مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی ـ پژوهشی)
جلد ۷، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۵

ارزیابی ریزازدیادی گیاه دارویی در معرض خطر انقراض پونه‌سای بی‌کرک (*Nepeta nuda L.*)

رسول نریمانی M.Sc. ، محمد مقدم Ph.D. *، سپیده مجرب M.Sc.

- دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی، مشهد، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m.moghadam@um.ac.ir و moghaddam75@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۵

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی تاثیر تیمارهای مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد بر میزان شاخه‌زایی، ریشه‌زایی، تولید کالوس و باززایی گیاه دارویی پونه‌سای بی‌کرک در شرایط درون شیشه‌ای بود.

مواد و روش‌ها: بذرهای این گیاه در محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ) نیم غلظت کشت و سپس گیاهچه‌ها واکشت شدند. پس از آن نمونه‌ها در سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد BA و Kinetin، به‌صورت منفرد یا در ترکیب با IBA کشت شدند. برگ‌های همسان جهت کالوس‌زایی با تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد BA و NAA در دو محیط (روشن و تاریک) استفاده شدند. همچنین جهت باززایی، کالوس‌های یکسان با تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد BA و NAA به‌کاربرده شدند.

نتایج: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در بخش پرآوری بیشترین وزن تر (۲۳۱۵/۹۱ میلی‌گرم) و تعداد شاخه (۱۵/۲۲ در هر بوته) در هر گیاهچه در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد. همچنین تیمار BA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر موجب تولید طویل‌ترین شاخه (۵/۵۰ سانتی‌متر) و بیشترین تعداد گره (۶/۵۳ در هر گیاهچه) گردید. بیشترین طول، تعداد و درصد ریشه در محیط کشت MS با ۱/۲ غلظت نمک و IBA ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد. در بخش کالوس‌زایی، بیشترین وزن تر کالوس مربوط به کاربرد ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. علاوه بر این، بیشترین درصد کالوس‌زایی در محیط تاریک مشاهده شد و بین تیمارهای هورمونی به‌کاربرده شده تفاوت معنی‌داری دیده نشد. همچنین، بیشترین درصد باززایی از کالوس مربوط به دو تیمار تنظیم‌کننده رشد BA ۱ میلی‌گرم در لیتر با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (۸۳/۲ درصد) و BA ۱ میلی‌گرم در لیتر با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (۸۱/۶۶ درصد)، بدون هیچ تفاوت معنی‌داری بود.

نتیجه‌گیری: در مجموع مفیدترین ترکیب تنظیم‌کننده رشد برای ریزازدیادی گیاه در معرض خطر انقراض پونه‌سای بی‌کرک تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و NAA بود.

واژگان کلیدی: پرآوری، کالوس، محیط کشت، تنظیم‌کننده رشد

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

کشت بافت ابزاری را برای تکثیر سریع تعداد زیادی از گیاهان یکنواخت، در عین حفظ ژنوتیپ آن‌ها فراهم کرده است. در مورد گیاهان دارویی، کاربرد روش‌های کشت بافت و ریزازدیادی برای به‌دست آوردن شمار زیادی گیاهان شبیه به اصل و سالم با ظرفیت تولید بالا، توسط پژوهشگران استفاده می‌شود. علاوه بر این کشت بافت گیاهی می‌تواند بستر مناسبی برای حفظ و نگه‌داری گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مادری و یا در حال انقراض طبیعت به‌منزله منابع با ارزش ژرم‌پلاسم محسوب شود (۱). به‌دلیل برداشت بی‌رویه و تخریب رویشگاه‌های طبیعی، بسیاری از گونه‌های دارویی و معطر وحشی تحت خطر انقراض و فرسایش قرارگرفته‌اند. تقاضای روزافزون جهانی برای این گونه‌ها، نیاز به اهلی کردن و کشت آن‌ها در سیستم‌های زراعی را افزایش داده است (۲ و ۳). لذا به‌نظر می‌رسد که کشت این گیاهان، در سیستم‌های زراعی بتواند به‌عنوان یک راه‌کار مهم در تأمین بازار رو به گسترش و گسترده جهانی گیاهان دارویی باشد (۴). با توجه به قدمت گیاهان دارویی تاکنون در مورد اصلاح آن‌ها پیشرفت چندانی انجام نشده است. طی سال‌های گذشته مواد اولیه گیاهی مورد نیاز صنایع دارویی از طبیعت برداشت شده است که علاوه بر تخریب روزافزون جنگل‌ها، مراتع و فضای سبز، تولید مواد اولیه ناهمگن، همچنین امکان خطر انقراض گونه را در پی داشته است. برخی از این گیاهان زیستگاه‌های طبیعی محدودی دارند و بسته به شرایط محیطی و جغرافیایی محل رویش گیاه، جمع‌آوری آن‌ها با مشکلاتی مواجه است. از آنجاکه استفاده از گیاهان دارویی در ایران تاریخچه غنی و پرافتخاری دارد، این دانش سنتی را باید مطابق استانداردهای روز دنیا به دانشی کاربردی تبدیل کرد که جوابگوی نیازمندی‌های روز دنیا با زبان علمی و قابل قبول برای مراجع پزشکی و صنعت باشد. در این راستا کشت و اهلی کردن گیاهان دارویی به‌منظور ارتقای صفات کمی و کیفی فرآورده‌های گیاهی و ایجاد ژنوتیپ‌هایی با صفات مطلوب اهمیت خاصی دارد (۵).

خانواده نعناعیان شامل ۲۰۰ جنس و ۳۳۰۰ گونه بوده که اکثر گونه‌های آن دارای اسانس می‌باشند. در بین گونه‌های مختلف این خانواده گیاه نپتا به‌عنوان گیاهی دارویی با خاصیت ضدتشنج، خلط‌آور، مدر، ضد آسم، ضد سرفه، تب-بر و... بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۶). مدیترانه منشا اولیه این گیاهان است اما به‌دلیل اهمیت دارویی و اقتصادی، آن‌ها در سراسر جهان انتشار یافته‌اند. در ایران تاکنون مصارف دارویی بیش از ۸۱ گونه از خانواده نعناعیان به ثبت رسیده، که در این میان ۱۲ گونه آن متعلق به جنس *Nepeta* می‌باشد. به این دلیل در طب سنتی گونه‌های مختلف این جنس به‌طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در طب سنتی ایران نیز برخی از گونه‌های آن شامل: *N. ispahanica*، *N. pungens*، *N. pogomosperma*، *N. bracteata*، *N. binaludensis* در درمان بیماری‌های عصبی، تنفسی و گوارشی استفاده می‌شوند (۷، ۸ و ۹). گونه مورد مطالعه با نام علمی *Nepet nuda* گیاهی است علفی، چندساله به ارتفاع ۵۰ تا ۹۰ سانتی‌متر که زمان گلدهی آن در رویشگاه طبیعی، در دامنه‌ی کوه‌ها اواخر بهار در منطقه ایرانی تورانی می‌باشد. پراکندگی این گیاه در ایران، شمال غرب همچون مناطق حفاظت شده‌ی ارسباران، گرمی و ارومیه است (۱۰). بر اساس مشاهدات Kökdil و همکاران (۱۱) بیشترین مقدار ترکیبات اسانس در این گیاه نپتالاکتون می‌باشد که خواص مختلفی همچون ضدقارچی، ضد باکتریایی و ضد ویروسی به این ترکیبات نسبت داده شده است (۱۲).

در آزمایشی Bageri و همکاران (۱۳) از BAP، NAA و IAA جهت بهینه‌سازی باززایی موثر زیره سبز استفاده کردند و نشان دادند که بیشترین فراوانی کالوس‌دهی و وزن خشک توده کالوس در غلظت‌های ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و NAA بدست آمد. همچنین Echeverrigaray و همکاران (۱۴) بهبود جوانه‌زنی و شاخه‌زایی را در محیط‌های کشت حاوی بنزیل آدنین در گیاه *Lavandula dentate* نشان دادند. در آزمایشی Afzalifar و همکاران (۱۵) نیز BA را به منزله مؤثرترین تنظیم‌کننده رشد در پرآوری دو گونه مرزه معرفی کردند. ریزازدیادی در گونه‌های گیاهی متنوعی از جمله تعداد زیادی از گیاهان دارویی شامل *Cinchona ledgeriana*، *Catharanthus roseus*، *Digitalis* spp.، *Datura melet*، *Bacopa monnieri* و *Chlorophytum borivilianum* نتایج مطلوبی را نشان داده است (۱۶و۱۷).

دستیابی به‌روش مطلوب تکثیر گیاهان یکی از عوامل مهم موفقیت کشت و اصلاح آن‌ها است. تکثیر موثر با قلمه و

Archive of SID
www.SID.ir

کشت بافت می‌تواند در کلون‌سازی ژنوتیپ‌های مرغوب کمک کند و در کوتاه مدت برای تکثیر تجاری این ژنوتیپ‌ها استفاده شود. با توجه به موارد گفته شده، تاکنون مطالعه‌ای برای ریزازدیادی گیاه دارویی در معرض خطر انقراض پونه‌سای بی‌کرک انجام نشده است. لذا بررسی شرایط ریزازدیادی آن ازجمله موارد امید بخش در جهت حفاظت ژنتیکی از این گونه نادر و نگه‌داری گیاه مادری و علاوه بر آن گامی موثر در جهت انجام تحقیقات اصلاحی در آینده است که در پژوهش حاضر به آن پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

به‌منظور مطالعه ریزازدیادی گیاه پونه‌سای بی‌کرک، بذرها این گیاه از رویشگاه طبیعی آن در استان اردبیل جمع‌آوری و به آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی منتقل شد. سپس مراحل ضد عفونی سطحی بذرها انجام گرفت. بذرها ابتدا به‌مدت ۳۰ دقیقه با آب جاری و چند قطره مایع ظرف‌شویی شسته و سپس ۳ بار با آب مقطر غیراستریل آبکشی شدند. ضدعفونی نهایی قبل از کشت در زیر لامینارفلوی استریل انجام گرفت. پس از آن نمونه‌ها ابتدا با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه ضدعفونی شدند. در مرحله بعدی آن‌ها با آب مقطر استریل آبکشی شدند. بلافاصله پس از این مرحله، بذرها در محلول هیپوکلریت ۱۰ درصد حاوی ۰/۱ درصد محلول توئین ۲۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه تیمار و سپس با آب مقطر استریل، سه مرتبه و با فواصل ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه آبکشی شدند. با هدف تولید گیاهچه‌های عاری از آلودگی، پس از ضدعفونی بذرها، آن‌ها در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (۱۸) (MS) نیم غلظت کشت شدند. به‌منظور جوانه‌زنی بذرها، نمونه‌ها در شرایط تاریکی در دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها، مراحل واکشت آغاز شد. در خصوص ایجاد یکنواخت کردن کشت‌ها، بهترین گیاهچه انتخاب و واکشت‌ها بر روی آن انجام گرفت. زمان هر دوره واکشت ۳۰ تا۴۰ روز و محیط کشت‌ها نیز MS کامل در نظر گرفته شد. پس از به‌دست آوردن تعداد کافی ریز نمونه، مرحله بعدی ریزازدیادی (پرآوری) شروع شد. به‌منظور بررسی اثر سطوح مختلف هورمون‌های سیتوکنین و اکسین، شاخه‌های تشکیل‌شده در مرحله قبل به قطعاتی دارای دو تا سه گره برش داده شدند و سپس به تعداد ۳ عدد در ویال‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS و تنظیم‌کننده‌های رشدBA (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) و Kinetin (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) به‌صورت منفرد و یا در ترکیب باIBA (۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند (۱۹). ۶ هفته پس از کاشت پارامترهای لازم در رابطه با وزن تر گیاهچه، تعداد شاخه، طول متوسط شاخه، تعداد گره در هر شاخه و طول بلندترین شاخه ثبت شد. داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تکرار پی‌ریزی شدند. پس از به‌دست آوردن تعداد زیادی نمونه، مرحله ریشه‌زایی شروع شد. پیش تیمار ریشه‌زایی به‌منظور حذف آثار بازدارنده سیتوکنین بر ریشه‌دهی و یکنواخت کردن نسبی محتوای هورمونی، صورت گرفت. بدین‌منظور شاخه‌های تشکیل شده در مرحله تکثیر به قطعاتی با طول تقریبی دو تا سه گره برش داده و سپس به‌مدت ۳۰ روز در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده رشد، کشت شدند. پس از طی این مدت برای بررسی ریشه‌زایی ریز نمونه‌ها، آن‌ها در محیط‌های کشت ۱/۴، ۱/۲ و غلظت کامل محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده رشدIBA (۰/۲۵ و ۰/۵میلی‌گرم در لیتر) و نیز محیط کشت فاقد هورمون (شاهد)، کشت شدند. چهار هفته پس از کاشت پارامترهای لازم از قبیل درصد ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه‌ها، ثبت شد. تیمارها شامل ۳ غلظت محیط کشت و ۳ غلظت مختلف تنظیم-کننده رشد IBA بودند که در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تکرار که در هر تکرار ۵ ریز نمونه کشت‌شده بود، مقایسه شدند.

در مرحله بعد ریزنمونه‌های حاصل از گیاهچه‌های تولیدشده در محیط کشت، به‌منظور بررسی اثر تنظیم-کننده‌های رشد مختلف در دو محیط (تاریکی و روشنایی) بر کالوس‌زایی پونه‌سای بی‌کرک مورد استفاده قرار گرفتند. در این بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد BA (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. ریز نمونه‌های برگی، به‌دلیل شرایط کاملا سترون درون ویال‌ها به گندزدایی نیازی نداشته و در زیر هود با اندازه‌های یکسان (تقریبا ۱×۱سانتی‌متر) از قسمت میانی برگ برای کشت مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین جهت باززایی غیرمستقیم، از کالوس‌های یکسان با تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد BA (۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در

Archive of SID
www.SID.ir

لیتر) در محیط کشت MS استفاده شد. این قسمت شامل ۵ تکرار بود که در هر تکرار ۳ نمونه قرار داشت.

مرحله سازگاری با هدف انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده از محیط کشت مصنوعی به خاک و سازگار کردن آن‌ها با شرایط طبیعی محیط انجام شد. بدین منظور گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در محیط کشت خود و در ویال‌هایی که درب آن‌ها نیمه باز نگه داشته شده بودند، به‌مدت ۶ هفته در اتاقک رشد و در شرایط دمایی ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی (با شدت جریان فتون فتوسنتزی PPFD=40µ mol m-2s-1)، نگه‌داری شدند. سپس گیاهچه‌های ریشه‌دار شده از محیط‌های کشت با احتیاط و به کمک پنس خارج‌شده و پس از شست‌وشوی آرام ریشه‌ها با جریان آب و حذف آگار، به‌صورت مستقیم در مخلوطی از خاک، خاک پیت و ماسه با نسبت وزنی، ۱:۱:۱، در گلخانه نگه‌داری شدند. آبیاری به‌صورت روزانه انجام گرفت. پس از ۲ ماه، درصد بقای گیاهچه‌ها ثبت شد.

داده‌های حاصل از هر آزمایش بر اساس طرح آماری استفاده شده، با استفاده از نرم‌افزار JMP8 تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. رسم اشکال و برخی محاسبات با استفاده از نرم‌افزار Excel 2003 انجام گرفت.

نتایج

نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق حاکی از آن بود که اعمال تیمارها در ۱۱ شاخص مورد ارزیابی شامل وزن تر گیاهچه، تعداد شاخه، ارتفاع متوسط، ارتفاع بلندترین شاخه، تعداد گره، طول ریشه، تعداد ریشه، درصد ریشه‌زایی، وزن تر کالوس، درصد کالوس‌زایی و درصد باززایی دارای تفاوت معنی‌داری ($p\leq$۰/۰۱) بودند (جدول ۱و۲).

جدول ۱: تجزیه واریانس تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر نرخ شاخه‌زایی گیاه دارویی پونه‌سای بی‌کرک (*Nepeta nuda* L.)

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		وزن تر گیاهچه	تعداد شاخه	ارتفاع متوسط	ارتفاع بلندترین شاخه	تعداد گره
تنظیم‌کننده رشد	۲۰	۹۴۸۰۳۳**	۳۱/۹۴۷۶**	۱/۴۴۷۸۳**	۴/۶۱۸۱۲**	۳/۴۱۵۱۳**
خطا	۸۴	۹۶۸۲	۰/۲۰۵۶	۰/۰۳۴۱۵	۰/۱۶۸۳۳	۰/۱۱۶۸۴

*، ** و ns: به‌ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد.

جدول۲: تجزیه واریانس تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر نرخ ریشه‌زایی، کالوس‌زایی و باززایی گیاه دارویی پونه‌سای بی‌کرک (*Nepeta nuda* L.)

	منابع تغییرات	میانگین مربعات	
		تنظیم‌کننده رشد	خطا
میانگین مربعات	طول ریشه	۸/۵۹۸۶۰**	۰/۱۴۰۴۴
	تعداد ریشه	۱۰/۰۱۰۰**	۰/۲۶۸۰
	درصد ریشه‌زایی	۱۰۰۰**	۱۵۹/۷۲
	درجه آزادی	۸	۳۶
	وزن‌تر کالوس	۳۹۳۴/۰۳**	۱۰۸/۵۳
	درصد کالوس‌زایی	۲۱۱۱/۹۱**	۷۷/۲۹
	درجه آزادی	۱۱	۴۸
	درصد باززایی	۱۹۱۵/۶۶**	۴۱۴/۷۹
	درجه آزادی	۵	۲۴

*، ** و ns: به‌ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد.

Archive of SID
www.SID.ir

پرآوری و ریشه‌زایی

قطعات گره‌دار به‌دست‌آمده از گیاهچه‌های رشد کرده در مرحله قبل، در تمامی ترکیب‌های مختلف سیتوکنین‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشدی، به‌خوبی رشد کرد و تولید گره‌های جدید ساقه، از طریق افزایش رشد طولی شاخه‌ها و نیز افزایش تعداد گره در هر گیاهچه، انجام شد. بیشترین وزن تر (۲۳۱۵/۹۱ میلی‌گرم) و تعداد شاخه (۱۵/۲۲ در هر بوته) در هر گیاهچه به‌ترتیب مربوط به تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA می‌باشد. همان‌طوری که در جدول ۳ مشاهده می‌شود کاربرد Kinetin به‌صورت تنها یا همراه با IBA باعث کاهش در صفات فوق شده است. همچنین مقدار بالای BA نیز روند کاهشی را در صفات ذکرشده در پی داشت. در بخش طول شاخه و تعداد گره، کاربرد مقدار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA باعث افزایش چشمگیری در این صفات شد. به‌طوری‌که با کاهش در مقدار این تنظیم‌کننده رشد سیر نزولی در مقدار طول شاخه و تعداد گره قابل مشاهده است. البته کاربرد مقدار پایین IBA (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر) همراه با ۲ میلی‌گرم در لیترBA نیز در طول بلندترین شاخه و طول متوسط گیاهچه موثر واقع شد (شکل ۲ و جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه میانگین تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر نرخ شاخه‌زایی گیاه دارویی پونه‌سای بی‌کرک (*Nepeta nuda* L.)

تنظیم‌کننده رشد			صفات موردبررسی				
سیتوکینین (mg/L)	اکسین (mg/L)	وزن‌تر گیاهچه (mg)	تعداد شاخه (در هر گیاهچه)	طول متوسط گیاهچه(cm)	طول بلندترین شاخه (cm)	تعداد گره (درهر گیاهچه)
BA۰/۵	-	۳۶۵/۸۲hij	۴/۰۶kl	۲/۸۲d	۳/۷۰d	۳/۶۰hij
BA۱	-	۱۱۴۸/۳۷b	۵/۸۳fg	۲/۷۸de	۳/۳۸de	۳/۳۳j
BA۱/۵	-	۵۳۲/۳۸def	۴/۷۶ig	۲/۶۸defg	۳/۳۰def	۴/۲۶fg
BA۲	-	۲۷۹/۲۴J	۳/۶۰lm	۳/۴۴b	۵/۵۰a	۶/۵۳a
BA۲/۵	-	۳۶۲hij	۵/۱۰hij	۲/۰۱j	۲/۵۴g	۴/۵۳def
Ki۰/۵	-	۵۷۳/۲۴de	۵/۶۶gh	۲/۶۹defg	۴/۷۶c	۴/۹۳cd
Ki۱	-	۵۲۴/۲۸defg	۶/۵۳cde	۲/۷۴def	۴/۵۰c	۴/۵۹cdef
BA۰/۵	IBA۰/۲۵	۶۳۹/۲۵cd	۸/۶۶b	۲/۴۹ghi	۳/۲۸def	۳/۲۸def
BA۰/۵	IBA۰/۵	۴۲۶/۳۸fghi	۶/۲۰efg	۲/۵۵fgh	۳/۶۰d	۳/۸۶gh
BA۱	IBA۰/۲۵	۲۳۱۵/۹۱a	۱۵/۲۲a	۱/۹۶j	۲/۴۶g	۳/۸۶gh
BA۱	IBA۰/۵	۷۵۰/۸۹c	۶/۲۳efg	۲/۶۲defgh	۲/۹۰efg	۳/۶۰hij
BA۱/۵	IBA۰/۲۵	۵۰۶/۴۱efg	۶/۰۶efg	۱/۷۹jk	۲/۸۰fg	۳/۴۰ij
BA۱/۵	IBA۰/۵	۴۱۳/۲۲fghi	۴/۵۳jk	۱/۵۹k	۲/۵۰g	۴/۳۹ef
BA۲	IBA۰/۲۵	۳۲۶/۰۴ij	۳/۳۳mn	۳/۶۸a	۵/۳۴ab	۴/۵۳def
BA۲	IBA۰/۵	۴۰۳/۹۰ghi	۲/۸۶n	۱/۹۵j	۲/۹۰efg	۳/۷۹hi
BA۲/۵	IBA۰/۲۵	۴۲۵/۲۱fghi	۵/۱۵hi	۲/۲۹i	۳/۵۰d	۳/۶۶hij
BA۲/۵	IBA۰/۵	۴۷۶/۳۱efgh	۵/۰۵ij	۲/۴۲hi	۳/۲۲def	۴/۸۰cde
Ki۰/۵	IBA۰/۲۵	۵۰۶/۵۸efg	۷/۰۶c	۳/۱۳c	۴/۸۶bc	۵/۶۰b
Ki۰/۵	IBA۰/۵	۴۱۷/۶۸fghi	۶/۳۳def	۳/۳۲bc	۴/۴۸c	۴/۹۹c
Ki۱	IBA۰/۲۵	۵۲۹/۴۵def	۶/۹۰cd	۲/۷۱defg	۴/۸۲c	۳/۵۳hij
Ki۱	IBA۰/۵	۴۶۵/۶۱efgh	۵/۱۵hi	۲/۵۶efgh	۴/۴۰c	۳/۵۳hij

در هر ستون میانگین‌های با حروف مشابه در سطح احتمال آماری ۵ درصد براساس آزمونLSD اختلاف معنی‌دار ندارند.

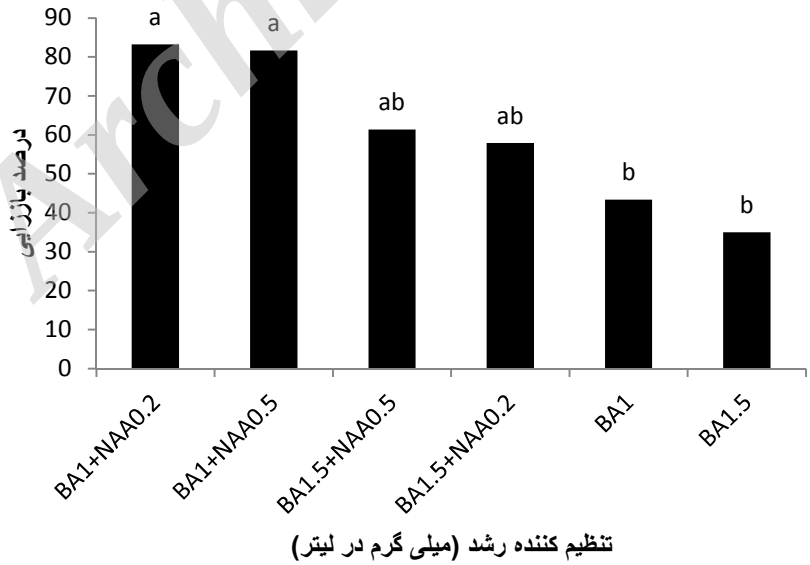
Archive of SID
www.SID.ir

در قسمت ریشه‌زایی بیشترین تعداد ریشه (۵/۶۰ و ۵ در هر گیاهچه) و درصد ریشه‌زایی (۷۵ درصد) در محیط کشت MS و ۱/۴MS همراه با کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد که این دو محیط در صفات ذکرشده تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. همچنین بیشترین طول ریشه مربوط به محیط کشت MS با غلظت ۱/۴ نمک همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به مقدار ۴/۸۲ سانتی‌متر بود (جدول ۴). بنابراین به‌نظر می‌رسد کاربرد مقدار متوسط IBA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) همراه محیط کشت با نصف غلظت نمک بهترین نتیجه را در ریشه‌زایی دارد. پس از ریشه‌زایی، مرحله سازگاری گیاهچه‌ها طبق روشی که در قسمت مواد و روش ذکر شد انجام شد و ۷۰ درصد گیاهچه‌ها به‌صورت موفقیت‌آمیزی در محیط گلخانه سازگار شدند (شکل ۲).

جدول ۴: مقایسه میانگین تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر نرخ ریشه‌زایی گیاه دارویی پونه‌سای بی‌کرک (*Nepeta nuda* L.)

تنظیم‌کننده رشد		صفات مورد بررسی		
محیط کشت	اکسین (mg/L)	طول ریشه (cm)	تعداد ریشه (در هر گیاهچه)	درصد ریشه‌زایی
۱/۴MS	IBA۰/۲۵	۱/۰۳f	۱/۴۰d	۴۰c
۱/۴MS	IBA۰/۵	۱/۴۵def	۲cd	۶۵ab
۱/۴MS	IBA۱	۱/۲۳ef	۱/۹۹cd	۶۰ab
۱/۲MS	IBA۰/۲۵	۱/۰۶ef	۲/۴۰c	۳۵c
۱/۲MS	IBA۰/۵	۴/۸۲a	۵a	۷۵a
۱/۲MS	IBA۱	۲/۶۵c	۳/۱۴b	۵۰bc
MS	IBA۰/۲۵	۱/۸۰d	۲/۶۰bc	۶۰ab
MS	IBA۰/۵	۳/۵۹b	۵/۶۰a	۷۵a
MS	IBA۱	۱/۵۱de	۲/۶۰bc	۶۵ab

در هر ستون میانگین‌های با حروف مشابه در سطح احتمال آماری ۵ درصد بر اساس آزمون LSD اختلاف معنی‌دار ندارند.



شکل ۱: مقایسه میانگین تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد (BA1.5 و BA1: بنزیل آدنین ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، NAA0.2 و NAA0.5: نفتالین استیک اسید ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بر نرخ باززایی از کالوس گیاه دارویی پونه‌سای بی‌کرک (*Nepeta nuda* L.). در هر ستون میانگین‌های با حروف مشابه در سطح احتمال آماری ۵ درصد بر اساس آزمون LSD اختلاف معنی‌دار ندارند.

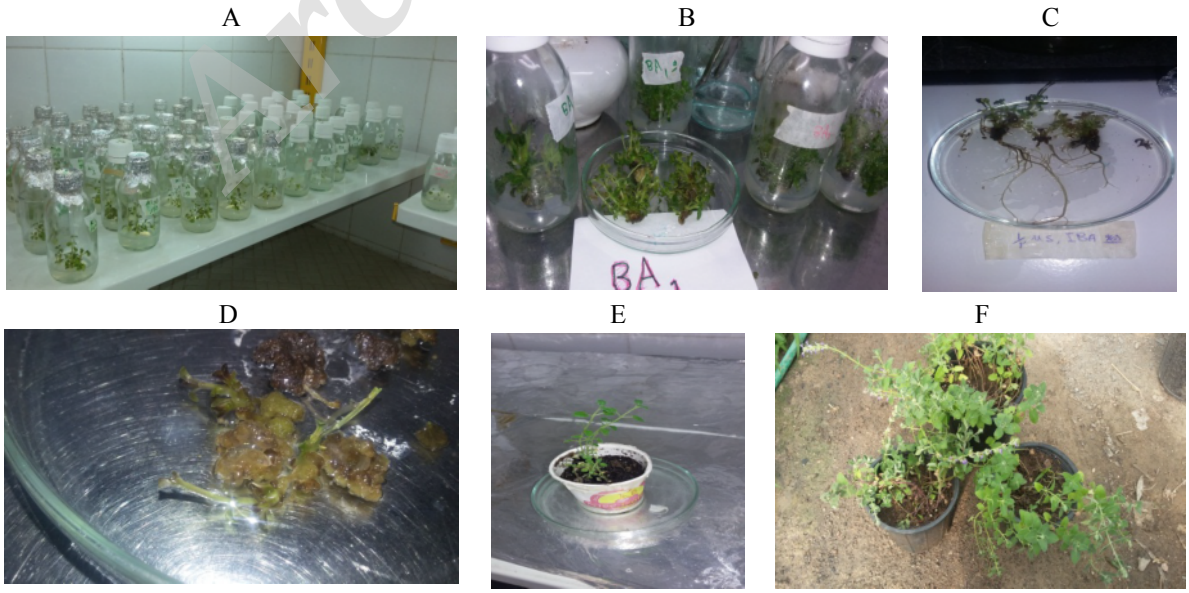
Archive of SID
www.SID.ir

کالوس‌زایی

در رابطه با کالوس‌زایی همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود محیط تاریک نتیجه مطلوبی را در رابطه با وزن تر کالوس و درصد کالوس‌زایی داشته است. به‌طوری‌که بیشترین مقدار وزن تر کالوس مربوط به تیمار تنظیم‌کننده رشد BA (۱ میلی‌گرم در لیتر) همراه با NAA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) با مقدار ۱۴۳/۸۱۸ میلی‌گرم مربوط به محیط تاریک می‌باشد. همچنین درصد کالوس در محیط تاریک بالاترین مقدار خود را دارا بود به‌طوری‌که بین تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در این محیط تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۵).

جدول ۵: مقایسه میانگین تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر نرخ کالوس‌زایی گیاه دارویی پونه‌سای بی‌کرک (*Nepeta nuda* L.)

	تنظیم‌کننده رشد		صفات موردبررسی		
	سیتوکینین (mg/L)	اکسین (mg/L)	وزن‌ترکالوس (mg)	درصد کالوس‌زایی	
روشنایی	BA۰/۵	NAA۰/۲	۵۳/۳۶۴g	۳۷/۸۰c	
	BA۱	NAA۰/۲	۷۱/۰۷۲f	۵۸b	
	BA۱/۵	NAA۰/۲	۷۶/۰۷۴ef	۵۳/۶۰b	
	BA۰/۵	NAA۰/۵	۹۳/۸۹۶cd	۶۳b	
	BA۱	NAA۰/۵	۷۸/۴۶۰ef	۵۶/۲۰b	
	BA۱/۵	NAA۰/۵	۶۷/۰۴۰f	۵۶/۸۰b	
تاریکی	BA۰/۵	NAA۰/۲	۷۷/۴۴۲ef	۹۱/۶۶a	
	BA۱	NAA۰/۲	۱۰۱/۱۶۶c	۹۱/۵۹a	
	BA۱/۵	NAA۰/۲	۸۵/۱۰۰de	۸۷/۴۹a	
	BA۰/۵	NAA۰/۵	۱۲۹/۶۰۲b	۹۶/۶۶a	
	BA۱	NAA۰/۵	۱۴۳/۸۱۸a	۹۱/۶۶a	
	BA۱/۵	NAA۰/۵	۱۲۶/۹۰۰b	۹۱/۶۶a	



شکل۲: استقرار اولیه گیاه پونه‌سای بی‌کرک در محیط کشت MS (B) تکثیر شاخه (C) ریشه‌دهی (D) کالوس‌زایی (E) سازگاری (F) انتقال به گلخانه

Archive of SID
www.SID.ir

باززایی

باززایی غیرمستقیم (ازکالوس) با کاربرد تنظیم‌کننده رشد BA (۱میلی‌گرم در لیتر) همراه با NAA (۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) نتیجه مطلوبی را داشت. به‌طوری‌که در این غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد، مقدار کالوس‌های باززایی شده ۸۳/۲ و ۸۱/۶ درصد بود. همچنین کاربرد تنهای BA موفقیت‌آمیز نبود به‌طوری‌که کمترین مقدار باززایی در غلظت ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد(شکل ۱).

بحث

یکی از پارامترهایی که در تکنیک کشت بافت اهمیت دارد مسئله تولید شاخه جانبی می‌باشد، زیرا در مرحله واکشت نمونه‌ها، شاخه‌های جانبی تولید شده را می‌توان جدا کرد و هر یک را به‌عنوان یک نمونه در محیطی جداگانه کشت نمود. حتی در برخی موارد که رشد شاخساره‌ها قوی باشد از هر شاخساره می‌توان چندین ریزنمونه تهیه کرد و با این کار سرعت تکثیر بسیار افزایش می‌یابد. نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که در غلظت‌های پایین نتایج بهتری را می‌توان در رابطه با شاخه‌زایی به‌دست آورد. AL-Sulaiman و همکاران (۲۰) گزارش کردند که مقادیر کم سیتوکنین‌ها برای شاخه‌زایی عناب مناسب می‌باشد.

Muna و همکاران (۲۱) گزارش کردند در محیط حاوی مقادیر کم NAA و IBA به‌ویژه زمانی که در ترکیب با غلظت‌های بالای BA همراه هستند، تشکیل کالوس اتفاق افتاده و شاخه‌های نابجا تمایز می‌یابند. Eliasson و Nordstrom (۲۲) نیز گزارش کردند که در محیط حاوی BA شاخه‌زایی زیادی اتفاق می‌افتد. نقش BA در محیط کشت، شکستن غالبیت انتهایی و تحریک رشد شاخه‌های جدید است. اثر آشکار دیگر حضور BA در محیط کشت، اثر بازدانگی آن در تشکیل ریشه می‌باشد. این نتایج با یافته‌های ما در این مطالعه هم‌خوانی دارد.

Afzalifar و همکاران (۱۵) طی آزمایشی BA را به‌منزله‌ی موثرترین تنظیم‌کننده رشد در پرآوری دو گونه مرزه معرفی کردند. در آزمایش آن‌ها، بیشترین تأثیر را غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BA از خود نشان داد. این بدان معناست که مرزه به غلظت‌های متوسط به بالای سیتوکنین از نوع BA جواب‌دهی بهتری از خود نشان می‌دهند. در صورتی‌که در پژوهش حاضر در پونه‌سای بی‌کرک BA به‌تنهایی نتیجه مطلوبی را به‌همراه نداشت. همچنین آن‌ها بیان کردند که در بین سیتوکنین‌های آزمون شده، کینتین در پرآوری کمترین اثر را داشته است که با نتیجه پژوهش ما در پونه‌سای بی‌کرک کاملا مطابقت دارد (جدول ۳). آن‌ها گزارش کردند که طویل‌ترین شاخه در ریزازدیادی مرزه در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده گردید که مطابق با نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر در پونه‌سای بی‌کرک است. مطالعات انجام شده درباره اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکینینی بر ریزازدیادی گیاهان مختلف حاکی از تأثیر بیشتر و بهتر تنظیم‌کننده رشد BAP در مقایسه با سایر تنظیم‌کننده‌های رشد مورد مطالعه است که موید نتایج به‌دست‌آمده است (۲۳). در مطالعه Shafie Haji Abad و همکاران (۲۴) بر پرآوری ریز نمونه‌های سرخس بوستونی، بیشترین تعداد شاخساره را در محیط کشت حاوی غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آوردند که نشان از اهمیت این تنظیم‌کننده رشد با غلظت به‌کاربرده شده دارد. در آزمایش حاضر تنظیم‌کننده رشد BA همراه با IBA دارای نتیجه‌ای مطلوبی بود. البته لازم به ذکر است که غلظت تنظیم‌کننده رشد BA توصیه شده در هر دو آزمایش مشابه هم می‌باشد. در بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکینینی بر ریزازدیادی گل آهار ظریف توسط Mahmoodzadeh و همکاران (۲۵)، مشخص شد کینتین با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تأثیر مثبتی بر جوانه‌زنی و افزایش ارتفاع گیاه داشت که با نتایج این تحقیق مشابهت دارد و نشان می‌دهد با افزایش غلظت کینتین، ارتفاع گیاه نیز افزایش می‌یابد و این تنظیم‌کننده رشد نیز به‌نوبه‌ی خود توانسته در افزایش ارتفاع گیاه موثر واقع شود. در بررسی‌های Karuppusamy و همکاران (۲۶) با استفاده از تنظیم-کننده‌های رشد 2iP،Kin و BAP موفق به ساقه‌زایی در گیاه *Vanasushava pedata* شده و BAP را از کینتین و 2iP موثرتر دانست. همچنین فراوانی تولید شاخه در تنظیم‌کننده BAP نسبت به دو تنظیم‌کننده دیگر بیشتر بود، که با نتایج این تحقیق نیز مطابقت دارد.

ریشه‌زایی که نقش مهمی در آماده‌سازی ریزشاخساره‌ها برای مرحله سازگاری دارد، در برگیرنده ریشه‌زایی تک‌ریز شاخساره‌ها در محیط کشتی است که در آن میزان اکسین افزایش و میزان سایتوکینین‌ها کاهش یافته و یا به‌طورکلی

Archive of SID
www.SID.ir

حذف شده است. هورمون اکسین در گیاهان معمولا باعث تحریک ریشه‌زایی و جلوگیری از ایجاد شاخه‌های جانبی می‌شود. یکی از متداول‌ترین اکسین‌ها در کشت بافت گیاهی تنظیم‌کننده رشد IBA می‌باشد. در رابطه با ریشه‌زایی، IBA به‌منظور ریشه‌زایی برخی گیاهان خانواده چتریان نظیر *V. pedata* توسط Karuppusamy و همکاران (۲۶)، *Anethum graveolens* توسط Sharma و همکاران (۲۷) گزارش شده که با نتایج این تحقیق مشابهت دارد. برخی پژوهش‌ها آثار مثبت کاهش غلظت نمک‌ها را در افزایش و بهبود ریشه‌زایی، در گونه‌های دارویی از قبیل *Salix humboldtiana* (۲۸) و *Hancorina speciosa* (۲۹) نشان داده‌اند. در این پژوهش نیز کاهش غلظت نمک به نصف به‌همراه کاربرد غلظت متوسط IBA موجب تولید بیشترین درصد و طول ریشه در ریز نمونه‌های پونه‌سای بی‌کرک شد. در تحقیقی بر روی گونه *Origanum sipyleum* L. برای آزمون ریشه‌زایی از دو اکسین NAA و IBA استفاده کردند. در اینجا نیز مانند آزمون شاخه‌زایی مقدار کمتر تنظیم‌کننده رشد تأثیر بهتری بر صفات مربوط به ریشه‌زایی داشت. ۹۶٪ از شاخه‌ها پس از قرارگیری در محیط کشت با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA پس از سه هفته ریشه‌دار شدند که کاملا با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (۳۰). همچنین نتایج تحقیق Junaid و همکاران (۳۱) نیز نشان داد که با افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد IBA تعداد ریشه‌ها کاهش پیدا می‌کند. Dhandapani و همکاران (۳۲) نیز از غلظت ۰/۴۴ میلی‌گرم در لیتر IBA بهترین نتیجه ریشه‌زایی را به‌دست آوردند و بیان داشتند که این تنظیم‌کننده رشد در غلظت‌های پایین تأثیر به‌مراتب بهتری در ریشه‌زایی دارد.

بافت کالوس گیاهی علاوه بر ازدیاد گیاهان، قابلیت‌های متنوع دیگری نیز دارد که از جمله می‌توان به استفاده از آن‌ها در انتقال ژن به گیاه و یا کاربرد آن در تهیه کشت‌های سوسپانسیون سلولی به‌منظور تولید متابولیت‌های ثانویه و یا ترکیبات مفید دیگر حاصل از آن‌ها اشاره نمود (۱۶). اثر تنظیم‌کننده‌های رشد را روی کالوس‌زایی ریز نمونه‌های مختلف (برگ، ساقه، ریشه و هیپوکوتیل) گیاه *Saussurea obvallata* بررسی نموده و دریافتند که ریز نمونه برگی و غلظت ۲/۵ میلی‌گرم BA و ۱۰ میلی‌گرم NAA بیشترین میزان کالوس‌زایی را داشتند (۳۳). تنوع در فراوانی تولید کالوس در گیاهان مختلف و در پاسخ به سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد، می‌تواند به‌دلیل تمایز در بیان ژن‌های کنترل کننده تولید کالوس باشد. همچنین ممکن است که در بعضی از سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده، برخی از ژن‌های مسئول در سنتز کالوس، به‌طور کامل بیان نشوند (۳۴). در بسیاری از مطالعات اثر القایی تاریکی بر تولید کالوس گزارش‌شده است (۳۵ و ۳۶). در این مطالعه نیز کالوس‌زایی اختلاف چشمگیری را در نور و تاریکی نشان داد. به‌طوری‌که در شرایط وجود نور کالوس‌ها بعد از مدتی به رنگ سیاه درآمدند. اغلب مطالعات نشان می‌دهد که تنظیم‌کننده‌های رشد گروه اکسین به‌ویژه 2,4-D و NAA در تمایززدایی و تولید کالوس نقش مهمی دارند. همچنین این تنظیم‌کننده‌های رشد همراه با سیتوکینین‌هایی ازجمله BA در تولید و رشد کالوس موثرند (۳۷).

نقش سیتوکینین‌ها به‌عنوان مهم‌ترین فاکتور موثر در باززایی ساقه به اثبات رسیده است و اثرات چشمگیر آن‌ها شاید با تغییرات بافت‌شناسی در بافت‌های القاشده مرتبط باشد (۳۸). در گیاه *Taxus wallichiana* گزارش شده است که با افزایش سیتوکینین و کاهش اکسین، باززایی افزایش می‌یابد که منطبق با نتیجه این آزمایش می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود کمترین غلظتBA (۱ میلی‌گرم در لیتر) دارای بیشترین باززایی می‌باشد (۳۹).

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر به ریزازدیادی پونه‌سای بی‌کرک پرداخته شد. نتایج به‌دست آمده بیانگر این بود که تیمار ۱میلی‌گرم در لیتر BA با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و NAA از مهم‌ترین و مفیدترین ترکیبات تنظیم‌کننده رشد برای ریزازدیادی این گیاه می‌باشند.

منابع

1. Arikat NA, Jawad FM, Karam NS, Shibli RA. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). Sci. Hort. 2004; 100(1):193-202.

Archive of SID
www.SID.ir

2. Lambert J, Srivastava J, Vietmeyer N. Medicinal plants: rescuing a global heritage. 1th Ed. The World Bank Washington, D. C; 1997.

3. Pushpangadan P. On Conservation Biology, Domestication and Commercial Cultivation of Wild Medicinal and Aromatic Plants. Recent Advances in Medicinal Aromatic, Spices and Crop. 1992; 2: 431-436.

4. Uniyal RC, Uniyal MR, Jain P. Cultivation of Medicinal Plants in India: A reference book– New Delhi, India, TRAFFIC India & WWF India; 2000.

5. Fotovati H, Noorbakhsh, S. Biotechnology, the new aspect for agricultural progress. The 6th National Biotechnology Congress of Iran, 13-15 Aug, Tehran; 2009.

6. Seitz HV, Hinderer W. Anthocyanins in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. San Diego Academic Press: Constabel, F & Vasil, I., 1988; 49-76

7. Amin G. Traditional Medical Plants of Iran, 2th Ed, Tehran: Ministry of Health publisher; 1990; 55p.

8. Jamzad Z, Chase MW, Ingrouille M, Simmonds MS, et al. Phylogenetic relationships in *Nepeta* L. (Lamiaceae) and related genera based on ITS sequence data. J. Taxon. 2003; 52(1): 21-32.

9. Zargari A, Medical Plants, 4th ET, Tehran University Publisher, 1993; Page 450.

10. Rechinger KH. *Nepeta*. Flora Iranica. 1982; 150: 108-216.

11. Kökdil G, Kurucu S, Topçu G. Chemical constituents of the essential oils of *Nepeta italica* L. and *Nepeta sulfuriflora* PH Davis. Flavour Frag. J. 1997; 12(1): 33-5.

12. Skaltsa HD, Lazari DM, Loukis AE, Constantinidis T. Essential oil analysis of *Nepeta argolica* Bory & Chaub. Subsp. argolica (Lamiaceae) growing wild in Greece. Flavour Frag. J. 2000; 15(2): 96-9.

13. Bagheri A, Moshiri F, Khosravinia S. Investigation on reaction of explants and plant growth regulators on callus induction, rooting and in vitro regeneration of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. Crop Biotech. 2013; 5: 53-61.

14. Echeverrigaray S, Basso R, Andrade LB. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. Biol. Plantarum. 2005; 49(3): 439-42.

15. Afzalifar M. Evaluation of different propagation and androgenesis in *Satureja khuzistanica* and *S. rechingeri.* M.Sc. thesis. Medicinal Plants and Drug Research Institute. Shahid Beheshti University, Iran. 2012; 46-73.

16. Kayser O, Quax W. Medicinal Plant Biotechnology. 7th ET. Federal Republic of Germany: Wiley-VCH; 2006.

17. Tripathi L, Tripathi JN. Role of biotechnology in medicinal plants. Trop. J. Pharm. Res. 2003; 2(2): 243-53.

18. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962; 15(3): 473-97.

19. Zahedi B, Sahraro A. Evaluation of the micropropagation of *Satureja khuzistanica*. Iranian Hort. Sci. 2015; 7(2): 291-296.

20. Al-Sulaiman MA. Clonal propagation of *Ziziphus spina-christi* by shoot tip culture: I. improved inorganic and organic media constituents for in vitro shoot multiplication. J. King Abdulaziz Uni. 2010; 21(2): 3.

21. Muna AS, Ahmad AK, Mahmoud K, Abdul-Rahman K. In vitro propagation of a semi-dwarfing cherry rootstock. PCTOC. 1999; 59(3): 203-8.

22. Nordstrom A, Eliasson L. Uptake and translocation of C14-labled benzylaminopurine in apple shoots grown in vitro in relation to shoot development. Physiol. Plant. 1986; 68(3): 431-435.

23. Nowruzian A, Masoumian M, Ebrahimi MA, Bakhshi Khaniki GR. Optimization of cytokinin concentration on *Ferula assa-foetida* height. 1th International & 13th Iranian Crop & Plant Breeding Sciences Congress and 3rd Seed

Archive of SID
www.SID.ir

Science and Technology Conference. Karaj, Iran. Agust 2014; 26-28.

24. Shafie Haji Abad M, Hamid Oghli Y. Fatahi Moghadam, J. The effects of different nutrient media on shoot proliferation of Boston Fern (*Nephrolepis exaltata* Schott cv. 'Bostoniensis'). J. Horti. Sci. Technol. 2008; 9: 139-144.

25. Mahmoodzadeh H, Abbasi F, Rohani Sh. The effect of different concentrations of cytokinins on micropropagation of *Zinnia elegans* Thumbelina. J. Biol. Sci., Islamic Azad Uni. Zanjan. 2010; 2: 61-65.

26. Karuppusamy S, Kiranmai C, Aruna V, Pullaiah T. Micropropagation of *Vanasushava pedata*-An endangered medicinal plant of South India. BAPTC&B. 2006; 16(2): 85-94.

27. Sharma RK, Wakhlu AK, Boleria M. Micropropagation of *Anethum graveolens* L. through axillary shoot proliferation. J. Plant Biochem. Biot. 2004; 13(2): 157-9.

28. Pereira AMS, Bertoni BW, Moraes RM, Franca SC. Micropropagation of *Salix humboldtiana* Hild. Rev. Bras. Plantas Med. 2000; 2: 17-21.

29. Pereira-Netto AB. In vitro propagation of *Hancornia speciosa*, a tropical fruit tree. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 1996; 32(4): 253-6.

30. Ccedil AK, Oluk a E, Ihsan YA. Comparison of the antimicrobial activity and essential oil content of wild and micropropagated *Origanum sipyleum* L.: A medicinal herb native to Turkey. J. Med. Plants Res. 2013; 7(6): 230-3.

31. Junaid A, Mujib A, Bhat MA, Sharma MP, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Catharanthus roseus*. Biol. Plantarum. 2007; 51(4): 641-6.

32. Dhandapani M, Kim DH, Hong SB. Efficient plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis from the explants of *Catharanthus roseus*. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2008; 44(1):18-25.

33. Dhar U, Joshi M. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. Plant Cell Rep. 2005; 24(4): 195-200.

34. Mahmood I, Razzaq A, Khan ZD, Hafiz IA, et al. Evaluation of tissue culture responses of promising wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and development of efficient regeneration system. Pak. J. Bot. 2012; 44(1): 277-84.

35. Li X, Krasnyanski SF, Korban SS. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in Rosa. J. Plant Physiol. 2002; 159(3): 313-9.

36. Nakamura M, Takeuchi Y, Miyanaga K, Seki M, et al. High anthocyanin accumulation in the dark by strawberry (*Fragaria ananassa*) callus. Biotechnol. Lett. 1999; 21(8): 695-9.

37. Dixon, RA, Gonzales, RA. A Practical Approach Plant Cell Culture. 2nd Ed. IRL Press; 1996; 230 p.

38. Neibaur I, Gallo M, Altpeter F. The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 2008; 44(6): 480-486.

39. Datta MM, Jha S. Embryo culture of *Taxus wallichiana* (Zucc.). J. Plant Biotech. 2004; 6(4): 213-219.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2017; 7(4)

Original Article

Evaluation of the micropropagation of hairless catmint (*Nepeta nuda* L.), an endangered medicinal plant

Rasoul Narimani M.Sc., Mohammad Moghaddam Ph.D.*, Sepideh Mojarab M.Sc.

- Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
* Email corresponding author: m.moghadam@um.ac.ir , moghaddam75@yahoo.com

Received: 5 Oct. 2016 Accepted: 5 Mar. 2017

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate the effects of different treatments of growth regulators on the amount of shooting, rooting, callus production and plant regeneration of hairless catmint (*Nepeta nuda*), in vitro condition.

Material and Methods: The seeds of this plant were cultured in MS/2, and then the plantlets were sub-cultured. The obtained samples were cultured in different levels of BA and Kinetin, either alone or in combination with IBA. Leaves of explants were used for callus induction with BA and NAA treatments in both medium (light and dark). Also, for regeneration, the same calluses were used with BA and NAA treatments.

Results: The results of this study showed that, in proliferation part, the highest fresh weight (2315.9 mg) and shoot number (15.22 per each bush) of each plantlet were obtained in 1 mgL-1 BA and 0.25 mgL-1 IBA. Moreover, the BA treatment with 2 mgL-1 concentration cause to produce the longest branches (50.5 cm) and the highest number of nodes (53.6 per plantlet) in each plantlet.

The highest length, number and percentage of root were obtained at MS/2 medium and 0.5 mgL-1 IBA. In callus formation part, the highest fresh weight of callus was related to application of 1 mgL-1 BA with 0.5 mgL-1 NAA. In addition, the highest percentage of callus formation was observed in dark medium and no significant differences were observed between the growth regulator treatments. Furthermore, the highest percentage of regeneration of callus related to both growth regulators treatments included 1 mgL-1 BA with 0.2 mgL-1 NAA (83.2 %) and 1 mgL-1 BA with 0.5 mgL-1 NAA (81.66 %) with no significant differences between them.

Conclusion: In total, the most useful growth regulator compound for micro-propagation of hairless catmint, which is endangered extinction species, were 1 mgL-1 BA with 0.5 mgL-1 IBA and NAA.

Keywords: Proliferation, Callus, Medium culture, Growth Regulator

Archive of SID

www.SID.ir