دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

# بهینه‌سازی کشت کالوس مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica* L.) با استفاده از ریزنمونه‌ها و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد

**لیلا الیاسی[۱]، علی‌اشرف مهرابی[۲]، مهدی صیدی[۳] و زینب صفری[۴]**

۱، ۲ و ۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، دانشگاه ایلام
۴- دانشجوی دکتری، دانشگاه ایلام، (نویسنده مسوول: zsafari_89@yahoo.com)
تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۲۹

**چکیده**

**مرزه بختیاری با نام علمی *Satureja bachtiarica* L. یکی از گیاهان دارویی مهم متعلق به خانواده نعناعیان است که به سبب داشتن ترکیبات با ارزش دارویی از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. بهینه‌سازی کشت کالوس این گونه به عنوان جایگزینی برای تکثیر رویشی مطرح می‌باشد. در این مطالعه یک روش مؤثر برای القاء کالوس مرزه بختیاری در محیط کشت MS با استفاده از ریزنمونه‌ها و غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی توسعه داده شد. نتایج نشان داد بالاترین سرعت القاء کالوس (۱۶/۸۲±۰/۹۴ روز پس از کشت) و حجم کالوس (۱۴/۱۷±۰/۴۷) با استفاده از ریزنمونه‌ی میانگره به دست آمد. از سوی دیگر ریزنمونه‌های جوانه انتهایی، میانگره و قطعات گرهی در مقایسه با ریزنمونه‌ی برگ، مطلوب‌ترین ریزنمونه‌ها برای درصد القای کالوس بودند. با توجه به نتایج، قطعات گرهی کشت شده روی محیط کشت تکمیل شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، منجر به کاهش چشمگیر سرعت القاء کالوس شد. حداکثر حجم کالوس با استفاده از ریزنمونه‌ی میانگره کشت شده روی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد.**

**واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده‌ی رشد، ریزنمونه، کالوس، محیط کشت، مرزه بختیار**

## مقدمه

رشد بی‌رویه‌ی جمعیت در کشورهای در حال توسعه و نیاز مبرم صنایع داروسازی به گیاهان دارویی به عنوان مواد اولیه‌ی تولید دارو، ناتوانی در تولید مصنوعی پاره‌ای از داروهای حیاتی توسط صنایع داروسازی و همچنین اهمیت مواد مؤثره گیاهان دارویی در صنایع مختلف باعث شده که توجه و تحقیق پیرامون این دسته از گیاهان از نقطه نظر اهلی‌سازی، کشت، تولید و مصرف از اهمیت خاصی برخوردار باشد (۱۱).

در میان تمام خانواده‌های گیاهی، نعناعیان دارای بیشترین گونه‌های گیاهی دارویی می‌باشند. خانواده نعناعیان یکی از بزرگترین خانواده‌های گیاهی است که دارای پراکنش جهانی می‌باشد و شامل حدود ۲۰۰ جنس و حدود ۵۰۰۰ –۲۰۰۰ گونه از بوته‌های معطر و درختچه‌ای کوتاه می‌باشد. از جمله گیاهان این خانواده، گیاه دارویی مرزه بختیاری با نام علمی *Satureja bachtiarica* L. متعلق به جنس مرزه و گیاهی چند ساله است. گونه‌ی S. bachtiarica انحصاری ایران و متعلق به منطقه زاگرس است و در استان‌های غربی، مرکزی، جنوب غربی ایران و نیز در رویشگاه‌های طبیعی استان ایلام به صورت خودرو می‌روید (۲۳،۴،۳،۱).

ترکیبات مؤثر این گیاه شامل اسانس‌ها، تری‌ترپن‌ها، فلاونوئیدها و رزمارینیک اسید است. اسانس مرزه دارای فعالیت‌های ضدقارچی، ضدویروسی، ضدباکتری و درمانی است و مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی اسانس آن مربوط به گروه مونوترپنوئیدها می‌باشند (۱۹،۱). اسانس‌های مرزه از ترکیباتی مانند کارواکرول، تیمول، بتاکاریوفیلن، گاماترپینن، پی‌سیمین و لینالول تشکیل شده و فعالیت اکسیدانی قوی آن‌ها در مطالعات مختلفی گزارش شده است (۲).

تولید انبوه و سریع این مواد مؤثره در مقیاس زیاد از طریق روش‌های شیمیایی عمدتاً مشکل و یا غیرممکن می‌باشد. از سوی دیگر عواملی مانند محدود بودن منابع گیاهی، بالا بودن هزینه‌ها و سایر مشکلات مربوط به تهیه‌ی متابولیت‌های ثانویه از گیاهان طبیعی، موجب افزایش گرایش به بهره‌گیری از فنون کشت‌بافت برای تولید آزمایشگاهی این ترکیبات با ارزش در دهه‌های اخیر شده است (۱۱).

در حال حاضر باززایی گیاهان بوسیله روش‌های کشت سلول و بافت، روشی مهم در اصلاح و تکثیر گیاهان زراعی و باغی به شمار می‌رود. این تکنیک نوعی تکثیر غیرجنسی در شرایط آزمایشگاهی و کنترل شده است که موجب تولید گیاهان یکنواخت از لحاظ محتوای ژنتیکی و کیفی در مدت زمان کوتاه و فضای اندک می‌شود (۱۵). این تکنیک همچنین زمینه حفظ گونه‌های گیاهی در حال انقراض از طریق نگه‌داری در شرایط انجماد و نیز تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون‌شیشه‌ای از طریق کشت سوسپانسیون سلولی را فراهم می‌آورد. امروزه تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان از طریق کشت کالوس و سوسپانسیون و در شرایط کنترل شده، با توجه به ارزش اقتصادی این ترکیبات دارای اهمیت فراوانی است. تا جایی که استقرار موفق لاین‌های سلولی به منظور تولید درصد بالایی از ترکیبات ثانویه در کشت‌های سوسپانسیون سلولی، توسط تعداد زیادی از محققین گزارش شده است (۲۲،۸).

کالوس توده‌ای از سلول‌های پارانشیمی بی‌شکل با دیواره سلولی نازک می‌باشد که در شرایط طبیعی و یا در محیط درون‌شیشه‌ای به صورت سازمان نیافته رشد می‌کنند. بافت کالوس بسته به گونه گیاهی ممکن است از نظر ساختمانی و چگونگی رشد با یکدیگر متفاوت باشد. بعضی کالوس‌ها مقادیر

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.20.10.7 ]

زیادی لیگنین دارند و در نتیجه سفت و سخت می‌باشند ولی بعضی کالوس‌ها بصورت ترد و شکننده هستند (۲۰،۱۱).

در اغلب گیاهان به منظور تولید کالوس، از محیط کشت MS تکمیل شده با گلوکز (به عنوان منبع قند) استفاده می‌شود. جهت القاء کال‌زایی نیز افزودن هورمون اکسین به محیط کشت ضروری می‌باشد (۱۷).

در یک بررسی روی یکی از گونه‌های جنس مرزه (*Satureja hortensis* L.)، مشخص شد که نوع تنظیم کننده‌ی رشد تأثیر معنی‌داری بر القاء کالوس دارد و محیط کشت‌های محتوی BAP و IBA در مقایسه با محیط‌های حاوی IBA به تنهایی، کال‌زایی بهتری داشتند (۷). همچنین صحراروا و همکاران (۱۶) نشان دادند که محیط کشت B5 تکمیل شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و نیز محیط کشت MS تکمیل شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP دارای حداکثر مطلوبیت برای سرعت القاء کالوس در S. khuzistanica بودند. نقش تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر کشت کالوس گونه‌های متعددی از خانواده نعناعیان بررسی شده است. پیوندی و همکاران (۱۲) ضمن بررسی القاء کالوس و اندام‌زایی اسطوخودوس (*Lavandula officinalis*)، نشان دادند که بهترین کالوس‌های اندام‌زا با استفاده از ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمدند. پیش از آن‌ها، کوازی (۱۳)، از جوانه‌های برگ اسطوخودوس و محیط کشت MS دارای ۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA جهت تولید کالوس استفاده نمود. کالوس‌های حاصل در محیط محتوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP، جنین‌های سوماتیکی تولید نمودند. وی همچنین بیان نمود که محیط حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلین (GA3)، ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA برای رشد جوانه‌ها و افزایش ساقه مناسب است.

در گزارشی دیگر برای تکثیر نعناع، از کشت پروتوپلاست استفاده شد. در این تحقیق پروتوپلاست‌های حاصل از برگ نعناع را در محیط کشت B5 حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر BAP قرار دادند، کالوس‌ها پس از سه مرتبه بازکشت، شاخه‌زا شدند و نهایتاً باززایی در محیط B5 بدون هورمون صورت گرفت (۱۸).

از سوی دیگر نتایج کشت کالوس در گیاه مرزنجوش (*Origanum* spp) نشان داد که محیط کشت MS حاوی ترکیبی از ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، بهترین نتیجه را برای تولید کالوس داشت (۲۱).

این تحقیق تلاشی در جهت بهینه‌سازی کشت کالوس گیاه دارویی مرزه بختیاری و زمینه‌سازی برای تولید اقتصادی، بهبود کیفیت و کمیت ترکیبات دارویی موجود در این گیاه می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه مواد گیاهی و ریزنمونه

در این مطالعه از توده‌های گیاهی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان ایلام که در مزرعه تحقیقاتی گیاهان دارویی دانشگاه ایلام کشت شده بود، استفاده شد. گیاهچه‌های جوان، ابتدا به مدت ۸ دقیقه در ظرفی محتوای یک لیتر آب و چند قطره مایع شوینده (به منظور افزایش جذب سطحی)، قرار گرفتند و سپس به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری قرار داده شدند. به منظور گندزدایی، گیاهچه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند و برای شستشوی الکل باقیمانده بر سطح نمونه‌ها، یک بار و به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. گیاهچه‌ها سپس به مدت ۱۲ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد فرو برده شدند و چهار مرتبه هر بار به مدت ۵ دقیقه آبکشی شدند. در ادامه ریزنمونه‌های میانگره، قطعات گرهی (جوانه جانبی)، جوانه انتهایی و برگ (قسمت میانی برگ شامل رگبرگ اصلی، به طول ۰/۵ سانتی‌متر) از گیاهچه‌های ضدعفونی شده تهیه شد و بلافاصله به پتری‌دیش‌های حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS (۹) تکمیل شده با ۳ درصد ساکارز، ۰/۸ درصد آگار و تنظیم کننده‌های رشد مختلف مستقر شدند. ترکیبات هورمونی مورد استفاده در این آزمایش شاملِ: ۶- بنزیل آمینوپورین (BAP) در چهار سطح (۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و نفتالین استیک اسید (NAA) در چهار سطح (۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) بود. در نهایت، میزان pH روی ۵/۸ تنظیم شد و پتری‌دیش‌ها با پارافیلم مسدود شده و در اتاقک رشد و تحت شرایط تاریکی مطلق و دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### محاسبات آماری

صفات مدت زمان تا القاء کالوس، درصد کال‌زایی و حجم کالوس (با استفاده از مقیاس رتبه‌ای هوکر و نی‌برز) (۶) اندازه‌گیری شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۴ تکرار اجرا شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.2، مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

## نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه آماری صفات بررسی شده (جدول ۱)، نشان داد که اثرات منشاء ریزنمونه برای تمامی صفات، معنی‌دار بوده است. به نحوی که مقایسه میانگین نشان داد ریزنمونه‌ی میانگره برای صفت مدت زمان تا القاء کالوس، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد با سایر ریزنمونه‌ها داشت و سرعت کال‌زایی بالاتری از خود نشان داد. همچنین این ریزنمونه منجر به تولید حداکثر حجم کالوس شد. ریزنمونه برگ به مراتب درصد کال‌زایی کمتری نسبت به ریزنمونه‌های میانگره، قطعات گرهی و جوانه انتهایی داشت که این امر احتمالاً مربوط به شرایط فیزیولوژیکی ریزنمونه و مقدار هورمون‌های درون‌زا (اکسین و سیتوکینین) بوده است (جدول ۲).

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.20.10.7 ]

از سوی دیگر، سطوح مختلف BAP و NAA به تنهایی، برای هیچ کدام از صفات اختلاف معنی‌داری نشان ندادند، که حاکی از عدم وابستگی صفات ارزیابی شده به غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌ها و واکنش یکسان کشت‌ها به غلظت‌های مختلف هر یک از تنظیم‌کننده‌های رشد است. در حالیکه برهمکنش هر کدام از آن‌ها با منشاء ریزنمونه، تفاوت معنی‌داری برای برخی از صفات داشتند که بیانگر واکنش متفاوت ریزنمونه‌ها به غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد می‌باشد. به این صورت که برهم‌کنش سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌ی NAA و منشاء ریزنمونه تنها برای صفت حجم کالوس و برهم‌کنش سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌ی BAP و منشاء ریزنمونه تنها برای صفت مدت زمان تا القاء کالوس، اختلاف معنی‌دار داشتند (به ترتیب در سطوح احتمال ۵ و ۰/۱ درصد) (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین حجم کالوس با استفاده از ریزنمونه‌ی میانگره کشت شده در ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل شد و همان‌طور که مشخص است، در تمامی غلظت‌های NAA ریزنمونه‌ی میانگره دارای کارایی بهتری نسبت به سایر ریزنمونه‌ها برای این صفت بود (شکل ۱).

بررسی تغییرات سرعت القاء کالوس ریزنمونه‌های مختلف در اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌ی BAP نشان داد که هنگام استفاده از ریزنمونه‌ی قطعات گرهی، اِعمال سطح ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، به شدت بازدارنده بود و این ترکیب بیشترین مدت زمان را برای القاء کال‌زایی به خود اختصاص داد. در این غلظت هورمونی استفاده از سایر ریزنمونه‌ها تأثیر چشمگیری بر بهبود سرعت القاء کالوس خواهد داشت. از سوی دیگر نتایج به دست آمده بیانگر این بود که برای سایر غلظت‌های این تنظیم‌کننده اختلاف معنی‌داری در منشاء ریزنمونه مشاهده نشد (شکل ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف و برهمکنش آن‌ها بر صفات مورد ارزیابی

Table 1. Variance analysis of effect of different treatments and their interaction on evaluated traits

| منابع تغییر | درجه آزادی | میانگین مربعات | | |
|---|---|---|---|---|
| | | مدت زمان تا القاء کالوس | درصد کال زایی | حجم کالوس |
| ریزنمونه | ۳ | ۱۹۳/۵۲$^{*}$ | ۱۶۴۱۶/۹۲$^{***}$ | ۱۰۴/۸۴$^{***}$ |
| NAA | ۳ | ۱۰۶/۷۹$^{ns}$ | ۸۵۴/۴۵$^{ns}$ | ۵/۸۹$^{ns}$ |
| BAP | ۳ | ۵۲/۶۱$^{ns}$ | ۴۴۸/۳۹$^{ns}$ | ۶/۷۴$^{ns}$ |
| NAA ×ریزنمونه | ۹ | ۹۷/۸۳$^{ns}$ | ۱۵۶/۲۴$^{ns}$ | ۲۵/۴۰$^{-}$ |
| BAP ×ریزنمونه | ۹ | ۱۹۴/۹۱$^{***}$ | ۳۲۷/۹۲$^{ns}$ | ۱۶/۰۲$^{ns}$ |
| BAP× NAA | ۹ | ۲۳۴/۹۲$^{***}$ | ۲۳۱/۵۹$^{ns}$ | ۴۳/۰۶$^{***}$ |
| BAP× NAA ×ریزنمونه | ۲۷ | ۱۴۷/۰۱$^{***}$ | ۲۷۵/۵۳$^{ns}$ | ۱۹/۵۷$^{-}$ |
| اشتباه آزمایشی | ۱۹۲ | ۵۳/۹۴ | ۳۳۹/۶۶ | ۱۰/۹۹ |

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

جدول ۲- مقایسات میانگین اثرات اصلی صفات ارزیابی شده

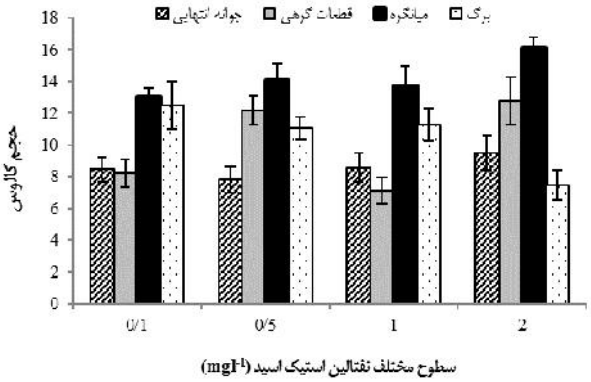
Table 2. Mean comparisons of the main effects of evaluated traits

| عوامل آزمایشی | سطوح فاکتورها | مدت زمان تا القاء کالوس | درصد کال‌زایی | حجم کالوس |
|---|---|---|---|---|
| ریزنمونه | قطعات گرهی | ۱/۴۰$^{a}$ ± ۲۴/۷۵ | ۲/۰۷$^{a}$ ± ۹۳/۰۱ | ۰/۵۷$^{b}$ ±۹/۷ |
| | جوانه انتهایی | ۱/۱۶$^{a}$ ± ۲۱/۳۱ | ۲/۲۷$^{a}$ ± ۹۲/۸۹ | ۰/۴۳$^{b}$ ± ۸/۵۶ |
| | میانگره | ۰/۹۴ $^{b}$ ±۱۶/۸۲ | ۲/۷۸$^{a}$ ± ۸۶/۱۹ | ۰/۴۷ $^{a}$ ±۱۴/۱۷ |
| | برگ | ۱/۲۷$^{a}$ ± ۲۳/۰۷ | ۲/۰۲$^{b}$ ± ۴۳/۰۱ | ۰/۵۱$^{b}$± ۹/۹۴ |
| NAA | ۰/۱ | ۱/۳۳$^{a}$ ±۲۴/۴۴ | ۳/۳۳$^{ab}$ ± ۸۰/۵۷ | ۰/۴۹$^{a}$ ± ۹/۸۶ |
| | ۰/۵ | ۱/۱۶$^{b}$ ± ۲۰/۳۸ | ۳/۷۲$^{b}$ ± ۷۵/۶۹ | ۰/۵۱$^{a}$ ± ۱۱/۱۳ |
| | ۱ | ۱/۲۹$^{ab}$ ± ۲۲/۰۲ | ۳/۲۳$^{a}$ ± ۸۶/۲۹ | ۰/۵۷$^{a}$ ± ۹/۹۸ |
| | ۲ | ۱/۱۸$^{b}$ ± ۱۹/۶۱ | ۳/۴۷$^{b}$ ± ۷۳/۷۴ | ۰/۶۵ $^{a}$±۱۰/۷۱ |
| BAP | ۰/۲ | ۱/۰۸$^{a}$ ± ۲۲/۴۳ | ۳/۶۶$^{a}$ ± ۸۰/۲۵ | ۰/۳۹$^{b}$ ± ۹/۱۳ |
| | ۰/۵ | ۱/۱۹$^{a}$ ± ۲۰/۲۳ | ۳/۴۸$^{a}$ ± ۷۸/۵۲ | ۰/۶۵$^{a}$ ± ۱۱/۳۱ |
| | ۱ | ۱/۳۸$^{a}$ ± ۲۰/۷۴ | ۳/۴۰$^{a}$ ± ۷۳/۸۰ | ۰/۵۵$^{ab}$ ± ۱۰/۵۸ |
| | ۲ | ۱/۳۳$^{a}$ ± ۲۲/۶۲ | ۳/۴۰$^{a}$ ± ۸۱/۹۲ | ۰/۵۸$^{ab}$ ± ۱۰/۰۷ |

مقادیر، میانگین ۴ تکرار ± SE (انحراف معیار میانگین‌ها) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

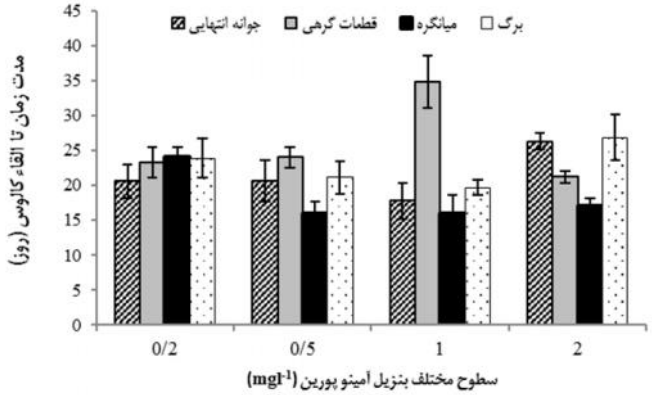
[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.20.10.7 ]




شکل ۱- بررسی پاسخ ریزنمونه‌های مختلف به غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌ی نفتالین استیک اسید برای صفت حجم کالوس
($mgl^{-1}$: میلی‌گرم در لیتر)

Figure 1. The response of different explants to different concentrations of NAA for volume callus trait

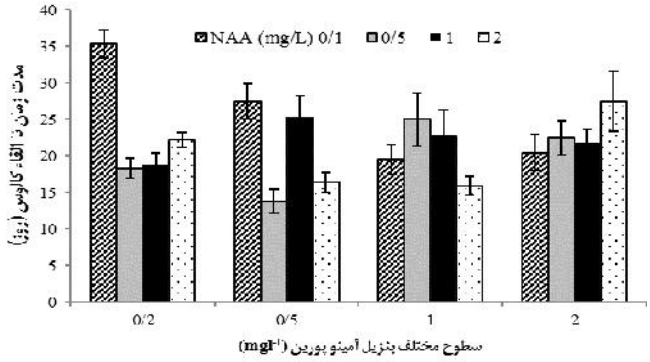



شکل ۲- تغییرات مدت زمان تا القاء کالوس تحت تأثیر ریزنمونه‌ها و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌ی بنزیل آمینو پورین
($mgl^{-1}$: میلی‌گرم در لیتر)

Figure 2. Change of duration to callus induction under influence of different explants and different concentrations of BAP

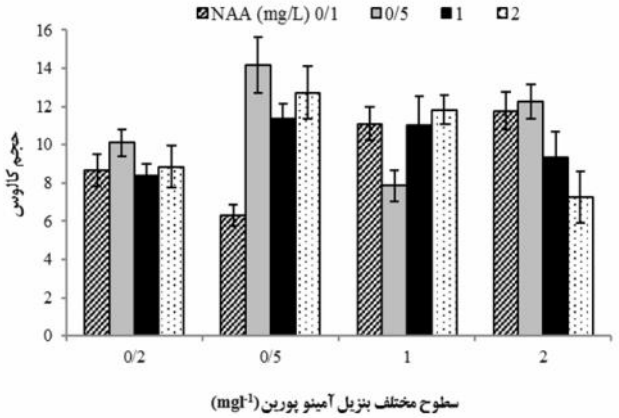
تجزیه واریانس برهمکنش سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های BAP و NAA، نمایانگر وجود اختلاف معنی‌دار برای صفات مدت زمان تا القاء کالوس و حجم کالوس در سطح احتمال ۰/۱ درصد بود. اما درصد کال‌زایی تحت تأثیر ترکیبات مختلف هورمونی یکسان بود (جدول ۱). نتایج نشان داد که ترکیبات مختلف هورمونی واکنش‌های متفاوتی به صفت مدت زمان تا القاء کالوس نشان دادند. به نحوی که ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، در مقایسه با سایر ترکیبات هورمونی حداکثر زمان را برای القاء کالوس نشان دادند. بنابراین در محیط کشت‌های محتوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، غلظت‌های بالاتر NAA (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) دارای کارایی بهتری نسبت به ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هستند. از طرف دیگر، استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA دارای حداکثر مطلوبیت برای دستیابی به کالوس در کوتاه‌ترین زمان بود (شکل ۳). مطلوبیت BAP (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) البته در ترکیب با اکسین IBA، برای دستیابی به حداکثر سرعت کال‌زایی اخیراً در گونه‌ی Satureja khuzistanica گزارش شده است (۱۶)

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.20.10.7 ]




شکل ۳- تأثیر برهمکنش تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد بر مدت زمان تا القاء کالوس
($mgl^{-1}$: میلی‌گرم در لیتر)
Figure 3. Effect of interaction of different growth regulators on duration to callus induction

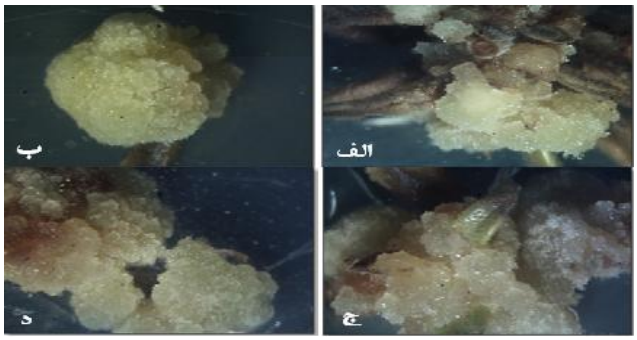
حداکثر حجم کالوس با استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد (شکل ۴). با توجه به اینکه کمترین زمان برای شروع کال‌زایی در همین ترکیب هورمونی بدست آمد، می‌توان با استفاده از این سطح هورمونی به بیشترین میزان کالوس در کمترین زمان دست یافت. بدیهی است که تولید کالوس بیشتر در مدت زمان کمتر، یکی از اهداف مهم روش‌های کشت‌بافت می‌باشد و این امر، علاوه بر صرفه‌جویی در وقت وهزینه، از تنوع سوماکلونی احتمالی در نتیجه طولانی شدن مدت زمان کشت جلوگیری می‌کند. بنابراین استفاده از ترکیبات هورمونی فوق در مقایسه با ترکیبات دیگر از پتانسیل خوبی برخوردارند. کارایی تنظیم‌کننده‌های BAP و NAA در بهینه‌سازی گونه‌های مختلفی از خانواده‌ی نعناعیان گزارش شده است (۲۱،۱۸،۱۵،۱۳).




شکل ۴- تأثیر برهمکنش تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد بر تغییرات حجم کالوس ($mgl^{-1}$: میلی‌گرم در لیتر)
Figure 4. Effect of interaction of different growth regulators on callus volume changes

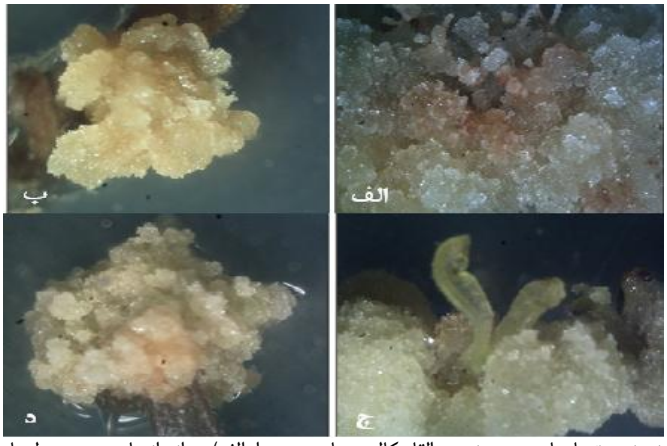
نتایج نشان داد که مقدار مناسب غلظت و ترکیب دو تنظیم‌کننده‌ی BAP و NAA، بسته به منشاء ریزنمونه متغیر است و ریزنمونه‌ها نسبت به ترکیبات مختلف دو تنظیم‌کننده، واکنش‌های متفاوتی بروز می‌دهند. به طور کلی، کالوس‌های بدست‌آمده از همه ریزنمونه‌ها کالوس‌هایی سفید، ترد و شکننده بودند که به نظر می‌رسد به دلیل قرار دادن کالوس‌ها تحت شرایط تاریکی باشد (شکل ۵). از سوی دیگر برخی از ترکیبات هورمونی کالوس‌های جنین‌زا تولید نمودند (شکل ۶). جنین‌زایی سوماتیکی فرآیند پیچیده‌ای است که ممکن است در پاسخ به برخی تنظیم‌کننده‌های رشد و عوامل تنش‌زا ایجاد شود. یک جنین سوماتیکی شبیه به یک رویان تخمی است اما، طی مسیری متفاوت و بدون عبور از مرحله‌ی لقاح بین دو سلول جنسی نر و ماده تشکیل می‌شود. این پدیده با توجه به تولید گیاهان هاپلوئید، تهیه بذور مصنوعی و بهینه‌سازی گیاهان دارای اهمیت خاصی است (۱۰،۵). در این بررسی، کالوس‌های ترد و غیر آبی به‌عنوان کالوس‌های رویان‌زا ارزیابی شدند (۲۴).

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.20.10.7 ]




شکل ۵- تاثیر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر القاء کالوس ریزنمونه‌های مختلف. الف) قطعات گرهی کشت شده در محیط حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA. ب) برگ کشت شده در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA. ج) جوانه انتهایی کشت شده در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA. د) میانگره کشت شده در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA.

Figure 5. Effect of different levels of growth regulators on callus induction of different explants. A) Nodal segments cultured in medium containing 0.2 $mgl^{-1}$BAP and 2 NAA $mgl^{-1}$. B) Leaves cultured in medium containing 1 $mgl^{-1}$ BAP and 0.5 $mgl^{-1}$ NAA. C) Terminal bud cultured in medium containing 2 $mgl^{-1}$ BAP and 0.1 $mgl^{-1}$ NAA. D) Internodes cultured in medium containing 0.5 $mgl^{-1}$ BAP and 2 $mgl^{-1}$ NAA




شکل ۶- تأثیر منشاء ریزنمونه و تیمارهای هورمونی بر القاء کالوس‌های جنین‌زا. الف) جوانه انتهایی در محیط حاوی ترکیب هورمونی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA. ب) قطعات گرهی در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA. ج) میانگره در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA. د) برگ در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA

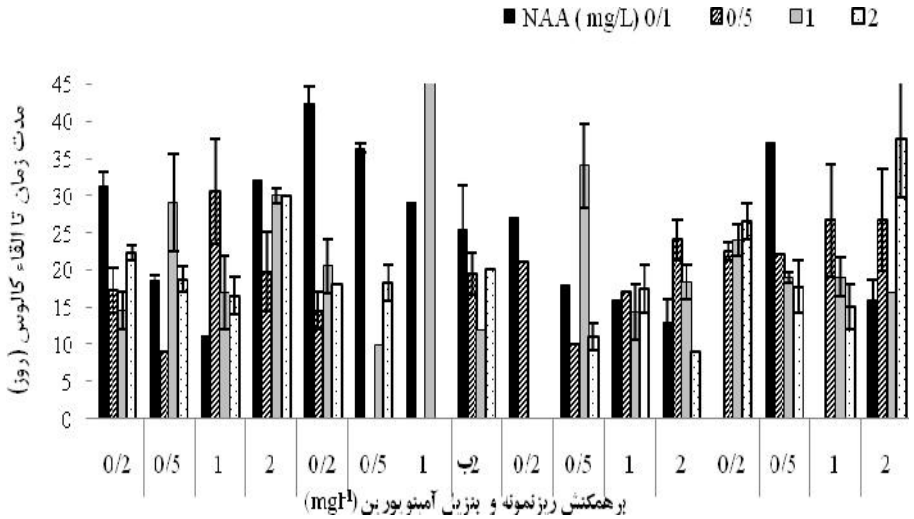
Figure 6. Effect of origin of explants and hormonal treatments on induction of embryogenic calli. A) Terminal bud in medium containing 0.2 $mgl^{-1}$ BAP and 0.5 $mgl^{-1}$ NAA. B) Nodal segments in medium containing 0.5 $mgl^{-1}$ BAP and 0.1 $mgl^{-1}$ NAA. C) Internodes in medium containing 1 $mgl^{-1}$ BAP and 0.1 $mgl^{-1}$ NAA. D) Leaves in medium containing 0.5 $mgl^{-1}$ BAP and 2 $mgl^{-1}$ NAA

اثرات بر هم‌کنش سه گانه‌ی فاکتورهای مورد بررسی، بر صفات مدت زمان تا القاء کالوس و حجم کالوس معنی‌دار بود، اما هیچ‌گونه تفاوتی برای درصد کال‌زایی مشاهده نشد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین برهم‌کنش سه‌گانه، برای صفت مدت زمان تا القاء کالوس در شکل ۷ نشان داده شده است. همان طور که مشخص است، قطعات گرهی کشت شده در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، بیشترین زمان را برای القاء کالوس به خود اختصاص داده است. از سوی دیگر، اثرات معنی‌دار بر هم‌کنش سه گانه برای صفت حجم کالوس نشان داد که ریزنمونه‌ی میانگره در محیط کشت تکمیل شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، منجر به تولید حداکثر حجم کالوس گردید (شکل ۸). اثرات مطلوب ریزنمونه‌ی میانگره بر حجم کالوس‌های تولید شده در جدول ۲ نیز کاملاً مشهود است. تأثیر مطلوب ریزنمونه‌ی میانگره و NAA بر بهینه‌سازی کشت کالوس بابونه در گذشته نیز اثبات شده است (۱۴).

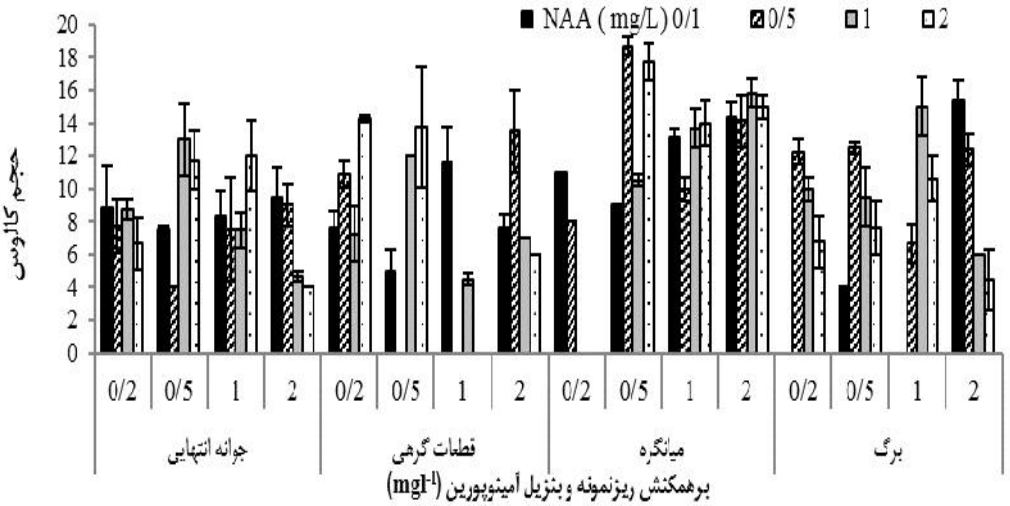
نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱)، بیانگر عدم حساسیت درصد کال‌زایی کشت‌های مرزه به تنظیم‌کننده‌های مختلف و برهم‌کنش آن‌ها با منشاء ریزنمونه است. به نحوی که نتایج به دست آمده، حاکی از کال‌زایی ریزنمونه‌ها در تمام سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد (نسبت‌های برابر اکسین به

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.20.10.7 ]

سیتوکینین، نسبت بیشتر اکسین به سیتوکینین و نیز نسبت بیشتر سیتوکینین به اکسین) بود. این امر نشان‌دهنده‌ی قابلیت انعطاف‌پذیری این گیاه به محیط‌های مختلف و تولید کالوس است. که از این خصوصیت می‌توان برای انجام کارهای اصلاحی در این گیاه استفاده نمود.




شکل ۷- مدت زمان تا القاء کالوس ریزنمونه‌های مختلف در پاسخ به ترکیبات هورمونی مختلف ($mgl^{-1}$: میلی‌گرم در لیتر)
Figure 7. Duration to callus induction of different explants in response of different hormonal combination




شکل ۸- تغییرات صفت حجم کالوس ریزنمونه‌های مختلف در پاسخ به ترکیبات هورمونی مختلف ($mgl^{-1}$: میلی‌گرم در لیتر)
Figure 8. Change of volume callus in response of different hormonal combination

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.20.10.7 ]

## منابع


1. Ahmadi, Sh., F. Sefidkon, P. Babakhanlo, F. Asgari, K. Khademi and M.A. Karimifar. 2009. Comparing essential oil composition of *Satureja bachtiarica* Bunge before and full flowering stages in field and provenance. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 2: 159-169 (In Persian).
2. Bezic, N., M. Skocibusic and V. Dunkic. 2005. Phyochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Saturaja cuneifolia* Ten. essential oil. Acta Botanica Croatica, 64: 313-322.
3. EL-Gazzar, A. and L. Watson 1970. A taxonomic study of *Labiatae* and related genera. New Phytologist, 69: 451-486.
4. Hadian, J., S.M.F. Tabatabaei, M.R. Naghavi, Z. Jamzad and T. Ramak-Masoumi. 2008. Gentic diversity of Iranian accessions of *Satureja hortensis* L. based on horticultural traits and RAPD markers. Scientia Horticulturae, 115: 196-202.
5. Majd, A., F. Chamandoosti, S. Mehrabian and M. Shedai 2008. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Canola (*Brassica napus* L.). Iranian Journal of Biology, 4: 344-352 (In Persian).
6. Mehrabi, A.A., M. Omidi and B.E. Seied-Tabataei. 2002. In vitro culture and effects of explants coculturing in canola (*Brassica napus* L.). Iranian Journal of Agricultural Sciences, 4: 627-635 (In Persian).
7. Motaghinia, T. 2013. Effect of explant, medium and plant growth regulators on induction rate of *Satureja hortensis* L. M.Sc. Thesis, Mashhad University, Faculty of Sciences. 150 pp (In Persian).
8. Mulabagal, V. and H.S. Tsay. 2004. Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering, 2: 29-48.
9. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. Physiological Plantarum, 15: 473-497.
10. Musavizadeh, S.J., K. Mashayekhi, Kh. Hemmati and B. Kamkar. 2010. Evaluation of media elements and materials on petiole somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.). Journal of Plant Production, 17: 1-21 (In Persian).
11. Omidi, M. and N. Farzin. 2012. Biotechnology approaches for improvement of medicinal plants. Modern Genetics Journal, 30: 209-220 (In Persian).
12. Peyvandi, M., L. Kazemi and A. Majd. 2009. Callogenesis and organogenesis of Lavandula vera DC. Journal on Plant Sciences Researches, 3: 57-64 (In Persian).
13. Quazi, M.H. 1980. In vitro multiplication of Lavandula spp. Annals of Botany, 45: 361-362.
14. Reichling, J. and H. Becker. 1976. Callus culturen von Matricaria chamomollia Planta Medica, 30: 258-268.
15. Sadeghian, S., G.A. Ranjbar and S.K. Kazemitabar. 2014. Consideration and selection of suitable hormonal composition for in vitro shoot regeneration and propagation of *Ocimum basilicum* L. Journal of Crop Breeding, 13: 1340-48 (In Persian).
16. Sahrarooa, A., M. Babalara, M.H. Mirjalilib, M.R. Fattahi-Moghaddamb and S. Nejad-Ebrahimic. 2014. In vitro callus induction and rosmarinic acid quantification in callus culture of *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae). Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 13: 1447-1456.
17. Salehian-Agblagh, H., N.A. Babaeian-Jelodar, G.A. Ranjbar and N.A. Bagheri. 2011. Investigation of Plant Growth Regulators Effect on Callus Induction and Green Plant Regeneration of Rice Cultivars. Journal of Crop Breeding, 4: 80-93 (In Persian).
18. Sato, H., S. Enomoto, S. Oka and I.Y. Hasomik. 1993. Plant regeneration from protoplast of peppermint (Menthapiperata). Plant Cell Reports, 12: 546-550.
19. Sefidkon, F., L. Sadeghzadeh, M. Teimouri, F. Asgari and Sh. Ahmadi. 2007. Antimicrobial effects of the essential oils of two Satureja species (S. Khuzistanica Jamzad and S. bachtiarica Bunge) in two harvesting time. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 2: 174-182 (In Persian).
20. Soltani-Pool, M., A. Mohammadi, H. Rahnama and B. Abaszadeh. 2014. Callogenesis investigation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Iranian Journal of Agronomy and Plant Breeding, 1: 45-54 (In Persian).
21. Souad, E.G., H.S. Taha and A.M. Kamel. 2006. In vivo and in vitro comparative studies on production of essential oils from Origanum spp. Journal of Food, Agriculture and Environment, 4: 127-134.
22. Tripathi, L. and J.N. Tripathi. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2: 243-253.
23. Vikrant, V., J.K. Grover, N. Tandon, S.S. Rathi and N. Gupta. 2001. Treatment with extracts of *Momordica charantia* and Eugenia Jambolana prevents hyperglycemia and hypernsuline miain fructose fed rats. Journal of Ethnopharmacology, 76: 139-143.
24. Von-Arnold, S., P. Sabala-IBozhkov, J. Dyachok and L. Filonova. 2002. Development pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 69: 233-249.


[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.20.10.7 ]

# Optimization of Callus Culture of *Satureja Bachtiarica* L. using Different Explants and Concentrations of Growth Regulators

**Leila Elyasi[1], Ali-Ashraf Mehrabi[2], Mehdi Seyedi[3] and Zeinab Safari[4]**

1, 2 and 3- Gradated M.Sc., Associate Professor and Assistant Professor, Ilam University
4- PhD Student, Ilam University (Corresponding Author: zsafari_89@yahoo.com)
Received: February 17, 2015 Accepted: September 20, 2015

**Abstract**

Satureja bachtiarica L, an important medicinal plant from Lamiaceae family is valuable because of its medical compounds. Optimization of in vitro culture through callogenesis is proposed to be an alternative for vegetative propagation. In present study, an efficient protocol has been developed for callus induction of S. bachtiarica using different explants and concentrations of plant growth regulators on MS basal medium. Results indicated that the highest rate of callogenesis (16.82±0.94 days after culture) and callus volume (14.17±0.47) were achieved from internodes explants. On the other hand, for percentage of callus induction, shoot tips, internodes and nodal segments explants were more efficient than that of leaves explants. According to the results, the nodal segments cultured on medium supplemented with 1 $mgl^{-1}$ BAP plus 1 $mgl^{-1}$ NAA led to a remarkable decrease in induction rate of calli. Maximum callus volume was obtained from internodes explants cultured on medium supplemented with 0.5 $mgl^{-1}$ BAP plus 0.5 $mgl^{-1}$ NAA.

**Keywords:** Callus, Explant, Growth regulator, Medium, *Satureja bachtiarica* L.

[ Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20 ]

[ DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.20.10.7 ]