دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:25 +0330 on Saturday December 7th 2019

بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی و باززایی آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Clake)

مهدی محب الدینی[۱]، رعنا میرزاده قصابه[۲]، مهدی بهنامیان[۳]، اسماعیل چمنی[۴] و رقیه فتحی[۵]

۱- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
(نویسنده‌ی مسوول: mohebodini@uma.ac.ir)
۲، ۳ و ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد ، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۵- دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
تاریخ دریافت ۹۷/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش ۹۸/۲/۲۳
صفحه: ۱۲۴ تا ۱۳۳

چکیده

آویشن دنایی با نام علمی *Thymus daenensis* Clake یکی از گیاهان دارویی مهمی می‌باشد که به تیره نعناییان (*Lamiaceae*) تعلق دارد. برگ و سرشاخه‌های گلدار این گیاه دارای تعدادی ترکیبات مهم مثل تیمول، کارواکرول، بتاپتین و پاراسیمین می‌باشد. تحقیق حاضر به منظور تعیین مناسب‌ترین غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها) برای تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌ی جوانه‌ی انتهایی و هیپوکوتیل انجام گرفت. بذور گیاه آویشن دنایی بعد از ضد عفونی جهت جوانه‌زنی در محیط کشت MS کشت شدند. ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و Kin جهت بررسی ریزازدیادی کشت گردیدند. ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل نیز در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BAP و NAA به صورت ترکیب هورمونی جهت القای کالوس و باززایی ساقه کشت شد. در آزمایشات بررسی ریزازدیادی، مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین تعداد ساقه، تعداد برگ، تعداد جوانه و وزن تر در تیمار Kin با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد و در آزمایشات بررسی باززایی آویشن دنایی، بیشترین درصد باززایی و بیشترین تعداد نوساقه در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/٦ میلی‌گرم در لیتر NAA در ریزنمونه‌ی هیپوکتیل مشاهده گردید. به‌طور کلی Kin بیشترین کارایی را در ریزازدیادی و ترکیب BAP و NAA بیشترین تاثیر را در باززایی آویشن داشتند.

واژه‌های کلیدی: القای کالوس، باززایی شاخه، ریزنمونه، درون‌شیشه‌ای، محیط کشت

مقدمه

گیاهان دارویی از جمله ذخایر طبیعی در جهان محسوب می‌شوند که جزء منابع تامین‌کننده دارو برای انسان به شمار می‌روند (۲). آویشن دنایی یکی از گیاهانی است که خواص دارویی فوق العاده‌ای دارد و از گذشته تاکنون مردم از آن به عنوان یک گیاه دارویی استفاده می‌کنند (۲۶). مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده در اسانس آویشن دنایی عبارت از تیمول، کارواکرول، بتاپیتن، پاراسیمین، ۱ و ۸ سینئول، کاریوفیلین و کاریوفیلین اکسید می‌باشد (۴). از برگ آویشن دنایی در فرآورده‌های غذایی و همچنین از اسانس گیاه آویشن دنایی در نوشیدنی‌ها و صنایع دارویی، بهداشتی و آرایشی استفاده متنوعی می‌شود (۲۶). اسانس آویشن از جمله ده اسانس معروف است که دارای خواص ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، نگهدارنده‌ی طبیعی غذا و تأخیردهنده‌ی پیری می‌باشد و جایگاه خاصی در تجارت جهانی دارد (۱۷). دم‌کرده و جوشانده‌ی این گیاه به عنوان طعم‌دهنده، ضد سرفه، ضد اسپاسم، خلط‌آور، ضد نفخ و ضد میکروب استفاده می‌شود و در استعمال خارجی همراه روغن زیتون و سایر روغن‌ها به عنوان محرک موضعی و قرمزکننده به کار می‌رود. در ایران و نیز سایر کشورها در درمان سرماخوردگی مصرف می‌شود و خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز دارد (۱۳). اثرات ضدقارچ و ضدانگل و ضدباکتری این گیاه و اثرات درمانی آن برای آسم، سرفه‌های خشک مکرر و برونشیت به اثبات رسیده است (۲). این گیاه علاوه بر اینکه توسط دام و طیور مورد چرا قرار گرفته است، به دلیل معطر بودن و پی بردن مردم به ارزش دارویی آن، توسط انسان نیز مورد بهره برداری فراوان قرار گرفته است، به طوریکه اکنون به گونه‌ای کمیاب تبدیل شده است (۱۸). لذا یافتن راهکار مناسب در جهت حفظ ذخایر ژنتیکی این گیاه دارویی و استخراج متابولیت‌های ثانویه ارزشمند آن ضرروی می‌باشد (۱۰). استفاده از روش‌های مرسوم اصلاح برای گیاهانی که دارای چرخه زندگی طولانی هستند زمان زیادی را می‌طلبد و ایجاد صفات مطلوب مثل مقاومت به حشرات و بیماری‌های قارچی در روش تکثیر معمولی امکان پذیر نیست. استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک و تکنیک‌های کشت بافت ایجاد صفات مطلوب را سریع‌تر و موثرتر کرده است. در فرآیند شناسایی، ارزیابی و سرانجام تجارتی کردن ذخایرتوارثی، قابلیت ازدیاد یک گیاه جدید یکی ازعوامل مهم است که باید مورد بررسی قرار گیرد (۲۰).

ریزازدیادی اعم از ایجاد جوانه‌های جانبی و یا شاخساره‌های درون شیشه‌ای حاصل از کشت ریزنمونه‌ها، ریشه‌دار کردن، سازگار نمودن و انتقال گیاهچه‌ها است (۹). به طور کلی، هدف از ریزازدیادی، بیشینه تولید از یک گیاه در زمانی معین و در عین حال ایجاد مجموعه‌ای از گیاهان با ویژگی‌های ژنتیکی یکسان و با صفات کمی و کیفی مورد نظر است (۷). در پژوهشی که برای ارزیابی ریزازدیادی گیاه دارویی مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*) انجام شد (۲۵)، بذور گیاه مرزه را در محیط نیم‌غلظت MS کشت کردند و سپس گیاهچه‌ها واکشت شدند. پس از آن نمونه‌ها در سطوح مختلف هورمون‌های BAP و Kin، به صورت منفرد

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:25 +0330 on Saturday December 7th 2019

یا در ترکیب با IBA کشت شدند و تیمار ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP را به منزله‌ی مفیدترین ترکیبات هورمونی برای ریزازدیادی مرزه خوزستانی معرفی کردند. در مورد بهینه‌سازی شرایط باززایی گیاه دارویی (*Artemisia annua*) مطالعه‌ای انجام دادند. نتایج حاصله درصد بالای باززایی را در تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA نشان داد (۲۲). در آزمایشی ریزازدیادی گیاه آویشن با استفاده از ریزنمونه‌های تک گره ساقه به طول ۱۰ میلی‌متر در شرایط سترون انجام شد (۲۳). محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، برای ریزازدیادی شاخساره مناسب است و بهترین تیمار برای ریشه‌زایی، صفر میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA پس از هشت هفته بود. در باززایی گیاه از طریق کشت بافت، تغییر غلظت هر یک از اجزای محیط کشت یا افزودن تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر روی پاسخ (اندام‌زایی، بافت زایی و غیره) قطعه‌های جدا کشت مطالعه شده کاملاً تأثیرگذار است و ممکن است کمیت ترکیبات شیمیایی، بافت‌های نوپدید را نیز تغییر دهد (۶). دقت در انتخاب نوع تنظیم‌کننده‌های رشد قابل استفاده و غلظت آنها ضروری به نظر می‌رسد، زیرا غلظت کلی هورمون‌های درون‌زا و بیرون‌زا تعیین‌کننده‌ی نوع اندام‌های نوپدید حاصل از کشت بافت است (۲۳). تحقیقی با عنوان باززایی گیاهچه از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل آویشن دنایی در محیط درون‌شیشه انجام شد (۱۱). محیط کشت B5 با تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم در لیتر Kin بهترین نتایج را به لحاظ القاء کالوس، ریشه، جنین سوماتیکی و اندام‌زایی بطور همزمان نشان داد. نتایج پژوهشی نشان داد که بیشترین طول ساقه و تعداد ساقه و تعداد برگ درغلظت ۰/۵، ۱، ۲ میلی گرم در لیتر BAP حاصل شد و استفاده از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D باعث بیشترین کالوس‌زایی شد و همچنین استفاده از ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و عدم استفاده از 2,4-D، کالوس‌زایی را افزایش داد ولی با افزایش BAP از ۱ میلی‌گرم و 2,4-D در غلظت‌های بالا منجر به کاهش در صفت مورد نظر شد (۱۵). در این راستا، هدف از پژوهش حاضر بهینه‌سازی ریزازدیادی آویشن دنایی در شرایط درون‌شیشه‌ای با استفاده از غلظت‌های مختلف BAP و Kin در ریزنمونه‌ی جوانه‌ی انتهایی و بررسی امکان کالوس‌زایی و باززایی آویشن دنایی با استفاده از غلظت‌های مختلف BAP و NAA در ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل است.

مواد و روش‌ها

بررسی ریزازدیادی آویشن دنایی با استفاده از BAP و Kin

بعد از گذشت دو هفته از جوانه‌زنی بذرها و در مرحله چهاربرگی، ریزنمونه جوانه‌ی انتهایی در زیر هود به وسیله‌ی اسکالپل از زیر جوانه‌ی انتهایی برش داده شد و در محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف BAP و Kin انجام شد (جدول ۱). ریزنمونه‌ها در داخل شیشه به صورت مورب گذاشته شدند. بعد از استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت، درب شیشه را بسته و به وسیله سلفون اطراف درب شیشه پوشانده شد و در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی (شدت نور ۲۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد قرار داده شدند. چهار هفته بعد از کشت ریزنمونه‌ها، صفاتی از قبیل تعداد جوانه، تعداد برگ، تعداد ساقه، وزن تر گیاهچه، طول ساقه و مقدار کلروفیل، اندازه‌گیری شد (۳).

جدول ۱- غلظت‌های مختلف BAP و Kin مورد استفاده در محیط کشت

Table 1. Different concentrations of BAP and Kin used in medium

ردیف	BAP (mg l^{-1})	Kin (mg l^{-1})
۱	۰	۰
۲	۰/۵	۰/۵
۳	۱	۱
۴	۱/۵	۱/۵
۵	۲	۲
۶	۲/۵	۲/۵
۷	۳	۳
۸	۳/۵	۳/۵
۹	۴	۴

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:25 +0330 on Saturday December 7th 2019

بررسی باززایی و کالوس‌زایی آویشن دنایی با استفاده از غلظت‌های مختلف BAP و NAA

به منظور بررسی کالوس‌زایی و باززایی گیاه آویشن دنایی ابتدا بذر را در شیشه‌های حاوی محیط کشت MS کشت کرده و بعد از رشد گیاهچه‌ها از گیاهان هشت روزه و هنگامی که گیاه چه در مرحله‌ی دوبرگی بود ریز نمونه‌ی هیپوکوتیل در زیر هود برش داده شد و در ۳ محیط کشت MS حاوی ترکیب غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (BAP + NAA) که BAP (صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (صفر، ۰/۳، ۰/۶، ۰/۹، ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم در لیتر)، طبق جدول ۲ کشت شد. ریزنمونه به طول ۵ میلی‌متر برش داده شد و داخل هر شیشه ۴ ریز نمونه کشت گردید. بعد از استقرار ریز نمونه در محیط کشت، شیشه‌ها در اتاق رشد و در شرایط دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد پایه و ۱۶ ساعت روشنایی (۲۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد قرار داده شدند. بعد از گذشت تقریباً ۴ هفته بعد از کشت، صفاتی از قبیل درصد تشکیل کالوس، درصد گیاهان باززایی شده، تعداد نو ساقه‌های باززایی شده، تعداد جوانه، وزن‌تر و تعداد برگ اندازه‌گیری شدند.

جدول ۲- تیمارهای هورمونی BAP و NAA مورد استفاده در محیط کشت

Table 2. Different concentrations of BAP and NAA used in medium

ردیف	NAA (mgl^{-1})	BAP (mgl^{-1})
۱	۰	۰
۲	۰/۳	۰/۵
۳	۰/۶	۱
۴	۰/۹	۱/۵
۵	۱	۲
۶	۱/۵	۲/۵
۷	۲	۳

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش ریزازدیادی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و آزمایش مربوط به باززایی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار کامپیوتری نسخه ۱۶ SPSS و برای مقایسه میانگین‌ها از روش Duncan در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. قبل از آنالیزهای آماری، آزمون تست نرمال بودن داده‌ها انجام گردید.

نتایج و بحث

بررسی تأثیر BAP بر ریز ازدیادی آویشن دنایی

در این آزمایش غلظت‌های مختلف BAP و Kin جهت بررسی ریزازدیادی آویشن دنایی با استفاده از ریز نمونه‌ی جوانه انتهایی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف در محیط کشت بر روی صفات مورفولوژیکی از قبیل وزن تر، تعداد ساقه، تعداد جوانه، طول ساقه و تعداد برگ وجود دارد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین تعداد ساقه (۴۰) در Kin با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد. کمترین میزان ساقه در تیمار شاهد و با میانگین یک ساقه مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین تعداد جوانه (۹۸) در Kin با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر حاصل گردید. در بین تیمارهای اعمال شده، بیشترین طول شاخه در Kin با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و با میانگین ۳۱/۱۶ سانتی‌متر بدست آمد همچنین بیشترین وزن تر (۰/۶۹) در تیمارهای Kin با غلظت ۲/۵ مشاهده شد. در این آزمایش بیشترین تعداد برگ (۱۳۸ و ۲۰۴/۶۷) در Kin با غلظت ۱/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر و با میانگین ۰/۲۲۴ میلی‌گرم حاصل شد (جدول ۴). نتایج آنالیز متعامد نیز نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تاثیر BAP و Kin در صفات تعداد برگ، تعداد جوانه، طول ساقه و وزن تر وجود دارد و در تمام آن‌ها تیمار Kin بهتر بود.

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر BAP و Kin بر ریزازدیادی

Table 3. Analysis of variance of BAP and Kin effect on micropropagation

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		تعداد ساقه	تعداد برگ	تعداد جوانه	طول ساقه	میزان کلروفیل	وزن‌تر
هورمون	۱۶	۲۷۱/۱*	۷۷۳۵/۶۳*	۱۷۴۶/۲۴**	۱۴۰/۸۲**	۱۵/۹۹ns	۰/۰۸۴*
خطا	۳۴	۱۳۳/۲۳	۲۸۸۵/۲۵	۶۴۷/۸۶	۳۲/۶۴	۱۲/۱۳	۰/۰۳۸
ضریب تغییرات		۱۲/۴۹	۸/۸۷	۹/۰۹	۳/۰۱	۱۱/۰۵	۱۵/۷۲

ns، * و **: به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌دار در سطح ۵ و ۱٪

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:25 +0330 on Saturday December 7th 2019

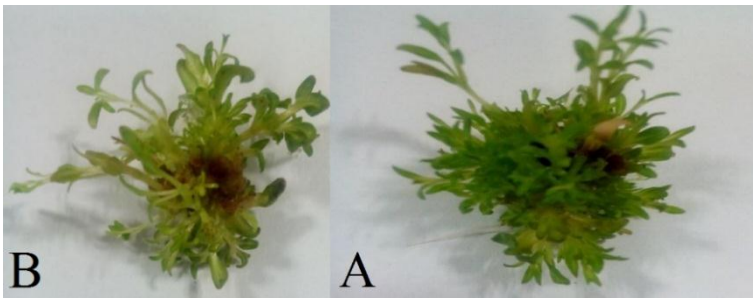
جدول ۴- مقایسه میانگین تأثیر تیمار BAP و Kin بر ریزازدیادی

Table 4. Mean comparisons of BAP and Kin effect on micropropagation

	غلظت ($mg\ l^{-1}$)	طول ساقه (cm)	تعداد جوانه	تعداد ساقه	وزن تر (gr)	تعداد برگ
BAP	۰	۳۰/۴۱^{a}	۵/۵۰^{c}	۱^{b}	۰/۰۱۴^{b}	۱۳^{c}
	۰/۵	۱۲/۴۹^{e}	۴/۱۷^{c}	۱/۳۳^{b}	۰/۰۰۷^{b}	۱۱/۵۳^{c}
	۱	۹/۸۵^{c}	۵^{c}	۱/۷۵^{b}	۰/۰۰۹^{b}	۱۴/۷۵^{c}
	۱/۵	۱۲/۷۵^{c}	۴/۷۵^{c}	۲^{b}	۰/۰۰۹^{b}	۴/۴۵^{c}
	۲	۱۴/۲۹۳^{de}	۱۹/۳۳^{bc}	۱۱/۶۷^{b}	۰/۰۴۶^{b}	۴۵/۵۰^{bc}
	۲/۵	۱۷/۵۵$^{c-e}$	۴۲/۶۷^{bc}	۱۶^{b}	۰/۲۲۴^{b}	۸۱/۶۷^{bc}
	۳	۱۶/۲۸$^{c--e}$	۲۷^{bc}	۱۲/۶۷^{b}	۰/۱۳۷^{b}	۷۰^{bc}
	۳/۵	۱۹/۸۹$^{b-e}$	۴۰/۶۷^{bc}	۱۶/۶۷^{b}	۰/۱۵۳^{b}	۷۳/۶۷^{bc}
	۴	۱۸/۷۰$^{b-e}$	۲۷^{bc}	۶^{b}	۰/۰۷۸^{b}	۳۸^{bc}
Kin	۰	۱۳/۳۲^{e}	۹/۳۳^{c}	۲/۳۳^{b}	۰/۰۲۱^{b}	۱۹^{c}
	۰/۵	۲۴/۹۵^{aa}	۲۸^{bc}	۵/۶۷^{b}	۰/۱۶^{b}	۶۷/۶۷^{bc}
	۱	۱۵/۷۴$^{c-e}$	۲۲^{bc}	۵/۶۷^{b}	۰/۰۶^{b}	۵۱/۳۳^{bc}
	۱/۵	۳۱/۱۶^{a}	۶۴/۳۳^{ab}	۱۵^{b}	۰/۳۰^{b}	۱۳۸^{ab}
	۲	۱۲/۲۶^{e}	۱۹^{bc}	۵^{b}	۰/۰۴۲^{b}	۳۸^{bc}
	۲/۵	۲۸/۸۰^{ab}	۹۸^{a}	۴۰^{a}	۰/۶۹^{a}	۲۰۴/۶۷^{a}
	۳	۲۶/۳۱$^{a-c}$	۳۲/۶۷^{bc}	۷/۶۷^{b}	۰/۱^{b}	۸۵/۶۷^{bc}
	۳/۵	۱۷/۶۱$^{c-e}$	۲۶/۳۳^{bc}	۷^{b}	۰/۰۵^{b}	۷۰^{bc}
	۴	۱۳/۱^{e}	۲۳/۳۳^{bc}	۷/۳۳^{b}	۰/۱^{b}	۶۵/۶^{bc}

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p<0.05$) نمی‌باشند

در این آزمایش در تیمار شاهد (بدون هورمون) ریشه‌زایی مشاهده شد و همچنین برگ‌های رویش یافته در تیمار شاهد نسبت به ریزنمونه‌های سایر تیمارها قطورتر بودند. با افزایش غلظت BAP تعداد برگ‌ها افزایش یافت ولی برگ‌ها ریزتر شدند و حالت شفات‌تری پیدا کردند (شکل ۱).



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف BAP بر تشکیل شاخه. A) شاخه‌های تشکیل شده در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP؛B) تشکیل شاخه در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP

Figure 1. Effect of different concentrations of BAP on shoot formation. A: The shoots formed in 2 $mg\ l^{-1}$ BAP. B: Shoot formation in 2.5 $mg\ l^{-1}$ BAP

ریزازدیادی را می‌توان تکثیر جوانه انتهایی یا جانبی و تکثیر غیر جنسی درون شیشه ای نیز نامید که یک روش تکثیر برای گونه‌ها یا واریته‌هایی با ویژگی‌های مطلوب است (۸). در این راستا تنظیم‌کننده‌های رشد نقش مهمی دارند از جمله عواملی که در ریزازدیادی موثر می‌باشد می‌توان به ژنوتیپ، تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت، نوع ریزنمونه، سن ریزنمونه و شرایط محیطی اشاره کرد (۵) همچنین عکس‌العمل ریزنمونه به مقدار بهینه تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی و بیرونی بستگی دارد (۱۲). نتایج این پژوهش نشان داد که اختلاف معنی‌داری در صفات تعداد برگ، تعداد ساقه، وزن تر و تعداد جوانه وجود دارد و بیشترین تعداد ساقه در Kin با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد. در ریزازدیادی جوانه انتهایی نوروزک نیز بیشترین درصد ساقه‌زایی را در Kin با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر گزارش کردند (۱۶). نتایج نشان داد که هورمون Kin اثر بسزایی در شاخه‌زایی ریزنمونه‌ی جوانه انتهایی گیاه آویشن دنایی دارد. در اکثر بررسی‌های کشت بافت، BAP و Kin به عنوان سایتوکینین بسیار فعال در شاخه‌زایی عمل می‌کند (۱۹). در بین تیمارهای اعمال شده، کمترین تعداد شاخه در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌ی رشد (شاهد) با میانگین ۱ ساقه حاصل شد. بیشترین تعداد برگ در تیمار Kin با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر حاصل گردید و کمترین مقدار برگ تولید شده نیز مربوط به تیمار شاهد بود. در این پژوهش هر چقدر غلظت تنظیم‌کننده‌ی رشد بیشتر شد، برگ‌ها ریزتر و

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:25 +0330 on Saturday December 7th 2019

شفاف‌تر شدند ولی در هیچ کدام از تیمارهای اعمال شده پدیده‌ی شیشه‌ای شدن مشاهده نشد همچنین مطالعه‌ای در مورد اثر بنزیل آدنین و سالیسیلیک اسید بر پدیده‌ی شیشه‌ای شدن در کشت ساقه‌ی ریزازدیادی شده گیاه آویشن دنایی انجام شد و گزارش کردند که بنزیل آدنین به تنهایی سبب ایجاد پدیده‌ی شیشه‌ای شدن در آویشن دنایی شد (۲۶).

قابل ذکر است که ریشه‌زایی در تیمار فاقد تنظیم‌کننده (شاهد) مشاهده شد. جوانه‌ی انتهایی حاوی اکسین داخلی می‌باشد و هورمون اکسین و ترکیبات مشابه آن، عامل مناسب برای ریشه‌زایی می‌باشند (۱۰). این هورمون به راحتی سبب تحریک سلول‌های دایره‌ی محیطی در بخش‌های بالایی تارهای کشنده شده و این تحریک منتج به تقسیم سلول‌های این منطقه و در نهایت تشکیل ریشه می‌شود (۸). در تیمارهایی که حاوی BAP بود ریشه‌زایی رخ نداد اما در تیمارهای ۱/۵، ۲/۵، ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و همچنین تیمار شاهد ریشه‌زایی دیده شد. ریزنمونه‌های برخی از گیاهان تیره‌ٔ نعناییان از قبیل *Salvia blancona* نیز قادر به ایجاد ریشه در محیط کشت فاقد اکسین بودند (۲۵). نتایج این تحقیق نشان داد که بهترین غلظت سایتوکینین برای پرآوری ریزنمونه‌ی جوانه انتهایی، در محیط کشت MS همراه با ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin حاصل شد. صبورا و همکاران (۲۱) نیز بهترین غلظت سایتوکینین برای پرآوری برازمبل را ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر عنوان کردند که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت همچنین در پژوهشی گزارش کردند که محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin برای ازدیاد شاخه‌ٔ ریزنمونه‌های گرهی نعناع فلفلی مناسب است (۱۳).

تاثیر BAP و NAA بر درصد کالوس‌زایی و باززایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل و اثرات اصلی غلظت‌های مختلف ترکیب هورمون‌های NAA و BAP بر درصد باززایی، تعداد نوشاخه، تعداد جوانه و تعداد برگ در هر ریزنمونه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۵). بیشترین باززایی در محیط MS حاوی ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP با ۸۳٪ باززایی مشاهده شد (شکل ۳، B). همچنین در ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، نیز درصد باززایی ۸۳٪ بود ولی گیاهان باززا شده در این تیمار نسبت به گیاهان باززا شده در ترکیب هورمونی حاوی صفر میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP ضعیف‌تر بودند. نتایج نشان داد بیشترین تعداد نوساقه، بیشترین تعداد جوانه و بیشترین تعداد برگ در ترکیب هورمونی ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیترBAP مشاهده گردید. همچنین در بین تیمارهای اعمال‌شده در ترکیب هورمونی صفر میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP باززایی مستقیم (بدون حد واسط کالوس) مشاهده گردید. در تمامی محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های به کار رفته از NAA بدون حضور BAP، باززایی از طریق کالوس فقط در غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده گردید (شکل ۳، A). همچنین در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های به کار رفته از BAP بدون حضور NAA، باززایی مستقیم در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، (شکل ۳، C) و باززایی از طریق کالوس در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر مشاهده گردید. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان باززایی ریزنمونه هیپوکوتیل در این ترکیب هورمونی با افزایش میزان BAP از ۲ میلی‌گرم بر لیتر میزان کاهش یافت. لازم به ذکر است که در اکثر تیمارهای اعمال شده کالوس‌زایی مشاهده گردید (جدول ۶). کالوس‌های تولید شده دو نوع بودند. نوع اول که به رنگ سبز بودند (شکل ۲، A) و نوع دوم حالت ترد و شکننده داشتند و به رنگ شیری بودند (شکل ۲، B).

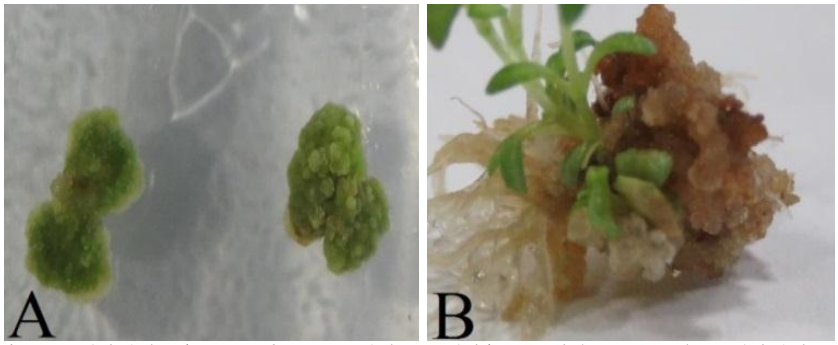
جدول ۵- تجزیه واریانس تأثیر ترکیب هورمونی BAP و NAA در باززایی و کالوس‌زایی

Table 5. Analysis of variance of BAP and NAA effect on regeneration and callus formation

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		تعداد ساقه	تعداد برگ	تعداد جوانه	درصد کالوس	وزن کالوس	باززایی
BAP	۴	۳۵/۴۴**	۵۲۳/۶۶۷**	۱۳۸/۳۷**	۰/۰۲۶**	۰/۰۱۴^{ns}	۰/۲۲۷**
NAA	۶	۱۳/۱۹۸**	۲۰۲/۹۰۷**	۵۱/۷۹**	۰/۰۰۸^{ns}	۰/۰۲۱**	۰/۰۹۴**
NAA×BAP	۱۲	۳۰/۱۳۰**	۴۱۴/۸۱۵**	۱۰۴/۴۷**	۰/۰۱۳**	۰/۰۱۱^{ns}	۰/۱۸۷**
خطا	۴۶	۴/۷۱۶	۵۵/۱۲	۱۵/۹۸	۰/۰۰۵	۰/۰۱۰	۰/۰۱۹
ضریب تغییرات		۱۸/۸۴	۱۳/۱۴	۱۳/۹۲	۷/۲۸	۱۲/۵	۱۱/۴۸

ns و **: به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌دار در سطح ۱٪

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:25 +0330 on Saturday December 7th 2019



شکل ۲- تشکیل کالوس، یک هفته بعد از کشت. A) کالوس تشکیل شده به رنگ سبز. B) تشکیل کالوس به رنگ شیری
Figure 2. Callus formation one week after culture. Callus formed in green color. B: Callus formed in creamy color

جدول ۶- مقایسه میانگین تأثیر ترکیب هورمونی NAA و BAP در باززایی و کالوس‌زایی
Table 6. Mean comparisons of BAP and NAA effect on regeneration and callus formation

BAP(mgl^{-1})	NAA (mgl^{-1})	درصد باززایی	تعداد نوساقه	تعداد برگ	تعداد جوانه	وزن کالوس	درصد کالوس
۰	۰	۰/۵۸^{bc}	۲/۳۳^{bc}	۸/۶۷^{c}	۴/۳۳$^{c-d}$	۰/۰۵۳$^{b-d}$	۱۰۰^{a}
۰	۰/۳	۰/۰۸^{d}	۳/۶۷^{bc}	۹/۳۳^{c}	۴/۶۷$^{c-d}$	۰/۲۵۸^{a}	۱۰۰^{a}
۰	۰/۶	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۱۱/۴۶$^{a-d}$	۱۰۰^{a}
۰	۰/۹	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۰/۳۸^{d}	۱۰۰^{a}
۰/۵	۰	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۰/۰۲^{d}	۱۰۰^{a}
۰/۵	۰/۳	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۰/۰۷۶$^{a-d}$	۱۰۰^{a}
۰/۵	۰/۶	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۰/۰۱۸^{d}	۱۰۰^{a}
۰/۵	۰/۹	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۰/۰۱۱^{d}	۱۰۰^{a}
۱	۰	۰/۰۸^{d}	۳/۳۳$^{b-c}$	۱۴^{bc}	۷/۶۷$^{b-d}$	۰/۰۷۸$^{a-d}$	۰/۹۱۶۷^{ab}
۱	۰/۳	۰/۱۶^{d}	۱/۳۳^{c}	۴/۶۷^{c}	۲/۳۳^{d}	۰/۰۱۷^{d}	۱۰۰^{a}
۱	۰/۶	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۰/۰۳۶^{d}	۱۰۰^{a}
۱	۰/۹	۰/۴۱۶۷^{c}	۳/۶۷$^{b-c}$	۱۴$^{b-c}$	۷$^{b-d}$	۰/۰۲۳^{d}	۱۰۰^{a}
۱/۵	۰	۰/۶۶۶۷^{bc}	۶^{b}	۲۲/۳۳^{b}	۱۲/۶۷^{b}	۰/۱۷۱^{cd}	۱۰۰^{a}
۱/۵	۰/۳	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۰/۰۰۴۳^{d}	۰/۶۶۶۷^{c}
۱/۵	۰/۶	۰/۸۳^{a}	۱۳/۶۷^{a}	۵۱/۳۳^{a}	۲۵/۶۷^{a}	۰/۰۶۰$^{a-d}$	۰/۸۳^{b}
۱/۵	۰/۹	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۰/۰۱۱$^{a-d}$	۱۰۰^{a}
۲	۰	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۰/۰۹۲$^{a-d}$	۱۰۰^{a}
۲	۱	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۰/۲۵$^{a-b}$	۱۰۰^{a}
۲	۱/۵	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۰/۰۷۸$^{a-d}$	۱۰۰^{a}
۲	۲	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۰/۰۹۲$^{a-d}$	۱۰۰^{a}
۳	۰	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۰/۰۹۲$^{a-d}$	۱۰۰^{a}
۳	۱	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۰/۰۲۴$^{a-c}$	۱۰۰^{a}
۳	۱/۵	۰^{d}	۰^{c}	۰^{c}	۰^{d}	۰/۰۴۳$^{c-d}$	۱۰۰^{a}
۳	۲	۰/۵۰$^{b-c}$	۶^{b}	۲۲/۶۷^{b}	۱۱$^{b-c}$	۰/۱۱۷۶$^{a-d}$	۱۰۰^{a}

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p<0.05$) نمی‌باشند

همبستگی بین صفات مربوط به کالوس‌زایی و باززایی

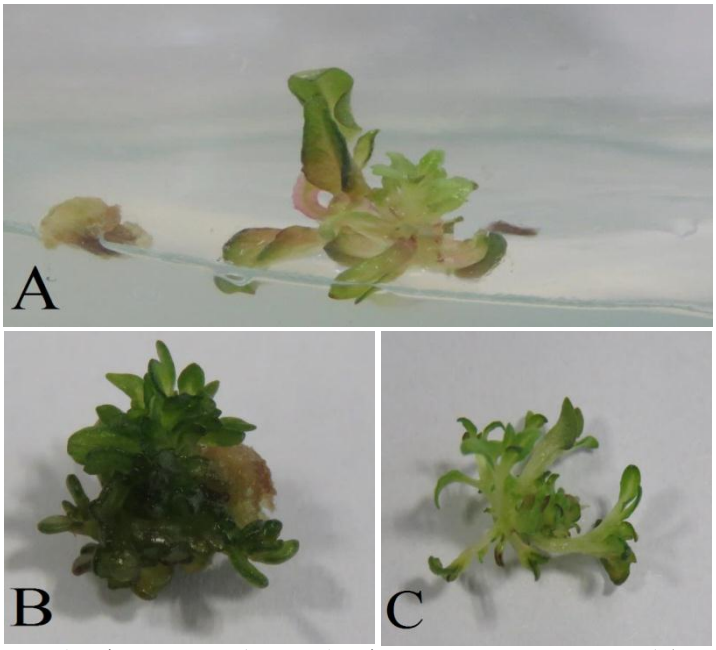
بررسی همبستگی بین درصد باززایی با میانگین تعداد ساقه، میانگین تعداد جوانه، میانگین تعداد برگ، در ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل نشان داد که همبستگی بین این صفات مثبت و معنی‌دار بود (جدول ۷).

جدول ۷- بررسی همبستگی بین صفات
Table 7. Evaluation of correlation coefficient of traits studied

	تعداد ساقه	تعداد برگ	تعداد جوانه	وزن کالوس	باززایی	کالوس‌زایی
تعداد ساقه	۱					
تعداد برگ	۰/۹۹۱**	۱				
تعداد جوانه	۰/۹۹۸**	۰/۹۹۸**	۱			
وزن کالوس	۰/۱۱۳^{ns}	۰/۱۰۹^{ns}	۰/۱۲۴^{ns}	۱		
باززایی	۰/۷۹۵**	۰/۸۱۷**	۰/۸۱۴**	۰/۰۷۰^{ns}	۱	
کالوس‌زایی	۰/۳۵۰**	۰/۳۵۲**	۰/۳۵۱**	۰/۰۸۰^{ns}	۰/۰۴۵^{na}	۱

ns و **: به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌دار در سطح ۱٪

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:25 +0330 on Saturday December 7th 2019



شکل ۳- تشکیل شاخه و کالوس در تیمار هورمونی حاوی A: ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA؛ B: ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر NAA ؛ C) ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP

Figure 3. Shoot and callus formation in treatment of 0.3 mg l^{-1} NAA, B: 1.5 mg l^{-1} BAP and 0.6 mg l^{-1} NAA, C: 1.5 mg l^{-1} BAP

در بین تنظیم‌کننده‌های رشد، اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها تأثیر بسیار زیادی در القای رشد در بافت‌های گیاهی دارند و اهمیت BAP برای باززایی گیاهان مختلف خانواده‌ی نعناع ثابت شده است. قطعات جداکشت هیپوکوتیل تمایل زیادی به تشکیل کالوس در تیمارهای هورمونی مختلف به کار رفته از خود نشان می‌دهند (۱). در این تحقیق، ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل کشت شده در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، NAA و BAP بعد از یک هفته از زمان کشت، در اکثر تیمارها کالوس‌زایی مشاهده گردید و بیانگر این موضوع است که قطعات جداکشت هیپوکوتیل آویشن دنایی تمایل زیادی به تشکیل کالوس در تیمارهای هورمونی مختلف به کار رفته از خود نشان دادند. درصد کالوس‌زایی در اکثر محیط‌های کشت، با سطوح مختلف اکسین و سایتوکینین و محیط‌های کشت فاقد اکسین (BAP به تنهایی) و محیط‌های کشت فاقد سایتوکینین (NAA به تنهایی) ۱۰۰٪ بود. در تحقیقی گزارش کردند که در محیط کشت حاوی اکسین فاقد سایتوکینین کالوس تولید شد اما بدون حضور اکسین تولید نشد که با نتایج این تحقیق مطابقت نداشت. در تیمار شاهد (فاقد هورمون) کالوس‌زایی مشاهده نشد. به عبارت دیگر، برای القای کالوس وجود هورمون ضروری است و در محیط کشت فاقد هورمون کالوس تولید نگردید (۲۴).

در این پژوهش کالوس‌زایی در یک هفته بعد از کشت ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل دیده شد و اولین باززایی نیز دو هفته بعد از کشت هیپوکوتیل مشاهده گردید. کالوس تشکیل شده در نواحی برش‌خورده در گیاه آویشن دنایی به دو صورت مشاهده شد. کالوس‌هایی که به رنگ سبز بلوری و گرانوله بودند و نوع دیگری که رنگ کالوس به صورت شیری یا کرم رنگ دیده شد. حجم کالوس‌های شیری رنگ بیشتر از حجم کالوس‌های سبز بودند و کالوس‌های شیری رنگ، حالت ترد و شکننده داشتند. نتایج تحقیق نشان داد که بیشترین وزن کالوس مربوط به ترکیب تیمار صفر میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA می‌باشد. در تحقیقی، کالوس‌زایی گیاه کاکوتی را مورد بررسی قرار داده و بهترین تیمار کالوس‌زایی در هورمون NAA با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر گزارش کردند که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت (۶). نتایج تحقیق نشان داد که گیاه آویشن دنایی در محیط حاوی اکسین و بدون سایتوکینین باززایی داشت ولی در گیاهچه باززایی شده حالت شیشه‌ای شدن مشاهده شد. NAA تنظیم‌کننده‌ای است که باعث القای ریشه می‌شود ولی در این گیاه باعث تولید نوساقه شد و این احتمال می‌رود که گیاه آویشن دنایی غلظت بالای سایتوکینین را در بافت‌های خود دارا می‌باشد که هنگام قرار گرفتن در محیط حاوی اکسین باززایی صورت گرفت. در پژوهشی گزارش کردند که به طور کلی مقدار کالوس در تیمارهای با ترکیب هورمونی اکسین و سایتوکینین نسبت به تیمارهای فاقد سایتوکینین بیشتر بود که با نتایج این تحقیق مطابقت نداشت. همچنین آن‌ها گزارش دادندکه در تیمارهای مورد استفاده، کالوس‌زایی و باززایی همزمان مشاهده شد که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت (۱۱).

باززایی ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل، بعد از گذشت ۲ هفته از کشت مشاهده شد. بهترین تیمار برای باززایی، ۱/۵میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۶میلی‌گرم در لیتر NAA و همچنین ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بود

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:25 +0330 on Saturday December 7th 2019

و ۸۳ درصد باززایی مشاهده شد. شایان ذکر است که میزان وزن کالوس در ترکیب تیماری ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، نسبت به وزن کالوس‌های تولید شده در ترکیب تیماری ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشتر بود و کالوس‌های این تیمار حجم بیشتری داشتند. در این پژوهش تمام اشکال باززایی به طور همزمان رخ داد که این امر به میزان قابل توجهی از طول زمان کشت بافت کاست. ریشه‌زایی نیز عمدتا در تیمارهای دارای NAA رخ داد. باززایی در تیمار حاوی اکسین و فاقد سایتوکینین فقط در غلظت ۰/۳ مشاهده شد و در غلظت‌های ۰/۶ و ۰/۹ باززایی رخ نداد و تنها کالوس‌زایی مشاهده شد. مکمل 2,4-D و NAA به تنهایی یا همراه با Kin برای تداوم القای کالوس مورد نیاز است و کاهش آن‌ها باعث القای فرآیند اندام‌زایی و تولید جنین نابجا در آویشن دنایی می‌گردد (۱۴). نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت BAP و NAA نه تنها میزان باززایی افزایش پیدا نکرد بلکه میزان کالوس‌زایی نیز کاهش یافت و در غلظت‌های بالای هر دو تیمار Kin و NAA، باززایی و کالوس‌زایی نیز کاهش چشم‌گیری داشت. شایان ذکر است که با افزایش میزان BAP میزان شیشه‌ای شدن نمونه‌ها افزایش یافت.

منابع

1. Aghaali, Z., Y. Hoshino and S. Monfared. 2019. Regulation of dedifferentiation and differentiation in different explants of *Papaver rhoeas* L. By one-step culture. Scientia Horticulturae, 246: 366-370.
2. Akbarinia, A. and M. Mirza. 2008. Identification of essential oil components of *Thymus daenesis celak* in field condition in Qazvin. The Journal of Gazvin University of Medical Sciences, 58-62 (In Persian).
3. Arnon, A.N. 1967. Method of exteraction of chlorophyll in plants. Agronomy Journal, 23: 112-121.
4. Ashrafi, M., A. Ghasemi, M. Rahim Malek and B. Hamedi. 2012. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis celak*. Journal of Herbal Drugs, 3(2): 75-80 (In Persian).
5. Cesar, P., A. Silverio García-lara and A. Janet. 2017. Enhancement of saponins and flavonols by micropropagation of *Agave Salmiana*. Industrial Crops and Products, 105(1): 225-230.
6. Dakah, A., S. Zaid, M. Suleiman and S. Abbas. 2014. In vitro propagation of the medicinal plant *Ziziphora tenuior* L. and evaluation of its antioxidant activity. Saudi Journal of Biological Sciences, 21(4): 317-323.
7. Desai, P., G. Patil, B. Dholiya, S. Desai, F. Patel and S. Nnarayanan. 2018. Development of an efficient micropropagation protocol through axillary shoot proliferation for pomegranate variety 'bhagwa'. Annals of Agrarian Science, 16(4): 444-450.
8. Faisal, M., N. Ahmad, M. Anis, A. Alatar and A. Gahtan. 2018. Auxin-cytokinin synergism in vitro for producing genetically stable plants of *Ruta graveolens* using shoot tip meristems. Saudi Journal of Biological Sciences, 25(2): 273-277.
9. Fan, S., D. Jian, X. Wei, J. Chen, R.C. Beeson, Z. Zhou and X. Wang. 2017. Micropropagation of blueberry 'bluejay'and 'pink lemonade'through in vitro shoot culture. Scientia horticulturae, 226: 277-284.
10. Fattahi, M. 2013. Autecology of *Dracocephalum kotschyi bioss*. in Iran. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 29(2): 1-9 (In Persian).
11. Hassannejad, S., F. Bernard, F. Mirzajani and M. Gholami. 2012. SA improvement of hyperhydricity reversion in *Thymus daenensis* shoots culture may be associated with polyamines changes. Plant Physiology and Biochemistry, 51: 40-46.
12. Jun-jie, Z., Y. Yue-sheng, I. Meng-fei, L. Shuqi, T. Yi and C. Hanbin. 2017. An efficient micropropagation protocol for direct organogenesis from leaf explants of an economically valuable plant, drumstick (*Moringa oleifera*). Industrial Crops and Products, 103: 59-63.
13. Karimi, A., A. Ghasemi Pirbalouti, F. Malekpoor, M. Yousefi and A. Golparvar. 2010. Evaluation of ecotype and chemotype diversity of *Thymus daenensis celak*. On Isfahan and Chaharmahal va Bakhtiari provinces. Journal of Herbal Drugs, 1(3): 1-10 (In Persian).
14. Kiran, G., C. kaviraj, R. Venugopal, F. Jabeen and S. Rao. 2004. Rapid regeneration of *mentha piperita* L. from shoots tip and nodal explants. Indian Journal of Biotechnology, 3: 594-598.
15. Mirshekar, A., M. Honarvar, F. Mohammadi and A. Alizadeh. 2014. Effects of plant regulators on *Thymus daenensis* celak. Tissue culture. International Journal of Biosciences, 11: 41-35
16. Modarres, M., M. Lahouti, A. Gangeali and J. Asili. 2013. Study of micropropagation of *Salvia leriifolia* benth using shoot tip. Iranian Journal of Plant Biology, 5(6): 89-100 (In Persian).
17. Naghdibadi, H., A. Haghiri, T.M. makizadeh, M. Ahvazi and K. Baghalian. 2006. Evaluation of cultivation of some exotic medicinal species in Karaj. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 169-172 (In Persian).
18. Otroshy, M. and K. Moradi. 2012. Effect of explants and growth regulators on direct organogenesis of *Dracocephalum kotschyi boiss*. via tissue culture technique. Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs): 3(3): 127-134 (In Persian).

19. Plihalova, l., H. Vylicilova, Z. Dolezal, Zahajska, L. Zatloukal and M. Strand. 2016. Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. New Biotechnology, 33(5): 614-624.
20. Roh, M. and R.H. Lawson. 1998. Requirements for new floral crops-perspectives for the United States of America. Acta Horticulturae, 454: 29-38.
21. Saboora, A. and S. Mahioubeh. 2013. Effect of plant growth regulators on in vitro germination and micropropagation of brazmbl (*Perovskia abrotanoides*), a medicinal plant. Iranian Journal of Plant Biology, 5(18): 95-114 (In Persian).
22. Sharafi, A., H. Hashemi and E. Jourabchi. 2008. Improvement on the situation of regeneration of medicinal plant *Artemisia annua* L. Iranian Journal of Biology, 3(5): 565-573 (In Persian).
23. Shazia, S. and G. Muzafar. 2011. Micropropagation of different species of *Thymus*. Journal of Research and Development, 11: 71-81.
24. Yang, j., G. Li and S. Hu. 2018. A protocol for efficient callus induction and stable transformation of *Spirodela polyrhiza* Schleiden using *Agrobacterium tumefaciens*. Aquatic Botany, 151: 80-86.
25. Zahedi, B. and A. Sahraroo. 2015. Evaluation of *Satureja khuzistanica* micropropagation as a medicinal plant. Iranian Journal of Horticultural Sciences, 291-296 (In Persian).
26. Zarooshan, M., F. Bernard and Z. Heydarian. 2012. Effect of salicylic acid on DNA methylation in *thymus daenensis celak*. under hyperhydricity syndrome. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 97-110 (In Persian).

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:25 +0330 on Saturday December 7th 2019

The Effect of Plant Growth Regulators on Micropropagation and Regeneration of *Thymus Daenensis* Celak

Mehdi Mohebodini[1], Rana Mirzadeh Qassabeh[2], Mahdi Behnamian[3], Esmaeil Chamani[4] and Roghayeh Fathi[5]

1- Assistant Professor, of Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, (Corresponding Author: mohebodini@uma.ac.ir)
2, 3 and 4- M.Sc. student, Assistant Professor and Professor University Mohaghegh Ardabili
5- PHD Student of Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
Received: Jun 10, 2018 Accepted: November 10, 2018

Abstract

Daenensis thyme (*Thymus daenensis* Celak) is one of the important medicinal plant that belongs to the family Labiatae. The leaves and flowering branches of this plant has a number of important compounds such as Thymol, Carvacrol, Btaptyn and Parasymyn. The present study was performed in order to determine the optimum of plant growth regulators (auxin and cytokinin) for production of *in vitro* plantlet using apical bud and hypocotyl explants. The seeds after sterilization were germinated on MS medium. The explants were cultured on the medium containing various concentrations of BAP and Kin for study of *in vitro* micropropagation. Hypocotyl explants were cultured on the medium containing various combinations of BAP and NAA for callus induction and shoot regeneration. In study of micropropagation, the mean comparison showed the highest number of shoot, leaf and bud obtained in MS medium containing 2.5 mg l^{-1} Kin in the apical explants. In study of regeneration, the mean comparison showed the highest percentage of shoot regeneration and mean of shoot number were obtained on MS medium supplemented with 1.5 mg l^{-1} BAP + 0.6 mg l^{-1} NAA in hypocotyl explants. Overall, Kin was most effective plant growth regulator on micropropagation and comination of BAP and NAA had most effect on regeneration of Daenensis thyme.

Keyword: Callus Induction, Explants, *In Vitro*, Medium, Shoot Regeneration

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:25 +0330 on Saturday December 7th 2019