Archive of SID

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۷، شماره ۱، صفحه ۱۵۱-۱۴۳ (۱۳۹۸)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2018.122142.1304
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1398.27.144.53.1.1576.41

بهینه‌سازی باززایی کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides* Lam)

اعظم مومنی[۱]، فاطمه ذاکر تولایی*[۲]، فرهاد شکوهی‌فر[۳] و محمد خیرخواه[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، مجتمع آموزش عالی شیروان

۲*- نویسنده و مسئول مکاتبات، استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، مجتمع آموزش عالی شیروان

پست الکترونیک: f.zaker.t@um.ac.ir

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- دانشیار، گروه زراعت، مجتمع آموزش عالی شیروان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۱۴

چکیده

گیاه دارویی و معطر کاکوتی کوهی با نام علمی *Ziziphora clinopodioides* L. متعلق به جنس *Ziziphora* و تیره نعناع می‌باشد. هدف از این مطالعه بهینه‌سازی باززایی این گیاه می‌باشد و برای این کار از دو کموتایپ با کدهای ۵ و ۶ استفاده شد. بدین‌منظور، ابتدا آزمون برای کنترل آلودگی از هیپوکلریت سدیم یک درصد و الکل ۹۶٪ استفاده شد. در مرحله بعد کنترل ترکیبات فنولی تولید شده با استفاده از ترکیبات سه ماده PVP (پلی‌وینیل پیرولیدین)، زغال فعال و اسید آسکوربیک بررسی شد. شاخه‌زایی چندگانه با استفاده از ریزنمونه جوانه جانبی در محیط کشت MS حاوی ترکیب هورمونی BAP در پنج سطح در ترکیب با NAA (نفتالین استیک اسید) با غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر انجام گردید. ریشه‌زایی شاخه‌ها در محیط کشت MS حاوی ترکیب هورمونی NAA در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر انجام شد. نتایج نشان داد که تیمار هیپوکلریت سدیم یک درصد به‌همراه الکل ۹۶ ٪ موفق به رفع آلودگی تا ۷۴ درصد شد. تیمار ترکیب پلی‌وینیل پیرولیدین، اسید آسکوربیک و زغال فعال با میانگین ۸/۲۵ درصد قهوه‌ای شدن در هر دو کموتایپ ۶ و ۵ کمترین میزان قهوه‌ای شدن را نشان داد. بیشترین شاخه‌زایی در کموتایپ ۵ با ۸۸ درصد در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌اضافه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و در کموتایپ ۶ با ۱۰۰ درصد در تیمار ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌اضافه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. بیشترین درصد ریشه‌زایی در کموتایپ ۶، در تیمار ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۳۳/۳ درصد مشاهده شد. نتایج این پژوهش می‌تواند در ریزازدیادی و تکثیر وسیع این گیاه استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، ریشه‌زایی، شاخه‌زایی چندگانه، *Ziziphora clinopodioides* Lam

مقدمه

گیاه دارویی و معطر کاکوتی کوهی با نام علمی *Ziziphora clinopodioides* Lam. متعلق به جنس زیزیفورا و تیره نعناع می‌باشد و به‌حالت وحشی در مناطق وسیعی از ایران می روید (Bakhshi Khaniki et al., 2010). این جنس حدود ۲۵ تا ۳۰ گونه دارد که در آفریقا، آسیا و اروپا پراکنده است. تنها ۴ گونه از آن در ایران شناخته شده است که شامل *Z. capitata*, *Z. clinopodioides* Lam, *Z. persica* Bunge و *Z. Tenuior* می باشند (Rechinger, 1982). پراکنش

www.SID.ir

Archive of SID

جغرافیایی کاکوتی کوهی در شبه جزیره بالکان، جنوب‌غرب آسیا و آسیای مرکزی، ایران، عراق، ترکیه و آفریقاست (Baser et al., 1991). نتایج تحقیقات صالحی و همکاران (۲۰۰۵) روی شناسایی ترکیبات اسانس کاکوتی نشان داد که از ۹۹/۵ در صد ترکیبات شناسایی شده اسانس این گیاه ۹۳/۳ درصد آن مونوترپن‌های اکسیژنه ازجمله پولگن (۴۸/۵ در صد)، پیپریتنن (۱۷/۴ در صد)، پی‌منت- ۳- ان-۸-ال (۱۲/۵ در صد) و تیمول (۸ درصد) می‌باشد (Salehi et al., 2005). به‌عنوان اشتهاآور، ملین، مقوی معده، ضد نفخ، ضد باکتری قوی، درمان تپش قلب، تب بر، درمان سرماخوردگی، ورم غدد لنفاوی، روماتیسم، فشار خون، تقویت قلب و درمان زخم به‌کار می‌رود (Beikmohammadi, 2011 و Eisenman et al., 2012). با توجه به تقاضای زیاد بازار جهانی به تأمین مداوم مواد مؤثره گیاهان دارویی و از سویی، برداشت بی‌رویه آنها از عرصه‌های منابع طبیعی موجب تخریب روزافزون رویشگاه‌های طبیعی آنها شده است. ازاین‌رو این گیاهان در معرض فرسایش قرار گرفته‌اند (Lamber et al, 1997). چنین به‌نظر می‌رسد که یکی از راهکارهای مهم در تأمین نیاز بازارهای جهانی و داخلی به‌منظور کاهش فشار بر عرصه‌های جوامع گیاهان وحشی، کشت این گیاه در نظام‌های زراعی و تکثیر آن از طریق ریزازدیادی است. جوانه‌زنی بذر در این گیاه بحرانی‌ترین عامل تعیین‌کننده موفقیت یا شکست استقرار گیاه است و اهمیت زیادی در تعیین تراکم نهایی بوته در واحد سطح دارد و حتی زمانی‌که شرایط رطوبتی مناسب است اغلب توسط دما محدود می‌شود. بنابراین برای تکثیر سریع‌تر و آسانتر این گیاه استفاده از فناوری کشت بافت ارز شمند است. در این زمینه Hirata و همکاران (۱۹۹۰) از محیط کشت مایع B5 با مقادیر ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA برای کالوس‌زایی در گیاه نعناع استفاده کردند. همینطور Quazi در سال ۱۹۸۰ از جوانه‌های برگ اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* و *Lavandula latifolia*) در محیط کشت MS حاوی BAP و NAA برای تولید کالوس استفاده کرد. در این مطالعه محیط کشت حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر جیبرلین، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۵ میلی گرم در لیتر IBA برای رشد جوانه‌ها و افزایش ساقه‌ها مناسب بود. یکی از مهمترین مشکلات به‌ویژه در گیاهان دارویی، قهوه‌ای شدن اکسایشی به دلیل تولید اکسیداسیون ترکیبات فنلی می‌باشد که باعث کاهش و یا توقف رشد سلول‌ها، کاهش قدرت باززایی و در نهایت مرگ سلول‌ها می‌شود (Jones & Sexena, 2013). بنابراین به‌نظر می‌رسد پژوهش موفقی در مورد باززایی و ریزازدیادی این گونه انجام نشده است. هدف این پژوهش بهینه سازی باززایی گیاه در محیط درون شیشه‌ای است تا شرایط برای ریزازدیادی گیاه در مقیاس وسیع فراهم شود.

مواد و روش‌ها

گیاه مورد مطالعه در این پژوهش، گیاه دارویی کاکوتی متعلق به خانواده نعناعیان از رقم کاکوتی چند ساله(*Ziziphora clinopodioides*) می‌باشد. بذرها از کموتایپ‌های ۵ و ۶ کاکوتی چند ساله از شیروان در خراسان شمالی جمع‌آوری شد. بذرها ابتدا در خاک استریل در داخل سینی نشاء کشت شد و بعد از رسیدن به مرحله چهار برگی به داخل گلدان‌های حاوی نسبت ۲ به ۱ پرلیت به کوکوپیت منتقل شد و بعد از گذشت سه ماه از آنها ریزنمونه تهیه شد.

ضدعفونی ریزنمونه‌ها

ابتدا ریزنمونه‌ها برای حذف مواد زاید به‌مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفتند، سپس برای کنترل آلودگی سه تیمار اعمال شد. به این صورت که اولین تیمار هیپوکلریت سدیم یک درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه (T1) و دومین تیمار هیپوکلریت سدیم یک درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه و الکل ۹۶٪ به‌مدت ۶۰ ثانیه (T2) و سومین تیمار الکل ۹۶٪ به‌مدت ۶۰ ثانیه (T3) بود. در هر سه مورد پس از ضدعفونی، آبکشی با آب‌مقطر استریل انجام شد. بعد از انجام ضدعفونی، ریزنمونه‌های دارای حداقل دو گره از هر کموتایپ کاکوتی کوهی در زیر هود لامینار تهیه شده و در محیط کشت MS حاوی سه درصد

www.SID.ir

Archive of SID

ساکارز و ۷/۵ درصد آگار با pH=۵/۸ کشت شدند. برای هر تیمار ضد عفونی ۳۰ تکرار در نظر گرفته شد. این آزمایش به‌صورت آزمایش فاکتوریل (۳×۲) کموتایپ‌ها با دو سطح و تیمارهای کنترل آلودگی با سه سطح در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با ۱۰ تکرار انجام گردید.

بررسی عوامل مؤثر بر کنترل قهوه‌ای‌شدن در کشت بافت

به‌دلیل بروز پدیده قهوه‌ای‌شدن در مرحله قبل، کشت بافت کاکوتی کوهی و بررسی عوامل مؤثر بر کنترل قهوه‌ای شدن انجام شد. در این راستا از تیمارهای اسید آسکوربیک، PVP (پلی‌ونیل پیرولیدین) به‌تنهایی و ترکیب اسید آسکوربیک و PVP استفاده شد. در تمام این تیمارها از زغال فعال نیز استفاده شد. پس از ضدعفونی‌کردن، ریزنمونه‌های دارای حداقل دو گره را در محیط کشت قرار داده و میزان قهوه‌ای‌شدن آنها ارزیابی شد. این آزمایش به‌صورت آزمایش فاکتوریل (۳×۲) کموتایپ‌ها با دو سطح و تیمارهای آنتی‌اکسیدان با سه سطح (دو گرم در لیتر PVP به اضافه یک گرم در لیتر زغال فعال، دو گرم در لیتر PVP به اضافه یک گرم در لیتر زغال فعال به اضافه ۵۰ گرم در لیتر اسید آسکوربیک و یک گرم در لیتر زغال فعال به اضافه ۵۰ گرم در لیتر اسید آسکوربیک) در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با ۱۰ تکرار انجام شد.

بررسی اثر ترکیب هورمونی بر شاخه‌زایی چندگانه

ریزنمونه‌های دارای دو گره از شاخه‌های ضدعفونی‌شده تهیه شد. ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS حاوی هورمون BAP با غلظت‌های (۰/۵، ۱، ۲، ۲/۵ و ۵) میلی‌گرم در لیتر و NAA با غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر، به اضافه ۳ درصد ساکارز و ۷/۵ درصد آگار با pH=۵/۹ کشت شدند. سپس ریزنمونه‌ها به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۲۵۰۰–۳۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از گذشت ۳۰ روز ویژگی‌های تعداد شاخه و تعداد برگ مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل (۲×۵) غلظت هورمون BAP (۵ سطح)، کموتایپ‌ها در (۲ سطح) در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام شد.

بررسی اثر اکسین بر میزان ریشه‌زایی شاخه‌های به‌دست‌آمده

در مرحله ریشه‌زایی، شاخه‌هایی که از مرحله قبل به‌دست آمد، به محیط کشت جامد MS با ترکیب هورمونی NAA (۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر)، ۳ درصد ساکارز و ۷/۵ درصد آگار در pH=۵/۹ برای ریشه‌زایی منتقل شدند. شاخه‌های انتقال یافته حداقل دارای دو گره و جوانه انتهایی بودند. نمونه‌ها پس از آن به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۲۵۰۰–۳۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از گذشت ۲۵ روز ویژگی‌های تعداد ریشه و طول ریشه ارزیابی شد. در کموتایپ ۵ در محیط کشت‌های حاوی NAA ریشه‌زایی مشاهده نشد و به‌همین دلیل مقایسه میانگین دو غلظت اکسین فقط در کموتایپ ۶ به روش LSD انجام شد

یکی از مهمترین مراحل کشت درون شیشه‌ای گیاهان، مرحله سازگاری گیاهچه‌ها با شرایط محیطی است. بدین‌منظور، باید رطوبت به‌تدریج کاهش یابد تا گیاهان به‌یکباره دچار تنش رطوبتی و حرارتی نشوند. ازاین‌رو گیاهچه‌های تولید شده با طول ۳ تا ۴ سانتی‌متر، به لیوان‌های یکبار مصرف حاوی کوکوپیت منتقل شدند. به‌منظور تأمین رطوبت لازم برای نگهداری گیاهچه‌ها روی لیوان‌ها با پلاستیک شفاف پوشیده شد. سپس در اتاقک رشد در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفتند. به‌منظور سازگاری تدریجی گیاهچه‌ها، پس از سه روز سوراخ‌هایی بر روی درپوش لیوان‌ها ایجاد شد و پس از حدود یک هفته درپوش‌ها به‌طور کامل برداشته شدند و به فضای گلخانه منتقل گردیدند.

تجزیه‌وتحلیل‌های آماری

آماده‌سازی داده‌ها در برنامه Excel و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

بررسی سه تیمار ضدعفونی بر کنترل آلودگی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارهای ضدعفونی اعمال شده روی ریزنمونه‌های کاکوتی اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد وجود داشت. در کموتایپ ۶ آلودگی کمتری نسبت به کموتایپ ۵ مشاهده شد. ضدعفونی زیزنمونه‌ها با هیپوکلریت‌سدیم یک درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه به اضافه الکل ۹۶٪ به‌مدت ۳۰ ثانیه بیشترین تأثیر را در کنترل آلودگی داشت (جدول ۱).

از میان ۹۰ ویال کشت شده در مرحله تثبیت، ۳۰ درصد نمونه‌ها آلودگی نشان دادند که آلودگی قارچی خیلی سریع‌تر بروز یافت. ۲۰ درصد نمونه‌ها آلودگی قارچی و ۱۰ درصد آلودگی باکتریایی نشان دادند. بنابراین به‌نظر می‌رسد شرایط ضدعفونی سطحی باعث حذف آلودگی از ۷۴ درصد از نمونه‌ها شد.

جدول ۱- تأثیر تیمارهای ضدعفونی بر کنترل آلودگی کاکوتی

تیمار ضدعفونی	کموتایپ ۵		کموتایپ ۶		میانگین آلودگی
	زمان بروز آلودگی	درصد آلودگی	زمان بروز آلودگی	درصد آلودگی	
هیپوکلریت‌سدیم ۱٪	۶ روز	۵۸ b	۳ روز	۳۳ c	۴۵/۵
هیپوکلریت‌سدیم ۱٪ + الکل ۹۶٪	۶ روز	۲۵ c	۳ روز	۲۷ c	۲۶
الکل ۹۶٪	۳ روز	۸۵ a	۲ روز	۶۰ b	۷۲/۵
میانگین	۵	۵۶	۲/۶۷	۴۰	

حروف مشابه در اثرهای متقابل تیمار ضدعفونی در کموتایپ براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارد.

بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر روی درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه

ایجاد زخم حاصل از برش ریزنمونه‌ها باعث تولید ترکیبات فنولی و بروز پدیده قهوه‌ای‌شدن و از بین رفتن ریزنمونه‌ها می‌شود. در این گیاه نیز در مرحله رفع آلودگی بسیاری از ریزنمونه‌ها به‌علت این مشکل از بین رفتند. ازاین‌رو برای کاهش این عارضه فیزیولوژیک و افزایش میزان باززایی گیاهان از آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در مرحله شاخه‌زایی استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمارهای آنتی‌اکسیدان اعمال شده در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری داشتند. در کموتایپ ۶ تیمار PVP و زغال فعال با تیمار ترکیب PVP و زغال فعال و اسید آسکوربیک اختلاف معنی‌داری نداشت ولی تیمار اسیدآسکوربیک و زغال فعال با دو تیمار دیگر آنتی‌اکسیدان اختلاف معنی‌داری داشت. در کموتایپ ۵ بین دو تیمار PVP و زغال فعال با تیمار اسیدآسکوربیک و زغال فعال اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول۲). در تیمار ترکیب PVP و زغال فعال و اسید آسکوربیک در ۷۷ درصد ریزنمونه‌های کموتایپ ۵ و ۹۱/۵ درصد ریزنمونه‌های کموتایپ ۶ قهوه‌ای‌شدن مشاهده نشد.

اثر تیمارهای هورمونی مختلف روی شاخه‌زایی چندگانه

ریزنمونه‌های ساقه دارای گره در هر دو کموتایپ استفاده شد. ریزنمونه‌ها در بیشتر محیط کشت‌ها بعد از ۷ تا ۱۰ روز تولید شاخساره کردند. در مقایسه میانگین بین دو کموتایپ ۵ و ۶ در تعداد شاخه‌های چندگانه تولید شده اختلاف معنی‌دار وجود داشت. طبق مقایسه میانگین انجام شده بین اثر متقابل کموتایپ و تیمار با تعداد شاخه در کموتایپ ۶، بین تیمارها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. بیشترین تعداد شاخه با میانگین ۱۴ در کموتایپ ۶ و تیمار ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد، در حالی‌که در کموتایپ ۵ بیشترین تعداد شاخه با میانگین ۸ در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست‌آمد (جدول ۳). ازاین‌رو در کموتایپ ۶ تعداد شاخه‌های جانبی بیشتری تولید شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. تأثیر تیمارهای آنتی‌اکسیدان بر کنترل قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های کاکوتی

تیمار آنتی‌اکسیدان	کموتایپ ۵		کموتایپ ۶		میانگین
	زمان قهوه‌ای شدن	درصد قهوه‌ای شدن	زمان قهوه‌ای شدن	درصد قهوه‌ای شدن	
PVP + زغال فعال	۴ روز	۲۵/۶۷ ab	۷ روز	۹/۹۱ b	۱۷/۸
PVP + اسیدآسکوربیک + زغال فعال	۷ روز	۸/۲۵ b	۹ روز	۸/۲۵ b	۸/۲۵
زغال فعال + اسیدآسکوربیک	۷ روز	۲۷/۵ ab	۷ روز	۴۱/۲۵ a	۳۴/۴
میانگین (درصد)		۲۰/۴۷		۱۹/۸	

حروف مشابه در اثرهای متقابل تیمار آنتی‌اکسیدان در کموتایپ بر اساس آزمون **LSD** در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارد.

در بررسی اثر غلظت‌های مختلف BAP روی درصد شاخه‌ها، نتایج نشان داد که در کموتایپ ۵ بیشترین درصد شاخه‌زایی در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌اضافه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با ۸۸ درصد و در کموتایپ ۶ بیشترین درصد شاخه‌زایی در تیمار ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌اضافه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، با ۱۰۰ درصد به‌دست آمد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

جدول ۳. اثر غلظت‌های مختلف BAP روی تعداد شاخه تولید شده در دو کموتایپ کاکوتی

نام کموتایپ	غلظت BAP (میلی‌گرم در لیتر) + ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA					میانگین
	۰/۵	۱	۲	۲/۵	۵	
تعداد شاخه در کموتایپ پنج	۱/۶cd	۵/۳bcd	۸ b	۰/۶۷ d	۵/۳bcd	۴/۲ b
تعداد شاخه در کموتایپ شش	۸ b	۵ bcd	۸/۳b	۱۴/۰۰a	۷/۳ bc	۸/۵ a

حروف مشابه در اثرهای متقابل غلظت هورمون در کموتایپ براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارد.

بررسی تأثیر تیمارهای مختلف هورمونی روی تعداد برگ در محیط کشت شاخه‌زایی

مقایسه میانگین بین اثر متقابل تیمارهای هورمونی و کموتایپ بر روی تعداد برگ نشان داد که بین غلظت‌های مختلف BAP در تولید برگ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. به‌طوری‌که در کموتایپ ۵ بیشترین تعداد برگ (۶۶ عدد) در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌اضافه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و کمترین تعداد برگ (۳/۳ برگ) در تیمار ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌اضافه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. در کموتایپ ۶ نیز بین تیمار ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌اضافه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با میانگین ۶۱ برگ اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها وجود داشت و بیشترین تعداد برگ در کموتایپ ۶ در این تیمار مشاهده شد (جدول ۴) .

جدول ۴. اثر تیمارهای هورمونی مختلف روی تعداد برگ در هر کموتایپ

نام کموتایپ	غلظت BAP (میلی‌گرم در لیتر) + ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA					میانگین
	۰/۵	۱	۲	۲/۵	۵	
تعداد برگ در کموتایپ پنج	۱۲bc	۳۵/۷ abc	۶۶ a	۳/۳ bc	۳۴ abc	۳۰/۲
تعداد برگ در کموتایپ شش	۴۲/۷ abc	۲۱/۷ abc	۵۲ ab	۶۱ a	۳۳/۳abc	۴۲/۱

حروف مشابه در اثرهای متقابل غلظت هورمون در کموتایپ براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارد.

www.SID.ir

Archive of SID

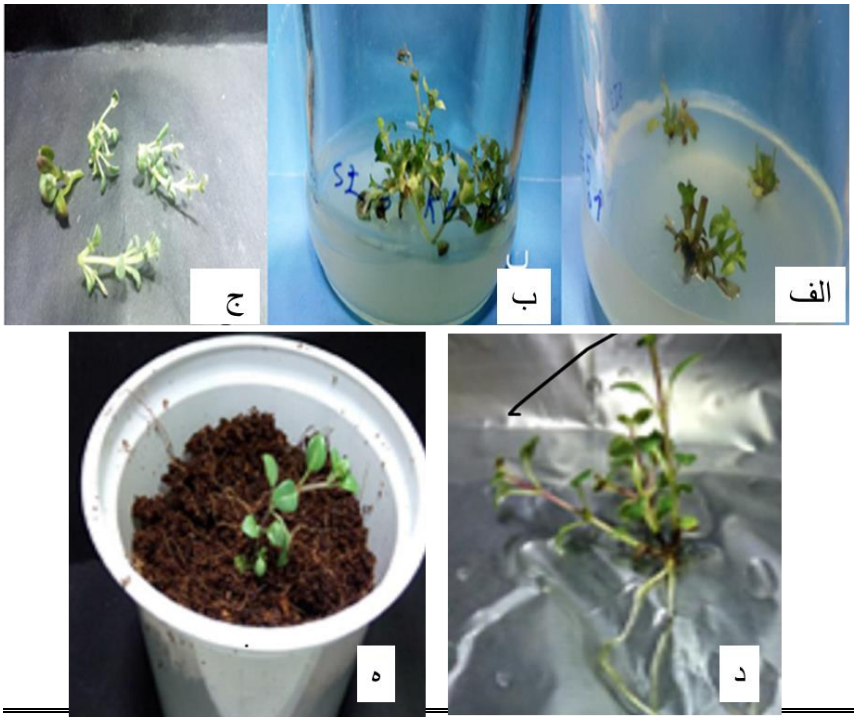
بررسی اثر غلظت‌های مختلف اکسین بر ریشه‌زایی

شاخه‌های تولید شده در مرحله شاخه‌زایی در محیط کشت حاوی NAA کشت شدند. در کموتایپ ۵ در محیط کشت‌های حاوی NAA ریشه‌زایی مشاهده نشد. از کموتایپ ۶ تعدادی شاخه به مرحله ریشه‌زایی منتقل شد، این شاخه‌ها دارای جوانه انتهایی بودند. به‌منظور تعیین مناسب‌ترین غلظت اکسین برای ریشه‌زایی از غلظت‌های مختلف NAA استفاده شد. اولین نشانه‌های ریشه‌زایی بعد از ۵ تا ۷ روز مشاهده شد و پس از تشکیل و رشد ریشه (۲۵ روز پس از انتقال)، درصد شاخه‌ای، تعداد و طول ریشه‌ها اندازه‌گیری و ثبت شد. اثر هورمون NAA بر ریشه‌زایی در کموتایپ ۶ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. براساس مقایسه میانگین بیشترین درصد ریشه‌زایی (۳۳/۳ درصد) و بیشترین طول ریشه (۱/۱ سانتی‌متر) در محیط حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد (جدول ۵).

جدول ۵. اثر غلظت‌های مختلف NAA روی ریشه‌زایی در کموتایپ ۶ کاکوتی

غلظت NAA	درصد ریشه‌زایی	تعداد ریشه	طول ریشه
۰/۱ میلی‌گرم در لیتر	۱۲b	۰/۵b	۰/۳۷b
۰/۳ میلی‌گرم در لیتر	۳۳/۳a	۲/۰۸a	۱/۱۳a

حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارد.



شکل ۱. مراحل ریزازدیادی کاکوتی کوهی: الف) ساقه دارای گره، ب) تولید شاخه بعد از چهار هفته، ج) جداکردن شاخه‌ها، د) ریشه‌دار کردن، ه) گیاه کاکوتی کوهی سازگارشده

بحث

همان‌گونه که در قسمت نتایج مشاهده شد، تیمار هیپوکلریت سدیم یک درصد به‌اضافه الکل ۹۶٪ مناسبترین تیمار ضدعفونی برای ریزنمونه‌های کاکوتی معرفی شد که توانست باعث رفع آلودگی ۷۰٪ از ریزنمونه‌ها شود. الکل ماده‌ای دهیدراته‌کننده می‌باشد که باعث تخریب غشای

www.SID.ir

Archive of SID

سلولی، واسرشت شدن سریع پروتئین‌ها و در ادامه برهم-خوردن سوخت‌وساز سلول می‌شود (Cowan, 1999). از الکل ۹۶٪ برای ضدعفونی بذرهای زوفا و ریحان نیز استفاده شده است (Hosseini & Alizadeh, 2013). در این مرحله هر چه ساقه‌های انتخابی جوان‌تر باشند میزان آلودگی داخلی کاهش می‌یابد و فرایند استریل کردن با موفقیت بیشتری همراه است. نتیجه این آزمایش مؤثر بودن استفاده توأم از الکل ۹۶٪ و هیپوکلریت سدیم یک درصد را نشان داد. خطیب‌زاده و همکاران (۲۰۱۳) نیز در مطالعه جوانه‌زنی انجدان رومی (*Levisticum officinale* Koch) برای ضدعفونی ریزنمونه-ها، استفاده از الکل به اضافه هیپوکلریت سدیم را به‌عنوان بهترین تیمار ضدعفونی معرفی کردند (Khatibzadeh *et al.* 2013).

نتیجه آزمایش رفع پدیده قهوه‌ای شدن نشان داد که تیمار توأم PVP به‌علاوه اسیدآسکوربیک و زغال فعال بهترین نتیجه را داشت. در تحقیقی که روی *Chinensis litchi* انجام شد، وقتی اسیدآسکوربیک و اسیدسیتریک به‌همراه هم استفاده شد، قهوه‌ای شدن متوقف شد و استفاده از هریک از این آنتی-اکسیدان‌ها به‌تنهایی تأثیری در بهبود کشت ریزنمونه نداشت (Tabatabai **&** Omidi, 2009). در مطالعه‌ای ترکیب اسیدآسکوربیک با اسیدسیتریک و یا PVP برای جلوگیری از قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه‌های انبه به‌کار برده شد که باعث کاهش قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه‌ها شد (Krishna *et al.*, 2008). اسیدآسکوربیک در محیط کشت بسیار ناپایدار است اما فراورده‌های آن نیز نقش آنتی‌اکسیدانی را به‌خوبی انجام می-دهند (Elmore *et al.*, 1990). در مطالعه Ghezelbash و همکاران (۲۰۱۶) روی تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها روی تولید ترکیبات فنلی در کشت بافت نعناع وحشی، آنان به این نتیجه رسیدند که زردچوبه می‌تواند به‌عنوان عامل مؤثری در تولید کالوس‌های عاری از فنل عمل نماید. نتیجه این پژوهش مؤثر بودن استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها به‌صورت ترکیبی را نشان می-دهد، به‌طوری‌که ترکیب اسید آسکوربیک و PVP و زغال فعال در کنترل پدیده قهوه‌ای‌شدن موفقیت بیشتری نشان داد.

در این پژوهش بیشترین درصد شاخه‌زایی در تیمارهای ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌اضافه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌ترتیب با ۸۸ درصد و ۱۰۰ درصد به‌دست آمد. در آزمایشی که بر روی باززایی مستقیم شاخه‌های چندگانه از گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) انجام شد، تعداد شاخه به‌دست‌آمده در ریزنمونه‌های مختلف متفاوت بود و ریزنمونه‌های مریستم شاخه و گره پاسخ مطلوبی به باززایی نشان دادند (Sarwar *et al.*, 2009). همچنین در گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) باززایی از ریزنمونه نوک شاخه در محیط کشت MS همراه با یک میلی‌گرم در لیتر NAA و سه میلی‌گرم در لیتر BAP انجام شد. در مورد کاکوتی ایرانی (*Ziziphora persica*) با استفاده از بذرهای این گیاه ابتدا کالوس‌زایی انجام شده و کالوس‌های به‌دست آمده به محیط کشت حاوی کینیتن و 2,4-D منتقل شدند (Taheri *et al.*, 2014). معمولا در باززایی غیرمستقیم امکان بروز تغییرات ژنتیکی در گیاه نهایی وجود دارد که ممکن است باعث تغییر در میزان مواد مؤثره گیاه دارویی شود (Taheri *et al.*, 2014). در بررسی که بر روی کموتایپ‌های مختلف آویشن شیرازی انجام شد، استفاده از هورمون BAP برای تولید شاخه تأثیر بیشتری نسبت به هورمون‌های دیگر داشت (Shamsuddini *et al.*, 2013).

در این پژوهش بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت MS حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA با میانگین ۷ عدد در کموتایپ ۶ به دست آمد. براساس مطالعات Asadi و همکاران (۲۰۰۹) القای ریشه در شاخه‌های در حال رشد چه به‌طور مستقیم از طریق تنظیم‌کننده‌های رشد مصنوعی یا پس از حذف سیتوکینین از محیط کشت، بستگی به گونه و رقم داشت. از سوی دیگر توانایی تولید ریشه، بستگی به برهم‌کنش فاکتور های بیرونی و درونی داشت. اغلب پژوهشگران موفق به ریشه‌دارکردن شاخه‌های پرآوری شده کشت بافتی در محیط های حاوی غلظت های کم BAP، NAA یا NAA شده‌اند. اگر چه گزارش هایی در مورد کالوس‌زایی و باززایی غیرمستقیم در کاکوتی ایرانی (*Ziziphora persica*) (Taheri *et al.*, 2014) و *Ziziphora tenuior* ارائه شد ولی در مورد باززایی مستقیم

www.SID.ir

Archive of SID

کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodiodies*) تاکنون گزارشی نشده است. از سویی با توجه به اینکه این دو کموتایپ در حال زراعی شدن هستند و تحقیقاتی بر روی به‌زراعی آن انجام شده است، به‌دست‌آوردن روشی برای تولید تعداد زیادی گیاهچه یکنواخت از نظر ژنتیکی ارزشمند خواهد بود و نتایج این پژوهش ما را در دستیابی به آن یاری خواهد کرد.

منابع مورد استفاده

– Asadi, A.A., Vedadi, C., Rahimi, M. and Naserian Khiabani, B., 2009. Effect of plant growth hormones on root and shoot regeneration in Rose (*Morrasia*) under *in vitro* conditions, Bioscience Research, 6(1): 40-45.

– Bakhshi Kaniki, G.R., Sefidkan, F. and Dehghan, Z., 2010. Investigation of the effect of some habitat conditions on the quality and quantity of essential oils of *Ziziphora clinopodioides*, Herbal Medicines, 1: 11-20

– Baser, K.H.C., Sezik, E., Tumen, G., 1991. Composition of the Essential Oil of *Ziziphora clinopodioides* Lam. Journal of Essential Oil Research, 3:237-239.

– Beikmohammadi, M. 2011. The evaluation of medicinal properties of *Ziziphora clinopodioides*, Journal World Applied Sciences, 12(9):1635-1638.

– Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology, 12(4):564-582.

– Elmore, H., Samples, B., Sharma, S., and Harrison, M. 1990. Influence of cultural and physiochemical factors on ascorbate stability in plant tissue culture media. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 20: 131-135.

– Eisenman, S.W., Zaurov, D. F., and Struwe, L. 2012. Medicinal plant of Central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan, Springer New York Heidelberg Dordrecht London, 351p

– Hirata, T., Murakami, S., Ogihara, K. and Suga, T. 1990. Volatile monoterpenoid constituent of the plantlet of Mentha spicata produced by shoot tip culture. Phytochemistry, 29(2): 493-495.

– Hosseini, B. and Alizadeh, M. 2013. Effect of biomass and BAP hormone on *in vitro* regeneration of medicinal herb (*Hyssopus officinalis* L.). Journal of Horticulture. 27: 207-201.

– Jones A.M.P. and Sexena, P.K. 2013. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in *artemisia annua* L.: A novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture, PLoS One. (10): 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.00768028.

– Ghezelbash, S., Qaderi, A., Bodaghi, H., Ghasimi Hagh, Z., Kashefi, M. and Zare Karizi, A.R. 2016. The effect of antioxidant compounds and media on biosynthesis of limiter phenolic compounds during *In vitro* culture of *Mentha arvensis* L., Journal of Medicinal Plants, 16 (1): 1-9.

– Khatibzadeh, R., Azizi, M., Arouiee, H. and Farsi, M. 2013. Effects of Sterilization Protocol and Pre-chilling Treatment on *In vitro* Seed Germination of *Levisticum officinale* Koch, Journal of Horticultural Science, 27(2): 130-138.

– Krishna, H., Sairam, R.K., Singh, S.K., Patel, V.B., Sharma, R.R., Grover, M., Nain, L. and Sachdev, A. 2008. Mango explants browning: effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. Science Horticulture Amsterdam, 118 (2): 132 - 8.

– Lamber, T.J., Sirvastava, J., and Vietmeyer, N. 1997. Medicinal plants, rescuing a global heritage, Washington D. C., World Bank Technical Paper, 355

– Quazi, M.H. 1980. *In vitro* multiplication of *Lavandula spp*. Annals of Botany, 45(3): 361-362.

– Rechinger, K.H. 1982. Labiatae. In: "Flora Iranica, Browicz, K.H., K. Persson and P. Wendelbo (Eds.)".

– Akademische Druk-und Verlasantalt, Wiena, Graz, Austria, ISBN: 3-201 -00728-5, pp: 25-44.

– Salehi, P., Sonboli, A., Eftekhar, F., Ebrahimi, Nejad, S. and Yousefzadi, M. 2005.Essenial oil composition antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodiodies* sub sp. Rigida (BOISS). Journal of Biological and Pharmacetical Bulletin, 28 (10):1892-1896.

– Sarwar, S., Zia, M., Riaz-Ur, R., Zarrin, F. and Riaz A. 2009. *In vitro* direct regeneration in mint from different explants on half strength MS medium. African, Journal of Biotechnology, 8(18): 4667-4671.

– Shamsuddini, M., Pakneiyyat, H. and Niyazi, A. 2013. Micropropagation of different ecotypes of *Zataria multiflora* under different hormonal treatments. Master's Thesis. Shiraz University. 20-6.

– Tabatabai, B. and Omidi, M., 2009. Plant tissue and cell culture. Tehran University Press

– Taheri, A., Kowsari Nasab, M. and Movafeghi, A. 2014. Effect of Hormonal Treatments on Callus production in *Ziziphora persica*. The first national environmental conference. Tabriz. 7-1.

www.SID.ir

Archive of SID

Optimization of regeneration in Mountain Ziziphora (*Ziziphora clinopodioides* Lam)

A.Momeni[1], F. Zaker Tavallaie[*2], F. Shokoohifar[3], M. Kheirkhah[4]

1- Msc. Plant Biotechnology. Complex Higher education of Shirvan. North Khorasan, I.R. Iran.
2*- Corresponding author, Assistant professor. Plant Biotechnology. Complex Higher education of Shirvan. North Khorasan, I.R. Iran. Email: f.zaker.t@um.ac.ir
3- Assistant professor. Plant Biotechnology. Research Center for Plant Sciences. Ferdowsi University of Mashhad. I.R. Iran.
4- Associate Professor. Agronomy. Complex Higher education of Shirvan. North Khorasan, I.R. Iran

Received: 04.06.2018 Accepted: 05.08.2018

Abstract

Medicinal and aromatic medicinal plant, *Ziziphora clinopodioides* L., belonging to the genus *Ziziphora* and Lamiaceae family. The aim of this study was to optimize asexual regeneration in two genotypes of this species as code 5 and 6. For this purpose, the first experiment was conducted for contamination control using sodium hypochlorite 1% and alcohol 96%. In the next step, the control of produced phenolic compounds was investigated by combining three polyvinylpyrrolidone, active charcoal and ascorbic acid. Multiple shoots induction were performed using lateral bud explant in a MS medium containing the BAP at five levels in combination with NAA (0.01 mg/L). Rooting of branches was performed in MS medium containing NAA at two levels (0. 1 and 0.3 mg/L). Result showed 1% sodium hypochlorite treatment coupled with 96% alcohol eliminated contamination up to 74%. The treatment of combination of polyvinylpyrrolidine, ascorbic acid and activated charcoal with average value of 8.25% had the lowest browning in both Genotype of 6 and 5. The highest branching values of (88% and 100%) were obtained in the treatment of 2 and 2.5 mg/L BAP combined with 0.01 mg/L NAA in genotype 5 and 6, respectively. The highest value of rooting (33.3%) was observed in genotype 6 using 0.3 mg/l NAA. The results of this research could be used in the micropropagation and proliferation of this plant.

Key words: Micropropagation, Multiple shoot induction, Rooting, *Ziziphora clinopodioides* Lam

www.SID.ir