دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

اثر دز و مدت زمان تیمار با کلشی‌سین بر خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی خشخاش برگ‌ریزان (*Papaver fugax* Poir.) با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف

گیتی ستوده اردبیلی[۱]، رسول اصغری زکریا[۲]، ناصر زارع[۱] و لیلا غفارزاده نمازی[۳]

۱- گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۲- گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران، (نویسنده مسوول: r-asghari@uma.ac.ir)
۳- دانشکده کشاورزی مشگین‌شهر، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۱۰
صفحه: ۶۹ تا ۷۹

چکیده

در این مطالعه، به‌منظور تعیین مناسب‌ترین روش القای پلی‌پلوئیدی در گیاه خشخاش برگ‌ریزان آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و سه فاکتور شامل سطوح مختلف کلشی‌سین (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد)، مدت زمان تیمار (۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) و نوع ریزنمونه (بذر، گیاهچه و جوانه انتهایی ساقه)، در سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۶ در دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. در کنار ارزیابی‌های مورفولوژیکی و روزنه‌ای، روش فلوسایتومتری افزایش محتوای ماده ژنتیکی را در برخی از گیاهان تیمارشده تأیید نمود. نتایج نشان داد که تیمار جوانه انتهایی ساقه با غلظت کلشی‌سین ۰/۰۵ یا ۰/۱ درصد در زمان تیمار ۴۸ ساعت، به‌دلیل دارابودن بیشترین درصد زنده‌مانی (۴۴/۴٪) و القای تتراپلوئیدی (۱۸/۹٪) بهترین روش تولید گیاهان تتراپلوئید در خشخاش برگ‌ریزان است. با بررسی اثرات اتوپلی‌پلوئیدی بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیک مشخص شد که میانگین فواصل میانگره، ارتفاع بوته و تراکم سلول‌های روزنه در گیاهان تتراپلوئید کاهش و اندازه و ضخامت برگ، اندازه کپسول، تعداد برگ، وزن خشک کل بوته، اندازه سلول‌های روزنه‌ای، محتوای کلروفیل، پروتئین، کربوهیدرات و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز افزایش یافته است. این در حالی است که تغییری در میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در نتیجه القای تتراپلوئیدی مشاهده نشد. علاوه‌بر این، افزایش محتوای مورفین و کاهش محتوای کدئین در گیاهان تتراپلوئید حاصل مشاهده شد. در مجموع با توجه به اینکه کلشی‌سین نقش مؤثری در القای تتراپلوئیدی گیاه خشخاش برگ ریزان و تغییر در خصوصیات مورفولوژیکی و فرآیندهای متابولیکی آن دارد می‌توان از این نتایج در برنامه‌های به‌نژادی این گیاه دارویی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: پلی‌پلوئیدی، خشخاش، کدئین، کلشی‌سین، فلوسایتومتری، مورفین

مقدمه

پلی‌پلوئیدی به‌وجود کروموزوم‌های اضافی در سلول‌های موجودات زنده گفته می‌شود که می‌تواند از یک گونه یا از گونه‌های مختلف منشأ بگیرد. افزایش تعداد نسخه‌های ژنی از طریق تکثیر درون گونه‌ای ژنوم، اتوپلی‌پلوئیدی و از طریق ترکیب ژنوم گونه‌های مختلف آلوپلی‌پلوئیدی نامیده می‌شود (۱۴). این فرآیند اثرات زیادی در تکامل گونه‌های گیاهی داشته و به‌دلیل ایجاد سازگاری‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی (۴۹) توسط اصلاح‌گران در بهبود صفات اقتصادی مهم مورد استفاده قرار گرفته است (۶). در واقع گیاهان پلی‌پلوئید به‌لحاظ افزایش اندازه سلول‌ها، تشدید بیان ژن، ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی و افزایش مقاومت به تنش‌های محیطی عملکرد بهتری نسبت به انواع دیپلوئید خود نشان می‌دهند (۴۷). علاوه‌بر مزایای ذکرشده، مواد ضدمیتوزی می‌توانند باعث ایجاد اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی سلول شده و سرعت تقسیم سلولی و در نتیجه سرعت رشد و نمو گیاه را در مراحل اولیه کاهش دهند (۳۶). اثرات منفی پلی‌پلوئیدی ممکن است باعث ایجاد ناباروری، شکنندگی گیاه، کوتاه قدی و ناهنجاری گردد (۴۸،۱۰). در طبیعت نیز دو برابرشدن محتوای ژنومی عامل اصلی تکامل بوده و بر اندازه ژنوم و تعداد نسخه‌های ژنی تأثیر می‌گذارد (۴۲).

مضاعف‌شدن ماده ژنتیکی توسط عوامل بازدارنده میتوزی مختلفی ایجاد می‌شود که مهمترین آن‌ها کلشی‌سین، اوریزالین و تریفلورالین هستند (۱۳). کلشی‌سین یک ماده جهش‌زا است که از گیاهان خانواده Colchicaceae و به‌ویژه گیاه گل حسرت *Colchicum autumnale* استخراج می‌شود و از دهه‌ی ۱۹۳۰ به‌صورت گسترده برای القای پلی‌پلوئیدی مورد استفاده قرار گرفته است (۶). این ماده از طریق اتصال به توبولین‌ها مانع جداشدن تارهای میکروتوبولی در طی تقسیم میتوز شده و باعث ایجاد سلول‌هایی با تعداد کروموزوم‌های دو برابر می‌شود (۱۳). گزارش‌های بسیاری مبنی‌بر القای موفق پلی‌پلوئیدی با استفاده از کلشی‌سین در گیاهان مختلف ارائه شده است (۲۸،۳۱). با وجود این، در خصوص القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان خانواده خشخاش اطلاعات کمی در دسترس است و این مطالعات محدود به *Papaver somniferum* و *Papaver bracteatum* می‌باشد (۳۰،۲۷).

گیاهان تیره Papaveraceae با حدود ۴۲-۲۶ جنس و ۸۰۰-۶۹۰ گونه از قدیمی‌ترین گروه گیاهان دارویی محسوب می‌شوند (۴۰). *Papaver* بزرگترین جنس زیرتیره‌ی Papaveroideae بوده و بر اساس آخرین طبقه‌بندی در ۱۱ بخش تقسیم‌بندی می‌شود. یکی از این بخش‌ها Meconidium است که در ایران هم وجود داشته و شامل ۱۴ گونه و ۱۰ واریته از جمله *P. fugax* Poir. یا خشخاش

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.52547/jcb.12.35.69]

برگ‌ریزان است (۱۸). این گونه گیاهی علفی، دو ساله و دیپلوئید با عدد پایه کروموزومی ۷ است (۱۹).

گیاهان جنس *Papaver* به جهت دارابودن آلکالوئیدهای گروه بنزیل ایزوکوئینولین[1] پتانسیل بالایی جهت استفاده در صنعت داروسازی دارند (۳۸). آلکالوئیدهای مورفینان محصولات جانبی نورلادانوزولین[2] هستند که طی فرآیند متیله‌شدن به رتیکولین[3] و در نهایت سالوتاریدین[4] تبدیل می‌شود. سالوتاریدین با از دست‌دادن یک گروه استات به تبائین تبدیل شده (۵) و باعث سنتز نئوپینون[5] و اوریپاوین[6] در دو مسیر جداگانه می‌گردد. نئوپینون به کدئینون[7] و نهایتاً به کدئین و اوریپاوین به مورفینون[8] و نهایتاً به مورفین تبدیل می‌شود (۲۱). از جمله آلکالوئیدهای مهم خشخاش برگ‌ریزان می‌توان به تبائین و کدئین اشاره کرد (۱۷). غلظت تبائین در ساقه این گیاه بیشتر از اندام‌های دیگر بوده (۳۹) و می‌تواند به کدئین و داروهای دیگر مانند نالوکسان، هیدروکدئین و اکسی‌کدئین تبدیل شود (۱۶).

با توجه به این که تغییرات سطح پلوئیدی در گیاهان از طریق تأثیر بر فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و اثرگذاری بر مسیر فتوسنتزی باعث تشدید تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌شود (۴۶) و به‌دلیل اهمیت آن در بهبود خصوصیاتی از قبیل افزایش اندازه اندام‌های گیاهی و ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی (۳۷)، تکنیک القای مصنوعی پلی‌پلوئیدی در برنامه‌های اصلاحی بسیاری از گیاهان دارویی از قبیل، *Hyoscyamus niger*، *Camelia spp*، *Atropa belladonna* و *Solanum nigrum* مورد توجه قرار گرفته است (۲۵). در این راستا، این پژوهش با هدف معرفی بهترین روش القای پلی‌پلوئیدی در گیاه خشخاش برگ‌ریزان و شناسایی صفات برتر در تتراپلوئیدها برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

به‌منظور بررسی القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه خشخاش برگ‌ریزان بذور دیپلوئید ($2n=2x=14$) از محل رویشگاه طبیعی آن در استان اردبیل واقع در عرض جغرافیایی "۲۴ '۰۴ °۳۸ شمالی و "۴۸ '۳۶ °۴۸ شرقی جمع‌آوری شد. این آزمایش در طی سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۶، در سه مرحله مختلف به‌صورت تیمار بذر، گیاهچه و جوانه انتهایی ساقه و به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانه و آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. در هر سه روش مورد مطالعه ریزنمونه‌ها با پنج غلظت مختلف کلشی‌سین (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد) در سه زمان متفاوت (۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) تیمار شدند.

القای پلی‌پلوئیدی از طریق تیمار با کلشی‌سین

در آزمایش اول، ابتدا بذور در داخل پتری‌های حاوی غلظت‌های مختلف کلشی‌سین غوطه‌ور شده و روی شیکر با دور ۱۲۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند و پس از گذشت مدت زمان تیمار شست و شو داده شدند. در مرحله بعد به‌منظور اطمینان از استقرار گیاهچه‌ها، ابتدا جوانه‌زنی بذور روی محیط کشت MS فاقد هورمون انجام شده و سپس انتقال آن‌ها به گلدان‌های کوچک و نهایتاً محیط گلخانه با دمای ۲۵-۱۸ درجه سانتیگراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی صورت گرفت. در آزمایش دوم، بذور در بین دو کاغذ صافی مرطوب جوانه زده و پس از گذشت مدت زمان یک هفته در مرحله ظهور دو برگ اولیه با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین در زمان‌های ذکر شده تیمار شدند. در آزمایش سوم از گیاهچه‌های پنج‌روزه و روش گلوله‌ی پنبه آغشته به کلشی‌سین استفاده گردید. در این راستا، جهت جلوگیری از تبخیر کلشی‌سین از نایلون پلی‌اتیلنی استفاده شد. در تیمار ۱۲ ساعت عمل آغشته‌سازی با کلشی‌سین ۱ بار و در تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعت به‌ترتیب ۲ و ۴ بار انجام شد. در نهایت پس از شست‌وشو، کشت ریزنمونه‌ها در گلدان انجام شد.

ارزیابی سطح پلوئیدی

سطح پلوئیدی نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر مدل PA ساخت شرکت Partec کشور آلمان تعیین گردید. از گیاه جعفری به‌عنوان گیاه استاندارد برای کالیبراسیون دستگاه استفاده شد. سوسپانسیون هسته از طریق ایجاد ضربات عمودی توسط اسکالپل تیز به حدود ۱ سانتیمتر مربع از برگ‌های جوان در ۴۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج هسته (محلول A کیت دستگاه، Partec) تهیه شد. در مرحله بعدی عمل فیلتراسیون به‌منظور حذف تجمع سلولی و قطعات درشت انجام شده و حدود ۱۶۰۰ میکرولیتر محلول رنگ‌آمیزی هسته حاوی ۴ و ۶-دی آمیدینو-۲ فنیل ایندول (DAPI، محلولB کیت) به محلول سوسپانسیون حاوی DNA گیاهی اضافه شد. سپس تزریق نمونه به دستگاه صورت پذیرفته و اندازه‌گیری حداقل ۵۰۰۰ هسته در هر نمونه انجام شد. هسته‌ها پس از ورود به دستگاه و عبور از منبع نوری آن سبب ایجاد سیگنال‌های فلورسانس شد که در نهایت به پالس‌های الکتریکی تبدیل شده و به کمک قسمت انفورماتیک دستگاه داده‌های دیجیتال را به‌صورت هیستوگرام DNAایجاد نمودند.

بررسی پارامترهای رشدی گیاهان دیپلوئید و پلی‌پلوئید

گیاهان شاهد و تیمارشده از لحاظ صفات مورفوفیزیولوژیک متعدد مورد ارزیابی قرار گرفتند. صفاتی از قبیل میانگین فواصل میانگره، طول و عرض برگ و ارتفاع گیاه به‌طور مستقیم توسط خط‌کش اندازه‌گیری شده و برای اندازه‌گیری ضخامت برگ از کولیس و وزن خشک بوته از ترازوی دیجیتال استفاده شد.

بررسی تعداد و اندازه روزنه

به‌منظور انجام مطالعات روزنه‌ای، برگ‌های جوان گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید انتخاب و لایه اپیدرمی روی سطح برگ و پشت آن با قشری نازک از لاک بیرنگ معمولی پوشانیده شد (۲۲). پس از خشک‌شدن، لایه مذکور با استفاده از نوار چسب معمولی بر روی لام شیشه‌ای تمیز منتقل شده و اندازه و تراکم سلول‌های روزنه در واحد میلیمتر مربع از سطح برگ توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰x مورد بررسی قرار گرفت.

1- Benzylisoquinoline
2- Norlaudanosoline
3- Reticulin
4- Salutaridine
5- Neopinon
6- Oripavine
7- Codeinone
8- Morphinone

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.52547/jcb.12.35.69]

بررسی فعالیت رنگدانه‌های فتوسنتزی، محتوای پروتئین کل و کربوهیدرات

جهت بررسی محتوای کلروفیل *a*، *b* و کل حدود ۰/۲۵ گرم از بافت برگ‌های جوان با استفاده از استون ۸۰ درصد پودر شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. به محلول رویی ۲/۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد اضافه شده و میزان جذب نوری در طول موج ۶۶۳ و ۶۴۶ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت گردید. در نهایت، مقادیر رنگدانه‌های فتوسنتزی به‌صورت میلی‌گرم بر گرم وزن تر بیان شد (۲۶).

استخراج پروتئین با استفاده از روش گای و همکاران (۲۰) انجام شده و کمیت آن مطابق روش برادفورد (۸) تعیین گردید. پروتئین آلبومین گاوی (BSA) برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. مقادیر پروتئین در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری و در نهایت به‌صورت میلی‌گرم بر گرم وزن تر بیان گردید. کربوهیدرات‌های محلول در بافت برگ نیز بر اساس روش اوموکولو و همکاران (۳۴) استخراج شد. مقادیر قند با استفاده از آنترون بر پایه روش مک کریدی و همکاران (۲۹) در طول موج ۶۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و درنهایت به‌صورت میلی‌گرم بر گرم وزن تر بیان شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

مقایسه میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید حدود ۴ ماه پس از کشت انجام شد. برای این منظور حدود ۲۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ جوان در یک هاون چینی محتوی ۱۰ میلی‌لیتر بافر تریس –اسید کلریدریک ۰/۱ مولار همگن شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰ دور در دقیقه (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) سانتریفیوژ شد (۴۴). محلول رویی حاوی عصاره پروتئینی برای تعیین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT; EC 1.11.1.6) (۹) و آنزیم‌های پراکسیداز (POD; EC 1.11.1.7) و پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO; EC 1.10.3.1) (۲۳) به‌ترتیب در طول موج‌های ۲۴۰، ۴۲۰ و ۴۲۵ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت میزان فعالیت آنزیم‌ها برحسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین تعیین شد.

بررسی کمیت آلکالوئیدها با استفاده از روش HPLC

در این پژوهش جهت انجام کروماتوگرافی مایع از دستگاه HPLC مدل Knauer با ستون C18 (250mm×4.6mm, 5µm)، دتکتور UV و طول موج ۲۵۴ نانومتر استفاده شد. Flow rate به‌کار برده‌شده برابر ۲ میلی‌لیتر در دقیقه با ترکیب فاز متحرک بافر فسفات تری‌اتیل‌آمونیوم و استونیتریل بود. عصاره‌گیری از نمونه‌ها مطابق روش فاچینی و دلوکا (۱۵) با اندکی تغییرات انجام شد. برای این منظور اندام‌های هوایی گیاهان به‌طور جداگانه برداشت شده و در تاریکی و دمای اتاق خشک و آسیاب شدند. به بافت گیاهی پودرشده ۵ میلی‌لیتر آمونیاک (۲۵٪)، ۲۵ میلی‌لیتر متانول و ۷۵ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شده و پس از استفاده از دستگاه سونیکاتور محلول حاصل پس از گذراندن یک مدت زمان کوتاه تاریکی به‌وسیله کاغذ مخصوص صاف شده و به‌منظور تبخیر حلال‌ها در دستگاه روتاری قرار گرفت. سپس به رسوب حاصل ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم و ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک یک نرمال اضافه شد و دو فاز تشکیل شده به‌وسیله قیف جداکننده از هم جدا گردید. فاز پایینی یا فاز کلروفرمی از محلول حاصل جدا شده و pH فاز آبی با آمونیاک قلیایی شده و مجدداً عصاره‌گیری توسط کلروفرم انجام شد. در نهایت برای آبگیری محلول کلروفرمی جمع‌آوری شده، سدیم سولفات انیدرید به آن اضافه شد و پس از صاف‌شدن، حلال آن توسط دستگاه روتاری خارج و مواد باقیمانده توسط متانول ویژه HPLC جمع‌آوری شد. برای اندازه‌گیری کمی آلکالوئیدها، استانداردهای مورفین و کدئین تهیه شده و در سه تکرار به دستگاه تزریق شد. در نهایت منحنی‌های کالیبراسیون پس از ترسیم سطح زیر منحنی در نتیجه تزریق و محاسبه معادله خطی و ضریب همبستگی استاندارد مورفین و کدئین ایجاد شده و نمودارهای کالیبراسیون خطی به‌دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS Version 9.1) انجام گرفت و تفاوت‌های آماری صفات مورد ارزیابی در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید از طریق آزمون t و نرم‌افزار SPSS 16.0 بررسی شد.

نتایج و بحث

تأثیر غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار بر درصد زنده‌مانی و تتراپلوئیدی

نتایج تجزیه واریانس مشخص نمود برهمکنش سه جانبه غلظت کلشی‌سین×مدت زمان تیمار×نوع ریزنمونه در مورد صفات درصد زنده‌مانی و تتراپلوئیدی غیرمعنی‌دار است. اگرچه، این صفات تحت تأثیر اثرات اصلی غلظت کلشی‌سین، مدت زمان تیمار و نوع ریزنمونه و برهمکنش غلظت کلشی‌سین×مدت زمان تیمار و غلظت کلشی‌سین×نوع ریزنمونه قرار گرفتند (جدول ۱). در بررسی این برهمکنش‌ها مشخص گردید با افزایش غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار درصد زنده‌مانی به‌شدت کاهش می‌یابد. به‌طوری‌که، در غلظت کلشی‌سین ۰/۵ درصد و مدت زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت به صفر می‌رسد. بالاترین درصدهای زنده‌مانی (۵۱/۱۱ و ۴۶/۶۶ درصد) پس از تیمارهای شاهد (غلظت صفر) نیز به‌ترتیب در غلظت‌های کلشی‌سین ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد و مدت زمان ۱۲ ساعت به‌دست آمد (شکل ۱، a). از طرف دیگر، ریزنمونه‌های مریستم انتهایی ساقه در غلظت‌های کلشی‌سین ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد و ریزنمونه‌های گیاهچه در غلظت کلشی‌سین ۰/۰۵ درصد بهترین شرایط زنده‌مانی را نشان دادند (شکل ۱، b).

ارائه مناسب‌ترین روش تیمار در این تکنیک به عوامل مختلف از جمله نوع و غلظت ماده ضدمیتوزی، مدت زمان تیمار، نوع ریزنمونه، روش تیمار و روش‌های باززایی بستگی دارد (۱۳،۳۷). کلشی‌سین به‌عنوان یکی از قدیمی‌ترین مواد

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.52547/jcb.12.35.69]

جهش‌زای شیمیایی در القای مصنوعی پلی‌پلوئیدی بوده (۱۳) و کاهش زنده‌مانی در غلظت‌های بالای آن (۴۳) به‌دلیل ایجاد اختلال در فرآیند تقسیم سلولی (۳۵)، از طریق نفوذ به سلول‌های رأسی یا اپیکال و ایجاد محدودیت‌های رشد سلولی است (۴۶).

در مطالعه حاضر علی‌رغم استفاده از روش‌های متفاوت تیمار تنها تعداد کمی از گیاهان تتراپلوئید بودند. هیستوگرام محتوای DNA هسته‌ای در آنالیز همزمان نمونه‌های سلولی گیاه جعفری (کنترل داخلی) و گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید خشخاش در شکل ۲ نشان داده شده است. در این تصویر پیک اول مربوط به سلول‌های برگی گیاه شاهد با سطح کروموزومی دیپلوئید و پیک دوم مربوط به سلول‌های برگی گیاه تیمارشده با سطح کروموزومی تتراپلوئید می‌باشد. مطالعات مورفولوژیکی، آناتومیکی، کاریولوژیکی و فلوسایتومتری از معمول‌ترین روش‌های بررسی امکان القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان محسوب می‌شوند (۱۳). در تکنیک فلوسایتومتری میزان فلورسانس اندازه‌گیری‌شده با محتوای DNA هسته‌ای رنگ‌آمیزی‌شده در ارتباط است و سطح پلوئیدی یک نمونه نامشخص می‌تواند از طریق مقایسه موقعیت پیک‌های آن با موقعیت نسبی پیک‌های مرحله‌ی G1 تقسیم سلولی یک گیاه با سطح پلوئیدی مشخص، تعیین گردیده (۳۲) و به‌صورت گسترده جهت تعیین سطح پلوئیدی و اندازه ژنوم مورد استفاده قرار گیرد (۴۷).

در این مطالعه بیشترین درصد گیاهان تتراپلوئید (۱۸/۹ درصد) در غلظت ۰/۱ درصد کلشی‌سین در مدت زمان ۴۸ ساعت و پس از آن در غلظت ۰/۲ درصد کلشی‌سین با زمان تیمار ۱۲ ساعت و غلظت ۰/۰۵ درصد کلشی‌سین با زمان تیمار ۴۸ ساعت به‌دست آمد (شکل ۱، c). در این راستا، ریزنمونه‌های جوانه انتهایی ساقه در غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد کلشی‌سین بهترین عملکرد را در پاسخ به القای تتراپلوئیدی داشتند (شکل ۱، d). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت استفاده از ریزنمونه‌های جوانه انتهایی ساقه در غلظت کلشی‌سین ۰/۰۵ یا ۰/۱ درصد با زمان تیمار ۴۸ ساعت، به‌دلیل دارابودن بیشترین درصد زنده‌مانی (۴۴/۴) و تتراپلوئیدی (۱۸/۹) ایده‌آل‌ترین روش القای تتراپلوئیدی در گیاه خشخاش برگ ریزان است.

یکی از ساده‌ترین روش‌ها در تأثیر عوامل بازدارنده‌ی میتوزی در گیاهچه‌ها، استفاده از آن‌ها در نواحی مریستمی می‌باشد. میشرا و همکاران (۳۰) و مدنی و همکاران (۲۷) نیز از طریق تیمار ناحیه مریستمی ساقه با کلشی‌سین موفق به تولید گیاهان پلی‌پلوئید خشخاش شدند.

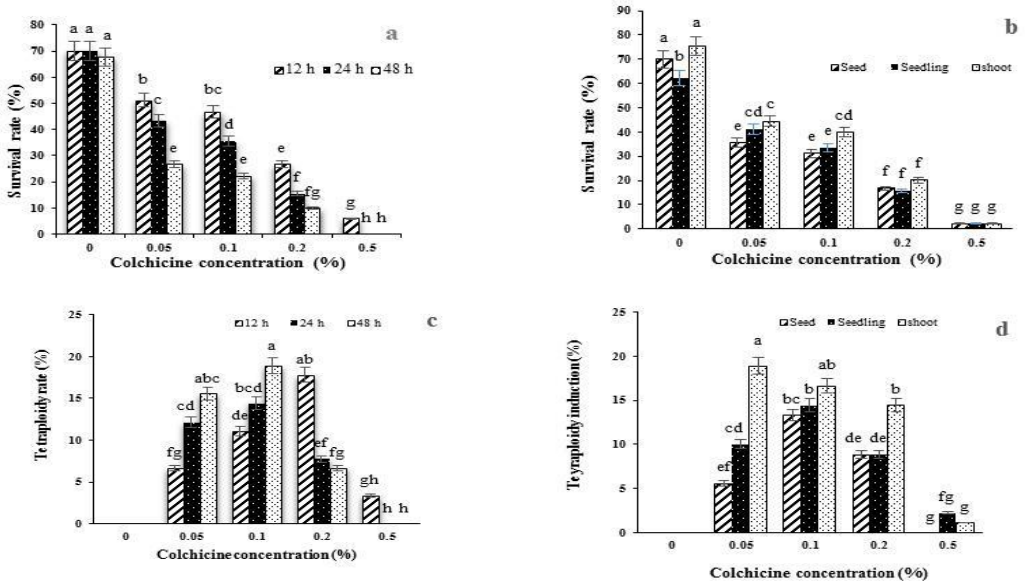
جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تأثیر تیمار بذر، گیاهچه و جوانه انتهایی ساقه با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین در فواصل زمانی متفاوت بر صفات درصد زنده‌مانی و تتراپلوئیدی

Table 1. Analysis of variance for the effect of seed, seedling and terminal bud treatment with different concentrations of colchicine at various exposure times on survival and tetraploidy induction percentage

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد زنده‌مانی	درصد تتراپلوئیدی
غلظت کلشی‌سین	۴	۱۷۲۹۷/۴۰**	۱۱۹۳/۷۰**
مدت زمان تیمار	۲	۲۴۹۴/۰۷**	۲۰/۷۴ns
ریزنمونه	۲	۴۴۵/۱۸**	۲۵۴/۰۷**
غلظت کلشی‌سین×مدت زمان تیمار	۸	۲۶۳/۵۱**	۱۶۷/۰۳**
غلظت کلشی‌سین×ریزنمونه	۸	۹۵/۱۸*	۷۲/۵۹**
مدت زمان تیمار×ریزنمونه	۴	۲/۹۶ns	۱۲/۹۶ ns
غلظت کلشی‌سین×مدت زمان تیمار×ریزنمونه	۱۶	۲۳/۷۹ns	۱۳/۴۲ ns
خطا	۹۰	۴۰/۰۱	۱۴/۸۱
ضریب تغییرات		۱۹/۲۷	۲۴/۴۴

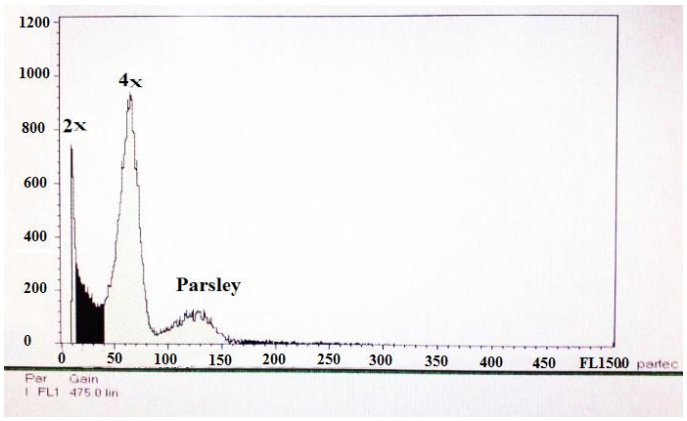
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.52547/jcb.12.35.69]



شکل ۱- درصد زنده‌مانی خشخاش برگ‌ریزان در برهمکنش غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار (a) و برهمکنش غلظت کلشی‌سین و نوع ریزنمونه (b). درصد القای تتراپلوئیدی در خشخاش برگ‌ریزان در برهمکنش غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار (c) و برهمکنش غلظت کلشی‌سین و نوع ریزنمونه (d). خطوط خطا مقادیر انحراف استاندارد و حروف مختلف اختلاف معنی‌دار از طریق آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ را نشان می‌دهند.

Figure 1. Plant survival percentage of bride rose poppy under influence of interaction effects of colchicine concentrations × treatment times (a) and interaction effects of colchicine concentrations × explant type (b). Tetraploidy induction percentage under interaction effects of colchicine concentrations × different treatment times (c) and interaction effects of colchicine concentrations × explant type (d). The errors bars represent standard deviation values. Means with different letters show significant differences by Duncan test at 1% probability level.



شکل ۲- هیستوگرام محتوای DNA هسته‌ای به دست آمده از فلوسایتومتری

Figure 2. Histogram of nuclear DNA content derived from flow cytometry analysis

تأثیر پلی‌پلوئیدی بر صفات مورفولوژیکی

شناسایی اولیه گیاهان پلی‌پلوئید از طریق بررسی خصوصیاتی از قبیل میانگین فواصل میانگره، اندازه و ضخامت برگ، تعداد برگ و ارتفاع بوته انجام شد (شکل ۳). نتایج به‌دست‌آمده مشخص نمود گیاهان تتراپلوئید خشخاش دارای طول، عرض و ضخامت برگ بیشتر، اندازه کپسول بزرگتر، تعداد برگ فراوان‌تر و وزن خشک بیشتر نسبت به انواع شاهد بودند. این در حالی است که اندازه فواصل میانگره و ارتفاع کل بوته در این گیاهان کاهش یافت.

پلی‌پلوئیدی می‌تواند منجر به شکل‌گیری تغییرات وسیع فنوتیپی گردد. در واقع این تکنیک از طریق افزایش محتوای DNA الگو و تحریک سازوکارهایی مانند رونویسی و ترجمه و افزایش، کاهش یا حتی خاموشی بیان ژن، صفات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.52547/jcb.12.35.69]

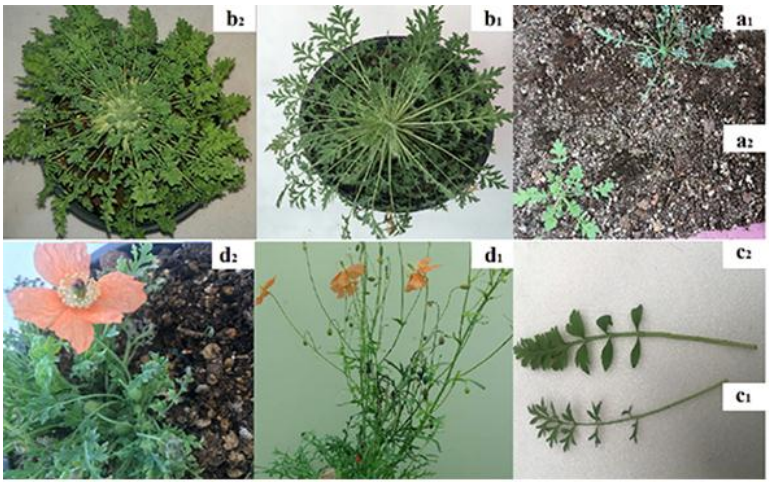
(۲). یکی از بارزترین اثرات دوبرابرسازی محتوای ماده ژنتیکی افزایش اندازه سلول‌هاست (۱۲)، که تحت تأثیر افزایش تعداد نسخه‌های ژنی بوده (۳۷) و به اشکال مختلفی از قبیل افزایش اندازه گل، میوه و برگ در انواع گیاهان دیده می‌شود (۴). ون لور و همکاران (۴۸) گزارش کردند گیاهان تتراپلوئید تیمارشده با کلشی‌سین دارای ارتفاع کمتری نسبت به انواع دیپلوئید خود هستند. این پدیده می‌تواند به‌علت کاهش فواصل میانگره در گیاهان پلی‌پلوئید باشد. نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش در خصوص افزایش ابعاد برگ (۳۳)، افزایش وزن تر و خشک گیاه (۳۳) و افزایش ضخامت برگ (۳۵) با نتایج به‌دست‌آمده از سایر تحقیقات مطابقت دارد.

تأثیر پلی‌پلوئیدی بر تعداد و تراکم سلول‌های روزنه و فعالیت رنگدانه‌های فتوسنتزی

بررسی صفات آناتومیکی برگ تأیید نمود اندازه و تعداد سلول‌های روزنه‌ای متأثر از تغییرات سطح پلوئیدی می‌باشد (جدول ۲). این خصوصیت در شناسایی گیاهان پلی‌پلوئید مورد استفاده قرار گرفت. شکل ۴ اندازه و تراکم سلول‌های روزنه‌ای را در یک نمونه دیپلوئید و یک نمونه تتراپلوئید از سطح روی برگ و سطح پشت برگ با بزرگنمایی ۱۰x نمایش می‌دهد. همان‌طور که مشخص است گیاهان تتراپلوئید دارای تعداد روزنه کمتر با اندازه بزرگتر نسبت به انواع دیپلوئید خود هستند. این نتایج در سایر گیاهان پلی‌پلوئید نیز تأیید شده است (۳۳،۳۲،۳۱).

مطالعه محتوای رنگدانه‌های فتوسنتری گیاهان شاهد و تتراپلوئید افزایش معنی‌داری را در مقادیر کلروفیل *a*، *b* و کل در گیاهان تتراپلوئید نشان داد (جدول ۲). این پدیده می‌تواند باعث افزایش کارآیی فتوسنتز شده و عملکرد مناسب‌تری را در گیاهان تتراپلوئید به‌وجود آورد (۴۱). افزایش محتوای کلروفیل در نتیجه القای پلی‌پلوئیدی در تحقیقات اسماردا و همکاران (۴۱) گزارش شده است.

با توجه به افزایش اندازه سلول‌های پلی‌پلوئید و تشدید سطح رونویسی آنها انتظار بر این است که بیان ناخالص اکثر ژن‌ها با افزایش سطح پلوئیدی در هر سلول به‌صورت خطی افزایش یابند (۳) و از طریق تأثیر بر فعالیت‌های متابولیکی، سنتز rRNA و میزان نسخه‌برداری ژنی بر میزان تنفس، فعالیت ژن‌ها و آنزیم‌ها و فرآیند انتقال الکترون در جریان فتوسنتز تأثیرگذاشته و به‌طور معمول باعث ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گردد (۳۷،۴۷). تأثیر القای پلی‌پلوئیدی بر محتوای پروتئین کل، کربوهیدرات و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در سایر مطالعات نیز گزارش شده است (۴۵، ۴۳).

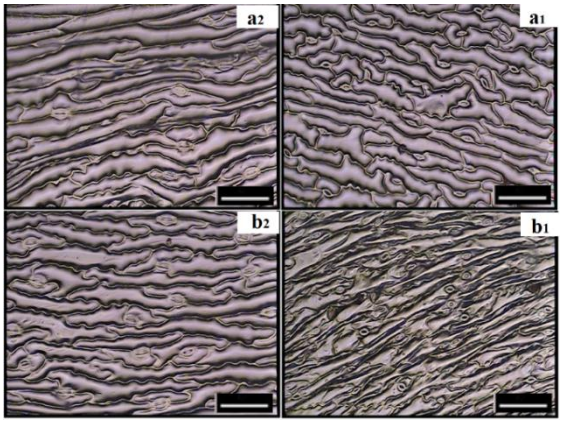


شکل ۳- مقایسه خصوصیات رشدی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید خشخاش برگ‌ریزان. گیاهچه دیپلوئید (a_1) و تتراپلوئید (a_2) در مراحل اولیه رشد، گیاه دیپلوئید (b_1) و تتراپلوئید (b_2) در مرحله رشد رویشی، برگ گیاه دیپلوئید (c_1) و تتراپلوئید (c_2)، مرحله رشد زایشی در گیاه دیپلوئید (d_1) و تتراپلوئید (d_2)

Figure 3. Comparison of growth characteristics between diploid and tetraploid plants of bride rose poppy. Diploid (a_1) and tetraploid (a_2) seedlings in the early stages of growth, diploid (b_1) and tetraploid (b_2) plants in the vegetative growth stage, the leaf of diploid (c_1) and tetraploid (c_2) plant, reproductive stage in the diploid (d_1) and tetraploid (d_2) plant

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.52547/jcb.12.35.69]



شکل ۴- تغییرات تعداد و اندازه‌ی سلول‌های روزنه. روزنه‌های سطح رویی برگ در گیاه دیپلوئید (a_1) و تتراپلوئید (a_2)، روزنه‌های سطح زیرین برگ در گیاه دیپلوئید (b_1) و تتراپلوئید (b_2)

Figure 4. Difference in stomata size and density. Adaxial stomata in diploid (a1) and tetraploid (a2) plants, Abaxial stomata in diploid (b1) and tetraploid (b2) plants. (Magnification=10x; Scale bars=40 µm)

جدول ۲- مقایسه برخی از خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی گیاه خشخاش برگ‌ریزان در سه روش مختلف تیمار با کلشی‌سین (میانگین و خطای استاندارد (SE) برای هر یک از صفات مشخص شده است)

Table 2. Comparison of some morphophysiological characteristics of bride rose poppy in three different methods of colchicine treatment (Means and standard error (SE) for each characteristics is specified.

ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیک مورد بررسی	بذر		گیاهچه		جوانه انتهایی ساقه	
	گیاهان دیپلوئید	گیاهان تتراپلوئید	گیاهان دیپلوئید	گیاهان تتراپلوئید	گیاهان دیپلوئید	گیاهان تتراپلوئید
	(SE± میانگین)		(SE± میانگین)		(SE± میانگین)	
تعداد روزنه روی برگ در mm^2	۱۳۶/۴۰ ± ۷/۰۷^{a}	۹۱/۸ ± ۳/۳۹^{b}	۱۲۹/۰۴ ± ۴/۷^{a}	۸۳/۲ ± ۳/۶۷^{b}	۱۱۱/۸ ± ۴/۴^{a}	۸۶/۴ ± ۳/۶۹^{b}
تعداد روزنه پشت برگ درmm^2	۲۱۳/۸۰ ± ۳/۹۶^{a}	۱۷۶/۴۰ ± ۴/۵۸^{b}	۲۱۲/۰۰ ± ۳/۰۳^{a}	۱۵۳/۰۰ ± ۳/۰۱^{b}	۲۰۸/۰۰ ± ۳/۵۷^{a}	۱۵۰/۰۰ ± ۳/۱۶^{b}
میانگین فواصل میانگره (cm)	۱/۷۲ ± ۰/۰۵^{a}	۱/۳۰ ± ۰/۰۳^{b}	۱/۳۴ ± ۰/۰۵^{a}	۱/۰۸ ± ۰/۰۳^{b}	۱/۵ ± ۰/۰۴^{a}	۱/۱۶ ± ۰/۰۵^{b}
میزان کلروفیل *a* (mg/g)	۱/۷۶ ± ۰/۰۷^{b}	۲/۵۴ ± ۰/۱۲^{a}	۲/۰۴ ± ۰/۶۲^{b}	۲/۵۸ ± ۰/۸^{a}	۱/۹۳ ± ۰/۰۹^{b}	۲/۶۸ ± ۰/۱^{a}
میزان کلروفیل *b* (mg/g)	۰/۹ ± ۰/۰۹^{b}	۱/۴۵ ± ۰/۱۱^{a}	۰/۹۸ ± ۰/۰۵^{b}	۱/۶۹ ± ۰/۰۷^{a}	۰/۹۹ ± ۰/۰۵^{b}	۱/۵۸ ± ۰/۰۹^{a}
میزان کل کلروفیل (mg/g)	۲/۶۶ ± ۰/۱^{b}	۴/۰۰ ± ۰/۲۳^{a}	۳/۰۲ ± ۰/۰۴^{b}	۴/۲۸ ± ۰/۰۳^{a}	۲/۹۲ ± ۰/۱۲^{b}	۴/۲۷ ± ۰/۱۸^{a}
میانگین ضخامت برگ (mm)	۰/۱۳ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۱۹ ± ۰/۰۰۷^{a}	۰/۱۴ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۲۰ ± ۰/۰۱^{a}	۰/۱۲ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۱۹ ± ۰/۰۰۵^{a}
طول برگ (cm)	۸/۱۸ ± ۰/۲۳^{b}	۱۳/۲۶ ± ۰/۲۸^{a}	۸/۷۰ ± ۰/۲۹^{b}	۱۵/۰۶ ± ۰/۳۴^{a}	۱۲/۷ ± ۰/۵۷^{b}	۱۸/۰۸ ± ۰/۴۹^{a}
عرض برگ (cm)	۲/۰۴ ± ۰/۱^{b}	۳/۳۰ ± ۰/۱۷^{a}	۲/۲۲ ± ۰/۱۱^{b}	۳/۶۸ ± ۰/۱۴^{a}	۲/۲۸ ± ۰/۰۸^{b}	۳/۹۲ ± ۰/۱^{a}
تعداد برگ	۱۲۶ ± ۵/۳۱^{b}	۱۷۷/۸۰ ± ۵/۷۳^{a}	۹۸/۸ ± ۳/۹۱^{b}	۱۳۹/۰۰ ± ۶/۲۸^{a}	۱۱۵ ± ۳/۵^{b}	۱۴۱/۲۰ ± ۲/۵۹^{a}
وزن خشک گیاه (g)	۲۸/۶۹ ± ۱/۳۴^{b}	۳۵/۸۵ ± ۱/۵۱^{a}	۲۶/۶ ± ۱/۹۸^{b}	۳۲/۱۴ ± ۰/۵۸^{a}	۲۲/۱ ± ۱/۲۳^{b}	۲۹/۴ ± ۰/۷۹^{a}
ارتفاع گیاه (cm)	۱۷/۸۸ ± ۰/۶۷^{a}	۱۴/۱۷ ± ۰/۵۴^{b}	۱۴/۵۶ ± ۰/۴۱^{a}	۱۱/۷۲ ± ۰/۵۹^{b}	۱۲/۹۶ ± ۰/۷۶^{a}	۱۱/۰۶ ± ۰/۲۷^{b}
پروتئین کل (mg/g)	۷۰/۰۴ ± ۰/۰۳^{b}	۱۱۴/۲۱ ± ۰/۰۳^{a}	۸۰/۱ ± ۰/۰۱^{b}	۱۲۰/۱۰ ± ۰/۰۳^{a}	۷۸/۵۹ ± ۳/۰۹^{b}	۱۳۰/۷۹ ± ۵/۱۲^{a}
کربوهیدرات (mg/g)	۰/۶۱ ± ۰/۰۳^{b}	۱/۰۱ ± ۰/۰۷^{a}	۰/۵۱ ± ۰/۰۲^{b}	۰/۹۷ ± ۰/۰۴^{a}	۰/۴۹ ± ۰/۰۳۷^{b}	۱/۱۲ ± ۰/۰۵^{a}
کاتالاز (OD/g.FW-min)	۰/۸۴ ± ۰/۰۵^{b}	۱/۲۵ ± ۰/۰۹۵a	۰/۷۳ ± ۰/۰۵^{b}	۱/۱۱ ± ۰/۰۶^{a}	۰/۸۱ ± ۰/۱۲^{b}	۱/۲۹ ± ۰/۱۳^{a}
پلی‌فنل‌اکسیداز (OD/g.FW-min)	۳/۵ ± ۰/۱۹^{a}	۳/۴۵ ± ۰/۱^{a}	۳/۴۱ ± ۰/۱۹^{a}	۳/۲۱ ± ۰/۲۳^{a}	۳/۰۵ ± ۰/۴۴^{a}	۳/۱۲۹ ± ۰/۲۸^{a}
پراکسیداز (OD/g.FW-min)	۳/۱۸ ± ۰/۱۷^{b}	۴/۴۳ ± ۰/۲۶^{a}	۳/۰۸ ± ۰/۱۸^{b}	۴/۴۸ ± ۰/۳^{a}	۳/۴۴ ± ۰/۲۸^{b}	۴/۵۶ ± ۰/۴۳^{a}

در هر ردیف حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد از طریق آزمون t است.

تأثیر پلی‌پلوئیدی بر محتوای پروتئین کل، کربوهیدرات و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

مقایسه میانگین داده‌ها اختلاف معنی‌داری را در محتوای پروتئین کل، کربوهیدارت و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نشان داد. به‌طوری‌که افزایش سطح پلوئیدی رابطه‌ی مستقیم با محتوای پروتئین کل، کربوهیدارت و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز داشته و سبب تشدید تولید آن‌ها می‌گردد. این در حالی است که فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز تحت تأثیر تغییرات سطح پلوئیدی قرار نگرفت (جدول ۲). تغییرات سطح پلوئیدی ممکن است از طریق تأثیر در بیان ژن‌ها و فعال‌سازی مسیر بیان یک ژن کلیدی یا ایجاد محدودیت در سنتز آن، سبب تغییر در محتوای پروتئین کل، کربوهیدرات و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شده و منجر به افزایش یا کاهش محتوایشان گردد. افزایش محتوای فلاونوئید، فنل و آنتی‌اکسیدان‌های کل در گیاهان تتراپلوئید خشخاش نسبت به انواع دیپلوئید توسط سایر محققین گزارش شده است (۲۷).

تأثیر پلی‌پلوئیدی بر محتوای آلکالوئیدهای گیاهی

بررسی محتوای آلکالوئیدهای گیاهی از طریق روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا مشخص نمود مقادیر مورفین در گیاهان تتراپلوئید افزایش و مقادیر کدئین کاهش یافته است (شکل ۵، جدول ۳). با توجه به جایگاه پلی‌پلوئیدی

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.52547/jcb.12.35.69]

در رشد و توسعه گیاهان از طریق افزایش اندازه گل، برگ، میوه و بذر (۲۰) و در مواردی که اندام‌های رویشی گیاه منبع مواد مؤثره هستند و باروری گیاهان پلی‌پلوئید اهمیت کمتری دارد (۱)، افزایش سطح کروموزومی می‌تواند به‌عنوان روشی ارزشمند و سریع جهت افزایش تولید ترکیبات دارویی، مورد توجه قرار گیرد. پلی‌پلوئیدی مصنوعی میزان زیست‌توده یا ترکیبات شیمیایی را در گیاهان دارویی افزایش می‌دهد (۴۶، ۱۸) که این فرآیند ممکن است ناشی از افزایش ژنوم پایه بیوسنتزکننده ترکیبات اصلی باشد (۳) و افزایش میزان آلکالوئیدها گیاهان پلی‌پلوئید را در نتیجه افزایش فعالیت‌های متابولیکی ناشی از دوبرابرشدن کروموزوم‌ها فراهم سازد. میشرا و همکاران (۲۹) گزارش کردند محتوای مورفین در گیاهان تتراپلوئید خشخاش افزایش و محتوای تبائین کاهش یافته است. اثر القای پلی‌پلوئیدی در افزایش متابولیت‌های گیاهی در پلی‌پلوئیدهای سایر گونه‌های گیاهی مانند درمنه (۱۱)، بنگ‌دانه (۲۴) و شابیزک و تاجریزی (۲۵) نیز مشاهده شده است.

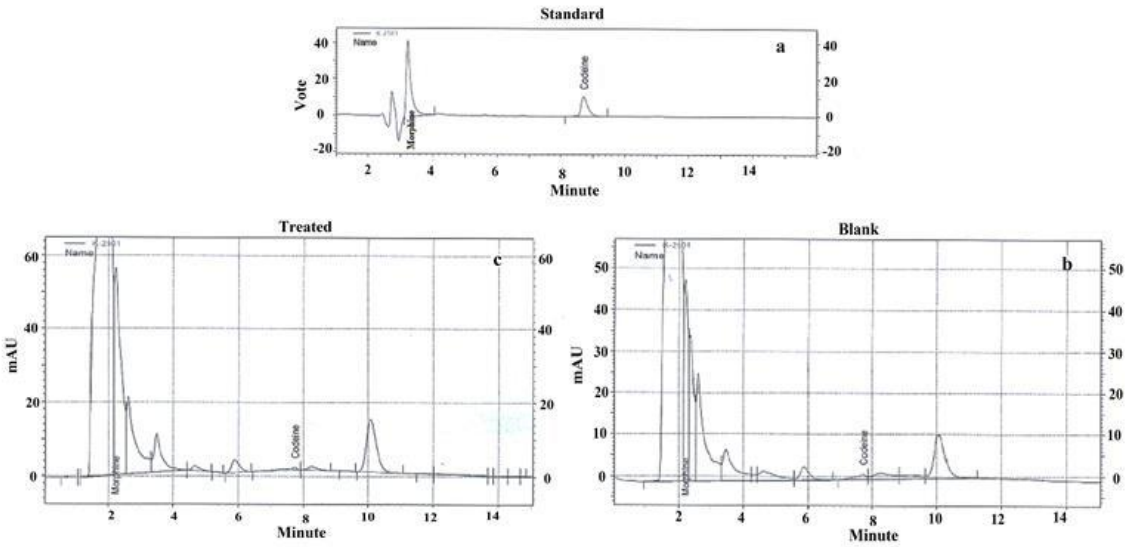
با توجه به اینکه هدف اصلی از تیمار با کلشی‌سین تولید گیاهان پلی‌پلوئید است، تیمار جوانه‌های انتهایی ساقه با غلظت کلشی‌سین ۰/۰۵ درصد به‌دلیل بالاترین درصد زنده‌مانی و تتراپلوئیدی بهترین روش تیمار در خشخاش برگ‌ریزان در این پژوهش می‌باشد. در مطالعه سایر صفات نیز مشخص شد گیاهان تتراپلوئید القاءشده از طریق کلشی‌سین، از نظر اندازه و ضخامت برگ، اندازه کپسول، تعداد برگ، وزن خشک کل بوته، اندازه سلول‌های روزنه‌ای، محتوای کلروفیل، پروتئین، کربوهیدرات، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و محتوای مورفین برتر از انواع دیپلوئید خود هستند. این در حالی است که فواصل میانگره، ارتفاع بوته، تراکم سلول‌های روزنه و محتوای کدئین در این گیاهان کمتر بود. گیاهان پلی‌پلوئیدی القاءشده از طریق این تکنیک به‌دلیل امکان تولید ژنوتیپ‌های جدید با کیفیت متمایز، افزایش جثه گیاهی و نهایتاً تشدید تولید محتوای مورفین می‌توانند بسته به اهداف اصلاحی، مورد توجه قرار گیرند.

جدول ۳- مقادیر مورفین و کدئین در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید خشخاش برگ‌ریزان

Table 3: Mmorphine and codeine contents in diploid and tetraploid plants of *P. fugax*

صفت	گیاهان دیپلوئید (SE± میانگین)	گیاهان پلی‌پلوئید (SE± میانگین)
مورفین (mg/g)	۴۸/۵۳ ± ۱/۳۸^{b}	۹۴/۹۱ ± ۱/۷۷^{a}
کدئین (mg/g)	۹/۷۱ ± ۰/۳^{a}	۵/۷۸ ± ۰/۲۴^{b}

در هر ردیف حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد از طریق آزمون t است.



شکل ۵- کروماتوگرام آنالیز نمونه‌ها: کروماتوگرام نمونه‌های استاندارد (a)، دیپلوئید (b) و تتراپلوئید (c)

Figure 5. Chromatogram of analyzed samples: Standard (a), diploid (b) and tetraploid (c) samples' chromatogram

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.52547/jcb.12.35.69]

منابع

1. Adaniya, S. and D. Shirai. 2001. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. Scientia Horticulturae, 88: 277-287.
2. Adams, K.L. and J.F. Wendel. 2005. Novel patterns of gene expression in polyploidy plants. Trends in Genetics, 10: 539-543.
3. Albuzio, A., P. Spettoli and G. Cacco. 2006. Changes in gene expression from diploid to autotetraploid status of *Lycopersicon esculentum*. Physiologia Plantarum, 44: 77-80.
4. Allario, T., J. Brumos, J.M. Colmenero-Flores, D.J. Iglesias, J.A. Pina, L. Navarro, M. Talon, P. Ollitrault and R. Morillon. 2013. Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. Plant Cell and Environment, 36: 856-868.
5. Balazova, A. and M. Psenak. 1998. Biosynthesis of morphinans: enzymological and molecular-biological aspects. Chemicke Listy, 92: 1006-1015.
6. Bennett, M.D. 2004. Perspectives on polyploidy in plants - ancient and neo. Biological Journal of the Linnean Society, 82: 411-423.
7. Birami Kohi, A., L. Fahmideh and M. Riasat. 2016. Evaluation of morphologic and physiologic traits of Sistan's native Fenugreek (*Trigonellafoenum graecum*) under colchicine treatments. Journal of Crop Breeding, 8(18): 153-159 (In Persian).
8. Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
9. Chance, B. and A.C. Maehly. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymology, 773-775 pp.
10. Chen, Z.J. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. Annual Review of Plant Biology, 58: 377-406.
11. De Jesus-Gonzalez, L. and P.J. Weathers. 2003. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. Plant Cell Reports, 21: 809-813.
12. Del Pozo, J.C. and E. Ramirez-Parra. 2014. Deciphering the molecular bases for drought tolerance in *Arabidopsis* autotetraploids. Plant, Cell and Environment, 37: 2722-273.
13. Dhooghe, E., K. Van Laere, T. Eeckhaut, L. Leus and J. Van Huylenbroeck. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. Plant Cell Tissue Organ Culture, 104: 359-373.
14. Dou, J.L., P.L. Yuan, S.J. Zhao, N. He, H.J. Zhu, L. Gao, W.L. Ji, X.Q. Lu and W.G. Liu. 2017. Effect of ploidy level on expression of lycopene biosynthesis genes and accumulation of phytohormones during watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit development and ripening. Journal of Integrative Agriculture, 16(9): 1956-1967.
15. Facchini, P.J. and V. De Luca. 1995. Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and biosynthesis of isoquinoline alkaloids in opium poppy. Plant Cell, 7: 1811-1821.
16. Fairbairn, J.W. and F. Hakim. 1973. *Papaver bracteatum* Lindl. A new plant source of opiates. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 25: 353-358.
17. Fakhari, A.R., S. Nojavan, S.N. Ebrahimi and C.J. Evenhuis. 2010. Optimized ultrasound-assisted extraction procedure for the analysis of opium alkaloids in Papaver plants by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. Journal of Separation Science, 33: 2153-2159.
18. Fedde, F. 1909. *Papaveraceae- Hypecoideae* et *Papaveraceae- Papaveroideae*. In: Engler, Das Pflanzenreich. 4: 1-430.
19. Gaffari, S.M. 2008. Chromosome reports for some plant species from Iran. Journal of Botany, 14: 39-46.
20. Guy, C.L., D. Haskell, L. Neven, P. Klein and C. Smelser. 1992. Hydration-state-responsive proteins link cold and drought stress in spinach. Planta, 188: 265-270.
21. Hagel, J.M. and P.J. Facchini. 2010. Dioxygenases catalyze the O-demethylation steps of morphine biosynthesis in opium poppy. Nature Chemical Biology, 6: 273-275.
22. Hamill, S.D., M.K. Smith and W.A. Dodd. 1992. In vitro Induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. Australian Journal Botanical, 40: 887-896.
23. Kar, M. and D. Mishra. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology, 57: 315-319.
24. Lavania, U.C. 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phytopharmaceuticals. Plant Genetic Resources, 3: 170-177.
25. Levin, D.A. 2002. The role of chromosomal change in plant evolution. New York: Oxford University Press, 230 pp.
26. Lichtenthaler, H.K. and A.R. Wellburn. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transactions, 11:591-592.
27. Madani, S.H., B. Hosseini, Gh. Karimzadeh and A. Rahimi. 2019. Effects of polyploidy induction on antioxidant capacity and some phytochemical and morphological characteristics of Iranian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 35:170-181 (In Persian).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.52547/jcb.12.35.69]

28. Madani, S.H., B. Hosseini, E. Dehghan and E. Rezaei Chiyaneh. 2016. Effects of in vitro polyploidy induction on regenerated plantlets of Lattice Henbane (*Hyoscyamus reticulatus* L.). Journal of Crop Breeding, 8(17): 66-76 (In Persian).
29. McCready, R.M., J. Guggolz, V. Silviera and H.S. Owens. 1950. Determination of starch and amylase in vegetables. Analytical Chemistry, 22: 1156-1158.
30. Mishra, B.K., S. Pathak, A. Sharma, P.K. Trivedi and S. Shukla. 2010. Modulated gene expression in newly synthesized auto-tetraploid of *Papaver somniferum* L. South African Journal of Botany, 76: 447-452.
31. Mo, L., J. Chen, X. Lou, Q. Xu, R. Dong, Z. Tong, H. Huang and E. Lin. 2020. Colchicine-induced polyploidy in *Rhododendron fortunei* Lindl. Plants, 9(4): 1-13.
32. Omidbaig, R., M. Mirzaee, M.E. Hassani and M. Sedghi Moghadam. 2010a. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal of Plant Production, 4(2):87-98 (In Persian).
33. Omidbaigi, R., S. Yavari, M.E. Hassani and S. Yavari. 2010b. Induction of autotetraploidy in Dragonh (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatments. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18(1): 23- 35 (In Persian).
34. Omokolo, N.D., N.G. Tsala and P.F. Djocgoue. 1996. Changes in carbohydrate, amino acid and phenol content in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. and Grif. Annals of Botany, 77: 153-158.
35. Rao, S.H., X. Kang, J. Li and J. Chen. 2019. Induction, identification and characterization of tetraploidy in *Lycium ruthenicum.* Breeding Science, 69: 160-168.
36. Roy, A.T., G. Leggett and A. Koutoulis. 2001. In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). Plant cell reports, 20: 489-495.
37. Sattler, M.C., C.R. Carvalho and W.R. Clarindo. 2016. The polyploidy and its key role in plant breeding. Planta, 243: 281-296.
38. Seddigh, M.D., G. Jolliff, W.M. Calhoun and J. Crane. 1982. *Papaver bracteatum* potential commercial source of codeine. Economic Botany, 36: 433-441.
39. Shafiee, A., Z. Mahmoudi and N. Samadi. 1997. Alkaloids of Papaveraceae XVI. Alkaloids of *Papaver fugax* population Tarom. Journal of Science Islamic Repablic Iran, 8: 166-169 (In Persian).
40. Simpson, M.G. 2006. Plant Systematics. 2nd Edition, Elsevier Academic Press, 752 pp.
41. Smarda, P., L. Horova, O. Knapek, H. Dieck, M. Dieck, K. Ražna, P. Hrubik, L. Orloci, L.F. Papp and K. Vesela. 2018. Multiple haploids, triploids, and tetraploids found in modern-day “living fossil” Ginkgo biloba. Horticulture Reserch, 5: 1-12.
42. Soltis, P.S. and D.E. Soltis. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97: 7051-7057.
43. Sotoudeh Ardabili, G., R. Asghari Zakaria and N. Zare. 2015. In vitro induction of polyploidy in *Sorghum bicolor* L. Cytologia, 80(4): 495-503.
44. Sudhakar, S., Y. Li, M.S. Katz and N. Elango. 2001. Translational regulation is a control point in RUNX2/Cbfa1 gene expression. Biochemical and Biophysical Research Communications, 289: 616-22.
45. Talebi, S.F., M.J. Saharkhiz, M. Jafarkhan Kermani, Y. Sharafi and F. Raouf Fard. 2017. Effect of different antimitotic agents on polyploid induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.). Caryologia, 70(2): 184-193 (In Persian).
46. Thao, N.T.P., K. Ureshino, I. Miyajima, Y. Ozaki and H. Okubo. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell Tissue Organ Culture, 72(1): 19-25.
47. Van de Peer, Y., E. Mizrachi and K. Marchal. 2017. The evolutionary significance of polyploidy. Nature Reviews Genetics, 18: 411-424.
48. Van Laere, K., S.C. Franca, H. Vansteenkiste, J. Van Huylenbroeck, K. Steppe and M.C. Van Labeke. 2011. Influence of ploidy level on morphology, growth and drought susceptibility in *Spathiphyllum wallisii*. Acta Physiologiae Plantarum, 33: 1149-1156.
49. Wei, K.H., J.P. Xu, L.X. Li, J.Y. Cai, J.H. Miao and M.H. Li. 2018. In vitro induction and generation of tetraploid plants of *Sophora tonkinensis* Gapnep. Pharmacogn Magazine, 14: 149-154.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.52547/jcb.12.35.69]

Effect of Colchicine Dose and Treatment Duration on Morphophysiological Characteristics of Bride Rose Poppy (*Papaver Fugax* Poir.) using Different Explants

Giti Sotoudeh Ardabili[1], Rasool Asghari Zakaria[2], Nasser Zare[1] and Leila Ghaffarzadeh Namazi[3]

1- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, (Corresponding author: r-asghari@uma.ac.ir)
3- Meshginshahr Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
Received: June 10, 2020 Accepted: August 31, 2020

Abstract

In this study, in order to determine the best method of polyploidy induction in bride rose poppy (*Papaver fugax* Poir.), a factorial experiment based on completely randomized design with three replications and three factors including different colchicine concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5%), different treatments duration (12, 24 and 48 h) and explant type (seeds, seedlings and terminal buds) were investigated in Mohaghegh Ardabili University in 2017-2018. In addition to morphological and stomatal evaluations, flow cytometry technique confirmed the increasing of DNA content in some of the treated plants. The results showed that, the treatment of terminal buds with 0.05% or 0.1% colchicine for 48 h, due to the highest percentage of survival (44.4%) and tetraploidy induction (18.9%), is the best method for production of tetraploid plants. The assessment of autopolyploidy effects on some of the studied traits revealed that, average internode length, plant height and stomata cells density in tetraploid plants decreased, while, leaf size and thickness, capsule size, number of leaves and dry weight of plants, stomata cell size, chlorophyll, protein and carbohydrate content and activity of catalase and peroxidase antioxidant enzymes increased. However, there was no significant change in the polyphenol oxidase activity as a result of tetraploidy induction. In addition, enhanced morphine content and declined codeine content in tetraploid plants were observed in this study. In conclusion, with regards to effective role of colchicine in tetraploidy induction along with morphological characteristics and metabolic process changes of bride rose poppy plants, the results can be used in breeding programs of this medicinal plant.

Keywords: Bride Rose Poppy, Codeine, Colchicine, Flow Cytometry, Morphine, Polyploidy

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-08-24]

[DOI: 10.52547/jcb.12.35.69]