بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه شاهرود

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات – بیوتکنولوژی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و نوع ریزنمونه بر کالوس‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای گیاه دارویی سرخارگل(*Echinacea purpurea*)

اصغر عرب اسدی

اساتید راهنما:

دکتر شاهرخ قرنجیک

دکتر محمدرضا عامریان

اساتید مشاور:

مهندس مهدی رحیمی

مهندس حسن قربانی قوژدی

شهریور ۱۳۹۲

دانشگاه شاهرود

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات - بیوتکنولوژی

پایان نامه کارشناسی ارشد آقای اصغر عرب اسدی

تحت عنوان: تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و نوع ریزنمونه بر کالوس‌زایی و باززایی درون شیشه‌ای گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

در تاریخ ../../۱۳۹۲ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد مورد ارزیابی و با درجه ..... مورد پذیرش قرار گرفت.

اساتید راهنما	امضاء	اساتید مشاور	امضاء
نام و نام خانوادگی : شاهرخ قرنجیک		نام و نام خانوادگی : مهدی رحیمی	
نام و نام خانوادگی : محمدرضا عامریان		نام و نام خانوادگی :حسن قربانی قوژدی	

اساتید داور	امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء
نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی :	
نام و نام خانوادگی :			

تعهد نامه

اینجانب **اصغر عرب اسدی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و نوع ریزنمونه بر کالوس‌زایی و باززایی گیاه دارویی سرخارگل تحت راهنمائی دکتر شاهرخ قرنجیک متعهد می شوم .

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه 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 صنعتی شاهرود می باشد 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 پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه 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

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

تقدیم به مهربان فرشتگانی که:

لحظات ناب بارور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه‌های

یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آنهاست و وجودم برایشان همه رنج بود و وجودشان برایم همه مهر

تشکر و قدردانی

اگر خزان را امید بهاری نبود، اگر درد را امید شفائی نبود، بی‌شک تلاش که مهم‌ترین عامل سازندگی و رشد انسان است در گرداب تنبلی هلاک می‌گشت. امّا تقدیر این بود، زندگی معنا یابد و آنان‌که می-خواهند همیشه زنده بمانند به تلاشی بزرگ برای رسیدن به امیدی در دوردست واداشته شوند.

سپاس بیکران پروردگار یکتا را که هستی‌مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه‌چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

در پایان از زحمات اساتید راهنما جناب آقای دکتر شاهرخ قرنجیک و دکتر محمدرضا عامریان و اساتید مشاور جناب مهندس قربانی قوژدی و مهندس مهدی رحیمی و دوستان عزیزم جناب آقای مهندس ابوالفضل مسعودی و خانم مهسا جوکار و آقای سعید متین و همچنین کارشناسان آزمایشگاه سرکار خانم مهندس سمیّه فرجی، آقایان مهندس محمّد ابراهیم حسین‌پور، مهندس غلامرضا شاکری، مهندس حسن گلی، مهندس حسین مطهّری‌نژاد و دیگر عزیزانی که مرا در انجام این پایان‌نامه یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایم.

امیدوارم بتوانم در آینده‌ی نزدیک جوابگوی این همه محبّت آنها باشم.

مقالات

Effect of hormones and explant in callus inductio and shoot organogenesis in tissue culture of *Echinacea purpurea*

اصغر عرب اسدی، شاهرخ قرنجیک، محمد رضا عامریان، مهدی رحیمی، حسن قربانی قوژدی

دومین کنگره گیاهان دارویی- اردیبهشت ۱۳۹۲

باززایی غیر مستقیم از ریزنمونه‌های برگی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

اصغر عرب اسدی، شاهرخ قرنجیک، محمد رضا عامریان، مهدی رحیمی، حسن قربانی قوژدی

هشتمین همایش ملّی بیوتکنولوژی و چهارمین همایش ملّی ایمنی‌زیستی ایران-تیر ۱۳۹۲

بررسی تاثیر نوع ریزنمونه و تنظیم کننده های رشد گیاهی برکالوس زایی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea*)

اصغر عرب اسدی، شاهرخ قرنجیک، محمد رضا عامریان، مهدی رحیمی، حسن قربانی قوژدی

هشتمین همایش ملّی بیوتکنولوژی و چهارمین همایش ملّی ایمنی‌زیستی ایران-تیر ۱۳۹۲

چکیده:

به منظور بهینه‌سازی شرایط کشت بافت گیاه دارویی سرخارگل، این تحقیق در قالب چند آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. در آزمایش اوّل اثر غلظت‌های مختلف هورمون-های سیتوکنینی شامل ۶-بنزیل آمینو پورین (BAP) و تیدیازرون (TDZ) و کینتین (KIN) به تنهایی یا در ترکیب با غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسینی شامل نفتالین استیک اسید (NAA) یا ایندول بوتریک اسید (IBA) بر کالوس‌زایی در محیط کشت پایه MS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیشترین مقدار کالوس (۱۰۰٪) در ترکیب‌های هورمونی حاوی TDZ و IBA است. در آزمایش دوّم اثر دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP بر شاخه‌زایی کالوس‌های دو ریزنمونه برگ و دمبرگ مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش بیشترین شاخه‌زایی (۹۲/۸۵٪) در محیط MS حاوی ترکیب‌های هورمونی BAP و NAA در ریزنمونه برگ مشاهده گردید. در آزمایش سوّم اثر غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP و TDZ به تنهایی یا در ترکیب با غلظت‌های مختلف هورمون NAA در شاخه‌زایی ریزنمونه برگ مورد بررسی قرار گرفت که محیط کشت MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بیشترین شاخه‌زایی (۸۵٪) را داشت. درآزمایش چهارم گیاهچه‌های بدست آمده از ترکیب هورمونی دو میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ NAA به محیط MS دارای غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و IBA منتقل شدند که بیشترین تعداد ریشه در هر ریزنمونه (۸/۱۶) در محیط‌های حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA حاصل شد.

کلمات کلیدی: سرخارگل، کالوس‌زایی، شاخه‌زایی، ریشه‌زایی، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

فهرست مطالب **شماره صفحه**

فصل اول: مفدمه و کلیِات ۱

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- مشخصات گیاهشناسی ۵

۱-۳- مشخصات رشدی ۶

۱-۴- نیاز اکولوژیکی ۷

۱-۵- روش کاشت ۸

۱-۶- اهمیّت دارویی ۸

۱-۷- کشت بافت گیاهی ۱۰

۱-۷-۱- ریزازدیادی ۱۲

۱-۷-۲- باززایی از طریق جنین سوماتیکی ۱۲

۱-۷-۳- اندام‌زایی از طریق کالوس ۱۲

۱-۸- اجزای محیط کشت بافت گیاهی ۱۳

۱-۸-۱- ساکارز ۱۴

۱-۸-۲- اسیدیته یا pH محیط کشت ۱۴

۱-۸-۳- عامل ژله کننده ۱۵

۱-۹- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ۱۵

۱-۹-۱- اکسین ۱۶

۱-۹-۲- سیتوکنین ۱۶

فصل دوم: بررسی منابع ۱۸

عوامل موثر بر کشت بافت سرخارگل ۱۹
۲-۱- بذر ۱۹
۲-۱-۱- خواب بذر ۱۹
۲-۱-۲- ضدعفونی بذور ۱۹
۲-۲- نوع ریزنمونه ۲۱
۲-۳- سن ریزنمونه ۲۴
۲-۴- نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد ۲۴
۲-۵- اسیدیته، ساکارز و مواد ژله کننده ۳۱
۲-۶- دوره روشنایی ۳۲
۲-۷- نوع محیط کشت ۳۴
۲-۸- نوع گونه ۳۵
فصل سوم: مواد و روش‌ها ۳۷
۳-۱- تهیه محیط کشت گیاهMS ۳۸
۳-۱-۱- محلول مادری مواد غذایی کم مصرف با غلظت 100X ۳۹
۳-۱-۲- محلول مادری مواد غذایی پر مصرف با غلظت 10X ۳۹
۳-۱-۳- محلول مادری ویتامین‌ها ۳۹
۳-۱-۴- محلول مادری آهن با غلظت10X ۴۰
۳-۱-۵- محلول مادری یدید پتاسیم (ماده غذایی کم مصرف) با غلظت 1000X ۴۰
۳-۱-۶- تهیه محلول مادری MS ۴۰
۳-۲- محیط‌های کشت گیاهی ۴۱

۳-۲-۱- محیط کشت برای کشت بذور و تولید گیاهچه..... ۴۱
۳-۲-۲- محیط‌های القاء کالوس‌زایی..... ۴۱
۳-۲-۳- محیط‌های القاء شاخه‌زایی..... ۴۲
۳-۲-۴- محیط القاء ریشه‌زایی..... ۴۲
۳-۳- طرز تهیه محلولهای ذخیره‌ای هورمون‌های گیاهی..... ۴۲
۳-۴- اندازه گیری pH و افزودن آگار..... ۴۳
۳-۵- تهیه گیاهچه و ریزنمونه..... ۴۴
۳-۵-۱- ضدعفونی و استریل کردن بذور..... ۴۴
۳-۵-۲- کشت بذور و تهیه گیاهچه..... ۴۵
۳-۵-۳- تهیه ریزنمونه و کشت آن‌ها..... ۴۷
۳-۶- آزمایشات کالوس‌زایی..... ۴۹
۳-۶-۱- آزمایشات بررسی درصد کالوس‌زایی..... ۴۹
۳-۶-۲- بررسی درصد شاخه‌زایی خودبه خودی کالوس‌ها..... ۵۰
۳-۷- آزمایشات شاخه‌زایی..... ۵۰
۳-۷-۱- شاخه‌زایی در محیط شاخه‌زایی حاوی 2mg/l هورمون BAP..... ۵۰
۳-۷-۲- شاخه‌زایی در اثر هورمون BAP یا TDZ در ترکیب با هورمون NAA..... ۵۱
۳-۷-۳- شاخه‌زایی در اثر هورمون BAP در ترکیب با هورمون NAA..... ۵۲
۳-۸- آزمایش ریشه‌زایی..... ۵۳
۳-۹- مرحله عادت دهی..... ۵۴

فصل چهارم: نتایج و بحث ۵۵

۴-۱- درصد کالوس‌زایی ۵۶

۴-۱-۱- ترکیب‌های هورمونی BAP+IBA ۵۶

۴-۱-۲- ترکیب‌های هورمونی BAP+NAA ۶۱

۴-۱-۳- ترکیب‌های هورمونی KIN+IBA ۶۵

۴-۱-۴- ترکیب‌های هورمونی KIN+NAA ۶۸

۴-۱-۵- ترکیب‌های هورمونی TDZ+IBA ۷۲

۴-۱-۶- ترکیب‌های هورمونی TDZ+NAA ۷۵

۴-۲- درصد شاخه‌زایی خود به خودی در کالوس‌ها ۷۹

۴-۲-۱- ترکیب‌های هورمونی: BAP+IBA ۷۹

۴-۲-۲- ترکیب‌های هورمونی: BAP+NAA ۸۲

۴-۳- نتایج آزمایشات شاخه‌زایی ۸۶

۴-۳-۱- ترکیب‌های هورمونیTDZ+IBA ۸۶

۴-۳-۲- ترکیب‌های هورمونی KIN+IBA ۸۹

۴-۳-۳ ترکیب‌های هورمونی KIN+NAA ۹۱

۴-۳-۴ ترکیب‌های هورمونی BAP+NAA ۹۴

۴-۴-۵ ترکیب‌های هورمونی BAP+IBA ۹۹

۴-۳-۶ ترکیب‌های هورمونی TDZ+NAA ۱۰۱

۴-۴- شاخه‌زایی کالوس‌های گرفته شده از ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA.... ۱۰۳

۴-۴-۱- ترکیب‌های هورمونی BAP+NAA ۱۰۳

۴-۴-۲- ترکیب‌های هورمونی TDZ+NAA ۱۰۶
۴-۴-۳- شاخه‌زایی کالوس‌های گرفته شده از ترکیب هورمونی 2TDZ+0/5IBA ۱۱۰
۴-۴-۳-۱- ترکیب‌های هورمونی BAP+NAA ۱۱۱
۴-۵- درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های شاخه‌زایی شده ۱۱۳
۴-۶- عادت‌دهی گیاه به شرایط گلخانه ۱۱۶
نتیجه گیری نهایی ۱۱۸
پیشنهادات ۱۲۲
فهرست منابع ۱۲۳

فصل اول

مقدمه و کلیات

سر خار گل (*Echinacea purpurea*)

۱-۱- مقدمه

گیاهان منبع مهم دارویی هستند و نقش کلیدی در سلامت بازی می‌کنند (Constabel, 1990). اغلب تمدّن‌ها از زمان باستان تا به امروز از گیاهان به عنوان دارو استفاده می‌کردند. در یک دهه گذشته دوباره علاقه به مطالعه و استفاده از گیاهان دارویی برای درمان و شناخت اهمیّت گیاهان دارویی، و نیز پیشرفتی در آگاهی بین المللی درباره‌ی ذخیره رو به کاهش گیاهان دارویی جهان، به وجود آمده است (Hoareau and Dasilva, 1999). تنوّع ژنتیکی گیاهان دارویی در جهان به خاطر روش‌های ویرانگر برداشت برای تولید دارو و همچنین تخریب اکوسیستم‌های طبیعی گیاهان دارویی و تبدیل آن‌ها به جنگل و زمین‌های کشاورزی، در معرض خطر است (Bhavanandan and Satheesh, 1988). همچنین شواهد زیادی نشان می‌دهد که منبع گیاهان برای تولید دارو و ترکیبات دارویی جدید در مقابل تقاضا کم است (Cunningham, 1993). بنابراین یک نیاز ضروری برای حفظ و نگهداری، کشت و استعمال مناسب گونه‌های گیاهان دارویی، برای استفاده آیندگان وجود دارد.

گیاهان منبع داروهای جدید هستند و در داروهای جدید، گیاهان به عنوان منبع درمانی مستقیم به کار برده می‌شوند. به طوری که تقریباً ۸۵ درصد از مراحل آماده سازی دارو، شامل استفاده از گیاه یا عصاره‌ی گیاهی است (Vieira and Skorupa, 1993). همچنین گیاهان دارویی، مدل‌هایی برای ترکیبات سنتزی و مارکرهای تاکسونومیک برای کشف ترکیبات جدید و نیز آن‌ها به عنوان یک مادّه‌ی خام برای اغلب ترکیبات شیمیایی سنتزی پیچیده به کار برده می‌شوند (Akerele, 1992). ساخت و سنتز ترکیبات فعّال زیستی به طور شمیایی به خاطر ساختمان پیچیده آنها و هزینه‌ی بالای آنها مشکل است (Shimomura *et al.*, 1997). از طرفی تغییرات زیادی در کیفیّت و مقدار داروهای گیاهی مشاهده می‌شود که این عوامل متأثر از دوره‌ی کشت و فصل جمع‌آوری، تغییر در محتویات دارویی، تقلّبی ساختن دارو و اضافه کردن گونه‌های گیاهی که به طور اشتباه انتخاب شدند و فقدان

روشهای کافی برای تولید و بهینه‌سازی ساخت محصولات و غیره است. تولید و تهیّه‌ی مجموعه‌ای از گیاهان رشد کرده در مزرعه مستعد پذیرش هجوم قارچ‌ها، باکتری‌ها و حشرات هستند که می‌توانند محتویّات یا مقدار دارو را تغییر دهند (Murch *et al.*, 2000). به طور کلّی آماده‌سازی گیاهان دارویی می‌تواند به طور جدّی به وسیله‌ی آلوگی‌های قارچی، باکتریایی و آلودگی‌های محیطی مورد مخاطره قرار گیرد (Laughlin and Munro, 1982). از طرفی تضمین کردن کنترل کیفیت برای آماده‌سازی و تهیه‌ی دارو از چند گیاه و تشخیص و کیفیت مادّه‌ی مؤثره آنها نیز مشکل است (Wen, 2000). همچنین برای تولید متابولیت‌های ثانویه، گیاهان به عنوان بیوراکتورها دارای اهمیّت هستند (Yaseen Khan *et al.*, 2009).

برای غلبه به این مشکلات، ابزارهای بیوتکنولوژی برای دستکاری و بهبود خصوصیات ژنتیکی گیاهان دارویی به وسیله‌ی تکنیک‌های اختیار شده مثل باززایی درون شیشه‌ای و تراریختی ژنتیکی از طریق تکنیک کشت بافت اهمیّت فراوانی دارند.

پیشرفت در کشت بافت در ترکیب با تکنیک‌های مهندسی ژنتیک، به طور ویژه تکنولوژی انتقال ژن، دریچه‌ی جدیدی برای تولید با حجم بالای دارو و ترکیبات مفید دیگر باز می‌کند (Wang and To, 2004 and Guillon *et al.*, 2006). گیاهان دارویی تکثیر یافته به وسیله کشت بافت دارای منبع یکسان استریل و مواد گیاهی مناسب برای توصیف صفات بیوشیمیایی و بازشناسی مادّه مؤثره گیاهان موردنظر هستند (Miura *et al.*, 1987). به علاوه کشت بافت شاید هزینه تولید مواد مؤثره را نیز کاهش دهد (Chang *et al.*, 1992). همچنین تکنیک کشت بافت گیاهی به طور زیادی در تعدادی از گیاهان دارویی به ویژه برای تکثیر انبوه، نگهداری ژرم پلاسم، مطالعه و بررسی ترکیبات فعّال زیستی (مواد مؤثره) و برای بهبود صفات ژنتیکی به کار برده می شود (Sajc, 2000).

امروزه گیاهان دارویی مهمّی در جهان مطرح هستند که دارای اهمیّت دارویی فراوانی هستند و کشت و کار آنها به صورت فزاینده‌ای درحال افزایش است. یکی از این گیاهان دارویی، سرخارگل است که بومی آمریکای شمالی است. گونه‌های مختلف سرخارگل، گیاهانی هستند که در گذشته نزد بومیان آمریکایی از اهمیّت فراوانی برخوردار بوده‌اند. آنها از این گیاهان برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده میکردند (Hobbs, 1994).

گیاهان دارویی برای اقتصاد جهانی دارای اهمیّت هستند (Srivastava *et al.*, 1995). از نظر اقتصادی در حال حاضر خرده فروشی سرخارگل سالیانه بیش از ۱۵۸میلیون دلار در آمریکا و همچنین سالیانه در کل جهان ۳۰۰ میلیون دلار تخمین زده می‌شود (Blumenthal, 2003). با وجود میلیون‌ها دلاری که هر ساله از فروش عصاره گیاهی و ریشه‌ی خشک سرخارگل بدست می‌آید، مشکلات متعددی در تهیه و بالا بردن کیفیت آن وجود دارد (Consumer Reports, 2000). همچنین از نظر اهمیّت دارویی، منابع علمی ۲۱۶ ترکیب فعّال دارویی متفاوت را در سرخارگل گزارش کرده‌اند که نشان دهنده اهمیّت فراوان این گیاه دارویی است (Susan *et al.*, 2006 and Murch *et al.*, 2006). از اینرو برای احیاء جمعیت‌های وحشی واریته‌های سرخارگل و برای تولید تجارتی گونه‌های آن، توسعه‌ی مؤثر روش‌های تولید درون شیشه‌ای و ریز ازدیادی مورد نیاز است (Mechanda *et al.*, 2003).

با توجه به اهمیّت کشت درون شیشه‌ای گیاه دارویی سرخارگل عمده‌ی اهداف این تحقیق عبارتند از:

۱- تعیین غلظت‌های مناسب هورمون‌های اکسین و سیتوکنین و نیز تعیین اثر متقابل آن-ها در کالوس‌زایی و باززایی گیاه دارویی سرخارگل

۲- معرفی بهترین و مناسب‌ترین ریزنمونه برای کالوس‌زایی و باززایی گیاه دارویی سرخارگل

۳- بهینه‌سازی شرایط کشت بافت سرخارگل به منظور استفاده در آزمایشات انتقال ژن

۱-۲- مشخصات گیاهشناسی

گیاه دارویی سرخارگل با نام علمی *Echinacea purpurea* (شکل۱-۱) در فلور گیاهی کشور ما وجود نداشته و بذر آن (گونه پورپورآ) برای اوّلین بار در سال ۱۳۷۲ توسط مرحوم دکتر امید بیگی به ایران وارد شده و نام سرخارگل برای آن انتخاب گردیده است (Miller, 2005 and Wagner *et al*., 1991). گونه‌های مختلف سرخارگل، گیاهانی علفی و چند ساله هستند. این گیاهان متعلق به تیره کاسنی (گل ستاره ای[1]) بوده و منشأ آنها شمال آمریکا گزارش شده است. این گیاه در شمال رودخانه میسوری آمریکا به صورت خودرو می‌روید (Perry *et al*., 2001 and Bernath, 2000). نام جنس اکیناسه از کلمه یونانی اکینو[2] به معنی خارپشت گرفته شده که نشان دهنده خاردار بودن گل‌های این گیاه می‌باشد (Speroni *et al*., 2003). این نام برای اولین بار، اواخر سال ۱۷۰۰ توسط کنرادمانخ[3] گیاه شناس معروف آلمانی به این گیاه اطلاق شد (Bernath, 2000 and Hobbs, 1994).

اکیناسه دارای گونه‌های مختلفی است که ۳ گونه‌ی آنگوستی فولیا (*E.angustifolia*) و پالیدا (*E.pallida*) و پورپورا (*E.purpurea*) از نظر دارویی دارای اهمیّت بیشتری هستند (McGregor, 1968). گونه آنگوستی فولیا و پالیدا از نظر شکل ظاهری شباهت زیادی به یکدیگر دارند. درحالی که شباهت گونه پورپورا با دو گونه مذکور کمتر است (Bernath, 2000).

[1] Asteraceae
[2] Echino
[3] Konrad manech

شکل۱-۱- عکس گیاه دارویی سرخارگل

۱-۳- مشخصات رشدی

ارتفاع بوته: ارتفاع بوته گیاه دارویی سرخارگل ۸۰ تا ۱۵۰ سانتی متر است.

ریشه: ریشه این گیاه مستقیم است و به طور عمیق در خاک فرو می‌رود. رنگ ریشه بین سرخ تا سفید مات متغیر است. ریشه دارای ریزوم کوتاهی است که در قسمت فوقانی آن جوانه‌های رویشی قرار گرفته‌اند. ریشه‌ها کم و بیش معطّر هستند.

ساقه: ساقه‌ی سرخارگل استوانه‌ای، مستقیم و محکم است و دارای انشعابات فراوانی است. رنگ ساقه سبز و یا گاهی به علّت وجود آنتوسیانین‌ها به رنگ آبی یا قرمز مشاهده می‌شود. همچنین ساقه پوشیده از کرک‌های ریز است.

برگ: برگ این گیاه پهن، کم و بیش نیزه‌ای یا بیضوی شکل و به ندرت دندانه‌دار است هر دو سطح برگ پوشیده از کرک‌های زبر و خشن است. رنگ برگ سبز تیره و سطح آن ناصاف است.

گل: سرخارگل دارای گل‌های فنجانی بوده و گل‌های آن در انتهای ساقه‌های اصلی و فرعی ظاهر می‌شوند. گلچه‌های زبانه‌ای بلند و به طول ۴ تا ۶ سانتی متر دارند. رنگ گلچه‌های زبانه‌ای بنفش تیره یا ارغوانی است.

میوه: میوه سرخارگل فندقه و چهار وجهی است. قسمت انتهای میوه دارای پاپوس است. رنگ میوه خاکستری با خطوط قهوه‌ای است. وزن هزار دانه‌ی آن ۳/۸ تا ۴/۵ گرم است (Bernath, 1993; 2000).

۱-۴- نیازهای اکولوژیکی

بذور گونه‌های مختلف سرخارگل در دمای ۱۸ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد سبز می‌شوند. رطوبت کافی نقش مهمّی در سبز شدن بذرهای سرخاگل دارد. هر سه گونه اکیناسه در طول رویش به نور و هوای نسبتاً گرم نیاز دارند. کشت گونه‌های مختلف سرخارگل در مناطق سرد و مرطوب مناسب نبوده و علاوه بر تأثیر منفی در رشد و نمو گیاه سبب کاهش کمیّت و کیفیّت مواد مؤثره آنها می‌شود (Bernath, 1993; 2000).

نیاز آبی گونه‌های آنگوستی فولیا و پالیدا متوسط است ولی نیاز آبی پورپورآ بیش از دو گونه مذکور می‌باشد. بنابراین آبیاری این گیاهان (به خصوص گونه پورپورآ) در مناطقی که میزان بارندگی مناسب نباشد، ضرورت دارد. آبیاری منظّم و به موقع، نقش مهمّی در افزایش عملکرد محصول و همچنین افزایش مقدار مواد مؤثّره دارد (Wagner *et al*., 1991 and Bernath, 2000).

هر سه گونه سرخارگل به شرایط خاک یکسان نیاز دارند. خاک‌هایی با بافت متوسط، ضخامت زیاد، حاوی ترکیب‌های هوموسی و همچنین ازت کافی برای کشت گونه‌های مختلف سرخارگل توصیه می‌شود. همچنین ترکیب‌های آهکی نیز نقش مهمّی در افزایش عملکرد ریشه و پیکر رویشی این گیاهان دارد (Bernath, 2000). گزارش‌های متعددی در رابطه با اسیدیته (pH) مناسب خاک برای کشت گونه‌های مختلف سرخارگل وجود دارد. در کشور نیوزلند pH برای گونه پورپورآ و پالیدا ۵/۵ تا ۶/۵ ولی برای گونه آنگوستی فولیا ۷/۵ گزارش شده است (Galambosi *et al*., 1992 and Bernath, 2000).

۱-۵- روش کاشت

سرخارگل را می‌توان به وسیله بذر و یا از طریق رویشی تکثیر کرد. بذرهای تازه برداشت شده سرخارگل از دوره خواب فیزیولوژیک برخوردارند، از این رو چند هفته پس از برداشت بذرها دارای کشت مناسب خواهند شد. اگرچه بذر گونه پورپورآ در مقایسه با دو گونه دیگر از قوّه نامیّه مناسب تری برخوردار است ولی تیمار چینه سرمایی به مدت یک تا چهار هفته در دمای صفر تا پنج درجه سانتی‌گراد سبب افزایش قوّه نامیّه بذر این گیاه می‌شود (Bernath, 2000).

۱-۶- اهمیّت دارویی

نسخ پزشکی بجا مانده از مردم بومی آمریکا بین سال‌های ۱۸۵۰ تا ۱۹۰۰ نشان می‌دهد که سرخارگل از مهمّترین و پرمصرف‌ترین گیاه دارویی نزد آن‌ها بوده است. این گیاه توسّط بومیان قبیله های آن زمان برای مداوای بیماری‌های مختلفی مصرف میشده است. به طوری که از سرخارگل برای معالجه زخم‌های دهان و لثه، و مداوای سرفه و سوء هاضمه، و برای درمان سرماخوردگی، دندان درد و قولنج، و برای معالجه سوزاک، و بیماری‌های عفونی و بالاخره به عنوان مادّه‌ای تقویّت کننده استفاده می‌کردند (Hobbs, 1994 Bernath, 2000 and).

در ۵۰ سال اخیر تحقیقات زیادی بر روی خواص تقویّت کنندگی سیستم ایمنی بدن توسط گونه-های سرخارگل، انجام شده است. مطالعه و تحقیقات در این زمینه بر روی گونه پورپورآ بیشتر انجام شده است. در حال حاضر در اکثر منابع معتبر از پیکر رویشی گونه‌های پورپورآ، آنگوستی فولیا و پالیدا و همچنین از ریشه‌های هر یک از گونه‌های مذکور به عنوان دارو یاد شده و خواص درمانی آنها به تفصیل مورد بحث قرار گرفته است. البتّه مصرف گونه پالیدا در صنایع دارو سازی از دو گونه دیگر کمتر است (Bernath, 1993).

مواد مؤثره موجود در ریشه و اندام رویشی گونه‌های مختلف سرخارگل خاصیت ضد قارچ، ضد باکتری و ضد ویروسی داشته و از آن‌ها داروهای پیشگیری کننده و همچنین معالجه کننده سرماخوردگی و بیماری‌های تنفسی تهیه می‌شود. مواد مؤثره گونه‌های مختلف سرخارگل همچنین با افزایش تولید ایمونوگلوبولین G[1] در خون سبب تقویت سیستم ایمنی بدن می‌شوند (Barrett, and Melachart *et al*., 1998 2003 and Bauer *et al*., 1989). از مواد مؤثره گیاه سرخارگل (گونه پورپورآ) دارویی با نام تجاری ایمونوفین[2] برای استفاده در صنعت پرورش طیور تهیه و به بازار دارویی کشور عرضه شده است. مصرف این دارو (به مقدار یک لیتر در ۱۰۰۰ لیتر آب) سبب تقویّت سیستم ایمنی بدن طیور شده و از ابتلای آنها به بیماری‌های عفونی، قارچی و ویروسی به شدّت جلوگیری می‌کند (امید بیگی، ۱۳۸۹).

اندام رویشی و ریشه این گیاهان حاوی مواد مؤثره ارزشمندی هستند که این مواد از نظر شیمیایی به گروه‌های مختلفی تعلق دارند. مهمّترین این ترکیب‌ها اسیدکافئیک[3] و مشتقّات آن، ترکیبات آلکیل آمیدی[4]، پلی ساکارید ها و اسانس‌ها می‌باشند. مشتقات اسید کافئیک مانند اسیدشیکوریک[5] و اکیناکوزید[6] در ریشه و پیکر رویشی گونه‌های مختلف سرخاگل وجود دارند. وجود اسید شیکوریک به مقدار زیادی در ریشه و پیکر رویشی گونه پورپورآ گزارش شده است. در ارقام اصلاح شده گونه پورپورآ، مقدار اسید شیکوریک به ۴/۵ درصد نیز می رسد. مقدار اکیناکوزید که از مشتقات دیگر اسید کافئیک می‌باشد، در ریشه دو گونه آنگوستی فولیا و پالیدا بیش از گونه پورپوآ گزارش شده است (Melachart *et al*., 1998 and Barrett, 2000 and Bauer *et al*., 1989).

[1] Emmunoglobolin G
[2] Immunofin
[3] Caffeic acid
[4] Alkylamid
[5] Cichoric acid
[6] Echinacoside

اندام رویشی و ریشه هر سه گونه سرخارگل حاوی ترکیب‌های آلکیل آمید است. تحقیقات نشان می‌دهد که مقدار و تنوّع این ترکیب‌ها در گونه پورپورآ بیش از دو گونه دیگر است. تاکنون ۱۱ ترکیب مختلف آلکیل آمیدی در پیکر رویشی و ریشه گونه پورپورآ شناسایی شده است (Bernath, 2000 and Perry *et al*., 2002 and Seemannova *et al*., 2006).

ریشه هر سه گونه مذکور اسانس وجود دارد. مقدار اسانس در ریشه گونه پورپورآ ۰/۲ درصد و در پیکر رویشی (در مرحله گلدهی) ۰/۱ تا ۰/۶ درصد است. مقدار اسانس در ریشه و پیکر رویشی گونه آنگوستی فولیا ۰/۱ درصد گزارش شده است. مقدار اسانس در ریشه گونه پالیدا بیشتر از گونه‌های دیگر بوده و بین ۰/۲ تا ۲ درصد گزارش شده است. مهمترین ترکیب‌های اسانس گونه‌های مختلف سرخارگل (اعم از اسانس ریشه یا پیکر رویشی) را هومولن[1]، کاریوفیلن[2] و اکسید کاروفیلن[3] تشکیل می‌دهد (Li, 1998 and Wagner *et al*., 1991 Bauer *et al*., 1989).

ریشه و اندام رویشی گونه‌های مختلف سرخارگل همچنین حاوی فلاونوئید، پلی استیلن و الکالوئید می‌باشد. در اندام رویشی این گیاهان وجود مقادیری از آلکالوئید پیرولیزیدین (مانند تئوسیلاگین و ایزوتوسیلاگین) گزارش شده است (Bernath, 1993 and Seemannova *et al*., 2006).

۱-۷- کشت بافت گیاهی

شوان و شیلدن[4] نخستین کسانی بودند که در سال ۱۸۳۸ فرضیه‌ای ارائه دادند که اگر هر کدام از سلول‌های زنده موجود پرسلولی را در شرایط مطلوب قرار دهیم، سلّول‌ها توانایی این را دارند که به طور مستقل به یک موجود کامل تبدیل شوند. بنابراین نظریه توانمندی (Totipotency) در سلول‌های

[1] Humulene
[2] Caryophyllene
[3] Caryophyllene oxide
[4] Schwann and schleiden

گیاهی شکل گرفت. این تئوری پایه و اساس کشت بافت گیاهی را بنا نهاد (شریفی و همکاران، ۱۳۸۹).

کشت بافت گیاهی یا کشت این ویترو[1] عبارت است از رشد سلول، بافت و یا اندام گیاهی در یک محیط غذایی مصنوعی استریل که به صورت جامد یا مایع تهیه می‌شود. این تکنیک به عنوان یکی از شاخه‌های بیوتکنولوژی، کاربرد گسترده‌ای در کشاورزی دارد (باقری و همکاران، ۱۳۸۶).

کشت بافت گیاهی در زمینه گیاهان دارویی کاربردهای متعدّدی دارد که مهمترین آنها عبارتند از، تکثیر انبوه و سریع گیاهان دارویی یکنواخت از لحاظ محتوی ژنتیکی و کیفی، حفظ گونه‌های گیاهی در حال انقراض از طریق نگهداری در شرایط انجماد[2] و تولید متابولیت‌های ثانویه در شرایط in vitro از طریق کشت سوسپانسیون سلولی و اندام (Mulabagal *et al*., 2004). روش‌های سنّتی تکثیر گیاهان دارویی همانند سایر گیاهان شامل روش‌های جنسی (تکثیر به وسیله بذر) و غیر جنسی نظیر قلمه، خوابانیدن، پاجوش و... می‌باشد. گیاهان تکثیر یافته با بذر عمدتاً از لحاظ ژنتیکی یکنواخت نیستند و گیاه حاصله دارای تمام خواص گیاه مادری نیست. به همین جهت تکثیر غیر جنسی به جنسی ترجیح داده می‌شود. روش‌های سنّتی تکثیر غیر جنسی عمدتاً با مشکلات متعددی از جمله محدودیت گیاه مادری و بازدهی پایین مواجه است، کشت بافت نوعی تکثیر غیر جنسی در شرایط in vitro است که مزیّت تکثیر از طریق کشت بافت نسبت به سایر روش‌های مرسوم، تولید تعداد زیادی گیاه با محتوی ژنتیکی یکسان و کیفیت یکنواخت، در زمان کوتاه‌تر و فضای نسبتاً محدود می‌باشد (Tripathi and tripathi, 2003).

مهمترین روش‌های تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان، ریزازدیادی، باززایی از طریق کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی است.

[1] In vitro
[2] Cryopreservation

۱-۷-۱- ریزازدیادی

تکثیر کلون در شرایط این ویترو را ریزازدیادی می‌نامند. ریزازدیادی امکان سریع و انبوه ژنوتیپ-های مطلوب و تولید گیاهان یکسان عاری از بیماری (به‌خصوص عاری از ویروس‌ها) را فراهم می‌سازد. مهمترین عوامل مؤثر بر افزایش کارایی ریزازدیادی درون شیشه‌ای گیاهان دارویی، ریزنمونه و ژنوتیپ گیاهی، میزان تنظیم کننده‌های رشد، محیط کشت و عوامل فیزیکی می‌باشد (Basu and Chand, 1993. And Shasany *et al*., 1998 and Mantell and Hugo, 1989).

۱-۷-۲- باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی

جنین‌زایی سوماتیکی فرایندی است که طی آن گروهی از سلول یا بافت‌های سوماتیکی به جنین تبدیل می‌شوند. این جنین‌ها شبیه جنین‌های زیگوتی هستند و در محیط کشت مناسب می‌توانند به گیاه تبدیل شوند.

۱-۷-۳- باززایی از طریق کالوس

در کشت بافت، قسمتی از گیاه یا ریزنمونه[1] که ممکن است بخشی از ساقه، برگ، جوانه یا یک سلول باشد، در یک محیط کنترل‌شده کشت می‌شود (شریفی و همکاران، ۱۳۸۹). قرار گرفتن ریزنمونه‌های گیاه بر روی یک محیط کشت مناسب و تحت شرایط بهینه منجر به تمایززدایی[2] می‌شود یعنی سلول بالغ از طریق سنتز DNA، RNA و پروتئین، ماهیّت مریستمی پیدا می‌کند و رشد مجدد بر روی محیط کشت آگار یک توده سازمان نیافته از سلول‌ها یعنی کالوس[3]را تولید می‌کند. از طرفی افزایش در تعداد سلّول‌ها یا کالوس منجر به تخلیه مواد غذایی محیط کشت شده و بنابراین بافت در حال رشد باید بعد از ۳ تا ۴ هفته به محیط جدید منتقل شود که این عمل واکشت[4] نامیده می‌شود.

[1] Explant
[2] Dedifferentiation
[3] Callus
[4] Sub culture

در نهایت از چنین بافت‌های سلولی برای ایجاد ساختارهای سازمان یافته‌ای نظیر ریشه و ساقه استفاده می‌شود که این فرایند به اندام‌زایی یا ریخت‌زایی[1] معروف است (باقری و همکاران، ۱۳۸۶).

تولید کالوس، قابلیت باززایی کالوس و ریشه‌زایی گیاهچه به عوامل متعددی بستگی دارد که مهمترین آن‌ها ژنوتیپ، ریزنمونه و شرایط فیزیولوژیک آن، نوع محیط کشت و عناصر غذایی، عوامل فیزیکی و شرایط محیطی از قبیل، نور، دما، pH و تنظیم کننده‌های رشد و ویتامین‌ها می‌باشد.

اغلب هدف نهایی هر نوع کشت درون‌شیشه‌ای، باززایی[2] گیاه مورد نظر است. باززایی به دو صورت مستقیم و غیر مستقیم صورت می‌گیرد. در روش مستقیم ابتدا بافت‌های مریستمی کشت شده و سپس از اندام‌زایی مستقیم (شاخه‌زایی[3] و ریشه‌زایی[4]) برای باززایی گیاهان استفاده می‌شود. در روش غیر مستقیم، عموماً تولید گیاهان به واسطه کالوس صورت می‌گیرد. مسیر دیگر برای باززایی گیاهان از کالوس، تولید اجسام شبه جنین در بافت کالوس است که این فرایند جنین‌زایی سوماتیکی[5] نامیده می‌شود. تکثیر به وسیله‌ی جنین سوماتیکی باعث تولید تعداد زیادی گیاهچه می‌شود (Ammirato, 1983 and KHibas, 1995 and Mithila *et al*., 2001).

۱-۸- اجزای محیط کشت بافت گیاهی

مواد تشکیل دهنده محیط کشت را می‌توان به چند دسته عناصر پر مصرف، عناصر کم مصرف، تکمیل کننده‌های آلی (ویتامین‌ها و اسید های آمینه یا آمیدها)، تنظیم کننده‌های رشد، هیدارت‌های کربن و مواد دیگر تقسیم بندی کرد. برای دست‌یابی به حداکثر رشد، غلظت بهینه هر یک از این مواد ممکن است به طور چشم‌گیری متفاوت باشد. در بین محیط کشت‌های مختلف، محیط کشت MS[6] (تهیه شده توسط موراشیگ واسگوک در سال ۱۹۶۲) حاوی عناصر مشخصی است و به طور گسترده-

[1] Organogenesis
[2] Regeneration
[3] Shooting
[4] Rooting
[5] Somatic embryogenesis
[6] Murashige T, Skoog F (1962)

ای در سیستم‌های مختلف کشت بافت کاربرد دارد (سید طباطبایی و همکاران، ۱۳۸۸). علاوه بر عناصر پر مصرف و کم مصرف، مواد و عوامل دیگری در کشت بافت دخیل هستند که در زیر شرح داده شده است.

۱-۸-۱- ساکارز

بیشتر گیاهان در کشت بافت به صورت اتوتروف رشد نمی‌کنند، یعنی کربن را از راه فتوسنتز جذب نمی‌کنند که عامل اصلی آن را به ناکافی بودن CO_2 در کشت‌ها نسبت داده‌اند (Gibson, 1967). بنابراین به یک منبع کربن برای جهت تهیه انرژی مورد نیاز خود وابسته می‌باشند. قندها، معمولترین هیدرات کربن مورد استفاده در محیط کشت هستند و بیشترین کارایی را در مقایسه با دیگر هیدرات‌های کربن دارند. ساکارز پر مصرف‌ترین قند مورد استفاده در محیط‌های کشت است (به مقدار ۴-۲ درصد وزنی حجمی)، اگرچه از گلوکز و مالتوز و لاکتوز و قندهای دیگر نیز در موارد خاص به عنوان منبع کربن استفاده می‌شود. شایان گفتن است که قسمتی از ساکارز مورد استفاده در محیط کشت نیز در طی اتوکلاو، هیدرولیز شده و به قندهای گلوکز و فروکتوز تبدیل می‌شود (مقداری ماده-ی سمّی ۵- هیدروکسی متیل فورفورال نیز تولید می‌شود)، که نتیجه‌ی آن تأثیر بیشتر در تنظیم فشار اسمزی است (Yoshida *et al*. 1973).

۱-۸-۲- اسیدیته یا pH محیط کشت

اسیدیته یا pH محیط کشت، اغلب در دوران کشت تغییر می‌کند. علّت این موضوع، تغذیه ریزنمونه و به ویژه کاهش آمونیوم محیط کشت است. pH مناسب در بیشتر محیط کشت‌ها حدود ۵/۶ تا ۵/۸ است. pH محیط کشت بر قابلیت حل شدن مواد غذایی، در دسترس بودن عناصر برای ریزنمونه و ویژگی جامد شدن ماده‌ی ژله کننده تأثیر گذار است. عاملی که بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد تغییر pH در خلال اتوکلاو است که حدود ۰/۳ تا ۰/۵ واحد کاهش می‌یابد (Skirvin et al., 1986). اگر pH

بیشتر از ۶ شود، محیط کشت بسیار سخت خواهد شد و در صورتی که کمتر از ۵/۲ باشد، مشکلات کاهش ژله‌ای شدن بروز می‌کند. کاهش pH موجب کاهش پایداری IAA، اسید جیبرلیک، تیامین و رسوب برخی از نمک‌ها (مانند نمک‌های فسفات و آهن) و همچنین کاهش جذب یون‌های آمونیومی می‌شود (Butenko, 1968).

۱-۸-۳- عامل ژله کننده

آگار یک پلی ساکارید با توده‌ی مولکولی بالا و مادّه‌ای ژلاتینی است که حاوی پلی ساکاریدهای بدون شاخه است و از دیواره سلولی بعضی از جلبک‌های قرمز و جلبک‌های دریائی[1] به دست می‌آید (Yamasaki and osuga, 1960) و از جمله مواد پرکاربرد درمحیط کشت گیاهی محسوب می‌شود قدرت ژلی شدن آگار در شرایط اسیدی (pH کمتر از۴/۵) کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد آگار توانایی جذب موادّی مانند زغال فعّال را داشته باشد. سیتوکنین یکی از موادی است که به وسیلهِ آگار جذب می‌شود، بنابراین غلظت زیاد آگار موجب می‌شود که سیتوکنین محیط کشت به سختی در اختیار ریزنمونه قرار گیرد. مقدار مصرفی آگار بین ۰/۵ تا ۱ درصد است. این مقدار مصرفی در برخی از کشت‌های گیاهی بسیار تأثیر گذار بر پاسخگویی است، به طوری که ممکن است سبب شیشه‌ای شدن کشت‌ها در محیط ژله‌ای نرم (استحکام کم، مقدار زیاد آب) و رشد ناکافی در محیط‌های به طور کامل ژله ای شده (مستحکم) شود (سید طباطبایی و همکاران، ۱۳۸۸).

۱-۹- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

اصولاً هورمون به موادی گفته می‌شود که در یک قسمت گیاه ساخته شده و به سایر قسمت‌ها منتقل می‌گردد و اثرات فیزیولوژیک محسوسی در بافت‌های جوان برجای می‌گذارد. این ترکیبات در مقادیر بسیار کم فعّال می‌باشند. هورمون‌های گیاهی که به آنها فیتوهورمون[2] می‌گویند، در بافت‌های

[1] Seaweed
[2] phytohormone

مریستمی و جوان ساخته می‌شوند. معمولا پنج گروه از تنظیم‌کننده‌های رشدی در کشت بافت استفاده می‌شوند که شامل اکسین‌ها، سیتوکنین‌ها، جیبرلین‌ها، اتیلن و آبسزیک اسید می‌باشد. البتّه اکسین‌ها و سیتو کنین‌ها بیشتر در کشت بافت استفاده می‌شوند.

۱-۹-۱- اکسین

اکسین‌ها رشد سلولی را تحریک نموده و باعث طویل شدن سلول می‌شوند. کاربرد این ترکیبات در محیط کشت سبب متورم شدن بافت‌ها و تشکیل توده سلولی تمایز نیافته‌ای به نام کالوس می-گردد. مقادیر کم اکسین در محیط سبب تحریک تشکیل ریشه نابجا می‌شود و کاربرد مقادیر بالای آن سبب تولید کالوس می‌گردد. اکسین غالبیت انتهایی را ایجاد نموده و مانع تشکیل شاخه‌های جانبی و نابجا می‌شوند. از اکسین‌های نسبتاً ضعیف می‌توان به ایندول بوتریک اسید (IBA[۱]) و ایندول استیک اسید (IAA[۲]) اشاره نمود. از اکسین‌های قوی می‌توان از نفتالین استیک اسید (NAA[۳])، ۲,۴-D[۴] و پیکلورام نام برد که در غلظت‌های کمتر استفاده می‌شوند. غلظت‌های زیاد اکسین می‌تواند مانع از اندام‌زایی شود (باقری و همکاران، ۱۳۸۶).

۱-۹-۲- سیتوکنین

سیتوکنین یک تنظیم کننده رشدی است که به صورت گسترده در کشت بافت استفاده می‌شود. سیتوکنین‌ها در غلظت‌های بالا سبب تحریک تولید ساقه‌های نابجا می‌شوند و غالبیت انتهایی را حذف می‌کنند. معروف‌ترین سیتوکینین، کینیتین (Kin[۵]) است که جزء سیتوکنین‌های سنتزی است. از سیتوکنین‌های دیگر می‌توان به ۶-بنزیل آمینو پورین (BAP[۶]) و بنزیل آدنین (BA) اشاره نمود که

[1] Indole-3 butyric acid
[2] Indole-3 acetic acid
[3] α-Naphthalene acetic acid
[4] 2,4_Dichlorophenoxy acetic acid
[5] Kinetin
[6] 6-Benzyl amino purin

جزء سیتوکینین‌های مصنوعی می‌باشند. البته ترکیبات دیگری نظیر ایزوپنتیل آدنین(2ip)[1]، زآتین، مشتقات زآتین و تیدیازرون(TDZ[2]) نیز جزء سیتوکینین‌های طبیعی طبقه بندی می‌شوند (باقری و همکاران، ۱۳۸۶).

[1] Isopentenyl amino purin
[2] Thidiazuron

فصل دوم

بررسی منابع

عوامل مؤثر بر کشت بافت سرخارگل

۲-۱- بذر

۲-۱-۱- خواب بذر

خواب بذر یکی از مشکلات تکثیر و کشت گیاهان محسوب می‌گردد. خواب بذر اکیناسه در گونه‌های مختلف متفاوت است، البتّه خواب گونه‌ی پورپورآ از ۲ گونه دیگر کمتر است (Hobbs, 1998). تکثیر از طریق بذر عموماً یک روش تجاری برای گیاه سرخارگل محسوب می‌شود. در یک تحقیقی اثر خراش‌دهی مکانیکی، اتفن، پوترسین[1] و تیمار[2]PEG 8000 (پلی‌اتیلن گلیکول) روی شکستن خواب بذر برای افزایش جوانه‌زنی گیاه سرخارگل انجام گردید. در این تحقیق، اتفن به طور معنی‌داری جوانه‌زنی اولیه را افزایش داد در حالیکه PEG در پتانسیل آبی ۰/۵ mpa و خراش‌دهی مکانیکی، به طور معنی‌داری کاهش در تعداد روز برای جوانه‌زنی و نیز درصد جوانه‌زنی بذرهای خواب رفته را افزایش دادند. از طرفی پوتریسین در مقادیر ۰/۲۵، ۰/۵ یا ۱ میکرومولار تأثیری روی جوانه‌زنی نداشت (Bishnoi *et al.*, 2010).

۲-۱-۲- ضدعفونی بذور

بذرها ریزنمونه‌ی مهمّی در کشت‌های درون شیشه‌ی سرخارگل هستند. روش‌های متفاوتی برای استریل کردن بذرها شامل ضدعفونی سطحی به وسیله‌ی اتانول و هیپوکلریدسدیم وجود دارد (Lakshmanan *et al.*, 2005). البتّه تنها ضدعفونی کننده‌های سطحی به طور کامل باعث حذف ترکیبات میکروبی نمی‌شوند. به همین خاطر روش‌های مختلفی برای ضدعفونی کردن بذور در نظر گرفته می‌شود.

[1] Putrescine
[2] Polyethylene *glycol*

تهیّه گیاهچه‌های استریل از طریق بذر برای کشت بافت امری ضروری است به همین منظور در بعضی از آزمایشات در گیاه دارویی سرخارگل یک فرایند پشت‌سرهم استریل کردن سطحی بذر به وسیله امولسیون ۱۰ درصد مخلوط محافظت کننده‌ی گیاهی (PPM[1]) و متعاقباً اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس هیپوکلریدسدیم حاوی [2]توویین ۲۰ به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه، تأثیر زیادی درجوانه‌زنی بذرهای عاری از آلودگی فراهم می‌کند (Kristen *et al*., 2000 and Murch *et al*., 2006 and zobayed and saxena,2003). در حالیکه در برخی آزمایشات فقط از هیپوکلرید سدیم ۶ درصد به مدّت ۲۰ دقیقه استفاده گردید (Subbaih *et al*., 2003). البتّه در مواردی دیگر در ابتدا از کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس هیپوکلریدسدیم ۱ درصد استفاده شد (Dahanayake *et al*., 2010). در یک تحقیق دیگر بذرها به وسیله‌ی هیپوکلرید سدیم ۲/۳۶ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی و در نهایت با آب مقطر استریل شتشو داده شدند (Moemen *et al*., 2010).

از آنجایی که حذف آلودگی‌های قارچی به طور کامل توسط پروتکل استریلیزاسیون بذر به وسیله‌ی هیپوکلرید سدیم از بین نمی‌رود از یک مخلوط محافظتی گیاه، برای کنترل آلودگی‌های قارچی بذرهای سرخارگل برای به دست آوردن گیاهچه‌های استریل استفاده می‌شود (Choffe *et al*., 2000a). افزودن PPM به محیط جوانه‌زنی به طور مؤثر آلودگی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. PPM، آنزیم‌های چرخه‌ی اسید سیتریک و زنجیره‌ی انتقال الکترون را در باکتری و قارچها هدف‌گذاری می‌کند و از بین برنده‌ی دیواره‌ی سلول گیاهی نیست بنابراین مانع رشد بافت گیاهان در کشت نمی‌شود. در یک تحقیق مناسب-ترین غلظت PPM را تا ۳ میلی‌لیتر در لیتر پیشنهاد گردید. در غلظت‌های بالای PPM، گیاهچه‌های سرخارگل و همچنین هیپوکوتیل‌های آنها به طور معنی‌داری کوتاه شدند و

[1] Plant preservative mixture
[2] Tween

این غلظت‌ها باعث کاهش میزان جوانه‌زنی گردید. همچنین مقادیر بالای PPM باعث کوتاه شدن گیاهچه و قهوه‌ای شدن بافت شدند. در این تحقیق غلظت‌های پائین‌تر از ۳ میلی‌لیتر برای حذف رشد قارچی مؤثر نبودند و با وجود تغییر PPM، جوانه‌زنی بذور کمتر از ۶۰ درصد بود (Kristen *et al*., 2000). از طرفی مطالعات جدید نشان می‌دهد که باکتری‌های درون بافتی مقاوم به آنتی بیوتیک، می توانند در کشت‌ها بدون تأثیر زیان‌آور روی رشد گیاهان در محیط‌های کشت زنده بمانند (Lata *et al*., 2006).

در یکسری از آزمایشات فقط از ریزنمونه‌های رشد کرده در شرایط استریل استفاده نمی‌شود و بعضاً مجبور می‌گردیم از ریزنمونه‌هایی که در محیط گلخانه یا بیرون رشد کرده‌اند استفاده شود. مثلاً در یک آزمایش از برگ‌های جوان سرخارگل ۴ ماهه به عنوان ریزنمونه استفاده شد. برگ‌های برداشت شده‌ی به وسیله‌ی محلول هیپوکلرید سدیم ۱/۰۵ درصد وزنی/ حجمی به مدت ۱۷ دقیقه خیسانده شد که این محلول حاوی ۱ درصد توئین ۲۰ بود و متعاقباً برگ‌ها ۳مرتبه به وسیله‌ی آب استریل در زیر هود شستشو داده شدند که این شیوه‌ی ضدّعفونی تأثیر مثبتی در استریل کردن ریزنمونه‌ها داشت (Koroch *et al*., 2002).

۲-۲- نوع زیرنمونه

انتخاب ریزنمونه مناسب یک نقش مهمّی در تعیین بازده‌ی نهایی تکثیر سرخارگل در کشت بافت ایفا می‌کند. در آزمایشات متعددی از دمبرگ، ساقه، قطعات برگی، هیپوکوتیل و کوتیلدون و ریشه به عنوان ریزنمونه برای القای کالوس که متعاقباً به شاخه‌ها و ریشه‌ها تمایز می‌یابند استفاده شده است. چندین روش باززایی برای گونه‌های اکیناسه گزارش شده است که تقریباً همه‌ی پروتوکل‌ها از زیرنمونه‌های گرفته شده از گیاهچه‌های رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای استفاده کرده‌اند. باید توجّه داشت که بعضی از ریزنمونه‌ها

ممکن است پاسخ‌های مورفولوژیکی متفاوتی تحت شرایط ویژه‌ای کشت از خود نشان دهند (Murch *et al*., 2006 and Choffe *et al*., 2000a).

به طور کلّی نوع ریزنمونه و نیز جهت قرارگیری آن‌ها در محیط کشت یک نقش کلیدی در تنظیم فرایند تمایز بازی می‌کنند (Jones *et al*., 2007). در یک تحقیق از ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵ میلی‌متری از گیاهچه‌های ۱۴ روزه سرخارگل، ریشه‌های ۱۵ میلی‌متری و برگهای ۱۰×۲۰ میلی‌متری از گیاهچه‌های ۲ ماهه استفاده گردید. در این تحقیق جنین‌های سوماتیکی در کشت‌های کوتیلدون و ریشه، باروری کمتری داشتند. همچنین تعداد جنین‌ها روی ریزنمونه‌های ریشه در مقایسه با برگ‌ها نسبتاً کمتر گزارش گردید (Zobayed and saxena, 2003).

در یک تحقیق دیگر که به منظور ریشه‌زایی انجام پذیرفت، ریزنمونه‌های هیپوکوتیل‌ها و کوتیلدون‌ها بعد از ۱۴ روز جوانه‌زنی بذر و رشد در تاریکی، از گیاهچه قطع شدند و روی محیط حاوی نمک‌های MS کشت گردیدند. هیپوکوتیل‌های به عنوان ریزنمونه با طول تقریبی ۱ سانتی‌متر و کوتیلدون‌ها با طول ۲ میلی‌متر برش خوردند و یا به طور دست نخورده به طول ۴ میلی‌متر کشت شدند. در این تحقیق هیپوکوتیل‌های ۱۴ روزه در محیط کشت عاری از تنظیم کننده‌های رشد، میانگین ۰/۵ تا ۲ ریشه درهر ریزنمونه تولید کردند و همچنین ریزنمونه‌های کوتیلدون میانگین ۹/۷ ریشه در هر ریزنمونه داشتند که تعداد بیشتری ریشه از ریزنمونه کوتیلدون بود (Kristen *et al*.,2000). در یک آزمایش دیگر که بر روی همین دو ریزنمونه انجام پذیرفت بیشترین کالوس‌زایی در ریزنمونه کوتیلدون بود. البتّه تفاوت معنی‌داری در باززایی این گیاه ما بین دو ریزنمونه مشاهده نگردید (Zebarjadi *et al*., 2011).

در مقایسه‌ی باززایی بین ریزنمونه‌های نوک‌شاخه[1] و برگ مشخص گردید که شاخه‌های تولید شده از نوک شاخه‌ها طول بیشتری از شاخه‌های باززایی شده از ریزنمونه‌های برگی دارند و شاخه‌های ریشه‌دار شده از ریزنمونه‌های برگی ریشه‌های بزرگ‌تر و بلندتر از ریزنمونه‌های نوک‌شاخه دادند (Moemen *et al*., 2010). در یک تحقیق دیگر که مقایسه توانایی باززایی بین ریزنمونه‌های ریشه و دمبرگ و برگ بود، ریزنمونه‌های ریشه و دمبرگ با سنّین متفاوت توانایی باززایی بیشتری از ریزنمونه‌های برگی نشان دادند و همچنین ریزنمونه‌های ریشه به راحتی تولید شاخساره در محیط درون شیشه کردند (Dahanayake *et al*., 2010).

در تحقیقی که بین ریزنمونه‌های ریشه و دمبرگ و برگ به جهت باززایی غیر مستقیم انجام شد، مشخص گردید که قطعات ریشه سپس برگ و دمبرگ بیشترین تأثیر برای توانایی باززایی را داشتند در حالیکه بیشترین کالوس‌زایی در قطعات دمبرگ سپس ریشه و در نهایت برگ بود (Ahmad *et al*., 2010).

این واضح است که منبع ریزنمونه‌ها به طور معنی‌داری در پاسخ‌های باززایی سرخارگل متفاوت است. مشاهدات متناقضی ممکن است به علت روش‌های کشت و وضعیت فیزیولوژیکی و بافت ریزنمونه در آزمایشات مختلف مشاهده شود. عامل نوع رقم گیاه نیز همچنین در تمایز و ظرفیت جنین‌زایی نیز تأثیر دارد.

در یک تحقیقی که به منظور شاخه‌زایی از ریزنمونه‌ی ساقه‌گل در گونه‌ی آنگوستی فولیا استفاده گردید، این ریزنمونه تکثیر و ازدیاد شاخساره بهتری از ریزنمونه‌های برگی و دمبرگ گونه‌ی پورپورا داشت (Lucchesini *et al*., 2003). در تحقیقی دیگر که بر روی همین گونه آنگوستی فولیا انجام پذیرفت نشان داده شد که بهترین کالوس‌زایی از بین سه ریزنمونه

[1] Shoot tip

برگ و ریشه و دمبرگ، در ریزنمونه برگ است. درحالیکه بیشترین تعداد شاخساره در ریزنمونه‌های ریشه و بزرگترین شاخساره‌ها در ریزنمونه برگ مشاهده گردید(Taha *et al*., 2010).

موضوع دیگر که در باززایی گیاه می‌تواند مؤثر باشد جهت ریزنمونه‌ها است. جهت ریزنمونه‌ها یک فاکتور مهم برای القای جنین‌های سوماتیکی از ریز نمونه‌های برگ و کوتیلدون است. تحقیقات نشان داد که تماس مستقیم سطح برگ از طرفی که پشت برگ روی محیط باشد به طور معنی‌داری باعث افزایش تعداد جنین‌های سوماتیکی می‌شود (Zobayed and Saxena, 2003).

۲-۳- سن ریزنمونه

سنّ ریزنمونه یا گیاهچه به طور خیلی زیادی در توانایی باززایی ریزنمونه مؤثر است و نیز تأثیر زیادی بر القای ساقه دارد و یک فاکتور دخیل در فراوانی باززایی است. در یک تحقیق که به منظور باززایی غیر مستقیم در گیاه دارویی سرخارگل صورت پذیرفت، بهترین سنّ گیاهچه برای شاخه‌زایی به وسیله‌ی مقایسه‌ی توانایی باززایی ریشه، دمبرگ و برگها از گیاهچه‌های ۱ و ۱/۵ و ۲ و ۲/۵ و ۳ ماهه تعیین شد. در این تحقیق تعداد شاخه‌ی باززایی شده از ریزنمونه‌های ریشه، دمبرگ و برگ با افزایش سن گیاهچه تا ۲/۵ ماهه افزایش یافت (Dahanayake *et al*., 2010).

۲-۴- نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد

یکی از عوامل مهم در باززایی درون‌شیشه‌ای گیاهان، نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی است. در یک تحقیقی ریزنمونه‌های کوتیلدون، ریشه و برگ گیاه سرخارگل را به محیط MS حاوی هورمونBAP (۰ تا ۵۰ میکرومول بر لیتر)، IBA (۰ تا ۲/۵ میکرومول بر

لیتر)، TDZ(۰ تا ۱۰ میکرومول بر لیتر)، IAA (۰ تا ۰/۲۵ میکرومول برلیتر) به منظور باززایی غیر مستقیم منتقل نمودند. در این آزمایش محیط مناسب برای القای جنین‌های سوماتیکی، ۵ میکرومول بر لیتر BAP همراه با ۲/۵ میکرومول بر لیتر IBA با میانگین ۸۳ جنین در ریزنمونه‌ی برگ و ۱۶ جنین در کوتیلدون و ریشه بعد از ۲۸ روز بود. از طرفی سیتوکینین‌های دیگر مثل TDZ به طور معنی‌داری مقدار جنین سوماتیکی را در ریزنمونه-های برگ کاهش دادند و توسعه‌ی جنین وقتی که TDZ همراه با IAA بود ۱۰-۷ روز به تأخیر افتاد. حتّی جوانه‌زنی جنین‌هایی که در محیط حاوی هورمون TDZ بودند ۱۰ تا ۱۵ روز به تأخیر افتاد. در این آزمایش القای کالوس در حضور هورمون TDZ جالب توجّه بود و جنین‌های سوماتیکی از کالوس‌های آن‌ها به وجود آمدند. البتّه فراوانی جنین‌های سوماتیکی القاء شده توسط هورمون TDZ کمتر از BAP بود.

مرحله بعد از شاخه‌زایی برای تولید گیاهچه، مرحله ریشه‌زایی است که در این تحقیق محیط مناسب برای ریشه‌زایی شاخساره‌های تولید شده، ۱۰ میکرومول NAA بود که باعث تولید ۹/۸ درصد ریشه در هر گیاهچه شد (Zobayed and Saxena, 2003). البتّه در تحقیق دیگر که بر روی ریزنمونه برگ کشت شده در محیط‌های حاوی هورمون‌های TDZ و 2,4-D و دی کامبا[1](DC) با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میکرومولار صورت پذیرفت بیشترین القای کالوس در غلظت‌های بالای ۱ میکرومولار TDZ مشاهده گردید. در این آزمایش هورمون TDZ باعث توسعه ترکیبی از ساختار کالوس و باززایی گیاه سرخارگل شد که این رفتار حاکی از شکل‌های متفاوتی از فعالیت TDZ است (Jones *et al.*, 2007).

[1] Dicamba

تحقیق دیگری بر روی دو ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل و کوتیلدون برای مقایسه‌ی القای ریشه از سه هورمون اکسین شامل IAA (از ۰ تا ۱۰۰ میکرومول بر لیتر) و IBA (از ۰ تا ۱۰۰ میکرومول بر لیتر) و NAA (از ۰ تا ۱۵ میکرو مول بر لیتر) انجام شد (Choffe *et al.*, 2000a). در این تحقیق در مواقعی که NAA در محیط کشت بود مانع اندام‌زایی ریشه شد در حالیکه IAA همراه با IBA فهمیده شد که برای القای تشکیل ریشه مؤثر هستند و به طور معنی‌داری ریشه‌زایی هیپوکوتیل‌ها در محیط حاوی ۵ تا ۱۰ میکرومول بر لیتر IBA بیشتر از تیمارهای دیگر بود. همچنین ریز نمونه‌های کوتیلدون بیشترین پاسخ را هنگامی که در ۵۰ میکرومول IBA کشت شدند از خود نشان دادند که میانگین ۹/۷ ریشه در هر نمونه را داشتند. از طرفی در محیط حاوی ۱۵ میکرومول IBA ۹/۱ریشه در هر ریزنمونه و در محیط حاوی ۱۰ میکرومول IAA ۶/۶ ریشه در هر ریزنمونه تولید کردند که به طور معنی‌داری مقدار ریشه‌زایی آن کمتر از IBA بود. از نتایج این تحقیق مشخص شد که ترتیب تأثیر ریشه‌زایی در این ۳ نوع اکسین به این شکل است IBA بیشتر از IAA و IAA بیشتر از NAA است.

در یک تحقیق دیگر برای القای کالوس و باززایی گیاه، فقط غلظت‌های پائین‌تر BAP (۰/۴۴–۸/۸۸ میکرومولار)، ساقه‌ی نابه‌جا بعد از ۴ هفته تشکیل دادند و غلظت‌های ۱۷/۷۶ و ۳۱/۰۸ میکرومولار BAP مانع تشکیل شاخساره بعد از ۴ هفته شدند. همچنین ترکیب BAP(۴/۴۴ میکرومولار) و NAA (۰/۵۴میکرومولار) ۱۰۰ درصد شاخه‌زایی با تعداد زیادی از شاخساره در هر ریز نمونه تولید کردند و از طرفی افزایش غلظت هورمون NAA باعث تشکیل کالوس و کمتر شدن القای شاخه‌زایی شد. البتّه NAA به تنهایی به طور مستقیم و غیر مستقیم باعث تشکیل ریشه‌زایی شد. همچنین ترکیب مقدار بالای NAA و مقدار پائین BAP باعث القای تکثیر شاخساره و بعضی ریشه‌های جانبی گردید.

در مقابل ریزنمونه‌های رشد کرده روی محیط حاوی سطوح بالای BAP به تنهایی یا در ترکیب با NAA دارای باززایی به آهستگی یا بدون باززایی بودند و کالوس‌های مشاهده شده با غلظت‌های بالای BAP و NAA قهوه‌ای و نکروزه شدند و اثرات سمّی نشان دادند (Koroch *et al*., 2002). همچنین در یک تحقیق دیگر مشخص گردید که غلظت‌های پائین BAP (۰/۴۵ تا ۴/۵ میکرومولار در لیتر) برای اندام‌زایی شاخه از ریزنمونه‌های بذر نیز مؤثر است (Gockel *et al*., 1992).

در یک تحقیق، آزمایشات برای مقایسه پتانسیل القای باززایی ریزنمونه‌ی دمبرگ از طریق هورمون‌های IAA (۵ و ۱۰ میکرومولار درلیتر)، TDZ (۰/۵ ، ۱ ، ۵ و ۱۰) NAA (۵ و ۱۰ میکرومولار BAP (۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) یا 2،4-D (۵ و ۱۰ میکرومولار) انجام شد. در این تحقیق محیط‌های حاوی ۱ تا ۱۵ میکرومول بر لیتر BAP تشکیل شاخه در همه‌ی غلظت‌ها را تحریک کردند و ۸۰ تا ۹۰ درصد ریز نمونه‌ها به BAP صرف‌نظر از غلظت واکنش نشان دادند. همچنین مناسب‌ترین مقدار BAP، ۲/۵میکرومول درلیتر بود که میانگین ۸/۱ شاخه در هر ریزنمونه در طی ۳۳ روز تولید کرد. از طرفی استفاده BAP درترکیب با NAA یا 2،4–D مانع باززایی شدند. باززایی همچنین جلوگیری شد هنگامی که 2،4–D به تنهایی استفاده شد و ریزنمونه‌های دمبرگ به وسیله NAA به تنهایی در ۵ یا ۱۰ میکرومول بر لیتر میانگین ۲/۲ ریشه در هر ریزنمونه تشکیل دادند و در حدود ۹۰ درصد از ریزنمونه‌ها با NAA تشکیل ریشه دادند. با وجود اینکه که باززایی در بیش از ۹۵ درصد از کشت‌ها هنگامی که IAA در ترکیب با TDZ یا هنگامی که محیط فقط دارای TDZ بود حاصل گردید، نشان داده شده که BAP برای باززایی بسیار مؤثر است ولی TDZ چندان مؤثر نیست البتّه فراوانی باززایی هنگامی که TDZ و IAA در محیط باهم بودند افزایش یافت (Choffe *et al*., 2000b).

هورمون TDZ در محیط کشت، تجمع اکسین‌های درونی و سیتوکنین‌ها را تحریک می‌کند. مشاهدات نشان داده است که BAP مؤثرتر از TDZ است و فعالیت TDZ به وسیله‌ی اکسین‌های خارجی تغییر می‌یابد که شاید یک علّت، تعادل هورمونی ویژه برای باززایی بافت سرخارگل باشد (Murthy *et al*., 1995).

در گزارشات قبلی باززایی گیاهان از ریزنمونه دمبرگ سرخارگل به وسیله‌ی مقادیر کم BAP صورت گرفت و باززایی از ریزنمونه برگ کمتر از ریزنمونه‌های دیگر بود در حالیکه در تحقیق دیگر، BAP در ترکیب با NAA بیشترین تأثیر در باززایی ساقه‌های نابه‌جا از ریزنمونه‌های برگ داشت و بیشترین تعداد ریشه در شاخساره‌های تولید شده در غلظت‌های ۲/۴۶ و ۴/۹ میکرومولار IBA بود و طویل شدن ریشه به طور واضح با افزایش غلظت IBA در محیط متوقف شد. این تفاوت مابین ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ در پاسخ به غلظت BAP و NAA در محیط‌ها می‌تواند انعکاس تفاوت‌های ممکن سطح تنظیم کننده‌های رشد در منبع ریزنمونه یا میزان حساسیت متفاوت بافت‌ها به تنظیم کننده‌های رشد گیاهی باشد (Koroch *et al*., 2002).

در تحقیقی که به منظور شاخه‌زایی مستقیم از ریزنمونه‌های برگ در محیط WPM حاوی غلظت‌های مختلف BAP صورت پذیرفت، بیشترین شاخه‌زایی در محیط حاوی ۵ درصد شیرنارگیل و غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. از طرفی بیشترین کالوس‌زایی در محیط حاوی 2/5BAP+0/5NAA میلی‌گرم در لیتر حاصل گردید. در نهایت ریشه‌زایی شاخه‌های تولید شده، در محیط حاوی 1/5IBA میلی‌گرم در لیتر بود (Mechanda *et al*., 2003).

در آزمایشی تحت عنوان شاخه‌زایی غیر مستقیم سرخارگل ایرانی از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون، به این موضوع پی بردند که بیشترین کالوس‌زایی در ترکیب

هورمونی 0/2BAP+0NAA میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه کوتیلدون و بیشترین شاخه‌زایی در ترکیب 0/4BAP+0NAA میلی‌گرم در لیتر در هر دو ریزنمونه و نهایتاً ریشه‌زایی در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA به وجود می‌آید (Zebarjadi *et al*., 2011).

به طور کلّی در سه گونه پورپورا و آنگوستی فولیا و پالیدا گزارش گردیده است که ترکیبات با غلظت‌های مختلفی از هورمون‌های BAP و NAA در القای کالوس و شاخه‌زایی در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون مؤثر هستند(Bhatti *et al*., 2002).

باززایی ازطریق کشت بافت یک مرحله حیاتی برای ترانسفورماسیون اغلب گیاهان است اگرچه در بعضی گونه‌ها فقدان روش باززایی مؤثر یک مانع بزرگ برای استعمال تکنولوژی ترانسفورماسیون است (Penna *et al*., 2002). با وجود ترانسفورماسیون تعدادی از گونه‌های گیاهی با اهمیّت ازنظر کشاورزی، گزارش این چنین تلاش‌ها روی گیاهان با اهمیّت از نظر دارویی خیلی کم است (Gomez *et al*., 2007). با وجود اهمیّت اکیناسه و مطالعات بالینی و دارویی فراوان، اطّلاعات در باب کشت بافت و ترانسفورماسیون ژنتیکی در مورد این گیاه در ابتدای راه است. البتّه گیاهان اکیناسه ترانسژنیک به واسطه‌ی اگروباکتریوم با به کار بردن نئومایسین ترانسفراز به عنوان مارکر گزارش شده است Koroch *et al*., 2002 and Wang *et al*., 2004) و همچنین کشت ریشه مویی سرخارگل به وسیله‌ی انواع مختلفی از ریزنمونه‌ها به وسیله‌ی ۳ نژاد *grobacterium rhizogenes* انجام شده است (Wang *et al*., 2006).

در یک تحقیق پروتکل جدید برای ترانسفورماسیون با واسطه‌ی اگروباکتریوم با به کار بردن ژن bar که باعث تحمل به علف‌کش Basta به عنوان یک مارکر گزینش‌گر است توسعه یافت. به منظور بهینه‌سازی کشت بافت گیاه سرخارگل برای انتقال این ژن، در این تحقیق فهمیده شد که BAP به طور خیلی زیادی به تنهایی یا در ترکیب با اکسین برای تشکیل شاخه‌های چندتایی از ریزنمونه های نوک شاخه و برگ در غلظت‌های ۴/۴ و ۸/۸۷

میکرومولار مؤثر است و افزودن ۰/۵۳ میکرومولار NAA و ۷/۸۸ میکرومولار BAP به محیط MS اغلب برای شاخه‌زایی (۹۳/۵۱ درصد) ریزنمونه‌های برگ و تولید بیشترین تعداد شاخساره در هر ریزنمونه (۸/۲۶) مناسب است. البتّه تعداد شاخساره تولیدی در هر ریزنمونه و همچنین درصد شاخه‌زایی ریزنمونه برگ بیشتر از ریزنمونه نوک شاخه بود ولی طول شاخساره‌های تولیدی از ریزنمونه نوک شاخه از برگ بیشتر بود (Moemen *et al*., 2010).

در یک آزمایش دیگر که به منظور بهینه‌سازی شرایط کشت بافت برای ترانسفورماسیون گیاه سرخارگل انجام شد، از محیط کشت حاوی غلظت‌های متفاوتی BAP به تنهایی یا در ترکیب با NAA استفاده شد. در این تحقیق BAP به تنهایی بعد از ۴ هفته فقط کالوسهای سبزرنگ تولید کردند و فقط غلظت‌های پائین آن بعد از ۴ هفته تشکیل شاخساره دادند. محیط MS همراه با BAP (۴/۴۴ میکرومولار) و NAA (۰/۵۴ میکرومولار) اغلب برای باززایی شاخساره برای ۱۰۰ درصد ریزنمونه‌ها با تعداد میانگین ۷/۷ شاخساره در هر ریزنمونه مؤثر بود. همچنین افزایش غلظت NAA باعث افزایش تولید کالوس و کاهش شاخه‌زایی نیز شد. اگرچه غلظت کم BAP در محیط کشت باعث تحریک القای شاخه می‌شود، تعادل اکسین به سیتوکین یک فاکتور مهم تعیین شکل‌زایی است. در این تحقیق مقادیر بالای NAA (۰/۴۴ میکرومولار) باعث القای تکثیر شاخساره و بعضی ریشه‌های نابه‌جا شد. اگرچه این ریشه‌ها به طور مستقل از شاخه‌ها تشکیل شدند (Koroch et al., 2002).

به طور کلّی نوع ریزنمونه و جهت قرار گیری آن‌ها در محیط کشت و تنظیم کننده-های رشد گیاهی یک نقش کلیدی در تنظیم فرایند تمایز بازی می‌کنند (Jones *et al*., 2007). همچنین انتخاب ریزنمونه مناسب در مرحله مناسبی از توسعه یک نقش مهمّی برای یک کشت موفق درون شیشه‌ای بازی می‌کنند. از طرفی انتخاب یک تنظیم کننده

رشد گیاهی به طور خیلی زیادی در القای کالوس و شاخه‌زایی مؤثر است (Khawar *et al.*, 2005). فاکتورهای کلیدی که صلاحیت اندام‌زایی سلولهای گیاهی را تعیین می‌کنند ناشناخته هستند. مشخص شده است که انواع متفاوتی ریزنمونه در بعضی گیاهان و سلول-های متفاوت در داخل بعضی ریزنمونه‌ها از نظر شایستگی باززایی در وضعیت‌های متفاوت وجود دارند و بنابراین عوامل متفاوتی در مسیر باززایی در گیاه مورد نیاز است (Hicks, 1994). بنابراین منطقی است نتیجه بگیریم که راندمان‌های متفاوتی از ریزنمونه‌ها در پاسخ به ترکیبات اکسینی و سیتوکنین باعث منعکس کردن وضعیت‌های متفاوتی از شایستگی یا صلاحیت شکل‌زایی سلول‌ها در دمبرگ، هیپوکوتیل و بافت‌های دیگر می‌شود (Choffe *et al.*, 2000a). به‌طور کلّی چندین فرایند بیوشیمیایی برای تمایز در طیّ اندام‌زایی در گیاهان مورد نیاز است (Chawla, 2000).

۲-۵- اسیدیته، ساکارز و مواد ژله کننده

به طور ویژه تأثیر تغییر اسیدیته (pH) محیط کشت روی باززایی گونه‌های اکیناسه گزارش نشده است و در اغلب پروتوکل‌ها pH ۵/۶±۰/۳ به کار برده شده است. از طرفی گونه‌های اکیناسه در خاک با محدوده pH از ۵/۹ تا ۸ رشد می‌کنند و بهترین تولید اکیناسه با pH طبیعی بین ۷-۶/۸ بوده است (Galambosi, 2004).

ترکیبات محیط کشت، پایه‌ای مناسب برای جوانه‌زنی درون شیشه‌ای بذرهای اکیناسه هستند. در بیشتر آزمایشات گیاهچه‌های استریل روی محیط MS کامل و ۰/۷ درصد آگار و ۳ درصد ساکارز با pH ۵/۸ تولید شدند (Moemen *et al.*, 2010). ولی در یک آزمایش بذرها روی محیط MS ۱/۲ و ۱ درصد ساکارز و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آلبومین هیدرولیز انکوبه شدند و جامد شدن محیط با ۰/۲ درصد فیتاژل بود و گیاهچه به محیط MS کامل با ۱ درصد ساکارز و ۰/۲ درصد فیتاژل منتقل شدند. البتّه pH محیط تا ۶ به وسیله NaOH ۱

نرمال و HCl ۱ نرمال تنظیم و از ۰/۶ درصد آگار برای جامد شدن محیط استفاده شد (Dahanayake *et al*., 2010). در یک تحقیق دیگر از محیط‌های MS حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوسیتول، ۰/۴ میلی‌گرم تیامین و ۲ درصد ساکارز استفاده و pH محیط ۵/۸ به وسیله‌ی KOH تنظیم گردید و در نهایت ۷ گرم در لیتر به آن آگار اضافه گردید (Koroch *et al*., 2002)

همچنین در یک تحقیق از محیط MS ۱/۲ و B5 ۱/۲ و ۲۰ گرم در لیتر ساکارز برای جوانه‌زنی گیاهچه استفاده کرد و pH را در حدود ۵/۷ تنظیم کرد و محیط کشت توسط ۸ گرم در لیتر آگار جامد و در نهایت به اتوکلاو با فشار ۱/۲ اتمسفر به مدّت ۲۰ دقیقه منتقل گردید (Zobayed and Saxena, 2003). در یک تحقیق دیگر از ۱/۵ درصد ساکارز در زمانی که ریزنمونه‌ها به تاریکی منتقل شدند و ۳ درصد در زمان انتقال به روشنایی استفاده شد و نیز برای جامد کردن محیط از ۳ درصد ژلرایت استفاده شد (*et al*., 2010 and Kristen et Moemen al., 2000). در بیشتر تحقیقات از آگار برای جامد کردن محیط کشت استفاده می‌شود ولی در یک تحقیق مشخص شد که فیتاژل به عنوان ماده جامد کننده تأثیر بیشتری از آگار بر باززایی گونه آنگوستی فولیا دارد (Lucchesini *et al*., 2003) و همچنین از آگارز به عنوان ماده جامد کننده برای باززایی گیاه سرخارگل نیز استفاده شده است (Mechanda *et al*., 2003).

۲-۶- دوره روشنایی

نور نقش مهمّی در ازدیاد شاخساره در کشت بافت گیاه سرخارگل بازی می‌کند. دوره روشنایی و دمای نگهداری محیط در مراحل مختلف کشت در آزمایشات مختلف متفاوت است. به طور معمول یک دوره نوری ۱۶ ساعته با شدت نور معادل ۳۰۰۰ تا ۶۰۰۰ لوکس با لامپهای فلورسانت سفید و دماهای ۲ ±۲۵ درجه سانتی‌گراد برای شاخه‌زایی گیاه

دارویی سرخارگل به کار برده می‌شود Lakshmanan *et al*., 2002 and Koroch *et al*., 2003 and Bhatti *et al*., 2000). در بعضی موارد یک انکوباسیون اولیه در تاریکی باعث افزایش باززایی در اکیناسه شده است. اگرچه شاخه‌زایی و نیز ریشه‌زایی، به طور معنی‌داری بستگی به گونه‌ی گیاهی دارد امّا دما و نور نیز خیلی مؤثر است (Harbage, 2001).

در یک آزمایش برای تولید گیاچه‌های استریل از ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد (Moemen *et al*., 2010). در تحقیق دیگر از دوره نوری ۱۲ ساعت تحت نور فلوروسانت و دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی گراد استفاده شده است (Dahanayake *et al*., 2010). همچنین در یک تحقیق دیگر بذرهای کشت شده را درتاریکی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کردند و بعد از ۱۴ روز آن‌ها را به اتاقک رشد با دمای ۲۴ درجه سانتی گراد و تحت ۱۶ ساعت روشنایی در روز با شدت نور ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ لوکس به مدت ۲ ماه منتقل کردند (Koroch *et al*., 2002).

در گونه آنگوستی فولیا القای کالوس در ریزنمونه ساقه گل در شرایط تاریکی وجود نداشت ولی کالوس‌ها در ریزنمونه برگ در شرایط تاریکی القاء شدند (Lucchesini *et al*., 2003). نتایج نشان می‌دهد که تاریکی باعث تعیین مسیر منابع گیاهی یا تغییر در سطح داخلی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در بافت‌های کشت شده می‌شود و از طرفی شاید حساسیت بافت ریزنمونه‌ها در مقابل تنظیم کننده‌های رشد در تاریکی تغییر کند (Zobayed and Saxena, 2003).

تکثیر به وسیله‌ی جنین‌های سوماتیکی باعث تولید تعداد خیلی زیادی گیاهچه‌ها می‌شود (Mithila *et al*., 2001). جنین های سوماتیکی سرخارگل اولین بار در زیرنمونه-های دمبرگ در حضورBAP، TDZ یا TDZ و IAA مشاهده شد (Chofee *et al*., 2000a). همچنین جنین‌های سوماتیکی بهبود یافته در سرخارگل به وسیله هورمون IBA به عنوان

اکسین در ۱۴ روز تاریکی بعنوان تیمار گزارش شده است (Zobayed and Saxena, 2003).

شواهد قابل توجّهی نشان می‌دهد نور، غلظت تنظیم کننده‌های داخلی رشد و یا حساسیت سلّول‌ها به هورمون‌ها را تغییر می‌دهد(Hutchinson, 2000). گزارش شده است که تیمار نور مداوم، به طور معنی‌داری مقدار تنظیم کننده‌های داخلی رشد را در بافتهای گل شمعدانی کاهش می‌دهد و باعث کاهش جنین‌های سوماتیکی می‌شود. همچنین دو برابر شدن فراوانی جنین‌های شمعدانی در اثر انکوباسیون در تاریکی (Croke and Cassells, 1997) و تأثیر مثبت تیمار تاریکی در یک دوره‌ی کوتاه برای القای جوانه و بنابراین افزایش تکثیر درون شیشه‌ای در آزالیا گزارش شده است (Hsia, and Korban, 1998). از طرفی القای جنین‌های سوماتیکی بستگی به در معرض گذاشتن ریزنمونه‌ها با اکسین، یا یک اکسین در ترکیب با سیتوکنین دارد (Gallo and Green, 2002).

یکی از عوامل جلوگیری کننده استعمال وسیع جنین‌های سوماتیکی در تکثیر گیاهان، جوانه‌زنی کم و قدرت زنده ماندن کم در طی عادت‌دهی است (Afreen *et al*., 2002). ولی در یک تحقیق نشان داده شد که این مطلب صحّت ندارد و ۸۰٪ از گیاهچه‌ها بدست آمده از جنین‌های سوماتیکی در گلخانه زنده ماندند (Zobayed and Saxena, 2003).

۲-۷- نوع محیط کشت

اگرچه محیط کشت موراشیگ و اسگوگ (MS) محیط انتخابی در اغلب مطالعات روی ریزازیادی و باززایی سرخارگل بود، استفاده از محیط‌های دیگر مثل WPM[1] گزارش شده است (Harbage, 2001 and Mechanda *et al*., 2003). همچنین در یک تحقیق که بر روی گونه آنگوستی فولیا صورت گرفت از محیط کشت CH که حاوی عناصر ماکرو و میکرو

[1] Woody plant medium

MS، ویتامین‌های B5، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتاتیون و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر ۲-اتان سولفونیک اسید استفاده گردید که تأثیر خوبی در باززایی داشت (Lucchesini *et al.*, 2009).

۲-۸- نوع گونه

نوع گونه باعث نتایج متفاوتی در باززایی و کشت بافت گیاهان می‌شود. در بالا نوع ریزنمونه و هورمون و همچنین غلظت‌های متفاوتی از هورمون‌ها در باززایی گونه پورپورا مورد بحث قرار گرفت. حال به بررسی کشت بافت گونه‌های دیگر می‌پردازیم.

در باززایی گیاهچه‌ها از ریزنمونه‌های برگی *E.pallida*، کالوس‌ها به وسیله‌ی ترکیب NAA (۰/۱۱ میکرومولار) و BAP (۲۶/۶ میکرومولار بر لیتر) القاء شدند. ترکیب BAP و NAA در این تحقیق مشخص شد که برای باززایی این گونه مفید هستند (Koroch *et al.*,2003).

با توجّه به مطالب قبل مشخص گردید که برگ‌های دو گونه پورپورا و پالیدا پتانسیل بالایی برای تشکیل شاخساره دارند که این موضوع مستقیماً مربوط به ترکیبی از تنظیم کننده‌های داخلی رشد با تنظیم کننده‌های خارجی رشد در محیط کشت است (Koroch *et al.*, 2002; 2003). از طرفی نیز فهمیده شده است که ترکیب هورمون TDZ یا BAP برای اندام‌زایی شاخه از ریزنمونه‌های برگی *E.tennesseenis* مؤثرهستند (Sauve, 2004).

در باززایی گیاهچه‌ها از ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ و ریشه گونه‌ی آنگوستی فولیا، بهترین نتیجه در تشکیل کالوس، در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در ریزنمونه برگ به وجود آمد و بیشترین تعداد شاخساره تولید شده از کالوس‌ها در محیط MS حاوی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر BAP در

ریزنمونه برگ و بیشترین ریشه‌زایی در محیط حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با زغال فعّال مشاهده گردید (Taha *et al*., 2010). از طرفی در تحقیقی که در همین گونه در جهت باززایی غیر مستقیم انجام گرفت بیشترین کالوس‌زایی و تعداد شاخساره در این ریزنمونه در ترکیب هورمونی 3BAP+0/5IBA بر حسب میلی‌گرم در لیتر وجود داشت و از نظر کیفیّت کالوس دارای کالوس‌های ترد و شکننده و سفید با نقطه‌های بنفش بودند(Lucchesini *et al*., 2009).

در یک تحقیق دیگر، مقایسه‌ای برای باززایی از ریزنمونه ساقه، بین غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP و KIN صورت گرفت. در این تحقیق باززایی به صورت مستقیم و بدون مرحله کالوس‌زایی صورت گرفت که بیشترین تعداد شاخساره در هر ریزنمونه در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و در بین غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۱میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های IBA و NAA و IAA، بیشترین ریشه‌زایی در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون IBA مشاهده گردید (Jong Se Kim *et al*., 2010).

فصل سوم

مواد و روش‌ها

مواد و روش‌ها

این تحقیق با هدف بررسی توانایی تولید کالوس و متعاقباً باززایی گیاهچه از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ گیاه دارویی سرخارگل در آزمایشگاه و اتاق کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود انجام پذیرفت.

تهیه محیط کشت گیاهی مناسب برای هدف درنظر گرفته شده امری ضروری است و یکی از کارهایی اوّلیه که در کشت بافت گیاهی صورت می‌گیرد تهیه محیط کشت است.

۳-۱- تهیه محیط کشت گیاهی MS

محیط MS یکی از مهمترین محیط‌های کشتی است که در کشت بافت گیاهی استفاده می‌شود. تهیه محیط کشت MS با استفاده از محلولهای مادری[1] مواد شیمیایی انجام می پذیرد. این محلول ها به طور معمول به صورت غلیظ (10 X) تهیه می‌شود و در زمان استفاده به میزان مورد نظر رقیق می‌گردد. محیط کشت MS شامل سه دسته مواد اصلی است: مواد غذایی پر مصرف (Macronutrients) مواد غذایی کم مصرف (Micronutrients) و ویتامین‌ها. هر یک از سه دسته مواد بالا را به صورت محلول مادری و با غلظت خاص آماده نموده و برای تهیه MS کامل استفاده می‌شوند.

به منظور تهیّه محلول‌های مادری، مواد شیمیایی باید در آب مقطر بسیار خالص و یون‌زدایی شده حل گردند. در حل مواد شیمیایی باید دقّت شود تا رسوب تشکیل نگردد. در مورد محلول‌های مادری نمک‌های ماکرو و میکرو، پس از حل شدن کامل هر ماده شیمیایی ماده دوّم اضافه گردید. از آنجاییکه مواد شیمیایی مورد استفاده در تهیه هر لیتر محیط کشت بسیار اندک می‌باشد، لذا به منظور افزایش دقّت در توزین مواد، معمولاً استوک‌ها را با غلظت های چند برابر ساخته تا از آن‌ها در محیط کشت استفاده شود.

[1] - Stock solution

۳-۱-۱- محلول مادری مواد غذایی کم مصرف با غلظت 100X

مقادیر داده شده مواد زیر در ۱ لیتر آب مقطر حل نموده و در مقادیرml ۱۰۰ در فریزر نگهداری شود.

Micro nutrients stock (100X)	
$MnSO_4. 4H_2O$	2.23 g
H_3BO_3	0.62 g
$ZnSO_4. 7H_2O$	0.86 g
$Na_2MoO_4. 2H_2O$	25 mg
$CuSO_4. 5H_2O$	2.5 mg
$CoCl_2. 6H_2O$	2.5 mg

۳-۱-۲- محلول مادری مواد غذایی پرمصرف با غلظت 10X

مقادیر داده شده ترکیبات زیر را در ml۵۰۰ آب مقطر حل کرده و سپس به حجم نهایی ml۶۹۰ رسانده شد (این محلول به صورت تازه تهیه شود).

Macro nutrients stock (10X)	
KNO_3	19 g
NH_4NO_3	16.5 g
$MgSO_4. 7H_2O$	3.7 g
$CaCl_2. 2H_2O$	4.4 g
KH_2PO_4	1.7 g

۳-۱-۳. محلول مادری ویتامین‌ها

B5- Vitamin stock (100 X)	
Myo- inositol	5 g
Nicotinic acid	50 mg
Pyridoxine HCl	50 mg
Thiamine HCl	0.5 g

مقادیر داده شده برای مواد بالا در ۵۰۰ml آب مقطر حل نموده و در مقادیر ۱۰۰ml در فریـزر (۲۰ $°C$ –) نگهداری شدند.

۳-۱-۴- محلول مادری آهن با غلظت 10X

مقادیر داده شده مواد زیر را هر یک به طور جداگانه در ۴۰ml آب مقطر حل کـرده سـپس روی هم ریخته و به حجم نهایی ۱۰۰ml رسانده شد. (محلول مادری آهن باید به صورت تازه تهیه شود).

EDTA-Fe Stock (10X)	
$FeSO_4$. $7H_2O$	278 mg
Na_2EDTA. $2H_2O$	373 mg

۳-۱-۵- محلول مادری یدید پتاسیم (ماده غذایی کم مصرف) با غلظت 1000X

مقدار ۸۳ mg از یدید پتاسیم را در ۱۰۰ml آب مقطر حل کرده و در یخچال $°C$ ۴ نگهداری شد.

۳-۱-۶- تهیه محلول مادری MS (غلظت 10X)

از محلول های مادری تهیه شده مقادیر زیر را در یک استوانه مدرج ریخته شد و با هـم مخلـوط گردید.

MS 10X stock	
1) Macro nutrients stock (10X)	690 ml
2) Micro nutrients stock (100X)	100 ml
3) B5- vitamins stock (100X)	100 ml
4) EDTA- Fe stock (10X)	100 ml
5) KI stock (1000X)	10 ml
Total volume	1000 ml

سپس در مقادیر ۱۰۰ ml در فریزر تا زمان مورد نیاز نگهداری شود. در زمان استفاده برای تهیه ۱ لیتر محیط MS کامل کافی‌است ۱۰۰ ml از محلول فوق را در آب مقطر حل نموده و به حجم ۱ لیتر رسانید و پس از تنظیم pH در صورت نیاز، آگار اضافه نموده و اتوکلاو گردد.

۳-۲- محیط‌های کشت گیاهی

۳-۲-۱- محیط کشت برای کشت بذور و تولید گیاهچه

این محیط حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های محیط 1/2MS (غلظت مواد نصف شده)، بدون هورمون گیاهی و ۲۰ گرم در لیتر ساکارز، ۷ گرم در لیتر آگار و pH 5.7 می‌باشد.

در این محیط کشت از مقدار کمتری ساکارز استفاده شد. به علّت داشتن مواد غذایی در داخل خود بذور یعنی آندوسپرم آن, برای جوانه‌زنی بذور مقدار زیادی نیاز به مواد غذایی یا ساکارز نیست. مخصوصاً که در این تحقیق از گیاهچه‌های ۷۰ روزه (یعنی سنّ آنچنان بالایی ندارند) برای تهیه‌ی ریزنمونه استفاده گردید.

۳-۲-۲- محیط القاء کالوس‌زایی (CIM)[1]

محیط‌های القای کالوس‌زایی دارای یک هورمون سیتوکنین به تنهایی یا در ترکیب با یک هورمون اکسین هستند. این محیط‌ها حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های محیط MS، هورمون BAP یا TDZ و یا KIN با غلظت‌های ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به عنوان هورمون‌های سیتوکنینی در ترکیب با هورمون IBA و یا NAA با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر به عنوان هورمون‌های اکسینی و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۷ گرم در لیتر آگار و pH 5.7 می‌باشند.

[1] - Callus Induction medium

۳-۲-۳- محیط‌های القاء شاخه‌زایی (SIM)[1]

۱- محیط‌های القای شاخه‌زایی حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP

این محیط‌ها حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های محیط MS، هورمون BAP با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر به عنوان سیتوکنین، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۷ گرم در لیتر آگار و pH 5.7 می‌باشد.

۲-محیط‌های القای شاخه‌زایی حاوی یکی از هورمون‌های BAP یا TDZ به عنوان سیتوکنین به تنهایی یا در ترکیب با هورمون NAA به عنوان اکسین هستند.

این محیط‌ها حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های محیط MS، هورمون‌های BAP و یا TDZ با غلظت-های ۰، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر به عنوان سیتوکنین در ترکیب با هورمون NAA با غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به عنوان اکسین، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۷ گرم در لیتر آگار و pH 5.7 می‌باشد.

۳-۲-۴- محیط القاء ریشه‌زایی (RIM)[2]

این محیط‌ها حاوی نمک‌ها و ویتامین‌های محیط MS، هورمون IBA و یا NAA با غلظت‌های ۰، ۰/۲، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به عنوان اکسین و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۷ گرم در لیتر آگار و pH 5.7 می‌باشد.

۳-۳- طرز تهیه محلولهای ذخیره‌ای هورمون‌های گیاهی

الف- هورمون BAP، KIN، IBA، NAA

محلول مادری تنظیم کننده‌های رشد با توجه به غلظت‌های در نظر گرفته شده در آزمایشات تهیّه می‌شود. برای تهیه محلول ذخیره از این هورمون‌ها مقداری از پودر مربوطه (در این آزمایشات

[1] - Shoot Induction Medium
[2]- Root Induction Medium

۲۰ میلی‌گرم) را ابتدا در ۱ میلی‌لیتر اتانل مطلق (و یا در ۱ میلی‌لیتر، محلول NaOH ۱ نرمال به‌همراه حرارت) حل نموده و سپس با آب دو بار تقطیر شده به حجم 40 ml رسانده شد. این هورمون‌ها قابل اتوکلاو نمودن هستند.

ب- هورمون تیدیازرون (TDZ)

برای تهیه محلول ذخیره از این هورمون مقداری از پودر مربوطه (در این آزمایشات ۲۰ میلی‌گرم) را ابتدا در ۱ میلی‌لیتر محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل نموده و سپس با آب دو بار تقطیر شده به حجم 40 ml رسانده شد. این هورمون قابل اتوکلاو نمودن است.

در ابتدا سعی گردد که همراه با حلّال‌ها آب مقطر به هورمون‌ها اضافه نشود چون به طور کامل هورمون‌ها حل نمی‌شوند و همچنین محلول‌های مادری تهیه شده سعی شود در تاریکی و دمای ۴-۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند تا نور باعث تخریب ساختمان و از دست رفتن خاصیت آن‌ها نشود.

۳-۴- اندازه‌گیری pH و افزودن آگار

تنظیم pH محیط کشت: بعد از تهیه محیط‌های کشت مورد نظر باید pH محیط کشت اندازه-گیری شود. برای تنظیم کردن pH محیط، نیاز به دو محلول است (pH محیط در این آزمایشات ۵/۷ تنظیم گردید).

۱- محلول NaOH ۱ نرمال: زمانی‌که pH محیط زیر ۵/۷ باشد از این محلول استفاده می‌شود.

۲- محلول HCl ۱ نرمال: زمانی‌که pH محیط بالای ۵/۷ باشد از این محلول استفاده می‌شود.

آخرین مرحله‌ی تهیه محیط کشت اضافه کردن آگار به محیط است. بعد از تهیّه محیط کشت، آنها را به ظروف درب آبی (ظروف قابل اتوکلاو) منتقل نموده و سپس برای استریل محیط این ظروف حاوی محیط کشت به اتوکلاو در فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه منتقل شدند. محیط‌های

استریل به همراه ظروف استریل شده به داخل دستگاه هود منتقل گردید و زمانیکه دمای محیط حدوداً به۵۰ -۴۰ درجه سانتی‌گراد رسید، محیط کشت به ظروف (شیشه مربا) استریل شده منتقل گردید و داخل هر ظرف شیشه‌ای تقریبا ۳۰ میلی لیتر محیط کشت ریخته شد.

نکته: سعی شود تا جایی که امکان دارد محیط سرد شده باشد تا در داخل ظروف بخار جمع نشود که این عامل می‌تواند در زمان انتقال محیط یا انتقال ریزنمونه‌ها به ظروف که درب ظروف و خود ظروف به علّت سهل‌انگاری آلوده شده باشند باعث آلوده شدن گیاهچه-ها شود .همچنین بعد از انتقال به ظروف کشت چند روز صبر شود که اگر محیط آلوده شده است اقدام به کشت بذور در داخل محیط کشت ننموده و محیط و ظروف آلوده حذف گردد.

۳-۵- تهیه گیاهچه و ریزنمونه

۳-۵-۱- ضدعفونی و استریل کردن بذور

مواد لازم جهت ضدعفونی کردن بذور به شرح زیر می‌باشد:

۱- محلول اتانول ۷۰ درصد: برای تهیّه این محلول باید به اندازه تفاضل درجه الکل اولیّه از درصد الکل مورد نیاز، به آن آب مقطر اضافه کرد. پس باید ۲۶ میلی‌لیتر آب مقطر به ۷۰ میلی‌لیتر الکل ۹۶ درصد اضافه نمود.

۲- هیپو کلرید سدیم ۲/۵ درصد: هیپوکلرید سدیم اولیه دارای ۵ درصد کلر فعّال بوده و چون ریزنمونه‌ها به این غلظت حساس هستند با افزودن آب مقطر استریل به این محلول، هیپوکلرید ۲/۵ درصد تهیه گردید.

۳- آب مقطر استریل:

در این تحقیق بذور با هیپوکلرید سدیم ۱/۵ و ۲ درصد هم ضدعفونی گردید. نتیجه کار این بود که بیشتر بذور ضدعفونی شده توسط هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد، در محیط کشت آلوده شدند و بذور ضدعفونی شده توسط هیپوکلرید سدیم ۲ درصد تعداد کمی از بذور آلوده شده بودند. ولی در بذور ضدعفونی شده با هیپوکلرید سدیم ۲/۵ درصد اصلاً آلودگی مشاهده نگردید. برای ضدّعفونی کردن بذور در ابتدا بذور را داخل ظروف حاوی اتانول ۷۰ درصد ریخته و آن‌ها را به مدت ۶۰ -۴۵ هم‌زده تا تمامی سطوح ضدعفونی گردند. سپس بذور را داخل محلول هیپوکلرید سدیم ریخته و آن‌ها را به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه هم‌زده تا بذور به طور کامل داخل محلول غوطه ور شوند. مرحله نهایی ضدعفونی بذور شستشو آن‌ها است که این کار با آب مقطر استریل در ۳ مرتبه انجام گردید که هر مرحله ۵ دقیقه به طول انجامید. با اتمام ضدعفونی، بذور به ظروف استریل منتقل گردیدند و سعی گردید که آب بذور گرفته شود و بعد از آن شروع به کشت در محیط کشت شود.

نکته: تمامی موارد بالا در زیر دستگاه هود انجام می‌شود

۳-۵-۲- کشت بذور و تهیه گیاهچه

در این تحقیق از گیاهچه و ریزنمونه‌های بدست آمده در شرایط درون شیشه‌ای استفاده گردید. به منظور تهیّه گیاهچه سرخارگل در شرایط درون شیشه‌ای سعی گردید که بذور سالم (فاقد شکستگی و آسیب) و بزرگتر انتخاب شود. برای کاشت بذور از آنجاییکه بذور دارای آلودگی هستند باید قبل از کشت آن‌ها را ضدعفونی کرد. امّا قبل از ضدعفونی، بذور در یخچال در دمای ۴-۰ درجه سانتی گراد به مدّت یک هفته قرار داده شد تا خواب بذور از بین رفته و درصد جوانه زنی بذور افزایش یابد. نتایج نشان داد که این کار باعث افزایش جوانه‌زنی بذور می‌شود و با این پیش تیمار سرمایی حدود ۹۵ درصد بذور جوانه زدند.

دستگاه لامینار فلو یا هود دستگاهی است که هوای بیرون را به داخل کشیده و آن را استریل می‌کند. این دستگاه دارای لامپ UV جهت استریل کردن قسمت داخلی و یک یا چند لامپ فلورسنت جهت تأمین روشنایی است. قبل از استفاده از دستگاه هود باید آنرا آماده ساخت. بدین صورت که ابتدا سطح داخلی لامینار با پنبه آغشته به الکل تمیز کردیم و سپس به مدت ۱۵ دقیقه تحت تابش نور UV قرار گرفت. کلیه ظروف مورد استفاده برای کشت یا ضدعفونی نمونه‌ها قبلا در آون یا اتوکلاو استریل گردیدند. قبل از روشن کردن لامپ UV می‌توان کلیه ظروف را نیز زیر آن قرار داد.

بذرهای ضدعفونی شده در زیر دستگاه هود را با استفاده از پنس‌های استریل (با استفاده از حرارت و الکل ۹۶ درصد) به محیط کشت جامد منتقل نموده و داخل هر ظرف ۴ بذر نیز کشت گردید. وقتی بذرها روی محیط کشت شد، درب ظروف را محکم بسته و دور آن را با پارافیلم بسته تا از ورود پاتوژن‌ها به داخل ظروف جلوگیری شود.

بعد از این مرحله این ظروف به یک محیط تاریک با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی-گراد به مدت ۲ هفته منتقل شده تا بذور جوانه زده و برگ‌های اولیه‌ی گیاه بوجود آید. حدوداً ۱۴-۱۰ روز طول کشید تا بذور جوانه زدند. بعد از ۲ هفته این ظروف به اتاقک رشد که دارای دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و مقدار نور فلورسانت حدوداً ۴۵۰۰ لوکس منتقل گردید. در این آزمایشات سنّ گیاهچه‌های استفاده شده برای تهیه‌ی ریزنمونه هفتاد روز در نظر گرفته شد (شکل ۳-۱). وقتی گیاهچه‌ها به سنّ مورد نظر رسیدند اقدام به تهیه‌ی ریزنمونه‌های مورد نظر شد. البتّه باید توجّه نمود که چون از محیط 1/2 MS استفاده گردید باید سعی شود که سنّ گیاهچه‌ها به علّت کمبود مواد غذایی از زمان مورد نظر نگذرد.

نکته: گیاهچه‌هایی که دارای ریشه بنفش رنگ بودند نسبت به گیاهچه‌ها با ریشه سفید از نظر رشدی در وضعیت بهتری داشتند.

شکل۳-۱ گیاهچه ۷۰ روزه برای تهیه ریزنمونه

۳-۵-۳- تهیه ریزنمونه و کشت آن‌ها

در بالا روش تهیه گیاهچه برای گرفتن ریزنمونه از گیاهچه‌ی موردنظر شرح داده شد. وقتی گیاهچه‌ها از نظر سن به حد موردنظر رسیدند اقدام به تهیه محیط کشت لازم برای کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های مورد نظر گردید. بعد از تهیه محیط‌های القای کالوس و اتوکلاو کردن محیط‌ها به منظور استریل، هریک از ظروف به داخل دستگاه هود منتقل شده و بعد از سرد شدن محیط، به داخل پتریدیش‌هایی که عرض ۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۱/۵ سانتی‌متر داشتند منتقل شد. ضمناً داخل هر پتری‌دیش حدوداً ۲۰ میلی لیتر محیط کشت ریخته شد.

پس از توزیع وسرد شدن محیط کشت، ظروف شیشه‌ای دارای گیاهچه‌های سالم و استریل به داخل دستگاه هود منتقل گردید و گیاه مورد نظر از محیط کشت جداسازی و داخل پتریدیش‌های استریل منتقل شد. سپس با استفاده از پنس و قیچی‌های استریل شده

دمبرگ و برگ‌های گیاه به قطعات با سایزهای مورد نظر برش داده شد. در این آزمایشات از دو ریزنمونه‌ی برگ و دمبرگ برای تهیه‌ی کالوس استفاده شد (شکل ۳-۲).

شکل۳-۲: ریزنمونه‌های برش خورده از گیاهچه-الف: ریزنمونه دمبرگ ب: ریزنمونه برگ

سایز ریزنمونه‌ی برگی حدوداً ۷ میلی‌متر و دمبرگ ۱ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. قبل از انتقال ریزنمونه‌های برش یافته به پتریدیش‌های حاوی محیط کشت القای کالوس، گیاهچه‌های هفتاد روزه را به داخل پتریدیش استریل که دارای کمی آب مقطر استریل هست برای شادابی و جلوگیری از پلاسمولیز ریزنمونه‌ها منتقل نموده و سپس ریزنمونه-های تهیه شده به محیط کشت منتقل گردیدند.ریزنمونه‌های برگی از قسمت پشت و ریزنمونه‌های دمبرگی به طور افقی بر روی محیط، کشت گردیدند.

بعد از کشت ریزنمونه‌ها در داخل پتریدیش‌های حاوی ترکیب‌های هورمونی درب پتریدیش‌ها با پارافیلم بسته و روی هر یک از آن‌ها نام ترکیب هورمونی نوشته شد.

۳-۶- آزمایشات کالوس‌زایی: این آزمایشات به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار (پتری‌دیش) اجرا شد و هر پتریدیش حاوی ۷ ریزنمونه بود.

۳-۶-۱- آزمایشات بررسی درصد کالوس‌زایی

در این آزمایشات نوع ریزنمونه (برگ و دمبرگ) به عنوان فاکتور اول و اثر هورمون سیتوکنین(BAP یا KIN یا TDZ) با غلظت‌های ۰ و ۱ و دو ۲ میلی‌گرم در لیتر به عنوان فاکتور دوم و اثر هورمون اکسین (IBA یا NAA) با غلظت‌های ۰ و ۰/ ۱ و ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر به عنوان فاکتور سوم و همچنین اثرات متقابل آن‌ها بر کالوس‌زایی در محیط کشت پایه MS مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایشات ۱۲ ترکیب هورمونی مطابق جدول زیر برای هر آزمایش به کار برده شد و در هر ترکیب هورمونی فقط یکی از هورمون‌های سیتوکنینی با غلظت مشخص همراه با یکی از هورمون اکسینی با غلظت مشخص استفاده گردید.

جدول ۳-۱- ترکیب غلظت‌های مختلف هورمون سیتوکنین با اکسین به منظور کالوس‌زایی

ترکیب هورمونی	غلظت‌های هورمون های سیتوکنین mg/l^{-1} (BAP, KIN, TDZ)	غلظت‌های هورمون‌های اکسین mg/l^{-1} (IBA ,NAA)
۱	۰	۰
۲	۰	۰/۱
۳	۰	۰/۵
۴	۰	۱
۵	۱	۰
۶	۱	۰/۱
۷	۱	۰/۵
۸	۱	۱
۹	۲	۰
۱۰	۲	۰/۱
۱۱	۲	۰/۵
۱۲	۲	۱

۳-۶-۲- بررسی درصد شاخه‌زایی خودبه خودی کالوس‌ها در محیط القاء کالوس

در این آزمایشات به بررسی شاخه‌زایی خود به خودی تمامی کالوس‌های گرفته شده از ترکیب‌های هورمونی ذکر شده پرداخته شد.

برای القای کالوس، پتریدیش‌های حاوی محیط‌های کشت و ریزنمونه‌های کشت شده، در شرایط تاریکی کامل و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. از نظر شرایط محیطی مکان نگهداری کشت‌ها باید کنترل شده باشد و احتمال ایجاد تنش به ریز نمونه‌های کشت شده وجود نداشته باشد. یادداشت برداری‌ها از کالوس‌ها نیز در آخر هفته ششم انجام شد. در این مدّت شش هفته هیچ واکشتی انجام نشد.

۳-۷- آزمایشات شاخه‌زایی

آزمایشات شاخه‌زایی خود دارای چند آزمایش مجزّا بود که به تفصیل در زیر شرح داده شده است.

۳-۷-۱- شاخه‌زایی در محیط شاخه‌زایی حاوی 2 mg/L BAP

این آزمایشات به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار (پتری‌دیش) اجرا شد و هر پتریدیش حاوی ۷ ریزنمونه (کالوس) بود.

این آزمایشات به این منظور صورت گرفت که اولاً تمامی ترکیبات هورمونی از نظر شاخه‌زایی مقایسه گردد و دوماً مشخص گردد کدام ترکیب هورمونی باززایی بهتری نشان می‌دهد تا در مراحل بعد از آن‌ها استفاده گردد. در این آزمایشات تمامی ترکیب‌های کالوس‌زایی ذکر شده در آزمایشات بالا بعد از شش هفته به اتاقک رشد که دارای دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ساعت روشنایی و مقدار نور فلورسانت حدوداً ۴۵۰۰ لوکس

منتقل گردیدند. کالوس‌های منتقل شده به محیط MS که دارای هورمون BAP با غلظت دو میلی‌گرم درلیتر بودند چهار هفته در این محیط نگهداری شدند و آخر هفته چهارم درصد شاخه‌زایی یادداشت برداری گردید. در این آزمایشات برای شاخه‌زایی، برای هر تیمار چهار تکرار درنظر گرفته و داخل هر پتریدیش همان هفت کالوس تولید شده در مرحله اوّل قرار داده شد.

در این آزمایش فاکتورهای در نظر گرفته شده مانند آزمایشات کالوس‌زایی است و در آن به مقایسه شاخه‌زایی ریزنمونه‌های مختلف در اثر ترکیبات هورمونی مختلف مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۳-۷-۲- شاخه‌زایی در اثر هورمون BAP یا TDZ در ترکیب با هورمون NAA

این آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار (پتری‌دیش) اجرا شد و هر پتریدیش حاوی پنج ریزنمونه (کالوس) بود.

در این آزمایشات کالوس‌های بدست آمده از ریزنمونه برگ در اثر ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA به محیط‌های کشت شاخه‌زایی منتقل گردیدند. کالوس‌های چهار هفته‌ای (برخلاف آزمایشات کالوس‌زایی که کالوس‌ها شش هفته عمر داشتند) بدست آمده از ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA در ریزنمونه برگ به محیط‌های شاخه‌زایی منتقل شد.

در این آزمایشات اثر هورمون‌های سیتوکنینی(BAP یا TDZ) با غلظت‌های ۰ ، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر به عنوان فاکتور اول و اثر هورمون NAA با غلظت‌های ۰ و ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به عنوان فاکتور دوم و همچنین اثرات متقابل آن‌ها بر شاخه‌زایی در محیط کشت پایه MS مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایشات ۱۲ ترکیب هورمونی مطابق جدول زیر به

کار برده شد و در هر ترکیب هورمونی فقط یکی از هورمون‌های سیتوکنینی با غلظت مشخص همراه با هورمون NAA با غلظت مشخص استفاده گردید.

جدول۳-۲- ترکیب غلظت‌های مختلف هورمون اکسین با سیتوکنین به منظور شاخه‌زایی

ترکیب هورمونی	غلظت‌های هورمون‌های سیتوکنینی $mg\ l^{-1}$ (BAP,TDZ)	غلظت‌های $mg\ l^{-1}$/NAA
۱	۰	۰
۲	۰	۰/۰۵
۳	۰	۰/۱
۴	۱	۰
۵	۱	۰/۰۵
۶	۱	۰/۱
۷	۲	۰
۸	۲	۰/۰۵
۹	۲	۰/۱
۱۰	۴	۰
۱۱	۴	۰/۰۵
۱۲	۴	۰/۱

۳-۷-۳- شاخه‌زایی در اثر هورمون BAP در ترکیب با هورمون NAA

کالوس‌های بدست آمده از ترکیب هورمونی 2TDZ+0/5IBA که در مرحله القای کالوس رشد زیادی داشتند به محیط‌های کشت شاخه‌زایی منتقل گردیدند. در این آزمایش کالوس‌های چهار هفته‌ای بدست آمده از ترکیب هورمونی 2TDZ+0/5IBA در ریزنمونه برگ به محیط‌های شاخه‌زایی حاوی هورمون‌های BAP و NAA (طبق جدول ۳-۲) منتقل گردید. کالوس-های بدست آمده از ریزنمونه برگ زمانی که به سنّ مورد نظر رسیدند به محیط شاخه‌زایی انتقال داده

شدند. شرایط رشد ریزنمونه‌ها در این آزمایشات مانند شرایط رشد ریزنمونه‌ها در محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP بود که در بالا شرح داده شد.

۳-۸- آزمایش ریشه‌زایی

آخرین مرحله باززایی مرحله ریشه‌زایی است. در این مرحله به یک گیاه کامل باززا رسیده شد. در این آزمایش گیاهچه‌های بدست آمده از ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA به محیط‌های ریشه‌زایی منتقل نموده تا تأثیر اکسین‌ها در ریشه‌زایی مورد بررسی قرار گیرد. برای ریشه‌زایی شش تیمار هورمونی و برای هر تیمار سه تکرار درنظر گرفته شد و داخل هر پتریدیش پنج ریزنمونه قرار داده شد. در این آزمایشات اثر هورمون‌های اکسینی IBA یا NAA به عنوان فاکتور اول و غلظت‌های هورمونی صفر و ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به عنوان فاکتور دوم و همچنین اثرات متقابل آن‌ها به عنوان فاکتور سوّم بر میزان ریشه‌زایی در محیط کشت پایه MS مورد بررسی قرار گرفت.

جدول۳-۳- نوع هورمون و غلظت آن برای ریشه‌زایی

غلظت هورمونی/ $mg\ l^{-1}$	نوع هورمون (IBA یا NAA)
0	NAA
0/2	NAA
0/5	NAA
0	IBA
0/	IBA
0/5	IBA

نکته: در بعضی تکرارها، ریزنمونه‌ها قبل از اینکه به محیط ریشه‌زایی برده شوند ریشه‌دار شده بودند. ولی آن‌هایی که دارای ریشه بودند به محیط‌های ریشه‌زایی منتقل نشدند. البتّه با توجه به تحقیقات

که در گذشته انجام شده است، نتایج نشان می‌دهد حتی آنهایی که ریشه دارند تعداد ریشه‌های آن‌ها افزایش می‌یابد.

۳-۹- مرحله[1] عادت دهی

گیاهان تولید شده در محیط درون‌شیشه‌ای چون در شرایط رطوبت بالا رشد کرده‌اند، باید قبل از انتقال به گلخانه یا مزرعه با این شرایط سازگار شوند. در این آزمایش بعد از تولید گیاهچه باززا در محیط درون شیشه‌ای (بعد از گذشت چهار هفته در محیط ریشه‌زایی) اقدام به انتقال گیاهچه‌ها به محیط طبیعی یا گلخانه گردید. در این آزمایش یکبار بعد از ریشه‌دار شدن گیاهچه‌ها فوراً به گلخانه منتقل گردید و یکبار دیگر بعد از ریشه‌دار شدن به مدّت یک ماه دیگر در محیط بدون هورمون در شرایط استریل نگداری شدند.

در این آزمایش مقداری از خاک سبک گلخانه به مدت چهار ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد با فشار ۱/۲ اتمسفر اتوکلاو گردید. سپس گیاهچه‌ها به داخل گلدان‌های پلاستیکی که زیر دستگاه هود در معرض UV قرار داشتند بعد از شستن محیط کشت اطراف ریشه با آب مقطر ولرم و استریل منتقل گردید. و نهایتاً به داخل اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و روشنایی حدوداً ۴۵۰۰ لوکس منتقل گردیدند. در طی دو هفته اول بعد از انتقال گیاه به گلخانه چون گیاه در این مدت احتیاج به رطوبت کافی دارد یک شیشه بر روی گلدان مورد نظر گذاشته تا رطوبت آن حفظ شود.

در نهایت داده‌های به دست آمده هر یک از آزمایشات با استفاده از نرم افزارهای آماری EXCEL و SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار داده شدند. در این آزمایشات برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد استفاده گردید.

[1] Acclimation

فصل چهارم

نتایج و بحث

نتایج و بحث

کالوس یا پینه، توده سلول پارانشیمی تمایز نیافته است. کالوس می‌تواند در تهیه پروتوپلاست، تولید جنین سوماتیک، تولید اندام‌های ریشه و ساقه و تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گیرد. تشکیل کالوس تحت تأثیر هورمون‌هایی که به محیط کشت اضافه می‌شوند، و همچنین نوع ریزنمونه قرار می‌گیرد. نتایج تأثیر نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون‌های سیتوکنینی (BAP، TDZ، KIN) و اکسینی (NAA و IBA) بر پتانسیل کالوس‌زایی و باززایی گیاه دارویی سرخارگل در زیر آورده شده است.

۴-۱- درصد کالوس‌زایی

بررسی درصد کالوس‌زایی دو ریزنمونه برگ و دمبرگ در اثر ترکیبات هورمونی مختلف در قالب شش آزمایش مجزّا مورد بررسی قرار گرفت که در زیر شرح داده شده است.

۴-۱-۱- ترکیب‌های هورمونی BAP+IBA

در این آزمایش نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف فاکتورهای مورد مطالعه شامل نوع ریزنمونه و غلظت‌های هورمون BAP (۰ و یک و دو میلی‌گرم در لیتر) و غلظت‌های هورمون IBA (۰ و ۰/۱ و ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر) و همچنین اثر متقابل آن‌ها، در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌داری از نظر میزان کالوس‌زایی وجود دارد (جدول۴-۱).

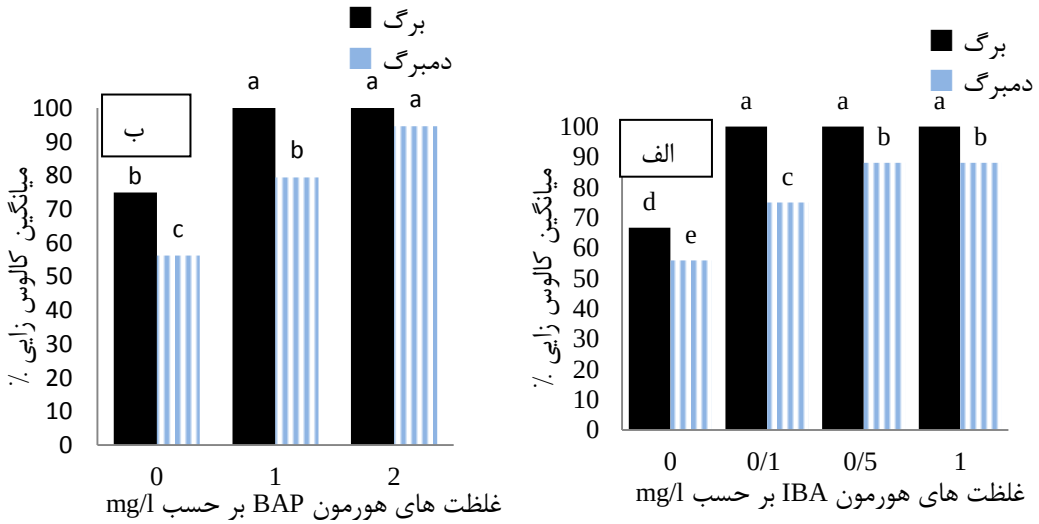
با توجّه به نتایج مقایسات میانگین داده‌ها در اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و غلظت‌های هورمون BAP نشان داد شد که بیشترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ و غلظت‌های یک و دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP (۱۰۰ درصد) و کمترین میزان کالوس‌زایی به غیر از تیمار شاهد (محیط فاقد هورمون) در ریزنمونه دمبرگ و غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP (۵۶/۲۴ درصد) وجود دارد. در ریزنمونه دمبرگ افزایش هورمون BAP باعث افزایش کالوس‌زایی می‌گردد. همچنین با

بررسی اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت‌های هورمون IBA بر میزان کالوس‌زایی مشخص گردید که بیشترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ و در سه غلظت ۰/۱ و ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم هورمون IBA(۱۰۰درصد) وجود دارد (نمودارA ۴-۱). که این موضوع دلالت بر تأثیر یکسان غلظت‌های مختلف هورمون IBA بر کالوس‌زایی در این ریزنمونه دارد.

جدول۴-۱- تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف دو هورمون BAP+IBA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ بر میزان کالوس‌زایی گیاه دارویی سرخارگل

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع ریزنمونه(A)	۱	۵۳۱۶.۹۲۲ **
غلظت های هورمون BAP (B)	۲	۸۷۶۵.۰۴۲ **
غلظت های هورمون IBA(C)	۳	۵۸۳۰.۲۸۷ **
نوع ریزنمونه*غلظت های هورمون BAP(A*B)	۲	۵۵۰.۷۹۲ **
نوع ریزنمونه*غلظت های هورمون IBA(A*C)	۳	۲۷۴.۹۵۴ **
غلظت های هورمونBAP * IBA (B*C)	۶	۵۰۴۵.۸۳۹**
نوع ریزنمونه*غلظت های BAP*غلظت‌های IBA (A*B*C)	۶	۳۲۳.۹۲۲ **
خطا	۷۲	۵۶.۷۱۱
ضریب تغییرات		۸.۹۴

**معنی دار در سطح احتمال ۱٪



نمودارA ۴-۱- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی در اثر غلظت هورمون‌های BAP (الف) و IBA (ب) در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ گیاه دارویی سرخارگل

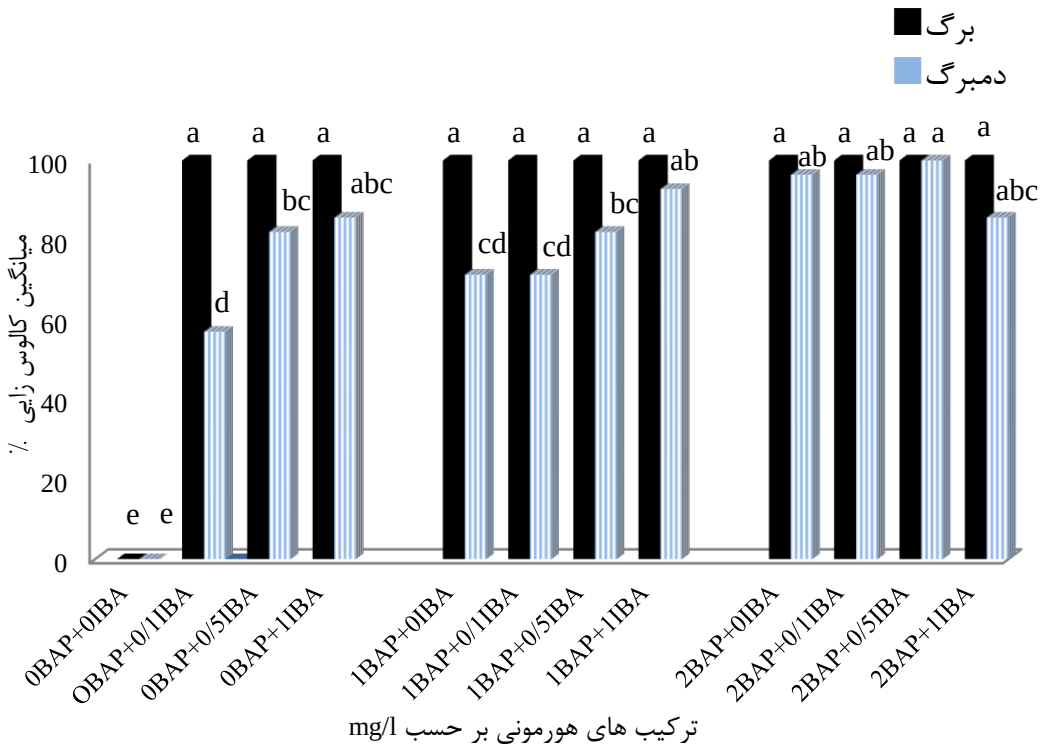
در بررسی اثر متقابل غلظت‌های مختلف دو هورمون BAP و IBA بر میزان کالوس‌زایی دو ریزنمونه برگ و دمبرگ گیاه سرخارگل، بیشترین مقدار کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) در ترکیب هورمونی 2BAP+0/5IBA مشاهده گردید. با توجّه به اینکه اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون BAP و IBA بر میزان کالوس‌زایی معنی‌دار شده بود مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در ریزنمونه برگ به غیر از تیمار شاهد (فاقد هورمون) در بقیه ترکیب‌های هورمونی ۱۰۰ درصد کالوس-زایی وجود دارد ولی در ریزنمونه دمبرگ بیشترین مقدار کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) در ترکیب هورمونی 2BAP+0/5IBA مشاهده گردید (شکل۴-۱). البتّه تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA زمانیکه با غلظت‌های صفر و یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP ترکیب می‌شود وجود ندارد ولی بین غلظت صفر و یک میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA در ترکیب با غلظت‌های صفر و یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP تفاوت معنی‌داری از نظر میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه دمبرگ مشاهده می‌گردد. (نمودار ۴-۱).

نتیجه‌ای که می‌توان از این آزمایش گرفت این است که افزایش غلظت دو هورمون با همدیگر باعث افزایش کالوس‌زایی در ریزنمونه دمبرگ می‌گردد.

اسگوک و میلر (۱۹۵۷) فرضیه‌ای ارائه کردند که مسیر ریخت‌زایی اصولاً به وسیله نسبت اکسین و سیتوکنین تعیین می‌شود یعنی نسبت زیاد اکسین به سیتوکنین باعث کالوس‌زایی و نسبت مساوی این دو باعث تولید کالوس و نسبت زیاد سیتوکنین به اکسین باعث شاخه‌زایی می‌گردد. در واقع محققین نظر دادند که اکسین برای القاء و سیتوکنین برای بیان باززایی در کشت بافت گیاهی مورد نیاز است (Steward *et al*., 1964). هیچ واکنشی را نمی‌توان به تنهایی نتیجه اثر یک هورمون منحصر به‌فرد دانست. در واکنش‌های هورمونی ممکن است یک هورمون، اثر هورمون دیگر را تشدید یا خنثی کند. معلوم شده است که هورمون‌ها اثر متقابل روی همدیگر داشته و می‌توانند اثرات همدیگر را بهبود ببخشند (Del Poza *et al*., 2005).

به طور کلّی بسیاری از پدیده‌های فیزیولوژیک گیاه که به رشد و تمایز منجر می‌شوند، دارای الگوی هورمونی در سیستم متابولیسمی هستند. این الگوهای هورمونی خود تحت کنترل سیستم ژنتیکی گیاه قرار دارند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۷).

علّت همگرایی اکسین با سیتوکنین در تقسیم سلولی عبارت است از: اولاً برای تقسیم سلول ابتدا باید بزرگ شدن سلول اتفاق بیافتد و به دنبال آن تقسیم سلولی انجام بگیرد و تا زمانی که سلول به اندازه مشخص نرسیده است تقسیم سلولی صورت نخواهد پذیرفت. ثانیاً مراحل اولیه تقسیم سلولی نیازمند به اثر اکسین است (Wang *et al*., 1981 and Bayliss, 1985).



نمودار ۴-۱- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی ترکیبات مختلف دو هورمون BAP و IBA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ گیاه دارویی سرخارگل

شکل۴- ۱- کالوس‌زایی ریزنمونه دمبرگ در اثر ترکیب هورمونی 2BAP+0/5IBA

با توجّه به نتایج بالا منطقی است نتیجه بگیریم که در ریزنمونه برگ تغییر غلظت تنظیم کننده-های خارجی رشد تأثیری بر میزان کالوس‌زایی آنها ندارد و با افزایش مقدار یکی از دو هورمون کالوس‌زایی زیادی مشاهده می‌گردد ولی در ریزنمونه دمبرگ غلظت بالای هورمون BAP باعث افزایش کالوس‌زایی نیز می‌گردد و تفاوت معنی‌داری در بین غلظت‌های مختلف هورمون IBA در ترکیب با دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP مشاهده نمی‌شود که این مطلب دلالت بر تأثیر یکسان هورمون IBA با غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با هورمون BAP با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر در کالوس‌زایی دارد.

در یک تحقیقی که به منظور باززایی غیر مستقیم گیاه دارویی سرخارگل از سه ریزنمونه برگ و دمبرگ و ریشه در اثر ترکیب این دو هورمون صورت پذیرفت، مشخص گردید که بیشترین کالوس-زایی در ریزنمونه دمبرگ است که با نتایج این آزمایش مطابقت ندارد (Ahmad *et al*., 2010). در یک تحقیقی دیگر که به منظور باززایی غیر مستقیم گیاه دارویی سرخارگل از ریزنمونه برگ صورت پذیرفت مشخص گردید که در ترکیبات حاوی هورمون BAP به تنهایی، مقدار کالوس‌زایی نسبت به این آزمایش کمتر است (Mechanda *et al*., 2003).

همواره در در کالوس‌زایی مجموع سطوح تنظیم کننده‌های داخلی رشد و همچنین تنظیم کننده‌های خارجی رشد در القاء این پدیده دخیل هستند. در ترکیب هورمونی BAP+IBA کالوس-

زایی در ریزنمونه برگ بیشتر از ریزنمونه دمبرگ است که علّت آنرا می‌توان به تعادل بین دو هورمون-های داخلی رشد با هورمون‌های خارجی رشد جهت کالوس‌زایی در این ریزنمونه نسبت داد.

۴-۱-۲- ترکیب‌های هورمونی BAP+NAA

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف فاکتورهای مورد مطالعه از قبیل نوع ریزنمونه و غلظت‌های هورمون BAP (۰ و یک و دو میلی‌گرم در لیتر) و غلظت‌های هورمون NAA (۰ و ۰/۱ و ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر) و اثر متقابل بین آنها (به غیر اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و غلظت‌های هورمون BAP)، در سطح احتمال ۱ درصد از نظر میزان کالوس‌زایی تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴-۲).

جدول۴-۲- تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف دو هورمون BAP+NAA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ بر میزان کالوس‌زایی گیاه دارویی سرخارگل

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع ریزنمونه(A)	۱	۵۱۰۵.۹۱۷ **
غلظت های هورمون BAP (B)	۲	۵۰۵۷.۴۹۰ **
غلظت های هورمون NAA (C)	۳	۹۶۸۴.۹۲۰ **
نوع ریزنمونه*غلظت های هورمون BAP(A*B)	۲	۶۵.۸۲۰ n.s
نوع ریزنمونه*غلظت های هورمون NAA(A*C)	۳	۱۹۴.۸۹۲ **
غلظت های هورمون BAP * NAA (B*C)	۶	۴۱۱۸.۹۰۹ **
نوع ریزنمونه*غلظت‌های BAP*غلظت های NAA(A*B*C)	۶	۴۸۸.۴۴۹ **
خطا	۷۲	۴۸.۹۰۹
ضریب تغییرت (C.V)		۸.۷۵

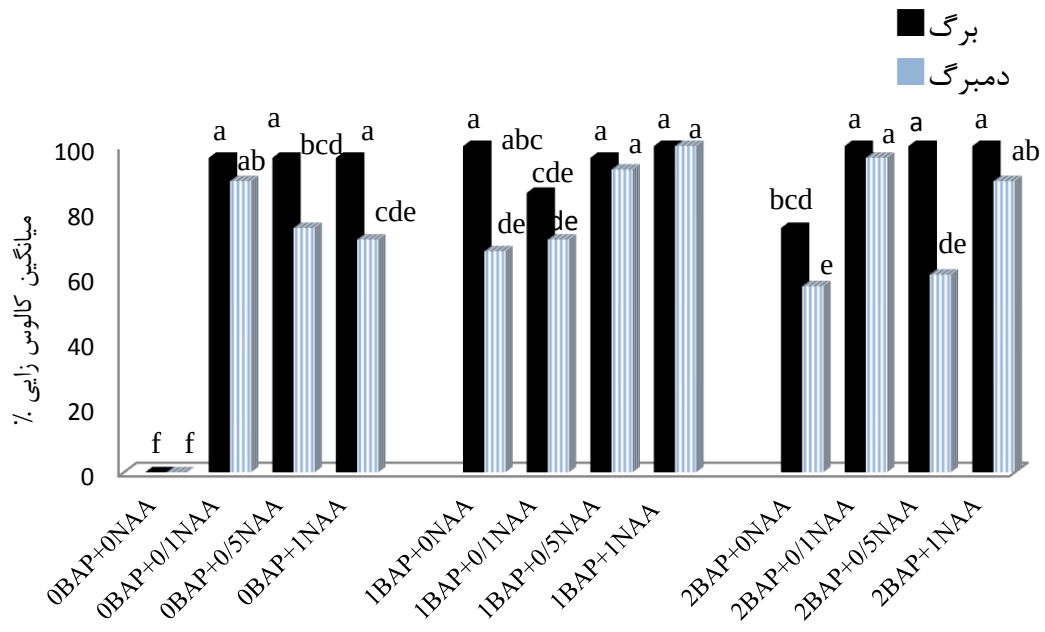
** و n.s به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و غیر معنی‌دار

بررسی مقایسات میانگین داده‌ها در اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و غلظت‌های هورمون NAA بر میزان کالوس‌زایی نشان داد که بیشترین کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ و غلظت یک میلی‌گرم در لیتر

هورمون NAA به میزان ۹۸/۸۰ درصد وجود دارد و در این ریزنمونه NAA باعث افزایش کالوس‌زایی می‌شود. البتّه تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ و یک وجود ندارد.

همچنین در اثر متقابل بین غلظت‌های هورمون BAP و NAA، بیشترین کالوس‌زایی (۱۰۰ درصد) در ترکیب هورمونی 1BAP+1NAA و کمترین مقدار (۶۶/۰۶ درصد) در ترکیب هورمونی 2BAP+0NAA به غیر از تیمار شاهد مشاهده گردید. در ترکیبات بدون هورمون BAP، تفاوت معنی‌دار از نظر میزان کالوس‌زایی با افزایش هورمون NAA مشاهده نگردید. با توجه به مقایسه میانگین داده‌ها مشخص گردید که در ریزنمونه برگ فقط ترکیبات هورمونی 2BAP+0NAA و 1BAP+0/1NAA و تیمار شاهد با بقیه از نظر کالوس‌زایی تفاوت معنی‌داری دارند و کمترین مقدار کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ در ترکیب 2BAP+0NAA به میزان ۷۴/۹۹ درصد مشاهده گردید. همچنین در ریزنمونه دمبرگ فقط در ترکیب هورمونی 1BAP+1NAA ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی و کمترین مقدار کالوس‌زایی در این ریزنمونه به غیر از تیمار شاهد در ترکیب هورمونی 2BAP+0NAA به میزان ۵۷/۱۴ درصد مشاهده شد (شکل۴-۲). با توجّه به این مطالب می‌توان چنین نتیجه گرفت که در ترکیبات حاوی فقط هورمون BAP در غلظت بالای این هورمون (دو میلی‌گرم در لیتر) کالوس-زایی کاهش می‌یابد.

در ترکیبات حاوی یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP همراه با غلظت‌های مختلف NAA در ریزنمونه دمبرگ با افزایش هورمون NAA از غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کالوس‌زایی افزایش می‌یابد ولی تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر وجود ندارد (نمودار ۴-۲). در ریزنمونه دمبرگ در ترکیبات حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP در ترکیب با غلظت‌های مختلف NAA کالوس‌زایی در ابتدا با افزایش غلظت هورمون NAA افزایش سپس کاهش و نهایتاً افزایش می‌یابد.



نمودار ۴-۲- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی در اثر ترکیبات مختلف دو هورمون NAA و BAP در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ گیاه دارویی سرخارگل

شکل۴- ۲- کالوس‌زایی ریزنمونه دمبرگ در اثر ترکیب هورمونی 1BAP+1NAA

این مطالب بیانگر این موضوع است که با تغییر غلظت هورمون‌های خارجی، هورمون‌های داخلی به منظور کالوس‌زایی تغییر پیدا می‌کنند و تعادل هورمونی به منظور کالوس‌زایی در بعضی ترکیبات هورمونی در ریزنمونه دمبرگ تغییر می‌یابد.

نوع ریزنمونه، نوع گونه، شرایط رشدی ریزنمونه (رشد در تاریکی یا روشنایی) و همچنین سنّ ریزنمونه در تقابل با ترکیبات هورمونی مختلف باعث بوجود آمدن اثرات متفاوتی از نظر کالوس‌زایی

می‌شوند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۷). در تحقیقی که بر روی ریزنمونه برگ گونه پورپورا انجام شد بهترین غلظت ترکیب دو هورمون BAP و NAA برای کالوس‌زایی، غلظت ۲/۴۴ و ۴/۴۴ میکرومولار هورمون BAP در ترکیب با غلظت ۰/۵۴ و ۲/۶۹ میکرومولار هورمون NAA گزارش شد (Koroch *et al*., 2002).

در این آزمایش نشان داده شد که افزایش هورمون NAA زمانیکه به تنهایی بکار برده می‌شوند باعث افزایش کالوس‌زایی می‌شود ولی در یک تحقیق دیگر که بر روی ریزنمونه برگ گیاه دارویی سرخارگل به منظور باززایی غیر مستقیم صورت پذیرفت با نتایج این آزمایش مغایرت داشت و افزایش هورمون NAA باعث افزایش کالوس‌زایی نشد (Moemen *et al*., 2010). در این آزمایش کالوس‌زایی بیشتری نسبت به تحقیقی که بر روی ریزنمونه برگ گیاه شش ماهه استفاده گردید صورت پذیرفت که می‌توان این تفاوت کالوس‌زایی را به سنّ ریزنمونه‌ها نسبت داد (Subbaiah *et al*., 2003). البتّه با نتایج بعضی محققین مطابقت داشت (Koroch *et al*., 2002).

در تحقیقی که به منظور کالوس‌زایی دو ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون در اثر ترکیبات هورمونی حاوی هورمون BAP (با غلظت‌های ۰، ۰/۲ و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (با غلظت‌های ۰، ۰/۱ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر) انجام پذیرفت، مشخص گردید در همه ترکیبات کالوس به وجود می‌آید و بیشترین کالوس‌زایی در ترکیب هورمونی 0/2BAP+0NAA در ریزنمونه کوتیلدون مشاهده می‌شود و همچنین همه غلظت‌های هورمون NAA در کالوس‌زایی مؤثر است (Zebarjadi *et al*., 2011). در گونه آنگوستی فولیا بیشترین کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ کشت شده در روشنایی و ترکیب هورمونی 1BAP+1NAA مشاهده گردید که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد (Taha *et al*., 2010). ولی در گزارشات دیگر در گونه آنگوستی فولیا مشخص گردید که مقدار کالوس‌زایی در روشنایی و تاریکی در ریزنمونه برگ یکسان است و ترکیبات حاوی هورمون BAP به تنهایی یا در ترکیب با هورمون NAA کالوس‌زایی یکسان است ولی کالوس‌های بدست آمده از ترکیبات BAP+NAA کالوس‌های سفیدتر و تردتر ایجاد می‌کنند (Luchesini *et al*., 2009).

در سه گونه پورپورا و آنگوستی فولیا و پالیدا گزارش گردیده است که ترکیبات مختلفی از BAP و NAA در القای کالوس و شاخه‌زایی در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون مؤثر هستند (Bhatti *et al*., 2002). به طور کلّی تفاوت بین یک ریزنمونه در پاسخ به غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسینی و سیتوکنینی در محیط کشت می‌تواند انعکاس احتمالی تفاوت تنظیم کننده‌های داخلی رشد در منبع ریزنمونه یا حساسیت بافت‌های مختلف به تنظیم کننده‌های داخلی رشد باشد (Lisowska and Wysonkinska, 2000).

۴-۱-۳- ترکیب‌های هورمونی KIN+IBA

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در این آزمایش نشان می‌دهد که در بین سطوح مختلف فاکتورهای نوع ریزنمونه و غلظت‌های هورمون KIN (۰ و یک و دو) و IBA (۰ و ۰/۱ و ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر) و اثر متقابل بین غلظت‌های هورمون KIN و غلظت‌های هورمون IBA در سطح احتمال ۵٪ و یا ۱٪ از نظر کالوس‌زایی تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول۴-۳).

بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها مشخص گردید که ریزنمونه‌ی برگ (۸۹/۲۸ درصد) در مقایسه دمبرگ (۸۴/۲۲ درصد) مقدار بیشتری کالوس تولید کرده است. با افزایش غلظت هورمون KIN کالوس‌زایی افزایش می‌یابد و از نظر آماری تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف آنها وجود دارد که این دلالت به واکنش‌های متفاوت غلظت‌های هورمون KIN در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ دارد.

با توجّه به نتایج مقایسه میانگین داده‌های اثر هورمون KIN و هورمون IBA بر میزان کالوس-زایی، مشخص گردید که بیشترین مقدار کالوس‌زایی در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر هورمون KIN به میزان ۹۹/۵۵ درصد و کمترین مقدار در غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر هورمون KIN به میزان ۷۲/۷۶ درصد وجود دارد.

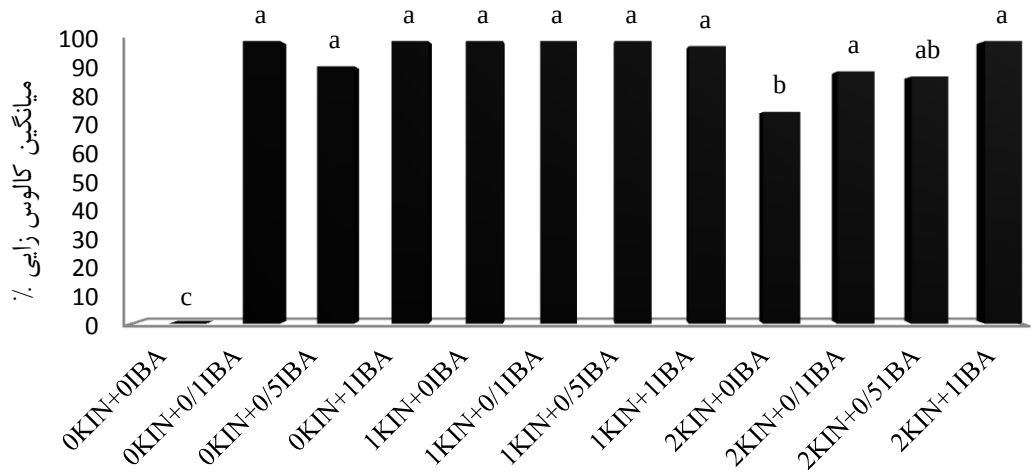
جدول۴-۳- تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف دو هورمون KIN+IBA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ بر میزان کالوس‌زایی گیاه دارویی سرخارگل

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع ریزنمونه(A)	۱	۶۱۴.۵۸۸ ❋
غلظت‌های هورمون KIN (B)	۲	۵۷۷۳.۹۵۲ ❋❋
غلظت‌های هورمون IBA (C)	۳	۸۷۸۹.۸۴۶ ❋❋
نوع ریزنمونه*غلظت‌های هورمون KIN (A*B)	۲	۱۶۱.۵۹۰ n.s
نوع ریزنمونه*غلظت‌های هورمون IBA (A*C)	۳	۹۲.۸۴۸ n.s
غلظت‌های هورمون KIN * IBA (B*C)	۶	۵۵۱۲.۷۲۷ ❋❋
نوع ریزنمونه*غلظت‌هایKIN*غلظت‌های IBA (A*B*C)	۶	۱۱۶.۲۷۹ n.s
خطا	۷۲	۱۰۵.۶۰۸
ضریب تغییرات (C.V)		۱۱.۸۴

❋، ❋❋ و n.s به ترتیب معنی‌دار در سطوح ۵٪ و ۱٪ و غیر معنی‌دار

بیشترین کالوس‌زایی در اثر هورمون IBA در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر IBA به میزان ۹۹/۴۰ درصد و کمترین مقدار آن در غلظت صفر به مقدار ۵۸/۳۳ درصد مشاهده گردید. البتّه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری از نظر کالوس‌زایی در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر وجود نداشت.

با توجّه به مقایسه میانگین داده‌های اثر متقابل بین غلظت‌های هورمون KIN و غلظت‌های هورمون IBA بر میزان کالوس‌زایی، مشخص گردید که به غیر از ترکیبات هورمونی شاهد و 0KIN+0/5IBA و 1KIN+1IBA و 2KIN+0IBA و 2KIN+0/1IBA و 2KIN+0/5IBA بقیه ترکیبات ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی داشتند. البتّه تفاوت معنی‌دار از نظر آماری بین آنها مشاهده نگردید و از طرفی در ترکیب هورمونی 2KIN+0IBA کمترین درصد کالوس‌زایی (۷۸/۵۶) مشاهده گردید (نمودار ۴-۳).



نمودار ۴-۳- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی ترکیبات مختلف هورمون‌های NAA و IBA در گیاه دارویی سرخارگل

این نتایج بیانگر این موضوع است که در غلظت دو میلی‌گرم KIN در مواقعی که به تنهایی به کار برده می‌شود کالوس‌زایی کاهش پیدا می‌کند. در این آزمایش ترکیب هورمونی 2KIN+0/5IBA در هر دو ریزنمونه از نظر میزان کالوس‌زایی (۹۲/۸۵درصد) یکسان بودند (شکل ۴-۳).

شکل۴-۳- کالوس‌زایی ریزنمونه برگ در اثر ترکیب هورمونی 2KIN+0/5IBA

یکی از معروف ترین سیتوکنین، هورمون KIN است که جزو سیتوکنین‌های طبیعی است. این هورمون اغلب در محیط کشت برای تحریک و رشد کالوس، کشت‌های تعلیقی (سوسپانسیون) و اندام-

زایی (یک تا ۲۰ میکرومولار) بکار می‌رود. هورمون‌های اکسینی در تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلول و همچنین ریشه‌زایی دخیل هستند که یکی از این هورمون‌های اکسینی هورمون IBA است. به طور کلّی، کاربرد اکسین در غلظت کم موجب تحریک ریشه‌زایی نابجا می‌شود، در صورتی که غلظت‌های زیاد اکسین سبب کالوس‌زایی می شود (طباطبایی و امیدی، ۱۳۸۸).

در این آزمایش مشخص گردید که هورمون IBA با غلظت‌های مختلف باعث کالوس‌زایی فراوانی می‌شود ولی هورمون KIN در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با غلظت‌های مختلف IBA، میزان کالوس‌زایی متفاوتی از خود نشان می‌دهند. با افزایش غلظت هورمون IBA از صفر تا یک میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با هورمون KIN با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر کالوس‌زایی افزایش و در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کالوس‌زایی کاهش و نهایتاً در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA کالوس‌زایی افزایش می‌یابد. این تغییرات می‌تواند به علّت سطح متفاوت تنظیم کننده‌های داخلی رشد و تغییر آنها در برابر تنظیم کننده‌های خارجی رشد باشد. هیچ کدام از این ترکیبات KIN+IBA در گونه پورپورا به منظور کالوس‌زایی گزارش نگردیده است.

۴-۱-۴- ترکیب‌های هورمونی KIN+NAA

در این آزمایش نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف فاکتورهای مورد مطالعه شامل غلظت‌های هورمون KIN (۰ و ۱ و ۲) و NAA (۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱) و اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و غلظت‌های هورمون NAA و همچنین اثر متقابل بین غلظت‌های هورمون KIN و NAA در سطح احتمال ۱٪ بر میزان کالوس‌زایی اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴-۴).

در این آزمایش بین ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ تفاوت معنی‌داری از نظر کالوس‌زایی وجود ندارد که دلالت بر تأثیر یکسان این دو ریزنمونه بر کالوس‌زایی دارد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها مشخص گردید که با افزایش غلظت هورمون KIN و همچنین NAA کالوس‌زایی افزایش می‌یابد. بیشترین کالوس‌زایی در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر KIN به میزان ۹۶/۴۲ درصد و کمترین کالوس-

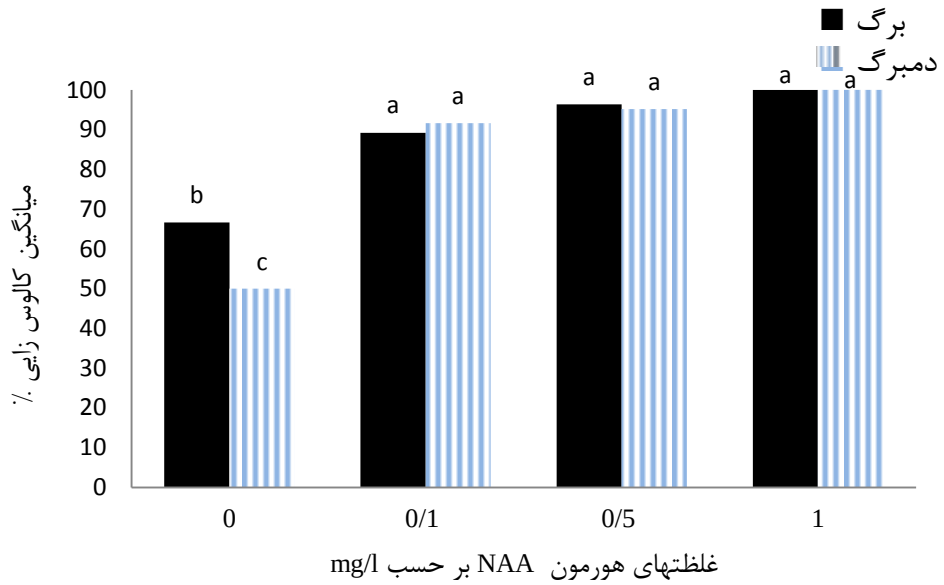
زایی در غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر به میزان ۷۵ درصد و همچنین بیشترین کالوس‌زایی در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر NAA به میزان ۱۰۰ درصد و کمترین کالوس‌زایی در غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر NAA به میزان ۵۸/۳۳ درصد مشاهده گردید. البتّه بین غلظت‌های یک و ۰/۵ و همچنین ۰/۵ با ۰/۱ تفاوت معنی‌دار از نظر آماری وجود ندارد.

جدول ۴-۴- تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف دو هورمون KIN+NAA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ بر میزان کالوس‌زایی گیاه دارویی سرخارگل

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع ریزنمونه(A)	۱	۳۵۹.۴۰۷ n.s
غلظت‌های هورمون KIN (B)	۲	۳۶۹۲.۴۱۶**
غلظت‌های هورمون NAA (C)	۳	۸۶۲۴.۷۶۳**
نوع ریزنمونه * غلظت‌های هورمون KIN (A*B)	۲	۱۰۴.۱۹۶ n.s
نوع ریزنمونه * غلظت‌های هورمون NAA (A*C)	۳	۴۵۰.۰۴۱ **
غلظت‌های هورمون KIN *NAA (B*C)	۶	۶۳۶۲.۶۷۷ **
نوع ریزنمونه*غلظت‌های KIN * غلظت‌های NAA (A*B*C)	۶	۱۴۳.۸۷۵ n.s
خطا	۷۲	۱۱۱.۲۷۲
ضریب تغییرات (C.V)		۱۲.۲۴

** و n.s به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱٪ و غیر معنی‌دار.

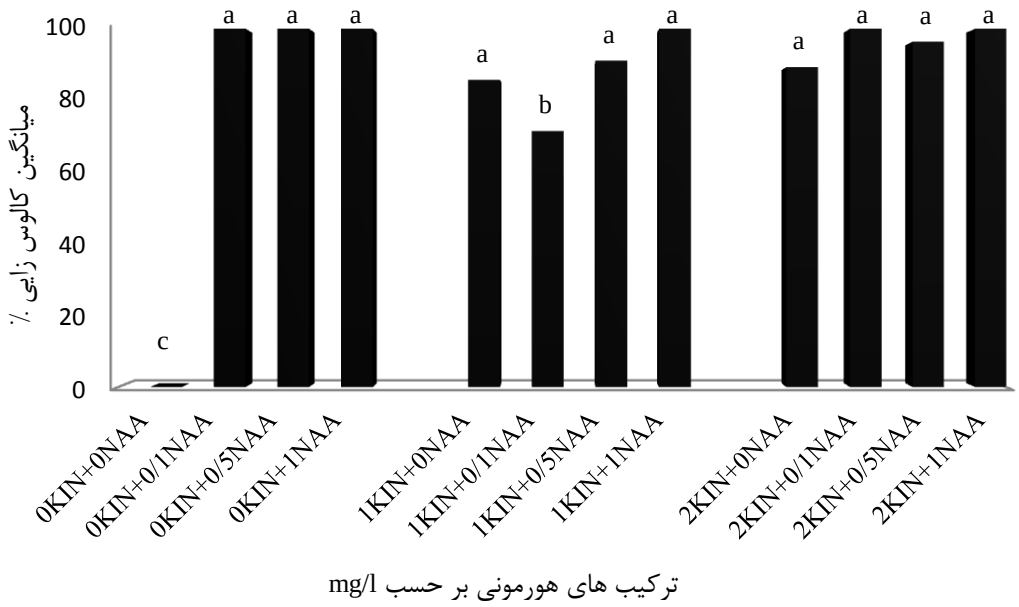
نتایج مقایسات میانگین داده‌ها در اثر متقابل نوع ریزنمونه و غلظت‌های هورمون NAA نشان داد که در هر دو ریزنمونه در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر NAA ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی به وجود می‌آید و کمترین مقدار کالوس‌زایی در ریزنمونه دمبرگ و در غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر به میزان ۴۹/۹۹ درصد وجود دارد. البتّه اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در هر دو ریزنمونه وجود ندارد (نمودارA ۴-۴).



نمودارA ۴-۴- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی در اثر غلظت‌های مختلف هورمون NAA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ گیاه دارویی سرخارگل

در بررسی اثر متقابل بین غلظت‌های هورمون KIN و غلظت‌های هورمون NAA بر میزان کالوس‌زایی مشخص گردید در ترکیبات هورمونی که حاوی KIN نبودند به غیر از تیمار شاهد بقیه ترکیبات ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی داشتند و در ترکیباتی که حاوی یک میلی‌گرم در لیتر KIN بودند فقط زمانیکه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA ترکیب می‌شدند ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی مشاهده گردید که این نتیجه با نتایج محققی که به بررسی باززایی غیر مستقیم از ریزنمونه هیپوکوتیل گیاه دارویی سرخارگل پرداخته بود مطابقت دارد (Coker and camper, 2000). با توجه به نتایج این محقّق مشخص گردید که در ریزنمونه هیپوکوتیل ترکیبات هورمونی حاوی 2,4-D و KIN، تأثیر بیشتری از ترکیبات حاوی KIN و NAA بر کالوس‌زایی دارند.

در ترکیباتی که دو میلی‌گرم در لیتر KIN داشتند در مواقعی که با ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (شکل ۴-۴) ترکیب می‌شدند ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی مشاهده گردید. البتّه تفاوت معنی‌دار از نظر کالوس‌زایی بین آنها وجود نداشت. کمترین مقدار کالوس‌زایی در ترکیب هورمونی 1KIN+0/1NAA به غیر از تیمار شاهد به میزان ۷۱/۴۲ درصد مشاهده گردید (نمودارB ۴-۴).



نمودارB ۴-۴- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی در اثر ترکیب غلظت‌های مختلف هورمون‌های NAA و KIN در گیاه دارویی سرخارگل.

در این آزمایش برخلاف آزمایش قبلی در ترکیبات حاوی یک میلی‌گرم در لیتر هورمون KIN همراه با غلظت‌های مختلف هورمون NAA کالوس‌زایی کاهش می‌یابد. در ترکیبات یک میلی‌گرم در لیتر KIN همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA کالوس‌زایی کاهش می‌یابد و سپس با افزایش غلظت از ۰/۱ تا یک میلی‌گرم در لیتر کالوس‌زایی دوباره افزایش می‌یابد. این موضوع را می‌توان به برهمکنش متفاوت این دو هورمون به منظور کالوس‌زایی نسبت داد.

هورمون‌های مختلفی در کالوس‌زایی و باززایی گیاه دارویی سرخارگل بکار برده شدند. در تحقیقات مختلف از هورمون‌های سیتوکنین مختلفی برای کالوس‌زایی استفاده می‌شود که در این بین هورمون KIN برای کالوس‌زایی در این گونه گیاهی کمتر گزارش شده است.

شکل۴-۴- کالوس‌زایی ریزنمونه برگ در اثر ترکیب هورمونی 2KIN+0/5NAA

۴-۱-۵- ترکیب‌های هورمونیTDZ+IBA

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف فاکتورهای مورد مطالعه شامل نوع ریزنمونه، غلظت‌های هورمون TDZ (۰، یک و دو میلی گرم در لیتر)، غلظت‌های هورمون IBA (۰، ۰/۱، ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر) و هچنین اثر متقابل بین آن‌ها در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری از نظر کالوس‌زایی وجود دارد (جدول۴-۵).

جدول۴-۵- تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف دو هورمون TDZ+IBA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ بر میزان کالوس‌زایی گیاه دارویی سرخارگل

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع ریزنمونه(A)	۱	۳۵۹.۴۸۴ **
غلظت های هورمون TDZ (B)	۲	۸۰۴۲.۵۲۴**
غلظت های هورمون IBA(C)	۳	۵۶۸۷.۷۸۹**
نوع ریزنمونه*غلظت های هورمون TDZ(A*B)	۲	۶۵.۹۴۱ **
نوع ریزنمونه*غلظت های هورمون IBA(A*C)	۳	۵۳.۱۷۸ **
غلظت های هورمون TDZ * IBA (B*C)	۶	۶۲۷۰.۴۴۳ **
نوع ریزنمونه * غلظت‌های TDZ *غلظت‌های IBA (A*B*C)	۶	۴۰.۴۱۵ **
خطا	۷۲	۱۲.۰۵۴
ضریب تغییرات (C.V)		۳.۸۶

**و n.s به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱٪ و غیر معنی‌دار.

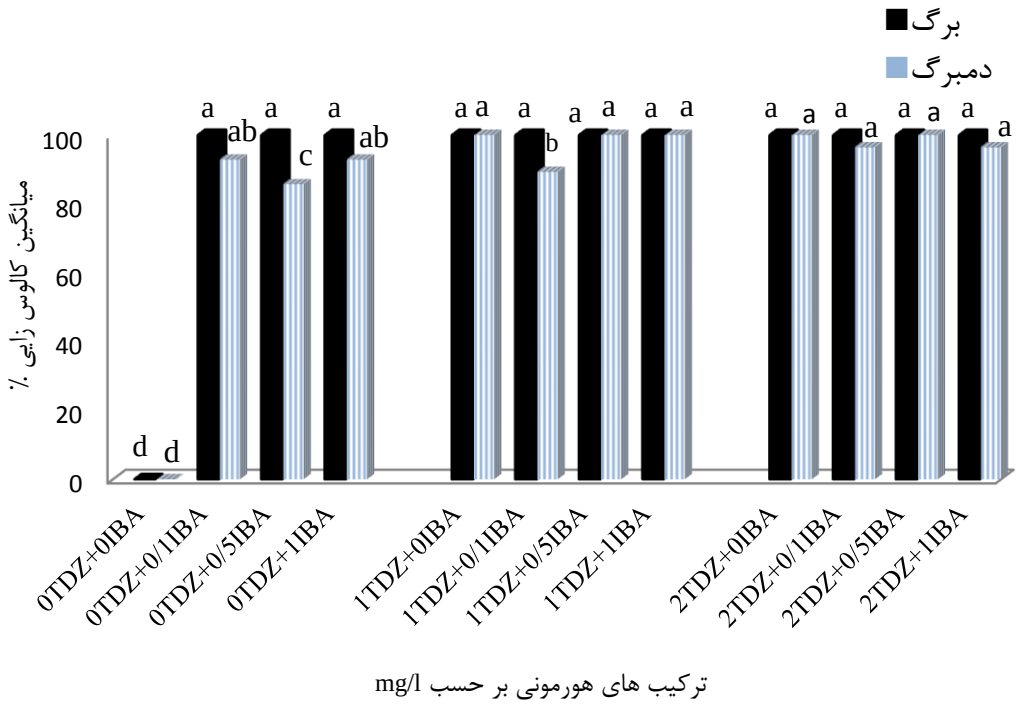
نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و غلظت‌های هورمون TDZ نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ و غلظت‌های یک و دو میلی‌گرم در لیتر TDZ به میزان ۱۰۰ درصد و در اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و غلظت‌های هورمون IBA بر میزان کالوس‌زایی، بیشترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ و غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر به میزان ۱۰۰ درصد وجود دارد. همچنین در اثر متقابل بین غلظت‌های مختلف TDZ و IBA، فقط در ترکیب‌های هورمونی 1TDZ+0IBA و 1TDZ+0/5IBA و 1TDZ+1IBA و 2TDZ+0IBA و 2TDZ+0/5IBA ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی وجود دارد. این مطلب بیانگر این موضوع است هورمون IBA در غلظت بالای آن یعنی یک میلی‌گرم در لیتر وقتی با غلظت بالای هورمون TDZ یعنی دو میلی‌گرم در لیتر ترکیب می‌شود کالوس‌زایی کمتری از غلظت پایین IBA انجام می‌دهد. کمترین مقدار کالوس‌زایی در ترکیب هورمونی 0TDZ+0/5IBA به میزان ۹۲/۸۵ درصد وجود دارد. البتّه باید متذکر گردید که کالوس‌های ریزنمونه برگ ترکیب هورمونی 2TDZ+0/5IBA در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار می‌گیرد (شکل ۴-۵).

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون TDZ و غلظت‌های مختلف هورمون IBA بر میزان کالوس‌زایی نشان داد که در ریزنمونه برگ به غیر از تیمار شاهد در بقیه ترکیبات هورمونی ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی وجود دارد و در ریزنمونه دمبرگ فقط در ترکیبات 1TDZ+0IBA و 2TDZ+0/5IBA و 2TDZ+0IBA و 1TDZ+0/5IBA و 1TDZ+1IBA ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی مشاهده شد و کمترین مقدار کالوس‌زایی در ریزنمونه دمبرگ در ترکیب هورمونی 0TDZ+0/5IBA به میزان ۸۵/۷۱ درصد وجود دارد.

در این آزمایش فقط در دو ترکیب هورمونی 0TDZ+0/5IBA و 1TDZ+0/1IBA در ریزنمونه دمبرگ کاهش معنی‌دار از نظر کالوس‌زایی وجود دارد. در ترکیبات بدون هورمون TDZ در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA کاهش معنی‌دار در کالوس‌زایی مشاهده می‌شود ولی در ترکیبات

حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون TDZ همراه با ۰/۱ میلی‌گرم IBA کاهش معنی‌دار نسبت به بقیه ترکیبات هورمونی از نظر کالوس‌زایی مشاهده می‌شود (نمودار ۴-۵).

با توجّه به آزمایشات قبلی می‌توان نتیجه گرفت بین سه هورمون سیتوکنینی، هورمون TDZ تأثیر زیادی بر کالوس‌زایی دارد. در یک دهه گذشته توجّه فراونی به نقش هورمون TDZ در کشت بافت گونه‌های مختلف گیاهی انجام شده است. این هورمون اثراتی شبیه هر دو نوع هورمون اکسین و سیتوکنین نشان میدهند ولی طرز فعالیت این هورمون هنوز ناشناخته است (Abbasi *et al*., 2007).



نمودار ۴-۵- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی ترکیبات مختلف دو هورمون NAA و IBA در ۲ ریزنمونه برگ و دمبرگ گیاه دارویی سرخارگل.

شکل۴-۵- کالوس‌زایی ریزنمونه برگ در اثر ترکیب هورمونی 2TDZ+0/5IBA

در بیشتر تحقیقات هورمون 2,4-D بیشترین تأثیر و کاربرد را در کالوس‌زایی دارد (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۷) ولی در تحقیقی که به منظور باززایی غیر مستقیم گیاه دارویی سرخارگل صورت پذیرفت نشان داده شد که رشد کالوس در ریزنمونه‌های برگ در محیط‌های حاوی TDZ از محیط-های حاوی 2,4-D و DC[1] بیشتر است که این نتایج با نتایج این آزمایش مطابقت دارد و اشاره به تأثیر فراوان هورمون TDZ در کالوس‌زایی دارد (Jones *et al*. 2007). همچنین در تحقیقی دیگر مشخص شد که بیشترین کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ و در اثر ترکیبات حاوی TDZ به وجود آمده است که با نتایج این آزمایش نیز مطابقت دارد (Ahmad *et al*., 2010).

۴-۱-۶- ترکیب‌های هورمونی TDZ+NAA

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف فاکتورهای مورد مطالعه شامل نوع ریزنمونه، غلظت‌های هورمون TDZ (۰، یک و دو میلی گرم در لیتر)، غلظت‌های هورمون NAA (۰، ۰/۱، ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر) و همچنین اثر متقابل بین آن‌ها در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری از نظر کالوس‌زایی وجود دارد (جدول۴-۶).

[1] Dichamba

جدول۴-۶- تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف دو هورمون TDZ+NAA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ بر میزان کالوس‌زایی گیاه دارویی سرخارگل

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع ریزنمونه(A)	۱	۳۵۹.۴۸۴ **
غلظت‌های هورمون TDZ (B)	۲	۸۰۴۲.۵۲۴ **
غلظت‌های هورمون NAA (C)	۳	۶۶۲۳.۴۳۹ **
نوع ریزنمونه * غلظت‌های هورمون TDZ (A*B)	۲	۶۵.۹۴۱ **
نوع ریزنمونه * غلظت‌های هورمون NAA (A*C)	۳	۳۶.۱۶۱ *
غلظت‌های هورمون TDZ * NAA (B*C)	۶	۵۸۰۲.۶۱۸ **
نوع ریزنمونه * غلظت‌های TDZ * غلظت‌های NAA (A*B*C)	۶	۴۸.۹۲۴ **
خطا	۷۲	۱۲.۰۵۴
ضریب تغییرات (C.V)		۳.۸۶۹

*، ** به ترتیب معنی‌دار در سطوح ۵٪ و ۱٪

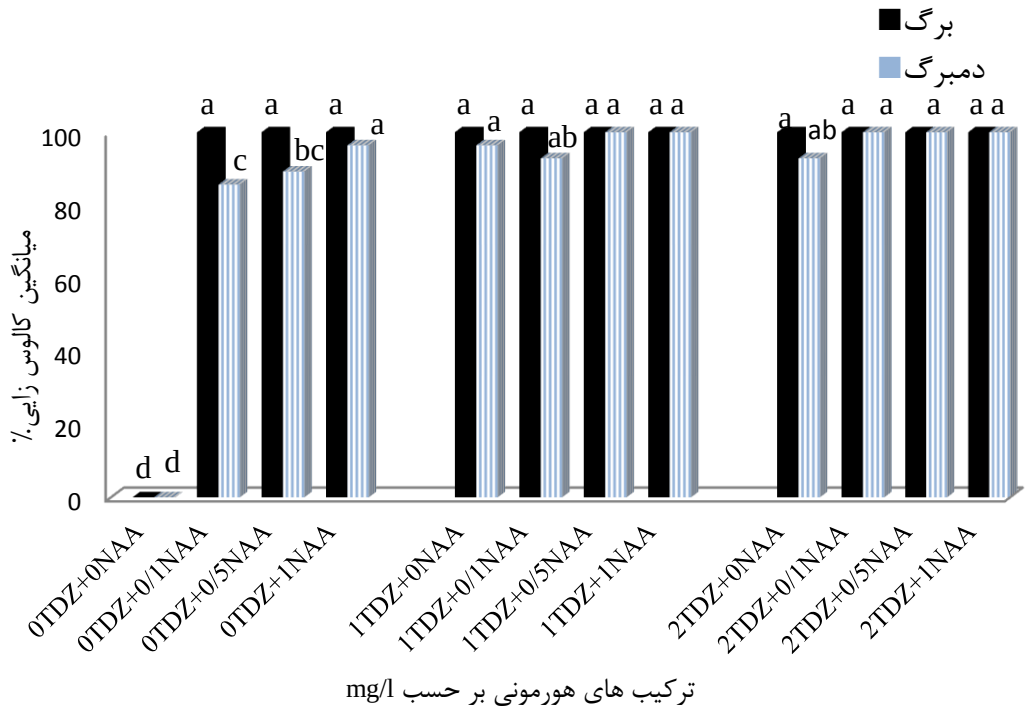
نتایج مقایسات میانگین داده‌ها در اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و غلظت‌های هورمون TDZ نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ و غلظت‌های یک و دو میلی‌گرم در لیتر به میزان ۱۰۰ درصد و در اثر متقابل بین ریزنمونه و هورمون NAA، بیشترین کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر NAA به میزان ۱۰۰ درصد وجود دارد. در بررسی مقایسه میانگین داده‌ها در اثر متقابل بین غلظت‌های هورمون‌های TDZ و NAA مشخص شد که در ترکیبات هورمونی 2TDZ+0/1NAA و 1TDZ+0/5NAA و 1TDZ+1NAA و همچنین ترکیب هورمونی 2TDZ+1NAA ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی وجود دارد. البتّه کمترین مقدار کالوس‌زایی به غیر از تیمار شاهد در ترکیب هورمونی 0TDZ+0/1NAA به میزان ۹۲/۸۵ درصد مشاهده گردید (شکل۴-۶).

بررسی مقایسه میانگین داده‌ها در اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و غلظت‌های مختلف هورمون TDZ و غلظت‌های مختلف هورمون NAA بر میزان کالوس‌زایی نشان داد که در ریزنمونه برگ به غیر تیمار شاهد (بدون هورمون) در بقیه ترکیب‌های هورمونی ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی مشاهده می‌گردد

ولی در ریزنمونه دمبرگ فقط در ترکیبات 2TDZ+0/1NAA و 1TDZ+0/5NAA و 2TDZ+1NAA و 1TDZ+0/5NAA و 1TDZ+1NAA ۱۰۰ درصد کالوس‌زایی مشاهده شد و کمترین مقدار کالوس-زایی در ریزنمونه دمبرگ در ترکیب هورمونی 0TDZ+0/1NAA به میزان ۸۵/۷۱ درصد وجود دارد (نمودار۴-۶).

با توجّه به آزمایش قبلی و این آزمایش مشخص گردید که تأثیر هورمون TDZ بر میزان کالوس-زایی از دو هورمون ترکیب شده با این هورمون یعنی هورمون‌های NAA و IBA به علّت کالوس‌زایی کم در غلظت‌های پایین هورمون‌های اکسینی IBA و NAA بیشتر است.

اساساً کالوس یک بافت توموری گیاهی کم و بیش سازمان یافته است که در زخم‌های بافت‌ها و اندام‌های تمایز یافته، بوجود می‌آید. بافت ریزنمونه یک بافت تمایز یافته است (برگ و دمبرگ و...) که بعنوان مادّه آغازین برای تولید بافت کالوس مورد استفاده قرار می‌گیرد. عمل تمایززدایی باعث تبدیل سلول‌های بالغ به سلول‌های جوان (نابالغ) به‌طور موقّت می‌شوند. در همه آزمایشات کالوس‌زایی مشخص گردید که به دلایل مختلف در ریزنمونه برگ کالوس‌زایی بیشتری اتفاق می‌افتد.



نمودار ۴-۶- مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی ترکیبات مختلف دو هورمون NAA و IBA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ گیاه دارویی سرخارگل

شکل۴-۶- کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ در ترکیب هورمونی 2TDZ+1NAA

باید توجّه داشت که نوع ریزنمونه، تعیین کننده سطح هورمون‌های داخلی می‌باشد، که تأثیر بسزایی بر فرایندهایی نظیر تقسیم سلولی و شکل‌گیری اندام دارد (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۷). همچنین ایجاد زخم روی ریزنمونه‌ها موجب افزایش جذب مواد غذایی و تنظیم کننده‌های رشد شده و واکنش ریزنمونه به محیط درون شیشه‌ای را افزایش می‌دهد. قرار دادن ریزنمونه‌ها در محیط‌های حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نقش مؤثری در افزایش واکنش مناسب ریزنمونه‌ها به محیط درون شیشه‌ای دارد. علّت واکنش بهتر برخی از ریزنمونه‌ها تأمین بهتر اکسیژن و تجمع مواد در قاعده فیزیولوژیکی ریزنمونه و عدم پخش این مواد در محیط کشت است (حسندخت و ابراهیمی، ۱۳۸۵). البتّه تنظیم کننده‌های رشد گیاهی از جمله اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها نقش به‌سزایی در تولید کالوس دارند و غلظت تنظیم کننده‌های رشد در محیط کشت برای کالوس‌زایی و اندام‌زایی بسیار مهم است. همچنین بعضی از ریزنمونه‌ها به تیمارهای هورمونی مختلفی جهت کالوس‌زایی پاسخ می‌دهند (Kristen *et al*., 2000)

۴-۲- درصد شاخه‌زایی خود به خودی در کالوس‌ها

این آزمایشات به منظور بررسی میزان شاخه‌زایی خود به خودی کالوس‌ها در اثر ترکیبات هورمونی مختلف بدون منتقل نمودن کالوس‌ها به محیط‌های شاخه‌زایی صورت پذیرفت.

۴-۲-۱- ترکیب‌های هورمونیBAP+IBA

در این آزمایش از بین ۱۲ ترکیب هورمونی حاوی هورمون‌های BAP و IBA که برای کالوس-زایی در نظر گرفته شده بود فقط چهار ترکیب هورمونی به صورت خود به خودی بدون منتقل نمودن به محیط‌های شاخه‌زایی به سمت شاخه‌زایی رفتند.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که فقط در بین نوع ریزنمونه، تفاوت معنی‌داری از نظر درصد شاخه‌زایی وجود ندارد و در بقیه موارد یعنی فاکتورهای ترکیب‌های هومونی و اثر متقابل بین ریزنمونه‌ها و ترکیب‌های هورمونی تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ از نظر میزان شاخه‌زایی وجود دارد که دلالت بر تأثیر متفاوت این فاکتورها بر میزان شاخه‌زایی دارد (جدول۴-۷).

در این آزمایش بین ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ تفاوت معنی داری از نظر شاخه‌زایی وجود ندارد که دلالت بر تأثیر یکسان این دو ریزنمونه بر شاخه‌زایی دارد.

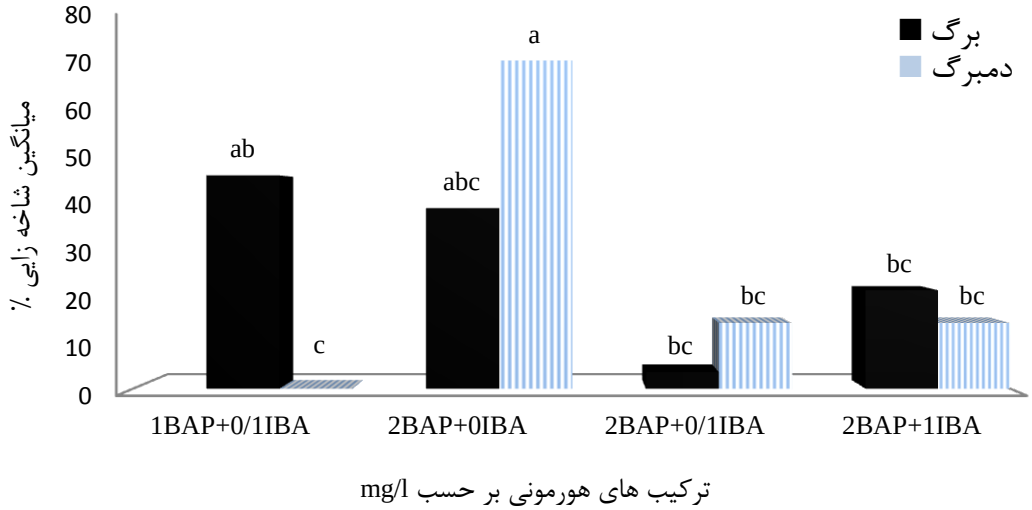
جدول۴-۷- تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف دو هورمون BAP+IBA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ بر میزان شاخه‌زایی خود به خودی در مرحله کالوس‌زایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع ریزنمونه(A)	۱	۵۷.۳۲۵ $^{n.s}$
ترکیب‌های هورمونی(B)	۳	۳۲۷۱.۳۸۵ **
نوع ریزنمونه×ترکیبهای هورمونی(A*B)	۳	۲۲۱۶.۹۷۳ **
خطا	۲۴	۴۰۱.۷۷۱

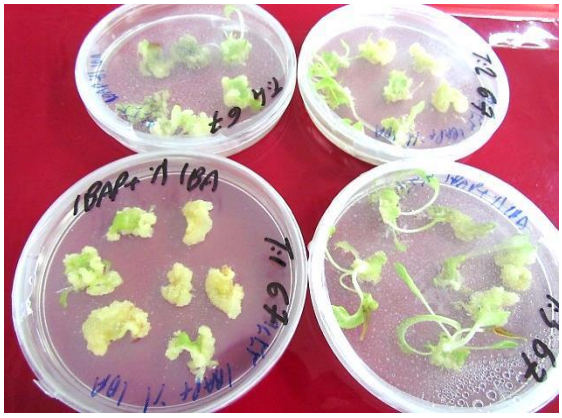
** و n.s به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱٪ و غیر معنی‌دار.

با توجّه به مقایسه میانگین داده‌ها در اثر متقابل بین ریزنمونه و ترکیب‌های هورمونی مشخص شد که بیشترین شاخه‌زایی مربوط به ترکیب هورمونی 2BAP+0IBA به میزان ۵۵/۳۵ درصد است. با توجّه به اینکه اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و ترکیب‌های هورمونی بر میزان شاخه‌زایی معنی‌دار شده است مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین شاخه‌زایی، در ریزنمونه دمبرگ در ترکیب هورمونی 2BAP+0IBA به میزان ۷۱/۴۲۵ درصد وجود دارد و بیشترین شاخه‌زایی در ریزنمونه برگ در ترکیب هورمونی 1BAP+0/1IBA به میزان ۴۲/۸۵ مشاهده گردید (شکل ۴-۷) ولی در ریزنمونه دمبرگ در همین ترکیب هورمونی 1BAP+0/1IBA هیچ گونه شاخه‌زایی مشاهده نگردید.

در ترکیبات هورمونی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با غلظت‌های ۰، ۰/۱ و یک میلی-گرم در لیتر IBA در ریزنمونه دمبرگ مشخص گردید که با افزودن هورمون IBA شاخه‌زایی کاهش می‌یابد ولی در ریزنمونه برگ با افزایش غلظت از ۰ تا ۰/۱ شاخه‌زایی کاهش و سپس با افزایش غلظت از ۰/۱ تا یک میلی‌گرم در لیتر شاخه‌زایی افزایش می‌یابد (نمودار۴-۷).



نمودار ۴-۷- مقایسه میانگین درصد شاخه‌زایی خود به خودی کالوس‌های ترکیبات هورمونی BAP+IBA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ گیاه دارویی سرخارگل



شکل۴-۷-. شاخه‌زایی خودبه خودی ریزنمونه برگ در اثر ترکیب هورمونی 1BAP+0/1IBA

تولید جنین‌های سوماتیکی در ریزنمونه‌های مختلف تحت تأثیر نوع ریزنمونه و هورمون‌های اکسینی و سیتوکنینی است. در یک تحقیق فراونی جنین‌های سوماتیکی در ریزنمونه برگ در اثر ترکیبات BAP+IBA بیشتر از ترکیبات فقط دارای هورمون BAP بود و بیشترین جنین‌های سوماتیکی در ترکیب پنج میکرومولار هورمون BAP همراه با ۲/۵ میکرومولار IBA مشاهده گردید و این جنین‌های سوماتیکی بعد از ۳۴ روز به صورت خود به خودی جوانه‌زایی انجام دادند (Zobayed and saxena, 2003). در این آزمایشات مشخص گردید که افزودن اکسین به محیط کشت باعث کاهش جنین‌زایی و نهایتاً باززایی می‌شود. همچنین در گونه آنگوستی فولیا نیز یک ترکیب مشابه در محیط کشت CH برای تولید کالوس و متعاقباً شاخه‌زایی در این ترکیبات، گزارش گردید که شاخه-زایی قابل قبولی از خود نشان دادند (Luchesini *et al*., 2009). از طرفی در همین گونه بیشتری شاخه‌زایی در ریزنمونه ساقه در ترکیب‌های هورمونی فقط حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل گردید و با اضافه کردن یکی از هورمون‌های اکسینی(IBA، NAA، IAA) با غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بعد از شش هفته به محیط کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP، بیشترین شاخه‌زایی در ترکیبات حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA و سپس ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA مشاهده گردید که با نتایج این آزمایش مطابقت ندارد (Jong se kim *et al*., 2010).

۴-۲-۲-ترکیب‌های هورمونی BAP+NAA

در این آزمایش از بین ۱۲ ترکیب هورمونی که برای کالوس‌زایی در نظر گرفته شده بود سه ترکیب هورمونی به صورت خود به خودی بدون منتقل نمودن به محیط‌های شاخه‌زایی به سمت شاخه‌زایی رفتند.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که بین فاکتورهای ریزنمونه و ترکیب‌های هورمونی و اثر متقابل بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ درصد از نظر درصد شاخه‌زایی وجود دارد (جدول۴-۸).

جدول۴-۸- تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف دو هورمون BAP+NAA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ بر میزان شاخه‌زایی خود به خودی در مرحله کالوس‌زایی گیاه دارویی سرخارگل

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع ریزنمونه(A)	۱	۴۴۹۷.۷۱۳ **
ترکیب‌های هورمونی(B)	۲	۲۷۶۳.۱۵۱ **
نوع ریزنمونه×ترکیب‌های هورمونی(A*B)	۲	۴۰۳۸.۵۹۳ **
خطا	۱۸	۳۳۱.۶۳۳

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها مشخص گردید که ریزنمونه‌ی برگ (۴۵/۲۳درصد) نسبت به ریزنمونه دمبرگ (۱۷/۸۵درصد) مقدار بیشتری شاخه‌زایی به صورت خود به خودی در همان محیط کالوس‌زایی انجام داده است که این مطلب دلالت بر واکنش متفاوت این دو ریزنمونه نسبت به شاخه‌زایی دارد.

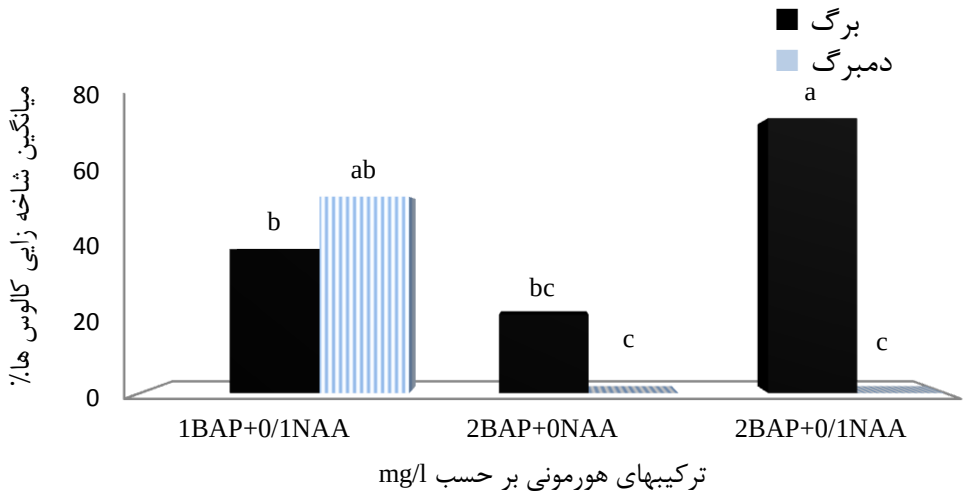
با توجّه به بررسی مقایسه میانگین داده‌ها در اثر فاکتور ترکیب‌های هورمونی، مشخص گردید که بیشترین شاخه‌زایی در ترکیب هورمونی 1BAP+0/1NAA به میزان ۴۶/۴۲ درصد و کمترین شاخه-

زایی در ترکیب هورمونی 2BAP+0NAA وجود دارد. البتّه تفاوت معنی‌داری از نظر آماری بین ترکیب‌های هورمونی 2BAP+0/1NAA و 1BAP+0/1NAA وجود ندارد.

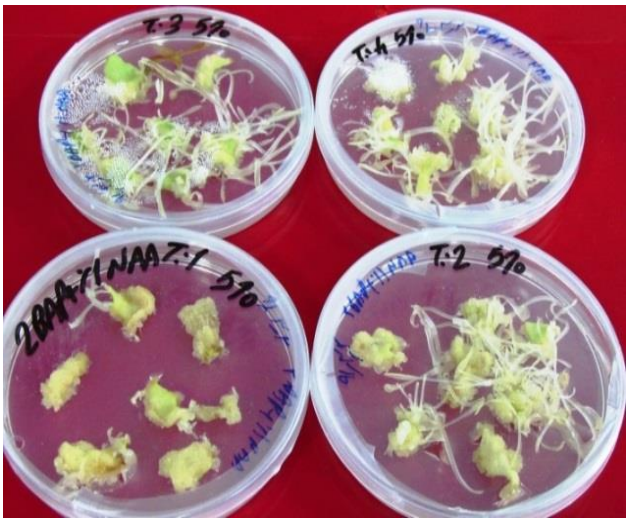
با توجّه به معنی‌دار بودن اثر متقابل بین ریزنمونه و ترکیب‌های هورمونی بر میزان شاخه‌زایی، با بررسی مقایسه میانگین داده‌ها مشخص گردید که بیشترین شاخه‌زایی در ریزنمونه برگ و ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA به میزان ۷۴/۹۹ درصد وجود دارد (شکل۴-۸) و تفاوت معنی‌داری از نظر آماری با ترکیب هورمونی 1BAP+0/1NAA در ریزنمونه دمبرگ ندارد. افزایش غلظت هورمون NAA از صفر تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در این ترکیب‌های هورمونی باعث افزایش شاخه‌زایی در هر دو ریزنمونه می‌شود ولی در ریزنمونه دمبرگ در ترکیبات حاوی دو میلی‌گرم در لیتر مانع شاخه‌زایی می‌گردد. در ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA در این آزمایش علاوه بر شاخه‌زایی بیشتر، شاخساره-های تولیدی آن دارای طول بیشتری از ترکیبات هورمونی دیگر بود.

در یک تحقیقی که به منظور باززایی غیر مستقیم از ریزنمونه دمبرگ گیاه دارویی سرخارگل صورت پذیرفت مشخص گردید که هورمون NAA در ترکیب با هورمون BAP مانع شاخه‌زایی می-گردد (Choffe *et al*., 2000b). در این آزمایش مشخص گردید که هورمون NAA وقتی با هورمون BAP با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر ترکیب می‌شود در ریزنمونه دمبرگ شاخه‌زایی مشاهده نمی‌گردد. این مطلب بیانگر این موضوع است که هورمون NAA در ترکیب با هورمون BAP مانع شاخه‌زایی می‌گردد.

در بیشتر آزمایشاتی که بر روی این گیاه دارویی صورت گرفته است مشخص گردیده است که دو هورمون BAP و NAA تأثیر فراوانی بر شاخه‌زایی دارند.



نمودار ۴-۸- مقایسه میانگین درصد شاخه‌زایی خود به خودی کالوس‌های ترکیبات هورمونی BAP+NAA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ گیاه دارویی سرخارگل.



شکل۴-۸- شاخه‌زایی خود به خودی در ریزنمونه برگ در اثر ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA

در ترکیبات حاوی مقادیر بالای اکسین‌ها مشخص شد که شاخه‌زایی کاهش می‌یابد یا اصلاً بوجود نمی‌آید. اکسین‌ها غالباً باعث القاء تقسیم سلول می‌شوند و از شکل‌گیری ساقه‌های نابجا و جانبی ممانعت می‌کنند و غلظت‌های بالای آنها باعث تشکیل کالوس می‌گردد و از طرفی اگر سیتوکنین‌ها همراه با اکسین بکار برده شوند، تقسیم سلولی را سرعت می‌بخشند و همچنین در

غلظت‌های بیشتر سیتوکنین‌ها (۱تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر)، تشکیل ساقه نابجا القاء شده و تشکیل ریشه متوقف می‌گردد (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۷).

به طور کلّی القای جنین‌های سوماتیکی به‌طور خیلی زیاد بستگی به در معرض قرار گرفتن ریزنمونه با هورمون اکسین (Steward *et al*., 1964) یا هورمون اکسین در ترکیب با سیتوکنین دارد (Gallo and Green, 2002).

در تحقیقی که به منظور باززایی غیر مستقیم گیاه دارویی سرخارگل صورت پذیرفت، مشخص گردید که در ریزنمونه برگ کالوس‌های به وجودآمده در اثر هورمون BAP با غلظت‌های ۰، ۰/۴۴، ۲/۲۲، ۴/۴۴، ۸/۸۸، ۱۷/۷۶ و ۳۱/۰۸ میکرومولار در ترکیب با هورمون NAA با غلظت‌های ۰، ۰/۰۵۴، ۰/۵۴ و ۲/۶۹ میکرومولار بیشترین ساقه نابه‌جا در ترکیب هورمونی ۴/۴۴ میکرومولار هورمون BAP در ترکیب با ۰/۵۴ میکرومولار هورمون NAA وجود دارد که این مطالب تا حدودی با نتایج این آزمایش مطابقت دارد (Koroch *et al*., 2002).

با توجّه به آزمایشات شاخه‌زایی خودبه‌خودی کالوس‌ها مشخص گردید که فراوانی کالوس‌های حاوی جنین‌های سوماتیکی در ترکیبات حاوی هورمون‌های BAP به عنوان سیتوکنین و NAA یا IBA به عنوان اکسین زیاد است و این نتایج با نتایج محققین دیگر مطابقت دارد (Zobayed and Saxena, 2003 and Choffe *et al*., 2000b). همچنین ریزنمونه برگ نسبت به ریزنمونه‌های دیگر در تولید جنین‌های سوماتیکی بیشتر گزارش گردیده است (Koroch et al., 2002 and Jones *et al*., 2007). البتّه تحت شرایط متفاوتی از کشت بعضی ریزنمونه‌ها پاسخ‌های مورفوژنیکی متفاوتی از خود نشان می‌دهند (Murch *et al*., 2006 and Choffe *et al*., 2000a).

در بقیّه ترکیب‌های هورمونی استفاده شده برای کالوس‌زایی هیچ‌گونه شاخه‌زایی خود به خودی در مرحله کالوس‌زایی مشاهده نشد و فقط ترکیب هورمونی KIN+NAA با غلظت‌های 2KIN+0/5NAA آن هم فقط در یک تکرار آن ۱۴/۲۸ درصد شاخه‌زایی مشاهده گردید و همچنین

در ترکیبات هورمونی حاوی TDZ هیچ گونه اثری از باززایی مشاهده نگردید که این نتایج با نتایج بعضی محققین مغایرت دارد (Choffe *et al*., 2000b).

۴-۳- نتایج آزمایشات شاخه‌زایی

اندام‌زایی فرایندی است که طیّ آن اندام‌های گیاهی نظیر ساقه، ریشه، جوانه، گل و غیره تولید می‌شود. اندام‌زایی یا به طور مستقیم از ریزنمونه یا به طور غیر مستقیم از بافت کالوس امکان پذیر است. عوامل متعددی از قبیل نوع ریزنمونه و نوع تنظیم کننده‌های خارجی و غیره در اندام‌زایی مؤثر است که در آزمایشات زیر به بررسی آن‌ها پرداخته شد.

سیتوکنین‌ها مشتقات آدنین بوده و نقش مهمّی در القاء شاخه‌دهی ایفا می‌نمایند و برای تحریک رشد و نمو بکار می‌روند. این هورمون‌ها با کاهش غالبیت انتهایی، تشکیل شاخه‌های فرعی را تسریع می‌نمایند. در این آزمایشات کالوس‌های گرفته شده از ترکیبات هورمونی مختلف در آزمایشات قبل به محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP به عنوان سیتوکنین به منظور بررسی تأثیر این تیمار هورمونی بر روی کالوس‌های القاء شده در ترکیبات هورمونی مختلف منتقل گردید و نتایج زیر حاصل گردید.

۴-۳-۱- ترکیب‌های هورمونی TDZ+IBA

در این آزمایش از بین ۱۱ ترکیب هورمونی حاوی هورمون‌های TDZ و IBA که کالوس‌های آنها القا شده بود فقط در سه ترکیب هورمونی در محیط حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP شاخه‌زایی مشاهده گردید.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که فقط در ترکیب‌های هورمونی تفاوت معنی‌داری از نظر درصد شاخه‌زایی در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد. ولی در فاکتورهای نوع ریزنمونه و اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و ترکیب‌های هورمونی تفاوت معنی‌داری از نظر شاخه‌زایی در سطح احتمال

۵ درصد مشاهده نمی‌شود که دلالت بر تأثیر یکسان این فاکتورها بر صفت شاخه‌زایی دارد (جدول ۴-۹).

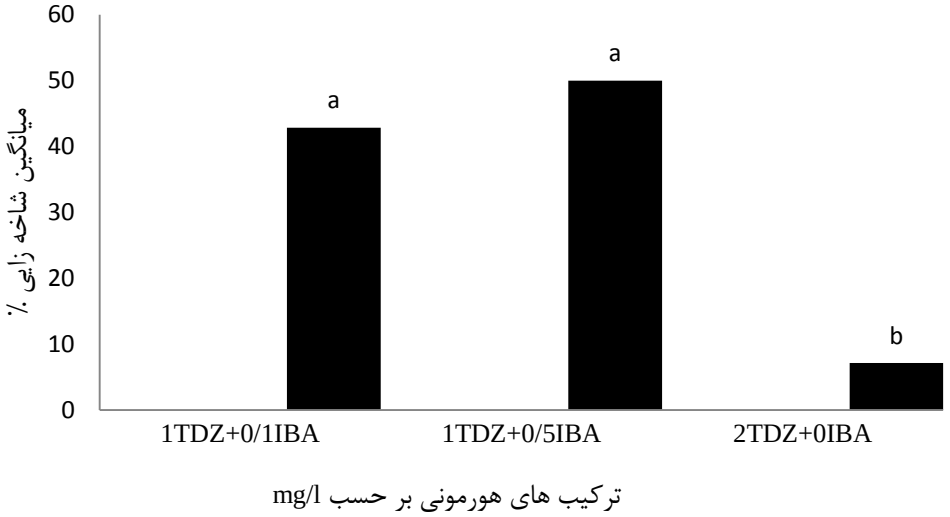
جدول۴-۹- تجزیه واریانس اثر ترکیبات هورمونی TDZ+IBA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ در مرحله کالوس‌زایی بر درصد شاخه‌زایی در محیط حاوی 2mg/l BAP

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع ریزنمونه(A)	۱	۳۰۶.۰۲۰ n.s
ترکیب های هورمونی(B)	۲	۴۲۱۷.۱۷۰ ❁
نوع ریزنمونه×ترکیب های هورمونی(A❁B)	۲	۱۰۲.۰۳۱ n.s
خطا	۱۸	۶۰۶.۵۳۵

❁ و n.s به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و غیر معنی‌دار

با توجّه به بررسی مقایسات میانگین داده‌ها در اثر فاکتور ترکیب‌های هورمونی، مشخص گردید که بیشترین شاخه‌زایی در کالوس‌های به وجود آمده از ترکیب هورمونی 1TDZ+0/5IBA به میزان ۴۹/۹۹ و کمترین شاخه‌زایی در ترکیب هورمونی 2TDZ+0IBA به میزان ۷/۱۴ درصد وجود دارد. البتّه از نظر آماری تفاوت معنی‌دار بین دو ترکیب 1TDZ+0/5IBA با 1TDZ+0/1IBA وجود ندارد. با توجّه به این مطالب می‌توان چنین نتیجه گرفت که افزایش غلظت هورمون TDZ در مرحله کالوس‌زایی باعث کاهش شاخه‌زایی در محیط حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP می‌گردد و افزایش هورمون IBA در ترکیبات حاوی دو میلی‌گرم در لیتر TDZ در محیط کالوس‌زایی تأثیری در شاخه‌زایی ندارد (نمودار ۴-۹).

شکل ۴-۹. شاخه‌زایی کالوس‌های ترکیب هورمونی 1TDZ+0/5IBA در محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP



نمودار ۴-۹- مقایسه میانگین شاخه‌زایی کالوس‌های ترکیب‌های هورمونی TDZ+IBA در محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP

القای کالوس‌های جنین‌زا به وسیله‌ی هورمون TDZ ممکن است در توسعه سوسپانسیون سلولی و انتقال ژن به گیاه سرخارگل به منظور تغییر ژنتیکی مناسب مفید باشد (Zobayed and Saxena, 2003). افزودن هورمون TDZ به محیط کشت فقط باعث رشد کالوس نمی‌شود بلکه باعث القای باززایی ریزنمونه‌های برگی نیز می‌شود. عمدتاً مقادیر بالاتر از ۲/۵ میکرومولار هورمون TDZ باعث افزایش جنین سوماتیکی و همچنین باززایی بیشتر در گیاه دارویی سرخارگل گزارش گردیده است (Jones *et al*., 2007). ولی در یک تحقیق که به منظور باززایی غیر مستقیم گیاه دارویی سرخارگل از ریزنمونه دمبرگ در اثر ترکیب هورمون TDZ (۰ تا ۱۰ میکرومول بر لیتر)، IAA (۰ تا ۲۵میکرومول برلیتر) صورت پذیرفت مشخص گردید که بیشترین میزان باززایی در ترکیب ۰/۵ میکرومولار TDZ همراه با مقادیر مختلف ۰، ۵، ۱۰ میکرومولار هورمون IAA مشاهده گردید (Choffe *et al*., 2000b).

در آزمایشات شاخه‌زایی، هورمون BAP به عنوان هورمون سیتوکنینی در شاخه‌زایی گیاه دارویی سرخارگل مؤثرتر از هورمون TDZ بود که این نتایج مطابق نتایج بسیاری از محققین بود. البتّه در بعضی گونه‌های گیاهی اثر هورمون TDZ بیشتر از هورمون BAP گزارش گردید است (Murthy *et al*., 1998 and Lu, 1993). همچنین زمانیکه هورمون TDZ در ترکیب با هورمون IAA به منظور

باززایی غیر مستقیم از ریزنمونه دمبرگ استفاده می‌شود جنین‌های سوماتیکی و نهایتاً باززایی افزایش می‌یابد (Choffe *et al*., 2000b). از طرفی در باززایی غیر مستقیم گیاه دارویی سرخارگل در سه ریزنمونه برگ، کوتیلدون و ریشه در اثر ترکیب هورمون TDZ همراه با هورمون IAA ، بیشترین جنین‌زایی و نهایتاً باززایی در ریزنمونه برگ رخ داد (Zobayed and saxena, 2003).

۴-۳-۲- ترکیب‌های هورمونیKIN+IBA

در این آزمایش از بین ۱۱ ترکیب هورمونی که کالوس‌های آنها القا شده بود فقط در هفت ترکیب هورمونی در محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP شاخه‌زایی انجام دادند.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که فقط در بین ترکیب‌های هورمونی تفاوت معنی-داری از نظر درصد شاخه‌زایی در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده وجود دارد و در فاکتور نوع ریزنمونه و اثر متقابل بین ریزنمونه و ترکیب‌های هورمونی تفاوت معنی‌داری از نظر درصد شاخه‌زایی در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده نمی‌شود که دلالت بر تأثیر یکسان این فاکتورها بر صفت شاخه‌زایی دارد (جدول ۴-۱۰).

جدول۴-۱۰- تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف دو هورمون KIN+IBA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ در مرحله کالوس‌زایی بر درصد شاخه‌زایی در محیط حاوی 2mg/l BAP

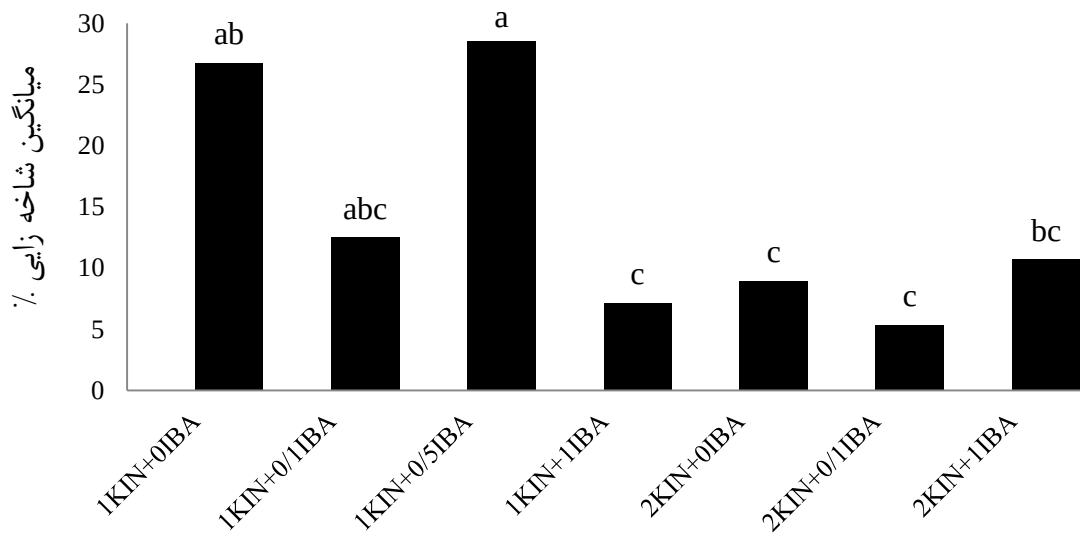
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع ریزنمونه(A)	۱	۷۱۴.۲۸۶ $^{n.s}$
ترکیب‌های هورمونی(B)	۶	۷۱۴.۱۴۹ *
نوع ریزنمونه×ترکیب های هورمونی(A*B)	۶	۳۴۰.۱۰۸ $^{n.s}$
خطا	۴۲	۲۴۰.۴۹۴

* و n.s به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و غیر معنی‌دار

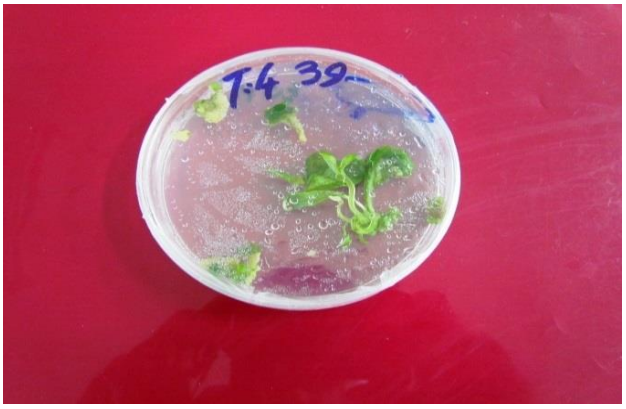
نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین شاخه‌زایی در ترکیب هورمونی 1KIN+0/5IBA به میزان ۲۸/۵۶ درصد و کمترین شاخه‌زایی در ترکیب هورمونی 1KIN+1IBA به

میزان ۷/۱۴ درصد وجود دارد. در این آزمایش افزایش غلظت هورمون KIN در ترکیبات هورمونی مختلف باعث کاهش شاخه‌زایی می‌گردد. از نظر شاخه‌زایی تفاوت معنی‌داری بین ترکیب هورمونی 1KIN+0/1IBA با ترکیبات حاوی دو میلی‌گرم در لیتر KIN همراه با غلظت‌های مختلف IBA وجود ندارد. در ترکیبات حاوی یک میلی‌گرم در لیتر KIN همراه با غلظت‌های مختلف IBA در غلظت‌های ۰ و ۰/۱ و ۰/۵ تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود و با افزایش غلظت از ۰ تا ۰/۱ شاخه‌زایی کاهش و سپس از ۰/۱ تا ۰/۵ (شکل ۴-۱۰) افزایش و نهایتاً از ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر کاهش می‌یابد (نمودار ۴-۱۰).

این نتایج می‌تواند به علّت سطوح مختلف تنظیم کننده‌های داخلی رشد و تغییر سطح آنها در برابر تنظیم کننده‌های خارجی رشد در مرحله کالوس‌زایی باشد.



نمودار۴-۱۰- مقایسه میانگین شاخه‌زایی کالوس‌های ترکیب‌های هورمونی KIN+IBA در محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP



شکل۴-۱۰- شاخه‌زایی کالوس‌های ترکیب هورمونی 1KIN+0/5IBA در محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP

۴-۳-۳- ترکیب‌های هورمونی KIN+NAA

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که فقط در بین فاکتور نوع ریزنمونه تفاوت معنی‌داری از نظر درصد شاخه‌زایی در سطح احتمال ۵ درصد وجود ندارد که دلالت بر تأثیر یکسان این فاکتور بر صفت شاخه‌زایی دارد ولی در بین فاکتورهای ترکیب‌های هورمونی و اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و ترکیب‌های هورمونی در سطح احتمال ۵ تفاوت معنی‌داری از نظر شاخه‌زایی وجود دارد (جدول۴-۱۱).

جدول۴-۱۱- تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف دو هورمون KIN+NAA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ در مرحله کالوس‌زایی بر درصد شاخه‌زایی در محیط حاوی 2mg/l BAP

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع ریزنمونه(A)	۱	۹۵۶.۴۹۲ n.s
ترکیب های هورمونی(B)	۵	۱۹۵۳.۱۸۲ ❋❋
نوع ریزنمونه×ترکیب های هورمونی(A❋B)	۵	۲۵۵۸.۲۰۲ ❋❋
خطا	۳۶	۳۰۷.۵۱۰

❋❋ و n.s به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و غیر معنی‌دار

در این آزمایش از بین ۱۱ ترکیب هورمونی حاوی هورمون‌های KIN و NAA که کالوس‌های آن‌ها القاء شده بود فقط در شش ترکیب هورمونی در محیط حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP شاخه-زایی مشاهده گردید. با توجّه به بررسی مقایسه میانگین داده‌ها مشخص شد بیشترین شاخه‌زایی در ریزنمونه دمبرگ، مربوط به ترکیب هورمونی 2KIN+1NAA به میزان ۶۷/۸۵ درصد است (شکل ۴-۱۱).

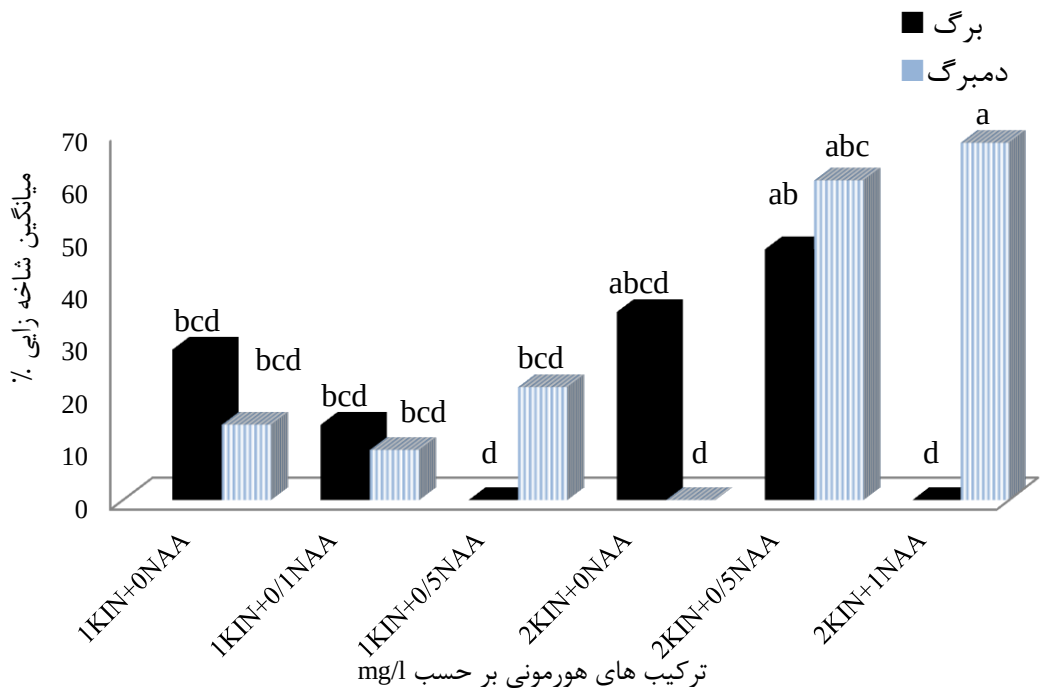
در این آزمایش در ریزنمونه برگ در ترکیبات هورمونی 2KIN+1NAA و 1KIN+0/5NAA هیچ گونه شاخه‌زایی مشاهده نشد. در ریزنمونه دمبرگ افزایش غلظت هورمون KIN همراه با هورمون NAA باعث افزایش شاخه‌زایی می‌گردد و در ریزنمونه برگ غلظت بالای هورمون NAA همراه با غلظت بالای KIN مانع شاخه‌زایی در محیط حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP می‌گردد. در ریزنمونه برگ در ترکیبات حاوی یک میلی‌گرم در لیتر KIN در ترکیب با غلظت‌های مختلف NAA تفاوت معنی‌دار از نظر شاخه‌زایی بین غلظت ۰ و ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA وجود ندارد. در ریزنمونه دمبرگ زمانیکه دو میلی‌گرم در لیتر KIN در محیط باشد تفاوت معنی‌داری از نظر شاخه-زایی در غلظت ۰ و ۰/۵ هورمون NAA وجود دارد (نمودار ۴-۱۱).

مانند آزمایش قبلی در تیمار هورمونی 2KIN+0IBA (فقط حاوی KIN) در ریزنمونه دمبرگ هیچگونه شاخه‌زایی مشاهده نشد. از این مطالب نتیجه گیری می‌شود که غلظت بالای KIN یعنی دو میلی‌گرم در لیتر وقتی به تنهایی به کار برده می‌شوند باعث کاهش شاخه‌زایی در ریزنمونه دمبرگ در محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP می‌شود و همچنین در آزمایش قبلی مشخص گردید که در ترکیبات حاوی دو میلی‌گرم در لیتر KIN وقتی با هورمون IBA ترکیب می-شوند شاخه‌زایی کاهش ولی در این آزمایش هورمون NAA باعث افزایش شاخه‌زایی می‌شود.

گزارشاتی مبنی بر شاخه‌زایی توسط ترکیب این دو هورمون در گونه پورپورا وجود دارد. در این گزارشات مشخص گردید که در ترکیبات حاوی هورمون KIN با غلظت‌های یک و دو میلی‌گرم در

لیتر همراه با هورمون NAA با غلظت‌های یک و دو و سه میلی‌گرم در لیتر، با افزایش غلظت هورمون KIN از یک تا دو میلی‌گرم در لیتر شاخه‌زایی افزایش نمی‌یابد که این نتایج با نتایج این آزمایش مطابقت دارد و بیشترین میزان شاخه‌زایی در ترکیب هورمونی 1KIN+2NAA وجود داشت. البتّه بیشترین تعداد شاخساره در ترکیب هورمونی 1/5KIN+0/5 2, 4- D مشاهده گردید (Coker and Camper, 2000 and Zhao et al., 2006).

در شاخه‌زایی گونه *Echinacea.angustifolia* گزارش گردید که اثر هورمون KIN در شاخه‌زایی کمتر از هورمون BAP است و غلظت دو میلی‌گرم در لیتر هورمون KIN تأثیر بیشتری از غلظت یک میلی‌گرم در لیتر آن در شاخه‌زایی در محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP دارد (Jong se kim, 2010).



نمودار ۴-۱۱- مقایسه میانگین شاخه‌زایی کالوس‌های ترکیب‌های هورمونی KIN+NAA در محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP

شکل۴-۱۱-. شاخه‌زایی کالوس‌های ترکیب هورمونی 2KIN+1NAA در محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP

۴-۳-۴- ترکیب‌های هورمونی BAP+NAA

در این آزمایش از بین ۱۱ ترکیب هورمونی حاوی هورمون‌های BAP و NAA که کالوس‌های آن‌ها القاء شده بود فقط در اثر هفت ترکیب هورمونی شاخه‌زایی مشاهده گردید.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که در بین سطوح مختلف فاکتورهای مورد مطالعه شامل نوع ریزنمونه و ترکیب‌های هورمونی و اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و ترکیب‌های هورمونی تفاوت معنی‌داری از نظر درصد شاخه‌زایی در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد وجود دارد (جدول۴-۱۲).

جدول۴-۱۲- تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف دو هورمون BAP+NAA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ در مرحله کالوس‌زایی بر درصد شاخه‌زایی در محیط حاوی 2mg/l BAP

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع ریزنمونه(A)	۱	۲۴۶۳.۵۷۶*
ترکیب‌های هورمونی(B)	۶	۴۶۲۹.۲۲۳**
نوع ریزنمونه×ترکیب‌های هورمونی (A*B)	۶	۱۴۱۷.۵۳۰*
خطا	۴۲	۵۲۲.۳۱۳

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪

بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها ریزنمونه‌ی برگ (۴۳/۸۵ درصد) در مقایسه با دمبرگ (۳۰/۶۰ درصد) مشخص گردید که ریزنمونه‌ی برگ مقدار بیشتری شاخه‌زایی در اثر تیمار شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP انجام داده است.

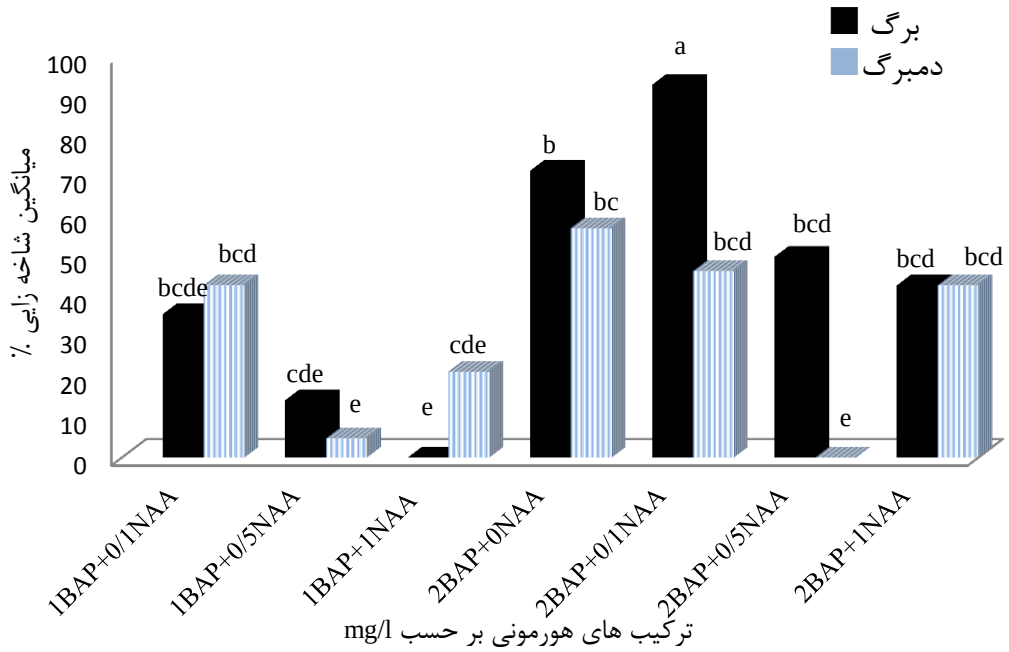
در فاکتور دوم مورد بررسی قرار داده شده یعنی ترکیب‌های هورمونی، بیشترین شاخه‌زایی (۶۹/۶۳ درصد) در ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA و کمترین شاخه‌زایی (۸/۹۲ درصد) در ترکیب هورمونی 1BAP+0/5NAA وجود دارد. در ترکیبات هورمونی حاوی BAP با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر همراه با هورمون NAA با غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر با افزایش هورمون NAA شاخه‌زایی کاهش می‌یابد. ولی در ترکیبات هورمونی حاوی BAP با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر همراه با هورمون NAA با غلظت‌های ۰، ۱/، ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر با افزایش هورمون NAA شاخه-زایی در ابتدا کاهش و سپس افزایش می‌یابد.

با توجّه به مقایسه میانگین داده‌های فاکتور اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و ترکیب‌های هورمونی مشخص شد که بیشترین شاخه‌زایی در ریزنمونه برگ و ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA به میزان ۹۲/۸۵ درصد وجود دارد (شکل ۴-۱۲). در ریزنمونه‌ی دمبرگ بیشترین شاخه‌زایی در ترکیب 2BAP+0NAA مشاهده می‌شود و در ترکیب هورمونی 2BAP+0/5NAA در ریزنمونه دمبرگ و در ترکیب هورمونی 1BAP+1NAA در ریزنمونه برگ شاخه‌زایی مشاهده نگردید.

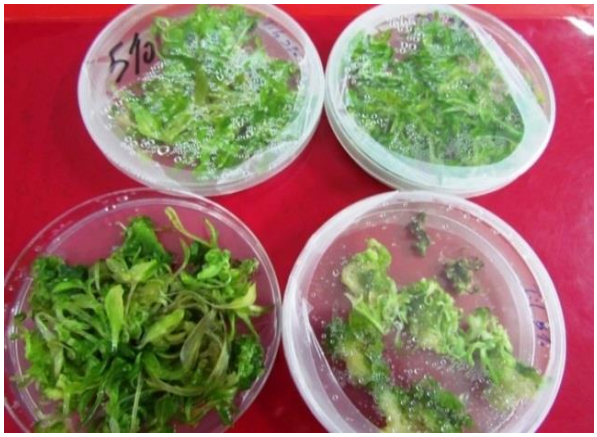
در ترکیبات هورمونی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP همراه با غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA در ریزنمونه برگ در مرحله کالوس‌زایی، با افزایش غلظت از ۰ تا ۰/۱ شاخه‌زایی افزایش می‌یابد و در غلظت‌های ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر NAA شاخه‌زایی کاهش می‌یابد و تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر وجود ندارد ولی در ریزنمونه دمبرگ در ترکیبات هورمونی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP همراه با غلظت‌های مختلف NAA فقط در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA کاهش معنی‌دار از نظر شاخه‌زایی مشاهده

گردید ولی در ترکیبات هورمونی حاوی یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP با افزایش غلظت از ۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA شاخه‌زایی کاهش و سپس در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر افزایش می‌یابد (نمودار ۴-۱۲).

با توجّه به نتایج این آزمایش و آزمایشات شاخه‌زایی خودبه‌خودی در مرحله کالوس‌زایی مشخص گردید که افزودن هورمون BAP به عنوان یک سیتوکنین با غلظت دو میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش شاخه‌زایی می‌گردد.



نمودار ۴-۱۲- مقایسه میانگین شاخه‌زایی کالوس‌های ترکیب‌های هورمونی BAP+NAA در محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP



شکل۴-۱۲- شاخه‌زایی کالوس‌های ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA در محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP

غلظت ۰/۱ هورمون NAA تأثیر زیادی در افزایش شاخه‌زایی در این آزمایش دارد. در باززایی غیر مستقیم سه ریزنمونه برگ ریشه و دمبرگ گیاه دارویی سرخارگل در اثر ترکیب هورمونی ۰/۳ میلی-گرم در لیتر هورمون BAP همراه با ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، مشخص گردید که ریزنمونه‌های برگ شاخه‌زایی بیشتری از ریزنمونه‌های دمبرگ دارند (Dahanayake *et al*., 2010). در گونه آنگوستی فولیا کالوس‌های ریزنمونه برگ بدست آمده از ترکیب‌های هورمونی BAP+NAA وقتی به محیط شاخه‌زایی حاوی ۰/۲۵ میلی‌گرم هورمون BAP منتقل شدند شاخه‌زایی بیشتری نسبت به محیط شاخه‌زایی ۰/۵ میلی‌گرم نشان دادند. (Luchesini *et al*., 2009).

با توجّه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که افزایش هورمون BAP باعث افزایش شاخه‌زایی می‌گردد. در همین گونه شاخه‌زایی کالوس‌های بدست آمده از ترکیب هورمونی BAP+NAA در غلظت‌های کمتر از ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP گزارش گردید. در این تحقیق با افزایش هورمون BAP شاخه‌زایی کاهش یافت که این نتایج با نتایج بدست آمده است در این آزمایش مغایرت دارد (Taha *et al*., 2010).

عکس‌العمل ریزنمونه‌ها در شرایط کشت درون شیشه‌ای بستگی به فاکتورهای متعدّدی دارد. مقادیر سطوح هورمون‌های داخلی، غلظت تنظیم کننده‌های رشد خارجی و برهمکنش اثر این تنظیم

کننده‌ها همگی بر پاسخ ریزنمونه مؤثر می‌باشد (Torres, 1989). هورمون NAA به عنوان تنظیم کننده‌های رشد اکسینی نقش مؤثری در تقسیم سلولی دارد، بنابراین بنابراین حضور آن برای باززایی مؤثر است و هورمون BAP به عنوان سیتوکنین در تحریک رشد و نمو و تقسیم سلولی نقش دارد و اضافه کردن سیتوکنین به محیط کشت سبب باززایی گیاهان می‌شود (باقری، ۱۳۸۱).

در بیشتر مطالعات حضور هورمون BAP در محیط کشت برای شاخه‌زایی گزارش گردیده است (Choffe et al., 2000a and Harbage, 2001 and Mechanda et al., 2003 and Koroch, 2003).

همچنین غلظت هورمون BAP فاکتور مهمّی در افزایش شاخه‌زایی و باززایی این گیاه دارویی است. در یک تحقیق که به منظور باززایی از ریزنمونه دمبرگ کشت شده در محیط حاوی هورمون BAP با غلظت‌های ۰، ۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ میکرومولار انجام پذیرفت مشخص گردید که بیشترین باززایی در این ریزنمونه مربوط به غلظت ۲/۵ میکرومولار هورمون BAP است (Choffe *et al*., 2000b).

در تحقیقاتی که به منظور باززایی غیر مستقیم گونه پورپورا از ریزنمونه دمبرگ صورت گرفته است مشخص گردید که مقادیر کم هورمون BAP در شاخه‌زایی مؤثرتر هستند که با نتایج این آزمایش مغایرت دارد (Choffe *et al*., . 2000b and Wang and To, 2004).

گزارشات متعدّدی از تأثیر ترکیبات هورمونی حاوی BAP و NAA در باززایی غیر مستقیم گونه-های پورپورا و پالیدا از ریزنمونه برگ صورت گرفته است و مشخص گردیده است که ریزنمونه‌های برگ این دو گونه پتانسیل بالایی در شاخه‌زایی دارند که این موضوع مستقیماً بستگی به تنظیم کننده‌های خارجی رشد و همچنین تعادل اکسین و سیتوکنین دارد (Koroch *et al*., 2002; 2003).

۴-۳-۵- ترکیب‌های هورمونی BAP+IBA

در این آزمایش از بین ۱۱ ترکیب هورمونی حاوی هورمون‌های BAP و IBA که کالوس‌های آنها القاء شدند فقط در پنج ترکیب هورمونی در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ شاخه‌زایی صورت پذیرفت.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که فقط در فاکتور نوع ریزنمونه تفاوت معنی‌داری از نظر شاخه‌زایی وجود ندارد که دلالت بر تأثیر یکسان این فاکتورها بر صفت شاخه‌زایی دارد و در بقیه موارد یعنی ترکیب‌های هورمونی و اثر متقابل بین نوع ریزنمونه و ترکیب‌های هورمونی، تفاوت معنی-داری از نظر شاخه‌زایی در سطح احتمال ۱٪ مشاهده می‌شود (جدول۴-۱۳).

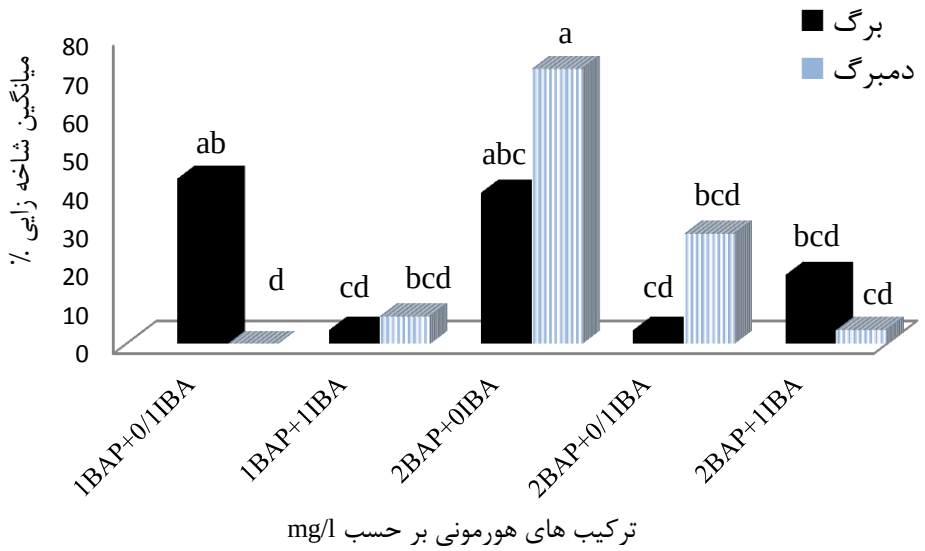
با توجه به مقایسه میانگین‌ها داده‌ها مشخص گردید که بیشترین شاخه‌زایی مربوط به ترکیب هورمونی 2BAP+0IBA به میزان ۵۵/۳۵ درصد و کمترین شاخه‌زایی به میزان ۵/۳۵ درصد در ترکیب هورمونی 1BAP+1IBA است.

با توجّه به مقایسه میانگین داده‌ها در اثر متقابل بین ریزنمونه و ترکیب‌های هورمونی مشخص شد که بیشترین شاخه‌زایی در ریزنمونه دمبرگ در ترکیب هورمونی 2BAP+0IBA به میزان ۷۱/۴۲۵ درصد وجود دارد (شکل۴-۱۳).

جدول۴-۱۳- تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف دو هورمون BAP+IBA در دو ریزنمونه برگ و دمبرگ در مرحله کالوس‌زایی بر درصد شاخه‌زایی در محیط حاوی 2mg/l BAP

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع ریزنمونه(A)	۱	۵.۱۱۲ $^{n.s}$
ترکیب‌های هورمونی(B)	۴	۳۱۰۴.۱۹۹ **
نوع ریزنمونه×ترکیبهای هورمونی(A*B)	۴	۱۸۵۴.۳۲۸ **
خطا	۳۰	۲۹۰.۸۲۲

** و n.s معنی دار در سطح ۱٪ و غیر معنی دار



نمودار ۴-۱۳- مقایسه میانگین شاخه‌زایی کالوس‌های ترکیب‌های هورمونی BAP+IBA در محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP

بیشترین شاخه‌زایی در ریزنمونه برگ در ترکیب هورمونی 1BAP+0/1IBA به میزان ۴۲/۸۵ مشاهده گردید. البتّه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین این ترکیب هورمونی با ترکیب هورمونی 2BAP+0IBA وجود ندارد. در ریزنمونه دمبرگ در ترکیب هورمونی 1BAP+0/1IBA هیچ گونه شاخه‌زایی مشاهده نشد.

در ترکیب‌های هورمونی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP همراه با هورمون IBA با غلظت‌های ۰، ۰/۱ و یک میلی‌گرم در لیتر مشخص گردید که شاخه‌زایی با افزایش غلظت IBA از ۰ تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه برگ کاهش و در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA شاخه‌زایی افزایش می‌یابد ولی در ریزنمونه دمبرگ کاهش می‌یابد البتّه در هر دو ریزنمونه تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر از نظر شاخه‌زایی وجود ندارد (۴-۱۳).

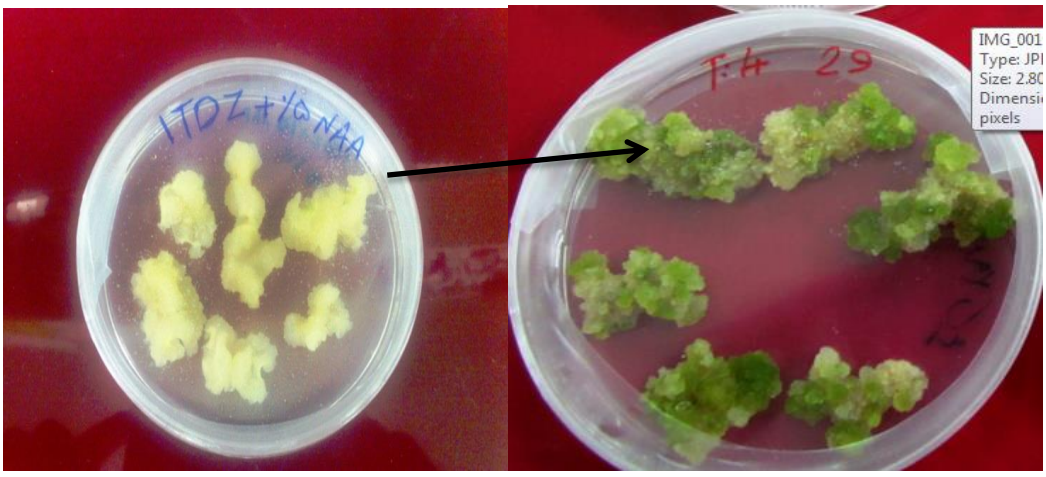
میزان شاخه‌زایی در گونه‌های مختلف متفاوت است. در گونه *E.anggustifolia* در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA در محیط کشت بیشترین شاخه‌زایی در ریزنمونه برگ مشاهده گردید که در این آزمایش در این ترکیب هورمونی هیچ

گونه شاخه‌زایی مشاهده نگردید (Jong se kim *et al*., 2010). این مطلب شاید دلالت بر نوع گونه داشته باشد.

شکل۴-۱۳- شاخه‌زایی کالوس‌های ترکیب هورمونی 2BAP+0IBA در محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP

۴-۳-۶- ترکیب های هورمونی TDZ+NAA

وقتی کالوس‌های بدست آمده در اثر ترکیب‌های هورمونی حاوی TDZ و NAA به محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP منتقل شدند هیچ گونه شاخه‌زایی در آن‌ها مشاهده نگردید و فقط کالوس‌ها بزرگتر و تغییر رنگ دادند و به رنگ سبز تبدیل شدند.



کل۴-۱۴-. تغییر رنگ کالوس‌های ترکیب هورمونی TDZ+NAA در محیط شاخه‌زایی حاوی2mg/L BAP

چندین فراین بیوشیمیایی برای شاخه‌زایی در گیاهان مورد نیاز است (Chawla, 2000). به طور کلّی نوع ریزنمونه و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نقش کلیدی در فرایند تمایز ایفا می‌کنند (kumar *et al.*, 2005 and Jones *et al.*, 2007). در آزمایشات شاخه‌زایی در محیط حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP مشخص گردید که شاخه‌زایی در کالوس‌های القاء شده در ریزنمونه برگ بیشتر از ریزنمونه دمبرگ است که این موضوع به دلایل متعددی می‌تواند باشد. ریزنمونه‌هایی که تقسیمات پریکلینال در زیر پوست بیرونی در اثر هورمون‌های مختلف ایجاد می‌کنند مورموژنز بهتری انجام می‌دهند که این تقسیمات منجر به تشکیل مراکز مریستمی متعددی می‌شود و همچنین سلول‌ها در مراکز مریستمی اینها کوچک با سیتوپلاسم غلیظ و هسته برجسته هستند (Choffe *et al.*, 2000b).

واضح است که منبع ریزنمونه به طور معنی‌داری روی پاسخ باززایی مؤثر است. مشاهدات متناقضی بر اثر تفاوت روش‌های کشت و پیش زمینه ژنتیکی گیاهان مادری و وضعیت فیزیولوژیکی بافت ریزنمونه وجود دارد. تفاوت در ماهیّت و نوع ریزنمونه تغییر بسیار زیادی در پاسخ باززایی ریزنمونه دارد (Annadana *et al.* 2000). به طور کلّی نوع ریزنمونه در بعضی گیاهان و سلول‌های متفاوت در بعضی ریزنمونه‌ها باعث وضعیت‌های متفاوتی از نظر مورفوژنز می‌شوند. بنابراین عوامل مختلف برای داخل شدن به مسیرهای متفاوت باززایی وجود دارد (Ammirato, 1983 and Hicks, 1994). فاکتورهای تنظیمی کلیدی که صلاحیت باززایی سلول‌های گیاهان را تعیین می‌کنند ناشناخته است. از طرفی نمی‌توان از نقش هورمون و همچنین غلظت هورمون چشم پوشی کرد. راندمان‌های متفاوتی از ریزنمونه‌ها در پاسخ به ترکیبات متفاوتی از اکسین و سیتوکنین وضعیت‌های متفاوتی از شایستگی ریخت‌زایی سلول‌ها در بافت‌های دمبرگ و برگ و بافت‌های دیگر به وجود می‌آید که مستلزم پیاهای القایی متفاوت برای فراخوانی پاسخ‌های باززایی ویژه می‌شود (Choffe *et al.*, 2000b and Lakshmanan *et al.*, 2002).

به طور کلّی القای کالوس و متعاقباً تمایز و شاخه‌زایی به وسیله تنظیم کننده‌های رشد و کنترل شرایط محیط کشت انجام پذیر است. تحریک تنظیم کننده‌های داخلی رشد و افزودن تنظیم کننده-های خارجی رشد به محیط کشت باعث تقسیم سلولی و رشد سلولی و تمایز بافتی ریزنمونه‌ها نیز می‌گردد. (Tripathi and Tripathi, 2003).

۴-۴- شاخه‌زایی کالوس‌های گرفته شده از ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA

هدف نهایی این تحقیق باززایی گیاه دارویی سرخارگل بود. با توجّه به آزمایشات کالوس‌زایی و شاخه‌زایی که در بالا توضیح داده شد مشخص گردید که در ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA در ریزنمونه برگ بیشترین شاخه‌زایی وجود دارد. همانطور که قبلاً ذکر گردید سنّ ریزنمونه و هورمون-های اکسینی و سیتوکنینی نقش فراوانی در باززایی گیاهان دارد. بدین منظور در آزمایشات ذیل کالوس‌های بدست آمده از ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA در ریزنمونه‌ی برگ قبل از افزایش شاخه‌زایی به محیط‌های شاخه‌زایی حاوی هورمون‌های BAP با غلظت‌های ۰، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی یا در ترکیب با هورمون NAA با غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر منتقل نموده و نتایج زیر بدست آمد.

در این آزمایشات سنّ کالوس‌های منتقل شده به محیط‌های شاخه‌زایی ۲۸ روز (برخلاف آزمایشات قبلی که ۴۲ روز بود) در نظر گرفته شد.

۴-۴-۱- ترکیب‌های هورمونی BAP+NAA

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف هورمون NAA (۰، ۰/۰۵ و ۰/۱) تفاوت معنی‌داری از نظر شاخه‌زایی در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد ولی تفاوت معنی‌داری در سطوح مختلف هورمون BAP (۰، یک، دو و چهار میلی‌گرم در لیتر) و اثر متقابل بین این دو

فاکتور در سطح احتمال ۵ درصد از نظر شاخه‌زایی وجود ندارد که دلالت بر تأثیر یکسان این فاکتورها بر میزان شاخه‌زایی دارد (جدول۴-۱۴).

جدول۴-۱۴- تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف ترکیب دو هورمون BAP+NAA بر شاخه‌زایی کالوس‌های القاء یافته در اثر ترکیب هورمونی 2BAP+0/1IBA

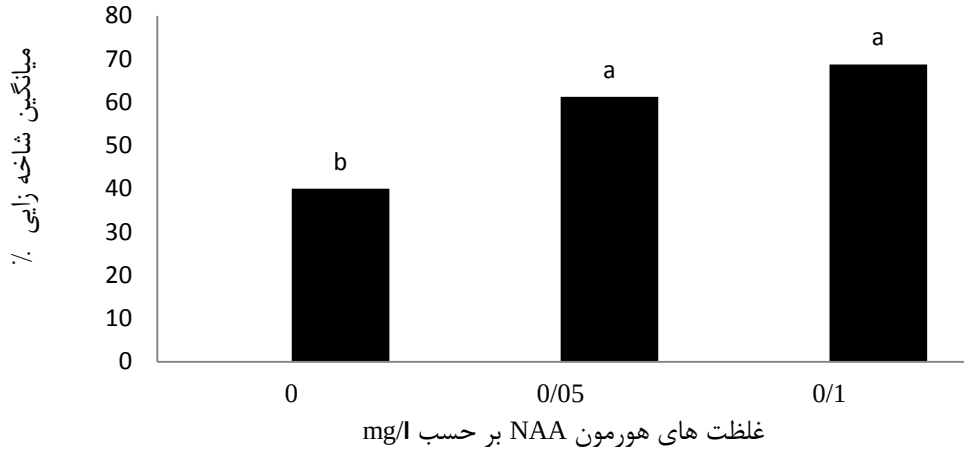
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
غلظت های هورمون BAP (A)	۳	۴۰۰.۰۰۰ n.s
غلظت‌های هورمون NAA (B)	۲	۳۵۵۸.۳۳۳ ❁
غلظت‌های هورمون BAP ×غلظت‌های هورمونNAA (A❁B)	۶	۶۹۱.۶۶۷ n.s
خطا	۳۶	۴۶۱.۱۱۱

❁ و n.s به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و غیر معنی‌دار.

در این آزمایش نشان داده می‌شود در بین غلظت‌های هورمون BAP به عنوان یک هورمون سیتوکنینی تفاوت معنی‌دار از نظر میزان شاخه‌زایی وجود ندارد و همه غلظت‌ها تأثیر یکسانی بر شاخه‌زایی دارند.

با توجّه به مقایسه میانگین داده‌ها مشخص گردید که با افزایش غلظت NAA شاخه‌زایی افزایش می‌یابد و بیشترین شاخه‌زایی در اثر غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به میزان ۶۸/۷۵ درصد بوجود آمده است و تفاوت معنی‌دار از نظر آماری بین غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده نمی‌شود. (نمودار۴-۱۴). در تحقیقی که به منظور باززایی غیر مستقیم گیاه سرخارگل از ریزنمونه برگ انجام شد، بهترین غلظت ترکیب دو هورمون BAP (با غلظت‌های۰، ۰/۴۴، ۲/۲۲، ۴/۴۴، ۸/۸۸، ۱۷/۷۶، ۳۱/۰۸ میکرومولار) و NAA (با غلظت‌های ۰، ۰/۰۵۴، ۰/۵۴، ۲/۶۹ میکرومولار) برای شاخه‌زایی، غلظت ۴/۴۴ میکرومولار هورمون BAP در ترکیب هورمون NAA با غلظت ۰/۵۴ میکرومولار گزارش شد و افزایش NAA باعث افزایش شاخه‌زایی شد که این نتایج با نتایج این آزمایش مطابقت داشت (Koroch *et al*., 2002).

تیمار کالوس‌زایی 2BAP+0/1NAA وقتی به همین تیمار برای شاخه‌زایی برده شد بیشترین (۸۵ درصد) شاخه‌زایی را نشان داد (شکل۴-۱۵) و در تیمار شاهد (بدون هورمون) هم ۴۵ درصد شاخه‌زایی وجود داشت. این مطلب بیانگر این موضوع است که افزودن مقداری هورمون باعث افزایش شاخه‌زایی می‌شود.



نمودار ۴-۱۴- مقایسه میانگین درصد شاخه‌زایی کالوس‌های القاء شده در ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA در اثر غلظت‌های مختلف هورمون NAA

در تحقیقی که به منظور باززایی غیر مستقیم گیاه دارویی سرخارگل از دو ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون در اثر ترکیبات هورمونی حاوی هورمون BAP (با غلظت‌های ۰، ۰/۴ و ۲/۴ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (با علظت‌های ۰، ۰/۰۳ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر) انجام پذیرفت مشخص گردید که شاخه‌زایی در اثر افزایش غلظت هورمون NAA افزایش نمی‌یابد که با نتایج این آزمایش مغایرت داشت و همچنین بیشترین شاخه‌زایی در ترکیب هورمونی 0/4BAP+0NAA وجود داشت (Choffe *et al*., 2000a).

شکل ۴-۱۵- شاخه‌زایی ریزنمونه برگ در اثر ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA

گزارشات متعدّدی از تأثیر ترکیبات هورمونی حاوی هورمون‌های BAP و NAA در باززایی غیر مستقیم گونه‌های پورپورا و پالیدا از طریق ریزنمونه برگ صورت گرفته است و مشخص گردیده است که ریزنمونه‌های برگ این دو گونه پتانسیل بالایی در شاخه‌زایی دارند که این موضوع مستقیماً بستگی به تنظیم کننده‌های خارجی رشد و همچنین تعادل اکسین و سیتوکنین دارد (Koroch *et al.*, 2002; 2003).

۴-۴-۲-ترکیب‌های هورمونی TDZ+NAA

در آزمایش ذیل کالوس‌های بدست آمده از ریزنمونه‌ی برگ در اثر ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA به محیط‌های شاخه‌زایی حاوی هورمون‌های TDZ با غلظت‌های ۰، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی یا در ترکیب با هورمون NAA با غلظت‌های ۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر منتقل نموده و نتایج زیر بدست آمد.

در این آزمایش نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف فاکتورهای غلظت‌های هورمون TDZ (۰، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و اثر متقابل بین غلظت‌های هورمون TDZ

و غلظت‌های هورمون NAA از نظر میزان شاخه‌زایی در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد که دلالت بر تأثیر متفاوت این فاکتورها بر میزان شاخه‌زایی دارد ولی در فاکتور غلظت‌های هورمون NAA (۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) از نظر میزان شاخه‌زایی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (جدول۴-۱۵).

با توجّه به مقایسه میانگین داده‌ها مشخص گردید که بیشترین شاخه‌زایی (۵۸/۳۳ درصد) در اثر هورمون TDZ در مواقعی است که غلظت هورمون TDZ صفر باشد، و بعد از آن بیشترین شاخه‌زایی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر به میزان ۴۰ درصد و کمترین میزان شاخه‌زایی در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ مشاهده گردید. این مطلب نشان دهنده این موضوع است که با افزایش غلظت هورمون TDZ شاخه‌زایی کاهش می‌یابد.

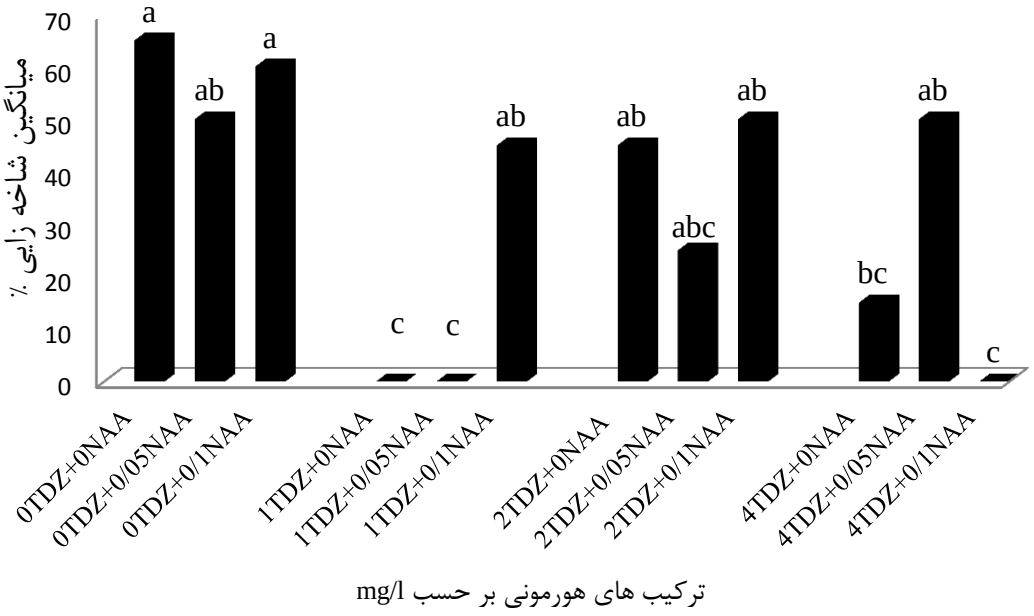
جدول۴-۱۵- تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف ترکیب دو هورمون TDZ+NAA بر شاخه‌زایی کالوس‌های القاء یافته در ترکیب هورمونی 2BAP+0/1IBA

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
غلظت های هورمون TDZ (A)	۳	۴۵۶۳.۸۸۹ **
غلظت‌های هورمون NAA (B)	۲	۳۰۰.۰۰۰ n.s
غلظت‌های هورمون TDZ ×غلظت‌های هورمونNAA (A*B)	۶	۱۹۸۸.۸۸۹ **
خطا	۳۶	۳۶۳.۸۸۹

** و n.s به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱٪ و غیر معنی‌دار

مقایسات میانگین‌ها داده‌ها نشان داد که در اثر متقابل بین غلظت‌های هورمون TDZ و NAA، بیشترین شاخه‌زایی در تیمار شاهد (محیط فاقد هورمون) به میزان ۶۵ درصد وجود دارد (شکل ۴-۱۶). در ترکیب‌های هورمونی 1TDZ+0NAA و 1TDZ+0/1NAA و 4TDZ+0/1NAA هیچ گونه شاخه‌زایی مشاهده نشد. در ترکیبات حاوی یک میلی‌گرم در لیتر هورمون TDZ همراه با غلظت‌های مختلف هورمون NAA، فقط در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم هورمون NAA شاخه‌زایی مشاهده گردید ولی در ترکیبات حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر هورمون TDZ عکس این موضوع بود. غلظت چهار میلی‌گرم

درلیتر TDZ وقتی با مقداری NAA (۰/۰۵) ترکیب می‌شود باعث افزایش شاخه‌زایی می‌شود و در ترکیبات حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون TDZ در ترکیب با غلظت‌های مختلف هورمون NAA عکس این موضوع است و تفاوت معنی‌داری از نظر شاخه‌زایی بین غلظت‌های مختلف هورمون NAA از نظر شاخه‌زایی مشاهده نشد. یکی از این ترکیبات، 2TDZ+0/1NAA است که شکل آن در ذیل آورده شده است (شکل ۴-۱۶ب). این مطالب بیانگر این موضوع است که غلظت چهار میلی‌گرم در لیتر هورمون TDZ اثر منفی بر روی غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA به منظور شاخه‌زایی دارد. همچنین در همه ترکیبات فاقد هورمون TDZ شاخه‌زایی فراوانی مشاهده گردید که این مطلب بیانگر این موضوع است که تأثیر هورمون NAA در شاخه‌زایی صرف نظر از غلظت آن بیشتر از هورمون TDZ در این آزمایش است (نمودار۴-۱۵-). عمدتاً مقادیر بالای هورمون TDZ (یک و دو میلی‌گرم در لیتر) تأثیر بیشتری در شاخه‌زایی نسبت به مقادیر پایین‌تر دارند (Jones *et al*., 2007).



نمودار ۴-۱۵- مقایسه میانگین درصد شاخه‌زایی کالوس‌های القاء شده در ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA برمیزان شاخه‌زایی در اثر ترکیبات هورمونی TDZ+NAA

از مطالب بالا می‌توان چنین برداشت کرد که هورمون TDZ تأثیر چندانی در شاخه‌زایی ندارد و همچنین باعث کاهش باززایی نیز می‌شود و نکته مورد توجه در این آزمایش این بود که در بیشتر ترکیباتی که ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به کار برده می‌شود شاخه‌زایی نیز افزایش می‌یابد.

شکل۴-۱۶- شاخه‌زایی در تیمار شاهد (الف) و شاخه‌زایی در ترکیب هورمونی 2TDZ+0/1NAA (ب)

در تحقیقی که به منظور شاخه‌زایی گونه آنگوستی فولیا صورت پذیرفت، مشخص گردید که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA بیشتر از غلظت ۰/۱ و غلظت ۰/۱ هورمون NAA بیشتر از غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر باعث شاخه‌زایی می‌شوند (Jong se kim *et al*., 2010).

تأثیر هورمون BAP به عنوان سیتوکنین و NAA به عنوان اکسین در شاخه‌زایی و باززایی گیاه دارویی سرخارگل بیشتر از هورمون TDZ است. تحقیقات محققین دیگر (Kristen *et al*., 2000 and Ahmad *et al*., 2010 and Zobayed *et al*,. 2003 and Coker and Camper, 2000 (Maxwell *et al*., 2007 نیز مناسب‌تر بودن هورمون BAP نسبت به TDZ را برای باززایی تأیید می‌کنند. البتّه در کشت بافت گونه *E.tennesseensis* ترکیبات هورمونی حاوی TDZ و NAA باعث تحریک سه برابری تعداد ساقه در برابر ترکیبات حاوی BAP به تنهایی شدند (Sauve *et al*., 2004).

۴-۴-۳- شاخه‌زایی کالوس‌های گرفته شده از ترکیب هورمونی 2TDZ+0/5IBA

در این آزمایش کالوس‌های بدست آمده از ترکیب هورمونی 2TDZ+0/5IBA در ریزنمونه‌ی برگ را که دارای سایز بزرگی بودند و سنّ آنها ۲۸ روز بود به محیط القای شاخه‌زایی حاوی هورمون‌های BAP با غلظت‌های ۰، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی یا در ترکیب با هورمون NAA با غلظت-های ۰، ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر منتقل نموده و نتایج زیر بدست آمد.

در این آزمایش کالوس‌های القاء شده در اثر ترکیب هورمونی 2TDZ+0/5IBA ۲۸ روز در محیط‌های القای شاخه‌زایی حاوی هورمون‌های BAP+NAA نگهداری شدند ولی هیچ اثری از باززایی در آن‌ها مشاهده نشد و فقط کالوس‌ها تغییر رنگ نشان دادند و به رنگ سبز تبدیل شدند (شکل۴A-۱۷) برای این منظور (شاخه‌زایی) بعد از ۲۸ روز واکشت به همان محیط‌ها انجام شد.

شکلA ۴-۱۷- رشد و تغییر رنگ کالوس‌ها در محیط‌های شاخه‌زایی حاوی ترکیبات هورمونی TDZ+NAA

در جنین‌زایی غیر مستقیم، جنین از بافت کالوسی که از تکثیر سلول‌های ریزنمونه تولید می‌شود، منشأ می‌گیرد. فرایند جنین‌زایی رویشی مراحل مختلفی شامل تشکیل کالوس، نمو جنین، بلوغ جنین و در نهایت تولید گیاهچه را در بر می‌گیرد. ترتیب محیط کشت‌های مورد استفاده و خصوصاً هورمون-های رشد در این فرایند اهمیّت فراوانی دارند. انتخاب محیط‌های کشت (محیط برای تولید کالوس و

محیط برای بلوغ جنین‌های سوماتیکی و نهایتاً محیط برای تبدیل این جنین‌ها به گیاه) در مواردی که جنین‌زایی سوماتیکی رخ نمی‌دهد و یا با مشکل انجام می‌شود ضروری می‌باشد.

عوامل متعدّدی بر سر راه جنین‌زایی رویشی وجود دارد که می‌توان به منبع ریزنمونه، نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد و شرایط محیطی از قبیل نور، دما و همچنین مواد موجود در محیط کشت و غیره اشاره کرد. افزودن تنظیم کننده‌های رشد بویژه اکسین و یا اکسین به همراه سیتوکنین برای شروع رشد و القاء جنین‌زایی الزامی است. از طرفی کمبود مواد غذایی در محیط کشت بدلیل رشد زیاد ریزنمونه و همچنین واکشت نکردن در زمان مناسب مانع از جنین‌زایی و نهایتاً باززایی گیاه می‌شود. همچنین منابع نیتروژن هم به آغازش جنین و هم به بلوغ جنین کمک می‌کند و از طرفی در غیاب آهن، نمو جنین از مرحله گلبولی شکل به مرحله قلبی شکل متوقف می‌شود (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۷).

از میان همه اکسین‌ها NAA و از میان سیتوکنین‌ها BAP با غلظت‌های مختلف همانطور که در آزمایشات قبلی ذکر گردید برای باززایی این گیاه دارویی مفید است. در این آزمایش با تغییر رنگ کالوس و تغییر شکل کالوس‌ها می‌توان حدس زد که جنین‌زایی صورت گرفته است ولی به دلایل ذکر شده به مراحل بعدی نمی‌روند و صلاحیت اندام‌زایی را ندارند. بدین منظور کالوس‌ها را دوباره به محیط‌های شاخه‌زایی حاوی ترکیبات BAP+NAA منتقل نموده و نتایج زیر حاصل گردید.

۴-۴-۳-۱- ترکیب‌های هورمونی BAP+NAA

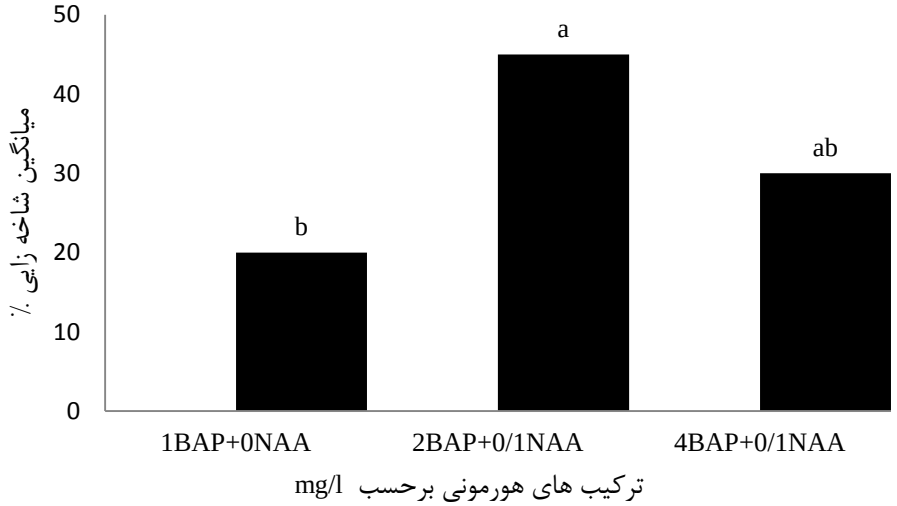
در این آزمایش از بین ۱۲ ترکیب هورمونی فقط در سه ترکیب هورمونی شاخه‌زایی صورت گرفت. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد از نظر درصد شاخه‌زایی در بین ترکیب‌های هورمونی وجود دارد (جدول ۴-۱۶).

جدول۴-۱۶- تجزیه واریانس اثر غلظتهای مختلف ترکیب دو هورمون BAP+NAA بر شاخه‌زایی کالوس‌های القاء یافته در ترکیب هورمونی 2TDZ+0/5IBA

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
ترکیب‌های هورمونی	۲	۶۳۳.۳۳ ✺
خطا	۹	۷۷.۷۷

✺معنی دار در سطح احتمال۵٪

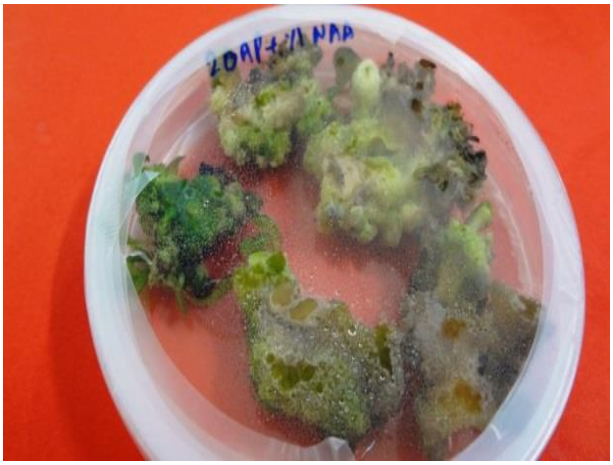
بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها مشخص شد که در ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA (شکلB ۴-۱۷) بیشترین درصد شاخه‌زایی به میزان ۴۵ درصد و کمترین شاخه‌زایی در ترکیب هورمونی 1BAP+0NAA به میزان ۲۰ درصد وجود دارد. این نتایج بیانگر این موضوع است که غلظت 0/1NAA همچنین غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP در ترکیب با هم باعث افزایش شاخه‌زایی می-شود (نمودار ۴-۱۷).



نمودار ۴-۱۷- مقایسه میانگین درصد شاخه‌زایی کالوس‌های بدست آمده از ترکیب هورمونی TDZ+NAA در محیط-های شاخه‌زایی حاوی ترکیب‌های هورمونی BAP+NAA

نکته جالب توجه این بود که این ترکیب هورمونی در آزمایشات دیگر هم بهترین درصد شاخه‌زایی را داشت. شاخه‌زایی و حتی طول شاخساره‌های بدست آمده در این آزمایش کمتر از بقیه ترکیبات

هورمونی آزمایشات شاخه‌زایی بود. این کمتر بودن شاخه‌زایی و طول شاخساره‌های ایجاد شده می-تواند به علّت محیط‌های کالوس‌زایی باشد که حاوی هورمون‌های TDZ و IBA هستند.



شکل۴B-۱۷ شاخه‌زایی کالوس‌های القاء یافته در ترکیب هورمونی 2TDZ+0/5IBA در اثر ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA

۴-۵- درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های شاخه‌زایی شده

ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در محیط درون شیشه‌ای آخرین مرحله باززایی گیاهان محسوب می‌گردد. تنظیم کننده‌های رشد برای تشکیل ریشه ضروری هستند و در این میان اکسین‌ها اهمیّت بیشتری دارند.

هدف از این آزمایش انتقال کالوس‌های شاخه‌زایی شده در اثر ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA، به محیط ریشه‌زایی به منظور یافتن هورمون اکسین مناسب و همچنین غلظت هورمونی مناسب بود. ضمناً گیاهچه‌هایی که خود به خود ریشه‌زایی انجام داده بودند به محیط‌های ریشه‌زایی منتقل نشدند (شکل ۴-۱۸ ب). به کلیّه عوامل ریشه‌زایی که در سلول‌های جوان پارانشیمی و مریستمی تشکیل و در سلول‌های دایره محیطیه ریشه ذخیره می‌شود، ریزوکالین می گویند. به

همین دلیل اصولاً ریشه‌زایی و تشکیل ریشه از دایره محیطه صورت می‌گیرد. در برخی موارد قدرت تولید ریزوکالین زیاد است و نیازی به مصرف اکسین وجود ندارد (حسندخت و ابراهیمی، ۱۳۸۵).

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در این آزمایش نشان می‌دهد که در فاکتور نوع هورمون (NAA و IBA) و غلظت‌های هورمونی (۰ و ۰/۲ و ۰/۵) بر تعداد ریشه در هر ریزنمونه در سطح احتمال ۵٪ یا ۱٪ تفاوت معنی‌داری وجود دارد. ولی در اثر متقابل بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری از نظر ریشه‌زایی وجود ندارد که دلالت بر تأثیر یکسان این فاکتور بر میزان ریشه‌زایی دارد (جدول۴-۱۷).

جدول۴-۱۷- تجزیه واریانس اثر دو هورمون NAA و IBA و غلظتهای مختلف آنها بر صفت ریشه‌زایی

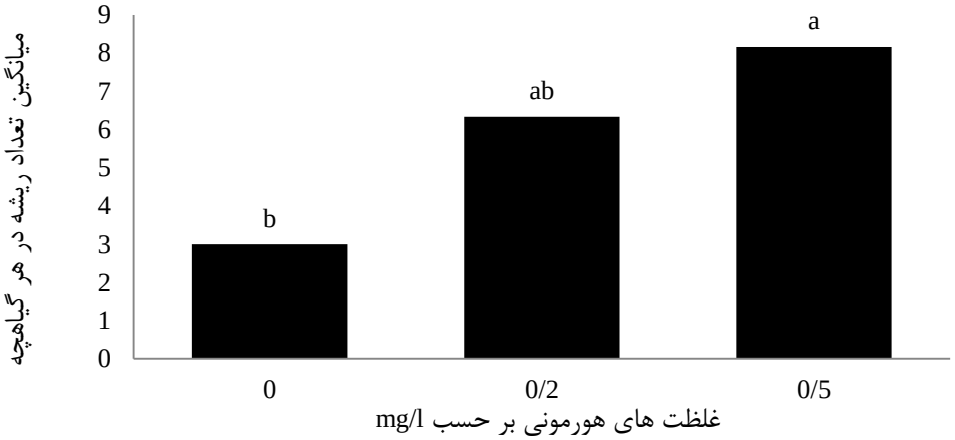
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع هورمون (A)	۱	۳۴.۷۲۲ ❁
غلظت های هورمونی (B)	۲	۴۱.۱۶۷❁❁
نوع هورمون×غلظت های هورمونی(A❁B)	۲	۵.۳۸۹ n.s
خطا	۱۲	۵.۳۸۹

❁❁، ❁ و n.s به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۱٪ و ۵٪ و غیر معنی‌دار

بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها مشخص گردید که تعداد ریشه بوجود آمده در گیاهچه در اثر هورمون NAA (۷/۲۲) بیشتر از هورمون IBA (۴/۴۴) است (شکل۴-۱۸الف).

با توجّه به مقایسه میانگین داده‌ها در اثر فاکتور غلظت‌های هورمونی مشخص شد که با افزایش غلظت هورمون‌ها مقدار ریشه‌زایی افزایش می‌یابد و بیشترین مقدار ریشه‌زایی در غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به میزان ۸/۱۶ عدد در هر ریزنمونه است (نمودار ۴-۱۸). البتّه در تحقیقاتی که به منظور ریزازدیادی در سه گونه اکیناسه صورت پذیرفت حضور اکسین حتی در مقادیر کم مانع ریشه-زایی شد که این جلوگیری از ریشه‌زایی دلالت بر مقادیر بالای اکسین درونی گیاه دارد (Lakshmanan *et al*., 2002).

نکته قابل توجّه آزمایش این بود که در تیمارهای بدون هورمون هم مقداری ریشه‌زایی (سه عدد) در هر ریزنمونه مشاهده گردید که در نهایت تبدیل به یک گیاه کامل شدند که این موضوع می‌تواند به علّت تولید جنین‌های سوماتیکی باززا شده در ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA باشد.



نمودار ۴-۱۸- مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی در اثر غلظت‌های مختلف دو هورمون NAA و IBA

در یک تحقیق که به منظور ریشه‌زایی گیاهچه‌های گیاه دارویی سرخارگل توسط هورمون IBA با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه برگ انجام شد بیشترین ریشه‌زایی در غلظت‌های بالاتر از یک میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA گزارش گردید همچنین برای ریشه‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون، هورمون IBA از دو هورمون NAA و IAA مؤثرتر است (Subbaih *et al*., 2003). از طرفی مقایسه بین سه هورمون NAA و IBA و IAA در ریشه‌زایی جنین‌های سوماتیکی تولید شده در کشت گیاه دارویی سرخارگل نشان داد که هورمون‌های NAA تأثیر بیشتری از دو هورمون دیگر در ریشه‌زایی دارد (Zobayed *et al*,. 2003). نتیجه بدست آمده در این آزمایش با نتایج این محقّق مطابقت دارد.

شکل ۴-۱۸- ریشه‌زایی در اثر هورمون NAA (الف) و ریشه‌زایی گیاهچه‌ها بدون منتقل نمودن به محیط ریشه‌زایی(ب)

البتّه باید توجّه داشت که در بسیاری از تحقیقات هورمون IBA به هورمون NAA برای ریشه-زایی گیاهچه ترجیح داده می‌شود (and Subbaih *et al*., 2003 and Zebarjadi *et al*., 2011 CHoffe *et al*., 2000a). عموماً ریشه‌زایی شاخساره‌های بوجود آمده در کشت بافت گیاهان اکیناسه در محیطهای حاوی هورمون‌های IBA و IAA به وجود می‌آید و هورمون IBA به نظر می‌رسد در ریزنمونه‌های مختلف تأثیر بیشتری در ریشه‌زایی دارد (Choffe *et al*., 2000b).

۴- ۶- عادت‌دهی[1] گیاه به شرایط گلخانه

همه گیاهچه‌های به‌دست آمده از کشت بافت، دارای کوتیکول ابتدایی و ناقص‌اند و اغلب سیستم ریشه‌ای نا مناسب دارند. ایجاد ریشه‌های مناسب در مرحله ریشه‌زایی در گیاهچه‌های باززا در موفقیت انتقال آنها به خاک موثر است ولی بیشتر گیاهچه‌های باززا شده به انتقال به خاک در شرایط گلخانه یا مزرعه حساس هستند (سیّد طباطبایی و امیدی، ۱۳۸۸).

در این تحقیق همانطور که انتظار می‌رفت گیاهچه‌ها بعد از انتقال به خاک سریع پژمرده شدند البتّه گیاهچه‌هایی که دارای شاخساره بیشتر بودند دوام بیشتری در محیط ابقاء داشتند. در مرحله اول انتقال، گیاهچه‌ها بعد از ریشه‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای به خاک منتقل گردیدند که در این بین تمامی گیاهچه‌ها از بین رفتند ولی در مرحله دوم گیاهچه‌ها به مدت یک ماه در شیشه‌ای بزرگتر

[1] Acclimation

و در محیط کشت بدون هورمون به منظور افزایش زنده ماندن نگهداری شدند و سپس به گلدان و نهایتاً گلخانه منتقل شدند. در این مرحله نیز بیشتر گیاهچه‌ها پژمرده شدند و فقط تعدادی از آن‌ها بعد از گذشت دو هفته به شرایط نرمال برگشتند. البتّه تعداد گیاهچه‌هایی که زنده ماندند بیشتر از شرایط قبلی بود (شکل۴-۱۹).

نکته: ساقه‌های گیاه پژمرده وقتی از گیاه جدا شدند دوباره از ناحیه‌ی پایین گیاه جوانه زدند و تولید ساقه و برگ کردند.

شکل۴-۱۹- گیاهچه ابقاء شده در شرایط گلخانه

در یک تحقیقی که به منظور بررسی باززایی غیر مستقیم از ریزنمونه برگ سرخارگل انجام شد مشخص شد که تیمارهای حاوی هورمون IBA به منظور ریشه‌زایی تأثیری بر ابقاء گیاهچه در شرایط گلخانه ندارد از طرفی غلظت‌های مختلف هورمون IBA باعث ریشه‌زایی متفاوتی از نظر تعداد می‌شود. در این تحقیق ثابت شد که حتّی ریشه‌زایی بیشتر هم تأثیری بر ابقاء گیاهچه در شرایط گلخانه ندارد ولی درصد زنده ماندن در شرایط گلخانه در این تحقیق در محیط بدون تنظیم کننده‌های رشد زیاد بود (Koroch *et al*., 2002).

این موضوع می‌تواند به دلایلی مختلفی همچون منبع ریزنمونه، شرایط رشدی و همچنین نوع هورمون و غلظت هورمونی باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

عکس‌العمل ریزنمونه‌ها در شرایط کشت درون شیشه‌ای بستگی به فاکتورهای متعدّدی دارد. مقادیر سطوح هورمون‌های داخلی، غلظت تنظیم کننده‌های خارجی رشد و بر همکنش اثر این تنظیم کننده‌ها همگی بر پاسخ ریزنمونه مؤثر می‌باشد. با توجّه به آزمایشات کالوس‌زایی مشخص گردید که میزان کالوس‌زایی ریزنمونه برگ در اثر ترکیبات هورمونی مختلف بیشتر از ریزنمونه دمبرگ است. این تفاوت مابین ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ در پاسخ به غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسینی و سیتوکنینی در محیط‌ها می‌تواند انعکاس تفاوت‌های ممکن سطح تنظیم کننده-های رشد در منبع ریزنمونه یا میزان حساسیت متفاوت بافت به تنظیم کننده‌های رشد گیاهی باشد. همچنین چون کالوس اساساً از محل زخم‌ها بوجود می‌آید و ایجاد زخم روی ریزنمونه‌ها موجب افزایش جذب مواد غذایی و تنظیم کننده‌های رشد شده و واکنش ریزنمونه به محیط درون شیشه‌ای را افزایش می‌دهد می‌توان حدس زد که سطوح زخمی بیشتر ایجاد شده در ریزنمونه برگ باعث افزایش مواد غذایی می‌گردد البتّه در همه مواقع بدین صورت نیست و عوامل مهمتری در این امر دخیل هستند.

عوامل مختلفی همچون شرایط رشد ریزنمونه و نوع هورمون و اثر متقابل بین آنها بر میزان کالوس‌زایی مؤثر می‌باشد. در بین هورمون‌های سیتوکنین مورد استفاده، هورمون TDZ تأثیر بیشتری از نظر میزان کالوس‌زایی در این آزمایش داشت و حتّی غلظت‌های مختلف یکی از هورمون‌های اکسینی در ترکیب با هورمون TDZ تفاوتی در تأثیر آن بر میزان کالوس‌زایی نداشت. TDZ یک هورمون دو عملکردی است یعنی هم فعالیت اکسینی و هم سیتوکنینی دارد و باعث تغییر تنظیم کننده‌های داخلی رشد گیاه و همچنین باعث واکنش‌هایی در بافت/سلول خصوصاً تقسیم/باززایی می-شود این خاصیت دو عملکردی TDZ باعث تعادل تنظیم کننده‌های داخلی رشد شده و می‌تواند باعث کالوس‌زایی و نهایتاً رشد کالوس‌ها نیز گردد.

در بین هورمون‌های اکسین، IBA تأثیر بیشتری از هورمون NAA در کالوس‌زایی در گیاه دارویی سرخارگل در این تحقیق دارد. همچنین با بررسی اثر متقابل بین ریزنمونه و هورمون‌های سیتوکنین و اکسین مشخص گردید هورمون TDZ در غلظت‌های بالا همراه با هورمون IBA بیشترین کالوس‌زایی در هر دو ریزنمونه دارد و در ترکیب‌های هورمونی TDZ+IBA بیشترین کالوس‌زایی نسبت به بقیه ترکیبات هورمونی مشاهده گردید. همچنین در ریزنمونه دمبرگ زمانی که در ترکیبات هورمونی از هورمون IBA استفاده می‌شود کالوس‌زایی افزایش می‌یابد. این مطلب بیانگر این موضوع است که هورمون IBA تأثیر مناسب‌تری در تنظیم کننده‌های داخلی رشد در جهت کالوس‌زایی در مقابل هورمون NAA به عنوان اکسین دارد. البتّه باید توجه داشت که بعضی از غلظت‌های هورمون TDZ در ترکیب با هورمون‌های IBA و NAA اثر سمّی نشان می‌دهند و باعث قهوه‌ای شدن کالوس‌ها می‌گردد.

تعادل اکسین به سیتوکین یک فاکتور مهم تعیین شکل‌زایی است. همچنین تعادل بین تنظیم کننده‌های داخلی رشد با تنظیم کننده‌های خارجی رشد باعث تعیین مسیر باززایی نیز می‌شود. در آزمایشات بررسی شاخه‌زایی خود به خود در کالوس‌ها مشخص گردید که در بین هورمون‌های سیتوکنین مورد آزمایش قرار گرفته فقط هورمون BAP باعث تولید شاخساره می‌شود و ریزنمونه‌های برگ شاخه‌زایی بیشتری انجام می‌دهند که این موضوع می‌تواند به علّت تولید جنین‌های سوماتیکی بیشتر در اثر این هورمون در ریزنمونه برگ بیان کرد. نکته مورد توجّه در این آزمایشات این بود که در ریزنمونه دمبرگ وقتی از IBA به عنوان اکسین در ترکیب هورمونی استفاده می‌شود شاخه‌زایی افزایش می‌یابد. این مطلب بیانگر این موضوع است که هورمون IBA در ریزنمونه دمبرگ باعث تعادل ویژه هورمونی جهت شاخه‌زایی می‌گردد.

در آزمایشات شاخه‌زایی که تمامی کالوس‌های القاء یافته به محیط شاخه‌زایی حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP منتقل شدند ریزنمونه برگ شاخه‌زایی بیشتری نشان دادند و در بین

سیتوکنین‌ها، هورمون BAP و سپس KIN و نهایتاً هورمون TDZ و در بین اکسین‌ها هورمون NAA تأثیر بیشتری در شاخه‌زایی داشتند و مشخص گردید که در کالوس‌های تولید شده در اثر ترکیب TDZ همراه با هورمون IBA تأثیر بیشتری از ترکیب TDZ همراه با هورمون NAA دارد. این مطلب بیانگر این موضوع است که اثر متقابل بین TDZ و NAA با یکدیگر در شاخه‌زایی تأثیر کمتری دارد. همچنین در این آزمایشات مشخص گردید که در ریزنمونه دمبرگ وقتی که در ترکیبات هورمونی هورمون IBA به کار برده می‌شود شاخساره بیشتری تولید می‌شود.

در آزمایشات شاخه‌زایی که محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلفی از هورمون‌های BAP و یا TDZ به عنوان سیتوکنین و NAA به عنوان اکسین بود مشخص گردید که در بین دو هورمون TDZ و BAP به عنوان سیتوکنین هورمون BAP تأثیر خیلی زیادتری در شاخه‌زایی دارد. همچنین غلظت‌های مختلف هورمون NAA به عنوان اکسین در شاخه‌زایی نیز خیلی مؤثر است. با توجّه به نتایج این آزمایش و نتایج محقّقین دیگر می‌توان به تأثیر فراوان هورمون BAP در باززایی این گیاه دارویی اشاره کرد.

در آزمایشات شاخه‌زایی کالوس‌های القاء یافته در ترکیب هورمونی 2TDZ+0/5IBA، زمانی که به محیط‌های شاخه‌زایی حاوی هورمون‌های BAP و NAA منتقل شدند در ابتدا هیچ‌گونه شاخه‌زایی مشاهده نگردید ولی بعد از واکشت کردن ریزنمونه‌ها، در بعضی از ترکیبات هورمونی شاخه‌زایی مشاهده گردید. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که سنّ کمتر کالوس‌ها در این آزمایش نسبت به آزمایشات قبلی و همچنین واکشت کردن کالوس‌ها به محیط جدید می‌تواند تأثیر زیادی در شاخه‌زایی داشته باشد.

نتایج آزمایشات محققین دیگر برای ریشه‌زایی گیاهچه‌ها با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف و اکسین‌های مختلف بیانگر این موضوع بود که هورمون NAA اثر کمتری نسبت به IBA در ریشه‌زایی دارد ولی در این آزمایش تأثیر این هورمون از هورمون IBA بیشتر

بود که این می‌تواند به علّت استفاده همین هورمون در مراحل اولیه مثل تولید کالوس و باززایی و همچنین تغییر سطوح هورمون‌های داخلی توسط این هورمون به منظور ریشه‌زایی باشد.

با توجّه به مطالب بالا منطقی است نتیجه بگیریم که راندمان‌های متفاوتی از ریزنمونه‌ها در پاسخ به ترکیبات اکسینی و سیتوکنین باعث منعکس کردن وضعیت‌های متفاوتی از شایستگی یا صلاحیت شکل‌زایی سلول‌ها در ریزنمونه‌های دمبرگ، برگ یا کالوس‌های این دو ریزنمونه می‌شود.

نکته مورد توجّه این تحقیق این بود که کالوس‌های ریزنمونه‌ی برگ القاء شده در ترکیب هورمونی 2BAP+0/1NAA بدون انتقال به محیط شاخه‌زایی و ریشه‌زایی تبدیل به یک گیاه باززا شدند که می‌توان حدس زد که در کالوس‌های این ترکیب هورمونی جنین-های سوماتیکی فراوانی نسبت به ترکیبات هورمونی دیگر به‌وجود آمده است و جنین‌های سوماتیکی تولید شده در اثر این ترکیب هورمونی صلاحیت باززایی را دارند. این نتایج شاید به علّت تغییر در سطح داخلی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در بافت‌های کشت شده در تاریکی باشد و یا شاید به علّت تغییر حساسیت بافت ریزنمونه‌ها در مقابل تنظیم کننده-های داخلی رشد در تاریکی باشد.

یکی از عوامل جلوگیری کننده استعمال وسیع جنین‌های سوماتیکی در تکثیر گیاهان، جوانه‌زنی کم و قدرت زنده ماندن کم در طی عادت‌دهی است که در این تحقیق هم مقدار زیادی از گیاهچه‌ها از بین رفتند که می‌توان این نتایج را به قدرت زنده ماندن کم گیاهچه‌های بدست‌آمده از جنین‌های سوماتیکی نسبت داد.

پیشنهادات

۱) انتخاب ریز نمونه مناسب و سنّ ریزنمونه از مهمترین مسائلی است که در کشت بافت باید مدّ نظر قرار گیرد. به همین منظور استفاده از گیاهچه‌ها با سنین مختلف همچنین استفاده از ریزنمونه‌های دیگر همچون ریشه و دمبرگ در مرحله شاخه‌زایی برای آزمایشات بعدی پیشنهاد می‌شود.

۲) انجام واکشت و تهیه‌ی کالوس تازه در جوان ماندن کالوس و افزایش جنین‌زایی نیز مؤثر است لذا بایستی سعی گردد در زمان مناسب واکشت صورت گیرد.

۳) استفاده از دیگر محیط‌های کشت و تیمارهای هورمونی جدید برای تحقیقات بعدی پیشنهاد می‌شود.

۴) با مطالعات بافت‌شناسی، جنین‌زایی سوماتیکی و مراحل مختلف آن و همچنین تأثیر تنظیم کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه بر تولید جنین مورد ارزیابی و بررسی قرار گیرد.

۵) افزایش رطوبت گلخانه، کاهش نور در مرحله عادت‌دهی همچنین کاهش میزان ساکارز محیط کشت در اواخر دوره کشت آزمایشگاهی به دلیل بهبود فعالیت فتوسنتزی گیاهچه باززا شده برای افزایش قدرت زنده ماندن گیاهچه‌ها در هنگام انتقال به خاک پیشنهاد می‌شود.

فهرست منابع

امید بیگی، ر. ۱۳۸۹. تولید و فراوری گیاهان دارویی، **انتشارات آستان قدس رضوی**. ۴۲۳ صفحه

باقری، ع. مشتاقی، ن و شریفی، الف. ۱۳۸۶. بیوتکنولوژی گیاهی، **انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد**. ۲۳۵ صفحه

شریفی، الف. مشتاقی، ن و باقری، ع. ۱۳۸۹. کشت بافت گیاهی کاربردی. **گروه پزوهشی کشت بافت و ازدیاد گیاهان جهاد دانشگاهی واحد مشهد**. ۴۷۹ صفحه

سید طباطبایی، ب. امیدی، م. ۱۳۸۸. کشت بافت و سلول گیاهی، **انتشارات دانشگاه تهران**. ۳۶۸ صفحه

فارسی، م و ذوالعلی، ج. ۱۳۸۷. اصول بیوتکنولوژی گیاهی، **انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد**. ۴۹۵ صفحه

حسندخت، م و ابراهیمی، ر. ۱۳۸۵. مبانی کشت بافت گیاهی. **انتشارات مرز دانش**. ۳۲۸ صفحه

Abbasi B, Saxena PK, Murch SJ, Liu CZ (2007). **Echinacea biotechnology:Challenges and opportunities**. *In Vitro Cell Development Biology* **43**: 481-492.

Ammirato, P. V. (1983.) **Embryogenesis**. *Handbook of plant cell culture I. MacMillan, New York, USA*, 82–123.

Annadana, S., Radamaker, W., Rammana, M., Udayakumar, M. and de Jong, J.(2000). **Response of stem explants to screening and explant source as a basis for methodical advancing regeneration protocols for hrysanthemum.** *Plant Cell Tissue Organ Cult.***62**:47–55.

Afreen, F. Zobayed, S. M. A. Kozai, T.(2002). **Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: development of a bioreactor for the large scale plantlet conversion from cotyledonary embryos.** *Ann. Bot.* **90**:21–29.

Ahmad. Kh. Zafar, z. Javed I. Mirza. (2010). **Effect Of Expelant Type And Plant Growth Regularor On The micropropagation Of *Echinacea Purpurea L.*** *Plant Biotechnology*. Oral Session 30

Akerele, O. (1992). **WHO guidelines for the assessment of herbal medicine**. *Fitoterapia* **62**(2):99–110.

Barrett, B. (2003). **Medicinal properties of Echinacea**: *acritical review.Phytomedicine*, **10**: 66-86.

Basu, P., and S. Chand. (1996). **Regeneration of plantlets from root-derived callus of Egyptian Henbane**. *Cell Chromosome Research* **19**:31-34.

Bhatti, S. M., Myles, E. L., Long, D. E., Sauve, R. (2002). **In vitro regeneration of St. Johns wort and coneflowers**. *SNA Research Conference*, **47**:340–342.

Bauer, R. and Remiger, P. (1989). **TLC and HPLC analysis of alkylamides in Echinacea druges**. *Planta Medica*, **55**: 367-371.

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.

Bernath, J. and Nemeth, E. (1989). **Traditions and contemporary efforts in developing the medicinial and aromatic plant sector of hungray**. *Hungarian Agric*. Res. **3**:20- 25

Bernath, J. (2000). **Medicinal and aromatic plant. (in Hungarian).** *Mezzo. Publ. Budapest***, pp. 667.**

Bernath, J. (1993). **Wild and cultivated medicinal plants. (in Hungarian).** *Mezzo. Publ. Budapest*, pp. 556.

Bilal Haider Abbasi & Praveen K. Saxena & Susan J. Murch & Chun-Zhao Liu (2007) . **Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities**. *In Vitro Cell.Dev.Biol-Plant* **43**:481

Bilal Haider Abbasi, Amir Zeb, L. L. Xu, Y. H. Wei.(2011). **Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator**. *African Journal of Biotechnology* Vol. **10**(45), pp. 8984-9000.

Bishnoi, U. R. Willis, J.E. and S Rao Mentreddy. (2010). Methods to improve seed germination of purple coneflower (Echinacea purpurea (L.) Moench). **Agriculture And Biology Journal Of North America**.

Blumenthal, M. (2003). **The ABC Clinical Guide to Herbs.** *American Botanical Council. Thieme, New York, ISBN* 1-58890-157-2.

Butenko. (1968). **Plant tissue culture and plant morphogenesis**. *Israel Program for Scientific Translations. Jerusalem*:1-291.

Chang, W. D. Gau, T. G. Chang, D. D.; Chern, Y. C. Chen, C. C. Yeh, F. T. Chang, Y. S. Hsieh, M. T.; Chu, N. Y.; Tsay, H. S. (1992). **Rapid clonal propagation and production of useful compounds of Chinese medicinal herbs by tissue and cell suspension culture.** *Proc. of The Sabrao International Symposium, National Chung-Hsin Univ. Taichung, Taiwan* :207–211.

Chawla, H. S.(2000). **Introduction to plant biotechnology**. *International Book Distributing, Lucknow, India*, pp 39–56.

Choffe, K.L., Murch S.J. and Saxena, P. K. (2000a). **Regeneration of *Echinacea purpurea*: induction of root organogenesis from hypocotyls and cotyledon explants**. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. **62**:227–234.

Choffe, K. L., Victor, R. M. J., Murch, S. J. and Saxena, P. K. (2000b). **In vitro regeneration of *Echinacea purpurea* L.: direct somatic embryogenesis and indirect shoot organogenesis in petiole culture**. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. **36**:30–36.

Constabel, F. (1990). **Medicinal plant biotechnology**. *Planta Med*. **56**:421–425.

Consumer Reports (2000). **The Mainstreaming of Alternative Medicine**.*Yonkers, New York*. 17–25.

Croke, J. T. Cassells, A. C.(1997). **Dark induction and genetic stability of somatic embryos of *zonal geraniums* (Pelargonium £ hortorum Baily).** *J. Appl. Bot.-Angewandte Botanik* **71**:119–124.

Cunningham, A. B. (1993).**African medicinal plants: setting priorities at the interface between conservation and primary health care.** *People and plant initiative working paper*

Coker, P. S.; Camper, N. D.(2000). **In vitro culture of *Echinacea purpurea L.*** *J. Herbs Spices Med. Plants* **7**:1–7.

Dahanayake, N. Xiao-Lu Chen , Fu-Cheng Zhao, Yue-Sheng Yang, Hong Wu, (2010). **An efficient in vitro propagation system for purpule cone-flower(*Echiniacea purpurea* l.),** *Trophcal Agriculture Research & Extension:* **13**(2)

Del-Poza Jc, Lopez-Matas MA, Ramirez-Parra E, Gutierrez C (2005). **Hormonal control of the plant cell cycle**. *Physiologia Plantarum* **123**: 173-183.

Galambosi, B. Palevitch, D. Simon and Mathe, A. (1992). **Introduction of *Echinacea purpurea* and leuzea carthamoides into cultivation in finaland**. *Acta Horticultua*, **331**: 169-178

Galambosi, B. (2004). **Cultivation in Europe. In: S Miller (ed)Echinacea. The genus Echinacea**. *CRC Press, Boca Raton, FL*, pp 29–52.

Gallo, M. Green, J.(2002). **Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscapeand medicinal plant**. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*. **68**:253–256.

Gockel, C. Wawrosch, C. H. Leonhardt, W. and Kopp, B. (1992). **Micropropagation of *Echinacea angustiofolia*.** *Planta Med*. **58**:626–629.

Gomez Galera S, Pelacho AM and Gene A (2007) .**The genetic manipulation of medicinal**

and aromatic plants. *Plant Cell Reports.* **26**: 1689-1715.

Guillon, S., Tremouillaux-Guiller, J., Pati, P. K., Rideau, M. and Gantet, P.(2006) **Hairy root research: recent scenario and exciting prospects**. *Curr Opin Plant Biol*. **9**:341–346.

Harbage, J. F. (2001). **Micropropagation of *Echinacea angustifolia, E. pallida*, and *E. purpurea* from stem and seed explants**. *Hortic Sci*. **36**:360–364.

Hicks, G. S. (1994). **Shoot induction and organogenesis in vitro: a developmental perspective**. *In vitro Cell Dev Biol Plant*. **30**:10–15.

Hobbs, C. R. (1994). **Echinacea**. *A literature review*. *Herbalgarm*, **30**:33-49.

Hoareau, L.; DaSilva E. (1999). **Medicinal plants: a re-emerging health aid**. *EJB Electronic J. Biotech.* **2**:56–70

Hobbs, C. R.(1998). The Echinacea handbook. Botanica, Capitola, CA. Hu, C. and Kitts, D. (2000). Studies on the antioxidant activity of Echinacea root extract. **J Agric Food Chem.**48:1466–1472.

Hsia, C. Korban, S. S.(1998). **Effect of growth regulators, dark treatment and light intensity on shoot organogenesis from leaf tissues of evergreen azalea.** *J. Hort. Sci. Biotechnol*. **73**:53–60.

Hutchinson, M. J. Sanaratna, T. Sahi, S. V. Saxena, P. K.(2000). **Light mediates endogenous plant growth substances in thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures.** *J. Plant Biochem. Biotechnol*. **9**: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.

Jong Se Kim, Sook Young Lee, Seok Hyun Eom and Sang Un Park (2010). **Improved shoot organogenesis and plant regeneration of *Echinacea angustifolia DC***. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. **4**(7): 587-591

Khibas, J. S.(1995). **Somaclonal variation in Rudbekia**. *Dirasat B Pure Appl Sci*.**22**:171–181.

Kristen L. Choffe, Susan J. Murch & Praveen K. Saxena (2000). **Regeneration of *Echinacea purpurea*: Induction of root organogenesis from hypocotyl and cotyledon explants**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **62**: 227–234

Koroch, A., J. Kapteyn, H.R. Juliani, and J.E. Simon. (2002). **In vitro regeneration and *Agrobacterium* transformation of *Echinacea purpurea* leaf explants. J. Janick and A. Whipkey (eds.), Trends in new crops and new uses.** *ASHS Press, Alexandria, VA.* p. 522–526.

Koroch, A. Juliani, HR. Kapteyn, J. and Simon JE (2002). **In vitro regeneration of *Ec hinacea purpurea* from leaf explants**. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. **69**: 79-83.

Koroch, A., Kapetyn, J., Juliana, H. R., Simon, J. E. (2003). **In vitro regeneration of *Echinacea pallida* from leaf explants.** *In Vitro Cell. Dev Biol Plant*. **39**:415–418.

Kristen L. Choffe, jerrin, M. R. Susan J. Murch & Praveen K. Saxena(2000a). **In Vitro regeneration Of *Echinacea purpurea* L. Direct Somatic Embryogenesis And Indirected Shoot Organogenesis In Petiol Culture**. *In Vitro Cell. Dev. Biol.ÐPlant* **36**:30±36.

Kumar, V., Gururaj, H. B., Prasad, N., Giridhar, P. and Ravishankar, G. A.(2005). **Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedlling explants of Capsicum annuum L**. *Sci Hortic*.**106**:237–246.

Khawar, K. M., Sarihan, E., Sevimay, C., Cocu, S., Parmaksiz, I., Uranbey, S., Ipek, A., Kaya, M. D., Sancak, C., Özcan, S. (2005). **Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata L*.** *Period Biol*., **107**: 113–116.

Lata, H. Li, X. C. Silva, B. Moraes, R. M. and Halda-Alija, L. (2006). **Identification of IAA producing entophytic bacteria from micropropagated Echinacea plants using 16S rRNA sequencing**. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. **85**:353–359.

Lakshmanan, P., Danesh, M. and Taji, A.(2002). **Production of four commercially cultivated Echinacea species by different methods of in vitro regeneration**. *J. Hortic. Sci Biotechnol*. **77**:158–163.

Laughlin JC & Munro D (1982). **The effect of fungal colonization on the morphine production of poppy *Papaver somniferum* L. capsules**. *J. Agric. Sci.* **98**: 679–686.

Leena Tripathi and Jaindra Nath Tripathi.(2003). **Role of biotechnology in medicinal plants .***Tropical Journal of Pharmaceutical Research;* **2** (2): 243-253

Li, T.S.C. (1998). **Echinacea cultivation and medicinal value**. *HorTecchnol*. **8**: 122-129.

Lisowska, K & Wysokinska, H. (2000**). In vitro propagation of Catalpa ovate.** *Plant Cell Tiss. Org*. **60**: 171–176

Lu, C.Y.(1993). **The use of thidiazuron in tissue culture. In Vitro Cell**. *Dev. Biol. Plant* **29**:92-96

Lucchesini, M. Bertoli, A. Mensuali-Sodi, A. Pistelli, L.(2009). **Establishment of in vitro tissue cultures from *Echinacea angustifolia D.C.* adult plants for the production of phytochemical compounds**. *Scientia Horticulturae.* **122**: 484–490.

Maxwell P. A. Jones . Zhijun Yi ,Susan J. Murch ,Praveen K. Saxena ,(2007). **Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea L.*: Micropropagation in solid and liquid culture systems**. *Plant Cell Rep.* **26**: 13–19

Mantell, S., and S. Hugo. (1989). **Effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and D. bulbifera L. yams**. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. **16**:23-37.

McGregor, R. L(1968). **The taxonomy of the genus Echinacea (Compositae).** *Univ Kans Sci Bull***. 48**(4):113–142.

Mechanda, S. M., B. R. Baum, D. A. Johnson and J. T. Arnason, (2003). **Direct shoot regeneration from leaf segments of mature plants of *Echinacea purpurea* (L.) Moench**. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* **39**:505–509.

Melachart, D; Walther, E. and Linde, K. (1998). **Echinacea root extracts for upper respiratory tract infection. A double-bind, placebocontrolled trial**. *Aech, fan. Med.* **7**:541-545.

Miller, S. C. (2005). **Echinacea, the genus Echinacea**. *CRC Press, London*, PP. 271.

Miura, Y. Fukui, H.; Tabata, M. (1987) .**Clonal propagation of chemically uniform fennel plants through somatic embryoids**. *Planta Med***. 53**:92–94;

Miller, A.(2000). **technical crop report. Richters: The herb specialists.** *Goodwood, ON, Canada*, pp 1–17.

Mithila, J., Murch, S.J., KrishnaRaj S. and Saxena, P. K.(2001). **Recent advances in Pelargonium in vitro regeneration systems**. *Plant Cell Tissue Organ Cult*.**67**:1–9.

Moemen Hanafy, Usama I. Aly and Mohamed A. Matter.(2010). **Regeneration and Tr ansformation via Agrobacterium tumefaciens of *Echinacea purpurea L*.** *Plant Tissue Cult. & Biotech.* **20**(2): 101-111.

Montagne, J.F.C., (1837). **Centurie de plantes cellulaires exotiques nouvelles**. *Annales des Sciences Naturelles. (a) Botanique.* **8**: 345-370

Mulabagal, V., and H.S. Tsay. (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. Skoog, F.(1962**). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. *Physiol. Plant***. 15**:473–497.

Murch, S. J., Peiris, S. E., Shi, W. L., Zobayed, S. M. A. and Saxena, P. K. (2006). **Genetic diversity in seed populations of *Echinacea purpurea* controls the capacity for regeneration, route of morphogenesis and phytochemical composition**. *Plant Cell Rep*. **25**:522–532.

Murch SJ, Krishna Raj S and PK Saxena (2000). **Phytopharmaceuticals: Problems, limitations and solutions**. *Scientific Review of Alternate Medicine*. **4**: 33–38.

Murthy BNS, Murch SJ & 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

Murthy, B. N. S.; Murch, S. J.; Saxena, P. K.(1998). **Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis**. *In Vitro Cell. Dev. Biol.ÐPlant* **34**:267±275.

Perry, B., Burges, E. and Glennie, V. (2001). **Echinacea standardization: analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species**. *J Agric Food Chem***. 49**:1702–1706.

Perry, N. B; Anderson, R; Burgess, E.J; Follet, J.M; Martin, D. and sallfield, B.M. (2002). **Echinacea purpureaP: variation in yield and quality between plant parts, harvest dates and sites.** *Crop and food Research, New Zaland***.**

Penna S, Sági L and Swennen R (2002). **Positive selectable marker genes for routine lant transformation.** *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*. **38**: 125-128.

Sauve, R. J., Mmbaga, M.T. and Zhou, S. (2004). **In Vitro regeneration of the Tennessee coneflower (*Echinacea tennesseensis*)**. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*.**40**:325–328.

Sajc, L. Grubisic, D. Vunjak-Novakovic, G. (2000). **Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research.** *Biochem. Engng J.* **4**:89–99.

Satheesh, K., and Bhavanandan K.V. (1988). **Micropropagation of Plumbago rosea Linn**. *Plant Cell Tissue Organ Culture.* **15**:275-8.

Shasany, A.K., S.P.S. Khanuja, S. Dhawan, U. Yadav, S. Sharma, S. Kumar, and J. Biosci. (1998). **High regenerative nature of Mentha arvensis internodes**. *Journal Bioscience*. **23**:641-6.

Shimomura, K. Yoshimatsu, K. Jaziri, M. Ishimaru, K. (1997). **Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity.** *Austin, TX: R. G. Landes Company and Academic Press.* 209–225.

Seemannova, Z; Mistrikova, I. and Vaverkova, S. (2006). **Effect of growing methods and plant age on the yield and on the content of flavonoied and phenolic acids in *Echinacea purpurea* L.** *Plant soil Environ*. **52**: 449-453.

Skoog F, Miller (1957). **Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro**. *Symp. Soc. Exp. Biol*. **11**:118-131.

Skirvin et al. (1986). *Plant Cell Rep*. **5**:292-294.

Speroni, E., Covoni, P., Guizzardi, S., Renzulli, C. and Guerra, M. C. (2002). **Anti-inflammatory and cicatrizing activity of *Echinacea.pallida*.** *J. Ethnopharmacol*.**79**:265–272.

Srivastava, J. Lambert, J. Vietmeyer, N.(1995). **Medicinal plants: an expanding role in development. World Bank technical paper no. 320. Washington, DC:** *World Bank Agriculture and Forestry Systems.*

Steward, F. C.; Mapes, M. O.; Kent, A. E.; Holsten, R. D. (1964). **Growth and development of cultured plant cells. Biochemical and morphogenic studies with cells yield new evidence on their metabolism and totipotency**. *Science* **143**:20±27.

Subbaih, M. Mechanda. Bernard R. Baum. Douglas A. Johnson and Hohn T. Arnason. (2003). **Directed Shoot Regeneration From Leaf Segments Of Mature Plants Of *Echinacea Purpurea L***. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* **39**:505–509

Susan J. Murch. Sriyani E. Peiris. Wendy L. Shi. S. M. A. Zobayed. Praveen K.Saxena (2006). **Genetic diversity in seed populations of *Echinacea purpurea* controls the capacity for regeneration, route of morphogenesis and phytochemical composition**. *Plant Cell Rep* **25**: 522–532.

Taha.h s. I. Lashin, A. M. Sharaf , I. Farghal and M. K. E- Bahr (2010). **In vitro studies and RAPD analysis of *Echinacea angustifolia*.** *Journal of American Science*. **6**(10).

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

Torres, K. (1989). **Tissue culture for horticulture crop**. Published by Van Nostrand Reinhold .New Yourk.

Vieira, R. F.; Skorupa, L. A. (1993). **Brazilian medicinal plants gene bank**. *Acta Hort.* **330**:51–58.

Wang TL, Everett NP, Gould AR, Street HP (1981**). Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells. The effects of cytokinin.** *Protoplasma* **106**: 23-35.

Wagner, H. faransworrth, N. R. (1991). **Economic and medicinal plant research**. *Academic press, London*. Vol. 5

Wang, H. M. and To, K. Y. (2004). **Agrobacterium-mediated transformation in the high value medicinal plant *Echinacea purpurea***. *Plant Sci*. **166**:1087–1096.

Wang B, Zhang G. Zhu, Chen L and Zhang Y (2006). **Genetic transformation of *Echi nacea purpurea* with Agrobacterium rhizogenes and bioactive ingredient a nalysis in transformed cultures.** *B: Biointerfaces*. **53**(1):101-104.

Wen, K. C. (2000). **The turnover rate of marker constituents in Chinese herbal medicine.** *J. Food Drug Analysis.* **8**:270–277.

Yamasaki, H. and Osuga, G. (1960). **Studies on the propagation of Gelidiaceus algae on the ratio of cystocarposporophyte to tetrasporophyte in Gelidium mansii on the artificial, stone bed**. *Bull. The Japanese Society of Fish*. **26**: 9-12

Yaseen Khan, M., S. Aliabbas, V Kumar and S. Rajkumar, (2009). **Recent advances in medicinal plant biotechnology**. *Indian J. Biotechnol*. **8**: 9-22.

Yoshida et al. (1973). **Plant Cell Physiol**. 14:329-339.

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.

Zebarjadi, A. R. Motamedi, j. and Ismaili, A. (2011). **Indirect Shoot Regeneration Of Iranian Purple Coneflower (*Echinacea Purpurea*) From Cotyledon And Hypocotyl Explants**. *Acta Agronomica Hungarica*. 59**(1)**: 65-72

Zhao, F.-C., Nilanthi, D., Yang, Y-S. and Wu, H. (2006). **Anther culture and haploid plant regeneration in purple coneflower (*Echinacea purpurea*)**. *Plant Cell Tissue Organ Cult*.**86**:55–62.

Abstract:

For optimization of tissue culture of *Echinacea Purpurea* medicinal plant, this study experiments was carried out as a factorial arrangement in a completely randomized design. In the first experiment, the effect of different concentrations of cytokinin hormones include 6-benzylaminopurine (BAP) and Thidiazuron (TDZ) and kinetin (KIN) alone or in combination with different concentrations of auxin hormones include indole-3-butyric acid (IBA) and naphthaleneacetic acid (NAA) in callus induction in leaf and petiol explants evaluated on basal MS medium. The results showed that the highest percentage callogenesis (100%) obtained in combinations include TDZ and IBA hormones. In the second experiment, the effect of 2 mg/L BAP hormone in shoot organogenesis in callus of leaf and petiol explant evaluated. Higher rates (92/85%) of shoot organogenesis were observed on MS medium supplemented with NAA and BAP from leaf explant. In the third experiment, the effect of different concentrations 6-benzyl amino purine (BAP) and Thidiazuron (TDZ) Hormones alone or in combination with different concentrations of naphthaleneacetic acid (NAA) in shoot organogenesis in leaf explant evaluated. Higher rates (85%) of shoot organogenesis were observed with 2 mg/l BAP & 0.1 mg/l NAA combination. In the fourth experiment plantlets from hormone combination included 2 mg/l BAP & 0.1 mg/l NAA transferred to MS medium supplemented with NAA and IBA. Highest number root per explant (8/16) was achieved using MS media supplemented with 0/5 mg/l NAA.

Key Words*: Echinacea Purpurea,* callogenesis, regeneration, rooting, Plant growth regulators

Shahrood University

Faculty of Agriculture and plant breeding – Biotechnology

Effect of plant growth regulators and type of explant on callogenesis and in vitro regeneration of *Echinacea purpurea*

Asghar Arab asadi

Supervisors:

Shahrokh gharanjik

Mohammad reza Amerian

September, 2013