

## 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\*<sup>۱</sup> و افسانه بی‌قامت<sup>۲</sup>

\*<sup>۱</sup>- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

پست الکترونیک: b.hosseini@urmia.ac.ir

<sup>۲</sup>- کارشناس ارشد گیاهان دارویی، علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰

### چکیده

مرزنجوش بخارایی (*Origanum vulgare ssp. gracile*) از گیاهان دارویی متعلق به خانواده نعنائیان (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

(EL-Gangaihi et al., 2006; Padulois, 1997). اسانس گیاه مرزنجوش عمدتاً از کارواکرول، گاماترینین، پاراسیمن، آلفاپینن، میرسن و تیمول تشکیل شده‌است و دارای فلاونوئید از جمله نارینجین و مشتقات کافئیک اسید به‌ویژه رزماریک اسید است (Lagrow, 2004). این گیاه در نواحی شمال، غرب،

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

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 سیتوکینین 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 شبلیله 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 لیتر 2,4-D به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP القای 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

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 (Bourgau 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 (Arafah 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

از تعیین وزن تر، برای خشک کردن کالوس‌ها از آون دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد.

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

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

T<sub>1</sub>: غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP

T<sub>2</sub>: غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

T<sub>3</sub>: غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

T<sub>4</sub>: غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D

فاکتور دوم: A (نماد ریزنمونه‌های مختلف)

کوتیلدون (A<sub>1</sub>)، هیپوکوتیل (A<sub>2</sub>)، برگ (A<sub>3</sub>)، گره (A<sub>4</sub>)، نوک شاخه (A<sub>5</sub>).

**آزمایش ۲ - بررسی اثر غلظت‌های مختلف BAP بر شاخه-**

زایی ریزنمونه‌های مرزنجوش بخارایی

این آزمایش به منظور بررسی اثر BAP بر شاخه‌زایی ریزنمونه‌های مختلف مرزنجوش بخارایی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً 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 واگشت درصد شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها ثبت شد.

تجزیه و تحلیل آماری: پس از انجام بررسی‌ها و اندازه‌گیری صفات مورد نظر، داده‌های به دست آمده برای هر یک از این صفات به طور جداگانه با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 مورد

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 به مدت 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 به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی و با آب دو بار تقطیر چند بار شستشو داده شدند.

کشت بذر: بذرهای پس از ضدعفونی سطحی، در فلاسک‌های حاوی محیط کشت MS جامد کشت شدند. سپس در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲۵±۲، 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 به صورت 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 واگشت 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

در ترکیب با ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP بر وزن تر ریزنمونه-های مختلف انجام شد. وزن تر کالوس در ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۳ و ۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D به ترتیب ۰/۳۲۰ و ۰/۲۹۲ گرم به دست آمد. کمترین میزان (فاقد کالوس) در محیط کشت MS بدون تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D و ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP در تمامی ریزنمونه‌ها مشاهده شد. غلظت پایین 2,4-D نسبت به غلظت-های بالا وزن تر بیشتری از کالوس را تولید کرد و ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل به ترتیب بیشترین و کمترین وزن تر را تولید کردند (شکل ۱).

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

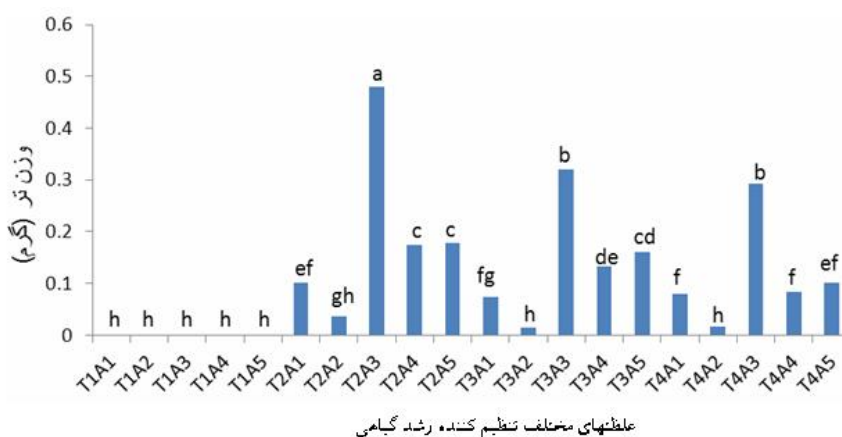
## نتایج

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 به منظور ارزیابی غلظت‌های مختلف 2,4-D

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	۰/۰۰۰۰۶	۰/۰۰۰۰۰۳	۰/۲۲۸۳	۰/۰۵۵
ضریب تغییرات (%)		۲۷/۴۹	۲۵/۹۸	۲۲/۱۲	۲۵/۹۹

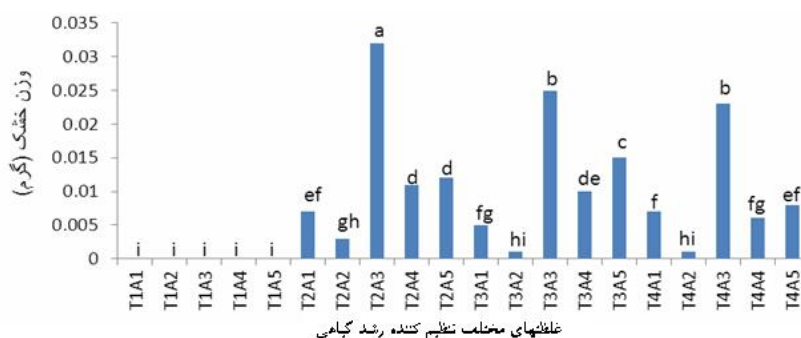
\*\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد گیاهی

شکل ۱- مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف 2,4-D در ترکیب با ۰/۱ میلی گرم 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 میلی گرم در لیتر BAP توأم می‌باشد: T1: فاقد 2,4-D، T2: ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D، T3: ۳ میلی گرم در لیتر 2,4-D و T4: ۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D. A نشان‌دهنده نوع ریزنمونه می‌باشد: A1: کوتیلدون، A2: هیپوکوتیل، A3: برگ، A4: گره، A5: نوک شاخه.

ریز نمونه برگ در تیمارهای ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به ترتیب ۰/۰۲۵ و ۰/۰۲۳ گرم وزن خشک تولید کرد. به طوری که کمترین میزان وزن خشک در تیمار بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D مشاهده گردید. در بین ریز نمونه‌ها، 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 ریز نمونه‌های 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 توأم 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 ریز نمونه می‌باشد: A1: کوتیلدون، A2: هیپوکوتیل، A3: برگ، A4: گره، A5: نوک شاخه.

الف). کمترین میزان القای کالوس (صفر درصد) در تیمارهای فاقد تنظیم‌کننده رشد گیاهی و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP برای تمامی ریز نمونه‌ها مشاهده شد و پس از آن ریز نمونه هیپوکوتیل در تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۲۰ درصد القای کالوس در رده بعدی قرار داشت. بهترین محیط کشت و ریز نمونه در القای کالوس، محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ریز نمونه برگ بود (شکل ۳).

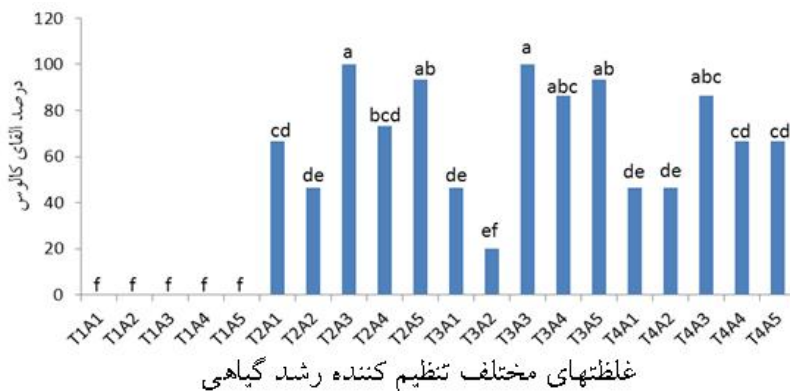
بررسی غلظت‌های مختلف 2,4-D بر درصد القای رویان-زایی بدنی ریز نمونه‌های مختلف مرزنجوش بخارایی بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین درصد تولید کالوس رویان‌زا در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم 2,4-D در لیتر در ریز نمونه نوک شاخه مشاهده شد و کمترین میزان القای کالوس رویان‌زا در محیط کشت MS فاقد 2,4-D در همه ریز نمونه‌ها و در محیط حاوی ۵

اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر وزن خشک ریز نمونه‌های مختلف مرزنجوش بخارایی اثرات متقابل 2,4-D و ریز نمونه‌های مختلف در سطح احتمال ۱ درصد بر وزن خشک کالوس معنی‌دار بود (جدول ۱). حداکثر وزن خشک ۰/۰۳۲ گرم در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و در ریز نمونه برگ ثبت شد.

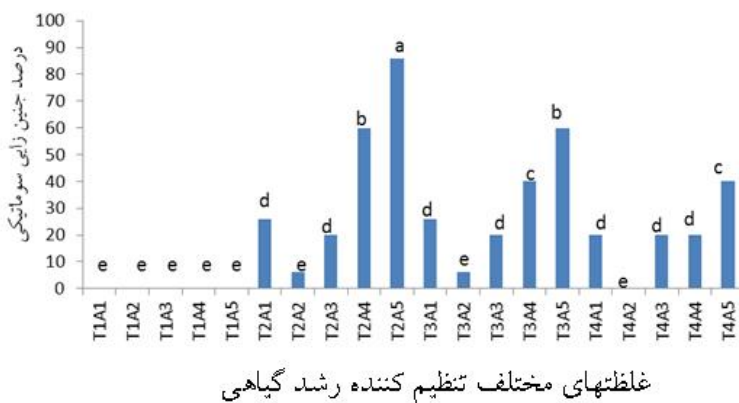
بررسی غلظت‌های مختلف 2,4-D در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بر القای کالوس ریز نمونه‌های مختلف پس از اعمال تیمارها، صفات مورد نظر ارزیابی و تجزیه واریانس شده و میانگین‌های حاصل از طریق آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است. تجزیه داده‌ها نشان داد که اثرات متقابل ریز نمونه 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 ریز نمونه برگ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد و ریز نمونه نوک شاخه در محیط کشت MS حاوی ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ریز نمونه گره در تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۹۳/۳ درصد القای کالوس در رده‌های بعدی قرار داشتند (شکل ۵

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).

میلی گرم 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



شکل ۳- مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف 2,4-D در ترکیب با ۰/۱ میلی گرم 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 میلی گرم در لیتر BAP توام می‌باشد؛ T1: فاقد 2,4-D، T2: ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D، T3: ۳ میلی گرم در لیتر 2,4-D و T4: ۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D. A نشان‌دهنده نوع ریزنمونه می‌باشد؛ A1: کوتیلدون، A2: هیپوکوتیل، A3: برگ، A4: گره، A5: نوک شاخه.



شکل ۴- مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف 2,4-D در ترکیب با ۰/۱ میلی گرم 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 میلی گرم در لیتر BAP توام می‌باشد؛ T1: فاقد 2,4-D، T2: ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D، T3: ۳ میلی گرم در لیتر 2,4-D و T4: ۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D. A نشان‌دهنده نوع ریزنمونه می‌باشد؛ A1: کوتیلدون، A2: هیپوکوتیل، A3: برگ، A4: گره، A5: نوک شاخه.

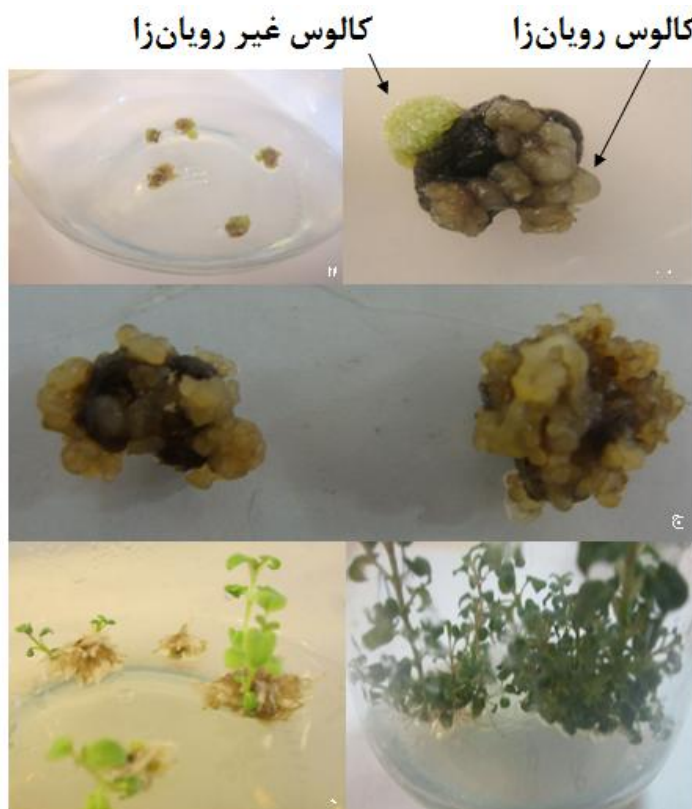
آزمایش ۲: بررسی اثر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده رشد BAP بر شاخه‌زایی ریزنمونه‌های متفاوت اثرات متقابل غلظت‌های مختلف BAP و ریزنمونه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد بر درصد شاخه‌زایی معنی‌دار بود

(جدول ۲). بیشترین میزان شاخه‌زایی (۱۰۰ درصد) در ریزنمونه گره و نوک شاخه در هر دو تیمار صفر و ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP و کمترین میزان در ریزنمونه کوتیلدون و برگ در تیمار فاقد تنظیم کننده رشد گیاهی

بیشترین میزان شاخه‌زایی (۱۰۰ درصد) در ریزنمونه گره و نوک شاخه در هر دو تیمار صفر و ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP و کمترین میزان در ریزنمونه کوتیلدون و برگ در تیمار فاقد تنظیم کننده رشد گیاهی

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).

به‌دست آمد (شکل ۶). با وجود تولید نشدن کالوس در محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی و محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ریزنمونه‌های نوک

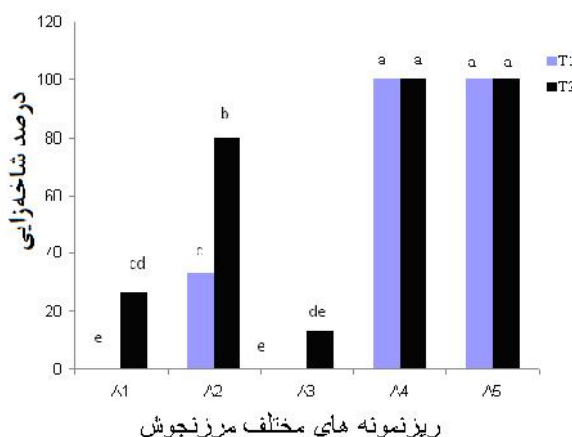


شکل ۵- القای کالوس، رویان‌زایی و باززایی گیاه مرزنجوش بخارایی در محیط‌های کشت پایه MS حاوی ترکیبات تنظیم‌کننده رشد گیاهی. الف: القای کالوس در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد گیاهی 2,4-D و BAP، ب: تولید کالوس‌های رویان‌زا و غیررویان‌زا در یک ریزنمونه نوک شاخه، ج: رشد کالوس‌های رویان‌زا در محیط کشت حاوی 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
BAP (B)	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



شکل ۶- بررسی مقایسه میانگین غلظت صفر و ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP برای شاخه زایی ریزنمونه های مختلف. حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد آزمون دانکن می باشد. T1: بدون تنظیم کننده رشد گیاهی، T2: ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP، A1: کوتیلدون، A2: هیپوکوتیل، A3: برگ، A4: گره و A5: نوک شاخه.

## بحث

تولید کالوس وجود تنظیم کننده 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 شده است (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 تنظیم کننده 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 غلظت های مختلف BAP و 2,4-D انجام می شود (Wang *et al.*, 1985)، اما با این حال مطالعه تأثیر غلظت های مختلف تنظیم کننده 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 می توان گفت که در این پژوهش محیط حاوی غلظت پایین 2,4-D درصد کالوس-زایی بهتری را نشان داد و با نتایج سایر پژوهش ها (Arafah *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 می کند.

حد اکثر وزن تر و وزن خشک کالوس در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D در ریزنمونه برگ مشاهده شد و کمترین میزان کالوس در محیط کشت MS فاقد 2,4-D در تمامی ریزنمونه ها مشاهده شد. تأثیر وجود اکسین به تنهایی و یا در حضور سیتوکینین در بیشترین درصد وزنی می تواند به علت تفاوت در وجود تنظیم کننده های رشد گیاهی درونزا در گیاهان مختلف باشد (Sarkheil *et al.*, 2009). برخی از گیاهان دارای اکسین درونزا می باشند و در صورت استفاده از اکسین خارجی به ویژه 2,4-D باعث تحریک سنتز بیشتر اکسین در داخل گیاه شده و این امر باعث تولید کالوس بیشتر در ریزنمونه ها می شود (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 تنظیم کننده رشد گیاهی باعث کاهش رشد و القای کالوس می شود که با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد (شکل ۳). غلظت های خیلی زیاد تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D ممکن است برای بیان ژن های درگیر در تقسیم سلولی و تمایززدایی بافت، مهارکننده باشد (Mahmood *et al.*, 2012). نتایج مطالعه نشان داد برای



زمینی، 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 اندام-زایی 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 درون شیشه‌ای 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).

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 سبب-

## نتیجه گیری کلی

نتایج نشان داد که وجود تنظیم کننده 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 میلی گرم در لیتر 2,4-D در ترکیب با ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP و در ریزنمونه برگ به دست آمد. به طوری که بیشترین وزن تر و خشک نیز در تیمار ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D و در ریزنمونه برگ مشاهده گردید. کمترین میزان القای کالوس و وزن تر و خشک در تیمار ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP مشاهده شد. با افزایش غلظت 2,4-D کالوس زایی، وزن تر و خشک و رویان زایی کاهش پیدا کرد. در بین ریزنمونه ها برگ و هیپوکوتیل به ترتیب بیشترین و کمترین کالوس زایی و وزن تر و خشک را نشان دادند و ریزنمونه نوک شاخه بهترین ریزنمونه برای رویان زایی ثبت شد. البته بیشترین میزان شاخه زایی (۱۰۰ درصد) در ریزنمونه گره و نوک شاخه در هر دو تیمار صفر و ۰/۱ میلی گرم در لیتر BAP و کمترین میزان در ریزنمونه کوتیلدون و برگ در تیمار فاقد تنظیم کننده رشد گیاهی به دست آمد.

## منابع مورد استفاده

- 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.
- Arafteh, 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.
- Bourgau, F., Gravot, A. and Goniter, E., 2002. Production of plant secondary metabolites. Plant Science, 161: 839-851.
- Centeno, M.I., Rodriguez, A., Feito, I. and Fernandez, B., 1996. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses 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 suberosa* L. (Passifloraceae). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 106: 47-45.
- 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. Improving 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-*

- 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 embryogenesis 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., Zagorskina, 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 Amsterdam, 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 *Tylophora 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., Saryhan, 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* micropagation 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

- 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 organogenesis in *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 heterophyllus* 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.
- Sarkheil, P., Omid, 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

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

B. Hosseini<sup>1\*</sup> and A. Bighammat<sup>2</sup>

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

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

Received: 20.01.2016

Accepted: 09.03.2016

### Abstract

*Origanum vulgare* 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<sup>-1</sup> 2,4-D on node explants. Maximum callus induction (93.3%) was observed on MS medium supplemented with 3 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D. No callus induction (0%) was observed on control and MS medium supplemented with 0.1 mg l<sup>-1</sup> BA on leaf explants. Higher percentage of embryogenic callus production was obtained on MS medium supplemented with 1 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D in combination with 0.1 mg l<sup>-1</sup> BAP on shoot tip explants. Percentage of embryogenic induction was the lowest on hormone free MS medium and media containing 0.1 mg l<sup>-1</sup> BAP in all explants and MS media supplemented with 5 mg l<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> BAP were obtained.

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