# بررسی تأثیر غلظت و مدت زمان تیمارهای مختلف کلشی‌سین بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه خشخاش ایرانی (*Papaver bracteatum* lindl)

سیدهادی مدنی[۱]، بهمن حسینی*[۱]، قاسم کریم‌زاده[۲]، امیر رحیمی[۳]
[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 داروئی مهم حاوی ترکیبات با ارزشی مثل تبائین می باشد. امروزه استفاده از 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، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد) در شرایط گلخانه و در سه دوره زمانی (۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت) بررسی گردید. نتایج بررسی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نشان داد که در غلظت ۰/۲ درصد و دوره القای ۴۸ ساعت حداکثر گیاهان تتراپلوئید تولید می‌شود. صفات متعددی نظیر طول و عرض برگ، طول و عرض و ضخامت دمبرگ در گیاهان تتراپلوئید در مقایسه با گیاهان شاهد (دیپلوئید) تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. همچنین میزان فنل در گیاهان تتراپلوئید نسبت به شاهد تفاوت معنی داری را نشان داد. حداکثر زنده‌مانی گیاهچه‌ها در غلظت ۰/۰۵ درصد و دوره زمانی ۲۴ ساعت مشاهده گردید.**

***کلمات کلیدی*: خشخاش ایرانی، پلی‌پلوئیدی، کلشی‌سین، فنل، درصد زنده‌مانی**

## مقدمه

گیاهان به‌عنوان 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). 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 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 (*Colchicum autumnal*) می‌باشد 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 چند برابر کردن کروموزوم درتعداد معدودی از گیاهان داروئی مانند بابونه گزارش شده است (Saharkhiz *et al*., 2007).

از آنجایی که برگ، ساقه و ریشه از مهمترین اندام‌های مورد استفاده درگیاهان دارویی محسوب می‌شوند، بنابراین القاءپلی‌پلوئیدی مصنوعی باعث افزایش تولید ترکیب‌های مهم دارویی و همچنین افزایش اندازه این اندام‌ها در مقایسه با انواع دیپلوئید گونه مورد نظر می‌گردد. با توجه به اهمیت و نقش آلکالوئید خشخاش ایرانی، انتظار می‌رود القاء پلوئیدی منجر به ایجاد تغییراتی در صفات مورفولوژیک و عملکرد این گیاه گردد. بنابراین، این پژوهش با هدف بررسی امکان تولید گیاه پلی‌پلوئید خشخاش ایرانی در شرایط گلخانه با استفاده از کلشی‌سین انجام گردید.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و تهیه کلشی سین

این پژوهش در بهار ۱۳۹۵ در گلخانه تحقیقاتی و آزمایشگاه گروه باغبانی دانشکده کشاورزی ارومیه انجام شد. بذور مورد نیاز برای پژوهش مورد نظر از منطقه غرب ایران جمع‌آوری گردید. به منظور برطرف کردن خواب بذر، ابتدا بذور 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، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد مورد نیاز تهیه شد.

### بررسی زنده‌مانی گیاهچه‌ها پس از اعمال تیمار

در این روش توسط پوشش جاذب ( پنبه )که به محلول کلشی‌سین با غلظت های مورد نظر آغشته شده بود، قسمت انتهایی شاخه تیمار گردید و پس از طی مدت‌زمان های مشخص برداشته شدند. این روش در مرحلهٔ ظهور ۴ تا شش برگ حقیقی انجام شد. آزمایش همراه با شش غلظت مختلف کلشی‌سین (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد) و مدت زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و با ۱۰ تکرار انجام شد. اثر کلشی‌سین روی رشد، نمو و زنده‌مانی گیاهچه‌ها پس از گذشت ۱۵ روز از اعمال تیمارها مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد ریزنمونه‌های زنده مانده شمارش گردید و از تعداد ریزنمونه‌های خشک شده در اثر تیمار کلشی‌سین تفکیک شد.

### مطالعه گیاهان حاصل از تیمار جهت تشخیص تغییرات ایجاد شده

پس از محاسبه میزان مرگ و میر در گیاهان تیمار شده، جهت بررسی تاثیر کلشی‌سین بر برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان باقی مانده، صفاتی به شرح زیر مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد برگ و شاخه‌های جانبی همراه با اندازه‌گیری ارتفاع بوته هر ۲ ماه یکبار در هر سطح پلوئیدی در گیاهچه‌ها شمارش شد. اندازه طول و عرض برگ ها توسط خط کش با دقت ۱mm انجام شد. بعد از مشخص شدن سطح پلوئیدی بوته‌ها با استفاده از فلوسایتومتری و بررسی کاریوتیپی نمونه ها، ضخامت ده برگ و ساقه برای هر سطح پلوئیدی با استفاده از کولیس دیجیتالی و با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر انجام گردید. به منظور استخراج عصاره بافت برگی در سنجش آنتی اکسیدان غیر آنزیمی شامل فنل طبق روش Ting و Attaway (۱۹۷۱) صورت گرفت. این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.2 انجام گردید.

## نتایج و بحث

### زنده مانی ریزنمونه ها

اثر غلظت‌های مختلف کلشی‌سین و زمان بر درصد زنده مانی ریزنمونه در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. بیشترین درصد زنده مانی گیاهچه‌ها (۹۸/۶۷ درصد) در تیمار شاهد مشاهده گردید (نمودار ۱ الف و ب). بین تیمار شاهد و تیمار ۰/۰۵ درصد نیز تفاوت معنی‌داری از لحاظ زنده‌مانی وجود نداشت ولی با تیمارهای ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۰/۷۵ تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید، به طوری که بیشترین و کمترین درصد بقاء ریزنمونه‌ها پس از اعمال تیمار کلشی‌سین به ترتیب در غلظت ۰/۰۵درصد با میانگین بیش از ۹۴/۳۳ درصد زنده‌مانی و غلظت ۰/۷۵درصد برابر با صفر درصد مشاهده گردید. تیمار زمانی ۲۴ ساعت با کلشی‌سین در مقایسه با ۷۲ ساعت تأثیر قابل توجهی بر میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها داشت. هر چند بین زمان‌های ۲۴ ساعت با زمان ۴۸ ساعت در این صفت اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد مشاهده نگردید. در واقع رابطه معکوس بین غلظت کلشی‌سین و بقاء ریزنمونه‌ها در این آزمایش مورد انتظار بود که با سایر بررسی‌های انجام شده روی گیاهان مختلف در شرایط طبیعی و درون شیشه‌ای مانند گیاه *Astragalus memberanaceus* مطابقت داشت. هردو ریزنمونه‌های بدون تیمار و تیمار شده با کلشی‌سین با واکشت‌های بعدی به طور تقریباً مساوی رشد کردند. به نظر می‌رسد کلشی‌سین منجر به یک تأخیر اولیه در رشد می‌شود و پس از این مرحله، رشد ریزنمونه‌ها به صورت عادی و همانند گیاهان شاهد ادامه خواهد یافت (Chen and Gao, 2007).

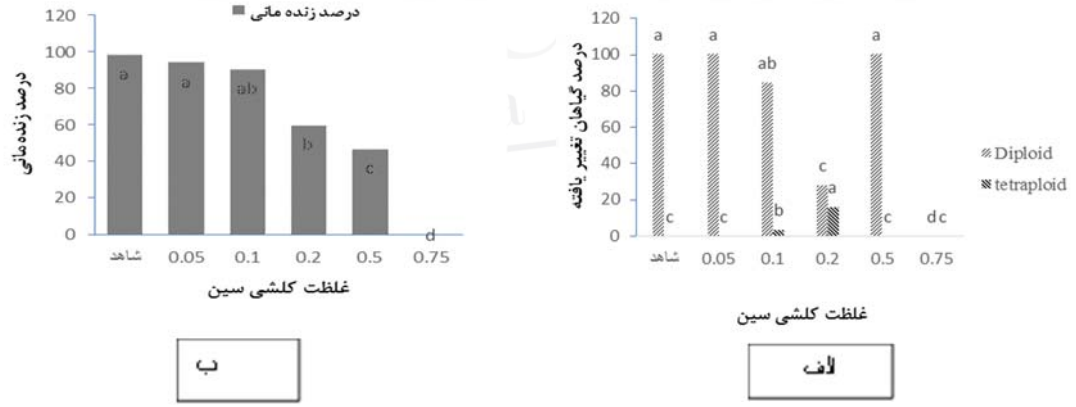
### تفاوت‌های مورفولوژیکی بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید بذرالبنج مشبک

ویژگی‌های مورفولوژیکی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید ۱۵ روز بعد از اعمال تیمار مورد ارزیابی قرار گرفتند. در اکثر موارد، اولین برگ‌های گیاهان تتراپلوئید ظاهر دفرمه پیدا کردند، اما برگ‌های بعدی ظاهر طبیعی داشتند. طول و عرض برگ، ضخامت و طول دمبرگ بین گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول ۱).

جدول۱- مقایسه صفات مورفولوژیکی بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید خشخاش ایرانی

| گیاه | دیپلوئید (2n) | تتراپلوئید (4n) |
|---|---|---|
| طول برگ (سانتی‌متر) | ۶/۲۴[a] | ۵/۲۵[b] |
| عرض برگ (سانتی‌متر) | ۱/۲۴[a] | ۲/۸۹[b] |
| طول دمبرگ (سانتی‌متر) | ۱/۶۴[a] | ۱/۷۴[a] |
| عرض دمبرگ (میلی متر) | ۲/۰۴[a] | ۲/۹۱[b] |
| ضخامت دمبرگ (میلی متر) | ۰/۳۳[a] | ۰/۶۵[b] |

حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد در بین میانگین ها در آزمون DMRT می باشند.




نمودار ۱- اثر غلظت‌های مختلف‌کلشی سین بر (الف) درصد گیاهان تغییر یافته (ب) بر درصد زنده مانی گیاه خشخاش ایرانی

پلی‌پلوئیدی اثرات قابل توجهی بر تغییر نحوه بیان ژن ها دارد که ممکن است شامل خاموش شدن یا روشن شدن برخی از ژن‌هایی شود که دو برابر شده‌اند. الگوی تغییر بیان ژن در سلول‌ها و اندام‌های مختلف و حتی در ژنوتیپ‌های مختلف یک گیاه می تواند متفاوت باشد (Chen and Gao, 2007). نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات Zhang و همکاران (۲۰۰۸) روی گیاه *Phlox subulata* و نتایج Tang و همکاران (۲۰۱۰) روی گیاه *Paulownia tomentosa* و همچنین نتایج *Allum* و همکارانش (۲۰۰۷) روی گیاه *Rosa rugosa* بر زنده‌مانی و صفات مورفولوژیکی مشابه بود.

## اثر پلی پلوئیدی بر میزان فنل کل

گیاهان پلی پلوئید توانایی افزایش تولید و انباشتگی متابولیت‌های ثانویه را دارند (Berkow and Philipov, 2002) که این عمل سبب افزایش مقاومت در برابر تنشهای غیر زیستی در گیاهان می شود. در گیاه خشخاش ایرانی افزایش سطح پلوئیدی تأثیر معنی داری را در میزان فنل گیاهان تتراپلوئید نسبت به دیپلوئید داشت (نمودار۲). بنابراین می توان گفت افزایش تعداد کروموزومها بر روی میزان فنل اثر داشته است. این نتیجه در تطابق با نتایج Griesbach و Kam(۱۹۹۵) روی گیاه اطلسی می‌باشد که نشان داد القای پلوئیدی سبب افزایش فنول شد. افزایش تعداد کروموزومها و مقدار ژن‌های وابسته می تواند در بعضی موارد بیان و غلظت متابولیتهای ثانویه و مواد شیمیایی دفاعی را افزایش دهد، با این حال این مورد در همه گیاهان صادق نیست و ممکن است در بعضی موارد ارتباط مشخصی بین مقدار ژن، خاموش شدن ژن و بیان متابولیتهای ثانویه وجود نداشته باشد (Thomas and Ranney.2006).

نمودار ۲- میزان فنل کل در گیاهان تتراپلوئید و شاهد (دیپلوئید) خشخاش ایرانی

## منابع

**Allum, J.F., Bringloe, D.H. and Roberts, A.V. 2007.** Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. Hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. Plant Cell Reports; 26:1977–1984.

**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.

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

**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.

**Tang, Z.Q., Chen, D.L., Song, Z.J. and Cai, D.T**. **2010.** *In vitro* induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa,* Plant Cell Tissue and Organ Culture; 2:213-220

**Ting, S.V., and Attaway, J.A. 1971**. Citrus fruits. In 'The biochemistry of fruits and their products.' Vol. 2. A.C. Hulme ed., Academic Press, New York. pp. 107–179.

**Thomas G. and 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.

# Effect of Concentration and Duration of Colchicine Treatments on Some Morphological and Biochemical Traits of Persian Poppy (*Papaver bracteatum* Lindl)

**Seyed Hadi Madani[1], Bahman Hosseini*[1], Ghasem Karimzadeh[2], Amir Rahimi[3]**
[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. Todays, using of polyploidy induction by chemical mutagen such as colchicine, as a widely used medicinal plant breeding. In this study the effect of different concentrations of colchicine (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 and 0.75 %) and three duration times (24, 48, 72 hours) in greenhouse medium was investigated. The morphological, physiological and biochemical results showed that the highest percentage of ploidy induction was obtained in concentration of 0.2% and 48-hours. Several traits such as length and width, leaf thickness, length and width, petiole thickness in tetraploid plants compared with control plants showed a significant difference. Also, the amount of phenol in polyploidy plants showed that significant difference between tetraploid and control. The maximum plantlets viability was observed at concentration of 0.05% and 24-hours period .**

***Keywords*: *Papaver bracteatum* lindl, polyploidy, colchicine, Phenol, percentage of survival.**