



"مقاله پژوهشی"

بررسی سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در کالوس‌زایی و باززایی پونه‌سای کوهی (*Nepeta pogonosperma* L.)

فهیمة نظرزاده^۱، عبدالله محمدی^۲ و محمود خسروشاهلی^۳

۱- گروه اصلاح نباتات، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۲- گروه اصلاح نباتات، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران، (نویسنده مسوول: abdollahmohammadi54@gmail.com)
۳- گروه بیوتکنولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۱
صفحه: ۱ تا ۸

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: جنس پونه‌سا (*Nepeta* L.) متعلق به خانواده نعنائیان، دارای گونه‌های دارویی و اسانس‌دار بسیار ارزشمندی است که تاکنون بالغ بر ۲۵۰ گونه از این جنس در جهان و ۶۷ گونه از ایران گزارش شده است. تحقیق حاضر به منظور ارائه یک روش سریع و کارآمد برای کالوس‌زایی و باززایی این گونه دارویی با استفاده از بذر برای ریزازدیادی و استفاده در سایر روش‌های اصلاحی انجام شده است.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی کالوس‌زایی، بذر این گیاه در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشدی 2,4-D و BAP (صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) کشت شد. به منظور بررسی باززایی، از تنظیم کننده‌های رشدی IBA و BAP (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و برای بررسی ریشه‌زایی از محیط‌های کشت مختلف MS، 1/2MS (بدون زغال فعال و با زغال فعال)، با تنظیم کننده‌های رشدی IBA (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد.

یافته‌ها: در آزمایش کالوس‌زایی حدود ۱۰ روز پس از کشت بذور اولین نشانه‌های تشکیل کالوس مشاهده شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس بر کالوس‌زایی نشان دهنده بی‌معنی بودن تاثیر اثر اصلی تنظیم کننده رشد BAP و اثر متقابل 2,4-D × BAP بر کالوس‌زایی، حجم کالوس و درصد جنین‌زایی بود. در آزمایش باززایی از کالوس، کالوس‌های ایجاد شده در محیط MS حاوی سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشدی IBA و BAP جهت باززایی غیرمستقیم قرار داده شدند. اندازه کالوس‌ها بعد از دو هفته افزایش یافت و برخی از ریزنمونه‌ها شروع به کالوس‌زایی نموده و تعدادی از آن‌ها هم باززا شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس در باززایی غیرمستقیم نشان داد که در محیط MS حاوی سطوح مختلف BAP در سطح احتمال ۵ درصد، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ولی در اثر متقابل تنظیم کننده‌های رشدی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف بر ریشه‌زایی هم نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف IBA و محیط‌کشت MS در سطح احتمال ۱ درصد روی این صفت معنی‌دار است. بنابراین در بین تیمارهای بکار رفته امکان پیدا کردن تیماری که تاثیر بهتری از بقیه دارد وجود دارد.

نتیجه‌گیری: سطوح مختلف 2,4-D تاثیر متنوعی روی کالوس‌زایی داشت و در تمام سطوح استفاده شده 2,4-D، کالوس‌زایی مشاهده شد اما بالاترین درصد کالوس‌زایی (۹۰ درصد)، کالوس‌های جنین زا (۶۳ درصد) و بزرگترین کالوس‌ها (به میزان ۱۸/۴ براساس مقیاس هوکر و نی برز) در محیط کشت تکمیل شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس بر باززایی نشان داد با توجه به اینکه اثر متقابل دو تنظیم کننده رشدی IBA و BAP معنی‌دار نشد بنابراین استفاده از یکی از این تنظیم کننده‌های رشدی می‌تواند مفید باشد. بالاترین درصد باززایی و ظهور گیاهچه از کالوس (۸۸/۹ درصد) در محیط MS با تنظیم کننده‌های رشدی IBA در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر حاصل شد. بالاترین درصد ریشه‌زایی (۱۰۰ درصد) در محیط 1/2MS حاوی تنظیم کننده‌های رشدی IBA در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر تولید شد. در نهایت برخلاف گزارش‌هایی مبنی بر ضعف در سازگاری گیاهان حاصل از کشت بافت، بیش از ۸۰ درصد از گیاهچه‌ها در محیط سازگار شدند.

واژه‌های کلیدی: باززایی، پونه‌سای کوهی، ریزنمونه، کالوس، 2,4-D، IBA

مقدمه

گیاه پونه‌سای کوهی (*Nepeta pogonosperma* L.) یکی از گیاهان تیره نعنائیان (*Labiatae*) و یکی از گونه‌های پونه‌سای انحصاری ایران (در منطقه الموت) می‌باشد (۳) ترکیبات گزارش شده از جنس پونه‌سا شامل فلاونوئیدها، ایریدوئیدها، فنل‌ها و دی‌ترپن‌ها می‌باشند (۳). گیاهان این جنس معطر بوده و اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، حشره کشی، ضد التهابی، ضد دردی و ضد اضطرابی دارند. همچنین در طب سنتی به دلیل داشتن اثرات خلط‌آور، ضد عفونی کننده، ضد سرفه، ضد آسم، مدر و تب‌بر استفاده می‌شوند (۳).

به دنبال مشخص شدن عوارض سوء ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، گیاهان دارویی در بسیاری از موارد جایگزین داروهای شیمیایی شدند (۶) به همین دلیل استفاده از گیاهان دارویی در جهان روز به روز در حال افزایش است (۱۸). این افزایش مصرف نیازمند تولید بیشتر می‌باشد زیرا در صورت بهره‌برداری از طبیعت نیازهای صنایع دارویی و آرایشی بهداشتی برطرف نخواهد شد، بلکه انقراض برخی

گونه‌های مهم دارویی و فرسایش‌های مختلف را نیز به دنبال خواهد داشت (۳، ۵). در میان گیاهان دارویی، جنس پونه‌سا (*Nepeta*) متعلق به خانواده نعنائیان، دارای گونه‌های دارویی و اسانس‌دار بسیار ارزشمندی است (۳). تکثیر گیاه پونه‌سای کوهی با استفاده از کشت بافت راه‌حل کارآمد و مفید برای غلبه بر مشکلات تکثیر آن می‌باشد (۲۴). بهره‌برداری ناپایدار و بی‌رویه و نیز پراکندگی محدود این گیاه در کوه‌های بینالود، موجب شده است که این گونه تحت خطر انقراض و فرسایش قرار گیرد. لذا کشت بافت اندام هوایی به‌عنوان اولین قدم در حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه مهم و همچنین تکثیر این گیاه ضروری می‌باشد (۱۶) تولید و توسعه مؤثر جنین‌های سوماتیکی، پیش‌نیازی برای تولید گیاهان در سطح تجاری است. جنین‌زایی سوماتیکی فرآیندی است که طی آن گروهی از سلول‌ها یا بافت‌های سوماتیکی (غیرگامتی) تمایز یافته و تشکیل ساختار دوقطبی شامل محور ریشه و ساقه می‌دهند. این جنین‌ها شبیه جنین‌های جنسی هستند و در محیط کشت مناسب می‌توانند بالغ شده و به نهال تبدیل شوند. باززایی

باززایی از کالوس: به‌منظور مطالعه روی باززایی از کالوس‌های بدست آمده از آزمایش اول، آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در محیط‌هایی با تنظیم‌کننده‌های رشدی BAP در پنج سطح (صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و IBA در پنج سطح (صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) در چهار تکرار اجرا شد. برای اندازه‌گیری درصد باززایی، ۳۰ روز پس از کشت کالوس‌ها در محیط‌های کشت یاد شده، از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{درصد باززایی} = \frac{\text{تعداد شاخه‌ها}}{\text{کل کالوس}} \times 100$$

ریشه‌زایی: به‌منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف IBA، وجود یا عدم وجود زغال فعال و غلظت محیط کشت روی القای ریشه از شاخه‌های نو پدید حاصل از محیط‌های باززایی از طرح کاملاً تصادفی با نه تیمار و چهار تکرار استفاده شد. تیمارها شامل محیط کشت 1/2MS در پنج ترکیب مختلف (حاوی صفر، یک و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و یک و دو میلی‌گرم در لیتر زغال فعال) و محیط کشت MS در چهار ترکیب تنظیم‌کننده رشدی مختلف (حاوی غلظت‌های صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA) بودند. پس از یک ماه میزان پاسخ ریشه‌زایی شاخه‌ها با استفاده از فرمول زیر یادداشت‌برداری شد.

$$\text{درصد ریشه‌زایی} = \frac{\text{تعداد گیاهان ریشه دار شده}}{\text{کل شاخه‌ها}} \times 100$$

به تمامی محیط‌های کشت ۷ گرم در لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز افزوده شد. pH محیط‌ها در ۵/۸-۵/۶ تنظیم شد و محیط‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در فشار ۱/۲ بار به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند.

به‌منظور سازگاری، گیاهچه‌ها از آگار خارج شده و پس از شستشو با آب ولرم، در گلدان‌های کوچک با ترکیب کوکوپیت: پرلیت (به نسبت ۱:۲) کشت شدند. سپس برای حفظ رطوبت، روی گلدان‌ها را با سرپوش پلاستیکی پوشانده و به داخل اتاق رشد در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. به‌منظور انجام سازگاری تدریجی و برای تهیه بهتر هر چند ساعت یک بار گیاهچه‌ها مورد مه‌پاشی قرار می‌گرفتند. پس از سه هفته، چند منفذ کوچک روی سرپوش‌ها ایجاد و در هفته ششم سرپوش‌ها به طور کامل برداشته شدند و گیاهان سازگار شده به گلخانه انتقال داده شدند (شکل ۴).

آنالیز داده‌ها و محاسبات آماری: به دلیل شمارشی بودن، داده‌ها با استفاده از تبدیل جذری نرمال شدند (۲۸) و سپس بررسی آماری داده‌های حاصل از آزمایشات در موارد مختلف با استفاده از نرم‌افزار MSTATc انجام گرفتند. تیمارها به کمک روش ANOVA و بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد گروه‌بندی و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل رسم شد.

نتایج و بحث

کالوس‌زایی: حدود ۱۰ روز پس از کشت بذور در محیط‌های کالوس‌زایی اولین نشانه‌های تشکیل کالوس مشاهده شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس بر کالوس‌زایی پونه‌سای کوهی (جدول ۱) نشان‌دهنده بی‌معنی بودن تاثیر اثر اصلی

گیاهان با استفاده از جنین‌زایی سوماتیکی از یک سلول، در بسیاری از گونه‌های گیاهان دارویی به اثبات رسیده است. بنابراین در این حالت با توجه به پتانسیل متفاوت سلول‌های مختلف در تولید یک ترکیب دارویی، می‌توان گیاهانی با ویژگی برتر نسبت به گیاه اولیه تولید نمود (۲).

با استفاده از کشت درون شیشه‌ای می‌توان نسبت به تولید انبوه و عاری از آلودگی گیاه پونه‌سای کوهی اقدام نمود (۲۱). همچنین اولین گام در اصلاح ژنتیکی، بهینه‌سازی کشت بافت این گیاه می‌باشد. با توجه به اهمیت گیاه پونه‌سای کوهی در صنایع مختلف، بهینه‌سازی کشت بافت آن به‌عنوان گام نخست در بهبود و افزایش تولید متابولیت ثانویه این گیاه حائز اهمیت می‌باشد (۲۲).

در مطالعه القاء کالوس در بادنجه‌بویه در شرایط *In vitro* نتایج نشان داد که بهترین تیمار تنظیم‌کننده رشدی برای القای کالوس در ریزنمونه‌های میانگرمه و دمبرگ استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر BAP و برای ریزنمونه برگ، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر BAP بود (۲۵). در بابونه شفاف نیز بیشترین فراوانی باززایی از اندام‌های هوایی در ریزنمونه برگ در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد. در ریزنمونه جنین نیز بهترین تیمار تنظیم‌کننده رشدی برای باززایی اندام هوایی، ۳ میلی‌گرم در لیتر BA بود (۲۷). این تحقیق با هدف مطالعه بهینه جنبه‌های مختلف کشت بافت شامل کالوس‌زایی، تولید اندام هوایی و ریشه‌زایی گیاه پونه‌سای کوهی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

برای این مطالعه گیاه پونه‌سای کوهی از آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج تهیه شد. به‌منظور ضدعفونی، بذور زیر هود لامینار به مدت ۳۰ ثانیه در معرض الکل ۹۶ درصد قرار داده شد و پس از شستشو با آب مقطر، به مدت ۳ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد قرار گرفت. بذرها پس از سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، جداگانه روی چند لایه کاغذ صافی استریل، خشک شدند و در شرایط کاملاً استریل به درون محیط کشت انتقال یافتند.

کالوس‌زایی: برای بررسی کالوس‌زایی از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با فاکتورهای تنظیم‌کننده‌ی رشدی 2,4-D در پنج سطح (صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و BAP در پنج سطح (صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و در چهار تکرار استفاده شد. ظروف کشت حاوی ریز نمونه‌ی بذر در اتاقک رشد در دمای $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ نگهداری شدند. پس از گذشت مدت زمان ۲۱ روز از تاریخ کشت درصد کالوس‌زایی بر اساس نسبت تعداد ریزنمونه‌های دارای کالوس به تعداد کل ریزنمونه‌های یک تکرار، درصد جنین‌زایی بر اساس نسبت تعداد کالوس‌های جنین‌زا به کل کالوس‌های ایجاد شده و حجم کالوس‌های تولید شده با استفاده از الگوی استاندارد هوکر و نی‌برز (۹) محاسبه گردید.

تنظیم کننده رشد BAP و اثر متقابل BAP × 2,4-D بر کالوس زایی، حجم کالوس و درصد جنین زایی بود. در حالی که اثر اصلی 2,4-D در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود. معنی داری صفات مورد مطالعه نشان می دهد سطوح مختلف 2,4-D تاثیر متنوعی روی کالوس زایی داشته است و برای تعیین بهترین سطوح باید مقایسه میانگین انجام شود.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تنظیم کننده های رشدی 2,4-D و BAP روی صفات کالوس حاصل از بذر پونه سای کوهی
Table 1. Analysis of variance for effect of BAP and 2, 4-D on callus characteristics of *N. pogonosperma*

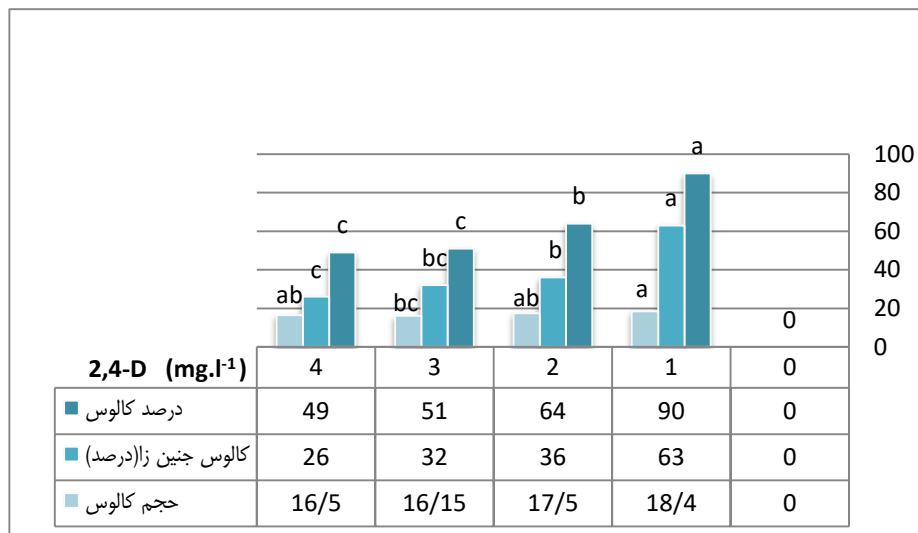
میانگین مربعات (MS)			df	منبع تغییرات
درصد جنین زایی	حجم کالوس	درصد کالوس		
۶۶۶ ^{ns}	۱۶/۵ ^{ns}	۸۱۴ ^{ns}	۴	BAP
۱۰۱۷۶ ^{**}	۱۱۹۰/۳ ^{**}	۲۱۴۷۴ ^{**}	۴	2,4-D
۶۵۸/۵ ^{ns}	۱۷/۱ ^{ns}	۶۱۱/۵ ^{ns}	۱۶	BAP × 2,4-D
۴۷۸/۷	۳۴	۷۷۶	۷۵	خطا
۵۵/۷	۲۳/۹	۴۳/۸		ضریب تغییرات (CV)

ns * و **: به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

و ترکیب تنظیم کننده رشدی جهت القای کالوس و نیز باززایی گیاه از ریزنمونه نشان داد که بهترین ریزنمونه ساقه، بالاترین میزان القای کالوس در محیط حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۱/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D معرفی گردید. همانطور که ملاحظه می شود نتیجه حاصل با نتایج پژوهش حاضر مطابقت نسبی دارد و نقش 2,4-D اینجا هم در کالوس زایی ثابت شده است. البته 2,4-D به تنهایی نمی تواند باعث ایجاد کالوس شود و نتیجه این آزمایش نشان می دهد که سیتوکینین های درون زرا در این گیاه باعث ایجاد تعادل شده است.

مشاهدات تجربی نشان داد که استفاده از 2,4-D به هر میزان در محدوده تعریف شده آزمایش باعث تشکیل کالوس می شود، اما آزمون مقایسه میانگین نشان داد کشت درون شیشه ای پونه سای کوهی در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D بیشترین درصد کالوس زایی (۹۰ درصد) را دارد. بدیهی است موقعی که هیچ تنظیم کننده رشدی استفاده نشد پاسخی هم مشاهده نگردید (شکل ۱).

تحقیقات انجام شده توسط امینی فر و همکاران (۱)، روی *Nepeta pogonosperma* به منظور بررسی بهترین ریزنمونه



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر غلظت های تنظیم کننده رشدی 2,4-D بر درصد کالوس، کالوس جنین زا و حجم کالوس به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد

Figure 1. Means Compare of callus induction, embryo genic callus and callus volume in different levels of 2,4-D with DMRT at p ≤ 0.05

خصوص در غلظت های بالای (۴ میلی گرم بر لیتر) 2,4-D در جنین ها تغییر رنگ مشاهده شد.

جنین ها در تیمارهای 2,4-D در ابتدا به بلوغ نرسیدند، اما پس از هر واکشت بر تعداد جنین ها افزوده شد. باززایی گیاهان با استفاده از جنین زایی سوماتیکی از یک سلول، در بسیاری از گونه های گیاهان دارویی به اثبات رسیده است. بنابراین در این حالت با توجه به پتانسیل متفاوت سلول های مختلف در تولید

نتایج مقایسه میانگین (شکل ۱) نشان داد که کشت درون شیشه ای پونه سای کوهی در محیط کشت پایه MS تکمیل شده با یک میلی گرم در لیتر 2,4-D با ۶۳ درصد، بیشترین کالوس های جنین زا را تولید کرد. جنین ها به رنگ سفید بودند و با توجه به مشاهده میکروسکوپی در مراحل مختلف رشدی قرار داشتند، بیشترین جنین ها در مراحل رشدی کروی و قلبی شکل بودند. در برخی از تیمارهای تنظیم کننده رشدی به

کوهى در محیط MS حاوى سطوح مختلف تنظیم کننده رشدى IBA و BAP جهت باززایى غیرمستقیم قرار داده شدند. پس از قرار دادن کالوس‌ها در محیط کشت پایه MS، اندازه کالوس‌ها بعد از دو هفته افزایش یافت و برخى از ریزنمونه‌ها شروع به کالوس‌زایى نموده و تعدادى از آن‌ها هم باززا شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس در باززایى غیر مستقیم نشان می‌دهد که در محیط MS حاوى سطوح مختلف BAP در سطح احتمال ۵ درصد، اختلاف معنی‌دارى وجود دارد ولی در اثر متقابل تنظیم کننده‌هاى رشدى اختلاف معنی‌دارى مشاهده نشد (جدول ۲).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس بر باززایى نشان داد تنظیم کننده‌هاى رشد IBA و BAP و اثر متقابل آن‌ها از نظر صفات تعداد شاخه و تعداد برگ بی‌معنى بودند، در حالى که از نظر درصد باززایى اثر اصلی IBA در سطح احتمال ۵ درصد و اثر اصلی BAP در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. با توجه به اینکه اثر متقابل این دو تنظیم کننده رشدى معنی‌دار نشد بنابراین استفاده از یکى از این تنظیم کننده رشدى می‌تواند مفید باشد و برای انتخاب بهترین آن لازم است مقایسه میانگین تیمارها انجام شود.

یک ترکیب داروئى، می‌توان گیاهانى با ویژگی برتر نسبت به گیاه اولیه تولید نمود (۲).

بر اساس نتایج مقایسه میانگین حجم کالوس و بر اساس مقیاس هوکر و نی‌برز(هوکر)، کالوس‌هاى حجیم در محیط کشت پایه MS حاوى 2,4-D در سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد (شکل ۱). همانطور که ملاحظه می‌شود این سطح از تنظیم کننده رشدى برای کالوس‌زایى، حجم کالوس و همچنین برای ایجاد کالوس‌هاى جنین‌زا مناسب می‌باشد و می‌توان آنرا برای استفاده در تحقیقات بعدى توصیه کرد. نتایج این تحقیق با تحقیقات انجام شده توسط سلطانى پول و همکاران (۲۵) روی بادرنجبویه مطابقت دارد. در تحقیق یاد شده نیز یکى از تنظیم کننده‌هاى رشدى موثر بر کالوس‌زایى ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود که همراه با BAP تیمار مناسبى محسوب می‌شد. در تحقیق حاضر با توجه به اینکه صرفا 2,4-D پاسخ داد می‌توان نتیجه گرفت که سیتوکینین درون‌زای گیاه پونه‌سای کوهى در حدى است که توانسته با اکسین اضافه شده به محیط تعادل ایجاد کرده و سبب تولید کالوس شود.

باززایى از کالوس: کالوس‌هاى ایجاد شده از بذور پونه‌سای

جدول ۲- تجزیه واریانس برای تاثیر سطوح مختلف BAP و IBA روی درصد باززایى، تعداد شاخه و تعداد برگ پونه‌سای کوهى

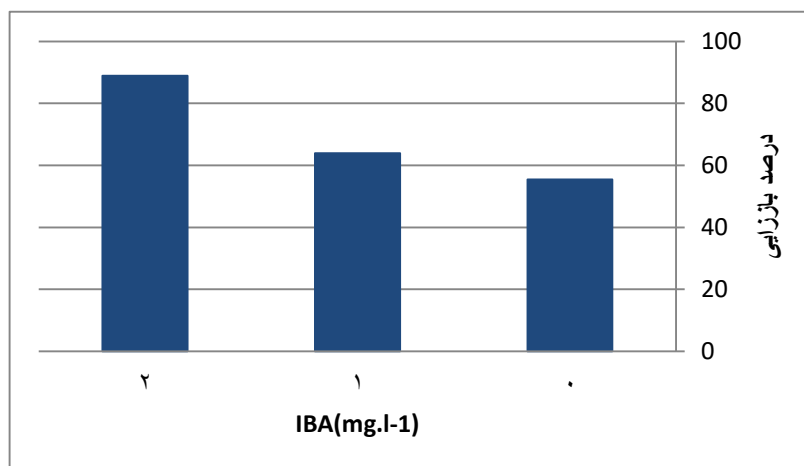
Table 2. Analysis of variance for effect of different levels of BAP and IBA on percentage of regenerating calli, No. of branches and leaves of *N. pogonosperma*

میانگین مربعات (MS)		df	منبع تغییرات (SOV)
تعداد برگ	تعداد شاخه	درصد باززایى	
۳۲۶۸/۱ ^{ns}	۷۲۸/۸ ^{ns}	۳۶۱۴/۴*	غلظت هورمون IBA
۱۱۸۷/۲ ^{ns}	۳۸۱/۲ ^{ns}	۴۵۲۳/۲**	غلظت هورمون BAP
۳۰۳۳/۱ ^{ns}	۷۴۹/۷ ^{ns}	۲۰۳۶/۴ ^{ns}	غلظت هورمون IBA × BAP
۲۰۵۱/۵	۵۶۴/۸	۷۷۲/۲	خطا
۳۱	۲۵/۲	۴۰	ضریب تغییرات (CV)

^{ns}، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

بررسی مقایسه میانگین تیمارها (شکل ۲) نشان داد که بیشترین باززایى (۸۸/۹ درصد) در محیط کشت پایه MS حاوى ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و کمترین میزان باززایى در محیط کشت پایه MS حاوى ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد. این نتیجه مجدد بر وجود مقادیر بالای تنظیم کننده رشدى سیتوکینین درون‌زا را در گیاه مورد مطالعه تایید می‌کند. تحقیقات انجام شده توسط صادقیان و همکاران (۲۰)، برای بررسى و انتخاب ترکیب تنظیم کننده رشدى مناسب جهت باززایى شاخه و تکثیر درون شیشه گیاه ریحان، بالاترین باززایى در محیط حاوى یک

میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با (۲/۰ میلی‌گرم بر لیتر) NAA به دست آمد. که طبیعتا نتیجه این تحقیق با تحقیق حاضر همخوانى ندارد که دلیل آن می‌تواند به نوع گیاه و میزان تنظیم کننده رشدى‌هاى درونى آن‌ها مربوط باشد. این هورمون درونى با توجه به اینکه می‌تواند تحت‌تاثیر محیط قرار گیرد حتى درون گونه و بوته‌هاى مختلف یک توده متفاوت باشد که این مساله اهمیت بهینه‌سازى کشت بافت توده‌هاى مختلف را نمایان می‌سازد. اما نتایج این تحقیق با نتایج امینى و همکاران (۱) مطابقت نسبی دارد.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های تنظیم‌کننده رشدی IBA بر درصد باززایی به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد
Figure 2. Means Compare of regeneration in different levels of IBA with DMRT at p≤0.05

ریشه‌زایی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف بر ریشه‌زایی (جدول ۳) نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف IBA و محیط‌کشت MS در سطح احتمال ۱ درصد روی این صفت معنی‌دار بود. بنابراین در بین تیمارهای بکار رفته امکان پیدا کردن تیماری که تاثیر بهتری از بقیه دارد وجود دارد.

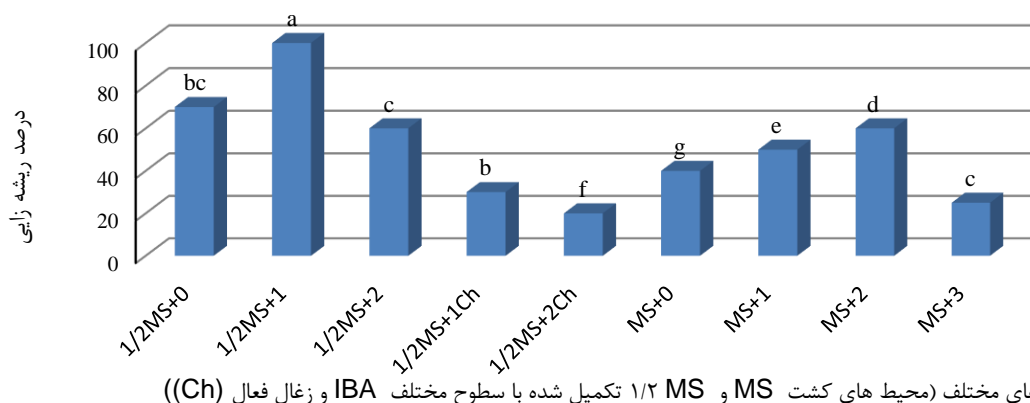
جدول ۳- تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف تنظیم‌کننده رشدی IBA و زغال فعال روی ریشه‌زایی
Table 3. Analysis of variance for effect of some treatments on percentage of rooting of *N. pogonosperma* explants

میانگین مربعات	df	منبع تغییرات
درصد ریشه‌زایی		
۳۶۱۴/۴**	۸	تیمار
۶۷۲/۲	۲۷	خطا
۲۶/۵		ضریب تغییرات

ns, * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

کشت MS کامل نیز درصد ریشه‌زایی کمتر بود. این یافته با نتایج تحقیقات انجام شده توسط حسین آبادی و همکاران (۱۰) روی گیاه دارویی سنبل‌الطیب همخوانی دارد. تحقیق آن‌ها تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA بهترین تیمار در تولید ریشه بود.

نتایج مقایسه میانگین (شکل ۳) نشان داد که در محیط کشت 1/2MS تکمیل شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بیشترین ریشه‌زایی (۱۰۰ درصد) مشاهده شد. با توجه به نتایج مشاهده شده بهترین محیط برای ریشه‌زایی محیط کشت پایه 1/2MS است و هر چقدر غلظت تنظیم‌کننده رشدی افزایش یافت درصد ریشه‌زایی کمتر شد. در محیط



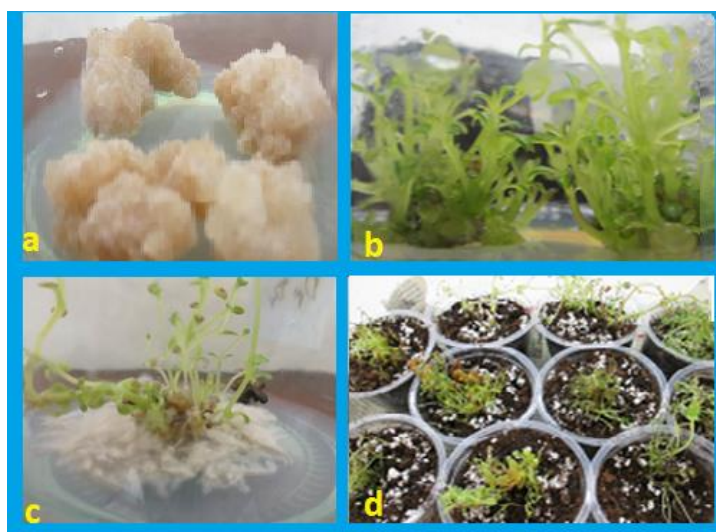
شکل ۳- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف MS (به همراه چهار سطح صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA)، 1/2MS ((به همراه ۳ سطح IBA صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و زغال فعال (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)) بر درصد ریشه‌زایی به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد

Figure 3. Means Compare of rooting of shoots in different levels of IBA, 1/2MS, MS and activated charcoal with DMRT at p≤0.05

باززایی معرفی گردید. همانطور که ملاحظه می‌شود نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق انجام شده توسط امینی‌فر و همکاران (۱) تطابق وجود ندارد که دلیل آن را می‌توان به نوع اکوتیپ، محل جمع‌آوری اکوتیپ، نحوه نگهداری آن و به طور کلی ژنوتیپ افراد دانست که نتیجه آن تفاوت در میزان هورمون‌های درونی است که بر میزان استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشدی تاثیر می‌گذارد و بنابراین بهینه‌سازی محیط کشت برای گونه‌های مختلف در تحقیق‌های مختلف از ضروریات می‌باشد.

با وجود اینکه گزارش ابراهیمی و همکاران (۴) حاکی از مشکل بودن سازگاری در خانواده نعناعیان می‌باشد ولی در این تحقیق بالای ۸۰ درصد از گیاهچه‌ها در محیط سازگار شدند (شکل ۴) و بقیه بنا به دلایل مختلف از جمله آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از بین رفتند.

با توجه به تحقیق انجام شده توسط امینی‌فر و همکاران (۱) روی بذور گیاه *Nepeta pogonosperma* بالاترین میزان القای کالوس در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D صورت گرفت و محیط حاوی ۱/۵ گرم در لیتر BAP و ۰/۱ گرم در لیتر NAA به عنوان محیط



شکل ۴- بهینه‌سازی کالوس‌زایی (a)؛ باززایی (b)؛ ریشه‌زایی (c)؛ گیاهچه‌های سازگار شده در شرایط برون شیشه‌ای (d) در گیاه پونه‌سای کوهی

Figure 4. Optimization of callus induction (a); regeneration (b); rooting of shoots (c) plantlets after hardening off (d) of *N. pogonosperma*

منابع

1. Aminifar, Z., H. Hashemi-sahi, S. Rostampour and A. Ashrafi. 2010. Callus induction and regeneration of *Nepeta pogonosperma*, Medicinal Plants Conference, Jahad-e-Daneshgahi, Mazandaran, https://www.civilica.com/Paper-HERBAL01-HERBAL01_724.html.
2. Bagheri, H. and P. Azadi. 2002. Plant tissue culture (techniques and experimental). First Edition. Mashhad University: 154 pp.
3. Batooli, H. and J. Safaei-Ghomi. 2012. Comparison of essential oil composition of three *Nepeta* L. species from kashan, Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28(1): 161-172.
4. Ebrahimie, E., M.R. Naghavi, A. Hosseinzadeh, M.R. Behamta, B. Mohammadi and G. Spangenberg. 2007. Induction and comparison of different in vitro morphogenesis pathways using embryo of cumin (*Cuminum cyminum* L.) as a model material, Plant Cell Tiss. Organ Cult, 90: 293-311.
5. Elyasi, L., A.A. Mehrabi, M. Seyedi and Z. Safari. 2016. Optimization of callus culture of *Satureja Bachtiarica* L. using different explants and concentrations of growth regulators. Journal of Crop Breeding, 8(20): 124-132 (In Persian).
6. Gooding, M.J., A.J. Murdoch and R.H. Ellis. 2003. The value of seeds, Seed Technology and its Biological Basis, Edit: Black, M., M. Bewley, 11: 2-41.
7. Haberlandt, G. 1902. Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen sitzungsbe. Kad. Wiss, math. Naturwiss. Kl. Abt, 111: 69-92.
8. Hans, R.S. 2007. The potential of stem cells: An Inventory. In: Nknoepffler, Dschipanski, S Lorenz sorgner (Eds.), Human biotechnology as social Challenge. Ashgate publishing, Ltd. 28 p.
9. Hooker, M.P. and M.W. Nabors. 1977. Callus initiation, growth and organogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). ZPflanzenphysio, 184: 237-246.

10. Hoseinabadi, M., S. Mansouri, A.A. Mehrabi and K.R. Esmaeili. 2011. Optimization of callus induction and regeneration of *Valeriana officinalis*. Medicinal Plants Conference, Jahad-e-Daneshgahi, Mazandaran, https://www.civilica.com/Paper-HERBAL01-HERBAL01_203.html.
11. Krikorian, A.D. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. In Daves, p.j. (ed.). Plant hormones: physiology, Biochemistry and molecular Biology. Kluwer, Dordrecht, 774-796 pp.
12. Madrid, F., R. Lopez and F. Cabrera. 2007. Metal accumulation in soil after application of municipal solid waste compost under intensive farming conditions. Agriculture, Ecosystems and Environment, 119: 249-256.
13. Malik, A.A., S. Suryapani and J. Ahmad. 2011. Chemical vs. Organic Cultivation of Medicinal and Aromatic plants: the choice is clear. Int. J. Med. Aromatic. Plants, 573 p.
14. Martin, K.P. 2003. *In vitro* propagation of the herbal spice *Eryngium foetidum* L. on sucrose-added and sucrose-free medium without growth regulators and CO₂ enrichment. Scientia Horticulturae, 102: 277-282.
15. Murashige, T. 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture. In: TA Thorpe (Ed.). Frontiers of plant tissue culture 1978 (pp: 15-26, 518-524). Frontiers of plant tissue culture. Calgary University. Press, Calgary.
16. Najafipour, N., M. Valizadeh, E. Mostafavi and A. Masoumi. 2016. In vitro regeneration studies of *Nepeta binaludensis* Jamzad. The 6th International Conference on the new horizons in the Agricultural Sciences, Natural Resources and Environment. Association of new horizons in sciences and technologies, Tehran.
17. Omidbeygi, R. 1995. Approaches manufacturing and processing plants. Tarrahan nashr publications, 283 p (In Persian).
18. Ozgen, U., A. Mavi, Z. Terzi, A. Yildirim, M. Coskum and P.J. Houghton. 2006. Antioxidant properties of some medicinal Lamiaceae (*Labiatae*) species. Pharm. Biology, 44: 107-112.
19. Poehlman, G.M. and J. Mitton. 2003. Breeding Field Crops. Van Nostrand Reinhold. New York. 45: 724.
20. Sadeghian S., Gh.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, 6(13): 40-48 (In Persian).
21. Sajjadi, S.E. and L. Mehregan. 2005. Chemical constituents of essential oil of *Nepeta daenensis* Boiss. Journal of Essential Oil Research, 17(5): 563-564.
22. Sefidkon, F. and A. Akbari-nia. 2003. Essential oil compositions of *Nepeta pogonosperma* Jamzad et Assadi from Iran, Journal of Essential Oil Research, 25: 327-328.
23. Sellmer, J.C., S.W. Ritchie, I.S. Kim and T.K. Hodges. 1996. Initiation, maintenance and plant regeneration of type II callus and suspension cells. In: The Maize Handbook (eds. M. Freeling and V. Walbot). Springer, New York, 671-677 pp.
24. Smith, R.H. 2000. Plan tissue culture: Techniques and Experiments. Second Edition. San Diego, CA: Academic Press.
25. Soltani-pool, M., A. Mohammadi, H. Rahnama and B. Abbaszadeh. 2011. Callusogenesis investigation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Agronomy and Plant breeding, 7(1): 45-54 pp.
26. Street, H.E. 1997. Introduction In: H.E. Street (Ed.), plant cell and Tissue culture. Oxford, UK: Blackwell, 1-10 pp.
27. Valizadeh, M. 2017. *In vitro* Shoot Regeneration of Medicinal Plant *Anthemis hyaline* DC. Journal of Crop Breeding. 9(21): 76-81 (In Persian).
28. Yazdi-samadi, B., A. Rezaee and M. Valizadeh. 1997. Statistical Designs in Agricultural Research. First edn. Tehran University Publication, Iran, 763 pp.

Evaluation of Effects of Some Growth Regulators on Callus Induction and Regeneration in *Nepeta pogonosperma* L.

Fahime Nazarzadeh¹, Abdollah Mohammadi² and Mahmood Khosroshahli³

1- Department of plant breeding, Karaj branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

2- Department of plant breeding, Karaj branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran,

(Corresponding author: abdollahmohammadi54@gmail.com)

3- Department of biotechnology, Science and research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 27 November, 2016

Accepted: 22 November, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: *Nepetaceae* genus (*Nepeta L.*) is a medicinal and valuable Essence species that belongs to the *Lamiaceae* family. More than 250 species of this genus reported in the world but you can find 67 species of them in Iran. The present study conducted to provide a quick and efficient method for callus induction and plantlet regeneration of this medicinal plant with using seeds as an explant.

Material and Methods: For evaluation of callus induction, seeds of this plant cultured in MS medium supplemented with 2, 4-D and BA in 5 levels (0, 1,2,3,4 mg. l⁻¹). For regeneration of calli, we used MS medium supplemented with IBA and BAP in 3 levels (0, 1, 2 mg.l⁻¹). In order to optimization of rooting, 1/2MS, MS without Charcoal and 1/2MS with charcoal media that all of them supplemented with 3 levels of IBA (0, 1, 2 mg. l⁻¹) were used.

Results: After 10 days of culture, the callus were induced. The results showed BAP and BAP × 2,4-D didn't have significant effects on calli induction, calli volume and regenerable calli. In regeneration treatments interaction between growth regulators couldn't affect but BAP alone affect the explants regeneration. Different concentration of IBA in MS medium affect the rooting of explants and we tried to find the best medium for this purpose.

Conclusion: Explants in all treatments were produced Callus but The largest callus (18.4 with Hooker and Nabors scale) and highest regenerable callus percentage (63%) were showed on the MS medium supplemented with 1mg/l 2, 4-D. The highest percentage of callus regeneration and seedling emergence (88.9%) were showed in the MS medium supplemented with 2 mg.l⁻¹ IBA .The highest percentage of rooting (100%) were showed in 1/2 MS containing 1mg.l⁻¹ IBA Despite of some research about difficulties of the hardening off this plant, in this research over than 80% of plantlets be survive in greenhouse.

Keywords: Callus, IBA, *Nepeta pogonosperma*, Regeneration, 2,4-D