دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۵، شماره ۲، صفحه ۱۸۱-۱۷۰ (۱۳۹۸)
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2019.121777.2314
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1398.35.170.94.2.1576.41

بررسی اثر القای پلی‌پلوئیدی بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و برخی خصوصیات فیتوشیمیایی و مورفولوژیکی خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum* Lindl.)

سید هادی مدنی[۱]، بهمن حسینی[۲*]، قاسم کریم‌زاده[۳] و امیر رحیمی[۴]

۱- دانشجوی دکترای گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

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

۳- دانشیار، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه زراعت، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۷ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۷

چکیده

خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum* Lindl.) از گیاهان دارویی متعلق به تیره خشخاش بوده که به‌دلیل دارا بودن آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکوئینولین در صنایع داروسازی، کاربرد فراوانی دارد. القای پلی‌پلوئیدی از موضوعات جالب توجه در اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهان دارویی می‌باشد. در این تحقیق، از تیمار کلشی‌سین در ۵ غلظت (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد) و سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، با سه تکرار به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط گلخانه‌ای با هدف مطالعه تغییرات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی در گیاهان پلی‌پلوئید و مقایسه آن با گیاهان دیپلوئید استفاده گردید. برای تعیین سطح پلوئیدی گیاهان، بررسی‌های میکروسکوپی، مورفولوژیکی و شمارش کروموزومی انجام شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد که غلظت ۰/۲٪ کلشی‌سین در مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت با بازدهی ۳۲٪ مناسب‌ترین تیمار برای تولید گیاهان پلی‌پلوئید است. القای پلی‌پلوئیدی باعث ایجاد تغییرات معنی‌دار در افزایش ترکیب‌های فیتوشیمیایی مانند فنل، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان کل در گیاهان پلی‌پلوئیدی نسبت به دیپلوئید گردید؛ همچنین شاخص تراکم روزنه در گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به دیپلوئید کاهش معنی‌داری را نشان داد. تعداد کروموزوم در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید به ترتیب برابر با ۱۴ (2n=2x=14) و ۲۸ (2n=4x=28) ثبت گردید. بنابراین می‌توان گفت، افزایش سطح پلوئیدی موجب افزایش ترکیب‌های فیتوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی در گیاه دارویی خشخاش ایرانی می شود.

واژه‌های کلیدی: خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum* Lindl.)، پلی‌پلوئیدی، فنل، کلشی‌سین.

مقدمه

خشخاش ایرانی با نام علمی *Papaver bracteatum* Lindl. از تیره Papaveraceae برای اولین بار توسط Lindley در سال ۱۸۲۱ شناخته شد (Coffman *et al.*, 1975). تمام اندام گیاه حاوی ماده مؤثره‌ای از نوع آلکالوئیدی است که مهمترین ترکیب را تبائین و به‌مقدار بسیار کم مورفین و کدئین تشکیل می دهند که در صنایع داروسازی کاربرد فراوانی دارند (Neubauer & Mothes,

1963). تبائین ۹۸٪ کل آلکالوئیدهای خشخاش ایرانی را تشکیل داده و بین ۰/۷ تا ۱/۳ درصد ماده خشک ریشه را شامل می‌شود و از ترکیب‌های اصلی گیاه خشخاش ایرانی می‌باشد (Neubauer & Mothes, 1963). تبائین به راحتی به کدئین تبدیل شده و اعتیادآور نیست و داروهای درمان اعتیاد مانند نالوکسون (Naloxone) و نالترکسون (Naltrexone) از آن ساخته می‌شوند (Palevitch & Levy, 1983). از آنجا که تولید جهانی خشخاش به علت نیاز به کشت آن در تولید کدئین توجیه شده است، هر گونه گیاهی که قادر به تولید کدئین یا پیش‌سازهای آن بدون تولید همزمان مواد مخدر دیگری مانند مورفین باشد، دارای ارزش بالایی است. دو برابرسازی ژنوم‌ها (پلی‌پلوئیدی) به‌عنوان یک ابزار تکاملی مهم در گیاهان گل‌دار شناخته شده است (Soltis & Soltis, 1999). گیاهان با سطوح پلوئیدی بالاتر اغلب سلول‌های بزرگتر، برگ‌های ضخیم‌تر، رشد کندتر، میزان آب بیشتر و تأخیر در گلدهی ولی افزایش دوره رشد را نشان می‌دهند (Kondorosi *et al.*, 2000). القاء پلی‌پلوئیدی در گیاهان اغلب موجب تولید واریته‌های جدید با کیفیت متمایز می شود و از سوی دیگر از طریق دو برابر شدن سطح کروموزومی، افزایش تعداد نسخه‌های ژنی بیان‌کننده ترکیب های مواد مؤثر و افزایش جثه گیاه، موجب افزایش ترکیب های ثانویه و دارویی آن می‌شود. مؤثرترین ماده به‌منظور تحریک پلی‌پلوئیدی، کلشی‌سین می باشد که از بذر پداژه و گل‌های گیاه گل حسرت (*Colchicum autumnale*) استخراج می‌شود (Arzani, 2001). برای القای پلی‌پلوئیدی از کلشی‌سین در بسیاری از گیاهان مانند پالونیا (*Paulownia tomentosa*) (Tang *et al.*, 2010)، بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*) (Madani *et al.*, 2015) و زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) (Zahedi *et al.*, 2014) استفاده شده است. با این حال، در بسیاری از گونه‌های گیاهی، کلشی‌سین باعث تأثیرات جانبی مانند عقیم شدن، رشد غیرطبیعی، زیان های کروموزوم یا بازآرایی و جهش ژن می‌گردد (Luckett, 1989)؛ همچنین تولید گیاهان تتراپلوئید به‌عنوان مانع در آمیزش اینترپلوئیدی محسوب می‌شوند (Zhang *et al.*, 2007). در رابطه با القای پلی‌پلوئیدی و تأثیرات آن بر مباحث میکروسکوپی، مورفولوژیکی، فیتوشیمیایی و همچنین سیتوژنتیک خشخاش ایرانی اطلاعات کمی در دسترس است. این تحقیق با هدف تکمیل یک دستورالعمل بهینه‌سازی شده برای القای پلی پلوئیدی در خشخاش ایرانی و در نهایت بهره‌گیری آن برای تولید گیاهان تتراپلوئید با ویژگی‌های فیتوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی بالاتر در جهت مقاومت به انواع تنش‌ها اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و کشت

این تحقیق در سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۴ در گلخانه تحقیقاتی و آزمایشگاه فیزیولوژی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه اجرا شد. بذرهای خشخاش ایرانی از کوهپایه‌های اطراف ارومیه واقع در استان آذربایجان‌غربی با مختصات جغرافیایی ۴۴ درجه و ۳۶ دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجه و ۳۵ دقیقه عرض شمالی جمع‌آوری شدند. با توجه به مشکلات مرتبط با جوانه‌زنی طبیعی بذرهای خشخاش ایرانی، از جیبرلین ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در شرایط تاریکی به مدت ۶ ساعت برای بهبود جوانه زنی بذرها استفاده گردید. سپس بذرهای خشخاش ایرانی در بستر خاکی در گلدانهای بزرگ (قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر) با ترکیب خاک، پیت ماس و ماسه (۲:۱:۱) کشت شدند. پس از کشت بذرها، گلدان‌ها در شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد، با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. چهار هفته بعد از جوانه‌زنی گیاهچه‌ها، در مرحله ۴ تا ۶ برگی، تیمار کلشی‌سین با غلظت‌های ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد برای مدت زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی با اعمال بر نوک شاخساره‌ها توسط تکنیک گلوله پنبه‌ای انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی

با بکارگیری سه تکرار (هر تکرار ۱۰ گیاهچه) برای هر تیمار (۹۰ ریزنمونه) انجام شد. اثر کلشی سین بر روی رشد، نمو و زنده مانی ریزنمونه ها پس از گذشت ۱۰ روز از اعمال تیمارها مورد ارزیابی قرار گرفت.

مطالعات میکروسکوپی

پس از گذشت ۱ ماه برای مشاهده تراکم روزنه ها، سه برگ بالغ و توسعه یافته و تا حد ممکن برگ‌های هم‌سن و هم‌اندازه از قسمت میانی هر یک از گیاهان تیمار شده و گیاهان دیپلوئید کنترل انتخاب و از هر بوته جدا شدند. سپس با استفاده از تکنیک لاک ناخن (Hamill *et al*., 1992)، از اپیدرم سطح زیرین آنها نمونه برداری انجام گردید. مشاهده نمونه و عکس‌برداری توسط دستگاه میکروسکوپ نوری (Olympus CX21, Olympus America Inc.) مجهز به لنز مشبک با بزرگنمایی ۴۰x در واحد سطح انجام شد. با استفاده از این روش تعدادی از گیاهان مشکوک به پلی‌پلوئیدی تفکیک شدند.

تعیین سطح پلوئیدی

برای تعیین سطح پلوئیدی گیاهان مذکور از تکنیک فلوسایتومتری و سیتوژنتیکی استفاده شد. مطالعات فرایند فلوسیاتومتری با استفاده از رنگ PI (Propidium Iodide) رنگ‌آمیزی شد و از گیاه نخودفرنگی (*Pisum sativum* cv. Ctirad 2C DNA = 9.09 pg) به‌عنوان گیاه استاندارد مرجع استفاده شد (Doležel *et al*., 2007). در ادامه مقدار ۰/۰۳ گرم از نمونه تازه برگ گیاهی را با یک تیغ تیز (Otto, 1990؛ Doležel & Göhde, 1995) در یک میلی‌لیتر از محلول بافر LBO1 (lysis buffer) روی پتری شیشه‌ای خرد کرده و بعد محلول سوسپانسیون حاصل از فیلتر نایلونی (۵۰ میکرومولار) عبور داده شد. در ادامه کار، پانزده دقیقه قبل از تزریق به دستگاه فلوسایتومتری، ۲ میلی‌لیتر از محلول دوم (Otto II) برای هر نمونه به همراه ۱۲ میکرولیتر از محلول رنگی PI و ۶ میکرولیتر از محلول RNase برای حذف RNA به محلول اولیه اضافه شد و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری PAS III (Partec, Germany) مجهز به لامپ لیزر در طول موج ۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای شمارش کروموزوم‌ها، ابتدا یک سانتی متر از برگ‌های جوان گیاهان جدا گردید و در محلول ۰/۲٪ وزنی به حجمی کلشی‌سین به مدت ۴-۲/۵ ساعت در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی قرار داده شد (Farjaminezhad *et al*., 2011). در ادامه، به‌منظور تثبیت سلول ها در مرحله تقسیم میتوزی از محلول کارنوی حاوی سه قسمت الکل اتیلیک خالص و یک قسمت استیک اسید گلاسیال استفاده گردید. برای هیدرولیز، نمونه‌ها درون ظرف حاوی اسید کلریدریک یک نرمال به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد درون حمام آب گرم قرار داده شدند. برای رنگ‌آمیزی، نمونه‌های هیدرولیز شده به مدت ۵۰ دقیقه درون محلول استوفریک هماتوکسیلین در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد درون حمام آب گرم قرار داده شدند و در نهایت نمونه‌های تهیه شده زیر میکروسکوپ نوری (Olympus CX21, Olympus America Inc.) قرار گرفت و شمارش کروموزوم انجام شد.

استخراج فنل، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان (DPPH) کل

به‌منظور استخراج عصاره بافت برگی برای سنجش فنل و فلاونوئید کل، برگ دوم نمونه‌های گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید جداگانه در هاون چینی با نیتروژن مایع سابیده و خرد شدند. ۰/۵ گرم از هر نمونه همگن شده با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ مخلوط و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار داده شد و بعد عصاره‌ها از کاغذ صافی عبور داده شد. سنجش مقدار فنل کل با استفاده از معرف Folin-Ciocalteu و استاندارد گالیک اسید انجام شد (Ebrahimzadeh *et al*., 2008). برای سنجش فلاونوئید

کل، از عصاره‌های برگی استخراج شده از روش رنگ‌سنجی و استاندارد کوئرستین استفاده شد. برای این منظور، ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده در داخل لوله فالکون منتقل و بعد ۱۵۰ میکرولیتر نیتریت سدیم ۵٪ به آن اضافه شد. پس از ۵ دقیقه ورتکس و اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪، لوله‌ها دوباره به مدت ۵ دقیقه ورتکس شدند. با اضافه کردن ۱۰۰۰ میکرولیتر سود ۱ مولار و رساندن آن به حجم ۵۰۰۰ میکرولیتر با آب دیونیزه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO UV/Vis 2100 USA) سنجش و قرائت شد (Cheng *et al*., 2009). برای سنجش آنتی‌اکسیدان کل از DPPH (ترکیب رادیکالی پایدار چربی‌دوست)، ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی به ۲ میلی‌لیتر محلول DPPH اضافه و در شرایط تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد و بعد در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO UV/Vis 2100 USA) سنجش و قرائت شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار رایانه‌ای SAS 9.2 و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ انجام گردید.

نتایج

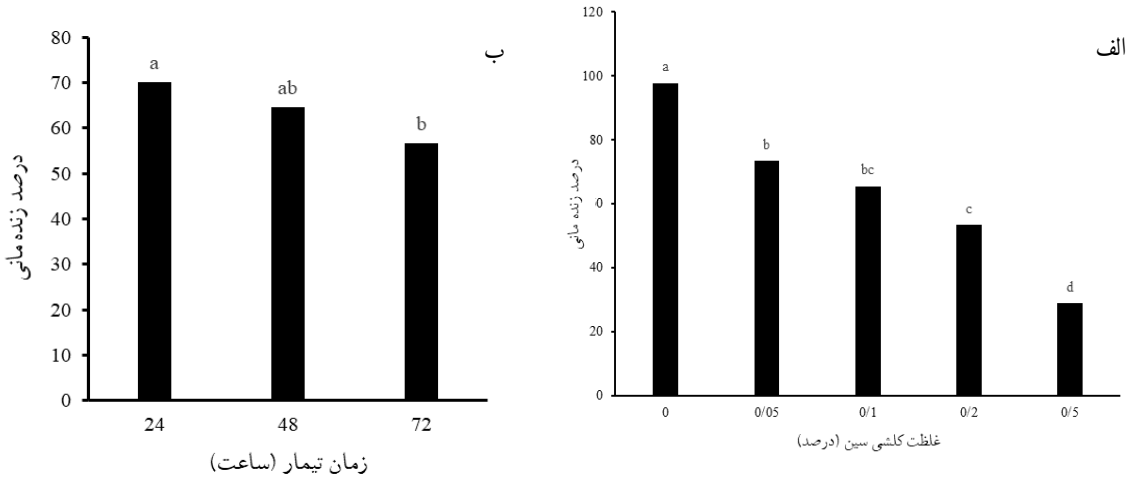
اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین بر زنده‌مانی ریزنمونه‌ها پس از اعمال تیمار

اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین بر درصد زنده‌مانی ریزنمونه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۱). بیشترین درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها (۹۷/۷٪) در تیمار شاهد و کمترین آن در غلظت ۰/۵٪ (۲۸/۸٪) مشاهده گردید (شکل ۱– الف). اثر زمان مختلف تیمار با کلشی‌سین بر درصد زنده مانی گیاهچه‌ها در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود. تیمار زمانی ۲۴ ساعت با کلشی‌سین در مقایسه با ۷۲ ساعت تأثیر قابل توجهی بر میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها داشت. به‌طوری که بیشترین زنده‌مانی در تیمار ۲۴ ساعت با میانگین ۷۰٪ و کمترین زنده‌مانی با میانگین تیمار ۷۲ ساعت با میانگین ۵۶/۶٪ می‌باشد. هرچند بین زمان‌های ۲۴ ساعت با زمان ۴۸ ساعت در این صفت اختلاف معنی داری مشاهده نگردید (شکل۱– ب)، اما میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها در تیمار زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌ترتیب ۷۰/۰، ۶۴/۶ و ۵۶/۶ درصد کاهش یافت. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که اثر متقابل غلظت در زمان بین تیمارها معنی‌دار نمی‌باشد. به‌طور کلی نتایج آزمایش نشان داد که با افزایش غلظت و زمان تیمار کلشی‌سین، درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها به‌طور معنی‌داری به‌دلیل افزایش سمّیت کلشی‌سین کاهش می‌یابد.

جدول ۱– نتایج تجزیه واریانس زنده‌مانی گیاهچه‌های تیمار شده با کلشی‌سین گیاه خشخاش ایرانی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات میانگین گیاهچه باقی‌مانده
غلظت	۴	۵۷۹۸ **
زمان	۲	۶۷۵ *
(غلظت×زمان)	۸	۶۴ ns
اشتباه آزمایشی	۳۰	۱۸۶
ضریب تغییرات (٪)		۲۱/۴۲

* و **، به‌ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ و ۱٪ می‌باشد.



شکل ۱- اثر تیمارهای مختلف کلشی‌سین بر درصد زنده‌مانی گیاه خشخاش ایرانی: (الف) غلظت تیمار و (ب) زمان تیمار

میانگین با حروف مشترک در هر شکل براساس آزمون دانکن، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

جدول ۲- مقایسه میانگین برخی از ویژگی‌ها در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید گیاه خشخاش ایرانی

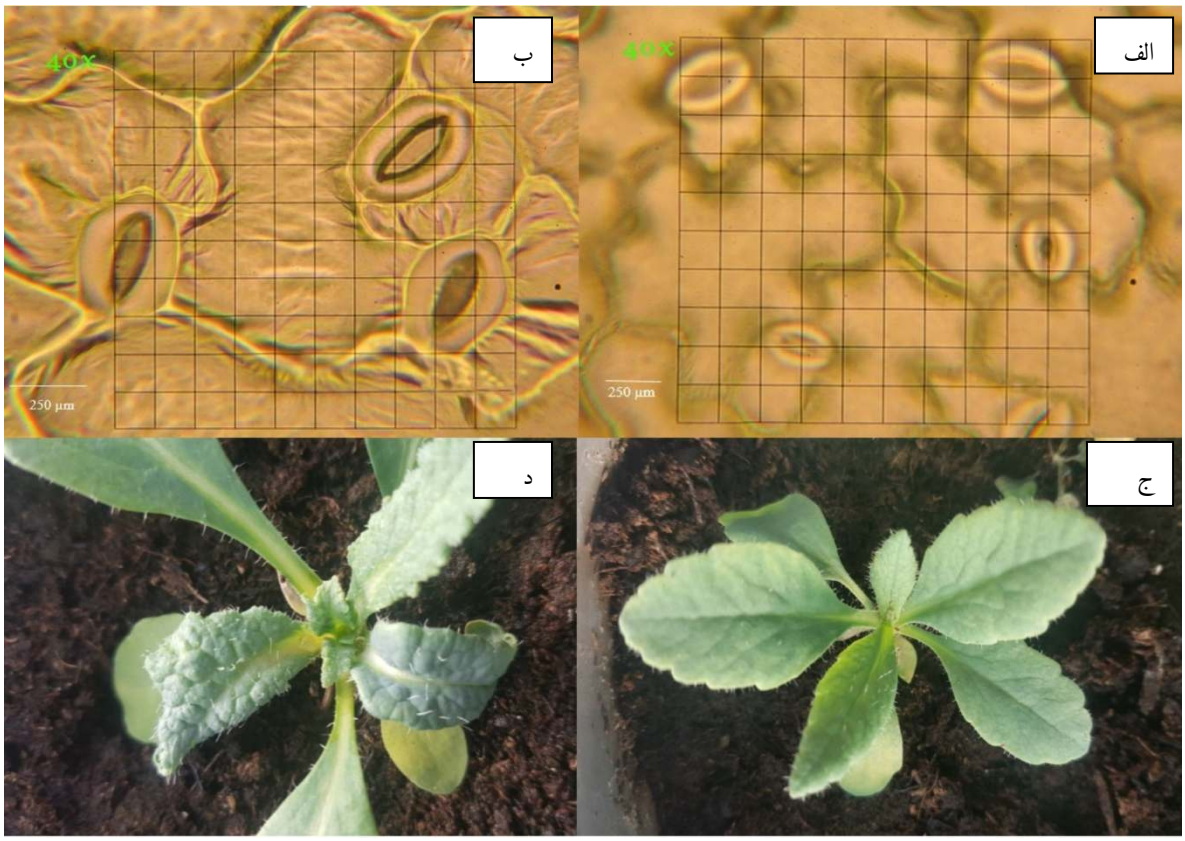
ویژگی‌های بررسی شده	گیاهان تتراپلوئید SE±میانگین	گیاهان دیپلوئید SE±میانگین
طول برگ (cm)	۵/۱۰±۰/۲۸b	۶/۲۱±۰/۳۲a
عرض برگ (cm)	۳/۸۳±۰/۴۶a	۱/۸۹±۰/۴۲b
تراکم روزنه (mm^2)	۱۷۵/۳±۲۰/۱۸a	۵۸/۸±۹/۴۸b
طول روزنه (µm)	۳۶/۸۲±۱/۹۱a	۲۳/۰۵±۱/۸۴b
عرض روزنه (µm)	۱۷/۷۸±۲/۲۶a	۶/۹۳±۱/۲۳b
مساحت برگ (mm)	۵۱۸۳/۶±۷۴۳/۱۵a	۳۳۶۰/۲±۳۲۱/۸۲b
ضخامت کلی برگ (µm)	۰/۵۴±۰/۱a	۰/۳۳±/۰۵b
آنتی‌اکسیدان کل (mg/gr)	۶/۱۹±۱/۲۷a	۴/۴۸±۱/۱۵b

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ردیف در سطح احتمال ۱٪ آزمون DMRT فاقد تفاوت معنی‌داری بودند

تأثیر تتراپلوئیدی بر خصوصیات مورفولوژیکی و آناتومیکی

نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده نشان داد که بجز تیمارهای شاهد بقیه تیمارها سبب ایجاد گیاهچه های تغییر یافته شدند. شناسایی گیاهچه‌های تغییر یافته با بررسی مشخصات و ویژگی‌های مورفولوژیکی از قبیل تأخیر در رشد، تفاوت در مساحت، ضخامت، شکل و رنگ برگ، همانند برگ های تیره، تغییر شکل یافته، چروک و ضخیم پس از اعمال تیمار همراه بود. بررسی شکل برگ در گیاه خشخاش ایرانی نشان داد که برگ‌های گیاهان تتراپلوئید از نظر اندازه (جدول ۲) دارای طول کمتری و عرض بیشتری نسبت به گیاهان دیپلوئید بودند. علاوه‌بر این، برگ‌های گیاهان تتراپلوئید چین‌خورده و ناصاف بودند و از لحاظ

ضخامت، ضخیم‌تر از گیاهان دیپلوئید بودند (شکل ۲- ج و د). مقایسه سطح برگ (جدول ۲) نشان داد که گیاهان تتراپلوئید به‌طور معنی‌داری سطح برگ بزرگتری نسبت به گیاهان دیپلوئید دارند. همچنین در مقایسه تراکم روزنه در یک میلی متر مربع از نقاط مختلف موجود در سطح پشت برگ (آباکسیال) در ۱۰ نمونه از گیاهان دیپلوئید و ۱۰ نمونه از گیاهان تتراپلوئید در مرحله توسعه کامل برگ ها، نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ در تعداد روزنه در واحد سطح برگ بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید وجود دارد (جدول ۲ و شکل ۲). گیاهان تتراپلوئید از لحاظ طول روزنه و عرض روزنه بزرگتر از همتای دیپلوئید خود بودند و اختلاف بین آنها معنی‌دار بوده است.

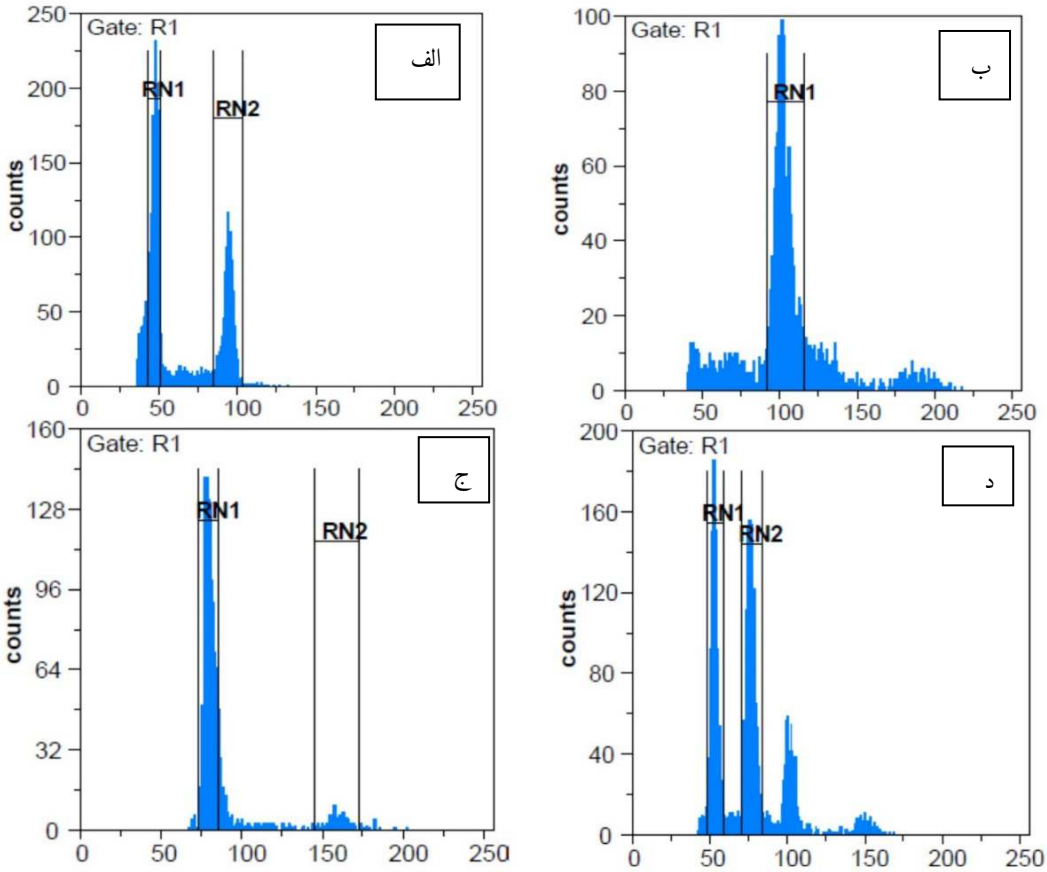


شکل ۲- مقایسه اندازه تراکم روزنه‌ها و تغییرات مورفولوژیکی بعد از اعمال تیمار در گیاه (الف – ج) دیپلوئید (ب-د) و تتراپلوئید خشخاش ایرانی (بزرگنمایی ۴۰x، میکروسکوپ نوری مجهز به لنز مشبک برای تصاویر روزنه)

ارزیابی گیاهچه‌های تغییر یافته بعد از تیمار توسط کلشی‌سین

تأیید تولید گیاهان با افزایش سطح پلوئیدی از طریق فلوسایتومتری امکان‌پذیر می‌باشد. نتایج حاصل از آنالیز فلوسایتومتری ثابت نمود که اعمال تیمار در غلظت‌های مختلف کلشی‌سین با استفاده از تکنیک گلوله‌های پنبه‌ای در مرحله ۴ تا ۶ برگ لپه‌ای باعث تولید گیاه تتراپلوئید شده است. نتایج آنالیز فلوسایتومتری نمونه‌های تیمار شده و شاهد نشان داد که میزان ژنوم در گیاهان تتراپلوئید دو برابر نمونه‌های دیپلوئید می‌باشد. همانطور که در شکل ۴ دیده می‌شود در گیاهان دیپلوئید اوج پیک در کانال ۵۰ می‌باشد که مربوط به G1 گیاهان دیپلوئید است (شکل ۳- الف و د)، در حالیکه اوج پیک تتراپلوئیدها در حدود ۱۰۰ (شکل ۳- ب) بود که حکایت از دو برابر شدن مقدار DNA نسبت به نمونه های دیپلوئید دارد. اوج پیک در گیاه استاندارد برای

G۱ در محدوده ۷۰ می‌باشد (شکل ۳- ج و د). اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین بر درصد گیاهچه های تغییر یافته نشان داد که بیشترین درصد گیاهچه های تغییر یافته در تیمار ۰/۲٪ با میانگین ۳۵ گیاهچه (۳۸/۸۹٪) و کمترین گیاهچه غیرطبیعی در تیمار شاهد (صفر درصد) بدست آمد. اثر متقابل غلظت کلشی سین و زمان تیمار نشان داد که در بین گیاهچه های تیمار شده با کلشی سین بیشترین تغییر در گیاهچه ها در تیمار ۰/۲٪ کلشی سین و زمان ۴۸ ساعت با میانگین ۱۶ گیاهچه (۵۳/۳۴٪) مشاهده گردید و کمترین تغییر در گیاهچه‌ها در غلظت ۰/۱٪ در زمان ۲۴ ساعت با میانگین ۲ گیاهچه (۶/۷٪) بدست آمد.



شکل ۳- تجزیه فلوسایتومتری هسته‌های سلولی خشخاش ایرانی در حالت دیپلوئید (الف)، تتراپلوئید (ب)، گیاه استاندارد (ج) و گیاه دیپلوئید به‌همراه استاندارد (د)

اثر زمان تیمار کلشی‌سین بر گیاهچه های تغییر یافته نشان داد که با افزایش زمان تیمار از ۲۴ به ۴۸ ساعت درصد گیاهان تغییر یافته افزایش یافت، اما با افزایش زمان تیمار و رسیدن به ۷۲ ساعت، تعداد گیاهان تغییر یافته به‌طور چشمگیری کاهش یافتند، به‌طوری که تعداد گیاهان تغییر یافته در زمان ۴۸ ساعت ۴۸ گیاهچه (۳۲٪) و زمان

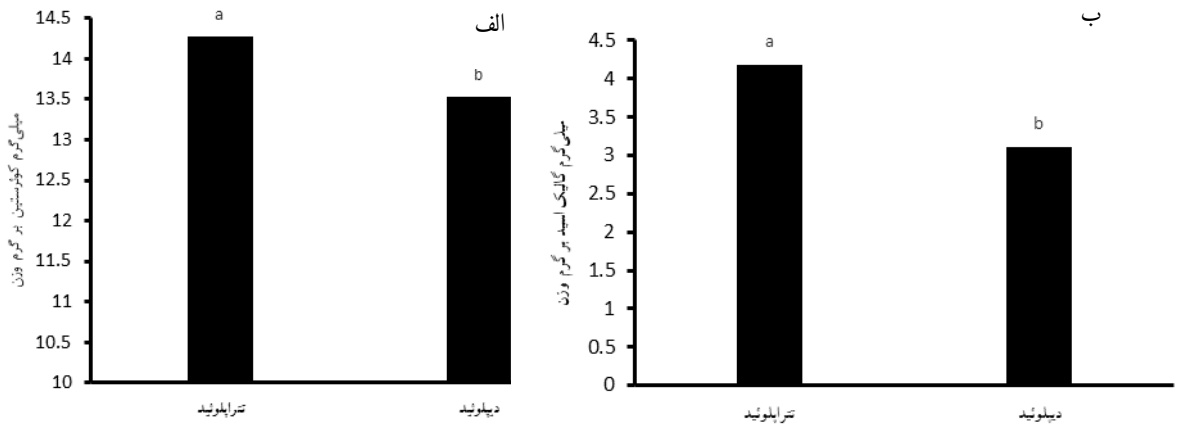
۷۲ ساعت ۱۶ گیاهچه (۱۰/۶۷٪) بودند.

ارزیابی تغییرات پلوئیدی به روش سیتولوژیکی

در این بررسی، برای مشاهده کروموزوم از قسمت‌های بسیار جوان برگ و بخش‌های نزدیک به مریستم انتهایی استفاده شد. نتایج نشان داد که تعداد کروموزوم‌های سلول‌های سوماتیکی در گیاهان تتراپلوئید (2n=4x=28) خشخاش ایرانی در مقایسه با گیاهان دیپلوئید (2n=4x=14) دو برابر شده است.

اثر پلی‌پلوئیدی بر میزان فنل، فلاونوئید کل و آنتی‌اکسیدان

براساس نتایج حاصل، در گیاه خشخاش ایرانی، افزایش سطح پلوئیدی تأثیر معنی داری ($P\leq0.1$) را در میزان فنل، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان کل در گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید داشت. بر این اساس بیشترین میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی در گیاهان تتراپلوئید با میزان ۱۴/۲۸ میلی‌گرم بر گرم وزن نسبت به ۱۳/۵۳ میلی‌گرم بر گرم وزن در گیاهان دیپلوئید بوده است (شکل ۴- الف). همچنین بیشترین میزان فنل در گیاهان تتراپلوئید با میزان ۴/۱۹ میلی‌گرم بر گرم وزن نسبت به ۳/۱۲ میلی‌گرم بر گرم وزن در گیاهان دیپلوئید بوده است (شکل ۴- ب). سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدان کل به روش DPPH در نمونه‌های حاصل نشان داد که گیاهان تتراپلوئید دارای بالاترین فعالیت با میزان ۶/۱۹ میلی‌گرم بر گرم وزن در مقایسه با همتای دیپلوئید خود با میزان ۴/۴۸ میلی‌گرم بر گرم وزن بوده است (جدول ۲).



شکل ۴- میزان فلاونوئید کل و فنل کل در گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید (شاهد) خشخاش ایرانی

بحث

رابطه معکوس بین غلظت کلشی‌سین و بقاء ریزنمونه‌ها در این آزمایش مورد انتظار بود که با سایر بررسی‌های انجام شده در سایر گیاهان مختلف در شرایط طبیعی مطابقت داشت. همچنین در گزارش‌های ارائه شده توسط Madani و همکاران (۲۰۱۵)، مشاهده شد که با افزایش غلظت کلشی‌سین در گیاهان تیمار شده بذرالبنج مشبک (*Hyoscyamus reticulatus*)، درصد مرگ و میر گیاهان افزایش یافت. به‌طوری که در غلظت ۰/۵٪ کلشی‌سین و تیمار ۴۸ ساعت و بیشتر از آن، همه گیاهان تیمار شده از بین رفتند. گیاهان تتراپلوئید در ابتدای رشد دارای دو برگ اولیه با ظاهر غیرعادی و نامناسب بودند، در حالیکه پس از

رشد گیاهچه‌ها، برگ‌های بعدی از رشد و نمو عادی و معمولی همانند گیاه شاهد برخوردار بودند. کاهش رشد پلی پلوئیدها پس از تیمار با مواد ضدمیتوزی، احتمالاً به‌دلیل کاهش سرعت و کم شدن تعداد تقسیم سلولی باشد که در نتیجه ایجاد اختلال در میزان اکسین در سلول‌های در حال تقسیم مریستمی، کاهش میزان تنفس و فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌هاست. برخی از بی‌نظمی‌های مشاهده شده در اندازه برگ، شکل، بافت و رنگ به نسبت تعداد تقسیمات سلولی همراه با اختلالات فیزیولوژیکی در ریزنمونه‌های تیمار شده مرتبط داده شده است و چنین بی‌نظمی معمولاً در جمعیت‌های تحت تیمار با کلشی‌سین مشاهده می‌شود (Dijkstra & Speckmann, 1980). بسیاری از محققان ازجمله Zahedi و همکاران (۲۰۱۴) طی بررسی های خود کلشی سین را به‌عنوان یک ماده جهش زا معرفی کردند و تأثیرات آن را روی ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) به اثبات رساندند؛ که اینکار باعث ایجاد اختلال در فرایندهای فیزیولوژیکی سلول شده و نتیجه آن کاهش سرعت تقسیم سلولی و رشد و نمو گیاه در مراحل اولیه است (Palevitch & Levy, 1983). مطابق با این مشاهدات در این پژوهش و در این راستا Mensah و همکاران (۲۰۰۷) از طریق تیمار بذرهای کنجد (*Sesamum indicum*) با کلشی‌سین توانستند از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی و همچنین از نظر ویژگی‌های فیزیولوژیکی در گیاهان حاصل در مقایسه با گیاهان دیپلوئید تفاوت مشاهده کنند. البته افزایش سطح پلوئیدی در هسته اغلب باعث تغییرات آناتومیکی و ساختاری از قبیل تغییر تراکم روزنه، اندازه سلول و تعداد کلروپلاست در سلول می‌گردد (Castro *et al*., 2003). تراکم روزنه‌ها به‌عنوان ابزار متمایزکننده در گیاهان با سطوح مختلف پلوئیدی در انواع گیاهان دیگر مورد استفاده قرار گرفته است. کاهش در تراکم روزنه‌ها در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید به‌وسیله یافته‌های متعددی اثبات شده‌است. در این تحقیق نیز میزان تراکم روزنه در هر میلی‌متر مربع در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید کاهش معنی‌داری داشت که با نتایج محققان قبلی مطابقت دارد. در این آزمایش گیاهان دیپلوئید خشخاش ایرانی دارای ۱۴ عدد کروموزوم (۲n=۱۴) بودند که این نتایج با نتایج بدست‌آمده از تحقیق Milo و همکاران (۱۹۸۷) مطابقت دارد. گیاهان پلی پلوئید توانایی افزایش تولید و انباشتگی متابولیت‌های ثانویه را دارند. این عمل سبب افزایش مقاومت در برابر تنش‌های غیرزیستی در گیاهان می‌شود. در گیاه خشخاش ایرانی افزایش سطح پلوئیدی تأثیر معنی داری را در میزان فنل کل، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان کل گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید داشت. بنابراین می‌توان گفت افزایش تعداد کروموزوم‌ها بر فنل کل، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان کل اثر داشته است. این نتیجه با نتایج Kong و همکاران (۲۰۱۷) در گیاه دارویی پیچ امین‌الدوله (*Lonicera japonica*) و نتایج Griesbach و Kam (۱۹۹۵) در گیاه اطلسی می‌باشد که نشان دادند القای پلوئیدی سبب افزایش فنل کل، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان کل شد. 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، تعداد کپی ژن، خاموش شدن ژن و بیان متابولیت‌های ثانویه وجود نداشته باشد و مکانیسم مولکولی دقیق که مشخص کند القای پلی‌پلوئیدی دقیقاً در کدام بخش متابولیت‌های ثانویه اثر می‌گذارد مبهم است (Buggs *et al*., 2009). از آنجایی که منطقه مرکزی مریستم مسئول تولید سلول های انتهایی ساقه است، دو برابر کردن کروموزوم‌های این ناحیه، باعث ایجاد بافت پلی پلوئید 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 در ناحیه مریستمی بوجود می‌آیند که در نهایت گیاهانی با سلول های تتراپلوئید همگن تولید می‌شود (Jones *et al*., 2008). 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. در خشخاش ایرانی بهترین روش تیمار با کلشی‌سین برای ایجاد تنوع مورفولوژیکی و تولید گیاهان تتراپلوئید، تیمار مریستم انتهایی به روش گلوله پنبه‌ای و در مرحله ظهور برگ‌های ۴ تا ۶ برگی با غلظت ۰/۲٪ محلول کلشی‌سین در زمان ۴۸ ساعت می‌باشد. به‌دلیل وجود تفاوت معنی‌دار بین گیاهان دیپلوئید و انواع تتراپلوئید خشخاش ایرانی از نظر اندازه و تراکم روزنه‌ها، بررسی های روزنه‌ای به‌عنوان روش مناسبی برای شناسایی گیاهان تتراپلوئید شناخته شد؛ به‌طوری که افزایش سطح پلوئیدی موجب افزایش ترکیب‌های بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی در این گیاه شد.

منابع مورد استفاده

- Arzani, A., 2001. Breeding Field Crops. (Authored Pullman and Aysplar). Isfahan University Publication Center, 606p.
- Buggs, R.J.A., Doust, A.N., Tate, J.A., Kon, J., Soltis, K., Feltus, F.A., Paterson, A.H., Soltis, P.S. and Soltis, D.E., 2009. Gene loss and silencing in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae): comparison of natural and synthetic allotetraploids. Heredity, 103: 73-81.
- Castro, C.M., Oliveira, A.C. and Carvalho, F.I.F.D., 2003. Changes on allele frequencies in colchicines-Treated *ryegrass* populations with RAPD markers. Revista Brasileira de Agrociência, 9(2): 107-112.
- Cheng, S., Xu, F. and Wang, Y., 2009. Advances in the study of flavonoids in *Ginkgo biloba* leaves. Journal of Medicinal Plants Research, 3(13): 1248-1252.
- Coffman, C.B., Bare, C.E. and Gentner, W.A., 1975. Thebaine variations between germplasm sources within one collection of *Papaver bracteaturn*. Bulletin on Narcotics, 27: 41-46.
- Dijkstra, H. and Speckmann, G.I., 1980. Auto tetrapliody in caraway (*Carum carvi* L.) for the increase of the aetheric oil content of the seed. Euphytica Journal, 29: 89-96.
- Doležel, J., Greilhuber, J. and Suda, J., 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. National Protocol, 2: 2233-2244.
- Doležel, J. and Göhde, W., 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. Cytometry, 19: 103-106.
- Ebrahimzadeh, M.A., Hosseinimehr, S.J., Hamidinia, A. and Jafari, M., 2008. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Feijoa sallowiana* fruits peel and leaves. Journal of Pharmacology-online, 1: 7-14.
- Farjaminezhad, R., Asghari, R., Zare, N. and Farjaminezhad, M., 2011. Study of karyological characteristics in several accessions of *Papaver bracteatum* Lindl. Journal of Agricultural Biotechnology, 3(2): 47-58.
- Griesbach, R. and Kam, K., 1995. The effect of induced polyploidy on the flavonols of *Petunia 'Mitchell*. Phytochemistry, 42(2): 361-363.
- Hamill, S., Smith, M. and Dodd, W., 1992. In vitro induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. Australian Journal of Botany, 40(6): 887-896.
- 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.
- Kondorosi, E., Roudier, F. and Gendrau, E., 2000. Plant cell-size: growing by ploidy. Current Opinion in Plant Biology, 3: 488-492.
- Kong, D., Yanqun Li, Y., Bai, M., Deng, Y., Liang, G. and Wu, H., 2017. A comparative study of the dynamic accumulation of polyphenol components and the changes in their antioxidant activities in diploid and tetraploid *Lonicera japonica*. Plant Physiology and Biochemistry, 112: 87-96.
- Luckett, D., 1989. Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. Euphytica, 42: 177-182.
- Madani, H., Hosseini, B., Dehghan, E. and Rezaei-chiyaneh, E., 2015. Enhanced production of scopolamine in induced autotetraploid plants of *Hyoscyamus reticulatus* L. Acta Physiolgica Planatrum, 37: 55-62.
- Mensah, J.K., Obadoni, B.O., Akomeah, P.A., Ikhajiagbe, B. and Ajibolu, J., 2007. The effects of sodium azide and colchicines treatments on morphologicaj and yield traits of sesame seed (*Sesame indicum* L.). African Journal of Biotechnology, 6: 534-538.
- Milo, J., Levy, A., Palevitch, D. and Ladizinsky, G., 1987. Thebaine content and yield in induced tetraploid and triploid plants of *Papaver bracteatum* Lindl. Euphytica, 36: 361-367.
- Neubauer, D. and Mothes, K., 1963. *Uber Papaver bracteatum* I. Mitteilung, ein neuer weg zur gewinnung von morphinanen auf pflanztichef

rohstoffbasis. Planta Medica, 11: 387-391.
- Otto, F.J., 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. Methods in Cell Biology, 33: 105-110.
- Palevitch, D. and Levy, A., 1983. Cultural and genetic factors affecting thebaine yield in *Papaver bracteatum* Lindl. Acta Horticulture, 132: 189-95.
- Soltis, D.E. and Soltis, P.S., 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evaluation of domesticated plants. American Journal of Botany, 80: 1491-1499.
- Tang, Z.Q., Chen, D.L., Song, Z.J., He, Y.C. and Cai, D.T., 2010. In vitro induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 102: 213-220.
- Zahedi, A.A., Hosseini, B., Fattahi, M., Dehghan, E., Parastar, H. and Madani, H., 2014. Overproduction of valuable methoxylated flavones in induced tetraploid plants of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. Botanical Studies, 55: 22.
- Zhang, J., Zhang, M. and Deng, X., 2007. Obtaining autotetraploids *in vitro* at a high frequency in *Citrus sinensis*. Plant Cell, Tissue and Organ culture, 89: 211-216.

Effects of polyploidy induction on antioxidant capacity and some phytochemical and morphological characteristics of Iranian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.)

S.H. Madani[1], B. Hosseini[2*], Gh. Karimzadeh[3] and A. Rahimi[4]

1- Ph.D. student, Department of Horticulture, Urmia University, Urmia, Iran
2*- Corresponding author, Department of Horticulture, Urmia University, Urmia, Iran
E-mail: b.hosseini@urmia.ac.ir
3- Department of Biotechnology and Plant Breeding, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4- Department of Agronomy, Urmia University, Urmia, Iran

Received: May 2018 Revised: December 2018 Accepted: December 2018

Abstract

Iranian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.) is one of the medicinal plants belonging to the Papaveraceae family, which is widely used in pharmaceutical industries due to the presence of benzyl isoquinoline alkaloids. The polyploidy induction is one of the most interesting issues in the breeding and biotechnology of medicinal plants. In this study, colchicine treatment was carried out in five concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5) and three duration times (24, 48, 72 hours) with three replications as a factorial in a completely randomized design under greenhouse conditions, which aimed at studying morphological and phytochemical changes in polyploid plants and comparing them with diploid ones. The Microscopic, morphological and chromosomal counts were used to determine ploidy level of plants. The results showed that the concentration of 0.2% of colchicine for 48 hours was the most suitable treatment for polyploidy induction. Polyploidy caused significant changes in the increasing phytochemicals amount such as phenol, flavonoids and total antioxidants (DPPH) and decreasing the stomatal density index in comparison with the diploid plants. The chromosomes number of the diploid and tetraploid plants was obtained 14 (2n=2x=14) and 28 (2n=4x=28), respectively. Therefore, it can be concluded that the increase in ploidy level increases the phytochemical and antioxidant compounds in Iranian poppy herb.

Keywords: *Papaver bracteatum* Lindl., polyploidy, phenol, colchicine.