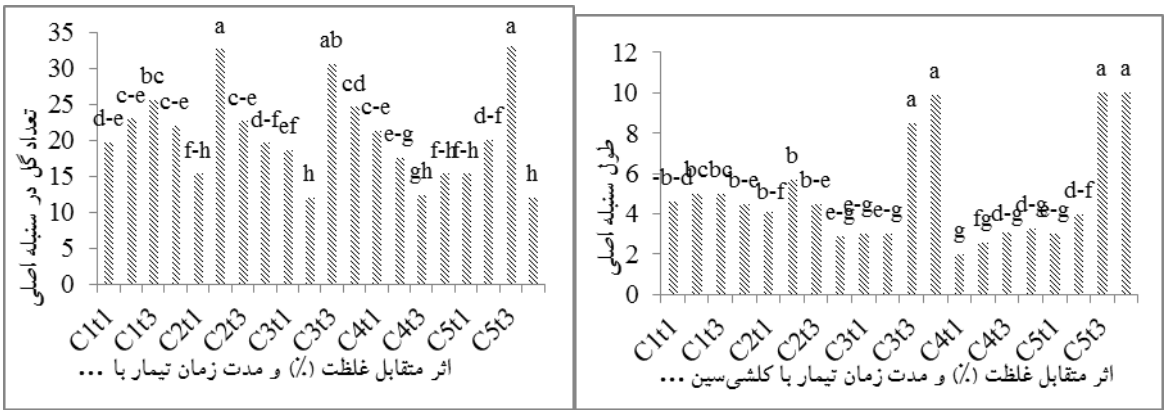
Archive of SID

اثر متقابل غلظت و زمان بر تعداد سنبله اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ داشت. در مدت زمان ۱۶ و ۲۴ ساعت تعداد سنبله‌ها در این دو مدت زمان برابر یا کمی کاهش داشته است و همین کاهش در تعداد سنبله‌ها در مدت زمان ۴۸ ساعت هم ادامه یافته است (شکل ۲).



شکل ۲- اثر متقابل تیمار کلشی‌سین و مدت زمان اعمال آن بر تعداد ساقه فرعی (چپ) و تعداد سنبله (راست) اسطوخودوس افراشته

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.



شکل ۳- اثر متقابل تیمار کلشی‌سین و مدت زمان اعمال آن بر تعداد گل در سنبله (چپ) و طول سنبله اصلی (راست) اسطوخودوس افراشته

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد اثر متقابل غلظت‌های متفاوت کلشی‌سین و مدت زمان بر طول سنبله ساقه اصلی و تعداد گل در این سنبله دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ می‌باشد. بیشترین افزایش در اندازه طول سنبله اصلی در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۴ درصد در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل ۳). در غلظت ۰/۴٪ در زمان ۲۴ ساعت و

www.SID.ir

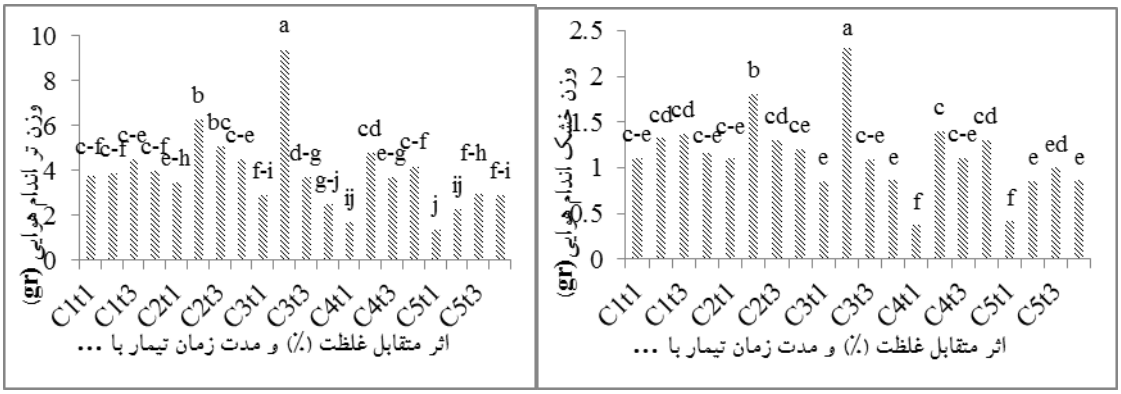
Archive of SID

غلظت ۰/۰۵٪ در زمان ۱۶ ساعت افزایش در تعداد گل وجود دارد و در غلظت ۰/۴٪ در زمان ۴۸ ساعت و غلظت ۰/۱٪ در زمان ۲۴ ساعت تعداد گل کاهش داشته است (شکل ۳).

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل غلظت‌های متفاوت کلشی‌سین و مدت زمان بر وزن تر و خشک اندام هوایی و وزن تر و خشک ریشه دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ است. اثر متقابل زمان و غلظت نشان می‌دهد که وزن تر و خشک اندام هوایی، در دو غلظت ۰/۰۵٪ و ۰/۱٪ با افزایش زمان از ۸ ساعت به ۱۶ ساعت افزایش در وزن تر و خشک اندام هوایی را به‌دنبال دارد. ولی در دو غلظت بالاتر ۰/۲٪ و ۰/۴٪ روند افزایشی از مدت زمان ۸ ساعت به ۱۶ ساعت مشاهده شده است و در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت ثابت یا کمی افزایش داشته است (شکل ۴). در غلظت ۰/۰۵٪ وزن تر ریشه در مدت زمان ۸ ساعت با شاهد برابر بوده است و در مدت زمان ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت وزن تر ریشه نسبت به شاهد افزایش داشته است. در غلظت ۰/۱٪ و ۰/۲٪ ابتدا یک روند افزایشی معنی‌دار از مدت زمان ۸ ساعت به ۱۶ ساعت وجود داشت ولی از زمان ۱۶ ساعت به بعد روندی کاهشی وجود دارد. در غلظت ۰/۴٪ با افزایش زمان از ۸ ساعت به ۱۶ ساعت ابتدا یک روند افزایشی در وزن تر ریشه وجود دارد ولی در ادامه در مدت زمان‌های ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت تقریباً ثابت مانده است. اثر متقابل غلظت و زمان بر وزن خشک ریشه هم نموداری مطابق با نمودار وزن تر ریشه دارد و در غلظت ۰/۰۵٪ در زمان ۴۸ ساعت و غلظت ۰/۱٪ در مدت زمان ۱۶ ساعت افزایش در وزن خشک ریشه مشاهده گردید و در مدت زمان ۸ ساعت برای غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد کمترین مقدار ثبت شده است (شکل ۵).

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثرهای متقابل غلظت کلشی‌سین و مدت زمان اعمال بر میانگین سطح برگ دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ است. اثرهای متقابل غلظت و زمان بر میانگین سطح برگ نشان داد که غلظت ۰/۱٪ با مدت زمان ۸ ساعت و غلظت ۰/۴٪ با مدت زمان ۱۶ ساعت بیشترین افزایش را بر میانگین سطح برگ دارد (شکل ۶).

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثرهای متقابل غلظت‌های متفاوت کلشی‌سین و مدت زمان بر میانگین طول میانگره دارای اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ است. اثر متقابل غلظت و زمان هم بیانگر این است که غلظت ۰/۴٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت کمترین طول میانگره را داراست و غلظت ۰/۱٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت بیشترین فاصله میانگره را دارد.

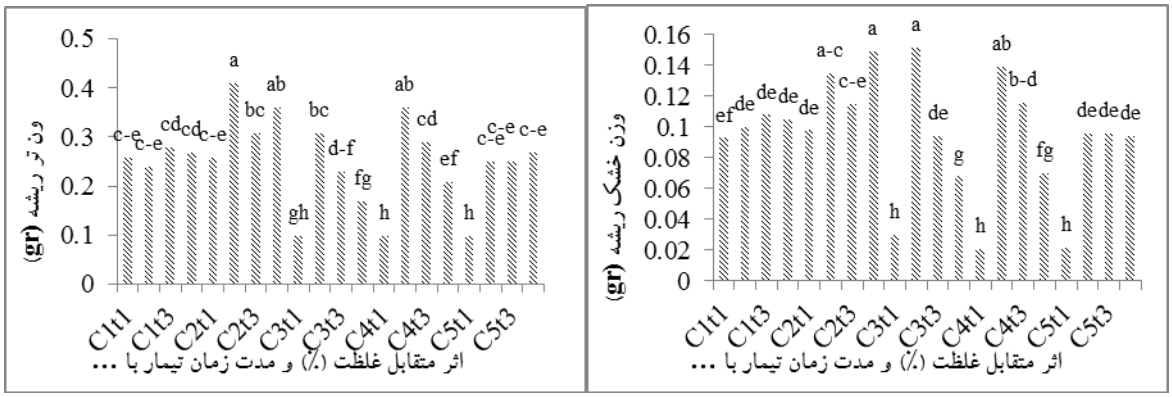


شکل ۴- اثر متقابل تیمار کلشی‌سین و مدت زمان اعمال آن بر وزن تر اندام هوایی (چپ) و وزن خشک اندام هوایی (راست) در بوته اسطوخودوس افراشته

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- اثر متقابل تیمار کلشی‌سین و مدت زمان اعمال آن بر وزن تر ریشه (چپ) و وزن خشک ریشه (راست) اسطوخودوس افراشته

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.

فنل کل

باتوجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر متقابل غلظت و زمان بر فنل کل در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بوده است. بیشترین میزان فنل کل در مدت زمان ۴۸ ساعت برای غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد است. اثر متقابل زمان و غلظت نشان داد که در غلظت ۰/۰۵٪ در زمان ۸ ساعت نسبت به زمان ۱۶ ساعت یک روند کاهشی دارد و با مدت زمان ۲۴ ساعت تقریباً برابر است ولی در ادامه برای ۴۸ ساعت یک روند افزایشی دارد. در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴٪ در ابتدا یک روند افزایشی در میزان فنل کل از زمان ۸ ساعت به ۱۶ ساعت وجود دارد، سپس یک روند نزولی در مدت زمان ۲۴ ساعت دیده می‌شود. در نهایت در مدت زمان ۴۸ ساعت روند صعودی وجود دارد که این روند در مدت زمان‌های مشابه (۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت) برای هر غلظت یکنواخت می‌باشد (شکل ۷).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

نتایج نشان داد که اثر متقابل زمان و غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ است. اثر متقابل زمان و غلظت بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که در غلظت ۰/۰۵٪ با افزایش زمان القاء، ابتدا یک روند افزایشی در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای مدت زمان ۱۶ ساعت ثبت گردید و در ادامه روند کاهشی برای مدت زمان ۲۴ ساعت ثبت شد و برای زمان ۴۸ ساعت هم افزایش کمی مشاهده شد که در هر دو مورد اخیر این روندها معنی‌دار نبوده است. در غلظت ۰/۱٪ برای زمان ۸ و ۱۶ ساعت مقداری یکسان ثبت گردید، در ادامه سیر نزولی تا مدت زمان ۴۸ ساعت مشاهده گردید. در غلظت ۰/۲٪ تقریباً برای تمامی تیمارها در مدت زمان‌های مختلف نتایج تقریباً مشابه بود و در غلظت ۰/۴٪ برای مدت زمان ۸ ساعت بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ثبت گردید، سپس در مدت زمان ۱۶ ساعت از این مقدار کاسته شد و برای مدت زمان ۲۴ ساعت دوباره افزایش در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشت و برای ۴۸ ساعت کاهش جزئی ثبت شده است (شکل ۷).

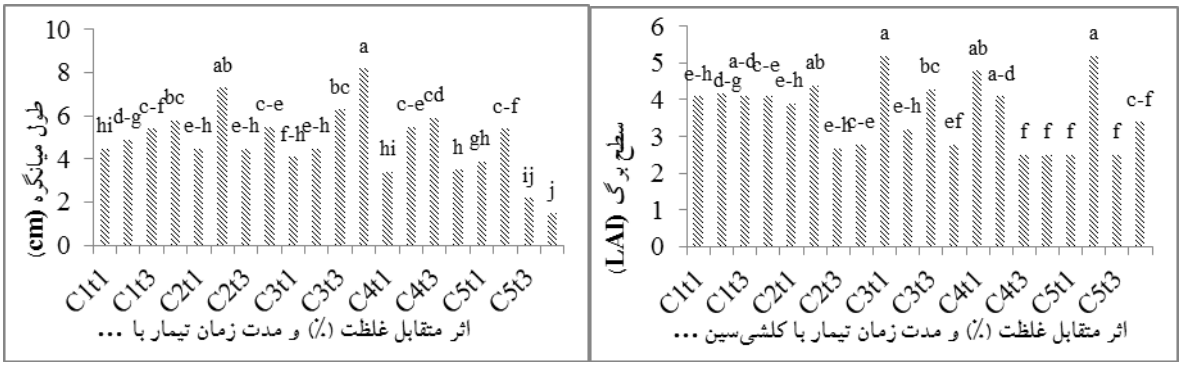
قند کل

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل زمان و غلظت بر قند کل در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بوده است. اثر متقابل زمان و غلظت بر قند کل نشان داد که در

www.SID.ir

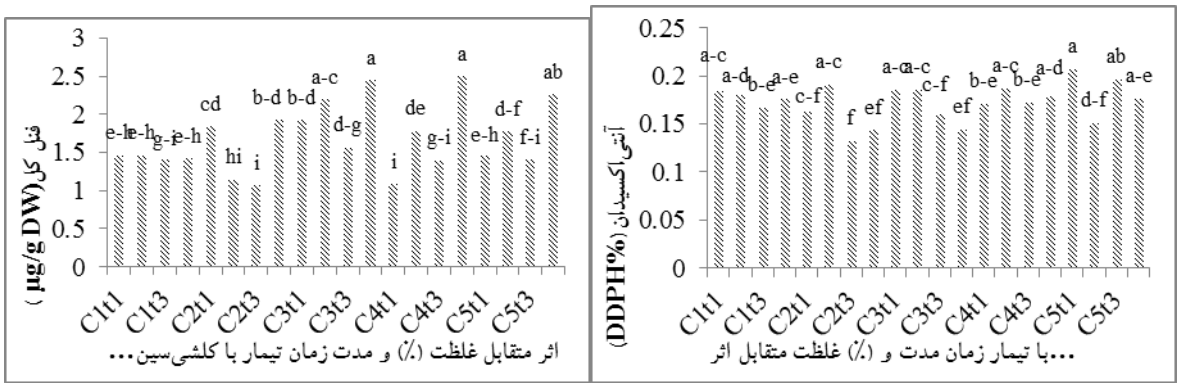
Archive of SID

غلظت ۰/۰۵٪ برای زمان ۸ و ۱۶ ساعت مقداری تقریباً مشابه ثبت گردید و در زمان ۲۴ ساعت به بیشترین مقدار خود رسیده است که این افزایش معنی‌دار بود و برای مدت زمان ۴۸ ساعت مقداری کمتر از مدت زمان ۲۴ ساعت ثبت گردید.



شکل ۶- اثر متقابل تیمار کلشی‌سین و مدت زمان اعمال آن بر سطح برگ (چپ) و طول میانگره (راست) اسطوخودوس افراشته

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.



شکل ۷- اثر متقابل تیمار کلشی‌سین و مدت زمان اعمال آن بر فنل کل (چپ) و آنتی‌اکسیدان (راست) اسطوخودوس افراشته

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.

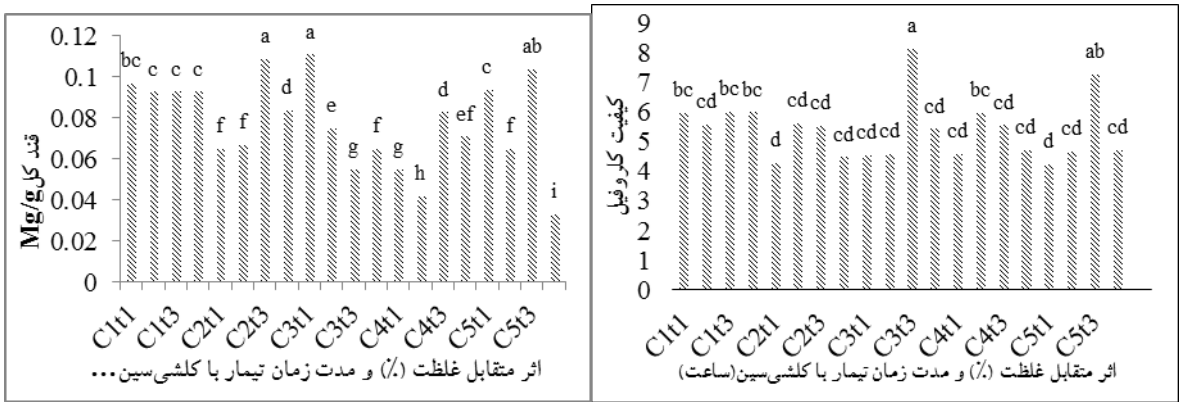
در غلظت ۰/۱٪ برای زمان ۸ ساعت بیشترین مقدار ثبت گردیده است و برای مدت زمان ۱۶ و ۲۴ ساعت سیر نزولی پیدا کرده است و برای ۴۸ ساعت دوباره افزایش جزئی ثبت گردید. برای غلظت ۰/۲٪ و ۰/۴٪ روندی مشابه مشاهده شده است که ابتدا از مدت زمان ۸ ساعت به مدت زمان ۱۶ ساعت یک روند کاهشی دارد، سپس برای مدت زمان ۲۴ ساعت یک روند افزایشی است که در غلظت ۰/۴٪ در این زمان به بیشترین مقدار خود رسیده است. سپس دوباره برای مدت زمان ۴۸ ساعت سیر کاهشی مشاهده شده است و کمترین مقدار را در زمان ۴۸ ساعت و در غلظت ۰/۴٪ داشته است (شکل ۸).

www.SID.ir

Archive of SID

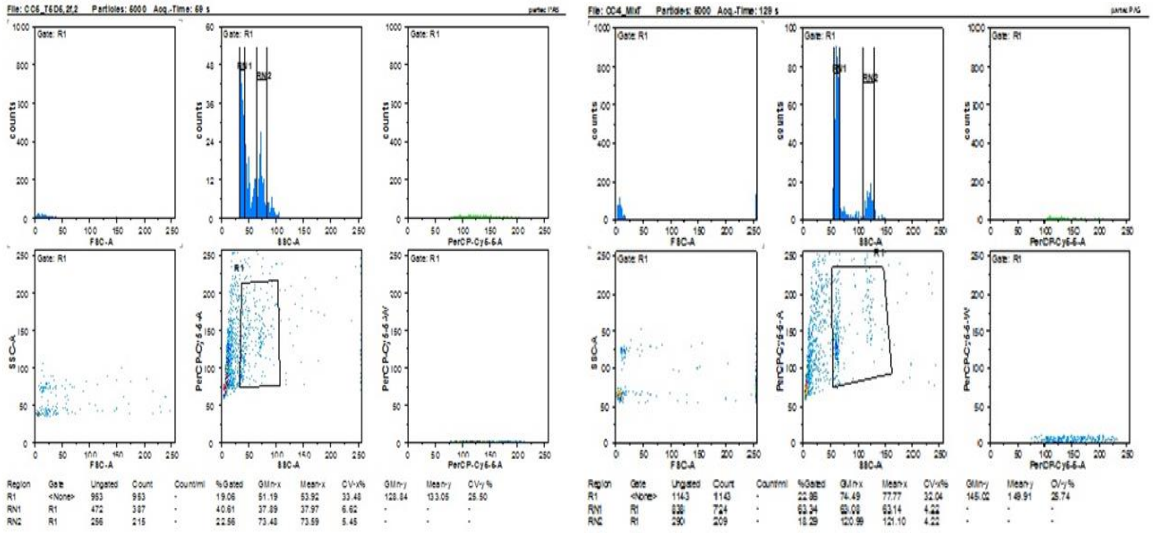
کیفیت کلروفیل

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) مشخص شد که اثر متقابل غلظت و زمان بر کیفیت کلروفیل تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ دارد. به‌طوری که در غلظت ۰/۱٪ در مدت زمان ۱۶ ساعت بیشترین مقدار و در دو غلظت ۰/۰۵ و ۰/۲ درصد در مدت زمان ۸ ساعت کمترین مقدار برای کیفیت کلروفیل ثبت شد.



شکل ۸- اثر متقابل تیمار کلشی‌سین و مدت زمان اعمال آن بر قند کل (چپ) و کیفیت کلروفیل (راست) اسطوخودوس افراشته

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.



شکل ۹- نمونه‌ای از هسیتوگرام فلوسایتومتری گیاه استاندارد تربچه (*Raphanus sativus* cv. Sexa) و اسطوخودوس افراشته در تیمار شاهد (چپ) و اسطوخودوس افراشته در غلظت ۰/۴٪ در زمان ۴۸ ساعت (راست)

www.SID.ir

Archive of SID

فیلوسایتومتری

نتایج بررسی‌های فیلوسایتومتری نشان داد (شکل ۹) که غلظت ۰/۴٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت با اندازه ژنوم ۰/۷۳ پیکوگرم نسبت به گیاه شاهد با اندازه ژنوم ۰/۵۵ پیگوگرم افزایش معنی‌داری نشان داد و بقیه تیمارها با میانگین اندازه ژنوم ۰/۵۷ پیکوگرم نسبت به گیاه شاهد تغییر معنی‌داری نشان ندادند. به‌طوری که در تیمارهای شاهد و تیمارهای تحت غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ درصد در زمان ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت بین ۰/۴، اندازه ژنوم تا ۰/۵۷ پیکوگرم و تحت غلظت ۰/۴٪ و ۴۸ ساعت اندازه ژنوم ۰/۷۳ پیکوگرم بدست آمد (شکل ۱۰).

بحث

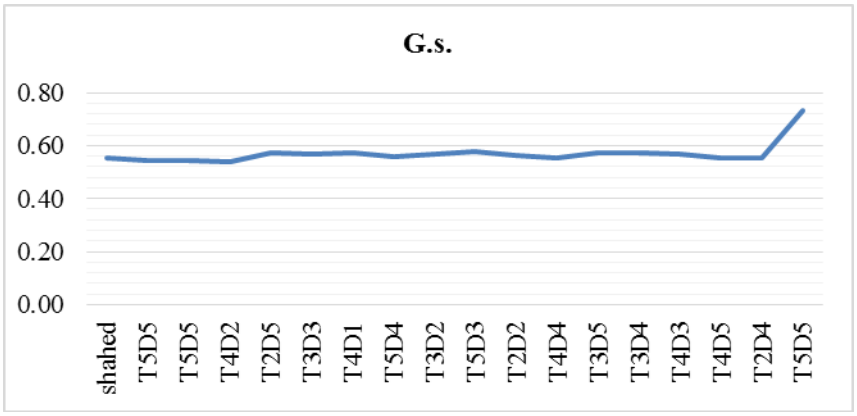
در این تحقیق به تأثیر کلشی‌سین بر خصوصیات رشدی پرداخته شد. نتایج نشان داد که در غلظت ۰/۲ و ۰/۴ درصد در مدت زمان ۴۸ ساعت رشد ارتفاع گیاه به حداقل خود رسیده است و گیاه شاهد رشد حداکثری را در ارتفاع اندام هوایی داشته است. گیاه با غلظت ۰/۴٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت میانگین میزان ژنوم بیشتری نسبت به شاهد دارد. نتایج این مطالعه با برخی از ویژگی‌های مورفولوژیک گل همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) (Alavipour *et al.*, 2016)، پروانش (*Catharanthus roseus*) (Hosseini *et al.*, 2013) و اولوکوس توبروسوس (*Ullucus tuberosus*) (Viehmannová *et al.*, 2012) و آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) (Shmeit *et al.*, 2010) مشابه بود. کاهش رشد پس از تیمار با مواد ضدمیتوزی، احتمالاً به‌دلیل کاهش سرعت و کم شدن تعداد تقسیم‌سلولی باشد که در نتیجه ایجاد اختلال در میزان اکسین در سلول‌های در حال تقسیم مریستمی، کاهش تنفس سلولی و فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌ها را در پی دارد (Madani *et al.*, 2019). به‌طوری که با بررسی انجام شده روی گیاه آویشن ایرانی مشخص شد با وجود اینکه تعداد گره در گیاهان تتراپلوئید نسبت به میکسوپلوئید و دیپلوئید اختلاف معنی‌داری نداشت ولی به‌دلیل طول میانگره کمتر در تتراپلوئیدها، ارتفاع آنها کمتر شد و ارتفاع گیاهان دیپلوئید بیشترین مقدار را داشت (Tavan *et al.*, 2015). در گیاه گل پروانش با افزایش سطح پلوئیدی در گیاه ارتفاع بوته به میزان قابل توجهی کاهش یافت. به‌طوری که ارتفاع در گیاهان تتراپلوئید ۳۴ سانتی‌متر و در گیاهان دیپلوئید ۵۳ سانتی‌متر بود (Hosseini *et al.*, 2013). در گیاه اولوکوس توبروسوس (*Ullucus tuberosus*)، ارتفاع گیاه دیپلوئید بیشتر از اکتاپلوئیدها بوده ولی در تعداد گره اختلاف معنی‌داری نداشتند. همچنین تعداد برگ فرعی در گیاهانی که تحت تأثیر کلشی‌سین قرار گرفتند در مقایسه با گیاهان دیپلوئید، کاهش داشته است (Viehmannová *et al.*, 2012).

نتایج مطالعات Birami kohi و همکاران (۲۰۱۷) بر روی گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) نشان می‌دهد که بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید افزایش سطح پلوئیدی باعث کاهش تعداد برگ، تعداد گل و تعداد نیام در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید شد که علت این کاهش می‌تواند سمّیت حاصل از کلشی‌سین برای سلول‌های مریستمی باشد، زیرا کلشی‌سین یک ماده جهش‌زا و در عین‌حال سمی برای گیاه محسوب می‌شود. در تحقیقی دیگر بر گیاه فلوکس (*Phlox drummondi*) اثرهای مرتبط با دوزهای تیمارهای پلوئیدی بر صفات کمّی مشاهده شد و نتایج حکایت از آن داشت که ارتفاع بوته و تعداد برگ در شاخه کاهش یافته اما تعداد شاخه‌ها افزایش یافت (Tiwari & Mishra, 2012). در این تحقیق مدت زمان و اثرهای متقابل غلظت و مدت زمان اعمال کلشی‌سین بر تعداد برگ فرعی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

نتایج این مطالعه با برخی از ویژگی‌های مورد بررسی در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) که تعداد شاخه جانبی تتراپلوئید نسبت به گیاه دیپلوئید افزایش یافته بود (Omid beygi *et al.*, 2010) مشابه می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱۰- نمودار خطی تغییرات سطح پلوئیدی در تیمار غلظت‌های کلشی‌سین و مدت زمان اعمال آن

نتایج بیانگر کاهش تعداد گل و افزایش طول سنبله تحت تیمار ۰/۴٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت کلشی‌سین بوده است. در درختچه توری (*Lagerstroemia indica* L.) خصوصیات زینتی در گیاهان تتراپلوئید افزایش یافته است. در گیاهان تتراپلوئید، افزایش قطر گل و طول پایه بیشتر گلبرگ‌ها و کاسبرگ‌ها مشاهده شده است و نیز قطر گرده و اندازه کپسول و دانه نیز به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود (Ye *et al.*, 2010). در تحقیقی که روی گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi* L.) انجام شده است نتایج حکایت از آن دارد که گیاهان تتراپلوئید بدست‌آمده از نظر طول برگ، قطر ساقه، طول گل‌آذین، طول دمگل و طول دانه بزرگتر از گیاهان دیپلوئید بودند و افزایش طول و عرض روزنه در گیاهان تتراپلوئیدی ناشی از افزایش سطح برگ بوده‌است (Sadat Noori *et al.*, 2017). نتایج حاصل از مقایسه میانگین بر روی گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) نشان داده است که تعداد گل، تعداد برگ، تعداد نیام، عرض برگ، قطر ریشه، قطر ساقه اصلی و فرعی و شاخه جانبی گیاهان دیپلوئید نسبت به گیاهان تتراپلوئید دارای برتری بودند ولی در برخی صفات کمّی مانند وزن تر و وزن خشک گیاه، بین گیاهان هر دو سطح پلوئیدی (تتراپلوئید و دیپلوئید) مورد بررسی، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ وجود نداشت (Birami kohi *et al.*, 2017).

در تحقیقی بر روی زرین‌گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.) نشان داده شد که در وزن تر و خشک گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (Zahedi *et al.*, 2018). در این تحقیق میانگین طول میانگره در گیاهان با غلظت ۰/۴٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت کاهش یافته است. نتایج آنالیز واریانس اثر کلشی‌سین بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل، فنل کل و فلاونوئید کل نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود داشته و میزان فنل کل در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید افزایش یافته است (Ayyobi *et al.*, 2017). به‌دلیل افزایش تعداد کروموزوم‌ها و ژن‌های وابسته و درنتیجه میزان بیان ژن‌ها، طی افزایش سطح پلوئیدی، در بسیاری موارد غلظت متابولیت‌های ثانویه و مواد فیتوشیمیایی دفاعی در گیاه افزایش می‌یابد (Ayyobi *et al.*, 2017). در تحقیقی که بر روی گیاه خشخاش (*Papaver somniferum*) انجام شده القای پلی‌پلوئیدی باعث ایجاد تغییرات معنی‌دار در افزایش ترکیب‌های فیتوشیمیایی مانند فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدان کل در گیاهان پلی‌پلوئیدی نسبت به دیپلوئید

www.SID.ir

Archive of SID

گردید (Madani *et al*., 2019). القای تتراپلوئیدی در شاهدانه (*Cannabis sativa* var. Indica) اثر معنی‌داری بر میزان قند کل در این گیاه داشت، به‌طوری که این ترکیب‌ها در برگ و ریشه گیاهان تتراپلوئیدی نسبت به نمونه دیپلوئید کاهش محسوسی داشت. تغییرات در قندهای احیاءکننده مشابه تغییرات مشاهده شده در قند کل بود (Bagheri & Mansouri, 2015). باتوجه به نتایج فیلوسایتومتری می‌توان گفت کلشی‌سین ماده مناسبی برای القای پلی‌پلوئیدی در گیاه مورد نظر می‌باشد. این نتایج البته به‌روش استفاده (ترکیب با ژل آگار)، نوع ماده ضدمیتوز (کلشی‌سین) و نوع ریزنمونه و غلظت ماده ضدمیتوزی نیز مرتبط است. علاوه‌براین پژوهش‌ها نشان می‌دهد که این ماده اثر یکسان و یکنواختی بر گونه‌های گیاهی مختلف و بخش‌های مختلف یک گیاه ندارد (Salahi Sadr *et al*., 2018). از آنجایی که مریستم‌های گیاهی از تعداد زیادی سلول تشکیل شده‌اند، بنابراین احتمال دستیابی به بافت‌های میکسوپلوئید (بافت ناهمسان هسته‌ای حاوی بافت دیپلوئید و تتراپلوئید) پس از تیمار با کلشی‌سین وجود دارد. به‌دلیل اینکه این ماده به‌طور مؤثری فقط روی سلول‌های در حال تقسیم اثر می‌گذارد، بنابراین پلی‌پلوئیدی عموماً به‌طور یکسان در تمام سلول‌های ریزنمونه اتفاق نمی‌افتد، در نتیجه باعث ایجاد بافت ناهمسان و میکسوپلوئیدی می‌گردد (Borgheei *et al*., 2010). نتایج بررسی‌ها روی گیاه لاله واژگون گرگان (*Fritillaria raddeana* Regel) نشان داد که کالوس‌های کشت شده در محیط حاوی غلظت‌های متفاوت کلشی‌سین (۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۵ درصد) به‌مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اعمال تیمار، بازکشت شدند و با وجود افزایش در سرعت رشد و کاهش تعداد روزنه‌ها در غلظت ۰/۰۱٪ کلشی‌سین تعداد کروموزوم‌ها تغییری نکرد و القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان تیمارشده مشاهده نشد (Salahi Sadr *et al*., 2018).

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باتوجه به مشاهدات این آزمایش باید گفت که برای تولید گیاهان پاکوتاه با مقادیر بالاتری از مواد مؤثره و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، می‌توان از کلشی‌سین استفاده کرد. بهترین تیمار کلشی‌سین در غلظت‌های متفاوت کلشی‌سین و مدت زمان‌های اعمال شده برای گیاه اسطوخودوس افراشته غلظت ۰/۴٪ به‌مدت زمان ۴۸ ساعت می‌باشد. باتوجه به نتایج فیلوسایتومتری می‌توان گفت کلشی‌سین ماده مناسبی برای القای پلی‌پلوئیدی در این گیاه بوده است، به‌طوری که می‌توان با تغییر در غلظت، زمان کاربری و حتی نحوه اعمال کلشی‌سین، نتایج بهتری بدست آورد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از دست‌اندرکاران دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، به‌دلیل حمایت‌ها در انجام این پژوهش تشکر می‌کنیم. همچنین از آقای دکتر قاسم کریم‌زاده (عضو هیئت‌علمی دانشگاه تربیت‌مدرس)، خانم مهندس شیما عباسی، خانم مهندس منصوره توان و آقای مهندس ایوب توکلی به‌دلیل حمایت‌ها و راهنمایی‌ها برای انجام این پژوهش صمیمانه تشکر می‌نماییم.

منابع مورد استفاده

- Afshari, E., Ranjbar, G.A., Kazemitabar, S.K., Riasat, M. and Poshtmasari, H., 2014. Investigation the effect of colchicine and trifluralin on cytogenetic characteristics in root meristem cell`s of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 29(4): 936-951.
- Alavipour, S., CHehrazi, M. and KHaleghi, E., 2016. The effect of colchicine application method on reproductive traits of pot marigold (*Calendula officinalis* L.). Seed and Plant Production Journal, 32(2): 119-122.
- Ayyobi, N., Hosseini, B. and Fattahi, M., 2017. Induction effects of colchicine and chitosan on

www.SID.ir

Archive of SID

- Khorasaninejad, S., Alizadeh Ahmadabadi, A. and Hemmati, K., 2018. The effect of humic acid on leaf morphophysiological and phytochemical properties of *Echinacea purpurea* L. under water deficit stress. Scientia Horticulturae, 239: 314-323.
- Lalegani, S., Gavlighi, H.A, Azizi, M.H. and Amini Sarteshnizi, R., 2018. Inhibitory activity of phenolic-rich pistachio green hull extract-enriched pasta on key type 2 diabetes relevant enzymes and glycemic index. Food Research International, 105: 94-101.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Dolezel, J. and Santos, C., 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flowcytometry: A test with 37 species. Annals of Botany, 100(4): 875-888.
- Madon, M., Clyde, M., Hashim, H., Mohd, Y., Mat, H. and Saratha, S., 2005. Polyploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. Journal of Oil Palm Research, 17: 110-123.
- Madani, S.H., Hosseini, B., Karimzadeh, Gh. and Rahimi, A., 2019. Effects of polyploidy induction on antioxidant capacity and some phytochemical and morphological characteristics of Iranian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 35(2): 170-181.
- Mazloomi Abukhyl, M., Khorasaninejad, S. and Alizadeh, M., 2017. Comparison of the effects of nano fertilizer and chemical fertilizer on morphophysiological and phytochemical properties of *Lavandula stricta* Del. regeneration from seed and tissue culture. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 33(6): 975-989.
- Mishra, B.K., Pathak, S., Sharma, A., Trivedi, P.K. and Shukla, S., 2010. Modulated gene expression in newly synthesized auto-tetraploid of *papaver somniferum* L. South African journal of Botany, 76(3): 447-452.
- Mozaffarian, V., 2004. A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser, Tehran, 671p.
- Nikfarjam, M., Parvin, N. and Asarzadegan, N., 2009. The effect of *Lavandula angustifolia* in the treatment of mild to moderate depression. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 11(4): 66-74.
- Omid beygi, R., Mirzaei, M., Hasani, M.E. and Sedighi, M.M., 2010. Induction and identification of polyploidy in basil (Ocimum basilicum L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal of Plant Production 4(2): 87-98.
- Rohloff J, 2015. Analysis of phenolic and cyclic compounds in plants using derivatization techniques in combination with GC-MS-based metabolite profiling. Molecules, 20(2): 3431-3462.
rosmarinic acid production in hairy root cultures of Zarrin-Giah (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.). Journal of Molecular and Cellular Research (Iranian Journal of Biology), 30(1): 1-30.
- Bagheri, M. and Mansouri, H., 2015. Effect of induced polyploidy on some biochemical parameters in *Cannabis sativa* L. Applied Biochemistry and Biotechnology, 175(5): 2366-2375.
- Barreca, D., Laganà, G., Leuzzi, U., Smeriglio, A., Trombetta, D. and Bellocco, E., 2016. Evaluation of the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (*Pistacia vera* L. variety Bronte) hulls. Food chemistry, 196: 493-502.
- Borgheei, S.F., Sarikhani, H., Chaichi, M. and Kashi, A., 2010. In vitro induction of polyploidy in lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 26(3): 283-295.
- Birami kohi, A., Fahmideh, L. and Riasat, M., 2017. Evaluation of morphologic and physiologic traits of Sistan's native Fenugreek (*Trigonellafoenum graecum*) under colchicine treatments. Crop Breeding, 18: 153-159.
- Chang, W.C., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K. and Kim, S.K. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant Science 163: 1161-1168.
- Eivazi, Sh., Khorasaninejad, S. and Alizadeh, M., 2015. Optimization of plant growth regulators for callus motivation and positioning in *Lavandula stricta* Del. First National Conference on Organic Cultivation and Propagation of Medicinal Plants, Hamedan, Iran, 28 November: 25-30.
- Golfakhrabadi, F., Yousefbeyk, F., Hassanzadeh, A.R. and Sadat Hamedi, Sh., 2017. Lavender in Iranian traditional medicine and new studies. Journal of Islamic and Iranian Traditional Medicine, 8(2): 161-173.
- Hosseini, H.R., Chehrazi, M., Nabati Ahmadi, D. and Mahmoodi Sorestani, M., 2013. Effect of colchicine treatment on the autotetraploidy induction and morpho-physiological traits alteration in *Catharanthus roseus* cv. alba. Plant production Technology, 13(2): 59-62.
- Jamzad, Z., 2013. Flora of Iran: Labiateae (Vol. 76). Research Institute of Forests and Rangelands, 1074p.
- Javadian, N., Karimzadeh, Gh., Sharifi, M., Moieni, A. and Behmanesh, M., 2017. In vitro polyploidy induction: changes in morphology, podophyllotoxin biosynthesis, and expression of the related genes in *Linum album* (Linaceae). Planta, 245(6): 1165-1178.

www.SID.ir

Archive of SID

Thymus persicus (Lamiaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 122(3): 573-583.
- Tiwari, A.K. and Mishra, S.K., 2012. Effect of colchicine on mitotic polyploidization and morphological characteristics of *Phlox drummondi*. African Journal of Biotechnology, 11(39): 9336-9342.
- Ye, Y.M., Tong, J., Shi, X.P., Yuan, W. and Li, G.R., 2010. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Scientia Horticulturae, 124(1): 95-101.
- Viehmannová, I., Trávníčková, M., Špatenková, E., Černά, M. and Trávníček, P., 2012. Induced polyploidization and its influence on yield, morphological, and qualitative characteristics of microtubers in *Ullucus tuberosus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 109(1): 83-90.
- Zishan, S., Asghari Zakaria, R. and Zare, N., 2016. Polyploidy induction in black cumin (*Nigella sativa* L.) by colchicine treatment on seeds. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 32(5): 824-832.
- Zahedi, A.A., Hosseini, B. and Fattahi, M., 2018. Effect of different concentration of colchicine on some morphological and phytochemical characteristics of *Dracocephalum Kotschyi* Boiss. The Plant Production (Scientific Journal of Agriculture), 40(4): 31-41.
- Sadat Noori, S.A., Norouzi, M., Karimzadeh, Gh., Shirkool, K.H. and Niazian, M., 2017. Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 130(3): 543-551.
- Salahi Sadr, S., Zakizadeh, H., Naghavi, M.R. and Olfati, J.A., 2018. Regeneration of an endangered Fritillaria (*Fritillaria raddeana*) species via petal and leaf explants. Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research, 26(1): 71-83.
- Sanginabadi, H., Khorasaninejad, S., Hemmati, Kh. and Ghasemnejad, A., 2016. A study on propagation methods of *Lavandula stricta* Del. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 32(3): 417-427.
- Shmeit, Y.H., Fernandez, E., Novy, P., Kloucek, P., Orosz, M. and Kokoska, L., 2010. Autopolyploidy effect on morphological variation and essential oil content in *Thymus vulgaris* L. Scientia Horticulturae, 263: 1-7.
- Soltanipour, M.A., 2005. Medicinal plants of the Geno protected area. Pajouhesh and Sazandegi, 68: 27-37.
- Tavan, M., Mirjalili, M.H. and Karimzadeh, G., 2015. In vitro polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of colchicine treatment and polyploidy induction on yield components and some morphological and biochemical characteristics of *Lavandula stricta* Delile

H. Nouri Dashlibroon[1], S. Khorasaninejad[2*], J. Mousavizadeh[3] and M.H. Mirjalili[4]

1- M.Sc. student in Medicinal Plant, Horticultural Sciences Department, Plant Production Faculty, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2*- Corresponding, author, Horticultural Sciences Department, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, E-mail: khorasaninejad@gau.ac.ir; skhorasaninejad@yahoo.com
3- Horticultural Sciences Department, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
4- Agriculture Department, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: February 2020 Revised: June 2020 Accepted: June 2020

Abstract

Lavandula stricta Delile is a native species of Iran growing in southern Iran. Polyploidy induction using mutagenic chemicals such as colchicine is one of the breeding methods of medicinal plants, which has potential to produce the crop purposefully. To evaluate the feasibility of polyploidy induction in *L. stricta*, a factorial experiment in a completely randomized design with two treatments including five concentrations of colchicine (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 %) as a gel on the end plant meristem and four times (8, 16, 24 and 48 hours) with three replications and 20 experimental units were performed under greenhouse conditions. To observe the effect of colchicine on morphological and biochemical characteristics at the flowering stage, the height of aerial parts, number of main leaves (leaves on the main stem), number of sub leaves (leaves on sub-branches), number of internodes on main stems, number of lateral stems, spike length on the main panicle, number of spikes, number of flowers per panicle, fresh and dry weight of aerial parts, fresh and dry weight of roots, root length, leaf area, internode length, total phenol content, total flavonoids content, antioxidant activity, total sugar content and chlorophyll quality were measured. The results of the analysis of variance showed that the studied treatments had a significant effect on all traits except the number of main leaves, the number of internodes on main stems, and root length. The means comparison showed that with increasing the concentration and period of colchicine application, height of aerial parts, internode length, the number of flowers per panicle, and total sugar content decreased and spike length on the main panicle and total phenol content increased. Based on the results of flow cytometric analysis, the mean genome size was 0.73 pg in plants treated with colchicine at a concentration of 0.4% for 48 hours, while the mean genome size in the control plants was 0.55 pg. Plants in other treatments showed a mean genome size of 0.57. In general, the results of this experiment showed a positive response of *L. stricta* to colchicine for the induction of polyploidy and the possibility of using this method in the future breeding of this plant.

Keywords: Leaf area, total flavonoid, phylocytometry, total phenol, spike length.

www.SID.ir