Archive of SID

اثرات القاء پلی‌پلوئیدی بر روی خصوصیات موروفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه زنیان (*Carum carvi* L.)

راحله اکبری[۱]، لیلا فهمیده[۱*] و بهمن فاضلی نسب[۲]

[۱] **ایران، زابل، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی**

[۲] **ایران، زابل، دانشگاه زابل، پژوهشکده کشاورزی، گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات**

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۱

چکیده

زنیان گیاهی علفی یک‌ساله متعلق به تیره چتریان، دارای اثرات ضد میکروبی و قارچ‌کش بوده که عمده اثرات مربوط به ترکیب تیمول است. القاء پلی‌پلوئیدی با استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا به‌عنوان یکی از روش‌های اصلاح گیاهان دارویی به‌منظور افزایش قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گرفته است. بدین منظور جهت بررسی اثرات القاء پلی‌پلوئیدی بر جمعیت زنیان شیراز آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از کلشی‌سین (۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ گرم در لیتر) و مدت زمان اعمال تیمار (۶، ۱۲ و ۱۸ ساعت) انجام و بعد از به دست آوردن بهترین غلظت و بهترین زمان اعمال تیمار، گیاهان تتراپلوئید به همراه شاهد کشت و برای صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بررسی شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که القاء تتراپلوئیدی بر صفات ارتفاع بوته، قطر ساقه، تعداد گل، تعداد شاخه جانبی، قطر ریشه، وزن تر، کلروفیل a و b، کارتنوئید، پراکسیداز، کاتالاز، پروتئین کل و فلاونوئید معنی‌دار بود. نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت ۰/۵ گرم در لیتر و مدت زمان ۶ ساعت، بهترین تیمار جهت القاء پلوئیدی در گیاه زنیان است. تعداد کروموزوم‌های گیاهان دیپلوئید برابر با ۱۸ عدد و در گیاهان تتراپلوئید برابر با ۳۶ عدد بود بنابراین می‌توان بیان کرد که کلشی‌سین به‌طور مؤثری قابلیت القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه زنیان را دارد. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد گیاهان تتراپلوئید شده از نظر صفات کمی مخصوصاً آنتوسیانین، پراکسیداز، کاتالاز، فلاونوئید و پروتئین کل نسبت به گیاهان دیپلوئید برتری داشتند.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، پلی‌پلوئیدی، زنیان، کلشی‌سین، فلاونوئید

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۴۳۱۲۳۲۱۰۰ ، پست الکترونیکی: l.fahmideh@uoz.ac.ir

مقدمه

زنیان (*Carum copticum* L.) متعلق به تیره چتریان (*Apiaceae*) گیاهی علفی، یک‌ساله و بی‌کرک به ارتفاع ۳۰ تا ۹۰ سانتی‌متر، پر شاخ و برگ (۲۴) که به‌طور عمده در مناطق خشک و نیمه‌خشک شرق هند، بخش شمال غربی، مرکزی و شرقی ایران و همچنین در مصر رشد می‌کند (۴۴). ارزش دارویی گیاه زنیان وابسته به متابولیت‌های ثانویه از جمله تیمول، پاراسیمن، آلفا پینن و کارواکرول است (۵) که حدود ۵۰ درصد آن را تیمول تشکیل داده و دارای اثرات ضد میکروبی، ضد اسپاسم و قارچ‌کش است (۸). خاصیت ضد میکروبی زنیان مربوط به ترکیب تیمول و خاصیت ضد اسپاسم آن مربوط به اسانس فرار آن است (۲۶).

القاء پلی‌پلوئیدی با استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا به‌عنوان یکی از روش‌های اصلاح گیاهان دارویی به‌منظور افزایش قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۲). از میان روش‌های اصلاحی مهم‌ترین و

www.SID.ir

Archive of SID

کاربردی‌ترین روش‌ها شامل دورگ‌گیری، موتاسیون و پلی‌پلوئیدی است که روش پلی‌پلوئیدی به‌عنوان یک روش اصلاحی بیشتر مورد توجه قرار گرفته و در اصلاح گیاهان و قارچ‌ها استفاده شده است (۱۵, ۲۱). یکی از روش‌های اصلاح گیاهان دارویی، انگیزش گیاهان تتراپلوئید از گیاهان دیپلوئید و منشأ آن‌ها است که می‌تواند در رشد و نمو و عملکرد و همچنین کمیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان دارویی تأثیر داشته باشد (۲۰). دورگ‌گیری بین و درون گونه‌ای در گیاهان به بروز صفات مطلوب کمک نموده است، اما ژرم پلاسم‌های موجود هنوز نمی‌توانند جواب-گوی نیاز مصرف‌کنندگان تنوع‌طلب باشند؛ بنابراین به نژاد گران و محققان همواره به دنبال منابع دیگر ایجاد تنوع هستند (۱۲).

از آنجا که جهش‌های خود به خودی به‌ندرت اتفاق می‌افتند، تولید جهش یافته‌های القایی راه مناسبی برای ایجاد تنوع در گیاهان محسوب می‌شود، لذا دست ورزی سطح پلوئیدی امکان برنامه‌های به‌نژادی به‌منظور تولید واریته‌های برتر در بسیاری از گونه‌های گیاهی را موفقیت‌آمیز نموده است (۳۱). گیاهان تتراپلوئید نسبت به انواع دیپلوئید خود به‌طور معمول رشد رویشی بیشتر، ساقه‌های درشت‌تر، برگ‌های کلفت‌تر، گل‌های بزرگ‌تر و پایداری طولانی‌تر دارند (۱۵). برای این منظور از مواد مختلفی مانند کلشی‌سین و اوریزالین برای القای پلی-پلوئیدی استفاده شده است (۲۲). برای القای پلی‌پلوئیدی از بخش‌های مختلف گیاه مانند بذور در حال جوانه‌زنی، غنچه‌های بسیار جوان یا مناطق مریستمی نوک جوانه‌ها می‌توان استفاده کرد (۱).

کلشی‌سین یک ترکیب آلکالوئیدی است که از غده گل حسرت پائیزه برای اولین بار توسط Zeisle در سال ۱۸۸۳ استخراج و دارای ساختار سه‌حلقه‌ای با فرمول $C_{22}H_{25}O_6N$ است (۳۷, ۴۶) که مانع از تشکیل شدن دوک در هنگام تقسیم سلولی شده و کروموزوم‌ها را در مرحله متافاز متوقف می‌کند و مانع از وقوع آنافاز می‌شود، در نتیجه باعث دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌ها در سلول می‌شود. تیمار با کلشی‌سین یکی از رایج‌ترین روش‌هایی است که برای القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان از آن استفاده می‌شود و نسبت به بقیه مواد جهش‌زا تغییرات مورفولوژیک بیشتری ایجاد می‌کند (۴۴).

در موارد زیادی گزارش شده است که گیاهان تتراپلوئید گوشتی‌تر بوده و میزان آب بیشتری دارند به همین خاطر وزن تر آن‌ها بیشتر از نمونه‌های دیپلوئید است(۵۴). برای مثال در بررسی امکان القاء پلوئیدی در بنفشه آفریقایی ارزیابی صفات ظاهری نشان داد گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید از نظر خصوصیات مورفولوژیکی رویشی و صفات زایشی با یکدیگر متفاوت هستند به‌طوری‌که گیاهچه‌های تیمار شده با ماده‌ی القایی، پا کوتاه‌تر، برگ-های پهن‌تر و ضخیم‌تر، دم برگ قطورتر، پر گل‌تر، پر برگ‌تر و دارای گل‌های درشت‌تر بودند که علت این تفاوت‌ها در مقدار هورمون اکسین که مسئول رشد می‌باشد است (۷). در بررسی کشت بافت و القاء پلی‌پلوئیدی کالوس گیاه *Morinda officinalis* بیشترین میزان القاء پلی‌پلوئیدی از تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلشی‌سین به مدت ۵ روز به‌دست‌آمده و در مقایسه با گیاهان پلی‌پلوئید و دیپلوئید، رشد ریشه در پلی‌پلوئیدها افزایش یافته است (۳۶). در تحقیقی به‌منظور بررسی تأثیر تیمار کلشی‌سین بر گیاه شنبلیله گزارش شد که غلظت و مدت زمان تیمار کلشی‌سین و اثر متقابل آن‌ها به‌صورت معنی‌داری بر اتو تتراپلوئید شدن شنبلیله تأثیر داشت و غلظت ۰/۵ گرم در لیتر با مدت تیمار ۱۲ ساعت بهترین نتیجه را داشت همچنین نتایج نشان داد که تغییر سطح پلوئیدی با کلشی-سین از دیپلوئیدی به تتراپلوئیدی به‌صورت معنی‌داری بر کلیه صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی شنبلیله (به‌جز وزن تر و خشک گیاه) اثر داشت (۱۱).

بر این اساس هدف از تحقیق حاضر مطالعه اثر ماده موتاژن

www.SID.ir

Archive of SID

کلشی‌سین بر القاء پلی‌پلوئیدی و خواص سیتوژنتیکی (تعداد کروموزوم)، مورفولوژیکی (ارتفاع بوته، قطر ساقه اصلی و فرعی، تعداد گل، تعداد شاخه جانبی، ارتفاع گیاه، قطر ریشه، وزن تر، طول برگ و عرض برگ) و آنتی‌اکسیدانی (پروتئین کل، کاتالاز، پراکسیداز، فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین، کارتنوئید، کلروفیل) گیاه زنیان در شرایط کشت گلخانه‌ای انجام شد.

مواد و روشها

بذر جمعیت شیراز گیاه زنیان از از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و جهت مطالعات سیتوژنتیکی در سال ۱۳۹۶ در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه زابل مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور به دست آوردن مریستم انتهایی ریشه، بذرها به ظروف پتری‌دیش حاوی کاغذ صافی مرطوب منتقل و پس از افزودن آب مقطر، در ژرمیناتور تحت شرایط کنترل رطوبت ۳۸ درصد، دمای ۲۴ درجه سانتی-گراد و نور ۱۴ ساعت قرار داده شدند. پس از چهار روز بذرهای جوانه زده با ریشه‌هایی به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر آماده تیمار شدن بودند. برای تیمار کردن از محلول کلشی-سین با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ گرم در لیتر در سه مدت زمان ۶، ۱۲ و ۱۸ ساعت استفاده شد (۶).

به‌منظور مشاهده و شمارش کروموزوم‌ها، به ترتیب مراحل پیش تیمار از محلول (۰/۰۰۲ میکرو مولار) ۸- هیدروکسی کینولین به مدت ۵ ساعت، تثبیت (محلول کارنوی۲- مرکب از اتانول ۹۶ درصد، کلروفرم ۱۰ درصد و اسید استیک ۳۰ درصد به نسبت ۱: ۳: ۶ به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق، هیدرولیز اسید کلریدریک 1N به مدت ۲۰ دقیقه و سپس رنگ‌آمیزی ریشه‌ها با استو اورسئین برای مشاهدات میکروسکوپی استفاده شد. قسمت انتهایی نوک ریشه با یک قطره اسید استیک ۴۵٪ روی اسلاید گذاشته و لامل روی آن گذاشته می‌شود تا ضمن خروج رنگ‌های اضافی سلول‌های مریستمی نیز در یک سطح پخش شوند (۳۴).

عکس‌برداری از نمونه‌های تهیه شده با استفاده از روش تحلیل تصویری با بزرگنمایی ۱۸۷۷ برابر انجام شد، به‌طوری‌که تصاویر کروموزومی از طریق دوربین رنگی که بر روی میکروسکوپ Olympus نصب شده بود به مانیتور منتقل شد و ضبط گردید. تصاویر تهیه شده به برنامه فتوشاپ نسخه ۱/۰۴ منتقل شد؛ و سپس برای بررسی صفات مورفولوژی (از قبیل ارتفاع بوته، طول و عرض برگ، قطر ساقه اصلی و فرعی، تعداد شاخه جانبی، قطر ریشه، تعداد گل وزن تر و وزن خشک در هر بوته نسبت به گیاهان دیپلوئید) فیزیولوژیکی و آنتی‌اکسیدانی (میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کارتنوئید، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، محتوای آنتوسیانین، فنل کل، پروتئین کل و فلاونوئید) گیاه زنیان، بذور تیمار شده به گلدان‌های حاوی کوکوپیت، خاک‌برگ و خاک معمولی منطقه منتقل شدند. در هر گلدان پنج بذر قرار داده شد. گیاهان با فاصله دو روز آبیاری شدند و در شرایط گلخانه رشد و نمو یافتند.

تهیه بافر Ice–Cold : این محلول شامل؛ ۲۰۰۰ میکرو لیتر محلول بافر پتاسیم فسفات 100 میلی مولار با ۷ =pH (برای تهیه محلول پتاسیم فسفات از دو نمک K_2HPO_4 (جرم حجمی ۱۷۴/۲) و KH_2PO_4 (جرم حجمی ۱۳۶/۰۸۶) استفاده و به این صورت که ابتدا محلول ۱ مولار از هر کدام از این نمک‌ها تهیه شد. سپس ۱۰ سی‌سی از هر کدام برداشته، مخلوط و به حجم ۱۰۰ سی‌سی رسانده شد و pH آن روی ۷ تنظیم شد.)، ۲۰ میکرو لیتر EDTA 0.1 mM و سپس ۱۹۸۰ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر بود (۱۸).

استخراج عصاره آنزیمی: جهت اندازه‌گیری آنزیم‌ها، ۰/۱ گرم از بافت سبز برگ برداشت و با ۴ سی‌سی بافر – Ice cold در هاون سرد کاملاً ساییده و به‌صورت همگن درآورده شدند. مخلوط همگن از کاغذ صافی عبور و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۶۰۰۰ دور با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار سانتریفیوژ شدند. سپس فاز بالایی

www.SID.ir

Archive of SID

به‌عنوان عصاره آنزیمی (پروتئینی) برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده گردید (۱۹).

آنزیم کاتالاز: به این منظور مخلوط واکنش شامل ۷۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی و ۱۵۰۰ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر به کووت کوارتز اضافه شد و به هنگام اندازه‌گیری آنزیم، ۷۵۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی‌مولار به مخلوط واکنش اضافه گردید. تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت شد. تغییرات جذب به‌دست‌آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر $۳۶mM^{-1}cm^{-1}$ است تقسیم شد و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد در گرم وزن‌تر بیان شد (۱۰, ۴۸).

آنزیم پراکسیداز (PX): جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز، سه میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل؛ ۲۳۹۰ میکرو لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار (PH=۶/۵)؛ ۲۴۰ میکرو لیتر گایاکول ۱ درصد و ۲۴۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن ۰/۳٪ و ۱۳۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی استفاده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس میزان اکسید شدن گایاکول در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی $۶/۲۶\ mM^{-1}cm^{-1}$ تعیین گردید (۴۵).

اندازه‌گیری میزان فنل کل و فلاونوئید: ۰/۱ گرم اندام هوایی در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد سائیده و به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در تاریکی به‌منظور سنجش ترکیبات فنلی کل و فلاونوئید کل نگه‌داری و سپس در ۴۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیق سانتریفیوژ شدند.

برای سنجش میزان فنل کل به یک میلی‌لیتر محلول رویی سانتریفیوژ شده، یک میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه گردید و با آب مقطر، حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و یک میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد به آن اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در تاریکی نگهداری شد و سپس جذب هر نمونه در طول‌موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید (شکل ۱ بخش A)، غلظت ترکیبات فنلی کل برحسب میلی‌گرم در گرم وزن‌تر محاسبه گردید. رسم منحنی استاندارد فنل کل در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر صورت گرفت (۴۰).

برای سنجش میزان فلاونوئید کل به ۵۰۰ میکرو لیتر از هر عصاره ۱/۵ میلی‌لیتر متانول (۸۰٪)، ۱۰۰ میکرو لیتر محلول آلومینیوم کلراید (۱۰٪)، ۱۰۰ میکرو لیتر محلول استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط بعد از گذشت ۴۰ دقیقه در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر نسبت به بلانک اندازه‌گیری گردید. بلانک حاوی تمام ترکیبات ذکر شده در بالا بود اما بجای عصاره، همان حجم متانول ۸۰٪ به آن اضافه‌شده بود. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد (شکل ۱ بخش B). میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها بر اساس میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد (۱۴).

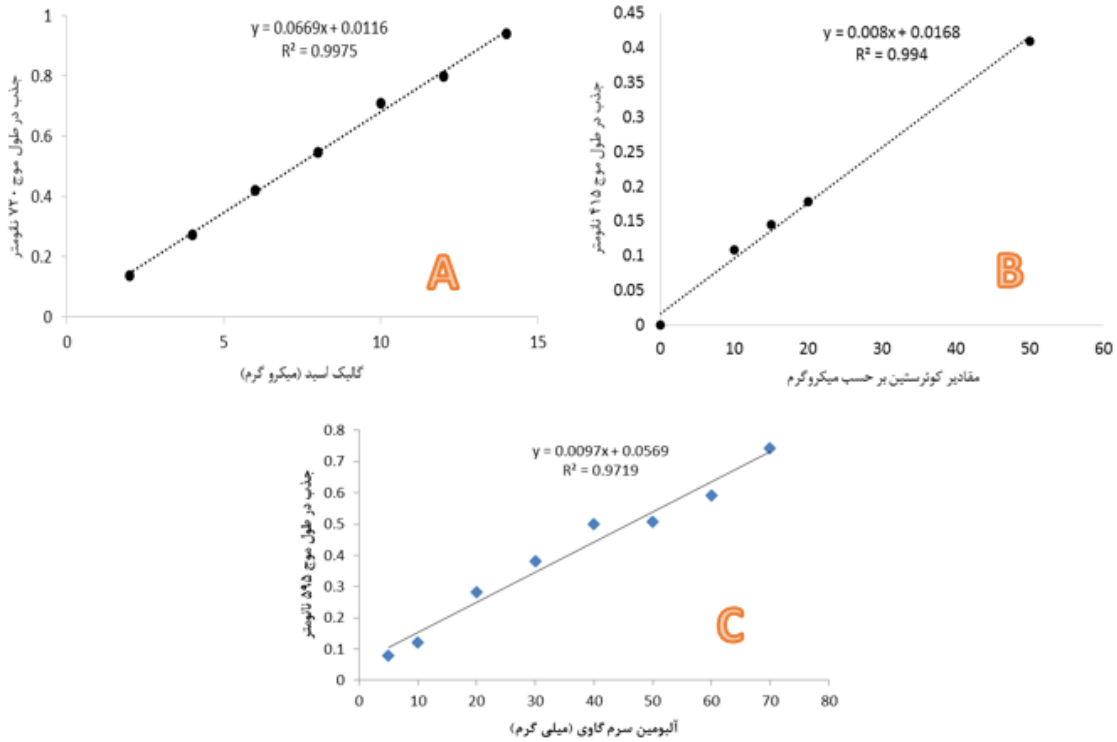
تهیه معرف بیوره: به‌منظور تهیه معرف بیوره، ۰/۱ گرم کوماسی بریلیانت بلو G250 در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه به مدت یک ساعت با کمک همزن مغناطیسی (مگنت) در تاریکی به‌خوبی حل گردد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد قطره‌قطره به آن افزوده شود. در پایان حجم کل محلول به کمک آب مقطر به یک لیتر رسانده شود محلول حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردد (۱۸).

سنجش پروتئین استاندارد و ارزیابی میزان پروتئین کل: برای ارزیابی و تعیین میزان فعالیت آنزیم، لازم است ارزیابی دقیقی از میزان کل پروتئین موجود در عصاره مورد آزمایش، صورت گیرد. بدین منظور از روش بردفورد (۱۳) به شرح زیر استفاده گردید. یک گرم بافت تر در یک هاون چینی محتوی سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷/۲ سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار در g ۱۴۰۰۰ و دمای ۴ درجه

www.SID.ir

Archive of SID

سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی (محلول رویی) به لوله‌های آزمایش منتقل و پنج میلی‌لیتر معرف بیوره افزوده و سریعاً ورتکس شد. پس از دو دقیقه و قبل از یک ساعت جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین گاوی (شکل ۱ بخش C) محاسبه و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر محاسبه گردید.



شکل ۱- منحنی استاندارد؛ گالیک اسید جهت اندازه‌گیری مقادیر فنل (A)؛ کوئرستین جهت اندازه‌گیری مقادیر فلاونوئید (B)؛ آلبومین سرم گاوی جهت اندازه‌گیری مقادیر پروتئین کل (C)

اندازه‌گیری آنتوسیانین: جهت اندازه‌گیری آنتوسیانین ۰/۱ گرم از بافت برگی تازه را در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت حجمی ۱: ۹) کاملاً ساییده و عصاره در لوله آزمایش سرپیچ‌دار ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و جذب محلول رویی در طول‌موج ۵۵۰nm اندازه‌گیری شد. غلظت با استفاده از فرمول زیر و با در نظر گرفتن ضریب خاموشی (ε) ۳۳۰۰۰ سانتی‌متر بر مول و نتایج بر حسب میکرو مول بر گرم وزن تر ارائه شد (۴۱).

اندازه‌گیری کلروفیل و کارتنوئید: جهت اندازه‌گیری کلروفیل و کارتنوئید مقدار ۰/۱۲۵ گرم از بافت تر برگ با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد خرد شد. مخلوط به‌دست‌آمده به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و در نهایت، قسمت بالایی عصاره جدا و حجم آن به ۸ میلی‌لیتر رسانده شد. اندازه‌گیری با استفاده از روش اسپکتروفتومتری انجام گرفت و برای کلروفیل a، b و کارتنوئید به ترتیب در طول‌موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. جهت تنظیم دستگاه، از استون ۸۰ درصد به‌عنوان کنترل استفاده شد. غلظت رنگیزه با استفاده از رابطه‌های صفحه بعد محاسبه گردید (۳۳).

www.SID.ir

Archive of SID

$$Chla = (19.3 * A\,663 - 0.86 * A645) * V$$

$$Chlb = (19.3 * A645 - 3.6 * A663) * V$$

$$Cartenoeid = [(100 * A470) - 3.27 * (mg\ chla) - 104 * (mg\ chlb)]/227$$

V ضخامت کووت می‌باشد

تجزیه وتحلیل آماری: داده‌های حاصله از این تحقیق به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار با استفاده از نرم‌افزارهای SAS (نسخه ۹/۱) و Excel ارزیابی شدند. داده‌های حاصله از بررسی‌های کروموزومی، داده‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی تجزیه آماری شدند و از نرم‌افزار جهت رسم نمودار استفاده شد. با توجه به اینکه اکثر داده‌های حاصل از شمارش پلی‌پلوئیدی به‌دست‌آمده در این تحقیق بر اساس درصد بودند، برای اینکه داده‌ها دارای توزیع نرمال باشند، از تبدیل داده جذری $X1=\sqrt{X2}$ استفاده شد. در مواردی هم که صفر وجود داشت از تبدیل $X_1=\sqrt{X2+0.5}$ استفاده گردید. مقایسه میانگین نیز بر اساس حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD) انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج پلی‌پلوئیدی حاصل از تیمار با کلشی‌سین: پس از مطالعه و عکس‌برداری از اسلاید نمونه شاهد، عدد کروموزومی در زنیان ۲n=۱۸ به دست آمد (شکل ۲A) که مشابه با نتایج تعدادی از محققان می‌باشد (۱۷, ۴۴). نتایج حاصل از بررسی سطح پلوئیدی گیاه تیمار شده با سطوح مختلف کلشی‌سین در سه زمان مختلف با استفاده از شمارش کروموزومی بررسی شد (شکل ۲B).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف کلشی‌سین و مدت زمان اعمال تیمار بر درصد احتمالی گیاهان تتراپلوئید زنیان شیراز معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان تتراپلوئیدی برای جمعیت شیراز مورد مطالعه، در غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر در مدت زمان ۶ ساعت مشاهده و سایر غلظت‌های پایین‌تر و بالاتر تأثیر کمتری بر این فاکتور داشتند (شکل ۳) در تحقیقی (۳۸) نیز بهترین زمان اعمال تیمار (۶ ساعت) و بهترین غلظت کلشی‌سین (۰/۵ گرم) جهت القاء پلی‌پلوئیدی در ریحان ذکر شده است که با تحقیق حاضر مشابهت داشت. همچنین در تحقیق دیگری (۱۱) بهترین غلظت کلشی‌سین (۰/۵ گرم در لیتر) به‌صورت معنی‌داری بر اتو تتراپلوئید شدن شنبلیله تأثیر داشت که با تحقیق حاضر مشابهت داشت. همچنین در سایر تحقیقات نیز غلظت مؤثر برای القای پلوئیدی را در گیاهان مختلف بین ۰/۰۰۰۶ تا ۳ درصد گزارش کرده‌اند و غلظت مؤثر بسته به نوع گیاه، روش تیمار و مدت زمان تیمار متفاوت می‌باشد (۱۷). در تحقیقات دیگر نیز غلظت مؤثر برای القای پلوئیدی را در گیاهان مختلف بین ۰/۰۰۰۶ تا ۳ درصد گزارش کرده‌اند و غلظت مؤثر بسته به نوع گیاه، روش تیمار و مدت زمان تیمار متفاوت می‌باشد (۲۳).

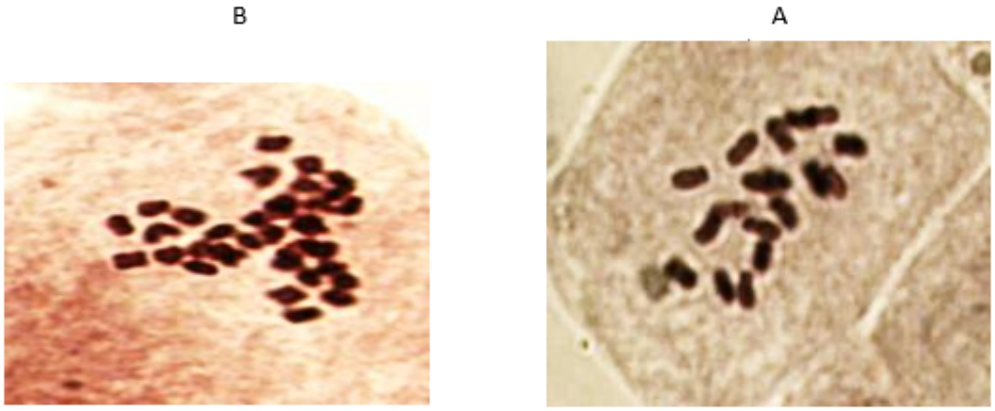
ارزیابی ویژگی‌های مورفولوژیک گیاه زنیان: نتایج حاصل از تجزیه واریانس تحقیق حاضر نشان داد که تأثیر تتراپلوئیدی بر صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه زنیان بررسی و مشخص شد که بر صفات تعداد گل، تعداد شاخه جانبی، ارتفاع گیاه، تعداد برگ، قطر ریشه و وزن تر و خشک بوته معنی‌دار اما بر صفات قطر ساقه اصلی و فرعی، طول و عرض برگ بی‌تفاوت بوده است (جدول ۲).

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تعداد گل در گیاه تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید کمتر شده است (جدول ۳). در گیاه ریحان گزارش شده (۲۸) تعداد گل در گیاهان تتراپلوئیدی که با دو برابر کردن کروموزوم‌های گیاهان دیپلوئید به‌دست‌آمده بود، کاهش یافته بود که با تحقیق

www.SID.ir

Archive of SID

حاضر مشابهت داشت اما در برخی منابع (۲۵) نیز ذکر شده مرحله گلدهی در گیاهان پلی‌پلوئید در مقایسه با انواع دیپلوئید دیرتر آغاز می‌شود اما طول مدت گلدهی در آن‌ها بیشتر است که در تحقیق حاضر این موضوع بررسی نشد.

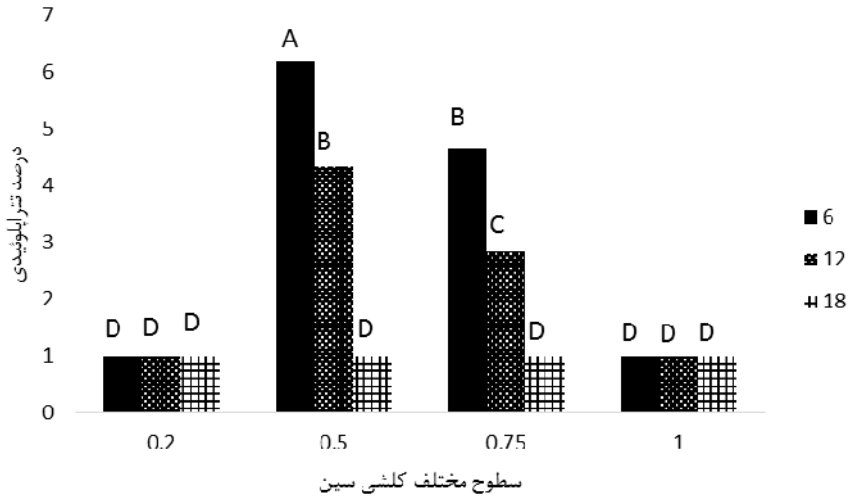


شکل ۲- تصاویر کروموزومی قبل و بعد از تیمار با کلشی‌سین: A؛ دیپلوئید و B؛ تتراپلوئید

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه زنیان پس از تیمار با کلشی‌سین در زمان‌های مختلف

منابع تغییرات	درصد پلی‌پلوئیدی
زمان	۲۳/۶۳**
غلظت	۱۷/۶۰**
زمان×غلظت	۸/۶۴**
خطا	۰/۱۱۴۷
ضریب تغییرات	۱۰/۳۰

ns، * و **: به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد



شکل ۳- اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار کلشی‌سین بر درصد پلی‌پلوئیدی گیاه زنیان

حروف مشابه برای هر تیمار نشان‌دهنده تفاوت غیر معنی‌دار بین آن‌هاست

(با توجه به کم بودن برخی اعداد و عدم نمایش آن‌ها در نمودار لذا سعی شد از تمامی اعداد لگاریتم بر مبنای ۲ گرفته شود $\log_2(x+2)$ ؛ x همان عدد اصلی می‌باشد)

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تعداد شاخه جانبی و تعداد برگ در گیاه تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید بیشتر شده است (جدول ۳). افزایش تعداد شاخه فرعی در اثر افزایش سطوح پلوئیدی در گیاه *Colophospermum mopan* (۵۳) و انگیزش پلوئیدی سبب افزایش تعداد برگ‌های بیشتر، دفرمه، قطور و به رنگ سبز تیره در گیاه دارویی بنگدانه شده است (۲۵).

بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، تیمار با کلشی‌سین روی ارتفاع گیاه تأثیر گذار و با افزایش سطح پلوئیدی ارتفاع گیاه افزایش یافت (جدول ۳). تأثیر پلی‌پلوئیدی بر ارتفاع گیاهان متفاوت است به‌طوری‌که در برخی موارد انگیزش پلی‌پلوئیدی در گیاهان ارتفاع بوته را افزایش(۲۷)، اما در برخی موارد سبب کاهش ارتفاع گیاهان شده است (۳۰, ۳۸). بررسی اثر کلشی‌سین روی گیاه مختلف نشان داده که افزایش ارتفاع در گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید می‌تواند به دلیل افزایش اندازه سلول‌ها باشد که این افزایش ارتفاع بسته به نوع گیاه و رقم نیز متفاوت است (۳۵, ۴۳). در کل القای پلی‌پلوئیدی ضمن افزایش میزان DNA الگو، با تحریک مکانیسم‌هایی در سلول، نسخه‌برداری و ترجمه را تحت تأثیر قرار داده و با افزایش یا کاهش بیان و یا حتی خاموشی ژن‌ها، بسیاری از صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک گیاه را تغییر می‌دهد (۲).

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که برگ‌های گیاهان زنیان تتراپلوئید از نظر اندازه دارای طول و عرض بیشتری نسبت به گیاهان زنیان دیپلوئید بودند در حالیکه اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۳) که با نتایج ارائه‌شده توسط چن و همکاران (۱۶) در گیاه چای مشابهت داشت.

در این پژوهش با افزایش پلی‌پلوئیدی، وزن‌تر و خشک بوته گیاهان تتراپلوئید در سطح بالاتر از گیاهان دیپلوئید قرار گرفت (جدول ۳). افزایش وزن تر و خشک گیاهان تتراپلوئید نسبت به گروه شاهد می‌تواند به دلیل دو یا سه شاخه بودن درصد بالایی از گیاهان تتراپلوئید، بیشتر بودن میانگین سطح و ضخامت برگ‌ها باشد که باعث افزایش مواد ذخیره‌ای بالاتر در برگ‌ها باشد (۲۹). در تحقیقی (۳۰) نیز افزایش سطح پلوئیدی به‌طور معنی‌داری وزن‌تر و خشک اندام هوایی در گیاه تتراپلوئید پراونش افزایش داده است.

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که قطر ریشه و قطر ساقه اصلی گیاهان زنیان تتراپلوئید از نظر اندازه دارای ضخامت بیشتری نسبت به گیاهان زنیان دیپلوئید بودند در حالیکه اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۳)، که با نتایج ارائه‌شده برای قطر ساقه اصلی در اثر افزایش سطح پلوئیدی بر گیاه‌چه پروانه (*Colophospermum mopane*) (۵۳) و قطر ریشه (۳۶, ۴۹) مشابهت داشت.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک گیاه زنیان پس از تیمار با کلشی‌سین

منابع تغییر	df	تعداد گل	تعداد شاخه جانبی	ارتفاع گیاه	تعداد برگ	قطر ریشه	قطر ساقه اصلی
تیمار	۱	۲۳۶۰/۱*	۱۶/۶۶ *	۶۴۰/۶**	۲۴*	۰/۲۸۱ **	۰/۰۱۵ ns
خطا	۴	۴۲۹/۱	۳/۱۶	۲/۱۶	۱۹/۳	۰/۰۱۱	۰/۰۰۸۳
ضریب تغییرات	-	۱۰/۱	۱۴/۲۶	۴/۰۱	۱۱/۶	۱۵/۰۷	۱۳/۳۵
منابع تغییر	df	قطر ساقه فرعی	طول برگ	عرض برگ	وزن تر	وزن خشک	
تیمار	۱	۰/۰۰۶ ns	۰/۱۳۵ ns	۰/۰۸۱۶ ns	۰/۴۱۷**	۰/۰۳۳ *	
خطا	۴	۰/۰۰۱۶	۰/۳۷	۰/۲۸۸	۰/۰۱۰	۰/۰۰۷	
ضریب تغییرات	-	۹/۴۲	۱۰/۶۱	۱۶/۰۲	۶/۰۷	۸/۹۱	

ns، * و **: به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات مورفولوژیک گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید

غلظت کلشی‌سین	تعداد گل	تعداد شاخه جانبی	ارتفاع گیاه (mm)	تعداد برگ	قطر ریشه (mm)	قطر ساقه اصلی (mm)
شاهد	۱۲۲/۶۷±۷/۱۶a	۵/۶۶±۱/۴۲b	۲۶±۳/۵۸b	۱۸/۳۳±۲/۲۹b	۰/۵±۰/۰۱۸b	۰/۶۳۳±۰/۰۱۱a
۰/۵ گرم بر لیتر	۸۳±۶/۹۵b	۹±۱/۸۴a	۴۷±۳/۶۶a	۲۲/۳۳±۳/۴۴a	۰/۹۳±۰/۰۱۷a	۰/۷۳۳±۰/۰۱۳a
غلظت کلشی‌سین	قطر ساقه فرعی (mm)	طول برگ (cm)	عرض برگ (cm)	وزن تر (g)	وزن خشک (g)	
شاهد	۰/۴۰±۰/۰۹a	۲/۸±۰/۶۱a	۳/۲۳±۰/۹۴a	۱/۴۰±۰/۲۱b	۰/۸۶±۰/۰۲۱b	
۰/۵ گرم بر لیتر	۰/۴۶±۰/۰۹۲a	۳/۱۰±۰/۶۲a	۳/۴۶±۰/۹۸a	۱/۹۲±۰/۱۹a	۱/۰۱۶±۰/۰۲۸a	

حروف مشابه برای هر صفت بین نمونه شاهد و تیمار داده شده نشان‌دهنده تفاوت غیر معنی‌دار بین آن‌هاست

بررسی اثر تغییر سطح پلوئیدی بر خصوصیات بیوشیمیایی: تأثیر تتراپلوئیدی ناشی از تأثیر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین و مدت زمان اعمال تیمار بر صفات فیتوشیمیایی گیاه زنیان بررسی شده و مشخص گردید که بر صفات کلروفیل a و b، کارتنوئید، پراکسیداز، کاتالاز، پروتئین کل و فلاونوئید معنی‌دار اما بر صفات آنتوسیانین و فنل کل غیر معنی‌دار بوده است (جدول ۴).

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد (جدول ۵) که میزان کلروفیل a در برگ نمونه‌های تتراپلوئید (۱۹۱/۰۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) نسبت به نمونه‌های دیپلوئید (۱۲۲/۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) بیشتر و همچنین میزان کلروفیل b در برگ نمونه‌های تتراپلوئید (۲۴۳/۷میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) نسبت به نمونه‌های دیپلوئید (۱۱۸/۵میلی‌گرم در وزن تر برگ) بیشتر بود. ازآنجاکه فرض بر آن است با دو برابر شدن ژنوم فعالیت متابولیکی، سنتز rRNA و نسخه‌برداری افزایش می‌یابد این افزایش می‌تواند بر میزان تنفس، فعالیت ژنی، تنوع و میزان فعالیت آنزیم‌ها و انتقال الکترون در فتوسنتز تأثیر داشته باشد (۲۵, ۳۲, ۴۲). گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید *Acacia mearnsii* از نظر میزان کلروفیل a و b با یکدیگر مقایسه شدند، مشاهده شد که میزان کلروفیل در گیاهان تتراپلوئید به‌طور معنی-داری بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود (۳۲).

بر اساس نتایج حاصله، در گیاه زنیان، افزایش سطح پلوئیدی بر میزان فنل کل گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین نسبت به گیاهان شاهد بی‌معنی اما بر میزان فلاونوئید مؤثر (جدول ۵) و مشخص شد که میزان فلاونوئید در برگ نمونه‌های تتراپلوئید (۲/۸۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) نسبت به نمونه‌های دیپلوئید (۱/۳۴ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) بیشتر بود. در گل اطلسی القاء پلی‌پلوئیدی سبب افزایش دو نوع فلاونول (۴۶) و در گیاهان زرین تیمار شده با کلشی‌سین میزان فلاونوئید بیشتری نسبت به گیاهان شاهد داشتند(۹) و همچنین القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه لیمو ترش (۳) تاثیری بر میزان فنل کل نداشته است که با نتایج این آزمایش مشابهت داشت. اما در کل میتوان استدلال کرد که گیاه مورد تیمار و گونه آن در میزان تغییر متابولیت‌های ثانویه در اثر القای پلوئیدی مؤثر است. افزایش تعداد کروموزوم‌ها و مقدار ژن‌های وابسته می‌تواند در بعضی موارد بیان و غلظت متابولیت‌های ثانویه و مواد شیمیایی دفاعی را افزایش دهد، با این حال این مورد در همه گیاهان صادق نیست و ممکن است در بعضی موارد ارتباط مشخصی بین مقدار ژن، خاموش شدن ژن و بیان متابولیت‌های ثانویه وجود نداشته باشد (۵۱).

تجزیه‌وتحلیل داده‌های حاصل از اثر تیمار با کلشی‌سین بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی زنیان نشان داد که با افزایش سطح پلوئیدی میزان فعالیت کاتالاز و پراکسیداز افزایش یافت (جدول ۵). گزارش شده که روش دو برابر

www.SID.ir

Archive of SID

کردن کروموزوم‌ها می‌تواند با افزایش فعالیت ژنی و در نتیجه افزایش تنوع آنزیم‌ها، افزایش نسبت فتوسنتز، کاهش میزان تعرق و سرعت رشد کمتر گیاه باعث مقاومت بیشتر نسبت به تنش‌های تغذیه‌ای و شرایط محیطی گردد (۵۰). در سورگوم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تتراپلوئید افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان دیپلوئید داشته‌اند (۵۶).

نتایج نشان داد که با افزایش سطح پلوئیدی میزان پروتئین کل (۱/۵۷ میلی‌گرم در گرم ماده تر) در زنیان افزایش اما میزان کارتنوئید کاهش یافته است (جدول ۵). افزایش اندازه سلول‌ها در نتیجه افزایش سطح پلوئیدی می‌تواند به‌عنوان عاملی جهت افزایش مواد ذخیره‌ای در سلول تلقی شود (۴۲). نتایج تحقیقات انجام شده نشان داد که محتوای پروتئینی در آندوسپرم لاین‌های اوتوتتراپلوئید برنج خیلی بیشتر از انواع دیپلوئید آن بود (۵۵) که با تحقیق حاضر مشابهت اما ذکر شده که گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین میزان کارتنوئید بیشتری نسبت به گیاهان دیپلوئید داشتند(۵۲) که با تحقیق حاضر متفاوت و می‌تواند به این دلیل باشد که کارتنوئید تحت تأثیر عواملی از جمله دما، شدت نور و میزان آب در دسترس در طول فصل رشد قرار می‌گیرد(۴, ۴۷). در تحقیقی (۳۹) گزارش شده کارتنوئید در جلبک سبز تحت تاثیر شوری بوده و همبستگی مثبتی با شوری داشته است.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک گیاه زنیان پس از تیمار با کلشی‌سین

منابع تغییر	df	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئید	آنتوسیانین	پراکسیداز
تیمار	۱	۷۱۱۳/۹۹**	۱۳۴۹۳/۷**	۳۴۴۱/۶**	۲/۶۶^{ns}	۲/۴**
خطا	۴	۳۶/۹	۷/۹۹	۱۳/۳۹	۵/۰۶	۱/۳۳
ضریب تغییرات	-	۳/۸۷	۱/۵۶	۱۵/۳۱	۱۲/۱۳	۱۴/۶۴
منابع تغییر	df	کاتالاز	فنل کل	پروتئین کل	فلاونوئید	
تیمار	۱	۱/۶۶**	۰/۰۰۵^{ns}	۰/۲۳**	۳/۴۷*	
خطا	۴	۶/۶۶	۰/۰۰۳۶	۰/۰۰۲۳	۲/۶۷	
ضریب تغییرات		۹/۴۲	۲/۴۲	۳/۳۷	۷/۶۷	

^{ns}، * و **: به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد

جدول ۵- مقایسه میانگین صفات فیزیولوژی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید

سطح پلوئیدی	کلروفیل a ($^{mg}/_{gFW}$)	کلروفیل b ($^{mg}/_{gFW}$)	کارتنوئید ($^{mg}/_{gFW}$)	آنتوسیانین ($^{mg}/_{gFW}$)	پراکسیداز ($^{mg}/_{gFW}$)
۰ (شاهد)	۱۲۲/۱±۹/۵۲b	۱۱۸/۵±۸/۷۱b	۳۸/۴±۲/۷۵a	۰/۰۰۰۸±۰/۰۰۰۰۱۳a	۰/۰۰۰۱۳±۰/۰۰۰۰۱۵b
۰/۵گرم بر لیتر	۱۹۱/۰۲±۱۰/۶۶a	۲۴۳/۷±۹/۹۴a	۴۹/۹±۲/۶۹b	۰/۰۰۰۹±۰/۰۰۰۰۱۴a	۰/۰۰۰۵۳±۰/۰۰۰۰۱۷a
سطح پلوئیدی	کاتالاز ($^{mg}/_{gFW}$)	فنل کل ($^{mg}/_{gFW}$)	پروتئین کل ($^{mg}/_{gFW}$)	فلاونوئید ($^{mg}/_{gFW}$)	
۰ (شاهد)	۰/۰۰۰۷±۰/۰۰۰۱۷b	۲/۴۷۵±۰/۰۲۸a	۱/۱۷۴±۰/۰۹۸b	۱/۳۴۶±۰/۰۸۳b	
۰/۵گرم بر لیتر	۰/۰۰۱۰±۰/۰۰۰۱۸a	۲/۵۳۴±۰/۰۲۷a	۱/۵۷۲±۰/۰۹۶a	۲/۸۶۸±۰/۰۹۱a	

حروف مشابه برای هر صفت بین نمونه شاهد و تیمار داده شده نشان‌دهنده تفاوت غیر معنی‌دار بین آن‌هاست

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد با استفاده از محرک‌های مختلف از جمله کلشی‌سین می‌توان باعث ایجاد تغییر در تولید متابولیت‌های ثانویه شد. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت ۰/۵ گرم در لیتر و مدت زمان ۶ ساعت، بهترین تیمار جهت القاء پلوئیدی در گیاه زنیان می‌باشد. همچنین بررسی‌های بیشتر و مقایسه بین خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید

www.SID.ir

Archive of SID

نشان داد که گیاهان تتراپلوئید از نظر صفات کمی از قبیل تعداد شاخه جانبی، ارتفاع گیاه، تعداد برگ، قطر ریشه، وزن تر و وزن خشک گیاه و همچنین کلروفیل a، کلروفیل b، پراکسیداز، کاتالاز، پروتئین کل و فلاونوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید برتری داشتند، بنابراین می‌توان گفت که پلی‌پلوئیدی با ایجاد تنوع در صفات مختلف گزینه‌های جدیدی برای اصلاح‌گران ایجاد می‌کند تا بسته به هدف که ممکن است کاربردهای دارویی، زینتی، مقاومتی و غیره باشد، گیاهان مطلوب گزینش شوند.

منابع

1- Acquaah G (2009) Principles of plant genetics and breeding. John Wiley & Sons. 560 Pages

2- Adams KL, Wendel JF (2005) Novel patterns of gene expression in polyploid plants. TRENDS in Genetics 21: 539-543. doi: 10.1016/j.tig.2005.07.009

3- Afshar Mohammadian M, Omidi Z, Purakbari kasmaei R, Asadi Abkenar A (2013) The effect of polyploidy on some anatomical and antioxidant characteristics of *Citrus ourantifulia* A. Journal of Plant Researches 26: 238-246. 2631

4- Afshar Mohammadian M, Pour Akbari R, Omidi Z, Ghanati F, Torang A (2012) The effect of induced polyploidy on morphological and physiological traits of lemon (*Citrus aurantifolia* L.). Plant Biology Journal 12: 13-24.

5- Akbarinia A, Sefidkon F, Ghalavand A, Tahmasbi SZ, Sharifi AE (2005) A study on chemical composition of Ajowan (*Trachyspermum ammi*) essential oil produced in Qazvin. The journal of gazvin university of medical sciences 9: 22-25.

6- Altrock S, Fonseca A, Pedrosa-Harand A (2011) Chromosome identification in the Andean common bean accession G19833 (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). Genetics and molecular biology 34: 459-463. 10.1590/S1415-47572011005000029

7- Amiri A, Taghizadeh M, Shoor M, Nemati H, Tehranian Far A (2013) Investigating the Possibility of Inducing Polyploidy in African Violets Using Colchicine in Reciprocal Seedlings of the African Violet (*Saintpaulia ionantha*). In: Proceedings of the Eighth Iranian Horticultural Sciences Congress, Hamadan|. Conference Location|. pp. Pages|.

8- Ashraf M, Orooj A (2006) Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in an arid zone traditional medicinal plant ajwain (*Trachyspermum ammi* [L.] Sprague). Journal of Arid Environments 64: 209-220.

9- Ayyobi n, Hosseini B, Fattahi m (2017) induction Effects of Colchicine and Chitosan on Rosmarinic Acid Production in Hairy Root Cultures of Zarrin-Giah (*Dracocephalum kotschyi Boiss*). Journal of Cellular and Molecular Researches 30 (1): 1-13.

10- Beers RF, Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol chem 195: 133-140.

11- Birami kohi A, Fahmideh L, Riasat M (2016) Evaluation of Morphologic and Physiologic Traits of Sistan's Native Fenugreek (*Trigonellafoenum graecum*) under Colchicine Treatments. Journal of Crop Breeding 8: 153-159.

12- Borgheei SF, Sarikhani H, Chaichi M, Kashi A (2010) In vitro induction of polyploidy in lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Scientific Journal Management System 26: 283-295. doi: 10.22092/ijmapr.2010.6688

13- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72: 248-254.

14- Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of food and drug analysis 10.

15- Cheema AK (2018) Plant Breeding its Applications and Future Prospects. International Journal of Engineering Technology Science and Research 5: 88-94.

16- Chen B, Li J, Zhang J, Fan H, Wu L, Li Q (2016) Improvement of the tissue culture technique for *Melaleuca alternifolia*. Journal of forestry research 27: 1265-1269.

17- Das AB, Das A, Pradhan C, Naskar SK (2015) Genotypic variations of ten Indian cultivars of *Colocasia esculenta* var. antiquorom Schott.

www.SID.ir

Archive of SID

evident by chromosomal and RAPD markers. Caryologia 68: 44-54.

18- Davari A, Solouki M, Fazeli-Nasab B (2018) Effects of jasmonic acid and titanium dioxide nanoparticles on process of changes of phytochemical and antioxidant in genotypes of *Satureja hortensis* L. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants 5: 1-20.

19- de Azevedo Neto AD, Prisco JT, Enéas-Filho J, de Abreu CEB, Gomes-Filho E (2006) Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environmental and Experimental Botany 56: 87-94. doi: 10.1016/j.envexpbot.2005.01.008

20- De Smet R, Sabaghian E, Li Z, Saeys Y, Van de Peer Y (2017) Coordinated Functional Divergence of Genes after Genome Duplication in *Arabidopsis thaliana*. The plant cell 29: 2786-2800.

21- Dehdari A (2014) Cytogenetical evaluation of canola cultivars and two wild species of Brassica. Journal of Cellular and Molecular Researches 26 (4): 446-461.

22- Escandón AS, Alderete LM, Hagiwara JC (2007) In vitro polyploidization of *Mecardonia tenella*, a native plant from South America. Scientia Horticulturae 115: 56-61.

23- Estaji A, Hosseini B, Ravandi EG, Dehghan E, Sefidkon F (2017) The effects of colchicine-induced autotetraploidy on selected characteristics of nuruozak (*Salvia leriifolia*). Cytology and genetics 51: 74-81. doi: 10.3103/S0095452717010042

24- Fazeli-nasab B, Fooladvand Z (2016) A Review on Iranian *Carum copticum* (L.): Composition and Biological Activities. European Journal of Medicinal Plants 12: 1-8. 10.9734/EJMP/2016/17584

25- Ghotbi Ravandi E, Dehghan E, Estaji A, Naghdi Badi H (2014) Increasing the Production of Valuable Phytopharmaceutical Compounds by Chromosome Manipulation: Perspectives and Techniques of Induction and Selection of Polyploid Plants. Journal of Medicinal Plants 2: 11-26.

26- Haghiroalsadat F, Azhdari M, Oroojalian F, Omidi M, Azimzadeh M (2015) The Chemical Assessment of Seed Essence of Three Native Medicinal Plants of Yazd Province (*Bunium Premium*, *Cuminum Cyminum*, *Trachyspermum Copticum*) and the Comparison of Their Antioxidant Properties. SSU_Journals 22: 1592-1603.

27- Harbard J, Griffin A, Foster S, Brooker C, Kha L, Koutoulis A (2012) Production of colchicine-induced autotetraploids as a basis for sterility breeding in *Acacia mangium* Willd. Forestry: An International Journal of Forest Research 85: 427-436. doi: 10.1093/forestry/cps041

28- Hasani MA, Mirzaie M, Omidbaigi R, Fathi Qarebaba M (2010) The effect of the amount of oil and some characteristics of qualitative and quantitative autotetraploid *Ocimum basilicum* L. Journal of Horticultural Science 41: 111-118.

29- Hosseini B, Javanbakht S (2017) Effects of in vitro polyploidy induction on some morphological, physiological and biochemical traits of *Salvia leriifolia* Benth. Scientific Journal Management System 25: 24-42. 10.22092/ijrfpbgr.2017.109815

30- hosseini h, chehrazi m, nabati ahmadi d, mahmoodi sorestani m (2015) Induction of autotetraploidy in Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* cv. *Rosea*) by colchicine treatment in order to induce diversity of morph-physiological and phenology traits. journal of plant process and function 3: 1-10.

31- Jafar Khani kermani M, Jokar A, Habashi AA (2008) A Review of Modern Breeding Methods of Ornamental Flowers and Ornamental Plants. Modern Genetics 3: 14-15.

32- Kasperbauer MJ (2018). In: Physiology and Biochemistry: Potential Use of Haploids and Doubled Haploids Biotechnology in Tall Fescue Improvement. (ed)^(eds). CRC Press. pp. 147-172.

33- Khalili H, Baghbani-arani F (2017) Green Synthesized of Silver Nanoparticles Using *Artemisia tschernieviana* Extract and Evaluation of Cytotoxicity Effects on Human Colon Cancer (HT29) and Normal (HEK293) Cell Lines. journal of ilam university of medical sciences 25: 91-100.

34- Lacerda LP, Malaquias G, Peron AP (2014) Antiproliferative action of aqueous extracts of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. (Fabaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. Anais da Academia Brasileira de Ciencias 86: 1147-1150.

35- Levin DA, Soltis DE (2018) Factors promoting polyploid persistence and diversification and limiting diploid speciation during the K–Pg interlude. Current opinion in plant biology 42: 1-7.

www.SID.ir

Archive of SID

36- Lin M, Wu Q, Zheng S, Tian H (2011) Tissue culture and polyploidy induction of *Morinda officinalis*. Zhongguo Zhong yao za zhi" Zhongguo zhongyao zazhi" China journal of Chinese materia medica 36: 2325-2328.

37- Liu B, Liu B (2009) Theory and practice of uncertain programming. Springer.

38- Malekzadeh Shafaroudi S, Ghani A, Habibi M, Amiri A (2012) The Study of Autotetraploidy Induction in Basil (*Ocimum basilicum*) by Colchicines Treatment. Journal Of Horticulture Science 25: 461-469. doi:10.22067/jhorts4.v1390i0.11781

39- Mansouri H, Nezhad FS (2017) Effects of polyploidy on response of *Dunaliella salina* to salinity. bioRxiv: 219840. doi: 10.1101/219840

40- Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG (2005) Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food chemistry 91: 571-577. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.10.006

41- Nadernejad N, Ahmadimoghadam A, Hossyinifard J, Poorseyedi S (2013) Study of the rootstock and cultivar effect in PAL activity, production of phenolic and flavonoid compounds on flower, leaf and fruit in Pistachio (*Pistacia vera* L.).

42- Nagymihály M, Veluchamy A, Györgypál Z, Ariel F, Jégu T, Benhamed M, Szűcs A, Kereszt A, Mergaert P, Kondorosi É (2017) Ploidy-dependent changes in the epigenome of symbiotic cells correlate with specific patterns of gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences 114: 4543-4548.

43- Nilanthi D, Chen X-L, Zhao F-C, Yang Y-S, Wu H (2009) Induction of tetraploids from petiole explants through colchicine treatments in *Echinacea purpurea* L. BioMed research international 2009: Article ID 343485, 343487 pages. doi: 10.1155/2009/343485

44- Noori SAS, Norouzi M, Karimzadeh G, Shirkool K, Niazian M (2017) Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). Plant cell, tissue and organ culture (pctoc) 130: 543-551.

45- Normohammadi S, Ghaderi N, Javadi T (2018) Morpho-physiological Responses of Strawberry (Fragaria× ananassa) to Exogenous Salicylic Acid Application under Drought Stress.

46- Oliveros Bastidas AdJ, Chinchilla N, Molinillo JM, Elmtili NE, Macias FA (2018) Qualitative study on the production of the allelochemicals benzoxazinones by inducing polyploidy in Gramineae with colchicine. Journal of agricultural and food chemistry 66: 3666–3674. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b05489

47- Palii A, BATÎRU G (2016) Amino-acid content in grain protein of tetraploid opaque-2 maize. Food and Environment Safety Journal 13: 1-7.

48- Panahi Y, Alishiri GH, Parvin S, Sahebkar A (2016) Mitigation of systemic oxidative stress by curcuminoids in osteoarthritis: results of a randomized controlled trial. Journal of dietary supplements 13: 209-220.

49- Piromya R, Kermanee P (2013) Occurrence of tetraploidy in colchicine-treated physic nut (*Jatropha curcas* Linn.). Kasetsart Journal (Nat Sci) 47: 23-29.

50- Qi-Qing L, ZHANG J, Ji-Hua L, Bo-Yang Y (2018) Morphological and chemical studies of artificial Andrographis paniculata polyploids. Chinese journal of natural medicines 16: 81-89.

51- Ranney TG (2006) Polyploidy: From evolution to new plant development. In: Combined Proceedings International Plant Propagators' Society(ed)^(eds). pp. 137-142.

52- Rodríguez-Suárez C, Mellado-Ortega E, Hornero-Méndez D, Atienza SG (2014) Increase in transcript accumulation of Psy1 and e-Lcy genes in grain development is associated with differences in seed carotenoid content between durum wheat and tritordeum. Plant molecular biology 84: 659-673.

53- Rubuluza T, Nikolova RV, Smith M, Hannweg K (2007) In vitro induction of tetraploids in Colophospermum mopane by colchicine. South African journal of Botany 73: 259-261.

54- Selmecki AM, Maruvka YE, Richmond PA, Guillet M, Shoresh N, Sorenson AL, De S, Kishony R, Michor F, Dowell R (2015) Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast. Nature 519: 349.

55- Singh A, Matta N (2010) Characterization Studies on Seed Storage Proteins in Rice Autotetraploids. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 6: 1078-1086.

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

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of polyploidy induction on morphological, physiological and biochemical characteristics of *Carum carvi* L.

Akbari R.[1], Fahmideh L.[1] and Fazeli-Nasab B.[2]

[1] Dep. Of Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran

[2] Research Dep. Of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran

Abstract

Carum carvi L., an herbaceous plant, one year old, belongs to the Chadian dwarf, has antimicrobial and fungicidal effects, which is mainly due to the effects of thymol composition. The induction of polyploidy using mutagenic chemicals has been used as one of the methods for modifying medicinal plants to increase the production capacity of secondary metabolites. In order to investigate the effects of polyploidy induction on Shiraz seedlings, a factorial in a completely randomized format using Colchicine (0.2, 0.5, 0.75 and 1 g/l) and treatment duration (6, 12 and 18 hours) and after obtaining the best concentration and best treatment time, tetraploidy plants and control plants were studied for morphological, physiological and biochemical traits. The results of analysis of variance showed that tetraploid induction was significant on plant height, stem diameter, flower number, number of lateral branches, root diameter, fresh weight, chlorophyll a and b, carotenoid, peroxidase, catalase, total protein and flavonoid. The results of this study showed that 0.5 g/l concentration and 6 hours duration is the best treatment for ploidy induction in the plant. The number of chromosomes of the diploid plants was 18 and in the tetraploid plants was 36 Therefore, it can be argued that colchicine is effective in inducing polyploidy in a plant. In general, the results of this study showed that tetraploidy plants excelled in terms of quantitative traits, especially anthocyanin, peroxidase, catalase, flavonoids and total protein relative to diploid plants.

Key words: Antioxidant, Polyploidy, Ajowan, Colchicine, Flavonoid

www.SID.ir