القای تترا پلی‌پلوئیدی در گیاه دارویی آرنیکا چامیسو

(*Arnica chamissonis* Less. ssp. *foliosa*)

مژده اسدی[۱]، جواد هادیان*[۲]، قاسم کریم‌زاده[۳]، صمد نژادابراهیمی[۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران

[*۲] نویسنده مسئول، دانشیار، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران

[۳] دانشیار، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی،گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

[۴] استادیار، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران

*نویسنده مسئول: J_hadian@sbu.ac.ir

چکیده

گیاه دارویی آرنیکای چامیسو (*Arnica chamissonis* Less. ssp. *foliosa*)گیاهی چندساله، ریزوم‌دار از خانواده کاسنی است. این گیاه دارای کاربرد گسترده در صنایع دارویی است. باوجوداینکه بذر آرنیکا چامیسو جهت کشت به ایران وارد شده است، به دلیل محدود بودن منابع ژنتیکی و لزوم انتخاب گیاهان سازگار با شرایط اقلیمی ایران، استفاده از روش‌های مناسب مانند القاء پلی‌پلوئیدی جهت ایجاد تنوع ژنتیکی در این گیاه ضروری است. جهت القای پلی‌پلوئیدی در گیاه آرنیکا چامیسو، غلظت کلشی‌سین در دو سطح صفر و ۰/۰۵ درصد و مدت‌زمان تیمار در سه سطح ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت انجام شد. تیمار بر روی مریستم انتهایی و به روش خیس کردن مریستم با گلوله‌ی پنبه‌ای اعمال شد. نتایج نشان داد که بهترین تیمار برای القای پلی‌پلوئیدی، تیمار مریستم‌های انتهایی با غلظت ۰/۰۵ درصد کلشی‌سین در مدت‌زمان ۲۴ ساعت است. محتوای 2C DNA گیاهان دیپلوئید برابر ۳/۷۰ پیکوگرم بود. گیاهان میکسوپلوئید دارای برگ هایی با رنگ سبز تیره‌تر، برگ و ساقه ضخیم‌تر، طول و عرض روزنه بیشتر و تراکم روزنه‌ای و ارتفاع کمتر نسبت به دیپلوئیدها بودند. در این مطالعه،سلول‌هایی با سطح پلوئیدی تتراپلوئید خالص مشاهده نشد.

***کلمات کلیدی:*گیاهان دارویی، آرنیکا چامیسو، فلوسایتومتری، کلشی‌سین، میکسوپلوئیدی، ژنوم.**

مقدمه

آرنیکا چامیسو با نام علمی *Arnica chamissonis* Less. ssp. *foliosa* گیاهی دارویی چندساله، ریزوم‌دار و بومی آمریکای شمالی از خانواده‌ی کاسنی است. بیش از ۱۵۰ ماده‌ی فعال بیولوژیک از آرنیکا جداسازی و شناسایی شده است که مهم‌ترین آن‌ها سزکوئی‌ترپن لاکتون‌ها، فلاونوئیدها و فنولیک اسیدها هستند. گل‌های انتهایی آرنیکا چامیسو به‌طور گسترده برای درمان موضعی کبودی و رگ به رگ شدن، دردهای عضلانی، بهبود زخم، درد مفاصل و تورم ناشی از شکستگی استخوان استفاده می‌شود (Merfort, 2010). امروزه از پلی‌پلوئیدی به‌عنوان یک روش مؤثر برای افزایش تولید و بهبود کیفیت متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شود. گیاهان پلی‌پلوئید معمولاً با تغییرات مورفولوژیکی، آناتومیکی و فیزیولوژیکی همراه بوده و در دامنه اکولوژیکی وسیع‌تر بهتر سازگار می‌شوند و مقاومت بیشتری به تنش های زنده و غیره زنده نشان می‌دهند. برای گیاهان دارویی معمولاً پلی‌پلوئیدی با ارزش است چون باعث افزایش در وزن تازه و ترکیبات مؤثر گیاه می‌شود (Yildiz, 2013). فرایند دو برابر کردن کروموزوم‌ها می‌تواند به‌وسیله چندین ماده ضد میتوزی القا شود. معمول‌ترین ماده‌ی مورد استفاده کلشی‌سین است که پلی‌مریزاسیون میکروتوبول‌ها را مختل می‌کند (Dhoogh *et al.*, 2011). مجد و کریم‌زاده (۲۰۱۰)، دو برابر شدن کروموزوم‌های گیاه *Tanacetum*

parthenium و تغییرات مورفولوژی، فیزیولوژی، فیتوشیمی و سیتوژنتیکی گیاهان تتراپلوئید القا شده را بررسی کردند. گیاهچه‌های یک هفته‌ای تاناستوم با غلظت ۰/۰۵ درصد محلول کلشی‌سین در مدت‌زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۲۴ ساعت تیمار شدند. گیاهان تتراپلوئید حاصل تغییرات معناداری در اندازه و تراکم روزنه، اندازه‌ی بذر، گل، دانه گرده، برگ، کرک‌ها و مقدار پارتنولید نشان دادند. به‌منظور بهبود صفات مورفولوژی آرنیکا در تحقیق پیش رو پروتکلی مناسب جهت القای تترا پلی‌پلوئیدی در این گیاه مطالعه و ارائه شده است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش بذرهای آرنیکا چامیسو از شرکت ژلیتو آلمان تهیه شدند. جهت القای پلی‌پلوئیدی در گیاه آرنیکا چامیسو، پژوهشی به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با دو فاکتور غلظت کلشی‌سین در دو سطح صفر و ۰/۰۵ درصد و مدت‌زمان در سه سطح ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت با سه تکرار انجام شد. جهت اعمال تیمارها از روش آغشته کردن نوک مریستم انتهایی به کلشی‌سین توسط گلوله‌ی پنبه‌ای استفاده شد. ۶۰ گیاهچه یکنواخت در مرحله ی دو تا چهار برگی جهت القای پلی‌پلوئیدی انتخاب شدند. آغشته کردن مجدد گلوله‌های پنبه‌ای به کلشی‌سین در تیمار ۱۲ ساعت یک‌بار و در تیمار زمانی ۲۴ ساعت دو بار صورت گرفت. پس از پایان زمان تیمار، نوک مریستم گیاهچه‌ها با آب مقطر استریل به‌طور کامل شسته شد. گیاهان تیمار شده به مدت شش ماه در کلکسیون گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی تا زمان انجام آزمایشات فلوسایتومتری نگهداری شدند.

برگ‌های آرنیکا برای تشخیص پلی‌پلوئیدی به‌وسیله‌ی فلوسایتومتری (اِف‌سی‌اِم[1]) آنالیز شدند. سوسپانسیون هسته‌ای حاصل از افزودن ۱/۵ میلی‌لیتر بافر دبلیوپی‌بی[2] به برگ گیاه آرنیکا و استاندارد مورد استفاده (گوجه‌فرنگی *Solanum lycopericum* cv Stupicke, 2C DNA = 1.96 pg) به دستگاه فلوسایتومتر BD FACSCanto™ - KE با مشخصات (BD: Biosciences, Bedford, MA, USA) تزریق شد. نتایج حاصل از فلوسایتومتری، در نرم‌افزار Flowing Software نسخه 2.4.1 تجزیه و تحلیل شده و در نرم‌افزار FloMax 2.0.0.1 ساخت شرکت پارتِک آلمان ویرایش شدند. جهت محاسبه مقدار2C DNA گیاه آرنیکا، از فرمول زیر استفاده شد (Tavan *et al*., 2015; Tarkesh Esfahani *et al*., 2016).

(pg) مقدار 2C DNA گیاه استاندارد × (میانگین پیک G_1 استاندارد / میانگین پیک G_1 نمونه) = مقدار 2C DNA نمونه (pg)

برای تعیین درصد زنده‌مانی و درصد میکسوپلوئیدی ۶۰ گیاه در سه تکرار مورد آنالیز قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار سس نسخه ۹/۱ آنالیز شدند. میانگین‌های موجود توسط آزمون LSD[3] مقایسه شدند. برای مقایسه مشخصات مورفولوژی و آناتومی از بین هرکدام از گیاهان دیپلوئید و میکسوپلوئید به‌طور تصادفی سه گیاه انتخاب شد که با استفاده از آزمون T-test مقایسه شدند.

نتایج و بحث

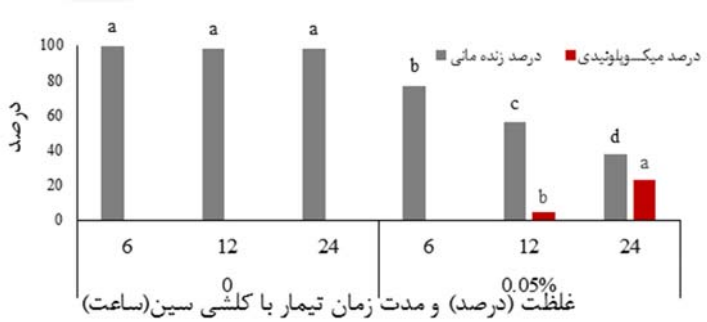
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ساده غلظت کلشی‌سین و مدت‌زمان تیمار و اثر متقابل آن‌ها بر درصد میکسوپلوئیدی گیاهان در سطح یک درصد معنادار است. بیشترین درصد گیاهان میکسوپلوئید در تیمار غلظت ۰/۰۵ درصد و مدت‌زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد. بیشترین درصد زنده‌مانی در تیمار غلظت ۰/۰۵ درصد کلشی‌سین در مدت‌زمان ۶ ساعت و کمترین درصد زنده‌مانی در مدت‌زمان ۲۴ ساعت بدست آمد.

[1]FCM
[2]Woody Plant Buffer; WPB
[3]Least Significant Difference; LSD

جدول ۱ تجزیه واریانس اثر غلظت کلشی‌سین و مدت‌زمان تیمار بر درصد زنده‌مانی و درصد میکسوپلوئیدی

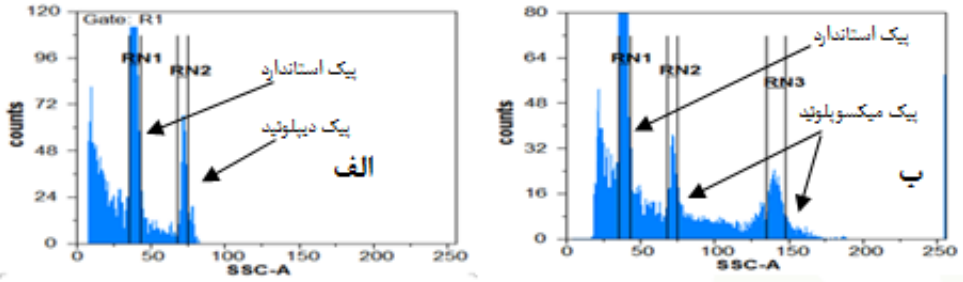
منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد زنده‌مانی	درصد میکسوپلوئیدی
		میانگین مربعات	
بلوک	۲	۵/۵۵$^{n.s}$	۹/۷۲$^{n.s}$
غلظت کلشی‌سین	۱	۷۸۱۲/۵**	۴۰۱/۳۸**
مدت‌زمان تیمار	۲	۶۰۱/۳۸**	۲۲۶/۳۸**
غلظت × زمان	۲	۵۰۴/۱۶**	۲۲۶/۳۸**
خطای آزمایش	۱۰	۱۰/۱۱	۴/۷
ضریب تغییرات (٪)		۴/۲۷	۲۸/۰۱

** نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تیمارها در سطح احتمال یک درصد است.



شکل ۱ نمودار اثر متقابل غلظت کلشی‌سین و مدت‌زمان تیمار بر روی صفات درصد زنده‌مانی و درصد میکسوپلوئیدی

در این تحقیق، آنالیز فلوسایتومتری مشخص کرد که پیک گیاهان دیپلوئید (۲x) روی کانال ۷۳ و پیک گیاهان میکسوپلوئید (۲x+۴x) روی کانال ۷۳ و ۱۴۰ قرار دارد. بر اساس پیک‌های بدست آمده از دستگاه فلوسایتومتری، در گیاهان تیمار شده توسط کلشی‌سین سلول‌هایی با دو سطح کروموزومی متفاوت شامل سلول‌های دیپلوئید - تتراپلوئید مشاهده شد. این سلول‌ها با داشتن دو سطح کروموزومی به‌عنوان گیاهان میکسوپلوئید در نظرگرفته شدند (شکل ۲). وجود سلول‌هایی با دو سطح پلوئیدی در کنار هم نشان‌دهنده نوعی بافت ناهمسان است. این گیاهان به‌عنوان گیاهان بافت ناهمسان هسته‌ای (میکسوپلوئید) درنظرگرفته شدند. ایجاد گیاهان میکسوپلوئید از این نظر که مریستم گیاهان از سلول‌های زیادی تشکیل شده و ممکن است تمایل جذب کلشی‌سین در آن‌ها متفاوت باشد دور از انتظار نیست (Jones *et al.*, 2008). میانگین محتوای دی‌ان‌ای، برای گیاهان دیپلوئید ۳/۷۰ پیکوگرم بدست آمد. در این گیاهان با آنالیز فلوسایتومتری، سلول‌هایی با سطح پلوئیدی تتراپلوئید خالص مشاهده نشد. در پژوهش حاضر برگ گیاهان میکسوپلوئید آرنیکا به‌طور قابل‌توجهی ضخیم‌تر از برگ گیاهان دیپلوئید بودند. همچنین کرک‌ها در سطح برگ گیاهان میکسوپلوئید بیشتر و رنگ برگ‌ها نیز سبز تیره‌تر بود. اما تراکم روزنه‌ای و ارتفاع بوته‌ها نسبت به گیاهان دیپلوئید کمتر بود. نتایج بررسی اثر پلی‌پلوئیدی بر روی ضخامت رگبرگ میانی برگ و قطر ساقه نشان داد که گیاهان میکسوپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید پارانشیم نردبانی و اسفنجی بزرگ‌تر و فضای بین سلولی بیشتری دارند. سلول های پلی‌پلوئید با داشتن حجم بیشتر نسبت به سلول‌های دیپلوئید، باعث ضخیم‌تر شدن بافت‌ها و بزرگ شدن اندازه اندام‌های گیاه می‌شوند (Rauf *et al.*, 2006).



شکل۲ گیتینگ هیستوگرام‌های فلوسایتومتری گیاهچه‌های آرنیکا (الف) هیستوگرام شاهد و استاندار (ب) هیستوگرام گیاهچه تیمار شده با کلشی‌سین و استاندارد

جدول ۲ اثر سطح پلوئیدی بر روی مشخصات مورفولوژی (ریختی)، مشخصات روزنه‌ای و آناتومی

مشخصات رشدی	دیپلوئید	میکسوپلوئید
ارتفاع گیاه (cm)	۱۳/۰±۹۴/۹۳	۷/۰±۷۹/۵۲
قطر ساقه (mm)	۱/۰±۶۶/۱۵	۲/۰±۹۳/۰۶
ضخامت پهنک (µm)	۱±۱۴۶/۹۶	۱۸۷/۲±۸۹/۶
ضخامت رگبرگ میانی (µm)	۴۲۸/۰±۳۴/۸۲	۵۶۶/۰±۵۲/۹۲
طول روزنه (µm)	۱۶/۰±۳۷/۳۸	۲۲/۰±۶۱/۵۶
عرض روزنه (µm)	۱۳/۰±۳۷/۷۴	۱۹/۰±۶۱/۵۵
تراکم روزنه (mm^2)	۱±۲۴۷/۵۲	۰±۲۱۳/۵۷

منابع

Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L. and Van Huylenbroeck, J., 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *104*(3), pp.359-373.

Esfahani, S.T., Karimzadeh, G. and Naghavi, M.R., 2016. 2C DNA Value of Persian Poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.) Medicinal Plant As Revealed By Flow Cytometry Analysis; A Quick Effective Criteria for Distinguishing Unidentified Papaver Species. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, *7*(2), pp.573-578.

Jones, J.R., Ranney, T.G. and Eaker, T.A., 2008. A novel method for inducing polyploidy in *Rhododendron* seedlings. *J. Amer. Rhododendron Soc*, *62*(3), pp.130-135.

Majdi, M., Karimzadeh, G., Malboobi, M.A., Omidbaigi, R. and Mirzaghaderi, G., 2010. Induction of tetraploidy to feverfew (*Tanacetum parthenium* Schulz-Bip.): Morphological, physiological, cytological, and phytochemical changes. *HortScience*, *45*(1), pp.16-21.

Merfort, I., 2010. *Arnica*: current state of efficacy, pharmacokinetics and side effects. *Zeitschrift für Phytotherapie*, *31*(4), pp.188-192.

Rauf, S., Munir, H., Abdullojon, E. and Basra, S.M., 2006. Role of colchicine and plant growth regulators to overcome interspecific incompatibility. *Gen. Appl. Plant Physiol*, *32*, pp.223-232.

Tavan, M., Mirjalili, M.H. and Karimzadeh, G., 2015. In vitro polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (Lamiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *122*(3), pp.573-583.

Yildiz, M., 2013. *Plant responses at different ploidy levels*. INTECH Open Access Publisher.

Polyploidy Induction in *Arnicachamissonis* Less. ssp. *foliosa*

Mojdeh Asadi[1], Javad Hadian[2*], Ghasem Karimzadeh[3], SamadNejad Ebrahimi[4]
[1]M. Sc. Undergraduate of Physiology and Breeding of Medicinal Plants, Medicinal Plants and Drug Research Institute, ShahidBeheshti University of Tehran
[2]Associate Professor, Medicinal Plants and Drug Research Institute, ShahidBeheshti University of Tehran
[3]Associate Professor, TarbiatModarres University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Breeding and Biotechnology
[4]Assistant Professor, Medicinal Plants and Drug Research Institute, ShahidBeheshti University of Tehran
[*]*Corresponding Author: J_hadian@sbu.ac.ir*

Abstract

***Arnica chamissonis* Less. ssp. *Foliosa* is a rhizomatous herbaceous perennial from the daisy family (Asteraceae).This plant has many uses in pharmaceutical industries. Although Chamisso's Arnica seed for culture in Iran is imported. due to the limited genetic resources and the need to choose plants adapted to the climatic conditions in Iran, using appropriate methods such as induction polyploidy in plants is essential to create genetic diversity.**

In order to induce polyploidy in *A. chamissonis*, used and colchicine dose and exposure time were tested. Colchicine dose was tested in 0 and 0.05 % concentrations and exposure times of 6, 12 and 24 hours were used to induce polyploidy. In the first set of experiments, apical meristems were exposed to colchicine both by the means of insertion of cotton balls. The results indicated that the best method to induce polyploidy in *A.chamissonis* was use of the cotton ball method and 24 hours exposure time. DNA content (2C) of diploid plants was 3.70 picograms. Mixoploid plants had darker green foliage, thicker stems, larger and sparser stomata and lower height compared to diploid plants. In this study, plants with a pure tetraploid level were not observed.

***Keywords*: Medicinal plants, *Arnica chamissonis*, flow cytometery, Colchicine, Mixoploidy, Genom.**