زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال پنجم، شماره هجدهم، زمستان ۱۳۹۲، صفحه ۹۵-۱۱۴
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۹/۲۲
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۱۱/۱۷
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۲/۰۵/۱۲

بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر جوانه‌زنی و ریزازدیادی گیاه دارویی برازمبل (*Perovskia abrotanoides*) در شرایط *in vitro*

عذرا صبورا * و محجوبه شکری
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران

چکیده

هدف از بررسی حاضر به دست آوردن ترکیب مناسبی از هورمون‌های نفتالن استیک اسید (NAA) همراه با بنزیل آمینوپورین (BAP) یا کینتین (KIN) برای کاهش دوره خواب بذر *Peroveskia abrotanoides*، بررسی اندام‌زایی و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نوشاخه‌ها و ریشه‌های نوپدید در شرایط *in vitro* بود. بذرها پس از سترون شدن در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی BAP یا KIN (در غلظت‌های صفر، ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) همراه با NAA (در غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) کشت شدند. تمام آزمایش‌ها بر اساس طرح فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با کمینه ۵ تکرار انجام شد. درصد جوانه‌زنی ۳۰ روز پس از کشت و میزان شاخه‌زایی، تعداد برگ، سطح برگی، طول شاخه‌ها و ریشه‌های نوپدید هشتاد روز پس از کشت بذرها تعیین شد. بیشترین درصد جوانه‌زنی (۹۳ درصد) در تیمار ۵ mg/L KIN و تیمار ۰/۱ mg/L NAA + ۲/۵ mg/L KIN به دست آمد که نقش این سیتوکینین را در شکست خواب بذر نشان داد. تأثیر BAP در افزایش شاخه‌زایی بیشتر از KIN بود (۳۰ نوشاخه پس از تیمار ۲/۵ mg/L BAP). برعکس، NAA بر شاخه‌زایی *P. abrotanoides* اثر مهار کننده‌ای داشت و با افزودن آن به محیط کشت تعداد نوشاخه‌ها به نصف کاهش یافت. بیشترین سطح برگی (۱۵ mm^2) در محیط‌هایی به دست آمد که بذرها تنها با NAA تیمار شده بودند. بالاترین درصد کالوس‌زایی (حدود ۸۰ درصد) در محیط‌های حاوی ۰/۲۵ یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP یا KIN حاصل شد. غلظت متوسطی از سیتوکینین‌های بررسی شده به تنهایی یا همراه با غلظت متوسطی از NAA، نظیر تیمار ۰/۲۵ mg/L NAA + ۲/۵ mg/L KIN، بیشترین تأثیر را در انباشتگی رزمارینیک اسید در اندام‌های نوپدید داشت (۷۵/۲۱ mg/g DW). در حالی که اندام‌های نوپدید رشدیافته روی محیط‌هایی که تنها حاوی NAA بودند، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای رزمارینیک اسید کم‌تری بودند.

واژه‌های کلیدی: گیاه برازمبل (*Peroveskia abrotanoides*)، جوانه‌زنی، ریزازدیادی، کشت بافت

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: saboora@alzahra.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۱۸۸۰۵۸۹۱۲

مقدمه

با توجه به اهمیّت گیاهان دارویی و معطر در حفظ سلامت و بهداشت جامعه جهانی و کاربرد آنها در طب سنتی، بررسی ویژگی‌ها و تکثیر این گیاهان همواره در کانون توجه مراکز علمی و تحقیقاتی مختلف قرار داشته است. در سال‌های اخیر از روش‌های کشت *in viro* به عنوان ابزاری قدرتمند برای حفظ ژرم‌پلاسم و تکثیر گیاهان تیره نعناعیان استفاده شده است (Arikat *et al.*,2004؛ Saha *et al.*, 2010؛ Saha *et al.*, 2012). مزیت اصلی تکثیر گیاهان دارویی با روش‌های کشت‌بافت آن است که می‌تواند باعث تولید گیاهانی عاری از هر گونه بیماری‌های قارچی و باکتریایی و عاری از آفت‌های رایج در کشتزارهای طبیعی شود. این مسأله در تهیه فراورده‌های دارویی ارزش فراوانی دارد (Murch *et al.*, 2000). علاوه بر این، کشت و تکثیر گیاهان با روش *in viro* ضمن غلبه بر محدودیت‌های آب و هوایی، فصلی و محدودیت دسترسی به آب و مواد غذایی با فراهم ساختن بستری مناسب برای ریزازدیادی آنها موجب بهره‌وری بیشتر از فضاها و امکانات موجود می‌شود (Begum *et al.*, 2002؛ Gopi *et al.*, 2006).

در باززایی گیاه از طریق کشت‌بافت، تغییر غلظت هر یک از اجزای محیط‌کشت یا افزودن تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر روی پاسخ (اندام‌زایی، بافت‌زایی و ...) قطعه‌های جداکشت مطالعه شده کاملاً تأثیر گذار است و ممکن است کمیّت ترکیبات شیمیایی بافت‌های نوپدید را نیز تغییر دهد. دقت در انتخاب نوع تنظیم‌کننده‌های رشد قابل استفاده و غلظت آنها ضروری به نظر می‌رسد، زیرا غلظت کلی هورمون‌های درون‌زا و برون‌زا تعیین کننده نوع اندام‌های نوپدید حاصل از کشت‌بافت است. بنابراین، لازم است هورمون‌های به کار برده شده در محیط‌های کشت در گستره‌ای از غلظت‌ها به تنهایی و یا به صورت همراه استفاده شوند. همچنین، باید محتوای متابولیت‌های ثانویه اندام‌های نوپدید نیز تحت تأثیر تیمارهای مختلف بررسی شود تا تولید گیاهانی با ترکیبات مؤثره بیشتر و کم‌خطرتر محقق شود. در شرایط *in virto*، عوامل متعددی (به صورت برون‌زا و درون‌زا) نقش خود را ایفا نموده، محتوای ترکیبات شیمیایی بافت‌های نوپدید را متأثر می‌سازند. از عوامل درون‌زا می‌توان به سطح هورمون‌های گیاهی قطعات جداکشت، سن و دوره رشدونموی بافت‌ها و از عوامل برون‌زا می‌توان به غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد افزوده شده به محیط‌کشت، تغییرات دوره‌های نوری، دمایی، رطوبت و میزان مواد مغذی طی کشت اشاره نمود.

روش‌های زیست‌فناوری متعددی به منظور تسهیل ریزازدیادی گیاهان و تولید ترکیبات زیست فعال (bioactive) مهم نظیر: رزمارینیک اسید، کامفور، کریپتوتانشینون و کارنوسول در جنس‌های مختلف تیره نعناعیان (Lamiaceae) استفاده شده است (Cuvelier *et al.*, 1996). جنس *Perovskia* L. متعلق به تیره نعناعیان دارای سه گونه است و *P. abrotanoides* با نام فارسی برازمبل (و نام محلی گل‌کبود در خراسان) به عنوان گیاه دارویی معطر از پراکنش وسیعی در ایران در استان‌های اصفهان، خراسان، گلستان و مازندران برخوردار است. این گیاه به شکل خودرو در افغانستان، پاکستان و ترکمنستان نیز رشد می‌کند (Rechinger, 1982).

اسانس این گیاه حاوی ترکیباتی است که ویژگی ضد باکتریایی دارد. همچنین، دی‌ترپن‌های تخلیص شده از آن نوعی سمّ سلولی و ضد پلاسمودیوم است. ضماد تهیه شده از ساییدن ریشه این گیاه در آب، روغن کنجد و موم در درمان بیماری لیشمانیا به کار می‌رود (Sairafianpour *et al*., 2001). از دیگر ویژگی‌های دارویی دیگر آن می‌توان به آثار مثبت آن روی عملکرد قلب (Zhou and Ruigrok, 1990)، بازدارندگی آنزیم آلدوز ردوکتاز (Tezuka *et al*., 1997)، اتصال به گیرنده‌های بنزودیازپین (Lee *et al*., 1991) والقای آپوپتوز (Yoon *et al*., 1999) اشاره کرد.

بررسی مجلات علمی معتبر نشان داده است که هر چند گزارش‌های متعددی درباره ترکیبات شیمیایی و ویژگی‌های دارویی گونه *P. abrotanoides* وجود دارد، اما درباره کشت بافت آن هنوز اطلاعاتی منتشر نشده است. با توجه به ویژگی‌های دارویی گیاه *P. abrotanoides* و پایین بودن درصد جوانه‌زنی بذرها در شرایط طبیعی، تکثیر و ریزازدیادی آن از اهمیّت ویژه‌ای برخوردار است. در پژوهش حاضر، برای نخستین بار تأثیر غلظت‌های مختلف دو سیتوکینین (BAP و KIN) و ترکیب اکسینی (NAA) در محیط کشت پایه MS روی شاخص‌های رشد و تشکیل اندام‌های نوپدید حاصل از کشت بذر، محتوای رزمارینیک اسید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها بررسی می‌شود تا غلظت بهینه لازم برای ایجاد بیشینه شاخه‌زایی و تولید گیاهچه‌هایی با ویژگی آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر و محتوای رزمارینیک اسید بیشتر تعیین شود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و کشت نمونه‌ها

بذر گیاه *P. abrotanoides* از ارتفاعات ۲۲۰۰ متری منطقه تاش واقع در ۲۰ کیلومتری شهرستان شاهرود جمع‌آوری شد. تیمار به کار برده شده برای سترون کردن بذرها شامل شستشو در آب جاری (۶ ساعت)، خیساندن در آب همراه با ۲ قطره توین ۲۰ (۲۰ دقیقه)، شستشو با آب مقطر (۳ بار)، اتانول ۷۰ درصد (۲ دقیقه)، هیپوکلریت سدیم ۱ درصد (۱۵ دقیقه) و شستشو با آب مقطر (۳ بار) بود. سپس، بذرهای ضدعفونی شده به محیط کشت جامد موراشیک و اسکوگ (Murashige and Skoog, 1962) واجد یکی از هورمون‌های بنزیل آمینو پورین (BAP) یا کینیتین (KIN) در غلظت‌های صفر، ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر همراه با نفتالن استیک اسید (NAA) در غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند. محیط‌های کشت به مدت ۲ روز در تاریکی نگهداری شدند سپس، به قفسه‌های کشت در شرایط دمایی ۲± ۲۳ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت روشنایی ۴۰۰۰ لوکس منتقل شدند. واکشت نمونه‌ها ۴ هفته یک‌بار انجام شد. درصد جوانه‌زنی بذرها، ۳۰ روز پس از کشت و شاخص‌های رشد شامل تعداد و طول شاخه‌ها، تعداد و سطح برگ‌های هر نوشاخه، طول ریشه و درصد کالوس‌زایی قطعات جداکشت ۸۰ روز پس از کشت بذرها تعیین شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل

به منظور بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بافت‌ها و حفظ ترکیبات زیست فعال آنها، نوشاخه‌ها و

ریشه‌های نوپدید به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد خشک (Radünz, 2004) و سپس پودر شدند. ۰/۱ گرم از هر نمونه با امواج فراصوت در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول عصاره‌گیری شد (۲×۱۵ دقیقه، دمای ۴۵ درجه سانتیگراد). عصاره حاصل توسط کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف و برای سنجش‌های بعدی استفاده شد.

۳۰۰ میکرولیتر عصاره اتانولی با ۲/۷ میلی‌لیتر محلول معرف شامل: سولفوریک اسید ۰/۶ میلی‌مولار، فسفات سدیم ۲۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مولار مخلوط شد. پس از مخلوط کردن مواد، نمونه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. جذب نمونه‌ها پس از رسیدن به دمای محیط در طول موج ۶۹۵ نانومتر خوانده شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل آنها بر اساس منحنی استاندارد رسم شده به کمک آسکوربیک اسید در محدوده غلظت ۱ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد (Prieto *et al.*, 1999).

سنجش محتوای رزمارینیک اسید

برای سنجش مقدار این ماده در اندام‌های نوپدید، ۲۰۰ میکرولیتر عصاره اتانولی با ۲۰۰ میکرولیتر محلول زیرکونیوم اکسید کلرید (1×10^{-3} M) و ۴/۶ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه نگهداری در دمای اتاق جذب نمونه‌ها در ۳۶۲ نانومتر خوانده و مقدار رزمارینیک اسید نمونه‌ها بر اساس منحنی رسم شده به کمک غلظت‌های مختلف ماده استاندارد رزمارینیک اسید در محدوده صفر تا ۲۰۰ µM که در اتانول حل شده بود، تعیین و بر حسب mg/g DW نمونه محاسبه شد (Öztürka *et al.*, 2010).

تحلیل داده‌ها

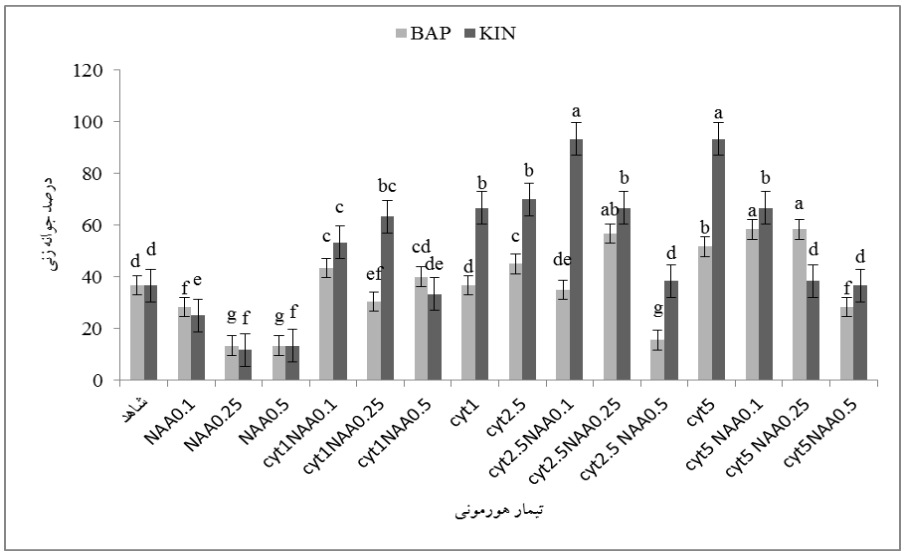
داده‌های حاصل از کشت‌بافت و سنجش‌های بیوشیمیایی با استفاده از طرح فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با کمینه ۵ تکرار برای هر تیمار با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ از طریق تحلیل واریانس دو طرفه تجزیه و تحلیل شدند. پس از تعیین معنی‌دار بودن اختلاف میانگین‌ها، گروه‌بندی میانگین‌های هر یک از شاخص‌های بررسی شده به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن با روش تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام و نمودارهای لازم ترسیم شد.

نتایج

درصد جوانه‌زنی

تحلیل واریانس داده‌های حاصل از تعیین درصد جوانه‌زنی بذرهای *P. abrotanoides* پس از ۳۰ روز تیمار در محیط کشت پایه MS محتوی غلظت‌های مختلفی از هورمون‌های سیتوکینینی و نفتالن استیک اسید تفاوت معنی‌داری را بین میانگین درصد جوانه‌زنی بذرها در سطح $P<0.05$ نشان داد. بالاترین درصد جوانه‌زنی، به میزان ۹۳ درصد، به تیمارهای حاوی ۵ mg/L KIN و ۰/۱ mg/L NAA + ۲/۵ mg/L KIN مربوط بود که نسبت به تیمار شاهد حدود ۲/۵ برابر بیشتر شده بود (شکل ۱). در حالی که در مجموعه تیمارهای NAA-BAP، بالاترین درصد جوانه‌زنی بذرها (حدود ۵۸ درصد) تحت تأثیر تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۲۵ یا ۰/۱میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل شد. در سایر تیمارها، کاربرد غلظت‌های مختلف BAP و KIN به تنهایی یا همراه با تنظیم‌کننده

رشد NAA باعث افزایش درصد جوانه‌زنی نسبت به تیمار شاهد شده بود (شکل ۱). در مجموعه تیمارهای NAA-BAP، کم‌ترین درصد جوانه‌زنی به محیط‌های کشت حاوی ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (به ترتیب ۱۱ و ۱۳ درصد) و محیط دارای ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (۱۵ درصد) متعلق بود که نسبت به شاهد ۶۰ تا ۷۰ درصد کاهش جوانه‌زنی را نشان داد. غلظت‌های بالای NAA به تنهایی باعث بازدارندگی از جوانه‌زنی بذرهای *P. abrotanoides* شده بود، برای مثال، درصد جوانه‌زنی بذرها طی تیمار با ۰/۱ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به ترتیب حدود ۱۲ درصد و ۲۵ درصد کاهش یافت، اما پس از تیمار با ۰/۲۵ mg/L NAA+ ۱ mg/L BAP حدود ۶ درصد کاهش و در تیمار با ۲/۵ mg/L BAP+۰/۲۵ mg/L NAA حدود ۲۰ درصد افزایش یافت (در مقابل، ۳۷ درصد در تیمار شاهد). همان طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، اثر بازدارندگی افزایش غلظت NAA بر درصد جوانه‌زنی را می‌توان به خوبی با تغییر ترکیب هورمونی در تیمار اخیر مشاهده نمود. افزایش غلظت NAA تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، درصد جوانه‌زنی بذرها را نسبت به شاهد ۲۰ درصد و نسبت به تیمار اخیر، ۴۰ درصد کاهش داد. روند تغییر درصد جوانه‌زنی در مجموعه تیمارهای NAA-KIN نیز تقریباً مشابه بود (شکل ۱).



شکل ۱- اثر متقابل غلظت‌های مختلف دو تنظیم کننده سیتوکینینی (cyt)، BAP یا KIN، و نفتالن استیک اسید (NAA) بر درصد جوانه‌زنی بذرهای *P. abrotanoides* ۳۰ روز پس از کشت بذر در محیط پایه MS. مقادیر میانگین ۵ تکرار ±SE است. در هر یک از مجموعه تیمارهای NAA-KIN و NAA-BAP، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.

تعداد و طول نوشاخه‌های القا شده

دانه‌رُست‌های رشد یافته در حضور ترکیب‌های هورمونی مختلف، پاسخ‌های متفاوتی را از نظر توان ریشه‌زایی، شاخه‌زایی و کالوس‌زایی به نمایش گذاشتند (شکل ۲). بررسی پاسخ شاخه‌زایی بذر جوانه زده *P. abrotanoides* طی ۸۰ روز و تحت تأثیر مجموعه تیمارهای BAP-NAA مشخص نمود که بیشینه میانگین تعداد نوشاخه‌های تشکیل شده (حدود ۳۰ نوشاخه)

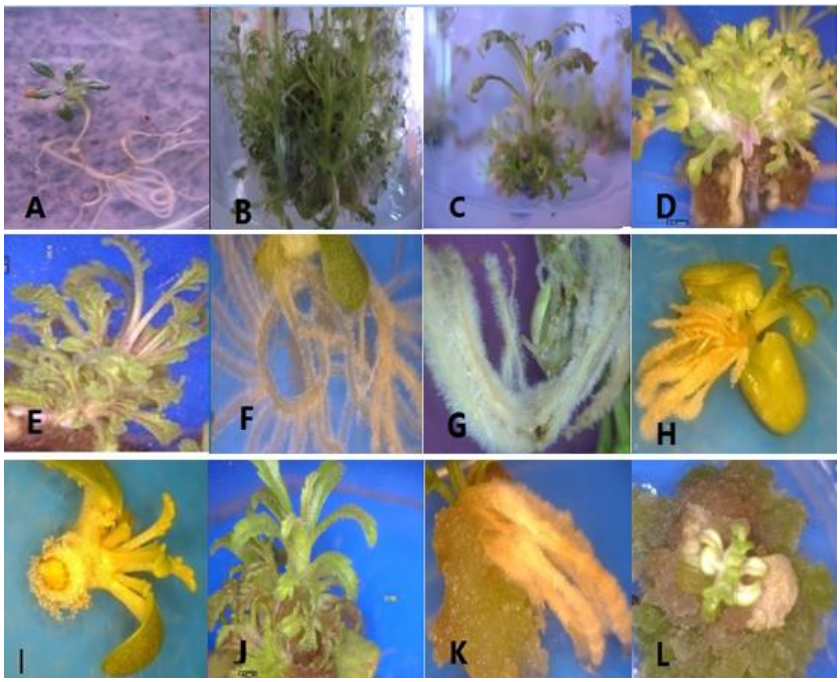
توسط کاربرد ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به تنهایی حاصل شده بود (شکل ۲-B و شکل ۳). اما افزایش غلظت BAP تا ۵ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش میانگین تعداد نوشاخه‌ها به ۶ عدد شد. کم‌ترین تعداد نوشاخه طی تیمار با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA القا شد و تفاوت معنی‌داری بین تأثیر غلظت‌های مختلف این هورمون با تیمار شاهد دیده نشد (شکل ۳). مقایسه تیمارهای BAP و NAA همراه با هم نشان داد که NAA علاوه بر تأثیر منفی بر جوانه‌زنی، بر شاخه‌زایی این گیاه نیز اثر بازدارنده‌ای داشت، به طوری که تعداد نوشاخه‌ها در تیمار حاوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP+ ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در مقایسه با تیمار حاوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP حدود ۶۰ درصد کاهش یافته بود. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت NAA در تیمار همزمان NAA و BAP اثر بازدارنده این هورمون بیشتر شد. مقایسه دو گروه تیمارهای مختلف نشان داد که اثر ممانعتی هورمون NAA بر شاخه‌زایی زمانی که همراه با کینتین به کار می‌رفت بیشتر از زمانی بود که همراه با BAP در محیط کشت استفاده می‌شد (شکل ۲-C). برای مثال، مشخص شد که در تیمار همزمان حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با یکی از سیتوکینین‌ها، جایگزینی KIN با BAP اثر شاخصی بر تعداد شاخه‌های نوپدید می‌گذاشت، به طوری که کاربرد KIN با غلظت مشابه تعداد نوشاخه را به نصف کاهش داد (شکل ۳).

غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشدی که در این پژوهش استفاده شد، نه تنها بر تعداد نوشاخه‌ها، بلکه بر رشد طولی آنها نیز آثار معنی‌داری داشت. بررسی طول نوشاخه‌ها نشان داد که در مجموعه تیمارهای BAP-NAA بیشترین طول نوشاخه در تیمار شاهد با حدود ۴/۵ سانتی‌متر وجود دارد و پس از آن کاربرد هر یک از هورمون‌های NAA در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی یا همراه با BAP در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر، بیشترین رشد طولی نوشاخه را القا نمود (شکل ۴). نتایج نشان داد که با افزایش غلظت NAA در محیط کشت (از ۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، هر چند رشد طولی نوشاخه‌ها افزایش یافت، اما گیاهان رشد یافته در محیط شاهد نوشاخه‌هایی بلندتری داشتند. کاربرد همزمان هر یک از دو هورمون BAP و KIN همراه با NAA یا به تنهایی اثر منفی بر رشد طولی نوشاخه‌ها گذاشت، اما با افزایش غلظت NAA تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر طول نوشاخه‌ها به اندازه ۵۰ تا ۸۰ درصد طول نوشاخه‌های گیاهان شاهد کاهش یافت. نسبت ۱ به ۱۰ اکسین به ستوکینین تا حدودی اثر بازدارنده NAA را بر رشد طولی نوشاخه‌ها برطرف نمود. این نتایج در مورد مجموعه تیمارهای KIN-NAA نیز صدق می‌کند (شکل ۴).

تعداد و سطح برگی

مقایسه تغییرات سطح برگی نوشاخه‌های تشکیل شده پس از اعمال مجموعه تیمارهای BAP-NAA نشان داد که حضور NAA اثر مثبتی بر افزایش سطح برگ دارد. اما در غلظت‌های بالاتر این تنظیم‌کننده رشد، سطح برگی اندکی کاهش یافته بود. برای مثال، در تیمار محتوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA سطح برگ برابر ۱۵ میلی‌متر مربع در هر نوشاخه یا حدود ۳ برابر نمونه‌های شاهد بود، اما با افزایش غلظت این هورمون تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر سطح برگی ۲۰ درصد کمتر شد و به حدود ۱۳ میلی‌متر مربع در هر نوشاخه

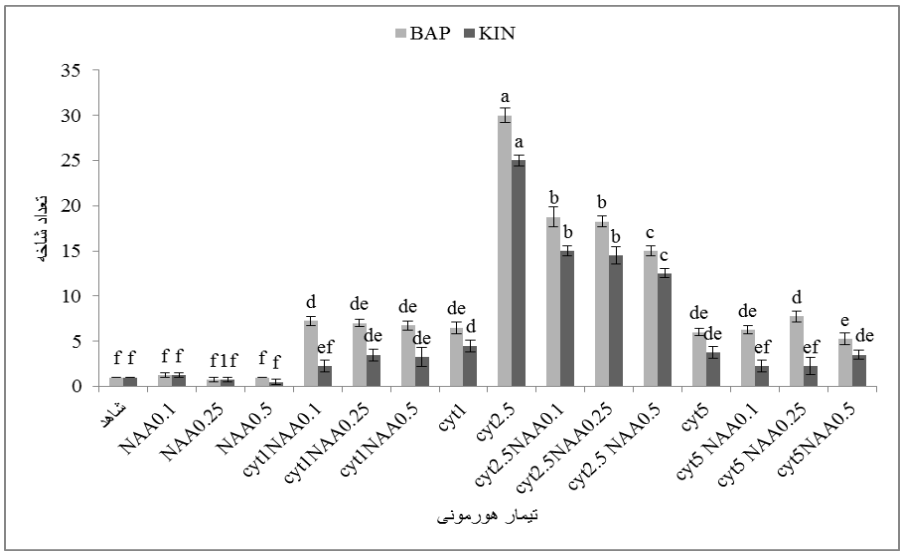
رسید. بیشترین سطح برگی در تیمارهای محتوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر از یک سیتوکینین همراه با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. در تیمارهای منفرد و یا همزمان ۱ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP تفاوت محسوسی بین سطح برگی نوشاخه‌های شاهد و تیمار مشاهده نشد (شکل ۵).



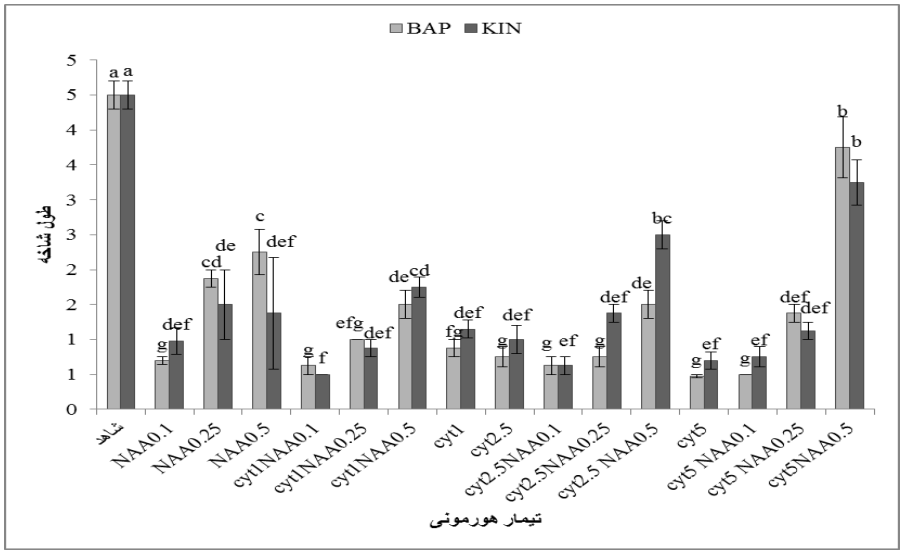
شکل ۲- پاسخ دانه‌رُست‌های *P. abrotanoides* تحت تأثیر تیمارهای هورمونی مختلف در محیط‌کشت MS طی ۸۰ روز پس از کشت بذر. A) گیاه شاهد در محیط بدون هورمون؛ B) شاخه‌زایی به تعداد فراوان با برگ‌های سبز تیره در تیمار حاوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP؛ C) تشکیل نوشاخه به تعداد کم در تیمار حاوی یک میلی‌گرم در لیتر KIN؛ D) شاخه‌زایی و تشکیل کالوس در تیمار حاوی ۵ میلی‌گرم در لیترBAP؛ E) شاخه‌زایی در تیمار محتوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN؛ F) القای ریشه‌های فرعی و تارهای کشنده در تیمار محتوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA؛ G) رشد طولی ریشه اولیه و تشکیل ریشه‌های فرعی بلند با تارهای کشنده فراوان در تیمار محتوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA؛ H) تشکیل ریشه‌های فرعی کوتاه و متعدد در تیمار محتوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA؛ I) ممانعت از ریشه‌زایی و رشد ریشه اولیه در تیمار حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP؛ J) تمایز نوشاخه و ممانعت از ریشه‌زایی در تیمار حاوی ۵ میلی‌گرم در لیترKIN؛ K) تشکیل کالوس و ریشه‌زایی در تیمار حاوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA؛ L) تشکیل کالوس و شاخه‌زایی در تیمار حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر KIN و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA.

همچنین، نتایج نشان داد که کاربرد NAA به تنهایی بر افزایش تعداد برگ‌های هر نوشاخه نیز اثر بازدارندگی دارد و بر عکس، کاربرد همزمان دو هورمون KIN و NAA محرک تشکیل برگ بود. برای مثال، در مقایسه با تیمار محتوی ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN، تیماری که علاوه بر همین مقدار KIN حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA هم بود، میانگین تعداد برگ‌ها را از ۸ به ۱۳ عدد افزایش یافت. بالا بردن

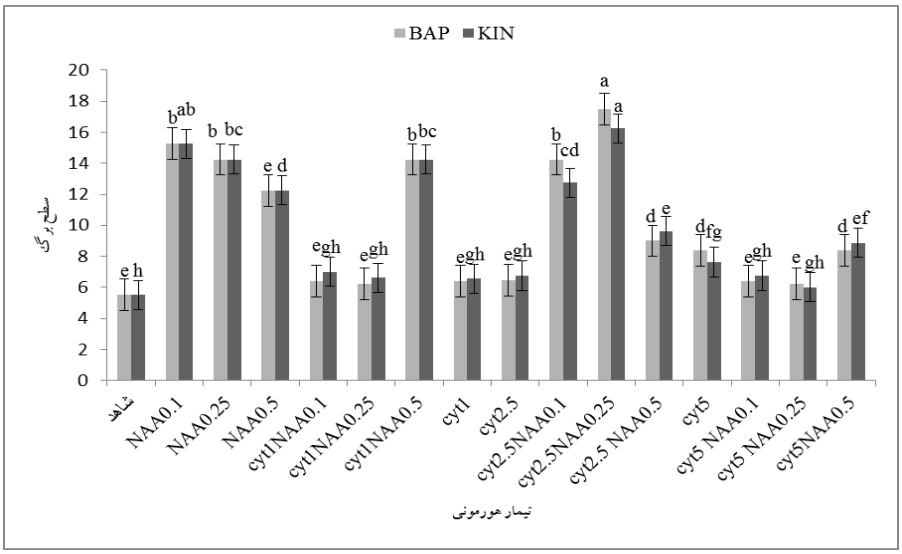
غلظت NAA تا ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر، میانگین تعداد برگ را به ۱۸ عدد در هر نوشاخه رساند. از سوی دیگر، بررسی‌ها نشان داد که حضور ترکیبات سیتوکینینی به تنهایی ابتدا متناسب با افزایش غلظت آن در محیط کشت، تعداد برگ را افزایش و سپس کاهش می‌دهند. برای نمونه، میانگین تعداد برگ در دو تیمار محتوی ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر KIN به ترتیب ۴ و ۸ عدد بود، اما با افزایش میزان KIN تا ۵ میلی‌گرم در لیتر این روند سیر نزولی پیدا کرد. مجموعه تیمارهای حاوی NAA و BAP نیز نتایج مشابهی را نشان داد.



شکل ۳- اثر متقابل غلظت‌های مختلف دو تنظیم‌کننده سیتوکینینی (cyt)، BAP یا KIN و نفتالن استیک اسید (NAA) بر میزان شاخه‌زایی دانه‌رُست‌های *P. abrotanoides* ۸۰ روز پس از کشت بذر در محیط پایه MS. مقادیر میانگین ۵ تکرار SE± است. در هر یک از مجموعه تیمارهای NAA-KIN و NAA-BAP، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.



شکل ۴- اثر متقابل غلظت‌های مختلف دو تنظیم‌کننده سیتوکینینی (cyt)، BAP یا KIN و نفتالن استیک اسید (NAA) بر طول نوشاخه دانه‌رُست‌های *P. abrotanoides* ۸۰ روز پس از کشت بذر در محیط پایه MS. مقادیر میانگین ۵ تکرار SE± است. در هر یک از مجموعه تیمارهای NAA-KIN و NAA-BAP، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.



شکل ۵- اثر متقابل غلظت‌های مختلف دو تنظیم‌کننده سیتوکینینی (cyt)، BAP یا KIN و نفتالن استیک اسید (NAA) بر سطح برگی دانه‌رُست‌های *P. abrotanoides* ۸۰ روز پس از کشت بذر در محیط پایه MS. مقادیر میانگین ۵ تکرار SE± است. در هر یک از مجموعه تیمارهای NAA-KIN و NAA-BAP، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.

تعداد و طول ریشه‌های نوپدید

از نظر پاسخ‌های ریشه‌زایی، نتایج نشان داد که غلظت NAA اثر تعیین‌کننده‌ای بر تعداد و طول ریشه‌های تشکیل شده بر روی قطعات جداکشت *P. abrotanoides* دارد. به طور کلی، با افزایش غلظت NAA طول ریشه‌های نوپدید به طور شاخص افزایش یافت (شکل ۶ و شکل ۲-F). همان طور که در شکل ۶ دیده می‌شود، بیشترین طول ریشه به تیمارهای حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون NAA تعلق دارد (۶ سانتی‌متر در تیمار با NAA به تنهایی یا ۵ تا ۶ سانتی‌متر در ترکیب با هر یک از دو هورمون KIN یا BAP). البته باید خاطر نشان ساخت که گستره غلظت این دو تنظیم‌کننده سیتوکینینی نیز بر پاسخ‌های ریشه‌زایی قطعات جداکشت آثار معنی‌داری به جا گذاشت (شکل ۶). در هر دو سری تیمارها، افزایش غلظت سیتوکینین (از ۱ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر) همراه با غلظت بالای NAA حدود ۲۰ درصد بر میانگین طول ریشه افزود (شکل ۲-H و G). اما غلظت بالای تنظیم‌کننده‌های سیتوکینینی به تنهایی باعث توقف کامل رشد طولی ریشه اولیه دانه‌رُست‌ها یا مانع تشکیل ریشه‌های فرعی شد (شکل ۲-I و J).

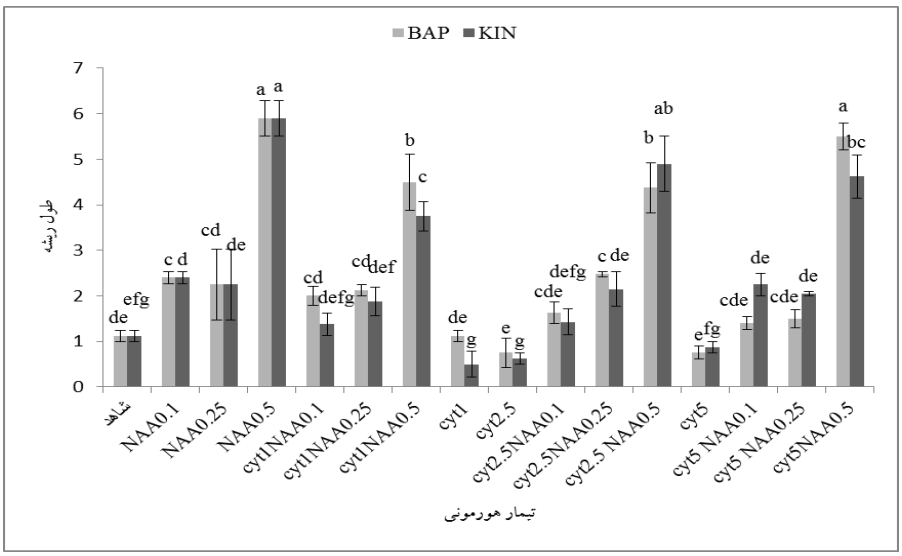
القای کالوس

بررسی نتایج به دست آمده نشان داد که بهترین تیمار به منظور القای تشکیل کالوس، طی کشت بذر این گیاه روی محیط کشت پایه MS محتوی ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP با ۸۰ درصد کالوس‌زایی حاصل می‌شود (شکل ۷). در تیمار شاهد هیچ نشانه‌ای از تشکیل کالوس مشاهده نشد. بررسی داده‌ها گویای آن بود که نسبت هورمون اکسین به سیتوکینین نقش مهمی در القای تشکیل کالوس دارد، به طوری که تیمارهایی با نسبت اکسین به سیتوکینین ۰/۵ تا ۱ پاسخ بهتری در رابطه با

کالوس‌زایی نشان دادند (شکل ۲-K و L). کاربرد غلظت‌های ۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، به شدت از القای کالوس روی قطعات جداکشت جلوگیری کرد، در حالی که این ترکیب با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بهترین تأثیر را در رابطه با کالوس‌زایی نمونه‌ها داشت (شکل ۷).

محتوای رزمارینیک اسید اندام‌های نوپدید

بررسی محتوای رزمارینیک اسید تنها در تیمارهای هورمونی که اندام‌زایی در آنها رخ داده بود، انجام شد. هر دو اندام نوشاخه و ریشه‌های نوپدید پس از عصاره‌گیری از نظر محتوای این ترکیب آنتی‌اکسیدانی مهم با گیاهان شاهد مقایسه شدند که نتایج آن در شکل ۸ مشاهده می‌شود. نتایج نشان داد که از میان سه هورمون NAA، BAP و KIN، کاربرد دو تنظیم‌کننده آخر بیشترین تأثیر را در افزایش محتوای رزمارینیک اسید اندام‌های بررسی شده داشتند. بر عکس، کاربرد هورمون NAA باعث کاهش محتوای این ترکیب شد (شکل ۸). با افزایش غلظت هورمون‌های سیتوکینینی، سطح رزمارینیک اسید اندام‌ها افزایش یافت. برای مثال، تیمارهای همزمان حاوی یکی از این دو هورمون فوق به همراه NAA مانند تیمار ۲/۵ KIN mg/L + ۰/۲۵ NAA mg/L بیشترین تأثیر را در انباشتگی این ترکیب فنلی در اندام‌های نوپدید داشت (۷۵/۲۱ mg/DW). میزان رزمارینیک اسید در تیمار اخیر نسبت به تیمارهای مشابه که تنها حاوی یکی از سیتوکینین‌ها بود، ۱/۲ برابر بیشتر بود.

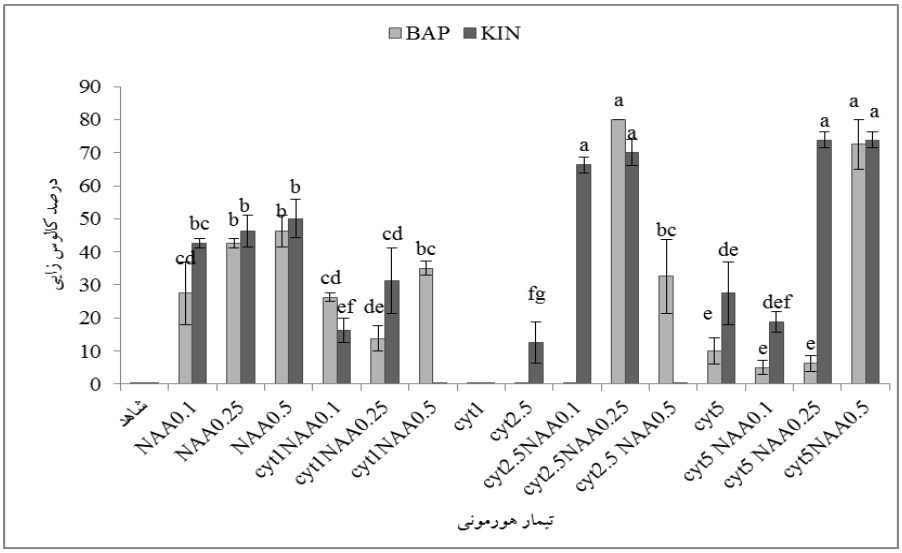


شکل ۶- اثر متقابل غلظت‌های مختلف دو تنظیم‌کننده سیتوکینینی (cyt)، BAP یا KIN و نفتالن استیک اسید (NAA) بر طول ریشه دانه‌رُست‌های *P. abrotanoides* ۸۰ روز پس از کشت بذر در محیط پایه MS. مقادیر میانگین ۵ تکرار ±SE است. در هر یک از مجموعه تیمارهای NAA-KIN و NAA-BAP، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.

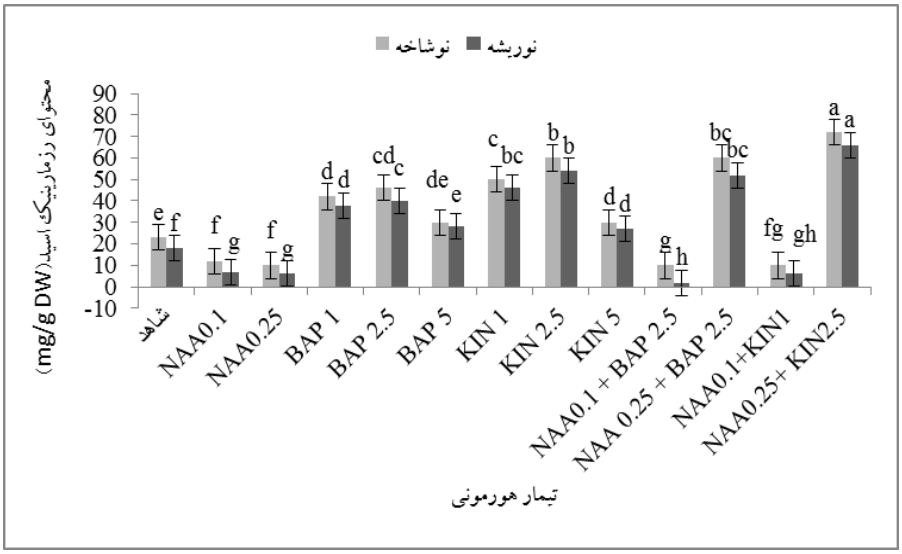
فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل اندام‌های نوپدید

بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های حاصل از نوشاخه‌ها و ریشه‌های نوپدید با روش فسفومولیبدن، الگویی مشابه نتایج یاد شده در بالا را نشان داد. کاربرد NAA به تنهایی باعث کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل اندام‌های بررسی شده شد و تحت

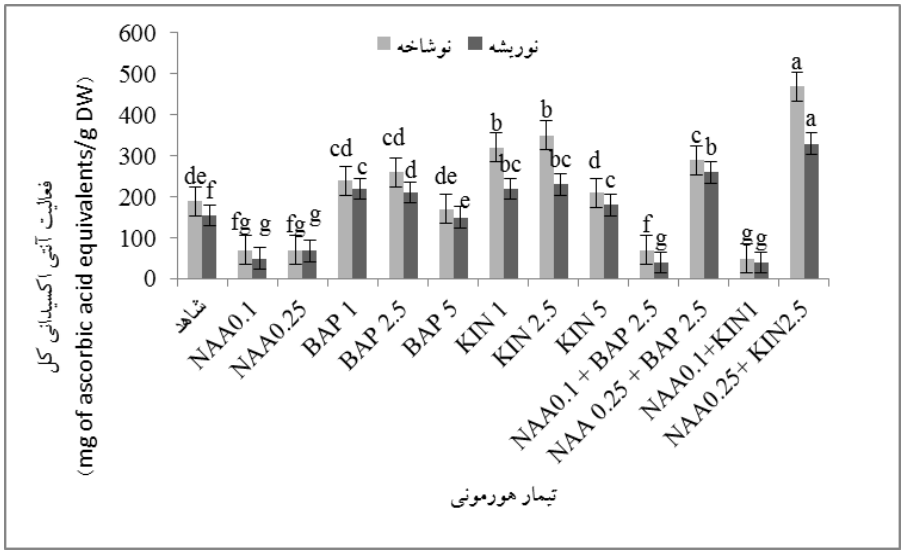
تأثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکینینی (۱ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها افزایش یافت. اما تیمار همراه با هم BAP یا KIN در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر با NAA mg/L ۰/۱ کاهش فوق العاده شدید فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل اندام‌ها را در پی داشت. مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در دو اندام نوشاخه و ریشه نشان داد که در بیشتر تیمارها، نوشاخه‌ها فعالیتی بیشتر از ریشه‌ها دارند (شکل ۹).



شکل ۷- اثر متقابل غلظت‌های مختلف دو تنظیم‌کننده سیتوکینینی (cyt)، BAP یا KIN و نفتالن استیک اسید (NAA) بر درصد کالوس‌زایی دانه‌رُست‌های *P. abrotanoides* ۸۰ روز پس از کشت بذر در محیط پایه MS. مقادیر میانگین ۵ تکرار ±SE است. در هر یک از مجموعه تیمارهای NAA-KIN و NAA-BAP، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.



شکل ۸- اثر متقابل غلظت‌های مختلف دو تنظیم‌کننده سیتوکینینی (cyt)، BAP یا KIN و نفتالن استیک اسید (NAA) بر محتوای رزمارینیک اسید نوشاخه ها و ریشه های نوپدید *P. abrotanoides* ۸۰ روز پس از کشت بذر در محیط پایه MS. مقادیر میانگین ۵ تکرار ±SE است. و در هر یک از مجموعه تیمارهای NAA-KIN و NAA-BAP، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.



شکل ۹- اثر متقابل غلظت‌های مختلف دو تنظیم‌کننده سیتوکینینی (cyt)، BAP یا KIN و نفتالن استیک اسید (NAA) بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل نوشاخه ها و ریشه های نوپدید *P. abrotanoides* ۸۰ روز پس از کشت بذر در محیط پایه MS. مقادیر میانگین ۵ تکرار SE± است. و در هر یک از مجموعه تیمارهای NAA-KIN و NAA-BAP، حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 است.

بحث

بررسی‌های ابتدایی نشان داد که جوانه‌زنی بذرهای *P. abrotanoides* در شرایط عادی به کندی اتفاق می‌افتد؛ از این رو، نخستین قدم برای تکثیر این گیاه در مکانی غیر از رویشگاه‌های طبیعی آن، یافتن تیمارهایی است که باعث شکست خواب بذرها شده، درصد جوانه‌زنی را افزایش دهد. مقایسه تیمارهای هورمونی استفاده شده در این پژوهش به خوبی بیانگر آن بود که تحت تأثیر افزودن هورمون‌های BAP و KIN به محیط کشت، به تنهایی یا همراه با غلظت‌های کم NAA، درصد جوانه‌زنی در این گیاه را می‌توان افزایش داد. در حالی که کاربرد غلظت‌های مختلف NAA به تنهایی به ویژه غلظت بالای آن (۰/۵ میلی گرم در لیتر) باعث کاهش درصد جوانه‌زنی شده بود. مقایسه دو سیتوکینین تیمار شده نشان داد که کاربرد هورمون KIN برای شکست خواب بذرهای *P. abrotanoides* بسیار موفقیت آمیزتر از BAP است و جوانه‌زنی را از ۳۷ درصد به ۹۳ درصد ارتقا داد. در گیاه *Zinnia elegans* (گل‌آهار یا Thumbelina) از تیره Asteraceae نیز بالاترین درصد جوانه‌زنی (۹۲/۵ درصد) از طریق تیمار بذرها با یک میلی‌گرم در لیتر کینتین حاصل شد. در این گونه، جوانه‌زنی بذرهای گیاه در حضور غلظت‌های مختلف KIN بیشتر از BAP بود (Mahmoodzadeh, 2010). اما در برخی پژوهش‌های دیگر تأثیر هورمون BAP بر تحریک جوانه‌زنی بذرها بیشتر از کینتین گزارش شده است. برای نمونه، Hartinie و Jualang (2007) گزارش کرده‌اند که درصد جوانه‌زنی *Labisia pumila* Benth. از تیره Myrsinaceae در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP بیش از درصد جوانه‌زنی در محیط کشت حاوی KIN است. مشابه این نتایج در مطالعه گیاهان *Kniphofia uvaria* Blaze. از تیره

Liliaceae و *Swainsona salsula* Taubert. نیز به دست آمده است (Yang *et al*., 2001). سیتوکینین‌ها، هورمون‌های گیاهی هستند که در تنظیم فرآیندهای مختلف زیستی نظیر رشدونمو، جوانه‌زنی بذرها و ریخت‌زایی اندام‌های هوایی حایز اهمیّت هستند (Chiwocha *et al*., 2005). سیتوکینین‌ها در تحرک ذخایر بذر و استفاده از آنها برای تأمین انرژی لازم برای رشد رویان در زمان جوانه‌زنی نقش کلیدی دارند (Fincher, 1989). به علاوه، در شرایط *in vitro* سیتوکینین‌ها تقسیمات سلولی را تحریک نموده، اثر ترکیبات مهارکننده جوانه‌زنی را خنثی می‌کنند (Khan, 1975؛ Werner and Schmülling, 2009). بنابراین، در مقایسه با جوانه‌زنی بذرهای شاهد می‌توان نتیجه گرفت که اثر محرک BAP و KIN در افزایش درصد جوانه‌زنی *P. abrotanoides* به تأثیر آنها در فعال کردن سیگنال‌های شکست خواب، حرکت دادن مواد غذایی از بافت‌های ذخیره‌ای بذر به سمت رویان و افزایش فعالیت مراکز مریستمی آن مربوط است. با توجه به تغییراتی که پس از اعمال تیمارهای هورمونی از نظر درصد جوانه‌زنی در این گیاه به وجود آمد، می‌توان به وضوح اظهار داشت که بذرهای *P. abrotanoides* دارای خواب فیزیولوژیک هستند. خواب فیزیولوژیک در بذرها به علت عوامل داخلی و در نتیجه عدم توازن بین مقدار ترکیبات تحریک کننده و بازدارنده رشد ایجاد می‌شود. در بسیاری از مطالعات انجام شده در مورد شکست خواب بذرها، کاربرد دو گروه از هورمون‌های جیبرلینی و سیتوکینین‌ها (به تنهایی یا در ترکیب با هم) باعث کاهش تأثیر محتوای بالای آبسیزیک اسید بافت‌های رویانی شده و جوانه‌زنی را تسریع کرد. در گیاهانی که دارای خواب هستند هنگام تمایز رویان، مقدار سیتوکینین‌ها زیاد می‌شود (Güleryüz *et al*., 2011) و نسبت بالای جیبرلین و سیتوکینین به آبسیزیک اسید که مهمترین بازدارنده جوانه‌زنی و رشد است، نشانه‌ای برای شروع فعالیت‌های متابولیسمی بذر برای شکست خواب، افزایش تقسیمات سلولی، تجزیه ذخایر سلولی و تحرک مواد به سمت رویان در حال تمایز است (Fincher, 1989؛ Hocart and Letham, 1990؛ Güleryüz *et al*., 2011).

در بخش دوم این پژوهش، اندام‌زایی دانه‌رُست‌های رشد یافته در حضور ترکیبی از هورمون‌ها در محیط کشت بررسی شد. بیشترین میزان شاخه‌زایی در بین تیمارهای تحت بررسی با کاربرد ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر از این هورمون‌های سیتوکینینی به دست آمد و در مقایسه بین دو تنظیم‌کننده رشد، تأثیر بیشتر BAP در القای شاخه‌زایی گیاه *P. abrotanoides* به اثبات رسید. نتایج گویای آن بود که نقش غلظت KIN و BAP در محیط کشت در پایه گذاری و تکوین اندام‌های نوپدید به ویژه نوشاخه‌ها بسیار مهم و تأثیرگذار بود به طوری که افزایش این هورمون‌ها فراتر از حد بهینه می‌توانست اثر مهارکنندگی بر شاخه‌زایی داشته باشد. پژوهش‌ها ثابت نموده است که افزودن هورمون‌ها به محیط کشت *Lavandula dentate* L.، متعلق به تیره نعناعیان، باعث تغییر توازن هورمون‌های درونی گیاه برای تولید یک اندام خاص نظیر نوشاخه‌ها شد (Machado *et al*., 2011). در گیاه *Premina serratifolia* L. از همین تیره، ۵ mg/L از انواع سیتوکینین‌ها شامل: BAP، KIN،

۲-ایزوپنتیل آدنین و زآتین پاسخ شاخه‌زایی حدود ۶۰ درصد با میانگین ۲/۶ تا ۴/۳ نوشاخه روی هر جداکشت را القا نمود (Chinnappan *et al*., 2011) در حالی که در پژوهش حاضر دانه‌رُست‌های گیاه *P. abrotanoides* بهترین تیمار شاخه‌زایی را با نیمی از غلظت این هورمون‌ها ایجاد کردند که تأثیر تفاوت ژنوتیپ‌ها و گونه‌ها را نشان می‌دهد.

بر اساس نظر Chiwocha و همکاران (۲۰۰۵) سیتوکینین‌های استفاده شده در این بررسی را می‌توان به دو گروه بنزیل آمینوپورین با آثار فیزیولوژیک ضعیف‌تر و مؤثرتر در شاخه‌زایی و کینتین با فعالیت فیزیولوژیک قوی‌تر و مؤثرتر در رشد طولی و تقسیم سلولی تقسیم کرد. پژوهشگران متعددی نشان داده‌اند که حضور BAP تشکیل شاخه‌های متعدد را تحریک می‌کند (Nikolic *et al*., 1997؛ Sudria *et al*., 2004)، از جمله افزایش غلظت BAP در محیط کشت *Melissa officinalis* L. از تیره نعناعیان تا حد ۱ mg/L به میزان درخور توجهی باعث افزایش شاخه‌زایی در این گونه شد (Tavares *et al*., 1996). همچنین، مطالعات دیگر نشان داده است که به طور میانگین روی ۸۲ تا ۹۰ درصد جداکشت‌های *Melissa officinalis* رشد یافته در محیط‌های کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP حدود ۳ تا ۴ نوشاخه تشکیل شده است (Meftahizade *et al*., 2010 a,b).

کاربرد NAA به همراه سیتوکینین‌ها روند افزایش رشد طولی شاخه را در *P. abrotanoides* سرعت بخشید. به طوری که تیمار قطعات جداکشت با ۰/۵ mg/L NAA همراه با تیمارهای محتوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP یا KIN طول نوشاخه را دو برابر کرد. نتایج فوق مشابه یافته‌های Chinnappan و همکاران (۲۰۱۱) روی گیاه *Premina serratifolia* بود. آنها نشان دادند که کاربرد BAP ۳ mg/L+ IAA ۰/۵ mg/L به جای تیمار BAP ۵ mg/L بالاترین درصد شاخه‌زایی با طول مناسب را القا می‌کند. با استفاده از KIN به جای BAP نتایج تقریباً مشابهی حاصل شد. مقایسه وضعیت رشد نوشاخه‌های *P. abrotanoides* در تیمارهای مختلف با تیمار شاهد نشان داد که اگر چه سیتوکینین‌ها تا غلظت معینی (۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) برای افزایش شاخه‌زایی مفید هستند، اما نگهداری طولانی مدت قطعات جداکشت در این محیط‌ها اثر نامناسبی روی رشد طولی نوشاخه‌ها دارد. همچنین، بررسی رابطه بین شاخه‌زایی و طول شاخه نشان داد در تیمارهایی که شاخه‌زایی افزایش یافته بود طول شاخه‌ها کمتر شده بود. این امر می‌تواند به علت توزیع منابع گیاه بین رشد نوشاخه‌ها و تشکیل اندام‌های جدید باشد، به طوری که در تیمارهای مناسب برای شاخه‌زایی، بیشتر انرژی گیاه صرف افزایش تعداد شاخه‌ها شده است، در حای که در تیمارهایی با تعداد شاخه کمتر این انرژی برای افزایش طول ساقه مصرف شده بود. در گیاه *Coleous forskohlii* Briq. پاسخ‌های متفاوتی در نتیجه تیمارهای هورمونی حاصل شد که وابسته به نوع و سن قطعه جداکشت، تنوع ژنتیکی نمونه‌ها و فصل برداشت آنها بود. در گیاه نامبرده، کاربرد هورمون‌های اکسینی به تنهایی بیشترین تأثیر را در افزایش بیماس شاخه‌ها داشت، اما کاربرد همزمان BAP در غلظت‌های ۰/۵-۱/۵ mg/L همراه با

یکی از ترکیبات اکسینی بهترین پاسخ را از نظر تولید شاخه‌های متعدد پدید آورد (Praveena *et al*., 2012).

بررسی نتایج تیمارهای هورمونی در دانه‌رُست‌های *P. abrotanoides* از نظر تحریک رشد ریشه‌ها نشان داد که هورمون‌های سیتوکینینی در افزایش رشد طولی ریشه‌ها مؤثر نبودند، زیرا در غلظت‌های مختلف آن تفاوت معنی‌داری بین طول ریشه‌ها دیده نشد. اما NAA به تنهایی یا در کنار سیتوکینین‌های استفاده شده به طور شاخص باعث افزایش تعداد و طول ریشه‌ها شد. نتایج این پژوهش منطبق بر گزارش‌های منتشر شده در سال ۲۰۱۰ بر روی ریحان (*Ocimum sanctum* L.) از تیره نعناعیان بود که نشان داد KIN تنها در غلظت کم باعث تسریع ریشه‌زایی و افزایش طول ریشه‌ها می‌شود (Kusampudi and Chinnasamy, 2010). در تأیید این یافته‌ها، Nabeta (۱۹۹۳) گزارش کرد که کاربرد KIN مانع از تشکیل ریشه در گونه *Solanum aculeatissimum* Jacq می‌شود و این اثر احتمالاً به علت قدرت KIN در مهار مهاجرت آمینو اسیدها و دیگر گهرمایه‌ها از محل قطعه جداکشت است. در گیاه *Mentha piperita* L نیز گزارش شده است که سیتوکینین‌های اضافه شده به محیط کشت درصد شاخه‌زایی آن را بالا می‌برند، در حالی که افزودن اکسین‌ها باعث کاهش پاسخ‌های شاخه‌زایی و افزایش تشکیل ریشه روی قطعات جداکشت می‌شوند (Sarwar *et al*., 2002). در *Ocimum sanctum* نیز نسبت بالای اکسین به سیتوکینین برای ریشه‌زایی مناسب‌تر بوده است (Shilpa *et al*., 2010). اکسین‌ها علاوه بر تحریک تقسیم سلولی و تشکیل کالوس، در غلظت‌های بسیار پایین محرک رشد ریشه و در غلظت‌های بالاتر باعث القای تشکیل ریشه فرعی می‌شوند. در حالی که سیتوکینین‌ها در غلظت‌های بالا تشکیل شاخه‌های جانبی را القا کرده، بازدارنده تشکیل ریشه هستند (Medford *et al*., 1989؛ Werner *et al*., 2001). بررسی تیمارهای مختلف نشان داد که هر چند افزودن NAA در غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر باعث القا کالوس‌زایی در ۵۰ درصد جداکشت‌ها می‌شود، اما کاربرد هورمون‌های سیتوکینینی در غلظت‌های پایین اثر منفی بر کالوس‌زایی داشته، تنها در غلظت‌های متوسط (KIN) و زیاد (KIN و BAP) اثر محرک NAA بر کالزایی بیشتر (۸۰ درصد کالزایی) را تقویت می‌کردند. در بررسی گونه *Ocimum sanctum* مشاهده شد که در بین تیمارهای مختلف، کاربرد ۰/۲ mg/L KIN + ۲ mg/L NAA یا ۲ mg/L NAA + ۱/۳ mg/L BAP بیشترین درصد کالزایی را القا می‌کند (Kusampudi and Chinnasamy, 2010).

تغییر محتوای رزمارینیک اسید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل اندام‌های حاصل از کشت بافت گیاه *P. abrotanoides* الگوی مشابه و وابسته به هم را نشان داد که گویای اهمیّت این ترکیب فنلی و انعکاس آن در قدرت آنتی‌اکسیدانی کل گیاه فوق داشت. تولید بخش درخور توجهی از مواد آنتی‌اکسیدانی *P. abrotanoides* وابسته به حضور سیتوکینین‌ها به ویژه KIN در محیط کشت بود. کاربرد غلظت‌های متوسط BAP و KIN (۲/۵ میلی‌گرم در لیتر) به طور شایان توجهی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندام‌های نوپدید شاخه و ریشه در این گیاه را افزایش داد. در حالی که

کاربرد همزمان این هورمون‌ها با اکسین بر حسب غلظت‌های مصرف شده نتایج متفاوتی را از نظر تولید آنتی‌اکسیدان‌ها یا مهار فعالیت آنتی‌اکسیدانی بافت‌های *P. abrotanoides* پدید می‌آورد. حتی با کاربرد غلظت‌های کم NAA در محیط کشت، محتوای رزمارینیک اسید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل دانه‌رُست‌های تیمار شده به طور قابل توجهی کمتر از نمونه‌های شاهد بود. نتایج پژوهشگران دیگر نیز مؤید آن است که استفاده از KIN و BAP در غلظت‌های تقریباً مشابه، میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی معطر را افزایش می‌دهد (Taha *et al*., 2008)، اما به طور کلی بالا بودن سرعت رشد و افزایش بیوماس اثر منفی بر تولید متابولیت‌های ثانویه دارد (Stafford and Warren, 1991). همبستگی منفی که بین میزان رشد و تولید رزمارینیک اسید در *Satureja hortensis* L. دیده شده است (Tepe *et al*., 2007)، در گیاه *P. abrotanoides* بیشتر در ارتباط با میزان شاخه‌زایی نمونه‌ها مشاهده شد. در گیاه *Salvia officinalis* L. اصلی‌ترین ترکیب آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره‌های فنلی، کارنوسول و رزمارینیک اسید است و کشت این گیاه در حضور KIN با غلظت ۱/۵-۴ mg/L محتوای ترکیبات فنلی و دی‌ترپنی و به ویژه رزمارینیک اسید اندام‌های نوپدید را تا سه برابر میزان موجود در نمونه‌های طبیعی بالا برد، در حالی که کم‌ترین مقدار این آنتی‌اکسیدان‌ها با تیمار ۱/۵ mg/L BAP حاصل شد (Santos-Gomes *et al*., 2002). افزایش غلظت KIN انباشتگی اکثر فنل‌های دی‌ترپنی نظیر کارنوسیک اسید، کارنوسول و دی‌رزمانول اتر را کاهش داده است (Santos-Gomes *et al*., 2002).

در غیاب سیتوکینین‌ها، اندام‌های نوپدید حاصل از کشت‌بافت دانه‌رُست‌های *P. abrotanoides* تیمار شده با NAA قدرت آنتی‌اکسیدانی و محتوای رزمارینیک اسید کمتری داشتند. در تأیید این مسأله گزارش شده است که *Lavandula dentate* کشت شده در حضور سیتوکینین بنزیل آدنین دارای برگ‌هایی سبز رنگ با عمر طولانی‌تر و غده‌های ترشحی متعدد بود که در غلظت بالای این هورمون این غده‌ها تخریب نشده و سطح مواد معطر در آنها کاهش یافته بود، اما کشت‌بافت این گیاه در حضور یک ترکیب اکسینی مانند ایندول بوتیریک اسید باعث تشکیل ریشه‌های بیشتر و برگ‌هایی با تعداد غدد ترشحی کمتر شد که به سرعت تخریب شدند (Sudria *et al*., 2004).

جمع‌بندی

مقایسه نتایج کاربرد دو مجموعه تیمارهای هورمونی در گیاه *P. abrotanoides* نشان داد که با وجود تشابه روند تغییرات شاخه‌زایی، استفاده از BAP به علت افزایش تعداد شاخه‌ها و درصد شاخه‌زایی بیشتر ارجحیت دارد و در بین غلظت‌های مختلف، غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر بهترین غلظت سیتوکینین به کار رفته در محیط کشت بود که همراه با NAA ۰/۲۵ mg/L بالاترین درصد کالوس‌زایی، بیشترین سطح برگی، بیشترین محتوای رزمارینیک اسید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را پدید آورد. هر گونه تغییر در ترکیب محیط کشت گیاهان از جمله غلظت هورمون‌ها می‌تواند به راحتی

روی میزان تولید متابولیت‌های ثانویه آنها در شرایط *in vitro* تأثیر گذارد. به نظر می‌رسد، کاربرد روش کشت‌بافت که امکان باززایی و تکثیر گیاهان را در شرایط آزمایشگاهی و رویشگاه‌های وسیع‌تر فراهم می‌کند می‌تواند با تنظیم محتوای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مهم توسط کاربرد هورمون‌ها جایگزینی مناسب برای روش‌های سنتی تولید عمده این ترکیبات باشد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه الزهراء (س) انجام شده است. نگارندگان از معاونت پژوهشی و گروه زیست‌شناسی دانشگاه که امکانات و هزینه لازم برای اجرای این طرح را فراهم کردند، سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

Gopi, C., Nataraja, Y. S. and Ponmurugan, P. (2006). *In vitro* multiplication of *Ocimum gratissimum* L. through direct regeneration. African Journal of Biotechnology 5(9): 723-726.

Güleryüz, G., Kırmızı, S., Arslan, H. and Sakar, F. S. (2011) Dormancy and germination in *Stachys germanica* L. subsp. *bithynica* (Boiss.) Flora 206: 943-948.

Hartinie, M. and Jualang, G. A. (2007) *In vitro* germination and plantlet establishment of *Labisia pumila* (Bl.) F. Vill. Scientia Horticulturae 115: 91-97.

Hocart, C. H. and Letham, D. S. (1990) Biosynthesis of cytokinin in germinating seeds of *Zea mays*. Journal of Experimental Botany 41: 1525-1528.

Khan, A. A. (1975) Primary, preventative and permissive roles of hormones in plant systems. Botanical Reveiw Journal 41: 391-420.

Kusampudi, S. and Chinnasamy, S. (2010) *In vitro* root culture of *Ocimum sanctum* L. and evaluation of its free radical scavenging activity. Plant Tissue Culture 101: 105-109.

Lee, C. M., Wong, H. N., Chui, K. Y., Choang, T. F., Hon, P. M. and Chang, H. M. (1991) A central benzodiazepine receptor partial agonist from a Chinese medicinal herb *Salvia miltiorrhiza*. Neuroscience Letters 127: 237-241.

Arikat, N. A., Jawad, F. M., Karam, N. S. and Shibli, R. A. (2004). Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). Science Horticulture 100: 193-202.

Begum, F., Amin, N. and Azad, M. A. K. (2002) *In vitro* rapid clonal propagation of *Ocimum basilicum* L.. Plant Tissue Culture and Biotechnology 12(1): 27-35.

Chinnappan, R. S., Ruthar, N. and Sethu, S. S. (2011) Rapid *in vitro* propagation of *Premna serratifolia*, a medicinally important declining shrub, India. Conservation Evidence 8: 66-73.

Chiwocha, S. D. S., Cutler, A. J., Abrams, S. R., Ambrose, S. J. and Yang, J.(2005). The *ert1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberreiiin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist chilling and germination. Plant Journal 42: 35-48.

Cuvelier, M. E., Richard, H. and Bers, C. (1996) Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. Journal of the American Oil Chemists' Society 46: 645-652.

Fincher, G. B. (1989) Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilisation in germinating cereal grains. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 40: 305-346.

Machado, M. P., da Silva, A. L. and Biasi, L. A. (2011) Effect of plant growth regulators on *in vitro* regeneration of *lavandula*. Journal of Biotechnology and Biodiversity 28: 28-31.

Mahmoodzadeh, H., Abbasi F. and Rohani, S. (2010) *In vitro* germination and early seedling growth of *Zinnia elegans*. Research. Journal of Environmental Sciences 4: 407-413.

Medford, J. I., Horgan, R., El-Sawi, Z. and Klee, H. J. (1989) Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentyl transferase gene. Plant Cell 1(4): 403-413.

Meftahizade, H., Lotfi, M. and Moradkhani, H. (2010a) Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L.. African Journal of Biotechnology 9: 4314-4321.

Meftahizade, H., Moradkhani, H., Naseri, B., Lotfi, M. and Naseri, A. (2010b) Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes. Journal of Medicinal Plant Research 4: 240-246.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Plant Physiology 15: 473-497.

Murch, S. J., KrishnaRaj, S. and Saxena, P. K. (2000) Phytomaceuticals: mass production, standardization and conservation. Herbal Medicine 4(2): 39-43.

Nabeta, K. (1993) *Solanum aculeatissimum* jacq: *In vitro* culture and the production of secondary metabolites. In: Biotechnology in agriculture and forestry (Ed. Bajaj, Y. P. S) 329-341. Springer, Verlage.

Nikolic, R., Mitic, N. and Neskovic, M. (1997) Evaluation of agronomic traits in tissue culture-derived progeny of birds-foot trefoil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48: 67-69.

Öztürka, M., Durua, M., İncea, B., Harmandara, M. and Topçu, G. (2010) A new rapid spectrophotometric method to determine the rosmarinic acid level in plant extracts. Food Chemistry 123: 1352-1356.

Praveena, R., Amarnath, Pandian, S. and Jegadeesan, M. (2012) *In vitro* culture studies on medicinal herb - *Coleus forskohlii* Briq. Libyan Agriculture Research Center Journal International 3(1): 30-35.

Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M. (1999) Spectophotometric quantitative of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry 269: 337-341.

Radünz, L. L. (2004) Dried *rosemary pepper* and mint together on guaco different temperatures and its influence on the quantity and quality of active ingredients. PhD thesis, University of Viçosa, Viçosa, Brazil.

Rechinger, K. H. (Ed.) (1963-2010) Flora Iranica, vols. 1-174. Akademische Druck- und Verlasanstalt, Graz, vols. 175-178, Naturhistorisches Museum, Wien.

Saha, S., Ghosh, P. D. and Sengupta, C. (2010) *In vitro* multiple shoot regeneration of *Mentha piperita.* Journal of Tropical Medicinal Plants 11(1): 89-92.

Saha, S., Kader, A., Sengupta, C. and Ghosh, P. D. (2012) *In vitro* propagation of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) and its evaluation of genetic fidelity using RAPD marker. American Journal of Plant Sciences 3: 64-74.

Sairafianpour, M., Christensen, J., Strk, D., Budnik, B. A., Kharazmi, A., Bagherzadeh, K. and Jaroszewski, J. W. (2001) Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of novel diterpenoid 1,2-quinones from *Perovskia abrotanoides*: new source of tanshinones. Natural Product 64: 1398-1403.

Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B. and Fernandes-Ferreira, M. (2002) Phenolic antioxidant compounds produced

by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). Plant Science 162: 981-987.

Sarwar, M., Khan, M. A. and Iqbal, Z. (2002) Feed resources for livestock in Pakistan. International Journal of Agricultural Biology 4: 186-192.

Shilpa, K., Selvakkumar, C., Senthil, A. K. and Lakshmi, B. S. (2010) *In vitro* root culture of *Ocimum sanctum* L. and evaluation of its free radical scavenging activity. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 101: 105-109.

Stafford, A. and Warren G. (1991) Plant cell and tissue culture. Open University Press, Buckingham.

Sudria, C., Palazon, J., Cusido, R., Bonfill M., Pinol M. T. and Morales, C (2004) Effect of benzyladenine and indolebutyric acid on ultrastructure, glands formation and essential oil accumulation in *Lavandula dentata* plantlets. Physiology of Plant 44: 1-6.

Taha, H. S., El-Rahman, A. and Fathalla, M. (2008) Successful application for enhancement and production of anthocyanin pigment from calli cultures of some ornamental plants. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 2(4): 1148-1156.

Tavares, A. C., Pimento, M. C. and Goncalves, M. T. (1996) Micropropagation of *Melissa officinalis* through proliferation of axillary shoots. Plant Cell Reports 15: 441-444.

Tepe, B., Sokmen, M., Askin Akpulat, H. and Sokmen, A. (2007) *In vitro* antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. Food Chemistry 15: 685-689.

Tezuka, Y., Kasimu, R., Basnet, P., Namba, T. and Kadota, S. (1997) Aldose reductase inhibitory constituents of the root of *Salvia miltiorhiza* Bunge. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 45: 1306-1311.

Werner, T. and Schmülling, T. (2009) Cytokinin action in plant development. Current Opinion in Plant Biology 12: 527-538.

Werner, T., Motyka, V., Strnad, M. and Schmulling, T. (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. Proceeding National Academy Science USA 98: 10478-10492.

Yang, Z., Yang, Z., Hu, G. Q., Guo, G. C. and Zheng, E. T. (2001) *In vitro* plant regeneration from cotyledon explants of *Swainsona salsula* Taubert. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 66: 35-39.

Yoon, Y., Kim, Y. O., Jeon, W. K., Park, H. J. and Sung, H. J. (1999) Tanshinone IIA isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. induced apoptosis in HL60 human premyelocytic leukemia cell line. Journal of Ethnopharmacology 68: 121-127.

Zhou, W. and Ruigrok, T. J. (1990) Protective effect of danshen during myocardial ischemia and reperfusion: an isolated rat heart study. American Journal of Chinese Medicine 18: 19-24.

Effect of plant growth regulators on *in vitro* germination and micropropagation of Brazmbl (*Perovskia abrotanoides*), a medicinal plant

Azra Saboora * and Mahjoubeh Shokri

Department of Biology, Faculty of Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

Abstract

The aim of this study was to obtain a suitable combination of hormones including naphthalene acetic acid (NAA) with benzyl aminopurin (BAP) or kinetin (KIN) to lower seed dormancy of *Peroveskia abrotanoides*, studying *in vitro* organogenesis and evaluation of antioxidant activity of shoots and roots. The seeds were sterilized and cultured on Murashige and Skoog medium (MS) containing BAP or KIN (at 0, 1, 2.5 and 5 mg/L concentrations) and NAA (at 0, 0.1, 0.25 and 0.5 mg/L concentrations). All experiments were done based on factorial design in a randomized block design with at least five replicas. Germination percent was estimated after 30 days and number of shoots and leave, leaf area, root and shoot length were determined after 80 days. The highest germination percent (93%) was obtained by 5 mg/L KIN and 2.5 mg/L KIN + 0.1 mg/L NAA treatments which was indicative of the role of the cytokinin on the seed dormancy breaking. Effect of BAP on rising shoot number was greater than KIN (30 shoots after 2.5 mg/L BAP treatment). In contrast to NAA that was inhibitor of shoot induction in *P. abrotanoides*, number of the shoots was reduced to half by addition of it to the media. The highest value of leaf area (15 mm^2) was obtained by treated seeds in the media supported with NAA alone. The highest percentage of callus induction (80%) was obverved on media containing 0.25 or 0.5 mg/L NAA in combination with 2.5 mg/L BAP or KIN. Intermediate concentration of the studied cytokinins alone or with intermediate concentration of NAA, such as 2.5 mg/L KIN + 0.25 mg/L NAA, had the highest effect on rosmarinic acid storage in *de novo* organs (75.21 mg/g DW). While, the induced organs was grown on the media that supplemented just with NAA had less antioxidant activity and rosmarinic acid content.

Key words: Brazmble (*perovskia abrotanoides*), Germination, Micropropagation, Plant tissue culture

* Corresponding Author: saboora@alzahra.ac.ir