

**القای تتراپلوئیدی در گیاه دارویی زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy* Boiss.) با استفاده از تیمار کلشی سین**علی اکبر زاهدی<sup>۱</sup>، بهمن حسینی<sup>۲</sup>، محمد فتاحی<sup>۳</sup>، اسماعیل دهقان<sup>۳</sup>، سید هادی مدنی<sup>۱</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان دارویی گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه. ۲- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه. ۳- دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی مشهد.

\*آدرس ایمیل نویسنده مسئول: azahedi65@gmail.com

**چکیده**

القای پلی پلوئیدی ابزار مهم در اصلاح گیاهان به شمار می رود. دوبرابر شدن کروموزوم ها در اثر پلی پلوئیدی ممکن است موجب تغییرات مورفولوژی و سیستم پرورش گیاهان شود و در نهایت موجب تولید یک رقم اصلاح شده شود. این مطالعه، یک روش موفق برای القای تتراپلوئیدی *Dracocephalum kotschy* Boiss. به وسیله تیمار کلشی سین از گیاهان دیپلوئید بود. تیمار مریستم انتهایی به روش خیساندن در مرحله دو و چهار برگگی گیاه استفاده شد. کلشی سین در غلظت های ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد در هر یک از این مراحل به کار گرفته شد. در گیاهان تیمار شده با غلظت های ۰/۰۵ و ۰/۵ درصد میزان گیاهان تتراپلوئید بیش از ۸٪ توسط فلوسایتومتری تعیین شد. بررسی های مورفولوژیکی و شاخص های روزنه ای نتایج فلوسایتومتری را تایید کرد. مطالعات سیتولوژیکی افزایش تعداد کروموزوم از سطح دیپلوئید ( $2n=2x=20$ ) به تتراپلوئیدی ( $2n=4x=40$ ) اثبات کرد. از مجموع ۱۶۵ دانها با مانده، ۷/۲۷ درصد تتراپلوئید، ۱۳/۳ درصد میکسوپلوئید و بقیه دیپلوئید بودند. در گیاهان تتراپلوئید روزنه ها به طور قابل توجهی بزرگتر و شاخص روزنه بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود. با توجه به نتایج به نظر می رسد تیمار ۰/۵٪ کلشی سین می تواند به عنوان یک تیمار موثر در القای پلی پلوئیدی در *D. kotschy* باشد.

واژه های کلیدی: *Dracocephalum kotschy* Boiss، تتراپلوئید، شمارش کروموزومی، کلشیسین، فلوسایتومتری**مقدمه**

زرین گیاه با نام علمی *Dracocephalum kotschy* Boiss گیاهی علفی و بومی ایران از خانواده نعناع است. فلاونوئید های متوکسی موجود در قسمت های مختلف گیاه خاصیت ضد سرطانی دارد (۸ و ۳). اطلاعات کمی در مورد اثرات دارویی عصاره برگ زرین گیاه در دسترس است. عصاره برگ آن دارای اثرات ضد درد<sup>۱</sup>، اثرات سیتوتوکسیک<sup>۲</sup> و تاثیر روی سیستم ایمنی<sup>۳</sup> بدن می باشد. همچنین دارای منبع غنی از اسانس می باشد. دست ورزی سطح پلوئیدی، ابزار توانمندی در اصلاح ژنتیکی بسیاری از گیاهان است (۶). القاء پلی پلوئیدی در گیاهان اغلب موجب تولید واریانتهایی جدید با کیفیت متمایز می شود و از سوی دیگر از طریق دو برابر شدن سطح کروموزومی، افزایش تعداد نسخه های ژنی بیان کننده ترکیبات موثر و افزایش جثه گیاه، موجب بیشتر شدن ترکیبات ثانویه و دارویی آن می شود (۱۰). موثرترین ماده ای که به منظور تحریک پلی پلوئیدی شناخته شده است، کلشی سین است. انگیزش پلی پلوئیدی در بسیاری از گیاهان دارویی موجب افزایش مواد موثره آنان شده است. ماده موثره آرتمیزین در گیاهان تتراپلوئید *Artemisia annua* ۶ برابر بیشتر از گیاهان دیپلوئید بود (۲). در گیاه شاهبیزک، بنگدانه و داتوره آلکالوئیدهای تروپانی در اثر افزایش سطح پلوئیدی افزایش یافته اند (۱). هدف از انجام این تحقیق بررسی تیمارهای مختلف کلشی سین بر سطوح پلوئیدی زرین گیاه بود تا بتوان از این طریق گامی در جهت اصلاح آن برداشت.

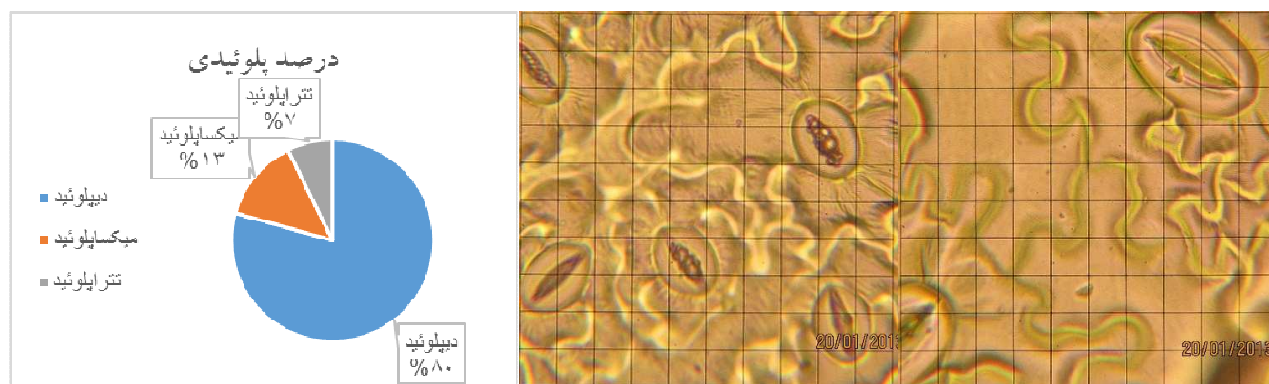
<sup>1</sup> antinociceptive<sup>2</sup> cytotoxic<sup>3</sup> immunomodulatory

## مواد و روش

این پژوهش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی، در سال ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ در گلخانه تحقیقاتی گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه انجام گردید. بذور مورد استفاده از شهرستان گچسار جمع آوری شد. بذور ابتدا توسط اسید سولفوریک غلیظ به مدت ۱۰ دقیقه جهت شکستن خواب بذر و حداکثر جوانه زنی تیمار شدند. به منظور افزایش سطوح پلوئیدی در این گیاه از روش گلوله پنبه ای آغشته به کلشی سین استفاده شد. غلظت های مورد استفاده عبارت بودند از ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ در صد و شاهد که در مرحله دو برگ لپه ای و دو برگ حقیقی به مدت ۴۸ ساعت با بکارگیری ۱۰ تکرار برای هر تیمار انجام شد. مرحله اول تعیین سطح پلوئیدی گیاهان حاصل از تیمار شامل شناسایی گیاهانی بود که در مراحل اولیه رشد و نمو از نظر صفات مورفولوژیکی با گیاهان شاهد تفاوت داشتند. مرحله دوم شامل تعیین سطح پلوئیدی با استفاده از شاخص های روزنه ای (تراکم روزنه و طول و عرض روزنه) بود. و در نهایت برای اثبات نتایج فوق سطح پلوئیدی گیاهان مذکور با استفاده از دستگاه فلوسایتمتری و شمارش کروموزومی تعیین شد، در آخر گیاهان دیپلوئید با گیاهان میکسوپلوئید و تراپلوئید حاصله از نظر برخی صفات با یکدیگر مقایسه شدند.

## نتایج و بحث

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کلشی سین درصد زنده مانده مانی کاهش می یابد. از ۲۲۵ گیاهچه تیمار شده با کلشی سین ۷۳/۳ درصد زنده ماندند که بعد از بررسی های مورفولوژیکی و سیتولوژیکی ۷/۲۷ درصد تراپلوئید، ۱۳/۳ درصد میکسوپلوئید و ۷۹/۴ درصد دیپلوئید بودند (شکل ۱). در این میان غلظت ۰/۵ درصد کلشی سین به دلیل این که نسبت به سایر غلظت ها درصد مرگ و میر کمتری داشت و در عین حال بیشترین درصد (۱۲٪) گیاهان تراپلوئید را تولید کرد که به عنوان بهترین تیمار جهت انگیزش تراپلوئیدی در زرین گیاه شناخته شد. در مقایسه ویژگی های گیاهان تراپلوئید، میکسوپلوئید با انواع دیپلوئید مشخص شد که افزایش سطح پلوئیدی در زرین گیاه موجب کاهش ارتفاع بوته ها، کاهش تراکم روزنه در واحد سطح، افزایش قطر ساقه و برگ، کاهش تعداد برگ و افزایش میزان کلروفیل در برگ شد. همانطور که انتظار می رفت سلول های تراپلوئید زرین گیاه بزرگتر از نمونه های دیپلوئید بودند. این امر به وضوح در سلول های نگهبان روزنه مشخص بود، تعداد روزنه در گیاهان تراپلوئید ۶۸/۸ عدد در میلی متر مربع و در دیپلوئیدها ۲۰۲/۸ عدد شمارش گردید (شکل ۱). به طور کلی اندازه سلول های نگهبان روزنه از فاکتورهای بسیار مناسب در شناسایی گیاهان تراپلوئید از دیپلوئید می باشد ولی فاکتور صد در صد مطمئن، مخصوصاً در شناسایی نمونه های شیمیر (مخلوط دیپلوئید و تراپلوئید) از تراپلوئید خالص نمی باشد. افزایش اندازه سلولی یکی از سریع ترین و گسترده ترین پیامدهای پلی پلوئیدی می باشد (۵). حجم سلول های تراپلوئید معمولاً حدود دو برابر و سطح غشای آنها حدود یک و نیم برابر سلول های دیپلوئید می باشد که این باعث بزرگتر شدن جثه گیاهان در پاسخ به پلی پلوئیدی می شود (۷). آزمایش های فلوسایتمتری حجم تقریباً دو برابر ژنوم (به صورت نسبی) گیاهان تراپلوئید را نسبت به نمونه های شاهد اثبات نمود. تغییر در پروفیل متابولیتی در اتوپلی پلوئیدها را می توان به خاطر بر هم خوردن مکانیسم های متابولیک تنظیم کننده بیوسنتز ترکیبات منفرد توجیه نمود. اتوتراپلوئیدی باعث افزایش فعالیت آنزیمی در سلول به ازای میلی گرم پروتئین در سیستم های مختلف شده است. در *Todea Barbara*، رابطه مستقیم بین دز ژنی و فعالیت پراکسیدازی وجود دارد. به همین ترتیب، این رابطه برای الکل دهیدروژناز و استراز نیز در تعدادی از گیاهان گزارش شده است (۵). نتایج این تحقیق با نتایج Omidbaigi و همکاران (۲۰۱۰) و Kaensaksiri و همکاران (۲۰۱۱) که با اعمال ماده کلشی سین علاوه بر گیاهان تراپلوئید موفق به تولید گیاهان میکسوپلوئید شدند همخوانی داشت.



شکل ۱- تراکم سلولهای روزنه. سمت راست (تتراپلوئید)، سمت چپ (دیپلوئید) و درصد پلوئیدی

### منابع

- 1- Dhawan, O.P., and U.C. Lavania. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. *Euphytica*. 87: 81-89.
- 2- Gonzalez, L.D.J., and P.J. Weathers. 2003. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. *Plant Cell Rep.*, 21: 809-813.
- 3- Jahaniani, F., SA. Ebrahimi, N. Rahbar-Roshandel, and M. Mahmoudian. 2005. Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and a potential anti-cancer agent. *Phytochemistry* 66 (13):1581-1592.
- 4- Kaensaksiri, T., P. Soontornchainaksaeng, N. Soonthornchareonnon, and S. Prathanturug. 2011. In vitro induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 107 (2):187-194.
- 5- Lavania, UC. 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. *Plant Genetic Resources*; 3: 170 - 7. DOI: 10.1079/PGR200576.
- 6- Madon, M., M.M. Clyde, H. Hashim, Y. Mohd yusuf, H. Mat, and S. Saratha. 2005. Polyploidy induction of oil palm through Colchicine and oryzalin treatments. *Journal of Oil Palm Research*, 17: 110-123.
- 7- Masterson, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*; 264: 421 - 3.
- 8- Moghaddam, G., SA. Ebrahimi, N. Rahbar-Roshandel, and A. Foroumadi. 2012. Antiproliferative Activity of Flavonoids: Influence of the Sequential Methoxylation State of the Flavonoid Structure. *Phytotherapy Research*.
- 9- Omidbaigi, R., S. Yavari, ME. Hassani, and S. Yavari. 2010. Induction of autotetraploidy in dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) by colchicine treatment. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 18 (1):23-35
- 10- 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 and Organ Culture*, 72: 19-25.

## Induction of Tetraploidy in Zarrin-Giah (*Dracocephalum kotschy* Boiss.) by Colchicine Treatment

Ali Akbar Zahedi <sup>1\*</sup>, Bahnan Hosseini <sup>2</sup>, Mohammad Fattahi <sup>2</sup>, Esmail Dehghan <sup>3</sup>, Hadi Madani <sup>1</sup>

1- M. Sc. Student of Medicinal Plants, Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

2- Assistant Prof., Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

3- Ph.D. Students of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

\*Corresponding author Email address: azahedi65@gmail.com

### Abstract

Polyploidy induction is an effective tool in plant breeding. Chromosome duplication and polyploidization may affect plant morphology and breeding systems, ultimately enabling the production of improved genotypes. In this study, an efficient procedure was established for successful induction of tetraploid *Dracocephalum kotschy* Boiss by treating diploid explants with colchicine. Treatment of seedlings apical meristem was carried out in two growth phase through presoaking manner at the two and four-leaf plants. Colchicine at a concentration of 0, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 % (w/v) were applied in each of these stages. Tetraploids were obtained at a frequency of over 8% by using 0.05% colchicine and 0.5% colchicine treatment as determined by flow cytometry. Cytological and morphological evidence confirmed the results of flow cytometric analysis. Cytological analyses showed the increase of chromosome numbers from  $2n=2x=20$  to  $2n=4x=40$ . The results of this study demonstrated for the first time that chromosome counting in *D.kotschy*. Of a total of 165 surviving seedlings, 7.27% were found to be tetraploids, 13.3% were chimeras while the remainder were diploids. Tetraploid plants demonstrated significantly longer stomata and a higher stomatal index compared to those of the diploid control plants. It seems that according to the results 0.5% of colchicine can be as an effective treatment on polyploidy induction in *D. kotschy*.

Keywords: *Dracocephalum kotschy* Boiss. , Tetraploid, chromosome counting, Colchicine, Flow cytometry.