دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

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

فهیمه نظرزاده[۱]، عبداله 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 آزاداسلامی، 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 نعناعیان، 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 به‌منظور ارائه یک روش سریع و کارآمد برای کالوس‌زایی و باززایی این گونه دارویی با استفاده از بذر برای ریزازدیادی و استفاده در سایر روش های اصلاحی انجام شده است.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی کالوس‌زایی، بذر این گیاه در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی 2,4-D و BAP (صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) کشت شد. به‌منظور بررسی باززایی، از تنظیم‌کننده‌ی رشدی IBA و BAP (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و برای بررسی ریشه‌زایی از محیط‌های کشت مختلف 1/2MS, MS (بدون زغال فعال و با زغال فعال)، با تنظیم‌کننده 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 نشان‌دهنده بی‌معنی بودن تاثیر اثر اصلی تنظیم‌کننده رشد BAP و اثر متقابل BAP × 2,4-D بر کالوس‌زایی،حجم کالوس و درصد جنین‌زایی بود. در آزمایش باززایی از کالوس، کالوس‌های ایجاد شده در محیط MS حاوی سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشدی IBA وBAP 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 تنظیم‌کننده‌های 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 شده‌ی 2,4-D، کالوس‌زایی مشاهده شد اما بالاترین درصد کالوس‌زایی(۹۰ درصد)، کالوس‌های جنین زا (۶۳درصد) 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 تنظیم‌کننده رشدی IBA و BAP معنی‌دار نشد بنابراین استفاده از یکی از این تنظیم‌کننده رشدی می‌تواند مفید باشد. بالاترین درصد باززایی و ظهور گیاهچه از کالوس (۸۸/۹ درصد) در محیط MS با تنظیم‌کننده‌ی رشدی IBA در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر حاصل شد. بالاترین درصد ریشه‌زایی (۱۰۰درصد) در محیط 1/2MS حاوی تنظیم کننده‌ی رشدی IBA در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر تولید شد. در نهایت برخلاف گزارش‌هایی مبنی بر ضعف در سازگاری گیاهان حاصل از کشت بافت، بیش از ۸۰ درصد از گیاهچه ها 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 نعناعیان (*Labiatae*) و یکی از گونه‌های پونه‌سای انحصاری ایران (در منطقه الموت) می‌باشد (۳) ترکیبات گزارش شده از جنس پونه‌سا شامل فلاونوئیدها، ایریدوئیدها، فنل‌ها و دی ترپن‌ها می‌باشند (۳). گیاهان این جنس معطر بوده و اثرات آنتی اکسیدانی، ضدمیکروبی، حشره کشی، ضدالتهابی، ضد دردی و ضد اضطرابی دارند. همچنین در طب سنتی به دلیل داشتن اثرات خلط‌آور، ضدعفونی‌کننده، ضدسرفه، ضدآسم، مدر و تب‌بر استفاده می‌شوند (۳).

به‌دنبال 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 نعناعیان، 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 توسعهٔ مؤثر جنین‌های سوماتیکی، پیش نیازی برای تولید گیاهان درسطح 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 می‌هند. این جنین‌ها شبیه جنین‌های جنسی هستند و در محیط کشت مناسب می‌توانند بالغ شده و به نهال تبدیل شوند. باززایی

گیاهان با استفاده از جنین‌زایی سوماتیکی از یک سلول، در بسیاری از گونه‌های گیاهان دارویی به اثبات رسیده است. بنابراین در این حالت باتوجه به پتانسیل متفاوت سلول‌های مختلف در تولید یک ترکیب دارویی، می‌توان گیاهانی با ویژگی برتر نسبت به گیاه اولیه تولیدنمود (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 کلوس در بادرنجبویه در شرایط *In vitro*، نتایج نشان داد که بهترین تیمار تنظیم‌کننده رشدی برای القای کالوس در ریزنمونه‌های میانگره و دمبرگ استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر BAP و برای ریزنمونه برگی، 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 میلی گرم در لیتر BA بود (۲۷). این تحقیق با هدف مطالعه بهینه جنبه های 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 کالوس زایی 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 (۱±۲۵°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.

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 درلیتر) 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:

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

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.

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

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، گیاهچه ها 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 تهویه 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 طورکامل 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

تنظیم‌کننده رشد BAP و اثر متقابل 2,4-D × BAP بر کالوس‌زایی، حجم کالوس و درصد جنین زایی بود. در حالی‌که اثر اصلی 2,4-D در سطح احتمال ۱درصد معنی‌دار بود. معنی‌داری صفات مورد مطالعه نشان می‌دهد سطوح مختلف 2,4-D تاثیر متنوعی روی کالوس‌زایی داشته است و برای تعیین بهترین سطوح باید مقایسه میانگین انجام شود.

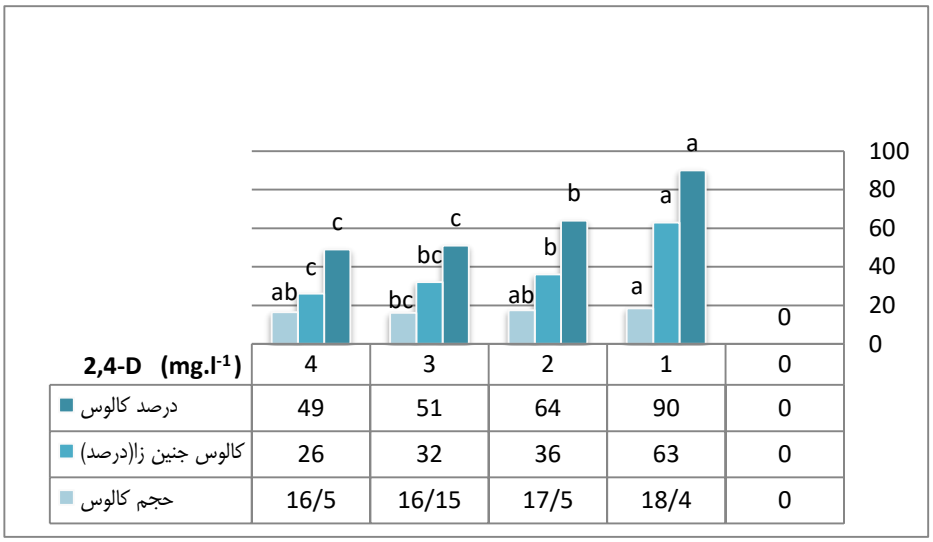
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تنظیم‌کننده‌های رشدی2,4-D و BAP روی صفات کالوس حاصل از بذر پونه‌سای کوهی
Table 1. Analysis of variance for effect of BAP and 2, 4-D on callus characteristics of *N. pogonosperma*

منبع تغییرات	df	میانگین مربعات (MS)		
		درصد کالوس	حجم کالوس	درصد جنین‌زایی
BAP	۴	۸۱۴^{ns}	۱۶/۵^{ns}	۶۶۶^{ns}
2,4-D	۴	۲۱۴۷۴**	۱۱۹۰/۳**	۱۰۱۷۶**
BAP ×2,4-D	۱۶	۶۱۱/۵^{ns}	۱۷/۱^{ns}	۶۵۸/۵^{ns}
خطا	۷۵	۷۷۶	۳۴	۴۷۸/۷
ضریب تغییرات(CV)		۴۳/۸	۳۳/۹	۵۵/۷

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

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 شیشه‌ای پونه‌سای کوهی در محیط کشت پایه MS حاوی غلظت ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۰ درصد) را دارد. بدیهی است موقعی که هیچ تنظیم‌کننده رشدی استفاده نشد پاسخی هم مشاهده نگردید (شکل ۱).

تحقیقات انجام شده توسط امینی‌فر و همکاران (۱)، روی *Nepeta pogonosperma* به‌منظور بررسی بهترین ریزنمونه و ترکیب تنظیم‌کننده رشدی جهت القای کالوس و نیز باززایی گیاه از ریزنمونه نشان داد که بهترین ریزنمونه، ریزنمونه ساقه، بالاترین میزان القای کالوس در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D معرفی گردید. همانطور که ملاحظه می‌شود نتیجه حاصل با نتایج پژوهش حاضر مطابقت نسبی دارد و نقش 2,4-D اینجا هم در کالوس‌زایی ثابت شده است. البته 2,4-D به تنهایی نمی‌تواند باعث ایجاد کالوس شود و نتیجه این آزمایش نشان می‌دهد که سیتوکینین‌های درون‌زا در این گیاه باعث ایجاد تعادل شده است.



2,4-D (mg.l^{-1})	4	3	2	1	0
درصد کالوس	49	51	64	90	0
کالوس جنین زا(درصد)	26	32	36	63	0
حجم کالوس	16/5	16/15	17/5	18/4	0

شکل۱- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های تنظیم‌کننده رشدی 2,4-D بر درصد کالوس، کالوس جنین‌زا 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 $p \leq 0.05$

نتایج مقایسه میانگین (شکل ۱) نشان داد که کشت درون شیشه‌ای پونه‌سای کوهی در محیط کشت پایه MS تکمیل شده با یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۶۳ درصد، بیشترین کالوس‌های جنین‌زا را تولید کرد. جنین‌ها به رنگ سفید بودند و با توجه به مشاهده میکروسکوپی در مراحل مختلف رشدی قرار داشتند، بیشترین جنین‌ها در مراحل رشدیِ کروی و قلبی شکل بودند. در برخی از تیمارهای تنظیم‌کننده رشدی به خصوص در غلظت‌های بالای (۴میلی‌گرم بر لیتر) 2,4-D در جنین‌ها تغییر رنگ مشاهده شد.

جنین‌ها در تیمارهای 2,4-D در ابتدا به بلوغ نرسیدند، اما پس از هر واکشت بر تعداد جنین‌ها افزوده شد. باززایی 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).

بر اساس نتایج مقایسه میانگین حجم کالوس و بر اساس مقیاس هوکر و نی‌برز(هوکر)، کالوس‌های حجیم در محیط کشت پایه MS حاوی 2,4-D در سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد (شکل ۱). همانطور که ملاحظه می شود این سطح از تنظیم‌کننده رشدی برای کالوس‌زایی، حجم کالوس و همچنین برای ایجاد کالوس‌های جنین‌زا مناسب می‌باشد و می‌توان آنرا برای استفاده در تحقیقات بعدی توصیه کرد. نتایج این تحقیق با تحقیقات انجام شده توسط سلطانی پول و همکاران (۲۵) روی بادرنجبویه مطابقت دارد. در تحقیق یاد شده نیز یکی از تنظیم کننده‌های رشدی موثر بر کالوس‌زایی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود که همراه با BAP تیمار مناسبی محسوب می‌شد. در تحقیق حاضر با توجه به اینکه صرفا 2,4-D پاسخ داد می‌توان نتیجه گرفت که سیتوکینین درون‌زای گیاه پونه‌سای کوهی در حدی است که توانسته با اکسین اضافه شده به محیط تعادل ایجاد کرده و سبب تولید کالوس شود.

باززایی از کالوس: کالوس‌های ایجاد شده از بذور پونه‌سای کوهی در محیط MS حاوی سطوح مختلف تنظیم‌کننده رشدی IBA وBAP جهت باززایی غیرمستقیم قرار داده شدند. پس از قرار دادن کالوس‌ها در محیط کشت پایه MS، 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 غیر مستقیم نشان می‌دهد که در محیط MS حاوی سطوح مختلف BAP در سطح احتمال ۵ درصد، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ولی در اثر متقابل تنظیم‌کننده‌های رشدی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲).

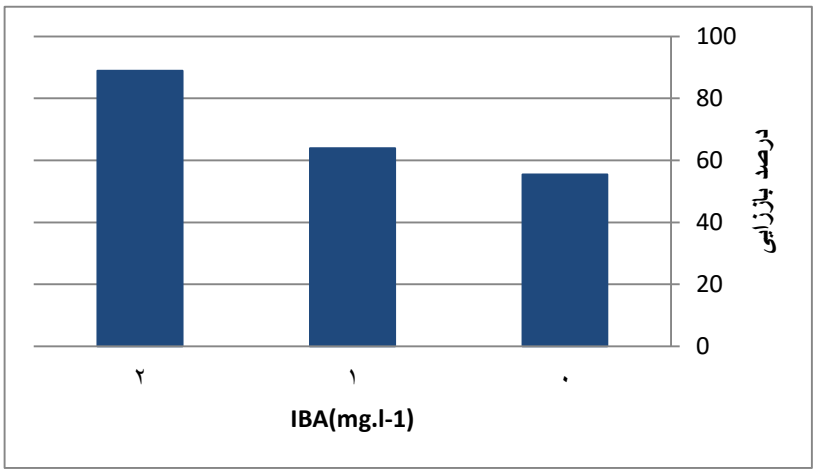
نتایج حاصل از تجزیه واریانس بر باززایی نشان داد تنظیم‌کننده‌های رشد IBA و BAP و اثر متقابل آن‌ها از نظر صفاتِ تعداد شاخه و تعداد برگ بی‌معنی بودند، در حالی‌که از نظر درصد باززایی اثر اصلی IBA در سطح احتمال ۵ درصد و اثر اصلی BAP در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. با توجه به اینکه اثر متقابل این دو تنظیم‌کننده رشدی معنی‌دار نشد بنابراین استفاده از یکی از این تنظیم‌کننده رشدی می‌تواند مفید باشد و برای انتخاب بهترین آن لازم است مقایسه میانگین تیمارها انجام شود.

جدول ۲- تجزیه واریانس برای تاثیر سطوح مختلف BAP و IBA روی درصد باززایی، تعداد شاخه و تعداد برگ پونه‌سای کوهی
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*

منبع تغییرات(SOV)	df	میانگین مربعات (MS)		
		درصد باززایی	تعداد شاخه	تعداد برگ
غلظت هورمون IBA	۲	۳۶۱۴/۴*	۷۲۸/۸^{ns}	۳۲۶۸/۱^{ns}
غلظت هورمون BAP	۲	۴۵۳۳/۲**	۳۸۱/۲^{ns}	۱۱۸۷/۲^{ns}
غلظت هورمون BAP× غلظت هورمون IBA	۴	۲۰۳۶/۴^{ns}	۷۴۹/۷^{ns}	۳۰۳۳/۱^{ns}
خطا	۲۷	۷۷۲/۲	۵۶۴/۸	۲۰۵۱/۵
ضریب تغییرات (CV)		۴۰	۲۵/۲	۳۱

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

بررسی مقایسه میانگین تیمارها (شکل ۲) نشان داد که بیشترین باززایی (۸۸/۹ درصد) در محیط کشت پایه MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر IBA و کمترین میزان باززایی در محیط کشت پایه MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد. این نتیجه مجدد بر وجود مقادیر بالای تنظیم‌کننده رشدی سیتوکینین درون‌زا را در گیاه مورد مطالعه تایید می‌کند. تحقیقات انجام شده توسط صادقیان و همکاران (۲۰)، برای بررسی و انتخاب ترکیب تنظیم‌کننده رشدیی مناسب جهت باززایی شاخه و تکثیر درون شیشه گیاه ریحان، بالاترین باززایی در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با (۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر) NAA به دست آمد. که طبیعتا نتیجه این تحقیق با تحقیق حاضر همخوانی ندارد که دلیل آن می‌تواند به نوع گیاه و میزان تنظیم‌کننده رشدی‌های درونی آن‌ها مربوط باشد. این هورمون درونی با توجه به اینکه می‌تواند تحت‌تاثیر محیط قرار گیرد حتی درون گونه و بوته‌های مختلف یک توده متفاوت باشد که این مساله اهمیت بهینه‌سازی کشت بافت توده‌های مختلف را نمایان می‌سازد. اما نتایج این تحقیق با نتایج امینی 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

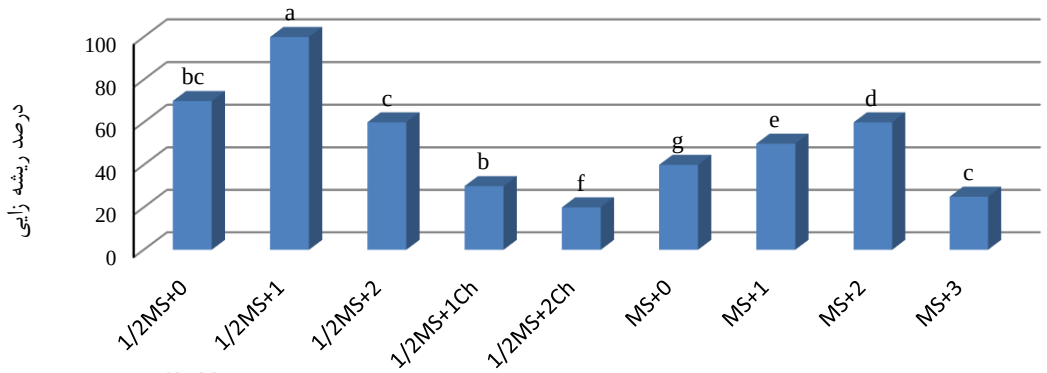
ریشه‌زایی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف بر ریشه‌زایی (جدول ۳) نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف IBA و محیط‌کشت MS در سطح احتمال ۱ درصد روی این صفت معنی‌دار بود. بنابراین در بین تیمارهای بکار رفته امکان پیدا کردن تیماری که تاثیر بهتری از بقیه دارد وجود دارد.

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

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

ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

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 تنظیم کننده رشدی افزایش یافت درصد ریشه‌زایی کمتر شد. در محیط 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.

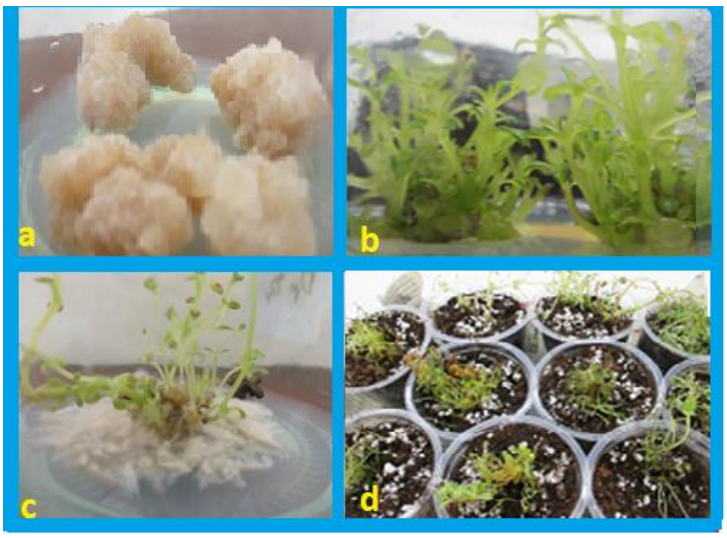


تیمارهای مختلف (محیط های کشت MS و MS ۱/۲ تکمیل شده با سطوح مختلف IBA و زغال فعال ((Ch))

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

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 ازجمله 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 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 می باشد.



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 isoliertern pflanzenzellen sitzungsbe. Kad. Wiss, math. Naturwiss. KI. 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, l84: 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 Nazarzadeh[1], Abdollah Mohammadi[2] and Mahmood Khosroshahli[3]

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 indued. The results showed BAP and BAP × 2,4-D didn't have significant effects on calli inducton, 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