مطالعه تاثیر ماده شیمیایی کلشی سین بر ویژگی‌های رشد و اندام زایی گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare* L.)

سیدابوالقاسم محمدی*[۱]، معصومه مازندرانی[۲]، افسانه گران[۳]

[۱] مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاداسلامی واحد گرگان، گرگان، ایران

[۲] استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاداسلامی واحد گرگان، گرگان، ایران

[۳] کارشناس‌ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاداسلامی واحد گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۱۲ تاریخ پذیرش:۹۲/۸/۵

چکیده

در این پژوهش ویژگی‌های رشد و نموی گیاه مرزنجوش که تحت تاثیر ماده شیمیایی کلشی سین قرار گرفته بود مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. ماده کلشی سین جهت تبدیل گیاه دارویی مرزنجوش (*Origanum vulgare* L.) به حالت تتراپلویید استفاده می‌شود. روش‌های مختلفی جهت ایجاد پلی‌پلوییدی در گیاهان وجود دارد مانند استفاده از اوریزالین و کلشی سین و غیره که ممکن است در بعضی از این روش‌ها نه تنها در بعضی گونه‌ها پلی پلوییدی بوجود نیاید، بلکه نتیجه منفی نیز در پی داشته باشند. سال‌هاست که از ماده شیمیایی کلشی سین جهت ایجاد تتراپلویید در گونه‌های گوناگون گیاهی استفاده می‌شود. علاوه بر اینکه این ماده می‌تواند سبب ایجاد تتراپلویید شود، همچنین می‌تواند تاثیر بسزایی در فرایند رشد و نموی قسمت‌های مختلف گیاهان نیز داشته باشد که هم مثبت و هم منفی می‌تواند باشد. بنابراین غلظت‌های مختلفی از کلشی سین شامل ۰/۰۱ درصد و ۰/۱ درصد و ۰/۵ درصد و ۱ درصد تهیه شد و به روش‌های مختلف بر روی گیاه مرزنجوش تیمار شده است. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که کلشی سین نه تنها جلوی رشد گونه یاد شده را گرفت، بلکه سبب مرگ و میر گیاه مورد آزمایش نیز شد. در این تحقیق سعی شده است که با مقایسه اندام‌های گیاه شاهد و تیمار شده با ماده کلشی سین، نتایج تاثیر منفی کلشی سین بر اندام‌های این گونه گیاهی را نشان داده شود. یکی از این تاثیرات منفی این است که رشد و نمو گیاه تیمار شده بسیار کندتر از گیاه شاهد است و در نهایت گیاه تیمار یافته با کلشی سین پژمرده می‌شود.

واژگان کلیدی: تتراپلویید، رشد، کلشی سین، کروموزوم، مرزنجوش

مقدمه

عوامل مختلفی روی ویژگی‌های رشد ونموی گیاهان تاثیر می‌گذارند. بعضی از این عوامل با تاثیر مثبت باعث افزایش ویژگی‌های رشد و نموی می‌شوند و بعضی دیگر با تاثیر منفی باعث کاهش ویژگی‌های رشد و نموی می‌گردند. ماده شیمیایی کلشی سین به‌عنوان یک ماده محرک و با هدف ایجاد تتراپلویید در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. در کنار ایجاد حالت پلی پلوییدی در گونه‌های گیاهی این ماده می‌تواند اثرات جنبی دیگری نیز داشته باشد از جمله تاثیر بر فرایندهای رشد و نموی و اندام‌زایی در گیاهان است (Dragland, 2003). تاکنون از این روش برای ایجاد تتراپلویید و پلی‌پلویید در گونه‌های مختلف گیاهان از جمله گیاهان زراعی نظیر گندم

*مسئول مکاتبه: sambondar@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

هگزاپلوییید استفاده شده است. وقتی گندم خوراکی به یک گونه آلوهگزاپلوییید تبدیل شد نه تنها اندازه گیاه گندم بزرگتر شد بلکه میزان تولید گندم در سطح نیز افزایش داشته است. همچنین چون روش تبدیل گندم به آلوهگزاپلوییید حاصل هیبرید گیری سه گونه دیپلوییید و استفاده از کلشی سین بوده است. بنابراین خواص سه گونه دیپلوییید نیز در گندم بدست آمده نیز وجود دارد. وقتی یک گیاه از حالت دیپلوییید به حالت تتراپلوییید تبدیل می‌شود نه تنها تعداد کروموزوم‌های گیاه دو برابر می‌گردد بلکه اندازه اندام‌ها و برگ‌ها و حتی اندازه میوه‌ها نیز نسبت به حالت دیپلوییید بزرگتر می‌شوند (Hamill et al., 1992). روش‌های مختلفی برای ایجاد پلی پلوییدی با استفاده از کلشی سین وجود دارد که سه روش مهم آن عبارتند از:

تیمار مستقیم کلشی سین‌دهی دانه‌ها (Barnabas et al., 1999)

قرار دادن کلشی سین بر روی جوانه‌ها (He-ping et al., 2010)

استفاده از محیط کشت آگار آغشته به کلشی سین (Peter, 2004)

استفاده از کلشی سین برای ایجاد پلی‌پلوییدی در گیاهان دارویی کمتر گزارش شده است. شاید یکی از دلایل این امر تاثیر منفی این ماده بر اندام‌های رشد و نموی گیاهان به‌ویژه گیاهان دارویی باشد چون شرایط رشد و نموی این گیاهان متفاوت از گیاهان زراعی می‌باشد بنابراین ممکن است که حساسیت آنها زیادتر باشد. یکی از گونه‌های گیاهان دارویی که در این ارتباط مورد استفاده قرار گرفته است گونه *Astragalus membranaceus* می‌باشد (Dragland, 2003). در کشور چین از این گیاه برای مقابله با سرطان استفاده می‌شود. چینی‌ها برای افزایش مواد موثره دارویی در این گیاه که همان متابولیت‌های ثانوی می‌باشند این گونه را به حالت تتراپلوییید تبدیل نمودند (Dragland, 2003). نوع پاسخ همه گونه‌های گیاهی به کلشی سین یکسان نیست و این ماده به خاطر سمیتی که دارد می‌تواند بر ویژگی‌های رشد و نموی گیاهان تاثیر منفی داشته باشد و گاه این تاثیر در بعضی از گونه‌ها چنان است که نه تنها ممکن است منظور اولیه استفاده از این ماده بدست نیاید بلکه ممکن است که ویژگی‌های رشد و نمو گیاه نیز تحت تاثیر منفی قرار گیرند (Chakraboti, 1998). گیاه مرزنجوش یا *Origanum vulgare* L. یکی از گونه‌های مهم دارویی از تیره نعناییان یا Lamiaceae است که دارای اثرات درمانی بسیار زیاد می‌باشد (Gupta, 1995). در طب بقراطی از این گیاه به‌عنوان یک گیاه ضدمیکروب و گندزدا نام برده می‌شود (Morsy and Dorra, 2009).

هدف از این تحقیق بررسی اثر کلشی سین بر اندام‌های رشد و نموی گیاه مرزنجوش بوده است. در صورتی که کلشی سین اثر مثبت بر مرزنجوش داشته باشد می‌توان از این ماده برای تبدیل مرزنجوش دیپلوییید به تتراپلوییید استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

ماده کلشی سین به‌صورت پودر در مراکز تجاری به فروش می‌رسند. ماده کلشی سین خشک با مارک مرک تهیه شد و یک استوک یک درصد از آن در آزمایشگاه آماده گردید. برای این که جذب کلشی سین بهتر صورت پذیرد آنرا با ماده DMSO (دی‌متیل سولفوکسید) ترکیب می‌کنند.

دانه‌های گیاه مرزنجوش بصورت مستقیم از روی بوته خشک شده برداشت شدند. دانه‌ها بعد از خارج شدن از روی بوته، ضدعفونی و شستشو شدند و با روش‌های مختلف فرآیند کلشی سین‌دهی به آنها انجام شد.

در روش اول دانه‌ها در پلیت‌های حاوی کاغذ واتمن و آغشته به کلشی سین با درصد خاص قرار

Archive of SID

www.SID.ir

داده شدند. در این طرح درصدهای ۰/۰۱ درصد و ۰/۱ درصد و ۰/۵ درصد و ۱ درصد استفاده شده است. علاوه بر اینکه غلظت کلشی سین به‌عنوان یک متغیر، متنوع بود بلکه مدت زمان تیماردهی نیز متفاوت و متغیر بوده است به‌طوری‌که از ۸ ساعت تا ٤٨ ساعت این زمان نوسان داشته است (Shao and Chen, 2003).

در روش دوم اجازه داده شد که دانه‌ها در درون پلیت و روی کاغذ صافی که تنها آب مقطر به آن اضافه شد، رشد کنند. بعد از آنکه دانه‌ها جوانه‌زده اند به چندین شیوه آنها را تحت تاثیر تیمارهای مختلف کلشی سین با زمان‌های مختلف قرار گرفتند (Obute et al., 2007).

در یکی از این شیوه‌ها سعی شد تا بخش مریستمی اندام هوایی در محلول کلشی سین قرار گیرد. برای این منظور رقت‌های مختلف محلول کلشی سین در پلیت الیزا قرار داده شدند و بخش مریستمی جوانه در داخل محلول کلشی سین قرار داده شدند. در شیوه دیگر با قرار دادن تکیه گاهی در کنار جوانه ابتدا جایگاه جوانه مستحکم شد سپس قطرات محلول کلشی سین بری تیمار کردن جوانه‌ها روی آنها قرار داده می‌شد (Arthur, 1993).

بعد از کلشی سین دهی از ریشه و طوقه و دم برگ گیاهان تیمار شده و شاهد برش عرضی تهیه شده است و بعد از رنگ‌آمیزی در زیر میکروسکوپ عکسبرداری انجام می‌شود.

نتایج

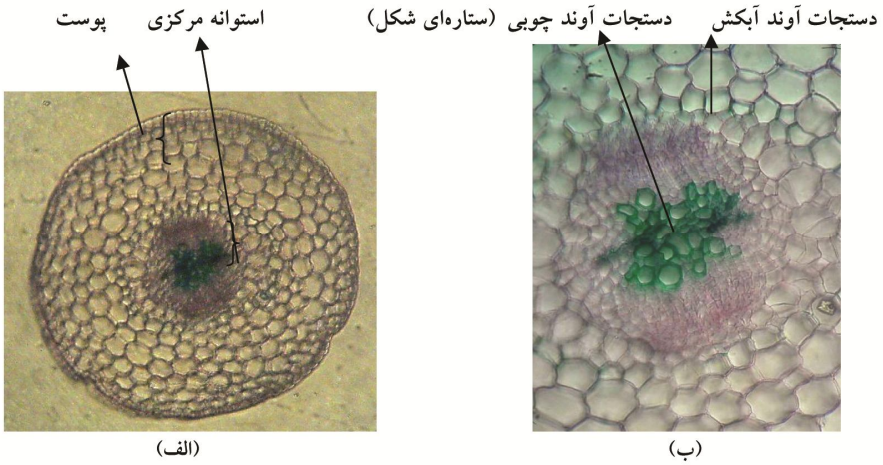
با روش اول که تیمار مستقیم دانه‌ها با کلشی سین بود، هیچ یک از دانه‌ها در کنار شاهد رشد نکردند. جوانه‌دهی دانه شاهد که در پلیت حاوی آب مقطر قرار داشت حاکی از سالم بودن دانه‌ها بوده است.

وقتی گیاه در مدت زمان مشخص در معرض تیمار کلشی سین قرار می‌گرفت، یک حالت کالوس مانندی بر روی گیاه در محل اثر کلشی سین ایجاد می‌شد که سپس از این منطقه جوانه‌های جدیدی روی گیاه بوجود می‌آمد اما بعد از مدتی همین گیاه بر اثر پژمردگی از بین می‌رفت. مطالعات که بر روی کارهای انجام شده در این زمینه انجام شد مشخص نمود که حالت کالوس مانند در محل اثر کلشی سین طبیعی است ولی باید کلشی سین‌دهی آن محل تداوم داشته باشد تا حالت تتراپلوییید ایجاد شود در غیر این صورت گیاه به حالت اول بر می‌گردد (Chakrabprti, 1998).

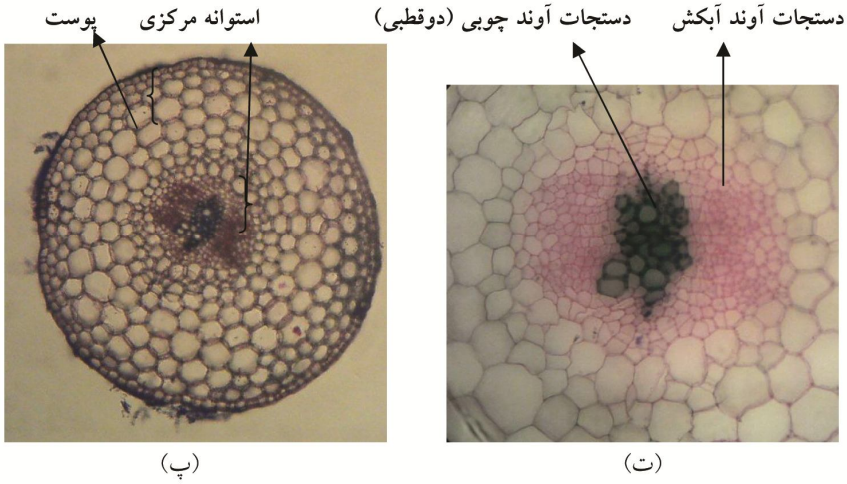
نتایج رنگ‌آمیزی از ریشه و طوقه و دم برگ گیاهان تیمار شده و شاهد در برش عرضی و عکسبرداری از آنها در زیر میکروسکوپ به شرح زیر می‌باشند. تعدادی از این عکس‌ها در تصاویر ۱ تا ٤ نشان داده شد. مقایسه این تصاویر بین گیاه تحت تیمار و گیاه شاهد تفاوت‌هایی را در صفات کمی و کیفی آنها نشان می‌دهد که در جدول ۱ و ۲ ذکر شده است.

Archive of SID

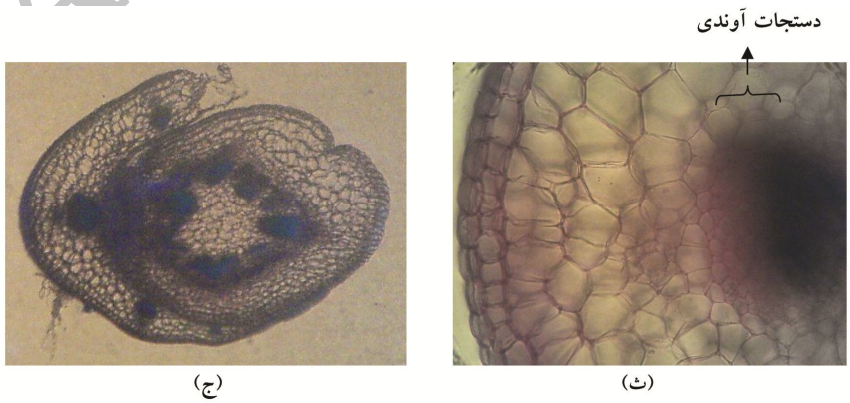
www.SID.ir



شکل ۱. مقطع عرضی ریشه در گیاه شاهد (الف) x٤٠، استوانه مرکزی (ب) x٤٠..



شکل ۲. مقطع عرضی ریشه در گیاه تیمار (پ) x٤٠، استوانه مرکزی (ت) x٤٠..



شکل ۳. مقطع عرضی طوقه در گیاه شاهد (ج) x٤٠، دستجات آوندی (ث) x٤٠.

www.SID.ir

(چ) (ح)

شکل ٤. مقطع عرضی طوقه در گیاه تیمار (چ) x٤، دستجات آوندی (ح) x٤٠.

جدول ١. صفات کیفی در دو نمونه شاهد و تیمار

نوع اندام	شاهد	تیمار
آرایش دستجات آوند چوبی ریشه	ستاره‌ای	دو قطبی
شکل مقطع عرضی دمبرگ	مثلثی نوک کند	بیضوی
وجود شیار دمبرگ	ندارد	دارد
آرایش آوندهای چوبی در طوقه	پروانه‌ای	صلیبی کشیده
بافت مغز در طوقه	ندارد	دارد
بافت آبکش	دو طرفه	سرتاسری
شکل مقطع عرضی طوقه به غلاف برگی	بیضوی	مدور

جدول ٢. صفات کمی در دو نمونه شاهد و تیمار

نوع اندام و صفت شاهد	mm	نوع اندام و صفت تیمار	mm
قطر بزرگ ریشه	٠/٧٠	قطر بزرگ ریشه	٠/٧٢
قطر کوچک ریشه	٠/٦٦	قطر کوچک	٠/٦٩
قطر بزرگ استوانه مرکزی ریشه	٠/٢٤	قطر بزرگ استوانه مرکزی ریشه	٠/٢٣
قطرکوچک استوانه مرکزی ریشه	٠/٢٢	قطرکوچک استوانه مرکزی ریشه	٠/١٩
قطر بزرگ دمبرگ	٠/٦٥	قطر بزرگ دمبرگ	٠/٥٨
قطر کوچک دمبرگ	٠/٦١	قطر کوچک دمبرگ	٠/٥١
قطر بزرگ مجرای ترشحی دمبرگ	٠/١٥	قطر بزرگ مجرای ترشحی دمبرگ	٠/١٦
قطر کوچک مجرای ترشحی دمبرگ	٠/١٠	قطر کوچک مجرای ترشحی دمبرگ	٠/١٣
قطر بزرگ طوقه	٠/١١٥	قطر بزرگ طوقه	٠/١١٠
قطر کوچک طوقه	٠/٩٠	قطر کوچک طوقه	٠/١٠٠
قطر بزرگ استوانه مرکزی طوقه	٠/٤٤	قطر بزرگ استوانه مرکزی طوقه	٠/٥٠
قطرکوچک استوانه مرکزی طوقه	٠/٢٧	قطرکوچک استوانه مرکزی طوقه	٠/٤٥

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

بررسی نتایج بدست آمده حاکی از آن است که ماده شیمیایی کلشی سین تاثیر بسزایی بر رشد و نمو گیاه دارویی گونه دارد. تفاوت‌هایی که در تصاویر نیز نشان داده شد همه بخش‌های گیاه تیمار شده را در بر گرفته است. از یک طرف کلشی سین یک ماده سمی است و می‌تواند اثرات نامطلوب بر فعالیت‌های متابولیسمی گیاه داشته باشد و از طرف دیگر بر بخش‌های مختلف گیاه گونه *O. vulgare* نیز با توجه تصاویر تاثیر فنوتیپی داشته است که با توجه به پژمردگی گیاه مذکور این تاثیرات را می‌توان تاثیر منفی تلقی نمود (Morsy and Dorra, 2009). وقتی که این نتایج با نتایج گونه‌های دیگری که با کلشی سین بصورت تتراپلویید در آمدند مقایسه می‌شود حاکی از این است روش تیمار با کلشی سین برای گونه دارویی مرزنجوش روش مناسبی نیست و حتی می‌تواند اثرات منفی در فرایندهای رشد و نموی این گونه نیز داشته باشد (Hamill et al., 1992). به‌عنوان نمونه در گونه *Astragalus membranaceus* تتراپلوییدی با بکارگیری کلشی سین انجام شد و نه تنها گیاه در اندازه و ابعاد برزگتر شد بلکه میزان مواد موثره دارویی آن نیز افزایش داشته است (Dragland, 2003).

اما نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که گونه مورد آزمایش در این پژوهش حتی در رقت‌های پایین کلشی سین و مدت حداقل تیمار دهی نیز دچار افت رشد و نمو شده است در صورتی که در تحقیقات دیگر به تغییرات کروموزومی بیشتر اشاره دارد (Chakraboti, 1998). افت رشد و نمو و بهم‌ریختگی اندام‌های بوته‌های تیمار شده بطور کامل مشخص است و در نهایت سبب مرگ و میر گیاه می‌شود (Arthur, 1993).

بنابراین روش استفاده از کلشی سین برای ایجاد تتراپلویید در این گیاه روش مناسبی نخواهد بود و پیشنهاد می‌شود از روش‌های دیگری نظیر استفاده از اورزالین برای ایجاد تتراپلویید در گونه دارویی مرزنجوش استفاده شود.

نتیجه‌گیری نهایی

مشاهده اشکال ۱ تا ٤ نشان می‌دهد که گیاه شاهد و تیمار در صفات کمی تفاوت‌هایی را به شرح زیر دارند. آرایش دستجات آوند چوبی در ریشه گیاه شاهد ستاره‌ای و در تیمار دو قطبی می‌باشد. شکل مقطع عرضی دمبرگ در گیاه شاهد مثلثی و در تیمار بیضوی است. در دمبرگ گیاه شاهد شیار وجود ندارد ولی در گیاه تیمار شیار وجود دارد. آرایش آوند چوبی در طوقه پروانه‌ای و در تیمار صلیبی است. بافت مغز در طوقه وجود ندارد و در تیمار وجود دارد. بافت آبکش در گیاه شاهد دو طرفه و در گیاه تیمار سرتاسری است و در نهایت شکل مقطع عرضی طوقه به غلاف برگی بیضوی است و در تیمار مدور می‌باشد.

قطر ریشه گیاه تیمار بزرگ‌تر از شاهد می‌باشد حال آنکه قطر استوانه تیمار کوچک‌تر از شاهد است. متوسط قطر دمبرگ در گیاه شاهد بزرگ‌تر از گیاه تیمار می‌باشد در صورتی‌که قطر مجاری ترشحی در تیمار بزرگ‌تر است. قطر طوقه شاهد بزرگتر از گیاه تیمار می‌باشد اما قطر استوانه مرکزی تیمار بزرگتر از گیاه شاهد است.

نتیجه نهایی از این تحقیق آن است که ماده کلشی سین اثر یکسان و یکنواختی بر بخش‌های مختلف ریشه و ساقه و سایر قسمت‌ها ندارد بلکه هر اندام و بخش از گیاه می‌تواند تاثیرات مختص به خود را از این ماده داشته باشد.

منابع

Arthur, E. (1993). Oryzalin conversion of lilies. Nals yearbook, 46. Arkansas: 133-142.

Barnabas, B. and Obert, B. (1999). An efficient genome doubling agent for

Archive of SID

www.SID.ir

maize microspores cultured in anthero. Plant Cell Report, 18: 858-62

Chakraborti, SP. (1998). In vitro induction of tetraploidy in mulberry. Plant Cell Report. 17: 799-803

Dragland, S. (2003). Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. Journal Nutrition.133: 1286-1290

Gupta, P.K. (1995). Cytogenetics. Published by vivek Ratogi Company. India: 33-44.

He-ping, H., Gao, S.L. and Chen, L.L. (2010). In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Dioscorea zingiberensis*. Pharmacognosy Magazine. 6:51-56

Hamill, S.D., Smith, M.K. and Dodd, W.A. (1992). In vitro induction of banana autoteteraploidy by colchicines treatment of micro propagated diploids. Australian Journal Botany. 40: 887-96.

Morsy, E.L. and Dorra, A.A. (2009). Commutative studies on diploid and tetraploid levels of nicotiana alata. Academic Journal of Plant Science. 2:182 188

Obute, G.C., Ndukwu, B.C. and Chuwu, O.F. (2007). Targeted mutagenesis in vigna unguiclata. African Journal Biotechnology. 6:2467-72.

Peter, K.V. (2004). Handbook of herbs and spices. Abington Hall. 1: 56-72.

Shao, J. and Chen, C. (2003). In vitro induction of tetrapod in pomegranate. Plant Cell Tissue. 75:241-246.

Archive of SID

www.SID.ir