

(OPEN ACCESS)

The Effect of Colchicine Treatment and *In vitro* Polyploidy Induction on Quantity and Quality of the Phenolic Compounds of *Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don

Elnaz Norouzi Pakzad¹, Ahad Hedayati^{*2}, Hadi Madani³

1. Ph.D. Secondary Metabolite Production in Biological System Research Department, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), West Azarbaijan Branch, Urmia, Iran. E-mail: e.norouzi@urmia.ac.ir
2. Corresponding Author, Assistant Prof., Secondary Metabolite Production in Biological System Research Department, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), West Azarbaijan Branch, Urmia, Iran. E-mail: a.hedayati@urmia.ac.ir
3. Ph.D. Graduate, Dept. of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: madani75@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 06.18.2024
Revised: 08.13.2024
Accepted: 09.09.2024

Keywords:
Catharanthus roseus (L.),
Cultivar,
In vitro Culture,
Polyphenol,
Tetraploid,
Total phenolic and flavonoid

ABSTRACT

Background and Objectives: *Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don) is an important medicinal plant with a wide distribution that has attracted increasing attention due to its high pharmacological value and different biological activities such as antioxidant, antibacterial, antifungal, anti-diabetic, and anti-cancer. Besides alkaloids, this plant produces a wide range of phenolic compounds. Due to the effects of polyploidy on the growth and development of plants, chromosome doubling has been used as a method in plant breeding to increase the valuable desired compound levels and improve morphological characteristics, and these changes depend on the plant species and cultivar. Hence, the aim of this paper was to explore the possibility of using polyploidy as a breeding method to compare the growth traits also investigate total phenolic and flavonoid content as well as, polyphenolic compounds accumulation between tetraploid and diploid plants in 'Red Really' and 'Polka Dot' cultivars.

Materials and Methods: In this study, *in vitro* apical buds of seedlings of 'Red Really' and 'Polka Dot' cultivars, were treated by various concentrations of colchicine (0, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5%) at three exposure time (24, 48 and 72 h). To distinguish the ploidy level of seedlings flow cytometry and chromosome counting were performed. After establishing tetraploid seedlings, total phenol and flavonoid content was measured. Extraction and analysis of phenolic compounds conducted using High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis.

Results: In our experiment, the concentration and exposure time of colchicine and their interaction effected the tetraploidy percentage. Karyotype analysis suggested that the number of chromosomes in the diploids species was $2n=2x=18$ and tetraploids plants contained $2n=4x=36$. The maximum tetraploidy frequency was observed at the 0.2% colchicine for 48h in 'Red Really' and 0.1% colchicine for 48h in 'Polka Dot'. The polyploid seedlings produced, visible changes in total phenol and flavonoid content compared to diploids. Also, gallic acid, caffeic acid,

chlorogenic acid, rutin, coumaric acid, rosmarinic acid, quercetin, cinnamic acid and apigenin content increased compared to diploid plants.

Conclusions: Despite the high economic and therapeutic value of *C. roseus*, there has been scarce investigation of polyploidy induction on various cultivars of this plant, although there are previous protocols, but they may not be effective on all cultivars. According to our results, polyploidization caused a significant increase in polyphenolic compound contents, especially cinnamic acid, apigenin, and quercetin in "Polka Dot". On the other hand, induced tetraploids of both cultivars had a significantly higher content of total phenol and flavonoid. Also, our results showed that polyploidization allows the creation of plant forms containing greater amounts of biologically active compounds than their diploid counterparts and resulting polyploid lines have the potential to be used in breeding programs to develop *C. roseus* cultivars.

Cite this article: Norouzi Pakzad, Elnaz, Hedayati, Ahad, Madani, Hadi. 2025. The Effect of Colchicine Treatment and *In vitro* Polyploidy Induction on Quantity and Quality of the Phenolic Compounds of *Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don. *Journal of Plant Production Research*, 32 (2), 155-173.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/jopp.2024.22526.3152

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

اثر تیمار کلشی‌سین و القاء پلی‌پلوئیدی در شرایط درون‌شیشه‌ای بر کمیت و کیفیت ترکیبات فنلی پروانش (*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don)

الناز نوروزی پاکزاد^۱، احد هدایتی^{۲*}، هادی مدنی^۳

۱. دکتری گیاهان دارویی، گروه پژوهشی تولید متابولیت‌های ثانویه در سامانه‌های زیستی، جهاد دانشگاهی آذربایجان غربی، ارومیه، ایران. رایانامه: e.norouzi@urmia.ac.ir
۲. نویسنده مسئول، استادیار گروه پژوهشی تولید متابولیت‌های ثانویه در سامانه‌های زیستی، جهاد دانشگاهی آذربایجان غربی، ارومیه، ایران. رایانامه: a.hedayati@urmia.ac.ir
۳. دانش‌آموخته دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: madani75@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی-پژوهشی	سابقه و هدف: پروانش (<i>Catharanthus roseus</i> (Linn.) G. Don) گیاه دارویی مهم با پراکندگی وسیع می‌باشد که به دلیل دارا بودن طیف وسیعی از ترکیبات فیتوشیمیایی با فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف مانند خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد دیابتی و ضد سرطانی، توجه روزافزونی را به خود جلب کرده است. این گیاه علاوه بر آلکالوئیدها، طیف وسیعی از ترکیبات فنلی را تولید می‌کند. به دلیل تأثیرات پلی‌پلوئیدی بر رشد و توسعه گیاهان، دوبرابر شدن کروموزوم به عنوان یک روش در اصلاح گیاهان برای افزایش سطوح ترکیبات با ارزش و بهبود ویژگی‌های مورفولوژیکی به کار گرفته شده است که این تغییرات ایجاد شده به گونه و ارقام مختلف گیاهی نیز بستگی دارد. از این‌رو، هدف این مقاله بررسی امکان استفاده از پلی‌پلوئیدی به عنوان یک روش اصلاحی برای مقایسه صفات رشدی و هم‌چنین بررسی محتوای فنل و فلاونوئید کل و هم‌چنین میزان تجمع ترکیبات فنلی بین گیاهان تتراپلوئیدی و دیپلوئیدی ارقام "Red Really" و "Polka Dot" بود.
واژه‌های کلیدی: پروانش، پلی‌فنل، تتراپلوئیدی، فنل و فلاونوئید کل، کشت درون‌شیشه‌ای	مواد و روش‌ها: در این پژوهش جوانه‌های انتهایی گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای ارقام 'Red Really' و 'Polka Dot' با غلظت‌های مختلف کلشی‌سین (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد) و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. به منظور تشخیص سطح پلوئیدی، آنالیز فلوسایتمتری و شمارش کروموزوم انجام شد. پس از تعیین نمونه‌های تتراپلوئید، محتوای فنل و فلاونوئید کل اندازه‌گیری شد. استخراج و آنالیز ترکیبات فنلی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام گردید.

یافته‌ها: بر اساس نتایج حاصل غلظت و مدت زمان تیمار با کلشی سین و اثر متقابل آن‌ها بر درصد تراپلوئیدی تأثیر داشت. بررسی کاربوتاپ نشان داد که تعداد کروموزوم‌ها در گونه‌های دیپلوئید $2n=2x=18$ و گیاهان تراپلوئیدی حاوی $2n=4x=36$ بود. بیش‌ترین میزان القاء تراپلوئیدی در 'Red Really' در تیمار $0/2$ درصد کلشی سین به مدت ۴۸ ساعت و در رقم 'Polka Dot' در تیمار $0/1$ درصد و به مدت ۴۸ ساعت مشاهده شد. دستکاری پلوئیدی باعث تغییرات قابل‌توجهی در محتوای فنل و فلاونوئید کل در نهال‌های پلی پلوئید نسبت به دیپلوئید شد. هم‌چنین گالیک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، روتین، کوماریک اسید، رزمارینیک اسید، کوئرستین، سینامیک اسید و آپی ژنین در گیاهان تراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئیدی افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: علی‌رغم ارزش اقتصادی و دارویی گیاه پروانش، پژوهش‌های کمی در مورد القاء پلی‌پلوئیدی روی ارقام مختلف این گیاه انجام شده است، اگرچه دستورالعمل‌های قبلی وجود دارد، اما ممکن است بر روی همه ارقام مؤثر نباشد. با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر، القاء پلی‌پلوئیدی باعث افزایش قابل‌توجهی در میزان ترکیبات پلی‌فنلی به‌خصوص سینامیک اسید، آپی ژنین و کوئرستین در رقم "Polka Dot" شد. از طرفی محتوای فنل و فلاونوئید کل نیز در اثر القاء پلی‌پلوئیدی در هر دو رقم افزایش یافت. نتایج ما نیز به خوبی نشان داد که پلی‌پلوئیدی اجازه می‌دهد تا اشکال گیاهی حاوی مقادیر بیش‌تری از ترکیبات فعال بیولوژیکی نسبت به فرم‌های دیپلوئید اولیه آن‌ها ایجاد شود و لاین‌های پلی پلوئید حاصل پتانسیل استفاده در برنامه‌های اصلاحی برای توسعه ارقام پروانش را دارند.

استناد: نوروژی پاکزاد، الناز، هدایتی، احد، مدنی، هادی (۱۴۰۴). اثر تیمار کلشی سین و القاء پلی‌پلوئیدی در شرایط درون‌شیشه‌ای بر کمیت و کیفیت ترکیبات فنلی پروانش (*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don). نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، ۳۲ (۲)، ۱۷۳-۱۵۵.

DOI: 10.22069/jopp.2024.22526.3152



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی سابقه طولانی دارد. اطلاعات اتنوبوتانیکی (مردم گیاه‌شناسی) در مورد گیاهان دارویی و استفاده از آنها توسط فرهنگ‌های بومی در حفاظت از فرهنگ‌های سنتی، تنوع زیستی، مراقبت‌های بهداشتی جامعه و توسعه دارو مفید است. پروانش (*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don) یکی از گیاهان دارویی مهم متعلق به تیره خرزهره (Apocynaceae) می‌باشد که در ایران با نام پیچ تلگرافی نیز شناخته می‌شود. هشت گونه شناخته شده از این گیاه وجود دارد که هفت مورد آن اندمیک ماداگاسکار هستند با این حال، گونه *C. roseus*، به‌طور گسترده در سراسر جهان گسترش یافته است (۱). ترکیبات فعال اصلی این گیاه عبارتند از اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها. این مواد فعال مسئول برخی از عملکردهای محافظتی در بدن انسان می‌باشند و در فعالیت‌های مهم آنتی‌اکسیدانی، ضد حساسیت، آنتی‌بیوتیکی، کاهش قند خون و ضد سرطان نقش دارند (۲). پروانش حاوی مقادیر قابل‌توجهی ترکیبات فرار و فنلی از جمله flavonoid glycosides و caffeoylquinic acids است که به فعالیت آنتی‌اکسیدانی معروف هستند و نقش مهمی در سیستم دفاعی بدن دارند (۳). بیش‌تر پژوهش‌ها عمدتاً بر روی آلکالوئیدهای این گیاه متمرکز شده است و اطلاعات کمی در خصوص سایر متابولیت‌های ثانویه آن موجود می‌باشد. با توجه به کاربرد این گیاه در درمان دیابت، به عنوان بیماری با شیوع و میزان مرگ و میر بالا در سرتاسر جهان، در پژوهشی عصاره آبی فاقد آلکالوئید تهیه شده از ساقه پروانش، اثر کاهنده قند خون را نشان داد. آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) عصاره فاقد آلکالوئید، حضور حداقل سه ترکیب پلی‌فنلی ناشناس را نشان داد (۴). از این نظر، وجود ترکیبات

پلی‌فنلی در گیاهان ضروری به‌نظر می‌رسد، زیرا آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند، قادر به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد بوده، می‌توانند از آسیب سلولی جلوگیری کنند و اثر محافظتی در برابر ایجاد عوارض دیابت ارائه دهند (۵). ترکیبات فنلی گیاهی چندین گروه از ترکیبات مانند فنل‌های ساده، اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها، تانن‌ها و لیگنین‌ها را شامل می‌شوند و به‌طور گسترده در گیاهان توزیع می‌شوند و به‌ویژه در سطوح افزایش یافته، چه به عنوان ترکیبات محلول و چه به صورت ترکیبات دیواره سلولی، در نتیجه برهمکنش گیاه با محیط خود وجود دارند (۶). آزمایش‌های فراوانی به‌منظور بهبود تولید آلکالوئیدهای ارزشمند مانند وین کریستین و وین بلاستین صورت گرفته است با این حال، چندین مطالعه بر روی گیاه پروانش هم‌چنین تجمع ترکیبات فنلی را در پاسخ به تنش زیستی و یا غیر زیستی گزارش کردند (۷، ۸). علاوه بر این، تجمع ترکیبات فنلی ممکن است بر مسیرهای بیوسنتزی سایر متابولیت‌های ثانویه از جمله مسیر بیوسنتز آلکالوئیدها تأثیرگذار باشد، زیرا سیستم دفاعی گیاه یک سیستم پیچیده است. هم‌چنین، وجود این اسیدهای فنولیک ممکن است به عنوان نشانگرهای شیمیایی برای تمایز گونه‌ها یا ارقام مورد استفاده قرار گیرند و استخراج این ترکیبات از گیاهان یک مرحله حیاتی است (۹). عوامل مختلفی مانند گونه‌های گیاهی، ارقام و شرایط اقلیمی بر مهار یا ارتقاء رشد و بهره‌وری ترکیبات ثانویه گیاهان تأثیر دارند (۱۰). گزارش‌ها نشان داده است که بین ترکیب فعال بیوشیمیایی و منابع ژنتیکی گیاهان همبستگی بالایی وجود دارد (۱۱). با توجه به اینکه ارقام نقش عمده‌ای در تولید مواد مؤثره دارویی دارند، بررسی تأثیر آنها بر تولید متابولیک گیاهان به ویژه متابولیت‌های ثانویه ضروری است (۱۲). با توجه به ارزش دارویی گیاه

پروانش و هم‌چنین وجود شباهت‌ها و یا تفاوت‌ها از نظر بررسی‌های فیتوشیمیایی ارقام مختلف این جنس، به‌نظر می‌رسد که این تفاوت می‌تواند در امور اصلاحی مؤثر واقع شود. اگرچه ارقام مختلف یک گیاه زیرمجموعه یک گونه در نظر گرفته می‌شوند، اما مشاهده تنوع بسیار آشکار ایجاد شده در ارقام مختلف قابل بحث است. با توجه به این موضوع، در پژوهش حاضر، برای نخستین بار ارقام "Red Really" و "Polka Dot" به منظور ایجاد پلی پلوئیدی انتخاب شدند.

دو برابر کردن کروموزوم (پلی پلوئیدی) ابزار مفیدی برای به دست آوردن ویژگی‌های مطلوب مانند رشد قوی، جثه درشت‌تر و با سطح زیاد، دوره گلدهی طولانی‌تر یا تاخیری و سطوح بالاتر مقاومت در برابر بیماری است (۱۳). علاوه بر این، دو برابر شدن کروموزومی فرصتی برای بررسی تغییرات فیتوشیمیایی جدید ناشی از القاء پلی پلوئیدی در ارقام مختلف پروانش است. استفاده از مواد شیمیایی برای ایجاد تغییرات در تعداد کروموزوم به خوبی ثابت شده است (۱۳). علاوه بر این، بسیاری از مهارکننده‌ها را می‌توان برای جلوگیری از پیشرفت چرخه سلولی در سلول‌های گیاهی در حال تقسیم به کار برد، مانند کلشی سین که برای ایجاد مانع در مرحله متافاز تقسیم میتوز استفاده می‌شود. کلشی سین یک آلکالوئید جدا شده از گیاه *Colchicum autumnale* L. است که با اتصال به دیم‌های توبولین مانع استقرار میکروتوبول‌ها و در نتیجه الیاف دوک در طی تقسیم سلولی می‌شود. علاوه بر این، کلشی سین یک ترکیب معمولی القاء‌کننده پلی پلوئیدی است که به‌طور موثری برای تولید پلی پلوئیدی با توقف میتوز در دوره آنافاز استفاده می‌شود (۱۴). با توجه به پیشرفت‌های جدید در زمینه بیوتکنولوژی گیاهی از طریق کشت آزمایشگاهی ریزنمونه‌های منتخب، می‌توان متابولیت‌های

تانویه را در تمام طول سال تولید کرد. کشت سلولی و بافتی هم‌چنین امکان استفاده از محرک‌ها و روش‌های اصلاحی به‌منظور القاء و یا افزایش تولید متابولیت‌های تانویه را فراهم می‌کند (۱۵). در این مطالعه، گیاهان تتراپلوئیدی حاصل از ارقام "Red Really" و "Polka Dot" با استفاده از کلشی‌سین، توسط آنالیز فلوسایتومتری و شمارش کروموزومی تعیین شد و محتوای فنل و فلاونوئید کل هم‌چنین میزان تجمع ترکیبات پلی فنلی در مقایسه با گیاهان دیپلوئید مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

استقرار درون‌شیشه‌ای، تکثیر و تهیه ریزنمونه گیاهی: بذور ارقام "Red Really" و "Polka Dot" از شرکت PanAmerican خریداری شد. بذرها ابتدا توسط اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۵ دقیقه استریل شدند و سپس سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند. در نهایت، بذرها در محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog) (۱۶) کشت گردیدند. کشت‌ها در شرایط رشدی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد جوانه زدند. یک ماه پس از جوانه‌زنی بذور و رشد گیاهچه‌ها، اندام هوایی با رشد مطلوب از گیاهان جدا شدند و برای باززایی مستقیم در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌منظور رسیدن به تعداد مطلوب ریزنمونه برای القاء پلوئیدی کشت داده شدند. شاخساره‌های تکثیر شده بعد از گذشت چهار هفته در محیط کشت MS فاقد هورمون قرار گرفتند.

القاء پلی پلوئیدی در شرایط درون‌شیشه‌ای: به منظور القاء پلوئیدی، قسمت انتهایی شاخه‌های رشد یافته در

سانتی گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۰ روز از کشت، گیاهچه‌های رشد کرده به محیط کشت MS دارای هورمون ریشه‌زایی IBA منتقل شده و بعد از ریشه دار شدن گیاهچه‌ها، به شرایط گلخانه در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد منتقل شدند. بوته‌ها در گلخانه با مخلوط خاک و پرلیت (۳:۱) در سینی کاشت (۵×۵ سانتی‌متر) و در طی سازگاری اولیه با پوشش پلاستیکی شفاف به مدت هفت روز کشت و سپس پوشش پلاستیکی آن‌ها برداشته شد. در نهایت، ریزنمونه‌ها برای تعیین آنالیز پلوئیدی مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۱).

شرایط درون‌شیشه‌ای به همراه دو برگ به عنوان ریزنمونه استفاده شد. برای این منظور، ریزنمونه‌های جدا شده به طول یک سانتی‌متر بر روی محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف کلشی سین فیلتر شده (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ درصد وزن بر حجم)، برای مدت زمان مشخص شده و در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. پس از سپری شدن دوره تیمار (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)، ریزنمونه‌ها ۳ بار به مدت ۲-۳ دقیقه با آب مقطر استریل شسته شده و سپس برای رشد در محیط کشت MS بدون هورمون (حاوی ۳ درصد ساکارز، ۷ گرم بر لیتر آگار و pH برابر ۵/۷) در دمای ۲۵ درجه



شکل ۱- القاء درون‌شیشه‌ای پلی پلوئیدی در ارقام پروانش: کشت بذر در محیط کشت MS جامد و جوانه‌زنی بذر (A)، کشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف کلشی سین (B) و کشت گیاه‌های سازگار شده دیپلوئید (C) و تتراپلوئید (D) در گلدان جهت انجام ارزیابی صفات فیتوشیمیایی.

Fig. 1. In vitro polyploidy induction in *Catharanthus roseus* cultivars. Seed culture in solid MS medium and seed germination (A), Shoot tip culture in MS medium containing different concentrations of colchicine (B), and of adapted diploid (C) and tetraploid (D) plants Cultivation in pots to phytochemical trait evaluations.

به‌عنوان گیاه مرجع استاندارد استفاده شد. به منظور شمارش کروموزوم‌ها، برگ‌های جوان (۱ سانتی‌متر) جدا شد و با محلول کلشی سین ۰/۲ درصد (وزنی بر حجم) به مدت ۳ ساعت در دمای ۲۵-۳۰ درجه

آنالیزهای سیتولوژیکی، شمارش کروموزومی و فلوسایتومتری: در این مرحله گیاه نخود (*Pisum sativum* cv. Ctirad 2C DNA = ۹/۰۹ pg) با مقدار DNA ژنومی مشخص ۲/۵ pg - ۲C

گردید و سپس نمونه‌ها در دستگاه اولتراسونیک (E120H model, Germany) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. در نهایت، عصاره حاصل از طریق صافی کاغذی عبور داده شده و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد جهت آنالیز میزان فنل و فلاونوئید کل نگهداری شد.

به منظور تعیین میزان فنل کل، ۹۰ میکرولیتر آب و ۶۰۰ میکرولیتر معرف فولین - سیکالتو (۱۰ درصد) به ۳۰ میکرولیتر عصاره متانولی اضافه گردید. پس از وقفه ۵ تا ۱۰ دقیقه‌ای، ۴۸۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۱۰ درصد به مخلوط فوق اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در شرایط تاریکی نگهداری شدند. سپس میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر ثبت شد. در نهایت، مقدار جذب (Y) در معادله به دست آمده با کالیبراسیون $(Y=0.0007X+0.0145)$ درج شد و میزان فنل کل (X) بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر محاسبه شد. اسید گالیک به عنوان استاندارد برای ترسیم منحنی کالیبراسیون استفاده شد (۱۸).

به منظور تعیین میزان فلاونوئید کل، ۱۵۰ میکرولیتر نیتريت سدیم ۵ درصد به ۵۰ میکرولیتر عصاره متانولی اضافه شد. پس از ۵ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، هیدروکسید سدیم ۱ مولار اضافه شد. در نهایت با استفاده از آب دیونیزه، حجم نهایی به ۵ میلی‌لیتر افزایش یافت. میزان جذب در طول موج ۳۸۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر ثبت شد. در نهایت، مقدار جذب (Y) در معادله به دست آمده با کالیبراسیون $(Y=0.0094X+0.0712)$ درج شد و میزان فلاونوئید کل (X) بر حسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر محاسبه شد. از کوئرستین به عنوان استاندارد برای ترسیم منحنی کالیبراسیون استفاده شد (۱۹).

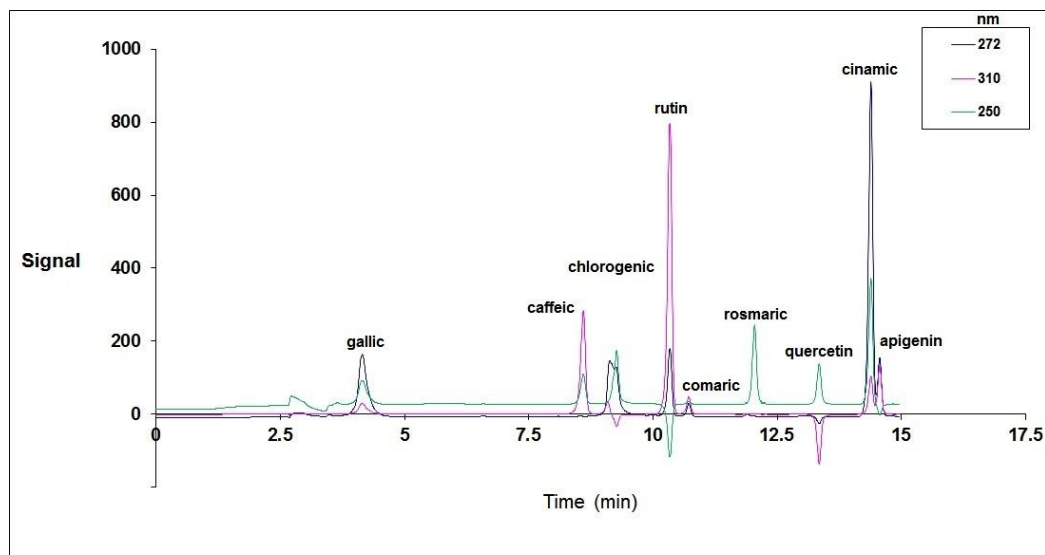
سانتی‌گراد در تاریکی پیش‌تیمار شد. برای تثبیت سلول‌ها در مرحله تقسیم میتوزی، از مایع کارنوی با اتیل الکل ۱:۳ (۹۵ درصد) و اسید استیک گلاسیال به عنوان محلول پیش تیمار استفاده شد. نمونه‌ها توسط اسید کلریدریک ۱ نرمال در حمام آب گرم در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه هیدرولیز شدند. نمونه‌های هیدرولیز شده توسط محلول همتوکسیلین (Sigma-Aldrich) در حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ دقیقه در معرض رنگ آمیزی قرار گرفتند (۱۷). در نهایت، نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ نوری (Olympus CX21, Olympus America Inc.) با بزرگنمایی ۱۰۰× به منظور شمارش کروموزومی مورد بررسی قرار گرفتند.

به منظور بررسی فلوسایتومتری، ۰/۰۳ گرم برگ تازه در ۱ میلی‌لیتر بافر LBO1 (بافر لیز) توسط اسکالپل خرد شد و سوسپانسیون خام حاصل از غشای نایلونی با منافذ ریز (۵۰ میکرومولار) عبور داده شد. سپس، ۲ میلی لیتر از محلول دوم $Otto II, (0.4 M Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O)$ به همراه ۱۲ میکرولیتر محلول رنگ PI (Propidium Iodide) با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۶ میکرولیتر محلول RNase برای حذف RNA به سوسپانسیون حاصل اضافه گردید. باید توجه داشت که PI ماده خطرناک و حساس به نور می باشد و نباید در دسترس شرایط نوری قرار گیرد. در مجموع ۲۰۰۰۰ هسته در هر نمونه با استفاده از فلوسایتومتری (BD FACSCanto II) به دست آمد. هیستوگرام‌ها با استفاده از نرم افزار (FloMax, v. 2.3; Partec GmbH) ارزیابی شدند.

اندازه‌گیری میزان فنل و فلاونوئید کل: به منظور تهیه عصاره متانولی، ۰/۱ گرم از ریزنمونه برگ منجمد شده با استفاده از نیتروژن مایع در هاون آسیاب شد و سپس به لوله‌های آزمایش منتقل شد. ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به هر لوله اضافه

(در طول ۲۵ سانتی متر، قطر داخلی ۴/۶ میلی متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر) انجام شد. منحنی استاندارد براساس سطح زیر منحنی استاندارد تمام ترکیبات (تولید شده توسط شرکت سیگما) در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در میلی لیتر ترسیم شد. سرعت جریان حلال ۱ میلی لیتر در دقیقه بود و فاز متحرک شامل استونیتریل و بافر اسید استیک در نسبت ۱۰:۸۰ بود. انتخاب یک طول موج مناسب یکی از بخش‌های حیاتی تجزیه و تحلیل ترکیبات است. با توجه به این که ترکیبات مورد تجزیه و تحلیل متفاوت بودند، طول موج‌های ۲۷۲ نانومتر (گالیک اسید)، ۳۱۰ نانومتر (اسید کافئیک)، ۲۵۰ نانومتر (کلروژنیک اسید)، ۳۱۰ نانومتر (کوماریک اسید)، ۲۵۰ نانومتر (رزمارینیک اسید)، ۲۷۲ نانومتر (سینامیک اسید و آپی ژنین)، ۳۱۰ نانومتر (روتین) و ۲۵۰ نانومتر (کوئرستین) استفاده شد (شکل ۲) (۲۰).

استخراج و آنالیز ترکیبات فنلی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC): جهت استخراج ترکیبات فنلی، ۰/۵ گرم بافت برگ منجمد توسط نیتروژن مایع آسیاب شد. بلافاصله ۵ میلی لیتر متانول (HPLC Gradient) ۸۰ درصد به آن اضافه شد. مخلوط حاصل در دستگاه اولتراسونیک در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. عصاره متانولی با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از فیلتراسیون (با فیلتر ۰/۲۲ میکرون) برای تجزیه و تحلیل به دستگاه HPLC تزریق شد. جداسازی، شناسایی و تعیین محتوای کمی ترکیبات پلی فنلی با استفاده از دستگاه HPLC سری ۱۱۰۰ (Agilent Co., United States) مجهز به حلقه تزریق با حجم ۲۰ میکرولیتر، پمپ گرادیان چهار حلال و تشخیص آرایه دیود (DAD) انجام شد. فرآیند جداسازی بر روی ستون octadecylsilane



شکل ۲- کروماتوگرام پیک‌های ترکیبات استاندارد پلی فنول‌ها در طول موج‌های مختلف حاصل از آنالیز با دستگاه HPLC.

Fig. 2. Chromatograms of standard peaks at three different wavelengths resulted from the HPLC-DAD device.

آنالیز واریانس یک طرفه و مقایسه میانگین براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد توسط نرم افزار آماری SAS 9.4 انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌های پارامترهای بیوشیمیایی و سیتولوژیکی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار با استفاده از

نتایج و بحث

اثرات القاء پلی‌پلوئیدی بر درصد زنده‌مانی: تیمار کلشی‌سین به‌طور مؤثر سبب القاء پلی‌پلوئیدی در هر دو رقم گردید و مطابق نتایج بیش‌ترین درصد بقاء گیاهچه (۱۰۰ درصد) در تیمار شاهد مشاهده شد. در رقم "Red Really" بیش‌ترین درصد زنده‌مانی (۱۰۰ درصد) در گیاهچه‌های تیمار شده با کلشی‌سین صفر درصد و ۰/۰۵ درصد به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده شد. درصد زنده‌مانی برای سایر غلظت‌ها و مدت زمان تیمار کاهش بود. در رقم "Polka Dot" بیش‌ترین درصد زنده‌مانی (۱۰۰ درصد) در تیمارهای صفر و ۰/۰۵ درصد کلشی‌سین در مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار مشاهده شد، در مقابل کم‌ترین پاسخ در گیاهان پلی‌پلوئید تیمار شده با ۰/۵ درصد کلشی‌سین (۱۰ درصد پاسخ) و ۰/۲ درصد کلشی‌سین (۱۵ درصد پاسخ) و در مدت زمان تیمار ۷۲ ساعت بود (جدول ۱). به‌طور کلی افزایش غلظت کلشی‌سین و افزایش زمان تیمار باعث کاهش محسوس در میزان بقای گیاهچه‌ها در هر دو رقم شد. در واقع، وجود نسبت معکوس بین غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار با میزان بقاء در این آزمایش با گزارش‌های قبلی در مورد *Dendrobium scabrilingue* (۲۱)، *Dionaea muscipula* (۲۲)، *Lycium ruthenicum* (۲۳) و *Dendrobium wardianum* (۲۴) مطابقت داشت. علت اصلی آسیب و مرگ سلول‌های گیاهی در تیمار با کلشی‌سین، اثر سمی بر سلول‌های مریستم است، زیرا کلشی‌سین به عنوان یک ماده جهش‌زا، در عین حال برای گیاه بسیار سمی است که در غلظت‌های نامناسب می‌تواند منجر به مرگ گیاه شود (۲۵). هم‌چنین با توجه به حساسیت بیش‌تر گیاه به کلشی‌سین در مراحل اولیه رشد، استفاده از کلشی‌سین در مراحل اولیه رشد می‌تواند منجر به تاخیر در رشد سلولی و مرگ برخی از گیاهان تیمار شده شود (۲۶). با این وجود، می‌توان نتیجه گرفت که مدت زمان

تیمار، غلظت، مرحله رشد، گونه و رقم نیز نقش مهمی در پاسخ گیاه به تیمار کلشی‌سین دارند (۲۷).
تشخیص تتراپلوئیدی از طریق شمارش کروموزومی و آنالیز سیتومتری: وقوع پلی‌پلوئیدی با استفاده از آنالیز فلوسایتومتری تأیید شد. با توجه به هیستوگرام فلوسایتومتری، گیاهان به دو سطح دیپلوئید و تتراپلوئید طبقه‌بندی شدند. نمودار حاصل از آنالیز فلوسایتومتری براساس رنگ‌های مختلف پیک‌های مربوط به فاز G1 و G2 در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید می‌باشد. موقعیت پیک G1 سلول‌های تتراپلوئید رقم "Red Really" در کانال ۱۰۰ بود (ضریب تغییرات (CV) پیک گیاه دیپلوئید برابر ۵/۷ بود)، اگرچه گیاهان شاهد این پیک را در اطراف کانال ۵۰ نشان دادند (CV گیاه دیپلوئید ۶/۷۲ بود). در سلول‌های تتراپلوئید، پیک فاز G2 در کانال ۲۰۰ قرار دارد که نشان می‌دهد ژنوم سلول در مقایسه با سلول‌های دیپلوئید دو برابر است. در مورد رقم "Polka Dot"، پیک سلول تتراپلوئید در کانال ۱۰۰ مشاهده گردید (CV پیک گیاه دیپلوئید برابر ۶/۰۳ بود) و در ژنوتیپ شاهد، این پیک در کانال ۵۰ (CV پیک گیاه دیپلوئید برابر ۷/۷۰ بود) قرار داشت، هم‌چنین پیک فاز G2 در کانال ۲۰۰ مشاهده شد (شکل ۳). به‌عبارت دیگر اثر متقابل غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار بر القاء در رقم "Red Really" نشان داد که با افزایش غلظت کلشی‌سین تا ۰/۲ درصد و مدت زمان ۴۸ ساعت، میزان پلی‌پلوئیدی افزایش یافت. به‌طوری‌که بیش‌ترین درصد تتراپلوئید (۱۵ درصد) در این تیمار مشاهده گردید، در حالی‌که تیمار ۰/۱ درصد کلشی‌سین به‌مدت ۴۸ ساعت، ۱۰ درصد منجر به القاء تتراپلوئید گردید (شکل ۳). در رقم "Polka Dot"، تیمار کلشی‌سین به میزان ۰/۱ به‌مدت ۴۸ ساعت به‌طور معنی‌داری بیش‌ترین میزان القاء تتراپلوئیدی (۳۰ درصد) را نسبت به شاهد داشت.

جدول ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف و مدت زمان تیمار با کلشی‌سین بر زنده‌مانی و سطوح پلوئیدی ارقام مختلف گیاه دارویی پروانش.

Table 1. The effect of concentration and duration of colchicine treatments on the survival rate and ploidy level of *C. roseus* cv. Red Really and *C. roseus* cv. Polka Dot.

گیاهان تتراپلوئید Tetraploid (4x) (%)	گیاهان دیپلوئید Diploid (2x) (%)	زنده مانى گیاهیچه‌ها بعد از ۱۵ روز Survived plants after 15 Days	تعداد ریزنمونه‌های تیمارشده Number of treated explants	زمان (ساعت) Time (h)	غلظت‌های کلشی‌سین Colchicine Concentration (%)
0 (0)	20 (100)	20 (100%) ^a	20	24	0 (Control)
0 (0)	20 (100)	20 (100%) ^a	20	48	
0 (0)	20 (100)	20 (100%) ^a	20	72	
0 (0)	20 (100)	20(100%) ^a	20	24	0.05
0 (0)	20 (100)	20 (100%) ^a	20	48	
1 (5)	17 (85)	18 (90%) ±1.03 ^a	20	72	
0 (0)	12 (63.3)	12 (60%) ±1.97 ^b	20	24	0.1
2 (10)	8 (40)	10 (50%) ±1.97 ^b	20	48	
2 (10)	7 (35)	9 (45%) ±1.97 ^b	20	72	
0 (0)	11 (55)	11 (55%) ±2.01 ^c	20	24	0.2
3 (15)	6 (30)	9 (45%) ±2.01 ^c	20	48	
0 (0)	8 (40)	8 (40%) ±2.01 ^c	20	72	
0 (0)	7 (35)	7 (35%) ±1.41 ^d	20	24	0.5
0 (0)	6 (30)	6 (30%) ±1.41 ^d	20	48	
0 (0)	6 (30)	6 (30%) ±1.41 ^d	20	72	
0 (0)	20 (100)	20(100%) ^a	20	24	0 (Control)
0 (0)	20 (100)	20(100%) ^a	20	48	
0 (0)	20 (100)	20 (100%) ^a	20	72	
0 (0)	20 (100)	20(100%) ^a	20	24	0.05
0 (0)	19 (95)	20 (100%) ^a	20	48	
0 (0)	17 (85)	19 (95%) ±0.57 ^a	20	72	
2 (10)	11 (55)	15 (75%) ±3.60 ^b	20	24	0.1
6 (30)	4 (20)	13 (65%) ±3.60 ^b	20	48	
0 (0)	6 (30)	8 (40%) ±3.60 ^b	20	72	
0 (0)	8 (40)	12 (60%) ±2.64 ^c	20	24	0.2
0 (0)	9 (30)	11 (55%) ±2.64 ^c	20	48	
2 (10)	3 (15)	7 (35%) ±2.64 ^c	20	72	
0 (0)	3 (15)	3 (15%) ±0.57 ^d	20	24	0.5
0 (0)	2 (10)	2 (10%) ±0.57 ^d	20	48	
0 (0)	2 (10)	2 (10%) ±0.57 ^d	20	72	

C. roseus cv. Red Really

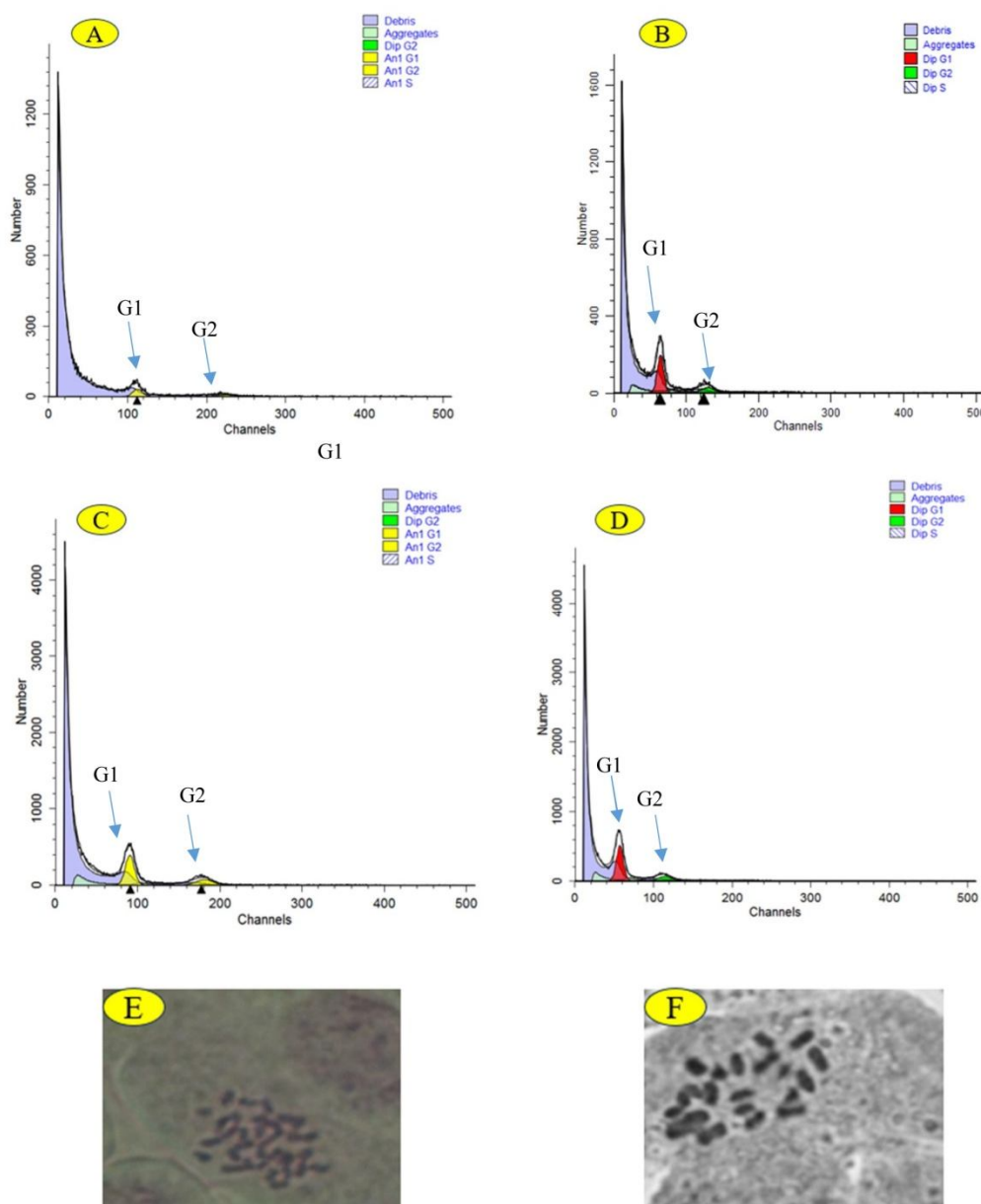
C. roseus cv. Polka Dot

کلشی‌سین یک عامل دوبرابرکننده کروموزوم است که خواص ضد میتوزی آن منجر به از هم گسیختگی میکروتوبول‌ها و القاء پلی‌پلوئیدی می‌شود. غلظت بهینه کلشی‌سین مورد استفاده در تولید پلی‌پلوئید وسیع بوده و این تفاوت بین بالاترین و کم‌ترین غلظت کلشی‌سین صد برابر است. میزان موفقیت در القاء پلی‌پلوئیدی را می‌توان به گونه و رقم تحت بررسی، پروتکل کاربرد کلشی‌سین (در شرایط آزمایشگاهی یا گلخانه)، غلظت و مدت زمان تیمار و هم‌چنین نوع و سن ریزنمونه مورد استفاده نسبت داد (۲۸). هم‌چنین، موفقیت در دو برابر شدن کروموزوم بستگی به نفوذپذیری بافت و توانایی انتقال عوامل ضد میتوزی به بخش‌های مرستم دارد.

به نظر می‌رسد که گیاهان پلی‌پلوئید خالص در نتیجه دو برابر شدن موفقیت‌آمیز سلول‌های تیمار شده در تمام لایه‌های بافتی ناحیه مرکزی تولید می‌شوند که در نهایت گیاهانی با سلول‌های تتراپلوئید همگن تولید می‌کنند (۲۹). آنالیز فلوسایتومتری قادر است جمعیت عظیمی از سلول‌ها را در مدت زمان نسبتاً کوتاهی تجزیه و تحلیل کند و در عین حال می‌تواند وجود میکسوپلوئیدها (بافت هسته‌ای ناهمگن حاوی سلول‌های دیپلوئید و تتراپلوئید) را تشخیص دهد. مطالعات نشان دادند که القاء پلی‌پلوئیدی با استفاده از بذور، گیاهچه‌ها، نوک ساقه و بخش‌های گرهی عمده‌تاً مستعد تولید میکسوپلوئید می‌باشند که یک نتیجه ناخوشایند است. وجود میکسوپلوئیدها اغلب آنالیز را گمراه می‌کند که منجر به نتیجه‌گیری نادرست

احتمالی می‌شود (۳۰). از آنجایی که مرستم‌های گیاهی از تعداد زیادی سلول تشکیل شده‌اند و با در نظر گرفتن این موضوع که کلشی‌سین به‌طور مؤثر تنها سلول‌های تقسیم‌شونده را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد، در نتیجه القاء پلی‌پلوئیدی در همه سلول‌های گیاهچه به‌طور یکسان رخ نمی‌دهد و احتمال رسیدن به بافت‌های هتروزیگوت و میکسوپلوئید وجود دارد. در گزارش‌های مربوط به *Dracocephalum kotschy* و *Echinaceae purpurea* L. و *Watsonia* sp. استفاده از غلظت‌های متفاوت کلشی‌سین به مدت ۴۸ ساعت منجر به تولید گیاهان میکسوپلوئید بدون دستیابی به تتراپلوئید شد (۳۱، ۳۲، ۳۳).

شمارش کروموزوم تأیید نمونه‌های تعیین شده با استفاده از آنالیز فلوسایتومتری را امکان‌پذیر می‌کند. در مطالعه حاضر، نتایج فلوسایتومتری با استفاده از نمونه‌های برگ با نتایج حاصل از طریق شمارش کروموزوم‌ها با استفاده از نمونه‌های نوک برگ‌های جوان هم‌راستا شد. در طی این بررسی مشخص شد که تعداد کروموزوم‌های سلول‌های سوماتیک در گیاهان تتراپلوئید ($2n=4x=36$) در مقایسه با گیاهان ($2n=4x=18$) دو برابر شده است (شکل ۳). شمارش کروموزوم روش دقیقی است زیرا به‌طور مؤثر تعداد کروموزوم‌ها را پیش‌بینی می‌کند. این پژوهش هم‌چنین نشان داد که در شرایط آزمایشگاهی، سلول‌های دیپلوئید تمایل زیادی به افزایش سطح پلوئیدی و تمایل به تتراپلوئیدی نشان دادند (۳۴).



شکل ۳- پروفایل حاصل از آنالیز فلوسایتمتری گیاهان تتراپلوئید (A) و دیپلوئید (B) رقم Red Really، گیاهان تتراپلوئید (C) و دیپلوئید (D) رقم Polka Dot و شمارش کروموزومی گیاهان تتراپلوئید (E) و دیپلوئید (F).

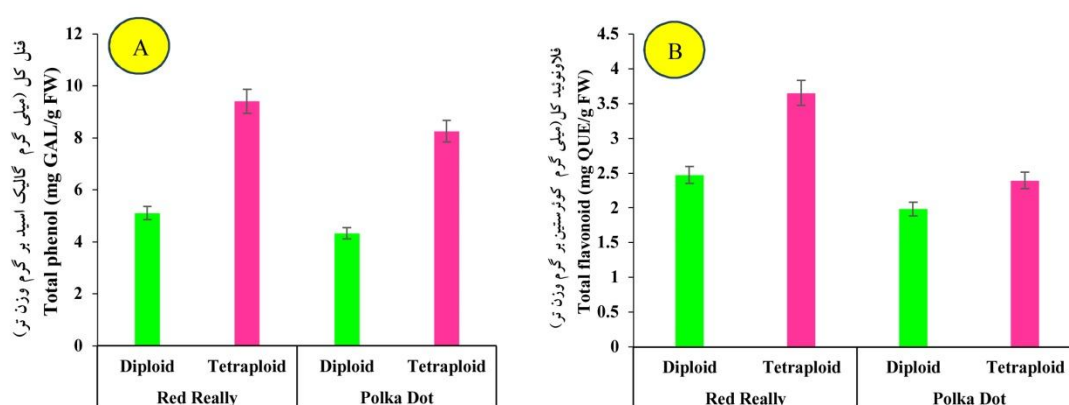
Fig. 3. Flow cytometry profiles of Red Really tetraploid (A) and diploid (B) plants, Polka Dot tetraploid (C) and diploid (D) plants and cytogenic chromosome counting of tetraploid (E) and diploid (F) plants.

دادند که به طور قابل توجهی در نمونه های تتراپلوئید افزایش یافت. در مورد رقم "Red Really" افزایش ۸۴/۳۱ و ۴۷/۷۷ درصدی به ترتیب در میزان فنل و فلاونوئید کل گیاهچه های تتراپلوئید نسبت به نمونه های دیپلوئید ثبت شد. با این حال، حداکثر میزان

تأثیر القاء پلی پلوئیدی بر میزان فنل و فلاونوئید کل: با توجه به نتایج، افزایش قابل توجهی در محتوای فنل و فلاونوئید کل هر دو رقم در پاسخ به القاء پلی پلوئیدی مشاهده گردید. در هر دو رقم، نمونه های دیپلوئید کمترین میزان فنل و فلاونوئید کل را نشان

مولکولی دقیق القاء پلی‌پلوئیدی در مسیر بیوستز متابولیت‌های ثانویه مبهم است (۴۰). ترکیبات فنلی مهم‌ترین و ضروری‌ترین ترکیبات برای روند رشد گیاهان هستند. در حال حاضر ترکیبات فنلی به دلیل نقش مؤثری که در حفاظت از گیاهان در برابر آسیب‌های اکسیداتیو و تنش‌های محیطی دارند، توجه قابل توجهی را به خود جلب کرده‌اند (۴۱). فعال شدن مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی در اثر القاء پلی‌پلوئیدی سبب می‌گردد که گیاهان تتراپلوئید حاصل از لحاظ بیوشیمیایی تطبیق‌پذیری بیشتری با محیط اطراف خود در مقایسه با گیاهان دیپلوئیدها داشته باشند، که این امر خود سبب می‌گردد که گیاهان تتراپلوئید در شرایط متفاوت و متغیر محیطی، جریان شفاف را از طریق مسیرهای متابولیکی هدایت کنند (۴۲). در واقع، روش دو برابر کردن تعداد کروموزوم‌ها می‌تواند مقاومت به کمبود مواد مغذی و تنش‌های معدنی و شرایط محیطی را با افزایش فعالیت ژن‌های مقاومت دیواره و سلول افزایش دهد، در نتیجه افزایش تنوع آنزیم می‌تواند بر فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه تأثیرگذار باشد (۴۳).

فنل و فلاونوئید کل در رقم "Polka Dot" با افزایش ۶۷/۸۲ و ۲۰/۷۱ درصدی به ترتیب در نمونه‌های تتراپلوئید در مقایسه با نمونه‌های دیپلوئید حاصل گردید (شکل ۴). نتایج حاصل از این پژوهش با گزارش‌های اعلام شده در مورد گیاهان *Lonicera japonica* و *Petunia Mitchell* و *Cannabis sativa* مطابقت دارد که نشان دادند القاء پلوئیدی سبب افزایش میزان فنل و فلاونوئید کل در گیاهان تتراپلوئید گردید (۳۵، ۳۶، ۳۷). دزهای ژنی در نمونه‌های پلی‌پلوئید دوبرابر می‌گردد و این امر نه تنها بر رشد و زیست‌توده گیاه، بلکه بر فعالیت آنزیم‌های گیاهی، تنوع ایزوآنزیم‌ها و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر می‌گذارد (۳۸). انتظار می‌رود در طی فرآیند پلی‌پلوئیدی نسخه‌های تکراری ژن‌ها حفظ شده و در مسیر دوبرابر بیان شوند، بنابراین بازده کل متابولیت‌های ثانویه به دلیل اثرات دوز ژن افزایش می‌یابد (۳۹). با این حال این مورد در همه گیاهان صادق نیست و ممکن است در بعضی موارد ارتباط مشخصی بین مقدار تعداد کپی ژن، خاموش شدن ژن و بیان متابولیت‌های ثانویه وجود نداشته باشد و مکانیسم



شکل ۴- ارزیابی میزان فنول کل (A) و فلاونوئید کل (B) در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید ارقام مختلف پروانش.
Fig. 4. Evaluation total phenol (A) and flavonoid (B) content in diploid and tetraploid plants of *C. roseus* cultivars.

اثر القاء پلی پلوئیدی بر میزان تجمع ترکیبات فنلی: انگشت نگاری شیمیایی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید دو رقم "Red Really" و "Polka Dot" گیاه دارویی پروانش براساس روش HPLC به طور هم زمان تغییرات ۹ ترکیب فنلی را نشان داد. نمونه های استاندارد هر یک از پلی فنول ها (Sigma-Aldrich company- USA) در متانول خالص تهیه و برای رسم منحنی استاندارد در محدوده ای از غلظت های مناسب رقیق شدند، سپس به دستگاه HPLC تزریق شدند. پس از تزریق عصاره گیاهی به دستگاه HPLC، مقادیر هر ترکیب براساس سطح زیر پیک و منحنی کالیبراسیون استاندارد آن ترکیب محاسبه گردید. براساس نتایج به دست آمده (جدول ۲) محتوای رزمارینیک اسید در بین تمام ترکیبات در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید در هر دو رقم، در بالاترین میزان بود به طوری که پس از دو برابر شدن کروموزوم، مقادیر انباشته شده در گیاهان تتراپلوئید رقم "Polka Dot" ۴/۹ درصد و در رقم "Red Really" ۲/۶ درصد بیش تر از گیاهان دیپلوئید بود. در میان دیگر ترکیبات فنلی در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید، مقادیر گالیک اسید، کوماریک اسید، سینامیک اسید، اپی ژنین، روتین و کوئرستین در رقم "Polka Dot" بیش تر از رقم "Red Really" بود. به طور کلی محتوای تمامی ترکیبات فنلی در گیاهان تتراپلوئید بیش تر بود. به عنوان مثال، محتوای انباشته شده سینامیک اسید، اپی ژنین و کوئرستین به ترتیب به میزان ۳۸/۲، ۳۳/۴ و ۱۸/۹ درصد در اثر القاء پلی پلوئیدی در رقم "Polka Dot" افزایش یافت. در مقابل، میزان کافئیک اسید، گالیک اسید و کلروژنیک اسید به ترتیب ۱۷/۳، ۱۴/۲ و ۱۱/۳ درصد در گیاهان تتراپلوئید رقم "Red Really" افزایش یافت.

این نتایج تأیید کرد که تغییرات در سطوح پلوئیدی باعث افزایش قابل توجهی در محتوای بسیاری از ترکیبات فنلی در هر دو رقم گیاه پروانش شد. اگرچه اثرات پلی پلوئیدی القایی غیر قابل پیش بینی بوده و باید به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گیرد، در عین حال، این روش اصلاحی از طریق دوبرابر کردن تعداد کروموزوم ها و تغییر فعالیت آنزیم های بیوسنتزی نقش مهمی در افزایش محتوای متابولیت های ثانویه ایفاء می کند. با این وجود، مکانیسم های مولکولی که از طریق آن القاء پلی پلوئیدی بر متابولیت های ثانویه تأثیر می گذارد، هنوز نامشخص است (۴۴). گزارش شد که پلی پلوئیدی شدن نه تنها با دو برابر شدن کروموزوم همراه است، بلکه منجر به تغییراتی در ساختار ژنوم و الگوی بیان ژن می گردد (۴۵). علاوه بر این، پلاستیسته ژنومی اثرات پایین دستی بر روی رونوشت، روتوم و متابولوم دارد که می تواند تغییرات فنوتیپی و متابولیتی در گیاهان پلی پلوئید ایجاد کند. به عنوان مثال، تکثیر ژنوم در *Isatis indigotica* منجر به افزایش آشکار انواع سطوح رونویسی ژن شد و تولید زیست توده و متابولیت های ثانویه بالاتری را نسبت به گیاهان دیپلوئیدی ایجاد نمود (۴۶). در عین حال، تکثیر کل ژنوم منجر به اتوپلوئیدی و در نتیجه افزایش اندازه سلول و غلظت متابولیت های ثانویه می گردد (۴۴). پژوهش گران تأیید کردند که سنتز و تجمع اسیدهای فنلی در گیاهان دیپلوئید نه تنها مستقیماً تحت تأثیر سطوح رونویسی ژن های مربوطه می باشد، بلکه با سطوح رونویسی ژن های تنظیم کننده بالادستی نیز ارتباط نزدیکی دارد. با این حال، ارتباط بین ژنوم، رونوشت و ویژگی های متابولیک باید موضوع پژوهش های بیش تر برای روشن کردن این مکانیسم تنظیمی پیچیده باشد (۴۷).

جدول ۲- مقایسه میزان ترکیبات فنلی در گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید ارقام Red Really و Polka Dot.

Table 2. Phenolic compounds content comparison in diploid and tetraploid plants of Red Really and Polka Dot cultivars.

ترکیبات فنلی (میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر) Phenolic compound (mg/kg fresh weight)									دیپلوئید / تتراپلوئید Diploid/ Tetraploid	
Apigenin	Cinnamic acid	Quercetin	Rosmarinic acid	Coumaric acid	Rutin	Chlorogenic acid	Caffeic acid	Gallic acid		
110.2	15.2	36.5	1457.4	89.1	7.1	356.2	230.56	60.15	Diploid	C. roseus cv. Red Really
128.3	17.6	41.2	1496.5	100.15	8.06	396.8	270.5	68.72	Tetraploid	
36.8	21.2	37.4	1049.1	91.4	10.4	347.6	205.6	101.5	Diploid	C. roseus cv. Polka Dot
49.1	29.3	44.5	1101.2	105.6	12.1	376.7	216.8	110.14	Tetraploid	

نتیجه‌گیری کلی

تیمار شدند، که با بالاترین میزان بقای گیاه بدون اثرات سمی همراه بود، در حالی که مدت زمان طولانی‌تر تیمار (۷۲ ساعت) در غلظت کلشی‌سین ۰/۵ درصد و ۰/۲ درصد کشنده بود. القاء پلی‌پلوئیدی باعث افزایش قابل‌توجهی در میزان ترکیبات پلی‌فنلی به‌خصوص سینامیک اسید، اپی ژنین و کوئرستین در رقم "Polka Dot" شد. از طرفی محتوای فنل و فلاونوئید کل نیز در اثر القاء پلی‌پلوئیدی در هر دو رقم افزایش یافت. نتایج ما نیز به خوبی نشان داد که پلی‌پلوئیدی اجازه می‌دهد تا اشکال گیاهی حاوی مقادیر بیش‌تری از ترکیبات فعال بیولوژیکی نسبت به فرم‌های دیپلوئید اولیه آن‌ها ایجاد شود.

پلی‌پلوئیدی یک پدیده جالب در گیاهان است و با ایجاد مسیر مهمی برای ایجاد تنوع ژنتیکی، نقش عمده‌ای در تکامل گیاهان ایفاء می‌کند. گیاهان پلی‌پلوئید از نظر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نسبت به گیاهان دیپلوئید برتری قابل‌توجهی دارند و می‌توان از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی آینده استفاده کرد. از این‌رو، این مطالعه با هدف توسعه نتاج پلی‌پلوئیدی در ارقام مختلف گیاه پروانش با صفات برتر فیتوشیمیایی انجام شد. در این پژوهش، بیش‌ترین میزان دو برابر شدن کروموزوم‌ها زمانی حاصل شد که ریزنمونه‌ها با کلشی‌سین ۰/۱ درصد به‌مدت ۴۸ ساعت در رقم "Polka Dot" و کلشی‌سین ۰/۲ درصد به‌مدت ۴۸ ساعت در رقم "Red Really" قرار دادند.

منابع

- 1.Ku, W. C., Chung, L., Chen, L., & Kuo, C. H. (2013). The complete plastid genome sequence of madagascar periwinkle *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: plastid genome evolution, molecular marker identification and phylogenetic implications in asterids. *Plos One*, 8 (6), 1-11.
- 2.Prabha, N., & Bhuvana, J. (2023). Phytochemical analysis of *Catharanthus roseus* L. by gas chromatography-mass spectrometry studies. *European Chemical Bulletin*, 12 (S3), 823-831. <https://doi.org/10.31838/ecb/2023.12.s3.094>.

3. Lahare, R. P., Yadav, H., Dashahre, A. K., & Bisen, Y. K. (2020). An updated review on phytochemical and pharmacological properties of *Catharanthus rosea*. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, 6(12), 759-766. <https://doi.org/10.36348/sjmps.2020.v06i12.007>.
4. Vega-Avila, E., Cano-Velasco, J. L., Alarcon-Aguilar, F. J., Fajardo Ortiz, M. D. C., Almanza-Pérez, J. C., & Román-Ramos, R. (2012). Hypoglycemic activity of aqueous extracts from *Catharanthus roseus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 934258. <https://doi.org/10.1155/2012/934258>.
5. Espejel-Nava, J. A., Vega-Avila, E., Alarcon-Aguilar, F., Contreras-Ramos, A., Díaz-Rosas, G., Trejo-Aguilar, G., & Ortega-Camarillo, C. (2018). A phenolic fraction from *Catharanthus roseus* L. stems decreases glycemia and stimulates insulin secretion. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 7191035. <https://doi.org/10.1155/2018/7191035>.
6. Kumar, K., Debnath, P., Singh, S., & Kumar, N. (2023). An overview of plant phenolics and their involvement in abiotic stress tolerance. *Stresses*, 3(3), 570-585. <https://doi.org/10.3390/stresses3030040>.
7. Yu, B., Pan, Y., Liu, Y., Chen, Q., Guo, X., & Tang, Z. (2021). A comprehensive analysis of transcriptome and phenolic compound profiles suggests the role of flavonoids in cotyledon greening in *Catharanthus roseus* seedling. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167, 185-197. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.07.028>.
8. Liu, J., Liu, Y., Wang, Y., Zhang, Zh., Zu, Y., Efferth, T., & Tang, ZH. (2016). The combined effects of ethylene and MeJA on metabolic profiling of phenolic compounds in *Catharanthus roseus* revealed by metabolomics analysis. *Frontiers in Physiology*, 7, 217. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00217>.
9. Gawenda-Kempczyńska, D., Olech, M., Balcerek, M., Nowak, R., Załuski, T., & Załuski, D. (2022). Phenolic acids as chemotaxonomic markers able to differentiate the *Euphrasia* species. *Phytochemistry*, 203, 113342. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113342>.
10. Qaderi, M. M., Martel, A. B., & Strugnell, C. A. (2023). Environmental factors regulate plant secondary metabolites. *Plants*, 12, 447. <https://doi.org/10.3390/plants12030447>.
11. Salgotra, R. K., & Chauhan, B. S. (2023). Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources. *Genes (Basel)*, 14(1), 174. <https://doi.org/10.3390/genes14010174>.
12. Omidbeaigi, R. (2013). Production and processing of medicinal plants. Vol. I. Behnashr Press. Mashhad, Iran. 347p. [In Persian]
13. Cui, L., Liu, Z., Yin, Y., Zou, Y., Faizan, M., Alam, P., & Yu, F. (2023). Research progress of chromosome doubling and 2n gametes of ornamental plants. *Horticulturae*, 9, 752. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9070752>.
14. Nett, R. S., & Sattely, E. S. (2021). Total biosynthesis of the tubulin-binding alkaloid colchicine. *Journal of the American Chemical Society*, 143(46), 19454-19465. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c08659>.
15. Ozyigit, I. I., Dogan, I., Hocaoglu-Ozyigit, A., Yalcin, B., Erdogan, A., Yalcin, I. E., Cabi, E., & Kaya, Y. (2023). Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1132555. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1132555>.
16. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for the rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
17. Farjaminezhad, R., Asghari-Zakaria, R., Zare, N., & Ahmadpoor, R. (2011). Karyotype study of three populations of *Papaver bracteatum* Lind. 7th National Biotechnology Congress of I.R. Iran. Tehran, Iran.

18. Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55. <https://doi.org/10.5344/ajev.1977.28.1.49>.
19. Shin, Y., Liu, R. H., Nock, J. F., Holliday, D., & Watkins, C. B. (2007). Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 349-357. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.03.007>.
20. Fattahi, M., Nazeri, V., Torras-Claveria, L., Sefidkon, F., Cusido, R. M., Zamani, Z., & Palazon, J. (2013). A new biotechnological source of rosmarinic acid and surface flavonoids: hairy root cultures of *Dracocephalum kotschy* Boiss. *Industrial Crops and Products*, 50, 256-263. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.029>.
21. Sarathum, S., Hegele, M., Tantivivat, S., & Nanakorn, M. (2010). Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. *European Journal of Horticultural Science*, 75, 123-7.
22. Jala, A. (2014). Colchicine and duration time on survival rate and micropropagation of *Dionaea muscipula* Ellis. *African Journal of Plant Science*, 8, 291-7. <https://doi.org/10.5897/AJPS2014.1177>.
23. Rao, S., Kang, X., Li, J., & Chen, J. (2019). Induction, identification and characterization of tetraploidy in *Lycium ruthenicum*. *Breeding Science*, 69(1), 160-168. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.18144>.
24. Wang, F., Zhuo, X., Arslan, M., Ercisli, S., Chen, J., Liu, Z., Lan, S., & Peng, D. (2023). *In Vitro* induction of polyploidy by colchicine in the protocorm of the Orchid *Dendrobium wardianum* Warner. *HortScience*, 58(11), 1368-1375. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI17355-23>.
25. Samatadze, T. E., Yurkevich, O. Y., Khazieva, F. M., Basalaeva, I. V., Konyaeva, E. A., Burova, A. E., Zoshchuk, S. A., Morozov, A. I., Amosova, A. V., & Muravenko, O. V. (2022). Agro-morphological and cytogenetic characterization of colchicine-induced tetraploid plants of *Polemonium caeruleum* L. (Polemoniaceae). *Plants*, 11(19), 2585. <https://doi.org/10.3390/plants11192585>.
26. Manzoor, A., Ahmad, T., Naveed, M. S., Rehman, A. Ur., Bashir, M. A., Ahmad, R., & Akhtar, N. (2023). Assessment of biological damage and toxic potency of colchicine in gladiolus (*Gladiolus grandiflorus*) plants. *Agricultural Sciences Journal*, 5 (2), 72-92. <https://doi.org/10.56520/asj.v5i2.259>.
27. Wu, J., Zhou, Q., & Sang, Y. (2023). *In vitro* induction of tetraploidy and its effects on phenotypic variations in *Populus hopeiensis*. *BMC Plant Biology*, 23, 557. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04578-0>.
28. Vilcherrez-Atoche, J. A., Silva, J. C., Clarindo, W. R., Mondin, M., & Cardoso, J. C. (2023). *In vitro* polyploidization of *Brassolaeliocattleya* Hybrid Orchid. *Plants (Basel)*, 12(2), 281. <https://doi.org/10.3390/plants12020281>.
29. Hemadesh, I., Shahriari, F., & Farsi, M. (2020). Evaluation of tetraploid induction in forage sorghum cultivar "Omid-Bakhsh" using colchicine treatment. *DYSONA - Applied Science*, 1(1), 1-10. <https://doi.org/10.30493/das.2020.103715>.
30. Eng, W. H., & Ho, W. S. (2019). Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review. *Scientia Horticulturae*, 246, 604-617. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.010>.
31. Zahedi, A. A., Hosseini, B., Fattahi, M., Dehghan, E., parastar, H., & Madani, H. (2014). Overproduction of valuable methoxylated flavones in induced tetraploid plants of *Dracocephalum kotschy* Boiss. *Botanical Studies*, 55, 22. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-22>.

32. Ascough, G. D. (2008). Micropropagation and *In vitro* manipulation of *Watsonia*. Ph.D. Thesis, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg. 189 p.
33. Nilanthi, D., Chen, X. L., Zhao, F., Yang, Y., & Wu, H. (2009). Induction of tetraploids from petiole explants through colchicine treatments in *Echinacea purpurea* L. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 34, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2009/343485>.
34. Lavania, U. C., & Srivastava, S. (1988). Ploidy dependence of chromosomal variation in callus cultures of *Hyoscyamus muticus* L. *Protoplasma*, 145, 55-8.
35. Kong, D., Li, Y., Bai, M., Deng, Y., Liang, G., & Wu, H. (2017) A comparative study of the dynamic accumulation of polyphenol components and the changes in their antioxidant activities in diploid and tetraploid *Lonicera japonica*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 112, 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.12.027>.
36. Griesbach, R. J., & Kamo, K. K. (1996). The effect of induced polyploidy on the flavonols of *Petunia* 'Mitchell'. *Phytochemistry*, 42, 361-363.
37. Bagheri, M., & Mansour, H. (2015). Effect of induced polyploidy on some biochemical parameters in *Cannabis sativa* L. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175, 2366-2375. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1435-8>.
38. Tossi, V. E., Martínez Tosar, L. J., Laino, L. E., Iannicelli, J., Regalado, J. J., Escandón, A. S., Baroli, I., Causin, H. F., & Pitta-Álvarez, S. I. (2022). Impact of polyploidy on plant tolerance to abiotic and biotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.869423>.
39. Gaynor, M. L., Lim-Hing, S., & Mason, Ch. M. (2020). Impact of genome duplication on secondary metabolite composition in non-cultivated species: a systematic meta-analysis. - *Annals of Botany*, 126, 363-376. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa107>.
40. Buggs, R. J. A., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2009). Does hybridization between divergent progenitors drive whole-genome duplication?. *Molecular Ecology*, 18(16), 3334-3339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04285.x>.
41. Zagorskina, N. V., Zubova, M. Y., Nechaeva, T. L., Kazantseva, V. V., Goncharuk, E. A., Katanskaya, V. M., Baranova, E. N., & Aksenova, M. A. (2023). Polyphenols in plants: structure, biosynthesis, abiotic stress regulation, and practical applications (Review). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 13874. <https://doi.org/10.3390/ijms241813874>.
42. Barber, H. N. (1970). Hybridization and the evolution of plants. *Taxon*, 19, 154-160. <https://doi.org/10.2307/1217947>.
43. Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, V., & Van Huylenbroeck, J. (2011). Mitotic chromosome doubling of plant tissues *In vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104, 359-373. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9786-5>.
44. Ruiz, M., Oustric, J., Santini, J., & Morillon, R. (2020). Synthetic polyploidy in grafted crops. *Frontiers in Plant Science*, 11, 540894. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.540894>.
45. Chen, Z. J., & Ni, Z. F. (2006). Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *BioEssays*, 28, 240e252. <https://doi.org/10.1002/bies.20374>.
46. Zhou, Y. Y., Kang, L., Liao, S. Y., Pan, Q., Ge, X., & Li, Z. Y. (2015). Transcriptomic analysis reveals differential gene expressions for cell growth and functional secondary metabolites in induced autotetraploid of Chinese woad (*Isatis indigotica* Fort.). *Plos One*, 10, e0116392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116392>.
47. Wang, H., Li, Y., Wang, S., Kong, D., Sahu, S. K., Bai, M., Li, H., Li, L., Xu, Y., Liang, H., Liu, H., & Wu, H. (2020). Comparative transcriptomic analyses of chlorogenic acid and luteolosides biosynthesis pathways at different flowering stages of diploid and tetraploid *Lonicera japonica*. *Peer J*, 8, e8690. <https://doi.org/10.7717/peerj.8690>.

