Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 23:39 IRST on Tuesday September 26th 2017

مقایسه استفاده کلشی سین بر روی بذر و سرشاخه آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak) از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی روزنه و محتوای DNA در گیاهچه‌های درون شیشه‌ای

فرزانه اصلانی[۱]، فرانسوآز برنارد[۱*]، فاطمه میرزا جانی[۲] و جواد هادیان[۳]

[۱]گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، [۲]گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران و [۳]گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

(تاریخ دریافت: ۹۲/۰۷/۳۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۴/۰۲)

چکیده:

تیمار کلشی‌سین به عنوان ماده القاءکننده پلی‌پلوئیدی روی بخش‌های مختلف گیاه نتایج متفاوتی نشان می‌دهد. هدف این پژوهش بررسی و مقایسه تأثیر کلشی‌سین برروی بذر و سرشاخه آویشن دنایی(*Thymus daenensis* Celak) از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی روزنه و محتوی DNA در شرایط درون شیشه‌ای است. بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی روزنه و محتوی DNA با روش اسپکتروفوتومتری روش‌های غیرمستقیم امّا سریع برای تعیین سطح پلوئیدی هستند. بدین منظور بذر و سرشاخه‌های گیاه در غلظت‌های مختلف کلشی‌سین شامل ۰ ٪- ۰/۰۳ ٪- ۰/۰۵ ٪- ۰/۰۸ ٪- ۰/۱ ٪ (وزنی/ حجمی) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند و درصد زنده‌مانی سرشاخه و جوانه‌زنی بذرها محاسبه گردید. تعداد کلروپلاست، تراکم روزنه در واحد سطح و میزان جذب محتوی DNA به منظور بررسی تأثیر کلشی‌سین مطالعه شد. در هر دو روش تیمار، درصد جوانه‌زنی و زنده‌مانی نسبت به گروه شاهد کمتر بود امّا تیمار سرشاخه میانگین درصد زنده‌مانی بالاتری را نسبت به تیمار بذر نشان داد. تعداد کلروپلاست و محتوی DNA در گیاهچه‌های حاصل از بذر در تیمار ۰/۰۸٪ -۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت و تراکم روزنه نیز در این تیمار به طور معنی‌دار کاهش یافت. در روش تیمار سرشاخه تیمارهای ۰/۰۳ ٪ -۲۴ساعت و۰/۱ ٪-۴۸ ساعت نتایج مشابه را ایجاد نمودند، امّا تنها نتایج مربوط به کلروپلاست در هردو تیمار معنی‌دار بود. بنابراین بخشی از گیاه که برای تیمار با کلشی‌سین انتخاب می‌شود در نتایج حاصل تأثیرگذار است و با وجود کاهش جوانه‌زنی بذر تحت تیمار کلشی‌سین، روش تیمار بذر با غلظت ۰/۰۸ ٪ (وزنی/حجمی) و با زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با تیمار سرشاخه، روش مناسب تری برای دستیابی به گیاهی با سطح پلوئیدی بالاتر است.

واژه‌های کلیدی: آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak)، پلی‌پلوئیدی، روزنه، کلروپلاست ، کلشی‌سین، محتوی DNA.

مقدمه:

آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak) گیاهی است از تیره نعناعیان که سرشاخه‌های آن حاوی تانن‌ها، ساپونین‌ها و اسانس روغنی (شامل تیمول و کارواکرول) است (ولاگ و استودلا، ۱۳۸۲). میکروب‌کشی، رفع اسپاسم، رفع سرماخوردگی و سرفه از خواص مهم پزشکی و دارویی این گیاه محسوب می‌شود (Prajapati *et al.*, 2004).

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: F_bernard@sbu.ac.ir

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 23:39 IRST on Tuesday September 26th 2017

القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه منجر به افزایش بیوماس و افزایش غلظت و یا تغییرات کیفی در ترکیبات مؤثره گیاه شده، و احتمال انتخاب آنها را برای کشاورزی افزایش می‌دهد (Osborn *et al.*, 2003). پلی‌پلوئیدی اغلب تغییرات قابل مشاهده در مورفولوژی و متابولیسم ثانویه را به دنبال دارد. در جایی که اندام‌های رویشی منبع متابولیت‌های ثانویه است، دستکاری‌های پلوئیدی ابزاری سریع برای افزایش تولید مواد داروئی گیاهی می‌باشد (Lavania, 2005).

کلشی‌سین برای افزایش سطح پلوئیدی در سلول‌ها در شرایط برون شیشه‌ای (*in vivo*) و همچنین در شرایط درون شیشه‌ای (*in vitro*) کاربرد دارد (Bennici *et al.*, 2006). القاء پلی‌پلوئیدی به کمک کلش‌سین می‌تواند با تیمار بخش‌های مختلف گیاه مانند ریشه موئینه (De Jesus, 2003)، کالوس و سرشاخه (Zhang *et al.*, 2010)، مریستم انتهایی (Chen and Gao, 2007)، بذر (Bernard *et al.*, 2012) و دانه رست (Campos *et al.*, 2009) انجام گیرد. جهت بررسی سطح پلوئیدی روش‌های غیرمستقیم از جمله، تراکم روزنه، شمارش تعداد کلروپلاست سلول‌های نگهبان روزنه و روش اسپکتروفوتومتری (Spectrophotometry) که در مقایسه با سایر روش‌ها مانند فلوسایتومتری و تعیین محتوی کروموزوم سلول‌ها، سریعتر و ارزانتر می‌باشند مورد استفاده قرارمی‌گیرد (Raza *et al.*,2003؛Winarto *et al.*, 2010). از طول و فراوانی روزنه در سطح برگ به عنوان روشی سریع برای شناسایی سطح پلوئیدی در *Aegilops neglecta* Req استفاده گردیده و مشاهده شده است که تفاوت معنی‌داری در فراوانی روزنه بین دو فرم تتراپلوئید و هگزاپلوئید این گیاه وجود دارد. نشان داده شده که میانگین فراوانی روزنه برای تتراپلوئید بین ۵۴/۸۰–۵۰/۲۴ به ازای هر متر مربع سطح و برای هگزاپلوئید بین۴۰/۵۰ –۳۹/۲۴ به ازای هر متر مربع سطح متغیر است (Aryavand *et al.*, 2003). همچنین، تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های نگهبان روزنه ارتباط معنی‌دار مثبتی با سطوح پلوئیدی دارد و می‌تواند به عنوان معیاری در جداسازی بین گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید استفاده شود (Winarto *et al.*, 2010). شمارش تعداد کلروپلاست در سلول‌های نگهبان را برای شناسایی سریع تتراپلوئیدها در تعدادی از گیاهان مورد استفاده قرار دادند و تفاوت معنی‌داری را در میانگین کلروپلاست‌ها بین گیاهچه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید شاهد بودند. برای گیاهان تتراپلوئید، تعداد کلروپلاست دو برابر تعداد آن در دیپلوئیدها بود (Ewald *et al.*, 2009). اسپکتروفوتومتری نیز روش سریع و آسانی برای تشخیص پلی‌پلوئیدی است. به دلیل اینکه در پلی‌پلوئیدی تعداد کروموزوم افزایش می‌یابد محتوی کل DNA سلول پلی‌پلوئید (تتراپلوئید، هگزاپلوئید، غیره) در مقایسه با سلول دیپلوئید بیشتر است. مقدار پرتو ماوراء بنفش جذب شده به وسیله محلول DNA به طور مستقیم نسبتی از مقدار DNAی موجود در نمونه می‌باشد. بنابراین، مقدار مشخصی از بافت دیپلوئید، محتوی کل DNA متفاوتی از همان مقدار بافت پلی‌پلوئید خواهد داشت که این را می‌توان با استفاده از روش-های اسپکتروفوتومتری و در طول موج ۲۶۰ نانومتر مشخص نمود (Raza *et al.*, 2003). در مطالعه انجام شده توسط Bernard و همکاران (۲۰۱۲) بذرهای *Glycyrrhiza glabra* را با غلظت‌های کلشی‌سین تیمار دادند و مشاهده نمودند جذب محتوی DNA در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت ۰/۰۸ ٪ و ۰/۱ ٪ کلشی‌سین با زمان ۲۴ ساعت دو برابر میزان آن در گروه کنترل بوده است و این نشان دهنده ایجاد تتراپلوئیدی در سلول‌ها می‌باشد. نتایج حاصل از فلوسایتومتری و مطالعه ویژگی‌های مورفولوژیکی نیز افزایش سطح پلوئیدی در تیمارهای فوق را تأیید کرد. بنابراین، می‌توان روش اسپکتروفوتومتری را به عنوان روشی سریع و کم هزینه امّا دقیق و با کارایی بالا برای تعیین سطح پلوئیدی به کار برد.

هدف از این مطالعه تیمار بخش‌های مختلف گیاه با کلشی سین و بررسی تأثیر آن در نتایج مربوط به تغییرات سطح پلوئیدی و تعیین مناسب‌ترین بخش گیاه آویشن دنایی برای تیمار با کلشی سین است. لذا بدین منظور بذرها و سرشاخه‌های آویشن دنایی به عنوان دو بخش مختلف از گیاه با کلشی‌سین تیمار شدند. با محاسبه درصد جوانه‌زنی و زنده‌مانی بذرها و سرشاخه‌ها و همچنین با بررسی ویژگی‌های

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 23:39 IRST on Tuesday September 26th 2017

مورفولوژیکی روزنه (فراوانی و تعداد کلروپلاست سلول محافظ روزنه) و سنجش محتوی DNA سلول با روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر تغییرات سطح پلوئیدی در گیاهچه‌های آویشن دنایی بررسی شد. تأثیر کاربرد کلشی سین بر روی بذر و سرشاخه آویشن دنایی مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها:

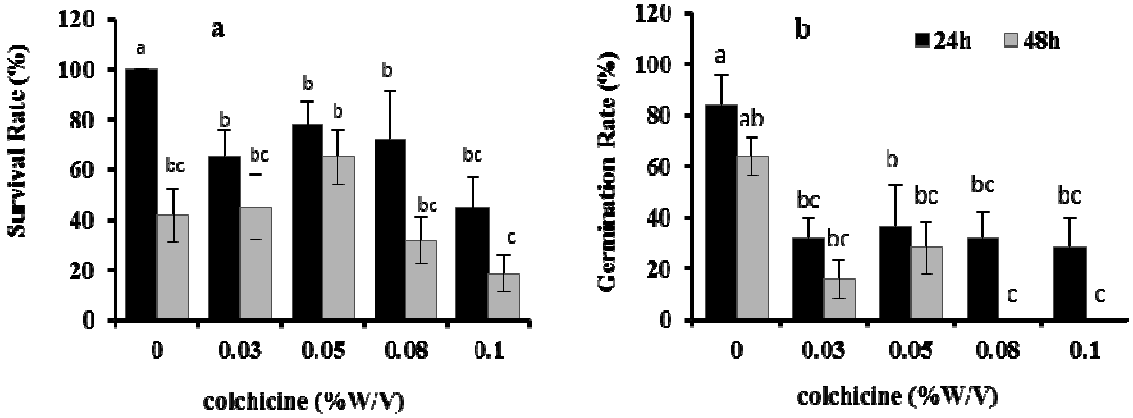
بذرهای گیاه *Thymus daenensis* با شماره هرباریومی MPH-660 از پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهیه گردید. بذرها بعد از ضد عفونی شدن در محیط جامد موراشیگ – اسکوگ (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۰/۸٪ (وزنی/حجمی) آگار و ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز و pH برابر ۵/۸–۵/۷ قرار گرفتند. پس از ۴ هفته سرشاخه‌هایی به طول ۱ سانتیمتر که دارای ۴ تا ۶ برگ بودند در شرایط استریل از گیاهچه‌های در حال رشد جدا شده و برای تیمار استفاده شدند. بذرها و سرشاخه‌ها به طور جداگانه در محیط های MS مایع حاوی غلظت‌های ۰/۰٪، ۰/۰۳٪– ۰/۰۵ ٪ – ۰/۰۸ ٪ – ۰/۱ ٪ (وزنی/حجمی) کلشی‌سین، به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در شرایط *in vitro* بر روی شیکر اربیتال با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه، در اتاق کشت دارای دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شدت نوری ۲۲۰۰ لوکس قرار گرفته و سپس به محیط کشت گیاهچه یعنی محیط جامد MS حاوی ۱میلی گرم بر لیتر هورمون بنزیل آدنین (Benzyl adenine) انتقال یافتند. بعد از گذشت۴ هفته تعداد بذرهای جوانه زده در هر تیمار و نیز تعداد سرشاخه‌هایی که زنده مانده و رشد کرده‌اند شمارش شده و به صورت درصد محاسبه شد. در هر آزمایش ۵ بطری تیماردهی و در هر بطری ۵ بذر کشت داده شد. بررسی‌های روزنه‌ای با استفاده از روش Zhang و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. بدین منظور برگهای گیاهان تیمار شده به مدت ۸ ساعت در محلول کارنوی (۱:۳ اتانول و استیک اسید) رنگبری شده و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر شستشو داده شدند. سپس رنگ آمیزی با محلول۱ درصد یدید یدور پتاسیم($KI-I_2$)به مدت۱۵ دقیقه انجام گرفت. برگهای رنگ آمیزی شده بر روی اسلاید شیشه‌ای قرار گرفته و بعد از قرار گرفتن لامل روی آن، اسکواش شد. اسلایدها با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین انتقال تصویر بررسی و عکس‌برداری شدند و پارامترهای روزنه از روی تصاویر تهیه شده مطالعه گردید. استخراج DNA نیز با استفاده از CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) انجام گرفت (Murray and Thompson, 1980).

شمارش تعداد کلروپلاست برای هر تیمار در۳۶ روزنه و محاسبه تراکم روزنه در ۱۸ منطقه برگی به وسعت ۱میلی‌متر مربع انجام گرفت. آزمایش با ۳ تکرار صورت گرفته و آنالیز آماری داده‌ها به کمک نرم افزار *SPSS 16* ، آزمون ANOVA و با ضریب اطمینان ۹۵٪ انجام شد. نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردید.

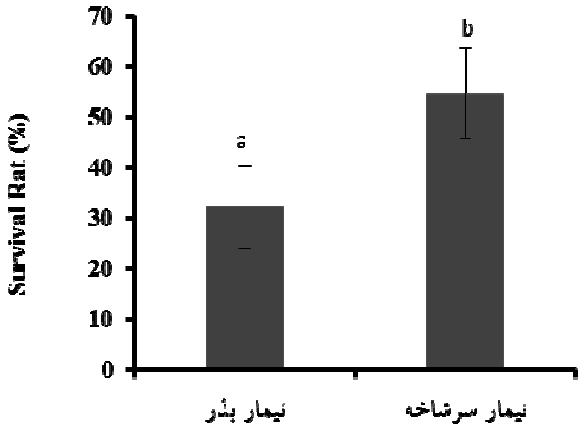
نتایج:

تأثیر تیمار کلشی‌سین بر درصد جوانه‌زنی و زنده‌مانی: در تیمار بذر مشاهده شد که درصد جوانه زنی در بذرهای تحت تیمار نسبت به گروه شاهد کمتر بود. در حالی که جوانه‌زنی بین غلظت‌های مختلف کلشی‌سین در هر دو زمان تیماردهی ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. زمان تیمار ۴۸ ساعت تغییر معنی‌داری در جوانه‌زنی نسبت به تیمار ۲۴ ساعت ایجاد نمود و غلظت‌های ۰/۰۸ ٪ و ۰/۱ ٪ با زمان تیمار ۴۸ ساعت جوانه‌زنی را نسبت به تیمار ۰/۰۸ ٪ و ۰/۱ ٪ ، ۲۴ساعت به شدت کاهش دادند. نتایج تیمار سر شاخه نشان داد که در همه تیمارهای کلشی‌سین به جز ۰/۰۸ ٪–۲۴ ساعت و ۰/۰۵ ٪ – ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد کاهش نرخ زنده-مانی سرشاخه‌ها مشاهده شد؛ اما بین غلظت‌های مختلف کاهش معنی‌دار زنده‌مانی وجود نداشت. دو زمان مختلف تیمار نیز تفاوت معنی‌داری را در نرخ زنده‌مانی ایجاد نمودند و در گروه شاهد زنده مانی در تیمار ۴۸ ساعت کمتر بود؛ همچنین تیمارهای ۰/۰۸ ٪ – ۴۸ ساعت و ۰/۱ ٪– ۴۸ ساعت در مقایسه با دیگر تیمارها کاهش زنده مانی بیشتری را نشان دادند

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 23:39 IRST on Tuesday September 26th 2017



شکل۱- مقایسه زنده مانی سرشاخه (a)، مقایسه جوانه‌زنی بذر(b) آویشن دنایی درمحیط حاوی هورمون بنزیل آدنین($1mg.L^{-1}$) در غلظت‌های کلشی سین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت.

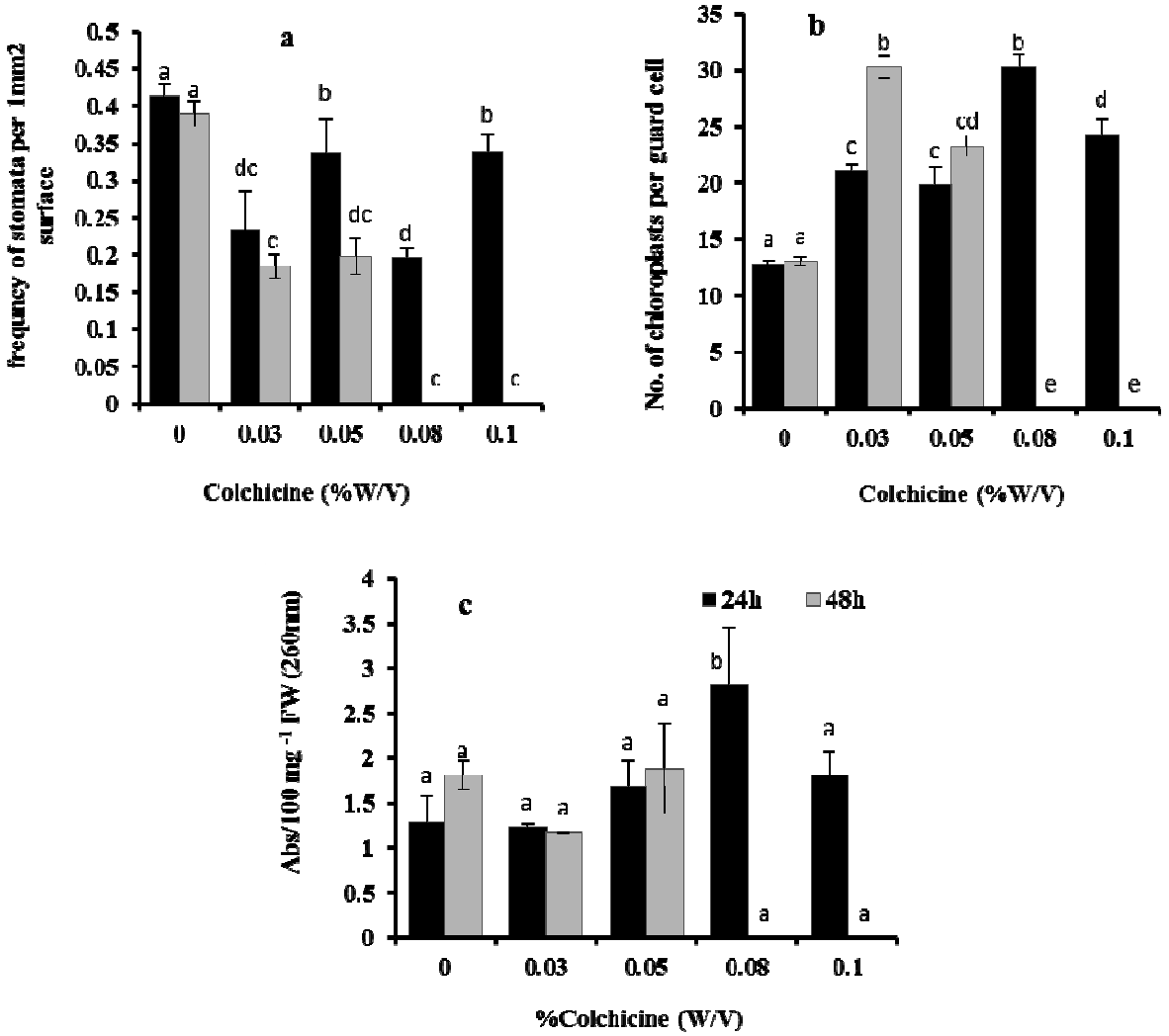


شکل۲- مقایسه تیمار کلشی‌سین بر روی بذر و سرشاخه آویشن دنایی از نظر میانگین درصد زنده‌مانی

(شکل۱). در مقایسه نتایج دو بخش تیمار شده مشاهده می‌شود که میانگین زنده‌مانی در تیمار سرشاخه نسبت به میانگین آن در تیمار بذر بالاتر است (شکل۲).

تأثیر تیمار کلشی‌سین بر روی ویژگی‌های روزنه و محتوی DNA: در شرایط تیمار بذر گیاهچه‌های تحت تیمار ۰/۰۳ ٪-۴۸ ساعت و ۰/۰۸ ٪- ۲۴ ساعت با تعداد به ترتیب۳۰/۲۷ و ۳۰/۲۵ بیشترین تعداد کلروپلاست را در سلول‌های محافظ روزنه خود داشتند که این تعداد حدود دو برابر گروه شاهد است درحالی‌که میانگین تراکم روزنه در تیمارهای ۰/۰۳ ٪- ۴۸ ساعت و ۰/۰۸ ٪- ۲۴ ساعت (به ترتیب ۰/۱۸۵ و ۰/۱۹۶ روزنه در واحد سطح) نسبت به دیگر تیمارها کاهش معنی داری نشان داد. همچنین تیمار۰/۰۸ ٪-۲۴ساعت منجر به افزایش معنی‌دار محتوی DNA در گیاهچه-های آویشن نسبت به گروه شاهد و نیز دیگر تیمارها شد (شکل۳). این درحالی است که در تیمار سرشاخه تعداد کلروپلاست در تیمار ۰/۰۳ ٪ -۲۴ساعت و ۰/۱ ٪-۴۸ ساعت کلشی‌سین (با تعداد به ترتیب ۱۸/۳۰ و ۱۹/۵۸) نسبت به دیگر تیمارها و تیمار شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد. تراکم روزنه در واحد سطح نیز در هر دو تیمار ذکر شده نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت اما این کاهش برای تیمار ۰/۰۳ ٪-۲۴ ساعت معنی‌دار نبود. محتوی DNA در هیچکدام از تیمارهای سرشاخه نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار نداشت (شکل۴).

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 23:39 IRST on Tuesday September 26th 2017



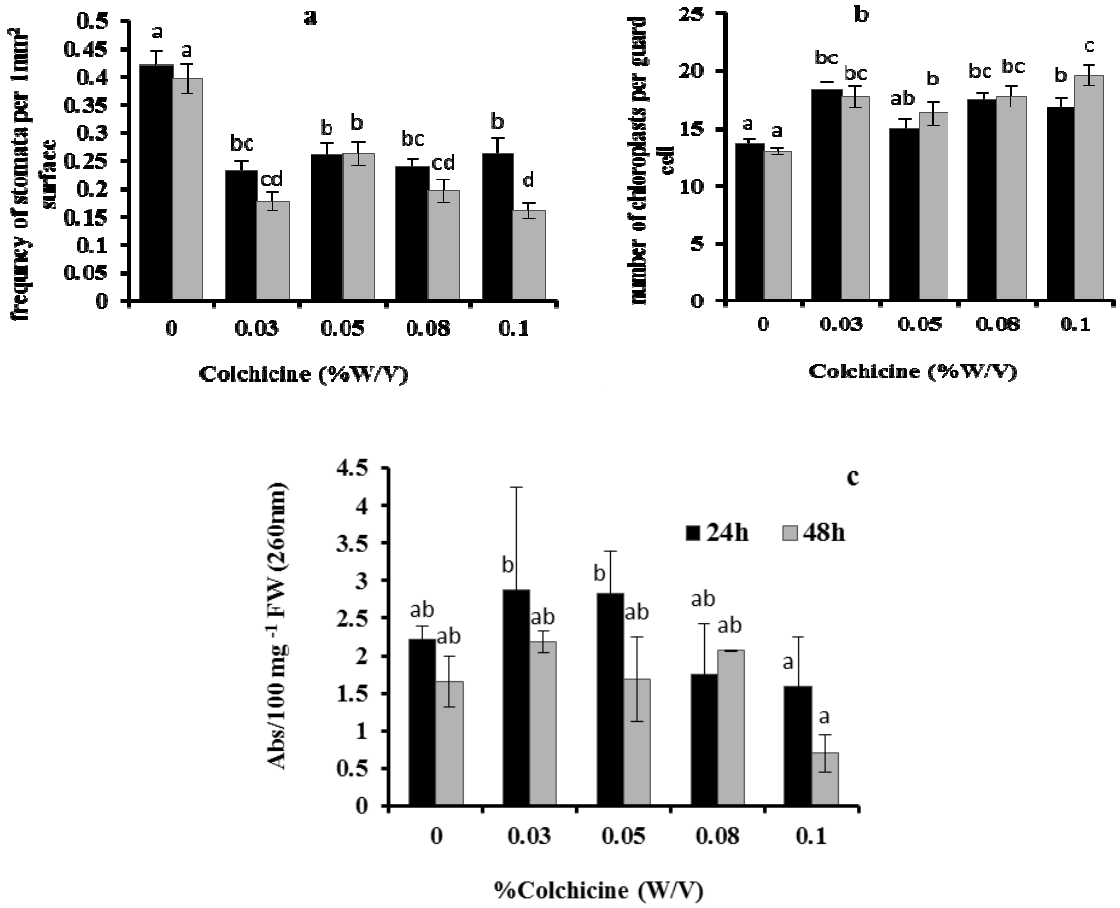
شکل۳- تراکم روزنه (a)، تعداد کلروپلاست در سلول‌های محافظ (b) و میزان جذب محتوی DNA (c) در گیاهچه‌های حاصل از بذر آویشن دنایی در محیط حاوی هورمون بنزیل آدنین ($1mg.l^{-1}$) در غلظت‌های کلشی سین.

بحث:

مقاومت بذرها و سرشاخه‌ها نسبت به تیمار کلشی‌سین:

کلشی سین یک ترکیب القاء کننده پلی‌پلوئیدی است که به طور موفقیت آمیزی برای افزایش سطح پلوئیدی به کار می‌رود از سوی دیگر طی این عمل ممکن است گیاه به شدت آسیب دیده، رشد نرمال آن متوقف شود و یا از بین برود که این مسئله به غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیماردهی بستگی دارد (Zhang *et al.*, 2010). در حقیقت غلظت بالا و مدت طولانی مواجه با آن کاهش درصد زنده‌مانی و رشد گیاهچه‌ها را به دنبال دارد (Kerdsuwan *et al.*, 2012). در مطالعه حاضر، تیمار کلشی‌سین با هر دو روش، کاهش جوانه‌زنی بذرها و زنده‌مانی سرشاخه‌های آویشن دنایی را نسبت به گروه شاهد به دنبال داشت. این اثر در مطالعات انجام شده بر روی بخش‌های مختلف چند گیاه دارویی مانند تیمار بذرهای *Ocimum basilicum* (Omidbaigi *et al.*, 2010) و تیمار جوانه‌های انتهایی *Melissa officinalis* (برقعی و همکاران،۱۳۸۹) نیز عنوان شده است. در گزارش ارائه شده توسط امیدبیگی و همکاران (۲۰۱۰) بذرهای گیاه ریحان

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 23:39 IRST on Tuesday September 26th 2017



شکل۴- تراکم روزنه (a)، تعداد کلروپلاست در سلول‌های محافظ (b) و میزان جذب محتوی DNA (c) در گیاهچه‌های حاصل سرشاخه آویشن دنایی در محیط حاوی هورمون بنزیل آدنین($1mg.l^{-1}$) درغلظت‌های کلشی سین.

(*Ocimum basilicum*) به کلشی سین حساس بودند و بیشتر گیاهچه‌های حاصل از بذور تیمار شده با این ماده در مرحله جوانه‌زنی و برخی در مرحله دانه رست از بین رفتند. درصد جوانه‌زنی بذرهای تحت تیمار کلشی سین در مقایسه با درصد زنده‌مانی سرشاخه‌های آویشن کاهش بیشتری را نشان داد. به طوری که میانگین جوانه زنی و ادامه رشد بذرهای تحت تیمار تنها ۳۲٪ بود. این درحالی است که به طور میانگین ۵۴/۵۷٪ از سرشاخه‌ها توانستند با حضور کلشی‌سین زنده مانده و رشد نمایند. به نظر می‌رسد در بذر تحت تیمار اکثر سلول‌های جنینی در حال رشد و یا دانه‌رست‌های حاصل از بذر تحت تأثیر سمیت کلشی‌سین قرار گرفته و می‌میرند در حالی که در سرشاخه‌ها سلول‌های بیشتری از تأثیر این ماده سمی در امان می‌مانند؛ همچنین در صورت از بین رفتن مریستم انتهایی جوانه‌های جانبی شروع به فعالیت نموده و گیاه کامل را ایجاد می‌کنند. بنابراین می‌توان گفت تیمار کلشی‌سین بر روی سرشاخه‌های آویشن روش مناسب تری از نظر زنده مانی گیاهچه‌هاست. دو زمان تیمار نیز تفاوت معنی‌داری از نظر زنده‌مانی ایجاد نمودند و زمان ۴۸ ساعت تیمار به ویژه وقتی با غلظت بالای کلشی‌سین همراه شد باعث کاهش زنده‌مانی گردید که این مسئله با نتایج ارائه شده توسط برقعی و همکاران (۱۳۸۹) مطابقت دارد.

تغییرات ویژگی‌های روزنه و محتوی DNA: القاء پلی‌پلوئیدی به کمک کلشی‌سین می‌تواند با تیمار بر روی بخش‌های مختلف گیاه انجام گیرد که در نتایج حاصل از آن

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 23:39 IRST on Tuesday September 26th 2017

تأثیرگذار است. در حقیقت برای مشخص شدن بهترین جدا کشت از گیاه برای این کار، باید چندین بخش مختلف از یک گونه گیاهی مورد آزمایش قرار گیرد. موفقیت و کارایی القاء پلی‌پلوئیدی تا حد زیادی به نوع جدا کشت بستگی دارد (Dhooghe *et al.*, 2011). چهار روش تیمار کلشی‌سین بر روی بذر، مریستم انتهایی دانه رست در مرحله پیدایش لپه‌های برگی و در مرحله پیدایش برگ‌های حقیقی و ریشه برای ایجاد جمعیت‌های تتراپلوئید ریحان (*Ocimum basilicum*) استفاده کردند. بذرها به کلشی‌سین حساسیت نشان داده و بیشتر گیاهچه‌های حاصل از آنها از بین رفتند و چند دانه‌رست حاصل از تیمار بذر با غلظت ۰/۰۵ ٪ نیز دیپلوئید بودند. تنها برخی از گیاهان حاصل از تیمار مریستم رأسی دانه‌رست در مرحله پیدایش لپه‌های برگی حاصل از تیمار ۰/۰۵ ٪ بر اساس ویژگی‌های ظاهری برای بررسی سطح پلوئیدی استفاده شدند (Omidbaigi *et al.*, 2010). در مطالعه حاضر بر روی گیاه *Thymus daenensis* نیز دو بخش مختلف گیاهی یعنی بذر و سرشاخه در محیط حاوی کلشی‌سین و بنزیل آدنین تیمار شدند و مشاهده شد که بخش‌های مختلف تیمار شده با کلشی‌سین نتایج متفاوتی را نشان می‌دهند به طوری‌که که گیاهچه‌های حاصل از بذر در تیمار ۰/۰۸ ٪- ۲۴ساعت شواهدی از افزایش سطح پلوئیدی را در ویژگی‌های مورفولوژیکی روزنه و محتوی DNA سلول‌های خود نشان دادند. این درحالی است که در تیمار سرشاخه، تیمارهای ۰/۰۳ ٪-۲۴ساعت و ۰/۱ ٪ - ۴۸ ساعت کلشی‌سین چنین تغییراتی را ایجاد نمودند اما این تفاوت‌ها از نظر آماری در سطح معنی‌دار نبود. در توضیح این امر می‌توان گفت که مریستم رأسی ساقه از چند منطقه تشکیل شده است. منطقه مرکزی مریستم سلول‌هایی را شامل می‌شود که به عنوان سلول‌های آغازگر عمل نموده و سلول‌های جدید، نواحی دیگر مریستم و انتهای ساقه را ایجاد می‌کنند. در این منطقه چند لایه بافت زا وجود دارد که انواع سلول‌ها و بافت‌ها را به وجود می‌آورند. ایجاد پلی‌پلوئیدی خالص نیازمند دو برابر شدن موفق کروموزومها در تمام لایه‌های بافت‌زا، در منطقه مرکزی مریستم رأسی است در حالی که در میکسوپلوئیدها سطوح پلوئیدی مختلفی در سلول های لایه‌های مختلف وجود دارد (Jones *et al.*, 2008). فقط یک بار کاربرد کلشی‌سین می‌تواند تنها بر روی درصد مشخصی از سلول‌های مریستمی رأس ساقه اثر بگذارد (Eiselein, 1994) و درحقیقت همزمان نبودن چرخه سلولی در سلول‌های مریستمی منجر به دوبل شدن کروموزوم‌ها به صورت جزئی در مریستم می‌شود (Jones *et al.*, 2008). بنابراین غلظت‌ها و تعداد دفعات کاربرد کلشی‌سین در حد کافی نبوده تا بتواند بر روی تمام سلول‌های ناحیه مریستمی سرشاخه اثر گذار باشد و گیاهچه پلی‌پلوئید خالص ایجاد کند. امّا به نظر می‌رسد از آنجایی که در بذر تعداد سلول‌های جنینی محدود هستند پس بیشتر آنها تحت تأثیر کلشی‌سین قرار می‌گیرند و دو برابر شدن کروموزوم به احتمال زیاد در اکثریت سلول‌ها اتفاق می‌افتد. این سلول‌ها در طی تقسیمات متوالی و با تولید بافت‌ها و اندام‌هایی که دو برابر تعداد معمول کروموزوم دارند، منجر به ایجاد یک گیاه با سطح پلوئیدی بالاتر می‌شوند. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که علاوه بر غلظت کلشی‌سین، مدت زمان تیمار و ژنوتیپ، نوع بخشی از گیاه که برای تیمار با کلشی‌سین انتخاب می‌شود در نتایج مربوط به افزایش سطح پلوئیدی مؤثر است و باید برای تیمار هر یک از بخش‌های گیاه جهت القاء پلی‌پلوئیدی غلظت خاصی از کلشی‌سین و نیز تعداد دفعات تیمار مناسب مورد استفاده قرار گیرد. به عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که علیرغم کاهش درصد جوانه‌زنی بذر آویشن دنایی تحت تیمار کلشی‌سین و بالاتر بودن زنده‌مانی سرشاخه‌ها، تیمار بذر با غلظت ۰/۰۸ ٪ و با زمان ۲۴ ساعت در مقایسه با تیمار سرشاخه، راه مناسب‌تری برای دست‌یابی به گیاهی با سطح پلوئیدی بالاتر است.

سپاسگزاری:

نگارندگان برخود واجب می‌دانند از مساعدت‌ها و همکاری های سرکار خانم دکتر جمیله پازوکی و نیز دانشجویانشان و همچنین کمک‌های علمی و عملی عزیزانی چون خانم مهندس فاطمه شجاعی و خانم مهندس نرگس نواب مقدم تشکر و قدردانی نمایند.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 23:39 IRST on Tuesday September 26th 2017

منابع:

برقعی، ف.، ساری خانی، ح.، چایی چی، م.، کاشی، ع. (۱۳۸۹) القاء درون شیشه‌ای پلی‌پلوئیدی در گیاه دارویی بادرنجبویه(*Melissa officinalis* L.)، فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران جلد ۲۶: ۲۸۳-۲۹۵.

ولاگ، ژ و استدولا، ژ.(۱۳۸۲) گیاهان دارویی، روش های کشت، برداشت و شرح مصور رنگی ۲۵۶ گیاه. ترجمه ساعد زمان. نشرققنوس. چاپ پنجم. ۳۶۷ صفحه.

Aryavand, A., Ehdaie, B., Tran, B., Waines, J. G. (2003) Stomatal frequency and size differentiate ploidy levels in *Aegilops neglecta.* Genetic Resources and Crop Evolution 50: 175–182.

Bennici, A., Schiff, S., Mori, B. (2006) Morphogenic effect of colchicine in *Cichorium intybus* L. root explant cultured *in vitro*. Caryologia 3:284-290.

Bernard, F., Moghbel, N., Hassannejad, S. (2012) Treatment of licorice seeds with colchicines: changes in seedling DNA levels and anthocyanin and glycyrrhizic acid contents of derived callus cultures. Natural Product Communications 7: 1457-1460.

Campos, J. M. S., Davide, L. C., Salgado, C. C., Santos, F. C., Costa, P. N., Silva, P. S., Alves, C. C. S., Viccini, L. F., Pereira, A. V. (2009) In vitro induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum.* Plant Breed 128:101–104.

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

De Jesus-Gonzalez, L., Weathers, P. J. (2003) Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. Plant Cell Rep 21:809–813.

Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., Van Huylenbroeck, J. (2011) Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. Plant Cell Tissue and Organ Culture 104:359–373.

Eiselein, J. E. (1994) A study of chromosome yields and growth responses in colchicine treated rhododendrons. Journal American Rhododendron Society 48:205-209.

Ewald, D., Ulrich, K., Naujoks, G., Schroder, M. (2009) Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicine: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids in vitro. Plant Cell Tissue and Organ Culture 99:353–357.

Jones, J. R., Ranney, T. G., Eaker, T. A. (2008) A novel method for induction polyploidy in rhododendron seedlings. Journal American Rhododendron Society 62:130-135.

Kerdsuwan, N., Te-chato, S. (2012) Effects of Colchicine on Survival Rate, Morphological, Physiological and Cytological Characters of Chang Daeng Orchid (*Rhynchostylis gigantean* var. rubrum Sagarik) In Vitro. Journal of Agricultural Technology 8: 1451- 1460.

Lavania, U. C. (2005) Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. Plant Genetic Resources 3:170–177.

Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Murray, M. G., Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 19: 4321-4325.

Omidbaigi, R., Mirzaee, M., Hassani, M. E., SedghiMoghadam, M. (2010) Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal of Plant Production 4: 87-98.

Osborn, T. C., Pires, J. C., Birchler, J. A., Auger, D. L., Chen, Z. J., Lee, H. S., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R. W., Colot, V. Martienssen, R. A. (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. Trends in Genetics 19: 141–147.

Prajapati, N. D., Purohit, S. S., Sharma, A. K., Kumar,T. (2004) A hand book of medicinal plants. Agrobios India. pp. 554.

Raza, H., JafarJaskani, M., Mumtaz khan, M., Malik Tanwir, A. (2003) *In vitro* induction of polyploids in watermelon and estimation based on dna content. International Journal of Agriculture and Biology 5: 298–302.

Winarto, B., Mattjik, N. A., Silva, J. A. T., Purwito, A., Marwoto, B. (2010) Ploidy screening of anthurium (*Anthurium andreanum* Linden ex Andre) regenerants derived from another culture. Scientia Horticulturae 127:86-90.

Zhang, Q., Luo, F., Liu, L., Guo, F. C. (2010) *In vitro* induction of tetraploids in crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 101:41–47.