

اثر تیمار کلشی سین و القای پلی پلوئیدی، بر اجزای عملکرد و برخی ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی

Lavandula stricta Delileحبیبه نوری داشلی‌برون^۱، سارا خراسانی‌نژاد^{۲*}، سید جواد موسوی‌زاده^۳ و محمدحسین میرجلیلی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

پست الکترونیک: skhorasaninejad@yahoo.com; skhorasaninejad@gau.ac.ir

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۴- دانشیار، گروه مهندسی کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۸

تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۹

چکیده

اسطوخودوس (*Lavandula stricta* Delile) یکی از گونه‌های بومی ایران می‌باشد که در مناطق جنوبی ایران رشد می‌کند. القاء پلی پلوئیدی با استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا مانند کلشی‌سین، به‌عنوان یکی از روش‌های اصلاح گیاهان دارویی است که قابلیت زیادی برای استفاده از این فرایندهای تکاملی طبیعی برای بهبود محصول هدفمند وجود دارد. برای بررسی امکان‌سنجی القای پلی پلوئیدی در گیاه دارویی اسطوخودوس افرشته، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار کلشی‌سین در پنج غلظت (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ درصد) به‌صورت ژل روی مریستم انتهایی گیاه و چهار زمان (۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت) با سه تکرار و ۲۰ واحد آزمایشی، در شرایط گلخانه‌ای اجرا شد. برای مشاهده تأثیر کلشی‌سین بر خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی در زمان گلدهی، طول اندام هوایی، تعداد برگ اصلی، تعداد برگ فرعی، تعداد میانگره ساقه اصلی، تعداد ساقه فرعی، طول سنبله، تعداد سنبله‌ها، تعداد گل در خوشه، وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه، طول ریشه، سطح برگ، طول میانگره، محتوای فنل کل، میزان فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان قند کل و کیفیت کلروفیل اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمارهای مورد بررسی روی تمامی صفات بجز تعداد برگ اصلی و تعداد میانگره ساقه اصلی و طول ریشه اختلاف معنی‌دار داشت. به‌طوری که نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد با افزایش غلظت و مدت زمان اعمال کلشی‌سین، ارتفاع، طول میانگره، تعداد گل و میزان قند کل کاهش و طول سنبله خوشه اصلی و محتوای فنل کل افزایش یافت. بررسی‌های فیلوسایتومتری نشان داد که میانگین اندازه ژنوم ۰/۷۳ پیکوگرم در گیاهان تحت تیمار کلشی‌سین با غلظت ۰/۴٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت بدست آمد، در حالی که میانگین اندازه ژنوم در تیمار شاهد ۰/۵۵ پیکوگرم بود. بقیه گیاهان تیمار شده در زمان و غلظت‌های متفاوت میانگین اندازه ژنوم ۰/۵۷ را نشان داد. به‌طور کلی از نتایج این آزمایش برآورد می‌شود که اسطوخودوس افرشته برای القای پلی پلوئیدی به کلشی‌سین پاسخ مثبت نشان داده‌است و چشم‌انداز روشنی در اصلاح این گیاه با افزایش سطح پلوئیدی آن به این روش وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: سطح برگ، فلاونوئید کل، فیلوسایتومتری، فنل کل، طول سنبله.

مقدمه

جنس *Lavandula* spp. یا اسطوخودوس دارای ۳۹ گونه است که موطن اصلی این گیاه اروپا، آسیا، آفریقا، آمریکا، استرالیا و زلاندنو بوده و در ایران برخی گونه‌های این جنس در منطقه وسیعی از نواحی شمالی ایران، تهران، منجیل رودبار و بسیاری نقاط دیگر یافت می‌شود (Golfakhrabadi et al., 2017). این جنس در ایران دو گونه چندساله چوبی به نام‌های اسطوخودوس افراشته (*L. stricta* Del.) و اسطوخودوس فلس‌دار (*L. sublepiduta* Rech.) دارد که بومی ایران هستند و در مناطق جنوبی ایران می‌رویند (Mozaffarian, 2004). اسطوخودوس افراشته با نام‌های "اسطوخودوس راست" (Sanginabadi et al., 2016)، "اسطوخودوس شاهی" (Eivazi et al., 2015)؛ (Mazloomi Abukhyl et al., 2017) و "اسطوخودوس لارستانی" (Mozaffarian, 2004) هم شناخته شده است. همچنین این گیاه دارای نام‌های علمی مترادف به صورت *Isinia laristanica* و *Lavandula coronopifolia* Poir می‌باشد (Jamzad et al., 2013). از نظر گیاه‌شناسی، دارای بوته‌ای با قاعده چوبی، به ارتفاع ۴۵ تا ۲۰۰ سانتی‌متر و ساقه در قسمت‌های پایینی منشعب، گیاه پوشیده از کرک‌های ساده کوتاه و کرک‌های زگیل مانند غده‌دار و برگ‌ها با بریدگی‌های عمیق می‌باشد (Jamzad et al., 2013). خواص درمانی جنس اسطوخودوس عمدتاً ناشی از فعالیت اسانس این گیاه است، کاربرد دارویی آن به عنوان ضدقارچی، ضدویروسی، آنتی‌اکسیدانی و فعالیت‌های آرام‌بخش و ضدافسردگی می‌باشد که می‌تواند جایگزینی برای قرص‌های ضدافسردگی باشد (Nikfarjam et al., 2009). در استان هرمزگان از برگ، گل و ساقه اسطوخودوس افراشته برای درمان درد مفاصل، دل‌پیچه و زکام استفاده می‌شود (Soltanipour, 2005). باتوجه به اهمیت و افزایش کاربرد جهانی گیاهان دارویی در زمینه‌های دارویی، غذایی و آرایشی بهداشتی از یکسو و محدودیت منابع تولید آنها از سوی دیگر، محققان راغب به استفاده از روش‌های اصلاحی

شده‌اند که علاوه بر افزایش عملکرد، کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه را نیز مطابق اهداف تغییر دهند. دستورزی سطح پلوئیدی، ابزار توانمندی در اصلاح ژنتیکی بسیاری از گیاهان است (Madon et al., 2005) که از گذشته به عنوان یک روش مهم در تکامل گونه‌های گیاهی در نظر گرفته شده است و نقش کلیدی در تنوع گونه‌های گیاهی دارد (Mishra et al., 2010). القای پلی‌پلوئیدی امکان دستیابی به ژنوتیپ‌های جدید را با صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی دارد (Shmeit et al., 2010). خواص پلی‌پلوئیدی اغلب صفات فنوتیپی جدید و ارزشمند را در مقایسه با اجداد دیپلوئید خود نشان می‌دهد، القای تتراپلوئیدی به عنوان یک روش برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی نیز استفاده می‌شود (Javadian et al., 2017). به طوری که در کتان سفید (*Linum album* Kotschy ex Boiss.) القای پلی‌پلوئیدی باعث افزایش ماده مؤثره پودوفیلوتوکسین در این گیاه گردید (Javadian et al., 2017). همچنین گزارش شده است برخی خصوصیات مورفولوژیک و میزان تیمول در اسانس در گیاه دارویی زنیان (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague) تتراپلوئید نسبت به نوع دیپلوئید برتر بوده است (Sadat Noori et al., 2017). امروزه القای پلی‌پلوئیدی با استفاده از کلشی‌سین مرسوم است، به طوری که در تحقیقی برای القای پلی‌پلوئیدی خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum* Lindl.) غلظت ۰/۲٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت بیشترین بازده را نشان داد. همچنین سبب افزایش ترکیب‌های فیتوشیمیایی مانند فنل کل، فلاونوئید کل و آنتی‌اکسیدان کل در گیاهان پلی‌پلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید گردید (Madani et al., 2019). در تحقیقی که روی لاله واژگون گرگانی (*Fritillaria raddeana* Regel) انجام شد، با وجود تغییراتی که در غلظت ۰/۰۱٪ در تعداد روزنه و سرعت رشد وجود داشت، تعداد کروموزوم‌ها تغییری نکرده و القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان تیمار شده مشاهده نشد (Salahi Sadr et al., 2018)، به طوری که حکایت از آن دارد که برای دو برابر کردن کروموزوم‌ها، مواد و

پلی‌پلوئیدی در گیاه اسطوخودوس افزایش یافته با ماده ضد میتوزی کلشی سین و چگونگی ایجاد تغییرات بر اجزای عملکرد و ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور القای پلی‌پلوئیدی در گیاه دارویی اسطوخودوس افراشته (*Lavandula stricta*) آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از تیمار کلشی سین در پنج غلظت (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ درصد) و چهار زمان اعمال (۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت) با سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای اجرا شد. این تحقیق در سال‌های ۹۷-۱۳۹۶ در گلخانه و آزمایشگاه‌های فیزیولوژی و کشت بافت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و آزمایشگاه سیتوژنتیک دانشگاه تربیت مدرس اجرا گردید.

تهیه مواد گیاهی و کاشت

بذرهای اسطوخودوس افراشته از پایه‌های مادری در رویشگاه‌های طبیعی از منطقه حفاظت شده گنو (بین ۲۷ درجه و ۱۸ دقیقه و ۲۷ درجه و ۲۹ دقیقه عرض شمالی و ۵۶ درجه و ۱۸ دقیقه و ۵۵ درجه و ۵۶ دقیقه طول شرقی، ارتفاع ۲۲۰ متر از سطح دریا) واقع در شهرستان بندرعباس، استان هرمزگان در جنوب کشور ایران جمع‌آوری گردید. پس از بوجاری، بذرها در بستر خاکی در گلدان‌های بزرگ (قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر) با مخلوط خاک، ورمی‌کمپوست و پرلیت (۱:۱:۴) در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

طرح آزمایشی و اعمال تیمارها

سه هفته بعد از جوانه‌زنی بذرها (اردیبهشت ماه ۱۳۹۶)، در مرحله چهار تا شش برگی، تیمار کلشی سین با غلظت‌های (۰/۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد (وزنی/حجمی) و زمان

روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که ممکن است در برخی گونه‌ها نه تنها پلی‌پلوئیدی القاء نشود، بلکه نتیجه‌ای برخلاف نتایج معمول نیز بدست آید (Salahi Sadr et al., 2018). کلشی سین، یک آمین‌آلکالوئید سه حلقه‌ای مشتق شده از پیازهای گل حسرت (*Colchicum autumnale* L.) است که مهم‌ترین عامل شیمیایی برای القای پلی‌پلوئیدی است و در سطح وسیعی بکار می‌رود. این ماده از تشکیل و پلیمرشدن میکروتوبول‌ها، از طریق پیوند با زیرواحد پروتئینی میکروتوبولی به نام توبولین ممانعت می‌کند، بنابراین کروموزوم‌ها در مرحله متافاز، یک‌جا وارد سلول می‌شوند که این امر آن را به یک القاء‌گر فعال پلی‌پلوئیدی تبدیل کرده است (Afshari et al., 2014). در تحقیق دیگری برای القای پلی‌پلوئیدی در سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) از طریق تیمار بذر، بیشترین درصد گیاهان تتراپلوئید در غلظت ۰/۰۵٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت مشاهده شده است که ویژگی‌های مورفولوژیک مانند ارتفاع بوته، فواصل میانگره و طول و عرض کپسول در آنها نسبت به گیاهان شاهد دیپلوئید بالاتر بود (Zishan et al., 2016).

در همین ارتباط در القای پلی‌پلوئیدی گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) بیشترین تغییرات در غلظت ۰/۰۵٪ و در مدت زمان ۱۲ ساعت گزارش گردید (Afshari et al., 2014). باتوجه به اینکه امروزه یکی از اهداف مهم متخصصان یافتن گونه‌های جدید گیاهی، توسعه استعداد های ژنتیکی و همچنین یافتن شیوه‌هایی برای افزایش مواد مؤثره گیاهان دارویی است (Sadat Noori et al., 2017) و با عنایت به پراکنش محدود، مصرف فراوان و صادرات سنتی اسطوخودوس افراشته به کشورهای حوزه خلیج فارس و دریای عمان و برداشت بی‌رویه از رویشگاه‌های طبیعی که موجب فرسایش ژنتیکی و از بین رفتن ذخائر ژنتیکی آن می‌شود (Sanginabadi et al., 2016)، لازم است اقداماتی برای برنامه‌ریزی دقیق در مورد این گونه انجام شود. در همین راستا، این پژوهش در جهت بررسی امکان‌سنجی القای

ویژگی‌های فیتوشیمیایی

برای ارزیابی ویژگی‌های فیتوشیمیایی ابتدا عصاره متانولی تهیه گردید، به طوری که پس از سایه خشک شدن نمونه‌ها، آنها با آسیاب برقی به صورت پودر شده درآمده و از هر نمونه به مقدار یک گرم در ۱۰ میلی‌لیتر حلال متانول (۸۰٪) حل گردید. سپس نمونه‌ها روی شیکر در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. آنگاه محتویات هر نمونه جداگانه توسط کاغذ صافی صاف گردید و در دور ۳۱۰۰ به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شد (Rohloff et al., 2015).

برای اندازه‌گیری فنل کل، ابتدا ۲۰ میکرولیتر از عصاره متانولی (یک گرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪) با ۱۰۰ میکرولیتر فولین سیوکالتیو و ۱/۱۶ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده و پس از ۵ تا ۸ دقیقه استراحت، ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم یک مولار (۱۰/۶ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به آن اضافه شد. محلول یادشده به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و حمام بخار ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای شاهد نیز به جای عصاره، از متانول ۸۰٪ استفاده شد و از این محلول برای کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (USA UVVRS.Spectrophotometr, 2008) استفاده شد و بعد جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های متفاوت استاندارد گالیک اسید، از محلول گالیک اسید در متانول: آب (۵۰:۵۰) استفاده گردید (Barreca et al., 2016).

برای محاسبه محتوای فلاونوئیدی از روش Chang و همکاران (۲۰۰۲) استفاده شد. ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی تهیه شده با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰٪ در اتانول (۱۰ گرم آلومینیوم کلرید در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول و آب مقطر)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار (۲/۴۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. برای تهیه شاهد به جای عصاره متانولی، تنها از متانول خالص استفاده شد. سپس

(۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸ ساعت) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط تاریک انجام گردید و نحوه اعمال کلشی‌سین به صورت تزریق مستقیم ژله حاوی ماده جهش‌زا به قسمت مرستم بود. این آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح آزمایشی کامل تصادفی با سه تکرار که هر تکرار شامل حداقل ۲۰ بوته بود، انجام شد. در مدت چهار ماه تا زمان رسیدن به مرحله زایشی (مرداد ماه ۱۳۹۶)، مراحل نگهداری از قبیل وجین علف‌های هرز، آبیاری و سله‌شکنی به طور مرتب انجام شد. دمای گلخانه در تمام مدت آزمایش به صورت دمای روزانه ۲۶ و دمای شبانه ۲۰ درجه سانتی‌گراد حفظ شد. ثبت تمامی اجزای عملکرد و صفات مورفولوژیک و بیوشیمیایی در زمان گلدهی کامل انجام گردید.

ارزیابی اجزای عملکرد و صفات مورفولوژیک

برای ارزیابی صفاتی مانند تعداد برگ، تعداد میانگره ساقه اصلی، تعداد ساقه فرعی، تعداد گل سنبله اصلی و تعداد کل سنبله‌ها با شمارش ثبت گردید. طول میانگره، طول سنبله ساقه اصلی، ارتفاع اندام هوایی و طول ریشه راست با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد. پس از تکمیل رشد گیاه در مرحله گلدهی، بوته‌ها به طور کامل به همراه ریشه از گلدان‌ها خارج و با آب شسته شدند، سپس طول ریشه و اندام هوایی و وزن تر اندام هوایی و ریشه اندازه‌گیری شد. برای تعیین وزن خشک اندام هوایی و ریشه، این اندام‌ها در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند و بعد وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد (Khorasaninejad et al., 2018). برای اندازه‌گیری شاخص سطح برگ نیز در مرحله تکمیل رشد رویشی و شروع مرحله زایشی، قبل از ظهر از هر تکرار یک گیاه به طور تصادفی انتخاب شد و سطح برگ آنها توسط دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ (Delta T Device, Cambridge, UK) اندازه‌گیری و میانگین آنها محاسبه شد.

اندازه‌گیری شد. روش کار به این صورت بود که ابتدا عصاره اولیه را با متانول رقیق نموده و بعد ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره و ۹۰۰ میکرولیتر از محلول متانولی ۰/۱ مولار رادیکال DPPH مخلوط شد و به مدت نیم ساعت در تاریکی قرار داده شد. سپس جذب آن در ۵۱۶ نانومتر قرائت شد. آنگاه توانایی مهار رادیکال‌های DPPH با استفاده رابطه ۱ محاسبه گردید.

$$100 = \frac{(Ac - As)}{Ac} \times \text{درصد مهار رادیکال آزاد}$$

تجزیه و تحلیل شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۲ و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج

اجزای عملکرد و ویژگی‌های مورفولوژیک

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل غلظت و زمان بجز تعداد برگ اصلی، تعداد میانگره ساقه اصلی و طول ریشه راست، بر بقیه صفات یعنی بر طول اندام هوایی، تعداد برگ فرعی، تعداد ساقه فرعی، طول سنبله (ساقه اصلی گل‌دهنده)، تعداد سنبله‌ها (تعداد خوشه گل در کل گیاه، تعداد گل در خوشه (ساقه اصلی)، وزن تر اندام هوایی، وزن تر ریشه، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی، میانگین سطح برگ و میانگین طول میانگره در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد. همچنین اثر متقابل غلظت و زمان بر همه صفات اندازه‌گیری شده بجز طول ریشه راست، تعداد برگ اصلی و تعداد میانگره، بر باقی صفات اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ داشته است.

مخلوط نیم ساعت در تاریکی قرار داده شده و بعد بلافاصله در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد. میزان فلاونوئید کل براساس منحنی استاندارد کوئرتستین تعیین شد. به این منظور غلظت‌های مختلف از استاندارد کوئرتستین ساخته شده از رابطه خط بدست آمده برای تعیین میزان فلاونوئید درصد گرم ماده خشک استفاده گردید (Chang et al., 2002).

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH طبق روش Lalegani و همکاران (۲۰۱۸) با کمی تغییرات

رابطه ۱

در این رابطه، Ac و As به ترتیب برابر با عدد جذب نمونه و کنترل می‌باشد. اعداد بدست آمده برابر با درصد مهار رادیکال‌های آزاد در عصاره آبی نمونه‌هاست (Lalegani et al., 2018).

فیلسایتمتری

برای مطالعات فرایند فلوسایتمتری از گیاه تربچه (*Raphanus sativus*) به عنوان گیاه استاندارد مرجع و رنگ آمیزی با رنگ پرویدیم یدید (PI) استفاده شد (Loureiro et al., 2007). پس از خرد کردن گیاه نمونه و گیاه استاندارد تربچه در یک میلی‌لیتر از بافر دیپلو پی بی، سوسپانسیون هسته‌های حاصل با استفاده از سمپلر ۱۰۰۰ بافر از فیلتر نایلون مش ۵۰ و ۳۰ میکرومتری عبور داده شد، این کار برای حذف قطعات بزرگ و بقایای بافت‌ها استفاده شد، سپس ۵۰ میکرولیتر آر ان ایز (برای جلوگیری از رنگ آمیزی RNA) و بعد ۵۰ میکرولیتر پرویدیم یدید (PI) برای رنگ آمیزی هسته‌ها اضافه گردید (Loureiro et al., 2007). سوسپانسیون هسته در دستگاه فلوسایتمتری دانشگاه تربیت مدرس مدل BD FACSCanto™ (Biosciences, Bedford, MA) ساخت آمریکا

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت و مدت اعمال کلسنی سین بر اجزای عملکرد، ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی اسطوخودوس افرشته

میانگین مربعات											
منابع تغییرات	درجه آزادی	ارتفاع اندام هوایی	طول میانگره	طول ریشه راست	تعداد برگ اصلی	تعداد برگ فرعی	تعداد میانگره (ساقه اصلی)	تعداد ساقه فرعی	طول سنبله (ساقه اصلی گل‌دهنده)	تعداد سنبله‌ها (تعداد در کل گیاه)	تعداد گل در خوشه (ساقه اصلی)
غلظت	۴	۶۹۱**	۱۲**	۱۵**	۴ns	۳۷۸۱**	۱۹**	۴ns	۲۹**	۰/۳۱ns	۷۳**
زمان	۳	۵۵۱**	۵**	۶*	۲۹ns	۱۴۳۱**	۱۱*	۴۹**	۳۱**	۹**	۱۴۱**
زمان × غلظت	۱۲	۷۷**	۶**	۲ ns	۱۲ ns	۴۴۵**	۳ ns	۷**	۱۳**	۴**	۱۳۲**
خطا	۴۰	۱۴	۰/۶	۱	۱۲	۳۰	۳	۲	۱	۰/۸	۱۱
ضریب تغییرات		۷	۱۶	۱۵	۱۵	۱۰	۱۳	۱۹	۱۹	۲۱	۱۶

ادامه جدول ۱-

میانگین مربعات											
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر اندام هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه	سطح برگ	فنل کل	فلاونوئید کل	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH)	قند کل	کیفیت کلروفیل (اسپد)
غلظت	۴	۱۱**	۰/۰۳**	۰/۶۹**	۰/۰۰۴**	۱/۱ns	۰/۶**	۰/۲۶ns	۰/۰۰۱*	۰/۰۰۱**	۱/۶ns
زمان	۳	۱۸**	۰/۰۵**	۱/۶**	۰/۰۱**	۴**	۱/۴**	۱/۵**	۰/۰۰۱*	۰/۰۰۱**	۸**
زمان × غلظت	۱۲	۶**	۰/۰۰۸**	۰/۲۸**	۰/۰۰۱**	۲**	۰/۲**	۰/۲۲ns	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۱**	۲*
خطا	۴۰	۶/۰	۰/۰۰۱	۰/۰۵	۰	۵/۰	۰/۰۴	۰/۱	۰	۰	۰/۸
ضریب تغییرات		۲۰	۱۶	۲۰	۱۴	۱۹	۱۳	۱۶	۱۱	۷	۱۷

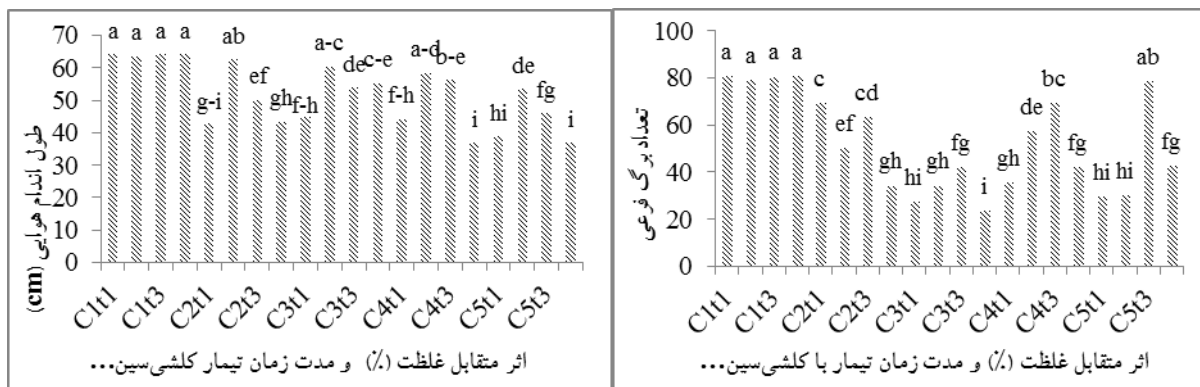
** معنی‌دار بودن در سطح ۱٪، * معنی‌دار بودن در سطح ۵٪ و ns: عدم معنی‌داری

۰/۲٪ و ۰/۴٪ یک روند افزایشی در تعداد برگ فرعی وجود دارد و در زمان ۲۴ ساعت به بیشترین مقدار خود در غلظت‌های مختلف رسیده و بعد یک روند کاهش از مدت زمان ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت وجود دارد. به نحوی که کمترین مقدار ثبت شده برای این صفت غلظت ۰/۱٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت بوده است (شکل ۱).

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثرهای متقابل غلظت و زمان بر تعداد ساقه فرعی دارای اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۱٪ می‌باشد. در برخی از تیمارها افزایش تعداد ساقه فرعی نسبت به شاهد وجود دارد که در غلظت ۰/۵٪ و غلظت ۰/۴٪ با افزایش مدت زمان اعمال تیمار تعداد ساقه فرعی افزایش یافته است ولی در دو غلظت ۰/۱٪ و ۰/۲٪ با افزایش مدت زمان اعمال تیمار تعداد ساقه فرعی کاهش یافته است. همچنین در مدت زمان هشت ساعت در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد در تعداد ساقه فرعی روند کاهشی مشاهده شد (شکل ۲).

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل غلظت‌های متفاوت کلشی سین و مدت زمان اعمال تیمار بر ارتفاع اندام هوایی در سطح احتمال ۱٪ معنی دار است. مدت زمان اعمال کلشی سین نشان داد که ابتدا با افزایش مدت زمان القاء از ۸ ساعت به ۱۶ ساعت در تمامی غلظت‌ها یک افزایش معنی دار در ارتفاع اندام هوایی بوجود می‌آید، سپس برای مدت زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت یک روند کاهش ارتفاع وجود دارد که در مدت زمان ۴۸ ساعت با غلظت‌های ۰/۲٪ و ۰/۴٪ به کمترین مقدار خود رسیده است (شکل ۱).

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثرهای متقابل غلظت‌های متفاوت کلشی سین و مدت زمان اعمال تیمار بر تعداد برگ فرعی دارای اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱٪ می‌باشد ولی بر تعداد برگ اصلی اختلاف معنی داری نداشته است. اثر متقابل مدت زمان و غلظت‌های متفاوت کلشی سین نشان می‌دهد که در غلظت‌های بالاتر با افزایش مدت زمان اعمال کلشی سین در غلظت‌های ۰/۱٪،



شکل ۱- اثر متقابل تیمار کلشی سین و مدت زمان اعمال آن بر ارتفاع اندام هوایی (چپ) و تعداد برگ فرعی (راست) اسطوخودوس افزاشته

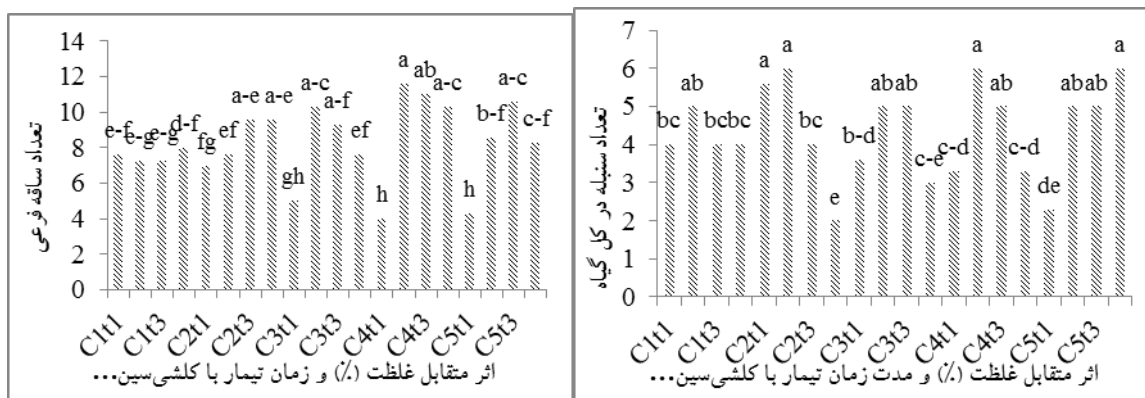
میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی داری نیستند.

C1: تیمار شاهد (غلظت صفر)، C2: غلظت ۰/۰۵٪، C3: غلظت ۰/۰۱٪، C4: غلظت ۰/۰۲٪ و C5: غلظت ۰/۰۴٪ کلشی سین؛

t1: مدت زمان ۸ ساعت، t2: مدت زمان ۱۶ ساعت، t3: مدت زمان ۲۴ ساعت و t4: مدت زمان ۴۸ ساعت

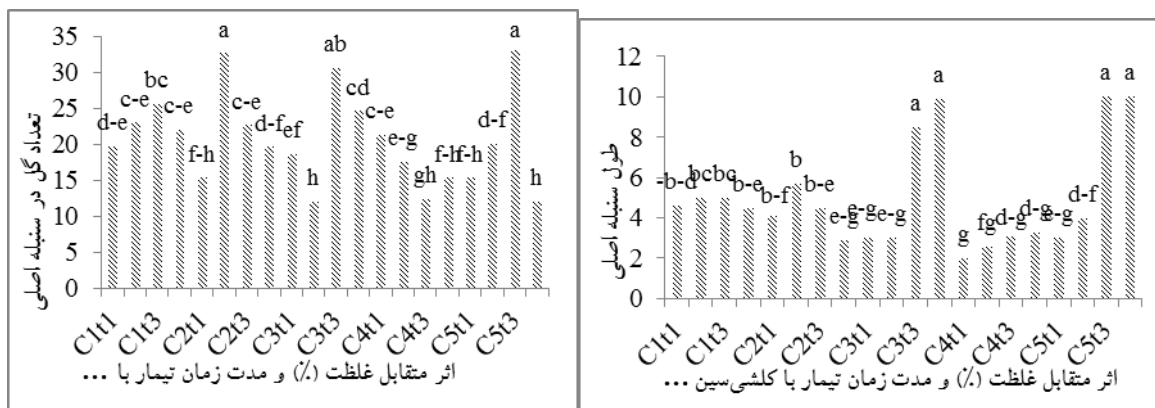
است و همین کاهش در تعداد سنبله‌ها در مدت زمان ۴۸ ساعت هم ادامه یافته است (شکل ۲).

اثر متقابل غلظت و زمان بر تعداد سنبله معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ داشت. در مدت زمان ۱۶ و ۲۴ ساعت تعداد سنبله‌ها در این دو مدت زمان برابر یا کمی کاهش داشته



شکل ۲- اثر متقابل تیمار کلشی‌سین و مدت زمان اعمال آن بر تعداد ساقه فرعی (چپ) و تعداد سنبله (راست) اسطوخودوس افراشته

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.



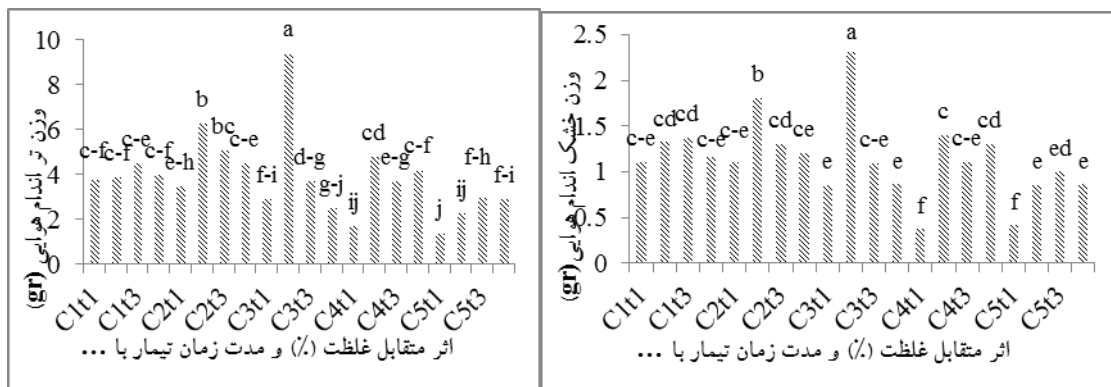
شکل ۳- اثر متقابل تیمار کلشی‌سین و مدت زمان اعمال آن بر تعداد گل در سنبله (چپ) و طول سنبله اصلی (راست) اسطوخودوس افراشته میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.

احتمال ۱٪ می‌باشد. بیشترین افزایش در اندازه طول سنبله اصلی در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۴ درصد در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل ۳). در غلظت ۰/۴٪ در زمان ۲۴ ساعت و

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد اثر متقابل غلظت‌های متفاوت کلشی‌سین و مدت زمان بر طول سنبله ساقه اصلی و تعداد گل در این سنبله دارای اختلاف معنی‌داری در سطح

افزایشی در وزن تر ریشه وجود دارد ولی در ادامه در مدت زمان‌های ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت تقریباً ثابت مانده است. اثر متقابل غلظت و زمان بر وزن خشک ریشه هم نموداری مطابق با نمودار وزن تر ریشه دارد و در غلظت ۰/۰۵٪ در زمان ۴۸ ساعت و غلظت ۰/۱٪ در مدت زمان ۱۶ ساعت افزایش در وزن خشک ریشه مشاهده گردید و در مدت زمان ۸ ساعت برای غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد کمترین مقدار ثبت شده است (شکل ۵). نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثرهای متقابل غلظت کلشی سین و مدت زمان اعمال بر میانگین سطح برگ دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ است. اثرهای متقابل غلظت و زمان بر میانگین سطح برگ نشان داد که غلظت ۰/۱٪ با مدت زمان ۸ ساعت و غلظت ۰/۴٪ با مدت زمان ۱۶ ساعت بیشترین افزایش را بر میانگین سطح برگ دارد (شکل ۶). نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثرهای متقابل غلظت‌های متفاوت کلشی سین و مدت زمان بر میانگین طول میانگره دارای اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ است. اثر متقابل غلظت و زمان هم بیانگر این است که غلظت ۰/۴٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت کمترین طول میانگره را داراست و غلظت ۰/۱٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت بیشترین فاصله میانگره را دارد.

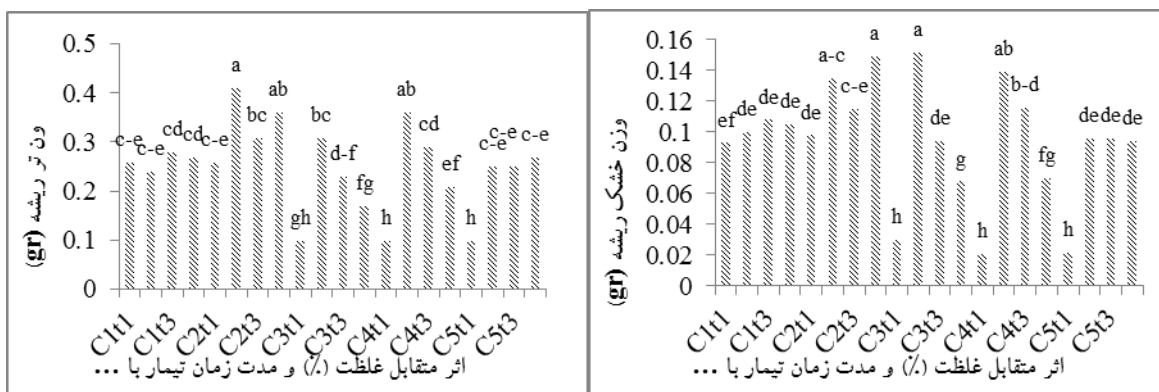
غلظت ۰/۰۵٪ در زمان ۱۶ ساعت افزایش در تعداد گل وجود دارد و در غلظت ۰/۴٪ در زمان ۴۸ ساعت و غلظت ۰/۱٪ در زمان ۲۴ ساعت تعداد گل کاهش داشته است (شکل ۳). نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل غلظت‌های متفاوت کلشی سین و مدت زمان بر وزن تر و خشک اندام هوایی و وزن تر و خشک ریشه دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ است. اثر متقابل زمان و غلظت نشان می‌دهد که وزن تر و خشک اندام هوایی، در دو غلظت ۰/۰۵٪ و ۰/۱٪ با افزایش زمان از ۸ ساعت به ۱۶ ساعت افزایش در وزن تر و خشک اندام هوایی را به دنبال دارد. ولی در دو غلظت بالاتر ۰/۲٪ و ۰/۴٪ روند افزایشی از مدت زمان ۸ ساعت به ۱۶ ساعت مشاهده شده است و در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت ثابت یا کمی افزایش داشته است (شکل ۴). در غلظت ۰/۰۵٪ وزن تر ریشه در مدت زمان ۸ ساعت با شاهد برابر بوده است و در مدت زمان ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت وزن تر ریشه نسبت به شاهد افزایش داشته است. در غلظت ۰/۱٪ و ۰/۲٪ ابتدا یک روند افزایشی معنی‌دار از مدت زمان ۸ ساعت به ۱۶ ساعت وجود داشت ولی از زمان ۱۶ ساعت به بعد روندی کاهشی وجود دارد. در غلظت ۰/۴٪ با افزایش زمان از ۸ ساعت به ۱۶ ساعت ابتدا یک روند



شکل ۴- اثر متقابل تیمار کلشی سین و مدت زمان اعمال آن بر وزن تر اندام هوایی (چپ) و وزن خشک اندام هوایی (راست) در بوته

اسطوخودوس افراشته

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.



شکل ۵- اثر متقابل تیمار کلشی سین و مدت زمان اعمال آن بر وزن تر ریشه (چپ) و وزن خشک ریشه (راست) اسطوخودوس افزاشته میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.

فنل کل

باتوجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر متقابل غلظت و زمان بر فنل کل در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بوده است. بیشترین میزان فنل کل در مدت زمان ۴۸ ساعت برای غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد است. اثر متقابل زمان و غلظت نشان داد که در غلظت ۰/۰۵٪ در زمان ۸ ساعت نسبت به زمان ۱۶ ساعت یک روند کاهشی دارد و با مدت زمان ۲۴ ساعت تقریباً برابر است ولی در ادامه برای ۴۸ ساعت یک روند افزایشی دارد. در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴٪، در ابتدا یک روند افزایشی در میزان فنل کل از زمان ۸ ساعت به ۱۶ ساعت وجود دارد، سپس یک روند نزولی در مدت زمان ۲۴ ساعت دیده می‌شود. در نهایت در مدت زمان ۴۸ ساعت روند صعودی وجود دارد که این روند در مدت زمان‌های مشابه (۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت) برای هر غلظت یکنواخت می‌باشد (شکل ۷).

نشان داد که در غلظت ۰/۰۵٪ با افزایش زمان القاء، ابتدا یک روند افزایشی در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای مدت زمان ۱۶ ساعت ثبت گردید و در ادامه روند کاهشی برای مدت زمان ۲۴ ساعت ثبت شد و برای زمان ۴۸ ساعت هم افزایش کمی مشاهده شد که در هر دو مورد اخیر این روندها معنی‌دار نبوده است. در غلظت ۰/۱٪ برای زمان ۸ و ۱۶ ساعت مقداری یکسان ثبت گردید، در ادامه سیر نزولی تا مدت زمان ۴۸ ساعت مشاهده گردید. در غلظت ۰/۲٪ تقریباً برای تمامی تیمارها در مدت زمان‌های مختلف نتایج تقریباً مشابه بود و در غلظت ۰/۴٪ برای مدت زمان ۸ ساعت بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ثبت گردید، سپس در مدت زمان ۱۶ ساعت از این مقدار کاسته شد و برای مدت زمان ۲۴ ساعت دوباره افزایش در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشت و برای ۴۸ ساعت کاهش جزئی ثبت شده است (شکل ۷).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

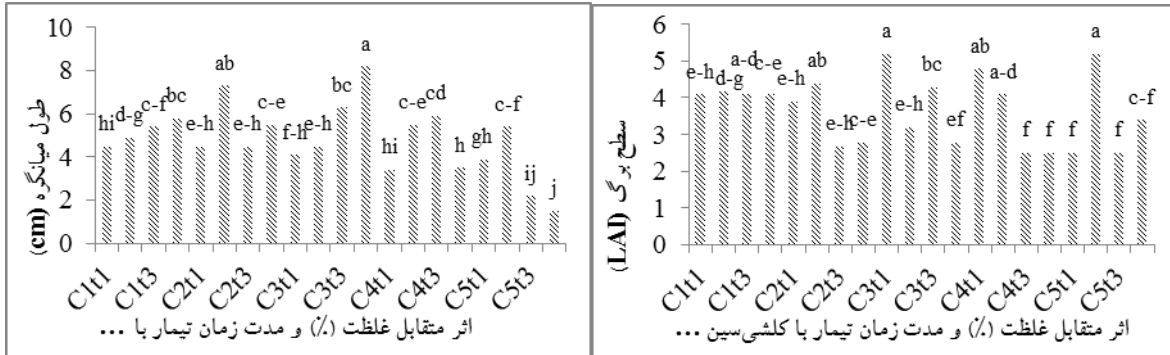
نتایج نشان داد که اثر متقابل زمان و غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ است. اثر متقابل زمان و غلظت بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

قند کل

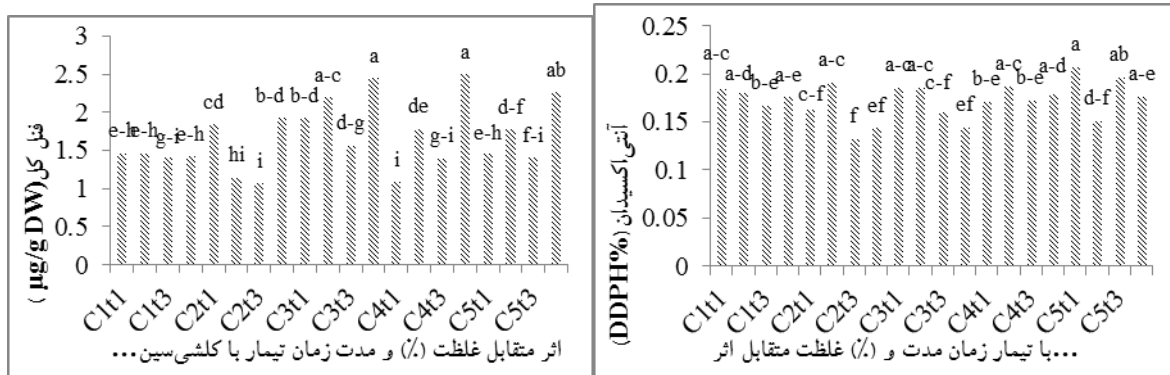
نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل زمان و غلظت بر قند کل در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بوده است. اثر متقابل زمان و غلظت بر قند کل نشان داد که در

رسیده است که این افزایش معنی دار بود و برای مدت زمان ۴۸ ساعت مقداری کمتر از مدت زمان ۲۴ ساعت ثبت گردید.

غلظت ۰/۰۵٪ برای زمان ۸ و ۱۶ ساعت مقداری تقریباً مشابه ثبت گردید و در زمان ۲۴ ساعت به بیشترین مقدار خود



شکل ۶- اثر متقابل تیمار کلشی سین و مدت زمان اعمال آن بر سطح برگ (چپ) و طول میانگره (راست) اسطوخودوس افزاشته میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.



شکل ۷- اثر متقابل تیمار کلشی سین و مدت زمان اعمال آن بر فنل کل (چپ) و آنتی‌اکسیدان (راست) اسطوخودوس افزاشته میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌داری نیستند.

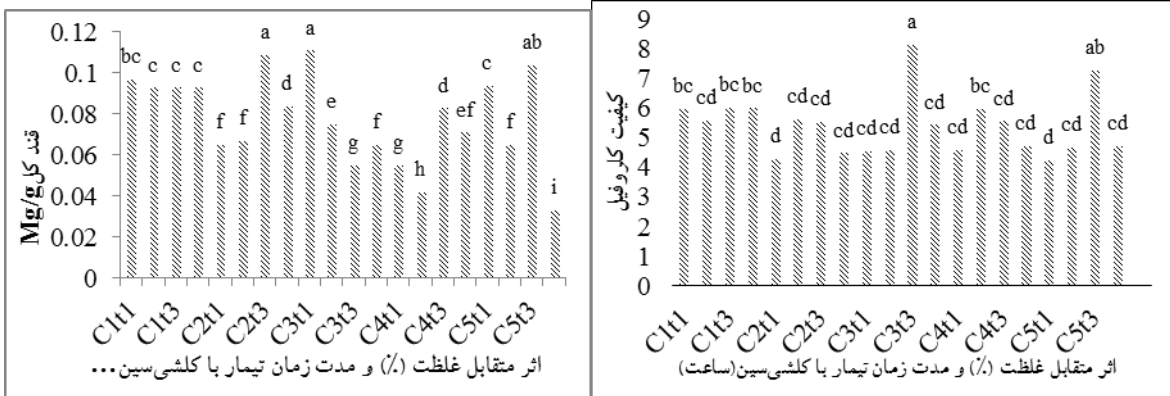
روند افزایشی است که در غلظت ۰/۴٪ در این زمان به بیشترین مقدار خود رسیده است. سپس دوباره برای مدت زمان ۴۸ ساعت سیر کاهشی مشاهده شده است و کمترین مقدار را در زمان ۴۸ ساعت و در غلظت ۰/۴٪ داشته است (شکل ۸).

در غلظت ۰/۱٪ برای زمان ۸ ساعت بیشترین مقدار ثبت گردیده است و برای مدت زمان ۱۶ و ۲۴ ساعت سیر نزولی پیدا کرده است و برای ۴۸ ساعت دوباره افزایش جزئی ثبت گردید. برای غلظت ۰/۲٪ و ۰/۴٪ روندی مشابه مشاهده شده است که ابتدا از مدت زمان ۸ ساعت به مدت زمان ۱۶ ساعت یک روند کاهشی دارد، سپس برای مدت زمان ۲۴ ساعت یک

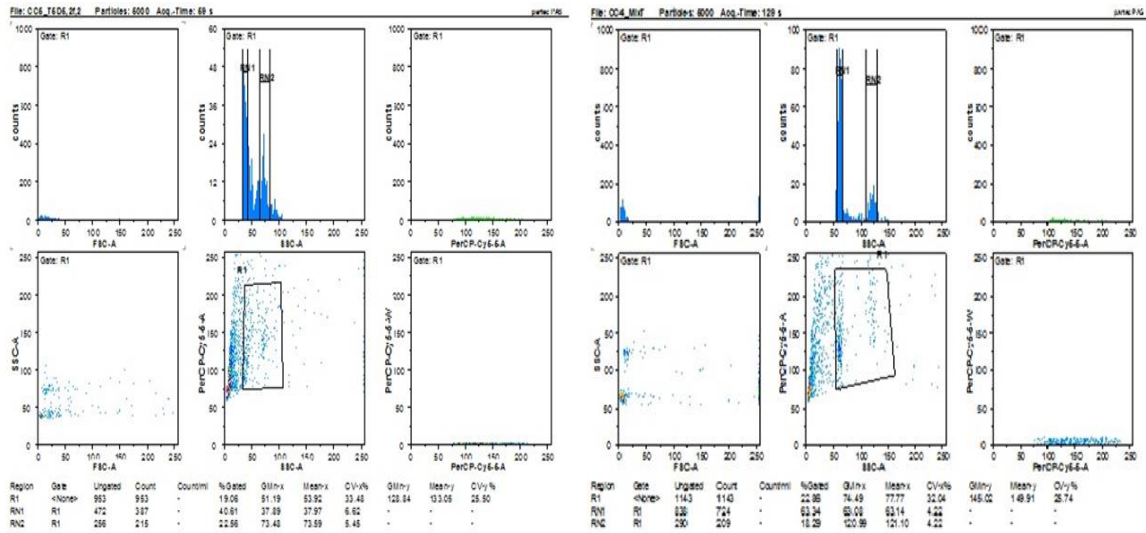
کیفیت کلروفیل

مدت زمان ۱۶ ساعت بیشترین مقدار و در دو غلظت ۰/۰۵ و ۰/۲ درصد در مدت زمان ۸ ساعت کمترین مقدار برای کیفیت کلروفیل ثبت شد.

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) مشخص شد که اثر متقابل غلظت و زمان بر کیفیت کلروفیل تأثیر معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارد. به طوری که در غلظت ۰/۱٪ در



شکل ۸- اثر متقابل تیمار کلشی سین و مدت زمان اعمال آن بر قند کل (چپ) و کیفیت کلروفیل (راست) اسطوخودوس افراشته میانگین های دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی داری نیستند.



شکل ۹- نمونه ای از هسیتوگرام فلوسایتومتری گیاه استاندارد تربچه (*Raphanus sativus cv. Sexa*) و اسطوخودوس افراشته در تیمار شاهد (چپ) و اسطوخودوس افراشته در غلظت ۰/۴٪ در زمان ۴۸ ساعت (راست)

فیلسایتومتري

دیپلوئید اختلاف معنی‌داری نداشت ولی به دلیل طول میانگرمه کمتر در تتراپلوئیدها، ارتفاع آنها کمتر شد و ارتفاع گیاهان دیپلوئید بیشترین مقدار را داشت (Tavan et al., 2015). در گیاه گل پروانش با افزایش سطح پلوئیدی در گیاه ارتفاع بوته به میزان قابل توجهی کاهش یافت. به طوری که ارتفاع در گیاهان تتراپلوئید ۳۴ سانتی‌متر و در گیاهان دیپلوئید ۵۳ سانتی‌متر بود (Hosseini et al., 2013). در گیاه اولوکوس توروسوس (*Ullucus tuberosus*)، ارتفاع گیاه دیپلوئید بیشتر از اکتاپلوئیدها بوده ولی در تعداد گره اختلاف معنی‌داری نداشتند. همچنین تعداد برگ فرعی در گیاهانی که تحت تأثیر کلشی سین قرار گرفتند در مقایسه با گیاهان دیپلوئید، کاهش داشته است (Viehmánová et al., 2012).

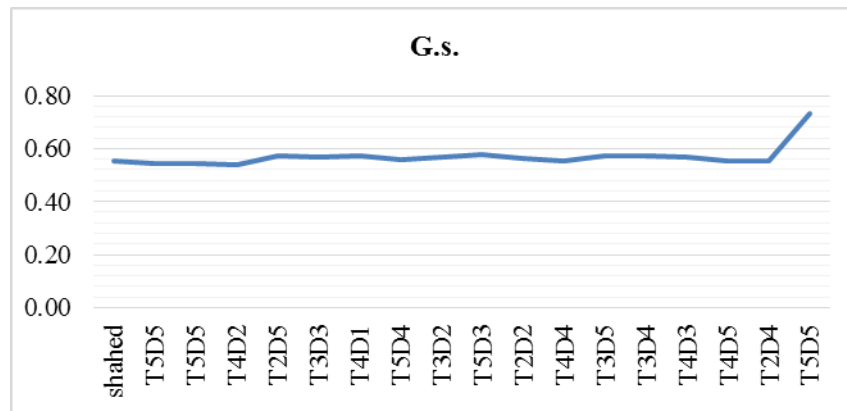
بحث

نتایج مطالعات Birami kohi و همکاران (۲۰۱۷) بر روی گیاه شنبليله (*Trigonella foenum-graecum*) نشان می‌دهد که بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید افزایش سطح پلوئیدی باعث کاهش تعداد برگ، تعداد گل و تعداد نیام در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید شد که علت این کاهش می‌تواند سمیت حاصل از کلشی سین برای سلول‌های مریستمی باشد، زیرا کلشی سین یک ماده جهش‌زا و در عین حال سمی برای گیاه محسوب می‌شود. در تحقیقی دیگر بر گیاه فلوکس (*Phlox drummondii*) اثرهای مرتبط با دوزهای تیمارهای پلوئیدی بر صفات کمی مشاهده شد و نتایج حکایت از آن داشت که ارتفاع بوته و تعداد برگ در شاخه کاهش یافته اما تعداد شاخه‌ها افزایش یافت (Tiwari & Mishra, 2012). در این تحقیق مدت زمان و اثرهای متقابل غلظت و مدت زمان اعمال کلشی سین بر تعداد برگ فرعی دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

نتایج این مطالعه با برخی از ویژگی‌های مورد بررسی در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) که تعداد شاخه جانبی تتراپلوئید نسبت به گیاه دیپلوئید افزایش یافته بود (Omid beygi et al., 2010) مشابه می‌باشد.

نتایج بررسی‌های فیلسایتومتري نشان داد (شکل ۹) که غلظت ۰/۴٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت با اندازه ژنوم ۰/۷۳ پیکوگرم نسبت به گیاه شاهد با اندازه ژنوم ۰/۵۵ پیکوگرم افزایش معنی‌داری نشان داد و بقیه تیمارها با میانگین اندازه ژنوم ۰/۵۷ پیکوگرم نسبت به گیاه شاهد تغییر معنی‌داری نشان ندادند. به طوری که در تیمارهای شاهد و تیمارهای تحت غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ درصد در زمان ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت بین ۰/۴، اندازه ژنوم تا ۰/۵۷ پیکوگرم و تحت غلظت ۰/۴٪ و ۴۸ ساعت اندازه ژنوم ۰/۷۳ پیکوگرم بدست آمد (شکل ۱۰).

در این تحقیق به تأثیر کلشی سین بر خصوصیات رشدی پرداخته شد. نتایج نشان داد که در غلظت ۰/۲ و ۰/۴ درصد در مدت زمان ۴۸ ساعت رشد ارتفاع گیاه به حداقل خود رسیده است و گیاه شاهد رشد حداکثری را در ارتفاع اندام هوایی داشته است. گیاه با غلظت ۰/۴٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت میانگین میزان ژنوم بیشتری نسبت به شاهد دارد. نتایج این مطالعه با برخی از ویژگی‌های مورفولوژیک گل همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) (Alavipour et al., 2016)، پروانش (*Catharanthus roseus*) (Hosseini et al., 2013) و اولوکوس توروسوس (*Ullucus tuberosus*) (Viehmánová et al., 2012) و آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) (Shmeit et al., 2010) مشابه بود. کاهش رشد پس از تیمار با مواد ضد میتوزی، احتمالاً به دلیل کاهش سرعت و کم شدن تعداد تقسیم سلولی باشد که در نتیجه ایجاد اختلال در میزان اکسین در سلول‌های در حال تقسیم مریستمی، کاهش تنفس سلولی و فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌ها را در پی دارد (Madani et al., 2019). به طوری که با بررسی انجام شده روی گیاه آویشن ایرانی مشخص شد با وجود اینکه تعداد گره در گیاهان تتراپلوئید نسبت به میکسوپلوئید و



شکل ۱۰- نمودار خطی تغییرات سطح پلوئیدی در تیمار غلظت‌های کلشی سین و مدت زمان اعمال آن

دیپلوئید) مورد بررسی، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ وجود نداشت (Birami kohi et al., 2017).

در تحقیقی بر روی زیرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss.) نشان داده شد که در وزن تر و خشک گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (Zahedi et al., 2018). در این تحقیق میانگین طول میانگره در گیاهان با غلظت ۴/۰٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت کاهش یافته است. نتایج آنالیز واریانس اثر کلشی سین بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل، فنل کل و فلاونوئید کل نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود داشته و میزان فنل کل در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید افزایش یافته است (Ayyobi et al., 2017). به دلیل افزایش تعداد کروموزوم‌ها و ژن‌های وابسته و در نتیجه میزان بیان ژن‌ها، طی افزایش سطح پلوئیدی، در بسیاری موارد غلظت متابولیت‌های ثانویه و مواد فیتوشیمیایی دفاعی در گیاه افزایش می‌یابد (Ayyobi et al., 2017). در تحقیقی که بر روی گیاه خشخاش (*Papaver somniferum*) انجام شده القای پلی‌پلوئیدی باعث ایجاد تغییرات معنی‌دار در افزایش ترکیب‌های فیتوشیمیایی مانند فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدان کل در گیاهان پلی‌پلوئیدی نسبت به دیپلوئید

نتایج بیانگر کاهش تعداد گل و افزایش طول سنبله تحت تیمار ۴/۰٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت کلشی سین بوده است. در درختچه توری (*Lagerstroemia indica* L.) خصوصیات زینتی در گیاهان تتراپلوئید افزایش یافته است. در گیاهان تتراپلوئید، افزایش قطر گل و طول پایه بیشتر گلبرگ‌ها و کاسبرگ‌ها مشاهده شده است و نیز قطر گرده و اندازه کپسول و دانه نیز به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود (Ye et al., 2010). در تحقیقی که روی گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi* L.) انجام شده است نتایج حکایت از آن دارد که گیاهان تتراپلوئید بدست آمده از نظر طول برگ، قطر ساقه، طول گل‌آذین، طول دمگل و طول دانه بزرگتر از گیاهان دیپلوئید بودند و افزایش طول و عرض روزنه در گیاهان تتراپلوئیدی ناشی از افزایش سطح برگ بوده است (Sadat Noori et al., 2017). نتایج حاصل از مقایسه میانگین بر روی گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum*) نشان داده است که تعداد گل، تعداد برگ، تعداد نیام، عرض برگ، قطر ریشه، قطر ساقه اصلی و فرعی و شاخه جانبی گیاهان دیپلوئید نسبت به گیاهان تتراپلوئید دارای برتری بودند ولی در برخی صفات کمی مانند وزن تر و وزن خشک گیاه، بین گیاهان هر دو سطح پلوئیدی (تتراپلوئید و

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باتوجه به مشاهدات این آزمایش باید گفت که برای تولید گیاهان پاکوتاه با مقادیر بالاتری از مواد مؤثره و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، می‌توان از کلشی‌سین استفاده کرد. بهترین تیمار کلشی‌سین در غلظت‌های متفاوت کلشی‌سین و مدت زمان‌های اعمال شده برای گیاه اسطوخودوس افزاشته غلظت ۰/۴٪ به‌مدت زمان ۴۸ ساعت می‌باشد. باتوجه به نتایج فیلوسایتومتری می‌توان گفت کلشی‌سین ماده مناسبی برای القای پلی‌پلوئیدی در این گیاه بوده است، به‌طوری که می‌توان با تغییر در غلظت، زمان کاربری و حتی نحوه اعمال کلشی‌سین، نتایج بهتری بدست آورد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از دست‌اندرکاران دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، به‌دلیل حمایت‌ها در انجام این پژوهش تشکر می‌کنیم. همچنین از آقای دکتر قاسم کریم‌زاده (عضو هیئت‌علمی دانشگاه تربیت‌مدرس)، خانم مهندس شیما عباسی، خانم مهندس منصوره توان و آقای مهندس ایوب توکلی به‌دلیل حمایت‌ها و راهنمایی‌ها برای انجام این پژوهش صمیمانه تشکر می‌نماییم.

منابع مورد استفاده

- Afshari, E., Ranjbar, G.A., Kazemitabar, S.K., Riasat, M. and Poshtmasari, H., 2014. Investigation the effect of colchicine and trifluralin on cytogenetic characteristics in root meristem cell's of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 29(4): 936-951.
- Alavipour, S., Chehrazhi, M. and KHaleghi, E., 2016. The effect of colchicine application method on reproductive traits of pot marigold (*Calendula officinalis* L.). *Seed and Plant Production Journal*, 32(2): 119-122.
- Ayyobi, N., Hosseini, B. and Fattahi, M., 2017. Induction effects of colchicine and chitosan on

گردید (Madani et al., 2019). القای تتراپلوئیدی در شاهدانه (*Cannabis sativa* var. Indica) اثر معنی‌داری بر میزان قند کل در این گیاه داشت، به‌طوری که این ترکیب‌ها در برگ و ریشه گیاهان تتراپلوئیدی نسبت به نمونه دیپلوئید کاهش محسوسی داشت. تغییرات در قندهای احیاء‌کننده مشابه تغییرات مشاهده شده در قند کل بود (Bagheri & Mansouri, 2015). باتوجه به نتایج فیلوسایتومتری می‌توان گفت کلشی‌سین ماده مناسبی برای القای پلی‌پلوئیدی در گیاه مورد نظر می‌باشد. این نتایج البته به‌روش استفاده (ترکیب با ژل آگار)، نوع ماده ضد میتوز (کلشی‌سین) و نوع ریزنمونه و غلظت ماده ضد میتوزی نیز مرتبط است. علاوه‌براین پژوهش‌ها نشان می‌دهد که این ماده اثر یکسان و یکنواختی بر گونه‌های گیاهی مختلف و بخش‌های مختلف یک گیاه ندارد (Salahi Sadr et al., 2018). از آنجایی که مریستم‌های گیاهی از تعداد زیادی سلول تشکیل شده‌اند، بنابراین احتمال دستیابی به بافت‌های میکسوپلوئید (بافت ناهمسان هسته‌ای حاوی بافت دیپلوئید و تتراپلوئید) پس از تیمار با کلشی‌سین وجود دارد. به‌دلیل اینکه این ماده به‌طور مؤثری فقط روی سلول‌های در حال تقسیم اثر می‌گذارد، بنابراین پلی‌پلوئیدی عموماً به‌طور یکسان در تمام سلول‌های ریزنمونه اتفاق نمی‌افتد، در نتیجه باعث ایجاد بافت ناهمسان و میکسوپلوئیدی می‌گردد (Borgheei et al., 2010). نتایج بررسی‌ها روی گیاه لاله واژگون گرگان (*Fritillaria raddeana* Regel) نشان داد که کالوس‌های کشت شده در محیط حاوی غلظت‌های متفاوت کلشی‌سین (۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۵ درصد) به‌مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اعمال تیمار، بازکشت شدند و با وجود افزایش در سرعت رشد و کاهش تعداد روزنه‌ها در غلظت ۰/۰۱٪ کلشی‌سین تعداد کروموزوم‌ها تغییری نکرد و القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان تیمار شده مشاهده نشد (Salahi Sadr et al., 2018).

- Khorasaninejad, S., Alizadeh Ahmadabadi, A. and Hemmati, K., 2018. The effect of humic acid on leaf morphophysiological and phytochemical properties of *Echinacea purpurea* L. under water deficit stress. *Scientia Horticulturae*, 239: 314-323.
- Lalegani, S., Gavlighi, H.A., Azizi, M.H. and Amini Sarteshnizi, R., 2018. Inhibitory activity of phenolic-rich pistachio green hull extract-enriched pasta on key type 2 diabetes relevant enzymes and glycemic index. *Food Research International*, 105: 94-101.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Dolezel, J. and Santos, C., 2007. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flowcytometry: A test with 37 species. *Annals of Botany*, 100(4): 875-888.
- Madon, M., Clyde, M., Hashim, H., Mohd, Y., Mat, H. and Saratha, S., 2005. Polyploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. *Journal of Oil Palm Research*, 17: 110-123.
- Madani, S.H., Hosseini, B., Karimzadeh, Gh. and Rahimi, A., 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 Research*, 35(2): 170-181.
- Mazloomi Abukhyl, M., Khorasaninejad, S. and Alizadeh, M., 2017. Comparison of the effects of nano fertilizer and chemical fertilizer on morphophysiological and phytochemical properties of *Lavandula stricta* Del. regeneration from seed and tissue culture. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 33(6): 975-989.
- Mishra, B.K., Pathak, S., Sharma, A., Trivedi, P.K. and Shukla, S., 2010. Modulated gene expression in newly synthesized auto-tetraploid of *papaver somniferum* L. *South African journal of Botany*, 76(3): 447-452.
- Mozaffarian, V., 2004. A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser, Tehran, 671p.
- Nikfarjam, M., Parvin, N. and Asarzagdegan, N., 2009. The effect of *Lavandula angustifolia* in the treatment of mild to moderate depression. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 11(4): 66-74.
- Omid beygi, R., Mirzaei, M., Hasani, M.E. and Sedighi, M.M., 2010. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. *International Journal of Plant Production* 4(2): 87-98.
- Rohloff J, 2015. Analysis of phenolic and cyclic compounds in plants using derivatization techniques in combination with GC-MS-based metabolite profiling. *Molecules*, 20(2): 3431-3462.
- rosmarinic acid production in hairy root cultures of Zarrin-Giah (*Dracocephalum kotschy* Boiss.). *Journal of Molecular and Cellular Research (Iranian Journal of Biology)*, 30(1): 1-30.
- Bagheri, M. and Mansouri, H., 2015. Effect of induced polyploidy on some biochemical parameters in *Cannabis sativa* L. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(5): 2366-2375.
- Barreca, D., Laganà, G., Leuzzi, U., Smeriglio, A., Trombetta, D. and Bellocco, E., 2016. Evaluation of the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (*Pistacia vera* L. variety Bronte) hulls. *Food chemistry*, 196: 493-502.
- Borgheei, S.F., Sarikhani, H., Chaichi, M. and Kashi, A., 2010. In vitro induction of polyploidy in lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 26(3): 283-295.
- Birami kofi, A., Fahmideh, L. and Riasat, M., 2017. Evaluation of morphologic and physiologic traits of Sistan's native Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) under colchicine treatments. *Crop Breeding*, 18: 153-159.
- Chang, W.C., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K. and Kim, S.K. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* 163: 1161-1168.
- Eivazi, Sh., Khorasaninejad, S. and Alizadeh, M., 2015. Optimization of plant growth regulators for callus motivation and positioning in *Lavandula stricta* Del. First National Conference on Organic Cultivation and Propagation of Medicinal Plants, Hamedan, Iran, 28 November: 25-30.
- Golfakhrabadi, F., Yousefbeyk, F., Hassanzadeh, A.R. and Sadat Hamedi, Sh., 2017. Lavender in Iranian traditional medicine and new studies. *Journal of Islamic and Iranian Traditional Medicine*, 8(2): 161-173.
- Hosseini, H.R., Chehrizi, M., Nabati Ahmadi, D. and Mahmoodi Soresani, M., 2013. Effect of colchicine treatment on the autotetraploidy induction and morpho-physiological traits alteration in *Catharanthus roseus* cv. alba. *Plant production Technology*, 13(2): 59-62.
- Jamzad, Z., 2013. Flora of Iran: Labiateae (Vol. 76). Research Institute of Forests and Rangelands, 1074p.
- Javadian, N., Karimzadeh, Gh., Sharifi, M., Moieni, A. and Behmanesh, M., 2017. In vitro polyploidy induction: changes in morphology, podophyllotoxin biosynthesis, and expression of the related genes in *Linum album* (Linaceae). *Planta*, 245(6): 1165-1178.

- Thymus persicus* (Lamiaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 122(3): 573-583.
- Tiwari, A.K. and Mishra, S.K., 2012. Effect of colchicine on mitotic polyploidization and morphological characteristics of *Phlox drummondii*. African Journal of Biotechnology, 11(39): 9336-9342.
 - Ye, Y.M., Tong, J., Shi, X.P., Yuan, W. and Li, G.R., 2010. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Scientia Horticulturae, 124(1): 95-101.
 - Viehmannová, I., Trávníčková, M., Špatenková, E., Černá, M. and Trávníček, P., 2012. Induced polyploidization and its influence on yield, morphological, and qualitative characteristics of microtubers in *Ullucus tuberosus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 109(1): 83-90.
 - Zishan, S., Asghari Zakaria, R. and Zare, N., 2016. Polyploidy induction in black cumin (*Nigella sativa* L.) by colchicine treatment on seeds. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 32(5): 824-832.
 - Zahedi, A.A., Hosseini, B. and Fattahi, M., 2018. Effect of different concentration of colchicine on some morphological and phytochemical characteristics of *Dracocephalum Kotschy* Boiss. The Plant Production (Scientific Journal of Agriculture), 40(4): 31-41.
 - Sadat Noori, S.A., Norouzi, M., Karimzadeh, Gh., Shirkoool, K.H. and Niazian, M., 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.
 - Salahi Sadr, S., Zakizadeh, H., Naghavi, M.R. and Olfati, J.A., 2018. Regeneration of an endangered *Fritillaria (Fritillaria raddeana)* species via petal and leaf explants. Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research, 26(1): 71-83.
 - Sanginabadi, H., Khorasaninejad, S., Hemmati, Kh. and Ghasemnejad, A., 2016. A study on propagation methods of *Lavandula stricta* Del. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 32(3): 417-427.
 - Shmeit, Y.H., Fernandez, E., Novy, P., Kloucek, P., Orosz, M. and Kokoska, L., 2010. Autopolyploidy effect on morphological variation and essential oil content in *Thymus vulgaris* L. Scientia Horticulturae, 263: 1-7.
 - Soltanipour, M.A., 2005. Medicinal plants of the Geno protected area. Pajouhesh and Sazandegi, 68: 27-37.
 - Tavan, M., Mirjalili, M.H. and Karimzadeh, G., 2015. In vitro polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of

Effects of colchicine treatment and polyploidy induction on yield components and some morphological and biochemical characteristics of *Lavandula stricta* Delile

H. Nouri Dashlibroon¹, S. Khorasaninejad^{2*}, J. Mousavizadeh³ and M.H. Mirjalili⁴

1- M.Sc. student in Medicinal Plant, Horticultural Sciences Department, Plant Production Faculty, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2*- Corresponding author, Horticultural Sciences Department, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, E-mail: khorasaninejad@gau.ac.ir; skhorasaninejad@yahoo.com

3- Horticultural Sciences Department, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

4- Agriculture Department, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: February 2020

Revised: June 2020

Accepted: June 2020

Abstract

Lavandula stricta Delile is a native species of Iran growing in southern Iran. Polyploidy induction using mutagenic chemicals such as colchicine is one of the breeding methods of medicinal plants, which has potential to produce the crop purposefully. To evaluate the feasibility of polyploidy induction in *L. stricta*, a factorial experiment in a completely randomized design with two treatments including five concentrations of colchicine (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 %) as a gel on the end plant meristem and four times (8, 16, 24 and 48 hours) with three replications and 20 experimental units were performed under greenhouse conditions. To observe the effect of colchicine on morphological and biochemical characteristics at the flowering stage, the height of aerial parts, number of main leaves (leaves on the main stem), number of sub leaves (leaves on sub-branches), number of internodes on main stems, number of lateral stems, spike length on the main panicle, number of spikes, number of flowers per panicle, fresh and dry weight of aerial parts, fresh and dry weight of roots, root length, leaf area, internode length, total phenol content, total flavonoids content, antioxidant activity, total sugar content and chlorophyll quality were measured. The results of the analysis of variance showed that the studied treatments had a significant effect on all traits except the number of main leaves, the number of internodes on main stems, and root length. The means comparison showed that with increasing the concentration and period of colchicine application, height of aerial parts, internode length, the number of flowers per panicle, and total sugar content decreased and spike length on the main panicle and total phenol content increased. Based on the results of flow cytometric analysis, the mean genome size was 0.73 pg in plants treated with colchicine at a concentration of 0.4% for 48 hours, while the mean genome size in the control plants was 0.55 pg. Plants in other treatments showed a mean genome size of 0.57. In general, the results of this experiment showed a positive response of *L. stricta* to colchicine for the induction of polyploidy and the possibility of using this method in the future breeding of this plant.

Keywords: Leaf area, total flavonoid, phylometry, total phenol, spike length.