بررسی تأثیر القای پلوئیدی بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه خشخاش ایرانی (*papaver bracteatum* lindl)

سیدهادی مدنی[۱]، بهمن حسینی*[۱]، قاسم کریم زاده[۲]، امیر رحیمی[۳]

[۱ و ۱]* گروه علوم باغبانی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

[۲] گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

[۳] گروه زراعت ، دانشگاه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه

*نویسنده مسئول: *b.hosseini@urmia.ac.ir*

چکیده

خشخاش ایرانی با نام علمی *Papaver bracteatum* Lindl، گیاهی چند ساله از تیره Papaveraceae است که بعنوان یک گیاه دارویی مهم حاوی ترکیبات با ارزشی مثل تبائین و نوسکاپین می‌باشد. امروزه استفاده از تکنیک القاء پلی‌پلوئیدی با استفاده از مواد شیمیایی القاء کننده جهش مانند کلشی‌سین، به عنوان یکی از روش‌های اصلاح گیاهان دارویی بطور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین (۰، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ،۰/۲ و ۰/۵) در شرایط گلخانه و در سه دوره زمانی (۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت) بررسی گردید. نتایج آنالیز سیتوژنتیکی نشان داد که غلظت ۰/۲ درصد و دوره القای ۴۸ ساعت باعث تولید گیاهان پلی‌پلوئید موفق می‌شود. میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در گیاهان پلی‌پلوئیدی نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان داد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که القای پلوئیدی باعث مقاومت به شرایط تنش در اثر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود.

کلمات کلیدی: خشخاش ایرانی، کلشی‌سین، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز

مقدمه

گیاهان بعنوان اولین حلقه تشکیل دهنده زنجیره اکولوژیکی نقش مهمی را در زندگی ایفا می‌کنند. استفاده از گیاهان داروئی به منظور درمان با تاریخ زندگی انسان هم زمان بوده است. تبائین یا پارامرفین یک آلکالوئید افیونی و ساختار شیمیایی آن شبیه به مرفین و کدئین است اما بیشتر محرک است تا مسکن و در صورت مصرف مقدار زیاد موجب تشنجی شبیه به مسمومیت با استرکنین می‌شود. تبائین کاربرد درمانی ندارد ولی می‌توان از آن برخی داروهای مخدر را تولید کرد (Rezaei and Damiri, 2010). آلکالوئید دیگری از این گیاه استخراج شده که توسط Lalezari و همکاران (۱۹۷۳) آلپیکنین (Alpignenine) شناسائی شده است. با توجه به اینکه فن‌آوری ساخت این داروها در ایران وجود دارد، در صورت دسترسی کافی به مواد اولیه و با قیمت مناسب می‌توان نسبت به ساخت این داروها در کشور اقدام کرد و گام مؤثری در جهت تولید داروهای مورد نیاز کشور و حتی صادرات و ارزآوری برداشت. با روی آوردن به کشت و کار گیاهان دارویی، می‌توان از اصلاح و زیست فن‌آوری در راستای استفاده از توانمندی ژنتیکی گیاهان دارویی به منظور بهبود و افزایش عملکرد نهایی و تعدیل مواد موثره استفاده کرد. اما تاکنون در مورد اصلاح این گیاهان پیشرفت قابل ملاحظه‌ای صورت نگرفته است. درحال حاضر تعداد ارقام بدست آمده از طریق اصلاح گیاهان دارویی اندک است. دستکاری پلوئیدی در برنامه اصلاحی بسیاری از گیاهان بطور موفقیت آمیزی استفاده شده و منجر به افزایش بازدهی ترکیبات مهم بسیاری از گونه‌های گیاهی شده است (Chen and Gao, 2007). دو برابر کردن تعداد کروموزوم‌ها با تغییرات مهمی در متابولیسم ثانویه گیاهان همراه است (Chen and Gao, 2007). پلی‌پلوئیدی اغلب فنوتیپ‌های جدیدی را در رفتار نسبت به گونه‌های اجدادی خود، مانند افزایش مقاومت به خشکی و تحمل

IrHC2019

تنش‌های زیستی و غیر زیستی، افزایش قابلیت رشدی و ایجاد تنوع نشان می‌دهد. مؤثرترین ماده شیمیایی بکار رفته در مطالعات جهت القاء پلی‌پلوئیدی کلشی‌سین است که یک آلکالوئید استخراج شده از بذر و پداژه گیاه سورنجان (*autumnal Colchicum*) می‌باشد که معادل سنتز شده این ماده کلسمید (colcemid) نامیده می‌شود (Chen and Gao, 2007). کلشی‌سین به عنوان یک بازدارنده طبیعی میتوز، ازطریق ایجاد حالت بازدارندگی در تشکیل فیبرهای دوکی و در نتیجه ممانعت از مهاجرت قطبی کروموزوم‌ها و تقسیم سلولی منجر به ایجاد سلولی با تعداد کروموزوم دو برابر شده می‌گردد. استفاده از کلشی‌سین به منظور دوبرابر کردن کروموزوم درتعداد معدودی از گیاهان دارویی مانند بابونه گزارش شده است (Saharkhiz *et al*., 2007).

القای پلوئیدی با تغییرات گوناگون در پیکره گیاه و مواجه آن با شرایط محیطی پیرامونی آن ایجاد می‌کند و پایداری گیاهان حاصل از القای پلوئیدی مصنوعی لازمه تداوم نسل و در نهایت تولید رقم خالص می‌باشد. بنابراین، این پژوهش با هدف بررسی امکان تولید گیاه پلی‌پلوئید خشخاش ایرانی در شرایط گلخانه با استفاده از کلشی‌سین و در نهایت سنجش میزان فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه کلشی‌سین

این پژوهش در مرحله اجرایی، بهار ۱۳۹۵ در گلخانه تحقیقاتی و آزمایشگاه گروه باغبانی دانشکده کشاورزی ارومیه در انجام شد. بذور مورد نیاز برای این‌کار از منطقه غرب ایران جمع‌آوری گردید. به منظور برطرف کردن خواب بذر، ابتدا بذور را در تیمار ۲۵۰ پی پی ام هورمون جیبرلین به مدت ۱۲ ساعت غوطه ور شد تا حداکثر جوانه زنی بذور اتفاق بیفتد. کلشی‌سین مورد استفاده در این پژوهش از شرکت دوچفا تهیه شد. جهت انجام این تحقیق محلول های کلشی‌سین با غلظت های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد مورد نیاز تهیه شد. در این روش توسط پوشش جاذب (پنبه) که به محلول کلشی‌سین با غلظت های مورد نظر آغشته شده بود، قسمت انتهایی شاخه تیمار گردید.

مطالعه گیاهان حاصل از تیمار جهت تشخیص تغییرات ایجاد شده

پس از القای پلوئیدی و گذشت مدت زمان ۲ ماهه جهت رشد گیاهان تحت تیمار، جهت بررسی تاثیر موفق کلشی‌سین و حصول اطمینان، کروموزم‌های سلول‌های گیاهان دیپلوئید و گیاهان تحت تیمار طی بررسیهای سیتوژنتیکی مشاهده و شمارش گردیدند. جهت شمارش کروموزومی از روش Madani و همکاران (۲۰۱۵) استفاده گردید. در ادامه جهت بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Aebi و Bergmeryer (۱۹۷۴) و گایاکول پراکسیداز از روش Mac-Adam و همکاران (۱۹۹۲) استفاده گردید.

نتایج و بحث

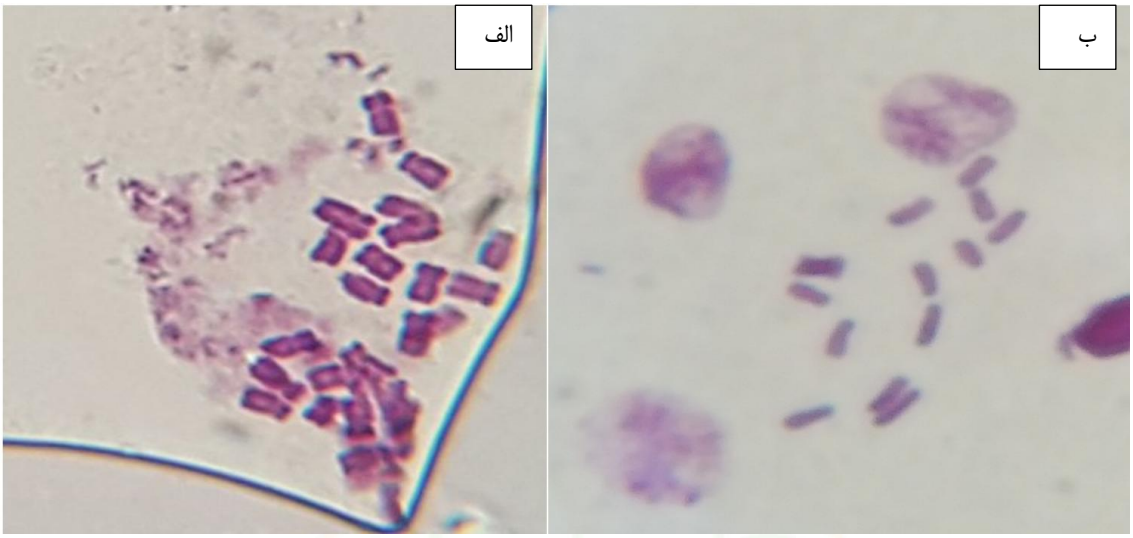
مشاهده و شمارش کروموزمها پس از اعمال تیمار:

جهت حصول اطمینان کافی از تتراپلوئیدی و عدم وجود آنیوپلوئیدی، کروموزمهای سلولهای گیاهان دیپلوئید و

گیاهانی که در معرض تیمار با کلشی‌سین قرار گرفتند، طی بررسی‌های سیتوژنتیکی مشاهده و شمارش شدند. جهت مشاهدهٔ کروموزم از نوک برگهای جوان و رشد یافته استفاده شد. طی این بررسی مشخص شد که تعداد کروموزم‌های سلولهای سوماتیکی در گیاهان تتراپلوئید (غلظت ۰/۲ درصد و دوره القای ۴۸ ساعت) خشخاش ایرانی (۴x=۲۸) در مقایسه با گیاهان دیپلوئید (۲x=۱۴) دو برابر شده است (شکل ۱). این روش برای تعیین سطح پلوئیدی در بسیاری از گیاهان از جمله در گیاه

IrHC2019

آب بشقابی (*Centella asiatica*) (Kaensaksiri *et al*., 2011)، در گیاه *Nepenthes gracilis* (Fong, 2008)، در گیاه *Bixa Orellana* (Carvalho *et al*., 2005) استفاده شده است.



شکل ۱: شمارش کروموزومی از قسمت مریستم انتهایی برگ در گیاهان (الف) تتراپلوئید (ب) دیپلوئید خشخاش ایرانی

نتایج تجزیه واریانس تاثیر افزایش سطح پلوئیدی بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول‌پراکسیداز در گیاه خشخاش ایرانی در جدول ۱ نشان داده شده است. فعالیت کاتالاز با افزایش سطح پلوییدی افزایش می‌یابد. گیاهان تتراپلوید بیشترین فعالیت کاتالاز (۹/۳۱ U g^{-1} FW) را نسبت به همتای دیپلوئید خود (۶/۵۶ U g^{-1} FW) نشان دادند (شکل۲ الف). نتایج نشان داد که فعالیت گایاکول‌پراکسیداز متفاوت بوده و بیشترین فعالیت در گیاهان تتراپلوئید (۲/۱۳ U g^{-1} FW) نسبت به همتای دیپلوئید (۱/۴۱ U g^{-1} FW) ثبت گردید (شکل ۲ ب). مکانیسم‌هایی که ویژگی‌های مهمی در پلی‌پلوئیدها ایجاد می‌کنند هنوز بطور دقیق مشخص نشده اند و تحقیقات بیشتر این مکانیزم را بهتر معرفی خواهند کرد (Zhang *et al*., 2010). از آنجا که یک گیاه تتراپلوئید ممکن است دارای سه یا چهار آلل مختلف در یک سطح مقطعی باشد، ممکن است انواع بیشتری از آنزیم‌های هیبرید در مقایسه با همتای دیپلوئید تولید کند. این تنوع فراوان آنزیمی‌ها ممکن است تتراپلوئیدها را از لحاظ بیوشیمیایی تطبیق پذیری بیشتری نسبت به دیپلوئیدها نسبت به محیط پیرامون آنها ایجاد کند، که به آنها اجازه می‌دهد در شرایط متفاوت و متغیر محیطی، جریان شفاف را از طریق مسیرهای متابولیکی هدایت کند (Barber 1970؛ Manwell and Baker 1970). افزایش فعالیت آنزیمی در گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید در این مطالعه می‌تواند به دلیل افزایش سطح پلوئیدی باشد. افزایش فعالیت آنزیمی با افزایش سطح پلوئیدی در چندین گیاه تتراپلوئید مانند پرتقال[۱] (Shafieizargar *et al*., 2013)، نیلوفر صحرایی[۲] (Zhang *et al*., 2010)، گل مکزیکی[۳] (Talebi *et al*., 2017)، اقاقیای سیاه[۴] (Luo *et al*., 2017)، گل گاوزبان ایرانی[۵] (Azoush *et al*., 2014) و جو[۶] (Tabatabaei, 2013) گزارش گردید.

۱. *Citrus sinensis*

۲. *Dioscorea*

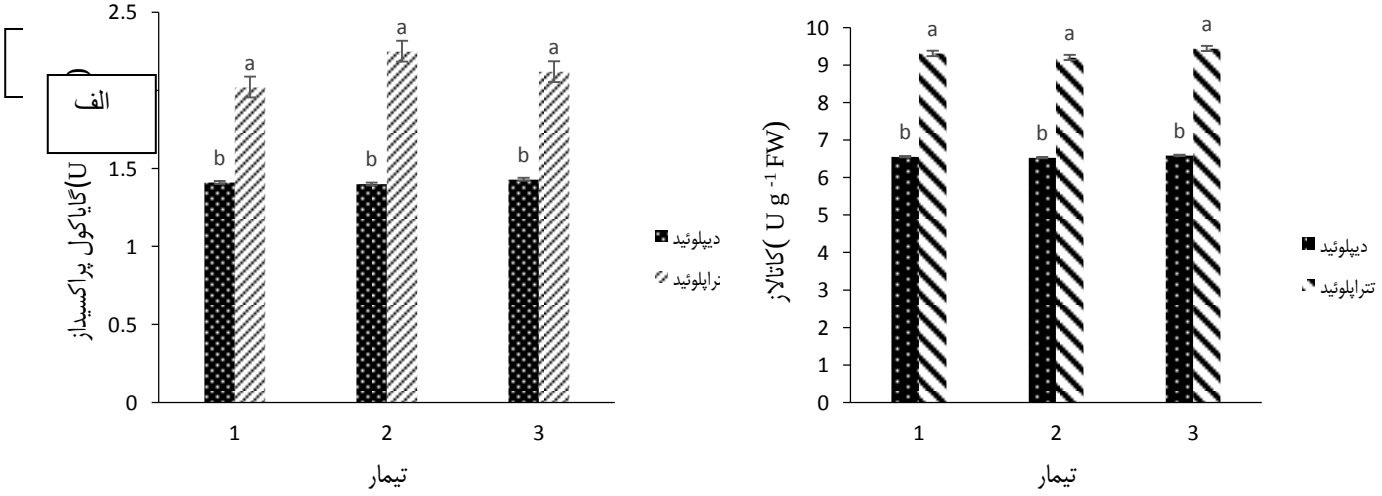
۳. *Agastache foeniculum*

IrHC2019

جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس آنزیم‌های آنتی اکسیدانی گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید خشخاش ایرانی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		کاتالاز	گایاکول‌پراکسیداز
تیمار	۱	۵۷/۲۶**	۰/۶۷**
اشتباه آزمایشی	۴	۰/۰۷	۰/۰۰۶
ضریب تغییرات (درصد)		۳/۳۵	۷/۵۹

**، به ترتیب نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح به ترتیب ۵ و ۱ درصد می‌باشند.



شکل ۲- میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (الف) و گایاکول‌پراکسیداز (ب) در گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید (شاهد) خشخاش ایرانی

منابع:

Berkov, S. and Philipov, S. 2002. Alkaloid production in diploid and autotetraploid plants of *Datura stramonium*. Pharmaceutical biology. 40(8):617–621.

Chen, L. L. and Gao, S. L. 2007. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in Astragalus membranaceus. Scientia Horticulturae. 112:339–344.

Griesbach, R and Kam, K. 1995. The effect of inducted polyploidy on the flavonols of *Petunia 'Mitchell*. Phytochemistry, 42 (2): 361-363.

٤ . *Robinia pseudoacacia*

٥ . *Echium amoenum*

٦ . *Hordeum vulgare*

IrHC2019

Lalezari, I.A, Shafiee, A. and Nasseri-Nouri, P.1973. Isolation of alpinigenine from *Papaver bracteatum*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 62: 17-18.

Madani, H., Hosseini, B., Dehghan, E. and Rezaei- chiyaneh, E. 2015. Enhanced production of scopolamine in induced autotetraploid plants of *Hyoscyamus reticulatus* L. Acta Physiologiae Plantarum. 37:55

Rezaei, B. and Damiri, S. 2010. Development of a voltammetric procedure for assay of thebaine at a multi-walled carbon nanotubes electrode: quantification and electrochemical studies. Journal of solid state electrochemistry, 14: 1079 – 1088.

Saharkhiz M. J., Davies, N., Omidbaigi R and Karimzadeh, Gh. 2007. The effect of ploidy level on the parthenolide content of flower and leaf samples of feverfew *Tanacetum parthenium* L. 3ndCongress of Medicinal Plants. Shahed University, Tehran. Iran.

Tabatabaei, S.A. 2013. Changes in proline, protein, catalase and germination characteristics of barley seeds under salinity stress. International Research Journal of Applied and Basic Sciences. 10: 1266-1271.

Talebi, S.F., Saharkhiz, M.J., Jafarkhani Kermani, M., Sharafi, Y. and Raouf Fard, F. 2016. Effect of different antimitotic agents on polyploid induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.). International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics. 70(2): 184-193.

Thomas G. Ranney. 2006. Polyploidy: From Evolution to New Plant Development. Combined Proceedings International Plant Propagators Society, 56: 137-142.

Zhang, Z., Dai, H., Xiao, M. and Liu, X. 2008. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. Euphytica. 159:59–65.

The Effect of Ploidy Induction on the Activity of Certain Antioxidant Enzymes of Iranian poppy (*Papaver Bracteatum* Lindl)

Seyed Hadi Madani[1], Bahman Hosseini*[1], Ghasem Karimzade[2], Amir Rahimi[3]
[1, 1*] Department of Horticulture, Urmia University, Urmia, Iran
[2]Department of Biotechnology and Plant Breeding, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3] Department of Agronomy, Urmia University, Iran
[*]*Corresponding Author: b.hosseini@urmia.ac.ir*

Abstract
Persian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.) is a Perennial plant of the family Papaveraceae, is an important medicinal plant is mainly known for the high amounts of valuable thebaine alkaloid. Today using of polyploidy techniques by used chemical mutagen such as colchicine, as a widely used medicinal plant breeding. In this study the effect of different concentrations of colchicine (0, 0.5, 0.1, 0.2, 0.5 and 0.75 %) and three duration times (24, 48, 72 hours) in greenhouse medium was investigated. The results of cytogenetic analysis showed that 0.2% and 48-hours induction induced successful polyploid plants. The activity level of antioxidant enzymes including catalase and guaiacol peroxidase in polyploidy plants was significantly different from that of control. Therefore, it can be concluded that ploidy induction induces resistance to stress due to increased activity of antioxidant enzymes.

Keywords: *Papaver bracteatum* lindl, colchicine, catalase, guaiacol peroxidase

IrHC2019