بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

# بررسی تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و  باززایی درون شیشه‌ای گیاه رازیانه

عصمت انباز

استاد راهنما

دکتر شاهرخ قرنجیک

استاد مشاور

دکتر احمد غلامی

پایان نامه ارشد جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

شهریور ۱۳۹۳

تقدیم به

آنکه علم او محیط به آنچه در پیش رو و آنچه در پشت سر است ؛

پدر و مادرم،آنهایی که دعای خیرشان را بدرقه راهم کردند ؛

سایر اعضای خانواده‌ام که همیشه در کنارم حضور داشتند.

اساتید ارجمندم که اندیشیدن را به من آموختند نه اندیشه را ؛

و آنهایی که معتقدند بن بستی وجود ندارد و بر این باورند که یا راهی خواهند یافت، یا راهی خواهند ساخت.

به نام خدا

سر بر آستان جلال پروردگار بی‌همتا می‌سایم که دگر بار توفیق اندوختن دانشی هر چند اندک را روزیم فرمود. اینک که توفیق جمع‌آوری و تهیه این مجموعه را یافته‌ام، بر خود واجب می‌دانم از تمامی عزیزان و سرورانی که در طی انجام این پژوهش به بنده لطف داشته‌اند تشکر و قدردانی نمایم.

شایسته است از استاد راهنمای بزرگوارم دکتر شاهرخ قرنجیک که در مراحل مختلف تحقیق در کمال اخلاص، یاریم نمودند و با حوصله زیاد مراجعت‌های مداوم مرا تحمل نمودند و همواره راه‌گشا و روشنی بخش من بودند، صمیمانه تشکر نمایم.

از اساتید ارجمند و گرانمایه: جناب آقای دکتر احمد غلامی مشاور، جناب آقای دکتر مهدی رضایی و جناب آقای دکتر ناصر فرخی که زحمت مطالعه و داوری این پایان‌نامه را پذیرفتند، تشکر می‌نمایم.

از استاد گرامی جناب آقای دکتر مصطفی حیدری ناظر محترم تحصیلات تکمیلی در برقراری هماهنگی-های ارزندشان در برگزاری جلسه دفاعیه، کمال تشکر را دارم. همچنین از کلیه اعضاء محترم هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی و متصدیان آزمایشگاه‌های دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود کمال تشکر و سپاس را دارم.

از الطاف به یاد ماندنی خانم زهرا نوروزی مسئول و سایر سرپرستان خوابگاه به خاطر زحمات و مساعدت هایشان در طول این دوره قدردانی می‌نمایم.

از زحمات و الطاف بیکران دوستان عزیزم:

خانم محبوبه صرامی و همه همکلاسی‌های عزیزم

که هر یک به نوبه خود خالق بهترین و به یاد ماندنی‌ترین خاطراتم هستند، صمیمانه قدردانی می نمایم.

تابستان ۹۳

# تعهدنامه

**اینجانب عصمت انباز دانشجوی دوره‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی بیوتکنولوژی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شاهرود**

**نویسنده‌ی پایان‌نامه‌ی** بررسی تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای گیاه رازیانه **تحت راهنمایی** دکتر شاهرخ قرنجیک**متعهد می‌شوم**تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام‌شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.

- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورداستفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه شاهرود» و یا « Shahrood University» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان‌نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه‌ی مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه‌ی مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه‌ی اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

**تاریخ**

**امضای دانشجو**

## مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه‌ی حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم‌افزارها و تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه شاهرود می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده

به منظور بهینه سازی شرایط کشت‌بافت گیاه دارویی رازیانه این تحقیق در قالب چند آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. در آزمایش اول اثر غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکنینی شامل بنزیل‌آمینوپورین (BAP) و تیدیازرون (TDZ) به تنهایی یا در ترکیب با غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسینی شامل نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) و ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA) بر کالوس‌زایی دو ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ در محیط‌کشت پایه MS مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که بیشترین میزان (۱۰۰ درصد) کالوس‌زایی از ریزنمونه هیپوکوتیل با ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آمد. در مرحله بعد کالوس‌های حاصله به محیط یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA برای شاخه‌زایی منتقل شدند. بیشترین میزان شاخه‌زایی (۱۰۰ درصد) مربوط به کالوس‌های حاصل از ترکیب هورمونی با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین و یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید بود. در ادامه تعدادی از گیاهچه‌های باززا شده به محیط ریشه‌زایی حاوی یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید منتقل شدند. بیشترین میزان ریشه‌زایی(۷۵ درصد) مربوط به گیاهچه‌های حاصل از کالوس‌هایی با ترکیب هورمونی ۱ NAA،۲BAP بودند.

کلمات کلیدی: کالوس زایی، باززایی، تیدیازرون، نفتالین استیک‌اسید

مقالات مستخرج از پایان نامه

۱- بررسی اثر سطوح مختلف تنظیم کننده های رشد گیاهی بر کالوس زایی گیاه رازیانه. اولین کنگره بین المللی و سیزدهمین کنگره ژنتیک ایران (دانشگاه شهید بهشتی). خرداد ۱۳۹۳

۲- مطالعه اثر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر باززایی غیر مستقیم از ریزنمونه هیپوکوتیل در گیاه رازیانه. اولین کنگره بین‌المللی و سیزدهمین کنگره ژنتیک ایران (دانشگاه شهید بهشتی). خرداد ۱۳۹۳

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و کلیات


۱-۱- مقدمه ..... ۲

۱ ـ ۲ ـ اهداف تحقیق ..... ۳

۱ ـ ۳ ـ تاریخچه و منشا رازیانه ..... ۴

۱ ـ ۴ ـ مشخصات گیاه شناسی رازیانه ..... ۴

۱ ـ ۵ ـ اهمیت دارویی رازیانه ..... ۶

۱-۶-کشت بافت ..... ۷

۱-۶-۱- باززایی از طریق جنین زایی سوماتیکی ..... ۸

۱-۶-۲- باززایی از طریق کالوس ..... ۹

۱-۶-۳- ریزنمونه ..... ۱۰

۱-۷- اجزای محیط کشت بافت گیاهی ..... ۱۱

۱-۷-۱- منبع قندی ..... ۱۲

۱-۷-۲- عامل ژله کننده ..... ۱۲

۱-۷-۳- تنظیم کننده های رشد گیاهی ..... ۱۳

۱-۷-۳- ۱- اکسین ..... ۱۴

۱-۷-۳- ۲- سیتوکینین ..... ۱۵

۱-۸- pH ..... ۱۶

فصل دوم : مروری بر منابع

۲ -۱- مروری بر منابع.....۱۸

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳ـ ۱ ـ مواد گیاهی.....۳۰
۳ـ ۲ ـ مواد شیمیایی.....۳۰
۳ـ ۳ ـ تهیه محیط کشت.....۳۰
۳-۳-۱- محلول مادری مواد غذایی پر مصرف .....۳۱
۳-۳-۲- محلول مادری مواد غذایی کم مصرف .....۳۱
۳-۳-۳- محلول مادری ویتامین ها.....۳۲
۳-۳-۴- محلول مادری آهن.....۳۳
۳-۴- تهیه محلول‌های مادری تنظیم کننده‌های رشد گیاهی .....۳۳
۳-۵- محیط‌های کشت گیاهی.....۳۴
۳-۵-۱- محیط‌کشت برای کشت بذر و تولید گیاهچه.....۳۴
۳-۵-۲- محیط القای کالوس‌زایی .....۳۴
۳-۵-۳- محیط القای شاخه‌زایی.....۳۵
۳-۵-۴- محیط القای ریشه‌زایی .....۳۵
۳-۶-تهیه گیاهچه و کشت ریزنمونه.....۳۵
۳-۶-۱- استریل کردن بذرها.....۳۵
۳-۶-۲- کشت بذور و تهیه گیاهچه‌ها .....۳۶
۳-۶-۳- تهیه و کشت ریزنمونه .....۳۷

۳-۷- آزمایشات کالوس‌زایی ..... ۳۸
۳-۷-۱- آزمایش اول کالوس‌زایی ..... ۳۹
۳-۷-۲- آزمایش دوم کالوس‌زایی ..... ۴۰
۳-۷-۳- آزمایش سوم کالوس‌زایی ..... ۴۱
۳-۸- آزمایش باززایی ..... ۴۲
۳-۹- آزمایش ریشه‌زایی ..... ۴۲
۳-۱۰- تجزیه آماری داده‌ها ..... ۴۲
فصل چهارم: نتایج و بحث
۴ـ ۱ـ نتایج کالوس‌زایی ..... ۴۴
۴ـ ۱ـ۱ـ آزمایش اول: تاثیرغلظت های مختلف هورمونی BAP، IBA ..... ۴۵
۴ـ ۱ ـ۲ـ آزمایش دوم: تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA، TDZ ..... ۵۲
۴ـ ۱ـ۳ـ آزمایش سوم: تاثیر غلظت‌های مختلف هورمونی BAP، NAA ..... ۵۸
۴ـ۲- بررسی باززایی و روز تا شاخه‌زایی در محیط با ترکیب هورمونی BAP، NAA ..... ۶۴
۴-۳- بررسی ریشه‌زایی ..... ۶۷
۴ـ ۴- سازگاری به شرایط بیرون از آزمایشگاه ..... ۶۸
ـ نتیجه‌گیری ..... ۷۰
ـ توصیه‌ها و پیشنهادات ..... ۷۲
ـ منابع ..... ۷۳

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱- عکس گیاه دارویی رازیانه ..... ۵

شکل ۳-۱- گیاهچه‌های حاصل از کشت بذور رازیانه روی محیط کشت ..... ۳۷

شکل ۳-۲- ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل گیاه رازیانه ..... ۳۸

شکل ۴-۱- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف دو هورمون BAP، IBA ..... ۴۷

شکل ۴-۲- اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون IBA ..... ۴۸

شکل۴-۳- اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون BAP ..... ۴۹

شکل۴-۴- اثر متقابل غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP، IBA ..... ۵۱

شکل ۴-۵- ریزنمونه برگ با رشد رویشی رو محیط کشت حاوی هورمون BAP ..... ۵۱

شکل ۴-۶- اثر متقابل سه گانه ریزنمونه و ترکیب‌های هورمونی TDZ، NAA ..... ۵۴

شکل ۴-۷- اثر متقابل بین ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون TDZ ..... ۵۵

شکل ۴-۸- اثر متقابل بین ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون NAA ..... ۵۷

شکل ۴-۹- اثر متقابل غلظت‌های مختلف هورمون‌های TDZ , NAA ..... ۵۷

شکل ۴-۱۰- اثر متقابل سه ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP، NAA ..... ۶۰

شکل ۴-۱۱- اثر متقابل بین ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون BAP ..... ۶۱

شکل ۴-۱۲- اثر متقابل بین ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون NAA ..... ۶۲

شکل ۴-۱۳- اثر متقابل غلظت‌های مختلف هورمون BAP، NAA ..... ۶۳

شکل ۴-۱۴- کالوس‌زایی ریزنمونه برگ رازیانه ..... ۶۳

شکل ۴-۱۵- نمونه‌ای از کالوس‌های شیشه‌ای شده ریزنمونه برگ ..... ۶۴

شکل ۴-۱۶- گیاه باززا شده رازیانه در محیط باززایی ..... ۶۷
شکل ۴-۱۷- ریشه‌زایی گیاه رازیانه در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر NAA ..... ۶۸
شکل ۴-۱۸- گیاه رازیانه در مرحله عادت‌دهی به هوای گلخانه..... ۶۹

جداول

جدول ۳-۱- نمک‌های پر مصرف محیط کشت پایه MS.....۳۰

جدول ۳-۲- نمک‌های کم مصرف محیط کشت پایه MS .....۳۱

جدول ۳-۳- ویتامین‌های محیط کشت پایه MS .....۳۲

جدول ۳-۴- آهن محیط کشت پایه MS.....۳۲

جدول ۳-۵- ترکیبات حلال هورمون‌های گیاهی.....۳۳

جدول ۳-۶- تیمارهای هورمونی مورد استفاده در کالوس‌زایی .....۳۹

جدول ۳-۷- تیمارهای هورمونی مورد استفاده در کالوس‌زایی .....۴۰

جدول ۳-۸- تیمارهای هورمونی مورد استفاده در کالوس‌زایی .....۴۱

جدول ۴-۱-۱- تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف دو هورمون BAP، IBA .....۴۶

جدول ۴-۱-۲- تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف دو هورمون TDZ، NAA .....۵۳

جدول ۴-۱-۳- تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف دو هورمون BAP، NAA .....۵۹

# فصل اول

## مقدمه و کلیات

## ۱-۱- مقدمه

گیاهان دارویی از منابع مهم تولید داروی است که از هزاران سال پیش کاربرد داشته‌اند. سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که بیش از ۸۰ درصد از مردم به صورت سنتی و یا مدرن از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند. به‌علاوه بسیاری از داروهای شیمیایی نیز با الگوبرداری از مواد گیاهی ساخته شدند(ترپاتی و ترپاتی، ۲۰۰۳). امروزه در سراسر دنیا بسیاری از گیاهان دارویی در مزرعه کشت و هر روز نیز به تعداد آنها افزوده می‌شود و علت عمده این روند، اثرات جانبی کمتر داروهای گیاهی نسبت به داروهای شیمیایی و همچنین عدم توانایی در ساختن بعضی ترکیبات به صورت مصنوعی و یا هزینه‌ی بالای ساخت آنها می-باشد.

در کشورهای توسعه یافته حدود ۲۵ درصد داروها دارای منشا گیاهی می‌باشند. دانش طب سنتی بر اساس استفاده از گیاهان دارویی نه تنها از نظر حفظ سنت‌های کشت و تنوع زیستی بلکه از جهت سلامت جامعه و بهبود کیفیت داروها سودمند است (موتو و همکاران، ۲۰۰۶). گیاهان، منبع بسیاری از مواد شیمیایی هستند که به عنوان ترکیب دارویی مصرف می‌شوند. فرآورده‌های حاصل از متابولیت‌های ثانویه گیاهی جزو ترکیبات شیمیایی گران‌بهای گیاهی هستند.

با توجه به این‌که رویکرد جهانی به سمت داروهای گیاهی و فاصله گرفتن از داروهای شیمیائی است، توجه بیش از پیش به گیاهان دارویی را ایجاب می‌نماید. اگرچه کاشت گیاهان دارویی به هزاران سال پیش باز می‌گردد، ولی باید گفت که در مورد اصلاح آنها تاکنون پیشرفت قابل ملاحظه‌ای صورت نگرفته است و در حال حاضر، تعداد ارقام مفید به‌دست آمده از طریق اصلاح گیاهان دارویی اندک است.

تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی به‌خاطر برداشت بی‌رویه و روش‌های نامناسب برداشت برای تولید دارو و همچنین تخریب اکوسیستم‌های طبیعی گیاهان دارویی و تبدیل آنها به جنگل و زمین‌های کشاورزی، در

معرض خطر است. با توجه به مطالب ذکر شده در بالا استفاده از تکنیک کشت بافت جهت حفظ تنوع ژنتیکی این گیاه ضروری به‌نظر می‌رسد.

کشت‌بافت گیاهی در زمینه گیاهان دارویی کاربردهای متعددی دارد که تکثیر انبوه و سریع گیاهان دارویی یکنواخت از لحاظ محتوای ژنتیکی و کیفی، حفظ گونه‌های گیاهی در حال انقراض از طریق نگهداری در شرایط انجماد و تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط *in vitro* از طریق کشت سوسپانسیون سلولی و کشت اندام، برخی از کارهای کشت بافت است(تری‌پاتی و تری‌پاتی، ۲۰۰۳; مولاباگال و تسای، ۲۰۰۴). با استفاده از کشت منبع اولیه دارو در شرایط کنترل شده و مستقل از محیط، افزایش تولید ترکیبات گیاهی و تولید ترکیبات جدید نیز امکان‌پذیر می‌گردد.

باززایی گیاهان با استفاده از جنین‌زایی سوماتیک از یک سلول، در بسیاری از گونه‌های گیاهان دارویی به اثبات رسیده است. ریزازدیادی[1] گیاهان دارویی از طریق ازدیاد سریع نوک شاخه‌ها و جوانه‌های محوری در محیط کشت به‌دست می‌آید. رازیانه به دلیل استفاده‌های دارویی فراوان کاربرد وسیعی دارد و از گیاهان دارویی با ارزش می‌باشد که در مناطق مختلف ایران و جهان کشت می‌شود.

### ۱-۲- اهداف این تحقیق

هدف از این تحقیق بهینه‌سازی و تعیین غلظت‌های مناسب هورمون‌های اکسین و سیتوکنین در کالوس‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ گیاه رازیانه می‌باشد، که بعد از بهینه‌سازی شرایط کشت بافت این گیاه می‌توان از آن در مطالعات انتقال‌ژن و تولید متابولیت‌های ثانویه از کشت سوسپانسیون‌های سلولی استفاده نمود.

1-Micropropagation

### ۱-۳- تاریخچه و منشأ رازیانه

رازیانه بومی منطقه مدیترانه و جنوب اروپا است و در حال حاضر در جنوب و مرکز اروپا، کشورهای آسیایی (هند، چین، ژاپن) و بسیاری از کشورهای آفریقایی و همچنین در برزیل و آرژانتین کشت می‌شود (امیدبیگی، ۱۳۷۹). در ایران در استان‌های شمال، شمال غرب و جنوب شرق کشور می‌روید (قهرمان، ۱۳۷۳). رازیانه مطابق نوشته‌های پاپیروس در ۱۵۵۰ سال قبل از میلاد در لیست گیاهان دارویی جای داشته است (ماسارویکف و همکاران، ۲۰۰۶). اسانس رازیانه حاوی آنتول[1]، می‌باشد. آنتول موجود در اسانس رازیانه اثر فعال کننده مراکز عصبی مغزی را دارد

### ۱-۴- مشخصات گیاه‌شناسی

رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare* L. (شکل ۱-۱) گیاهی است دیپلوئید (۲n = ۲۲) منشاء آن مدیترانه و متعلق به خانواده چتریان (*Apiaceae*) می‌باشد. در ایران فقط یک گونه به نام *Foeniculum vulgare* هم به صورت زراعی و هم وحشی یافت می‌شود (مظفریان، ۱۳۷۵). ارتفاع ساقه حدود۱۵۰ تا ۲۰۰ سانتی‌متر، قائم، استوانه‌ای، منشعب و سبز رنگ است. ریشه غده‌ای، دوکی شکل و مستقیم، برگ‌های این گیاه متناوب با پهنک منقسم به قطعات نازک و نخی شکل، گل‌ها زرد رنگ و مجتمع کوچک و منظم به صورت چتر مرکب است. شاخک‌های چترهای آن بلند و شامل پایه‌های نامساوی است و تعداد آنها به ۱۵ نیز می‌رسد. پهنای گل آذین چتری آن در حدود ۱۵ سانتی‌متر است. میوه رازیانه به طول ۶ تا ۱۰ میلی متر به عرض ۲ تا ۳ میلی‌متر، دوکی شکل با دو انتهای باریک و رنگ آن سبز یا قهوه‌ای روشن می‌باشد. میوه پریکارپ دارای ۵ پره برجسته و ناودانی شکل، و هر یک از شیارها بین پره‌ها دارای یک مجاری ترشح کننده است (قهرمان، ۱۳۷۳). از آنجایی که رازیانه گیاهی است مدیترانه‌ای، هوای گرم برای رشد و

1- Anethole

نمو این گیاه مطلوب است. به‌طورکلی کشت این گیاه در کشورهایی با هوای گرم (که تابستان طولانی و زمستان سرد نداشته باشد) موفقیت آمیز می‌باشد.

جوانه زنی بذور در ۶ تا ۸ درجه سانتی‌گراد انجام می‌گیرد ولی درجه حرارت مطلوب برای جوانه زنی ۱۵ تا ۱۶ درجه سانتی گراد می‌باشد (امید بیگی، ۱۳۷۹). آبیاری در مراحلی از رشد، رویش اولیه، مرحلهٔ تشکیل ساقه و مرحلهٔ نمو گل‌ها، تأثیر قابل توجهی بر کمیت و کیفیت مواد مؤثره این گیاه دارد. اسیدیته خاک برای رازیانه ۴/۸ تا ۸ مناسب است (امید بیگی، ۱۳۷۹).

شکل ۱-۱- گیاه داروئی رازیانه

### ۱-۵- اهمیت دارویی رازیانه

در طب سنتی رازیانه به عنوان ضد نفخ، دفع کننده سنگ‌های کلیه و مجاری ادراری، افزایش دهنده شیر مادران مورد استفاده قرار می‌گیرد (میرحیدری، ۱۳۸۰). اشتهاآور، محرک، مقوی و آرام‌بخش است و در رفع انواع انگل‌ها مؤثر است و باعث تسکین سرفه، سیاه سرفه و آسم می‌شود و اندام‌ها را پاک می‌کند. تمام قسمت‌های گیاه خاصیت درمانی دارد، اما بیشترین قسمت مورد استفاده آن بذر است که حاوی روغن و اسانس فرار است و مهم‌ترین ترکیب شیمیایی آن آنتول است که بیشترین خواص این گیاه مربوط به این ترکیب است.

میوه‌ی رازیانه دارای نوعی اثر استروژنیک است و سبب افرایش وزن و چاقی می‌شود (لاولز، ۱۹۹۲). رازیانه به عنوان طعم دهنده در مخلوط‌های چای، نوشیدنی‌ها و فراورده‌های غذایی به‌کار می‌رود. روغن رازیانه را می‌توان، به عنوان ترکیب در فراورده‌های پوستی چون ضد چین و چروک و ضد پیری، صابون‌ها، پاک کننده‌ها، کرم‌ها، لوسیون‌ها و مواد خوشبو کننده به‌کار برد (مداح، ۱۳۷۹). در اسانس رازیانه ۲۲ ترکیب شناسایی شده است که درصد آنها طی مراحل مختلف رشد متغیر است. ولی ترکیبات عمده اسانس رازیانه در تمام مراحل رشد ترانس آنتول، لیمونن، فنچون، استراگول[1] یا متیل کایکول[2] و آلفاپینن[3] می‌باشد. از دیگر ترکیبات آن می‌توان میرس، اوسیمن، فلاونوئیدها، قندها، لعاب، ویتامین A را نام برد (سفیدکن، ۱۳۸۰). اسانس رازیانه در صنایع داروسازی ، نوشابه، صنایع غذایی، بهداشتی و آرایشی مورد استعمال قرار می‌گیرد (بجاج، ۱۹۸۹ ; امید بیگی، ۱۳۷۶) ریشه رازیانه دارای کومارین می‌باشد. این ماده رقیق کننده‌ی خون است، که برای تصلب شرائین یا انسداد رگ‌ها مفید می‌باشد (خاتمی سبزواری،

1- Estragole
2- Methyl kaykvl
3- Alpha-pinene

۱۳۷۹). اسانس میوه‌های رازیانه حاوی آلفا- پینن، کامفن، آلفا –فلاندرن، ترانس-آنتول، فنکون،استراگول، انیس آلدئید[1] و در نهایت مقدار اندکی از برخی از ترکیب‌های قلیایی است (ستال و همکاران، ۱۹۷۵).

### ۱-۶- کشت بافت[2]

کشت گیاهان دارویی از قرن‌ها پیش انجام می‌شده است، اما در مورد جمع آوری کلکسیون‌های ژرم پلاسم، ارزیابی و استفاده از آنها در اصلاح این گیاهان، کارهای بسیار کمی صورت گرفته است. روش‌های سنتی اصلاح برای بهبود گیاهان دارویی، شامل ارزیابی و نوترکیبی مبتنی بر دستکاری ساختار ژنتیکی از طریق تولید مثل جنسی است که گیاهان حاصله عمدتا از لحاظ ژنتیکی یکنواخت نیستند از طرف دیگر این روش‌ها به سال‌ها زمان نیاز دارند.

کشت‌بافت (که نوعی تکثیر غیر جنسی است) عبارت است از رشد سلول، بافت و یا اندام‌های گیاهی در یک محیط غذایی مصنوعی که به صورت جامد یا مایع تهیه می‌شود و این تکنیک به عنوان یکی از شاخه-های بیوتکنولوژی در کشاورزی شناخته شده است (باقری و همکاران، ۱۳۸۶). گیاهان حاصل از کشت-بافت دارای محتوای ژنتیکی یکسان و کیفیت یکنواخت هستند.

از لحاظ تاریخی، اگرچه تکنیک "کشت‌بافت" برای اولین بار، در سال‌های ۱۹۳۹-۱۹۴۰ در مورد گیاهان به‌کار گرفته شد، ولی در سال ۱۹۵۶ بود که یک شرکت دارویی در کشور آمریکا (Pfizer Inc) اولین ثبت اختراع را در مورد تولید متابولیت‌ها با استفاده از کشت توده‌ای سلول‌ها منتشر کرد. کول و استابو (۱۹۶۷) و هبل و همکاران (۱۹۶۸) توانستند مقادیر بیشتری از ترکیبات ویسناجین[3] و دیوسجنین[4] را با استفاده از کشت‌بافت نسبت به حالت طبیعی استخراج از گیاه کامل به‌دست آورند. در تکنیک کشت بافت می‌توان به

1- Ennis aldehyde
2- Tissue culture
3- Vysnajyn
4- Dyvsjnyn

منظور تکثیر ژنوتیپ‌های خاص گیاهی بهره جست. این تکنولوژی به تکثیر کلونی، کلون‌سازی، و یا ریزازدیادی نیز موسوم است.

در بعضی از گونه‌ها می‌توان مستقیما از طریق اندام‌زایی[1] نمونه گیاهی که از بافت غیر مریستمی و نابجا (بازایی مستقیم) و یا به‌صورت غیرمستقیم از بافت کالوس[2]، گیاهان باززا (باززایی غیرمستقیم) تولید کرد (باززایی غیرمستقیم). در باززایی غیرمستقیم با تغییر نسبت هورمون‌ها می‌توان کالوس را به سمت شاخه-زایی یا جنین‌زایی سوماتیکی[3] هدایت نمود.

### ۱-۶- ۱- باززایی[4] از طریق جنین‌زایی سوماتیکی

جنین‌زایی سوماتیکی فرآیندی است که طی آن گروهی از سلول یا بافت‌های سوماتیکی به جنین تبدیل می‌شوند. یک جنین سوماتیکی از نظر فرآیند جنین‌زایی، شبیه یک جنین زیگوتی است. از جنین سوماتیکی به‌عنوان یک مدل سیستمی برای مطالعه جنین‌زایی زیگوتی استفاده شده است. جنین‌زایی سوماتیکی نظیر جنین‌زایی زیگوتی شامل مراحل ایجاد پیش جنین، جنین گویچه‌ای، جنین قلبی شکل، جنین اژدری و لپه‌ای می‌باشد، که از مسیری متفاوت نمو می‌یابند یعنی در این حالت بین دانه گرده و سلول تخم‌زا لقاح انجام نمی‌گیرد و در واقع تولید جنین های سوماتیکی رویدادی غیر جنسی است (سیمولا، ۲۰۰۰; تاری و همکاران ۲۰۰۴). بیشترین کاربرد جنین سوماتیکی تکثیر رویشی گیاهان در مقیاس کلان می‌باشد. در برخی از موارد جنین‌زایی سوماتیکی در مقایسه با سایر روش‌های تکثیر غیر جنسی برتری دارد، زیرا امکان تکثیر انبوه گیاهان را با استفاده از بیوراکتورها فراهم می‌کند. برای القای

1- Organogenesis
2- Callus
3- Somatic embryogenesis
4- Regeneration

جنین‌های سوماتیکی از سلول‌های گیاهی در طی جنین‌زایی باید ژن‌های خاصی در زمان و مکان مناسب در گیاه بیان شوند (کارکونین ۲۰۰۱).

### ۱-۶-۲- باززایی از طریق کالوس

کالوس توده‌ای سلولی کم و بیش سازمان نیافته، با دیواره سلولی نازک می‌باشد که معمولا " از سلول‌های پارانشیمی" بوجود آمده است. در طی تمایز مجدد به گیاه کامل، این سلول‌ها باید به انواع مختلفی از سلول‌ها تمایز یابند. این تمایز مجدد سلول‌ها به "تمایز سلولی[1]" معروف است. در شرایط *in vitro* و *in vivo*، تاکید اصلی در تمایز سلولی به تمایز بافت‌های آوندی (چوب و آبکش) به‌ویژه عناصر آوند چوب معطوف می‌باشد. رشد کالوس در یک گونه گیاهی بر اساس نوع ریزنمونه آن گیاه متفاوت است و علت آن به درستی مشخص نشده است (ماگیار و همکاران، ۲۰۱۰).

تولید کالوس، قابلیت باززایی کالوس و ریشه‌زایی گیاهچه به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم‌ترین آنها ژنوتیپ، ریزنمونه و شرایط فیزیولوژیک آن، نوع محیط‌کشت و عناصر غذایی، عوامل فیزیکی و شرایط محیطی از قبیل: نور، دما و pH، تنظیم‌کننده‌های رشد[2] و ویتامین‌ها می‌باشد. نتایج نشان داده است که وابستگی خاص القای کالوس و باززایی گیاه به ژنوتیپ اجتناب ناپذیر و کلی است و القای کالوس و باززایی گیاه با ژنوتیپ گیاه تغییر می‌کند (هان و همکاران، ۲۰۱۱).

میزان تنظیم کننده‌های خارجی و مواد مغذی موجود جهت القای کالوس به رقم گیاهی وابسته است. بنابراین ترکیبات محیط‌کشت وابسته به ژنوتیپ گیاهی تغییر می‌کند (هان و همکاران، ۲۰۱۱). قطعات میانی هر ریزنمونه تولید کالوس و باززایی بیشتری دارند چون احتمالا قطعات وسط دو لبه بریده دارند و زخمی شدن و قطعه قطعه شدن می‌تواند ظرفیت القای کالوس و در نتیجه باززایی را افزایش دهد (نی بایور

1- Cell differentiation
2- Growth regulators

و همکاران، ۲۰۰۸ ; مگیار- تابوری و همکاران، ۲۰۱۰). توانایی القای کالوس و باززایی با سن برگ نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد. معمولا برگ‌های جوان برای باززایی مناسب‌ترند (مگیار- تابوری و همکاران، ۲۰۱۰).

### ۱-۶-۳- ریزنمونه[1]

در کشت‌بافت گیاهی بیشتر اوقات برای شروع رشد ریزنمونه (قطعه جدا شده از بافت یا اندام تمایز یافته) در محیط کشت مصنوعی قرار داده می‌شود. سلول‌های غیر فعال، تمایز یافته و تقسیم نشده ریزنمونه، در حین رشد در محیط غذایی، ابتدا متحمل تغییراتی برای وارد شدن به حالت مریستمی می‌شوند. میزان موفقیت در انتخاب یک ریزنمونه خوب به عواملی چون سن گیاه پایه، سن فیزیولوژیکی ریزنمونه، مرحله‌ی نمو ریزنمونه و اندازه‌ی ریزنمونه بستگی دارد. در برخی از گونه‌ها مانند هویج و یونجه تمام اندام‌های گیاه قادر به تولید جنین می‌باشند که نشان دهنده‌ی پتانسیل بالای توانایی جنین‌زایی در این گیاهان است اما در اغلب گونه‌ها تولید جنین محدود به بافت‌های مشخصی از گیاه می‌شود (نیومان، ۲۰۰۶).

در میان بافت‌های مختلف گیاهی، شیبی از پاسخ به جنین‌زایی وجود دارد، به طوری که در بافت‌های با منشأ جنینی این پاسخ بیشتر است و به سمت لپه، هیپوکوتیل، برگ و ریشه کاهش می‌یابد (نیومان، ۲۰۰۶). در آزمایشات باززایی کشت بافت‌های جداکشت، معمولا استفاده از بخش‌های هوایی برای تولید شاخساره‌های نابجا رایج‌تر است و نتایج مطلوب‌تری نیز دارد، در این میان قطعات هیپوکوتیل به دلیل قابلیت رشد سریع و عدم تمایزیابی شدید به سمت اندام‌ها بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (دی‌اکسین و گنزالس، ۱۹۹۶). انتخاب ریزنمونه در مرحله رشدی مطلوب نقش اساسی در موفقیت‌آمیز بودن کشت‌بافت دارد. به‌طور کلی نوع ریزنمونه‌ها و نحوه‌ی قرارگیری آن‌ها در محیط کشت نقشی کلیدی در فرآیند تمایز

1- Explant

بازی می‌کنند (جونز و همکاران، ۲۰۰۷). جهت قرارگیری ریزنمونه‌ها فاکتور مهمی برای القای جنین‌زایی سوماتیکی از ریزنمونه‌های برگ و کوتیلدون است. تحقیقات نشان داد که تماس مستقیم سطح برگ از طرفی که پشت برگ روی محیط کشت باشد به طور معنی‌داری باعث افزایش تعداد جنین‌های سوماتیکی می‌شود (زوباید و سااکسینا، ۲۰۰۳).

### ۱-۷- اجزای محیط کشت بافت‌گیاهی

برای رشد بافت‌های گیاهی کشت شده، تأمین مداوم بعضی از ترکیبات شیمیایی معدنی در محیط کشت ضروری می‌باشد. هیچ‌گونه تضمینی وجود ندارد که یک محیط‌کشت[1] برای تمام ژنوتیپ‌ها مطلوب باشد. محیط‌کشت مورد نیاز جهت رشد کالوس نسبت به محیط‌کشت برای ایجاد و رشد ساقه باید دارای مواد معدنی با غلظت بیشتری باشد. در حالی‌که محیط‌کشت مورد نیاز جهت ایجاد و رشد ریشه فرق می‌کند. از طرف دیگر گونه‌هایی وجود دارد که در طیف وسیعی از محیط‌کشت‌ها به‌خوبی رشد می‌کنند. یعنی محیط‌کشت‌های مطلوب و مشخصی برای این‌ها وجود ندارد.

در برخی از گونه‌ها هر رقم دارای نیازهای غذایی مخصوص به خود است. کربن، هیدروژن، اکسیژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم، منیزیم و نیتروژن به مقادیر نسبتاً زیادی برای رشد و نمو بافت‌های گیاهی ضروری می‌باشد. نیتروژن که بیشتر از سایر عناصر مورد استفاده می‌باشد. به صورت نیترات یا یون آمونیاک و یا ترکیبی از آنها به محلول غذایی افزوده می‌شود. سولفات منیزیم نیاز محیط‌کشت به دو عنصر منیزیم و گوگرد را تأمین می‌کند. فسفر را می‌توان به صورت فسفات منوسدیک و یا فسفات منوپتاسیک به محیط‌کشت اضافه کرد. به منظور تأمین کلسیم می‌توان از کلرورکلسیم یا نیترات کلسیم استفاده نمود. اجزای محیط‌کشت

1- Medium

بافت شامل منابع قندی، ژله‌ای کننده و تنظیم کننده‌های رشدی است که در ادامه به اختصار معرفی می-گردند.

### ۱-۷-۱- منبع قندی

بیشتر گیاهان در کشت بافت به صورت اتوتروف رشد نمی‌کنند، یعنی کربن را از راه فتوسنتز جذب نمی-کنند. که عامل اصلی آن را به ناکافی بودن دی‌اکسیدکربن در کشت‌ها نسبت داده‌اند سلول‌ها و بافت‌های گیاهی مورد استفاده در کشت بافت، حتی اگر سبز و کلروفیل‌دار هم باشند به دلیل محدودیت در میزان نور و دی‌اکسیدکربن در شرایط کشت بافت اتوتروف یا خودکفا نیستند و با محدودیت منابع قندی مواجه هستند (باقری، ۱۳۸۱). منبع کربن معمول در محیط‌کشت ساکاروز یا گلوکز (۲-۵) درصد است.
فروکتوز نیز می‌تواند به‌عنوان منبع قندی کار رود، اما کارایی کمتری دارد. ساکاروز در محیط غذایی سریعا به گلوکز و فروکتوز تبدیل می‌شود. اول گلوکز و به دنبال آن فروکتوز مصرف می‌شود.

### ۱-۷-۲- عامل ژله کننده

آگار از رایج‌ترین عوامل تولید ژل است که در محیط‌کشت استفاده می‌شود. آگار متشکل از پلی‌ساکارید-هایی پیچیده است که از برخی گونه‌های نوعی جلبک دریایی به‌دست می‌آید. آگار طی مراحل ساخت درجات متفاوتی از خلوص را طی می‌کند ولی مقداری ناخالصی‌های آلی و معدنی در آن باقی می‌ماند.
محققان اغلب آگار را در غلظت‌های بین ۰/۵ و ۱ درصد به‌کار می‌برند. این مقدار آگار مصرفی تاثیر بسیاری بر عکس‌العمل برخی از کشت‌های گیاهی دارد. به‌طوری که ممکن است سبب شیشه‌ای شدن برخی از بافت‌های کشت شده شود (سید طباطبایی و همکاران، ۱۳۸۸).

غلظت مناسب آگار برای هر نوع محیط کشت باید تعیین شود. غلظت خیلی بالای آن منجر به تنش آب در بافت می‌شود و غلظت‌های کم آن یک لایه مایع روی سطح ژله تشکیل خواهد داد و غرق شدن ریزنمونه در مایع، مانع از مبادلات گازی و منجر به کاهش رشد می‌شود. ممانعت از رشد در غلظت بالای آگار احتمالاً مربوط به تجمع سریع فرآورده‌های زاید در سطح زیرین نمونه است و در محیط با غلظت کم آگار ممکن است به دلیل اینکه میزان انتشار مواد به اندازه کافی وجود داشته از بروز چنین حالتی جلوگیری شده باشد. انواع متداول آگار در دمای بیش از ۴۰ درجه سانتی‌گراد تشکیل ژل می‌دهند. تصور می‌شود آگار دارای توانایی جذب مواد است که این توانایی می‌تواند در حذف مواد زاید سلولی از محیط‌کشت به روشی مشابه زغال عمل نماید. همچنین این خاصیت می‌تواند مانع جذب برخی مواد شیمیایی به بافت کشت شده شود.

### ۱-۷-۳- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به پنج دسته اصلی به نام‌های اکسین‌ها[1]، جیبرلین‌ها[2]، سیتوکینین‌ها[3]، اسیدآبسیزیک[4] و اتیلن[5] طبقه‌بندی شده‌اند. هنگامی که تنظیم‌کننده‌های رشد توسط سلول‌ها جذب شدند در تقابل با تنظیم‌کننده‌های رشد ساخته شده در داخل سلول قرار خواهند گرفت. اگر سلول آماده باشد عکس‌العمل‌های رشد به‌دنبال خواهد آمد. برای دستیابی به واکنش مطلوب همیشه نیازی به تنظیم کننده‌های رشد خارجی نیست.

در برخی مواقع واکنش مناسب می‌تواند از طریق فراهم آمدن عوامل فیزیکی یا شیمیایی داخلی تحت تأثیر مدت، کیفیت و شدت نور و نیز عواملی محیطی شیمیایی نظیر عناصر غذایی کم مصرف یا پرمصرف ایجاد شود. بعلاوه فعال کردن یا نکردن مسیرهای متابولیسمی بیوسنتز اسیدهای آمینه و تنفس، سطح

1- Auxin
2- Gibberellin
3- Cytokinin
4- Abscisic acid
5- Ethylene

هورمون‌های داخلی را تغییر خواهد داد. بنابراین روش‌هایی که در این مسیرهای متابولیسمی مؤثر است بر رشد اثر گذار خواهد بود و درنتیجه تنظیم رشد و ریخت‌زایی توسط عواملی غیر از افزودن تنظیم کننده-های رشد به محیط کشت، شایسته توجه است. میزان تنظیم‌کننده‌های خارجی به شدت به ژنوتیپ و مقدار هورمون داخلی گیاه بستگی دارد (باسکاران، ۱۹۹۰). باید دانست اضافه کردن هورمون به محیط کشت بستگی به نوع ریزنمونه و گونه گیاهی دارد. به‌عنوان مثالریزنمونه‌هایی که خود اکسین کافی تولید می‌کنند، به اکسین اضافی برای رشد و تقسیم سلولی نیاز ندارند.

**۱-۷-۳-۱- اکسین**

به‌طور کلی اکسین در آغازه‌های برگ، برگ‌های جوان و همچنین در بذرهای رشد یافته ساخته می شود و از سلولی به سلول دیگر منتقل می‌شود. انتقال اکسین به ریشه ممکن است آوند چوبی را نیز درگیرکند. ویژگی عمومی اکسین‌ها، القای تقسیم سلول و تشکیل کالوس است. اکسین موجب تقسیم سلول، طویل شدن سلول، تورم بافت‌ها و القای ریشه‌های نابجا می‌شود. اکسین غالبا از شکل‌گیری ساقه‌های نابجا و جانبی ممانعت می‌کند. در غلظت‌های پایین اکسین، تشکیل ریشه‌های نابجا غلبه می‌یابد. در حالی‌که در غلظت‌های بالای اکسین، ریشه تشکیل نمی‌شود و کالوس تشکیل می‌شود (فارسی، ۱۳۸۸).

غلظت بهینه اکسین‌ها نسبت به همدیگر برای قطعات ریزنمونه یک گونه و همچنین از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است. بررسی‌ها نشان می‌دهد حذف اکسین از محیط کشت پیش نیاز خاموشی چند ژن و یا سنتز محصولات جدید ژنی می باشد که برای نمو جنین لازم است (شینویاما و همکاران، ۲۰۰۴). نفتالین-استیک اسید[1] و ایندول‌بوتیریک‌اسید[2] ازجمله اکسین‌های مصنوعی می‌باشند که در ریشه‌زایی تاثیر بسزایی دارند همچنین نفتالین‌استیک‌اسید در ترکیب با هورمون گیاهی دیگری بنام جیبرلین نقش موثری

1-α-Naphthalene acetic acid
2-Indole-3 butyric acid

در شکل گیری فیبرسلولز بر عهده دارد (ناوالون و همکاران، ۱۹۹۷). ایندول‌بوتیریک‌اسید با انتقال قطبی در گیاه در گیاه حرکت می‌کند و گیاه آن را برای تنظیم ریشه دهی خود ذخیره می‌کند (اپستین و همکاران، ۱۹۹۳).

**۱-۷-۳-۲- سیتوکینین**

سیتوکینین‌ها از مشتقات آدنین است و نقش مهمی در القای ساقه‌دهی دارند و غالبا برای تحریک رشد و نمو به‌کار می‌روند (فارسی، ۱۳۸۸). ایزوپنتیل‌آدنین ، ۶- فورفوریل آدنین که کینتین[1] نیز نامیده می‌شود و بنزیل‌آدنین از سیتوکینین‌های متداول محیط کشت‌بافت گیاهی هستند. زآتین با اعمال تغییراتی در نوع و غلظت نسبی سیتوکینین‌ها در محیط کشت، امکان القای رشدهای تمایز نیافته و یا ریخت‌زایی را فراهم می‌کند (ارچانا و همکاران، ۲۰۰۲). سیتوکینین به ویژه در تحریک سنتز پروتئین و کنترل چرخه سلولی مشارکت دارد. اثر سیتوکنین در کشت‌بافت اغلب همراه با اکسین، برای تحریک تقسیم سلولی و کنترل مورفوژنز قابل‌توجه است. سیتوکینین‌ها باعث تسریع تقسیم سلولی، تشکیل اندام‌هوایی و ریخت‌زایی می‌شوند (باقری و آزادی، ۱۳۸۱). سیتوکینین‌ها در واقع تشکیل سلول‌های جنین‌زا را تحریک می‌کنند (نیشیواکی و همکاران، ۲۰۰۰; پاسترناک و همکاران، ۲۰۰۲; لکدا و همکاران، ۲۰۰۳). یکی از سیتوکینین‌هایی که امروزه مورد توجه قرار گرفته تیدیازرون[2] می‌باشد. این هورمون اثراتی شبیه اکسین و سیتوکینین نشان می‌دهد ولی طرز فعالیت این هورمون هنوز ناشناخته است (عباسی و همکاران، ۲۰۰۷). بنزیل‌آمینوپورین[3] سیتوکنین مصنوعی است که از طریق تقسیم سلولی باعث رشد گیاه می‌شود همچنین این هورمون مهار کننده کیناز تنفسی در گیاهان است ( سیدیکیوی و همکاران،۲۰۱۱).

1-Kinetin
2-Thidiazuron
3-Benzyl amino purin

### pH -۸-۱

pH برجنبه‌های بسیار مهمی از ساختمان و فعالیت ماکرومولکول‌های بیولوژیکی تاثیر می‌گذارد. pH محیط‌کشت معمولا در محدوده‌ی ۵/۶ تا ۵/۸ می‌باشد. pH بالاتر از ۷ و پایین‌تر از ۴/۵ رشد و نمو را متوقف می‌سازد. pH محیط‌کشت قبل از اتوکلاو کردن و بعد از آن متفاوت است و معمولا بعد از اتوکلاو کردن ۰/۳ تا ۰/۵واحد کاهش می‌یابد (اسکیروین و همکاران، ۱۹۸۶). اگر pH در طی روند کشت‌بافت گیاهی به نحو محسوسی افت نماید، محیط‌کشت به حالت مایع درمی‌آید و باید محیط جدیدی تهیه شود. باید در نظر داشت که pH بالاتر از۶ موجب سفت شدن محیط‌کشت می‌شود و pH پایین‌تر از ۵ از منعقد شدن مطلوب آگار ممانعت می‌کند.

# فصل دوم

# مروری بر منابع

تیلور و همکاران (۱۹۹۱) با مطالعه بر روی دو جمعیت از گیاه رازیانه در محیط موراشیگ و اسکوگ حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی[1] و ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر کینتین موفق به کالوس‌زایی شدند. که در این آزمایش تنها جمعیت جمع‌آوری شده از Francia pernod توانایی جنین‌زایی سوماتیکی را نشان داد، که دلیل این عدم پاسخ‌گویی اختلاف ژنوتیپی گزارش شد. در این آزمایش کالوس‌های غیرجنینی ۱۲ ماه در محیط توفوردی که کالوس‌های ثانویه با خاصیت جنین‌زایی تولید و به محیط موراشیگ و اسکوگ جامد و مایع فاقد توفوردی منتقل شدند و باززایی انجام شد.

در تحقیق دیگری کالوس‌های جنینی ثانویه رازیانه در محیط موراشیگ و اسکوگ دارای ۰/۸۸توفوردی و ۲/۳ میکرومول کینتین قرار داده شدند و سپس به محیط با ترکیب ۳/۳ میکرومول جیبرلین انتقال داده-شدند، که رشد این جنین‌های سوماتیکی افزایش یافت (هنایولت و ماتر، ۱۹۹۵).

آنزیدی و همکاران (۱۹۹۶) با مطالعه روی چندین جمعیت رازیانه از مناطق Borntraeger (آلمان)، Aboca erba (ترکیه)، Sedaherb (فرانسه)، Francia pernod (فرانسه)، Antella و Scafat (ایتالیا) اعلام کردند که تنها جمعیت‌های Francia pernod و Aboca erba تحت شرایط موراشیگ و اسکوک حاوی توفوردی (2,4-D) و کینتین به کالوس دست یافتند. ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در محیط کشت حاوی توفوردی (۸ میکرومولار 2,4-D)، نفتالین‌استیک‌اسید (۲/۶ میکرومولار NAA) و محیط دارای کینتین (۲/۳ میکرومولار) ۱۰۰ درصد، کالوس ایجاد کرد. کالوس‌های رشدیافته در محیط دارای نفتالین‌استیک-اسید و کینتین، شاخه‌زایی نمودند. ولی کالوس‌های رشد یافته در محیط دارای توفوردی، اندام‌زایی نشان ندادند. پس از انتقال شاخه‌های باززایی شده به محیط موراشیگ و اسکوگ نصف غلظت مایع فاقد هورمون، گیاه کامل باززایی شد. در این گیاه حضور بنزیل‌آدنین همراه با نفتالین‌استیک‌اسید شاخه‌زایی را

1- 2,4_Dichlorophenoxy acetic acid

کاهش ولی کالوس‌زایی را افزایش داد. در این مطالعه ریزنمونه هیپوکوتیل به عنوان ریزنمونه موفق در کالزایی معرفی شده است.

آنزیدی و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از ریزنمونه هیپوکوتیل رازیانه به بررسی اندام‌زایی این گیاه پرداختند و سطوح مختلفی از هورمون نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) به همراه کینتین یا بنزیل‌آدنین (BA) را بررسی نمودند. بیشترین باززایی در محیط با نسبت۱:۱ کینتین و نفتالین‌استیک‌اسید بعد از ۹ ماه گزارش شد. همچنین ریزنمونه هیپوکوتیل به عنوان ریز نمونه موفق در کالوس‌زایی شناخته شد

و افزایش زمان در کشت، میزان باززایی را افزایش داد.

بنیسی و همکاران (۲۰۰۴) پایداری ژنتیکی و یکنواختی گیاه رازیانه را در جمعیت Francia pernod بررسی نموده و بر اساس این مطالعه کروموزم‌های دیپلوئیدی نرمالی برای کالوس‌هایی با مورفولوژی متفاوت و باززایی گیاه از مسیرهای جنین‌زایی مستقیم و غیرمستقیم گزارش دادند. و با استفاده از مارکر RAPD پلی‌مورفیسم گیاهان باززا شده بررسی شد. که در این مورد هیچ‌گونه پلی‌مورفیسمی گزارش نشد.

در تحقیق دیگری سرخیل و همکاران (۱۳۸۸) موفق به القای کالوس با کشت ریزنمونه‌های برگ، هیپوکوتیل، مریستم انتهایی، ریشه و طوقه درگیاه رازیانه روی محیط پایه موراشیگ و اسکوگ با ۹ تیمار هورمونی شامل هورمون توفوردی با غلظت‌های ۲ ،۴ و ۸ میلی‌گرم در لیتر و بنزیل‌آمینوپورین با غلظت-های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر شدند. هورمون‌های توفوردی به میزان ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر و بنزیل‌آمینوپورین به میزان ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بهترین ترکیب‌های هورمونی و نیز هیپوکوتیل و مریستم انتهایی بهترین ریز نمونه‌ها شناخته شدند. ریزنمونه برگ به علت عدم پاسخ در مرحله کالوس-زایی حذف شد. ریزنمونه برگ در محیط‌کشت موراشیگ و اسکوگ نصف غلظت تنها به رشد ادامه می‌داد و هیچ‌گونه تحریک‌پذیری نسبت به کالوس‌زایی نشان‌نداد. در مرحله باززایی کالوس، محیط موراشیگ و اسکوگ نصف غلظت با ۹ ترکیب هورمونی ذکرشده به همراه توفوردی با غلظت ۰/۲میلی‌گرم در لیتر و

بنزیل‌آمینوپورین با غلظت‌های ۰/۵، ۲، ۴، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر و تیدیازرون ۱۵ و ۲۰ میکرولیتر و محیط موراشیگ و اسکوگ نصف غلظت بدون هورمون در نظر گرفته شد که محیط موراشیگ و اسکوگ نصف غلظت بدون هورمون بهترین محیط برای باززایی شناخته شد.

کارگر و همکاران (۱۳۹۰) اثر هورمون‌های توفوردی در ۴ سطح ۰، ۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم در لیتر و کینتین در ۴ سطح ۰، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بر کالوس‌زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی سه ریزنمونه ریشه، محور زیر لپه و برگ لپه‌ای گیاه رازیانه را بررسی کردند. نتایج این آزمایش نشان داد که بهترین ریزنمونه از لحاظ کالوس‌زایی ریشه و بیشترین طول شاخساره از ریزنمونه ساقه به‌دست آمد. بیشترین وزن کالوس از تیمار با غلظت هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر توفوردی به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین با استفاده از ریزنمونه‌ی ریشه و بالاترین میزان طول شاخساره از ریزنمونه‌ی ساقه با تیمار هورمونی صفر میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و بالاترین میزان طول ریشه، از ریزنمونه ساقه بدون تیمار هورمونی و همچنین ریزنمونه ریشه با تیمار هورمونی صفر میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۰/۱ گرم در لیتر کینتین حاصل شد.

در آزمایش دیگری که توسط ماریا و همکارانش (۲۰۱۲) به منظور مطالعه اثر ترکیبات مختلف هورمونی اکسین و سیتوکنین در القای جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی گیاه از دانه چهار اکوتیپ مختلف رازیانه شامل FD11, FD12, FD19, FOE 29 انجام شد. در این آزمایش همچنین، تجزیه و تحلیل[1] RAPD به منظور بررسی تغییرات ژنتیکی در سطح DNA از گیاهان، به‌دست آمده از جنین‌های سوماتیکی انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل سه ریزنمونه لپه، هیپوکوتیل و گل‌های نابالغ و سه محیط $T_5$, $T_4$, $T_{16}$ به همراه هورمون‌های بنزیل‌آمینوپورین، نفتالین‌استیک‌اسید، تیدیازرون و توفوردی بررسی شد. اثر قابل توجه محیط و اکوتیپ در کالوس، پس از ۲ ماه در شرایط آزمایشگاهی، مشاهده شد. تفاوت معنی‌داری در

1-Random Amplified Polymorphic DNA

تشکیل کالوس جنینی بین محیط‌های $T_5$ و $T_{16}$ ثبت شد. تاثیر منفی توفوردی در تولید شبه جنینی در رازیانه که قبلا توسط هنایولت گزارش شد، در این آزمایش نیز تایید شد.

در تحقیقی دیگر باقری و همکاران (۱۳۹۲) القای کالوس، باززایی و ریشه‌زایی ریزنمونه‌های مختلف زیره سیاه ایرانی (خانواده چتریان) شامل گره‌لپه‌ای، هیپوکوتیل و ریشه چه را در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ حاوی غلظت‌های متفاوت از تنظیم‌کننده‌های رشد ایندول‌استیک‌اسید[1] در دو سطح صفر و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، نفتالین‌استیک‌اسید و بنزیل‌آمینوپورین هر یک در سه سطح صفر، ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر را بررسی کردند. با کشت ریزنمونه‌ها در تیمارهای مختلف محیط‌کشت، فراوانی کالوس‌زایی، ریشه-زایی و باززایی از ریزنمونه ریشه‌چه افزایش معنی‌داری داشت. تنظیم‌کننده‌های رشدی نفتالین‌استیک‌اسید و بنزیل‌آمینوپورین بر القای‌کالوس و تداوم رشد آن مؤثر بودند. بیشترین فراوانی کالوس‌دهی و وزن خشک توده‌ی کالوس در غلظت‌های ۰/۵ یا یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین و نفتالین‌استیک‌اسید مشاهده شد. فراوانی ریشه‌زایی غالباً متأثر از تنظیم‌کننده رشد نفتالین‌استیک‌اسید با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر بود. همچنین ایندول‌استیک‌اسید در باززایی مستقیم موثر شناخته شد و باززایی ساقه از هر سه ریزنمونه گره لپه‌ای، هیپوکوتیل و ریشه‌چه مشاهده شد (باقری و همکاران، ۱۳۹۲).

آزا و همکاران (۲۰۰۱) گزارش دادند در زیره سبز بهترین پاسخ به شاخه‌زایی از ریزنمونه قطعات میان-گرهی ساقه در محیط‌کشت موراشیگ و اسکوگ دارای ۲/۵ میکرومول بنزیل‌آدنین مشاهده شد (آزا و همکاران، ۲۰۰۱). ابراهیمی و همکاران (۲۰۰۳) از محور جنینی (جنین برش یافته) در کشت‌بافت زیره سبز (خانواده چتریان) استفاده کردند و در زمان کوتاه و بدون هیچ‌گونه واکنشی، به باززایی مناسب دست یافتند. بهترین محیط کشت، $B_5$ با ترکیب ۰/۲ میلی‌گرم درلیتر نفتالین‌استیک‌اسید و یک میلی‌گرم در

1- Indole acetic acid

لیتر بنزیل‌آمینوپورین و یا ترکیب ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین بود.

در تحقیق دیگری که توسط ولی‌زاده و همکارانش (۱۳۸۷) انجام شده است. برای اولین‌بار از ریزنمونه جنین برش‌خورده برای باززایی زیره پارسی استفاده شد. در این روش به دلیل جوان بودن ریزنمونه و عکس‌العمل مناسب به محیط‌کشت، کالوس‌دهی و باززایی به میزان نسبتا بالایی فقط در یک نوع محیط-کشت و بدون نیاز به هیچ‌گونه واکشتی انجام شد، که منجر به کوتاه‌شدن زمان کشت‌بافت و کم‌شدن آلودگی و نیاز به مواد مصرفی شد. همچنین، محیط‌کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی غلظت‌های مختلف نفتالن‌استیک‌اسید و توفوردی به تنهایی یا همراه با کینتین مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش با ۳۰ تیمار مختلف انجام شد. در تعدادی از تیمارهای فاقد کینیتین نیز باززایی انجام شد که نشان داد، برای باززایی زیره پارسی وجود هورمون سیتوکینین الزامی نیست. بهترین تیمار از نظر میانگین تعداد ساقه باززایی شده، تیمار با تر کیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید و ۲ میلی‌گرم در کینتین بود. بهترین تیمار از نظر القای جنین تیمار با ترکیب هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید و ۰/۵ میلی-گرم در لیتر کینتین بود.

شایلدرا و همکارانش (۲۰۱۱) با استفاده از ریزنمونه هیپوکوتیل و هورمون‌های بنزیل‌آمینوپورین و کینتین (به‌عنوان سیتوکنین) و هورمون‌های نفتالین‌استیک‌اسید و ایندول‌استیک‌اسید (به‌عنوان اکسین) به بررسی اندام‌زایی انیسون ( خانواده چتریان) پرداختند. نتایج نشان داد که بیشترین میزان باززایی از ریزنمونه هیپوکوتیل بدست آمده از گیاهچه‌های کشت شده در شرایط آزمایشگاهی حاصل شده است. نقش هورمون بنزیل‌آمینوپورین در شاخه‌زایی موثرتر از کینتین بوده است. بالاترین میزان شاخه‌زایی (۴۵ شاخه در یک ریزنمونه) در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین بدست‌آمده است. اثر متقابل بین هورمون‌های سیتوکنین و اکسین طول شاخه‌های باززا شده را افزایش داد.

در تحقیقی که توسط ضیائی فرد و میان آبادی (۱۳۹۰) بر روی گیاه دارویی جاشیر (خانواده چتریان) صورت گرفت. اثر ترکیبات مختلف هورمون‌های توفوردی و کینتین و غلظت‌های مختلف نفتالن‌استیک‌اسید و بنزیل‌آمینوپورین روی باززایی ساقه و گیاه کامل از قطعات جداکشت هیپوکوتیل جاشیر مورد بررسی قرار گرفت. به منظور القای کالوس‌زایی، ریز نمونه ریشه‌چه، محور زیر لپه، محل اتصال محور زیر لپه به ریشه‌چه (یقه) و برگ‌های لپه‌ای به محیط‌کشت موراشیگ و اسکوگ دارای حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم کننده-های رشد شامل کینتین به تنهایی با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر، کینتین همراه با توفوردی (کینتین با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و توفوردی با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و همچنین بنزیل‌آمینوپورین و نفتالین‌استیک‌اسید هرکدام به تنهایی در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر و به‌صورت ترکیبی از غلظت‌های ۰/۲ و یک میلی‌گرم بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۸ و یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید برده شد. محیط دارای یک میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۵میلی‌گرم در لیتر توفوردی بهترین تیمار برای باززایی ساقه بود. ساقه‌های باززا شده، در محیط پایه فاقد هورمون ریشه‌زایی نمودند. با توجه به این‌که، کینتین یک هورمون سیتوکینینی است و ساقه‌زایی جاشیر نیاز به فاکتورهای تنظیم کننده رشد خارجی دارد، بنابراین نسبت خاصی از سیتوکینین به اکسین برای ساقه‌زایی آن ضروری به نظر می‌رسد.

در تحقیقی که توسط قاسمیان و همکاران (۱۳۹۱) به منظور بررسی و تایید بافت شناختی مراحل جنین‌زایی سوماتیکی گیاه وشا (*Dorema ammoniacum*) از خانواده چتریان انجام گرفت، بذرها به دو صورت مورد استفاده قرار گرفتند. در گروه اول بذرها مستقیما جهت جوانه‌زنی به پتری‌دیش حاوی محیط ۱/۴ موراشیگ و اسکوگ منتقل شدند و ریزنمونه‌های حاصل از گیاهچه‌های فوق جهت بررسی تولید کالوس مورد استفاده قرار گرفتند. در گروه دوم برای تولید مستقیم کالوس از رویان بذری، تعدادی از بذرها پس از ضدعفونی سطحی، در آب مقطر استریل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. از قسمت‌های

مختلف (ریشه‌چه، هیپوکوتیل و کوتیلدون) گیاهچه‌های حاصله و همچنین از جنین‌های بذری خارج شده از بذرها، به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. ریزنمونه‌ها بر روی محیط پایه موراشیگ و اسکوگ حاوی هورمون-های نفتالین‌استیک‌اسید با غلظت‌های صفر تا ۲ میلی‌گرم در لیتر و بنزیل‌آدنین با غلظت‌های صفر تا ۴ میلی‌گرم در لیتر کشت داده شدند. از میان ریزنمونه‌های مختلف مورد بررسی، جنین‌های بذری موفق به تشکیل کالوس‌های جنین‌زا شدند. هورمون اکسین به طور موثر میزان جنین‌زایی را افزایش داده و بیشترین میزان تولید کالوس های جنین‌زا مربوط به محیط موراشیگ و اسکوگ حاوی ۱ میلی‌گرم بر نفتالین-استیک‌اسید و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین بوده است (قاسمیان و همکاران، ۱۳۹۱).

اطروشی و همکاران (۲۰۱۳) اثر برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در جنین‌زایی سوماتیکی باریجه در شرایط کشت‌بافت، از طریق جنین‌زایی غیرمستقیم بررسی نمودند. جنین‌زایی ریزنمونه‌های حاصل از ریشه، هیپوکوتیل و جنینی (برگ) بر روی محیط موراشیگ و اسکوگ حاوی غلظت‌های هورمونی توفوردی و نفتالین‌استیک‌اسید (هر یک با ۶ سطح غلظت ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴ میلی‌گرم در لیتر ) و کینتین (در سه سطح با غلظت ۰، ۰/۲، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بررسی شد. بهترین جنین‌زایی سوماتیکی غیر مستقیم در محیط با تیمارهای هورمونی ۲ میلی‌گرم درلیتر توفوردی و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل-آمینوپورین و یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین با جداکشت ریشه بالاترین جنین غیر مستقیم به دست آمد. همچنین بالاترین درصد کالوس‌زایی در محیط موراشیگ و اسکوگ حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۴ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید یا ۲ میلی‌گرم در لیتر توفوردی در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین بدست آمده است (اطرشی و همکاران، ۲۰۱۳).

در تحقیقی که به منظـور بررسـی تأثیر دو هورمون اکسین و سیتوکنین برای ایجاد اندام‌زایی دو ریزنمونه مریستم انتهایی و نمونه برگی از گیاه آنغوزه (خانواده چتریان) در شرایط کشت بافـت با چهار

سطح اکسین و چهـار سـطح سـیتوکنین و دو نـوع ریزنمونـه انجـام گرفـت. سطوح مختلف دو هورمون شامل غلظت‌های ۰، ۰،۱/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر از دو هورمون اکسین و سیتوکینین بود. نتایج نشان داد که تیمار پیشنهادی برای طول و وزن اندام هوایی ۱ میلی‌گرم بر لیتر، اکسین و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتـر سـیتوکنین مـی‌باشـد. ریزنمونه برگی بیشترین طول شاخساره را داشت و ریزنمونـه مریسـتمی بیشـترین وزن شاخساره را دارا بود (سنچولی و همکاران، ۱۳۹۱).

در آزمایشی دیگر که توسط خطیب‌زاد و همکارانش در سال ۱۳۸۸ به منظور بررسی تاثیر نوع ریزنمونه، ترکیب محیط‌کشت و نوع هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد بر کالوس‌زایی انجدان رومی (خانواده چتریان) انجام گرفت، ریزنمونه‌های ریشه، برگ، دمبرگ و گره طوقه در محیط موراشیگ و اسکوگ با سطوح مختلف هورمونی مورد بررسی قرار گرفته شد. نتایج نشان داد که حداکثر میزان رشد و کیفیت کالوس با استفاده از ریزنمونه ریشه، در محیط با ترکیب هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۰۲۵ میکرولیتر نفتالین‌استیک‌اسید بود. ترکیب هورمونی مناسب برای القای کالوس در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ ۰/۰۲۵میکرولیتر نفتالین‌استیک‌اسید در ترکیب با ۰/۲۵ میکرولیتر کینتین و ۱/۵ میکرولیتر توفوردی و برای ریزنمونه گره ۰/۰۲۵ میکرولیتر نفتالین‌استیک‌اسید در ترکیب با ۰/۵ میکرولیترکینتین و یک میکرولیتر توفوردی بود (خطیب‌زاده و همکاران، ۱۳۸۸). در تحقیقی دیگر ووتی پارک و همکاران (۲۰۱۰) جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی دو ریزنمونه برگ و ساقه انجدان رومی را در محیط حاوی غلظت‌های ۰/۰،۱، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون توفوردی بررسی نمودند. ریزنمونه ساقه برای القای هر دو کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی نسبت به ریزنمونه برگ، ریزنمونه مناسب‌تری بود و با این وجود هر دو ریزنمونه در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر توفوردی حداکثر تولید کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی را داشتند (ووتی پارک، ۲۰۱۰).

جانا و شخاوات (۲۰۱۱) با تحقیقی که بر روی گیاه شوید (خانواده چتریان ) انجام دادند. قطعات گرهی بر روی محیط پایه موراشیگ و اسکوگ همراه با اکسین و سیتوکنین‌های مختلف به تنهایی و همچنین در ترکیب با هم کشت شدند.کالوس‌های مطلوب (۹۳/۳۳ درصد) در محیط کشت حاوی ۲/۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین و ۰/۲۱میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید به‌دست آمد. کالوس‌ها در محیط کشت موشیگ و اسکوگ حاوی ۲/۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین و ۱/۸۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین واکشت شد. بیشترین باززایی (۸۵/۷ درصد) با ۱۲/۸۶ شاخساره در هر ریزنمونه بعد از دو هفته به دست آمد. متوسط طول شاخه‌های باززا شده ۳/۱۵ تا ۴/۸ بود. بیشترین میزان ریشه‌زایی (حدود ۱۰۰ درصد) و با طول ریشه ۵/۱ سانتیمتر از گیاهچه‌های کشت شده بر روی محیط۱/۴ موراشیگ و اسکوگ حاوی ۴/۹ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک‌اسید مشاهده شد. در گیاهان عادت‌داده شده به هوای بیرون به میزان ۶۰ درصد موفقیت در زنده ماندن گیاه مشاهده شد (جانا و شخاوات، ۲۰۱۱).

در تحقیقی که به منظور بررسی تمایز ریشه و تجمع اسانس ارچن‌گلیکا[1]در شرایط آزمایشگاهی گیاه سنبل‌ختایی (خانواده چتریان) توسط گابریلا و همکارانش انجام گرفت. باززایی ریشه از دو ریزنمونه ساقه و برگ با هورمون‌های اکسین از قبیل ایندول‌استیک‌اسید، ایندول‌بوتیریک‌اسید و نفتالین‌استیک‌اسید بررسی شد. هر دو ریزنمونه با تیمار هورمونی ایندول‌بوتیریک‌اسید بالاترین درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه در هر ریزنمونه را نشان دادند و به طور مستقل از تیمار هورمونی ریزنمونه ساقه بیشترین میزان ریشه‌زایی را داشت (گابریلا و همکاران، ۲۰۰۱).

در تحقیق دیگر که به‌منظور بررسی اثر اکسین بر رشد و تجمع اسکوپولتین[2] در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه سنبل ختایی انجام گرفت اثر ۴ اکسین توفوردی، نفتالین‌استیک‌اسید، ایندول‌استیک‌اسید و ایندول-بوتیریک‌اسید در ۴ غلظت ۰/۲، ۲، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر بر روی رشد سوسپانسیون سلولی و تجمع

1- Archangelica
2- Scopoletin

اسکوپولتین در شرایط نور و تاریکی بررسی شد. بیشترین میزان رشد از تیمار با ۲ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ایندول‌استیک‌اسید به‌دست آمد. بهترین سطح اسکوپولتین با ۰/۲ و ۲ میلی‌گرم در لیتر توفوردی، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر ایندول‌استیک‌اسید به دست آمد (سی‌تکا و کاسپارووا، ۲۰۰۸).

موافقی و همکاران (۱۳۸۶) تاثیر دو نوع هورمون نفتالین‌استیک‌اسید و بنزیل‌آمینوپورین در تولید شاخساره و ریشه بر روی قطعات جداکشت هیپوکوتیل گیاه دارویی کور در آزمایشگاه بررسی شد. در محیط‌کشت موراشیگ و اسکوگ حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیترنفتالین‌استیک‌اسید و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین بیشترین تولید مستقیم شاخساره مشاهده شد. افزایش مقدار نفتالین‌استیک‌اسید تولید شاخساره را مهار نمود و باعث تولید کالوس گردید. ریشه‌زایی قطعات جداکشت در محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید بهینه بود. بنابراین شاخساره‌های تشکیل شده، از هم جدا و به این محیط انتقال یافت. پس از ۴ هفته ریشه‌های قابل مشاهده بود.

زوباید و سااکسینا (۲۰۰۳) ، ریزنمونه‌های کوتیلدون، برگ و ریشه گیاه سرخارگل به منظور باززایی غیرمستقیم به محیط موراشیگ و اسکوگ حاوی هورمون‌های بنزیل‌آمینوپورین (۰ تا ۵۰ میکرومول بر لیتر)، ایندول‌بوتیریک‌اسید (۰تا ۲/۵ میکرومول برلیتر)، تیدیازرون (۰تا ۱۰ میکرومول بر لیتر) و ایندول-استیک‌اسید (۰تا ۲۵/ میکرومول بر لیتر) انتقال داده شدند. در این آزمایش محیط مناسب برای القای جنین‌های سوماتیکی حاوی ۵ میکرومول برلیتر بنزیل‌آمینوپورین همراه با ۲/۵ میکرومول بر لیتر ایندول-بوتیریک‌اسید با میانگین ۸۳ جنین در ریزنمونه برگ و ۱۶ جنین در کوتیلدون و ریشه بعد از ۲۸ روز بود. از طرفی سیتوکنین‌های دیگر مثل تیدیازرون به طور معنی‌داری جنین‌های سوماتیکی را در ریزنمونه‌های برگ کاهش دادند و توسعه‌ی جنین وقتی که تیدیازرون همراه با نفتالین‌استیک‌اسید بود به تاخیر افتاد. در تحقیقی دیگر که توسط کوروچ و همکاران ۲۰۰۲ انجام شد. فقط غلظت‌های پایین‌تر بنزیل‌آمینوپورین

(۰/۴۴ تا ۸/۸۸ میکرومولار) ساقه‌ی نابجا بعد از ۴ هفته تشکیل دادند و غلظت‌های ۱۷/۷۶ و ۳۱/۸ میکرومولار بنزیل‌آمینوپورین مانع تشکیل ساقه شدند. همچنین ترکیب بنزیل‌آمینوپورین (۴/۴۴ میکرومولار) و نفتالین‌استیک‌اسید (۵۴/ میکرومولار) ۱۰۰درصد شاخه‌زایی با تعداد زیادی شاخساره از هر ریزنمونه تولید کردند. همچنین افزایش هورمون نفتالین‌استیک‌اسید باعث تشکیل کالوس و کمترشدن القای شاخه‌زایی شد. ترکیب مقدار بالای نفتالین‌استیک‌اسید و مقدار پایین بنزیل‌آمینوپورین باعث القای تشکیل شاخساره و بعضی ریشه‌های جانبی گردید. ریزنمونه‌های رشد کرده روی محیط حاوی سطوح بالای بنزیل‌آمینوپورین به‌تنهایی یا در ترکیب با نفتالین‌استیک‌اسید دارای باززایی به آهستگی یا بدون باززایی بودند و کالوس‌های مشاهده شده با غلظت بالای بنزیل‌آمینوپورین و نفتالین‌استیک‌اسید قهوه‌ای و نکروز شدند و اثرات سمی نشان دادند (کوروچ و همکاران، ۲۰۰۲). در تحقیقی دیگر کشت ریزنمونه‌های دمبرگ، دمبرگچه و برگچه گیاه دارویی همیشه بهار (خانواده آستراسه) روی محیط‌کشت دارای ۲ میلی-گرم در لیتر کینتین و محیط دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک‌اسید و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین، بعد از ۴ هفته قادر به باززایی مستقیم شاخه (بدون تولید کالوس) بودند. شاخه‌های تولید شده در محیط دارای ۰/۵میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین، پس از ۴ هفته در محیط مشابه کالوس‌زایی نمودند و کالوس‌ها سپس شاخه‌زایی داشتند (نوکواندا و همکاران، ۲۰۰۵).

# فصل سوم

# مواد و روش‌ها

### ۳-۱- مواد گیاهی

در این تحقیق از ژنوتیپ سبزوار بذرهای رازیانه که از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید، استفاده شد.

### ۳-۲- مواد شیمیایی

تمامی هورمون‌های مورد استفاده در این پایان‌نامه از شرکت Duchefa (هلند) و همچنین عناصر ماکرو و میکرو مورد استفاده در محیط‌کشت MS و نیز ساکارز و آگار از نمایندگی شرکت Merck (آلمان) در ایران تهیه شد.

### ۳-۳- تهیه محیط کشت

برای تهیه محیط‌کشت، ابتدا محلول‌های پایه ترکیبات مورد استفاده در محیط‌کشت به‌صورت جداگانه تهیه شد. محیط‌کشت مورد استفاده در این تحقیق محیط‌کشت پایه MS (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹۶۲) بود. این محیط شامل عناصر کم‌مصرف[1]، پرمصرف[2]، آهن و ویتامین است. این محیط‌کشت ابتدا به‌صورت محلول‌های مادری[3] تهیه می‌شود و در هنگام نیاز با هم مخلوط و به حجم رسانیده می‌شود. برای تهیه محلول‌مادری عناصر کم‌مصرف به صورت ۱۰۰ برابر غلظت نهایی برای یک لیتر محیط کشت، محلول-مادری عناصر غذایی پرمصرف به‌صورت ۱۰ برابر غلظت نهایی یک لیتر محیط‌کشت، محلول پایه ویتامین-ها به‌صورت ۱۰۰ برابر غلظت نهایی یک لیتر محیط‌کشت و محلول پایه آهن به‌صورت ۱۰ برابر غلظت نهایی یک لیتر محیط‌کشت تهیه گردید. به دلیل حساسیت آهن به نور این محلول در شیشه‌های دودی رنگ نگهداری شد. هنگام حل نمودن مواد مغذی در آب، ترکیبات باید مرحله به مرحله اضافه تا از ته نشین شدن مواد جلوگیری شود.

1- Micronutrients
2- Macronutrients
3-Stoke solution

### ۳-۳-۱- محلول مادری مواد غذایی پر مصرف با غلظت × ۱۰

نمک‌های پرمصرف در غلظت ۱۰ برابر نسبت به غلظت‌های نهایی خود تهیه شدند. ابتدا مقدار هر نمک را جداگانه با توجه به جدول به میزان ۱۰ برابر غلظت توزین و در داخل بشر با آب مقطر حل می‌شود. نمک‌های پرمصرف به صورت یک محلول مادری تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد درون یخچال نگهداری شدند.

جدول ۳-۱- نمک‌های پرمصرف محیط کشت پایه MS

| نمک | مقدار ماده لازم برای یک لیتر محیط کشت (mg) |
|---|---|
| $KNO_3$ | ۱۹۰۰ |
| $NH_4NO_3$ | ۱۶۵۰ |
| $KH_2PO_4$ | ۱۷۰ |
| $MgSO_4.7H_2O$ | ۳۷۰ |
| $CaCl_2.2H_2O$ | ۴۴۰ |

### ۳-۳-۲- محلول مادری مواد غذایی کم مصرف با غلظت ×۱۰۰

برای تهیه محلول مادری عناصر کم مصرف با غلظت ×۱۰۰، مقادیر داده شده در جدول را به صورت ۱۰۰ برابر توزین و هر کدام جداگانه در آب مقطر حل گردید و با افزودن آب مقطر به حجم رسانیده شد. محلول مادری نمک‌های کم‌مصرف در ۴ درجه سانتی گراد درون یخچال نگهداری شدند.

جدول ۳-۲- نمک‌های کم مصرف محیط کشت پایه MS

| نمک | مقدار ماده لازم برای یک لیتر محیط کشت (mg) |
|---|---|
| $ZnSO_4.7H_2O$ | ۸/۶ |
| $MnSO_4$ | ۲۲/۳ |
| $CuSO_4$ | ۰/۰۲۵ |
| KI | ۰/۸۳ |
| $H_3BO_3$ | ۶/۲ |
| $CoCl_2.6H_2O$ | ۰/۰۲۵ |
| $NaMoO_4.2H_2O$ | ۰/۲۵ |

**۳-۳-۳-محلول مادری ویتامین‌ها**

ویتامین‌ها نقش کاتالیزوری در سیستم‌های آنزیمی داشته و در محیط‌های کشت گیاهی فقط به مقدار بسیار جزیی مورد نیاز هستند.

جدول ۳-۳ -ویتامین‌های محیط کشت پایه MS

| ویتامین | مقدار ماده لازم برای یک لیتر محیط کشت (mg) |
|---|---|
| Tiamin.HCl | ۰/۱ |
| Nicotinic acid | ۰/۵ |
| Pyriodoxine.HCl | ۰/۵ |
| Myo- inositol | ۱۰۰ |

### ۳-۳-۴- محلول مادری آهن با غلظت۱۰ x

مقادیر داده شده مواد زیر را هر یک به طور جداگانه وزن کرده در ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده سپس با هم مخلوط کرده و به حجم نهایی ml ۱۰۰ رسانده می شود. پس از تهیه، محلول در یک بطری تیره و درون یخچال در ۴ درجه سانتی گراد محافظت می‌شود.

جدول ۳-۴- ویتامین‌های محیط کشت پایه MS

| نمک | مقدار ماده لازم برای یک لیتر محیط کشت(mg) |
|---|---|
| $FeSO_4.7H_2O$ | ۲۷/۸ |
| $Na_2EDTA.H_2O$ | ۳۷/۳ |

برای تهیه یک لیتر محیط‌کشت، ابتدا مقداری آب مقطر (۵۰۰ میلی‌لیتر) داخل یک بشر یک لیتری ریخته و سپس محلول‌های مادری عناصر میکرو، ماکرو، ویتامین‌ها و آهن اضافه شد. پس از اضافه کردن ۳۰ گرم ساکارز و ۰/۱ گرم میواینوزیتول و هورمون‌های مورد نیاز حجم نهایی به یک لیتر رسانده شد. سپس pH محلول با HCl/NaOH یک نرمال در حدود ۵/۸ تنظیم گردید. در آخرین مرحله آگار به محیط کشت اضافه شد.

### ۳-۴ - تهیه محلول‌های مادری تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

بعضی از تنظیم‌کننده‌های رشد در آب محلول نیستند و باید در یک حلال حل شوند. برای تهیه محلول-های مادری هورمون‌های BAP، IBA و NAA مقداری از پودر هورمون مورد نظر را ابتدا در ۱ میلی‌لیتر

اتانول و یا در ۱ میلی‌لیتر محلول NaOH یک نرمال به همراه حرارت حل نموده و به حجم ۴۰ میلی‌لیتر رسانده و در یخچال نگهداری می‌شود همچنین برای حل نمودن هورمون TDZ از ماده DMSO استفاده شده است.

جدول ۳-۵ ترکیبات حلال هورمون‌های گیاهی

| هورمون | حلال |
|---|---|
| **BAP** | 1 N NaOH |
| **TDZ** | DMSO[1] |
| **IBA** | 1 N NaOH |
| **NAA** | 1 N NaOH |

### ۳-۵- محیط‌های کشت گیاهی

#### ۳-۵-۱-محیط کشت برای کشت بذر و تولید گیاهچه

این محیط حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های محیط MS به‌صورت نصف غلظت بدون هورمون‌های گیاهی و حاوی ۲۰ گرم در لیتر ساکاروز pH = ۵/۷ و ۷ گرم در لیتر آگار می‌باشد. با توجه به این‌که خود بذرها دارای مواد غذایی در درون اندوسپرم خود هستند و از طرف دیگر سن گیاهچه‌ها برای تولید ریزنمونه زیاد نیست، پس از مقدار ساکاروز کمتری استفاده شد.

#### ۳-۵-۲- محیط القای کالوس‌زایی(CIM)[2]

محیط‌های القای کالوس، که در این تحقیق استفاده شدند حاوی هورمون‌های اکسین و سیتوکنین می-باشد. این محیط‌ها حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های محیط موراشیگ و اسکوگ و هورمون‌های ایندول-

1- Dimethyl sulfoxide
1 - Callus Induction medium

بوتیریک‌اسید و نفتالین‌استیک‌اسید به‌عنوان هورمون‌های اکسینی در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ میلی‌گرم در لیتر و هورمون‌های بنزیل‌آمینوپورین و تیدیازرون به‌عنوان هورمون‌های سیتوکنینی در غلظت‌های ۰، ۲، ۴، ۶ میلی‌گرم در لیتر و ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۷ گرم آگار و pH = ۵/۷ می‌باشد.

### ۳-۵-۳- محیط القای شاخه‌زایی[1] (SIM)

محیط القای شاخه‌زایی حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های محیط MS و غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون نفتالین‌استیک‌اسید به‌عنوان اکسین و غلظت یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین به‌عنوان سیتوکینین و ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۷ گرم آگار و pH = ۵/۷ می‌باشد.

### ۳-۵-۴- محیط القای ریشه‌زایی[2] (RIM)

محیط القای ریشه‌زایی حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های محیط موراشیگ و اسکوگ و هورمون نفتالین‌استیک-اسید در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر و ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۷ گرم آگار و pH =۵/۷ می‌باشد.

### ۳-۶- تهیه گیاهچه و ریزنمونه

### ۳-۶- ۱- استریل کردن بذرها

بهترین راه برای تولید گیاهچه‌ی استریل کشت بذر است. بافت‌های گیاهی را می‌توان با انواع مختلفی از مواد شیمیایی استریل نمود و با کمک مواد شیمیایی میکروارگانیسم‌ها را از بین برد.

مواد لازم جهت ضدعفونی بذر اتانول ۷۰٪(v/v) و هیپوکلرید سدیم ۱/۵ ٪ (v/v) می‌باشد.

2- Shoot Induction Medium
1- Root Induction Medium

نوع و غلظت ماده استریل کننده‌ی مورد استفاده و مدت زمان تماس آن با نمونه گیاهی، به‌طور تجربی باید تعیین شود. تیمار بیش از حد با مواد شیمیایی، فقط منجر به حذف کامل میکروارگانیسم‌ها نمی‌شود، بلکه برای بافت گیاهی نیز کشنده است.

بنابراین تعیین شرایط بهینه برای هر بافت خاص اهمیت زیادی دارد. برای به‌دست آوردن ریزنمونه‌های عاری از آلودگی لازم است که ابتدا بذرها استریل شوند. در این تحقیق بذر ابتدا با آب شیر شسته، سپس در زیر هود درون یک فالکون استریل شده ریخته و با الکل۷۰ درصد به‌مدت۳۰ ثانیه تکان داده شد و الکل دور ریخته شد و بذرها با آب مقطر استریل شسته شدند. در مرحله‌ی بعد بذرها با هیپوکلریدسدیم با ماده‌ی موثره ۲/۵ به مدت ۱۳ تا ۱۵ دقیقه همراه با تکان دادن شستشو و سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شد. به منظور جلوگیری از ورود قطرهای آب همراه با بذر به محیط-کشت، بذرها روی کاغذ صافی خشک شدند.

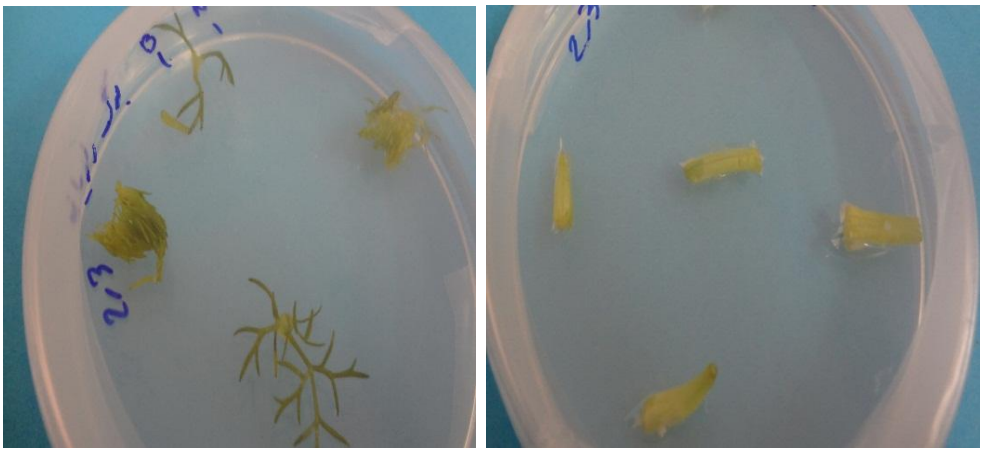
### ۳-۶-۲-کشت بذور و تهیه گیاهچه

بعد از ضدعفونی بذور در این مرحله بذرهای استریل ، توسط پنس، درون شیشه حاوی ۲۵ میلی‌گرم محیط‌کشت جامد موراشیگ و اسکوگ نصف غلظت بدون هورمون کشت شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. بعد از ۸ تا ۱۲ روز بذرها جوانه زدند.

شکل ۳-۱-گیاهچه‌های حاصل از کشت بذرو رازیانه روی محیط‌کشت MS نصف غلظت

### ۳-۶-۳-تهیه و کشت ریزنمونه

دراین تحقیق گیاهان مادری ۵۵ تا ۶۰ روزه جهت تولید ریزنمونه انتخاب شدند. ریزنمونه‌های برگ و هیپوکوتیل در اندازه یک سانتی‌متری توسط اسکالپل یا قیچی استریل ، بریده و به پتری دیش‌های حاوی محیط‌کشت با ترکیب هورمونی مدنظر انتقال داده شد. ریزنمونه‌ها بلافاصله به محیط‌کشت منتقل و دور پتری‌دیش‌ها با پارافیلم بسته شد. سپس پتری‌ها در اتاقک رشد با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی یا سیکل نوری موردنظر قرار داده شد.



شکل ۳-۲- ریزنمونه برگ و هیپوکوتیل گیاه رازیانه

### ۳-۷- آزمایشات کالوس‌زایی

آزمایشات کالوس‌زایی به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در ۴ تکرار اجرا شد. هر تکرار شامل یک پتری‌دیش و هر پتری‌دیش شامل ۴ ریزنمونه بود. فاکتورهای مورد بررسی شامل ریزنمونه در دو سطح هیپوکوتیل و برگ ، هورمون سیتوکینین شامل بنزیل‌آمینوپورین (BAP) و تیدیازرون (TDZ) در چهار سطح ۰، ۲، ۴، ۶ میلی‌گرم در لیتر و هورمون اکسین شامل نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) و ایندول‌بوتیریک‌اسید (IBA) در پنج سطح ۰، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ میلی‌گرم در لیتر بوده است.

محیط‌کشت مورد استفاده، محیط MS کامل همراه با تیمارهای ذکر شده در بالا می‌باشد. اولین کالوس‌ها بعد از ۴ تا ۶ هفته پس‌از قرار دادن ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت و حداقل یک بار و حداکثر دو بار واکشت[1] مشاهده شد.

1- Subculture

### ۳-۷-۱- آزمایش اول کالوس‌زایی:ترکیب هورمونی BAP, NAA

**جدول ۳-۶-تیمارهای هورمونی BAP و NAA مورد استفاده در کالوس¬زایی**

| **غلظت‌های هورمون اکسین NAA mg /1** | غلظت‌های هورمون سیتوکینین BAP mg / l | ترکیب هورمونی |
|---|---|---|
| **۰** | ۰ | ۱ |
| **۰/۵** | ۰ | ۲ |
| **۱** | ۰ | ۳ |
| **۲** | ۰ | ۴ |
| **۴** | ۰ | ۵ |
| **۰** | ۲ | ۶ |
| **۰/۵** | ۲ | ۷ |
| **۱** | ۲ | ۸ |
| **۲** | ۲ | ۹ |
| **۴** | ۲ | ۱۰ |
| **۰** | ۴ | ۱۱ |
| **۰/۵** | ۴ | ۱۲ |
| **۱** | ۴ | ۱۳ |
| **۲** | ۴ | ۱۴ |
| **۴** | ۴ | ۱۵ |
| **۰** | ۶ | ۱۶ |
| **۰/۵** | ۶ | ۱۷ |
| **۱** | ۶ | ۱۸ |
| **۲** | ۶ | ۱۹ |
| **۴** | ۶ | ۲۰ |

### ۳-۷-۲- آزمایش دوم کالوس‌زایی: ترکیبات هورمونی BAP و IBA

**جدول ۳-۷-تیمارهای هورمونی BAP و IBA مورد استفاده در کالوس¬زایی**

| **غلظت‌های هورمون اکسین IBA mg /1** | غلظت‌های هورمون سیتوکینین BAP mg / l | ترکیب هورمونی |
|---|---|---|
| **۰** | ۰ | ۱ |
| **۰/۵** | ۰ | ۲ |
| **۱** | ۰ | ۳ |
| **۲** | ۰ | ۴ |
| **۴** | ۰ | ۵ |
| **۰** | ۲ | ۶ |
| **۰/۵** | ۲ | ۷ |
| **۱** | ۲ | ۸ |
| **۲** | ۲ | ۹ |
| **۴** | ۲ | ۱۰ |
| **۰** | ۴ | ۱۱ |
| **۰/۵** | ۴ | ۱۲ |
| **۱** | ۴ | ۱۳ |
| **۲** | ۴ | ۱۴ |
| **۴** | ۴ | ۱۵ |
| **۰** | ۶ | ۱۶ |
| **۰/۵** | ۶ | ۱۷ |
| **۱** | ۶ | ۱۸ |
| **۲** | ۶ | ۱۹ |
| **۴** | ۶ | ۲۰ |

### ۳-۷-۳- آزمایش سوم کالوس‌زایی: ترکیبات هورمونی NAA و TDZ

**جدول ۳-۸-تیمارهای هورمونی TDZ و NAA مورد استفاده در کالوس¬زایی**

| **غلظت‌های هورمون اکسین NAA mg /1** | غلظت‌های هورمون سیتوکینین TDZ mg / l | ترکیب هورمونی |
|---|---|---|
| **۰** | ۰ | ۱ |
| **۰/۵** | ۰ | ۲ |
| **۱** | ۰ | ۳ |
| **۲** | ۰ | ۴ |
| **۴** | ۰ | ۵ |
| **۰** | ۲ | ۶ |
| **۰/۵** | ۲ | ۷ |
| **۱** | ۲ | ۸ |
| **۲** | ۲ | ۹ |
| **۴** | ۲ | ۱۰ |
| **۰** | ۴ | ۱۱ |
| **۰/۵** | ۴ | ۱۲ |
| **۱** | ۴ | ۱۳ |
| **۲** | ۴ | ۱۴ |
| **۴** | ۴ | ۱۵ |
| **۰** | ۶ | ۱۶ |
| **۰/۵** | ۶ | ۱۷ |
| **۱** | ۶ | ۱۸ |
| **۲** | ۶ | ۱۹ |
| **۴** | ۶ | ۲۰ |

### ۳-۸- آزمایش باززایی

باززایی در محیط‌کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA انجام شد. در این تحقیق اولین کالوس‌ها ۲۸ تا ۴۲ روز بعد از انتقال به محیط باززایی شروع به شاخه‌زایی نمودند. در طول مدت شاخه‌زایی همه تیمارها حداقل ۱ و برخی ۲ بار واکشت شدند.

### ۳-۹- ریشه‌زایی

هورمون مورد استفاده برای ریشه‌زایی در این تحقیق نفتالین‌استیک‌اسید با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. گیاهچه‌های ۷۰ تا ۸۰ روزه به محیط‌کشت حاوی نفتالین‌استیک‌اسید منتقل شدند. نخستین ریشه‌ها بعد از ۲۵ روز و یک بار واکشت در در محیط ریشه‌زایی مشاهده شد.

### ۳-۱۰- تجزیه آماری داده‌ها

در این تحقیق تجزیه واریانس داده‌های خام با استفاده از نرم افزار MSTATC انجام شد و سپس مقایسات میانگین صفات مورد بررسی به روش آزمون LSD انجام گرفت. نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم شدند.

# فصل چهارم

# نتایج و بحث

## نتایج و بحث

همواره در القای کالوس‌زایی مجموع سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی و همچنین تنظیم کننده‌های رشد خارجی دخالت دارند. هیچ واکنشی را نمی‌توان در اثر یک هورمون منحصر به فرد دانست. در واکنش‌های هورمونی ممکن است یک هورمون اثر هورمون دیگر را تشدید یا خنثی کند. معلوم شده است که هورمون‌ها روی هم اثر متقابل داشته و اثرات همدیگر را بهبود می‌بخشند (دل-پوزا و همکاران ۲۰۰۵). بافت کالوس از نظر ظاهری و جنبه‌های فیزیکی تفاوت زیادی دارد. این تنوع تحت تاثیر بافت والدی ریزنمونه، سن کالوس، شرایط رشدی و نوع تیمارهای هورمونی به‌کار رفته در مرحله‌ی القا و رشد کالوس است. پیچیدگی مورفولوژیکی یک ریزنمونه به همراه انتخاب تنظیم‌کننده‌های‌رشد گیاهی مناسب تاثیر چشم‌گیری بر القای کالوس و باززایی نوساقه‌ها دارد (خاور و همکاران، ۲۰۰۵).

در این تحقیق از دو نوع ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ استفاده شد. با توجه به اینکه در آزمایشات گذشته از ریزنمونه برگ فقط تا مرحله کالوس‌زایی استفاده شده بود و باززایی این ریزنمونه بررسی نگردیده بود، در این تحقیق سعی شد تا باززایی این ریزنمونه مورد بررسی قرارگیرد. در این فصل نتایج اثر تیمارهای هورمونی مختلف دو نوع هورمون اکسین (شامل نفتالین‌استیک‌اسید و ایندول‌بوتیریک‌اسید) و دو نوع هورمون سیتوکینین (شامل بنزیل‌آمینوپورین و تیدیازرون) بر کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی دو نوع ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ گیاه رازیانه شرح داده شده است.

### ۴-۱- نتایج کالوس‌زایی

در این تحقیق آزمایشات کالوس‌زایی گیاه رازیانه در قالب سه آزمایش جداگانه با دو ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل و برگ با تیمارهای هورمونی اکسین و سیتوکنین مورد بررسی قرار گرفت.

### ۴-۱-۱- آزمایش اول تاثیر ترکیب‌های هورمونی BAP و IBA بر کالوس‌زایی رازیانه

در این تحقیق پس از گذشت ۴ تا ۵ هفته، تشکیل کالوس بر روی قطعات ریزنمونه در محیط‌های کشت به‌کار رفته قابل مشاهده بوده است. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف فاکتورهای مورد مطالعه شامل نوع ریزنمونه، غلظت‌های مختلف هورمون بنزیل‌آمینوپورین (۰، ۲ ،۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر)، غلظت‌های مختلف هورمون ایندول‌بوتیریک‌اسید (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و همچنین اثر متقابل دوگانه ریزنمونه و بنزیل‌آمینوپورین اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد وجود دارد. همچنین اثر متقابل دوگانه نوع ریزنمونه و هورمون ایندول‌بوتیریک‌اسید، اثر متقابل دوگانه هورمون-های بنزیل‌آمینوپورین و ایندول‌بوتیریک‌اسید و همچنین اثر متقابل سه‌گانه ریزنمونه و هورمون‌های بنزیل‌آمینوپورین و ایندول‌بوتیریک‌اسید نیز در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد.

نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه، هورمون بنزیل‌آمینوپورین و ایندول‌بوتیریک‌اسید نشان می‌دهد که بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل با ترکیب تیماری ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل‌آمینوپورین و ۲ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک‌اسید به میزان ۸۱/۲۵ درصد می‌باشد، البته ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول-بوتیریک‌اسید نیز برای ریزنمونه هیپوکوتیل میزان کالوس‌زایی بالایی را نشان می‌دهند که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل‌آمینوپورین و ۲ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک‌اسید نشان نمی‌دهد.

بیشترین درصد کالوس‌زایی ریزنمونه برگ مربوط به تیمار هورمونی ۶ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل-آمینوپورین و ۴ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک‌اسید به میزان ۷۵ درصد است (شکل ۴-۱). با توجه به اینکه که در ریزنمونه برگ نسبت به ریزنمونه هیپوکوتیل تعامل غلظت‌های بالای دو هورمون بنزیل-

آمینوپورین و ایندول‌بوتیریک اسید کالوس‌زایی بیشتری را سبب شده است می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا غلظت داخلی این دو هورمون در ریزنمونه برگ پایین بوده است، در صورتی که این تعامل

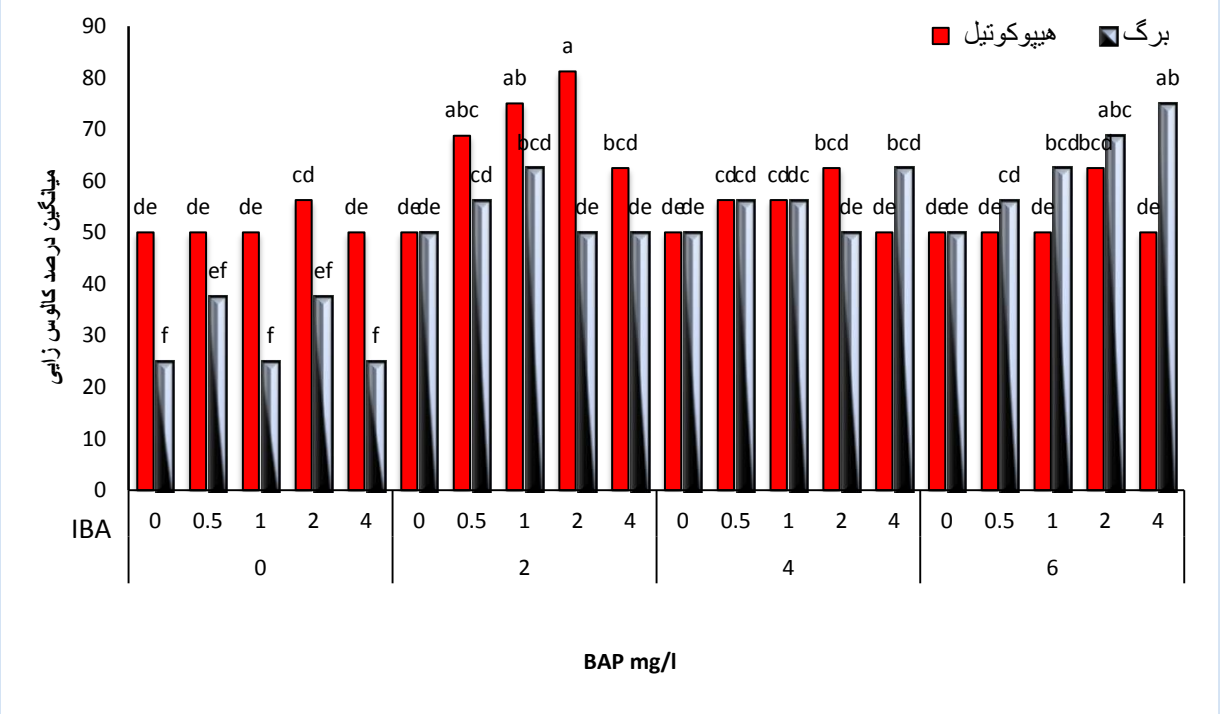
جدول ۴-۱-۱- نتایج تجزیه واریانس اثر نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف دو هورمون BAP ، IBA بر میزان کالوس‌زایی گیاه رازیانه

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات |
|---|---|---|
| نوع ریزنمونه(A) | ۱ | ۰/۱۵۶** |
| غلظت‌های هورمونBAP (B) | ۳ | ۰/۳۱۳** |
| غلظت‌های هورمونIBA (C) | ۴ | ۰/۰۵۷** |
| نوع ریزنمونه *غلظت‌های هورمونBAP (A*B) | ۳ | ۰/۱۹۵** |
| نوع ریزنمونه *غلظت‌های هورمونIBA(A*C) | ۴ | ۰/۰۲۱* |
| غلظت‌های هورمونIBA*BAP(B*C) | ۱۲ | ۰/۰۵۱* |
| نوع ریزنمونه *غلظت‌های هورمونBAP*غلظت‌های هورمونIBA(A*B*C) | ۱۲ | ۰/۰۱۵* |
| خطا آزمایش | ۱۲۰ | ۰/۰۰۸ |
| ضریب تغییرات (درصد) | | ۱۶/۸۱ |

ns و * و ** به ترتیب نشان دهنده عدم معنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن در سطح ۵ و ۱ درصد می‌باشد .

هورمونی برای ریزنمونه هیپوکوتیل در غلظت‌های پایین تر دو هورمون حاصل شده است. روند کالوس-زایی ریزنمونه برگ در این نمودار نشان می‌دهد که ترکیبات هورمونی BAP و IBA ترکیبات مناسبی

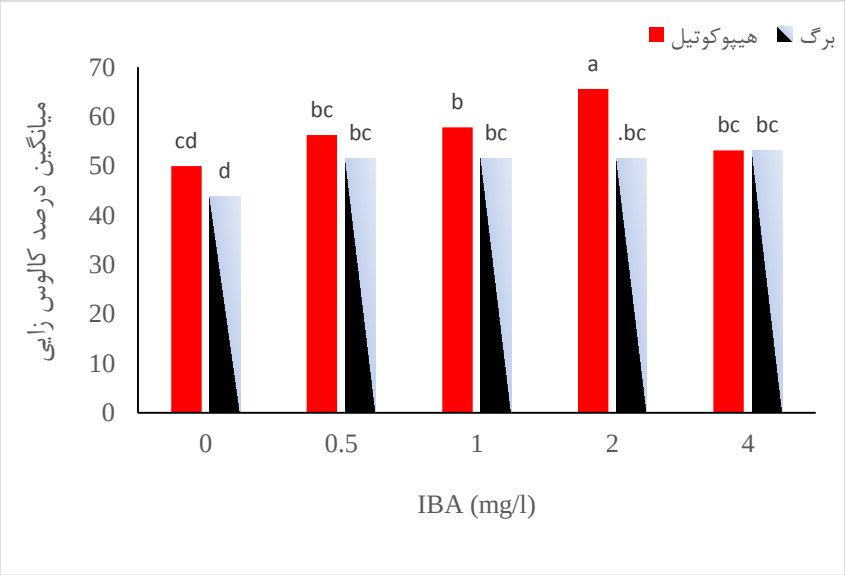
جهت کالوس‌زایی این ریزنمونه می‌باشند. برهمکنش مناسب این دو هورمون با ریزنمونه برگ برای القای جنین‌زایی سوماتیکی گیاه دارویی سرخارگل نیزگزارش شده است(ساکسینا و همکاران، ۲۰۰۳). البته باید توجه نمود که علت واکنش بهتر برخی ریزنمونه‌ها تامین بهتر اکشیژن و تجمع مواد در قاعده‌ی فیزیولوژیکی ریزنمونه و عدم پخش این مواد در محیط کشت است (حسندخت و ابراهیمی ۱۳۸۵).




شکل۴-۱ مقایسه میانگین اثر نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف BAP و IBA بر میانگین درصد کالوس-زایی گیاه رازیانه

نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون ایندول‌بوتیریک‌اسید نیز نشان می‌دهد که بیشترین میزان کالوس‌زایی (۶۵/۶۳ درصد) مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک‌اسید است. با توجه به این نمودار روند کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل ابتدا با افزایش غلظت ایندول‌بوتیریک‌اسید تا غلظت خاصی افزایش و بعد از آن کاهش می‌یابد. نتایج نشان

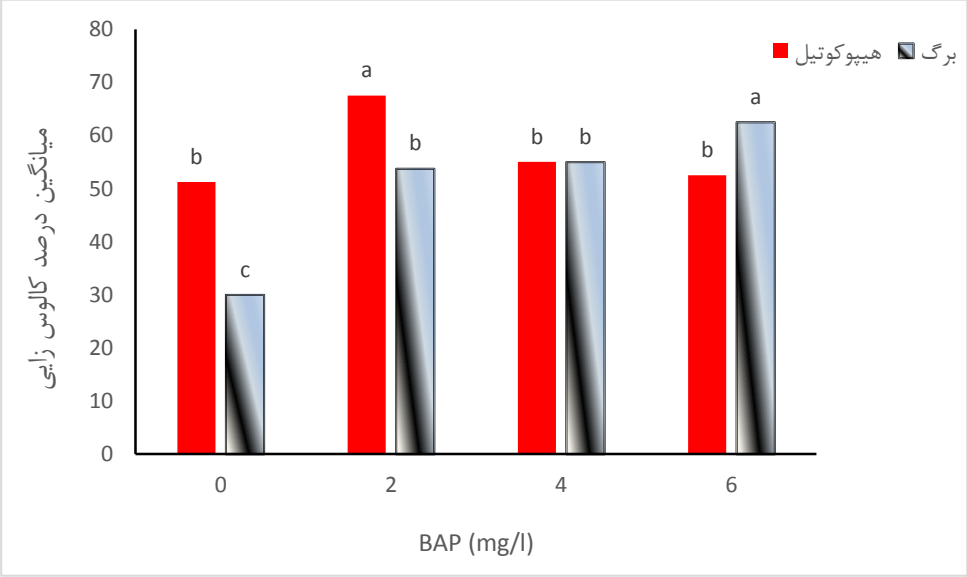
می‌دهد که غلظت‌های مختلف هورمون ایندول‌بوتیریک‌اسید از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بر میزان کالوس‌زایی ریزنمونه برگ ندارند (شکل ۴-۲).




شکل ۴-۲- اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون IBA بر میانگین درصد کالوس‌زایی گیاه رازیانه

نمودار مقایسه میانگین حاصل از اثر متقابل بین ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون بنزیل‌آمینوپورین نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی از ریزنمونه هیپوکوتیل و غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل‌آمینوپورین (۶۷/۵ درصد) و در ریزنمونه برگ، غلظت ۶ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل‌آمینوپورین (۶۲/۵ درصد) و کمترین میزان کالوس‌زایی (۳۰ درصد) مربوط ریزنمونه برگ در تیمار شاهد (عدم مصرف هورمون) بدست آمد (شکل ۴-۳). در ریزنمونه برگ با افزایش سطوح این هورمون میزان کالوس‌زایی افزایش یافته، درصورتی که در ریزنمونه هیپوکوتیل استفاده از غلظت‌های بالای هورمون بنزیل‌آمینوپورین از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد (عدم استفاده هورمون) نشان نداد. که این موضوع احتمالا به نوع ریزنمونه و واکنش‌های متفاوتی که هر ریزنمونه در مقابل مقدار هورمون نشان می‌دهد، بستگی

دارد. با توجه به این نتایج می‌توان بیان نمود که احتمالا در ریزنمونه برگ غلظت هورمون بنزیل آمینو پورین پایین بوده که این ریزنمونه به غلظت‌های بالاتر عکس العمل بهتری نشان داده است. نوع ریزنمونه، تعیین کننده‌ی سطح هورمون‌های داخلی می‌باشد، که تاثیر بسزایی بر فرآیندهایی نظیر تقسیم سلولی و شکل گیری اندام دارد (فارسی و ذوالعلی ۱۳۸۷).

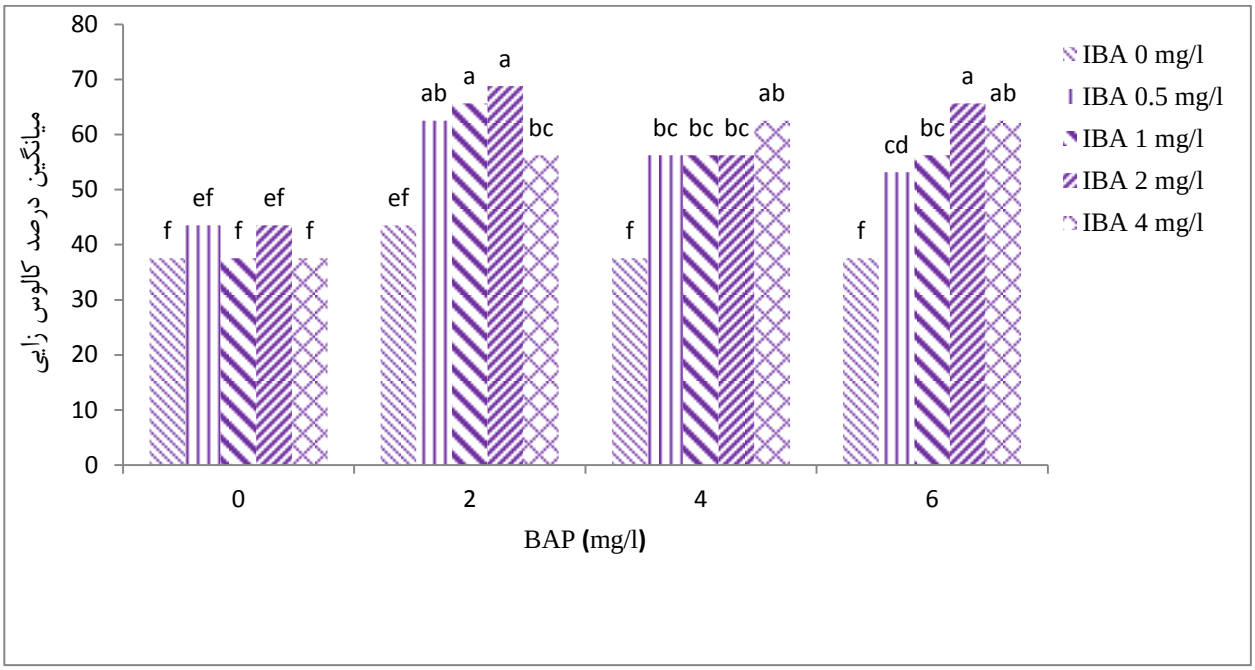



شکل ۴-۳- اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون BAP بر میانگین درصد کالوس‌زایی رازیانه

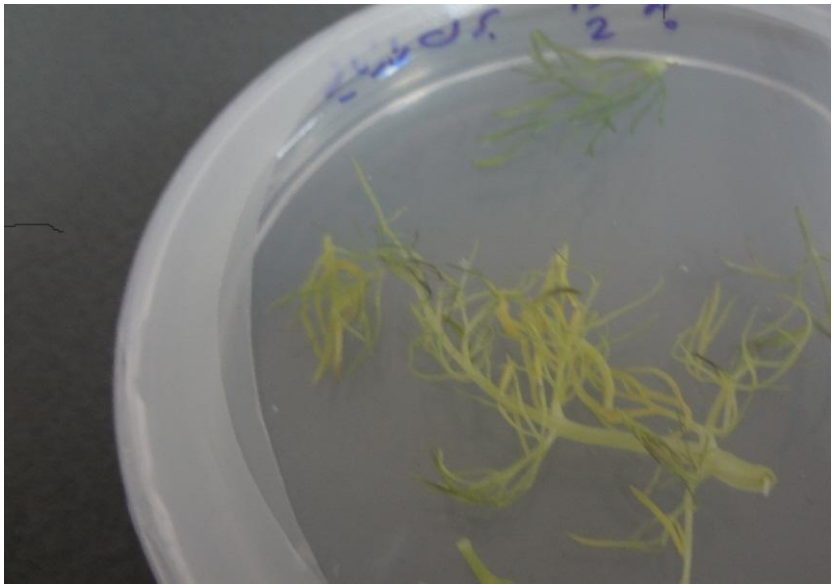
نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف هورمون‌های بنزیل‌آمینوپورین و ایندول‌بوتیریک-اسید نشان می‌دهد که بیشترین میزان کالوس‌زایی (۶۸/۷۵ درصد) مربوط به تیمار هورمونی با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۲ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک‌اسید است. ترکیب‌های هورمونی با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین و غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک-اسید و غلظت ۶ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین و غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک-اسید از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با تیمار هورمونی با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۲ میلی‌گرم در لیتر ایندول‌بوتیریک‌اسید نداشت(۴-۴).

نتایج نشان می‌دهد که هر کدام از هورمون‌ها به تنهایی تاثیر اندکی در مقایسه با اثر ترکیبی آن‌ها بر میزان کالوس‌زایی دارد، به‌طوری که صرف‌نظر از غلظت، هر هورمون به تنهایی کمترین میزان کالوس‌زایی را حاصل کرده که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با شاهد ندارد. می‌توان نتیجه گرفت هرچه غلظت‌های به‌کار رفته دو هورمون به هم نزدیک باشند و تعادل بیشتری بین دو هورمون وجود داشته باشد، میزان کالوس بیشتری تولید خواهد شد. باید توجه نمود که تعدادی از ریزنمونه‌های برگ در بعضی تیمارها فقط رشد رویشی نموده و هیچ‌گونه تحریک پذیری برای کالوس‌زایی نسبت به هورمون‌های بکار رفته نشان نداده است (شکل۴-۵) ، که‌این موضوع قبلا توسط سرخیل و همکاران (۱۳۸۸) نیز گزارش شده است.

با توجه به این‌که در هر پتری‌دیش هم نمونه‌های تبدیل شده به کالوس و هم نمونه‌هایی که فقط رشد کرده و به کالوس‌زایی واکنشی نشان نداده‌اند مشاهده شده، نمی‌توان خیلی با قاطعیت دلیل خاصی را بیان کرد. اما از آنجایی که این پدیده بیشتر در مورد تیمارهای هورمونی که هرکدام از هورمون‌های بنزیل-آمینوپورین و ایندول‌استیک‌اسید به تنهایی به‌کار رفته بود مشاهده گردید، می‌توان گفت واکنش کالوس-زایی به تعامل متقابل هورمون‌های اکسین و سیتوکنین وابسته است. محققین معتقدند میزان تولید کالوس بستگی به ترکیب هورمون‌های رشد بکار رفته دارد و تعادل بین هورمون‌های اکسین و سیتوکنین یک فاکتور مورفوژنیکی تعیین‌کننده و مهم به شمار می‌رود (عباسی و همکاران، ۱۳۸۶).




شکل ۴-۴- اثر متقابل غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP و IBA بر میانگین کالوس‌زایی گیاه رازیانه



شکل ۴-۵-ریزنمونه برگ با رشد رویشی در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP

**۴-۱-۲- آزمایش دوم تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌های TDZ و NAA بر کالوس‌زایی گیاه رازیانه**

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که از بین فاکتورهای مختلف مورد مطالعه فقط نوع ریزنمونه معنی‌دار نشده است، درحالی‌که سایر فاکتورها شامل غلظت‌های مختلف هورمون تیدیازرون، هورمون نفتالین‌استیک‌اسید و همچنین اثرمتقابل بین ریزنمونه و هورمون تیدیازرون، اثر متقابل بین ریزنمونه و هورمون نفتالین‌استیک‌اسید و اثر متقابل سه‌گانه ریزنمونه و هورمون‌های تیدیازرون و نفتالین‌استیک‌اسید در سطح ۱ درصد معنی‌دار شدند(جدول۴-۱-۲).

نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌گانه نوع ریزنمونه، هورمون‌های تیدیازرون و نفتالین‌استیک‌اسید نشان می‌دهد که بیشترین میزان کالوس‌زایی (۷۵ درصد) مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل و با استفاده از ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر تیدیازرون و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید و ریزنمونه برگ با ترکیب هورمونی ۴ میلی‌گرم در لیتر تیدیازرون و غلظت‌های ۲ و۴ میلی‌گرم در لیتر نفتالین-استیک‌اسید است(شکل ۴-۶). با توجه به این نمودار می‌توان نتیجه گرفت که در اکثر تیمارهایی که هورمون نفتالین‌استیک‌اسید (که نوعی اکسین می‌باشد) به تنهایی به‌کار رفته ریزنمونه برگ در مقایسه با ریزنمونه هیپوکوتیل میزان کالوس‌زایی کمتری داشته، درحالی که مصرف تیدیازرون (که نوعی سیتوکنین می‌باشد) باعث شده تا ریزنمونه برگ در مقایسه با ریزنمونه هیپوکوتیل میزان کالوس‌زایی برابر یا بیشتری داشته باشد.نتایج نشان می‌دهد که برای ریزنمونه برگ غلظت‌های بالاتر نفتالین‌استیک‌اسید در ترکیب با غلظت‌های بالاتر تیدیازرون میزان کالوس‌زایی بیشتری را داشته است، درحالی‌که برای ریزنمونه هیپوکوتیل سطوح پایین‌تر هر دو هورمون میزان کالوس‌زایی بیشتری داشته است، که این موضوع احتمالا به برهمکنش بین سلول‌های هر بافت (نوع ریزنمونه) و نوع و غلظت هورمون‌های درونی و هورمون‌های به-کار رفته در محیط دارد. همچنین این موضوع می‌تواند متاثر از ویژگی‌های خاص هورمونTDZ باشد. اگر چه این هورمون در گروه سیتوکینین‌ها قرار می‌گیرد، ولی یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد آن بروز

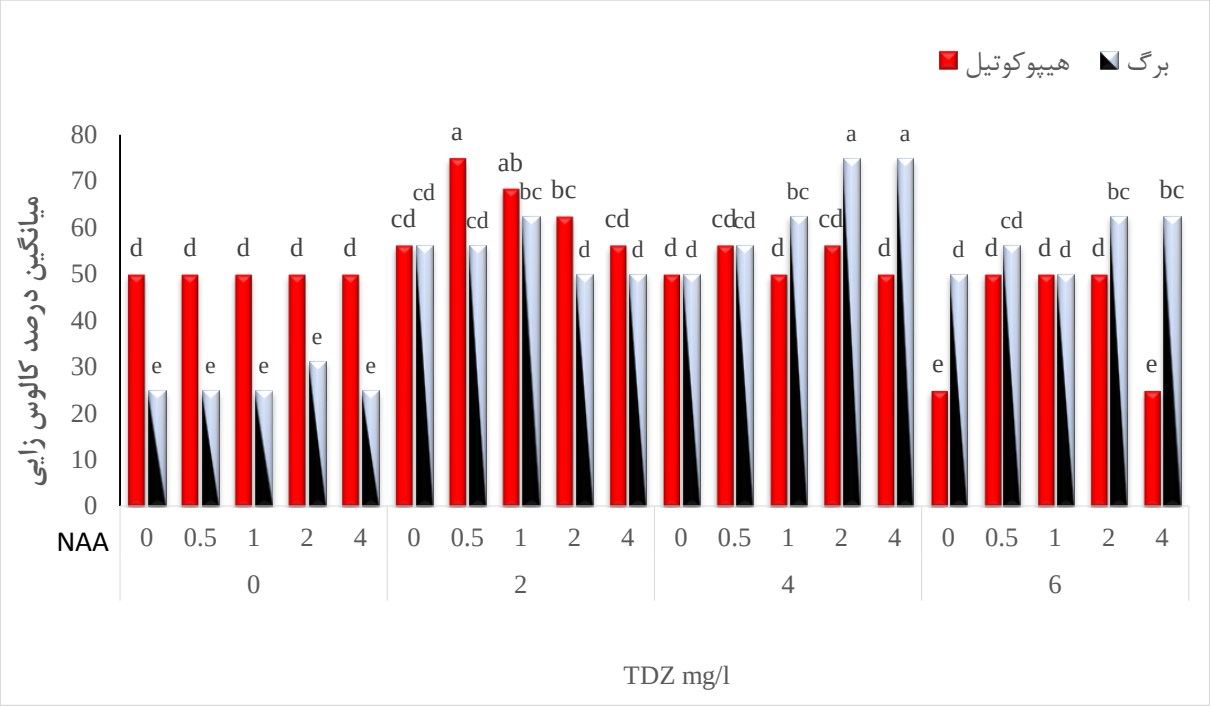
جدول ۴-۱-۲- نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف دو هورمون TDZ و NAA در دو ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ بر میانگین درصد کالوس‌زایی گیاه رازیانه

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات |
|---|---|---|
| نوع ریزنمونه(A) | ۱ | ۰/۰۱۹$^{ns}$ |
| غلظت‌های هورمونTDZ (B) | ۳ | ۰/۳۵۷$^{**}$ |
| غلظت‌های هورمونNAA (C) | ۴ | ۰/۰۶۶$^{**}$ |
| نوع ریزنمونه *غلظت‌های هورمونTDZ (A*B) | ۳ | ۰/۳۳۳$^{**}$ |
| نوع ریزنمونه *غلظت‌های هورمونNAA(A*C) | ۴ | ۰/۰۱۷$^{**}$ |
| غلظت‌های هورمونNAA*TDZ(B*C) | ۱۲ | ۰/۰۲۱$^{**}$ |
| نوع ریزنمونه *غلظت‌های هورمونTDZ*غلظت‌های هورمونNAA(A*B*C) | ۱۲ | ۰/۰۱۸$^{**}$ |
| خطا آزمایش | ۱۲۰ | ۰/۰۰۶ |
| ضریب تغییرات (درصد) | | ۱۴/۸۳ |

ns و * و ** به ترتیب نشان دهنده عدم معنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن در سطح ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

همزمان اثر اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها است. این در حالی است که از نظر ساختاری کاملاً متفاوت از این گروه از تنظیم کننده‌ها می‌باشد(هیوتمان و همکاران ۱۹۹۳). هورمون TDZ در محیط کشت ، تجمع اکسین‌های درونی و سیتوکنین‌ها را تحریک می‌کند. فعالیت TDZ به وسیله‌ی اکسین‌های خارجی تغییر می‌یابد (مورثی و همکاران، ۱۹۹۵). احتمالا غلظت هورمون‌های داخلی ریزنمونه هیپوکوتیل به اندازه کافی

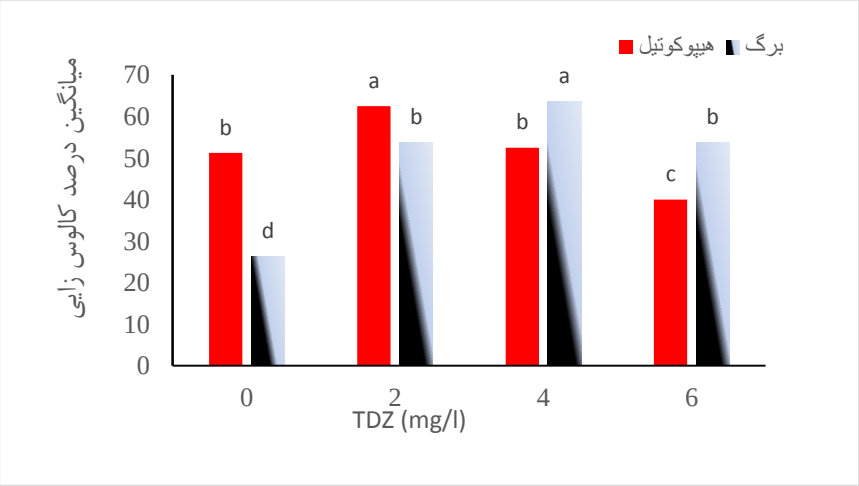
مناسب است که در واکنش با غلظت کمتر هورمونی‌های بیرونی، کالوس‌زایی مناسب را ایجاد نماید




شکل ۴-۶- اثر متقابل سه‌گانه انواع ریزنمونه و ترکیب‌های هورمونی TDZ و NAA بر میانگین درصد کالوس‌زایی

احتمالا غلظت و یا نوع هورمون‌های اکسین و سیتوکنین در ریزنمونه برگ پایین بوده و نیاز به غلظت-های بالاتر این هورمون‌ها برای کالوس‌زایی دارد. نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل دوگانه نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون تیدیازرون نشان می‌دهد که بیشترین میزان کالوس‌زایی (۶۳/۷۵ درصد) مربوط به ریزنمونه برگ با غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون تیدیازرون است (شکل۴-۷). روند کالوس-زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در این نمودار ابتدا افزایشی و سپس کاهشی است. یعنی سطوح بالای هورمون تیدیازرون کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل را کاهش می‌دهد، به‌طوری که حتی میزان کالوس‌زایی کمتر از تیمار شاهد همین ریزنمونه است، درحالی‌که در ریزنمونه برگ کمترین میزان کالوس‌زایی مربوط به تیمار شاهد می‌باشد. ریزنمونه برگ در تیمار شاهد درصد کالوس‌زایی کمی حاصل نمود و با افزایش غلظت تیدیازرون درصد کالوس‌زایی این ریزنمونه افزایش نشان داد، که احتمالا دلیل آن پایین بودن

غلظت سیتوکنین خود بافت می‌باشد. افزایش کالوس‌زایی این ریزنمونه در غلظت‌های بالای TDZ قبلا توسط جونز و همکاران نیز گزارش شد. کشت ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی هورمون‌های TDZ، توفوردی و دی کامبا[1] نشان داد که بیشترین القای کالوس در غلظت‌های بالاتر از یک میکرومولار TDZ حاصل شد (جونز و همکاران، ۲۰۰۷).




شکل ۴-۷ اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون TDZ بر میانگین درصد کالوس‌زایی گیاه رازیانه

نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین‌استیک‌اسید نشان می‌دهد که بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون نفتالین‌استیک‌اسید (۵۷/۸۱ درصد) بدست آمد. بیشترین میزان کالوس‌زایی ریزنمونه برگ از غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید (۵۴/۶۹ درصد) بدست آمد که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با ریزنمونه هیپوکوتیل با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون نفتالین‌استیک‌اسید نداشت (۴-۸).

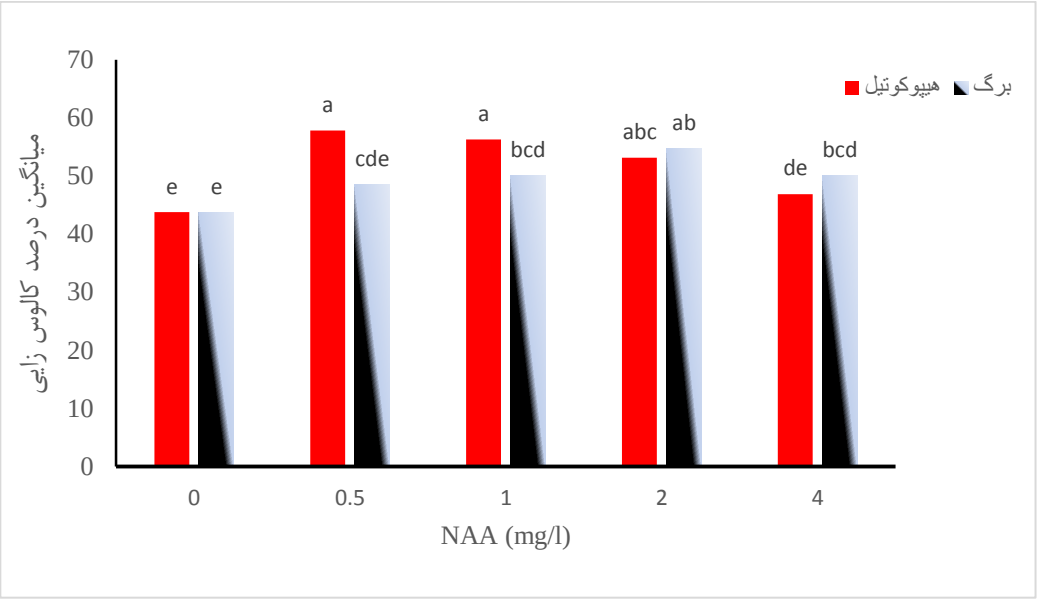
1-Dicomba

مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از با آزمون LSD انجام شد و از آن‌جایی که این آزمون کمترین اختلاف بین سطوح را نشان می‌دهد می‌توان معنی‌دار شدن اثر متقابل ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین‌استیک‌اسید را (بخصوص در مورد ریزنمونه برگ که اختلاف میانگین کالوس‌زایی این ریزنمونه در غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین استک‌اسید بسیار کم است) توجیح کرد.

با توجه به این نمودار می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های بالای هورمون نفتالین‌استیک‌اسید ریزنمونه برگ را بیشتر تحت تاثیر قرار داده و کالوس‌زایی بیشتری نسبت به ریزنمونه هیپوکوتیل ایجاد نموده است. به‌طورکلی با افزایش غلظت هورمون نفتالین‌استیک‌اسید کالوس‌زایی ریزنمونه برگ روند افزایشی داشت، در ریزنمونه هیپوکوتیل این روند بیشترکاهشی به نظر می‌رسد.که این افزایش کالوس‌زایی متناسب با افزایش غلظت نفتالین‌استیک‌اسید توسط کورچ نیزگزارش شد( کوروچ و همکاران، ۲۰۰۲). انتخاب یک ریزنمونه در مرحله رشدی مطلوب نقش اساسی در موفقیت‌آمیز بودن کشت‌بافت در شرایط *in vitro* بازی می‌کند (خاور و همکاران ۲۰۰۵).

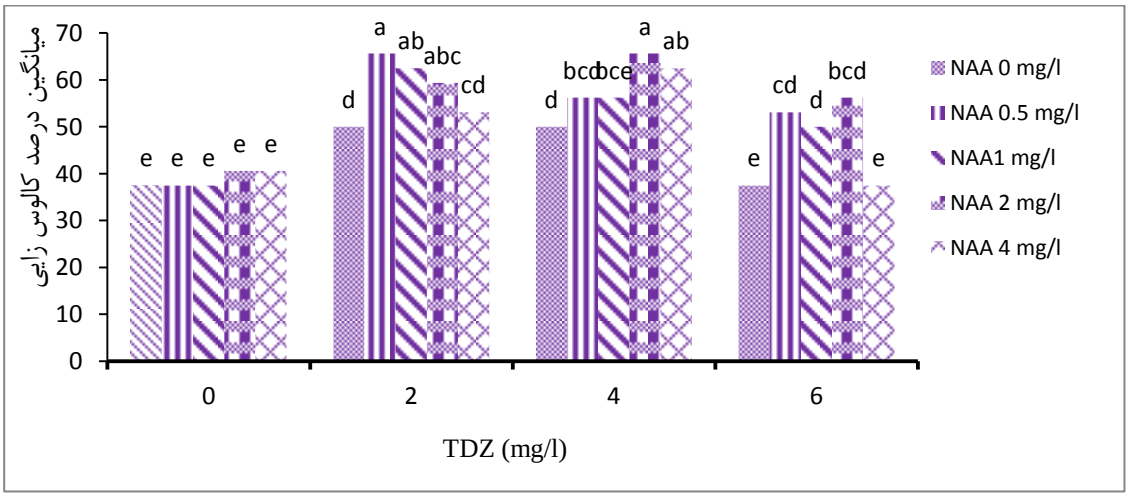
در بررسی اثر متقابل غلظت‌های مختلف هورمون تیدیازرون و نفتالین‌استیک‌اسید بر میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ مشاهده گردید که بیشترین میزان کالوس‌زایی (۶۵/۶۳ درصد) در ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر تیدیازرون و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید و ترکیب ۴ میلی‌گرم درلیتر تیدیازرون و ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید مشاهده گردیده است (شکل۴- ۹).

نتایج حاصل نشان می‌دهد که در غلظت صفر تیدیازرون (ترکیبات بدون هورمون سیتوکنین) با افزایش غلظت هورمون نفتالین‌استیک‌اسید میزان کالوس‌زایی از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد




شکل ۴-۸- اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون NAA برمیانگین درصد کالوس‌زایی گیاه رازیان

ندارد، درحالی‌که تیمارهای حاصل از ترکیب هر دو هورمون درصد کالوس‌زایی بیشتری نسبت به تیمار شاهد نشان می‌دهد، از این رو می‌توان نتیجه گرفت که حضور سیتوکنین (تیدیازرون) در ترکیب با اکسین (نفتالین‌استیک‌اسید) برای افزایش کالوس‌زایی مهم به‌نظر می‌رسد. معلوم شده هورمون‌ها اثر متقابل روی یکدیگر داشته و می‌توانند اثرات همدیگر را بهبود بخشند (دل پوزا و همکاران ۲۰۰۵).




شکل۴-۹- اثر متقابل غلظت‌های مختلف هورمون‌های TDZ ، NAA برمیانگین درصد کالوس‌زایی رازیانه

### ۴-۱-۳- آزمایش سوم تاثیر ترکیب‌های هورمونی BAP و NAA بر کالوس‌زایی رازیانه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف فاکتورهای مورد مطالعه شامل نوع ریزنمونه، غلظت‌های مختلف هورمون بنزیل‌آمینوپورین (۰، ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر)، غلظت‌های مختلف هورمون نفتالین‌استیک‌اسید (۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر ) و همچنین اثرمتقابل بین آن‌ها در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری از نظر کالوس‌زایی وجود دارد (جدول ۴-۱-۳).

نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌گانه نوع ریزنمونه و هورمون‌های بنزیل‌آمینوپورین و نفتالین‌استیک-اسید نشان می‌دهد که بیشترین میزان کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل با ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید است (شکل ۴-۱۰)، البته کالوس‌زایی ۱۰۰ درصد این ریزنمونه در محیط کشت حاوی توفوردی (۸ میکرومولار 2,4-D )، نفتالین‌استیک‌اسید (۲/۶ میکرومولار NAA) و محیط دارای کینتین (۲/۳ میکرومولار) نیز توسط آنزیدی و همکاران نیز گزارش شد (آنزید و همکاران ۱۹۹۶). با بررسی اثر این دو هورمون بر کالوس‌زایی زیره سیاه بیشترین فراوانی کالوس‌زایی در غلظت های ۰/۵ یا یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین و نفتالین‌استیک‌اسید حاصل شد (باقری و همکاران، ۱۳۹۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون بنزیل‌آمینوپورین نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه هیپوکوتیل و غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل‌آمینوپورین به میزان ۶۵ درصد است (شکل ۴-۱۱). با توجه به این نمودار می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت هورمون بنزیل‌آمینوپورین میزان کالوس‌زایی ریزنمونه برگ افزایش یافته است. (آنزید و همکاران ۱۹۹۶). با بررسی اثر این دو هورمون بر کالوس‌زایی زیره سیاه بیشترین فراوانی کالوس‌زایی در غلظت های ۰/۵ یا یک میلی‌گرم در

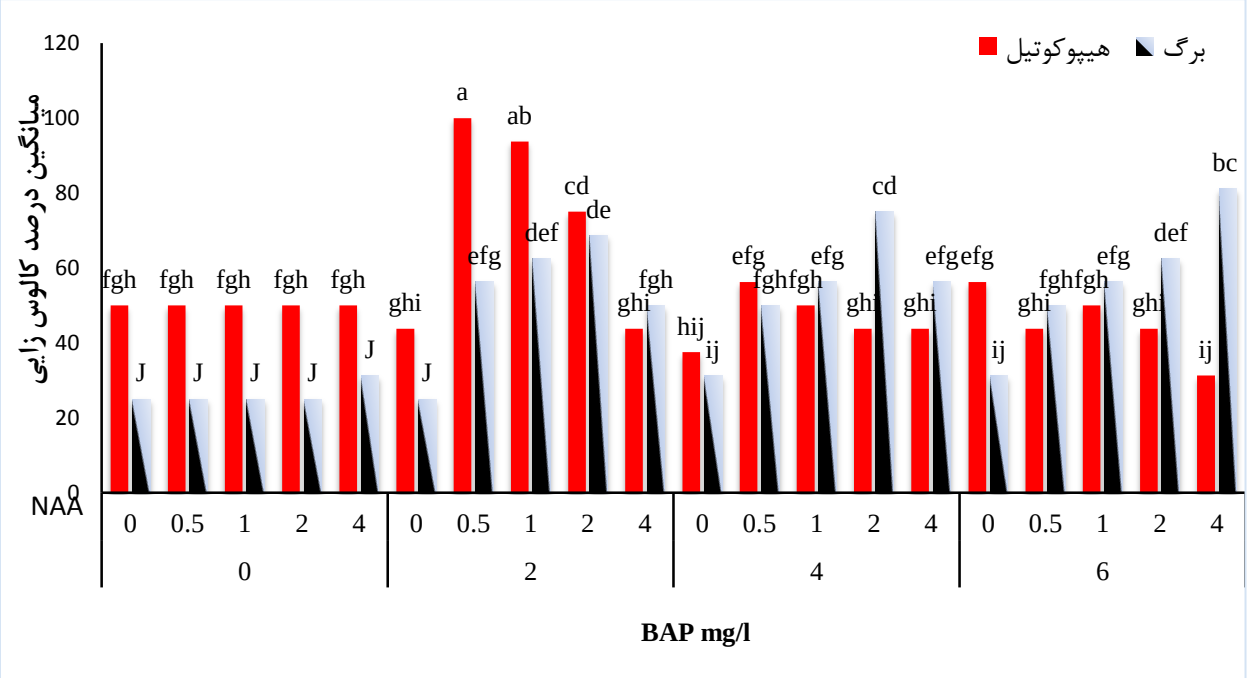
جدول ۴-۱-۳- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف دو هورمون BAP و NAA بر میزان کالوس‌زایی گیاه رازیانه

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات |
|---|---|---|
| نوع ریزنمونه(A) | ۱ | ۰/۱۱۳** |
| غلظت‌های هورمون BAP (B) | ۳ | ۰/۲۸۷** |
| غلظت‌های هورمونNAA (C) | ۴ | ۰/۱۴۱** |
| نوع ریزنمونه *غلظت‌های هورمون BAP (A*B) | ۳ | ۰/۲۴۴** |
| نوع ریزنمونه *غلظت‌های هورمونNAA(A*C) | ۴ | ۰/۲۱۶** |
| غلظت‌های هورمونNAA*BAP(B*C) | ۱۲ | ۰/۰۸۲** |
| نوع ریزنمونه *غلظت‌های هورمونBAP*غلظت‌های هورمونNAA(A*B*C) | ۱۲ | ۰/۰۴۸** |
| خطا آزمایش | ۱۲۰ | ۰/۰۰۹ |
| ضریب تغییرات (درصد) | | ۱۹/۵۴ |

ns و * و ** به ترتیب نشان دهنده عدم معنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن در سطح ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

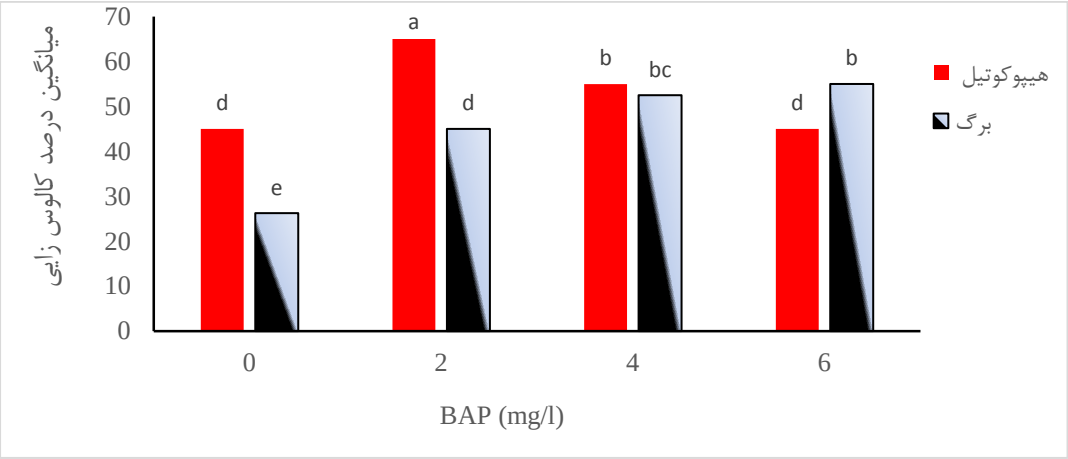
لیتر بنزیل‌آمینوپورین و نفتالین‌استیک‌اسید حاصل شد (باقری و همکاران، ۱۳۹۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون بنزیل‌آمینوپورین نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه هیپوکوتیل و غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل‌آمینوپورین به میزان ۶۵ درصد است (شکل ۴-۱۱). با توجه به این نمودار می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت هورمون بنزیل‌آمینوپورین میزان کالوس‌زایی ریزنمونه برگ افزایش یافته است. بیشترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه هیپوکوتیل و غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل‌آمینوپورین به میزان ۶۵ درصد است

(شکل ۴-۱۱). با توجه به این نمودار می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت هورمون بنزیل‌آمینوپورین میزان کالوس‌زایی ریزنمونه برگ افزایش یافته است.



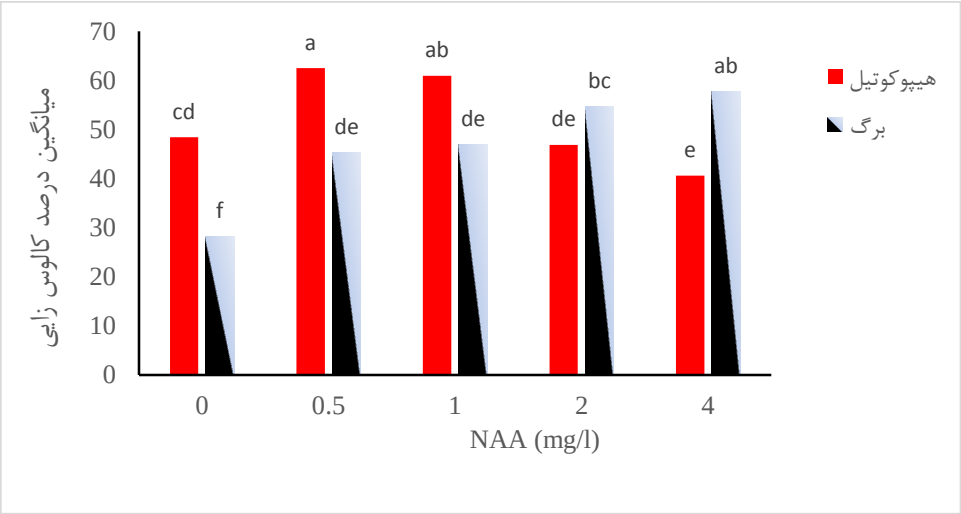

شکل ۴-۱۰- اثر متقابل سه‌گانه نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون‌هایBAP و NAA بر میانگین درصد کالوس-زایی رازیانه

این تفاوت میزان کالوس‌زایی به نوع ریزنمونه، برهمکنش بین هر ریزنمونه و غلظت هورمون بستگی دارد که احتمالا غلظت‌های بالاتر هورمون بنزیل آمینوپورین برهمکنش مثبت‌تری نسبت به غلظت‌های کمتر همین هورمون با ریزنمونه برگ دارند. درصورتی که در ریزنمونه هیپوکوتیل عکس این قضیه اتفاق افتاده است. همان‌طورکه قبلا گفته شد انتخاب یک ریزنمونه و مرحله مورفولوژیکی یک ریزنمونه به همراه انتخاب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مناسب، تاثیر چشمگیری بر القاء کالوس و باززایی نوساقه‌ها دارد (خاور و همکاران، ۲۰۰۵). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در اثر متقابل ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون




شکل ۴-۱۱- اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمونBAP بر میانگین درصد کالوس‌زایی رازیانه

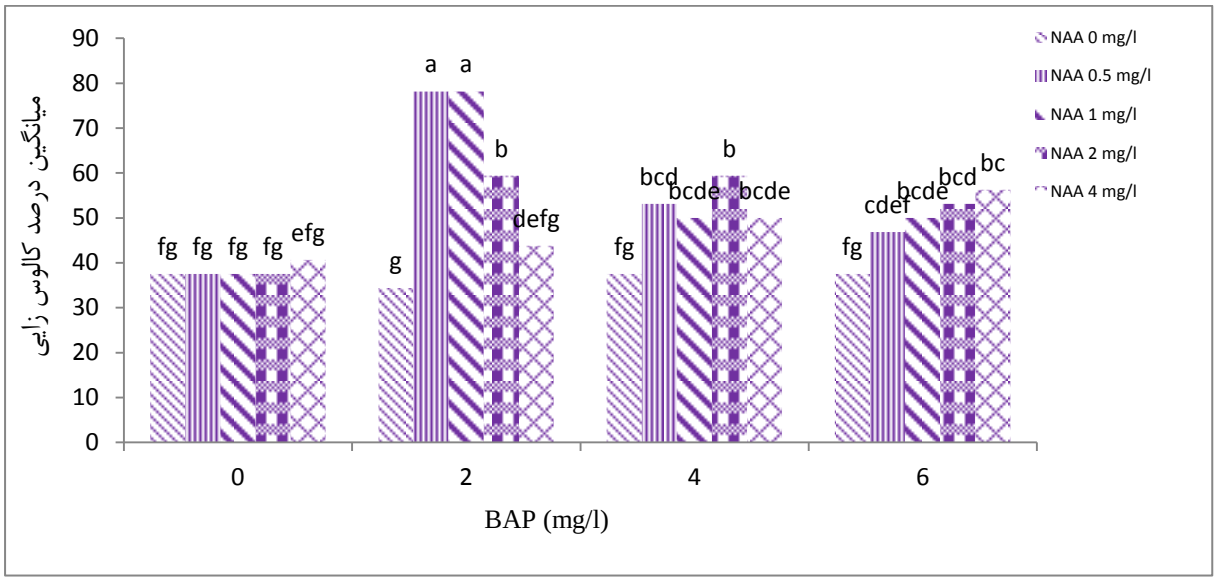
نفتالین‌استیک‌اسید نیز نشان می‌دهد که بیشترین میزان کالوس‌زایی از ریزنمونه هیپوکوتیل با غلظت هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید به میزان ۶۲/۵ درصد بدست آمد که البته از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با ریزنمونه هیپوکوتیل با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید و ریزنمونه برگ با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید نشان نداد (شکل۴-۱۲). نتایج نشان داد که در ریزنمونه برگ غلظت‌های بالاتر هورمون نفتالین‌استیک‌اسید میزان کالوس بیشتری تولید می‌کند، به‌طوری که از غلظت صفر میلی‌گرم (شاهد) این هورمون تا غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر میزان کالوس‌زایی روند صعودی داشته است. درصورتی‌که میزان کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل ابتدا دارای روند صعودی بوده سپس از یک غلظت خاص به بعد روند کالوس‌زایی نزولی می‌شود. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف دو هورمون بنزیل‌آمینوپورین و نفتالین‌استیک‌اسید نشان داد




شکل ۴-۱۲- اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون NAA برمیانگین درصد کالوس‌زایی

که بیشترین میزان کالوس‌زایی از ترکیب غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل‌آمینوپورین و غلظت-های ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید به میزان (۷۸/۱۳) درصد بدست می‌آید (۴-۱۳). نتایج نشان داد که مصرف هر کدام از این دو هورمون به‌تنهایی از نظر میزان کالوس‌زایی تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نشان نمی‌دهد، که این موضوع نشان دهنده‌ی برهمکنش متقابل معنی‌دار این دو هورمون در کالوس‌زایی است و این برهمکنش متقابل دو هورمون توسط باقری و همکاران نیز گزارش شده است. تنظیم‌کننده‌های رشدی نفتالین‌استیک‌اسید و بنزیل‌آمینوپورین بر القای کالوس و تداوم رشد آن مؤثراست (باقری و همکاران، ۱۳۹۲). در این تحقیق کالوس‌های حاصل از تیمارهای هورمون BAP به‌تنهایی (۴-۱۵)، دچار پدیده‌ی شیشه‌ای[1] شدن شده و قادر به شاخه‌زایی نبوده‌اند، یا شاخه‌های ایجاد شده دارای ظاهر شکننده، شیشه‌ای و آبکی می‌شود. در بسیاری از گونه‌ها شیشه‌ای شدن ممکن است با علائم ظاهری قابل شناسایی و تشخیص نباشد.

1-Vertification




شکل ۴-۱۳- اثر متقابل هورمون‌های BAP و NAA برمیانگین درصد کالوس‌زایی گیاه رازیانه

شکل ۴-۱۴-کالوس‌زایی ریزنمونه برگ رازیانه

برای مثال اتصال دسته‌های آوندی به صورت ضعیف ایجاد می‌گردد و یا باعث تولید لایه واکسی غیر نرمال می‌شود. پدیده شیشه‌ای شدن در اثر تجمع اتیلن، غلظت پایین آگار در محیط‌کشت، دزهای بالای سیتوکینین برون‌زا و غیره ایجاد می‌گردد و منجر به کاهش تولید گیاهچه‌های باززایی شده می‌شود (لشم ۱۹۸۳؛ میرا و همکاران ،۱۹۸۳). به نظر می‌رسد که در بین تنظیم کننده‌های رشد، گروه سیتوکینین‌ها و

در بین سیتوکینین‌ها، BAP درعارضه شیشه‌ای شدن عامل بسیار مهمی باشد و هر اندازه غلظت آن افزایش یابد، به همان اندازه نیز شیشه‌ای شدن بیشتر می‌شود (کورس و همکاران،۱۹۸۷).

در تحقیقی که کورس و همکاران (۲۰۰۲) انجام دادند، دریافتند که وجود تنظیم‌کننده رشدBAP در محیط‌کشت باعث القای پدیده شیشه‌ای شدن در کشت‌بافت سیب می‌گردد. نتایج این آزمایش در مورد تأثیر BAP در القای پدیده شیشه‌ای شدن، نتایج گنکوو (۱۹۹۵) در مورد مؤثر بودن اثرات سایتوکینین‌های مختلف در القای پدیده شیشه‌ای شدن در کشت بافت میخک را تایید می‌کند.

شکل ۴-۱۵- نمونه‌ای از کالوس‌های شیشه‌ای شده ریزنمونه برگ

### ۴-۲- بررسی باززایی و روز تا شاخه‌زایی در محیط با ترکیب هورمونی BAP و NAA

برای صفت روز تا شاخه‌زایی، اولین روزی که نخستین شاخه روی هرکالوس مشاهده شد مدنظر است که این فاصله بین اولین تا آخرین ریزنمونه که شروع به شاخه‌زایی نمودند ۱۴ روز بوده است، به‌طوری‌که اولین شاخه‌زایی ۲۸ روز و آخرین شاخه‌زایی ۴۲ روز بعد از انتقال کالوس‌ها به محیط باززایی مشاهده شد.

ترکیب هورمونی محیط باززایی این تحقیق غلظت یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آمینوپورین و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید بود. بیشترین درصد باززایی کالوس‌های حاصل از تیمار هورمونی بنزیل-آمینوپورین و نفتالین‌استیک‌اسید مربوط به تیمار هورمونی (BAP ۲ و NAA ۱) برای ریزنمونه هیپوکوتیل به میزان ۱۰۰ درصد بود که در میانگین فاصله زمانی ۳۴/۲۵ روز نخستین شاخه‌ها مشاهده شدند. در صورتی که میزان باززایی ریزنمونه برگ حاصل از تیمار هورمونی(BAP ۲ و NAA ۱) ، ۵۱/۲۵ درصد در میانگین فاصله زمانی ۳۶/۷۵ روزحاصل شد. همچنین بیشترین میزان باززایی کالوس‌های حاصل از تیمار هورمونی بنزیل‌آمینوپورین و ایندول‌بوتیریک‌اسید مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل با تیمار هورمونی (BAP ۲ و IBA ۱) به میزان ۸۷/۵ درصد بدست آمد و اولین شاخه‌زایی در میانگین فاصله زمانی ۳۰ روز مشاهده شد. در حالی که کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ در تیمار هورمونی (BAP ۲ و NAA ۱) به میزان ۵۰ درصد باززایی نشان دادند و اولین شاخه‌زایی در میانگین فاصله زمانی۳۳ روز حاصل شد. بیشترین میزان باززایی کالوس‌های حاصل از ترکیب هورمونی تیدیازرون و نفتالین‌استیک‌اسید از ریزنمونه هیپوکوتیل با تیمار هورمونی (TDZ ۲ و NAA ۱) به میزان ۸۱/۲۵ درصد بدست آمد و اولین شاخه‌زایی در میانگین فاصله زمانی ۲۹/۷۵ روز مشاهده شد. البته ریزنمونه برگ در تیمار هورمونی (TDZ ۲ و NAA ۱) به میزان ۲۵ درصد باززایی نمود که اولین شاخه‌زایی در میانگین فاصله زمانی ۳۳ روز مشاهده شد.

باززایی ۱۰۰ درصد در محیط با ترکیب هورمونی نفتالین‌استیک‌اسید و بنزیل‌آمینوپورین

(۱BAP، NAA ۱) توسط آنزیدی و همکاران قبلا گزارش شد (آنزیدی و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین ترکیب این دو هورمون برای شاخه‌زایی زیرسیاه نیز مثبت گزارش داده شد به‌طوری که غلظت۰/۲ نفتالین‌استیک‌اسید در ترکیب با غلظت‌های ۰/۲ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل‌آمینوپورین بهترین ترکیبات شاخه‌زایی معرفی شدند (ابراهیمی و همکاران ۲۰۰۳).

در آزمایشات قبلی انجام شده بر روی گیاه رازیانه از ریزنمونه برگ تا مرحله‌ی کالوس‌زایی استفاده شده بود و به‌دلیل حجم کوچک، این کالوس‌ها، در همین مرحله حذف شدند (سرخیل و همکاران، ۱۳۸۸)، که این موضوع احتمالا به‌دلیل نوع هورمون‌های بکاررفته و بر همنکش این هورمون‌ها در ریزنمونه برگ بوده است.

باززایی به دلیل خاصیت پرتوانی سلول‌ها امکان پذیر است. پرتوانی به توانایی سلول‌های گیاهی در تبدیل شدن به گیاه کامل از طریق فرآیندهای مشخص و تحت شرایط رشدی مناسب اطلاق می‌گردد. گیاه باززا شده کاملا مشابه گیاهی است که سلول‌های آن در باززایی مورد استفاده قرار گرفته‌است. در آزمایشات باززایی معمولاً استفاده از بخش‌های هوایی برای تولید شاخساره‌های نابجا رایج‌تر است و نتایج مطلوب‌تری نیز دارد. در این میان قطعات هیپوکوتیل بدلیل قابلیت رشد سریع و عدم تمایزیابی شدید به سمت اندام‌ها بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند (دی‌اکسین وگنزالس، ۱۹۹۶; دودس و روبرتث، ۱۹۸۷).

اندام‌زایی یک فرآیند فیزیولوژیکی و بیوشمیایی پیچیده‌ای است که مرتبط با تغییرات آنزیمی و هورمون-های درون‌زا است (تیان و همکاران، ۲۰۰۳). باززایی موفق به عوامل متعددی از جمله نوع ریزنمونه، ژنوتیپ، محیط‌کشت مورد استفاده و ترکیبات هورمونی برای باززایی بستگی دارد. باززایی یک فرآیند فوق‌العاده پیچیده است که عوامل متعدد کمی و کیفی مانند خصوصیات ژنتیکی گیاه، موقعیت اولیه ریزنمونه روی گیاه، سن ریزنمونه، فصل سال، میزان هورمون‌های درون‌زا، اندازه ریزنمونه، مقدار مواد تنظیم کننده‌رشد و غیره بر آن تأثیر می‌گذارند (باقری ۱۹۷۷). در آزمایشات باززایی نسبت اکسین به سایتوکینین مهم است. با کاهش اکسین و افزایش سایتوکینین در بعضی گونه‌ها، جوانه تشکیل می‌شود. بنابراین، با تغییر مقدار دو تنظیم‌کننده رشد در محیط کشت، می‌توان قدرت ریخت‌زایی در ریزنمونه‌ها را به میزان قابل‌توجهی کنترل نمود.

شکل ۴-۱۶- گیاه باززار شده رازیانه با تیمار هورمونی BAP ، NAA در محیط باززایی

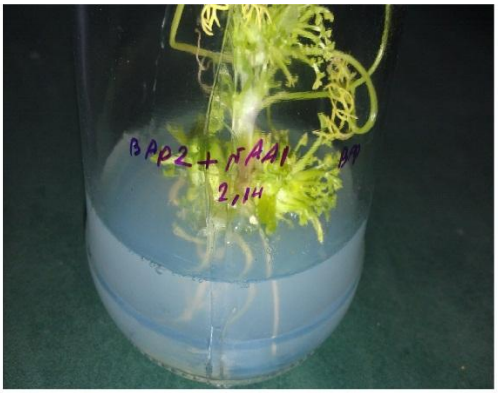
### ۴-۳- بررسی ریشه‌زایی

محیط ریشه‌زایی این تحقیق حاوی غلظت یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین‌استیک‌اسید بود. کالوس‌های حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل به میزان ۷۵ درصد و کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ به میزان ۵۰ درصد در این غلظت هورمونی ریشه‌زایی نمودند. کارگر و همکاران (۱۳۹۰) ریشه‌زایی رازیانه را با استفاده از ریزنمونه ساقه بدون تیمار هورمونی و همچنین ریزنمونه ریشه با تیمار هورمونی ۰/۱ گرم در لیتر کینتین گزارش کردند.

القای ریشه‌زایی ریزنمونه توسط اکسین‌ها پاسخ متعارفی است که بسته به گیاه، ریزنمونه و ژنوتیپ در مدت زمان نسبتا متفاوتی در حضور هورمون نفتالین‌استیک‌اسید مشاهد می‌شود. دو هورمون نفتالین-استیک‌اسید و ایندول‌بوتیریک‌اسید به‌عنوان اکسین‌های مصنوعی پایدار غیرفنوکسی در محیط‌های‌کشت

گیاهی برای ایجاد ریشه در اکثر گونه‌ها به‌کار می‌رود (دودس و روبرتث، ۱۹۸۷; دبناس و همکاران، ۲۰۰۶). بنا به گزارش بارکلو و همکاران (۱۹۸۸) نوک شاخساره‌ها محل تولید و سنتز اکسین بوده که وقتی به سمت قسمت قاعده ساقه حرکت می‌کند، باعث ریزوژنز و تحریک تولید ریشه می‌شود. با این وجود، کیفیت شاخساره در مرحله ازدیاد هم عامل تعیین کننده در موفقیت ریشه‌دهی است(بارکلو و همکاران، ۱۹۸۸).

در مورد گیاه رازیانه همزمان با تولید و رشد ریشه، شاخساره‌های جدید در محیط ریشه‌زایی رشد بسیار سریعی نشان دادند، به طوری‌که نیازی به کاربرد هورمون رشد جیبرلین نبود. ازاین‌رو امکان انتقال سریع به محیط برون‌شیشه (*ex vitro*) در مدت زمان نسبتا کوتاهی بعد از تشکیل ریشه امکان‌پذیر شد.




شکل ۴-۱۷-ریشه‌زایی گیاه رازیانه در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر NAA

### ۴-۴- سازگاری به شرایط بیرون از آزمایشگاه

یکی از پیچیدگی‌های کشت‌بافت گیاهان خانواده چتریان استقرار ضعیف آنها در خاک بعد از کشت درون شیشه است، که دلیل این استقرار ضعیف آمادگی آنها برای پوسیدگی‌های قارچی و زرد شدن است. همان-گونه که گیاهچه‌های باززایی شده زیره سبز، گیاه خلال‌دندان پس از ۲ هفته انتقال به خاک زرد شدند (ماکونگا و همکاران، ۲۰۰۳؛ نوکواندا و همکاران، ۲۰۰۵; تافیک و نوگا، ۲۰۰۱). گیاهچه‌های باززایی شده

رازیانه نیز پس از انتقال به خاک رشد مطلوبی را نشان نداده و بعد از ۵ روز به‌شدت زرد و پژمرده شده‌اند. احتمالا این موضوع به‌خاطر ظریف، نازک و کوچک بودن برگ‌های این گیاه می‌باشد، که نسبت به تغییر شرایط حساسیت نشان داده و زرد رنگ می‌شوند. بنابراین، مطالعه و بررسی دقیق‌تر چگونگی سازگار نمودن گیاهان باززایی شده حاصل از کشت‌بافت خانواده چتریان در خاک، در پژوهش‌های بعدی ضروری به‌نظر می‌رسد.

شکل۴-۱۸- گیاه رازیانه در مرحله عادت دهی به هوای گلخانه

## نتیجه‌گیری نهایی

ریزنمونه‌های مختلف در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای به ترکیبات هورمونی مختلف عکس‌العمل متفاوتی نشان می‌دهند، که این عکس‌العمل متفاوت به عوامل متعددی از قبیل ژنوتیپ، مقادیر سطوح هورمون‌های داخلی، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های خارجی رشد و برهمکنش اثر این عوامل همگی بر چگونگی پاسخ ریزنمونه موثر می‌باشد. با مقایسه سه آزمایش کالوس‌زایی دو ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ با ترکیبات هورمونی (IBA، BAP) و (NAA، BAP) و (NAA، TDZ) می‌توان نتیجه گرفت که ریزنمونه هیپوکوتیل نسبت به ریزنمونه برگ پتانسیل کالوس‌زایی بیشتری داشته و پدیده‌ی شیشه‌ای شدن در کالوس‌های حاصل از این ریزنمونه بسیار کمتر از ریزنمونه برگ مشاهده شده است و همچنین برخلاف ریزنمونه برگ که بعضی از ریزنمونه‌ها به کالوس‌زایی واکنش نشان نداده و فقط در محیط کشت به رشد خود ادامه می-دادند، در این ریزنمونه این اتفاق مشاهده نشد.

کارکرد جدید این تحقیق استفاده از ریزنمونه برگ می‌باشد که با وجود نازک و ظریف بودن برگ‌های گیاه رازیانه کار کردن با این برگ‌ها نیاز به دقت و ظرافت کاری بالایی دارد، به‌طوری‌که این برگ‌های حساس در حین نمونه‌گیری و بریدن نمونه‌ها با اسکالپل یا قیچی آسیب نبینند و حتی دقت در انتخاب سایز ریزنمونه نیز بسیار مهم است. اگرچه برای هر ریزنمونه بدون توجه به بافت باید در حین کات کردن دقت کافی شود.

در این آزمایش نیز می‌توان بیان نمود که ریزنمونه هیپوکوتیل به جهت پتانسیل کالوس‌زایی بالاتر و راحتی کار با آن ریزنمونه مناسب‌تری جهت ادامه کارهای کشت‌بافتی پیشنهاد می‌شود. بهترین ترکیب هورمونی این تحقیق جهت کالوس‌زایی ترکیب NAA،BAP است که میزان کالوس‌زایی ۱۰۰ درصد داشته است. با مقایسه دو نوع هورمون اکسین شامل نفتالین‌استیک‌اسید و ایندول‌بوتیریک‌اسید در ترکیب با هورمون سیتوکینین بنزیل‌آمینوپورین می‌توان نتیجه گرفت که برای ریزنمونه هیپوکوتیل برهمکنش

نفتالین‌استیک‌اسید در ترکیب با بنزیل‌آمینو پورین در غلظت کمتر این اکسین میزان کالوس بیشتری تولید کرده است، ولی برای ریزنمونه برگ هر دو نوع اکسین تقریبا در غلظت‌های مشابه بیشترین میزان کالوس‌زایی را داشته‌اند، ولی نفتالین‌استیک‌اسید کالوس‌زایی بیشتری داشته است.

با مقایسه دو نوع هورمون سیتوکنین بنزیل‌آمینوپورین و تیدیازرون در ترکیب با هورمون اکسین نفتالین-استیک‌اسید برای ریزنمونه هیپوکوتیل، گرچه غلظت بهترین ترکیب در هر دو آزمایش یکسان بوده است ولی بنزیل‌آمینوپورین مقدار کالوس‌زایی بیشتری داشته و البته اختلاف میزان کالوس‌زایی ترکیبات مختلف این هورمون با نفتالین‌استیک‌اسید خیلی نوسان داشته است. برای ریزنمونه برگ گرچه در بعضی ترکیب‌ها بنزیل‌آمینوپورین بهتر عمل کرده ولی عملکرد کلی تیدیازرون بهتر بوده و نمودار نوسان کمتری داشته است. تعادل اکسین به سیتوکینین همچنین تعادل بین تنظیم کننده‌های داخلی رشد و تنظیم کننده‌های خارجی رشد باعث تعیین مسیر باززایی می‌شود.

با توجه به مطالب ذکر شده می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت در توان کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها می‌تواند مربوط به تفاوت فعالیت‌های متابولیکی و مقدار تنظیم‌کننده‌های درون‌زا و تنظیم‌کننده‌های رشد بیرونی باشد، و تیمار با هورمون‌های اکسین و سیتوکنین برون‌زا شاید بتواند به‌عنوان یک وضعیت تنش‌زا توسط بافت تلقی شود و روند تقسیمات معمولی را به سوی کالوس‌زایی متحول سازد. مشاهدات عمومی نشان می‌دهد که برای القا و افزایش کالوس‌زایی وجود اکسین و سیتوکینین ضروری است.

**پیشنهادات**

۱- استفاده از تیمارهای هورمونی مناسب جهت تولید گیاهچه‌های لازم برای ریزنمونه، به دلیل اینکه گیاهچه‌های قوی‌تر ریزنمونه‌های با کیفیت‌تری تولید می‌نمایند.

۲- استفاده از ریزنمونه هیپوکوتیل برای کارهای انتقال ژن و مهندسی ژنتیک به دلیل اینکه ایجاد کالوس‌های با کیفیت بهتر و مدت زمان کالوس‌زایی و باززایی سریعتر و همچنین قدرت باززایی مستقیم این ریزنمونه

۳- بررسی تاثیر ترکیبات هورمونی تیدیازرون و ایندول‌بوتیریک اسید بر کالوس‌زایی رازیانه

۴- بررسی شرایط عادت‌دهی گیاهچه‌ها به شرایط بیرون

# فهرست منابع

امید بیگی، ر. (۱۳۸۷). **"ضرورت استفاده از رازیانه اصلاح شده"** فصلنامه پژوهش و سازندگی.ش ۴۴. ص ۴۶-۴۰.

امید بیگی، ر.( ۱۳۷۹). **"رهیافت‌های ا ان دارویی(۲)"**. ققنوس. ص ۷۸-۷۰.

باقری، ع. مشیری، ف. خسروی‌نیا، س. (۱۳۹۲)" **بررسی عکس العمل ریزنمونه و تنظیم کننده‌های رشدی بر کالوس‌زایی، ریشه‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای زیره سیاه ایرانی"** مجله علمی-پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، سال سوم، ش پنجم، پاییز و زمستان.ص ۶۱-۵۳.

باقری، ه. آزادی ، پ. (۱۳۸۱) **" کشت بافت گیاهی"** (تکنیک ها و آزمایش ها تالیف رابرتا اچ .اسمیت). چاپ اول، انتشارات جهاد دانشگاهی، مشهد، ص ۱۵۴.

بخردی، ر. (۱۳۸۳) . **"گیاه درمانی نوین"**. مترجم.ص ۷۳-۶۱.

بیگدلی، م. (۱۳۸۴)."**کشت و اهلی کردن ۵ گونه گیاهی کوچک سفید . زیره سبز- کاسنی**- رازیانه و **اسفرزه در استان تهران"**. دفتر نشر و فرهنگ اسلامی

سادات نوری، س ا. مرتضویان، س م م. قمری زارع، ع. امیدی، م. حوری، م. (۱۳۹۲)" **بررسی کال‌زایی و جنین‌زایی سوماتیکی در زیره سیاه"** مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، دوره ۵، شماره ۲.ص ۱۸-۱.

سرخیل پ، امیدی م.، پیغمبری س ع. دوازده امامی س، (۱۳۸۸) **" تاثیر هورمونی و ریزنمونه در بر کالزایی، باززایی و کشت سوسپانسیون سلولی در رازیانه *(Foeniculum vulgare* (Mill."** فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، شماره۳ ، جلد ۲۵ ، ۳۷۵-۳۶۴.

سفیدکن، ف. (۱۳۸۰). **"تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران "**. موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع.

سنچولی، م. خالقی، د. رمضانی مقدم، م ر. آهنی، م.(۱۳۹۱). **"تاثیر مقادیر مختلف دو هورمون اکسین و سیتوکینین بر اندام‌زایی گیاه آنغوزه در شرایط کشت بافت *Ferula ass foetida*"** . همایش ملی فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی.ص ۲۷.

سید طباطبایی، ب . امیدی، م. (۱۳۸۸) **"کشت بافت و سلول گیاهی"**. انتشارات تهران. ص ۳۶۸.

ضیائی‌فرد، ز. میان آبادی، م. اقدسی، م. (۱۳۹۲) **" نقش تیمارهای هورمونی در باززایی گیاهان کامل از ریزنمونه های گیاه جاشیر در شرایط درون شیشه ای"** مجله پژوهش های تولید گیاهی، جلد ۲۰. شماره ۱. ص ۴۸-۳۵.

خطیب‌زاده، ر. عزیزی، م. آرویی، ح. فارسی، م. (۱۳۸۸)**" مطالعه اثر نوع ریزنمونه، ترکیب محیط-کشت و سطوح تنظیم کننده‌های رشد بر کال‌زایی در گیاه دارویی *Levishicum officinale* Koch"** ششمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. ص ۵-۱.

حسندخت، م. ابراهیمی، ر (۱۳۸۵)، **"مبانی کشت بافت گیاهی"** انتشارات مرز دانش. ص ۳۲۸.

ولی زاده، م . صفرنژاد، ع. نعمت زاده، ق.کاظمی تبار، س.ک و حمیدی، ح. (۱۳۸۷). **"باززایی زیره پارسی (*Bunium persicum* Boiss) با استفاده از ریزنمونه جنین برش خورده"** :نهال و بذر. ش ۲۴: ۳۸۹-۳۹۷.

مجد، ا. پورمحمدفتالی، ش. میرزایی، م. (۱۳۸۹) **" بررسی اثرات برخی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر رویان‌زایی پیکری و بافت شناسی مراحل آن در گیاه گوجه فرنگی واریته Y"** فصلنامه پژوهش‌های علوم گیاهی، ش ۲۰، سال پنجم، شماره۴ .۵۶-۴۹.

مداح، م. (۱۳۷۹). پایان نامه کارشناسی ارشد. **"بررسی تاثیر پرتوهای فرابنفش بر روی ویژگی‌های ترشحی و تکوینی اندام‌های رویشی و زایشی و مقدار نوع اسانس گیاه رازیانه"**

مشایخی، ک. ( ۱۳۸۶) **" جنین زایی رویشی گیاهی"** ا فراغی،ص ۴۸۳ .

مظفریان، و. (۱۳۷۵). **"فرهنگ نام های گیاهان ایران"**. موسسه فرهنگ معاصر.

موافقی، ع . حبیبی، ق . علی اصغر پور، م. (۱۳۸۷) **"باززایی گیاه دارویی کور *Capparis spinosa* L. با استفاده از کشت قطعات هیپوکوتیل"** مجله زیست شناسی ایران، شماره ۲ ، جلد ۲۱. ۲۸۹-۲۹۷.

میر حیدر، ح. (۱۳۸۰). **"معارف گیاهی"**. دفتر نشر فرهنگ اسلامی.

کارگر، م. سجادی، ر. مبشری، س. صادقی، ح. بهروزنام، ب . (۱۳۹۰)، **"مطالعه کشت بافت و اندام‌زایی در قطعات جداکشت رازیانه"** همایش ملی مدیریت کشاورزی. ص ۷-۱.

قاسمیان، خ. ناظری، س. چهرگانی راد، ع. میرزایی اصل، ا. (۱۳۹۱) **" مراحل رویان زایی** سوماتیکی حاصل از رویان بذری در گیاه وشا، مجله سلول و بافت" جلد ۳. شماره ۱: ۲۱-۲۷.

قهرمان، ا. (۱۳۷۳). **" کورموفیت های ایران"** نشر دانشگاهی . ص ۷۶۴.

فارسی، م. ذوالعلی، ج. (۱۳۸۷) **"اصول بیوتکنولوژی گیاهی"** انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.ص ۴۹۵.

Abbasi B., Saxena P, .K. and Murch S .J., Liu C.Z. (2007) **"Echinacea biotechnology**: **Challenges and opportunities"** In Vitro Cell Development Biology 43: 481-492.

Anzidei M., Vivona L., Schiff S. and Bennici A. (1996) **"In vitro culture of Foeniculum vulgare: callus characteristics in relation to morphogenesis"**. Plant Cell Tiss Org Cult 45:263–268.

Anzidie M., Bennici, A., Schiff S., Tan, C. and Mori B. (2000)**." Organogenesis and somatic embryogenesis in Foeniculum vulgare: histological observation of developing embryogenesis callus"** Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 61- 69.

Archana G. Sarish, T., Dhingra V. and Narasu M.L. (2002) **"Influence of different strains of Agrobacterium rhizogenes on induction of hairy roots and artemisinin production in Artemisia annua"** Current Science. 81: 455–458.

Azza A., Tawfic A.A. and Noga G. (2001) **"Adventitious shoot proliferation from hypocotyl and intermodal stem explants of cumin"** Plant Cell Tissue. Organ Culture. 66: 141-147.

Bagheri A., Saffari M. (1997) **"In vitro culture of higher plants".** Ferdowsi university of mashhad press. 406 pages (In Farsi).

Barcelo C.J., Nicolas R.G., Sabater G.B. and Sanchez, T.R. (1988). **"Fisiologia Vegetal**. **Piramide**",

Bayliss M. (1985) **"Control of cell division in cultured cells"** In Bryant JA and Francis D (eds) The cell division cycle in plants. Cambridge: Cambridge University Press. 157-178.

Bennici A., Anzidei M. and Vendramin G. (2004) **"Genetic stability and uniformity of Foeniculum vulgar Mil. Regeneration of plants through organogenesis and somatic embryogenesis"** Plant Science. 166: 221-227.

Debnath M. Malik, C.P. and Bisen P.S. (2006) **"Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines"** Curr. Pharm. Biotechnol., 7: 33-49.

Del-Poza J.c., Lopez-Matas M.A., Ramirez-Parra E.and Gutierrez C. (2005) **"Hormon control of the plant cell cycle"** Physiologia Plantarum 123: 173-183.

Dixon R.A., and Gonzales R.A. (1996) **"Plant cell culture: a practical approach"** IRL Press, Oxford, UK.

Dodds J.H., and Roberts L.W. (1987) **"Experiments in plant tissue culture"** Cambridge Unversity Press, UK.

Ebrahimie E., Habashi A., Ghareyazie B., Ghannadha M. and Mohammadie M., (2003) "**A rapid and efficient method for regeneration of plantlets from embryo explants of cumin (*Cuminum cyminum*)"** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75: 19-25.

Epstein E and Ludwig-Muller J. (1993). **"Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport"**. Physiologia Plantarum. 88:382-389.

Gabriella P., Barbara M., Andrea S.and Renato M (2001) **"In vitro root differentiation and essential-oil accumulation in Angelica archangelica"** In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant . 37.6 .763-766.

Genkov T., Ivanova I. (1995) **"Effect of cytokinin-active phenylurea derivatives on shoot multiplication, peroxidase and superoxide dimutase activities of in vitro cultured of carnation"** Journal of Plant Physiology. 21: 73-83.

George E.F. (1993) **"Plant propagation by tissue culture"** (part I:The technology). Exegetics.

Ghamari Zare A. (2007) **"In vitro micropropagation of Denderostellera lessertii Van Tiegh"**Pajouhesh And Sazandegi (In Farsi).

Han Y., Jin X., Wu F.and Zhang G.(2011) **"Genotypic differences in callus induction and plantregeneration from mature embryos of barley *(Hordeum vulgare* L.)"** JZUS.12(5): 399-407.

Hanault G., Mattar A. (1995) **"Enhancement of somatic embryogenesis frequency by gibberellic acid in fennel"** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 41: 171-176.

Hunault G., Desmarest P. and Manoir J. D. (1989). **"*Foeniculum vulgare* Miller"**: cell culture, regeneration and the production of anethole pp. 185-212. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry 7:Medicinal and Aromatic Plants II. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Ikeda I.,wai M., Umehara M., Satoh S. and Kamada H. (2003). **"Stress induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of Arabidopsis thaliana**" The Plant Journal 34: 107- 114.

Jana S. and Shekhawat G. S. (2001) **"In vitro regeneration of Anethum graveolens**, **antioxidative enzymes during organogenesis and RAPD analysis for clonal fidelity"**.Biologia Plantarum. 1-6.

Jones M. P. A., Yi Z., Murch S. J. and Saxena P. K. (2007). **"Thidiazuron-induced regeneration of Echinacea purpurea L. micropropagation in solid and liquid culture systems".** Plant Cell Rep. 26:13–19.

Khawar K.M., Sarýhan E., Sevimay C.and Cocu S**. "Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L**" Period Biol. 2005; 107: 113-116.

Koroch A., Juliani H.R., Kapteyn J. and Simon J.E (2002) **"In vitro regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants"** Plant Cell Tiss. Org. Cult. 69: 79-83.

Khawar K.M., Sarýhan E., Sevimay C.and Cocu S.(2005) **"Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L"** Period Biol.; 107: 113-116.

Koroch A., Juliani H.R., Kapteyn J. and Simon J.E (2002) **"In vitro regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants"** Plant Cell Tiss. Org. Cult. 69: 79-83.

Lawless J. (1992). **"The encyclopedia of essential oils"** Element Books Lt, Shaftesbur ,United Of Kigdom, 256 pages.

Leshem B. (1983). **" Growth of carnation meristems in vitro: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation"** Annual Botanical 52: 413–415.

Magyar-Tabori K., Dobranszki J., Teixeira da., Silva JA., et al.(2010) **"The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple"** Plant Cell Tiss Organ Cult; 101: 251–267.

Makunga N.P., Jager A.K. and Staden J. (2003). **"Micropropagation of *Thapsia garganica* a medicinal plant"** Plant Cell Reports. 21: 967- 973.

Maria C. F., Francesco C. and Angela C.(2012) **"Efficient plant regeneration via somatic embryogenesis in bulbing fennel using immature flower explants"** In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant DOI 10.1007/s11627-012-9441-4

Meira Z., Meir G. and Halevy A.H. (1983). **"Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro"** Plant Cell Tissue and Organ Culture 2: 55-65.

Mulabagal V. and Tsay H.S. (2004). **"Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites"** International Journal of Applied Science and Engineering. 2:29-48.

Murashige T. and Skoog F. (1962) **"A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures"** Physiology of plant 15: 473-497.

Murthy BNS., Murch SJ. and Saxena PK. (1995):**" Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea* L.)"** endogenous growth

regulator levels and significance of cotyledons. Phys. Plant 94: 268–276.

Navalon A., Blanc R and Vilchez Jl.(1997). **" Determination of 1-naphthylacetic acid in commercial formulations and natural waters by solid-phase spectrofluorimetry "** Mikcrochim :Acta, 126. 33–38.

Neibaur I., Gallo M. and Altpeter F. (2008) **"The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz)"** In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant.44(6):480-486.

Neumann K. (2006) **"Some studies on somatic embryogenesis: A tool in plant biotechnology"** Plant biotechnology and its applications in tissue culture.I. K. International. New Delhi.1-14.

Nikam T.D. and Shitole M.G. (1999). **"In vitro culture of Safflower, L. cv. Bhima**: **initiation, growth optimization and organogenesis"** Plant Cell Tissue and Organ Culture 5: 15-22.

Nokwanda P., Makunga Anna K., Jager and Johannes V.S. (2005) **."An improved system for the in vitro regeneration of *thapsia garganica* via direct organogenesis– influence of auxins and cytokinins"** Plant Cell Tissue. Organ Culture. 82: 271- 28

Otroshy M., Pakravan V., Enteshary SH., Mokhtari A. and Roozbeh SH.(2013). **"Micropropagation of *bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. via indirect somatic embryogenesis".** Agricultural Engineering and Biotechnology: Vol. 1 Iss. 3, PP. 48-53.

Pasternak T.P., Prinsen E., Ayaydin F., Miskolczi P., Potters G., Asard H., Van Onckelen H. A., Dudits D. and Fehér A. (2002). **"The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa**" Plant physiology 129: 1807.

Huetteman C.A. and. Preece J.E. (1993). **"Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture"**. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 33(2): 105-119.

Piri K.h., Nazarian F. (2001). **"Plant Tissue Culture"** Bu Ali Sina Press.

Shailendra N, S., Ishan U, K. and Rohit S. (2011) **"Organogenesis in anise*(Pimpinellanisuma* L.) "**Spices and Aromatic Crops . 21:59-63.

Shinoyama H., Nomura Y., Tsuchiya T. and Kazuma T. A.(2004) **"simple and efficient method for somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of Chrysanthemum (dendranthema× grandiflorum) (Ramat.) Kitamura**)" Plant Bio Tech. 21(1):25-33.

Simola L., Hrry Waris, .( 2000) **"apineer in somatic embryogenesis, In: Tain SM, Gupta PK, Newton KJ "**somatic embryogenesis in woody plants; 73: 61-6.

Siatka T.and Kasparova M.(2008)" **Effects of auxins on growth and scopoletin accumulation in cell suspension cultures of *Angelica archangelica* L"** Ceska Slov Farm. 57(1):17-20.

Siddiqui M. W.; Bhattacharjya A.; Chakraborty I. and Dhua R. S. (2011). **"6-benzylaminopurine improves shelf life, organoleptic quality, and health-promoting compounds of fresh-cut broccoli florets".** Journal of Scientific and Industrial Research, 70 (6): 461- 465.

Stahl E., Dumont E. and Jork H. (1975). **"Analyze chromatograhique et microscopique des drogues"** Technique et Documentation, pp: 148-149.

Tarre E., Magioli C., Margis-Pinheiro M. and Martins G.(2004) **"In vitro somatic embryogenesis and adventitious) root initiation have a common origin in (*Solanum melongena* L.)"** Revista Brasil. 27: 79-84.

Tawfic A.A. and Noga G. (2001). **"Adventitious shoot proliferation from hypocotyls and internodal stem explants of cumin"** Plant Cell Tissue. Organ Culture. 66: 141-147

Theiler H. R. and Kagi A.C. (1991) **"Cloning in vitro & somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare* Mill"** (fennel) of 'Zeta fino' and 'Zefa tard.' Acta Horticulture, 300: 287-291.

Tian M., Q. Gu and M. Y. Zhu. (2003). **"The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus"** Plant Sci. 165: 701–707.

Tripathi L. and Tripathi J.N. (2003). **"Role of biotechnology in medicinal plants"** Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2:243-253.

Waileng L.W., LaiKeng C. (2004). **"Plant regeneration from stem nodal segments of Orthosiphon stamineus banth., a medicinal plant with diuretic activity"** In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 40: 115-118.

Wang T.L., Everett N.P., Gould A.R. and Street H.P. (1981). **"Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells"** The effects of cytokinin. Protoplasma 106: 23-35.

Zobayed S. M. A. and Saxena P. K. (2003)**" In vitro regeneration of *echinacea purpurea* l. enhancment of somatic embryogenesis by indolebutric acid and dark pre-incobation. in vitro cell"** Dev. Biol Plant. 39:605–612.

Woo T P., Yong K K., Md R U., Nam I P., Su G K., Sook Y L. and Sang U P.(2010) **"Somatic embryogenesis and plant regeneration of lovage (Levisticum officinale Koch)".**Plant Omics Journal: 3(5):159-161.

**Abstract**

Several factorial experiment was done the base of completely randomized design for optimizing fennel tissue culture condition. In the first experiment the effect of different concentrations of hormones such as Benzyl amino purine (BAP) and Thidiazuron (TDZ) alone or in combination with different concentrations of naphthalene acetic acid (NAA) and indole butyric acid (IBA) was studied on callus induction hypocotyl and leaf explants in MS medium. The highest callus induction (100%) was observe in 2 mg/l BAP and 0.5 mg/l NAA in hypocotyl explants. In next experiment for shoot regeneration the calli of hypocoltyle and leaf explant cultured in MS medium supplemented with 1 mg/l BAP and 0.2 mg/l NAA. The highest shoot regeneration, 100%, was observe of callus derived from 2 mg/l of BAP and 1 mg/l of NAA. The more the number of regenerated plantlets were transferred io rooting medium containing one milligram per liter of NAA. The highest rooting (75%) was observe of plantlets from callus with combined hormonal 2 milligram per liter BAP,1 milligram per liter NAA.

Keywords: callus regeneration, regeneration, Thidiazuron , NAA.

**University of Shahrood**

**Faculty: Agricultural Biotechnology**

# Study on the effects of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in *Foeniculum vulgare*

Esmat Anbaz

Supervisor:

**Dr. Shahrokh Gharanjik**

Advisors:

Dr. Ahmad Gholami

**September 2015**