Archive of SID

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۴، شماره ۲، صفحه ۲۷۶-۲۶۴ (۱۳۹۵)

بررسی اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی و نوع ریزنمونه بر میزان القای کالوس، رویان‌زایی و باززایی شاخساره مرزنجوش بخارایی (*Origanum vulgare* ssp. *gracile*)

بهمن حسینی*[1] و افسانه بی‌قامت[2]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

پست الکترونیک: b.hosseini@urmia.ac.ir

۲- کارشناس ارشد گیاهان دارویی، علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۹

چکیده

مرزنجوش بخارایی (*Origanum vulgar* ssp. *gracile*) از گیاهان دارویی متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) می‌باشد. ترکیب غالب اسانس آن را کارواکرول تشکیل می‌دهد. در این تحقیق تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D در ترکیب با BAP بر روی کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف (کوتیلدون، هیپوکوتیل، گره، نوک شاخه و برگ) گیاه مرزنجوش بخارایی بررسی شد. اثر متقابل نوع محیط کشت در نوع ریزنمونه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. در ریزنمونه برگ حداکثر القای کالوس (۱۰۰ درصد) در تیمارهای ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و در ریزنمونه گره در تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D حداکثر درصد القای کالوس (۹۳/۳ درصد) مشاهده شد. تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP کمترین میزان القای کالوس (صفر درصد) را در ریزنمونه برگ نشان داد. بیشترین درصد تولید کالوس رویان‌زا در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در ریزنمونه نوک شاخه به‌دست آمد و کمترین میزان در محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی و محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در همه ریزنمونه‌ها و در محیط حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ریزنمونه هیپوکوتیل مشاهده شد. با افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D رویان‌زایی کاهش یافت و در بین ریزنمونه‌ها نوک شاخه و گره بالاترین درصد رویان‌زایی را داشتند. در آزمایش بررسی اثر BAP در شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها، بیشترین میزان شاخه‌زایی (۱۰۰ درصد) در ریزنمونه گره و نوک شاخه در هر دو تیمار صفر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، بنزیل‌آمینو پورین، توفوردی، وزن تر.

مقدمه

مرزنجوش بخارایی (*Origanum vulgare* ssp. *gracile*)، گیاهی چند ساله و غنی از ترکیبات معطر است که بومی اروپا بوده و به‌فراوانی در دامنه‌های سنگی و در قسمت‌های وسیعی از ارتفاعات نواحی کوهستانی ایران رشد می‌کند (EL-Gangaihi *et al.*, 2006; Padulois, 1997). اسانس گیاه مرزنجوش عمدتاً از کارواکرول، گاماترپینن، پاراسیمن، آلفاپینن، میرسن و تیمول تشکیل شده‌است و دارای فلاونوئید ازجمله نارینجین و مشتقات کافئیک اسید به‌ویژه رزماریک اسید است (Lagrow, 2004). این گیاه در نواحی شمال، غرب،

www.SID.ir

Archive of SID

شمال‌غرب، شمال‌شرق و در استان‌های گیلان، مازندران، کردستان و آذربایجان پراکنش دارد (Lagrow, 2004). مرزنجوش در طب سنتی ایران و سرزمین‌های دیگر به‌عنوان مقوی، مدر، آرام‌بخش و التیام‌دهنده زخم‌ها استفاده شده است. از اجزای مختلف گیاه مرزنجوش و عصاره‌های بیوشیمیایی آن در صنایع غذایی به‌عنوان ادویه، در صابون‌سازی برای معطر-کردن و در فراورده‌های آرایشی استفاده می‌شود (Zargari, 1987; Padulois, 1997).

استفاده از روش‌های سنتی، وقت‌گیر و کم‌بازده تحت تأثیر شرایط مختلف محیطی بوده، بنابراین امکان تکثیر گیاهان یکنواخت، همگن و پربازده از طریق روش‌های سنتی فراهم نبوده و کشت بافت گیاهی روش مناسبی برای تولید کلن گیاهی می‌باشد (Singh, 2005). از طرف دیگر برداشت بی‌رویه گیاهان دارویی در مراتع منجر به زوال این گونه ارزشمند شده است و تلاش برای استفاده از روشهای نوین برای حفظ، نگهداری و تکثیر این گونه دارویی بسیار ارزشمند می‌باشد. کشت سلول، بافت و اندام‌های گیاهی امکان تکثیر انبوه و سریع گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه را در شرایط درون شیشه‌ای فراهم می‌کند. با استفاده از کشت درون شیشه گیاه، علاوه بر دسترسی به منبع اولیه دارو در شرایط کنترل‌شده و مستقل از محیط، افزایش تولید ترکیبات نسبت به گیاه و تولید ترکیبات جدید نیز امکان‌پذیر می‌شود (Bourgaud *et al.*, 2002). کالوس می‌تواند در تهیه پروتوپلاست، تولید رویان بدنی، تولید اندام‌های ریشه و ساقه و تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گیرد (Hasandokht & Ebrahimi, 2006).

مطالعه در مورد رویان‌زایی بدنی جنبه‌های علمی و کاربردی زیادی دارد. رویان‌زایی بدنی به‌دلیل امکان تولید بیشتر و مداوم توده رویان‌زا، روش مناسب برای تکثیر است (Khosravi *et al.*, 2007). در مطالعه‌ای در گیاه مرزنجوش سطوح پایین 2,4- D (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) بیشترین میزان کالوس‌زایی را نشان داد (Arafeh *et al.*, 2006). در این رابطه EL-Gangaihi و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط کشت پایه MS بهترین نتیجه از القای کالوس را در گونه‌های مرزنجوش نشان داد. در تحقیقی Ahmadi و همکاران (۲۰۱۳) در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) از غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D، BAP و Kin استفاده کردند که تیمار تنظیم‌کننده رشد گیاهی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌تنهایی یا به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP یا Kin بیشترین میزان کالوس را تولید کرد. در این آزمایش مشاهده شد که غلظت‌های پایین سیتوکنین در محیط حاوی اکسین تأثیر مطلوبی بر کالوس‌زایی دارد. در ترکیب‌های مختلف 2,4-D و BAP در آزمایش کالوس‌زایی گونه *Gymnema sylvestre*، ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP حداکثر کالوس‌زایی (۸۰ درصد) را نشان داد (Roy *et al.*, 2008). در مطالعه‌ای بر روی شنبلیله Afshari و همکاران (۲۰۱۰) از ۴ ریزنمونه (ساقه، برگچه حاوی دمبرگ، رویان و هیپوکتیل) استفاده کردند و بهترین ریزنمونه برای کالوس‌زایی در محیط کشت پایه MS ریزنمونه جنین گزارش شد. در بررسی که Ishii و همکاران (۱۹۹۸) در گیاه *Phalaenopsis* انجام دادند، گزارش کردند که در ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشترین میزان القای کالوس رویان‌زا به‌وجود آمد. یک‌دهم میلی‌گرم در لیتر2,4-D به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP القاء کالوس رویان‌زا را در گونه *Gossypium hirsutum* موجب شده است، از دو ریزنمونه هیپوکتیل و کوتیلدون مورد استفاده، ریزنمونه هیپوکتیل برای القای کالوس بسیار مناسب گزارش شد (Adben & Khalafallah, 2008).

گیاه دارویی مرزنجوش بخارایی از گیاهان دارویی بسیار مهم و ارزشمند عرصه طبیعی ایران می‌باشد که مطالعه‌ای در حوزه تکثیر درون شیشه آن انجام نشده است و امروزه با شناخت بیشتر آن در عرصه، جمع‌آوری آن شدت یافته است و احتمال می‌رود در چند سال آینده به‌دلیل مدیریت ناصحیح، در لیست گیاهان در معرض خطر انقراض قرار گیرد. به‌همین منظور مطالعات اولیه برای تکثیر درون شیشه‌ای این گیاه آغاز شده است. در این مطالعه اثر متقابل تنظیم‌کننده رشد گیاهی و ریزنمونه‌های متفاوت به‌منظور القای کالوس و همچنین تولید

www.SID.ir

Archive of SID

کالوس‌های رویان‌زا و باززایی شاخساره بررسی شد تا بهترین ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی و مناسبترین ریزنمونه برای تکثیر درون شیشه آن انتخاب شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذرهای گیاه مرزنجوش بخارایی جمع‌آوری شده از عرصه طبیعی شهرستان سقز استان کردستان، با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه در حالت غوطه‌وری ضدعفونی و پس از آن ۳ بار با آب دو بار تقطیر شستشو و در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی و با آب دو بار تقطیر چند بار شستشو داده شدند.

کشت بذر: بذرها پس از ضدعفونی سطحی، در فلاسک‌های حاوی محیط کشت MS جامد کشت شدند. سپس در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲±۲۵، نور سفید فلورسنت و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس قرار گرفتند.

***آزمایش ۱* – بررسی اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D در ترکیب با BAP بر میزان وزن تر، کالوس‌زایی و رویان‌زایی ریزنمونه‌های مختلف مرزنجوش بخارایی**

آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در ۶ تکرار و هر تکرار حاوی ۵ ریزنمونه انجام شد. در این آزمایش فاکتور اول محیط کشت پایه MS حاوی غلظت‌های مختلف 2,4-D در چهار سطح (شامل ۰، ۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و فاکتور دوم ریزنمونه‌های مختلف در پنج سطح شامل کوتیلدون، هیپوکوتیل، برگ، گره و نوک شاخه بود. ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون ۷ روز پس از کشت بذر در محیط کشت پایه MS از گیاهچه‌های ۳ تا ۴ روزه تهیه و ریزنمونه‌های برگ، گره و نوک شاخه از گیاهچه‌های ۲۰ روزه تهیه شدند. کالوس‌های تهیه شده هر ۳ هفته یکبار در محیط کشت تازه واکشت شده و پس از ۹ هفته، درصد کالوس‌زایی و درصد رویان‌زایی بدنی و وزن تر و وزن خشک کالوس‌ها ثبت شد. لازم به ذکر است که پس از تعیین وزن تر، برای خشک کردن کالوس‌ها از آون دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت استفاده شد.

نمادهایی که برای نمایش دادن نوع تیمارها و غلظت‌های مورد استفاده در این آزمایش به‌کار گرفته شد، عبارتند از:

فاکتور اول: T (نماد ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی)

T_1: غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP

T_2: غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

T_3: غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

T_4: غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

فاکتور دوم: A (نماد ریزنمونه‌های مختلف)

کوتیلدون (A_1)، هیپوکوتیل (A_2)، برگ (A_3)، گره (A_4)، نوک شاخه (A_5).

***آزمایش ۲* – بررسی اثر غلظت‌های مختلف BAP بر شاخه‌زایی ریزنمونه‌های مرزنجوش بخارایی**

این آزمایش به‌منظور بررسی اثر BAP بر شاخه‌زایی ریزنمونه‌های مختلف مرزنجوش بخارایی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در ۶ تکرار و هر تکرار حاوی ۵ ریزنمونه انجام شد. در این آزمایش، فاکتور اول محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف BAP در دو سطح شامل (۰ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و فاکتور دوم ریزنمونه‌های مختلف در پنج سطح شامل کوتیلدون، هیپوکوتیل، برگ، گره و نوک شاخه بود. ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون ۷ روز پس از کشت بذر از گیاهچه‌های ۳ تا ۴ روزه تهیه و ریزنمونه‌های برگ، گره و نوک شاخه از گیاهچه‌های ۲۰ روزه تهیه شدند. پس از دو بار واکشت درصد شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها ثبت شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری: پس از انجام بررسی‌ها و اندازه‌گیری صفات مورد نظر، داده‌های به‌دست آمده برای هریک از این صفات به‌طور جداگانه با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 مورد

www.SID.ir

Archive of SID

تجزیه واریانس قرار گرفته و میانگین‌های حاصل با استفاده از آزمون دانکن دسته‌بندی شدند. برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده شد.

نتایج

آزمایش ۱- بررسی اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D در ترکیب با BAP بر میزان وزن تر، کالوس‌زایی و رویان‌زایی ریزنمونه‌های مختلف مرزنجوش بخارایی

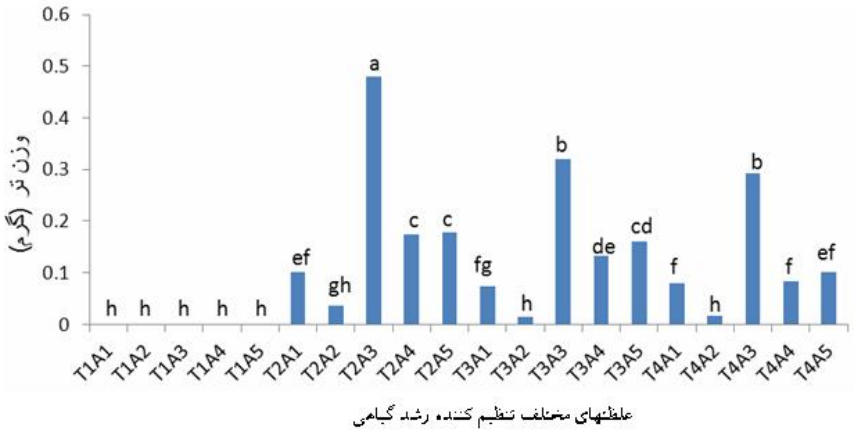
الف: بررسی غلظت‌های مختلف 2,4-D بر ریزنمونه‌های مختلف مرزنجوش بخارایی

این آزمایش به‌منظور ارزیابی غلظت‌های مختلف 2,4-D در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بر وزن تر ریزنمونه‌های مختلف انجام شد. وزن تر کالوس در ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌ترتیب ۰/۳۲۰ و ۰/۲۹۲ گرم به‌دست آمد. کمترین میزان (فاقد کالوس) در محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP در تمامی ریزنمونه‌ها مشاهده شد. غلظت پایین 2,4-D نسبت به غلظت‌های بالا وزن تر بیشتری از کالوس را تولید کرد و ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل به‌ترتیب بیشترین و کمترین وزن تر را تولید کردند (شکل ۱).

جدول ۱- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثرات غلظت‌های مختلف 2,4-D در کالوس‌زایی، وزن تر، وزن خشک و رویان‌زایی ریزنمونه‌های مختلف مرزنجوش بخارایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر	وزن خشک	درصد کالوس‌زایی	رویان‌زایی بدنی
2,4-D	۳	۰/۱۱۳**	۰/۰۰۰۶۲**	۵۹/۲۵**	۱۲/۱۵۳**
ریزنمونه	۴	۰/۰۸۹**	۰/۰۰۰۴۹**	۶/۶۵**	۶/۴۸۶**
اثر متقابل 2,4-D و نوع ریزنمونه	۱۲	۰/۰۱۷**	۰/۰۰۰۰۹**	۲/۰۲**	۱/۵۲۸**
خطا	۴۸	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۰۰۳	۰/۲۲۸۳	۰/۰۵۵
ضریب تغییرات (٪)		۲۷/۴۹	۲۵/۹۸	۲۲/۱۲	۲۵/۹۹

**: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



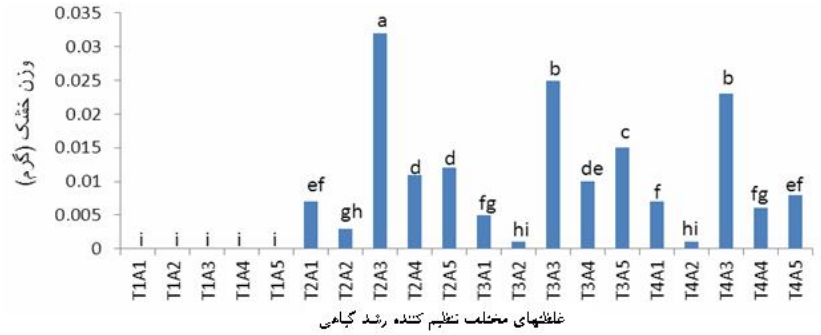
شکل ۱- مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف 2,4-D در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بر وزن تر کالوس ریزنمونه‌های مختلف مرزنجوش بخارایی. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن می‌باشد. T نشان‌دهنده سطوح 2,4-D است که همه سطوح آن با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP توام می‌باشد؛ T1: فاقد 2,4-D، T2: ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، T3: ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و T4: ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D. A نشان‌دهنده نوع ریزنمونه می‌باشد؛ A1: کوتیلدون، A2: هیپوکوتیل، A3: برگ، A4: گره، A5: نوک شاخه.

www.SID.ir

Archive of SID

اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر وزن خشک ریزنمونه‌های مختلف مرزنجوش بخارایی

اثرات متقابل 2,4-D و ریزنمونه‌های مختلف در سطح احتمال ۱ درصد بر وزن خشک کالوس معنی‌دار بود (جدول۱). حداکثر وزن خشک ۰/۰۳۲ گرم در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و در ریزنمونه برگ ثبت شد. ریزنمونه برگ در تیمارهای ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌ترتیب ۰/۰۲۵ و ۰/۰۲۳ گرم وزن خشک تولید کرد. به‌طوری‌که کمترین میزان وزن خشک در تیمار بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D مشاهده گردید. در بین ریزنمونه‌ها، برگ بیشترین و هیپوکوتیل کمترین میزان وزن خشک را تولید کرد (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف 2,4-D در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بر وزن خشک کالوس ریزنمونه‌های مرزنجوش بخارایی. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن می‌باشد. T نشان‌دهنده سطوح 2,4-D است که همه سطوح آن با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP توام می‌باشد؛ T1: فاقد 2,4-D، T2: ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، T3: ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و T4: ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D. A نشان‌دهنده نوع ریزنمونه می‌باشد؛ A1: کوتیلدون، A2: هیپوکوتیل، A3: برگ، A4: گره، A5: نوک شاخه.

بررسی غلظت‌های مختلف 2,4-D در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بر القای کالوس ریزنمونه‌های مختلف

پس از اعمال تیمارها، صفات مورد نظر ارزیابی و تجزیه واریانس شده و میانگین‌های حاصل از طریق آزمون دانکن مورد مقایسه قرارگرفت که نتایج در جدول ۱ نشان داده شده‌است. تجزیه داده‌ها نشان داد که اثرات متقابل ریزنمونه در ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی در سطح ۱ درصد بر میزان القای کالوس معنی‌دار بود. حداکثر میزان القای کالوس (۱۰۰ درصد) در محیط کشت MS حاوی ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ریزنمونه برگ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد و ریزنمونه نوک شاخه در محیط کشت MS حاوی ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ریزنمونه گره در تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۹۳/۳ درصد القای کالوس در رده‌های بعدی قرار داشتند (شکل ۵ الف). کمترین میزان القای کالوس (صفر درصد) در تیمارهای فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP برای تمامی ریزنمونه‌ها مشاهده شد و پس از آن ریزنمونه هیپوکوتیل در تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۲۰ درصد القای کالوس در رده بعدی قرار داشت. بهترین محیط کشت و ریزنمونه در القای کالوس، محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ریزنمونه برگ بود (شکل ۳).

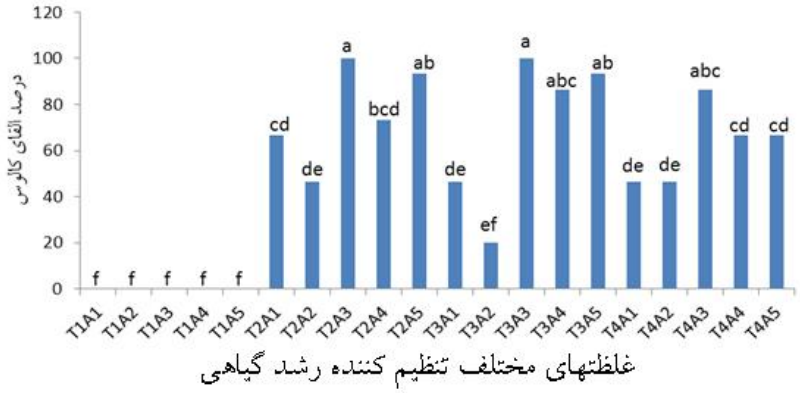
بررسی غلظت‌های مختلف 2,4-D بر درصد القای رویان-زایی بدنی ریزنمونه‌های مختلف مرزنجوش بخارایی

براساس نتایج به‌دست آمده، بیشترین درصد تولید کالوس رویان‌زا در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم 2,4-D در لیتر در ریزنمونه نوک شاخه مشاهده شد و کمترین میزان القای کالوس رویان‌زا در محیط کشت MS فاقد 2,4-D در همه ریزنمونه‌ها و در محیط حاوی ۵

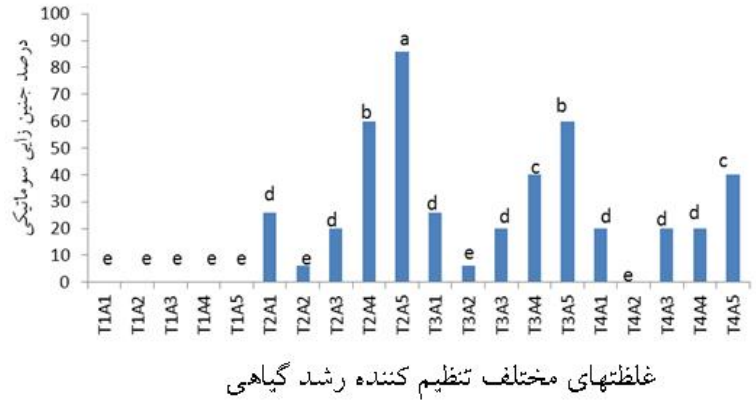
www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌گرم 2,4-D در لیتر در ریزنمونه هیپوکوتیل مشاهده شد. با افزایش غلظت 2,4-D رویان‌زایی کاهش یافته است و در بین ریزنمونه‌ها نوک شاخه و گره بالاترین درصد رویان‌زایی را داشتند (شکل ۴ و شکل ۵ ب و ج). پس از القای کالوس رویان‌زا، انتقال ریزنمونه‌ها به محیط بدون اکسین منجر به باززایی شاخساره از کالوس شد (شکل ۵ د).



شکل ۳- مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف 2,4-D در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بر درصد القای کالوس ریزنمونه‌های مختلف مرزنجوش بخارایی. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن می‌باشد. T نشان‌دهنده سطوح 2,4-D است که همه سطوح آن با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP توام می‌باشد؛ T1: فاقد 2,4-D، T2: ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، T3: ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و T4: ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D. A نشان‌دهنده نوع ریزنمونه می‌باشد؛ A1: کوتیلدون، A2: هیپوکوتیل، A3: برگ، A4: گره، A5: نوک شاخه.



شکل ٤- مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف 2,4-D در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بر درصد رویان‌زایی بدنی ریزنمونه‌های مرزنجوش بخارایی. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن می‌باشد. T نشان‌دهنده سطوح 2,4-D است که همه سطوح آن با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP توام می‌باشد؛ T1: فاقد 2,4-D، T2: ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، T3: ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و T4: ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D. A نشان‌دهنده نوع ریزنمونه می‌باشد؛ A1: کوتیلدون، A2: هیپوکوتیل، A3: برگ، A4: گره، A5: نوک شاخه.

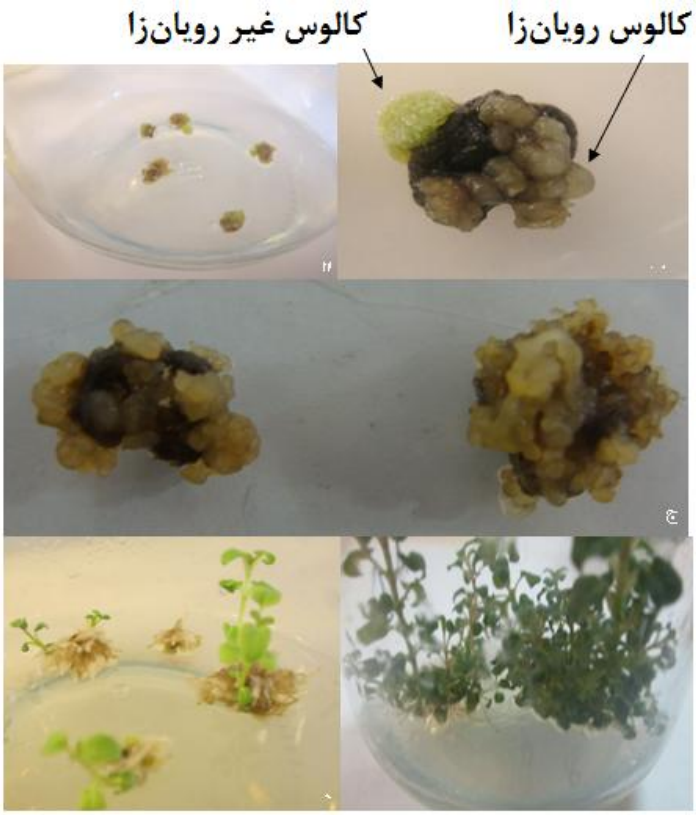
آزمایش ۲: بررسی اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد BAP بر شاخه‌زایی ریزنمونه‌های متفاوت

اثرات متقابل غلظت‌های مختلف BAP و ریزنمونه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد بر درصد شاخه‌زایی معنی‌دار بود (جدول ۲). بیشترین میزان شاخه‌زایی (۱۰۰ درصد) در ریزنمونه گره و نوک شاخه در هر دو تیمار صفر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و کمترین میزان در ریزنمونه کوتیلدون و برگ در تیمار فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی

www.SID.ir

Archive of SID

به‌دست آمد (شکل ۶). با وجود تولیدنشدن کالوس در محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی و محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ریزنمونه‌های نوک شاخه و گره در این محیط کشت‌ها بالاترین میزان باززایی مستقیم را نشان دادند و در بقیه محیط کشت‌ها باززایی مستقیم مشاهده نشد (شکل ۵ ر).



شکل ۵- القای کالوس، رویان‌زایی و باززایی گیاه مرزنجوش بخارایی در محیط‌های کشت پایه MS حاوی ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاهی. **الف: القای کالوس در محیط کشت حاوی 2,4-D و BAP**، ب: **تولید کالوسهای رویان‌زا و غیررویان‌زا در یک ریزنمونه نوک شاخه**، ج: **رشد کالوسهای رویان‌زا در محیط کشت حاوی غلظت پایین** تنظیم‌کننده رشد گیاهی **2,4-D و BAP**، د: **باززایی غیرمستقیم شاخساره از کالوس**، ر: **باززایی مستقیم شاخساره از ریزنمونه نوک شاخه در محیط کشت MS حاوی** تنظیم‌کننده رشد گیاهی **BAP**

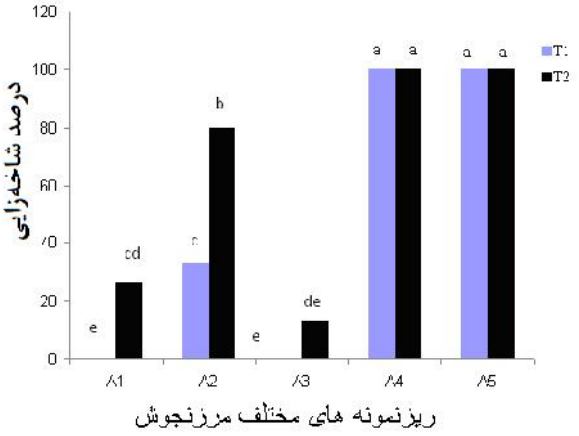
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس بررسی اثرات BAP بر شاخه‌زایی ریزنمونه‌های مختلف مرزنجوش بخارایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد شاخه‌زایی
(B) BAP	۱	۵/۶۳**
ریزنمونه (A)	۴	۳۰/۴۶**
اثر متقابل (B*A)	۴	۱/۴۶**
اشتباه آزمایشی	۱۸	۰/۲۱۸۵
ضریب تغییرات (٪)		۱۶/۸۹

**: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٦- بررسی مقایسه میانگین غلظت صفر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP برای **شاخه‌زایی ریزنمونه‌های مختلف. حروف غیر مشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن می‌باشد. T1: بدون** تنظیم‌کننده رشد گیاهی، **T2: ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، A1: کوتیلدون، A2: هیپوکوتیل، A3: برگ، A4: گره و A5: نوک شاخه.**

بحث

حداکثر وزن تر و وزن خشک کالوس در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ریزنمونه برگ مشاهده شد و کمترین میزان کالوس در محیط کشت MS فاقد 2,4-D در تمامی ریزنمونه‌ها مشاهده شد. تأثیر وجود اکسین به‌تنهایی و یا در حضور سیتوکنین در بیشترین درصد وزنی می‌تواند به‌علت تفاوت در وجود تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی درون‌زا در گیاهان مختلف باشد (Sarkheil1 *et al.*, 2009). برخی از گیاهان دارای اکسین درون‌زا می‌باشند و در صورت استفاده از اکسین خارجی به‌ویژه 2,4-D باعث تحریک سنتز بیشتر اکسین در داخل گیاه شده و این امر باعث تولید کالوس بیشتر در ریزنمونه‌ها می‌شود (Rostami *et al.*, 2011). اثر 2,4-D بر میزان القای کالوس در نمونه-های برگ گیاه چای توسط Nicolaeva و همکاران (۲۰۰۹) مورد بررسی قرار گرفت. آنان مشاهده کردند که افزایش غلظت این تنظیم‌کننده رشد گیاهی باعث کاهش رشد و القای کالوس می‌شود که با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد (شکل ۳). غلظت‌های خیلی زیاد تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D ممکن است برای بیان ژن‌های درگیر در تقسیم سلولی و تمایززدایی بافت، مهارکننده باشد (Mahmood *et al.*, 2012). نتایج مطالعه نشان داد برای تولید کالوس وجود تنظیم‌کننده رشد گیاهی ضروری است و در محیط کشت بدون اکسین تشکیل کالوس مشاهده نشد. البته نتایج مشابهی نیز در این رابطه توسط محققان دیگر در چند گونه گیاهی گزارش شده‌است (Ahmad *et al.*, 2011, Abd Elaleem *et al.*, 2009). همچنین گزارش شده است که جنس داتوره برای تولید کالوس به حضور همزمان اکسین و سیتوکینین نیازمند است (Dessouky *et al.*, 2001). ترکیب تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D و سیتوکینین در تسهیل القای کالوس و حفظ آن مؤثر است (Abd Elaleem *et al.*, 2009). اگرچه نمو کالوس در غلظت‌های مختلف BAP و 2,4-D انجام می‌شود (Wang *et al.*, 1985)، اما با این حال مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد گیاهی بر میزان رشد کالوس نشان داد که افزایش غلظت 2,4-D اثر بازدارنده روی رشد و القای کالوس دارد (Park *et al.*, 2001). بنابراین می‌توان گفت که در این پژوهش محیط حاوی غلظت پایین 2,4-D درصد کالوس-زایی بهتری را نشان داد و با نتایج سایر پژوهش‌ها (Arafeh *et al.*, 2006; Pola *et al.*, 2009; Rostampur *et al.*, 2010) مطابقت داشت. در این رابطه Hooker و Nabors (۱۹۷۷) نشان دادند که ترکیب 2,4-D و BAP نسبت به IAA یا NAA کالوس بیشتری را تولید می‌کند.

www.SID.ir

Archive of SID

البته تفاوت در القای کالوس در ریزنمونه‌های مختلف ممکن است به‌علت تفاوت در نسبت اکسین به سیتوکینین در بافت گیاه مورد مطالعه باشد (Centeno *et al*., 1996). تنوع در توانایی تشکیل کالوس از ریزنمونه‌های مختلف در گیاهان دیگر نیز گزارش شده است (Ishii *et al*., 1998).

بنابراین نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نوع ریزنمونه در تولید کالوس بسیار مؤثر می‌باشد. البته انتخاب ریزنمونه و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مناسب تأثیر چشمگیری در القای کالوس و باززایی دارد (Khawar *et al*.,2005). در تمام محیط کشت‌های بررسی شده در این مطالعه، درصد کالوس‌زایی حاصل از ریزنمونه برگ نسبت به بقیه بیشتر بود که با نتایج Te-chato و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت داشت که می‌تواند به‌علت خراش‌دهی ریزنمونه‌های برگ باشد. نتایج ما در مورد القای کالوس در ریزنمونه‌های مختلف با نتایج سایر پژوهش‌های انجام شده در این زمینه (Pandey *et al*., 2013; Mohajer *et al*., 2012; Dennis *et al*., 2011) مطابقت داشت. داده‌های به‌دست آمده برای ریزنمونه‌های مختلف در واکنش به کالوس‌زایی نشان داد که با توجه به نوع ریزنمونه، غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی تغییر کرده و هرگونه ایجاد زخم در ریزنمونه‌های مورد استفاده موجب تحریک تشکیل کالوس شده است و این امر تفاوت چشمگیری را در روند کالوس‌زایی و باززایی اعمال می‌کند. در این رابطه مطالعات متعددی وجود دارند که صحت نتایج این مطالعه را تأیید می‌کنند (Mandal & Gupta, 2001; Sujatha & Dinesh-Kumar, 2007; Basalma *et al*., 2008).

تأثیر موفقیت‌آمیز استفاده از 2,4-D در تولید کالوس رویان‌زا توسط (Yang *et al*., 2008; Pola *et al*., 2009) به تنهایی و نیز در ترکیب با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی سیتوکینینی گزارش شده‌است. تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مخصوصاً اکسین‌ها در تحریک تقسیم سلولی و بعد القای رویان‌زایی برای تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی گزارش شده‌است (Turker *et al*., 2010). در ارتباط با مؤثر بودن 2,4-D در القاء و تولید کالوس رویان‌زا در سیب‌زمینی، Rostami و همکاران (۱۳۸۸) بیان کردند با افزایش این تنظیم‌کننده رشد گیاهی در محیط تا حد آستانه تحمل، به تولید اکسین درون‌زا کمک شایانی می‌کند و این امر باعث القا و تولید رویان بدنی می‌شود.

سیتوکینین‌ها به‌عنوان مهمترین فاکتور مؤثر در باززایی ساقه به اثبات رسیده‌اند و اثرات چشمگیر آنها شاید با تغییرات بافت‌شناسی بافت‌های القا شده مرتبط باشد (Neibaur *et al*., 2008). در گونه *Taxus wallichiana* گزارش شده‌است که با افزایش سیتوکینین و کاهش اکسین، باززایی افزایش می‌یابد (Datta & Jha, 2004). غلظت‌های کم سیتوکینین در گل داوودی می‌تواند درصد جوانه‌زنی از برگ را افزایش دهد (Rout *et al*., 2006). در گیاه *Possiflora suberosa* استفاده از BAP میزان باززایی از این گیاه را افزایش داد (Garcia *et al*., 2011). البته اندام‌زایی در شرایط درون شیشه به استفاده از تنظیم‌کننده رشد گیاهی و همچنین به توانایی بافت‌ها برای پاسخ به این تغییرات تنظیم‌کننده رشد گیاهی در طول کشت وابسته است (Akbas *et al*., 2009).

میزان باززایی در محیط حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی به نوع ریزنمونه مورد استفاده نیز بستگی دارد. در انتخاب بهترین ریزنمونه برای تکثیر درون‌شیشه‌ای گیاهان علفی و چوبی فاکتورهای متعددی مانند ژنوتیپ، نوع و سن ریزنمونه، شرایط فیزیولوژیک و رشدی ریزنمونه، موقعیت ریزنمونه بر روی گیاه مادری روی رشد و نمو آن مؤثر می‌باشد. البته هر چه ریزنمونه جوان و از قسمت‌های بالاتر گیاه تهیه شود احتمال موفقیت در کشت بافت بیشتر خواهد بود (باقری و آزادی، ۱۳۸۱). به‌همین دلیل به‌نظر می‌رسد یکی از دلایل عملکرد موفقیت‌آمیز ریزنمونه نوک شاخه و گره نسبت به سایر ریزنمونه‌ها، موقعیت آنها بر روی گیاه مادری باشد. در یک بررسی بر روی باززایی مستقیم فلفل (*Capssicum annume*) از ریزنمونه نوک شاخه به‌عنوان ریزنمونه کشت درون شیشه‌ای استفاده شد و نتایج باززایی بسیار مناسبی گزارش شد (Sobhakumari & Lalithakumari, 2003).

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که وجود تنظیم‌کننده رشد گیاهی اکسینی برای القای کالوس لازم است و در محیط فاقد اکسین کالوس تشکیل نشد. بهترین تیمار القای کالوس مربوط به محیط کشت دارای ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و در ریزنمونه برگ به‌دست‌آمد. به‌طوری‌که بیشترین وزن تر و خشک نیز در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و در ریزنمونه برگ مشاهده گردید. کمترین میزان القای کالوس و وزن تر و خشک در تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. با افزایش غلظت 2,4-D کالوس‌زایی، وزن تر و خشک و رویان‌زایی کاهش پیدا کرد. در بین ریزنمونه‌ها برگ و هیپوکوتیل به‌ترتیب بیشترین و کمترین کالوس‌زایی و وزن تر و خشک را نشان دادند و ریزنمونه نوک شاخه بهترین ریزنمونه برای رویان-زایی ثبت شد. البته بیشترین میزان شاخه‌زایی (۱۰۰ درصد) در ریزنمونه گره و نوک شاخه در هر دو تیمار صفر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و کمترین میزان در ریزنمونه کوتیلدون و برگ در تیمار فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی به‌دست آمد.

منابع مورد استفاده

–Abd Elaleem, K.G., Modawi, R.S. and Khalafalla, M.M., 2009. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. African Journal of Biotechnology, 8: 2529-2534.

–Abdi, G. and Hedayat, M., 2009. Callus induction and plant regeneration in *Tanacetum cinerariaefolium* (Trevir.) Schultz-Bip: an important medicinal plant. Horticulture, Environment and Biotechnology, 50: 347- 351.

–Abdin, M.Z. and Kamaluddin, A., 2006. Improwing quality of medicinal herbs through physio- chemical and molecular approaches, in traditional systems of medicine. Narosa India Publishing, House Pvt. Ltd, New Dehli.

–Afshari, E., Ranjbar, G.A., Kazemitabar, S.K., Riasat, M. and Kazemi Poshtmasari, H., 2011. Callus induction, Somatic embryogenesis and plant regeneration in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 27: 147-160.

–Ahmad, N., Fazal, H. and Zamir, R., 2011. Callogenesis and shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert.). Sugar Tech., 13: 174-177.

–Ahmadi, J., Mohammadi, R., Garousi, Gh. and Hosseini, R., 2013. Optimization of Callus Induction and Cell Suspension in *Catharanthus roseus*. Agricultural Biotechnology, 4: 1-18.

–Akbas, F., Isikalan, C. and Namli, S. 2009. Callus induction and plant regeneration from different explants of *Actinidia deliciosa*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 158: 470-475.

–Arafeh, M.R., Shibli, A., Al-Mahmoud, M. and Shatanwi, M.A., 2006. Callusing cell suspension culture and secondary metabolites production in Persian oregano(*Origanum vulgare* L.) and Arabian oregano (*Origanum. syriacum* L.), Jordan Journal of Agricultural Sciences, 2: 274-284.

–Basalma, D., Uranbey, S., Mirici, S. and Kolsarici, O., 2008. TDZ×IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and *in vitro* multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). African Journal of Biotechnology, 7: 960-966.

–Bourgaud, F., Gravot, A. and Goniter, E., 2002. Production of plant secondary metabolites. Plant Science, 161: 839-851.

–Centeno, M.l., Rodriguez, A., Feito, I. and Fernandez, B., 1996. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic respnses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures. Plant Cell Reports. 16:58-62.

–Datta, M.M. and Jha, S., 2004. Embryo culture of *Taxus wallichiana* (Zucc.). Journal of Plant Biotechnology, 6: 213-219.

–Dennis, T.T. and Maseena, E.A., 2006. Callus induction and plant regeneration in *Cardiospermum kalicacabum* L. an important medicinal plant. Scientia Horticulturae, 108: 332-336.

–Dessouky, M., Taha, H. and El-Bahr, M., 2001. Enhancement of alkaloids production in suspension cultures of *Datura stramonium* L. and *Datura metel* L. Biotechnology, 4: 23-30.

–El-Gengaihi, S., Taha, H.S. and Kamel, A.M., 2006. *In vivo* and *in vitro* comparative studies of *Origanum* species. Journal of Food, Agriculture and Environment, 4: 127-134.

–Garcia, R., Pacheco, G., Falcao, E. and Borges, G., 2011. Influence of type of explant, plant regulators, salt composition of basal medium and light on callogenesis in *Passiflora subersoa* L. (Passifloraceae). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 106: 47-45.

www.SID.ir

Archive of SID

–Mahmood, I., Razzaq, A., Khan, Z.U.D, Hafez, I.A. and Kaleem, S., 2012. Evaluation of tissue culture responses of promising wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and development of efficient regeneration system, Pakistan Journal of Botany, 44: 277-284.

–Mandal, A.K.H. and Gupta, S.D., 2001. Direct shoot organogenesis and plant regeneration in safflower. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant, 37: 50-54.

–Mohajer, S., Taha, R., Khorasani, A. and Syafawati, J.Y., 2012. Induction of different types of callus and somatic emberyogenesis in various explants of sainfoin (*Onobrychis sativa*). Australian Journal of Crop Science, 6(8): 1305-1313.

–Neibaur, I., Gallo, M. and Altpeter, F. 2008. 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* Cellular & Developmental Biology - Plant, 44: 480-486.

–Nicolaeva, T.N., Zagoskina, N.V. and Zaprometov, M.N. 2009. Production of phenolic compounds in callus cultures of tea plant under the effect of 2,4-D and BA. Russian Journal of Plant Physiology, 56: 45-49.

–Padulois, S., 1997. Oregano. Proceeding of the IPGRI International Workshop on Oregano, Rome, Italy, pp: 84 - 86.

–Pandey, P., Mehta, R. and Upadhyay, R., 2013. Effect of explants type and different plant growth regulators on callus induction and plantlet regeneration in *Psoraleacorylifolia L*. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Science, 4: 914-918.

–Park,. H.J., Lee, H.R., Pyee, J. and Cha, H.C., 2001. Regeneration of grape (*Vitis labruscana* cv. *Kyoho*) by shoot tip culture. Journal of Plant Biology, 44: 185-192.

–Pola, S., Mani, S. and Ramana, T., 2009. Long-term maintenance of callus culture from immature embryo of sorghum bicolor, World Journal of Agricultural Sciences, 5: 415-421.

–Rostami, R., Abrishamchi, P. and Lahooti, M., 2011. Callus induction and plant regeneration from meristem culture of potato (*Solanum tuberosum* L.). Journal of Science (Kharazmi University), 10: 1011-1032

–Rostampur, S., Hashemi, S. and Dehestani, A., 2010. *In vitro* regeneration of Persian poppy (*Papaver bracteatum*). Biologia, 65: 647-652.

–Rout, G., Mohapatra, A. and Mohan, S., 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on

–Hsia, C. and Korban, S.S., 1996. Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis* minima. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 44: 1–6.

–Hasandokht, M. R. and Ebrahimi, R., 2006. Principle of Plant Tissue Culture. Marze Danesh Publication. Tehran, Iran, 328 p.

–Ietswaart, J.H., 1982. Origanum. In: Rechinger, K. H.,(Eds). Flora Iranica pp: 527-532 Amesterdam, No. 150.

–Ikeuchi, M., Sugimoto, K. and Iwase, A., 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. The Plant Cell, 25: 3159-3173.

–Ishii, Y., Takamura, T., Goi, M. and Tanaka, M., 1998. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. Plant Cell Reports, 17: 446-450.

–Islam, M.M., Ahmed, M. and Mahaldar, D., 2005. *In vitro* callus induction and plant regeneration in seed explants of rice (*Oryza sativa* L.). Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 1: 72–75.

–Jahangir, A., Iftekhar, A., Akhtar, Sh.,Mizanur, R.M., Anisuzzaman, M. and Mohammad Firoz, A., 2010. Micropropagation and antimicrobial activity of *Operculina turpethum'* (Syn. *'Ipomoea turpethum'*), an endangered medicinal plant. Plant Biology and Omics, *3: (2): 40-46.*

–Jayanthi, M. and Mandel, P.K., 2001. Plant regeneration through somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plants in *Tylopbora indica* (Burm. F. Merrill). *In vitro* Cellular and Developmental Biology- Plant, 37: 576-580.

–Jayasree, T., Pavan, U., Ramesh, M. and Rao, A.V., 2001. Somatic embryogenesis from leaf culture of potato. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 64: 13-17.

–Khawar, K.M., Sarýhan, E., Sevimay, C. and Cocu, S., 2005. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L. Period Biology, 107: 113-116.

–Khorrami Raad, M., Bohluli Zanjani, S., Ramezani Sayyad, A., Maghsudi, M. and Kaviani, B., 2012. Effect of cultivar, type and age of explants, light conditions and plant growth regulators on callus formation of *Anthurium.* American-Eurasian Journal of Agriculture. & Environmental. Sciences, 12: 706-712.

–Khosravi, S., Azghandi, A.V., Hadad, R. and Mojtahedi, N., 2007. *In vitro* micrpropagation of *Lilium longiflorum*. Journal of Agricultural Research: Seed and Plant, 23: 159- 168.

–LaGrow, B., 2007. PDR for Herbal Medicine. 4th edition, Thomson Healthcare Hardcover, USA, 990 pp

www.SID.ir

Archive of SID

Capsicum annuum L. cv. PLR-1. Phytomorphology, 53: 235-242.

–Sujatha, M. and Dinesh Kumar, V., 2007. *In vitro* bud regeneration of *Carthamus tinctorius* and wild *Carthamus* species from leaf explants and axillary bud. Biologia Plantarum, 51: 782-786.

–Te-chato, S., Susanon, T. and Sontikun, Y., 2004. Cultivar explant type and culture medium influencing embryogenesis and organogenegenesisin *Anthurium*. Organic Biochem., 28: 717-722.

–Wang, Y.Z., Ge, K.L., Zou, G.Z., Yang, J.S. and Ye, M.M., 1985. Callus induction and plantlet regeneration in grapevines. Acta Botanica Sinica, 27: 661-664.

–Yang. J., Gong, Z.C. and Tan, X., 2008. Induction of callus and extraction of alkaloid from Yimu Cao (*Leonurus hetrophylus* Sw.) culture. African Journal of Biotechnology, 7: 1157-1162.

–Zargari, A., (1987). Iranian Medicinal Plants, Tehran University Press, Tehran.

present scenario and future prospects. Biotechnology Advance, 24: 531-560.

–Roy, A., Ghosh, S., Chaudhuri, M. and Saha, P.K., 2008. Effect of different plant hormones on callus induction in *Gymnema sylvestris* R. Br. (*Asclepiadaceae*). African Journal of Biotechnology, 7: 2209-2211.

–Sarkheil1, P., Omidi, M., Peyghambari, S.A. and Davazdahemami, S. 2009. The effects of plant growth regulators and explants on callogenesis, regeneration and suspension culture in *Foeniculum vulgare* Mill. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 25: 364-375.

–Singh, B.D., 2005. Plant tissue culture. Biotechnology-Fundamental and applications. New Delhi. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 14: 332-425.

–Sobhakumari, V.P. and Lalithakumari, D., 2003. Direct plant regeneration from shoot tip cultures of

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of different concentrations of growth regulators and explants type on callus induction, embryogenesis and shoot regeneration of O*riganum vulgare* ssp. *Gracile*

B. Hosseini [1*] and A. Bighamat [2]

1*-Corresponding author, Associate Prof., Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. Iran, Email: b.hosseini@urmia.ac.ir

2- M.Sc., Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. Iran

Received: 20.01.2016 Accepted: 09.03.2016

Abstract

Origanum vulgar ssp. *gracile* is one of medicinal plants belonging to Lamiaceae family. Carvacrol was detected as a dominant component of essential oils of the species. Effects of different concentrations of 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D) in combination with benzyl adenine (BAP) were investigated on callus induction of various explants (Cotyledon, Hypocotyl, Node, Shoot Tip and leaf) of the species. Interaction between culture media and explant types was significant at 1% Level of probability. The highest percentage of callus induction (100%) was obtained on MS medium supplemented with 1 and 3 mg l^{-1} 2,4-D on node explants. Maximum callus induction (93.3%) was observed on MS medium supplemented with 3 mg l^{-1} 2,4-D. No callus induction (0%) was observed on control and MS medium supplemented with 0.1 mg l^{-1} BA on leaf explants. Higher percentage of embryogenic callus production was obtained on MS medium supplemented with 1 mg l^{-1} 2,4-D in combination with 0.1 mg l^{-1} BAP on shoot tip explants. Percentage of embryogenic induction was the lowest on hormone free MS medium and media containing 0.1 mg l^{-1} BAP in all explants and MS media supplemented with 5 mg l^{-1} 2,4-D on hypocotyl explant. By increasing 2,4-D concentration, embryogenesis was decreased and maximum embryogenesis percentage was obtained by shoot tip and node explants. Effects of BAP on shoot regeneration from explants, the highest shoot regeneration (100%) on nodes and shoot tip explants on hormone free media and MS media fortified with 1 mg l^{-1} BAP were obtained.

Keywords: BAP, Essential oil, fresh weight, 2,4-D,

www.SID.ir