



"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 زنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیل، اردبیل، ایران

۲- گروه تولید و زنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیل، اردبیل، ایران؛ (نویسنده مسؤول: r-asghari@uma.ac.ir)

۳- دانشکده کشاورزی مشگین شهر، دانشگاه محقق اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۱۰

صفحه: ۷۹ تا ۶۹

چکیده

در این مطالعه، به منظور تعیین مناسب‌ترین روش القای پلی‌پلوئیدی در گیاه خشخاش برگ‌ریزان آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و سه فاکتور شامل سطوح مختلف کلشیسین (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۵ درصد)، مدت زمان تیمار (۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۴۸ ساعت) و نوع ریزنمونه (بندر، گیاهچه و جوانه انتهایی ساقه)، در سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۷ در دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. در کنار ارزیابی‌های مورفوفیزیولوژیکی و روزنده‌ای، روش فلوسایتومتری افزایش محتوای ماده زنتیکی 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، به دلیل دارای بودن بیشترین درصد زنده‌مانی (۴۴/۴٪) و القای تراپلوبوئیدی (۱۸/۹٪) بهترین روش تولید گیاهان تراپلوبوئید در خشخاش برگ‌ریزان است. با بررسی اثرات اتوپلی‌پلوئیدی بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیک مشخص شد که میانگین فواصل میانگره، ارتفاع بوته و تراکم سلول‌های روزنده در گیاهان تراپلوبوئید کاهاش و اندازه و ضخامت برگ، اندازه کپسول، تعداد برگ، وزن خشک کل بوته، اندازه سلول‌های روزنده‌ای، 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 تراپلوبوئید مشاهده نشد. علاوه‌بر این، افزایش محتوای مورفین و کاهاش محتوای کدینین در گیاهان تراپلوبوئید حاصل مشاهده شد. در مجموع با توجه به اینکه کلشیسین نقش مؤثری در القای تراپلوبوئید گیاه خشخاش برگ‌ریزان و تغییر در خصوصیات مورفوفیزیکی و فرآیندهای متابولیکی آن دارد می‌توان از این نتایج در برخورد می‌تواند به توانایی این گیاه دارویی استفاده کرد.

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

مقدمه

ضاعف‌شدن ماده زنتیکی توسط عوامل بازدارنده می‌توزی مختلفی ایجاد می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها کلشیسین، اوپرزالین و تریفلورالین هستند (۱۳). کلشیسین یک ماده جهش‌زا است که از گیاهان خانواده *Colchicaceae* و بهویژه گیاه گل حسرت *Colchicum autumnale* است (۱۴) و از دهه ۱۹۳۰ به صورت گسترده برای القای پلی‌پلوئیدی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵). این ماده از طریق اتصال به توبولین‌ها مانع جاذشدن تارهای میکروتوبولی در طی تقسیم می‌توز شده و باعث ایجاد سلول‌هایی با تعداد کروموزوم‌های دو برابر می‌شود (۱۶). گزارش‌های بسیاری مبنی بر القای موفق پلی‌پلوئیدی با استفاده از کلشیسین در گیاهان مختلف ارائه شده است (۱۷، ۱۸). با وجود این، در خصوص القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان خانواده خشخاش اطلاعات کمی در دسترس است و این مطالعات محدود به *Papaver bracteatum* و *Papaver somniferum* می‌باشد (۱۹، ۲۰).

گیاهان تیره *Papaveraceae* با حدود ۲۶-۴۲ جنس و ۶۹۰-۸۰۰ گونه از قدیمی‌ترین گروه گیاهان دارویی محسوب می‌شوند (۲۱). *Papaver* بزرگترین جنس زیرتیره‌ی *Papaveroideae* بوده و بر اساس آخرین طبقه‌بندی در ۱۱ بخش تقسیم‌بندی می‌شود. یکی از این بخش‌ها است که در ایران هم وجود داشته و شامل *Meconidium* ۱۴ گونه و ۱۰ واریته از جمله *P. fugax* Poir. یا خشخاش

خشخاش برگ‌ریزان پلی‌پلوئیدی به وجود 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 (۲۲). این فرآیند اثرات زیادی در تکامل گونه‌های گیاهی داشته و به دلیل ایجاد سازگاری‌های مورفوفیزیکی و فیزیولوژیکی (۲۳) توسط اصلاح‌گران در بهبود صفات اقتصادی مهم مورد استفاده قرار گرفته است (۲۴). در واقع گیاهان پلی‌پلوئید به لحاظ افزایش اندازه سلول‌ها، تشدید بیان ژن، ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی و افزایش مقاومت به تنش‌های محیطی عملکرد بهتری نسبت به انواع دیپلوبوئید خود نشان می‌دهند (۲۵). علاوه‌بر مزایای ذکر شده، مواد ضدمتیوزی 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 دهنند (۲۶). اثرات منفی پلی‌پلوئیدی ممکن است باعث ایجاد ناباروری، شکنندگی گیاه، کوتاه قدری و ناهنجاری گردد (۲۷، ۲۸). در طبیعت نیز دو برآورشدن محتوای ژنومی عامل اصلی تکامل بوده و بر اندازه ژنوم و تعداد نسخه‌های ژنی تأثیر می‌گذارد (۲۹).

MS فاقد هورمون انجام شده و سپس انتقال آنها به گلدان‌های کوچک و نهایتاً محیط گلخانه با دمای ۱۸-۲۵ درجه سانتیگراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی صورت گرفت. در آزمایش دوم، بذور در بین دو کاغذ صافی مطروب 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 پنج روزه و روش گلوله‌ی پنبه آغشته به کلشیسین استفاده گردید. در این راستا، جهت جلوگیری از تبخر کلشیسین از نایلون پلی‌اتیلنی استفاده شد. در تیمار ۱۲ ساعت عمل آغشته‌سازی با کلشیسین ۱ بار و در تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۲ و ۴ بار انجام شد. در نهایت پس از شستشو، کشت ریزنمونه‌ها در گلدان انجام شد.

ارزیابی سطح پلوبئیدی

سطح پلوبئیدی نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از دستگاه فلوسایتمتر مدل PA ساخت شرکت Partec کشور آلمان تعیین گردید. از گیاه جعفری به عنوان 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 میکرومیتر از بافر استخراج هسته (محلول A کیت دستگاه، Partec) تهیه شد. در مرحله بعدی عمل فیلتراسیون به منظور حذف تجمع سلولی و قطعات درشت انجام شده و حدود ۱۶۰۰ میکرولیتر محلول رنگ آمیزی هسته حاوی ۴ و ۶-دی‌آمیدینو-۲ فنیل ایندول (DAPI، محلول B 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 الکترونیکی تبدیل شده و به صورت هیستوگرام ایجاد نمودند.

بررسی پارامترهای رشدی گیاهان دیبلوئید و پلی‌پلوبئید
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 به طور 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

به منظور انجام مطالعات روزنایی، برگ‌های جوان گیاهان دیبلوئید و تترابلوبئید انتخاب و لایه اپیدرمی روی سطح برگ و پشت آن با قشری نازک از لاک پیرنگ 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 روزنے در واحد میلیمتر مربع از سطح برگ توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $10\times$ مورد بررسی قرار گرفت.

برگ ریزان است (۱۸). این گونه گیاهی علفی، دو ساله و دیبلوئید با عدد پایه کروموزومی ۷ است (۱۹). گیاهان جنس *Papaver* به جهت دارابودن آلکالوئیدهای گروه بنزیل ایزوکوئینولین^۱ پتانسیل بالایی جهت استفاده در صنعت داروسازی دارند (۳۸). آلکالوئیدهای مورفینان محصولات جانبی نورلادانوزولین^۲ هستند که طی فرآیند متیله‌شدن به رتیکولین^۳ و در نهایت سالوتاریدین^۴ تبدیل می‌شود. سالوتاریدین با از دستدادن یک گروه استات به تبائین تبدیل شده (۵) و باعث سنتر نئوپینون^۵ و اورپیاوین^۶ در دو مسیر جداگانه می‌گردد. نئوپینون به کدئینون و نهایتاً به کدئین و اورپیاوین به مورفینون^۷ و نهایتاً به مورفین تبدیل می‌شود (۲۱). از جمله آلکالوئیدهای مهم خشخاش برگ‌ریزان می‌توان به تبائین و کدئین اشاره کرد (۷). 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 پلوبئیدی در گیاهان از طریق تأثیر بر فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و اثرگذاری بر مسیر فتوستراتی باعث تشديد 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 پلی‌پلوبئیدی در برنامه‌های اصلاحی بسیاری از گیاهان دارویی از قبیل، *Atropa spp*, *Hyoscyamus niger*, *Camelia spp*, *Solanum nigrum* و *belladonna* است (۲۵). در این راستا، این پژوهش با هدف معرفی بهترین روش القای پلی‌پلوبئیدی در گیاه خشخاش برگ‌ریزان و شناسایی صفات برتر در تترابلوبئیدها برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

به‌منظور بررسی القاء پلی‌پلوبئیدی در گیاه خشخاش برگ‌ریزان بذور دیبلوئید ($2n=2x=14$) از محل رویشگاه طبیعی آن در استان اردبیل واقع در عرض جغرافیایی "۴۰° ۳۸' شمالی و ۴۸° ۳۶' شرقی" آزمایش در طی سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۷، 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، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۸ درصد) در سه زمان متفاوت (۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) تیمار شدند.

القای پلی‌پلوبئیدی از طریق تیمار با کلشیسین

در آزمایش اول، ابتدا بذور در داخل پتری‌های حاوی غلظت‌های مختلف کلشیسین غوطه‌ور شده و روی شیکر با دور بر دققه 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

1- Benzylisoquinoline
5- Neopinon

2- Norlaudanosoline
6- Oripavine

3- Reticulin
7- Codeinone

4- Salutaridine
8- Morphinone

کاغذ مخصوص صاف شده و به منظور 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 به وسیله قیف جاداکننده از هم جدا گردید. فاز پایینی یا فاز کلروفرمی از محلول حاصل جدا شده و pH فاز آبی با آمونیاک قیایی شده و مجددآ عصاره‌گیری توسط کلروفرم انجام شد. در نهایت برای آبگیری محلول کلروفرمی جمع‌آوری شده، سدیم سولفات آنیدرید به آن اضافه شد و پس از صاف شدن، حلال آن توسط دستگاه روتاری خارج و مواد باقیمانده توسط متانول ویژه HPLC انجام آوری شد. برای اندازه‌گیری کمی آلکالوئیدها، استانداردهای مورفين 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 همسنگی استاندارد مورفين و کدئین ایجاد شده و نمودارهای کالیبراسیون خطی به دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً مصادفی با سه تکرار و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن با استفاده از نرم‌افزار SAS Version 9.1 (انجام گرفت و نتایج تجزیه و تفاوت‌های آماری صفات مورد ارزیابی در گیاهان دیبلوئید و تترابلوئید 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 تترابلوئیدی

نتایج تجزیه واریانس مشخص نمود برهمکنش سه جانبه غلظت کلشی‌سین \times مدت زمان تیمار \times نوع ریزنمونه در مورد صفات درصد زنده‌مانی و تترابلوئیدی غیرمعنی دار است. اگرچه، این صفات تحت تأثیر اثرات اصلی غلظت کلشی‌سین، مدت زمان تیمار و نوع ریزنمونه و برهمکنش غلظت کلشی‌سین \times مدت زمان تیمار و غلظت کلشی‌سین \times نوع ریزنمونه قرار گرفتند (جدول ۱). در بررسی این برهمکنش‌ها مشخص گردید با افزایش غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار درصد زنده‌مانی بهشت کاهش می‌یابد. به طوری که، در غلظت کلشی‌سین ۵/۰ درصد و مدت زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت به صفر می‌رسد. بالاترین درصدهای زنده‌مانی (۱۱/۱) و (۶۶/۴۶ درصد) پس از تیمارهای شاهد (غلظت صفر) نیز بهترتب در غلظت‌های کلشی‌سین ۰/۰۵ و ۰/۰۱ درصد و مدت زمان ۱۲ ساعت بدست آمد (شکل ۱، a). از طرف دیگر، ریزنمونه‌های مریستم انتهایی ساقه در غلظت‌های کلشی‌سین ۰/۰۵ و ۰/۰۱ 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 ضدمتوزی، مدت زمان تیمار، نوع ریزنمونه، روش تیمار و روش‌های باززایی بستگی دارد (۱۳، ۳۷). کلشی‌سین به عنوان یکی از قدیمی‌ترین مواد

بررسی فعالیت رنگدانه‌های فتوستنتزی، 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 به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ سانتی‌فیبوژ گردید. به محلول رویی در طول موج ۶۶۳ و ۶۴۶ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت گردید. در نهایت، مقادیر رنگدانه‌های فتوستنتزی به صورت میلی‌گرم بر گرم وزن تر بیان شد (۲۶).

استخراج پروتئین با استفاده از روش گائی و همکاران (۲۰) انجام شده و کمیت آن مطابق روش برادفورد (۸) تعیین گردید. پروتئین الیومین گاوی (BSA) برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. مقادیر پروتئین در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری و در نهایت به صورت 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 (۳۶) در طول موج ۶۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین و در نهایت به صورت میلی‌گرم بر گرم وزن تر بیان شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

مقایسه میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فلن اکسیداز در گیاهان دیبلوئید و تترابلوئید 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 سانتی‌گراد) سانتی‌فیبوژ 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) (۲۳) و پلی‌فلن اکسیداز (PPO; EC 1.10.3.1) (۲۳) به ترتیب در طول موج‌های ۴۲۰ و ۴۲۵ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت میزان فعالیت آنزیم‌ها بر حسب 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 \times 4.6mm, ۵ μ m) دتکتور UV و طول موج ۲۵۴ نانومتر استفاده شد. Flow rate به کار برده شده 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 اندامه‌های هوایی گیاهان به طور 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 به وسیله

گردیده (۳۲) و به صورت گستره جهت تعیین سطح پلوئیدی و اندازه ژنوم مورد استفاده قرار گیرد (۴۷). در این مطالعه بیشترین درصد گیاهان تترابلوبیت ۱۸/۹ در غلظت ۱/۰ درصد کلشیسین در مدت زمان ۴۸ ساعت و پس از آن در غلظت ۲/۰ درصد کلشیسین با زمان تیمار ۱۲ ساعت و غلظت ۰/۰۵ درصد کلشیسین با زمان تیمار ۴۸ ساعت به دست آمد (شکل ۱، c). در این راسته، ریزنمونه‌های جوانه انتهایی ساقه در غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد کلشیسین بهترین عملکرد را در پاسخ به القای تترابلوبیت 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، به دلیل دارا بودن بیشترین درصد زنده‌مانی (۴۴/۴) و تترابلوبیت (۱۸/۹) آیده‌آل ترین روش القای تترابلوبیت 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.

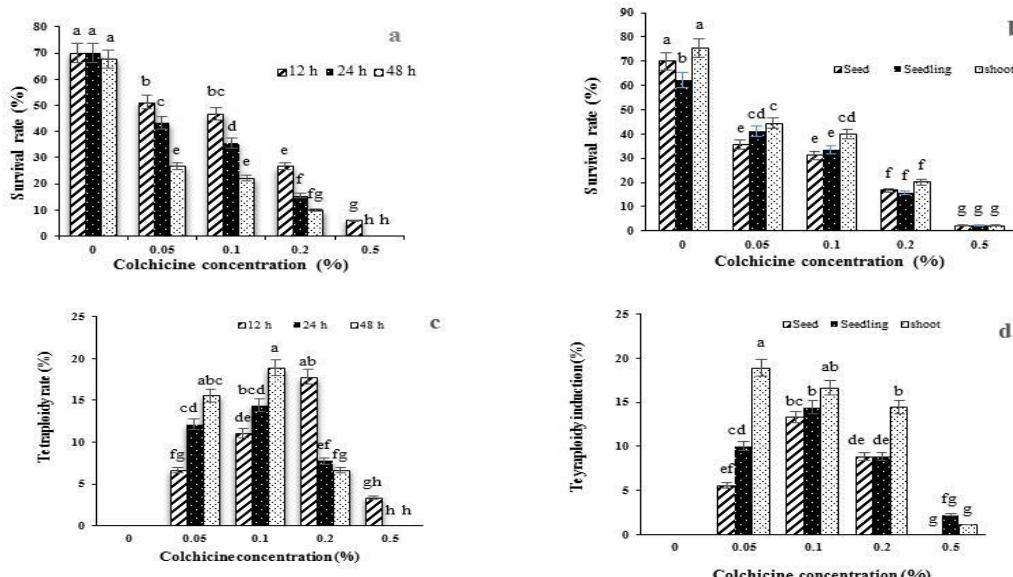
جهش‌زای شیمیایی در القای مصنوعی پلی‌پلوئیدی بوده (۱۳) و کاهش زنده‌مانی در غلظت‌های بالای آن (۴۳) به دلیل ایجاد اختلال در فرآیند تقسیم سلولی (۳۵)، از طریق نفوذ به سلول‌های رأسی یا اپیکال و ایجاد محدودیت‌های رشد سلولی است (۴۶).

در مطالعه حاضر علی‌رغم استفاده از روش‌های متفاوت تیمار تنها تعداد کمی از گیاهان تترابلوبیت بودند. هیستوگرام محتوای DNA هسته‌ای در آنالیز همزمان نمونه‌های سلولی گیاه جعفری (کنترل داخلی) و گیاهان دیپلوبیت و تترابلوبیت خشخاش در شکل ۲ نشان داده شده است. در این تصویر پیک اول مربوط به سلول‌های برگی گیاه شاهد با سطح کروموزومی دیپلوبیت و پیک دوم مربوط به سلول‌های برگی گیاه تیمارشده با سطح کروموزومی تترابلوبیت می‌باشد. مطالعات مورفوژیولوژیکی، آناتومیکی، کاربیولوژیکی و فلورسایتومتری از معمول ترین روش‌های بررسی امکان القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان محاسبه می‌شوند (۱۳). در تکنیک فلورسایتومتری میزان فلورسانس اندازه‌گیری شده با محتوای DNA هسته‌ای رنگ‌آمیزی شده 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

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 تترابلوبیت

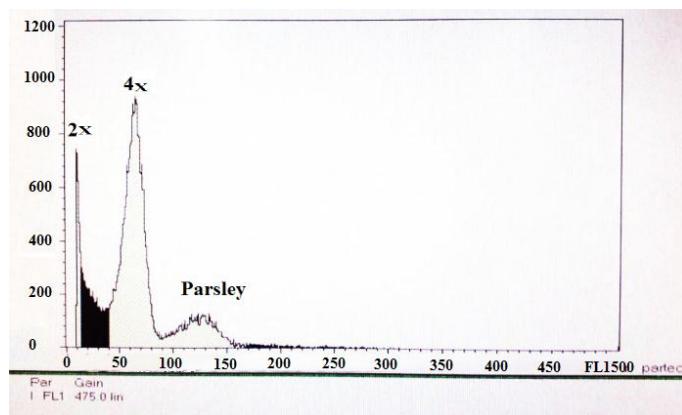
Table 1. Analysis of variance for the effect of seed, seedling and terminal bud treatment with different concentrations of colchicine at various exposure times on survival and tetraploidy induction percentage

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد زنده‌مانی	درصد تترابلوبیت	میانگین مریعت
غلظت کلشیسین	۴	۱۷۳۹/۷/۴۰**	۱۱۹۳/۷/۰**	
مدت زمان تیمار	۲	۲۴۹۴/۰/۷**	۲۰/۷۴ns	
ریزنمونه	۲	۴۴۵/۱۸**	۲۵۱/۷**	
غلظت کلشیسین×مدت زمان تیمار	۸	۲۶۳/۵۱**	۱۶۷/۰/۳**	
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	۱۳/۴۳ ns	
خطا	۹۰	۴۰/۰۱	۱۴/۸۱	
ضریب تغییرات	۱۹/۲۷	۱۹/۴۴		



شکل ۱- درصد زندمانی خشخاش برگ‌ریزان در برهمکنش غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار (a) و برهمکنش غلظت کلشی‌سین و نوع ریزنمونه (b). درصد القای تترابلوئیدی در خشخاش برگ‌ریزان در برهمکنش غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار (c) و برهمکنش غلظت کلشی‌سین و نوع ریزنمونه (d). خطوط مقدار انحراف استاندارد و حروف مختلف 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 \times treatment times (a) and interaction effects of colchicine concentrations \times explant type (b). Tetraploidy induction percentage under interaction effects of colchicine concentrations \times different treatment times (c) and interaction effects of colchicine concentrations \times 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 فلوسایوتومتری
Figure 2. Histogram of nuclear DNA content derived from flow cytometry analysis

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 فوتیبی 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

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 به دست آمده مشخص نمود گیاهان تترابلوئید خشخاش دارای طول، عرض و ضخامت برگ بیشتر، اندازه کپسول بزرگتر، تعداد برگ فراوان‌تر و وزن خشک بیشتر نسبت به انواع شاهد

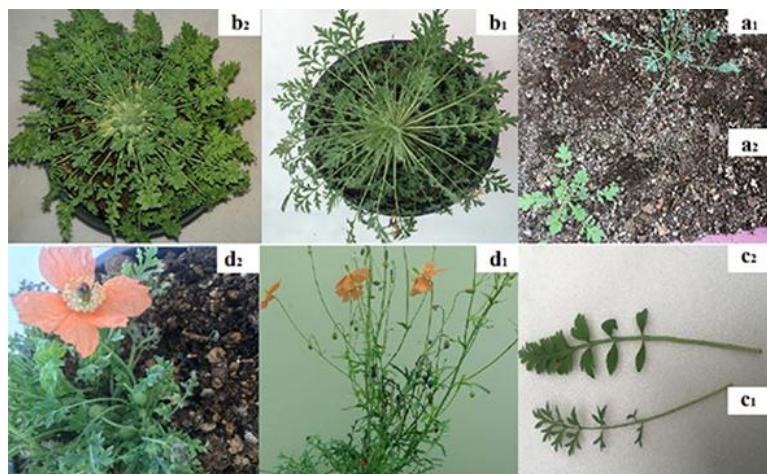
هستند. این نتایج در سایر گیاهان پلیپلوئید نیز تأیید شده است (۳۲، ۳۳، ۳۱). مطالعه محتوای رنگدانه‌های فتوستتری گیاهان شاهد و تترابلوبloid افزایش معنی‌داری را در مقادیر کلروفیل *a* و *b* و کل در گیاهان تترابلوبloid نشان داد (جدول ۲). این پدیده می‌تواند باعث افزایش کارآیی فتوستتر شده و عملکرد مناسبتری را در گیاهان تترابلوبloid به وجود آورد (۴۱). افزایش محتوای کلروفیل در نتیجه القای پلیپلوئیدی در تحقیقات اسمارد 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 پلوبloidی در هر سلول به صورت خطی افزایش یابند (۳) و از طریق تأثیر بر فعالیت‌های متabolیکی، ستر rRNA و میزان نسخه‌برداری ژنی بر میزان تنفس، فعالیت ژن‌ها و آنزیم‌ها و فرآیند انتقال الکترون در جریان فتوستتر تأثیرگذاشته و به طور معمول باعث ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گردد (۳۷، ۳۸). تأثیر القای پلیپلوئیدی بر محتوای پروتئین کل، کربوهیدرات و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در سایر مطالعات نیز گزارش شده است (۴۳، ۴۵).

(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 تترابلوبloid تیمارشده با کلشیسین دارای ارتفاع کمتری نسبت به انواع دیپلوئید خود هستند. این پدیده می‌تواند به علت کاهش فواصل میانگره در گیاهان پلیپلوئید باشد. نتایج به دست آمده در این پژوهش در خصوص افزایش ابعاد برگ (۳۳)، افزایش وزن تر و خشک گیاه (۳۳) و افزایش ضخامت برگ (۳۵) با نتایج به دست آمده از سایر تحقیقات مطابقت دارد.

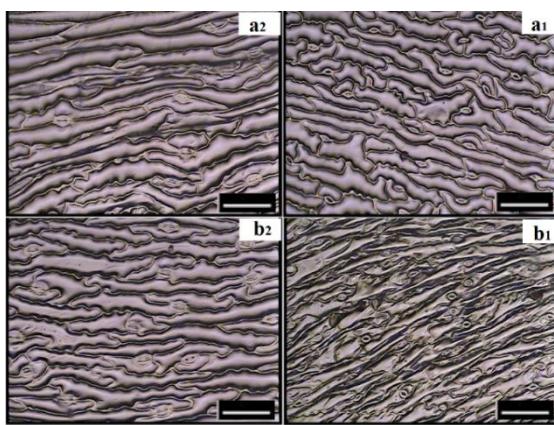
فعالیت رنگدانه‌های فتوستتری

بررسی صفات آناتومیکی برگ تأیید نمود اندازه و تعداد سلول‌های روزنه‌ای متأثر از تغییرات سطح پلوبloidی 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 تترابلوبloid از سطح روی برگ و سطح پشت برگ با بزرگنمایی $\times 10$ نمایش می‌دهد. همان‌طور که مشخص است گیاهان تترابلوبloid دارای تعداد روزنه کمتر با اندازه بزرگتر نسبت به انواع دیپلوئید خود



شکل ۳- مقایسه خصوصیات رشدی گیاهان دیپلوئید و تترابلوبloid خشخاش برگ‌ریزان. گیاهچه دیپلوئید (a₁) و تترابلوبloid (a₂) در مراحل اولیه رشد، گیاه دیپلوئید (b₁) و تترابلوبloid (b₂) در مرحله رشد رویشی، برگ گیاه دیپلوئید (c₁) و تترابلوبloid (c₂)، مرحله رشد زایشی در گیاه دیپلوئید (d₁) و تترابلوبloid (d₂)

Figure 3. Comparison of growth characteristics between diploid and tetraploid plants of bride rose poppy. Diploid (a₁) and tetraploid (a₂) seedlings in the early stages of growth, diploid (b₁) and tetraploid (b₂) plants in the vegetative growth stage, the leaf of diploid (c₁) and tetraploid (c₂) plant, reproductive stage in the diploid (d₁) and tetraploid (d₂) plant



شکل ۴- تغییرات تعداد و اندازه‌ی سلول‌های روزنه. روزنه‌های سطح رویی برگ در گیاه دیپلولوئید (a₁) و تترابلوئید (a₂), روزنه‌های سطح زیرین برگ در گیاه دیپلولوئید (b₁) و تترابلوئید (b₂)

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 مورفووفیزیولوژیکی گیاه خشخاش برگریزان در سه روش مختلف تیمار با کلشی سین (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.

بررسی وینگی‌های مورفووفیزیولوژیک مورد نظر	گیاهچه				بذر
	گیاهان دیپلولوئید ±SE (میانگین)	گیاهان تترابلوئید ±SE (میانگین)	گیاهان دیپلولوئید ±SE (میانگین)	گیاهان تترابلوئید ±SE (میانگین)	
تعداد روزنه روی برگ در mm ²	۸۶/۴ ± ۳/۶۹ ^b	۱۱۱/۸ ± ۴/۴ ^a	۸۳/۲ ± ۲/۶۷ ^b	۱۲۹/۰ ± ۴/۴ ^a	۹۱/۸ ± ۳/۳۹ ^b
تعداد روزنه پشت برگ در mm ²	۱۵۰/۰ ± ۳/۱۶ ^b	۲۰۸/۰ ± ۲/۵۷ ^a	۱۵۳/۰ ± ۳/۰۱ ^b	۲۱۲/۰ ± ۲/۰۳ ^a	۱۷۶/۰ ± ۴/۵۸ ^b
میانگین فاصل میانگره (cm)	۱/۱۶ ± ۰/۰۵ ^b	۱/۵ ± ۰/۰۴ ^a	۱/۸ ± ۰/۰۳ ^b	۱/۴۳ ± ۰/۰۵ ^a	۱/۳۰ ± ۰/۰۵ ^b
میزان کلروفیل a (mg/g)	۲/۶۸ ± ۰/۱ ^a	۱/۹۳ ± ۰/۰۹ ^b	۲/۵۸ ± ۰/۰۸ ^a	۲/۰۴ ± ۰/۰۷ ^b	۲/۵۴ ± ۰/۱۳ ^a
میزان کلروفیل b (mg/g)	۱/۵۸ ± ۰/۰۹ ^a	۰/۹۹ ± ۰/۰۵ ^b	۱/۶۹ ± ۰/۰۷ ^a	۰/۹۸ ± ۰/۰۵ ^b	۱/۴۵ ± ۰/۱۱ ^a
میزان کل کلروفیل (mg/g)	۴/۲۷ ± ۰/۱۸ ^a	۲/۹۲ ± ۰/۱۱ ^b	۴/۲۸ ± ۰/۰۳ ^a	۳/۰۲ ± ۰/۰۴ ^b	۴/۰۰ ± ۰/۲۲ ^a
میانگین ضخامت برگ (mm)	۰/۱۹ ± ۰/۰۵ ^a	۰/۱۲ ± ۰/۰۱ ^b	۰/۲۰ ± ۰/۰۱ ^a	۰/۱۴ ± ۰/۰۱ ^b	۰/۱۹ ± ۰/۰۷ ^a
طول برگ (cm)	۱۸/۰ ± ۰/۴۹ ^a	۱۲/۷ ± ۰/۵۷ ^b	۱۵/۰ ± ۰/۳۴ ^a	۸/۷۰ ± ۰/۲۹ ^b	۱۳/۲۶ ± ۰/۲۸ ^a
عرض برگ (cm)	۳/۹۲ ± ۰/۱ ^a	۲/۲۸ ± ۰/۰۸ ^b	۳/۶۸ ± ۰/۱۰ ^a	۲/۲۲ ± ۰/۱۱ ^b	۳/۳۰ ± ۰/۱۷ ^a
تعداد برگ	۱۴/۱۰ ± ۲/۵۹ ^a	۱۱۵ ± ۳/۵ ^b	۱۳۹/۰ ± ۶/۲۸ ^a	۹۸/۸ ± ۳/۹۱ ^b	۱۷۷/۸۰ ± ۵/۲۳ ^a
وزن خشک گیاه (g)	۲۹/۴ ± ۰/۷۹ ^a	۲۲/۱ ± ۱/۲۳ ^b	۳۲/۱۴ ± ۰/۵۸ ^a	۲۶/۶ ± ۱/۹۸ ^b	۳۵/۸۵ ± ۱/۱۵ ^a
ارتفاع گیاه (cm)	۱۱/۰۶ ± ۰/۳۷ ^b	۱۲/۹۶ ± ۰/۷۶ ^a	۱۱/۷۲ ± ۰/۵۹ ^b	۱۴/۵۶ ± ۰/۴۱ ^a	۱۴/۱۷ ± ۰/۵۴ ^b
پروتئین کل (mg/g)	۱۳۰/۷۹ ± ۵/۱۳ ^a	۷۸/۵۹ ± ۳/۰۹ ^b	۱۲۰/۱۰ ± ۰/۳ ^a	۸۰/۱ ± ۰/۰۱ ^b	۱۱۴/۲۱ ± ۰/۰۳ ^a
کربوهیدرات (mg/g)	۱/۱۲ ± ۰/۰۵ ^a	۰/۴۹ ± ۰/۰۳۷ ^b	۰/۹۷ ± ۰/۰۴ ^a	۰/۵۱ ± ۰/۰۲ ^b	۱/۰۱ ± ۰/۰۷ ^a
کاتالاز (OD/g.FW-min)	۱/۲۹ ± ۰/۱۲ ^a	۰/۸۱ ± ۰/۱۲ ^b	۱/۱۱ ± ۰/۰۶ ^a	۰/۷۳ ± ۰/۰۵ ^b	۱/۲۵ ± ۰/۰۵۲ ^a
پلی فنل اکسیداز (OD/g.FW-min)	۳/۱۲۹ ± ۰/۲۸ ^a	۳/۰۵ ± ۰/۴۳ ^a	۳/۲۱ ± ۰/۲۳ ^a	۳/۴۱ ± ۰/۱۹ ^a	۳/۴۵ ± ۰/۱ ^a
پراکسیداز (OD/g.FW-min)	۴/۵۶ ± ۰/۴۳ ^a	۳/۴۴ ± ۰/۲۸ ^b	۴/۴۸ ± ۰/۳ ^a	۳/۰۸ ± ۰/۱۸ ^b	۴/۴۳ ± ۰/۲۶ ^a

در هر دیف حروف مقنوات نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال یک درصد از طریق آزمون است.

فعال سازی مسیر بیان یک ژن کلیدی یا ایجاد محدودیت در سنتر آن، سبب تغییر در محتوای پروتئین کل، کربوهیدرات و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان شده و منجر به افزایش یا کاهش محتوایشان گردد. افزایش محتوای فلاونوئید، فنل و آنتی اکسیدان‌های کل در گیاهان تترابلوئید خشخاش نسبت به انواع دیپلولوئید توسط سایر محققین گزارش شده است (۲۷).

تأثیر پلی پلوئیدی بر محتوای آلکالوئیدهای گیاهی بررسی محتوای آلکالوئیدهای گیاهی از طریق روش کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا مشخص نمود مقادیر مورفین در گیاهان تترابلوئید افزایش و مقادیر کمین کاهش یافته است (شکل ۵، جدول ۲). با توجه به جایگاه پلی پلوئیدی

تأثیر پلی پلوئیدی بر محتوای پروتئین کل، کربوهیدرات و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مقایسه میانگین داده‌ها اختلاف معنی داری را در محتوای پروتئین کل، کربوهیدرات و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز بین گیاهان دیپلولوئید و تترابلوئید نشان داد. به طوری که افزایش سطح پلی پلوئیدی رابطه‌ی مستقیم با محتوای پروتئین کل، کربوهیدرات و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز داشته و سبب تشید تولید آن‌ها می‌گردد. این در حالی است که فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز تحت تأثیر تغییرات سطح پلی پلوئیدی قرار نگرفت (جدول ۲). تغییرات سطح پلی پلوئیدی ممکن است از طریق تأثیر در بیان ژن‌ها و

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 تترابلولوئیدی بهترین روش تیمار در خشخاش برگ‌ریزان در این پژوهش می‌باشد. در مطالعه سایر صفات نیز مشخص شد گیاهان تترابلولوئید القاء شده 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 دیبلولوئید خود هستند. این در حالی است که فواصل میانگره، ارتفاع بوته، تراکم سلول‌های روزنه و محتوای کدئین در این گیاهان کمتر بود. گیاهان پلیپلوئیدی القاء شده از طریق این تکنیک بهدلیل امکان تولید ژنتیکی جدید با کیفیت متمایز، افزایش جثه گیاهی و نهایتاً تشدید تولید محتوای مورفین می‌توانند بسته به اهداف اصلاحی، مورد توجه قرار گیرند.

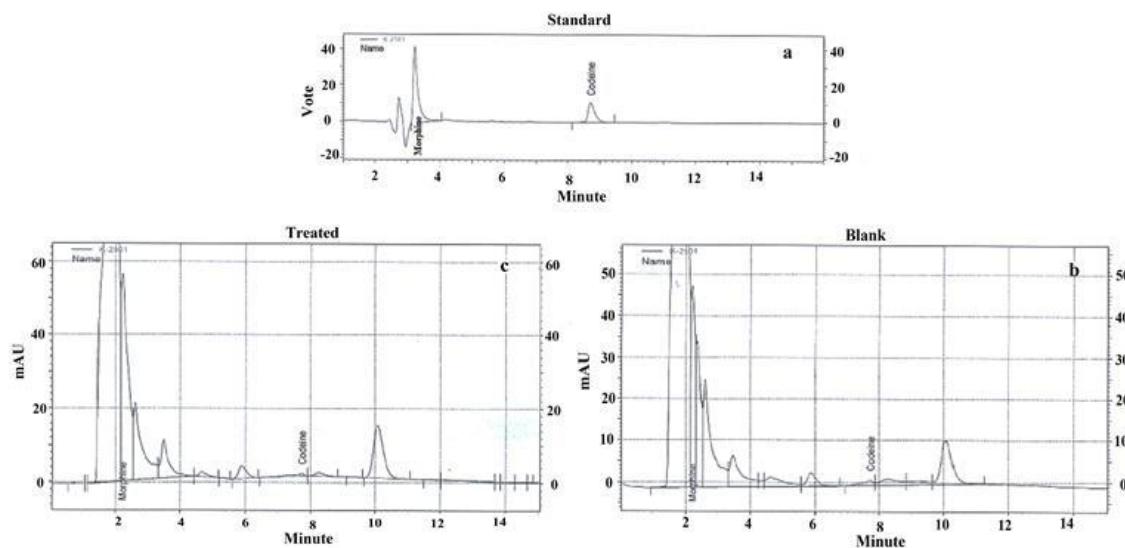
در رشد و توسعه گیاهان از طریق افزایش اندازه گل، برگ، میوه و بذر (۲۰) و در مواردی که اندام‌های رویشی گیاه منع مواد مؤثره هستند و باروری گیاهان پلیپلوئید اهمیت کمتری دارد (۱)، افزایش سطح کروموزومی می‌تواند به عنوان روشی ارزشمند و سریع جهت افزایش تولید ترکیبات دارویی، مورد توجه قرار گیرد. پلیپلوئیدی مصنوعی میزان زیست‌توده یا ترکیبات شیمیایی را در گیاهان دارویی افزایش می‌دهد (۴۶، ۱۸) که این فرآیند ممکن است ناشی از افزایش ژنوم پایه بیوسترنزکننده ترکیبات اصلی باشد (۳) و افزایش میزان آکالولوئیدها گیاهان پلیپلوئید را در نتیجه افزایش فعالیت‌های متابولیکی ناشی از دوبرابر شدن کروموزوم‌ها فراهم سازد. میشرا و همکاران (۲۹) گزارش کردند محتوای مورفین در گیاهان تترابلولوئید خشخاش افزایش و محتوای تباشی کاهش یافته است. اثر القای پلیپلوئیدی در افزایش متابولیت‌های گیاهی در پلیپلوئیدهای سایر گونه‌های گیاهی مانند درمنه (۱)، بنگدانه (۳۴) و شابیزک و تاج‌حریزی (۲۵) نیز مشاهده شده است.

جدول ۳- مقدار مورفین و کدئین در گیاهان دیبلولوئید و تترابلولوئید خشخاش برگ‌ریزان

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

صفت	گیاهان پلیپلوئید (mg/g) ± SE میانگین	گیاهان دیبلولوئید (mg/g) ± SE میانگین
مورفین (mg/g)	۹۴/۹۱ ± ۱/۷۷ ^a	۴۸/۵۳ ± ۱/۳۸ ^b
کدئین (mg/g)	۵/۷۸ ± ۰/۲۴ ^b	۹/۷۱ ± ۰/۱۳ ^a

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

منابع

- 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.
- Adams, K.L. and J.F. Wendel. 2005. Novel patterns of gene expression in polyploidy plants. *Trends in Genetics*, 10: 539-543.
- 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.
- 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.
- Balazova, A. and M. Psenak. 1998. Biosynthesis of morphinans: enzymological and molecular-biological aspects. *Chemicke Listy*, 92: 1006-1015.
- Bennett, M.D. 2004. Perspectives on polyploidy in plants - ancient and neo. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82: 411-423.
- 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).
- 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.
- Chance, B. and A.C. Maehly. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 773-775 pp.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Fairbairn, J.W. and F. Hakim. 1973. *Papaver bracteatum* Lindl. A new plant source of opiates. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 25: 353-358.
- 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.
- Fedde, F. 1909. *Papaveraceae- Hypecoideae et Papaveraceae- Papaveroideae*. In: Engler, Das Pflanzenreich. 4: 1-430.
- Gaffari, S.M. 2008. Chromosome reports for some plant species from Iran. *Journal of Botany*, 14: 39-46.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kar, M. and D. Mishra. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57: 315-319.
- Lavania, U.C. 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phytopharmaceuticals. *Plant Genetic Resources*, 3: 170-177.
- Levin, D.A. 2002. The role of chromosomal change in plant evolution. New York: Oxford University Press, 230 pp.
- 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.
- 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).

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 Republic 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. Hrubík, 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.

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

Giti Sotoudeh Ardabili¹, Rasool Asghari Zakaria², Nasser Zare¹ and Leila Ghaffarzadeh Namazi³

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