Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 50, No 2, Summer 2019 (449-456)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.252724.1404

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۸ (ص ۴۵۶-۴۴۹)

باززایی گیاه بنفشه معطر (*Viola odorata*) از طریق کالوس‌های حاصل از دمبرگ

سیده نسترن حسینی درویشانی[۱]، اسماعیل چمنی[۲*]، ولی‌اله قاسمی عمران[۳] و بهروز اسماعیل‌پور[۴]
۱، ۲ و ۴. دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، بلوار دانشگاه، اردبیل، ایران، کدپستی: ۵۶۱۹۹۶۴۷۶۷
۳. استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، پژوهشکده زیست فناوری و کشاورزی طبرستان، کیلومتر ۷ جاده دریا، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۳)

چکیده

بنفشه معطر (*Viola odorata*)، یک گیاه دارویی با ارزش دارویی منحصر به‌فرد می‌باشد که برداشت بیش از اندازه این گیاه دارویی از طبیعت منجر به کاهش زیستگاه‌های طبیعی آنها می‌شود. تکثیر درون‌شیشه‌ای، روش قدرتمندی برای تکثیر در سطح وسیع گونه‌های مهم تجاری و حفظ ژرم‌پلاسم گونه‌های در معرض انقراض محسوب می‌شود. مطالعه حاضر، به‌منظور فراهم‌ساختن پروتکلی کارآمد برای کالوس‌زایی و اندام‌زایی درون‌شیشه‌ای بنفشه معطر از طریق بهینه‌سازی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد انجام گرفته است. جهت کالوس‌زایی، غلظت‌های مختلف بنزیل‌آدنین (BA) (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) به‌همراه توفوردی (2,4-D) (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و برای باززایی ساقه غلظت‌های مختلف BA (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، مناسب‌ترین ترکیب برای القای کالوس ریزنمونه دمبرگ پس از ۳۰ روز شناخته شد. بهترین رشد و بیش‌ترین میزان باززایی شاخه از کالوس‌های دمبرگ در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده گردید. گیاهچه‌ها نیز به‌آسانی در همان محیط کشت، پس از واکشت دوم، ریشه‌زایی نمودند و پس از آن با صد در صد زنده‌مانی در بستر پیت‌ماس و پرلیت سازگاری یافتند. این پروتکل می‌تواند به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تکثیر در سطح وسیع و حفظ ژرم‌پلاسم این گیاه دارویی باارزش استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: اندام‌زایی، بنزیل آدنین، تنظیم‌کننده رشد گیاهی، توفوردی، کشت بافت.

Regeneration of *Viola odorota* plant from petiole callus

Seyede Nastaran Hosseini Darvishani[1], Esmaiel Chamani[2*], Vali Ollah Ghasemi Omran[3] and Behrouz Esmaielpour[4]
1, 2, 4. Ph.D. Candidate, Professor and Associate Professor, Department of Horticulture Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardebili, Ardebil, Iran
3. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology, Genetics and Agricaltural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricaltural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
(Received: Mar. 10, 2018 - Accepted: Jul. 25, 2018)

ABSTRACT

Sweet violet (*Viola odorata*) is a medicinal plant with immense medicinal value that over-exploitation of this medicinal plant led to decline its natural habitat. *In vitro* propagation delivers powerful methods for the mass multiplication of economically important species and germplasm conservation of endangered species. The present study has been carried out to establish an efficient protocol for *in vitro* callus induction and regeneration of Sweet violet by optimizing the various concentrations of plant growth regulators. For calli induction, different concentrations of 6-benzyladenine (BA) (0, 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 mg/l) and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 mg/l) and for indirect shoot regeneration different concentrations of BA (0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 mg/l) were used. The MS medium supplemented with 1.5 mg/l BA and 1.5 mg/l 2,4-D was found most suitable for callus induction from petiole explants after 30 days of incubation. The best growth response and the highest rate of shoot regeneration from callus were observed on MS medium containing 1.5 mg/l BAP. Shoots were rooted easily in the same regeneration medium after the second subculture and then successfully acclimatized in pitmoss:perlite substrate with 100% survival rate. This protocol could be successfully used for the mass multiplication and germplasm conservation of this valuable medicinal plant.

Keywords: Benzyladenine (BA), organogenesis, plant growth regulator, tissue culture.

* Corresponding author E-mail: echamani@uma.ac.ir

مقدمه

بنفشه معطر (Sweet violet) با نام علمی *Viola odorata* و از خانواده Violaceae می‌باشد. یک گیاه علفی چندساله است که بیش‌تر از طریق بذر و شاخه رونده تکثیر می‌یابد (Lim, 2014) و بیش از ۴۰۰ گونه شناخته‌شده دارد (Mabberley, 1987). این گیاه برای درمان برونشیت، بلغم، سرفه، آسم، سرطان، دیابت، مشکلات گوارشی و ریوی کاربرد دارد (Ghani *et al.*, 1997). گیاهان خانواده ویولاسه به‌دلیل تولید سیکلوتیدها شناخته می‌شوند (Burman *et al*., 2014). بیوشیمی و بیولوژی پپتیدهای تولیدشده گیاهی از این خانواده‌ی منحصر به‌فرد، برای محققان بسیاری، جالب هستند (Arnison *et al*., 2013). ساختار منحصر به‌فرد سیکلوتیدها، سنتز شیمیایی آنها را با مشکل مواجه می‌کند؛ به‌طوری‌که تا این زمان، روش مورد استفاده برای دستیابی گسترده به سیکلوتیدها در مقادیر فراوان، استخراج از ماده گیاهی است (Dornenburg, 2010; Craik & Conibear, 2011). اخیراً روش‌های درون‌شیشه‌ای برای تولید سیکلوتیدها توسعه یافته، اما مطالعه به *Oldenlandia affinis* (روبیاسه) محدود گردیده است (Dornenburg, 2010).

Wang & Bao (2007) از طریق کشت کالوس‌های دمبرگ *Viola wittrockiana* در محیط کشت MS به‌همراه هورمون‌های مختلف، موفق به باززایی شدند که بهترین نتیجه کالوس‌زایی در محیط کشت ۱/۲MS حاوی ۰/۰۹ mg/l 2,4-D + ۲ mg/l BA به‌دست آمد. در مطالعه‌ای که Vishwakarma *et al*. (2013) انجام دادند با استفاده از ریزنمونه دمبرگ *Viola serpens* Wall.، در محیط کشت MS حاوی ۱/۵ mg/l 2,4-D و ۲/۵ mg/l BA به‌ترتیب به بهترین کالوس‌زایی و باززایی دست یافتند. Slazak *et al*. (2015) با استفاده از برگ و دمبرگ *Viola uliginosa* موفق به باززایی مستقیم از محیط کشت حاوی TDZ و باززایی غیرمستقیم از طریق تیمارهای ۲ mg/l Kin + ۲ mg/l 2,4-D شدند. در پژوهشی که توسط Naeem *et al*. (2013) انجام شد، کالوس‌زایی با استفاده از غلظت‌های مختلف BA و 2,4-D و سپس القای شاخه در *Viola odorata* از ریزنمونه‌های مختلف برگ، دمبرگ و شاخه اتفاق افتاد. Chalageri & Babu (2012) از کالوس‌های حاصل از دمبرگ *Viola patrinii* در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف BA و NAA، باززایی شاخه را انجام دادند. Kaloo *et al*. (2013) اقدام به تکثیر *Viola odorata* از طریق جوانه‌های جانبی و انتهایی ساقه‌رونده در محیط کشت MS حاوی هورمون‌های مختلف شامل BAP، Kin و NAA نمودند. همچنین Soni & Kaur (2014) نیز به محیط کشت مناسب برای تکثیر جوانه‌های محوری *Viola pilosa* با ترکیب ۰/۵ mg/l BA +۰/۵ mg/l TDZ +۰/۵ mg/l GA3 دست یافتند.

برداشت بیش از اندازه گیاهان دارویی از طبیعت، منجر به کاهش زیستگاه‌های طبیعی آنها می‌شود. گیاهان دارویی به‌دلیل برداشت مخرب‌شان برای تولید دارو و برآوردن نیاز بازار، در معرض خطر انقراض قرار دارند. با توجه به اینکه این گیاهان به‌صورت تجاری کشت نمی‌شوند، تکثیر درون‌شیشه‌ای، روش قدرتمندی برای تکثیر در سطح وسیع و حفظ ژرم‌پلاسم گونه‌های مهم محسوب می‌شود (Kaur *et al*. 2010). علاوه بر آن، به‌دلیل خواب ثانویه بذر بنفشه معطر، میزان جوانه‌زنی این گیاه دارویی بسیار پایین است (Lord, 1983).

با توجه به اهمیت گیاه بنفشه معطر از لحاظ زینتی، دارویی و گیاه پوششی و همچنین دارا بودن ترکیبات منحصر به‌فرد و با ارزش نظیر سیکلوتیدها و از همه مهم‌تر تحقیقات اندک در رابطه با کشت بافت این گیاه، انجام باززایی گیاه به‌روش مستقیم و یا غیرمستقیم و دستیابی به محیط کشت هورمونی مناسب برای تکثیر این گیاه ضروری به‌نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی بنفشه معطر از منطقه جنگلی جنوب‌شرقی شهرستان نکا استان مازندران برداشت و به آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان انتقال داده شد. نمونه‌های گیاهی (گیاه کامل) به‌وسیله تیغ تیز به قطعات کوچکتر تقسیم گردیدند و آبشویی سطحی با آب جاری به‌مدت ۴۰-۳۰ دقیقه صورت گرفت. پس از آن، نمونه‌ها در زیر هود

لامینار، به‌مدت ۴۵ ثانیه در معرض الکل ۷۰٪ و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در معرض هیپوکلریت‌سدیم ۲/۵٪ به‌همراه یک الی دو قطره تواین ۲۰ قرار گرفتند و در نهایت سه الی پنج مرتبه با آب مقطر استریل شست‌وشو شدند. ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ به قطعات تقریباً یک سانتی‌متری برش داده شدند و به‌منظور القای کالوس در محیط‌های کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد شامل BA (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و 2,4-D (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) کشت گردیدند. پس از آن، به‌منظور بررسی شاخه‌زایی کالوس‌ها به محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف BA (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) انتقال یافتند. ظروف کشت به اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس و دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. حجم کالوس، درصد کالوس، وزن‌تر کالوس، رنگ و بافت کالوس و درصد باززایی، تعداد برگ، طول گیاهچه، درصد ریشه‌زایی، تعداد و طول ریشه، پس از گذشت سی روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. حجم کالوس، با اندازه‌گیری اختلاف حجم آب قبل و بعد از قراردادن کالوس در استوانه مدرج به‌دست آمد. در نهایت برای اطمینان از نرمال‌بودن داده‌ها، تست نرمال به روش کولموگروف-اسمیرنوف انجام و سپس با نرم‌افزار آماری SAS (۱۸) نسخه ۹/۱ تجزیه واریانس گردید.این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا و میانگین‌ها نیز بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر مقایسه گردید و رسم منحنی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

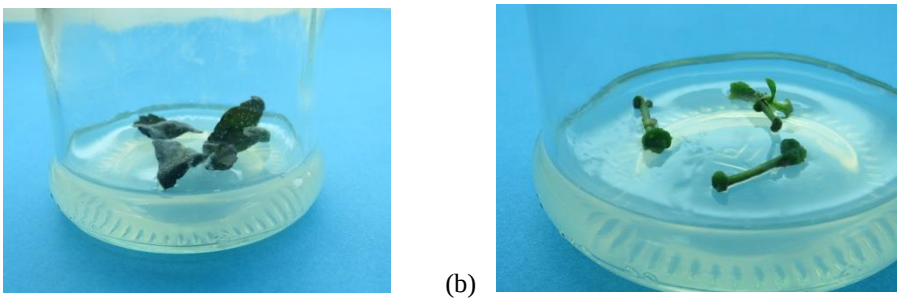
نتایج و بحث

حجم کالوس

نتایج حاصل از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده از لحاظ حجم کالوس تولیدی نشان داد؛ به‌طوری‌که بیش‌ترین حجم کالوس تولیدی به تیمار هورمونی ۱/۵ mg/l BA+۱/۵ mg/l 2,4-D اختصاص یافت (شکل‌های ۱ و۲) که این نتایج با تحقیقات Naeem *et al.* (2013) مطابقت دارد؛ آنها گزارش کردند که در میان همه تنظیم‌کننده‌های رشد، ترکیب BA و 2,4-D، بهترین و مؤثرترین کالوس‌ها را در بنفشه معطر القا نمود. همچنین، تیمارهای ۲ mg/l BA + ۱ mg/l 2,4-D و ۱/۵ mg/l 2,4-D نیز در کالوس‌زایی اثرات مثبتی از خود نشان دادند. کم‌ترین حجم کالوس با کشت ریزنمونه دمبرگ در محیط کشت MS حاوی۰/۵ mg/l 2,4-D به‌همراه غلظت‌های ۰ mg/l BA، ۰/۵ و ۱ و ۱ mg/l 2,4-D + ۰/۵ mg/l BA مشاهده گردید (شکل ۲). در تیمارهای حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، افزایش میزان هورمون BA از صفر به ۲ میلی‌گرم در لیتر، روند افزایشی در حجم کالوس را القا نمود؛ به‌طوری‌که بیش‌ترین حجم کالوس در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر از این تنظیم‌کننده رشد مشاهده گردید، زمانی‌که BA به‌تنهایی در محیط کشت به‌کار گرفته شد هیچ اثری در القای کالوس بر ریزنمونه دمبرگ نشان نداد. با این حال زمانی که BA در ترکیب با غلظت‌های مختلفی از 2,4-D مورد استفاده قرار گرفت تشکیل کالوس را القا نمود. 2,4-D (۲ mg/l و ۱/۵، ۱، ۰/۵) به‌تنهایی در دمبرگ باعث کالوس‌زایی گردید. این بدان معنی است که افزودن 2,4-D به محیط کشت برای القای کالوس ضروری است. به‌طوری‌که در بین غلظت‌های 2,4-D، بهترین نتیجه در القای کالوس از محیط کشت MS حاوی ۱/۵ mg/l 2,4-Dبه‌دست آمد. Murashige (1974) و Razdan (1993) نیز گزارش دادند که 2,4-D یک اکسین قوی برای تحریک کالوس می‌باشد. تحقیقات انجام‌گرفته توسط Vishwakarma *et al.* (2013) با این نتایج کاملاً مطابقت دارد؛ به‌طوری‌که در آن نیز محیط کشت MS حاوی 2,4-D (۱/۵ mg/l) مناسب‌ترین تیمار برای القای کالوس در ریزنمونه دمبرگ معرفی گردید. آنها گزارش دادند که سایتوکینین‌هایی مانند BA و Kin و اکسین‌هایی مانند IAA، IBA و NAA، زمانی که به‌تنهایی در محیط کشت استفاده شدند، هیچ اثری بر القای کالوس در ریزنمونه دمبرگ نشان ندادند، اما زمانی که در ترکیب با 2,4-D (۱/۵ mg/l) قرار گرفتند کالوس‌زایی را القا کردند. همچنین مشابه تحقیق حاضر، 2,4-D (۲ mg/l و ۱/۵) به‌تنهایی در دمبرگ *Viola serpens* کالوس‌زایی را القا کرد. در این مطالعه، فراهم‌سازی تنها 2,4-D به محیط کشت نتایج خوبی را به‌دست آورد.

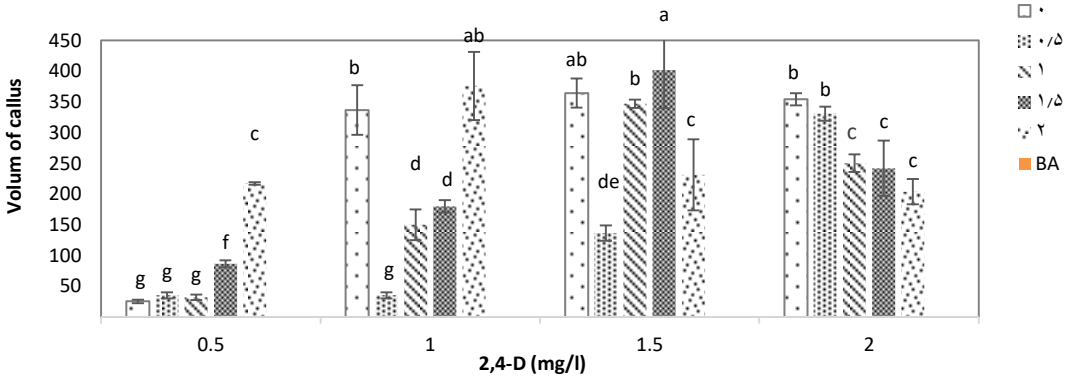
افزودن BA به تیمارهای حاوی 2,4-D به‌جز تیمارهای حاوی ۰/۵ mg/l، کاهش معنی‌داری در حجم کالوس‌های تولیدی داشت. البته افزودن تدریجی BA به محیط کشت‌های حاوی 2,4-D، این اختلاف به‌وجود آمده را کاهش داد. به‌طوری‌که محیط کشت حاوی mg/l ۲ BA + ۱2,4-D mg/l، بیش‌ترین حجم کالوس را تولید نمود. در محیط کشت حاوی 2,4-D mg/l ۱/۵، چنین حالتی در غلظت BA mg/l ۱/۵ مشاهده گردید و در تیمارهای حاوی 2,4-D mg/l ۲، افزایش غلظت BA اثر منفی در حجم کالوس نشان داد. در این تحقیق، در صورت عدم استفاده از BA جهت کالوس‌زایی، تیمارهای ۱، ۱/۵ و 2,4-D mg/l ۲، پاسخ مشابهی از لحاظ حجم کالوس نشان دادند و تنها تیمار 2,4-D mg/l ۰/۵، کم‌ترین حجم کالوس را تولید نمود. افزایش غلظت BA، روند افزایشی یا کاهشی تیمارهای مختلف 2,4-D را دستخوش تغییر قرار داد، به‌عنوان مثال، با افزایش غلظت BA به mg/l ۲، روند افزایش حجم کالوس در بیش‌ترین مقدار مربوط به غلظت 2,4-D mg/l ۱ بوده است، درصورتی‌که در غلظت 2,4-D mg/l ۱/۵، بیش‌ترین حجم به غلظت BA mg/l ۱/۵ اختصاص داشت. قابل ذکر است که محیط کشت بدون تیمار هورمونی و ریزنمونه برگ، هیچ‌گونه کالوس‌زایی یا باززایی مستقیمی از خود نشان ندادند (شکل ۱).

بررسی دقیق‌تر شکل ۲ نشان می‌دهد که با فرض ثابت‌بودن میزان غلظت تنظیم‌کننده رشدی BA، افزایش غلظت هورمون 2,4-D در همه غلظت‌های BA حجم کالوس را درغلظت‌های مشخصی افزایش داده است به‌طوری‌که در تیمارهای حاوی BA mg/l ۰/۵، غلظت 2,4-D ۲mg/l، در ۱ و BA mg/l ۱/۵، غلظت 2,4-D mg/l ۱/۵ و در BA mg/l ۲، غلظت 2,4-D mg/l ۱ بیش‌ترین مقدار حجم کالوس را نشان داد. در مطالعه‌ای دیگر، 2,4-D به‌همراه NAA، میزان بالایی از القای کالوس را در *Viola tricolor* ایجاد کرد (Babber & Kulbhushan, 1991).



شکل ۱. کالوس‌های تولیدشده از دمبرگ در محیط کشت MS حاوی: 2,4-D mg/l ۱/۵ +BA mg/l ۱/۵ (a) و عدم کالوس‌دهی ریزنمونه‌های برگی (b)

Figure 1. Calli derived from petiol explants on MS medium supplemented with 1.5 mg/l BA+ 1.5mg/l 2,4-D (a) and leaf explants failed to induce calli



شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر حجم کالوس

Figure 2. Effect of different growth regulators on callus volume

درصد کالوس‌زایی

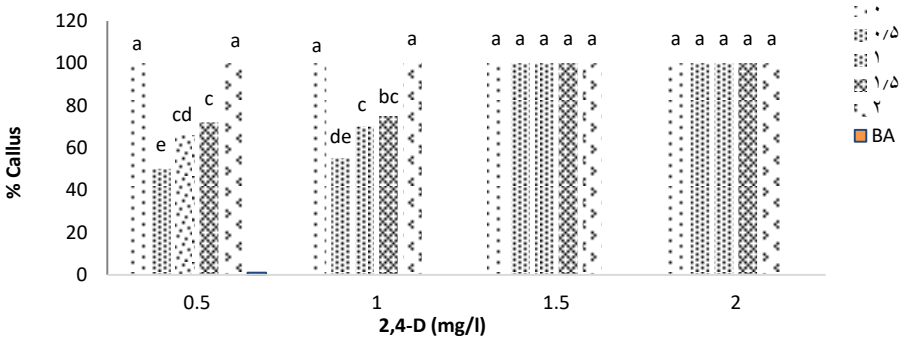
اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مورد استفاده جهت کالوس‌زایی از لحاظ درصد کالوس‌زایی مشاهده گردید. در تیمارهای حاوی ۱/۵ mg/l 2,4-D و ۲، تولید کالوس در همه نمونه‌ها به‌میزان صد درصد صورت پذیرفت. با این حال، افزودن غلظت‌های مختلف BA در محیط کشت‌های حاوی ۰/۵ mg/l 2,4-D و ۱، سبب کاهش درصد کالوس‌زایی گردید و کم‌ترین درصد کالوس‌زایی، با افزودن ۰/۵ mg/l BA در این تیمارها مشاهده شد. ثابت شده است که اکسین، برای درصد بالایی از القای کالوس ضروری است و 2,4-D یا NAA مؤثرتر از IBA بود؛ درحالی‌که غلظت بالای BA از تشکیل کالوس ممانعت می‌کند (Wang & Bao, 2007). با این وجود، افزایش غلظت BA به ۲ mg/l، درصد کالوس‌زایی را به‌میزان ۱۰۰ درصد مشابه حالت بدون BA برگرداند (شکل ۳).

وزن تر کالوس

مشابه با حجم کالوس‌های تولیدی، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف از لحاظ وزن کالوس‌های تولیدی وجود داشت. بیش‌ترین وزن کالوس تولیدشده در تیمارهای ۱/۵ mg/l 2,4-D +۱/۵ mg/l BA و ۱mg/l 2,4-D +۲ mg/l BA و کم‌ترین وزن در تیمار ۰/۵ mg/l 2,4-D مشاهده گردید (شکل۴). در تیمارهای مختلف افزودن BA، اثرات مشابه به حجم کالوس را داشته است به‌طوری‌که با افزایش حجم کالوس، وزن تر کالوس نیز افزایش می‌یابد. با این وجود، تیمارهای فاقد BA، وزن تر کم‌تری نسبت به تیمارهای واجد آن داشت. به بیان دیگر، افزودن مقادیر مختلف BA منجر به متراکم‌شدن بافت سلولی و کالوس‌ها و متعاقب آن کاهش محتوای آبی سلول‌ها گردید.

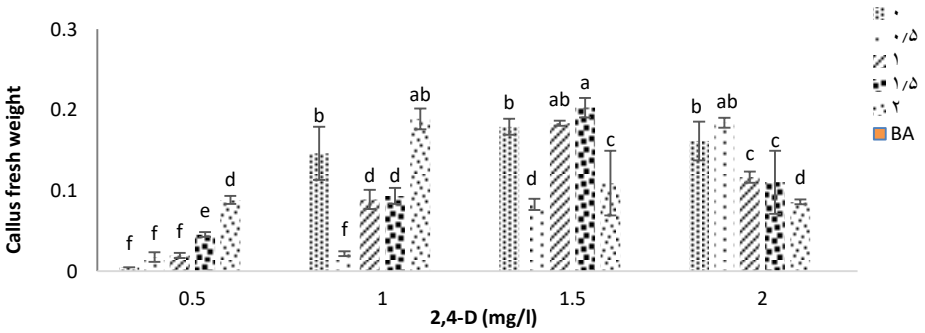
باززایی

کشت کالوس‌های تولیدی در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلفی از BA، تفاوت معنی‌داری از لحاظ درصد باززایی، تعداد و طول گیاهچه‌های تولیدی داشته است (شکل‌های ۵ و ۶).



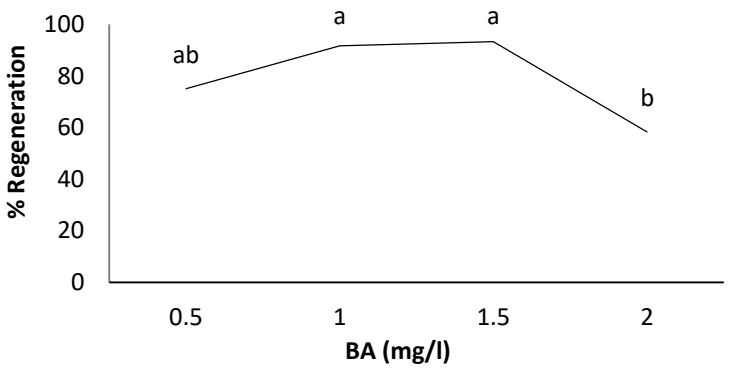
شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد کالوس‌زایی

Figure 3. Effect of different growth regulators on callus production persantage



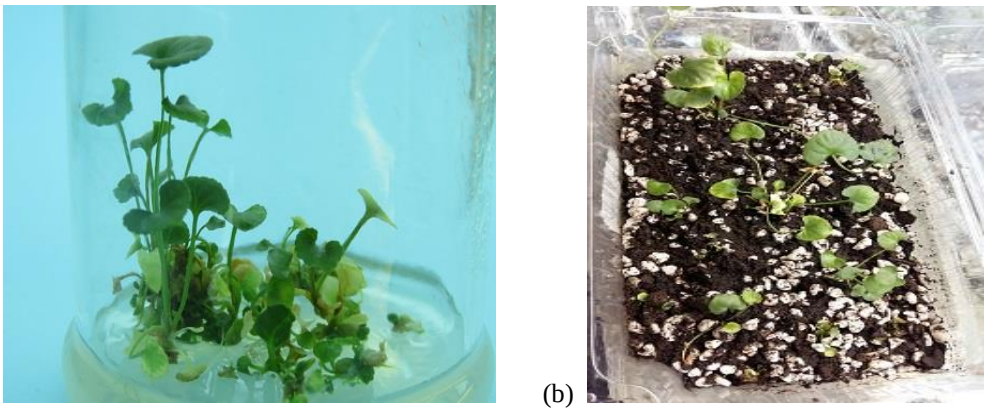
شکل ۴. تأثیر غلظت‌های مختلف هورمونی بر وزن ترکالوس

Figure 4. Effect of different growth regulators on fresh weight of callus



شکل ۵. اثر غلظت‌های مختلف BA بر درصد باززایی شاخه

Figure 5. Effect of different concentrations of BA on shoot regeneration persantage



شکل ۶. باززایی گیاهچه‌های بنفشه معطر در محیط کشت MS حاوی BA (a) و مقاوم‌سازی گیاهچه‌ها (b)

Figure 6. Regeneration of *Viola odorata* plantlets on MS medium containing BA (a) and hardening of plantlets (b)

با افزایش غلظت BA از ۰/۵ به ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، درصد باززایی و تعداد برگ‌های تولیدی افزایش معنی‌داری پیدا کرد، به‌طوری‌که بیش‌ترین باززایی و تعداد برگ در تیمار ۱/۵ mg/l BA مشاهده گردید. سایتوکینین‌ها به‌تنهایی در محیط کشت، تشکیل شاخه را در بسیاری از گیاهان القا می‌کند (Rout *et al*., 2006). باززایی شاخه از کالوس‌های دمبرگی *Viola serpens* و *Viola wittrockiana* به‌ترتیب در محیط کشت‌های MS حاوی غلظت‌های مختلف BAP و $^1/_2$ MS حاوی BA و TDZ مشاهده گردید (Vishwakarma *et al*., 2013; Wang & Bao, 2007). Vishwakarma *et al*. (2013) بیان داشتند که BA نسبت به Kin در باززایی شاخه مؤثرتر است. در تکثیر *Viola pattrinii*، باززایی شاخه از کالوس‌های دمبرگ در محیط کشت MS حاوی BA (Kin) و NAA (Chalageri & Babu, 2012; Tadahiko *et al*., 1995) و *Alocasia micholitziana* در محیط کشت MS حاوی Kin و 2,4-D به‌دست آمد (Thao *et al*., 2003). اثر تحریک‌کنندگی BA در ساقه‌زایی در چندین گونه گیاهی دارویی و آروماتیک گزارش شده است (Pattnaik & Chand, 1996; Saxena *et al*., 1997; Khalafalla & Hattori, 1999; Faisal *et al*., 2006; Kaur *et al*., 2007). با این وجود، بخشی از کارایی شاخه‌زایی نیز به رنگ کالوس، سن و نوع ریزنمونه‌ای که کالوس از آن به‌وجود می‌آید بستگی دارد (Orlikowska *et al*., 1999). کاربرد 2,4-D به‌تنهایی در محیط کشت و بدون ترکیب با BA باعث تشکیل کالوس‌هایی با بافت نرم، آبکی و شفاف گردید، اما در ترکیب با BA کالوس‌های سبزتر و متراکم‌تری به‌دست آمد که از کالوس‌های سبز و با بافت متراکم، پتانسیل اندام‌زایی بالاتری در مقایسه با کالوس‌های روشن و غیرمتراکم مشاهده گردید. نتایج مشابه در

برخی گیاهان دیگر نیز گزارش شده است (Maureen & Pau, 1990; Wang & Bao, 2007). این مشاهده، امکان دستیابی به نسبت بالاتر باززایی، از طریق انتخاب کالوس‌های سبز در کشت بافت بنفشه معطر را فراهم می‌سازد. در این آزمایش مشخص شد که وجود BA برای دستیابی به کالوس‌هایی با کیفیت بهتر و باززایی مؤثرتر، در محیط کشت ضروری می‌باشد. همچنین ریزنمونه دمبرگ نسبت به برگ در کشت‌های درون‌شیشه‌ای و ریزازدیادی بنفشه معطر مناسب‌تر است، به‌طوری‌که ریزنمونه برگ در محیط کشت‌های حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد، واکنشی در مقابل کالوس‌زایی از خود نشان نداد که در اکثر مطالعات انجام‌گرفته در ریزازدیادی گونه‌های Violaceae از ریزنمونه دمبرگ به نتیجه مطلوب دست یافتند (Wang & Bao, 2007; Chalageri & Babu, 2012; Vishwakarma *et al*., 2013; Naeem *et al*., 2013).

افزایش غلظت BA به ۲ mg/l سبب کاهش باززایی و تعداد برگ گردید. غلظت بالای سایتوکینین‌ها برای تشکیل شاخه از برگ یا دمبرگ در برخی گیاهان زینتی نامناسب است؛ به‌طوری‌که در مطالعه‌ای که روی گونه-های بگونیا انجام گرفت، غلظت‌های پایین سایتوکینین در میزان باززایی بالای جوانه شاخه مؤثر بود (Rout *et al*., 2006). بیش‌ترین طول گیاهچه در تیمارهای ۱ و ۱/۵ mg/l BA به‌دست آمد. ریشه‌زایی در تمام گیاهچه‌های حاصل، پس از واکشت دوم به محیط کشت‌های حاوی BA، با درصدهای مشابه صورت پذیرفت. تنها در غلظت ۰/۵ mg/l BA، تعداد ریشه‌های تولیدشده بیش‌تر از سایر تیمارها بوده است. با این وجود، شاخص طول ریشه در بین تیمارها، اختلاف معنی‌داری نشان نداد (جدول۲). همه گیاهچه‌های حاصل از کالوس‌ها، بدون انتقال به محیط کشت ریشه‌زایی، به‌آسانی در محیط کشت حاوی BA در واکشت دوم پس از ۵۰ تا ۶۰ روز ریشه‌دار شدند. گیاهچه‌های ریشه‌دار به محیط کشت حاوی پیت و پرلایت به نسبت مساوی انتقال یافتند. قابل ذکر است که هیچ‌کدام از کالوس‌ها، بدون تیمار با BA قادر به باززایی نبودند.

نتیجه‌گیری کلی

با انجام این آزمایش مشخص گردید که ریزنمونه دمبرگ در گیاه بنفشه معطر، واکنش مثبتی به کالوس‌زایی در محیط کشت حاوی 2,4-D از خود نشان داده است که با افزایش مقدار 2,4-D، میزان کالوس نیز افزایش یافته است؛ اما تولید کالوس‌های سبزتر و با کیفیت بهتر از لحاظ باززایی در ترکیب با BA به‌دست آمد. مناسب‌ترین محیط کشت برای القای کالوس در 2,4-D mg/l ۱/۵+ BA mg/l ۱/۵ و برای باززایی محیط کشت حاوی mg/l BA۱/۵ پیشنهاد می‌گردد.

جدول ۲. اثر غلظت‌های مختلف BA بر باززایی بنفشه معطر

Table 2. Effect of different concentrations of BA on regeneration of *Viola odorata*

different concentrations of BA	Number of leaf	Length of shoots (mm)	Persantage of rooting	Number of roots	Length of shoots (mm)
0.5 mg/l BA	42.3	6.3	100	9.3	3.2
1 mg/l BA	53	15	100	6.3	3.3
1.5 mg/l BA	63	14.3	100	6.3	3.5
2 mg/l BA	37	5.3	100	5.3	3.6

REFERENCES

1. Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., Camarero, J. A., Campopiano, D. J., Challis, G. L., Clardy, J., Cotter, P. D., Craik, D. J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P. C. & Entian, K. D. (2013). Ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports*, 30, 108-160.
2. Babber, S. & Kulbhushan, S. (1991). Study of anatomy of vitrified structure in *Viola tricolor* L. *Annals of Biology*, 7(1), 93-95.
3. Burman, R., Gunasekera, S., Stromstedt, A. A. & Goransson, U. (2014). Chemistry and biology of cyclotides: Circular plant peptides outside the box. *Journal of Natural Products*, 77, 724-736.
4. Chalageri, G. & Babu, U. V. (2012). In vitro plant regeneration via petiole callus of *Viola patrinii* and genetic fidelity assessment using RAPD markers. *Turkish Journal of Botany*, 36, 358-368.

5. Craik, D.J., Conibear, A. C. (2011). The chemistry of cyclotides. *Journal of Organic Chemistry*, 76, 4805-4817.
6. Dornenburg, H. (2010). Cyclotide synthesis and supply: From plant to bioprocess. *Biopolymers*, 94, 602-610.
7. Faisal, M., Siddique, I. & Anis, M. (2006). In vitro rapid regeneration of plantlets from nodal explants of *Mucuna pruriens*- a valuable medicinal plant. *Annals of Applied Biology*, 148,1-6.
8. Ghani, U. K., Saeed, A. & Alam, M. T. (1997). *Industryunic Medicine*. Department of Pharmacognosy, University of Karachi, India, pp, 310-311.
9. Kaloo, Z. A., Akhtar, R., Hag, Z. & Wafai, B. A. (2013). Effect of growth regulators on the in vitro multiplication of Viola odorata. International Journal of Medicinal Plant Research, 2(4), 187-189.
10. Kaur R., Kashyap A., Majeed S., Chauhan, N. S. & Bhardwaj, S. V. (2010). In vitro propagation and conservation of *Inula recemosa* Hook F. an endangered medicinal plant of temperate origin. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*, 1(1), 88-91.
11. Kaur R., Sadiq, M., Kumar, V., Mahajan, R., Saxena, B. & Sharma, D. R. (2007). In vitro propagation and conservation of *Gentiana kurroo*- a temperate medicinal herb. *Journal of Plant Science and Research*, 23(1-2), 69-72.
12. Khalafalla, M. M. & Hattori, K. (1999). A combination of thiadiazuron andbenzyl adenine promotes multiple shoot production from cotyledonary node explants of faba bean (*Vicia faba* L). *Plant Growth Regulation*, 27, 145-148.
13. Lim, T. K. (2014). *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants*: *Volume 8, Flowers*, Springer Science, New York, London. 1038p.
14. Lord, A. M. M. (1983). Comparative flower development in the cleistogamous species *Viola odorata*. I. A growth rate study. *American Journal of Botany*, 1, 1556-1563.
15. Mabberley, D. (1987). *The Plant Book.* Cambridge University Press. Cambridge, 858p.
16. Maureen, M. & Pau, H. M. (1990). Comparison of 2, 4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus cultures of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20(3), 157-163.
17. Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25, 135-166.
18. Naeem, M., Naveed, I., Saqlan naqvi, S. M. & Mahmood, T. (2013). Standardization of tissue culture conditions and estimation of free scavenging activity in *Viola odorata* L. *Pakistan Journal of Botany*, 45(1), 197-202.
19. Orlikowska, T., Nowak, E., Marasek, A. & Kucharska, D. (1999). Effects of growth regulators and incubation period on in vitro regeneration of adventitious shoots from gerbera petioles. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 59, 95-102.
20. Orlikowska, T., Nowak, E., Marasek, A. & Kuchrska, D. (1999). Effect of growth regulators and incubation period on in vitro regeneration of adventitious shoots from gerbera petioles. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 59, 95-102.
21. Pattnaik, S. K. & Chand, P. K. (1996). *In vitro* propagation of the medicinal herbs *Ocimum americanum* L. syn *O. canumsinus* and *O. sanctam*. *Plant Cell Reports*, 15, 846-890.
22. Razdan, M. K. (1993). *An Introduction to Plant Tissue Culture*. New Delhi: Oxford and IBH Publishing Co. India.
23. Rout, G. R., Mohapatra, A. & Mohan Jain, S. (2006). Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 24, 531-560.
24. Saxena, C., Palai, S. K., Samantaray, S., Rout, G. R. & Das, P. (1997). Plant regeneration from callus cultures of *Psoralea corylifolia* Linn. *Plant Growth Regulation*, 22, 13-17.
25. Slazak, B., Sliwinska, E., Saługa, M., Ronikier, M., Bujak, J., Słomka, A., Go¨ransson, U. & Kuta, E. (2015). Micropropagation of *Viola uliginosa* (Violaceae) for endangered species conservation and for somaclonal variation-enhanced cyclotide biosynthesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 120, 179-190.
26. Soni, M. & Kaur, R. (2014). Rapid in vitro propagation, conservation and analysis of genetic stability of *Viola pilosa*. *Physiology* and *Molecular Biology of Plants*, 20(1), 95-101
27. Tadahiko, S., Kwon, O. C., Miyake, H., Taniguchi, T. & Maeda, E. (1995). Regeneration of plantlets from petiole callus of wild Viola (*Viola patrinii* DC.). *Plant Cell Reports*, 14,768-72.
28. Thao, N. T. P., Ozaki Y. & Okubo, H. (2003). Callus induction and plantlet regeneration in ornamental *Alocasia micholitziana*. Plant Cell Tissue Organ Culture, 73(3), 285-9.
29. Vishwakarma, U. R., Gurav, A. M. & Sharma, P. Ch. (2013)**.** Regeneration of multiple shoots from petiole callus of *Viola serpens* Wall. *Pharmacognosy Research*, 5, 86-92.
30. Wang, J. & Bao, M. Z. (2007). Plant regeneration of pansy (*Viola wittrockiana*) 'Caidie' via petiole-derived callus. *Scientia Horticulturae*, 111(3), 266-270.