دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

تأثیر کلشی سین بر القاء پلی‌پلوئیدی وخصوصیات مورفوفیزیولوژیکی جمعیت زنیان (*Carum copticum* L.) منطقه جغرافیایی سیستان

راحله اکبری[۱]، لیلا فهمیده[۲] و بهمن فاضلی‌نسب[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
(نویسنده مسوول: l.fahmideh@gau.ac.ir)
۳- عضو هیئت‌علمی گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۴
صفحه: ۳۵ تا ۴۵

چکیده

زنیان، متعلق به تیره خانواده چتریان، اسانس آن حاوی تیمول، پاراسیمن، آلفا پینن، کارواکرول است و دارای خاصیت ضد میکروبی و قارچ‌کشی است. القاء پلی‌پلوئیدی با استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا به عنوان یکی از روش‌های اصلاح گیاهان دارویی جهت افزایش میزان تولید متابولیت‌های ثانویه آنها مورد استفاده می‌گیرد. جهت بررسی اثرات القاء پلی‌پلوئیدی جمعیت زنیان سیستان آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از غلظت‌های مختلف کلشی‌سین (۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ گرم در لیتر) و مدت زمان اعمال تیمار (٦، ۱۲ و ۱۸ ساعت) انجام شد. پس از پلی‌پلوئید کردن و تعیین بهترین غلظت و زمان اعمال تیمار کلشی‌سین، گیاهان تتراپلوئید به‌همراه شاهد کشت شدند و برخی صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان تتراپلوئید شده و گیاهان شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این پژوهش نشان داد که غلظت ۰/۵ گرم در لیتر و مدت زمان ٦ ساعت، بهترین تیمار جهت القاء پلوئیدی در گیاه زنیان بود. تعداد کروموزوم‌های گیاهان دیپلوئید برابر با ۱۸ عدد و در گیاهان تتراپلوئید برابر با ۳٦ عدد بود بنابراین می‌توان بیان کرد که کلشی‌سین به‌طور مؤثری قابلیت القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه زنیان را دارد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که القاء تتراپلوئیدی بر صفات ارتفاع بوته، قطر ساقه، تعداد گل، تعداد شاخه جانبی، قطر ریشه، وزن تر، کلروفیل a و b، کارتنوئید، پراکسیداز، کاتالاز، پروتئین کل و فلاونوئید معنی‌دار بود و گیاهان تتراپلوئید (تیمار شده) از نظر صفات فیزیولوژی (کلروفیل a، آنتوسیانین، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز ،فنل و کارتنویید) و مورفولوژی (تعداد شاخه جانبی، ارتفاع گیاه، تعداد برگ، طول و عرض برگ و وزن تر و خشک) نسبت به گیاهان شاهد برتری داشتند. با توجه با نتایج حاصله از این تحقیق پیشنهاد می‌شود که این روش اصلاحی به‌عنوان روشی مناسب می‌تواند برای گیاه زنیان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، تتراپلوییدی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای فنلی، محتوی فلاونوئیدی

مقدمه

زنیان با نام علمی (*Carum copticum*) متعلق به خانواده چتریان (*Apiaceae*) است علفی یکساله و بی‌کرک به ارتفاع ۳۰ تا ۹۰ سانتی‌متر (کمتر از یک متر) پر شاخ و برگ، که به‌حالت خودرو در نواحی شرقی هند، ایران و مصر می‌روید، برگ‌هایی با پهنک منقسم به بریدگی‌های نازک و ظریف و گل‌ها با گلبرگ‌هایی به رنگ سفید و کوچک و همچنین مجتمع به صورت چتر مرکب دارد. قسمت مورد استفاده این گیاه میوه‌ی آن است (۱۶).

تعداد کروموزوم موجود در این گیاه 2n=2x=18 می‌باشد (۱۳). زنیان در مرحله رویشی ظاهری شبیه به گیاه شوید دارد. گلدهی از اواخر فصل بهار شروع و همزمان با رشد رویشی ادامه می‌یابد (۳۱،۳۰). گیاه زنیان دارای اسانس روغنی حاوی تیمول، پارا-سیمن، آلفا-پینن، کارواکرول است (۲۲). مقداری از آن یعنی۳۵ تا ۶۰ درصد اسانس را تیمول تشکیل می‌دهد. اسانس آن شامل: بتا -پینن، گاما -ترپینن، بتا -ترپینن است که مخلوط آن‌ها به‌طور تجاری تحت عنوان تیمن شناخته می‌شود (۴). از جمله ترکیبات شیمیایی دیگر گیاه زنیان، پروتئین، چربی و کاتیون‌های مانند سدیم، پتاسیم، آهن، کلسیم، منیزیم و روی است (۲۲). خاصیت ضد میکروبی زنیان مربوط به‌ترکیب تیمول و خاصیت ضد اسپاسم آن مربوط به اسانس فرار آن است (۲۵).

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 (۴۱). القاء پلی‌پلوئیدی استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا به‌عنوان یکی از روش‌های اصلاح گیاهان دارویی به‌منظور افزایش قابلیت تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰). مهم‌ترین و کاربردی‌ترین روش‌های اصلاحی شامل دورگ‌گیری، موتاسیون و پلی‌پلوئیدی است (۱۸،۱۴). القاء پلی‌پلوئیدی روشی است که اغلب در گیاهان موجب تولید واریانت‌هایی جدید با کیفیت مجزا می‌شود و از طرف دیگر از طریق دو برابر شدن سطح کروموزومی، افزایش تعداد نسخه‌های ژنی بیان‌کننده و افزایش جثه گیاه ممکن است موجب بیشتر شدن ترکیبات ثانویه و دارویی آن بشود (۵۵). تولید گیاهان تتراپلوئید از گیاهان دیپلوئید می‌تواند در رشد و نمو، عملکرد و همچنین کمیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان دارویی موثر باشد (۱۷). پلی‌پلوئیدی باعث افزایش سازگاری

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]
[DOI: 10.52547/jcb.13.38.35]

گیاه به شرایط محیطی نامساعد از جمله خشکی و شوری می‌شود. ضمناً افزایش در خصوصیات سطح ژنومی (نسخه‌های ژنی) ممکن است با تأثیر بر انعطاف‌پذیری، تنوع فنوتیپی، هتروزیس، بنیه (درشتی اندام رویشی)، انجام وظیفه متفاوت نسخه‌های تکراری ژن در اندام مختلف و حتی تأثیر در نحوه تولید مثل گیاه سبب برتری پلی‌پلوییدی نسبت به دیپلوئید شود (۳۷).

کلشی‌سین ($C_{22}H_{25}O_6N$) یک ماده محرک و با هدف ایجاد پلی‌پلوئیدی در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹). کلشی‌سین یک ترکیب آلکالوئیدی است که از بذر پداژه و گل‌های گیاه گل حسرت (*Colchicum autumnale*) استخراج می‌شود (۲۱). کلشی‌سین مانع از ایجاد رشته‌های دوکی در طی تقسیم سلولی از طریق جلوگیری از پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها با پیوند به زیر واحدهای پروتئینی توبولین و تغییر شکل آن‌ها شده و در نتیجه منجر به دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌ها در سلول می‌شود (۷). این ترکیب نسبت به مواد جهش‌زای دیگر تغییرات مورفولوژیکی بیشتر و میزان موتاسیون بالاتری را ایجاد می‌کند (۴۹،۴۵).

در بررسی امکان القاء پلوئیدی در بنفشه آفریقایی ارزیابی صفات ظاهری نشان داد گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید از نظر خصوصیات مورفولوژیکی رویشی و صفات زایشی با یکدیگر متفاوت هستند به‌طوری‌که گیاهچه‌های تیمار شده با ماده‌ی القایی، پا کوتاه‌تر، برگ‌های پهن‌تر و ضخیم‌تر، دم برگ قطورتر، پر گل‌تر، پر برگ‌تر و دارای گل‌های درشت‌تر بودند که علت این تفاوت‌ها در مقدار هورمون اکسین که مسوول رشد می‌باشد است (۶). در بررسی کشت بافت و القاء پلی‌پلوئیدی کالوس گیاه *Morinda officinalis* بیشترین میزان القاء پلی‌پلوئیدی از تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلشی‌سین به مدت ۵ روز به‌دست‌آمده و در مقایسه با گیاهان پلی‌پلوئید و دیپلوئید، رشد ریشه در پلی‌پلوئیدها افزایش یافته است (۲۹). در تحقیقی به‌منظور بررسی تأثیر تیمار کلشی‌سین بر گیاه شنبلیله گزارش شد که غلظت و مدت زمان تیمار کلشی‌سین و اثر متقابل آن‌ها به‌صورت معنی‌داری بر اتو تتراپلوئید شدن شنبلیله تأثیر داشت و غلظت ۰/۵ گرم در لیتر با مدت تیمار ۱۲ ساعت بهترین نتیجه را داشت همچنین نتایج نشان داد که تغییر سطح پلوئیدی با کلشی‌سین از دیپلوئیدی به تتراپلوئیدی به‌صورت معنی‌داری بر کلیه صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی شنبلیله (به‌جز وزن تر و خشک گیاه) اثر داشت (۹).

هدف از این تحقیق، مطالعه امکان ایجاد گیاهان تتراپلوئید زنیان با استفاده از غلظت‌های مختلف و زمان‌های مختلف تیمار با کلشی‌سین و بررسی خواص سیتوژنتیکی (تعداد کروموزوم)، مورفولوژیکی (ارتفاع بوته، قطر ساقه اصلی و فرعی، تعداد گل، تعداد شاخه جانبی، ارتفاع گیاه، قطر ریشه، وزن تر، طول برگ و عرض برگ)، رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b، کل و کارتنوئید)، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و پراکسیداز) و اندازه‌گیری میزان فنل کل، فلاونوئید، پروتئین کل و آنتوسیانین گیاهان تتراپلوئید ایجاد شده و گیاهان شاهد بود.

مواد و روش‌ها

بذر جمعیت سیستان گیاه زنیان از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و جهت مطالعات سیتوژنتیکی در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه زابل مورد مطالعه قرار گرفت. به‌منظور به دست آوردن مریستم انتهایی ریشه، بذرها در ظروف پتری‌دیش حاوی کاغذ صافی مرطوب انتقال و بعد از افزودن آب مقطر، در ژرمیناتور تحت شرایط کنترل رطوبت ۳۸ درصد، دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی با شدت نور ۱۰۰۰۰ لوکس قرار داده شدند. بعد از چهار روز بذرهای جوانه زده با ریشه‌هایی به‌طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر آماده تیمار بودند. برای تیمار کردن از محلول کلشی‌سین با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ گرم در لیتر در سه مدت زمان ۶، ۱۲ و ۱۸ ساعت استفاده شد (۵).

مشاهده و شمارش کروموزوم‌ها، بلافاصله بعد از اتمام مدت زمان تیمار صورت گرفت. در مرحله پیش تیمار از محلول (۰/۰۰۲ میکرو مولار) ۸- هیدروکسی کینولین به‌مدت ۵ ساعت، تثبیت (محلول کارنوی-۲ مرکب از اتانول ۹۶ درصد، کلروفرم ۱۰ درصد و اسید استیک ۳۰ درصد به‌نسبت ۱: ۳: ۶) به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق، هیدرولیز اسید کلریدریک 1N به‌مدت ۲۰ دقیقه و سپس رنگ‌آمیزی ریشه‌ها با استو اورسئین برای مشاهدات میکروسکوپی استفاده شد. قسمت انتهایی نوک ریشه با یک قطره اسیداستیک ٪۴۵ روی اسلاید گذاشته و لامل روی آن گذاشته می‌شود تا ضمن خروج رنگ‌های اضافی سلول‌های مریستمی نیز در یک سطح پخش شوند (۳۴).

عکس‌برداری از نمونه‌های تهیه شده با استفاده از روش تحلیل تصویری با بزرگنمایی ۱۸۷۷ برابر انجام شد، به‌طوری‌که تصاویر کروموزومی از طریق *Color Video Camera* که بر روی میکروسکوپ نوری مدل *Olympus* نصب شده بود به مانیتور منتقل و ضبط شد. تصاویر تهیه شده به برنامه *Photoshop* (*Version 1.04*) منتقل شد. از هر تیمار تعداد ۱۰ اسلاید و از هر اسلاید تعداد ۵ سلول انتخاب شد و شمارش کروموزوم آن‌ها انجام شد. و به این‌صورت در دو گروه طبقه‌بندی شدند: ۱- سلول‌های دیپلوئید که تغییر تعداد کروموزوم نشان ندادند ۲- سلول‌های تتراپلوئید که تعداد کروموزوم آنها دو برابر تعداد کروموزوم دیپلوئید بود. در ادامه داده‌های هر گروه دیپلوئید و تتراپلوئید براساس درصد محاسبه شد.

بعد از تعیین بهترین دز و زمان اعمال کلشی‌سین (غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر در مدت زمان ۶ ساعت) برای القاء پلی‌پلوئیدی که با انجام عمل اسکواش و شمارش کروموزومی حاصل شد، بذور با کلشی‌سین تیمار شدند. ابتدا بذور پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد، در پتری‌دیش حاوی ۰/۵ گرم در لیتر کلشی‌سین روی کاغذ صافی به‌مدت ۶ ساعت در جایی تاریک منتقل گردید. پس از اعمال تیمار مورد نظر، بذرها در دو گروه بذرهای تیمار نشده (شاهد) و بذرهای تیمار شده با کلشی‌سین با استفاده از آب‌مقطر استریل شست‌وشو داده شده و در گلدان‌های حاوی کوکوپیت، خاک‌برگ و خاک معمولی منطقه منتقل شدند. در هر گلدان

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.52547/jcb.13.38.35]

پنج بذر قرار داده شد و گیاهان با فاصله دو روز آبیاری شدند و در شرایط گلخانه رشد و نمو یافتند.

صفات مورفولوژیکی مانند ارتفاع گیاه، طول و عرض برگ (با خط‌کش مدرج و برحسب سانتی‌متر)، تعداد شاخه جانبی، تعداد گل، تعداد برگ، وزن تر و خشک بوته، قطر ساقه اصلی و فرعی، قطر ریشه (توسط کولیس برحسب میلی‌متر) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی

تهیه بافر Ice–Cold: این محلول شامل؛ ۲۰۰۰ میکرولیتر محلول بافر پتاسیم فسفات 100 میلی‌مولار با pH= ۷ (برای تهیه محلول پتاسیم فسفات از دو نمک K_2HPO_4 (جرم حجمی ۱۷۴/۲) و KH_2PO_4 (جرم حجمی ۱۳۶/۰۸۶) استفاده و به این‌صورت که ابتدا محلول ۱ مولار از هر کدام از این نمک‌ها تهیه شد. سپس ۱۰ سی‌سی از هر کدام برداشته، مخلوط و به حجم ۱۰۰ سی‌سی رسانده شد و pH آن روی ۷ تنظیم شد.)، ۲۰ میکرو لیتر EDTA 0.1 mM و سپس ۱۹۸۰ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر بود (۱۶).

استخراج عصاره آنزیمی: برای اندازه‌گیری آنزیم‌ها، ۰/۱ گرم از بافت سبز برگ برداشت و با ۴ سی‌سی بافر Ice – cold در هاون سرد کاملاً ساییده و به‌صورت همگن درآمدند (۱۱). مخلوط همگن از کاغذ صافی عبور و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۶۰۰۰ دور با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار سانتریفیوژ شدند. سپس فاز بالایی به‌عنوان عصاره آنزیمی (پروتئینی) برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده گردید (۱۶).

آنزیم کاتالاز: جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، به‌ترتیب به ۷۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی، مقدار ۱۵۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر به کووت کوارتز اضافه شد و به هنگام اندازه‌گیری آنزیم، ۷۵۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن ۷۰

میلی‌مولار به مخلوط واکنش اضافه شد. تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر به‌مدت ۶۰ ثانیه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت شد. تغییرات جذب به‌دست‌آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر $۳۶mM^{-1}cm^{-1}$ است تقسیم و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد در گرم وزن‌تر بیان شد (۴۶،۸).

آنزیم پراکسیداز (PX): جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز، سه میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل؛ ۲۳۹۰ میکرو لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (PH=۶/۵)؛ ۲۴۰ میکرو لیتر گایاکول ۱ درصد و ۲۴۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۰/۳٪ و ۱۳۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استفاده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس میزان اکسید شدن گایاکول در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی mM^{-1} $۶/۲۶ cm^{-1}$ تعیین شد (۴۳).

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

جهت اندازه گیری میزان فنل کل به یک میلی‌لیتر محلول رویی سانتریفیوژ شده، یک میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه گردید و با آب مقطر، حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و یک میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد به آن اضافه گردید. مخلوط حاصل به‌مدت یک ساعت در تاریکی گذاشته شد و سپس جذب هر نمونه در طول‌موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید (شکل ۱ بخش A)، غلظت ترکیبات فنلی کل برحسب میلی‌گرم در گرم وزن‌تر محاسبه گردید. رسم منحنی استاندارد فنل کل در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر صورت گرفت (۳۸).

برای اندازه گیری میزان فلاونوئید کل به ۵۰۰ میکرو لیتر از هر عصاره ۱/۵ میلی‌لیتر متانول (۸۰٪)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلراید (۱۰٪)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. جذب مخلوط بعد از گذشت ۴۰ دقیقه در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر نسبت به شاهد (بلانک) اندازه‌گیری شد. شاهد حاوی تمام ترکیبات ذکر شده در بالا بود اما به‌جای عصاره، همان حجم متانول ۸۰٪ به آن اضافه‌شده بود. برای رسم منحنی استاندارد از کوئرستین استفاده شد (شکل ۱ بخش B). میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها بر اساس میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه گزارش شد (۱۳).

تهیه معرف بیوره: به‌منظور تهیه معرف بیوره، ۰/۱ گرم کوماسی بریلیانت بلو G250 در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه به مدت یک ساعت با کمک همزن مغناطیسی (مگنت) در تاریکی به‌خوبی حل شد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد قطره‌قطره به آن اضافه شد و در پایان حجم کل محلول به‌کمک آب مقطر به یک لیتر رسانده شد. محلول حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردید (۱۶).

سنجش پروتئین استاندارد و ارزیابی میزان پروتئین کل: برای ارزیابی و تعیین مقدار فعالیت آنزیم، لازم است ارزیابی دقیقی از میزان کل پروتئین موجود در عصاره مورد آزمایش، صورت گیرد. بدین‌منظور از روش بردفورد (۱۱) به شرح زیر استفاده گردید.

یک گرم بافت تر در یک هاون چینی محتوی سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷/۲ سائیده شد. عصاره حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار در g ۱۴۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی (محلول رویی) به لوله‌های آزمایش منتقل و پنج میلی‌لیتر معرف بیوره افزوده و سریعاً ورتکس شد. پس از دو دقیقه و قبل از یک ساعت جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین گاوی محاسبه و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر محاسبه گردید.

اندازه‌گیری آنتوسیانین: جهت اندازه‌گیری آنتوسیانین ۰/۱ گرم از بافت برگی تازه را در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت حجمی ۱: ۹) کاملاً ساییده و عصاره در لوله آزمایش

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.52547/jcb.13.38.35]

سرپیچ‌دار ریخته شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و جذب محلول رویی در طول‌موج ۵۵۰nm اندازه‌گیری شد. غلظت با استفاده از فرمول زیر و با در نظر گرفتن ضریب خاموشی (ε) ۳۳۰۰۰ سانتی‌متر بر مول و نتایج بر حسب میکرو مول بر گرم وزن تر ارائه شد (۴۰).

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی و کارتنوئید: جهت اندازه‌گیری کلروفیل و کارتنوئید مقدار ۰/۱۲۵ گرم از بافت تر برگ با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد خرد شد. مخلوط به‌دست‌آمده به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و در نهایت، قسمت بالایی عصاره جدا و حجم آن به ۸ میلی‌لیتر رسانده شد. اندازه‌گیری با استفاده از روش اسپکتروفتومتری انجام گرفت و برای کلروفیل a، b و کارتنوئید به‌ترتیب در طول‌موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد (۳۲).

تجزیه و تحلیل آماری

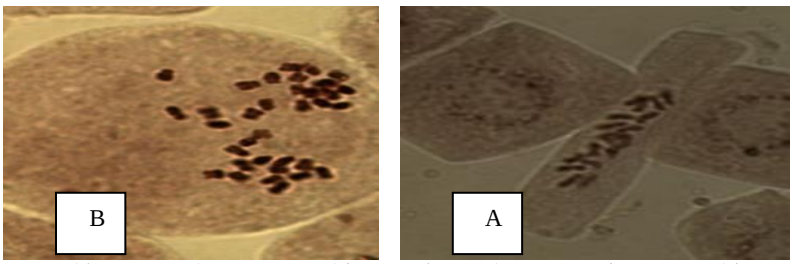
داده‌های حاصله از بررسی‌های کروموزومی به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و پس از اتمام داده‌برداری برای داده‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی حاصله دو گروه شاهد و تیمار، براساس طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار تجزیه واریانس و سپس مقایسه میانگین با روش LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. جهت انجام تجزیه‌ها و رسم شکل، از نرم‌افزارهای SAS (نسخه ۹/۱) و Excel استفاده شد. با توجه به اینکه اکثر داده‌های حاصل از شمارش تتراپلوئیدی به‌دست‌آمده در این تحقیق بر اساس درصد بودند، برای اینکه داده‌ها دارای توزیع نرمال باشند، از تبدیل داده جذری $X1=\sqrt{X2}$ استفاده شد. در مواردی هم که صفر وجود داشت از تبدیل $X_1=\sqrt{X2+0.5}$ استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج پلی‌پلوئیدی حاصل از تیمار با کلشی‌سین

پس از مطالعه و عکس‌برداری از اسلاید نمونه شاهد، عدد کروموزومی در زنیان ۲n=۱۸ به‌دست آمد (شکل ۲A) که مشابه با نتایج تعدادی از محققان می‌باشد (۲۳،۱۴). نتایج حاصل از بررسی سطح پلوئیدی گیاه تیمار شده با سطوح مختلف کلشی‌سین در سه زمان مختلف با استفاده از شمارش کروموزومی بررسی شد (شکل ۲B).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان‌داد که غلظت‌های مختلف کلشی‌سین و مدت زمان اعمال تیمار بر درصد پلی‌پلوئیدی شدن بذر زنیان جمعیت سیستان معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان تتراپلوئیدی برای جمعیت سیستان مورد مطالعه، در غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر در مدت زمان ۶ ساعت مشاهده و سایر غلظت‌های پایین‌تر و بالاتر تأثیر غیر معنی‌داری بر این فاکتور داشتند (شکل ۲) در تحقیقی نیز بهترین زمان اعمال تیمار (۶ ساعت) و بهترین غلظت کلشی‌سین (۰/۵ گرم) جهت القاء پلی‌پلوئیدی در ریحان ذکر شده است (۳۶) که با تحقیق حاضر مشابهت داشت. همچنین در تحقیق دیگری (۹) بهترین غلظت کلشی‌سین (۰/۵ گرم در لیتر) به‌صورت معنی‌داری بر اتوتتراپلوئید شدن شنبلیله تأثیر داشت که با تحقیق حاضر مشابهت داشت. همچنین در سایر تحقیقات نیز غلظت مؤثر برای القای پلوئیدی را در گیاهان مختلف بین ۰/۰۰۰۶ تا ۳ درصد گزارش کرده‌اند، غلظت تاثیرگذار بسته به نوع گیاه، روش تیمار و مدت زمان تیمار تفاوت دارد (۱۵).



شکل ۱- تصاویر کروموزومی قبل و بعد از تیمار با کلشی‌سین: A؛ دیپلوئید و B؛ تتراپلوئید

Figure 1. Chromosomal images before and after treatment with colchicine: A; Diploid and B; Tetraploid

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

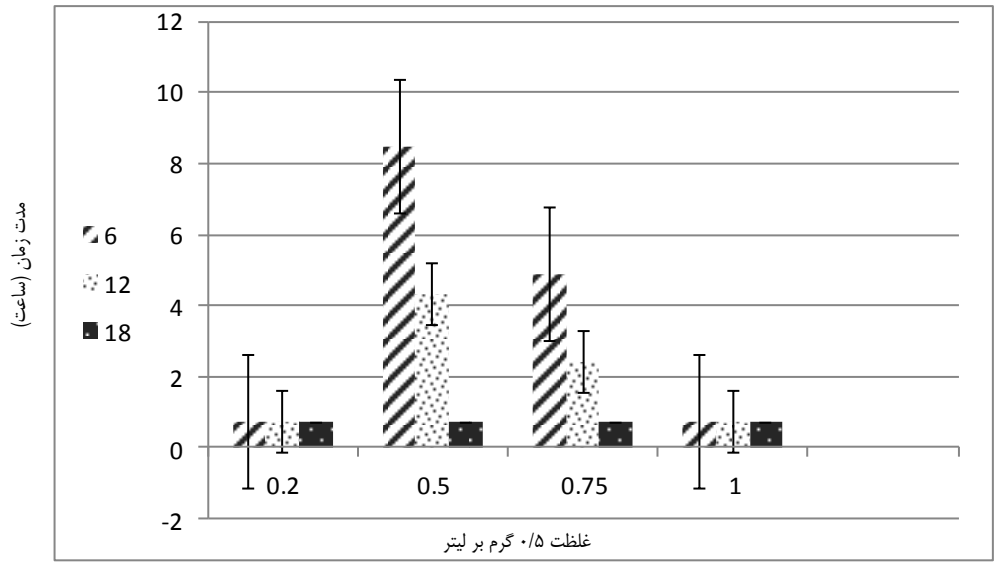
Table 1. variance analysis of polyploidy induction in Ajowan plant after treatment with colchicine at different times

منابع تغییرات	درجه آزادی	پلی پلوئیدی٪
زمان	۴	۲۶/۱۷**
غلظت	۲	۲۱/۵۰**
زمان× غلظت	۸	۹/۲۸**
خطا	–	۰/۳۴
ضریب تغییرات	–	۱۱/۳۹
ضریب تبیین	–	۰/۹۵

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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.52547/jcb.13.38.35]



شکل ۲- اثر متقابل غلظت و مدت زمان تیمار کلشی‌سین بر درصد پلی‌پلوئیدی گیاه زنیان
Figure 2. Interaction of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy percentage of Ajowan

ارزیابی ویژگی‌های مورفولوژیکی گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده زنیان

نتایج تجزیه واریانس نشان دادکه گیاهان شاهد و تیمار شده با کلشی‌سین از نظر اغلب صفات فنوتیپی مورد بررسی دارای تفاوت‌های معنی دار بودند (جدول ۲). همچنین نتایج مقایسه میانگین نیز برای صفات مورد بررسی به شرح زیر می‌باشد (جدول ۳).

قطر ریشه: با آنکه قطر ریشه گیاه با افزایش سطح پلوئیدی افزایش یافته بود اما این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۳). در تحقیقات مختلف (۴۷،۳۵) گزارش شده که ریشه‌های گیاهان پلی‌پلوئید قطورتر از گیاهان دیپلوئید می‌باشند در حالیکه نتایج Birami و همکاران (۹) نشان داد، قطر ریشه گیاهان دیپلوئید و تتراپلویید شنبلیله اختلاف معنی‌داری نداشتند که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

ارتفاع: بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، تیمار کلشی‌سین روی ارتفاع گیاه موثر بود و با افزایش سطح پلوئیدی ارتفاع گیاه افزایش یافت (جدول ۳). در برخی موارد انگیزش پلی‌پلوئیدی در گیاهان ارتفاع بوته را افزایش داد که طبق نتایج که Birami همکاران (۹) تیمار کلشی سین باعث افزایش ارتفاع بوته شنبلیله نسبت به گیاه شاهد گردید و همچنین در انگیزش پلی‌پلوئیدی در گیاه *Carom Coptium* توسط نوری و همکاران (۴۲) گیاهان تتراپلوئید به‌صورت معنی‌داری بلندتر از گیاهان دیپلوئید بودند که مطابق نتایج مطالعه حاضر است، اما در برخی موارد انگیزش پلی‌پلوئیدی سبب کاهش ارتفاع گیاهان شده است (۲۸).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک گیاه زنیان پس از تیمار با کلشی‌سین
Table 2. Results of analysis of variance of morphological traits of Ajowan after treatment with colchicine

منابع تغییر	df	تعداد گل	تعداد شاخه جانبی	ارتفاع گیاه	تعداد برگ	قطر ریشه	قطر ساقه اصلی
تیمار	۱	۲۳۶۰/۲*	۱۶/۳۶**	۶۴۰/۲**	۲۴**	۰/۳۸۱^{ns}	۰/۰۲۵^{ns}
خطا	۴	۴۲۶/۲	۲/۳۶	۲/۲۶	۱۹/۱۳	۰/۰۲۱۶	۰/۰۱۸۳
ضریب تغییرات	-	۲۰/۲	۲۴/۲	۴/۲۱	۲۱/۱۶	۱۳/۰۷	۱۳/۳
منابع تغییر	df	قطر ساقه فرعی	طول برگ	عرض برگ	وزن تر	وزن خشک	
تیمار	۱	۰/۰۲۶^{ns}	۰/۱۵۵^{ns}	۰/۰۹۱^{ns}	۰/۵۱*	۰/۰۴۳*	
خطا	۴	۰/۰۲۱	۰/۴۷	۰/۲۹۸	۰/۰۲	۰/۰۰۸	
ضریب تغییرات	-	۹/۴۲	۱۷/۶	۱۴/۰۲	۶/۰۷	۸/۹۱	

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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]
[DOI: 10.52547/jcb.13.38.35]

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات مورفولوژی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید

Table 3. Comparison of mean morphological traits of diploid and tetraploid plants

سطح پلوئیدی	قطر ریشه	ارتفاع گیاه	تعداد شاخه جانبی	قطر ساقه اصلی	قطر ساقه فرعی	تعداد برگ	طول برگ	عرض برگ	وزن تر بوته	وزن خشک بوته	تعداد گل
شاهد	۱^{a}	۱۹/۶۷^{b}	۵/۶۶^{b}	۰/۴۳^{a}	۰/۲۶^{a}	۱۹/۳۳^{b}	۳/۳۶^{a}	۱/۸۶ ^{a}	۱/۵۰^{b}	۰/۷۹^{b}	۱۱۳/۶۶^{a}
۰/۵ گرم بر لیتر	۱/۱۶^{a}	۳۷/۶۷^{a}	۷/۳۳^{a}	۰/۷۰^{a}	۰/۳۶^{a}	۲۲/۶۷^{a}	۱/۸۶^{a}	۲/۴۶^{a}	۱/۹۷^{a}	۰/۹۷^{a}	۸۵/۶۶^{b}

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

تعداد شاخه جانبی: گیاهان تتراپلوئید از نظر تعداد شاخه جانبی بیشتر از گیاهان شاهد بودند (جدول ۳). افزایش تعداد شاخه فرعی در این تحقیق نیز در اثر افزایش سطح پلوئیدی حاصل شد که با نتایج پژوهشی که بر روی گیاه *Colophospermum mopan* انجام شده بود (۵۰)، مطابقت داشت.

قطر ساقه اصلی و فرعی: نتایج حاصل از مقایسه قطر ساقه اصلی و فرعی در بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نشان داد که گیاهان شاهد بالاتر از گیاهان تتراپلوئید بودند اما اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳). نتایج متفاوتی در تحقیقات مختلف به‌دست‌آمده است بطوریکه نتایج تحقیقاتی که بر روی گیاهچه پروانه *(Colophospermum mopane)* (۵۰) و هندوانه (۵۲) انجام شده بود که با تحقیق حاضر مغایرت داشت. در بررسی و مقایسه ویژگی‌های کمی گیاهان تتراپلوئید شده با تیمار کلشی‌سین با گیاهان دیپلوئید، برخی صفات کمی به لحاظ اینکه این صفات توسط تعداد زیادی ژن کنترل می شوند و تحت تأثیر محیط هستند، نتایج متفاوتی مشاهده می شود.

تعداد برگ: در این مطالعه افزایش سطح پلوئیدی باعث افزایش تعداد برگ در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید شد (جدول ۳). در تحقیقی که روی گل دندروبیوم تیمار شده با کلشی‌سین در محیط کشت بافت انجام شد، بهترین غلظت ۰/۷۵ درصد به مدت ۱۴ ساعت معرفی گردید که سبب کاهش زاویه برگ و افزایش عرض و رنگ برگ‌ها و همچنین افزایش تعداد برگ در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان شاهد شد (۵۱).

طول و عرض برگ: در اغلب گیاهان تتراپلوئید برگ‌های اولیه دارای ظاهری نابهنجار بودند اما برگ‌های بعدی ایجاد شده ظاهر طبیعی داشتند. طول برگ در گیاهان دیپلویید بالاتر از گیاهان تتراپلوئید بود و عرض برگ در گیاهان تتراپلوئید بالاتر از گیاهان دیپلوئید بود، اما از نظر آماری اختلاف معنی‌دار نبود (جدول ۳). در گیاه شقایق (۳۹) و گیاه بادرشبو (۴۴) گزارش کردند که انگیزش تتراپلوئیدی علاوه بر تعداد برگ، در بسیاری از موارد بر رنگ، شکل، ضخامت و افزایش عرض و اندازه دندانه‌های برگ این گیاهان تأثیر می‌گذارد. بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش سطح پلوئیدی هسته اغلب باعث تغییرات آناتومی و ساختاری در گیاهان می‌شود و هر یک با توجه به نوع گونه با یک فنوتیپ ظاهر می‌شوند. افزایش سطح برگ با وجود کاهش طول برگ در نمونه‌های تتراپلوئید را می‌توان به افزایش عرض برگ در گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید نسبت داد.

وزن‌تر و خشک بوته: در این پژوهش با ایجاد تتراپلوئیدی، وزن‌تر و خشک بوته گیاهان تتراپلوئید در سطح بالاتر از گیاهان دیپلوئید قرار گرفت (جدول ۳). افزایش وزن تر و خشک گیاهان تتراپلوئید نسبت به گروه شاهد می‌تواند به دلیل دو یا سه شاخه بودن درصد بالایی از گیاهان تتراپلوئید، بیشتر بودن میانگین سطح و ضخامت برگ‌ها و یا به دلیل افزایش فتوسنتز و افزایش کارایی آن، بهبود روابط آبی و هورمونی باشد که باعث افزایش مواد ذخیره‌ای بالاتر در برگ‌ها شد (۲۷) و همچنین گزارش شده (۲۹) که افزایش سطح پلوئیدی به‌طور معنی‌داری وزن تر و خشک اندام هوایی را در گیاهان تتراپلوئید پراونش افزایش داده است.

تعداد گل: در طی آزمایش کاهش تعداد گل در گیاه تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید مشاهده گردید (جدول ۳). گزارش شده که در گیاه ریحان با دو برابر کردن کروموزوم‌ها تعداد گل کم شده است (۲۶) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. توجیه این صفت می‌تواند به این دلیل باشد که مرحله گلدهی در گیاهان پلی‌پلوئید در قیاس با انواع دیپلوئید دیرتر آغاز شده اما طول مدت گلدهی در آن‌ها بیشتر است (۲۴).

نتایج بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده

پس از بررسی نتایج خصوصیات فیزیولوژیکی گیاهان شاهد و گیاهان تحت تیمار کلشی‌سین، نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در تمامی صفات فیزیولوژیکی مورد مطالعه به جزء میزان آنتوسیانین، پراکسیداز و کاتالاز بین گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین تفاوت معنی‌دار وجود داشت (جدول ۴). همچنین نتایج مقایسه میانگین نیز نشان داد که تفاوت‌هایی به شرح زیر وجود دارد (جدول ۵):

محتوای کلروفیل: نتایج نشان داد (جدول ۵) که میزان کلروفیل a در برگ نمونه‌های تتراپلوئید (۱۷۹/۵۵میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) نسبت به نمونه‌های دیپلوئید (۱۲۴/۶۸ میلی‌گرم در گرم وزن‌تر برگ) بیشتر بود اما میزان کلروفیل b در برگ نمونه‌های تتراپلوئید (۳۱۶/۴۵ میلی‌گرم در وزن تر برگ) نسبت به نمونه‌های دیپلوئید (۳۶۷/۶۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) کمتر بود. از آنجا که فرض بر آن است که با دو برابر شدن ژنوم، فعالیت متابولیکی، سنتز rRNA و نسخه-برداری افزایش می‌یابد در نتیجه این افزایش می‌تواند بر میزان تنفس، فعالیت ژنی، تنوع و میزان فعالیت آنزیم‌ها و انتقال الکترون در فتوسنتز تأثیر داشته باشد (۴۸،۳۳،۱۲). حتی گزارش شده (۱) افزایش سطح پلوئیدی موجب افزایش تعداد کلروپلاست در برگ و نهایت افزایش فتوسنتز می‌شود. نتایجی که بیرامی و همکاران(۹) گیاهان تتراپلوئید نشان داد

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.52547/jcb.13.38.35]

که میزان کلروفیل در گیاهان تتراپلوئید شنبلیله نسبت به گیاهان دیپلوئید افزایش داشته که با نتایج ما همخوانی دارد.

آنتوسیانین: با افزایش سطح پلوئیدی محتوای آنتوسیانین در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید تغییری ایجاد نشد (جدول ۵). گزارشی مبنی بر کاهش یا افزایش میزان آنتوسیانین با تیمار با کلشی‌سین در گیاه تتراپلوئید نسبت به گیاه دیپلوئید یافت نشد.

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

Table 4. Results of analysis of variance of physiological traits of Ajowan after treatment with colchicine

منابع تغییر	df	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئید	آنتوسیانین	پراکسیداز
تیمار	۱	۸۱۲۴/۹**	۳۴۲۵۱/۷**	۳۶۲۵/۶**	۲/۶۶^{ns}	۲/۳۴^{ns}
خطا	۴	۳۴/۹	۸/۹۹	۱۲/۳	۴/۱۶	۳/۲۲
ضریب تغییرات	-	۱۰/۸۷	۷/۵۶	۹/۳	۸/۱	۱۰/۶
منابع تغییر	df	کاتالاز	فنل کل	پروتئین کل	فلاونوئید	
تیمار	۱	۱/۵۲^{ns}	۰/۰۰۵۲**	۰/۲۴۵**	۴/۵۳*	
خطا	۴	۵/۴۵	۳/۲۸	۰/۰۰۴	۲/۳۸	
ضریب تغییرات		۹/۴۲	۵/۴۲	۶/۳۷	۸/۶	

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

جدول ۵- مقایسه میانگین صفات فیزیولوژی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید

Table 5. Comparison of mean physiological traits of diploid and tetraploid plants

سطح پلوئیدی	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئید	آنتوسیانین	پراکسیداز	کاتالاز	فنل کل	پروتئین کل	فلاونوئید
شاهد	۱۲۴/۶^{b}	۳۶۷/۶^{a}	۹۴/۱۸^{a}	۰/۰۰۰۷۶۶^{a}	۰/۰۰۰۲۳۳^{a}	۰/۰۰۶۶۶^{a}	۲/۶۳^{a}	۱/۳۸۶^{b}	۲/۶۳ ^{a}
۰/۵گرم بر لیتر	۱۷۹/۵^{a}	۳۱۶/۴^{b}	۱۶/۱۳^{b}	۰/۰۰۰۶۶^{a}	۰/۰۰۰۲۰۰^{a}	۰/۰۱۳۶۶^{a}	۲/۰۷^{b}	۱/۵۹۰^{a}	۱/۷۴ ^{b}

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: تجزیه‌وتحلیل داده‌های حاصل از اثر تیمار با کلشی‌سین بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اختلاف معنی داری نشان نداد (جدول ۵). در حالیکه در گیاه سورگوم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تتراپلوئید افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان دیپلوئید نشان داد (۵۳).

میزان فنل و فلاونوئید کل: بر اساس نتایج حاصله، در گیاه زنیان، افزایش سطح پلوئیدی باعث کاهش میزان فنل و فلاونوئید کل گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین نسبت به گیاهان شاهد شده است (جدول ۵). با مقایسه گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید برای میزان فنل کل، گیاهان دیپلوئید (با میانگین ۲/۶۳۳) برتر از گیاهان تتراپلوئید (۲/۰۷) خود بودند. میزان فلاونوئید در دیپلوییدها (۲/۶۳) بالاتر از گیاهان تتراپلویید (۱/۷۴) نبود (جدول ۴). در بابونه (*Chamomilla recutita*) محتوای فلاونوئید بیشتر به‌عنوان یک نتیجه از پلی‌پلوئیدی عنوان شده است (۵۴) و در تحقیق دیگری (۲) نیز گزارش شد که افزایش سطح پلوئیدی اثر معنی‌داری در میزان فنل و فلاونوئید گیاهان تتراپلوئید لیمو ترش نسبت به گیاهان دیپلوئید نداشت که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد.

محتوای پروتئین کل و کارتنوئید: نتایج نشان داد که با افزایش سطح پلوئیدی میزان پروتئین کل در گیاهان تتراپلوئید افزایش یافت ولی افزایش سطح پلوئیدی سبب کاهش میزان کارتنوئید گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید شد (جدول ۵). در بعضی گونه‌ها مانند نیلوفر پیچ و تربچه (۵۶) پروتئین کل بیش از دو برابر افزایش یافته است و در تحقیقی دیگر (۳) گزارش شده که گیاهان تیمار شده لیمو ترش با کلشی‌سین میزان کارتنوئید بیشتری نسبت به گیاهان دیپلوئید داشته اما شرایطی مانند دما، شدت پرتو و میزان آب در دسترس در طول فصل رشد نیز بر میزان کارتنوئید تأثیرگذار است. همچنین طبق گزارش (۲۰) گیاهان ریحان تیمار شده با کلشی‌سین میزان کارتنوئید بیشتری نسبت به گیاهان شاهد (دیپلوئید) داشتند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد غلظت ۰/۵ گرم در لیتر کلشی‌سین با مدت زمان ۶ ساعت، در بین تیمارهای مورد استفاده در این تحقیق بهترین تیمار جهت القاء پلوئیدی در گیاه زنیان می‌باشد. همچنین بررسی‌های بیشتر و مقایسه بین خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید نشان داد که گیاهان تتراپلوئید از نظر صفات کمی از قبیل تعداد شاخه جانبی، ارتفاع گیاه، تعداد برگ، وزن تر بوته و همچنین کلروفیل a و پروتئین کل نسبت به گیاهان دیپلوئید برتری داشتند، بنابراین می‌توان گفت که پلی‌پلوئیدی با تغییرات ساختاری، نموی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گسترده‌ای در گیاهان همراه است که نتیجه آن ایجاد تنوع گسترده برای انتخاب است. ایجاد تنوع در صفات مختلف گزینه‌های جدیدی برای اصلاح‌گران ایجاد می‌کند تا بسته به هدف که ممکن است کاربردهای متفاوت دارویی، زینتی، مقاومتی و به خصوص آن دسته از گیاهانی که از اندام رویشی آنها به‌طور تجاری استفاده می‌شود، داشته باشد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.52547/jcb.13.38.35]

منابع

1. Abdoli, M., A. Moieni and H.N. Badi. 2013. Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicine-induced tetraploid plants of *Echinacea purpurea* (L.). Acta Physiologiae Plantarum, 35(7): 2075-2083.
2. Afshar, M.M., Z. Omidi, K.R. Purakbari and A.A. Asadi. 2013. The effect of polyploidy on some anatomical and antioxidant characteristics of *Citrus ourantifulia* Journal of Plant Research (Iranian Journal Of Biology), 26(3): 238-246.
3. Afshar Mohammadian, M., R. Pour Akbari, Z. Omidi, F. Ghanati and A. Torang. 2012. The effect of induced polyploidy on morphological and physiological traits of lemon (*Citrus aurantifolia* L.). Plant Biology Journal, 12: 13-24.
4. Ahmand, Z., L. Fahmideh and B. Fazeli-Nasab. 2017. Genetic Evaluation of *Cumin* and *Caraway* Using *Eryngium planum* Microsatellite Markers. Scientific Journal Management System, 8(2): 59-71.
5. Altrock, S., A. Fonseca and A. Pedrosa-Harand. 2011. Chromosome identification in the Andean common bean accession G19833 (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). Genet Mol Biol, 34(3): 459-463.
6. Amiri, A., M. Taghizadeh, M. Shoor, H. Nemati and A. Tehranian Far. 2013. Investigating the Possibility of Inducing Polyploidy in African Violets Using Colchicine in Reciprocal Seedlings of the African Violet (*Saintpaulia ionantha*). In Eighth Iranian Horticultural Sciences Congress, Hamadan, 3256-3295.
7. Arzani, A. and N.L. Darvey. 2001. The effect of colchicine on triticale anther-derived plants: Microspore pre-treatment and haploid-plant treatment using a hydroponic recovery system. Euphytica, 122(2): 235-241.
8. Beers, R.F. and I.W. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. Journal of Biological Chemistry, 195(1): 133-140.
9. 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.
10. Borgheei, S.F., H. Sarikhani, M. Chaichi and A. Kashi. 2010. In vitro induction of polyploidy in lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Scientific Journal Management System, 26(3): 283-295.
11. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry,72(1-2): 248-254.
12. Byrne, M.C., C.J. Nelson and D.D. Randall. 1981. Ploidy effects on anatomy and gas exchange of tall fescue leaves. Plant Physiology, 68(4): 891-893.
13. Chang, C.C., M.H. Yang, H.M. Wen and J.C. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10(3): 178-182.
14. Cheema, A.K. 2018. Plant Breeding its Applications and Future Prospects. International Journal of Engineering Technology Science and Research, 5(3): 88-94.
15. Das, A.B., A. Das, C. Pradhan and S.K. Naskar. 2015. Genotypic variations of ten Indian cultivars of *Colocasia esculenta* var. antiquorom Schott. evident by chromosomal and RAPD markers. Caryologia, 68(1): 44-54.
16. Davari, A., M. Solouki and B. Fazeli-Nasab. 2018. Effects of jasmonic acid and titanium dioxide nanoparticles on process of changes of phytochemical and antioxidant in genotypes of *Satureja hortensis* L. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants, 5(4): 1-20 (In Persian).
17. De Smet, R., E. Sabaghian, Z. Li, Y. Saeys and Y. Van de Peer. 2017. Coordinated Functional Divergence of Genes after Genome Duplication in *Arabidopsis thaliana*. The plant cell 29(11): 2786-2800.
18. Dehdari, A. 2014. Cytogenetical evaluation of canola cultivars and two wild species of Brassica. Journal of Cellular and Molecular Researches, 26(4): 446-461.
19. 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 and organ culture, 104(3): 359-373.
20. Esmailhasani, M., M. Mirzaii, R. Omidbeygi and M. Fathigharehbaba. 2010. Autotetraploidy Effect on quantitative and qualitative properties of essential oils and herb basil. Iranian Journal of Horticultural Science, 41: 111-118.
21. Fathi, S., S. Masiha and J. Panahandeh. 2011. Duplication of L3-layer chromosomes of *solanum commersonii* diploid cultivars and *S. aureus* strain hybrids (*S. acaule* × *S. phureja*) using different doses of colchicine. In 7th Iranian Horticultural Science Congress. Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
22. Fazeli-nasab, B. and Z. Fooladvand. 2016. A Review on Iranian *Carum copticum* (L.): Composition and Biological Activities. European Journal of Medicinal Plants, 12(1): 1-8.
23. Gendy, A.S., M.A. Abdelkader, N.Z. El-Naggar and H.A. Elakkad. 2018. Effect of intercropping systems and NPK foliar application on productivity and competition indices of black cumin and fenugreek. Current Sci. Int, 7(3): 387-340.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.52547/jcb.13.38.35]

24. Ghotbi Ravandi, E., E. Dehghan, A. Estaji and H. Naghdi Badi. 2014. Increasing the Production of Valuable Phytopharmaceutical Compounds by Chromosome Manipulation: Perspectives and Techniques of Induction and Selection of Polyploid Plants. Journal of Medicinal Plants, 2(50): 11-26.
25. Haghiroalsadat, F., M. Azhdari, F. Oroojalian, M. Omidi and M. Azimzadeh. 2015. The Chemical Assessment of Seed Essence of Three Native Medicinal Plants of Yazd Province (*Bunium Premium*, *Cuminum Cyminum*, *Trachyspermum Copticum*) and the Comparison of Their Antioxidant Properties. SSU_Journals, 22(6): 1592-1603.
26. Hasanzadeh, E., S. Rezazadeh, S. Shamsa, R. Dolatabadi and J. Zarringhalam. 2010. Review on phytochemistry and Therapeutic properties of Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum*). Journal of Medicinal Plants, 2(34): 1-18.
27. Hosseini, B. and S. Javanbakht. 2017. Effects of in vitro polyploidy induction on some morphological, physiological and biochemical traits of Salvia leriifolia Benth. Scientific Journal Management System, 25(1): 24-42.
28. Hosseini, H., M. Chehrazi, D. Nabati Ahmadi and M. Mahmoodi Sorestani. 2012. Polyploidy stimulation in *catharanthus roseus* cv. alba and changes in phenotypic characteristics. In First national conference on sustainable development strategies. Tehran, Ministry of Interior of Iran.
29. Hosseini, H., M. Chehrazi, D. Nabati Ahmadi and M. Mahmoodi Sorestani. 2015. Induction of autotetraploidy in Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* cv. Rosea) by colchicine treatment in order to induce diversity of morph-physiological and phenology traits. journal of Plant Process and Function, 3(9): 1-10.
30. Jani pour, L., L. Fahmideh and B. Fazeli-Nasab. 2018. Genetic assessment of some populations of the medicinal plant Caraway (*Carum carvi*) using RAPD and ISSR markers. Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research 12(48): 78-91.
31. Janipour, L., L. Fahmideh and B. Fazeli-Nasab. 2018. Genetic evaluation of different population of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) using DNA molecular markers. Journal of Cellular and Molecular Researches 31(1): 16-32.
32. Khalili, H. and F. Baghbani-arani. 2017. Green Synthesized of Silver Nanoparticles Using *Artemisia tschernieviana* Extract and Evaluation of Cytotoxicity Effects on Human Colon Cancer (HT29) and Normal (HEK293) Cell Lines. Journal of Ilam University of Medical Sciences, 25(2): 91-100.
33. Kondorosi, E., F. Roudier and E. Gendreau. 2000. Plant cell-size control: growing by ploidy? Current Opinion in Plant Biology, 3(6): 488-492.
34. Lacerda, L.P., G. Malaquias and A.P. Peron. 2014. Antiproliferative action of aqueous extracts of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. (Fabaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. An Acad Bras Cienc, 86(3): 1147-1150.
35. Lin, M., Q. Wu, S. Zheng and H. Tian. 2011. Tissue culture and polyploidy induction of *Morinda officinalis*. China journal of Chinese Materia Medica, 36(17): 2325-2328.
36. Malekzadeh Shafaroudi, S., A. Ghani, M. Habibi and A. Amiri. 2012. The Study of Autotetraploidy Induction in Basil (*Ocimum basilicum*) by Colchicines Treatment. Journal Of Horticulture Science, 25(4): 461-469.
37. Mansouri, H. and M. Bagheri. 2015. The Effect of Polyploidy Induction on Some Growth Parameters in *Cannabis sativa* L. Journal of Plant Process and Function 4(13): 113-120.
38. Meda, A., C.E. Lamien, M. Romito, J. Millogo and O.G. Nacoulma. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food chemistry, 91(3): 571-577.
39. Milo, J., A. Levy, D. Palevitch and G. Ladizinsky. 1987. Thebaine content and yield in induced tetraploid and triploid plants of Papaver bracteatum Lindl. Euphytica, 36(2): 361-367.
40. Nadernejad, N., A. Ahmadimoghadam, J. Hossyinifard and S. Poorseyedi. 2013. Study of the rootstock and cultivar effect in PAL activity, production of phenolic and flavonoid compounds on flower, leaf and fruit in Pistachio (*Pistacia vera* L.). Iranian Journal of Plant Biology, 5(15): 95-109.
41. Naghavi, M.R., M. Mardi, H.A. Ramshini and B. Fazeli-Nasab. 2004. Comparative analyses of the genetic diversity among bread wheat genotypes based on RAPD and SSR markers. Iran. Journal of Biotechnol, 2(3): 195-202.
42. Noori, S.A.S., M. Norouzi, G. Karimzadeh, K. Shirkool and M. Niazian. 2017. Effect of colchicine-induced polyploidy on morphological characteristics and essential oil composition of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). Plant cell, tissue and Organ Culture, 130(3): 543-551.
43. Normohammadi, S., N. Ghaderi and T. Javadi. 2018. Morpho-physiological Responses of Strawberry (Fragaria× ananassa) to Exogenous Salicylic Acid Application under Drought Stress. Journal of Agricultural Science and Technology, 17: 167-178.
44. Omidbaigi, R., S. Yavari, M.E. Hassani and S. Yavari. 2010. Induction of autotetraploidy in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatment. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18(1): 23-35.
45. Omran, A. and B. Mohammad. 2008. Polyploidization effect in two diploid cotton (*Gossypium herbaceum* L. and G. *arboreum* L.) species by colchicine treatments. African Journal of Biotechnology, 7(2): 102-108.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.52547/jcb.13.38.35]

46. Panahi, Y., G.H. Alishiri, S. Parvin and A. Sahebkar. 2016. Mitigation of systemic oxidative stress by curcuminoids in osteoarthritis: results of a randomized controlled trial. Journal of Dietary Supplements, 13(2): 209-220.
47. Piromya, R. and P. Kermanee. 2013. Occurrence of tetraploidy in colchicine-treated physic nut (*Jatropha curcas* Linn.). Kasetsart Journal (Nat. Sci.), 47: 23-29.
48. Randall, D.D., C.J. Nelson and K.H. Asay. 1977. Ribulose bisphosphate carboxylase: altered genetic expression in tall fescue. Plant Physiology, 59(1): 38-41.
49. Rauf, S., I.A. Khan and F.A. KHAN. 2006. Colchicine-Induced Tetraploidy and Changes in Allele Frequencies in Colchicine-Treated Populations of Diploids Assessed with RAPD Markers in *Gossypium arboreum* L. Turkish Journal of Biology, 30(2): 93-100.
50. Rubuluza, T., R. Nikolova, M. Smith and K. Hannweg. 2007. *In vitro* induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicine. South African Journal of Botany, 73(2): 259-261.
51. Sarathum, S., M. Hegele, S. Tantiviwat and M. Nanakorn. 2010. Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. European Journal of Horticultural Science, 75(3): 123-127.
52. Sari, N., K. Abak and M. Pitrat. 1999. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai. Scientia Horticulturae, 82(3-4): 265-277.
53. Sotude Ardabili, G., R. Asgari Zakaria and N. Zare. 2014. Polyploidy induction and its effects on some morpho-physiologic characteristics in sorghum (*Sorghum bicolor* cv. KFS2). Iranian Journal of Crop Sciences, 16(2): 151-164.
54. Švehlíková, V. and M. Repčák. 2000. Variation of apigenin quantity in diploid and tetraploid *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. Plant Biology, 2(4): 403-407.
55. 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 and Organ Culture, 72(1): 19-25.
56. Yan, P., Y.Y. Xu, X.W. Zhu, L. Zhe, Y.Q. Gong, X. Liang, M.Y. Gong and L.W. Liu. 2014. Molecular characterization and expression profiles of myrosinase gene (RsMyr2) in radish (*Raphanus sativus* L.). Journal of Integrative Agriculture, 13(9): 1877-1888.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.52547/jcb.13.38.35]

Effect of Colchicine on Polyploidy Induction and Morphophysiological Characteristics of Ajowan (*Carum copticum* L.) Population of Sistan Geographical Area

Raheleh Akbari[1], Leila Fahmideh[2] and Bahman Fazeli Nasab[3]

1- M.Sc. Student of Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran (Corresponding author: l.fahmideh@gau.ac.ir)

3- Faculty Member, Department of Agriculture and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, Zabol University, Zabol, Iran

Received: July 27, 2020 Accepted: February 2, 2021

Abstract

Ajowan (*Carum copticum* L.) is a plant in the umbellifer family *Apiaceae*. It's essential containing thymol, parasiman, and alpha-pinene, carvacrol, which has antimicrobial and fungicidal properties. Polyploidy induction, one of the herbal remediation methods, is used to increase the production of secondary metabolites by using mutagenic chemicals. To investigate the effects of polyploidy induction on the population of Sistan Ajowan an experiment was conducted in a completely randomized design with a randomized design using the colchicine factor (0.2, 0.5, 0.75 and 1 g/l) and period Treatment (6, 12 and 18 h). To obtain the best concentration and time duration of colchicine treatment, the tetraploid plants were cultivated with control plants. Some morphological, physiological, and biochemical were studied. Analysis of variance showed that tetraploid induction was significant for plant height, stem diameter, flower number, lateral branch number, root diameter, fresh weight, chlorophyll a and b, carotenoid, peroxidase, catalase, total protein, and flavonoid. The results of this study showed that the best treatment for ploidy induction was obtained at 0.5 g L -1 and duration of 6 h. The number of chromosomes in diploid plants was 2 and in tetraploid plants were 2, so it can be concluded that colchicine is capable of inducing polyploidy in mating plants. . Results showed that tetraploid (treated) plants were physiologically (chlorophyll a, anthocyanin, ascorbate peroxidase, catalase, phenol, and carotenoid) and morphological (lateral branch number, plant height, leaf number, leaf length and width, and fresh weight). And dry) were superior to control plants. This breeding method can also be used for mating plants.

Keywords: Antioxidant enzymes, Tetraploid, Photosynthetic pigments, Phenolic and flavonoid contents

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.52547/jcb.13.38.35]