



بررسی و انتخاب ترکیب هورمونی مناسب جهت باززائی شاخه و تکثیر درون شیشه‌ای گیاه ریحان

سحر صادقیان^۱، غلامعلی رنجبر^۲ و کاظمی تبار^۳

۱ و ۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: a.ranjbar@sanru.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۱۰

چکیده

ریحان (*Ocimum basilicum* L.) متعلق به خانواده نعناع (Lamiaceae) است. این گونه گیاهی غنی از روغن‌های معطر ضروری است و در صنعت داروسازی و عطرسازی بسیار با ارزش است. تحقیق حاضر روی کشت بافت گیاه ریحان با استفاده از ریزنمونه برگی حاصل از گیاه رشدیافته در شرایط درون شیشه‌ای متمرکز شده است. آزمایش حاضر به صورت طرح کاملاً تصادفی در ۵ تکرار در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری اجرا شد. ریزنمونه‌های برگی جهت القاء کالوس در محیط کشت پایه موراشیک و اسکوگ (MS) همراه با غلظت‌های مختلف BAP (1 mg l^{-1} ، 0.5 mg l^{-1} و 0.1 mg l^{-1}) و 2,4-D (0.1 mg l^{-1} ، 0.05 mg l^{-1} و 0.01 mg l^{-1}) قرار گرفتند. پس از آن کالوس‌ها به منظور باززائی به محیط کشت MS همراه با هورمون‌های BAP در سطوح (1 mg l^{-1} ، 0.3 mg l^{-1} و 0.1 mg l^{-1}) در ترکیب با 0.2 mg l^{-1} هورمون NAA منتقل شدند. بالاترین میانگین شاخه در محیط حاوی 1 mg l^{-1} BAP در ترکیب با 0.2 mg l^{-1} NAA بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: ریحان (*Ocimum basilicum* L.)، ریزنمونه برگی، باززائی شاخه، هورمون گیاهی

مقدمه

در کشورهای فرانسه، مجارستان، آمریکا (کالیفرنیا)، هند، اسپانیا، مصر، پاکستان، اندونزی، مراکش و تقریباً در تمام نقاط گرم و معتدل کشت و کار می‌شود (۹، ۱۰، ۱۹). اینگونه گیاهی غنی از روغن‌های معطر ضروری است و در صنعت داروسازی و عطرسازی بسیار با ارزش است. ریحان گیاهی خوراکی،

ریحان (*Ocimum basilicum* L.) گیاه علفی و یکساله و متعلق به خانواده نعناع (Lamiaceae) است.

جنس *Ocimum* شامل ۳۰ گونه است و در میان آنها گونه *basilicum* مهمترین گونه اقتصادی بوده است و امروزه به صورت تجاری

ضدانگل، تببر و عرق‌آور است (۱۷، ۱۳). ریشه‌ها، پوست و برگ‌هایش توانائی تولید سیانید دارند. بذرهايش خاصیت تسکین‌دهندگی، ادرارآوری و عرق‌آوری دارند (۱۷). واریته‌های تجاری ریحان بسیار پربرگ، دارای گل‌های رنگی و ارتفاع بلند و بوی خوش هستند. واریته‌های بنفش ریحان منبع غنی از آنتوسیانین‌ها هستند و بسیاری از آنها شاید یک منبع بالقوه از آنتی‌اکسیدانها باشند (۱۳). هرچندکه تغییرپذیری ژنتیکی و ناهماهنگی‌های بیوشیمیایی مشکل اساسی استفاده از گونه‌های نعنای برای اهداف دارویی است (۱۸). با توجه به اینکه تکثیر ریحان بوسیله بذر باعث ایجاد تنوع در نسل می‌شود و به دلیل اینکه این گیاه دگرگشن است بنابراین نمی‌توان گیاهان یکنواخت برای مصارف صنعتی تولید کرد. کشت درون‌شیشه‌ای یک راه مؤثر برای تکثیر سریع گونه‌هاست و برای بدست آوردن یک نسل یکنواخت ضروری است. در نتیجه سود استفاده از این تکنیک‌ها برای بدست آوردن گیاهان عطری و دارویی بطور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است (۱۷). کشت بافت گیاهی عبارت است از کشت درون‌شیشه‌ای اجزای گیاهی (بافت، اندام، جنین، تک سلول، پروتوپلاست)، در محیط‌های غذایی و تحت شرایط استریل. برخلاف سلول‌های جانوری، سلول گیاهی حتی در مراحل پیشرفته بلوغ و تمایز، در صورتیکه سیستم غشائی و هسته آنها سالم و فعال باشد، توانائی تغییر به حالت مریستمی و نمو به گیاه کامل را دارد. بنابراین هر قسمت از یک گیاه ممکن است در شرایط مناسب و ویژه بتواند

یک جنین کامل ایجاد نماید (۵). تولید گیاهان کامل از پروتوپلاست، سلول‌های منفرد و قطعات کوچکی از بافت گیاه امکان‌پذیر است زیرا سلول‌های گیاهی دارای خاصیت توتی‌پتَنسی^۱ هستند (۷). به این معنی که سلول گیاهی در شرایط کشت مناسب و در یک دوره برنامه‌ریزی شده قابلیت تشکیل گیاهان کامل جدید را دارد. گیاه تولید شده همانند گیاه مادری اولیه است. باززائی گیاه از طریق کشت بافت در حال حاضر یک فرایند ضروری و اساسی در بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات بشمار می‌رود. امروزه برای تکثیر غیرجنسی بسیاری از گیاهان زراعی و باغی استفاده می‌شود (۵). ریزنمونه‌هائی نظیر برگ‌های بالغ، ریشه، ساقه، دمبرگ و اجزای گل، می‌توانند با موفقیت برای تولید گیاهچه به روش اندام‌زائی مورد استفاده قرار گیرند. فصل، سن و وضعیت فیزیولوژیکی گیاه والد، محیط کشت پایه و ترکیب مناسب هورمون‌ها نیز در موفقیت اندام‌زائی از کشت‌های سلولی سهم‌مند (۲۱). سیتوکینین‌ها جزو مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد برای باززائی محسوب می‌شوند. در بین آنها بنزیل‌آمینوپورین (BAP) مؤثرترین سیتوکینین مورد استفاده می‌باشد و کینتین و 2ip در درجات بعدی قرار دارند (۲۱). افزودن هورمون اکسین، روند تکثیر ساقه‌های جانبی را تسریع نمی‌بخشد اما اگر به مقدار کم استفاده شود اثر بازدارنده مقادیر زیاد سیتوکینین بر رشد طولی ساقه‌های جانبی را خنثی نموده و روند رشد ساقه‌ها را به وضعیت عادی برگشت می‌دهد (۱۸). زمانی که تکثیر شاخساره مورد نیاز است، غلظت پائین

اکسین اغلب در هماهنگی با سطوح بالای سیتوکنین سودمند است (۲۱).

در بسیاری از مطالعات درون‌شیشه‌ای روی گونه‌های نعنای، از جمله جنس *basilicum* ریزنمونه‌های متعددی مثل قطعات گره ساقه، برگ، گل‌آذین‌های جوان و جوانه‌های جانبی استفاده شده است (۳، ۴، ۱۴، ۱۸، ۲۰). اسکالا و ویسوکینکا در سال ۲۰۰۶ اعلام کردند که در کشت گیاه مریم‌گلی یا سالویا که هم‌خانواده گیاه ریحان است بیشترین شاخه‌ها را از محیط کشت MS حاوی ۸/۹ میکرومول BA و ۲/۹ میکرومول IAA و بیشترین ریشه‌ها را از محیط ریشه‌دهی حاوی ۰/۵ میکرومول NAA بدست آوردند (۲۱). در پژوهشی که آندرد و باسو در سال ۲۰۰۵ بر روی کشت بافت گیاه اسطوخودوس که هم‌خانواده گیاه ریحان است انجام دادند، بهترین محیط شاخه‌دهی محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و بهترین محیط ریشه‌دهی محیط کشت حاوی هورمون NAA معرفی شده است. در این گزارش از ریزنمونه‌های جوانه‌های جانبی استفاده شد (۱).

تحقیق حاضر با هدف بررسی ترکیبات هورمونی مناسب در محیط کشت MS جهت باززائی گیاه ریحان انجام گردید.

مواد و روش‌ها

ضدعفونی بذور: ابتدا بذورهای ریحان (*Ocimum basilicum* L.) حدود ۱۵ دقیقه در آب خیسانده شدند که پس از این مدت

یک لایه لعاب‌مانند دور آنها شکل گرفت. سپس در اتاقک استریل با اتانول ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه ضدعفونی شده بعد ۳ مرتبه با آب مقطر و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه شستشو داده شدند و در ادامه در محلول کلرید جیوه ۰/۰۱٪ به مدت ۲ دقیقه قرار گرفتند و سپس ۳ مرتبه با آب مقطر و هر بار به مدت یک دقیقه شسته شدند. در آخر بذور در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۵٪ به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند و باز هم ۳ بار با آب مقطر و هر بار ۲ دقیقه شسته شدند. در مرحله آخر به‌منظور تهیه گیاهچه استریل، بذور ضدعفونی شده بر روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند. سپس در محیط کشت MS بدون هورمون (تکمیل شده با ۳٪ ساکاروز، ۰/۷ درصد آگار، 100 mg l^{-1} میواینوزیتول و pH ۵/۸) کشت شدند. درب ظروف کشت با پارافیلیم مسدود شده و به انکوباتور تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و درجه حرارت 26 ± 2 درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند.

القای کالوس: برگ‌های جوان از گیاهچه‌های بذری درون‌شیشه‌ای ۱۲ روزه جدا شده و به‌عنوان ریزنمونه در محیط کشت پایه MS با ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز، ۷ گرم در لیتر آگار 100 mg l^{-1} میواینوزیتول به همراه هورمون 2,4-D در سه سطح (1 mg l^{-1} ، ۰/۵، ۰) و BAP در دو سطح (1 mg l^{-1} ، ۰) کشت شدند که در مجموع ۶ تیمار مختلف را تشکیل دادند. pH محیط‌های کشت قبل از اتوکلاو، با استفاده از NaOH یک نرمال روی عدد ۶

نتایج و بحث

ریزنمونه‌ها بعد از گذشت ۲ روز در محیط کالوس‌دهی، بتدریج متورم شدند. بعد از ۱ هفته ریزنمونه‌ها بطور کامل کالوس‌زائی کردند. از این میان کالوس‌های حاصل از محیط‌کشت حاوی 1 mg l^{-1} BAP به تنهائی و 1 mg l^{-1} 2,4-D به تنهائی که بیشترین وزن را داشتند به محیط کشت باززائی با سطوح مختلف هورمونی منتقل شدند. در حدود یک ماه پس از انتقال کالوس به محیط باززائی، با مشاهده شدن نقاط سبز رنگ در کالوس، باززائی القا و سپس پریموردیای برگی تشکیل شد (شکل ۱). جدول ۱ نتایج حاصل از تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف هورمون BAP در باززائی گیاه *O. basilicum* نشان می‌دهد. بر اساس نتایج حاصل، اثر سطوح مختلف تیمار هورمونی BAP بر تعداد شاخه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. بیشترین میانگین باززائی شاخه به ترتیب در تیمارهای هورمونی 1 mg l^{-1} BAP، (۴/۱۴) و 3 mg l^{-1} BAP (۳/۶۳) بدست آمد. ساها و همکاران در مرحله شاخه‌دهی در گیاه *Ocimum kilimandscharicum* نیز با بکارگیری ریزنمونه گره و با استفاده از 1 mg l^{-1} BAP، بیشترین میزان باززایی (۶/۰۹±۰/۰۵) را گزارش کردند (۱۶). علت تفاوت در میانگین شاخه‌دهی در این گزارش با تحقیق حاضر می‌تواند مربوط به تفاوت در نوع

تنظیم گردید و ضدعفونی محیط‌های کشت توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و در فشار $1/5 \text{ kg cm}^{-2}$ صورت گرفت. پس از کشت ریزنمونه‌ها، درب ظروف با پارافیلیم مسدود شده و در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد در اتاقک رشد به مدت ۴۵ روز در تاریکی قرار گرفتند.

باززائی: به‌منظور بهینه‌سازی محیط کشت باززائی در این آزمایش، کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌ها به محیط کشت باززائی شامل محیط کشت MS حاوی هورمون BAP در سطوح (5 mg l^{-1} و 3 و 1) در ترکیب با $0/2 \text{ mg l}^{-1}$ هورمون NAA بود، منتقل شدند و سپس در انکوباتور با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی در دمای 25 ± 2 قرار گرفتند. پس از ۳۰ روز که گیاهان باززا شده رشد خوبی پیدا کردند، جهت تولید ریشه به محیط کشت MS بدون هورمون منتقل شدند. جهت ریشه‌دهی سریعتر انتهای ظروف کشت با فویل آلومینیومی پوشیده شدند تا شرایط تاریکی برای رشد ریشه‌ها فراهم گردد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۵ تکرار در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری اجرا گردید و برای تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایشی مختلف پس از جمع‌آوری از نرم‌افزار آماری SPSS استفاده شد و مقایسه میانگین داده‌ها به وسیله آزمون دانکن انجام گرفت.

ریزنمونه و نوع هورمون بکارگرفته شده، باشد. سینگ و سگال نیز محیط بهینه شاخه‌دهی را در گیاه *Ocimum sanctum* محیط حاوی 1 mg l^{-1} BAP معرفی کردند (۲۰). گزارش قنتی و همکاران و نیز آندرد و باسو مبنی بر بیان محیط حاوی 1 mg l^{-1} BAP به‌عنوان بهترین محیط شاخه‌دهی به ترتیب در نعنا فلفلی و گیاه اسطوخودوس که هم‌خانواده گیاه ریحان هستند نیز این نتیجه را تأیید می‌کند (۵، ۱). در پژوهشی دیگر دنیل و همکاران نیز در گیاه ریحان بهترین نتیجه را از تیمار

هورمونی 1 mg l^{-1} BAP با میانگین شاخه $23/8 \pm 0/23$ گرفتند (جدول ۲). با این تفاوت که هورمون اکسین استفاده شده در گزارش آنها $0/5 \text{ mg l}^{-1}$ IAA و ریزنمونه به کار گرفته شده گره بود (۶) که نتایج متفاوت می‌تواند به نوع ریزنمونه، نوع هورمون بکار رفته نسبت داده شود، از آنجا که ریزنمونه‌های گره دارای سلول‌های مریستمی بیشتری نسبت به دیگر قسمت‌ها هستند و در نتیجه بهتر باززائی می‌شوند (۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر هورمون BAP بر میانگین تعداد شاخه حاصل از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگی در گیاه ریحان

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۲	$0/911^{**}$
خطای آزمایشی	۱۲	$0/040^{**}$
کل	۱۴	

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر هورمون BAP بر میانگین تعداد شاخه

تیمار	میانگین تعداد شاخه
1 mg l^{-1}	$4/14^a$
3 mg l^{-1}	$3/292^c$
5 mg l^{-1}	$3/630^b$

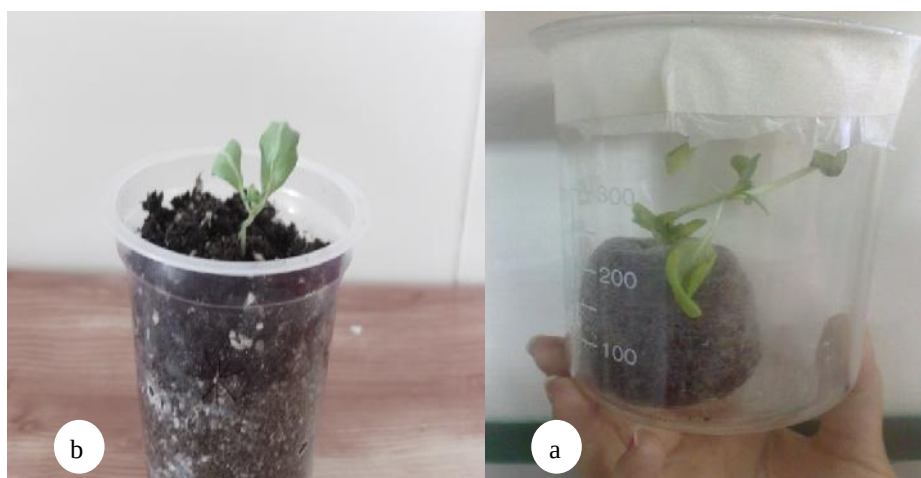
محققین مختلفی گزارش کردند که یک همبستگی قوی بین نسبت اکسین/سیتوکنین در محیط کشت و تشکیل اندام هوائی با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف در ژنوتیپ‌های مختلف وجود دارد (۱۱، ۱۲، ۱۸، ۲۰).

تعادل هورمون‌های رشد در محیط القای شاخه یک اثر کنترلی بر روی مورفوزن دارد. سطوح مختلف هورمون‌های خارجی نقش بسیار مهمی در تشکیل شاخه دارند و شدیداً روی مورفوزن تأثیرگذار هستند (۱۵). حدود دو هفته پس از واکشت، شاخساره‌های باززا

شده در محیط کشت MS بدون هورمون قرار گرفتند و حدود ۱۰۰٪ از شاخساره‌ها ریشه‌دار شدند. پس از ۴۵ روز نمونه‌ها به گلدان‌های کاغذی منتقل شدند. سپس گلدان‌های کاغذی حامل گیاه باززائی شده در محفظه شیشه‌ای که دهانه آن با پلاستیک منفذدار پوشانده شده بود، قرار گرفت. پس از رشد کافی گیاه و سازگاری آن به محیط قبلی، گیاهچه‌ها به محیط حاوی خاک زراعی همراه با مقداری خاک برگ اتوکلاو شده، انتقال یافت (شکل ۲).



شکل ۱- a- تولید برگ‌های اولیه از کالوس، b- رشد برگ‌ها، c- ادامه رشد و تشکیل ساقه و d- شکل‌گیری اندام هوائی کامل



شکل ۲- a - گیاه رشدیافته در جیفی‌پات و b- گیاه انتقال یافته به خاک اتوکلاو شده

منابع

1. Andrade, L. and R. Basso. 2005. Micropropagation of *Lavandula dentana* from axillary buds of field-grown adult plants. *Biologia Plantarum*. 3: 439-442.
2. Asghari, F., A. Hassani, B. Hosseini and J. Farrokhi. 2013. Effects of consideration of genotypes and different concentration of banzil adenine on direct regeneration of *Occimum basilicum* clones under invitro conditions. *Journal of Horticultural Science*, 26(4): 434-439.
3. Begum, F., N. Amin and M.A.K. Azad. 2000. *In vitro* clonal propagation of holy basil (*Ocimum sanctum* L.). *Plant Tissue Cult.*, Rehovot, 10(1): 31-37.
4. Begum, F., N. Amin and M.A.K. Azad. 2002. *In vitro* rapid clonal propagation of *Ocimum basilicum* L. *Plant Tissue Culture*. 12: 27-35.
5. Bhojwanis, S. 1989. *Theory and Practice Plant Tissue Culture*, Publishing company Inc. New York, 767 pp.
6. Daniel, A., C. Kalidass and V.R. Mohan. 2010. *In vitro* multiple shoot induction through axillary bud of *Ocimum basilicum* L. an important medicinal plant. *International Journal of Biological Technology*, 5: 24-28.
7. Evan, D.E., J.O.D. Coleman and A. Kerans. 2003. *Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publisher-Taylor and Francis Group. ISBN: 1 85996 320 X, 194 pp.
8. Ghanti, K., C.P. Kaviraj, R.P. Venugopal, F.T.Z. Jabeen and S. Rao. 2003. Rapid regeneration of *Mentha piperita* L of shoot tip and nodal explant. *Indian Journal of Biotechnology*, 5: 594-598.
9. Hiltunen, R. and Y. E.D. Holm. 1999. *Basil The genus Ocimum*, CRC Press, USA.
10. Janick J, Ed. 1999. *Perspectives on new crops and new uses*, ASHS Press, Alexandria.
11. Khanna, H.K. and S.K. Raina. 1998. Genotype x culture media interaction effects on regeneration response of three indica rice cultivars. *Plant Cell, Tissue Organ. Cult.*, Dordrecht. 52: 145-153.

12. Pattanaik, S. and P.K. Chand. 1996. *In vitro* propagation of the medicinal herbs *Ocimum americanum* L. syn. *O. canum* Sims. (hoary basil) and *Ocimum sanctum* L. (holy basil). *Plant Cell Repo*, Berlin, 15: 846-850.
13. Phippen, W.B. and J.E. Simon. 1998. Anthocyanins in basil. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, DC. 46: 1734-1738.
14. Phippen, W.B. and J.E. Simon. 2000. Shoot regeneration of young leaf explants from basil.
15. Rout, G.R. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*. 18: 91-120.
16. Saha, S., D. Tulsi and P. Ghosh. 2010. Micropropagation of *Ocimum klimandscharikum* Guerke (Labiatae). Polish Academy of Sciences and Jagiellonian University. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 52/2: 50-58.
17. Sahoo, Y., Y.N. Remien and R.S. Yao. 1997. *In vitro* clonal propagation of an aromatic medicinal herb *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by axillary shoot proliferation. *In Vitro Cell. Devel. Biol. Plant*, Largo. 33: 293-296.
18. Shahzad, A., S.A. Siddiqui. 2000. *In vitro* organogenesis in *Ocimum sanctum* L. – A multipurpose herb. *Phytomorphology*, Delhi. 50(1): 27-35.
19. Simon, J.E., J. Quinn and R.G. Murray. 1990. Basil: A source of essential oils- In: Janick, J. and J.E. Simon. (eds.): *Advances in new crops*, Timber Press, Portland. 484-489.
20. Singh, N.K. and C.B. Seghal. 1999. Micropropagation of “Holy basil” (*Ocimum sanctum* L.) from young inflorescences of mature plants. *Plant Growth Regul.*, Dordrecht. 29: 161-166.
21. Skala, A. and A. Wysokinska. 2006. *In vitro* Regeneration of (*Salvia nemorosa* L.) from shoot tips and leaf explants. Department of Biology and Pharmaceutical Botany, 1: 90-151.
22. Smith, R.H. and J.H. Gould. 1989. Introductory essay. In J. Janick (Ed), *Classic Papers in Horticultural Science*, pp: 52-90.

Consideration and Selection of Suitable Hormonal Composition for *in vitro* Shoot Regeneration and Propagation of *Ocimum basilicum* L.

Sahar Sadeghian¹, Gholam Ali Ranjbar² and Seyed Kamal Kazemitabar³

1 and 3- Former M.Sc. Student and Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

2- Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

(Corresponding author: a.ranjbar@sanru.ac.ir)

Received: September 3, 2011

Accepted: October 31, 2012

Abstract

Ocimum basilicum L. (sweet basil), from Lamiaceae family, is rich in aromatic essential oils and valuable in industry for its pharmaceutical, aromatic properties. The present study has focused on tissue culture of *O. basilicum* using leaf explants from *in vitro* germinated plants. The current study has been fulfilled based on completely randomized design with 5 replications using MS (Murashige and Skoog) medium with different concentrations of BAP (0, 1 mg l⁻¹) and 2,4-D (0,0.5,1mg l⁻¹). After callus formation the calluses were transferred on new MS media with (1, 3 & 5 mg l⁻¹) BAP in combination with 0.2 mg l⁻¹ NAA, for regeneration. The highest average number of shoots occurred in the medium containing 1 mg l⁻¹ BAP and 0.2 mg l⁻¹ NAA. The presence of NAA inhibited root formation, when combined with different concentrations of BAP.

Keywords: *Ocimum basilicum* L., Leaf explants, Shoot regeneration, Phytohormone