Archive of SID

مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ٦ شماره ٢ صفحه های ٦١ تا ٦٨ (١٣٨٤)

اثرهای محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریزافزایی آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.)[1]

EFFECTS OF MEDIA AND GROWTH REGULATORS ON GARDEN THYME (*THYMUS VULGARIS* L.) MICROPROPAGATION

بنفشه حسینی بهشتی و مرتضی خوشخوی[2]

چکیده

آزمایش‌هایی برای ریزافزایی گیاه آویشن باغی با استفاده از ریزنمونه‌های[3] تک گره[4] ساقه به طول ۱۰ میلی‌متر در شرایط سترون انجام شد. ریزنمونه‌ها، روی محیط کشت پایه موراشیگی واسکوگ (MS)[5] و محیط کشت پایه نیم غلظت MS که به آن ها ۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم درلیتر، بنزیل‌آدنین (BA)، ۰ و ۰/۲ میلی‌گرم درلیتر نفتالن استیک اسید (NAA)، ۸ گرم در لیتر آگار و ۲۵ گرم درلیتر سوکروز افزوده شده بود، قرار گرفتند. در مرحله دوم آزمایش از غلظت های ۰، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ میلی گرم در لیتر BA به همراه ۰ و ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA جهت تشکیل شاخساره استفاده شد. محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، برای پرآوری[6] شاخساره مناسب بود. شاخساره‌های تولید شده در کشت درون شیشه‌ای[7] چهار بار به فاصله چهار هفته روی محیط کشت تازه زیرکشت[8] شدند. زیرکشت ها در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری بایکدیگر نداشتند. برای ریشه‌زایی شاخساره‌های تولید شده، محیط کشت MS با ۸ گرم درلیتر آگار و ۲۵ گرم درلیتر سوکروز به کار گرفته شد. بهترین تیمار تنظیم کننده رشد برای ریشه‌زایی، صفر میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA پس از ۸ هفته بود. سازگاری گیاهک های ریشه دار شده در آمیخته خاکی سترون به نسبت حجمی یک ششم خاک رسی شنی، یک ششم ماسه, یک ششم پیت خزه و سه ششم پرلایت انجام شد. گیاهان پس از دو هفته سازگار شدند و به شرایط معمولی انتقال یافتند.

واژه های کلیدی: آویشن, ریز افزایی, کشت بافت, کشت درون شیشه ای, گیاهان دارویی.

مقدمه

گیاه آویشن باغی با نام علمی *Thymus vulgaris* L. و نام انگلیسی Garden thyme از تیره نعناع سانان[9] می‌باشد (۷). این گیاه پرشاخه بوده و دارای ساقه‌های چوبی به ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتیمتر می‌باشد که به حالت وحشی به صورت بوته‌های پرپشت در دامنه‌های خشک و بین تخته سنگ‌های نواحی مختلف مدیترانه می‌روید. ساقه‌های این گیاه پوشیده از کرک و برگ‌های کوچک آن دارای ظاهری لوزی شکل می‌باشد (۷). بیوسنتز و تجمع اسانس در کرک های غده‌ای آویشن صورت می‌گیرد. آویشن با بذر، قلمه و تقسیم بوته افزوده می‌شود (۱۴، ۱۹).

۱- تاریخ دریافت: ۸۳/۸/۳۰ تاریخ پذیرش: ۸۴/۳/۱۹

۲- به ترتیب دانشجوی پیشین کارشناسی ارشد و استاد بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی, دانشگاه شیراز, شیراز, جمهوری اسلامی ایران.

۳- Explants ۴- Single-node ۵- Murashige and Skoog ٦- Proliferation

۷- *In vitro* ۸- Subculture ۹- Lamiaceae

www.SID.ir

Archive of SID

در پژوهش‌هایی که روی کشت بافت گونه‌های مختلف در جنس آویشن صورت گرفته از محیط کشت MS، CMS[1]، نیچ ونیچ[2] و وایت[3] به همراه مقادیر مختلف از ویتامین‌ها، تنظیم کننده‌های رشد استفاده شده است (۱۰، ۱۸، ۲۰). منابع مختلف کربوهیدرات و مواد جامد کننده نیز برای ریزافزایی آویشن باغی به کار گرفته شده است (۱۰، ۱۵، ۲۱، ۲۳). سولفات آدنین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و IBA با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر روی محیط نیچ و نیچ رشد و نمو گیاه را افزود (۳٦). کشت تک گره روی محیط کشت CMS (محیط کشتی که با تغییراتی در محیط کشت MS به وجود آمده به این صورت که ازفسفات آمونیم و نیترات کلسیم به جای نیترات آمونیم، فسفات پتاسیم وکلرید کلسیم استفاده شد و ۵۰٪ از میزان نیترات پتاسیم و سولفات منیزیم و ٦۰٪ از میزان کلات آهن کاسته شد) بدون تنظیم کننده‌های رشد نیز مؤثر بود (۲۱). در آزمونی دیگر، افزودن BA (حداکثر ٦/٦ یا ٤/٤ میکرومولار) بیشتر از کینتین (حداکثر ۹/۳ میکرومولار) قابلیت شاخه‌زایی را بالا برد. ریشه‌زایی در غلظت ۲/۸ میکرومولار IAA و بدون سایتوکینین به دست آمد (۱۷). در کشت ریزنمونه‌های *Thymus piperella* L. با استفاده از ٦/٦ میکرومولار BA به همراه ۲/۸ میکرومولار IAA بهترین نتیجه به دست آمد. در این آزمایش ها، از ۲۰ تا ٤۰ گرم در لیتر سوکروز به همراه ٦ گرم در لیتر آگار استفاده شد (۱۰، ۱۲). سازگار کردن گیاهان زمانی صورت گرفت که طول آن ها به ۱۰ تا ۱۵ سانتیمتر رسیده بود.

با استفاده از روش کشت بافت می توان افزونگری همگروه ها را با سرعتی زیاد و در مدتی کوتاه انجام داد و گیاهانی دارای فرآورده های ثانویه یکسان و زیاد به دست آورد. افزون بر آن کشت بافت گیاهی نیاز به قرنطینه گیاه را از بین می برد که خود عاملی در صرفه جویی زمان می باشد. همچنین با توجه به اهمیت فرآورده های ثانویه در گیاهان دارویی در صورت شناسایی یک تک گیاه با میزان فرآورده های ثانویه بالا می توان آن را با سرعت و به تعداد زیاد و بدون تغییر در ژنوتیپ افزود.

بررسی عوامل مؤثربرکشت بافت برای افزایش سریع توده‌های آویشن باغی مورد کشت در ایران, به ویژه تعیین محیط کشت مناسب و نوع تنظیم کننده رشد مورد نیاز برای کشت درون شیشه‌ای این گیاه، هدف این پژوهش بود.

مواد و روش ها

ابتدا نشاءهای تهیه شده از بذر بهنژادی شده آویشن باغی ارسال شده از دفتر گل، گیاهان زینتی، دارویی و قارچ های خوراکی معاونت باغبانی وزارت جهاد کشاورزی که در شرکت گیاه‌افزای شیراز کشت شده بودند، به گلخانه بخش باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز انتقال داده شدند. نشاءها در گلخانه در شرایط نور غیرمستقیم آفتاب، میانگین دمایی۳ ±۲٦ درجه سانتی‌گراد در روز و ۳ ±۱٦ درجه سانتی‌گراد در شب، رطوبت نسبی۵ ±۷۰٪ و تغذیه مناسب با کود تجاری فوسامکو ٤ (دارای ۱۰٪ N ، ٤/٤٪ P_2O_5 ، ۷٪ K_2O ، ۰/۹۱٪ Mg ، ۰/۰۰۸٪ MnEDTA) پرورش داده شدند. آمیخته خاکی استفاده شده به نسبت حجمی یک دوم خاک رسی شنی و یک دوم کود دامی بود. گیاهان حدود یک ماه در این شرایط نگهداری شدند. سپس قسمت انتهایی برگ دار و جوان ساقه‌ها به همراه برگ‌ها به عنوان ریزنمونه به کار رفتند.

محیط کشت پایه (MS) (۱۷) و محیط کشت نیم غلظت پایه MS هر کدام شامل ۸ گرم در لیتر آگار، ۲۵ گرم در لیتر سوکروز، صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر BA و ۰ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA برای آزمایش ابتدایی مرحله شاخه‌زایی شامل استقرار و پرآوری شاخساره مورد استفاده قرار گرفتند. براساس

۱- Modified MS Culture Medium ۲- Nitsch and Nitsch ۳- White

www.SID.ir

Archive of SID

این آزمایش‌ها، غلظت‌های ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA برای شاخه‌زایی استفاده شد.

در بررسی ریشه‌زایی، غلظت های BA ۰ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و NAA ۰، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر انتخاب شدند. غلظت‌های ۸ گرم در لیتر آگار و ۲۵ گرم در لیتر سوکروز در این محیط کشت به کار گرفته شد.

مقدار ۲۵ میلی‌لیتر از محلول‌های کشت تهیه شده در ظروف شیشه‌ای به حجم ٤٠ تا ٥٠ میلی‌لیتر توزیع شد. ظروف حاوی محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه و تمامی وسایل به مدت ۳۰ دقیقه در اتوکلاو و با دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار بخار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتیمتر مربع گندزدایی شدند. نمونه‌های ساقه گرفته شده از گلدان های داخل گلخانه به مدت ۱۵ دقیقه زیر آب جاری شستشو شدند. سپس نمونه‌ها وارد ظرف سترون حاوی محلول ۱۰٪ حجمی مایع سفید کننده تجاری (حاوی ۵٪ هیپوکلریت سدیم) با سه قطره مایع ظرفشویی معمولی شدند. تیمارهای مورد استفاده شامل ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه محلول سفیدکننده تجاری ۱۰٪ حجمی بود. پس از گندزدایی سطحی با تیمار مناسب و سه بار آبکشی با آب مقطر سترون نمونه‌های ساقه به وسیله چاقوی سترون آزمایشگاه به قطعه های شامل یک تک‌گره به طول ۱ تا ۱/۵ سانتیمتر تقسیم شدند. نمونه‌های کشت شده در طول روز ١٦ ساعت با شدت نور ۱۵۰۰ لوکس که توسط دو لامپ مهتابی خنک فراهم می‌شد قرار گرفتند. میانگین دما در دوران آزمایش ۳±۲۵ درجه سانتیگراد بود.

شاخساره‌های پرآوری شده از کشت ریزنمونه‌های ساقه پس از ٤ هفته روی محیط کشت پایه MS با تیمار هورمونی NAA با غلظت ۰/۲ میلی گرم در لیتر و BA با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر زیرکشت شدند و شاخساره‌های به دست آمده به همین ترتیب تا ٤ زیر کشت به فاصله ٤ هفته برای ارزیابی قدرت پرآوری شاخه افزونه ها[1] کشت شدند. برای ریشه‌زایی شاخساره‌های به دست آمده روی محیط کشت پایه MS با تیمار تنظیم کننده رشد NAA با غلظت های ۰، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ و BA با غلظت های ۰ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر قرارداده شدند. پس از کشت، نمونه‌ها در شرایط نوری با شدت ۱۵۰۰ لوکس و دوره نوری ١٦ ساعته قرار گرفتند.

برای سازگاری، گیاهک‌های ریشه‌دار شده به گلدان های حاوی آمیخته خاکی گندزدایی شده به نسبت حجمی یک ششم خاک رسی شنی، یک ششم ماسه, یک ششم پیت خزه و سه ششم پرلایت منتقل شدند. برای حفظ رطوبت از ظروف پلاستیکی دربسته استفاده شد که دریچه هایی برای کنترل رطوبت داشتند. آبیاری گلدان ها با آب معمولی و به مدت دو هفته انجام شد. به مرور گیاهان در طی یک ماه با محیط بیرون سازگار شدند.

واکنش ریزنمونه‌های ساقه در آزمایش ابتدایی یادداشت شد. همچنین تعداد شاخساره، درصد ریشه‌زایی و تشکیل شاخساره در ٤ زیر کشت یادداشت برداری شد. آزمایش ها در قالب طرح به طور کامل تصادفی با ٦ تکرار انجام شد. در این آزمایش ها هر ۲۵ ظرف به عنوان یک کرت در نظر گرفته شد و در هر ظرف ۲ ریزنمونه کشت شد. داده‌ها به صورت آماری تجزیه و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای جدید دانکن و توزیع t- استیودنت مقایسه شدند.

۱- Propagules

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

گندزدایی

آلودگی ریز نمونه‌ها در مرحله گندزدایی در سطح احتمال ۵٪ دارای اختلاف معنی‌داری بود و مشاهده شد که تیمار ۱۰ دقیقه محلول۱۰٪ حجمی مایع سفید کننده تجاری مناسب تر از سایر تیمارها می‌باشد (جدول ۱). آلودگی باکتریایی در هیچ یک از تیمارها مشاهده نشد.

آزمایش اول

در مرحله اول آزمایش روی محیط کشت MS، تیمار BA به غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و NAA به غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر با سایر تیمارها در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۲). در محیط کشت نیم‌غلظت MS تیمارها در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری نداشتند. مقایسه محیط کشت MS و نیم‌غلظت MS با استفاده از توزیع t- استیودنت صورت گرفت. در سطح احتمال ۵٪، t=۳/٦٦٦ آزمون بزرگتر از t= ۲/۰۰۰ جدول بود که نشان دهنده برتری محیط کشت MS به محیط کشت نیم‌غلظت MS بود.

جدول ۱- مقایسه درصد ریزنمونه‌های آلوده نشده در تیمارگندزدایی آویشن باغی.

Table 1. Mean comparisons of non-infected explants during sterilization of garden thyme.

زمان (دقیقه) Time (min)	درصد ریزنمونه‌های آلوده نشده Percent of non-infected explants
0	0.0 c†
5	20.0b
10	98.66a
15	1.66b
20	0.66bc

† Means with the similar letters are not significant at 5% level of probability using DNMRT.

† میانگین‌هایی که دارای حروف یکسانی می‌باشند، در سطح ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای جدید دانکن تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

شاخه‌زایی و زیرکشت مرحله پرآوری شاخساره

شمارش تعداد شاخساره تولید شده نشان داد که تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (٤/٥ شاخساره) تفاوت معنی‌داری با تیمارهای۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیترNAA (۲/۸۳۳ شاخساره) و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (۲/۸۳۳ شاخساره) مورد استفاده در باززایی شاخساره داشت. گیاهچه‌های به دست آمده از تیمار یاد شده در بالا در همان محیط کشت ٤ بار زیرکشت شدند. میانگین های به دست آمده در چهار زیرکشت در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- مقایسه میانگین تعداد شاخساره های آویشن پس از ٤ هفته در ۸ تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی روی محیط کشت MS.

Table 2. Mean comparisons of garden thyme shoot number after 4 weeks in 8 growth regulator treatments on MS medium.

غلظت‌های NAA (میلی گرم در لیتر) BA Concentrations (mg l^{-1})	غلظت‌های BA (میلی گرم در لیتر) BA Concentrations (mg l^{-1})				
	0	0.5	1.0	1.5	میانگین (Mean)
0	0.166c†	0.166c	0.166c	0.166c	0.166B
0.2	0.833cb	2.000b	4.333a	0.666c	1.958A
میانگین(Mean)	0.500C	1.083B	2.250A	0.416C	

† Means with similar letters (capital letters for means of columns and rows) are not significantly different at 5% level of probability using DNMRT.

† میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه می‌باشند (حروف بزرگ برای میانگین ستون ها و ردیف ها) در سطح ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای جدید دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

ریشه‌زایی و انتقال به خاک و سازگاری

تعداد ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده ۸ هفته پس از کشت روی محیط کشت MS با NAA به غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر و BA به غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمارهای دیگر در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین تعداد ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده پس از ۸ هفته در ۸ تیمار تنظیم کننده‌های رشد گیاهی.

Table 3. Comparisons between the rooted explants after 8 weeks in 8 growth regulator treatments.

غلظت‌های BA (میلی گرم در لیتر) BA Concentrations (mg l^{-1})	غلظت‌های NAA (میلی گرم در لیتر) NAA Concentrations (mg l^{-1})			
	0.75	1.0	1.25	میانگین (Mean)
0	1.50b†	2.83b	5.67a	4.56A
0.5	0.83c	1.00bc	1.67b	1.67B
میانگین(Mean)	1.16B	1.91B	3.67A	

† Means with the similar letter are not significantly different at 5% level of probability using DNMRT.

† میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه می‌باشند در سطح ۵٪ آزمون چنددامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

www.SID.ir

Archive of SID

گیاهان ریشه‌دار شده در طی یک ماه با شرایط محیطی بیرون سازگار شدند (شکل ۱).

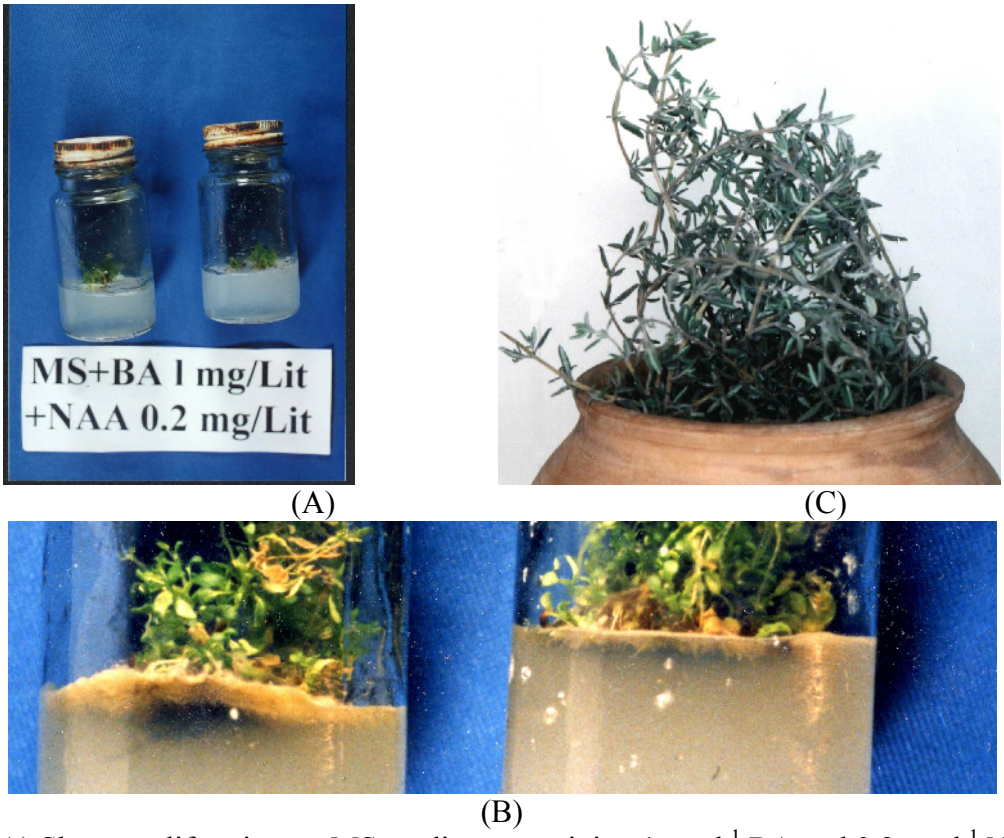

Fig. 1. (A) Shoot proliferation on MS medium containing 1 mg l^{-1} BA and 0.2 mg l^{-1} NAA. (B) Root growth on the surface of MS medium containing 0 mg l^{-1} BA and 0.2 mg l^{-1} NAA. (C) Acclimatized garden thyme to natural conditions.

شکل ۱- (A) شاخساره‌های تولید شده روی محیط کشت MS با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA. (B) ریشه‌های ایجاد شده در سطح محیط کشت MS با صفر میلی‌گرم در لیتر BA و ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA. (C) گیاه سازگار شده با شرایط معمولی.

بحث

دراین پژوهش، شستشوی آویشن باغی بیش از ۱۵ دقیقه و یا همراه با مواد شوینده به علت حساس بودن بافت‌های گیاه موجب از بین رفتن آن ها شد. در گزارش‌های پیشین (۲۲،۱۲) شستشوی آویشن باغی در آب مقطر به همراه چند قطره توین-۲۰[۱] موفقیت در گندزدایی را بالا برده بود. در این پژوهش گندزدایی به مدت ۱۰ دقیقه با محلول ۱۰٪ حجمی مایع سفید کننده تجاری بهترین تیمار برای گندزدایی بود و هیچگونه آلودگی باکتریایی مشاهده نشد. در پژوهش های گذشته استفاده از هیپوکلریت کلسیم و اتانل ۷۰٪ برای گندزدایی آویشن پیشنهاد شده است. در این پژوهش ها آلودگی گزارش نشده است که با توجه به موفقیت ۹۸/٦٦٪ به دست آمده در این پژوهش نتایج مشابه بوده است (۲۲،۱۲).

در مرحله اول این پژوهش مقایسه‌ای میان محیط کشت MS و محیط کشت نیم غلظت MS صورت گرفت. محیط کشت MS نسبت به محیط کشت نیم غلظت MS بهتر بود (جدول ٤). به نظر می‌رسد غلظت مواد در محیط

۱ - Tween-20

www.SID.ir

Archive of SID

کشت نیم غلظت MS برای رشد و نمو گیاه کافی نمی‌باشد. در گزارش‌های دیگر در کشت آویشن از محیط کشت نیچ ونیچ (۱۲)، محیط کشت وایت (۱۲) و محیط کشت MS تغییر یافته (۲۲) افزون بر محیط کشت MS (۱۲، ۱۵) استفاده شده است. در این پژوهش ها در مقایسه ای که میان محیط کشت نیچ ونیچ، محیط کشت وایت و محیط کشت MS صورت گرفته به برتری محیط کشت نیچ ونیچ اشاره شده است (۱۲) و محیط کشت MS تغییر یافته نسبت به محیط کشت MS برتری داشته (۲۲) که به نظر می رسد تفاوت در نتایج مربوط به اختلاف در نوع ژنوتیپ به کار برده شده، بوده است.

در پژوهش انجام شده ریزنمونه‌هایی که در محیط کشت بدون اکسین قرار داده شدند ریشه ای ایجاد نکردند و یا تعداد ریشه بسیار کم و ریشه‌های بسیار باریک ایجاد نمودند که به احتمال در اثر اکسین‌های طبیعی و درونی گیاه بود. نتایج مشابهی در کشت درون شیشه‌ای گیاه *Cunila galioides* Benth. (۱۱) به دست آمده است. تعداد شاخساره‌های ریشه‌دار شده روی محیط کشت دارای ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و صفر میلی‌گرم در لیتر BA پس از ۸ هفته نسبت به تیمارهای دیگر بیشتر بود. این نتیجه با نتایج به دست آمده در کشت درون‌شیشه‌ای گونه دیگری از این جنس *Thymus piperella* L. (۲۱) که بهترین نمو ریشه در حضور اکسین و بدون سایتوکنین بود، مشابه بود. گرچه بدون حضور اکسین پرآوری شاخساره در پژوهش حاضر به دست آمد شد ولی با افزودن مقدار کمی اکسین میزان آن افزوده شد و حتی گاهی حضور اکسین برای زنده بودن ریزنمونه‌ها ضروری بود. اما در تیمارهایی از NAA بدون BA در حالی که ریزنمونه‌ها زنده بودند هیچ شاخساره ای تشکیل نشد. بنابراین سایتوکینین برای تشکیل شاخساره لازم است. به طور کلی برای تشکیل شاخساره اکسین و سایتوکنین باید در یک غلظت بهینه در یک محیط کشت موجود باشند. نتایج این پژوهش با نتایج پژوهش‌های انجام شده در مورد این گونه از آویشن، با گونه‌های مشابه و یا گیاهان دیگر این تیره یکسان بود (۱۸، ۲۱، ۲۲). افزایش غلظت BA از ۱ به ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر باعث کم شدن تعداد شاخساره در گیاهان و کوتاه شدن شاخساره‌ها شد. نشان داده شده که در *Coleus forskohlii* L. (Lamiaceae) نیز درصد تشکیل شاخساره با افزایش غلظت سایتوکنین کاهش می یابد (۲۲).

نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش تعداد زیر کشت‌ها، پرآوری شاخساره تغییری نکرد. علت اصلی شاید تأمین دوباره عناصر غذایی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت تازه برای گیاه باشد. نتایج مشابهی برای گیاه *Coleus forskohlii* L. به دست آمده که تا ٦ زیرکشت تعداد شاخه‌ها و درصد تشکیل شاخساره کاهش نیافت (۲۲)، هر چند که نتایج متفاوتی در زیرکشت‌های رز مینیاتور (۲٤)، لیمو شیرین (٦) و بگونیا (۱) گزارش شده است.

منابع REFERENCES

۱- احمدی، ج. ۱۳۷۹. افزایش درون شیشه‌ای *Begonia lucerna* Hort.، پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم باغبانی- دانشگاه شیراز. ۵۱ صفحه.

۲- امیدبیگی، ر. ۱۳۷٤. اسانس، زمینه‌ای برای صادرات. مجله صنایع آرایشی و بهداشتی ۵۲-۲:۵۰.

۳- امیدبیگی، ر. ۱۳۷٤. رهیافت های تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد اول. انتشارات فکر روز. تهران. ۲۸۳ ص.

٤- امیدبیگی، ر، ۱۳۷۹. رهیافت های تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد سوم. موسسه چاپ و انتشارات آستان قدس رضوی. مشهد. ۳۹۷ ص.

www.SID.ir

Archive of SID

۵- تورز، ک. ۱۳۷۳. فنون کشت بافت (برای گیاهان باغبانی). برگردان از مرتضی خوشخوی. انتشارات دانشگاه شیراز. ٤٣٦ ص.

٦- رضازاده، ر. ۱۳۷۷. افزایش درون شیشه‌ای لیمو شیرین. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم باغبانی- دانشگاه شیراز. ۸۱ ص.

۷- زرگری، ع. ۱۳۷۰. گیاهان دارویی. جلد سوم (۹۱٦ ص), جلد چهارم (۹٦۸ ص) و جلد پنجم (۹۷٤ ص). موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران.

8. Bidwell, S.D., J.W. Pederick, J. Sommer-Knudsen and I.E. Woodrow. 2001. Micropropagation of the nickel hyperaccumulator, *Hybanthus floribundus* (family Violaceae).Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 67:89-92.
9. Chambon, C., A. Poupet, D. Beck, B. Bettachini and J. Touche. 1992. The *in vitro* morphogenetic potential of various clones of lavender and lavandin: Preliminary observations on the agronomic value of *in vitro* plants. Agronomie 12:173-181.
10. Erzen-Vodenica, M. and D. Baricevic. 1996. Tissue propagation of medicinal and aromatic plants. University of Lyublijana, (Slovenia). 201-206.
11. Faraco, F. and S. Echeverrigaray. 2001. Micropropagation of *Cunila galioides,* a popular medicinal plant of south Brazil. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 64:1-4.
12. Furmanowa, M. and O. Olszowska. 1980. *Thymus vulgaris* L. propagation through tissues culture. Acta Polon. Pharm. 37:243-247.
13. Hammerschlag, F.A. and R.E. Litz. 1992. Somaclonal variation. Biotechnology of Perennial Fruit Crop. Cambridge Univ. Press Cambridge, U.K. 550 p.
14. Hornok, L. 1992. Cultivation and Processing of Medicinal Plants. Academiai Kiado. Budapest, Hungary. 338p.
15. Le, C.L. 1980. *In vitro* propagation by microcutting in thyme (*Thymus vulgaris*). Revue-Suisse-do-Viticulture, d'Aboriculture-et-d'Horticulture 21:355-358.
16. Letchamo, W. and A. Gosselin. 1996. Transpiration, essential oil glands, epicuticular wax and morphology of *Thymus vulgaris* are infeluenced by light intensity and water supply. J. Hort. Sci. 71:123-134.
17. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
18. Olszowska, O. and M. Furmanowa. 1987. Micropropagation of thyme (*Thymus vulgaris*). Revue-Suisse-do-Viticulture, d'Arboriculture-et-d'Horticulture 21:355-358.
19. Prakash, V. 1990. Leafy Spices. CRS Press. Boca Ra. U.S.A. 114 p.
20. Reddy, S., P. Rodrigues and R. Rajasekharan. 2001. Shoot organogenesis and mass propagation of *Coleus forskohlli* from leaf derived callus. Plant Cell, Tiss. Org. Cult.66:183-188.
21. Saez, F. 1996. Micropropagation of *Thymus piperella.* Beitrage Zur Zuchtungs Forschung-Bundesarstalt fur zu Chutung on Kulturepflanzen 2:311-314.
22. Saez, F., P. Sanches and A. Piqueras. 1994. Micropropagation of *Thymus piperella.* Plant Cell Tiss. Org. Cult. 39:269-272.
23. Sajina, A., S.P. Geetha, D. Minoo, J. Rema, K.N. Babu, A.K. Sadanandan and P.N. Ravindran. 1996. Micropropagation of some important herbal spices. Indian Soc. Spices. 79-86.
24. Salehi, H. and M. Khosh-Khui. 1996. Micropropagation of miniature rose cultivars. Iran Agric. Res. 15:51-67.

www.SID.ir