نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۷، شماره ۱، صفحه ۱۴۲-۱۳۲ (۱۳۹۸)
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2019.122126.1303
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1398.27.144.53.1.1576.41

بررسی نوع محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی درون‌شیشه‌ای گیاه دارویی و مرتعی اروانه یزدی *(Hymenocrater yazdianus)*

کاظم کمالی[1*]، حمیده برزگر[2] و حمید سودایی‌زاده[3]

۱- نویسنده و مسئول مکاتبات، استادیار، گروه علوم خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه یزد، ایران، پست الکترونیک: kkamali@yazd.ac.ir
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه یزد، ایران
۳- دانشیار، گروه مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه یزد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۲۴

چکیده

اروانه یزدی (***Hymenocrater yazdianus***) از گونه‌های مهم دارویی و مرتعی متعلق به تیره نعنا می‌باشد. در این تحقیق تکثیر انبوه این گیاه با روش کشت بافت بررسی شد. پس از ضدعفونی جوانه‌های جانبی و انتهایی به‌عنوان ریزنمونه در کلرید جیوه ۰/۱ درصد، سه بار شست‌وشو با آب‌مقطر استریل حاوی اسید سیتریک به غلظت ۰/۱ درصد، در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ بدون تنظیم‌کننده رشد گیاهی استقرار یافت. سپس گیاهچه‌ها برای انجام پرآوری به همین محیط کشت، شامل ترکیب چهار غلظت بنزیل آدنین (BA) (۰/۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و سه سطح ایندول بوتیریک اسید (IBA) (۰/۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) در ۱۲ تیمار و ۸ تکرار منتقل شدند. نتایج نشان داد که بیشترین شاخه‌زایی در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید با متوسط ۵/۵ شاخه به‌دست آمد. برای ریشه‌زایی محیط‌های کشت موراشیگ و اسکوگ و لینسمایر و اسکوگ (LS) (۱۹۵۶) مورد بررسی قرار گرفتند. در این محیط‌ها از پنج سطح ایندول بوتیریک اسید (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد و ۹۵ درصد گیاهچه‌ها در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ با ۲ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید ریشه‌دار شدند. در نهایت، ۸۳ درصد گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در محیط پیت و پرلیت با نسبت ۲ به ۱ با موفقیت سازگار گردیدند.

واژه‌های کلیدی: ایندول بوتیریک اسید، بنزیل آدنین، سازگاری، ریشه‌زایی، شاخه‌زایی

مقدمه

اروانه (*Hymenocrater yazdianus*) گیاهی است متعلق به تیره نعنا که دارای ۲۱ گونه بوده که ۱۱ گونه آن در ایران تشخیص داده شده و کم و بیش به صورت پراکنده در مناطق مختلف وجود دارد و از میان این‌ها چهار گونه شامل (*H.yazdianus*، *H. incanus*، *H. platystegius* و *H. oxyodontus*) به‌عنوان گونه‌های بومی ایران شناخته شده‌اند (Mozaffarian, 1996; Soodmand *et al*., 2015). گیاه اروانه یزدی انحصاری ایران و فقط در استان یزد وجود دارد و در رویشگاه‌های طبیعی دارای تراکم بسیار پایین و در معرض خطر انقراض قرار دارد (Mozafarian, 1996; Hassanzadeh *et al*., 2011).

گونه‌های مختلف اروانه در استان‌های خراسان رضوی، خراسان شمالی و جنوبی، آذربایجان شرقی، فارس، گلستان،

اصفهان، کرمانشاه، کردستان، مازندران، قزوین، تهران و یزد یافت شده است و بسیاری از این گونه‌ها دارای ارزش دارویی و در سراسر دنیا در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Shahriari *et al*., 2013; Sadeghian *et al*., 2015).

گل اروانه با نام محلی دوای شیخ‌علی، در طب سنتی ایران مصرف دیرینه دارد. از برگ‌ها و سرشاخه‌های گلدار آن به صورت دم‌کرده به‌عنوان برطرف‌کننده علائم سرماخوردگی، مدر، خوشبوکننده دهان و به‌صورت موضعی برای خوشبو کردن بدن استفاده می‌شود. ماده مؤثره گل اروانه، اسانس حاصل از تقطیر برگ‌ها و سرشاخه‌های گلدار با ترکیبی از مواد شیمیایی مختلف بوده و دارای خواص ضد باکتری، ضد قارچ و آنتی‌اکسیدان می‌باشد. اسانس گل اروانه جزء ۱۰ اسانس مهم خانواده نعنا گزارش شده که جایگاه خاصی در تجارت جهانی دارد (Timori *et al*., 2011).

مهمترین مواد تشکیل‌دهنده اسانس در جنس *Hymenocrater* شامل فلاونوئیدها، اسید فنولیک و ترپنوئیدها هستند. براساس تحقیقات انجام شده و مطالعات دارویی گونه‌های مختلف این جنس به دلیل وجود متابولیت‌های مهم مانند اسید رزمارینیک و روتین[1] در شاخه‌های هوایی دارای اثرهای ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدان، تقویت‌کننده قلب، ضد سرطان و ضد دیابت هستند (Soodmand *et al*., 2015). علاوه‌براین بر اساس آزمایش‌های انجام شده اجزاء اصلی مواد مؤثره این گیاه شامل ترپن‌ها و برخی دیگر از ترکیبات آروماتیک و خطی با وزن مولکولی کم می‌باشد. بر اساس منابع موجود فیتول، سیترال و اسپاتوولنول[2] به‌عنوان مواد اصلی اسانس این گیاه می‌باشند (Hassanzadeh *et al*., 2011). علاوه‌براین اسانس به‌دست آمده از اروانه یزدی دارای خاصیت جلوگیری از فعالیت *Escherichia faecalis*، *E. coli*، *Staphylococcus paratyphoid* و *S. epidermidis* می‌باشد (Taherpour *et al*., 2011).

گیاه اروانه دارای گونه‌های متعددی در ایران و خارج از کشور است و از لحاظ دارویی دارای ارزش زیادی است و همان طوری که اشاره شد اروانه یزدی فقط در یزد بوده و جمعیت گیاهی آن بسیار اندک است (Mozafarian, 1997). ازاین‌رو با توجه به اهمیت حفظ این گیاه با ارزش و عدم جوانه‌زنی یکنواخت بذرها در گونه‌های مختلف این جنس، کشت بافت آن برای تولید انبوه و جلوگیری از خطر انقراض انجام شده است. مطالعه کشت بافت این گیاه می‌تواند به تکثیر انبوه و حفظ خواص ژنتیکی آن کمک کند. در واقع این روش یک راه مؤثر برای تکثیر سریع گونه‌های گیاهی است و برای به‌دست آوردن گیاهان با خلوص ژنتیکی بالا کاربرد دارد (Timouri *et al*., Sadeghian *et al*., 2014, 2011).

کشت درون شیشه‌ای در واقع شامل کشت سلول، بافت و اندام گیاهیست. در همه این کشت‌ها، رشد ماده گیاهی ضدعفونی شده در یک محیط سترون و مغذی در یک لوله آزمایش انجام می‌شود. در سال‌های اخیر تکنیک‌های کشت بافت گیاهی به یک ابزار بسیار قوی برای تکثیر و اصلاح گونه‌های مختلف گیاهی تبدیل شده‌اند Azadi and (Bagheri, 2003). کشت بافت روشی مفید و کاربردی در جهت ریزازدیادی گیاهان در یک دوره کوتاه بدون در نظر گرفتن فصل کاشت و رویش می‌باشد. علاوه‌براین کشت بافت روشی جدید و مؤثر برای اصلاح گیاهان از طریق دستکاری‌های ژنتیکی می‌باشد. عوامل مختلفی مانند محیط کشت، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، نوع گونه و غیره در میزان باززایی گیاهان مؤثر می‌باشد (Ghotbzadeh *et al*., 2012). تیموری و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه کشت بافت گونه‌ای از اروانه به نام *H. platysteguis*، تک‌گره‌های فعال را به‌عنوان ریزنمونه اولیه از گیاهان در حال رشد در رویشگاه طبیعی انتخاب و در محیط‌های کشت مختلف قرار دادند. بیشترین میزان باززایی در محیط کشت B5 دارای ۴ میلی‌گرم بر لیتر زغال فعال و ۴ میلی‌گرم بر لیتر IBA و کمترین میزان باززایی در محیط کشت MS حاصل شد (Timouri *et al*., 2011).

1- Rosmarinic acid and Rutin
2- Phytol, Citral and Spathulenolp

در تحقیق دیگری روی کشت بافت مریم‌گلی که هم‌خانواده گیاه اروانه می‌باشد از جوانه‌های انتهایی برای کشت اولیه استفاده شد، در نتیجه بیشترین تعداد شاخه در محیط کشت MS حاوی ۸/۹ میکرومول BA و ۲/۹ میکرومول IAA و بیشترین ریشه‌ها در محیط ریشه‌دهی حاوی ۰/۵ میکرومول NAA به‌دست آمد (Skała and Wysokińska, 2004). در پژوهشی که روی کشت بافت گیاه اسطوخودوس به‌عنوان گیاهی از خانواده نعناع انجام شد، بالاترین میزان تکثیر با استفاده از محیط کشت MS حاوی ۲/۲ میکرومول BA و ۲/۵ میکرومول نفتالین استیک اسید و بهترین نتایج برای ریشه‌دهی، در محیط MS حاوی ۲/۵ میکرومول نفتالین استیک اسید حاصل شد (Echeverrigaray et al., 2005). بررسی باززایی گیاه ریحان با استفاده از ریزنمونه‌های تک‌گره نشان داد که در محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آمینو پورین[3] بیشترین تعداد شاخه تولید شد (Begum *et al.*, 2000).

این تحقیق با هدف تعیین بهترین محیط کشت، بهترین غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و شرایط محیطی بهینه برای تولید انبوه گیاه اروانه یزدی در شرایط درون شیشه‌ای، طی مراحل استقرار، پرآوری یا شاخه‌زایی، ریشه‌زایی و انتقال به خاک و سازگار کردن گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت انجام شد.

مواد و روش‌ها

مرحله ضدعفونی و استقرار

برای کشت اولیه در این تحقیق جوانه‌های جانبی و انتهایی با طول ۰/۵ تا ۱/۵ سانتیمتر به‌عنوان ریزنمونه اولیه استفاده شد که این نمونه‌ها از عرصه‌های طبیعی رشد این گیاه در استان یزد فراهم گردید. برای ضدعفونی مواد گیاهی، از کلرید جیوه با غلظت ۰/۱ درصد به مدت دو دقیقه استفاده شد. پس از ضدعفونی مواد گیاهی سه مرتبه با آب‌مقطر حاوی اسید سیتریک ۰/۱ درصد برای کاهش آزاد شدن مواد فنلی و پیشگیری از پدیده قهوه‌ای شدن شست‌وشو داده شدند. در تمام مراحل ضدعفونی و آبکشی شیشه‌های حاوی ریزنمونه در محلول ضدعفونی‌کننده و در محلول‌های شست‌وشو تکان داده شد تا این محلول‌ها به همه قسمت‌های ریزنمونه نفوذ نماید. در نهایت برای آبگیری به روی کاغذ صافی استریل منتقل و بعد از آبگیری در محیط کشت MS (Murashige & Skooge,1962) بدون هورمون کشت (تکمیل شده با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۶ گرم بر لیتر آگار، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول) و در شیشه‌های کوچک (مکارتی به قطر ۲۵ میلیمتر و طول ۸۵ میلی‌متر) از هریک فقط یک نمونه کشت داده شد.

تمام محیط‌های کشت در دستگاه اتوکلاو و دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۱۴ دقیقه ضدعفونی شدند. pH محیط‌های کشت قبل از افزودن آگار بین ۵/۷ تا ۵/۸ تنظیم شد. نمونه‌های گیاهی بعد از کشت، به اتاق رشد با شدت نور ۴۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. درجه حرارت در زمان روشنایی ۲۷ و در تاریکی ۲۵ درجه تنظیم شد.

مرحله شاخه‌زایی

چهار هفته پس از استقرار گیاهان و حذف آلودگی‌های اولیه، برای شاخه‌زایی آزمایشی در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار سطح BA (۰/۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و سه سطح IBA (۰/۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) به صورت یک هورمون و ترکیبی در ۱۲ تیمار و هر تیمار با هشت تکرار در گیاهچه‌های با طول تقریبی ۱۲ میلی‌متر در محیط کشت MS انجام شد (جدول ۱).

3- BAP

جدول ۱- تیمارهای هورمونی استفاده شده برای شاخه‌زایی گیاه اروانه یزدی

BA mgl^{-1} / IBA mgl^{-1}	۰	۰/۵	۱	۱/۵
۰	B_1I_1	B_2I_1	B_3I_1	B_4I_1
۰/۰۱	B_1I_2	B_2I_2	B_3I_2	B_4I_2
۰/۱	B_1I_3	B_2I_3	B_3I_3	B_4I_3

در این جدول ردیف‌های B1، B2، B3 و B4 مربوط به سطوح به‌کار برده شده BA در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و ردیف‌های I1، I2 و I3 مربوط به سطوح به‌کار برده شده IBA در غلظت‌های ۰، ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد که در یک طرح کاملا تصادفی انجام شد. تمام تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شده به صورت ترکیبی می‌باشد.

ریشه‌زایی

به‌منظور تعیین محیط کشت مناسب ریشه‌زایی، نمونه‌های گیاهی با رشد مطلوب و دارای ارتفاع حدود ۵/۱ سانتیمتر یا بیشتر به محیط‌های کشت لینسمایر و اسکوگ (LS) حاوی غلظت‌های مختلف IBA در پنج سطح (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۱ و۲ میلی‌گرم در لیتر) و محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف IBA در پنج سطح (۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) با ۱۰ تکرار در شیشه‌های مربایی معمولی به قطر ۶۵ میلی‌متر و طول ۹۰ میلی‌متر منتقل شدند. در هر دو آزمایش ریشه‌دهی، بعد از اعمال یک هفته تیمار تاریکی و القاء ریشه‌زایی، به اتاق رشد با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند. بعد از چهار هفته در نمونه‌هایی که ریشه‌دار شده بودند میانگین ریشه‌زایی در غلظت‌های مختلف هورمونی اندازه‌گیری شد.

پس از رشد ریشه‌ها در محیط‌های کشت، زمانی که طول آن‌ها به اندازه مطلوب (بطول ۳ سانیمتر و بیشتر) رسید آنها را از شیشه‌های حاوی محیط کشت بیرون آورده و پس از شستن آگار چسبیده به ریشه‌ها به ترکیب خاکی (پیت و پرلیت) به نسبت ۲ به۱ منتقل شدند. لازم به ذکر است که این ترکیب ابتدا کمی مرطوب و بعد در اتوکلاو به مدت ۲۵ دقیقه ضدعفونی گردید. بسترهای کشت در این مرحله در داخل لیوان‌های پلاستیکی توزیع و به‌منظور حفظ رطوبت در روزهای اول (چهار روز) به وسیله لیوان دیگری کاملاً پوشانده شد و به‌تدریج با ایجاد منافذی در روی آن پس از یک ماه گیاهان به شرایط طبیعی سازگار شدند. برای آبیاری گیاهچه‌های سازگار شده از محلول 1/2 MS هر ۱۰ روز یکبار و آب‌مقطر استریل هر هفته یکبار استفاده شد.

طرح آماری و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

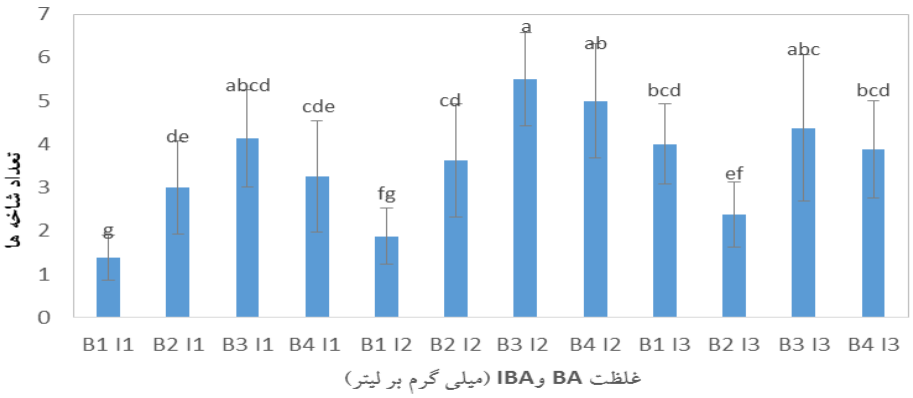
طرح آماری مورد استفاده در این مرحله طرح کاملاً تصادفی بوده، داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار $SPSS_{20}$ مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. در صورت نرمال بودن داده‌ها از روش تجزیه واریانس و در صورت نرمال نبودن داده‌ها از آزمون کروسکال والیس برای تجزیه‌وتحلیل استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

رشد طولی و پرآوری

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تأثیر هورمون‌های سایتوکینین و اکسین بر شاخه‌زایی گیاه اروانه یزدی نشان داد که اثر متقابل BA و IBA در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌داری بر میزان شاخه‌زایی داشت (جدول ۲ و شکل ۱). مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که با ترکیب BA و IBA به‌ترتیب با غلظت ۱ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر با متوسط ۵/۵ شاخه

بالاترین میزان شاخه‌زایی به‌دست آمد شکل ۱ و شکل ۲ ج) و کمترین شاخه‌زایی مربوط به تیمار شاهد فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد BA و IBA برابر ۱/۳ شاخه بود (شکل ۱ و شکل ۲ الف و ب).



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر غلظت BA و IBA بر تعداد شاخه حاصل از ریزنمونه‌های کشت جوانه *H.yazdianus*

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند در سطح ۵ درصد آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

B1I1 (BA=۰، IBA=۰)، B2I1 (BA=۰/۵، IBA=۰)، B3I1 (BA=۱، IBA=۰)، B4I1 (BA=۱/۵، IBA=۰)، B1I2 (BA=۰، IBA=۰/۰۱)، B2I2 (BA=۰/۵، IBA=۰/۰۱)، B3I2 (BA=۱، IBA=۰/۰۱)، B4I2 (BA=۱/۵، IBA=۰/۰۱)، B1I3 (BA=۰، IBA=۰/۱)، B2I3 (BA=۰/۵، IBA=۰/۱)، B3I3 (BA=۱، IBA=۰/۱)، B4I3 (BA=۱/۵، IBA=۰/۱).

جدول ۲- تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تأثیر هورمون‌های سایتوکینین و اکسین بر شاخه‌زایی گیاه اروانه یزدی

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
تیمار BA*IBA	۱۱	۱/۴۸	۰/۱۳۵	۱۲/۶۶۴**
خطا	۸۴	۰/۸۹۴	۰/۰۱۱	
کل	۹۵	۲/۳۷۴		
ضریب تغییرات		۱۶/۶۷		

نتایج بدست‌آمده در مرحله شاخه‌زایی با نتایج کمالی و همکاران (۱۹۹۵) مطابقت داشت (Kamali *et al* , 1995)، این محققان تیمار حاوی BA با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر را مناسب‌ترین تیمار برای شاخه‌زایی پایه‌های رویشی هیبرید هلو- بادام پیشنهاد کردند. با این تفاوت که در آزمایش‌های مربوط به شاخه‌زایی از تنظیم‌کننده رشد NAA به‌عنوان اکسین استفاده کردند و بالاترین میزان شاخه‌زایی مربوط به تیمار حاوی BA با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر و NAA با غلظت صفر میلی‌گرم بر لیتر بود. هرچند نمونه مورد آزمایش این محقق از یک گیاه چوبی بوده ولی شباهت نتایج این تحقیق از لحاظ نقش هم‌افزایی اکسین‌ها (در غلظت پایین) همراه با یک نوع سیتوکینین می‌باشد. صادقیان و همکاران (۲۰۱۴) نیز نتایجی مشابه به‌دست آوردند و آنها نیز استفاده از BA با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر را برای

شاخه‌زایی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) پیشنهاد کردند (Sadeghian *et al*., 2014).

با توجه به بررسی‌های انجام شده نتایج حاصل در مرحله شاخه‌زایی با نتایج بگام و همکاران (۲۰۰۰) بر روی باززایی گیاه ریحان مقدس و ساها و همکاران (۲۰۱۰) روی گیاه ریحان نیز مطابقت دارد (Begum et al., 2002; Saha *et al*., 2010; Alizadeh and Hosseini, 2013).

ریشه‌زایی (به ابتدای بند بعد به‌عنوان تیتر منتقل شود)

از نظر تعداد ریشه و طول ریشه‌ها در مرحله ریشه‌زایی به علت عدم نرمال بودن داده‌های حاصل با آزمون Kolmogorov Smirnov، از آزمون ناپارامتریک آزمون کروسکال برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها استفاده شد. بر این اساس نتایج مقایسه ۵ غلظت مورد مطالعه IBA در محیط کشت LS نشان داد که نوع تیمار بر تعداد ریشه و طول ریشه اثر معنی‌داری نداشته است (جدول ۳ و شکل ۲ د و ه).

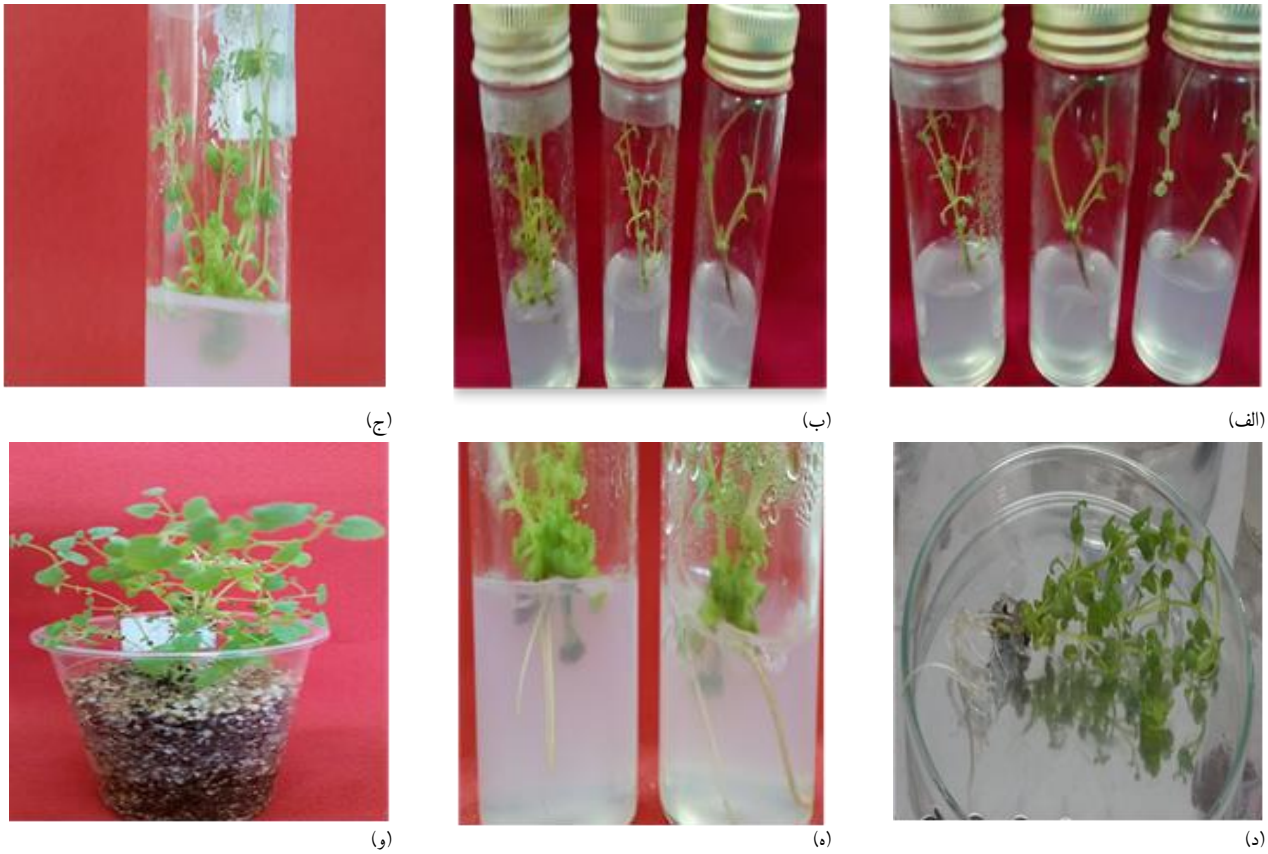
جدول ۳- نتایج حاصل از آزمون کروسکال والیس به همراه متغیرهای گروه‌بندی بر تعداد و طول ریشه گیاه اروانه یزدی

منابع تغییر	تعداد ریشه‌ها (عدد)	طول ریشه‌ها (میلی‌متر)
Chi-Square	۳/۸۴۴	۵/۸۲۸
DF	۴	۴
Sig	۰/۴۲۸	۰/۲۱۲

در آزمایشی دیگر که از محیط کشت MS به‌منظور ریشه‌زایی استفاده شد در این آزمایش نیز از نظر تعداد ریشه و طول ریشه‌ها در مرحله ریشه‌زایی به علت عدم نرمال شدن داده‌های حاصل با آزمون Kolmogorov Smirnov از آزمون کروسکال والیس برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها استفاده شد. نتایج مقایسه ۵ غلظت مورد مطالعه IBA بررسی شده در محیط کشت MS توسط آزمون کروسکال والیس نشان داد که با توجه به جدول ۴ هورمون IBA در سطح احتمال ۱ درصد بر تعداد ریشه و در سطح احتمال پنج درصد بر طول ریشه اثر معنی‌داری گذاشت (جدول ۴).

جدول ۴- نتایج حاصل از آزمون کروسکال والیس به همراه متغیرهای گروه‌بندی

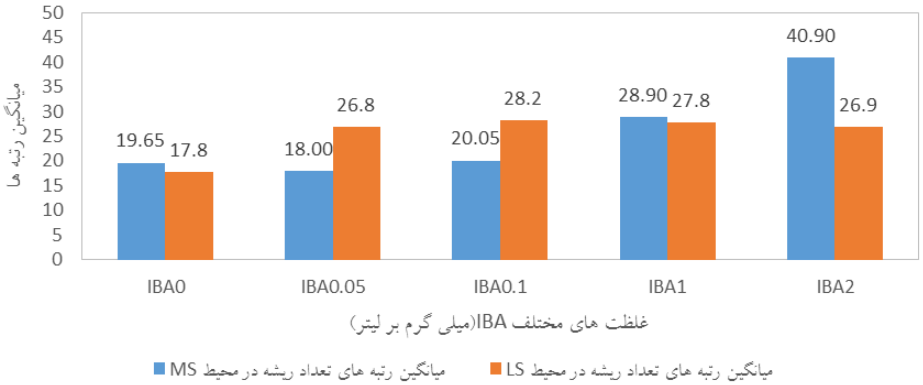
منابع تغییر	تعداد ریشه‌ها	طول ریشه‌ها (میلی‌متر)
Chi-Square	۲۲/۸۰۰	۱۲/۰۲۴
DF	۴	۴
Sig	۰/۰۰۰	۰/۰۱۷



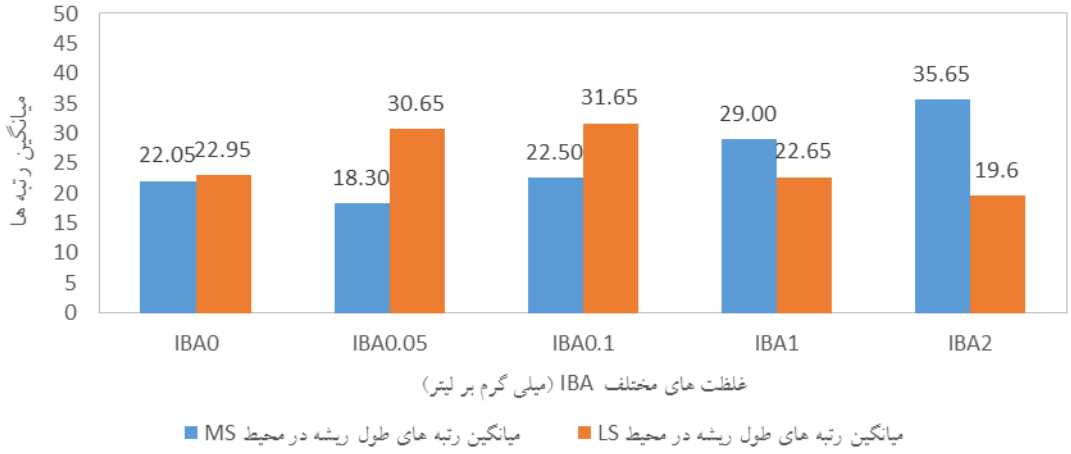
شکل ۲- مراحل مختلف استقرار و رشد طولی: الف و ب) پرآوری، ج) ریشه‌زایی، د) انتقال به خاک، ه) گیاه اروانه یزدی

توجه: زیرنویس شکل بررسی شود، بنظرم کامل نیست.

با توجه به شکل ۳ بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت MS با تیمار هورمونی IBA با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد، به‌طوری‌که حدود ۹۰ درصد از گیاهچه‌ها در این تیمار ریشه‌دار شده بودند.



شکل ۳- مقایسه میزان ریشه‌زایی در محیط کشت **MS** و **LS** در تیمارهای حاوی **IBA**



شکل ۴- مقایسه طول ریشه‌ها در محیط کشت MS و LS در تیمارهای حاوی IBA

با توجه به شکل ۴، بیشترین طول ریشه در محیط کشت MS با تیمار هورمونی IBA با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. نتایج بدست‌آمده در مرحله ریشه‌زایی در این پژوهش با نتایج نریمانی و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت داشت (Narimani *et al.*, 2016). این محققان نیز محیط کشت MS با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA را از نظر طول، تعداد و درصد ریشه‌زایی برای گیاه دارویی پونه‌سای بی‌کرک (*Nepeta nuda*.L) معرفی کردند. در پژوهشی دیگر که توسط اطریشی و مرادی (۲۰۱۴) روی کالوس‌زایی و اندام‌زایی غیرمستقیم گیاه فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum* L.) انجام شد، محیط کشت پایه MS حاوی زغال فعال بیشترین ریشه‌زایی را نشان داد که این نتایج نیز با نتایج این پژوهش در رابطه با نتیجه‌بخش بودن محیط MS برای ریشه‌زایی مطابقت دارد (Utrishi and Moradi, 2014). محققان دیگری به‌منظور شناسایی محیط کشت مناسب ریشه‌زایی بر باززایی درون‌شیشه‌ای گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis*) از دو محیط کشت پایه MS و ½ MS به تنهایی و محیط کشت MS ½ تکمیل شده با چهار غلظت هورمون IBA (۱، ۲/۵، ۴/۹۲ و ۹/۸۴ میکرومولار) استفاده کردند و بیشترین درصد ریشه‌زایی در غلظت ۹/۸۴ میکرومولار IBA مشاهده شد (Alizadeh and Hossaini.2013).

در مرحله انتقال، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده پس از سه ماه شمارش و در پایان ۸۳ درصد از گیاهچه‌ها سازگار شده و در شرایط عادی رشد کردند (شکل ۲).

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق در غلظت‌های پایین و بدون هورمون عمدتاً رشد طولی انجام شده و شاخه‌زایی انجام نشد. ازاین‌رو نمونه‌هایی که در غلظت‌های پایین هورمونی به اندازه حدود یک سانتیمتر یا بیشتر بودند برای شاخه‌زایی به غلظت‌های بالاتر انتقال یافتند. علاوه‌براین در غلظت‌های بالاتر تعداد شاخه‌ها افزایش یافت ولی به دلیل اندازه کوچک آنها برای ورود به مرحله ریشه‌زایی بهتر است دوباره به محیط بدون هورمون یا غلظت‌های پایین منتقل شوند تا اندازه آنها به بیشتر از ۱/۵ سانتی‌متر برسد. بنا بر نتایج حاصل، مرحله شاخه‌زایی گیاه اروانه یزدی با استفاده از بنزیل آدنین ۱ میلی‌گرم در لیتر و ایندول بوتیریک اسید ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تعداد شاخه با میانگین ۵/۵ شاخه به‌دست آمد و افزایش غلظت به دلیل به هم زدن آهنگ رشد گیاهی و تولید برخی مواد ناخواسته مانند اتیلن منجر به بروز پدیده شیشه‌ای شدن،

زردی و در نهایت مرگ و میر گیاهچه‌ها گردید و در غلظت‌های پایین‌تر تعداد شاخه‌های تولید شده کاهش یافت (میانگین ۱/۳ شاخه) و گیاهان فقط وادار به رشد طولی شدند. در مورد مرحله ریشه‌زایی نتایج نشان داد نمونه‌هایی که دارای اندازه کمتر از ۱/۵ سانتی‌متر باشند در محیط خاکی به دلیل تماس نزدیک با خاک آلوده و به‌دلیل ضعیف بودن گیاهچه از بین خواهند رفت. در این مرحله تیمار تاریکی به مدت ۷ روز و کاربرد محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید بهترین نتیجه را در تشکیل ریشه به همراه داشت و مشخص شد که تاریکی می‌تواند به عنوان یک القاءکننده در ریشه‌زایی عمل نموده و تأثیر IBA افزودنی و IAA داخل گیاه را افزایش دهد. دلیل آن این است که هورمون اکسین داخلی گیاه در تاریکی پایداری بیشتری داشته، ازاین‌رو عملکرد آن افزایش خواهد یافت. سازگاری نمونه‌ها نیز با استفاده از مخلوط پیت و پرلیت طی ۵ هفته بدست آمد و ۸۳ درصد گیاهچه‌های کشت‌بافتی در مدت ۵ هفته در این مرحله سازگار شدند. به‌طور کلی می‌توان بیان کرد با کاربرد روش‌های انجام شده در این تحقیق می‌توان اروانه یزدی را به صورت انبوه تولید و از انقراض این گیاه باارزش و مقاوم جلوگیـری کرد. به‌عـلاوه اینکه از ایـن پروتکل بـا قدری تغییرات می‌توان برای تکثیر سایر گونه‌های اروانه استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

– Alizadeh, M., and Hosseini, B., 2013. The Effect of type of mass and BAP on regeneration of (*Hyssopus officinalis* L.). Journal of Horticultural Science (Science and Technology of Agriculture), 27(2): 207-201. (in Persian with English abstract).
– Azadi, P., and Bagheri, H., 2003. Plant breeding using tissue culture technique. Hamedan, University of Bo Ali Sina, First Edition, (in Persian with English abstract).
– Begum, F., Amin, N., Azad M.A.K., 2002. In vitro rapid clonal propagation of Ocimum basilicum L. Plant Tissue Culture and biotechnology Journal, 12: 27-35.
– Echeverrigaray, S., Basso, S., Andrade., L.B., 2005. Micropropagation of Lavandula dentata from axillary buds of field-grown adult plants . Biologia Plantarum, 49(3): 439–442
– Ghotbzadeh Kermani, S., Poursidi, S., Mohammadi, G., Moeini, A., and Baghizadeh, A., 2012 Regenaration of Cardaria draba L. through tissue culture, Agricultural Biotechnology Journal, 1: 151-133. (in persion with English abstract).
– Hassanzadeh, M.K., Emami, S.A., Asili, J., Tayarani Najaran, Z., 2011. Review of the essential oil composition of Iranian Lamiaceae. Journal of Essential Oil Research, 23:1–40
– Kamali, K., Majidi, E., Zarghami, R., 1995. Determination of the most suitable culture medium and growth conditions for micropropagation of GF677 (Hybrid of Peach and Almond). Tarbiat Modares University, Master's Thesis, Agricultural Engineering (Horticulture). (in Persian with English abstract).
– Mozaffarian, V., 1997. Flora of Yazd, Yazd Publishing House, (in Persian)
– Mozaffarian, V., 1996. A dictionary of Iranian plant names. Tehran, Iran: Farhang Mo'aser Publishers (in Persian).
– Murashige, T. and Skoog, F., 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". Physiologia Plantarum. 15 (3): 473–497.
– Narimani, R., Moghadam, M., and Maharb, S., 2016. Evaluation of micropropagation in of Nepeta nuda.L as a medicinal plant, 7(4): 397-387.
– Sadeghian, S., Ranjbar, G., and Kazemi. 2014. Study and selection of suitable hormone composition for regeneration of and proliferation of Basil plant. Agronomy correction research, 6(13): 46-40.
– Sadeghian, M., Hakimi, M.H., Sodaeizadeh, H., 2015. Effect of drought stress on some physiological and morphological characteristics of *Hymenocrater yazdianus*. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 7:110–119
– Saha, S., Tulsi, D., and Ghosh, P., 2010. Micropropagation of Ocimum Klimandscharikum Guerke (Labiatae). Polish Academy of Sciences and Jagiellonian university. Acta Biological Cracoviensia Series Botanica, 52:50-58.
– Shahriari, S., Khanahmadi, M., Tahvilian, R., 2013. T he study of essential oil of Hymenocrater longiflorus Benth growing in Paveh. Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences, 2:111–115.
– Skala, E., and Wysokinska, H., 2004. In vitro regeneration of Salvia nemorosa L. from shoot tips and leaf explants. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 40:596–602.
– Soodmand, M., Mohamadi Sani, A., Jalilvand, M.R., 2015. Phytochemical analysis, total phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity from aerial parts

on the direct regeneration *Hymenocrater platystegius* plant. Seventh Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran (in Persian with English abstract).

– Utrishi, M., and Moradi, K., 2014. Investigation of callus and indirect organogenesis of sweet pepper plant (*Capsicum annuuml*.) under *in vitro* culture conditions, 27(3): 355-346 (in Persian).

of *Hymenocrater calycinus* (Boiss). Journal of Applied Environmental and Biological Sciences, 4:141–145.

– Taherpour, A., Maroofi, H., Changizi, M., et al. 2011. Chemical compositions of the essential oil and calculation the biophysicochemical coefficients of the components of *Hymenocrater longiflorus* Benth. of Iran. Journal of Nature and Science, 3:104–108.

– Timouri, S., M., Kocheki, A., and Mahallati, M., 2011 The effects Comparison of different culture media

Evaluation of the culture medium and hormonal treatments on the regeneration of *Hymenocrater yazdianus* as a medicinal and pasture plant

K. Kamali[1*], H. Barzegar[2], H. Sodaezadeh[3]

1*- Corresponding Author, Assist. Prof., Department of Soil Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Yazd University, Yazd, I.R. Iran.
E-mail: kkamali@yazd.ac.ir
2- M.Sc. student, Department of desert management, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Yazd University, Yazd, I.R. Iran.
3- Assoc. Prof., Department of desert management, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Yazd University, Yazd, I.R. Iran.

Received: 15.07.2018 Accepted: 02.06.2018

Abstract

Hymenocrater yazdianus is one of the important medicinal and range plant. This plant belongs to Lamiaceae family that grows in arid land regions. In this research mass production of Hymenocrater plant via tissue culture technique was studied. Lateral and apical buds were used as a primary explant for cultivation. For sterilization, Mercuric chloride was used at 0.1% concentration for 2 minutes. After sterilization, explants were washed 3 times with sterilized water containing 0.1% Citric acid for browning prevention of theme. Then all explants transfer to MS medium without any plant growth regulators as an establishment stage. After 4 weeks, explant transported in MS medium containing 0, 0.5, 1, 1.5 mg_l^{-1}, Benzyl adenine (BA) and Indole-butyric acid (IBA) concentrations at 0, 0.01 and 0.1 mgl^{-1} in 12 treatments for proliferation. The results showed, highest shoot number were obtained when we used MS medium at a concentration (1 mgl^{-1}BA and IBA 0.1 mg l^{-1}) In this culture medium we obtained 5.5 shoots in each tube. For rooting stage, MS and LS culture media were studied. In these culture media IBA was used in 0.0, 0.05, 0.1, 1 and 2 mgl^{-1}. The results indicated using MS medium supplemented to 2 mgl^{-1} 95% of explants were rooted. Finally rooted plantlets were adapted successfully in peat and perlite complex to ratios of 2:1 and *in vitro* culture plant successfully transferd to the field.

Keyword: Indole-butyric acid, Benzyl adenine, Rooting, Proliferation, Adaptation