Archiv

Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Effect of plant growth regulators on callogenesis and regeneration of *Hyssopus officinalis* in *In vitro* conditions

Saba Morovatti
M.Sc. Student of Agricultural Biotechnology, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran. Email: mahmorovatti@yahoo.com

Alireza Zebarjadi
*Corresponding author. Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran. Email: zebarjadiali@yahoo.com

Sohbat Bahraminejad
Associate Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran. Email: bahraminejad@hotmail.com

Abdollah Nadhaphy
Associate Professor, Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran. Email: nadjaphy@yahoo.com

Abstract

Objective

Hyssopus officinalis, one of the most important medicinal plants belongs to the Lamiaceae family and it is rich in essential oils that is used for medicinal purposes, health care and food. By tissue culture method such as; callus production and plant regeneration, we able to increase the production of quality and quantity of effective secondary metabolites in this medicinal important plant. This study was performed on MS medium, aimed to determine the most appropriate concentration of auxin and cytokinin plant growth regulators to obtain the maximum efficiency in induction and production of callus and *in vitro* regeneration of plantlets from leaf and hypocotyl explants of *Hyssopus officinalis*.

www.SID.ir

Archive of SID

Materials and Methods

Callus induction was evaluated in a factorial experiment based on completely randomized design (CRD) with three replications. In this experiment, different levels of NAA plant growth regulator (0, 0.5, 1 and 2 mg/L) and two different types of explant, leaves and hypocotyl explants were used. Traits including, relative growth rate, fresh and dry weight, diameter, color and physical structure and the percentage of callus induction was measured. Also, the direct and indirect regeneration was evaluated in a factorial experiment based on completely randomized design (CRD) with three replications. The different levels of plant growth regulator (1 and 2 mg/L NAA) and (2 and 4 mg/L BAP) were used and regeneration percentage were measured.

Results

The highest percentage of callus induction (100 %) were obtained on MS medium with 2 mg/L NAA in hypocotyl explants. The highest percentage of direct regeneration (73 %) and indirect regeneration (80 %) were observed in MS medium with combinations of 2 mg/L NAA and 4 mg/L BAP in hypocotyl and calli derived from hypocotyl.

Conclusions

The results showed that the hypocotyl explant was more suitable for callus induction and regeneration in *Hyssopus officinalis*.

Keywords: Callus, Hyssop, Plant Growth Regulators, MS medium

Paper Type: Research Paper.

Citation: Morovatti S, Zebarjadi A.R, Bahraminejad S, Nadhaphy A (2021) Effect of plant growth regulators on callogenesis and regeneration of *Hyssopus officinalis* in *In vitro* conditions. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (3), 187-204

Agricultural Biotechnology Journal 13 (3), 187-204. DOI: 10.22103/jab.2021.16756.1277

Received: July 24, 2021. Accepted: August 25, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

www.SID.ir

Archiv

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
انجمن بیوتکنولوژی ایران
دانشگاه شهید باهنر کرمان
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی گیاه دارویی زوفا (*Hyssopus officinalis*) در شرایط درون شیشه‌ای

صبا مروتی

دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران، رایانامه: mahmorovatti@yahoo.com

علیرضا زبرجدی

*نویسنده مسئول: استاد گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران، رایانامه: zebarjadiali@yahoo.com

صحبت بهرامی‌نژاد

دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: bahraminejad@hotmail.com

عبداله نجفی

دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: nadjaphy@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۳

چکیده

هدف: زوفا (*Hyssopus officinalis*)، از مهم‌ترین گیاهان دارویی و ادویه‌ای متعلق به تیره نعناعیان و غنی از اســانس‌های روغنی ا ست که برای اهداف دارویی، بهدا شتی و خوراکی مورد ا ستفاده قرار می‌گیرد. با ا ستفاده از روش‌ک شت بافت از جمله تولید کالوس و باززایی این گیاه دارویی مهم می‌توان راندمان تولید متابولیت‌های ثانویه موثر آن را از نظر کمی و کیفی ارتقاء بخشــید. مطالعه حا ضر در محیط ک شت پایه MS، به منظور تعیین منا سب‌ترین غلظت تنظیم‌کننده‌های ر شد اک سینی و سیتوکینینی برای بدســت آوردن بیشــترین بازده در القاء و تولید کالوس و همچنین باززایی گیاهچه‌های درون شــیشــه‌ای از ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل در گیاه زوفا انجام گرفت.

www.SID.ir

مواد و روش‌ها: آزمایش کالوس‌دهی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار اجرا گردید. در این آزمایش از سطوح مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA) و دو نوع ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل استفاده گردید. صفات مختلف از جمله سرعت رشد نسبی، وزن خشک و تر، قطر، رنگ و ساختار فیزیکی و درصد القای کالوس اندازه‌گیری و بررسی شد. آزمایش باززایی مستقیم و غیر مستقیم نیز به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. از سطوح مختلف تنظیم کننده رشد (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA) و (۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP) استفاده شد و صفت درصد باززایی اندازه‌گیری شد.

نتایج: بهترین در صد القای کالوس (۱۰۰٪) در محیط MS همراه با ۲ میلی گرم در لیتر NAA و در ریزنمونه هیپوکوتیل بد ست آمد. بیشترین درصد باززایی مستقیم (۷۳٪) و غیر مستقیم (۸۰٪) در محیط MS و ترکیب هورمونی ۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۴ میلی گرم در لیتر BAP در ریزنمونه هیپوکوتیل و کالوس حاصل از هیپوکوتیل مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: این آزمایش مشخص نمود که ریزنمونه هیپوکتیل مناسب جهت کالوس زایی و باززایی در زوفا می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: کالوس، زوفا، تنظیم کننده رشد گیاهی، محیط کشت MS

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: مروتی صبا، زبرجدی علیرضا، بهرامی‌نژاد صحبت، نجفی عبداله (۱۴۰۰) اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی گیاه دارویی زوفا (*Hyssopus officinalis*) در شرایط درون شیشه‌ای. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۳)، ۱۸۷-۲۰۴.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

زوفا (*Hyssopus officinalis*)، گیاهی خشبی، چند ساله، متعلق به خانواده نعناعیان با منشأ آسیای صغیر است. میزان اسانس در پیکره رویشی زوفا بین ۰/۳ تا ۱ درصد است و در برخی منابع ۰/۱ تا ۱/۸ درصد گزارش شده است (Dzhumaevkh 1986). مهم‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس، پینوکامفن (۵۰٪)، آلفا و بتا پینن، کامفن و الکل‌های سزکویی ترپنی می‌باشد. پیکره رویشی همچنین حاوی فلاونوئید، تانن (۵ تا ۸ درصد)، مواد تلخ (۳ تا ۶ درصد) و مواد دیگری مانند دیوزمین، هیسوپین و ترکیبات موسیلاژی است (Bernath 1993). کاربرد تکنیک کشت بافت و افزایش راندمان باززایی گیاهان دارویی می‌تواند نتایج امیدوار کننده‌ای را در تولید داروهای گیاهی با کیفیت و کمیت بالا ایجاد کند (Van Ech and Kitto 1992). عوامل مختلفی مانند محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشدی و غیره در میزان کالزایی و باززایی گیاهان مؤثر است (Alizadeh and

www.SID.ir

Hosseini 2013). نتایج بررسی‌ها در گیاه دارویی اسطوخدوس نشان داد که ریزنمونه هیپوکوتیل بهترین کالوس را در حضور تنظیم‌کننده رشد اکسینی تولید کرده است (Zhang et al. 2008). همچنین مطالعه کال‌زایی زوفا نیز برتری ریزنمونه هیپوکوتیل را در تولید کالوس مشخص کرده است (Zebarjadi et al. 2012). بررسی جنس‌های خانواده نعناعیان و تحقیق بر روی نعناع فلفلی مشخص کرد که این گیاه بیشترین کالوس‌زایی را در غلظت‌های بالا NAA و IAA (۴ میلی‌گرم در لیتر) و غلظت‌های متوسط 2,4-D (۲ میلی‌گرم در لیتر) دارد (Ebrahimi 1996). از بررسی‌های انجام شده بر روی گیاهان هم‌خانواده زوفا می‌توان نتیجه گرفت که NAA به‌عنوان یک اکسین قوی، نقش بسزایی در کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها ایفا می‌کند و ترکیب این اکسین با اکسینی دیگر می‌تواند در افزایش بهینه کال‌زایی موثر واقع شود. به‌منظور باززایی غیر مستقیم زوفا، بین غلظت‌های مختلف هورمون BAP، تنها محیط MS حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP توانست کالوس‌های حاصل از برگ زوفا را باززا کند و سایر تیمارهای مورد استفاده از سبز روشن به سبز تیره تغییر رنگ داده و کالوس‌ها بدون اینکه تولید نوساقه نمایند به‌صورت کالوس باقی ماندند (Zebarjadi et al. 2012). همچنین بررسی باززایی غیر مستقیم گیاه مرزه سهندی در حضور غلظت‌های مختلف BA (۰، ۲، ۴، ۵، ۶ و ۸ میلی‌گرم در لیتر)، مشخص کرد که بیشترین باززایی حاصل از کالوس در سطح ۵ میلی‌گرم در لیتر به وقوع پیوست (Bahmani et al. 2016). گزارش شده است که بین غلظت‌های متفاوت تنظیم‌کننده رشد IAA و BA در ریشه‌زایی گیاه زوفا، بیشترین درصد ریشه‌زایی (۹۰٪) مربوط به تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA بوده است (Nanova et al. 2007). بررسی اثر نوع توده و تیمار تنظیم‌کننده رشد BAP بر باززایی مستقیم زوفا مشخص کرد که بیشترین میزان باززایی در توده مشهد (۸۶٪) با ۲/۲ میکرومولار BAP ایجاد شده است (Alizadeh and Hosseini 2013). در مطالعه‌ای که بر روی تولید کالوس دو گونه زوفا (*H. officinalis* and *H. angustifolius*) تحت تاثیر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی انجام شد، نتایج نشان داد که در هر دو گونه بهترین محیط تولید کالوس محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA می‌باشد (Tayefeh et al. 2018). در گزارشی سه نوع ریزنمونه (برگ، هیپوکوتیل و ریشه) زوفا از نظر تولید کالوس در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D، NAA و BA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین میزان تشکیل کالوس (۳۳ درصد) در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به‌علاوه ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ریزنمونه هیپوکوتیل حاصل گردید (Soheili et al. 2021). در پژوهشی تاثیر ترکیبات مختلف غذایی محیط کشت بر تولید متابولیت‌های ثانویه (نظیر محتوی ساپونین‌ها و ترکیبات فنولی) و همچنین فعالیت آنتی اکسیدانت‌ها کالوس زوفا مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق از دو نوع محیط کشت B5 و MS حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی 2,4-D، NAA، Kin، IAA و BA استفاده شد که نتایج نشان از برتری محیط کشت MS نسبت به B5 داشت. حداکثر تولید ترکیبات فنلی و ساپونین‌ها در محیط کشت MS تکمیل شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin به‌علاوه ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA گزارش گردید و در مورد فعالیت آنتی اکسدانت‌ها بیشترین میزان مربوط به تیمار شاهد بود (Babich et al. 2021). این

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش به‌منظور ارزیابی فاکتورهای موثر در کال‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای و دستیابی به محیط بهینه تکثیر زوفا در شرایط درون شیشه‌ای انجام گردید.

مواد و روش‌ها

بذور مورد استفاده در این پژوهش از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و تحقیقات، در طول سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۳ در آزمایشگاه کشت بافت گروه اصلاح نباتات دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی دانشگاه رازی انجام گردید. به‌منظور ضد عفونی بذور زوفا، از اتانول ۷۰٪ به‌مدت یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ به‌مدت زمان ۱۵ دقیقه استفاده گردید. سپس بذور بوسیله آب مقطر استریل در سه مرحله ۱، ۳ و ۵ دقیقه شستشو داده شدند (Zebarjadi et al. 2012). پس از کشت بذور در محیط کشت MS، شیشه‌های حاوی بذور در اتاقک‌های رشد با شرایط دمای روز ۲±۲۵ و دمای شب ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، نور سفید فلورسنت و فتوپریود ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. برای آزمایش القای کالوس در گیاه دارویی زوفا از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با فاکتورهای، ریزنمونه (برگ و هیپوکوتیل) و تنظیم‌کننده رشد NAA (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) در شرایط روشنایی و در سه تکرار استفاده شد. ریزنمونه‌های تهیه شده از گیاهان ۳۰ روز رشد یافته در شرایط *in vitro* بر روی محیط کشت MS بدست آمدند. پس از گذشت یک ماه از کشت ریزنمونه‌ها، صفات سرعت رشد نسبی، وزن تر و خشک، قطر، رنگ و ساختار فیزیکی و درصد القای کالوس ثبت شد. به‌منظور اجرای آزمایش باززایی مستقیم و غیر مستقیم، تنظیم‌کننده رشد گیاهی (NAA) از گروه اکسین‌ها و (BAP) از گروه سیتوکنین‌ها در غلظت‌های مختلف در محیط پایه MS مورد استفاده قرار گرفتند. این پژوهش در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح CRD و حضور تنظیم‌کننده رشد NAA در دو غلظت (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP در دو غلظت (۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و دو ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل انجام شد و صفت درصد باززایی پس از گذشت حدود سه ماه یادداشت برداری شد.

تجزیه و تحلیل: این پژوهش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. تجزیه آماری داده‌ها توسط نرم افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت.

نتایج و بحث

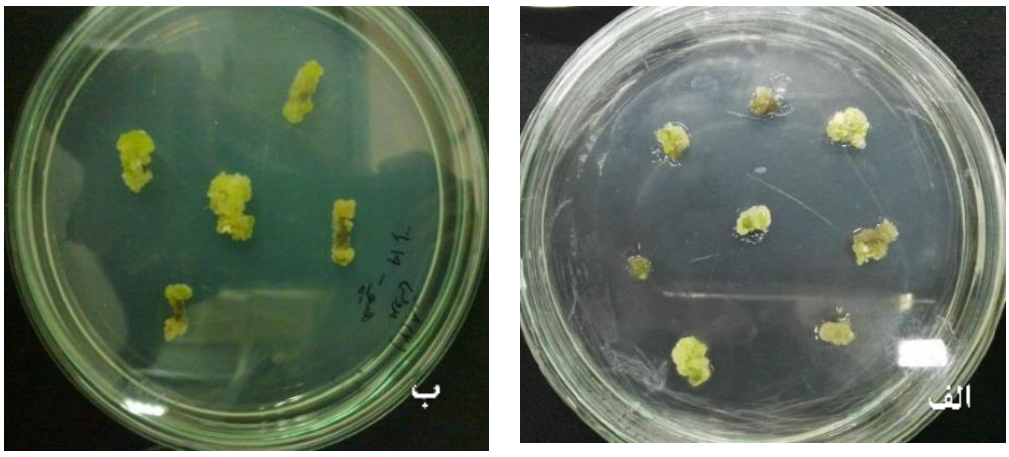
جوانه‌زنی بذور: یک هفته پس از کشت بذور، جوانه‌زنی شروع گردید. هرچند میزان جوانه‌زنی بذور بالا بود اما رشد و توسعه جوانه‌های تشکیل شده ضعیف بود و پس از ۳۰ روز به اندازه مورد نظر برای تهیه ریز نمونه رسیدند.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش القای کالوس: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های کالوس در جدول (۱) نشان داده شده است. طبق نتایج به‌دست آمده در ارتباط با صفت درصد القای کالوس، دو فاکتور سطوح تنظیم‌کننده رشد و نوع ریزنمونه تأثیر بسیار معنی‌داری بر روی این صفت داشتند و اثر متقابل آن‌ها نیز معنی‌دار شد. نوع ریزنمونه، سطوح تنظیم‌کننده رشد و اثر متقابل این دو در مورد صفت سرعت رشد نسبی کالوس تأثیر بسیار معنی‌داری داشتند. در رابطه با صفت وزن تر و خشک کالوس، سطوح تنظیم‌کننده رشد و نوع ریزنمونه، تأثیر بسیار معنی‌دار و اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار شد. در مورد صفت قطر کالوس نیز، اثر متقابل سطوح تنظیم‌کننده رشد و نوع ریزنمونه بسیار معنی‌دار شد. تصاویر کالوس‌های حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ در شکل (۱) ارائه گردیده است.



شکل۱. کالوس حاصل از ریزنمونه (الف) برگ و (ب) هیپوکوتیل

Figure 1. Callus derived from leaf explant (A) and hypocotyl explant (B)

نتایج مقایسه میانگین برای صفات کال‌زایی: نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تیمارها برای صفات کالوس‌دهی در شکل‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ گزارش شده است. در مورد صفت درصد القای کالوس، اثر متقابل دو فاکتور ریزنمونه و سطوح NAA در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد و بین دو ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌داری از نظر تأثیر بر روی این صفت وجود داشت. همچنین سطوح ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، بهترین غلظت‌ها برای تولید کالوس هیپوکوتیل بودند گرچه با سطح ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA اختلاف معنی‌داری نداشتند. بیشترین درصد القای کالوس برگ (۷۳/۳۳٪) در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و هیپوکوتیل (۱۰۰٪) در سطح ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA می‌باشد (شکل ۲). تفاوت میان ریزنمونه برگی و هیپوکوتیلی در پاسخ به غلظت‌های NAA در محیط ممکن است منعکس کننده تفاوت احتمالی از سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد درونی یا حساسیت بافت‌های مختلف به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی باشد (Lisowska and Wysokinska 2000). برتری ریزنمونه هیپوکوتیل نسبت به دو ریزنمونه برگ و ریشه در تشکیل کالوس در زوفا توسط محقیقن دیگر نیز گزارش شده است (Soheili et al. 2021) که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. برای صفت سرعت رشد نسبی، بین دو ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل

www.SID.ir

Archive of SID

در سه سطح ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و سرعت رشد نسبی کالوس بین ۱۶ تا ۲۲ درصد بود. در حالیکه بین دو ریزنمونه (برگ و هیپوکوتیل) در محیط فاقد NAA از نظر سرعت رشد نسبی کالوس اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۳).

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس تاثیر ریزنمونه و سطوح تنظیم‌کننده های رشد گیاهی بر صفات مختلف کالزایی زوفا

Table 1. Results of ANOVA effect of explant and levels of plant growth regulators (PGRs) on different callogenesis traits of Hyssop

		میانگین مربعات				
منابع تغییرات Source of Variation	درجه آزادی Degree of Freedom	درصد کالوس Callus %	قطر کالوس Callus Diameter (mm)	وزن تر کالوس Callus Wet Weight (g)	وزن خشک کالوس Callus Dry Weight (g)	سرعت رشد نسبی کالوس Relative Growth Rate of Callus
سطوح تنظیم‌کننده رشد (NAA)	3	5000**	0.8481**	0.1501**	0.0057**	0.0199**
ریزنمونه (Explant)	1	17066**	1.95**	0.3398**	0.0135**	0.0303**
سطوح تنظیم‌کننده رشد *ریزنمونه (Explant × NAA)	3	1200*	0.9382**	0.0302*	0.0017*	0.0261**
خطا Error	16	266.76	0.0372	0.0059	0.0003	0.0033
ضریب تغییرات (CV%) Coefficient of Variation		27.99	20.50	24.33	29.12	42.47

***و** معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد به ترتیب**

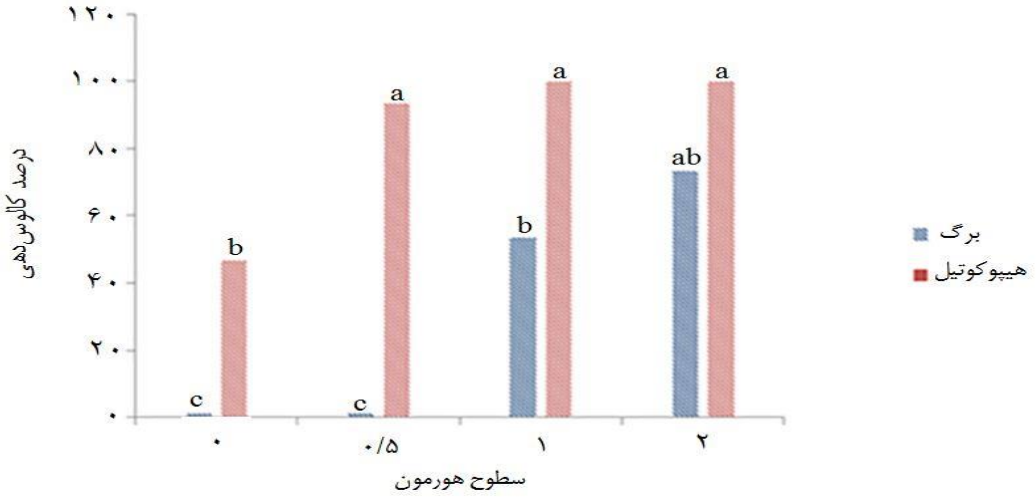
*** and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively**

مقایسه میانگین: صفت قطر کالوس نشان می‌دهد که بین دو ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل در دو سطح ۰ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در سطح احتمال ۱٪ اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد. ریزنمونه هیپوکوتیل دارای بیشترین قطر کالوس (۲ میلی‌متر) بود. اما بین این دو ریزنمونه در سطوح ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. اثر متقابل دو فاکتور ریزنمونه

www.SID.ir

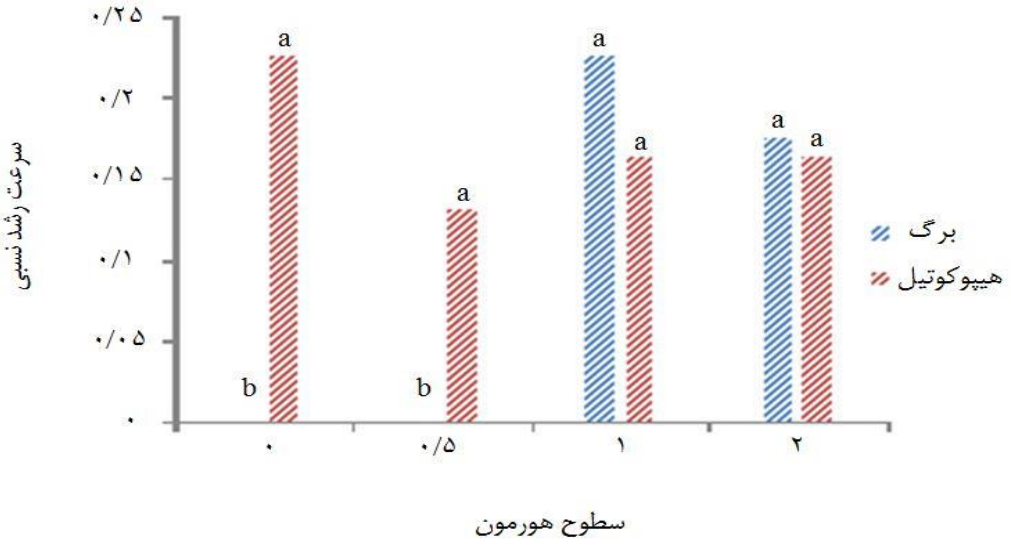
Archive of SID

و سطوح NAA در سطح احتمال ۱٪ بسیار معنی‌دار شده است (شکل ۴). مقایسه میانگین صفت وزن تر و خشک کالوس نشان داد که بین دو ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل تفاوت معنی‌دار وجود دارد، بیشترین وزن تر و خشک کالوس، مربوط به هیپوکوتیل می‌باشد و بین سطوح مختف NAA، بیشترین وزن کالوس در سطوح ۲ میلی‌گرم در لیتر رخ داد. البته بین سطوح ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر برای ریزنمونه هیپوکوتیل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل‌های ۵ و ۶).



شکل ۲. اثر متقابل ریزنمونه در سطوح مختلف NAA برای صفت درصد القای کالوس

Figure 2. Interaction of explant and different levels of NAA on percentage of callus induction trait

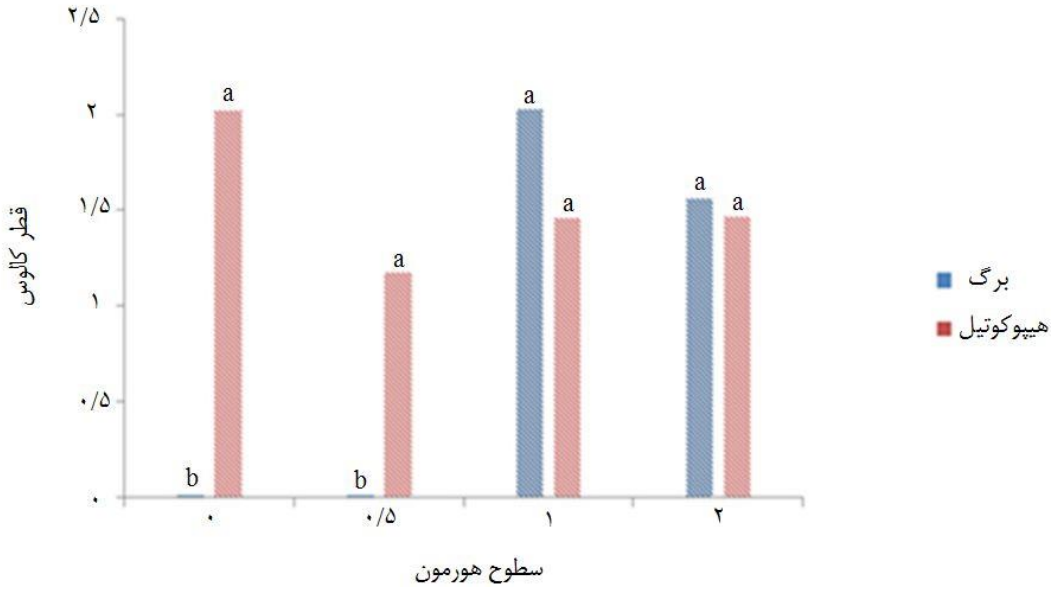


شکل ۳. اثر متقابل ریزنمونه در سطوح مختلف NAA برای صفت سرعت رشد نسبی کالوس

Figure 3. Interaction of explant and different levels of NAA on relative growth rate of callus trait

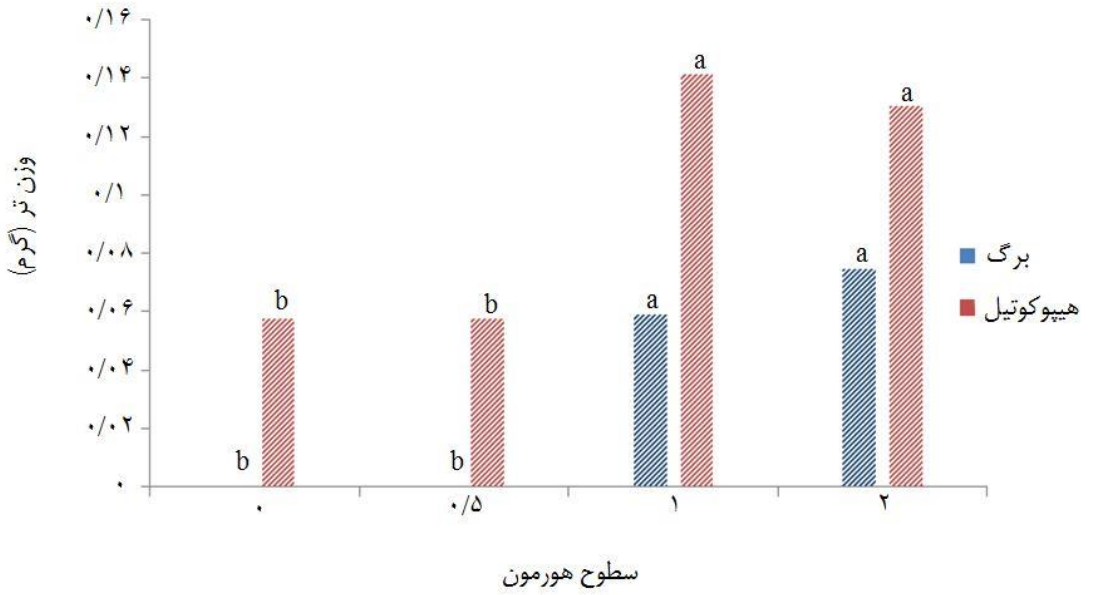
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤. اثر متقابل ریزنمونه در سطوح مختلف NAA برای صفت قطر کالوس

Figure 4. Interaction of explant and different level of NAA on callus diameter trait

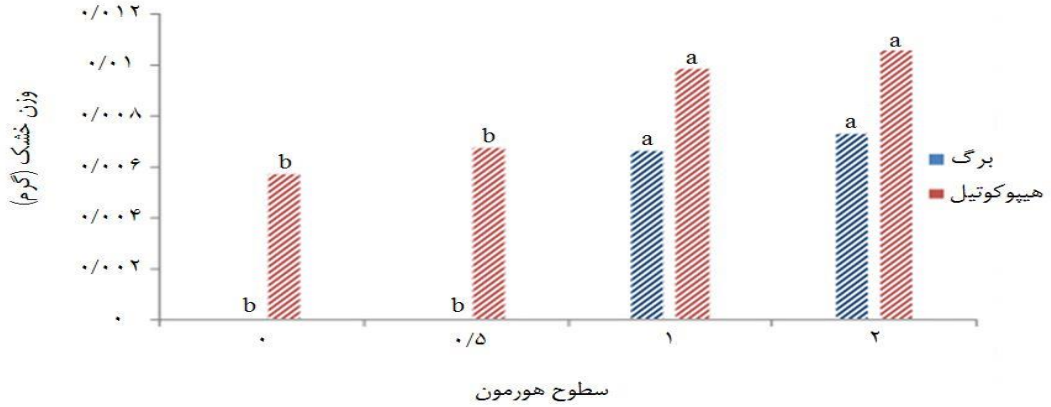


شکل ٥. اثر متقابل ریزنمونه در سطوح مختلف هورمون NAA برای صفت وزن تر کالوس

Figure 5. Interaction of explant and different levels of NAA on callus fresh weight

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٦. اثر متقابل ریزنمونه در سطوح مختلف NAA برای صفت وزن خشک کالوس

Figure 6. Interaction of explant and different levels of NAA on callus dry weight

آزمایش باززایی غیر مستقیم: نتایج تجزیه واریانس باززایی غیرمستقیم در جدول (۲) نشان داده شده است. در این مرحله جنین و نوساقه‌های اولیه تشکیل گردید اما ریشه‌زایی اتفاق نیفتاد و تجزیه‌ها بر مبنای همین مشاهدات انجام گرفت. تصاویر جنین‌های تشکیل شده از کالوس حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ در شکل (۷) ارائه گردیده است. طبق جدول (۲) اثر متقابل ریزنمونه، NAA و BAP در سطح ۱٪ برای درصد باززایی غیر مستقیم معنی‌دار شده است.

جدول۲. تجزیه واریانس صفت درصد باززایی غیر مستقیم در زوفا

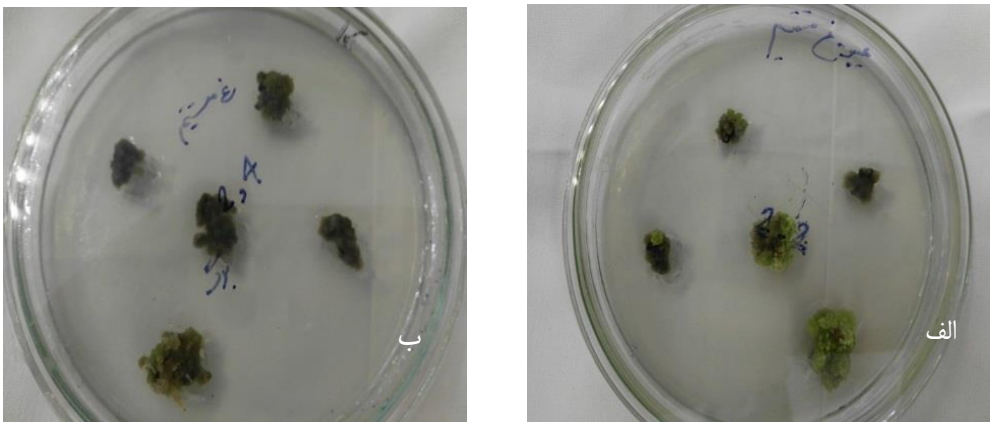
Table 2. Analysis of variance for percentage of indirect regeneration in Hyssop

منابع تغییرات (SOV)	درجه آزادی(df)	میانگین مربعات (MS)
ریزنمونه (A) Explant	1	1666**
(B) NAA	1	2400**
(C) BAP	1	4266**
A×B	1	0ns
A×C	1	266.6**
B×C	1	66.66*
A ×B × C	1	600**
خطا Error	16	233.3
ضریب تغییرات (CV)٪ Coefficient of Variation		27.7

****نشاندهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ **: Significant at 1% probability level**

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷. جنین‌های ایجاد شده در باززایی غیرمستقیم ریزنمونه (الف) هیپوکوتیل و (ب) برگ زوفا

Figure 7. Embryos inducted in indirect regeneration (A) hypocotyl and (B) leaf of Hyssop

نتایج مقایسه میانگین صفت درصد باززایی غیرمستقیم: مقایسه میانگین تأثیر ترکیبات مختلف NAA و BAP روی صفت درصد باززایی غیرمستقیم ریزنمونه‌های کالوس حاصل از برگ و هیپوکوتیل زوفا در جدول (۳) نشان می‌دهد که بالاترین درصد باززایی غیرمستقیم در کالوس حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل با استفاده از ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و۴ میلی‌گرم در لیتر BAP به میزان ۸۰ درصد بود، بیشترین درصد باززایی غیر مستقیم کالوس حاصل از برگ نیز در سطح ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌میزان ۷۳/۳۳ درصد بود که بین دو ریزنمونه در این ترکیبات اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

گرچه ترکیب ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP برای ریزنمونه هیپوکوتیل اختلاف معنی‌داری با ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP نداشته است اما با توجه به اینکه هدف ما بهینه‌سازی و معرفی بهترین ترکیب هورمونی می‌باشد، ترکیب ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP پیشنهاد می‌گردد. کاربرد همزمان BAP با یکی از ترکیبات اکسینی بهترین پاسخ را از نظر تولید شاخه‌های متعدد پدید می‌آورد (Praveena et al. 2012). در تحقیقات صورت گرفته، علت همگرایی اکسین با سیتوکینین در تقسیم سلولی این‌طور عنوان شده است که اولاً برای تقسیم سلولی ابتدا باید بزرگ شدن سلول اتفاق بیافتد و به دنبال آن تقسیم سلولی انجام بگیرد و تا زمانیکه سلول به یک اندازه مشخص نرسیده است، تقسیم صورت نخواهد گرفت. ثانیاً مراحل اولیه تقسیم سلولی نیازمند به اثر اکسین است (Wang et al. 1981; Bayliss 1985).

www.SID.ir

همچنین نسبت سیتوکینین به اکسین بسیار مهم است و در باززایی نقش مهمی ایفا می‌کند، و نسبت اکسین پایین و سیتوکینین بالا را برای شاخه‌زایی لازم دانستند (George and Deburgh 2008).

جدول ۳. تاثیر ترکیبات مختلف NAA و BAP روی صفت درصد باززایی غیر مستقیم حاصل از کالوس ریزنمونه های برگ و هیپوکوتیل زوفا

Table 3. Effect of different combination of NAA and BAP on percentage of indirect regeneration of callus derived from leaf and hypocotyl explants

تیمارها Treatments	تنظیم‌کننده‌های رشد PGRs (mg/l)		درصد باززایی غیرمستقیم ریزنمونه‌ها % Indirect regeneration of explants	
	NAA	BAP	برگ (Leaf)	هیپوکوتیل (Hypocotyl)
1	1	2	33.33 b	33.33 b
2	1	4	40 b	73.33 a
3	2	2	40 b	60 ba
4	2	4	73.33 a	80 a

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری با هم ندارند

The means with the same letter in each column do not have significant difference

نتایج تجزیه واریانس صفت درصد باززایی مستقیم: نتایج تجزیه واریانس باززایی مستقیم در جدول (۴) نشان داده شده است. این جدول نشان می‌دهد که اثر متقابل ریزنمونه، NAA و BAP در سطح ۱٪ برای درصد باززایی معنی‌دار شده است. در این مرحله از آزمایش نیز مانند باززایی غیر مستقیم، شاخساره و ریشه زایی ایجاد نشد. و فقط جنین و نوساقه‌های اولیه مشاهده شد. آنالیزها نیز بر اساس همین مشاهدات انجام گرفت.

نتایج مقایسه میانگین آزمایش باززایی مستقیم: نتایج مقایسه میانگین ترکیبات مختلف NAA و BAP روی صفت درصد باززایی مستقیم حاصل از ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل زوفا در جدول (۵) ارائه گردید.

www.SID.ir

جدول ٤. تجزیه واریانس صفت درصد باززایی مستقیم در زوفا

Table 4. Analysis of variance for percentage of direct regeneration in Hyssop

منابع تغییرات (SOV)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
ریزنمونه (A) Explant	1	416.6**
(B) NAA	1	1350**
(C) BAP	1	7350**
A×B	1	150 **
A×C	1	816**
B×C	1	150**
A ×B × C	1	1350**
خطا Error	16	100
ضریب تغییرات (CV)٪ Coefficient of Variation		18.7

نشاندهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ **: Significant at 1% probability level

جدول ۵. تاثیر ترکیبات مختلف NAA و BAP روی صفت درصد باززایی مستقیم حاصل از ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل زوفا

Table 5. Effect of different combination of NAA and BAP on percentage of direct regeneration from leaf and hypocotyl explants of Hyssop

تیمارها Treatments	تنظیم‌کننده‌های رشد PGRs (mg/l)		درصد باززایی غیرمستقیم ریزنمونه‌ها % direct regeneration of explants	
	NAA	BAP	برگ (Leaf)	هیپوکوتیل (Hypocotyl)
1	1	2	0 c	6.67 c
2	1	4	33.33 b	33.33 b
3	2	2	20 bc	6.67 c
4	2	4	33.33 b	73.33 a

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری با هم ندارند

The means with the same letter in each column do not have significant difference

www.SID.ir

مقایسه میانگین تأثیر ترکیبات مختلف NAA و BAP روی صفت درصد باززایی مستقیم ریزنمونه‌های برگ و ساقه زوفا در جدول (۵) نشان می‌دهد که بالاترین درصد باززایی مستقیم در کالوس حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل با استفاده از ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۴ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌میزان ۷۳ درصد بود. می‌توان گفت بین سایر ترکیبات تنظیم‌کننده رشدی و ریزنمونه‌ها اختلاف چندانی وجود ندارد. نتایج در این آزمایش نشان می‌دهد که در محیط‌هایی با غلظت کم‌تر BAP باززایی چندانی صورت نگرفته و این نشان‌دهنده نقش مشخص سیتوکینین‌ها در قابلیت تحریک، تکثیر و تقسیم سلولی در بافت‌های ریزنمونه مورد کشت و در نتیجه تشکیل اندام در بافت‌های تیمار شده می‌باشد و تنظیم‌کننده رشد اکسینی بدون توجه به غلظت سیتوکینین‌ها تاثیری در پرآوری شاخساره ندارند (Roberson et al. 2005). نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد که برای القای ریشه‌زایی، استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی در کنار سیتوکینین ضروری می‌باشد. گزارش شده است که سیتوکینین‌ها نقش اساسی در تقسیم سلولی داشته و باعث رفع غالبیت انتهایی شده و بر القای شاخساره و رشد شاخساره اثر می‌گذارد (Precce 1995)، همچنین استفاده از تنظیم‌کننده رشد اکسین باعث باززایی گیاهچه و تشکیل کالوس شده و در ترکیب با تنظیم‌کننده رشد سیتوکینینی باعث سریع‌تر شدن سرعت تقسیم سلولی و در نهایت باعث تشکیل تعداد زیادی سلول‌های کوچک و تمایز نیافته می‌شود (Mendoza and Kaeppler 2002) طبق بررسی‌های صورت گرفته نسبت اکسین به سیتوکینین در باززایی بسیار مهم است. با کاهش اکسین و افزایش سیتوکینین در بعضی گونه‌ها، جوانه‌ها تشکیل می‌شود. بنابراین با تغییر مقدار دو تنظیم کننده رشد در محیط کشت، می‌توان قدرت ریخت‌زایی در ریز نمونه‌ها را به‌میزان قابل توجهی کنترل نمود. مشخص شده است که تنظیم‌کننده‌های رشد اثر متقابل روی یکدیگر داشته و می‌توانند اثرات همدیگر را بهبود بخشند (Del Poza et al. 2005). پژوهش‌ها بیانگر این نکته هستند که توانایی باززایی نوساقه در شرایط درون شیشه‌ای یک فرآیند ژنتیکی است (Stang et al. 1999). در واقع باززایی گیاه از کشت بافت یک پدیده مورفوژنتیکی پیچیده است که عوامل خارجی و داخلی نقش مهمی را در آن ایفا می‌کنند. در بیشتر موارد ماهیت فاکتورهای درگیر در مسائل آزمایشگاهی هنوز کاملاً مشخص نشده است. ولی گونه‌ها نه تنها از نظر پاسخ به محیط‌های کشت متفاوت با هم فرق می‌کنند بلکه پاسخ آن‌ها به یک محیط کشت در مراحل مختلف رشد نیز متفاوت است (Aba et al. 1996; Gholizadeh 2009).

نتیجه‌گیری: این آزمایش مشخص نمود که ریزنمونه هیپوکتیل مناسب جهت کالوس زایی و باززایی در زوفا می‌باشد.

سپاسگزاری: از معاونین محترم پژوهشی و آموزشی دانشگاه رازی به خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

www.SID.ir

منابع

ابراهیمی منصور (۱۳۷۵) رویان‌زایی در گیاه نعناع و تعیین مقدار منتول در نمونه‌های کشت آزمایشگاهی. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت معلم.

بهمنی هلیا، معروفی اسعد، فاخری براتعلی، مجدی محمد (۱۳۹۵) بررسی تولید کالوس و باززایی غیر مستقیم گیاه دارویی مرزه سهندی (*Satureja sahendica* Bornm). بیست و چهارمین کنگره بین المللی و کنگره ملی ژنتیک ایران. ۵-۱.

زبرجدی علیرضا، کهریزی دانیال، ملصقی مژگان (۱۳۹۱) بررسی کال‌زایی و باززایی در گیاه دارویی زوفا (*Hyssopus officinalis* L.). گزارش نهایی طرح پژوهشی. دانشگاه رازی.

سهیلی شهاب، میری سید مهدی، قاضی‌جهانی نوشین (۱۴۰۰). القاء کالوس از کشت‌های درون شیشه‌ای برگ، هیپوکتیل و ریشه زوفا (*Hyssopus officinalis*). اولین همایش ملی کاربرد پژوهش‌های نوین شیمی و کشاورزی در توسعه گیاهان دارویی. نهاوند. ایران. ۴-۱.

قلی‌زاده جعفر (۱۳۸۸) بررسی اثرات تیمارهای هورمونی در رشد و تکوین قطعات جداکشت برگ و ریشه اسپند (*Peganum harmala*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم گیاهی گرایش سلولی-تکوینی. دانشگاه تبریز.

References

Abe T, Kudo M, Oka Y, et al. (1996) Changes in α-amylase activity during plant regeneration from rice calli. J Plant Physiol 146, 592-598.

Alizadeh M, Hosseini B (2013) Study of the effect of population and BAP hormonal treatments on in vitro regeneration of medicinal plant (*Hyssopus officinalis*). J Horticul Sci 27 (2), 201-207.

Babich O, Sukhikh S, Pungin A, et al. (2021) Evaluation of the conditions for the cultivation of callus cultures of *Hyssopus officinalis* regarding the yield of polyphenolic compounds. Planta 10(915): 1-10.

Bahmani H, Maroufi A, Fakherei B, Majdi M (2016) Study of callogenesis and Indirect regeneration in Sahandi Savory (*Satureja sahendica* Bornm). 24th Int Iran Genet Cong 1-5 (In Persian).

Bayliss M (1985) Control of cell division in cultured cells. In: Bryant JA and Francis D (eds). The cell division cycle in plants. Cambridge: Cambridge University Press 157-178.

Bernath J (1993) Cultivation Medicinal Plant. Mezo. Publication. Budapest 566p.

Del-Poza J C, Lopez-Matas M A, Ramirez-Parra E, Gutierrez C (2005) Hormonal control of the plant cell cycle. Physiol Plantarum 123, 173-183.

www.SID.ir

Dzhumaevkh K (1986) Dynamic of essential oil accumulation in *Hyssopus seravschanicus*. Pro Nat Acad Sci 6, 31-33.

Ebrahimi M (1996) Embryogenesis in peppermint plant and determine the amount of menthol in laboratory cultures. M.Sc. thesis. Tarbiat Moallem University (In Persian).

George E. F, Deburgh P. C (2008) Micropropagation: Uses and methods. Plant Propagation by Tissue Culture 1, 29-64.

Gholizadeh J (2009) Study of the effects of hormonal treatments on the growth and development of root and leaf explants of *Pegaum harmala*. Cellular and Developmental M.Sc. Thesis. Tabriz University (In Persian).

Lisowska K, Wysokinska H (2000) In vitro propagation of *Catalpa ovate* G. Don. Plant Cell Tissue Organ Culture 60, 171-176.

Mendoza M G, Kaeppler H F (2002) Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration Frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). In vitro cell Develop Biol Plant 38, 39-45.

Nanova Zh, Slavova Y, Nenkova D, Ivanova I (2007) Microclonal Propagation of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). Bulgar J Agric Sci 13, 213-219.

Praveena R, Amarnath-Pandian S, Jegadeesan M (2012) *In vitro* culture studies on medicinal herb - *Coleus forskohlii* Briq. Libyan Agric Res Center J 3(1), 30-35.

Preece JY (1995) Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator? Plant Tissue Culture Biotechnol 1, 26-37.

Roberson D, Cristiane L, Francine L, et al. (2005) Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis*. Sci Agric 62, 406-412.

Soheili Sh, Miri SM, Ghazijahani N (2021) Callus induction from *In vitro* cultured leaf, hypocotyl and root of *Hyssopus officinalis*. The First national conference on the applications of advanced chemical and agricultural research for development of medicinal plants. 1-4. Nahavand, Iran (In Persian).

Stang C, Prehn D, Gebauer M (1999) Optimization of *in vitro* culture conditions for *Pinus radiat* embryos and histological characterization of regeneration shoots. Biol Res 32, 19-28.

Tayefeh S, Mahna N, Kazemitabar S. K, Ghasemi-Omran V (2018) Callogenesis induction in two Hyssopus species (*H. officinalis* and *H. angustifolius*) using different hormonal levels and culture media. J Medic Plant Biotechnol 3(2), 29-39.

Van Ech J M, Kitt S L (1992) Regeneration of peppermint and orange mint from leaf disks. Plant Cell Tissue Organ Culture 30, 41-49.

Wang T L, Everett N P, Gould A R, Street H P (1981) Study on the control of the cell cycle in cultured plant cells. The effects of cytokinin. Protoplasma 106, 23-35.

www.SID.ir

Zebarjadi A, Kahrizi D, Molsaghi M (2012) Study of callus induction and regeneration of medicinal plant (*Hyssopus officinalis* L.). The final report of the research project. Razi university (In Persian).

Zhang Y, Gao Y, Wang W, Yao L (2008) Callus Induction and Plantlet Regeneration of *Lavandula angustifolia* 'Munstead'. J Shanghai Jiaotong Univy (Agric Sci).

www.SID.ir