DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2017.109815

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۵، شماره ۱، صفحه ۴۲-۲۴ (۱۳۹۶)

اثرات القاء پلی‌پلوئیدی در شرایط درون شیشه‌ای بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.)

بهمن حسینی*[۱] و سپیده جوانبخت[۲]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

پست الکترونیک: b.hosseini@urmia.ac.ir

۲- کارشناس ارشد، علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۲۲

چکیده

نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) گیاهی علفی و چندساله، متعلق به تیره نعناعیان که در سال‌های اخیر خواص مختلف دارویی این گیاه شناخته شده است. پلی‌پلوئیدی درون شیشه‌ای گیاهان دارویی در سال‌های اخیر یکی از موضوعات جالب توجه در بیوتکنولوژی و کشت بافت گیاهی می‌باشند. بر این اساس، با استفاده از غلظت‌های مختلف کلشی‌سین (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد) در سه سطح زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، القای پلی‌پلوئیدی در جوانه‌های انتهایی گیاهچه‌های باززا شده نوروزک مطالعه شد. برای شناسایی گیاهان پلی‌پلوئید، خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و سیتوژنتیکی بررسی شد. نتایج نشان داد که تأثیر تیمارهای مختلف کلشی‌سین بر درصد زنده‌مانی گیاهچه‌های حاصل در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد. با مقایسه تیمارهای ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد کلشی‌سین، بالاترین میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در تیمار ۰/۰۵ درصد برابر با ۸۴/۴۴ درصد مشاهده شد. همچنین بالاترین میزان مرگ گیاهچه، در غلظت ۰/۵ درصد کلشی‌سین ثبت شد. القاء تتراپلوئیدی سبب تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، سیتولوژیکی و ترکیبات شیمیایی از قبیل افزایش طول و عرض روزنه در سطح زیرین برگ، عرض برگ، سطح برگ، میزان کلروفیل برگ، میزان آنتی‌اکسیدان کل، فنل کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد (آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز)، همچنین موجب کاهش طول برگ و تراکم روزنه در واحد سطح برگ شد. تعداد کروموزوم گیاهان دیپلوئید برابر با ۲۲ عدد ($2n=2x=22$) و در گیاهان تتراپلوئید برابر با ۴۴ ($2n=4x=44$) بود. بنابراین می‌توان بیان کرد که کلشی‌سین به‌طور مؤثری قابلیت القای پلی‌پلوئید در گیاه نوروزک را دارد.

واژه‌های کلیدی: نوروزک، کلشی‌سین، پلی‌پلوئیدی، کشت درون شیشه.

مقدمه

گیاه دارویی نوروزک با نام علمی (*Salvia leriifolia* Benth) متعلق به تیره نعناع (Lamiacea)، جنس مریم‌گلی (*Salvia*)، گونه لریفولیا (*Leriifolia*) و بومی استان‌های خراسان و سمنان می‌باشد (Rechinger, 1982)، که در سال‌های اخیر خواص مختلف دارویی این گیاه مانند کاهش وابستگی به مورفین، کاهش قند خون، ضد درد و ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان، ضد انعقاد خون، ضد تشنج، جلوگیری

از ایجاد و توسعه زخم‌های معده، فعالیت‌های ضد باکتری و اثرات آنتی‌موتاژنیک شناخته شده است (Hosseinzadeh, 2009). ارزش دارویی گیاه نوروزک وابسته به متابولیت‌های ثانویه، ازجمله ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و آلکالوئیدها می‌باشد (Tabatabaei yazdi, 1996).

امروزه تأکید اصلی و هدف اختصاصی متخصصان، یافتن گونه‌های جدید گیاهی، توسعه استعدادهای ژنتیکی و همچنین یافتن شیوه‌هایی برای افزایش مواد مؤثره گیاهان دارویی است (Yavari, 2008). 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. پلی‌پلوئیدها اغلب سلول‌های بزرگتر، برگ‌های ضخیم‌تر، رشد کندتر، میزان آب بیشتر و تأخیر در گلدهی را همراه با افزایش دوره آن نشان می‌دهند (Kondorosi *et al*., 2000). سازگاری اکولوژیکی بیشتر در پلی‌پلوئیدها، آنها را مستعد می‌سازد که بتوانند نسبت به دیپلوئیدها شرایط سخت را بهتر تحمل کنند و در طی تغییر محیط که در طی تکامل ایجاد می‌شود، بهتر استقرار پیدا کنند (Levin, 1983). تحقیقات انجام شده در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) نشان داد که مقاومت گیاه تتراپلوئید نسبت به سرخشکیدگی و پوسیدگی طوقه و ریشه بیشتر از گیاه دیپلوئید بود (Dhawan and Lavania, 1996).

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

کلشی‌سین مؤثرترین ماده شیمیایی مورد استفاده در مطالعات القاء پلی‌پلوئیدی است که یک آلکالوئید استخراج شده از بذر پداژه و گل‌های گیاه گل حسرت (*Colchicum autumnale*) می‌باشد (Arzani, 2001). با توسعه تکنیک‌های کشت بافت، القای پلی‌پلوئیدی در محیط درون شیشه‌ای به‌عنوان یکی از روش‌های اصلی برای القای گیاهان پلی‌پلوئیدی مطرح است (Zhang *et al*., 2008). به‌طوری‌که برای القای درون شیشه‌ای پلی‌پلوئیدی در بسیاری از گیاهان مانند بذرالبنج سیاه (*Hyoscyamus reticulatus*) (Madani *et al*., 2015)، بذرالبنج مصری (*Hyoscyamus muticus*) (Shahriari Ahmadi *et al*., 2008)، داتوره (*Datura stramonium*) (Rowson, 1949)، درمنه (Wallaart *et al*., 1999)، مریم گلی (*Salvia miltiorrhiza*) (Gao *et al*., 1996)، و پالونیا (*Paulownia tomentosa*) (Tang *et al*., 2010) از کلشی‌سین استفاده شده است.

نتایج تحقیقات مختلف در پدیده پلی‌پلوئیدی نشان داد که در گیاه بابونه (*Salvia miltiorrhiza* Bge.)، افزایش سطوح پلوئیدی منجر به افزایش قطر و وزن گل‌های آن می‌شود (Gao *et al*., 1996). همچنین در گیاه بادرشبی (*Dracocephalum moldavica* L.) افزایش سطح پلی-پلوئیدی سبب ایجاد گیاهانی با برگ‌های درشت‌تر و تیره‌تر شد (Omidbaigi *et al*., 2010b).

در گیاه ریحان و بادرشبی، با افزایش سطح پلوئیدی تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه، طول و عرض سلول‌های محافظ روزنه افزایش و تراکم آنها کاهش یافت (Omidbaigi *et al*., 2010a; Omidbaigi *et al*., 2010b). محققان بیان کردند که اتوپلی‌پلوئیدی در بسیاری از گیاهان دارویی ازجمله *Atropa*، *Camellia*، *Hyoscyamus* و *Solanum* افزایش شدید متابولیت‌های ثانویه را به‌ازاء واحد وزن خشک نشان می‌دهد، در حالی‌که

گونه‌هایی مانند *Datura* و *Mentha* کاهش تولید این ترکیبات را نشان می‌دهند (Dhawan and Lavania, 1996).

گیاه دارویی نوروزک از گیاهان دارویی بسیار مهم و ارزشمند عرصه طبیعی ایران می‌باشد که مطالعه‌ای در حوزه اصلاح و تکثیر درون شیشه‌ای آن انجام نشده است و از طرفی در رابطه با القای پلی‌پلوئیدی در محیط درون شیشه‌ای اطلاعات کمی در دست است. این پژوهش به‌منظور مطالعه القاء تتراپلوئیدی در شرایط درون‌شیشه‌ای در گیاه دارویی نوروزک و امکان‌سنجی تولید گیاهانی با قابلیت تولید میزان اسانس بیشتر و خصوصیات مورفولوژیکی بهتر انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این تحقیق در سالهای ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی و گلخانه تحقیقاتی گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه اجرا شد. بذرهای مورد استفاده نوروزک در این مطالعه از ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی سبزوار (منطقه آبخوانداری در شمال‌غرب سبزوار)، واقع در استان خراسان رضوی تهیه شد. ریزنمونه‌های گیاه دارویی نوروزک برای انجام آزمایش از گیاهچه‌های رشد یافته این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای تهیه شدند.

به‌منظور دستیابی به تعداد گیاهچه مورد نظر برای القاء پلوئیدی، ابتدا بذرها با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه و بعد با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد (کلر فعال) به‌مدت ۲۵ دقیقه ضدعفونی شده و در نهایت ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو شد. بذرها بعد از ضدعفونی در شرایط استریل و زیر هود لامینار، به‌دلیل جوانه‌زنی بسیار پایین این گیاه، با استفاده از پنس و اسکالپل از قبل استریل شده نصف شده و جنین به‌همراه آندوسپرم، در محیط کشت MS تکمیل شده با ۳ درصد ساکارز، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول و ۰/۷ درصد آگار کشت شد، پس از رشد کافی، ریزنمونه‌ها به محیط باززایی انتقال داده شدند. برای پرآوری (ساقه‌زایی) از جوانه انتهایی ساقه استفاده شد و از محیط کشت MS تکمیل شده با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP (۱۰۰۰ میکرومولار)، IBA (۱۰۰ میکرومولار) و GA (۵۰۰ میکرومولار) استفاده شد و برای ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها ابتدا گیاهان به‌دست آمده از مرحله پرآوری به‌مدت یک ماه به محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی انتقال یافت و بعد به محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد گیاهی NAA منتقل شد.

تهیه محیط‌های کشت حاوی کلشی‌سین

کلشی‌سین مورد استفاده در این تحقیق از شرکت سیگما[1] تهیه شد. به‌منظور تهیه محیط حاوی تیمارهای کلشی‌سین، ابتدا یک محلول پایه[2] با بیشترین غلظت مورد نیاز یعنی ۰/۵ درصد با حجم مورد نیاز که قبلاً محاسبه شده بود، تهیه شد. سپس محلول پایه کلشی‌سین با فیلترینگ سرد (فیلتر نایلونی ۰/۲ میکرون) استریل شد. در ادامه با رقیق‌کردن محلول پایه، غلظت‌های مختلف از محیط‌های حاوی کلشی‌سین به‌دست آمد. لازم به‌ذکر است که برای جذب بهتر محلول کلشی‌سین توسط ریزنمونه‌ها، به محلول پایه تهیه شده چند قطره از محلول تووین ۲۰[3] افزوده شد.

مرحله القا پلی‌پلوئیدی در شرایط درون‌شیشه‌ای: برای القاء پلوئیدی از سرشاخه‌های رشد کرده این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای همراه با دو برگ انتهایی استفاده شد، به این منظور جوانه‌های انتهایی به‌طول یک سانتی‌متر در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف کلشی‌سین ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد (وزنی به حجمی) کشت شدند. پس از گذشت زمان مورد نظر تیمار (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)، گیاهچه‌ها با آب مقطر استریل به‌مدت ۲ تا ۳ دقیقه شستشو داده شدند و پس از آن در محیط کشت فاقد هورمون برای رشد واکشت شده و در شرایط دمایی ۱ ± ۲۵ درجه

1. Sigma Company
2. Stock solution
3. Tween 20

سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاق رشد نگه‌داری شدند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی همراه با پنج غلظت مختلف کلشی‌سین (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد)، سه سطح زمانی مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) و با به‌کارگیری سه تکرار (هر تکرار ۱۵ ریزنمونه) برای هر تیمار (۴۵ ریزنمونه) انجام شد.

بررسی زنده‌مانی ریزنمونه‌ها پس از اعمال تیمار

اثر کلشی‌سین در رشد، نمو و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها پس از گذشت ۳۰ روز از اعمال تیمارها مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد ریزنمونه‌های زنده مانده در هر تکرار و تیمار شمارش شد و از تعداد ریزنمونه‌های خشک شده در اثر تیمار کلشی‌سین تفکیک شد.

شناسایی گیاهان تغییریافته به‌دلیل ویژگی‌های مورفولوژیکی در شرایط درون شیشه‌ای

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

مطالعات میکروسکوپی: برای مشاهده روزنه‌ها، سه برگ بالغ و کاملاً توسعه‌یافته و تا حد ممکن برگ‌های هم‌سن و هم‌اندازه از قسمت میانی هریک از گیاهان مشکوک به پلی-پلوئیدی در مقایسه با گیاهان دیپلوئید انتخاب و از گیاه جدا شد. سپس با استفاده از تکنیک لاک ناخن[4] (Hamill *et al.*, 1992)، از اپیدرم سطح زیرین آنها نمونه‌برداری انجام شد. مشاهده نمونه و عکس‌برداری از آن توسط دستگاه میکروسکوپ نوری انجام و تا حد زیادی گیاهان مشکوک به پلی‌پلوئیدی با استفاده از این روش تفکیک شدند.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های کلروفیل

برای اندازه‌گیری رنگیزه‌های کلروفیل از روش Lichtenthaler و Wellburn (1985) استفاده شد. ۰/۱ گرم از وزن تر برگ به‌همراه ۵ میلی‌لیتر استون ۱۰۰ درصد در هاون چینی ساییده شد. عصاره حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ دور سانتریفوژ شد. سپس جذب هریک از نمونه-های سانتریفوژ شده توسط اسپکتروفتومتر (WPAS2100, UK UV/Vis) در طول موج‌های ۶۶۲ نانومتر، ۶۴۵ نانومتر و۴۷۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه کلروفیل a و کلروفیل b از فرمول‌های زیر استفاده شد. در ضمن A میزان جذب خوانده شده در هر طول موج توسط دستگاه اسپکتروفتومتر می‌باشد.

$$Chla = 11.75\ A662 - 2.350\ A645$$

$$Chlb = 18.61\ A645 - 3.960\ A662$$

اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان کل و فنل کل

عصاره‌گیری متانولی

برای این‌منظور، ۰/۵ گرم از برگ‌های خشک شده در سایه، پس از آسیاب‌کردن به لوله آزمایش انتقال داده شدند. در ادامه، ۱۰ میلی‌لیتر دی اتیل اتر بر روی نمونه‌ها اضافه و به‌مدت ۲۴ ساعت در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری شدند. برای نفوذ بهتر دی‌اتیل‌اتر به داخل بافت‌ها چند بار نمونه‌ها به‌هم زده شد (Fattahi *et al.*, 2011). بعد از این مرحله، مایع روشناور عصاره اتری به بشرهای ۱۰ میلی‌لیتر منتقل شد. بر روی عصاره، ۵ میلی‌لیتر دی‌اتیل‌اتر اضافه و بعد از گذشت ۵ ساعت که دی‌اتیل‌اتر (زیر هود) تبخیر شد، به ماده خشک باقی‌مانده، ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد تا عصاره باقی‌مانده را در خود حل کند. به‌دنبال آن عصاره حاصل از صافی عبور داده شده و در یخچال نگه‌داری شد.

1. Nail varnish technique

اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان کل

به‌منظور اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان کل، ۹۵۰ میکرولیتر DPPH (5× 10-6mol/lit) به ۵۰ میکرولیتر عصاره متانولی (ذکر شده در قسمت قبل) اضافه شده و پس از ۱۵ تا ۳۰ دقیقه، جذب هریک از نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. برای محاسبه فعالیت آنتی‌اکسیدان کل از فرمول زیر استفاده شد (Chiou *et al.*, 2007). برای تهیه بلانک آنتی‌اکسیدان نیز به‌روش بالا عمل شد، فقط به‌جای عصاره، ۵۰ میکرولیتر متانول ۸۰ درصد اضافه شد.

$$\frac{AC - AS}{AC} * 10$$

که در آن AS = طول موج نمونه و AC = طول موج بلانک است

اندازه‌گیری فنل کل

به‌منظور اندازه‌گیری فنل کل، به ۳۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۹۰ میکرولیتر آب و ۶۰۰ میکرولیتر فولین ۱۰ درصد اضافه شد. پس از ۵ تا ۱۰ دقیقه، ۴۸۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۱۰ درصد به نمونه‌های تهیه شده اضافه شد و به مدت ۱/۵ تا ۲ ساعت در جای تاریک نگهداری تا رنگ نمونه‌ها به بنفش تغییر کند. سپس جذب هریک از نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. میزان جذب خوانده شده برحسب (µg/g DW) می‌باشد (Slinkard and Singleton, 1977).

$$y = 0.0007x+0.0145$$

$$\text{Units(mM/min)} = \frac{\frac{\text{doD}}{\text{min(slope)}} \times \text{Vol. of assay}(.0001)}{\text{Extinction cofficient (2.8)}}$$

$\frac{\text{doD}}{\text{min(slop)}}$ = اختلاف بین دو قرائت در یک دقیقه

Vol. of assay = حجم محلول داخل سل

$\text{Extinction cofficient}$ = ضریب خاموشی

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

برای سنجش فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، عصاره گیاهی با استفاده از روش Kang و Saltiveit (2002) با اندکی تغییرات تهیه شد و برای این منظور ابتدا ۰/۵ گرم وزن تر بافت از برگ‌های گیاه در هر سطح پلوئیدی توزین شد و بعد توسط ۳ میلی‌لیتر بافر (شامل ۰/۰۵ مولار بافر تریس HCL باpH= ۷/۵، $MgCl_2$ ۳ میلی مولار، ETDA ۱ میلی‌مولار) در داخل هاون سرد ساییده شد. بافر استخراجی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) شامل ۰/۲ میلی‌مولار آسکوربات نیز بود. هموژنات سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در داخل سانتریفوژ (۵۰۰۰ دور در دقیقه) قرار گرفت. محلول رویی حاصل به‌عنوان عصاره خام برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز (CAT) استفاده شد.

آنزیم آسکوربات پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم با استفاده از روش Aseda (۱۹۹۲) با اندکی تغییرات انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷ (شامل EDTA ۱ میلی‌مولار، آسکوربات سدیم ۱ میلی‌مولار و ۰/۲ میلی‌لیتر H_2O_2 ۱۰ میلی‌مولار) را برداشته و روی آن ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره استخراجی اضافه کرده و بعد فعالیت آنزیم از طریق اکسید شدن آسکوربات توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول - موج ۲۹۰ nm اندازه‌گیری شد که همراه با کاهش جذب در طی یک دقیقه فعالیت آنزیم بود ($۲/۸ \ Mm^{-1} \ cm^{-1}$).

آنزیم کاتالاز

سنجش فعالیت آنزیم CAT با استفاده از روش Aebi (۱۹۸۴) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷ محتوای ۰/۲ میلی‌لیتر H_2O_2 ۱ درصد و ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود. فعالیت آنزیم CAT به‌صورت کاهش در جذب طی یک دقیقه در طول موج ۲۴۰ nm محاسبه شد. برای سنجش میزان فعالیت از ضریب خاموشی (۴۳/۶ $Mm^{-1}\ cm^{-1}$) و از فرمول زیر استفاده شد.

$$\text{Units(mM/min)} = \frac{\frac{\text{doD}}{\text{min(slope)}} \times \text{Vol. of assay}(.0003)}{\text{Extinction cofficient (43.6)}}$$

$\frac{\text{doD}}{\text{min(slop)}}$ = اختلاف بین دو قرائت در یک دقیقه

Vol. of assay = حجم محلول داخل سل

$\text{Extinction cofficient}$ = ضریب خاموشی

مشاهده کروموزوم‌ها: در این مرحله برای حصول اطمینان، کروموزوم‌های سلول‌های گیاهان دیپلوئید و گیاهان مشکوک به پلی‌پلوئیدی طی بررسی‌های سیتوژنتیکی مشاهده شدند. برای مشاهده کروموزوم از قسمت‌های نوک ریشه‌های جوان استفاده شد. یک سانتی‌متر از ریشه‌های جوان گیاهان جدا و در محلول ۲ میلی‌مول ۸- هیدروکسی- کینولین به‌مدت ۳/۵ تا ۴ ساعت در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به‌دنبال آن برای تثبیت سلول‌ها در مراحل تقسیم از محلول کارنوی حاوی سه قسمت الکل اتیلیک خالص و یک قسمت استیک اسید گلاسیال استفاده شد. با قرار دادن نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در محلول تثبیت‌کننده در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد، سلول‌های در حال تقسیم را در مراحل مختلف کشته و ثابت شدند. برای انجام هیدرولیز، نمونه‌های ریشه درون ظرف حاوی اسید کلریدریک یک نرمال به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد درون حمام آب گرم قرار داده شدند. برای رنگ‌آمیزی، نمونه‌های هیدرولیز شده به‌مدت ۷ – ۸ ساعت درون محلول استوکارمن در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای مطالعات میکروسکوپی قسمت‌های تیره‌تر نمونه جدا شد و زیر میکروسکوپ قرار گرفت و کروموزوم‌ها مشاهده شدند (Chavadej and Becker, 1984)

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن[5] (DMRT) انجام گردید و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2007انجام شد.

نتایج

زنده‌مانی گیاهچه‌ها پس از اعمال تیمار

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که غلظت کلشی- سین تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بر درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها داشت، در حالی‌که اختلاف معنی‌داری بین زمان‌های مختلف و اثرات متقابل غلظت و زمان تیمار مشاهده نشد (جدول ۱).

1- Duncan s Multiple Test.

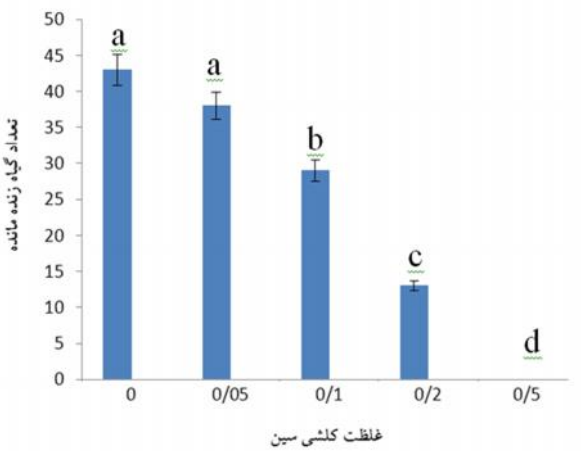
جدول ۱- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس زنده‌مانی گیاهچه‌های تیمار شده با کلشی‌سین در گیاه نوروزک

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین گیاهچه زنده مانده
غلظت کلشی‌سین	۴	۳۵/۴۷**
زمان	۲	۱/۴۰ ns
غلظت کلشی‌سین × زمان	۸	۰/۴۲ ns
اشتباه آزمایشی	۲۸	۰/۶۲
ضریب تغییرات (درصد)		۲۹/۵۵

ns، **: به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۱ درصد

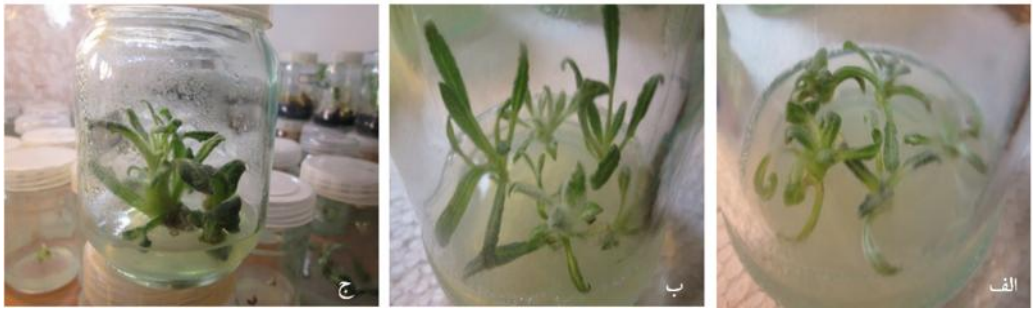
در بین غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد کلشی‌سین در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری در زنده‌مانی ریزنمونه‌ها ثبت شد و بیشترین درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها (۹۵/۵۵ درصد) در تیمار شاهد مشاهده شد. به‌نحوی‌که بین تیمار شاهد و تیمار ۰/۰۵ درصد نیز تفاوت معنی‌داری از لحاظ زنده‌مانی وجود نداشت، ولی با تیمارهای ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد، به‌طوری‌که بیشترین درصد بقاء ریزنمونه‌ها پس از اعمال تیمار کلشی‌سین در غلظت ۰/۰۵ درصد با میانگین ۸۴/۴۴ درصد زنده‌مانی مشاهده شد (شکل ۱). با افزایش غلظت کلشی‌سین، درصد بقاء گیاهچه کاهش پیدا کرد، به‌طوری‌که در غلظت ۰/۵ درصد کلیه گیاهچه‌های تیمار شده از بین رفتند. به‌طور کلی با افزایش غلظت کلشی‌سین، کاهش محسوس درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها مشاهده شد. تیمار زمانی ۲۴ ساعت (با درصد زنده‌مانی ۶۱/۳۳) در مقایسه با ۷۲ ساعت (با درصد زنده‌مانی ۴۹/۳۳) تأثیر قابل توجهی بر میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها داشت. هر چند بین زمان‌های مختلف در این صفت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

در بیشتر غلظت‌های به‌کار رفته کلشی‌سین، جوانه دو برگی اولیه پس از خشک شدن کامل ریزنمونه تیمار شده و پس از تأخیر در رشد اولیه باززایی شد (شکل ۲).



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین بر تعداد گیاه زنده مانده نوروزک

میانگین‌های با حروف غیر مشابه، در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن معنی‌دار می‌باشند.



شکل ۲- کشت گیاهان تیمار شده نوروزک در محیط کشت MS فاقد هورمون؛ الف) تأخیر در رشد اولیه گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین پس از دو هفته، ب) رشد عادی گیاهان تیمار نشده، ج) گیاه رشد یافته با دو نقطه رشدی (تیمار شده)

مطالعات مورفولوژیک به‌منظور تعیین سطح پلوئیدی گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین

در اغلب گیاهان تتراپلوئید و میکسوپلوئید، برگ‌های اولیه دارای ظاهری نابهنجار بودند اما برگ‌های بعدی ایجاد شده در محل تیمار ظاهر طبیعی داشتند.

مراحل تعیین سطح پلوئیدی گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین

۱- بررسی اثر تغییر سطح پلوئیدی بر خصوصیات مورفولوژیکی

نتایج بررسی خصوصیات مورفولوژیکی گیاهان شاهد و تحت تیمار غلظت‌های مختلف کلشی‌سین نشان داد که از نظر برخی خصوصیات فنوتیپی دارای تفاوت‌هایی به‌شرح زیر می‌باشند.

طول، عرض و سطح برگ گیاهان دیپلوئید و پلی-پلوئید

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بین گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید در رابطه با طول، عرض و سطح برگ وجود داشت (جدول ۲). میانگین طول برگ در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۸۸/۶۹ میلی‌متر و در نمونه‌های پلی‌پلوئید برابر با ۶۲/۸ میلی‌متر به‌دست آمد. افزایش سطح پلوئیدی، باعث کاهش طول برگ و افزایش عرض برگ شد (جدول ۳). نتایج حاصل نشان داد که اثر سطح پلوئیدی بر سطح برگ در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). به‌طوری‌که با افزایش سطح پلوئیدی، سطح برگ نیز افزایش یافت (جدول ۳).

ضخامت برگ و دمبرگ گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید

تجزیه واریانس داده‌ها در مورد ضخامت برگ، قطر دمبرگ و ساقه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید وجود دارد (جدول ۲). میانگین ضخامت برگ بخش میانی در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ٤/۲۱ میلی‌متر و در نمونه‌های گیاهان پلی‌پلوئید برابر با ۷/۵۰ میلی‌متر بود. همچنین با افزایش سطح پلوئیدی ضخامت دمبرگ نمونه‌های پلی‌پلوئید نیز افزایش یافت و به ۱۲/۸ میلی‌متر در مقایسه با نمونه‌های دیپلوئید که ۹ میلی‌متر بودند، رسید (جدول ۳).

جدول ۲- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس شاخص‌های رشدی اندازه‌گیری شده در رابطه با سطوح مختلف پلوئیدی گیاه نوروزک

منابع تغییر	DF	طول برگ	عرض برگ	سطح برگ	ضخامت برگ	قطر دمبرگ	قطر ساقه
سطح پلوئیدی	۱	۲۱۸/۰۵★★	۲۱۴/۵۱★★	۱۹۳۰۶۱/★★	۳/۱۸★★	۰/۱۳★	۸/۹۷★★
اشتباه آزمایشی	۹	۱۶۹/۵۵	۲/۵۲	۱۲۴۱۳/۳۶	۰/۰۱۶	۰/۰۱۵	۰/۱۴
ضریب تغییرات (درصد)		۱۶/۵۹	۱۲/۳۳	۱۹/۳۷	۱۵/۷۶	۱۰/۴۴	۱۱/۹۵

★ و ★★: به‌ترتیب معنی‌دار در سطوح ۵ درصد و ۱ درصد

جدول ۳- مقایسه میانگین شاخص‌های رشدی اندازه‌گیری شده در رابطه با سطوح مختلف پلوئیدی گیاه نوروزک

شاخص‌ها	دیپلوئید	پلی‌پلوئید
	خطای استاندارد ± میانگین	خطای استاندارد ± میانگین
میانگین طول برگ (mm)	۸۸/۶۹ ± ۱۰/۳۱ a	۶۲/۸ ± ۱۶/۷۶ b
میانگین عرض برگ (mm)	۹/۶ ± ۱/۲۴ b	۱۶/۱۵ ±۱/۴۷ a
میانگین سطح برگ (mm^2)	۴۷۶/۸ ± ۷۰/۸۷ b	۶۷۳/۳ ± ۱۳۱/۲۲ a
میانگین ضخامت برگ (mm)	۴/۲۱ ± ۰/۹۹ b	۷/۵۰ ± ۰/۱۵ a
میانگین قطر دمبرگ (mm)	۹/۰۰ ±۰/۰۷ b	۱۲/۸ ± ۰/۱۷ a
میانگین قطر ساقه (mm)	۲۵/۴ ±۰/۴۲ b	۳۸/۸ ± ۰/۳۹ a

میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف، در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن معنی‌دار می‌باشد.

وزن تر و خشک گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید

نتایج حاصل از مقایسه وزن تر و خشک ریشه و شاخساره حاصل از گیاهان درون شیشه بین ۵ بوته دیپلوئید و ۵ بوته پلی‌پلوئید نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد در وزن تر و خشک شاخساره گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید وجود دارد. با این حال در وزن تر و خشک ریشه بین سطوح مختلف پلوئیدی اختلاف معنی-داری مشاهده نشد. میانگین وزن تر شاخساره‌ها در گیاهان دیپلوئید برابر با ٤/٥٠ گرم و در نمونه‌های پلی‌پلوئید برابر با ۷/۰٦ گرم بود، که اختلاف معنی‌داری نشان داد (جدول ٤). میانگین وزن تر ریشه در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ٤/٢٦ گرم و در نمونه‌های پلی‌پلوئید برابر با ٤/٦٦ گرم بود که اختلاف معنی‌داری را با هم نشان ندادند (جدول ٤). در این پژوهش با وجود افزایش وزن تر و خشک ریشه در گیاهان پلی‌پلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید، اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد.

جدول ۴- مقایسه وزن تر و خشک در گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید نوروزک

شاخص‌ها	دیپلوئید	پلی‌پلوئید
	خطای استاندارد ± میانگین	خطای استاندارد ± میانگین
وزن تر شاخساره (گرم)	۴/۵۰ ± ۰/۴۶ b	۷/۰۶ ± ۰/۷۲ a
وزن خشک شاخساره (گرم)	۰/۳۵ ± ۰/۱۱ b	۰/۵۰ ± ۰/۰۷ a
وزن تر ریشه (گرم)	۴/۲۶ ± ۰/۹۳ a	۴/۸۶ ± ۱/۰۷ a
وزن خشک ریشه (گرم)	۰/۷۶ ± ۰/۱۰ a	۰/۷۹ ± ۰/۱۲۱ a

میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف، در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن معنی‌دار می‌باشد.

۲- بررسی اثر تغییر سطح پلوئیدی بر خصوصیات فیزیولوژیکی

مطالعات میکروسکوپی (شاخص‌های روزنه‌ای) گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین

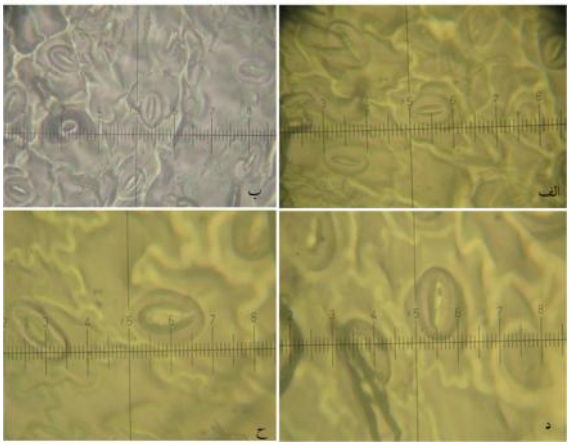
طول و عرض روزنه در گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید

نتایج حاصل از مقایسه میانگین طول و عرض روزنه-ها در سطح پشتی برگ‌های کاملاً توسعه‌یافته در ۱۰ نمونه از گیاهان دیپلوئید و ۱۰ نمونه از گیاهان پلی‌پلوئید با استفاده از آزمون آماری دانکن نشان داد که اختلاف معنی-داری در سطح احتمال ۱ درصد هم در طول و هم در عرض روزنه‌ها وجود داشت (جدول ۵). به‌طوری‌که میانگین طول روزنه در نمونه‌های پلی‌پلوئید ۱۶/۶۳ میکرومتر و در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۹/۶۹ میکرومتر بود. همچنین میانگین عرض روزنه‌ها در حالت باز در نمونه‌های پلی‌پلوئید برابر با ۸/۶۶ و در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ٤/۷۹ میکرومتر بود (جدول ٦ و شکل۳).

جدول ۵- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس طول و عرض روزنه و تراکم روزنه مربوط به سطوح مختلف پلوئیدی نوروزک

منابع تغییر	درجه آزادی	طول روزنه	عرض روزنه	تراکم روزنه
تیمار (سطح پلوئیدی)	۱	۲٤۲/٤۸**	۷٤/۷٦**	٥۲٤۸۸/۰۰**
اشتباه آزمایشی	۹	۰/۹٥۷	۱/۸٦	۲۳۹۱/۱۱
ضریب تغییرات (درصد)	-	۷/٤۲	۲۰/۲۸	۸/۸۹

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۳- مقایسه طول و عرض روزنه در گیاه نوروزک؛ (الف) و (ب) به‌ترتیب طول و عرض روزنه دیپلوئید و (ج) و (د) به‌ترتیب طول و عرض روزنه پلی‌پلوئید

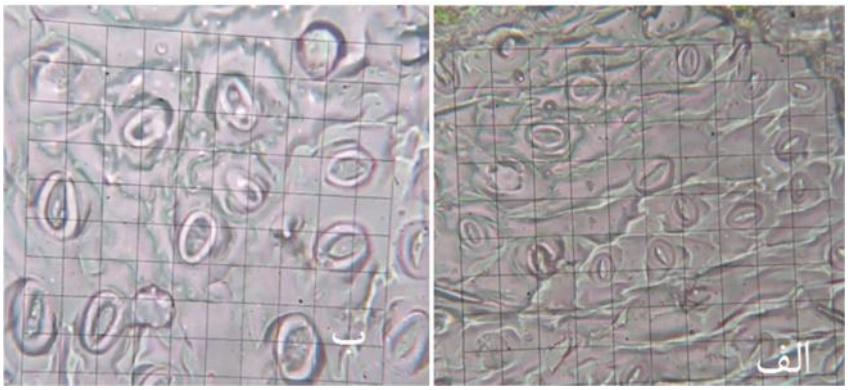
جدول ۶- مقایسه میانگین اندازه طول و عرض و تراکم روزنه‌ها در گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید نوروزک

سطح پلوئیدی	تعداد نمونه	خطای استاندارد ± میانگین طول روزنه (µm)	خطای استاندارد ± میانگین عرض روزنه (µm)	خطای استاندارد ± میانگین تراکم روزنه (mm^2)
دیپلوئید	۱۰	۹/۶۹ ± ۱/۰۶ b	۴/۷۹ ± ۱/۲۱ b	۴۱۲/۲ ± ۳۴/۸۰ a
پلی‌پلوئید	۱۰	۱۶/۶۶ ± ۱/۶۹ a	۸/۶۶ ± ۱/۴۴ a	۲۴۶/۴ ± ۴۸/۸۰ b

میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ستون، در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن معنی‌دار می‌باشد.

تراکم روزنه در گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید نوروزک

نتایج حاصل از تجزیه واریانس تراکم روزنه در یک میلی‌متر مربع از نقاط مختلف موجود در سطح پشت برگ در ۱۰ نمونه از گیاهان دیپلوئید و ۱۰ نمونه از گیاهان پلی‌پلوئید در مرحلهٔ توسعه کامل برگ‌ها، نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد در تعداد روزنه در واحد سطح برگ بین گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید وجود داشت (جدول ۵)، به‌طوری‌که میانگین تراکم روزنه در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ٤١٢/٢ عدد در یک میلی‌متر مربع و در نمونه‌های پلی‌پلوئید برابر با ٢٤٦/٤ عدد در یک میلی‌متر مربع بود (جدول ٦ و شکل ٤).



شکل ۴- مقایسه میزان تراکم روزنه در گیاه نوروزک؛ الف) دیپلوئید و ب) پلی‌پلوئید

محتوای کلروفیل در گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید نوروزک

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها، وجود اختلاف معنی‌دار را در سطح ۱ درصد بین گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید در مورد میزان کلروفیل برگ در گیاهچه‌های نوروزک نشان داد (جدول ۷). میزان کلروفیل a در برگ نمونه‌های دیپلوئید، ۲۸/۵۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ[1] و در برگ نمونه‌های پلی‌پلوئید، ۳۹/۰۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ ثبت شد. همراه با افزایش میزان کلروفیل a در گیاهان پلی‌پلوئید، میزان کلروفیل b نیز روند افزایشی نشان داد. به‌طوری‌که میانگین میزان کلروفیل b در برگ نمونه‌های دیپلوئید١٤/٨١ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ و در نمونه‌های پلی‌پلوئید ۲۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ محاسبه شد. همچنین میزان کلروفیل کل در برگ نمونه-های دیپلوئید، ٤٢/٣٦ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ و در نمونه‌های پلی‌پلوئید، ٥٦/٩٤ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ بود (جدول ۸).

جدول ۷- نتایج تجزیه واریانس میزان کلروفیل در گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید نوروزک

منابع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل
تیمار (سطح پلوئیدی)	۱	۲۷۶/۲۹**	۹۵/۶۶**	۵۳۱/۵۸**
اشتباه آزمایشی	۴	۱/۸۳	۱/۷۷	۱۳/۵۹
ضریب تغییرات (درصد)	-	۴/۰۱	۷/۴۴	۷/۴۲

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

1. mg g-1FW

جدول ۸- مقایسه میانگین میزان کلروفیل در گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید نوروزک

شاخص‌ها	دیپلوئید	پلی‌پلوئید
	خطای استاندارد ± میانگین	خطای استاندارد ± میانگین
میانگین کلروفیل a برگ (میلی‌گرم کلروفیل در گرم وزن تر برگ)	۲۹/۰۳ ± ۰/۸۱ [b]	۳۸/۶۸ ± ۲/۴۱ [a]
میانگین کلروفیل b برگ (میلی‌گرم کلروفیل در گرم وزن تر برگ)	۱۴/۵۸ ± ۱/۲۹ [b]	۲۱/۵۹ ± ۳/۱۸۲ [a]
میانگین کلروفیل کل برگ (میلی‌گرم کلروفیل در گرم وزن‌تر برگ)	۴۱/۶۱ ± ۱/۷۳ [b]	۵۸/۲۴ ± ۲/۹۱ [a]

میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف، در سطح احتمال ۵ درصد آزمون DMRT معنی‌دار می‌باشد.

۲- بررسی اثر تغییر سطح پلوئیدی بر خصوصیات بیوشیمیایی

میزان آنتی‌اکسیدان کل و فنل کل در گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید

نتایج حاصل از تجزیه واریانس آنتی‌اکسیدان کل نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد بین گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید وجود داشت (جدول ۱۱). میانگین میزان آنتی‌اکسیدان کل در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۵۶/۲۴ درصد DPPH و در نمونه‌های گیاهان پلی‌پلوئید برابر با ۷۴/۲۸ درصد DPPH بود (جدول ۹). اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد بین گیاهان دیپلوئید و پلی-پلوئید در مورد میزان فنل کل وجود داشت (جدول ۹). میانگین میزان فنل کل در نمونه‌های دیپلوئید برابر با ۱۴۹۲/۶۵ میکروگرم بر گرم ماده خشک و در نمونه‌های گیاهان پلی‌پلوئید برابر با ۲۲۶۶/۳۰ میکروگرم بر گرم ماده خشک بود (جدول ۱۰).

جدول ۹- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف پلوئیدی بر میزان کلروفیل، آنتی‌اکسیدان کل، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فنل کل نوروزک

منابع تغییرات	درجه آزادی	آنتی‌اکسیدان کل	فنل کل	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز
تیمار (سطح پلوئیدی)	۱	۸۱۳/۶۰۴**	۲۲۷۱۴۳۹/۳۷۹*	۰/۰۵۶*	۰/۶۱۹**
اشتباه آزمایشی	۴	۰/۳۵۴	۱۲۶۱۹۲/۴	۰/۰۰۶	۰/۰۲۴
ضریب تغییرات (درصد)	-	۴/۹۳	۱۹/۸۴	۲۱/۱۵	۱۳/۷۴

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطوح ۵ درصد و ۱ درصد

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

تجزیه‌وتحلیل واریانس داده‌های حاصل از اثر تیمار کلشی‌سین بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اختلاف معنی-داری را در سطح ۱ درصد ($P< ۰/۰۱$) بین تیمارها نشان داد. همچنین بین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سطوح مختلف پلوئیدی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت (جدول ۹). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش سطح پلوئیدی میزان فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت (جدول ۱۰).

جدول ۱۰- مقایسه میانگین مربوط به تأثیر سطوح مختلف پلوئیدی بر میزان آنتی‌اکسیدان کل، فنل کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نوروزک

سطح پلوئیدی	آنتی‌اکسیدان کل (DDPH٪)	فنل کل (µg/g DW)	کاتالاز ($\mu MH_2O_2/min/gfw$)	آسکوربات پراکسیداز ($\mu MH_2O_2/min/gfw$)
دیپلوئید	۵۶/۲۴ [b]	۱۴۹۲/۶۵۱ [b]	۰/۲۰ [b]	۰/۷۵ [b]
پلی‌پلوئید	۷۴/۲۸ [a]	۲۲۶۶/۳۰۰ [a]	۰/۳۶ [a]	۱/۱۱ [a]

میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ستون، در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن معنی‌دار می‌باشد.

۳- بررسی اثر تغییر سطح پلوئیدی بر خصوصیات سیتوژنتیکی

مشاهدهٔ کروموزوم‌ها: برای حصول اطمینان کافی از تتراپلوئیدی و عدم وجود آنیوپلوئیدی، کروموزوم‌های سلول‌های گیاهان دیپلوئید و گیاهانی که با استفاده از روش مورفولوژیکی و میکروسکوپی پلی‌پلوئید بودن آنها مشخص شده بود، طی بررسی‌های سیتوژنتیکی مشاهده شدند. برای مشاهدهٔ کروموزوم از نوک ریشه‌های جوان و رشد یافته استفاده شد. طی این بررسی مشخص شد که تعداد کروموزوم‌های سلول‌های سوماتیکی در گیاهان تتراپلوئید (4x= 44) نوروزک در مقایسه با گیاهان دیپلوئید (2x= 22) دو برابر شده بود.

بحث

زنده‌مانی گیاهچه‌ها پس از اعمال تیمار

اثر کلشی‌سین بر روی رشد و نمو و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها پس از گذشت ۳۰ روز از اعمال تیمارها مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به تغییرات فیزیولوژیکی که باعث کاهش سرعت تقسیم سلولی یا باقی ماندن اثرات کلشی‌سین که به جوانه‌های تازه روئیده صدمه می‌زند، بیشتر گیاهچه‌های تحت تیمار با کلشی‌سین پس از تیمار، رشد کندی داشتند. البته کاهش اولیه در میزان رشد ناشی از پلی‌پلوئیدی در گیاهان دیگر نیز گزارش شده است (Sikdar and Jolly, 1994; Majdi *et al*., 2010). گیاهچه‌های به‌دست آمده در ابتدای رشد دارای دو برگ اولیه با ظاهر غیرعادی و نامناسب بودند، در حالی که پس از باززایی ریزنمونه‌های حاوی برگ‌های بعدی از رشد و نمو عادی و معمولی همانند گیاه شاهد برخوردار بودند. حجم سلول‌های تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئید ۲ برابر بود. در حالی‌که سطح سلولی آنها ۱/۵ برابر بود (Lavania, 2005). سلول‌های بزرگ‌تر به سطح کوچک‌تر به نسبت حجم تمایل دارند که این پدیده می‌تواند منجر به کاهش میزان رشد سلول‌های پلی‌پلوئیدی گردد و تأثیر هندسه سلول بر میزان رشد به محیط رشد آنها بستگی دارد (Adams and Hansche, 1974; Mable, 2001). برخی از بی‌نظمی‌های مشاهده شده در اندازه برگ، شکل، بافت و رنگ به‌نسبت تعداد تقسیمات سلولی همراه با اختلالات فیزیولوژیکی در ریزنمونه‌های تیمار شده نسبت داده شده است. چنین بی‌نظمی معمولاً در جمعیت‌های تحت تیمار با کلشی‌سین مشاهده می‌شود (Sikdar *et al*., 1986; Dwivedi *et al*., 1989). شاید به‌عنوان یک نتیجه از متابولیسم سلولی، گیاهان پلی‌پلوئیدی تمایل به رشد و نمو آهسته‌تر دارند (Levin, 1983).

در واقع رابطه معکوس بین غلظت کلشی‌سین و بقاء ریزنمونه‌ها در این آزمایش مورد انتظار بود که با سایر بررسی‌های انجام شده روی گیاهان مختلف در شرایط طبیعی و درون شیشه‌ای مانند گیاه *Astragalus memberanaceus* (Chen and Gao, 2007) مطابقت داشت.

اولین اثر قابل مشاهده کلشی‌سین تأخیر در رشد ریزنمونه‌های تیمار شده بود. آغاز رشد جوانه‌ها در ریزنمونه‌های شاهد پس از گذشت ۵ تا ٦ روز اتفاق افتاد،

در حالی‌که در ریزنمونه‌های تیمار شده توسط کلشی‌سین رشد اولیه پس از گذشت دو هفته از واکشت مشاهده شد. این اثر در مطالعات انجام شده در چند گیاه دارویی ازجمله *Astragalus memberanaceus* (Chen and Gao, 2007) و *Hyoscyamus muticus* (Shahriari Ahmadi *et al*., 2008) نیز گزارش شده است. به‌طوری‌که با بررسی اثر کلشی‌سین در گیاه دارویی *Astragalus memberanaceus* نتایج نشان داد که رشد آهسته ممکن است به‌دلیل تخریب فیزیولوژیکی ایجاد شده به‌وسیله این ماده باشد که در نتیجه باعث کاهش سرعت تقسیم سلولی می‌گردد (Chen and Gao, 2007). بنابراین به نظر می‌رسد کلشی‌سین منجر به تأخیر اولیه در رشد می‌شود و پس از این مرحله، رشد ریزنمونه‌ها به‌صورت عادی و همانند گیاهان شاهد ادامه خواهد یافت.

مطالعات مورفولوژیک

افزایش عرض و مساحت برگ و کاهش طول برگ که در گیاهان پلی‌پلوئید مشاهده شد، مغایر با نتایجی است که Hasani و همکاران (۲۰۱۰) در گیاه تتراپلوئید ریحان در مقایسه با همتای دیپلوئید به آن دست یافتند. نتایج این پژوهش منطبق با نتایج Milo و همکاران (۱۹۸۷) در گیاه شقایق و Omidbaigi و همکاران (۲۰۱۰) در گیاه بادرشبی است که بیان کردند انگیزش تتراپلوئیدی سبب کمتر شدن دندانه‌های برگ این گیاهان شد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که افزایش سطح پلوئیدی هسته اغلب باعث تغییرات آناتومیکی و ساختاری در گیاهان می‌گردد و هریک با توجه به نوع گونه با یک فنوتیپ بروز می‌کند. افزایش سطح برگ با وجود کاهش طول برگ در نمونه‌های پلی‌پلوئید را می‌توان به افزایش عرض برگ در گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید نسبت داد.

مورفولوژی غیر طبیعی برگ در گیاهان تتراپلوئید می‌تواند به‌عنوان یک روش مناسب برای شناسایی سطح پلوئیدی این گیاهان خاص از همتای دیپلوئید خود به‌کار رود (Abdoli *et al*., 2013). برگ‌های گیاهان پلی‌پلوئید دارای ظاهری بزرگ‌تر، پهن‌تر و تعداد کنگره کمتر و نیز ضخیم‌تر و سبز تیره‌تر نسبت به گیاهان دیپلوئید در همان سن بودند، که تیره بودن برگ‌ها احتمالاً به‌علت افزایش تعداد کلروپلاست در برگ است که با افزایش محتوای کلروفیل همراه بود (Abdoli *et al*., 2013). انگیزش پلی‌پلوئیدی با افزایش اندازه سلول‌ها سبب افزایش اندازه برگ و ضخامت آنها می‌شود. درحقیقت می‌توان این چنین بیان کرد که افزایش اندازه سلولی یکی از اثرات عمومی القاء پلی‌پلوئیدی در نوروزک می‌باشد. بنابراین به‌نظر می رسد که این یک اثر ژنتیکی است و افزایش اندازه در همه اندام‌های برگ و ساقه را به‌همراه دارد.

نتایج این پژوهش منطبق با نتایج Zahedi و همکاران (۲۰۱٤) در زرین گیاه (*Dracocephalum Kotschyi*) است که گزارش کردند که تحریک پلی‌پلوئیدی در این گیاه سبب ایجاد گیاهانی با برگ‌های بزرگ‌تر، ضخیم‌تر و تیره‌تر می‌شود. همچنین Omidbaigi و همکاران (۲۰۱۰b) گزارش کردند که افزایش سطح پلوئیدی در گیاه بادرشبی (*D. moldavica* L.) سبب ایجاد گیاهانی با برگ‌های درشت‌تر و تیره‌تر شد. گیاهان اتوتتراپلوئید بذرالبنج مشبک نیز دارای برگ‌های دفرمه، قطور و به‌رنگ سبز تیره می‌باشند (Madani *et al*, 2015). از طرفی حجم سلول‌های تتراپلوئید در مقایسه با دیپلوئید معمولاً دو برابر می‌باشد، در حالی‌که سطح سلولی آنها ۱/۵ برابر است که این باعث بزرگ‌تر شدن جثه گیاهان در پاسخ به پلی‌پلوئیدی می‌شود (Lavania, 2005). افزایش حجم و سطح در گیاهان پلی‌پلوئید احتمالاً به این علت است که دسته‌های کروموزومی سلول‌ها افزایش یافته و به‌دنبال آن افزایش رشد سبب می‌گردد تا نسبت سیتوپلاسم به حجم هسته حفظ گردد.

در این پژوهش وزن تر و وزن خشک شاخساره در گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید اختلاف معنی‌داری نشان داد، که با گزارش Estaji (۲۰۱۲) مطابقت داشت و افزایش میانگین وزن تر و خشک شاخساره در گیاهان پلی‌پلوئید نوروزک نسبت به انواع دیپلوئید می‌تواند به‌دلیل دو یا سه شاخه

بودن درصد بالایی از گیاهان پلی‌پلوئید، بیشتر بودن میانگین سطح و ضخامت برگ‌ها و یا به‌دلیل افزایش فتوسنتز و افزایش کارایی آن، بهبود روابط آبی و هورمونی باشد که باعث افزایش مواد ذخیره‌ای بالاتر در برگ‌ها شد. افزایش وزن تر و خشک شاخساره در گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید در چندین گونهٔ گیاهی ازجمله ریحان (*Vetiveria zizanioides* L.) و گیاه وتیور (Omidbaigi *et al*., 2010a) گزارش شده است (Lavania, 1988).

در این پژوهش با وجود افزایش وزن تر و خشک ریشه در گیاهان پلی‌پلوئید در مقایسه با گیاهان دیپلوئید، اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که القاء پلی‌پلوئیدی در نسل اول بر قسمت‌های رویشی هوایی تأثیر گذاشته است. از طرفی چون تولید ریشه در شرایط درون شیشه‌ای تحت تأثیر هورمون‌های خارجی انجام می‌شود، به‌نظر می‌رسد که در گیاهان پلی-پلوئید و دیپلوئید به یک میزان ریشه تولید شده است. نتایج این تحقیق با گزارش Gao و همکاران (۱۹۹۶) در گیاه (*Salvia miltiorrhiza*) مغایر و با گزارش Zahedi و همکاران (2014) در گیاه زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) مطابقت دارد.

مطالعات میکروسکوپی

نتایج این پژوهش نشان داد با افزایش سطوح پلوئیدی سلول‌ها، طول و عرض روزنه‌ها افزایش و در نتیجه تراکم روزنه کاهش یافت. نتایج این پژوهش با نتایج چندین پژوهش دیگر (Omidbaigi *et al*., 2010b; Tang *et al*., 2010; Gantait *et al*., 2011; Rêgo *et al*., 2011) مطابقت دارد که در آنها گزارش شده است که با افزایش سطح پلوئیدی سلول‌ها طول و عرض روزنه برگ‌ها افزایش و در نتیجه تراکم روزنه‌ها در واحد سطح برگ کاهش می‌یابد. Zahedi و همکاران (۲۰۱٤) در گیاه زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi*) اندازهٔ طول روزنه را در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید به‌ترتیب ۲۰/۰۱ و ۳٦/٤۲ میکرومتر و اندازهٔ عرض روزنه را در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید به‌ترتیب ۵/٦۳ و ۲۲/۲ گزارش کردند. در همین راستا Yang و همکاران (۲۰۰٦) در گیاه انگور (*Vitis vinifera* L.) گزارش کردند که میانگین تراکم روزنه در انواع دیپلوئید ۱۸۷/۲ عدد در میلی‌متر مربع و در انواع تتراپلوئید آن برابر با ۱٦۰/٦ عدد بود. Madani و همکاران (۲۰۱۵) در گیاه بذرالبنج مشبک گزارش کردند که میانگین تراکم روزنه در انواع دیپلوئید ۱۸۱/۸ و تتراپلوئید ۵۲ عدد بود. در گیاه تتراپلوئید رازک (*Humulus lupulus*)، با وجود افزایش اندازهٔ روزنه، تفاوت معنی‌داری در تراکم روزنه‌ها در واحد سطح در نمونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید مشاهده نشد (Roy *et al*., 2001). از این‌رو چنین استنباط می‌گردد که نوع گونه مورد مطالعه نقش مهمی در شاخص‌های روزنه‌ای در تعیین سطوح مختلف پلوئیدی داشته باشد.

محتوای کلروفیل در گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید نوروزک

از آنجا که 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 (Randall *et al*., 1997; Byrne *et al*., 1981; Kondorosi *et al*., 2000). با استناد به گزارش Abdoli و همکاران (۲۰۱۳) می‌توان گفت که افزایش سطح پلوئیدی موجب افزایش تعداد کلروپلاست در برگ می‌شود که این عامل موجب افزایش محتوای کلروفیل در گیاهان تتراپلوئید می‌شود. افزایش میزان کلروفیل در نتیجه افزایش سطح پلوئیدی که در این پژوهش مشاهده شد در پژوهش‌های دیگر نیز مورد تأیید قرار گرفته است. در گیاه *Dendranthema nankingense* مقدار کلروفیل (a + b) در گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئیدها افزایش نشان داد (Liu *et al*., 2011). همچنین در تحقیق دیگری که گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید *Acacia mearnsii* از نظر میزان کلروفیل با یکدیگر مقایسه شدند، مشاهده شد که

میزان کلروفیل در گیاهان تتراپلوئید به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود (Mathura *et al.*, 2006).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: در گیاه نوروزک افزایش سطح پلوئیدی تأثیر معنی‌داری روی میزان فنل کل و آنتی‌اکسیدان کل داشت که با نتایج Afshar-Mohammadian و همکاران (۲۰۱۳) مغایرت داشت. نامبردگان گزارش کرده‌اند که افزایش سطح پلوئیدی تأثیر معنی‌داری بر فنل کل و فلاونوئید کل در گیاه لیموترش نداشت. در گل اطلسی القاء پلی‌پلوئیدی سبب افزایش دو نوع فلاونول شد (Griesbach and Kam, 1995). بنابراین می‌توان استدلال کرد که گیاه مورد تیمار و گونهٔ آن در میزان تغییر متابولیت‌های ثانویه در اثر القاء پلی‌پلوئیدی مؤثر است. افزایش تعداد کروموزوم‌ها و مقدار ژن‌های وابسته می‌تواند در بعضی موارد بیان و غلظت متابولیت-های ثانویه و مواد شیمیایی دفاعی را افزایش دهد. با این حال این مورد در همه گیاهان صادق نیست و در بعضی موارد ارتباط مشخصی بین مقدار ژن، خاموش شدن ژن و بیان متابولیت‌های ثانویه وجود نداشت (Thomas and Ranney, 2006).

گیاهان از طریق سیستم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدانی خود را از آسیب گونه‌های فعال اکسیژن مانند رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسیدهیدروژن و رادیکال هیدروکسیل محافظت می‌کنند. گیاهان پلی‌پلوئید، قابلیت بیشتری برای کنترل فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن داشته و مقاومت بیشتری نسبت به تنش‌های محیطی از خود نشان می‌دهند (Zhang *et al.*, 2010). تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی زیادی پس از القاء پلی‌پلوئیدی اتفاق می‌افتد و ممکن است به‌علت افزایش بیان ژن‌ها، فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش پیدا کند. در این تحقیق، افزایش فنل کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان پلی‌پلوئید نوروزک، احتمالاً به‌دلیل افزایش سطح پلوئیدی باشد. نتایج این تحقیق با نتایج Sotude Ardabili و همکاران (۲۰۱۴) در سورگوم مطابقت دارد، به‌طوری‌که گزارش کرده‌اند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تتراپلوئید افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان دیپلوئید داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج آزمایش نشان داد که حساسیت به کلشی‌سین با افزایش غلظت و زمان تیمار با کلشی‌سین و نیز در مراحل ابتدایی رشد گیاهچه‌ها شدیدتر است. در این آزمایش تیمار سرشاخه‌های رشد یافته با استفاده از غلظت ۰/۱ درصد کلشی‌سین به‌مدت ۷۲ ساعت بهترین روش ممکن برای القاء پلی‌پلوئیدی در محیط کشت بافت نوروزک شناخته شد. به‌طوری‌که با افزایش سطح پلوئیدی، طول روزنه و عرض روزنه در سطح پشتی برگ به‌طور معنی‌داری افزایش و تراکم روزنه در واحد سطح برگ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در گیاهان پلی‌پلوئیدی میزان برخی از صفات مانند عرض برگ، سطح برگ، میزان کلروفیل برگ، میزان آنتی‌اکسیدان کل، فنل کل و فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز) نسبت به‌گیاهان دیپلوئید افزایش معنی‌داری یافت، در صورتی که برخی از صفات دیگر مانند میزان طول برگ کاهش معنی‌داری را در گیاهان پلی‌پلوئیدی نسبت به گیاهان دیپلوئید نشان داد.

منابع

- Abdoli, M., Moieni, A. and Badi, H. N., 2013. Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicine-induced tetraploid plants of *Echinacea purpurea* (L.). Acta Physiologiae Plantarum, 13: 12- 22.
- Adams, J. and Hansche, P. E., 1974. Population studies in microorganisms I. Evolution of diploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 76: 327- 338.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzymology, 105: 121- 126.
- Afshar Mohammadian, M., Omidi, Z., Porakbari, R. and Asadiabkenar, A., 2013. Effect of polyploidy on some anatomical characteristics and antioxidant compounds of sour lemon, Iranian Journal of Plant Biology, 26(3): 238-246.

- Hamill, S., Smith, M. and Dodd, W., 1992 *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. Australian J Botany, 40:887-896
- Hasani, M.A., Mirzaie, M., Omidbaygi, R. and 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 (2): 111-118.
- Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H. R. and Imanshahidi, M., 2009. Review of the Pharmacological and Toxicological Effects of *Salvia leriifolia*. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 12: 1- 8.
- Kang, H. M. and Saltiveit, M. E., 2002. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling (leaves and roots) and differentially affected by salicylic acid. Physiologia Plantarum, 115 (4): 571-576.
- Kondorosi, E., Roudier, F. and Gendreau, E., 2000. Plant cell-size control growing by ploidy. Current Opinion in Plant Biology, 3: 488-492.
- Lavania, U. C., 1988. Enhanced productivity of the essential oil in the artificial autotetraploid of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.). Euphytica, 38: 271-276.
- Lavania, U. C., 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. Plant Genetics Resources, 3: 170-177.
- Lavania, U. C. and Strivastava, S., 1991. Enhanced productivity of tropane alkaloids and fertility in artificial autotetraploids of *Hyoscyamus niger* L. Euphytic, 52: 73- 77.
- Levin, D. A., 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. American Naturalist, 122: 1- 25.
- Lichtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R., 1985. Determination of total carotenoids and chlorophylls A and B of leaf in different solvents. Biochemical Society Transactions, 11: 591-592.
- Liu, S., Chen, S., Chen, Y., Guan, Z., Yin, D. and Chen, F., 2011. *In vitro* induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance. Scientia Horticulturae, 127: 411- 419.
- Mable, B. K., 2001. Ploidy evolution in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A test of the nutrient limitation hypothesis. Journal of Evolutionary Biology, 14: 157–170.
- Madani, H., Hosseini, B., Dehghan, E. and Rezaei-Chiyaneh, E., 2015. Enhanced production of scopolamine in induced autotetraploid plants of *Hyoscyamus reticulatus* L. Acta Physiologiae Plantarum, 37:55
- Arzani, A. 2001. Breeding Field Crops. (Authored Pullman and Aysplar). Second edition. Isfahan University Publication Center, 606 pp (In Persian).
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase: A hydrogen peroxide scavenging enzyme in plant. Physiologia Plantarum, 58: 235- 241.
- Byrne, M. C., Nelson, C. J. and Randall, D. D., 1981. Ploidy effects on anatomy and gas exchange of tall fescue leaves. Plant Physiology, 68: 891- 893.
- Chavadej, S. and Becker, H., 1984. Lnfluence of Colchicine treatment on chromosome number and growth rate of tissue Culure of *Valeriana wallichii* DC. Plant Cell Tiss Organ Cult. 3: 265-272
- Chen, L. L. and Gao, S. L., 2007. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. Scientia Horticulturae, 112: 339- 344.
- Chiou, A., Karathanos, V. T., Mylona, A., Salta, F. N., Preventi, F. and Andrikopoulos, N. K., 2007. Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. Food Chemistry, 102: 516- 522.
- Dhawan, O. P. and Lavania, U. C., 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. Euphytica, 87: 81- 89.
- Dwivedi, N.K.,Susheelamma, B.N., Sikdar, A.K., Suryanarayana, N., Jolly, M.S. and Sengupta, K., 1989. Induced tetraploidy in mulberry III. Morphological and hybridization studies in cultivars S30 and S36. Indian Journal Series, 28: 131-138.
- Estaji, A. 2012. The effects of some environmental factors and ploidy level on morphological and physiological characteristics of Noruzak (*Salvia leriifolia* Benth) Dissertation, Urmia University, Iran.
- Fattahi, M., Nazeri, V., Sefidkon, F., Zamani, Z. and Palazon, J., 2011. The effect of pre-sowing treatments and light on seed germination of Dracocephalum kotschyi Boiss: An endangered medicinal plant in Iran. Horticulture Environment and Biotechnology, 52: 559-566.
- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S. and Kanti Das, K., 2011. Induction and identification of tetraploids using *In vitro* colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. Plant Cell Tissue Organ Culture, 10: 112- 227.
- Gao, S. L., Zhu, D. N., Cai, Z. H. and Xu, D. R., 1996. Autotetraploid plants form colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 47: 73- 77.
- Griesbach, R. and Kam, K., 1995. The effect of inducted polyploidy on the flavonols of *Petunia 'mitchell*. Phytochemistry, 42 (2): 361-363.

technique as a tool to ascertain different ploidy level in mulberry. Indian Journal of series, 25: 88-90
- Slinkard, K. and Singleton, V. L., 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28(1): 49- 55.
- Tabatabaie Yazdi., F. 1996. Study of antioxidant Effects of essential oil and leaf extract of *salvia leriifolia* leriifolia and identifying its phytochemical. Master's Thesis Chemistry, College of Sciences, Mashhad Ferdowsi University, 121p.
- Sotude Ardabili, G., Asgari zakaria, R., and Zare, N., 2014. Polyploid induction effect on morpho-physiological traits of *Sorghum bicolor* cv. KFS 2. Iranian Journal of Crop Sciences. 16(2): 151-165.
- 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.
- Thomas, G. and Ranney, F., 2006. Polyploidy: From Evolution to New Plant Development. Combined Proceedings International Plant Propagators Society, 56: 137-142.
- Wallaart T.E., Pras N. and Quax, W.J.,1999. Seasonal variations of artemisinin and its biosynthetic precursors in tetraploid *Artemisia annua* plants compared with the diploid wild-type. Planta Medica, 65: 723-728.
- Weber, J., Georgiev, V., Pavlov A., and Bley, T., 2008. Flow cytometric investigations of diploid and tetraploid plants and *in vitro* cultures of *Datura stramonium* and *Hyoscyamus niger*. Cytometry Part a, 73: 931-939.
- Yang, X., Cao, Z., An, L., Wang, Y. and Fang, X., 2006. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Euphytica, 152: 217- 224.
- Yavari, S., 2007. The effect of treatment with colchicine on morphological, physiological and active substances of *Dracocephalum moldavica* L. M.Sc. Thesis, Tarbiat Modares University, 140p.
- Zahedi, A.A., 2013. The effects of colchicine on some morphological, biochemical and cytogenetic of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. M.Sc. Thesis, Urmia University, 96p.
- Zhang, X. Y., Hu, C. G. and Yao, J. L., 2010. Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. Journal of Plant Physiology, 167: 88- 94.
- Zhang, Z., Dai, H., Xiao, M. and Liu, X., 2008. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. Euphytica, 159: 59-65.
- Majdi, M., Karimzadeh, G., Malboobi, M. A., Omidbaigi, R. and Mirzaghaderi, G., 2010. Induction of tetraploidy to feverfew (*Tanacetum parthenium* Schulz-Bip.): Morphological, physiological, cytological, and phytochemical changes. Horticalture Science, 45: 16- 21.
- Mathura, S., Fossey, A. and Beck, S. L., 2006. Comparative study of chlorophyll content in diploid and tetraploid black wattle (*Acacia mearnsii*). Forestry, 79: 381- 388.
- Milo, J., Levy, A., Palevitch, D. and Ladizinsky, G., 1987. The bain content and yield in induced tetraploid and triploid plants of *papaver bracteatum* LINDL. Euphytica, 39(2): 45- 54.
- Omidbaigi, R., Mirzaee, M., Hassani, M. E. and Sedghi Moghadam, M., 2010a. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal of Plant Production, 4: 1735- 8043.
- Omidbaigi, R., Yavari, S., Hassani, M. E. and Yavari, S., 2010b. Induction of autotetraploidy in Dragonh (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatments. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18(1): 23- 35.
- Randall, D. D., Nelson, C. J. and Asay, K. H., 1977. Ribulose bisphosphate carboxylase altered genetic expression in tall fescue. Plant Physiology, 59: 38- 41.
- Rechinger, K. H., 1982. Flora Iranica. No. 150, Graz: Akademicsch Druck- u.Verlagsannstal, Pp. 417.
- Rêgo, M., Rêgo, E., Bruckner, C., Finger, F. and Otoni, W., 2011. *In vitro* induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 107: 451- 459.
- Rowson, J.M. 1949. Increased alkaloid contents of induced polyploid of *Datura*. Nature Reviews Genetics, 154: 81-82.
- Roy, A., Leggett, G. and Koutoulis, A., 2001. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Reports, 20: 489- 495.
- Shahriari Ahmadi, F., Dehghan, E., Farsi, M. and Azizi, M ., 2008. Tetraploid induction of *Hyoscyamus muticus* L. using colchicine treatment. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11: 2653-2659
- Sikdar, A. and Jolly, M., 1994. Induced polyploidy in mulberry (*Morus* spp.): induction of tetraploids. Sericologia, 34: 105-122.
- Sikdar, A.K., Dwiwedi, N.K., Dandin, S.B., Kumar, R. and Giridhar, K., 1986. Stomatal chloroplast count

Effects of *in vitro* polyploidy induction on some morphological, physiological and biochemical traits of *Salvia leriifolia* Benth

B. Hosseini [1*] and S. Javanbakht [2],

1* - Corresponding author, Assoc. Prof., Horticulture Department, Urmia University, Urmia, I.R. Iran, E.Mail: b.hosseini@urmia.ac.ir
2 - M.Sc., Horticulture Department, Urmia University, Urmia, I.R. Iran,

Received: 04.05.2016 Accepted: 13.10.2016

Abstract

Salvia leriifolia Bent. is a perennial herbaceous plant belongs to Lamiaceae family. Different pharmacological activities of the species were evaluated during recent years. Medicinal plant *In vitro* ploidy induction was one of the interesting issues in biotechnology and plant tissue culture. Therefore, influence of different colchicine concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2, and 0.5 %) in three time duration levels (24, 48 and 72 hours) on ploidy induction of *in vitro* regenerated seedlings of the species was studied. For detection of polyploid plants, morphological, physiochemical, biochemical and cytogeneticall characteristics were analyzed. ANOVA results revealed that, the effects of colchicine concentrations on explants survival rate were significant at $p < 0.01$. Among the colchicine treatments the highest seedling survival rate (84.44%) was observed by 0.05% treatment. Although the most dead plants, were recorded in high colchicine concentration (0.5%). Induction of tetraploidy in *Salvia Leriifolia* accompanied by significant changes in different morphological, cytological, physiological and physiochemical characteristics such as, increasing length and width of stomata on leaf surface, leaf width, leaf area, leaf chlorophyll content, total antioxidant levels, total phenol and antioxidant enzyme activity (catalase and ascorbate peroxidase), as well as reducing density of stomata per unit leaf area and leaf length. Chromosome number of diploid plants was $2n = 2x = 22$, and in tetraploid plants was $2n = 4x = 44$. Therefore, colchicine effectively induces polyploidy in the species.

Keywords: Colchicine, *in vitro*, polyploidy, *Salvia leriifolia*, total antioxidant, total phenol.