Archive of SID

دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۶، صفحه ۹۶۷-۹۵۸ (۱۳۹۵)

# بررسی کال‌زایی و باززایی گیاه دارویی آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak.)

مریم پیروز[۱]، حمزه امیری[۲*] و بهروز دوستی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

پست الکترونیک: amiri_h_lu@yahoo.com

۳- استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خرم‌آباد، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۳ تاریخ اصلاح نهایی: فروردین ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۵

## چکیده

آویشن دنایی با نام علمی *Thymus daenensis* Celak.، گیاهی از تیره نعناعیان و از گونه‌های اندمیک جنس آویشن در ایران می‌باشد. با وجود نیاز روزافزون برای تکثیر انبوه این گیاه به‌دلیل وجود انواع متابولیت‌های ثانویه مفید، اطلاعات کمی در مورد روش‌های ازدیاد آن وجود دارد. در این تحقیق برهم‌کنش بعضی از تیمارهای هورمونی به‌منظور ایجاد کشت درون شیشه برای کال‌زایی و ریزازدیادی گیاه آویشن دنایی در محیط کشت MS با غلظت‌های مختلف از هورمونهای اندول‌استیک اسید (IAA)، بنزیل آمینوپورین (BAP)، کینتین (Kin) و در حضور یا عدم حضور آسکوربیک اسید (AS) بررسی شد. نتایج نشان داد که شاخص کالوس، وزن تر و وزن خشک در قطعات میان‌گره‌ای نسبت به قطعات مریستم رأسی مناسب‌ترند. باززایی گیاه از کالوس بدست آمده از جداکشت‌های مریستم رأسی و میان‌گره‌ای واجد اختلاف معنی‌داری بوده و بهترین ترکیب‌های هورمونی برای باززایی گیاه شامل NAA-Kin به‌ترتیب با غلظت (۴/۵-۱/۵) و NAA-BAP به‌ترتیب با غلظت‌های (۶-۹) میلی‌گرم بر لیتر بود. تولید کالوس در قطعات میان‌گره‌ای اختلاف معنی‌داری نسبت به مریستم رأسی نشان داد و در ترکیب هورمونی Kin-NAA (۹-۳) میلی‌گرم بر لیتر و NAA-BAP (۶-۹) میلی‌گرم بر لیتر در حضور آسکوربیک اسید بهترین تراکم تولید کالوس بدست آمد. در مجموع از میان تیمارهای بکار برده شده، تیمار شاهد و تیمارهای هورمونی NAA و Kin اثرات مطلوب‌تری بر باززایی داشته و نیز کال‌زایی در قطعات میان‌گره‌ای بهتر انجام شده است.

**واژه‌های کلیدی:** آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak.)، کشت بافت، آسکوربیک اسید، کال‌زایی، باززایی.

## مقدمه

گیاهان دارویی از هزاران سال پیش به‌عنوان یکی از مهمترین منابع دارویی کاربرد داشته‌اند. فناوری زیستی با استفاده از راهکارهایی مانند کشت سلول‌ها، اندام‌ها، بافت‌ها، مهندسی ژنتیک و کاربرد نشانگره‌ای مولکولی قادر است کارایی و بهره‌وری گیاهان دارویی را به‌عنوان منابعی برای تولید دارو افزایش دهد. البته کشت سلول، بافت‌ها و اندام‌های گیاهی امکان تکثیر سریع و انبوه بسیاری از گیاهان دارویی مهم را فراهم کرده است (امیدی و فرزین، ۱۳۸۸).

www.SID.ir

Archive of SID

کشت بافت در واقع نوعی تکثیر غیرجنسی در محیط شیشه می‌باشد که منجر به تولید انبوه گیاه با محتوای ژنتیکی یکسان و کیفیت یکنواخت در زمانی کوتاه و فضای نسبتاً محدودی می‌شود. از مهمترین روش‌های تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان ریزازدیادی، اندام‌زایی از طریق کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی است. کشت بافت‌ها و اندام‌های گیاهی امکان تولید متابولیت‌های ثانویه را در شرایط شیشه فراهم می‌سازد و از طرفی استفاده از این راهکارها، راه حلی مناسب برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (امیدی و فرزین، ۱۳۸۸).

آویشن یکی از جنس‌های مهم خانواده نعناعیان است که دربرگیرنده تقریباً ۲۱۵ گونه علفی پایا و درختچه‌ای کوچک در دنیاست و ۱۴ گونه مختلف از این جنس در بخش‌های مختلف کشور ایران رویش دارند. علاوه‌بر ایران در آناتولی، ماورای قفقاز، عراق، ترکمنستان و تالش نیز رشد می‌کنند (مظفریان، ۱۳۷۶).

یکی از گونه‌های مهم آویشن، آویشن دنایی است با ساقه‌ای کوتاه که در پایین کاملاً چوبی است. ارتفاع گل‌دهنده حداکثر ۳۰ سانتی‌متر است. طول برگ از ۵/۹ تا ۱۶ و عرض برگ از ۴/۲ تا ۴ میلی‌متر است. برگها ممکن است به‌صورت همپوش یا کوتاه‌تر از میان‌گره‌ها باشند. موسم گلدهی آن خرداد تا تیر می‌باشد (اکبری‌نیا و میرزا، ۱۳۸۷). این گیاه در مناطق مختلف کشور به‌ویژه در شمال و غرب پراکنده است. این گونه دارای درصد بالایی از ترکیب‌های فنولی مخصوصاً تیمول (۴۷/۷٪) است که می‌تواند کاربرد وسیعی در مصارف دارویی داشته باشد. آویشن دنایی در ایران به‌صورت سنتی به‌عنوان ضد نفخ، هضم‌کننده غذا، ضد اسپاسم، ضد سرفه و خلط‌آور مصرف می‌شود (نیک‌آور و همکاران، ۱۳۸۳).

اسیدآسکوربیک یک مولکول کوچک فراوان در گیاهان و یک ماده کلیدی در شبکه آنتی‌اکسیدانی شامل آسکوربات، گلوتاتیون، آلفا-توکوفرول و یک سری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است. گزارش‌های متعددی مبنی بر اثرهای مثبت اسیدآسکوربیک بر جنبه‌های مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان مختلف وجود دارد (قربانلی و همکاران، ۱۳۹۱). در تحقیقی که توسط پازوکی و همکاران (۱۳۹۱) بر روی برخی صفات مورفولوژیکی گیاه آویشن تحت تیمار آسکوربیک اسید و جیبرلین انجام شد، نشان داده شد که حضور این دو ترکیب به طور همزمان رشد اندام‌های هوایی و اجزای اصلی تولیدکننده اسانس در آویشن را به‌طور چشمگیری افزایش داده و به‌دنبال آن وزن خشک نمونه‌ها افزایش یافت. تحقیقات و پژوهش‌های متعددی بر روی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس آویشن دنایی (نیک‌آور و همکاران، ۱۳۸۳) و نیز بررسی‌های مقایسه‌ای بین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس در میان گونه‌های متعدد آویشن انجام شده‌است (خرمی و همکاران، ۱۳۹۰). در بررسی حسینی بهشتی و خوشخوی (۱۳۸۴) مشخص شده که ترکیب نفتالن استیک اسید و بنزیل آدنین شرایط مناسبی را در محیط MS برای تولید شاخساره ایجاد کرده و همچنین نفتالن استیک اسید به تنهایی در فرایند ریشه‌زایی بسیار مناسب عمل کرده است. اما در مورد بهینه‌سازی کالوس‌ها، مطالعات نسبتاً اندکی در رابطه با گونه آویشن دنایی انجام شده است. از این‌رو سعی شده در این تحقیق به کال‌زایی و باززایی آویشن دنایی در شرایط مختلف پرداخته شود.

هدف از این تحقیق، مطالعه تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر مؤلفه‌های رشد و باززایی گیاه آویشن دنایی در حضور و عدم حضور آسکوربیک اسید است.

## مواد و روشها

بذر گیاه آویشن دنایی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. در شرایط سترون و در زیر دستگاه لامینار ایرفلو، ابتدا بذرها در مجاورت آب مقطر به همراه شوینده قرار داده شدند و بعد از ده دقیقه به محلول هیپوکلریت سدیم ۳۰٪ انتقال یافتند و به مدت ده دقیقه سترون شدند و پس از شستشو با آب مقطر استریل به محیط کشت MS انتقال داده شدند. از دانه‌رست‌های سترون رشد کرده، جداکشت‌های مریستم رأسی و میان‌گره‌ای تهیه شد و قطعات حاصل به

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت با ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد مطابق جدول ۱ انتقال یافت.

محیط‌های کشت تهیه شده تحت شرایط دوره نوری (تاریکی 16h-8h نور) و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت بیست روز، نمونه‌های بدست آمده از نظر شاخص ریشه‌زایی، شاخص شاخساره، شاخص کالوس، قطر کالوس و وزن تر و وزن خشک مورد بررسی قرار گرفت (حسن‌پور و همکاران، ۱۳۸۶) و تجزیه‌وتحلیل آماری آنها به کمک نرم‌افزار SAS انجام شد.

فاکتورهای شاخه‌زایی، ریشه‌زایی و کال‌زایی با استفاده از فرمول‌های زیر مورد ارزیابی قرار گرفت (موافقی و همکاران، ۱۳۸۷).

$$\text{شاخص کالوس} = \frac{\text{میانگین میزان تولید کالوس} \times \text{تعداد قطعات کال داده}}{\text{تعداد کل قطعات جداکشت}} \times 100$$

$$\text{شاخص شاخساره} = \frac{\text{میانگین میزان تولید شاخساره} \times \text{تعداد قطعات شاخه داده}}{\text{تعداد کل قطعات جداکشت}} \times 100$$

$$\text{شاخص ریشه‌زایی} = \frac{\text{میانگین میزان تولید ریشه} \times \text{تعداد قطعات ریشه داده}}{\text{تعداد کل قطعات جداکشت}} \times 100$$

$$\text{قطر کالوس} = \text{طول} \times \text{عرض}$$

**جدول ۱- انواع ترکیب‌های هورمونی استفاده شده در تیمارها**

| ردیف | Kin (mg/l) | BAP (mg/l) | NAA (mg/l) | AS (mg/l) |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۲ | ۱/۵ | ۰ | ۴/۵ | ۰ |
| ۳ | ۳ | ۰ | ۹ | ۰ |
| ۴ | ۴/۵ | ۰ | ۱۳/۵ | ۰ |
| ۵ | ۰ | ۳ | ۴/۵ | ۰ |
| ۶ | ۰ | ۶ | ۹ | ۰ |
| ۷ | ۰ | ۹ | ۱۳/۵ | + |
| ۸ | ۰ | ۰ | ۰ | + |
| ۹ | ۱/۵ | ۰ | ۴/۵ | + |
| ۱۰ | ۳ | ۰ | ۹ | + |
| ۱۱ | ۴/۵ | ۰ | ۱۳/۵ | + |
| ۱۲ | ۰ | ۳ | ۴/۵ | + |
| ۱۳ | ۰ | ۶ | ۹ | + |
| ۱۴ | ۰ | ۹ | ۱۳/۵ | + |

www.SID.ir

Archive of SID

## نتایج

### تولید کالوس

براساس نتایج جدول ۳، قطعات جداکشت میان‌گره‌ای آویشن دنایی تمایل زیادی به تشکیل کالوس در تیمارهای هورمونی مختلف بکار برده شده از خود نشان می دهد و در واقع اختلاف معنی‌داری نسبت به قطعات مریستم رأسی دارند ($P<0.05$). در تیمارهای هورمونی کینتین ۳ میلی‌گرم بر لیتر و نفتالن استیک اسید ۹ میلی گرم بر لیتر در حضور آسکوربیک اسید و نیز نفتالن استیک اسید ۹ میلی‌گرم بر لیتر و بنزیل آمینوپورین ۶ میلی‌گرم بر لیتر به همراه آسکوربیک اسید بیشترین حجم کالوس بدست آمد. این در صورتی است که تیمار هورمونی ۱۳/۵ میلی‌گرم بر لیتر، نفتالن استیک اسید و ۹ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین همراه آسکوربات بهترین تیمار هورمونی برای رشد کالوس در قطعات مریستم رأسی است. در دو تیمار هورمونی شاهد و ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر نفتالن استیک اسید و ۳ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین در هیچ‌یک از قطعات جداکشت، کال‌زایی انجام نشد.

### ریشه‌زایی

براساس نتایج جدول ۳، شاخص ریشه‌زایی جدا کشت‌های میان‌گره‌ای اختلاف معنی‌داری را نسبت به قطعات مریستم رأسی نشان داد ($P<0.05$). در تیمار شاهد که فاقد هر گونه ترکیب هورمونی است شرایط برای ریشه‌زایی مناسب بوده و بیشترین میزان ریشه‌زایی در این تیمار مشاهده شد. کمترین میزان ریشه‌زایی مربوط به محیط حاوی ۳ میلی گرم بر لیتر کینتین و ۹ میلی‌گرم بر لیتر نفتالن استیک اسید است. همچنین در محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر، کینتین و ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر، نفتالن استیک اسید هیچ‌گونه ریشه‌زایی مشاهده نشد. نتایج نشان داد که حضور یا عدم حضور آسکوربیک اسید تأثیری در فرایند ریشه‌زایی ندارد.

### شاخه‌زایی

براساس نتایج جدولهای ۲ و ۳، شاخص شاخساره در تیمارهای هورمونی مختلف و در هر دو قطعه جداکشت مورد نظر اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P<0.05$). بهترین تیمار برای شاخه‌زایی در ۹ میلی‌گرم بر لیتر، نفتالن استیک اسید و ۶ میلی‌گرم بر لیتر، بنزیل آمینوپورین بود که منجر به تولید و افزایش برگهای سبز تیره و در برخی موارد بنفش رنگ (حضور آنتوسیانین) شد. شاخه زایی در تیمار شاهد به‌صورت مطلوبی انجام شد. ترکیب هورمونی ۱۳/۵ میلی گرم بر لیتر نفتالن استیک اسید و ۹ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین کمترین میزان شاخه‌زایی را نشان داد.

### قطر کالوس

براساس نتایج جدول ۲، آنالیز مربوط به حجم و اندازه قطر کالوس های تولید شده، اختلاف معنی‌داری را در قطعات جداکشت مریستم رأسی نشان داد ($P<0.05$). به‌طوری که بیشترین کالوس‌های ایجاد شده مربوط به تیمارهای ۱/۵ میلی گرم بر لیتر کینتین و ۴/۵ میلی گرم بر لیتر نفتالن استیک اسید و همچنین ۹ میلی‌گرم بر لیتر، نفتالن استیک اسید و ۶ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین بود. در حالیکه کوچکترین کالوس‌های تولید شده مربوط به تیمار ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر نفتالن استیک اسید و ۳ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین بود. از سوی دیگر در تیمار شاهد ریشه‌زایی و شاخه‌زایی در حد مطلوب و بهینه بدون تولید کالوس مشخص مشاهده شد. در شکل ۱ تصاویری از باززایی و کال‌زایی گیاه آویشن دنایی تحت تیمارهای هورمونی مختلف دیده می‌شود.

### وزن تر و وزن خشک

براساس نتایج جدول ۲، بررسی وزن تر و وزن خشک در قطعات جدا کشت مریستم رأسی اختلاف معنی‌داری را

www.SID.ir

Archive of SID

نشان داد ($P<0.05$). این در حالیست که در قطعات میان‌گره‌ای این اختلاف معنی‌دار نبود. به‌نحوی که بیشترین وزن تر و خشک مربوط به تیمارهای واجد اسید آسکوربیک مشاهده شد. نتایج نشان داد که تیمار ۹ میلی‌گرم بر لیتر، نفتالن استیک اسید و ۶ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینوپورین، به همراه آسکوربیک اسید، بیشترین میزان وزن تر و وزن خشک نمونه ها را داشت و همین تیمار بدون حضور آسکوربیک اسید، کمترین مقدار مؤلفه‌های فوق را نشان داد (جدول ۴).

**جدول ۲- تجزیه واریانس مربوط به مقایسه میانگین‌های ۶ صفت مریستم رأسی گیاه آویشن دنایی در ۱۴ تیمار هورمونی مختلف**

| منبع | df | MS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | C1 | S1 | R1 | D1 | F1 | Ca1 |
| تیمار | ۱۳ | ۰/۸۴ | ۲/۲۱ ❊ | ۰/۵۵ | ۰/۰۰۹ | ۰/۱۸ ❊ | ۴۸۸/۸ |
| خطا | ۲۸ | ۰/۵۵ | ۰/۵۷ | ۰/۳۳ | ۰/۰۰۶ | ۰/۰۲۴ | ۱۴۰/۱ |

❊: معنی‌دار در سطح ۵٪

شاخص کالوس (C)، شاخص شاخساره (S)، شاخص ریشه‌زایی (R)، وزن خشک (D)، وزن تر (F)، قطر کالوس (Ca)

**جدول ۳- تجزیه واریانس مربوط به مقایسه میانگین‌های ۶ صفت قطعات میان‌گره‌ای گیاه آویشن دنایی در ۱۴ تیمار مختلف**

| منبع | Df | MS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | C2 | S2 | R2 | D2 | F2 | Ca2 |
| تیمار | ۱۳ | ۱/۰۴۹ ❊ | ۲/۰۴ ❊ | ۰/۶۳۷ ❊ | ۰/۰۴۹ | ۰/۶۷۵ ❊ | ۱۹۲۹/۱ |
| خطا | ۲۸ | ۰/۴۰ | ۰/۴۰۴ | ۰/۱۱۹ | ۰/۰۲۴ | ۰/۲۴۱ | ۱۳۷۷/۸ |

❊: معنی‌دار در سطح ۵٪

شاخص کالوس (C)، شاخص شاخساره (S)، شاخص ریشه‌زایی (R)، وزن خشک (D)، وزن تر (F)، قطر کالوس (Ca)

www.SID.ir

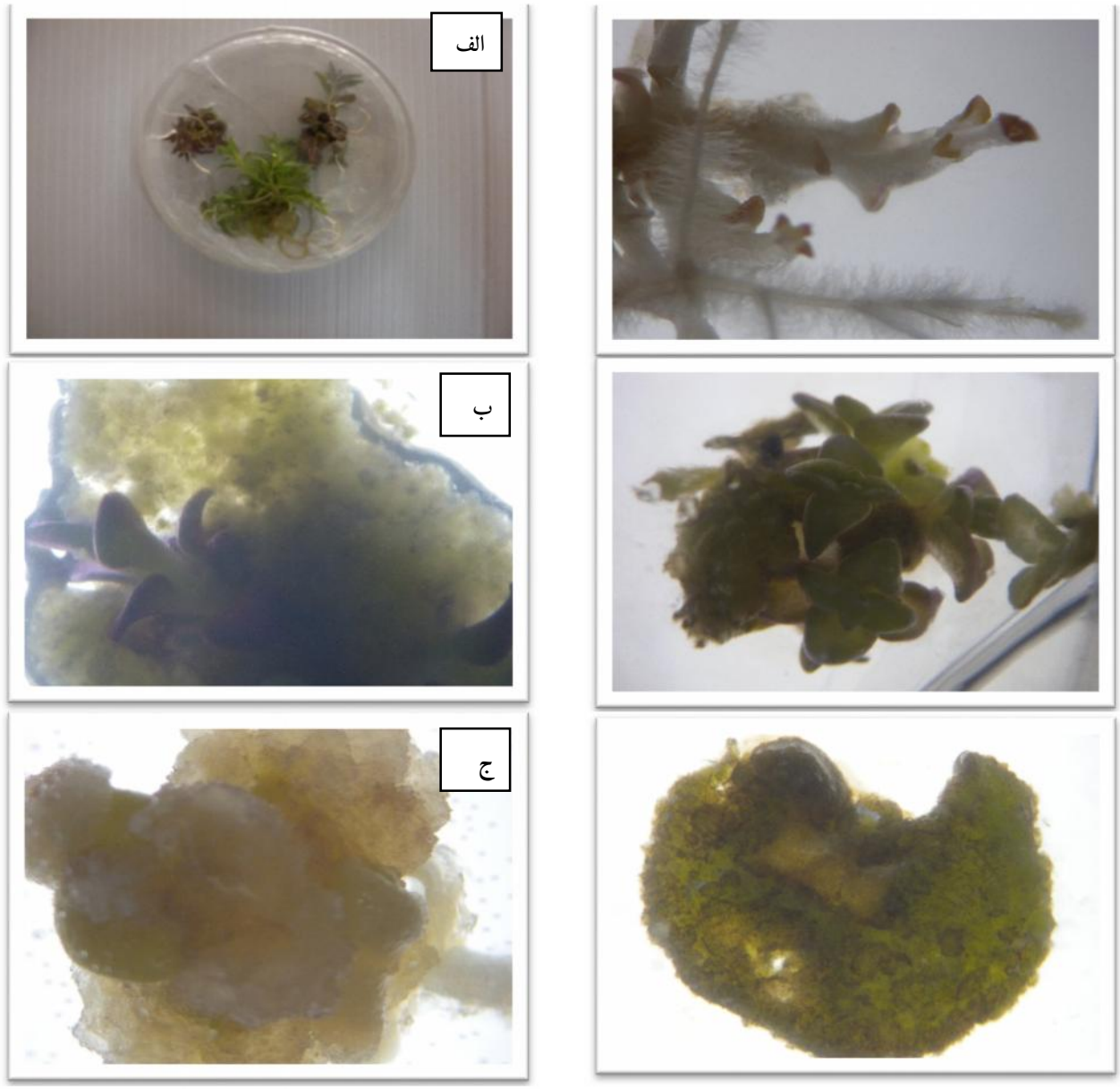
Archive of SID

**جدول ۴- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در ۱۴ ترکیب هورمونی در محیط کشت MS، بر روی جداکشت‌های مریستم رأسی و میان‌گره‌ای**

| ردیف | شاخص کالوس (رأس) mm | شاخص کالوس (میان‌گره) mm | شاخص شاخساره (رأس) mm | شاخص شاخساره (میان‌گره) mm | شاخص ریشه‌زایی (رأس) mm | شاخص ریشه‌زایی (میان‌گره) mm | وزن خشک (رأس) mg | وزن خشک (میان‌گره) mg | وزن تر (رأس) mg | وزن تر (میان‌گره) mm | قطر کالوس (رأس) mm | قطر کالوس(میان‌گره) mm |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۰ a | ۰ a | ۲/۳۳ abc | ۳ a | ۱/۳۳ a | ۱/۶۶ a | ۰ b | ۰ b | ۰ f | ۰ d | ۰ c | ۰ a |
| ۲ | ۱ a | ۱/۳۳ a | ۲/۳۳ abc | ۲/۳۳ ab | ۱ ab | ۰/۳۳ b | ۰/۰۲ b | ۰/۳۸ a | ۰/۳۵ bcd | ۰/۷۱ abcd | ۷/۶ bc | ۶/۰۲ a |
| ۳ | ۰ a | ۱ ab | ۳ a | ۲/۳۳ ab | ۰/۳۳ ab | ۰/۳۳ b | ۰/۲۱ b | ۰/۰۷ b | ۰/۵۰ b | ۱/۰۲ abc | ۰ c | ۶/۰۸ a |
| ۴ | ۰/۳۳ a | ۱ ab | ۱/۳۳ bcd | ۲/۳۳ ab | ۰ b | ۰ b | ۰/۰۱۴ b | ۰ b | ۰/۰۷ def | ۰ d | ۳ bc | ۵/۵ a |
| ۵ | ۰ a | ۰ b | ۱ cd | ۲ ab | ۰ b | ۰ b | ۰/۱۲ b | ۰/۰۱۳۸ b | ۰/۱۸ cdef | ۰/۱۹ cd | ۰ c | ۰ a |
| ۶ | ۰ a | ۱/۳۳ a | ۳/۳۳ a | ۲/۳۳ ab | ۰ b | ۰ b | ۰/۰۱۴ b | ۰/۰۳۶ b | ۰/۰۵۳ ef | ۰/۳۵ dc | ۰ c | ۶ a |
| ۷ | ۱/۳۳a | ۱/۳۳ a | ۰/۳۳ d | ۱/۶۶ b | ۰ b | ۰ b | ۰/۰۹۷ ab | ۰/۳۷ a | ۰/۹۱ a | ۰/۸۴ abcd | ۷/۷۱ bc | ۴/۶ a |
| ۸ | ۰a | ۰ b | ۲/۶۶ ab | ۲/۳۳ ab | ۰ b | ۰ b | ۰ b | ۰ b | ۰ f | ۰ d | ۰ c | ۰ a |
| ۹ | ۱/۶۶ a | ۱/۳۳ a | ۲ abc | ۳ a | ۰/۳۳ ab | ۰/۳۳ b | ۰/۰۰۹ b | ۰/۰۸۶ b | ۰/۰۴۲ ef | ۰/۳۸ bcd | ۱۱/۳۷ bc | ۴۲/۵ a |
| ۱۰ | ۱ a | ۱/۶۶ a | ۲/۶۶ ab | ۲/۳۳ ab | ۰/۶۶ ab | ۰/۶۶ b | ۰/۰۵ b | ۰/۰۸۱ b | ۰/۳۷ bcd | ۰/۹۸ abc | ۲۳/۶ ab | ۷۱/۵ a |
| ۱۱ | ۱/۳۳ a | ۱ ab | ۱ dc | ۰/۳۳ c | ۰ b | ۰ b | ۰/۰۵۷ b | ۰/۱۰۵ b | ۰/۴۳ bc | ۱/۳۱ ab | ۴/۴ bc | ۳۶/۴ a |
| ۱۲ | ۱ a | ۱/۳۳ a | ۲/۶۶ ab | ۲/۶۶ ab | ۰/۳۳ ab | ۰ b | ۰/۰۲۴ b | ۰/۰۴۲ b | ۰/۲۳ bcdef | ۰/۴۴ bcd | ۲۲/۵ abc | ۴۰/۹ a |
| ۱۳ | ۱ a | ۱/۶۶ a | ۲ abc | ۱/۶۶ b | ۰ b | ۰ b | ۰/۰۴۵ b | ۰/۰۷۷ b | ۰/۳۲ bcde | ۱/۳۹ a | ۲۴/۳ ab | ۶۴ a |
| ۱۴ | ۱/۳۳ a | ۱/۳۳ a | ۲/۳۳abc | ۰/۳۳ c | ۰ b | ۰ b | ۰/۰۵۲ b | ۰/۰۴۹ b | ۰/۳۳ bcde | ۰/۴۶ abcd | ۴۱/۳ a | ۴۱ a |

www.SID.ir

Archive of SID




**شکل ۱- نمایی از باززایی و کال‌زایی گیاه آویشن دنایی تحت تیمارهای هورمونی مختلف**

الف: ریشه‌زایی و شاخه‌زایی در قطعات جداکشت در محیط فاقد هورمون (تیمار شاهد)؛

ب: تشکیل جوانه‌های متعدد شاخساره در محیط کشت حاوی NAA(9 mg/l) و BAP(6mg/l)؛

ج: کال‌زایی در محیط کشت حاوی NAA(13.5 mg/l) و BAP(9 mg/l) در حضور اسکوربیک اسید و تیمار NAA(13.5 mg/l) و Kin(4.5 mg/l) در غیاب اسکوربیک اسید

## بحث

اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط‌های کشت گیاهی در بیشتر گونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. این در صورتی است که غلظت بهینه آنها و نسبت مقدار بکار برده شده برای قطعات جداکشت یک گونه و نیز از یک گونه به گونه دیگر متفاوت است. طبق گزارش (Dodds & Roberts, 1987)، نفتالن استیک اسید و اندول بوتیریک اسید به‌عنوان اکسین‌های مصنوعی غیرفنوکسی در محیط‌های کشت گیاهی برای ایجاد ریشه در بیشتر گونه‌ها بکار می‌روند.

www.SID.ir

Archive of SID

القای کالوس در گیاه آویشن دنایی در تیمار هورمونی اکسین و سیتوکینین حاصل می‌شود و استفاده از هر یک از آنها به تنهایی نمی‌تواند در القای کالوس مؤثر باشد. البته غلظت نسبتاً بالای بنزیل آمینوپورین با حضور نفتالن استیک اسید افزایش چشمگیری را در بهینه‌سازی کال‌زایی نشان داد. تحریک و شدت تکثیر کالوس در حضور بنزیل آمینوپورین و نفتالن استیک اسید به حدی است که بعد از گذشت زمان، بافت کالوس تمام قطعات جداکشت را دربرگرفته و به‌دنبال تشکیل کالوس، باززایی گیاه با شکل‌گیری ریشه‌چه و تشکیل نوساقه آغاز شد.

اگر چه مقادیر بالای اکسین بزرگ شدن طولی سلول و افزایش تقسیم سلولی را سبب می‌شود، اما در تحقیقی که توسط سلطانی‌پول و همکاران (۱۳۹۰) انجام شد، ملاحظه گردید که افزایش در غلظت این هورمون نه تنها افزایش تولید کالوس را بدنبال نداشت بلکه خود عاملی برای تخریب سریع ریزنمونه‌ها بود که این امر مخالف نتایج Kumar و همکاران (۲۰۰۲) بود. در این پژوهش غلظت بالای اکسین به همراه غلظت‌های نسبتاً بالای کینتین و بنزیل آمینوپورین توانسته نتایج مؤثری را در کال‌زایی و افزایش میزان قطر کالوس داشته باشد که با نتایج بررسی سلطانی‌پول و همکاران (۱۳۹۰) مطابقت ندارد، در حالی‌که با نتایج Kumar و همکاران (۲۰۰۲) همخوانی دارد. در مطالعات دیگری مشاهده شد که نتایج در رشد کالوس‌های آویشن با کاربرد ۲ میلی‌گرم بر لیتر نفتالن استیک اسید و ۲ میلی‌گرم بر لیتر کینتین بهترین بازدهی را نشان داد (ولی‌زاده و کاظمی تبار، ۱۳۸۹). در تحقیقی مشخص شد که غلظت‌های بالای بنزیل آمینوپورین و ۲و۴- دی کلرو فنوکسی استیک اسید در محیط کشت MS بر روی جنس آویشن برخلاف نتایج بدست آمده در این پژوهش می‌باشد، به گونه‌ای که کمّیت و کیفیت کالوس‌ها و برگ‌های ایجاد شده با افزایش غلظت اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها کاهش یافت (Mirshekar *et al.*, 2014). در این پژوهش حضور آسکوربیک اسید نقش مؤثری را در افزایش وزن تر و وزن خشک کالوس‌های گیاه آویشن دنایی نشان داد. از خواص آنتی‌اکسیدانی آسکوربیک اسید می‌توان به نقش آن در تغییر چرخه سلولی و تحریک تقسیم سلولی اشاره کرد که سبب افزایش تعداد برگ و وزن خشک و تر در گیاه می‌گردد (Rosales *et al.*, 2006). از سوی دیگر آسکوربیک اسید گسترش سلولی و رشد طولی را امکان‌پذیر می‌سازد (Horemans *et al.*, 2000). این ترکیب با جلوگیری از افزایش سطح اسید آبسیزیک از اثرات بازدارندگی آن بر رشد ممانعت بعمل می‌آورد. علاوه‌بر این همانطور که در بالا اشاره شد آسکوربیک اسید می‌تواند با ممانعت از تیره شدن کالوس‌ها، طول عمر بافت‌ها را افزایش دهد (پازوکی و همکاران، ۱۳۹۱).

در این تحقیق بر خلاف نظر Saez و همکاران (۱۹۹۴)، که بر این امر معتقد بودند که غلظت بالای بنزیل آمینوپورین باعث کم شدن تعداد شاخساره در گیاهان و کوتاه شدن آنها می‌شود، غلظت‌های بالای کینتین و بنزیل آمینوپورین با همراهی اکسین توانسته بیشترین میزان تولید شاخساره را داشته باشد. Rudnicki و Nowak (۱۹۷۶)، به نقش ضروری سیتوکینین‌ها در تقسیم سلولی و تنظیم سنتز پروتئین‌های درگیر در دستگاه‌های دوکی شکل میتوز و در نهایت افزایش رشد و شاخه‌زایی اشاره کرده‌اند.

در این تحقیق نتایج مشابهی در هورمون‌های بکار برده شده نسبت به آنچه که در باززایی مستقیم ریزنمونه گره و تکثیر شاخه در گیاه پروانش، توسط طالبی و همکاران (۱۳۹۱) انجام شده بدست آمده‌است، به این صورت که ترکیب نفتالن استیک اسید با بنزیل آمینوپورین بهترین شرایط باززایی را در گیاه آویشن دنایی ایجاد کرده است. در واقع میان‌کنش اکسین و سیتوکینین منجر به القاء شکل‌گیری نوساقه‌های نابه‌جا به‌طور مستقیم از بافت‌ها و به‌صورت غیرمستقیم از کالوس‌ها می‌گردد و از طرفی می‌تواند منجر به چیرگی رأسی و خروج جوانه‌های جانبی از دوره کمون گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

## منابع مورد استفاده


- اکبری‌نیا، ا. و میرزا، م.، ۱۳۸۷. شناسایی ترکیب‌های معطر گیاه دارویی آویشن دنایی کشت شده در قزوین. علوم پزشکی قزوین، ۱۲(۳): ۶۲-۵۸.
- امیدی، م. و فرزین، ن.، ۱۳۸۸. راهکارهای بیوتکنولوژی در افزایش کارآیی گیاهان دارویی. همایش منطقه‌ای غذا و بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه، ۱۴-۱۳ اسفند.
- پازوکی، ع.، رضایی، ح.، حبیبی، د. و پاک‌نژاد، ف.، ۱۳۹۱. اثر تنش خشکی محلول‌پاشی آسکوربات و جیبرلین بر روی برخی صفات مورفولوژیکی متحوای نسبی آب برگ و پایداری غشای سیتوپلاسمی گیاه آویشن (*Thymus vulgaris* L.). زراعت و اصلاح نباتات ایران، ۱: ۱۴-۱.
- حسن‌پور، ح.، برنارد، ف. و شاکر، ح.، ۱۳۸۶. بهینه‌سازی کشت بافت آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Bioss.) برای تولید اسید رزمارینیک. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۷: ۹-۱.
- حسینی بهشتی، ب. و خوشخوی، م.، ۱۳۸۴. اثرهای محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزافزایی آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.). مجله علوم و فنون باغبانی ایران، ۶(۲): ۶۸-۶۱.
- خرمی، م.، علیزاده، ا.، نوروزنژاد، م.ج. و رحمانی، م.، ۱۳۹۰. بررسی و مقایسه ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak. Subsp. *Daenensis*) و آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.). ششمین همایش ایده‌های نو در کشاورزی، دانشگاه آزاد خوراسگان، ۱۰ اسفند.
- سلطانی‌پول، م.م.، محمدی، ع.، رهنما، ح. و عباس‌زاده، ب.، ۱۳۹۰. بررسی کال‌زایی در گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L). زراعت و اصلاح نباتات، ۷(۱): ۵۴-۴۵.
- طالبی، م.، اعتصام، ف.، سید طباطبایی، ب. و خاکسار، غ.، ۱۳۹۱. استفاده از ریزنمونه‌های گره و ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد در باززایی مستقیم پروانش (*Catharanthus roeus* L.). علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای، ۳(۱۰): ۶۵-۵۵.
- قربانلی، م.، احمدی، ف.، منفرد، ا. و بخشی خانیکی، غ.، ۱۳۹۱. اثر تنش شوری و برهم‌کنش آن با آسکوربات بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پرولین و مالون دی‌آلدئید در گیاه زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) چهار هفته بعد از جوانه‌زنی. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۸(۱): ۲۷-۱۴.
- مظفریان، و.، ۱۳۷۶. فرهنگ نام‌های گیاهان ایران. انتشارات فرهنگ مصور، تهران، ۷۵۰ صفحه.
- موافقی، ع.، حبیبی، ق. و علی‌اصغرپور، م.، ۱۳۸۷. باززایی گیاه دارویی کور (*Capparis spinosa* L.) با استفاده از کشت قطعات هیپوکوتیل. زیست‌شناسی ایران، ۲۱(۲): ۲۹۷-۲۸۹.
- نیک‌آور، ب.، مجاب، ف. و دولت‌آبادی، ر.، ۱۳۸۳. بررسی اجزای تشکیل‌دهنده اسانس سرشاخه‌های گل‌دار آویشن دنایی. گیاهان دارویی، ۱(۱۳): ۴۹-۴۵.
- ولی‌زاده، م. و کاظمی تبار، ک.، ۱۳۸۹. باززایی گیاهچه از ریز نمونه‌های هیپوکوتیل آویشن دنایی در محیط درون شیشه. یازدهمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه شهید بهشتی تهران، ۴-۲ مرداد.
- Dodds, J. and Roberts, L., 1987. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge Unversity Press, UK, 276p.
- Horemans, N., Foyer, H.C., Potters, G. and Asard, H., 2000. Ascorbate function and associated transport system in plant. Plant Physiology and Biochemistry, 38(7-8): 531-540.
- Kumar, O.A., Tata, S.S. and Rupavati, T., 2002. *In vitro* induction of callusogenesis in chili peppers (*Capsicum annuum* L.). International Journal of Current Reseaech, 3: 42-44.
- Mirshekar, A., Honarvar, M., Mohammadi, F. and Alizadeh, A., 2014. Optimization of tissue culture of *Thymus daenensis* Celak. American-Eurasian Journal Agricultural and Environmental Science, 14(9): 949-953.
- Rosales, M.A., Ruiz, J.M., Hernández, J., Soriano, T., Castilla, N. and Romero, L., 2006. Antioxidant content and as ascorbate metabolism in cherry tomato exocarp to temperature and solar radiation. Journal of Science Food and Agriculture, 86(10): 1545-1551.
- Rudnicki, R.M. and Nowak, J., 1976. Studies on the physiology of hyacinth bulbs (*Hyacinthus orientalis* L.): vi. hormonal activities in hyacinth bulbs during flower formation and dormancy release. Journal of Experimental Botany, 27(2): 303-313.
- Saez, F., Sanchez, P. and Piqueras, A., 1994. Micropropagation of *Thymus piperella*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 39: 269-272.


www.SID.ir

Archive of SID

# Callus induction and plant regeneration of *Thymus daenensis* Celak.

**M. Pirooz[1], H. Amiri[2*] and B. Dostii[3]**

1- M.Sc. Student, Department of Biology, Lorestan University, Khoram-Abad, Iran.
2*- Corresponding author, Department of Biology, Lorestan University, Khoram-Abad, Iran, E-mail: amiri_h_lu@yahoo.com
3- Department of Science, Islamic Azad University, Khoram-Abad Branch, Koram-Abad, Iran

Received: October 2014 Revised: April 2016 Accepted: April 2016

## Abstract

*Thymus daenensis* Celak., belonging to the Lamiaceae family, is an endemic species of genus *Thymus* in Iran. Despite the increasing need for mass propagation of this plant due to the presence of useful secondary metabolites, there is little information about its proliferation. In the present study, the interaction of some hormonal treatments in the MS medium containing indole acetic acid (IAA), benzyl amino purine (BAP) and kinetin (Kin) in presence or absence ascorbic acid (AS) were investigated for callus induction and micropropagation of *Thymus daenensis*. Results showed that the callus index, fresh weight, and dry weight of callus from internode explants were better as compared with apical meristem explants. Significant differences were found for regeneration from callus cultures derived from apical meristem and internode, so that NAA-Kin (4.5 and 1.5 mg/L) and NAA-BAP (9 and 6 mg/L) were the best hormonal combination. As well, significant differences were found between callus production from internode explants and apical meristem explants, so that Kin-NAA (9 and 3 mg/L), and NAA-BAP (6 and 9 mg/L) in presence of ascorbic acid were the best hormonal combination. Overall, the control treatment, NAA and Kin showed favorable effects on callus induction and better regeneration was obtained from internode explants.

**Keywords:** *Thymus daenensis* Celak., tissue culture, ascorbic acid, callus induction, regeneration.

www.SID.ir