علوم باغبانی ایران
دورۀ ۴۵، شمارۀ ۴، زمستان ۱۳۹۳ (ص ۳۹۹-۳۹۱)

اثر نوع ریزنمونه و ترکیبات مختلف هورمونی بر باززایی مستقیم گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)

خدیجه جنگجو[۱]، عباس حسنی[۲]*، بهمن حسینی[۳]، مراد جعفری[۴] و مرتضی علیزاده[۵]
۱، ۲، ۳، ۴ و ۵. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیاران، استادیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشکدۀ کشاورزی دانشگاه ارومیه
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۹/۱۱)

چکیده

بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) **گیاهی علفی، چندساله و متعلق به تیرۀ نعناعیان** (Lamiaceae) **است که کاربرد دارویی و خوراکی وسیعی دارد. پژوهش حاضر به‌منظور بررسی پتانسیل ۵ نوع ریزنمونۀ مختلف (قطعات گره، مریستم انتهایی، هیپوکوتیل، کوتیلدون و قطعات برگ) درراستای باززایی مستقیم گیاه بادرنجبویه با استفاده از غلظت‌های مختلف هورمون ۶- بنزیل‌آمینوپورین** (BAP) **(۲/۲، ۴/۴ و ۸/۸ میکرومولار) با یا بدون ۱ میکرومولار هورمون ایندول‌استیک اسید** (IAA) **به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام گرفت. بیشترین تعداد القای جوانه (به‌طور متوسط ۲۳/۵۹ و ۱۶/۹۰ جوانه به‌ترتیب برای ریزنمونه‌های مریستم انتهایی و قطعات گره) در غلظت ۸/۸ میکرومولار** BAP **مشاهده شد. بالاترین درصد باززایی (۹۹ درصد) در ریزنمونه‌های مریستم انتهایی و قطعات گره به‌ترتیب در محیط‌های** MS **تکمیل‌شده با ۸/۸ و ۲/۲ میکرومولار** BAP **حاصل شد. در سایر ریزنمونه‌ها هیچ‌گونه باززایی مشاهده نشد. ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززایی‌شده در محیط‌های** MS، MS ½ **و** MS **تکمیل‌شده با ۱، ۲/۵، ۴/۹۲ و ۹/۸۴ میکرومولار ایندول بوتیریک اسید** (IBA) **ارزیابی شد. بیشترین تعداد ریشۀ تشکیل‌شده (۹/۰۶ ریشه‌چه در گیاهچه) در محیط** MS **تکمیل‌شده با ۴/۹۲ میکرومولار** IBA **به دست آمد.**

واژه‌های کلیدی: بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)**، باززایی مستقیم، قطعات گره،** BAP**، محیط** MS.

مقدمه

با توجه به اهمیت گیاهان دارویی در تولید ترکیبات مؤثر مورد نیاز صنایع غذایی، داروسازی، آرایشی و بهداشتی و همچنین رویکرد مجدد دنیا، به‌خصوص کشورهای پیشرفته به استفاده از داروهای گیاهی و سنتی به جای داروهای شیمیایی، لزوم پژوهش بیشتر در مورد جنبه‌های مختلف تولید این گیاهان ارزشمند، احساس می‌شود. یکی از این گیاهان بااهمیت، بادرنجبویه است. بادرنجبویه گیاهی علفی، چندساله و متعلق به تیرۀ نعناعیان (Lamiaceae) است که منشأ اصلی آن شرق مدیترانه و جنوب اروپا گزارش شده است. در فارماکوپه‌های معتبر به کاربردهای دارویی برگ‌ها و پیکر رویشی این گیاه اشاره شده است (Omidbaigi, 2008). اسانس آن در صنایع داروسازی، غذایی و آرایشی و بهداشتی کاربرد فراوان دارد. از مواد مؤثر این گیاه برای درمان ناراحتی‌های عصبی و همچنین بیماری‌های معدی، قلبی و روده‌ای که منشأ عصبی دارند، استفاده می‌شود (Omidbaigi, 2008). این گیاه از زمان‌های گذشته به‌دلیل داشتن خواص تقویت حافظه و رفع افسردگی (Wake *et al*., 2000) مورد توجه بوده است.

* تلفن: ۰۹۱۴۳۴۳۹۹۵۸
E-mail: horthasani@yahoo.com

اخیراً نیز به‌طور گسترده استفاده از آن به‌منزلهٔ داروی ضد اسپاسم، ضد آلزایمر و تقویت‌کنندهٔ قلب (Bennett, 2003)، ضد میکروب، ضد ویروس (Kabala *et al*., 2004)، ضد قارچ، ضد باکتری و تنظیم‌کنندهٔ خواب رایج شده است (Allahverdiyev *et al*., 2004). بادرنجبویه به‌علاوه خواص ضد توموری و ضد سرطانی نیز دارد (Kennedy *et al*., 2004). تکثیر درون‌شیشه‌ای[1] گیاهان دارویی، پتانسیل فوق‌العاده‌ای را برای تولید داروهای گیاهی با کیفیت بالا فراهم آورده است و برای بسیاری از گیاهان باارزش اقتصادی دارویی نظیر *Hydrastis canadensis*، *Catharanthus roseus*، *Datura metel* و *Hypericum perforatum* گزارش شده است (Murch *et al*., 2000; Liu *et al*., 2004; Debnath *et al*., 2006). در بیشتر پژوهش‌ها از روش‌های کارآمد نظیر ریزازدیادی به‌دلیل مزایای زیاد نسبت به روش‌های سنتی تکثیر استفاده می‌شود. در روش ریزازدیادی، میزان تکثیر به‌سرعت افزایش می‌یابد و امکان تولید مواد گیاهی عاری از پاتوژن فراهم می‌شود (Larkin & Scowcroft, 1981). فاکتورهای متعددی مانند ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، ترکیبات مختلف هورمونی و تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر اسیدهای آمینه و پلی‌آمین‌ها در موفقیت کشت بافت یک گیاه مؤثرند که در این بین، ریزنمونه از موارد مؤثر در میزان باززایی گیاهان دارویی است (Tripathi & Tripathi, 2003). به‌منظور باززایی درون‌شیشه‌ای گیاهان دارویی از ریزنمونه‌های مختلف درراستای تولید انبوه شاخساره استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال در گل انگشتانه (*Digitalis lanata* Ehrh) از انتهای شاخساره (Erdei *et al*., 1981)، در شقایق روغنی (*Papaver somniferum* L.) از هیپوکوتیل (Nessler, 1982)، در رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) از قطعات گره ساقه (Misra & Chaturvedi, 1984)، در پونه (*Mentha arvensis* L.) از جوانه‌های جانبی (Rech & Pires, 1986)، در درمنه (*Artemisia annua* L.) از قطعات گره (Gulatia *et al*., 1996)، در سیر (*Allium sativum* L.) از مریستم انتهایی (Ayab & Sumi, 1998)، در *Hydrastis canadensis* از قطعات برگ (Shanshan *et al*., 2007)، در نوعی ختمی (*Hibiscus sabdariffa* L.) از قطعات هیپوکوتیل و کوتیلدون (Raoul *et al*., 2010) و در ریحان (*Ocimum basilicum* L.) از قطعات گره (Asghari *et al*., 2012) استفاده شده است. نتایج بررسی‌ها بر روی گیاه بادرنجبویه نشان می‌دهد که هورمون BAP در ترکیب با نفتالین استیک اسید (NAA) در ریزنمونهٔ مریستم انتهایی بیشترین باززایی (۳/۲ شاخساره در هر ریزنمونه) را داشته است (Meftahizade *et al*., 2010a). Gogu *et al*. (2005) از ریزنمونه‌های قطعات گره و مریستم انتهایی برای بررسی پاسخ‌های مورفولوژیکی گیاه بادرنجبویه به شرایط کشت درون‌شیشه‌ای در محیط‌های MS پایه و تکمیل‌شده با ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیترBAP و کینتین (KIN) به همراه ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم NAA استفاده کردند. آنان دریافتند که با کاربرد این دو ریزنمونه، باززایی خوبی در محیط کشت درون‌شیشه‌ای دیده می‌شود.

تکثیر بادرنجبویه از طریق بذر به‌کندی صورت می‌گیرد و به‌علاوه رشد اولیهٔ بوته‌های آن کند و ضعیف است و بنابراین در اوایل رشد قدرت رقابت با علف‌های هرز و استفادهٔ مطلوب از منابع غذایی محیط خود را ندارد (Omidbaigi, 2008). به همین دلیل ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای می‌تواند روش مؤثری برای تکثیر سریع و انبوه آن محسوب شود که منجر به تولید گیاهان با یکنواختی بالا می‌شود. در پژوهش حاضر تأثیر نوع ریزنمونهٔ حاصل از گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای و ترکیبات مختلف هورمونی بر میزان باززایی مستقیم گیاه بادرنجبویه بررسی شده است تا ضمن بهینه‌سازی کشت درون‌شیشه‌ای آن، بستر مناسب برای انجام سایر پژوهش‌ها نظیر انتقال ژن مقاومت به علف‌کش‌ها و نیز افزایش کمّیت و کیفیت مواد مؤثر با استفاده از دست‌ورزی ژنتیکی فراهم شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور بادرنجبویه از مزرعهٔ کلکسیون گیاهان دارویی گروه باغبانی دانشگاه ارومیه تهیه شد. برای سترون‌کردن بذور پس از شست‌وشو با آب مقطر، از الکل ۷۰درصد به مدت یک دقیقه و سپس از محلول هیپوکلریت سدیم (حاوی کلر فعال ۲/۵درصد) به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد و

1. *In vitro* propagation

درنهایت با چهار بار آبکشی (هر بار ۵ دقیقه) در آب مقطر سترون، ضد عفونی انجام گرفت. برای جوانه‌زنی و تولید گیاهچه‌های سترون به‌منزلهٔ منبع تهیه ریزنمونه، بذور در محیط پایه MS (Murashige & Skoog, 1962) کشت شدند.

تهیهٔ ریزنمونه و شرایط کشت

ریزنمونه‌های مختلف شامل قطعات گره، مریستم انتهایی، هیپوکوتیل، کوتیلدون و قطعات برگ از گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای بادرنجبویه تهیه شد. ریزنمونه‌های فوق در محیط MS تکمیل‌شده با ۳درصد ساکارز، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول، ۰/۷درصد آگار و غلظت‌های مختلف BAP (۲/۲، ۴/۴ و ۸/۸ میکرومولار) به‌تنهایی یا در ترکیب با ۱ میکرومولار IAA کشت شدند. تأثیر ریزنمونه‌ها در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD)[1] در سه تکرار و هر تکرار حاوی ۱۰ ریزنمونه بررسی شد. برای تهیهٔ محلول‌های ذخیره از هورمون‌ها، BAP در اتانول و IAA در NaOH حل شد. pH محیط‌های کشت روی ۵/۸ تنظیم و عمل سترون‌سازی در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد در فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۱ دقیقه در دستگاه اتوکلاو انجام گرفت. بعد از کشت ریزنمونه‌ها، پتری‌دیش‌ها به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد، شدت روشنایی ۳۳/۷۵ $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ و دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. پس از گذشت ۸ هفته و واکشت ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار، تعداد جوانهٔ القایی و درصد باززایی به‌ازای هر ریزنمونه محاسبه شد.

همچنین ریشه‌زایی گیاهچه‌های تولیدشده، با استفاده از محیط MS بدون هورمون، محیط ½ MS بدون هورمون و محیط MS تکمیل‌شده با غلظت‌های مختلف IBA (۱، ۲/۵، ۴/۹۲ و ۹/۸۴ میکرومولار) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار ارزیابی شد. برای تجزیهٔ آماری داده‌ها از نرم‌افزار SAS 9.1 و برای مقایسهٔ میانگین‌ها از آزمون FLSD استفاده شد.

1. Completely Randomized Design

نتایج

درصد باززایی

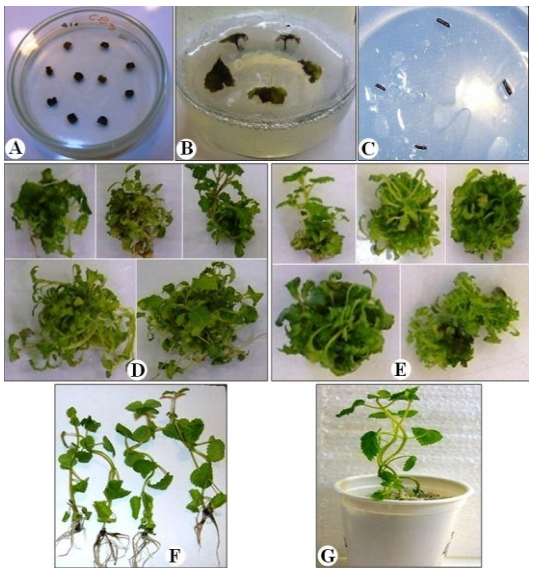
از میان ریزنمونه‌های آزمایش‌شده، ریزنمونهٔ قطعات برگی در غلظت‌های پایین از هورمون BAP هیچ گونه پاسخی از نظر القای جوانه و باززایی نشان نداد و در غلظت‌های بالاتر از BAP ریزنمونه کاملاً سیاه شد و از بین رفت. ریزنمونهٔ هیپوکوتیل در مراحل اولیهٔ آزمایش سیاه‌رنگ شد و پس از گذشت چند هفته هیچ تغییری اعم از رشد، تورم و یا القای جوانه از خود نشان نداد. در مورد کوتیلدون‌های کشت‌شده در محیط‌های مختلف نیز هیچ گونه آثار رشد و تحریک‌پذیری درراستای القای جوانه مشاهده نشد و ریزنمونه‌ها پس از گذشت چند هفته سیاه‌رنگ و بافت آن‌ها شکننده شدند و زوال یافتند (شکل ۱ A, B,C). اما ریزنمونه‌های مریستم انتهایی و قطعات گره دو هفته پس از کشت در محیط‌های مختلف، متورم شد و آثار ابتدایی باززایی و القای جوانه در آن‌ها قابل مشاهده بود (شکل ۱ D ,E). براساس نتایج تجزیهٔ واریانس، اثرات ریزنمونه، هورمون BAP و IAA و اثرات متقابل ریزنمونه و BAP (در سطح ۵درصد)، اثرات متقابل BAP و IAA (در سطح ۱درصد) و اثرات متقابل سه‌گانهٔ آن‌ها (در سطح ۵درصد) بر درصد باززایی گیاه بادرنجبویه معنادار بود ولی اثر متقابل ریزنمونه و IAA اختلاف معناداری نشان نداد (جدول۱). در ریزنمونهٔ مریستم انتهایی، غلظت ۲/۲ میکرومولار BAP بدون کاربرد IAA و غلظت ۸/۸ میکرومولار BAP در ترکیب با یک میکرومولار IAA بیشترین درصد باززایی (۹۹درصد) را داشتند و البته اختلاف آن‌ها با محیط MS تکمیل‌شده با ۴/۴ میکرومولار BAP معنادار نبود. در ریزنمونهٔ قطعات گره با افزایش غلظت BAP در محیط، درصد باززایی کاهش یافت به‌طوری که بالاترین درصد باززایی (۹۹درصد) در محیط MS تکمیل‌شده با ۲/۲ میکرومولار BAP و بدون کاربرد IAA حاصل شد که اختلاف معناداری با محیط MS تکمیل‌شده با ۲/۲ میکرومولار BAP در ترکیب با یک میکرومولار IAA نشان نداد و کمترین درصد باززایی (۶۶ درصد) نیز در غلظت ۸/۸ میکرومولار BAP در ترکیب با یک میکرومولار IAA به دست آمد (شکل۲).

جدول ۱. نتایج تجزیهٔ واریانس اثر ریزنمونه و هورمون BAP در ترکیب با IAA بر درصد و میانگین باززایی گیاه بادرنجبویه

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات	
		درصد باززایی	میانگین باززایی
ریزنمونه (a)	۱	۸۳۹/۸۹*	۰/۲۱ns
(b) BAP	۲	۵۸۷/۲۵*	۱۲/۹۴*
(c) IAA	۱	۱۷۴۰/۱۰*	۱/۵۳*
a*b	۲	۱۹۳۷/۱۸*	۲/۰۶*
a*c	۱	۱/۵۸ ns	۲/۳۲*
b*c	۲	۲۳۱/۲۸**	۱/۲۴*
a*b*c	۱	۹۸۹/۸۳*	۵/۱۷*
اشتباه آزمایشی	۲۴	۷۴/۳۶	۰/۱۷
برش‌دهی اثر متقابل a*b			
a1	۲	۲۴۰/۰۴**	۱۲/۶۷*
a2	۲	۲۲۸۴/۳۹*	۲/۳۳*
برش‌دهی اثر متقابل a*c			
a1	۱	–	۳/۸۱*
a2	۱	–	۰/۰۴ns
برش‌دهی اثر متقابل b*c			
b1	۱	۱۵۹۴/۸۳*	۰/۰۲*
b2	۱	۵۶۷/۲۰**	۰/۱۱*
b3	۱	۷۲/۲۵ns	۳/۸۸ns
برش‌دهی اثر متقابل a*b*c			
a1	۵	۱۴۳۵/۷۹*	۶/۱۱*
a2	۵	۵۵۷/۹۹**	۳/۲۳ *
ضریب تغییرات (٪)		۱۲/۹۵	۱۱/۸۹

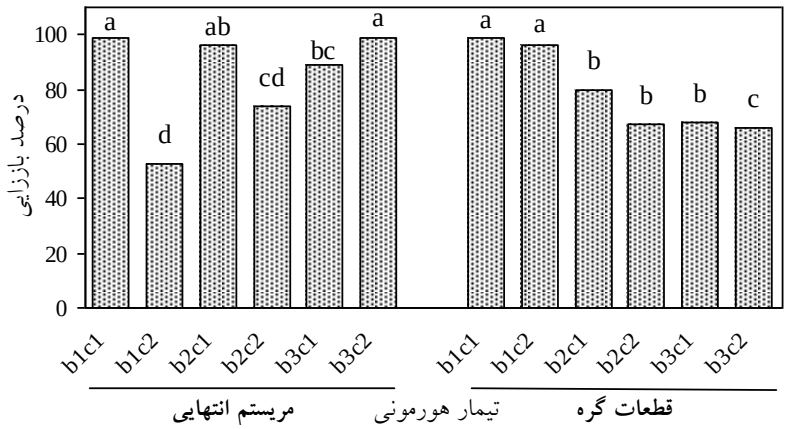
*، ** و ns: به‌ترتیب معنادار در سطح احتمال ۵ درصد، ۱درصد و غیرمعنادار.

a1: مریستم انتهایی، a2: قطعات گره، b1: ۲/۲ میکرومولار BAP، b2: ۴/۴ میکرومولار BAP، b3: ۸/۸ میکرومولار BAP.



شکل ۱. مقایسهٔ پتانسیل باززایی در ریزنمونه‌های مختلف گیاه بادرنجبویه

A) ریزنمونهٔ کوتیلدون B) ریزنمونهٔ قطعات برگ C) ریزنمونهٔ هیپوکوتیل D) باززایی از ریزنمونهٔ قطعات گره E) باززایی از ریزنمونهٔ مریستم انتهایی F) گیاهچه‌های ریشه‌دارشده G) گیاهچه سازگارشدهٔ بادرنجبویه



شکل ۲. مقایسهٔ درصد باززایی تیمارهای مختلف هورمونی در ریزنمونهٔ مریستم انتهایی و قطعات گره

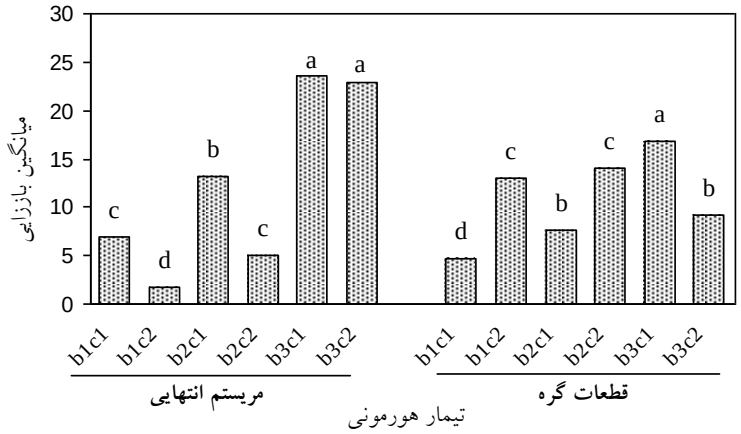
b_1: ۲/۲ میکرومولار BAP، b_2: ۴/۴ میکرومولار BAP، b3: ۸/۸ میکرومولار BAP، c_1: محیط بدون IAA، c_2: محیط دارای IAA. حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در سطح احتمال ۵درصد در بین میانگین‌ها در آزمون FLSD هستند.

میانگین باززایی

نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد که اثرات هورمون BAP و IAA، اثرات متقابل ریزنمونه و BAP، ریزنمونه و IAA، BAP وIAA و اثرات متقابل سه‌گانهٔ آن‌ها بر میانگین باززایی گیاه بادرنجبویه در سطح ۵ درصد معنادار بود ولی نوع ریزنمونه تأثیر معناداری بر این صفت نداشت (جدول۱). بیشترین تعداد گیاهچه در ریزنمونه با ۲۳/۵۹ و ۱۶/۹۰ جوانه، به‌ترتیب برای ریزنمونهٔ مریستم انتهایی و قطعات گره در تیمار ۸/۸ میکرومولار BAP بدون کاربرد IAA مشاهده شد (شکل۳). کمترین میانگین باززایی در ریزنمونهٔ مریستم انتهایی (۱/۸ گیاهچه در ریزنمونه) در تیمار ۲/۲ میکرومولار BAP در ترکیب با IAA و در ریزنمونهٔ گره (۴/۶ گیاهچه در ریزنمونه) در تیمار ۲/۲ میکرومولار BAP بدون کاربرد IAA حاصل شد.

ریشه‌زایی

اثر غلظت‌های مختلف IBA بر میانگین طول و تعداد ریشه‌چه در سطح احتمال ۱درصد معنادار بود (جدول۲). تمام گیاهچه‌های باززاشده ۱۰۰درصد ریشه‌زایی داشتند. بیشترین تعداد ریشه (۹/۰۶ ریشه‌چه در گیاهچه) در محیط MS تکمیل‌شده با ۴/۹۲ میکرومولار IBA تشکیل شد (شکل۴). بیشترین طول ریشه (۴۴/۷ میلی‌متر) نیز در محیط ½MS مشاهده شد (شکل ۵ و شکل F,G ۱).



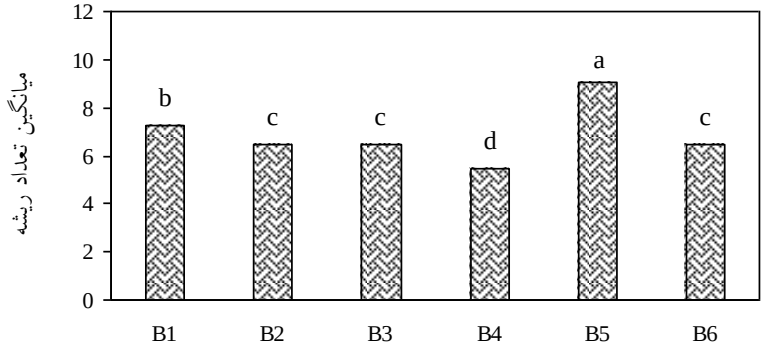
شکل ۳. مقایسهٔ میانگین باززایی تیمارهای مختلف هورمونی در ریزنمونهٔ مریستم انتهایی و قطعات گره

b_1: ۲/۲ میکرومولار BAP، b_2: ۴/۴ میکرومولار BAP، b3: ۸/۸ میکرومولار BAP، c_1: محیط بدون IAA، c_2: محیط دارای IAA. حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در سطح احتمال ۵ درصد در بین میانگین‌ها در آزمون FLSD هستند.

جدول ۲. نتایج تجزیهٔ واریانس میانگین تعداد و طول ریشه در پاسخ به تیمار هورمونی

منابع تغییرات	درجات آزادی	میانگین مربعات	
		میانگین طول ریشه‌چه	میانگین تعداد ریشه‌چه
تیمار	۵	۳۸۶/۲۳**	۰/۱۴۸**
اشتباه آزمایشی	۱۲	۴/۴۶	۰/۰۰۳۲
ضریب تغییرات (٪)		۷/۲۲	۲/۱۸

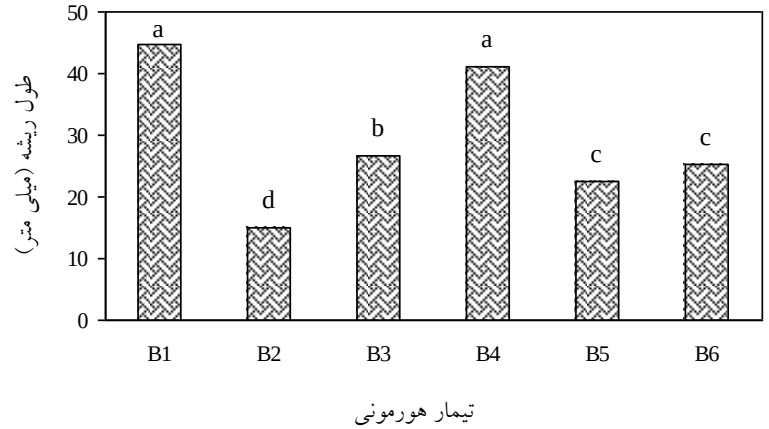
** : معنادار در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۴. تأثیر تیمارهای مختلف هورمونی بر میانگین تعداد ریشه

B_1: محیط MS ½، B_2: محیط MS، B_3: غلظت ۱ میکرومولار IBA، B_4: غلظت ۲/۵ میکرومولار IBA، B_5: غلظت ۴/۹۲ میکرومولار IBA، B_6: غلظت ۹/۸۴ میکرومولار IBA

حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در سطح احتمال ۱درصد در بین میانگین‌ها در آزمون FLSD هستند.



شکل ۵. تأثیر تیمارهای مختلف هورمونی بر میانگین طول ریشهٔ ریزنمونه‌ها

B_1: محیط MS ½، B_2: محیط MS، B_3: غلظت ۱ میکرومولار IBA، B_4: غلظت ۲/۵ میکرومولار IBA، B_5: غلظت ۴/۹۲ میکرومولار IBA، B_6: غلظت ۹/۸۴ میکرومولار IBA

حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در سطح احتمال ۱درصد در بین میانگین‌ها در آزمون FLSD هستند.

بحث

از فاکتورهای مؤثر در باززایی گیاهان دارویی می‌توان به ژنوتیپ، ریزنمونه و عوامل هورمونی اشاره کرد و به‌همین دلیل در گیاهان دارویی از ریزنمونه‌های مختلف برای باززایی و نیز القای جنین‌های سوماتیکی استفاده شده است (Bhojwani & Razdan, 1996; Tripathi & Tripathi, 2003; Meftahizade *et al*., 2010b). در این پژوهش پاسخ ریزنمونه‌های مختلف به غلظت‌های

مختلف BAP بسیار متفاوت بود. فرایند باززایی فقط در ریزنمونه‌های مریستم انتهایی و قطعات گره مشاهده شد. ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل و قطعات برگ باززایی نداشتند. در آزمایش مشابهی که بر روی گیاه نعناع فلفلی، برای ارزیابی قدرت باززایی ریزنمونه‌های گره، مریستم انتهایی، میان‌گره و دمبرگ در محیط MS ½ حاوی ترکیبات هورمونی مختلف شامل ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و KIN در ترکیب با NAA انجام گرفت بیشترین درصد باززایی (۸۵درصد) در ریزنمونهٔ گره در محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر و در ریزنمونهٔ مریستم انتهایی در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد (Sarwar *et al.*, 2009). شرایط فیزیولوژیکی ریزنمونه (که تحت کنترل فاکتورهای ژنتیکی است) (Baroncelli *et al.*, 1978; Nagarathna *et al.*, 1991)، وضعیت سلول از نظر مرحلهٔ تقسیم سلولی، توانایی انتقال یا قابلیت دسترسی به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و توانایی متابولیکی سلول، از عوامل اصلی تنوع در قابلیت باززایی ریزنمونه‌ها هستند. ریزنمونه‌های حاوی انتهاهای مریستمیک نظیر جوانه‌های انتهایی ساقه و ریشه و همچنین جوانه‌های جانبی از پتانسیل باززایی بالایی برخوردارند. چنین بافت‌هایی قدرت تقسیم بالایی دارند و با تولید و تجمع تنظیم‌کننده‌های رشد مورد نیاز (اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها) قابلیت باززایی بالایی نشان می‌دهند و تحت شرایط درون‌شیشه‌ای موجب القای شاخساره‌های نابجا می‌شوند (Akin-Idowu *et al.*, 2009). نتایج آزمایش حاضر بیانگر آن است که حضور اکسین برای به دست آوردن بیشترین درصد باززایی ضروری نبوده است ولی در غلظت‌های بالاتر BAP، وجود IAA اثرات تشدیدکنندگی داشت و درصد باززایی را افزایش داد. Meena *et al.* (2010)، برای به دست آوردن بیشترین میزان باززایی در گیاه *Citrullus colocynthis* از ریزنمونهٔ مریستم انتهایی استفاده کردند که سبب تولید بیشتر گیاهچه‌های باززاشده با سرعت بالا شد. در یک بررسی دیگر بر روی ریز ازدیادی گیاه *Origanum sipyleum* از مریستم انتهایی به‌منزلهٔ ریزنمونه در کشت درون‌شیشه‌ای استفاده شد که پس از واکشت‌های متعدد پاسخ مناسبی به محیط کشت MS تکمیل‌شده با غلظت‌های مختلف هورمون BAP نشان داد (Oluk & Cakir, 2009). در مطالعه‌ای در گیاه فلفل (*Capsicum annum*) که به‌منظور مشخص‌شدن پتانسیل باززایی سه ریزنمونهٔ هیپوکوتیل، کوتیلدون و مریستم انتهایی در محیط MS غنی‌شده با غلظت‌های مختلف BAP انجام شد، بیشترین درصد باززایی (۷۵درصد) در محیط حاوی ۵ میلی‌گرم در لیترBAP در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در ریزنمونهٔ مریستم انتهایی به دست آمد (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009). در پژوهش حاضر، میزان جوانهٔ القایی در حالت استفاده از BAP به‌تنهایی، نسبت به استفادهٔ ترکیبی آن با IAA بیشتر بود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب BAP با IAA، تعداد جوانهٔ کمتری در هر دو ریزنمونه القا می‌کند. در حالت طبیعی جوانه‌های جانبی به‌علت غالبیت انتهایی که تحت کنترل تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف مخصوصاً اکسین است در حالت رکودند (Cline, 1996). BAP ازجمله سیتوکینین‌هایی است که اثر آن در شکستن رکود جوانه‌های جانبی در گیاهان مختلف گزارش شده است. بدیهی است که برش ساقه به‌صورت قطعات گره ساقه و کشت آن‌ها در محیط حاوی سیتوکینین می‌تواند سبب شکستن رکود جوانه‌های جانبی و القای جوانه‌های نابجا شود (Dai *et al.*, 2006). براساس اظهار نظر Rout *et al.* (1999) پرآوری شاخساره و افزونگری آن بیشتر تحت‌تأثیر سیتوکینین‌های محیط کشت است تا اکسین‌ها، و IAA بدون توجه به غلظت BAP هیچ اثری در پرآوری شاخساره ندارد.

Gogu *et al.* (2005)، از ریزنمونه‌های قطعات گره و مریستم انتهایی برای بررسی پاسخ‌های مورفولوژیکی گیاه بادرنجبویه به شرایط کشت درون‌شیشه‌ای در محیط‌های MS پایه و تکمیل‌شده با ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و KIN و ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده کردند. آنان دریافتند که با کاربرد این دو ریزنمونه بهترین پاسخ باززایی در محیط کشت درون‌شیشه‌ای ایجاد می‌شود که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت دارد. نتایج بررسی دیگری در گیاه بادرنجبویه نشان داد که کاربرد ریزنمونهٔ مریستم انتهایی در ترکیب هورمونی BAP با NAA بیشترین باززایی را داشته است (Meftahizade *et al.*, 2010a) که

نتایج پژوهش حاضر را تأیید می‌کند. در اغلب محیط‌های کشت رایج‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی برای انگیزش ریشه در محیط درون‌شیشه‌ای IAA، IBA و NAA هستند. این اکسین‌ها در ریشه‌زایی تأثیر مشابهی دارند و می‌توان آن‌ها را به جای همدیگر استفاده کرد. در پژوهش حاضر، بیشترین میانگین ریشه‌زایی (۹/۰۶ ریشه‌چه در گیاهچه) در محیط MS تکمیل‌شده با ۴/۹۲ میکرومولار IBA اتفاق افتاد. Shanshan *et al*. (2007) در ریشه‌زایی گیاهچه‌های پرآوری‌شده *Hydrastis canadensis* از غلظت‌های مختلف هورمون IBA استفاده کردند و دیدند که بیشترین میزان توسعهٔ ریشه در محیط MS ½ تکمیل‌شده با ۱ الی ۲ میکرومولار IBA حاصل شد که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج این پژوهش، برای باززایی مستقیم در گیاه بادرنجبویه استفاده از ریزنمونه‌های قطعات گره و مریستم انتهایی در محیط MS حاوی ۸/۸ میکرومولار BAP بدون کاربرد IAA قابل توصیه است.

REFERENCES

1. Akin-Idowu, P.E., Ibitoye, D.O. & Ademoyegun, O.T. (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticulture crops. *African Journal of Biotechnology*, 8(16), 3782-3788.
2. Allahverdiyev, A., Duran, N., Ozguven, M. & Koltas, S. (2004). Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against herpes simplex virus type2. *Phytomedicine*, 11, 657-661.
3. Asghari, F., Hosseini, B., Hassani, A. & Shirzad, H. (2012). Effect of explants source and different hormonal combinations on direct regeneration of basil plants (*Ocimum basilicum* L.). *Australian Journal of Agricultural Engineering*, 3(1), 12-17.
4. Ashrafuzzaman, M., Hossain, M.M., Razi Ismail, M., Shahidul Haque, M., Shahidullah, S.M. & Shahin, Z. (2009). Regeneration potential of seedling explants of chilli (*Capsicum annum*). *African Journal of Biotechnology*, 8(4), 591- 596.
5. Ayab, M. & Sumi, S. (1998). Establishment of a novel tissue culture method, stem disk culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports*, 17, 773-780.
6. Baroncelli, S., Buittiet, S., Bennici, M., Foroughi, W., Mix, G., Gaul, H., Tagliasacchi, A.M., Loiero, M. & Giorgi, B. (1978). Genetic control of *in vitro* and *in vivo* growth of hexaploid wheat. *Z. Pflanzenzuecht*, 80, 109-116.
7. Bennett, C. (2003). *Plant extract improves cognitive function in Alzheimer's disease*. Health News Co. UK.
8. Bhojwani, S.S. & Razdan, M.K. 1996. *Plant tissue culture: Theory and practice. Developments in crop science.* Vol.5. Elsevier, Amsterdam.
9. Cline, M.G. (1996). Exogenous auxin effects on lateral bud outgrowth in decapitated shoots. *Annals of Botany*, 78, 255-266.
10. Dai, Y., Wang, H., Li, B., Huang, J., Liu, X., Zhou, Y., Mou, Z. & Li, J. (2006). Increased expression of mapkinase kinase causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18, 308-320.
11. Debnath, M., Malik, C.P. & Bisen, P.S. (2006). Micropropagation: A tool for the production of high quality plant-based medicine. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7, 33-49.
12. Erdei, I., Kiss, Z. & Maliga, P. (1981). Rapid clonal multiplication of *Digitalis Lanata* in tissue culture. *Plant Cell Reports*, 1, 34- 38.
13. Gogu, I., Diana, S.T. & Daniela, N. (2005). Investigation on the *in vitro* morphogenetic reaction of *Melissa officinalis* L. *Journal of Genetic and Molecular Biology*, 54, 119-122.
14. Gulatia, A., Bharel, S., Abdin, M.Z., Jain, S.K. & Srivastava, P.S. (1996). *In vitro* micropropagation and flowering in *Artemisia annua*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 5, 31- 37.
15. Kabala-Dzik, A., Stojko, R., Szaflarska-Stojko, E., Wroblewska-Adamek, I., Stojko, A., Stojko, J. & Stawiarska-Pieta, B. (2004). Influence of honey balm on the rate of scare formation during experimental burn wound healing in pigs. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 48, 311-316.
16. Kennedy, D.O., Little, W. & Scoley, A.B. (2004). Attenuation of laboratory induced stress in humans after acute administration of *Melissa officinalis* L. (lemon balm). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56, 677-681.
17. Larkin, P.J. & Scowcroft, W.R. (1981). Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60, 197-214.
18. Liu, C.Z., Murch, S., Jain, J.C. & Saxena, P.K. (2004). Goldenseal *Hydrastis canadensis* L. *in vitro* regeneration for germplasm conservation and elimination of heavy metal contamination. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 70, 73-79.

19. Meena, M., Meena, R. & Patni, V. (2010). High frequency plant regeneration from shoot tip explants of *Citrullus colocynthis* an important medicinal herb. *African Journal of Biotechnology*, 9 (31), 5037- 5041.
20. Meftahizade, H., Lotfi, M. & Moradkhani, H. (2010a). Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. *African Journal of Biotechnology*, 9, 4314-4321.
21. Meftahizade, H., Moradkhani, H., Naseri, B., Lotfi, M. & Naseri, A. (2010b). Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 240-246.
22. Misra, P. & Chaturvedi, H.C. (1984). Micropropagation of *Rosmarinus officinalis* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 3, 163-166.
23. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
24. Murch, S.J., Krishna, R.S. & Saxena, P.K. (2000). Tryptophan is a precursor for metalonin and serotonin biosynthesis in *in vitro* regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants. *Plant Cell Reports*, 19, 698-704.
25. Nagarathan, K.C., Prakash, H.S. & Shetty, H.S. (1991). Genotypic effects on the callus formation from different explants of pearl millet B lines. *Advances in Plant Sciences*, 4, 82-86.
26. Nessler, C.L. (1982). Somatic embryogenesis in the Opium poppy, *Papaver somniferum*. *Plant Physiology*, 55, 453-456.
27. Oluk, E. & Cakir, A. (2009). Micropropagation of *Origanum sipyleum* L. an endemic medicinal herb of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 8 (21), 5769- 5772.
28. Omidbaigi, R. (2008). *Production and processing of medicinal plants*. Behnashr publisher. (In Farsi).
29. Raoul, S., Gilbert, C., Hamidou, F.S., Yannick, T., Yao, D., Abdourahmane, S. & Michel, B. (2010). Protocols for callus and somatic embryo initiation for *Hibiscus sabdariffa* L. *Australian Journal of Crop Science*, 4, 98-106.
30. Rech, E.L. & Pires, J.P. (1986). Tissue culture propagation of *Mentha* spp. by the use of the axillary buds. *Plant Cell Reports*, 5, 17-21.
31. Rout, G.R., Saxena, C., Samantaray, S. & Das, P. (1999). Rapid clonal propagation of *Plumbago zeylanica* Linn. *Plant Growth Regulation*, 28, 1-4.
32. Sarwar, S.Z., Rehman, M., Fatima, R.Z., Sial, R.A. & Chaudhary, M.F. (2009). *In vitro* direct regeneration in mint from different explants on half strength MS medium. *African Journal of Biotechnology*, 8(18), 4667- 4671.
33. Shanshan, H., Chunzhao, L. & Praveen, S. (2007). Plant regeneration of an endangered medicinal plant *Hydrastis canadensis* L. *Scientia Horticulturae*, 113, 82-86.
34. Tripathi, L. & Tripathi, J.N. (2003). Role of biotechnology in medicinal plant. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2, 243- 253.
35. Wake, G., Court, J., Pickering, A., Lewis, R., Wilkins, R. & Perry, E. (2000). CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. *Journal of Ethnopharmacology*, 69(2), 105-114.